



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

**EXPLORACIÓN DEL USO DE MICROSCOPIA DE TIEMPO DE VIDA DE
FLUORESCENCIA PARA LA COLOCALIZACIÓN DE FLUORÓFOROS
NATIVOS EN CÉLULAS *IN VIVO***

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

Q. MARIO GONZÁLEZ GUTIÉRREZ

DR. JORGE PEÓN PERALTA
INSTITUTO DE QUÍMICA

CDMX, NOVIEMBRE DE 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS
QUÍMICAS**

**EXPLORACIÓN DEL USO DE MICROSCOPIA DE TIEMPO DE VIDA DE
FLUORESCENCIA PARA LA COLOCALIZACIÓN DE FLUORÓFOROS
NATIVOS EN CÉLULAS *IN VIVO***

**PROYECTO DE INVESTIGACIÓN
PARA OPTAR POR EL GRADO DE**

MAESTRO EN CIENCIAS

P R E S E N T A

Q. MARIO GONZÁLEZ GUTIÉRREZ



Ciudad de México, 2019.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Jorge Peón Peralta por su confianza y paciencia. Confianza al dejarme a cargo de este proyecto y paciencia con la entrega de cada uno de los resultados, sus comentarios y sugerencias a lo largo del desarrollo de esta investigación.

Al Dr. Rafael Eduardo López Arteaga, por su impulso en el camino de la microscopía de tiempo de vida de fluorescencia, por actuar como un mentor y un hermano en el Instituto de Química.

A los miembros del jurado: Dra. Liliana Quintanar Vera, Dra. Daniela Araiza Olivera Toro, Dr. Armando Hernández García, Dr. Miguel Tapia Rodríguez y Dr. Arturo Jiménez Sánchez. Por su apoyo, paciencia y sus estimulantes comentarios.

A mis compañeros del Laboratorio de Espectroscopía Láser: Andrea, Óscar, Mariana, Jesús, Bernardo, Denhy; Amigos: Bety, Adrián, Pablo; muchas gracias por la buena compañía en este otro capítulo.

A mi familia por todo el apoyo que me han dado, por los consejos del abuelo, por las sugerencias de mis padres, por los retos, desafíos y provocaciones de mi hermano, por los exhortos (gritos) de mi madre. Por el apoyo incondicional de Circe que siempre me motivó para no rendirme. Todo ello enriqueció no sólo mi trabajo, sino mi persona. Gracias.

A CONACYT por el apoyo de financiamiento al proyecto Fronteras de la Ciencia 179. Por la beca otorgada (629331)

A DGAPA por el proyecto IN208618

Este trabajo fue presentado en los siguientes congresos:

1. Colloquium Spectroscopicum Internationale XLI/Latin American Meeting on LIBS. México, 2019.
2. Berkeley Global Science Institute. Química y Materiales en el Siglo XXI. Fututre of Science. México, 2019.

Contenido

| | |
|---|----|
| 1. INTRODUCCIÓN..... | 1 |
| 2. OBJETIVOS..... | 3 |
| 2.1 Objetivo general..... | 3 |
| 2.2 Objetivos particulares | 3 |
| 3. ANTECEDENTES..... | 4 |
| 3.1 Conceptos básicos de fotofísica | 4 |
| 3.2 Cronometraje de Arribo de Fotones Individuales..... | 5 |
| 3.3 Microscopía Confocal de Fluorescencia | 8 |
| 3.4 Microscopía de Tiempo de Vida de Fluorescencia | 9 |
| 4. METODOLOGÍA..... | 11 |
| 5. RESULTADOS | 12 |
| 5.1 Características fotofísicas de cromóforos nativos de la célula..... | 12 |
| 5.2 Sistema de Microscopía de Tiempo de Vida de Fluorescencia | 14 |
| 5.3 Medición del tiempo de vida de fluorescencia de MitoTracker®..... | 16 |
| 5.4 Experimentos de colocalización de NADH y FAD..... | 17 |
| 6. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS | 23 |
| 7. REFERENCIAS | 24 |

1. INTRODUCCIÓN

“Puedes observar mucho con tan sólo ver”
—Lawrence Peter “Yogi” Berra.

La microscopía óptica es una técnica que aprovecha la luz para resolver objetos a escalas de micrómetros. Con ésta ha sido posible visualizar estructuras celulares y subcelulares¹. Además, ha permitido el entendimiento de la dinámica bioquímica dentro de las células. Sin embargo, muchas de las técnicas de microscopía desarrolladas hasta la actualidad no han sido capaces de medir en células vivas los cambios inducidos por el propio metabolismo de la célula, por lo que históricamente se ha optado por técnicas bioquímicas que pierden contexto estructural y temporal².

El uso de agentes externos como sondas de monitoreo puede comprometer los resultados observados ya que, al introducirse al ambiente celular, se genera una respuesta derivada del proceso de homeostasis³. Es preferible, por tanto, usar sustancias nativas de las células como sondas.^{4,45,46}

En esta investigación, se presenta un sistema de microscopía de tiempo de vida de fluorescencia (*Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy*, FLIM por sus siglas en inglés) para estudios estructurales con base en la *colocalización* del dinucleótido reducido de Adenina y Nicotinamida (NADH) y el dinucleótido oxidado de Adenina y Flavina (FAD), ambos nativos de la célula. Estas moléculas participan como coenzimas en diversas reacciones metabólicas y están localizados mayoritariamente en las mitocondrias de las células^{3,5}. Esta técnica es una combinación de la microscopía confocal de fluorescencia, con un sistema de detección que permite hacer mediciones de fluorescencia resuelta en tiempo como puede ser el Cronometraje de Arribo de Fotones Individuales* (*Single-Photon Timing*, SPT, por sus siglas en inglés)⁷⁻¹¹.

El tiempo de vida de fluorescencia de un fluoróforo es una propiedad fisicoquímica que no depende de la concentración de éste; sin embargo, es afectada por el microambiente en el que se encuentre el cromóforo fluorescente¹⁰. Por lo que permite establecer un mapa de tiempos de vida cuya información incluya el contexto estructural dentro de las células^{2,11}.

Hasta donde se sabe, esta técnica no se ha utilizado específicamente para hacer estudios de *colocalización* con estas dos moléculas, pues existe una enorme variedad de cromóforos fluorescentes exógenos con alta afinidad para varias estructuras sub celulares. Por ejemplo, la familia de pigmentos MitoTracker®.⁴⁵

* En 2007, la UIQPA publicó un reporte técnico⁶ en el que indica que, a pesar de que históricamente la técnica se conoce como “conteo de fotones individuales correlacionados en tiempo” (TCSPC, por sus siglas en inglés), la versión correcta debe ser “cronometraje” (*timing*, en inglés). En este informe se toma en cuenta esa indicación.

En microscopía confocal, la colocalización de dos (o más) fluoróforos se refiere a dos situaciones distintas: a la localización las sondas fluorescentes en un mismo espacio dentro de la imagen (pixel), o a una función estadística que describe cómo se relacionan las intensidades de las señales observadas de estas sustancias. En este trabajo de investigación se exploran ambas características con base en las señales de los cromóforos nativos NADH y FAD. Por un lado, la sola señal de fluorescencia de ambos permite localizarlas dentro de una región específica de la célula viva. Además, las diferencias observadas en el tiempo de vida de fluorescencia promedio exhibidas por ambos cromóforos se corresponde con la dinámica redox que sufren estas sustancias debidas al propio metabolismo de la célula.

Por lo tanto, la *colocalización* de NADH y FAD es importante, ya que permitiría prescindir del uso de fluoróforos exógenos, los cuales son una fuente importante de error en el estudio metabólico de la célula viva, pues su uso está condicionando el comportamiento de las células.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

Esta investigación inicia la exploración del uso de cromóforos nativos de células para estudios estructurales de colocación de NADH y FAD. Hasta donde sabemos, la señal de estos dos compuestos no se ha utilizado con este propósito específico, siendo parte de una metodología estándar el uso de fluoróforos externos. Para ello, es imprescindible instalar un sistema de Microscopía de Tiempo de Vida de Fluorescencia con el fin de llevar a cabo estudios de *colocalización* dentro de zonas diferenciadas de la célula a través un mapa de tiempos de vida de los cromóforos nativos NADH y FAD para establecer un protocolo que evite el uso de fluoróforos exógenos en estudios de metabólica en células vivas.

2.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- El sistema de Microscopía de Tiempo de Vida requiere un entendimiento de la teoría óptica involucrada en la Microscopía Confocal y de las técnicas de fluorescencia resueltas en tiempo, de tal manera que es necesario la identificación de los principales componentes ópticos y electrónicos necesarios para la instalación y mejora continua del sistema de microscopía FLIM.
- Los cromóforos que se estudiarán —NADH, FAD— tienen características fotofísicas que los hacen candidatos versátiles para los objetivos de esta investigación; sin embargo, sus señales de fluorescencia están muy cercanos entre sí, por lo que se debe determinar —con sus espectros de fluorescencia estática— los filtros ópticos necesarios para separar sus señales de emisión.
- Con el sistema diseñado para esta investigación se detectarán las señales de fluorescencia de las formas libres y asociadas de NADH y FAD en células vivas. Con estos datos se cuantificará la correlación posicional de estos compuestos de acuerdo con los cambios observados en los tiempos de vida de fluorescencia exhibidas por estos compuestos.
- Con el fin de verificar la posible correlación de las señales de los tiempos de vida de fluorescencia de NADH y FAD se debe tomar en cuenta, como control, el uso de un cromóforo comercial para distinguir compartimientos subcelulares. Además, derivado de que esta investigación explora el uso de la técnica FLIM, es importante medir el tiempo de vida de fluorescencia de este marcador para establecer una metodología de *colocalización* de NADH y FAD exclusivamente, *ut supra*.
- Esta investigación es relevante en el área de la biología celular ya que permitiría establecer metodologías estándar en metabólica, farmacología, toxicología, etc. Para ello es conveniente familiarizarse con el manejo de células como objeto de estudio. Por lo tanto, se cultivarán células tumorales para realizar observaciones *in vivo*. En específico, la cepa U251 MG, por su importancia en estudios metabólicos.

3. ANTECEDENTES

La técnica de microscopía FLIM puede considerarse como la fusión de la Microscopía Confocal de Fluorescencia (cf. 3.3 Microscopía Confocal de Fluorescencia) y la técnica de Cronometraje de Arribo de Fotones Individuales (SPT, por sus siglas en inglés; cf. 3.2 Cronometraje de Arribo de Fotones Individuales)⁷⁻¹¹. Por tal motivo, en este capítulo se presentan brevemente los conceptos de fluorescencia y tiempo de vida de fluorescencia, para luego explicar el procedimiento de SPT.

Por otro lado, es importante destacar que este sistema se utilizó para realizar estudios de *colocalización* de los fluoróforos NADH y FAD. La colocalización responde a dos preguntas fundamentales: ¿Las señales detectadas se encuentran en la misma región de espacio muestra? ¿Existe alguna correlación entre las intensidades de fluorescencia de los compuestos observados?

En esta investigación se contestan estas dos preguntas con base en los tiempos de vida de fluorescencia promedio de NADH y FAD. La presencia de las formas libres y asociadas de NADH y FAD contribuyen a las diferencias en el promedio observado de los tiempos de vida de fluorescencia, de tal manera que se puede establecer una correlación de estos datos con la dinámica redox de estos dos compuestos lo que, a su vez, contribuye en su localización espacial.

3.1 CONCEPTOS BÁSICOS DE FOTOFÍSICA

La fluorescencia es una forma de desactivación de estados electrónicos excitados (EEE) a partir de la emisión de un fotón. Los diferentes procesos que favorecen la relajación de un sistema tienen, en principio, la misma probabilidad de ocurrir. Sin embargo, la manifestación fenomenológica macroscópica de un proceso sobre el otro, depende de su *constante cinética*, k_i . Lo que determina, a su vez, la magnitud de su tiempo de vida¹¹⁻¹³.

Generalmente, la fluorescencia ocurre desde el estado excitado de más baja energía aun cuando el fluoróforo absorba un fotón que promueva una transición a estados electrónicos superiores. Esta condición se conoce como la *Regla de Kasha*¹⁴. La información de la emisión de fluorescencia de un cromóforo generalmente se presenta mediante un *espectro de fluorescencia*, que es una gráfica que relaciona la intensidad de la emisión respecto de un intervalo de longitudes de onda $-\lambda$, [nm]— o de números de onda $-\bar{\nu}$, [cm⁻¹]—, ver figura 3.1.^{11,12}

Otro aspecto importante a medir es el tiempo de vida de fluorescencia (τ_F). Esta propiedad se define como el tiempo promedio que un fluoróforo reside en su estado excitado. El ritmo de decaimiento depende de la constante cinética, $k_F = \Gamma + k_{nr}$, donde Γ es la constante cinética de fluorescencia y k_{nr} considera los procesos no radiativos que afectan el proceso global observado. El tiempo de vida se refiere al tiempo t igual al inverso de la constante cinética k_F , en el que la

concentración del fluoróforo en su estado electrónico excitado habría disminuido hasta un factor $1/e$, $\sim 36.7\%$. Es decir, $\tau_F = 1/k_F$.¹¹

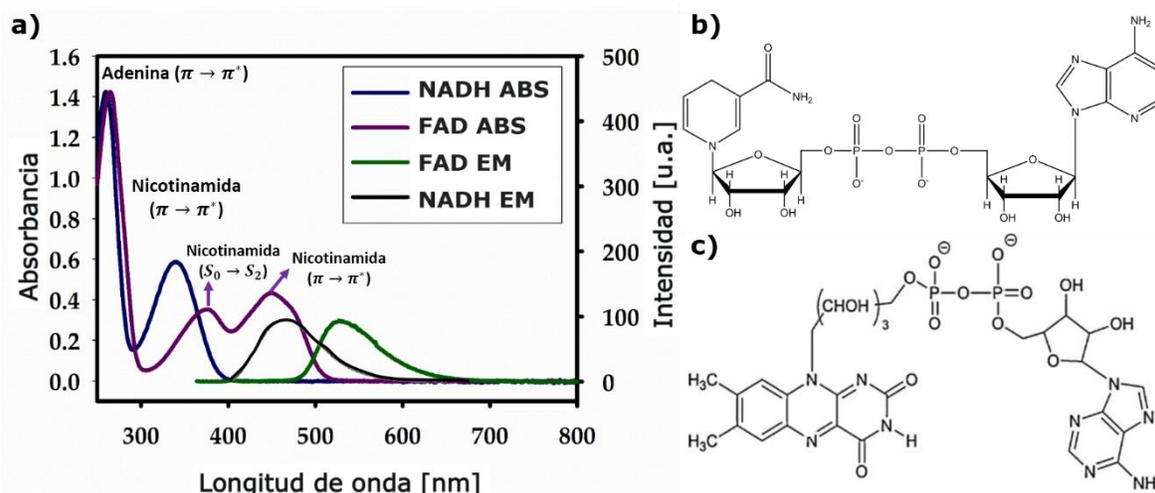


Figura 3.1 a) Espectros de absorción (ABS) y de emisión (EM) de los cromóforos NADH y FAD. Los espectros se obtuvieron de NADH y FAD en sendas soluciones con buffer de fosfatos, pH=7.2. $\lambda_{ex} = 354$ nm. b) Estructura de NADH. c) Estructura de FAD

En un experimento de tiempo de vida de fluorescencia, no es posible medir la concentración de las moléculas en su estado excitado. Sin embargo, el número de fotones emitidos es proporcional al número de estas moléculas, por lo que es posible medir la intensidad de la radiación como función del tiempo¹¹.

$$I(t) = I_0 e^{-t/\tau_F} \quad (1)$$

Donde I_0 es la intensidad de emisión de fluorescencia que corresponde al tiempo $t = 0$.

El tiempo de vida de fluorescencia se puede medir con técnicas espectroscópicas *resueltas en tiempo*, que contemplan el uso de pulsos de radiación —cuya duración es menor que el proceso de emisión de fluorescencia— para promover un fluoróforo a su estado excitado. Para fines de esta investigación —que requiere la medición del tiempo de vida de fluoróforos nativos de células— fue necesario tomar en cuenta la técnica conocida como *Cronometraje de arribo de fotones individuales* (Single Photon Timing en inglés, SPT).

3.2 CRONOMETRAJE DE ARRIBO DE FOTONES INDIVIDUALES

El diseño de un sistema de microscopía de tiempo de vida (FLIM) debe contemplar el entendimiento de los fundamentos de las técnicas de medición resueltas en tiempo¹¹. La técnica de cronometraje de arribo de fotones individuales mide la intensidad de la fluorescencia en términos de fotones individuales como función del tiempo. La información se presenta como un histograma de puntos que representa el conteo de cada fotón respecto de intervalos de tiempo (Δt) conocidos como *canales*, cuyo ancho depende de la electrónica del equipo de detección⁷.

La figura 3.2 muestra un diagrama de la instalación electrónica involucrada en esta técnica. Los experimentos comienzan con la excitación de la muestra con un pulso de ancho temporal definido y frecuencia de repetición constante. Al mismo tiempo, este pulso láser induce una respuesta eléctrica que inicia un cronómetro basado en una rampa de voltaje. Después de un tiempo t , la muestra emite un fotón que es detectado por un tubo fotomultiplicador o un diodo de avalancha. Su registro sirve como señal de paro para detener el cronómetro. La señal eléctrica resultante es traducida —con ayuda de un convertidor analógico digital— a un valor numérico digital el cual es guardado en la memoria de una computadora que registra el evento como un punto en el tiempo t . Este proceso se repite numerosas veces para reconstruir un histograma que define un perfil temporal de decaimiento como el de la ecuación (1) ^{7,11}.

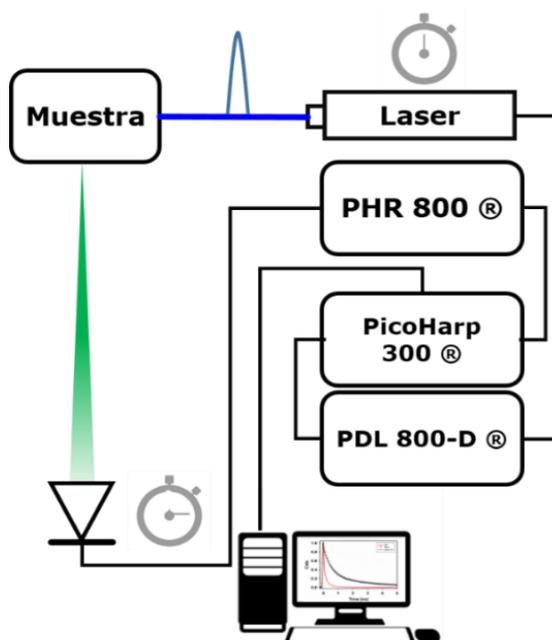


Figura 3.2 Esquema básico de un sistema de Cronometraje de Arribo Individual de Fotones (SPT). PDL 800-D ® es un controlador del láser, éste modula la intensidad y la frecuencia de repetición del haz de pulsos láser y envía la señal de inicio al PicoHarp 300®. El PHR 800 es un enrutador que conecta varios canales electrónicos, como los diodos de detección. Éste envía la señal de paro al PicoHarp 300®. Por último, los datos son enviados a una computadora para su análisis. Los objetos aquí mencionados son de la marca PicoQuant GmbH.

Típicamente, un histograma de tiempo de vida de fluorescencia se presenta con tres gráficas en la misma figura, ver Figura 3.3. La primera se conoce como *Función de Respuesta del Instrumento* (IRF, por sus siglas en inglés). Ésta representa la respuesta del equipo a un tiempo de vida *cero*. El ancho observado en esta curva depende tanto de las características del detector como del tiempo de respuesta de los componentes electrónicos del equipo⁷.

La segunda gráfica muestra el histograma de puntos cuya altura representa la cantidad de fotones medidos en el intervalo de tiempo desde t_k a $t_k + \Delta t$, donde

t_k es el tiempo en el que ocurre el evento k -ésimo de emisión de fluorescencia y Δt es el ancho del *canal* de tiempo medido en la técnica SPT^{7,11}.

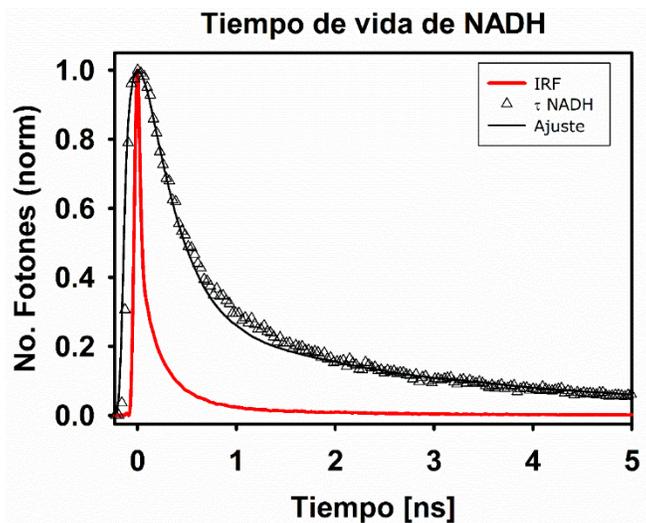


Figura 3.3 Gráfica típica de un histograma de tiempos de vida. Presenta el ajuste de la Ley de decaimiento para NADH en medio intracelular medido con la técnica SPT. IRF es la función de respuesta del equipo.

Entre más pequeño sea un canal, el histograma se aproxima a la función de decaimiento de la intensidad de fluorescencia del analito, ecuación (1). Por último, en la figura 3.3, se muestra también la curva que corresponde al ajuste del decaimiento observado (línea continua). Esta curva se conoce como *Ley de decaimiento* y representa la función que mejor se ajusta a la ecuación (1) como resultado de la convolución de la IRF y el decaimiento observado, es decir:

$$f(t) = IRF \otimes I_0 e^{-t/\tau_F} \quad (2)$$

Donde $f(t)$ es la Ley de decaimiento; IRF, la función de respuesta del equipo; $I_0 e^{-t/\tau_F}$, la intensidad de fluorescencia medida respecto del tiempo y \otimes es el operador de convolución⁷.

En general, debido a las condiciones en las que se encuentra un fluoróforo, es posible que la función de ajuste del tiempo de vida no coincida con un solo factor exponencial, esto indica la coexistencia de otras conformaciones moleculares o incluso otras especies químicas que también van a contribuir con la señal de fluorescencia observada y el tiempo de vida que presenten. En otras palabras, la ecuación (2) puede tomar la forma:

$$f(t) = IRF \otimes \sum \alpha_i e^{-t/\tau_i} \quad (3)$$

$\sum \alpha_i e^{-t/\tau_i}$ corresponde a una función modelo multiexponencial. En un sistema que contempla diversas conformaciones moleculares, u otras especies químicas fluorescentes, cada una de éstas contribuirá con una función exponencial individual que contenga un tiempo de vida τ_i . El factor pre exponencial α_i —amplitud— es un indicador de cuánto aporta cada confórmero i -ésimo a la fluorescencia total observada $f(t)$ siempre que $\sum \alpha_i$ esté normalizado a la unidad⁷, de tal manera que

el tiempo de vida promedio, $\bar{\tau}$, es un promedio ponderado de acuerdo con cada valor de α_i ; es decir, $\bar{\tau} \approx \sum \alpha_i \tau_i$.²

El proceso de análisis de datos consiste en encontrar los parámetros α_i y τ_i que producen la función $\sum \alpha_i e^{-t/\tau_i}$ que más se ajusta con los datos observados $f(t)$. Este procedimiento se conoce como *reconvolución iterativa*. El ajuste se evalúa con el parámetro estadístico $\chi_{red}^2 = \frac{\chi^2}{\nu}$; donde $\chi^2 = \sum_{k=1}^n \frac{1}{\sigma_k^2} [N(t_k) - N_c(t_k)]^2$ es la bondad de ajuste, $N(t_k)$ son los datos observados, $N_c(t_k)$ son los datos calculados en el ajuste, σ_k^2 es la varianza de los datos k -ésimos y ν son los grados de libertad.¹¹

3.3 MICROSCOPIA CONFOCAL DE FLUORESCENCIA

La microscopía óptica es una técnica de imagen que se fundamenta en la difracción de la luz, de hecho, la «*imagen generada por un microscopio es el efecto de interferencia de un fenómeno de difracción*»^{†15,16}. De acuerdo con esta definición, todo objeto puntual visto con el microscopio genera un patrón de difracción que delimita su resolución en el plano de la imagen. Existen dos formas de describir ésta. La primera es la *resolución lateral* que se refiere a la distinción de dos objetos individuales en el mismo plano de detección¹⁷ (ver Figura 3.4, a).

Matemáticamente, la resolución lateral se calcula con base en el *Criterio de Rayleigh*, es decir, dos objetos se pueden distinguir si están separados entre sí una distancia d mayor o igual a su correspondiente radio de Airy, r_{Airy} , ecuación (4).

$$r_{Airy} = 0.61 \frac{\lambda}{NA_{Obj}} \quad (4)$$

Donde λ es la longitud de onda de la luz con que se realiza la observación, NA_{Obj} es el número de apertura del objetivo. Esta definición se basa en el hecho de que un objeto puntual describe formas conocidas como *anillos de Airy*, que son círculos concéntricos alternados de luz y oscuridad. El radio de Airy es la distancia que va del centro del objeto al primer disco oscuro de Airy¹⁸.

Por otro lado, la *Resolución axial*, es la capacidad de distinguir dos objetos como individuales a lo largo del eje óptico (z) (Figura 3.4, b). Su expresión matemática —ecuación (5)— introduce de manera implícita el concepto de *profundidad de campo*, que se refiere al conjunto de planos coaxiales con el eje óptico —por encima y debajo del espécimen— que se perciben nítidos¹⁷.

$$z = \frac{2\lambda\eta}{NA_{Obj}^2} \quad (5)$$

Cuando el espécimen es un fluoróforo, la profundidad de campo es aparentemente mayor debido a la propia irradiación de la luz (Figura 3.4, c), por lo que los conos de luz de cada uno pueden *invadir* el plano de otro cromóforo. La

[†] Ernst Karl Abbe (1840-1905).

imagen de microscopía de fluorescencia de campo amplio se presenta inherentemente difuminada por este fenómeno¹⁷.

En la microscopía confocal de escaneo con láser, este problema se resuelve iluminando un campo muy pequeño a la vez. La luz que se capta del objeto observado es enfocada en un agujero estenopeico cuyo radio es del orden del campo de visión iluminado^{17,19}.

De esta forma, la imagen del plano iluminado se recrea en el agujero y se transmite a través de éste, evitando que la luz proveniente de zonas fuera del foco interactúe con la imagen¹⁷.

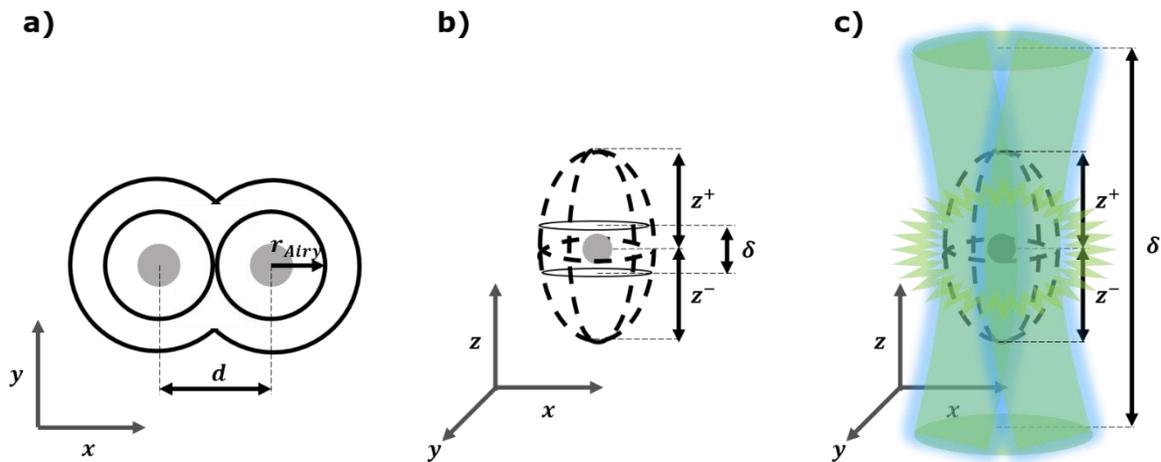


Figura 3.4 Resolución en microscopía. a) Lateral: dos objetos que comparten el mismo plano se distinguen entre sí con base en el criterio de Rayleigh. b) La resolución axial considera el eje óptico z, define la profundidad de campo, δ . En microscopía óptica $\delta \approx \frac{1}{4}(z^+ + z^-)$. c) Si el espécimen es un fluoróforo, $\delta > (z^+ + z^-)$.

Para reconstruir la imagen completa de un espécimen, la microscopía confocal cuenta con un sistema que permite registrar uno a uno cada punto emisor de la muestra¹⁹, que en el detector se traduce en la generación de la imagen pixel a pixel. En cada uno de los pixeles definidos en el detector se guarda la información respectiva de intensidad —cuentas de fotones— y posición, con base en el sistema tractor de la muestra.

3.4 MICROSCOPÍA DE TIEMPO DE VIDA DE FLUORESCENCIA

Con los conceptos expuestos anteriormente es posible asignar una definición operativa de la técnica de microscopía FLIM. Este método se entiende como una técnica de imagen en la cual el tiempo de vida promedio, $\bar{\tau}$, de un fluoróforo se describe con resolución espacial^{10,20}. En otras palabras, la imagen de un espécimen se recrea a través de un *mapa* que muestra cambios en la expresión del tiempo de vida de fluorescencia promedio debidos a la localización espacial de un analito.

Desde el punto de vista operativo, FLIM tiene los mismos requerimientos instrumentales que la microscopía confocal de escaneo con láser más un sistema

de detección con resolución temporal como el cronometraje de arribo de fotones individuales²¹.

En la figura 3.5 se muestra el proceso de reproducción de una imagen FLIM. Primero, el objetivo enfoca el haz de excitación hacia un punto en particular del campo de visión, se capta la fluorescencia del mismo con el objetivo y su imagen se registra en un pixel (m, n) dentro del detector (Figura 3.5, b). El pixel (m, n) registra información referente a la posición asignada por el elemento tractor de la muestra, la intensidad de la señal —número de cuentas de fotones— y el análisis del histograma de tiempo de vida. Un análisis rápido se consigue con base en definir el tiempo de vida, τ_F , como el tiempo en el que el número de cuentas corresponda a $\frac{1}{e}$ de la intensidad a $t = 0$.⁸⁻¹⁰

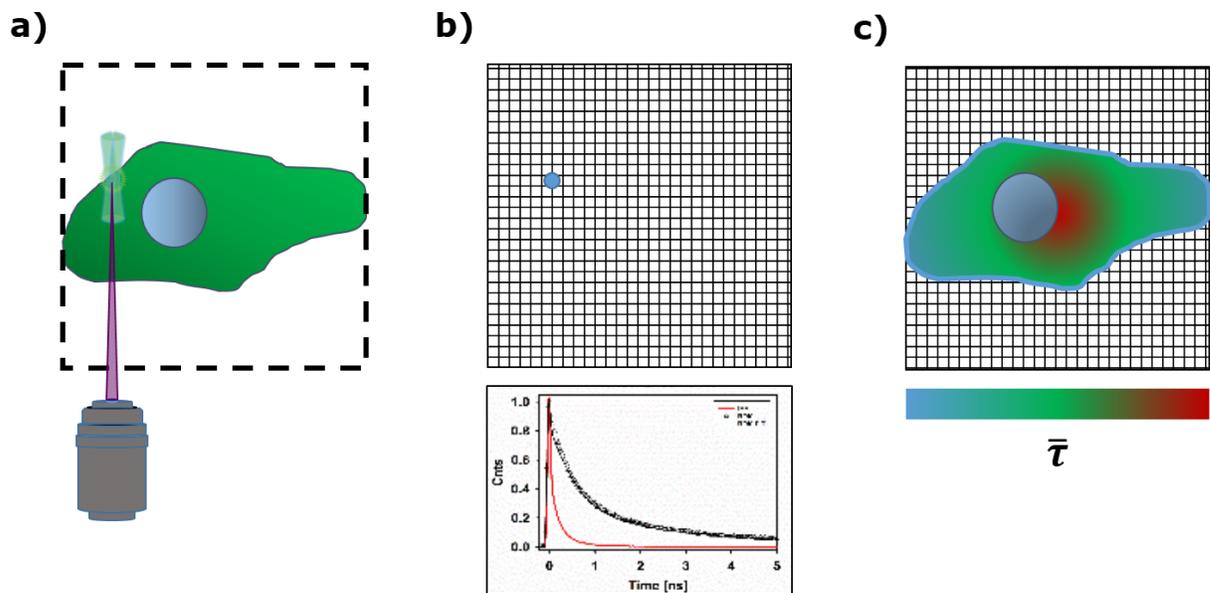


Figura 3.5 Construcción de una imagen FLIM. El vértice del cono de excitación (a) se registra en el pixel (m, n) en donde se analiza el tiempo de vida (b). Después de un registro total de la matriz de pixeles, se recrea la imagen con base en un análisis pixel a pixel y se muestra un mapa de colores falsos que representa los valores locales de $\bar{\tau}$ (c).

Este proceso se repite para cada pixel (m, n) de la matriz que construye el campo de visión escogido. Al finalizar, se realiza un análisis de tiempos de vida promedio pixel a pixel y la imagen se muestra con un mapa de colores falsos que indican ciertos valores del tiempo de vida promedio, $\bar{\tau}$ (Figura 3.5, c).¹⁰

4. METODOLOGÍA

La primera parte de la investigación consistió en la caracterización fotofísica de los cromóforos de interés, NADH y FAD. Al trabajar con células se debe tomar en cuenta que éstos se encuentran en un ambiente altamente heterogéneo lo que implica que el modelo de tiempo de vida debe ser multiexponencial.

Se midieron los espectros de fluorescencia estáticos de una mezcla equimolar de NADH y FAD en una solución amortiguadora de fosfatos, pH=7.2 y a 19°C —la temperatura del laboratorio láser—. Esta observación incluyó un experimento en el que se utilizaron filtros ópticos para aislar las señales individuales de cada cromóforo, el cual consistió en medir diferentes espectros de excitación, cada uno de ellos detectando a diferentes longitudes de onda de emisión de la mezcla, para encontrar aquella ventana espectral que produjera un espectro similar al de absorción de cada fluoróforo. Al aislar las señales de estos dos compuestos es posible establecer una correlación en los tiempos de vida de fluorescencia que exhiben debido a su localización específica dentro de las células.

Se realizó una búsqueda exhaustiva en la literatura para conocer los valores de tiempo de vida reportados para el NADH y FAD en observaciones de células *in vivo*. Esto, con el fin de establecer un intervalo razonable para los ajustes hechos con la técnica FLIM. Se encontró que hay diversos valores debido al medio altamente heterogéneo que ofrecen las células (ver Tabla 1, 5. RESULTADOS); así mismo, se presentan diferencias significativas en correspondencia con distintas cepas estudiadas. Se encontró, además, que cada cromóforo puede ajustarse con un modelo multiexponencial pero no hay un consenso general acerca de cuántas exponenciales son suficientes o necesarias para establecer el mejor modelo.

En esta investigación, los modelos de ajuste de cada decaimiento resultantes de los análisis FLIM se evalúan con base en el parámetro estadístico χ_{red}^2 . Este parámetro debe ser lo más cercano a 1, pero, debido a que el aumento de exponenciales siempre disminuirá este valor, se estableció un intervalo que garantice sentido físico, es decir, que limitara los artefactos matemáticos propios del ajuste. Así, se cuidó que los ajustes cumplieran con un valor $1.2 < \chi_{red}^2 < 1.8$.^{7,11,22}

La construcción del microscopio requiere un entendimiento de la teoría óptica para garantizar la óptima instalación de los componentes del sistema. En especial, el arreglo telescópico con agujero estenopeico, que es el elemento crucial en la microscopía confocal de fluorescencia.^{17,19} Gracias al esquema de armado por nosotros mismos, nuestro equipo es muy versátil ya que permite su mejora constante para implementar otros experimentos con el mismo sistema.

Por último, para resolver la pregunta acerca de si basta con las señales de los fluoróforos nativos NADH y FAD para establecer un mapa de tiempos de vida para colocalización, se requirió el uso de un cromóforo estándar como auxiliar para la identificación de zonas diferenciadas dentro de la célula. Por lo tanto, fue necesario medir su tiempo de vida característico con la técnica SPT.

5. RESULTADOS

5.1 CARACTERÍSTICAS FOTOFÍSICAS DE CROMÓFOROS NATIVOS DE LA CÉLULA

La tabla 1 presenta un listado de las características espectroscópicas más relevantes de los cromóforos endógenos —NADH y FAD— auxiliares en la microscopía FLIM de células *in vivo*.

Tabla 1 Colección de datos espectroscópicos de NADH y FAD. ^a La longitud de onda de excitación es mostrada en paréntesis. ^b Los valores de α se muestran entre paréntesis y la longitud de onda detectada, en corchetes.

| Fluoróforo | $\lambda_{abs,m\acute{a}x}$ [nm] | $\lambda_{fluo,m\acute{a}x}$ [nm] ^a | Tiempo de vida [ns] ^b | Medio | Referencia |
|-------------------------|----------------------------------|--|---|--|----------------------|
| NADH | 340-351 | 440 | 0.3-0.65, 1.9-2.3 | Tejidos | 23 24 25 26 |
| | 355 | | 0.4, 0.78 | Buffer de fosfatos | 27 |
| | 260, 340 | ~465(370) | 0.14(0.60), 0.43(0.37), 1.1(0.03) | Buffer de fosfatos | 28 |
| | | ~450(370) | 0.53(0.73), 3.10(0.25), 15.9(0.02)[440] | Células HeLa | 28 |
| | | 440-445(355) 460(760) | 0.44(0.63), 1.88(0.30), 5.68(0.07)[440] 0.4, 1.0, 1.7, 3.2 | Mitocondrias de células cardiacas Tejido cerebral | 29 30 |
| NADH libre | | 460 | 0.3 | | 31 |
| | | 470 | $\bar{\tau} = 0.64-0.74$ | Buffer Mops | 32 |
| | | 470 | $\bar{\tau} = 0.43$ | Solución acuosa | 33 |
| NADH asociado a enzimas | | 440 | 2.0-2.3 | | 31 |
| | | 470 | $\bar{\tau} = 2.0$ | Buffer Mops | 32 |
| | | ~450(336) | 1.2(0.46), 3.1(0.54)[466] | Buffer de fosfatos | 34 |
| FAD | 450 | 515, 535 | 0.15-0.33, 0.5-0.95, 4.5-5.7 | | 23 24 25 26 |
| | 440 | | $\bar{\tau} = 2.5-2.8$ | Buffer de fosfatos | 27 35 |
| | 420-500 | 520-570 | 2.91 | | 36 |
| | 375,450 | ~530(450) | 0.007(0.66), 0.22(0.03), 2.09(0.17), 3.97(0.14) | Buffer de fosfatos | 37 |
| | | 525-530(450) 504-522(438) | 0.08(0.60), 0.7(0.25), 3.17(0.13)[530] 0.18(0.66), 0.75(0.21), 2.10(0.13)[531-549] | Células HeLa Cardiomiocitos | 37 38 |
| FAD unido a enzimas | 450 | 550 504(438) | $\bar{\tau} = 2.0$ 0.88(0.35), 4.14(0.65)[495-550] | Buffer de fosfatos | 39 38 |

Como se aprecia en la tabla 1, no hay un consenso general acerca del número de exponenciales necesarias o suficientes para tener un buen ajuste del modelo de decaimiento para los cromóforos NADH y FAD. Se puede partir de un modelo biexponencial considerando conformaciones libre y asociada a proteínas para cada analito. Sin embargo, hay autores que le asignan más exponenciales a los fluoróforos estudiados debido a la alta complejidad del medio celular.^{2,37,38,40} De

hecho, el autor Mohammad A. Yaseen asegura que no importa el número de exponenciales que se asigne, el modelo siempre quedará sobresimplificado.³⁰

Al respecto, el Prof. Joseph Lakowicz hace una excelente discusión acerca del significado físico que es importante mantener a costa del beneficio matemático de aumentar el número de exponenciales en un ajuste. Con base en estas ideas se llegó a establecer, para esta investigación, que los mejores ajustes son aquellos cuyo valor de χ_{red}^2 estuviera entre 1.2 y 1.7. Se puede seguir una simple regla mnemotécnica: si al aumentar el número de exponenciales, el valor de χ_{red}^2 no disminuye más que el 10% del valor anterior, y está dentro del intervalo mencionado, entonces el análisis ha encontrado la función que mejor ajusta a la ley de decaimiento observada.¹¹

La figura 5.1 muestra los espectros de fluorescencia estática de una mezcla equimolar de NADH y FAD en solución amortiguadora de fosfatos. El espectro de absorción de la mezcla muestra dos bandas características muy similares a las bandas de FAD (Figura 3.1). Sin embargo, la banda de la izquierda se encuentra desplazada hacia el azul, coincidiendo con el espectro de absorción del NADH, además, esta última es la *convolución* de ambas bandas —NADH y FAD—.

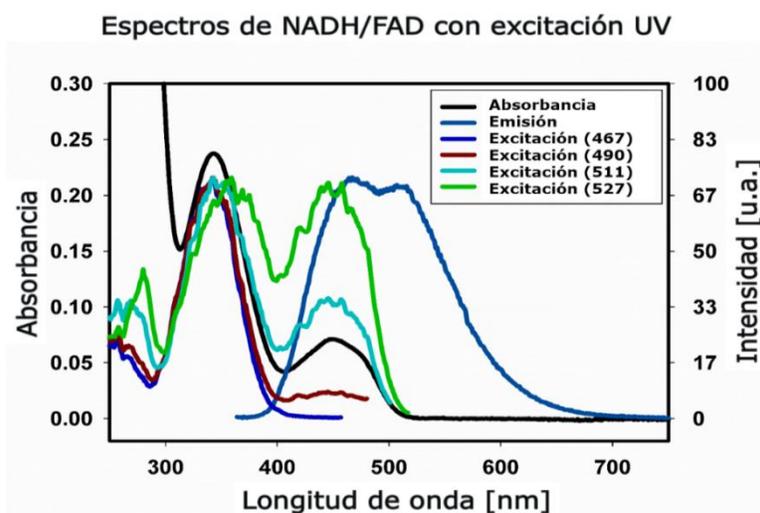


Figura 5.1 Espectros de absorción, emisión y excitación de la mezcla equimolar de NADH y FAD en solución amortiguadora de fosfatos, pH=7.2. Los números entre paréntesis indican la longitud de onda de detección.

En la imagen se aprecian los espectros de excitación detectando la señal en 467nm, 490nm, 511nm y 527nm. El patrón observado con las longitudes de onda de 467nm y 527nm es similar al espectro de absorción del NADH y del FAD, respectivamente, debido a que, en los experimentos con detección en longitudes de onda intermedias, el espectro es semejante al de absorción de la mezcla. Por lo tanto, para aislar la señal de NADH se requiere utilizar un filtro que *corte* entre 467nm y 490nm, mientras que un filtro que permita la transmisión de longitudes de onda mayores a 527nm bastaría para aislar la señal de FAD. Las mejores opciones de filtros disponibles en nuestro laboratorio son: un *shortpass* de 480nm (SPF480) y un *longpass* de 550nm (LPF55), ver Figura 5.2.

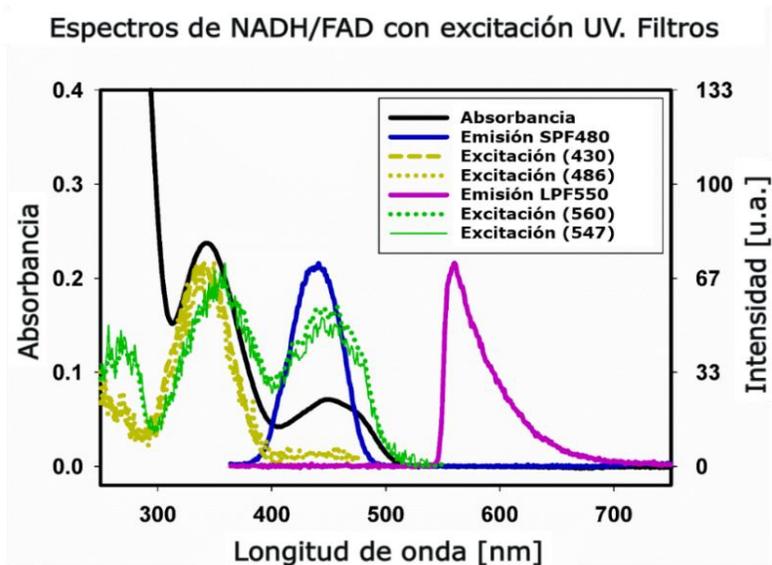


Figura 5.2 Evaluación de los filtros ópticos. SPF480 es el filtro de transmisión de longitudes de onda menores a 480nm. LPF550, de longitudes mayores a 550nm. Entre paréntesis están las longitudes de onda de detección.

Otra alternativa para aislar ambas señales es realizar la detección de ésta a través de dos canales, con lo cual es posible visualizar la misma zona del espacio muestra con la información de cada uno de los cromóforos a través de dos imágenes independientes, pero en el tiempo que tomaría escanear una sola imagen. Para conseguir esto fue necesario instalar un espejo dicroico en el camino óptico de nuestro sistema FLIM, *vide infra*.

5.2 SISTEMA DE MICROSCOPIA DE TIEMPO DE VIDA DE FLUORESCENCIA

La construcción del sistema de microscopía FLIM se realizó partiendo de un cuerpo de microscopio Ti-2 Eclipse® de la marca Nikon®, por lo que se trata de un sistema modificado (ver Figura 5.3).

El sistema cuenta con tres fuentes de excitación que son láseres de diodos pulsados con longitudes de onda de emisión de 354nm, 405nm y 485nm, respectivamente; y con potencia modulable hasta 7mW. En el cuerpo del microscopio se encuentra una serie de objetivos para enfocar el haz de excitación a la muestra y recolectar su fluorescencia. Para realizar excitación monofotónica de fluoróforos nativos de la célula, se instaló un objetivo de Nikon 60x/0.85NA que permite la transmisión de luz UV hasta en un 60%. La emisión de fluorescencia de los cromóforos excitados se recoge con el mismo objetivo que pasa a través del espejo dicroico hasta un arreglo de telescopio, que consta de una lente convergente. Esta lente tiene como propósito enfocar la imagen producida por la emisión de fluorescencia y con ayuda de un agujero estenopeico de 30µm de diámetro se bloquea la luz fuera de foco en la muestra. Luego, la imagen del plano de la muestra se vuelve a colimar con otra lente que manda la señal, a través de un espejo dicroico de 510 nm, hacia dos fotodiodos de avalancha (APD, por sus siglas en inglés). Es decir, hacia un APD se dirigen las señales con longitudes de onda mayores a 510 nm —Canal 1— mientras que en el otro APD se registran las señales con longitudes

de onda menores a 510nm —Canal 2—. Frente a cada fotodiodo se encuentra una lente adicional que enfoca la imagen en sus detectores. Estos generan una señal eléctrica que se envía a una tarjeta digital TTL para su correspondiente análisis, que se realiza con el software especializado llamado SymphoTime64®.

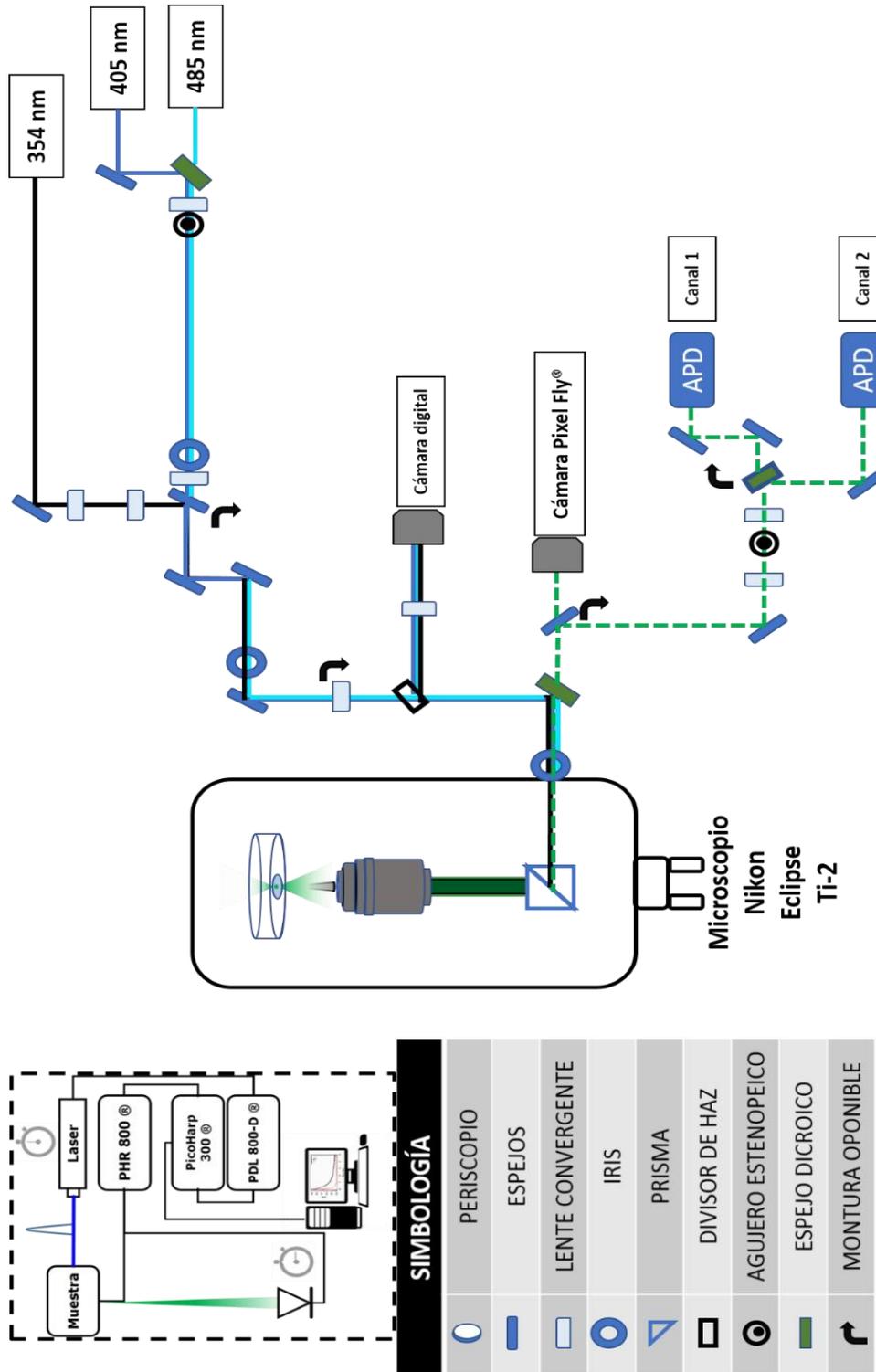


Figura 5.3 Diagrama del sistema de Microscopía FLIM construido en el Laboratorio de Espectroscopía Láser. En el recuadro arriba de SIMBOLOGÍA se muestra un diagrama de las conexiones electrónicas del sistema.

5.3 MEDICIÓN DEL TIEMPO DE VIDA DE FLUORESCENCIA DE MITOTRACKER®

La figura 5.4 muestra los espectros de absorbanza y fluorescencia del MitoTracker Red® (MTR) obtenido en solución con metanol.

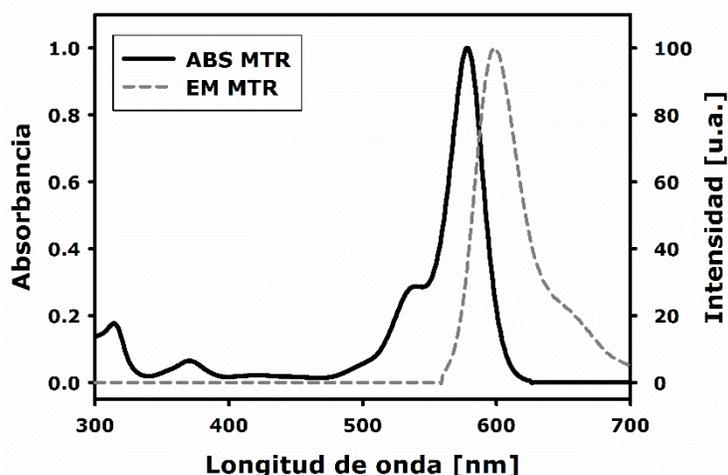


Figura 5.4 Espectros de absorción (ABS) y emisión (EM) normalizados de MitoTracker Red®. Espectro de una solución en metanol.

De acuerdo con nuestro esquema de detección a dos canales, la señal de fluorescencia del MTR se colecta en el canal 1 —longitudes de onda mayores a 510nm—. Esto significa que la señal detectada en el canal 1 para los experimentos con células incluirá también la emisión del FAD. Gracias a la técnica FLIM podemos separar ambas señales con base en su tiempo de vida; sin embargo, también aislamos la señal debida a MTR usando un filtro óptico que permite la transmisión de longitudes de onda mayores a 655 nm.

El MTR sirvió en los experimentos de colocalización como control. Por lo que se midió su tiempo de vida de fluorescencia en solución amortiguadora de fosfatos (PBS) y medio de cultivo DMEM plus®, que son las condiciones experimentales necesarias para mantener a las células vivas durante la observación.

Como se aprecia en la figura 5.5, el análisis del decaimiento de fluorescencia que mejor ajusta es un modelo biexponencial, lo que indica la presencia de dos conformémeros moleculares responsables de cada tiempo de vida. Aun cuando no podemos asegurar nada respecto de una dinámica de estructuras conformacionales para el MTR en solución, se observó que en los experimentos con células se continúa observando dos tiempos de vida para el MTR. Este resultado se explica en este caso considerando que en un momento el MTR puede estar libre, $\tau_1 = 0.234 \pm 0.035 \text{ ns}$, o asociado con alguna estructura dentro de la mitocondria, $\tau_2 = 3.180 \pm 0.014 \text{ ns}$. La bondad de ajuste se evaluó con el parámetro estadístico mencionado arriba, resultando en $\chi_{red}^2 = 1.66$, que es aceptable según el criterio que impusimos arriba.

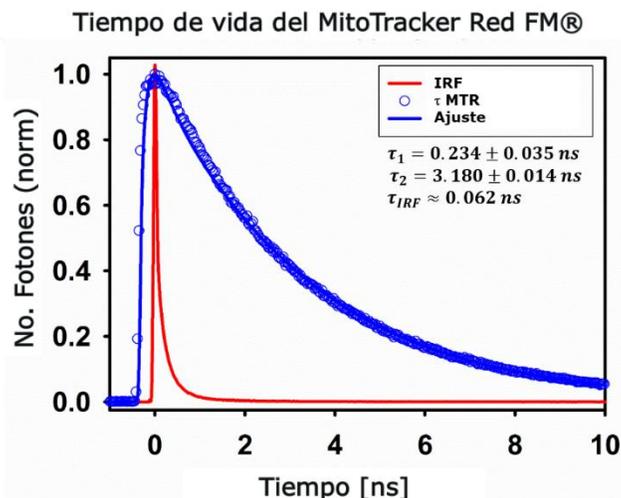


Figura 5.5 Ajuste del tiempo de vida del MitoTracker Red FM®. Debajo del recuadro de leyenda se encuentran los valores calculados para dos tiempos de vida. Este tiempo de vida se midió de una solución 5mM con DMEM plus® y PBS a pH=7.2. IRF es la función de respuesta del equipo.

5.4 EXPERIMENTOS DE COLOCALIZACIÓN DE NADH Y FAD

Con la información anterior fue posible realizar los análisis de tiempo de vida para recrear las imágenes FLIM de células de glioblastoma. Es decir, las imágenes que se muestran a continuación son el resultado del análisis de la función de decaimiento de fluorescencia de los cromóforos estudiados: NADH, FAD y MTR.

El ajuste de dicha función nos permitió establecer un mapa de colores relacionado con el tiempo de vida de fluorescencia de cada forma (libre y asociada) de los tres cromóforos. Los cambios en color de la escala observada representan cambios observados en el tiempo de vida promedio por la propia interacción de los cromóforos con un determinado microambiente.

El tiempo de vida promedio cambia de acuerdo con las amplitudes α_i calculadas en el ajuste de la función de decaimiento, que cuantifican la participación de un cromóforo en la señal total de fluorescencia observada. En otras palabras, describe qué forma (libre o asociada) de un determinado cromóforo está presente con mayor o menor preponderancia.

En la figura 5.6 se observan dos imágenes, cada una es un campo de visión (FOV, por sus siglas en inglés) de 160 x 160 μm de un cultivo de células teñidas con MTR. De estas imágenes, se seleccionaron varias células vivas como *regiones de interés* (ROI, por sus siglas en inglés). Estas regiones se diferenciaban del fondo de la imagen por la cuenta de fotones, es decir, se definió un umbral (*threshold*) de número de cuentas para discriminar aquellos píxeles que estuvieran fuera de las células. En estos píxeles no se realizó un análisis de tiempo de vida y por tanto aparecen oscuros.⁴²

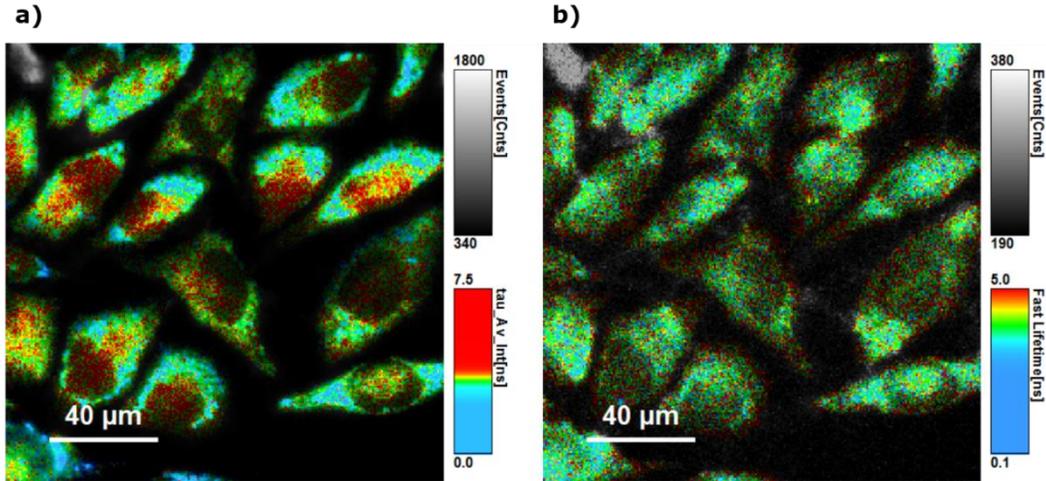


Figura 5.6 Imágenes FLIM de células de glioblastoma. a) Canal 1: Señal de MTR y FAD. b) Canal 2: señal de NADH.

La figura 5.6a es una imagen obtenida con los datos registrados por el canal 1 (APD 1) de nuestra configuración del sistema FLIM, este APD registra las señales con longitudes de onda mayores a 510 nm, por lo que la imagen muestra la fluorescencia de FAD y MTR. Por otro lado, la figura 5.6b se realizó con los datos registrados por el canal 2 (APD 2), es decir, señales con longitud de onda menores a 510nm, correspondientes a NADH.

Es notable que en la figura 5.6a las señales observadas se encuentran muy bien localizadas, con una alta incidencia en la zona del citoplasma. Gracias al marcador MTR es posible identificar pequeñas estructuras reconocibles como mitocondrias⁵⁰. Mientras que para la imagen de la derecha (figura 5.6, b) la señal de fluorescencia se muestra más difusas en todas las células. Estas diferencias pueden asociarse a la propia localización de los cromóforos NADH, FAD y MTR. Es decir, tanto MTR como FAD se encuentran mayoritariamente en las mitocondrias, por lo tanto, la imagen se ve más nítida.^{50,51} El NADH es un fluoróforo ubicuo lo que favorece esa apariencia difusa al encontrarse en todos lados de la célula.⁵² Los tiempos de vida encontrados para cada cromóforo en este primer análisis FLIM se muestran en la tabla 2.

Tabla 2. Tiempos de vida del análisis FLIM para el campo de visión de 160 x 160 µm. Se presentan los valores de alfa relativos, es decir, la fracción de cada alfa considerando que $\sum \alpha_i = 1$.

| Canal | τ_1 [ns] | τ_2 [ns] | τ_3 [ns] | τ_4 [ns] | α_1 | α_2 | α_3 | α_4 |
|-------|---------------|---------------|---------------|---------------|------------|------------|------------|------------|
| 1 | 0.085 ± | 0.725 ± | 3.09 ± | 5.57 ± | 0.695 ± | 0.135 ± | 0.121 ± | 0.049 ± |
| | 0.015 | 0.034 | 0.024 | 0.025 | 0.029 | 0.011 | 0.018 | 0.004 |
| 2 | 0.063 ± | 0.3 ± | 1.87 ± | 4.8 ± | 0.62 ± | 0.18 ± | 0.112 ± | 0.092 ± |
| | 0.009 | 0.03 | 0.039 | 0.027 | 0.035 | 0.01 | 0.013 | 0.012 |

Los tiempos de vida mostrados en la tabla 2 se pueden asignar de la siguiente manera: en el canal 1 se detecta solamente las señales debidas a la fluorescencia del MTR y FAD, de tal manera que, según lo descrito en la tabla 1, τ_1 , τ_2 y τ_4 pueden considerarse pertenecientes al FAD mientras que el valor de τ_3 se puede asociar a MTR. Por otro lado, el canal 2 mostró que el mejor ajuste se conseguía con 4

exponenciales. Los valores de tiempos de vida τ_2 , τ_3 y τ_4 sí coinciden con tiempos de vida reportados previamente para NADH (ver tabla 1). El valor de τ_1 es atípicamente rápido y casi del orden de la función de respuesta del equipo. Debido al valor tan alto de α para este componente (ca. 62%) no es posible descartarlo como un mero artefacto matemático.³⁰ Una inspección rápida al espectro de emisión de FAD (ver figuras 3.1 y 5.1) nos sugiere que esta amplitud podría pertenecer a este fluoróforo, pues presenta un máximo de emisión en 525 nm. Por lo que el espejo dicróico *longpass* de 510 nm no separa estas señales de manera eficiente.

Una forma de solucionar esto es utilizar el filtro *shortpass* de 480nm o con un espejo dicróico cuyo valor límite sea más bajo que 510nm. La razón principal por la cual fue utilizado el esquema de detección a dos canales es que permite la generación de hasta tres imágenes en el tiempo que tomaría la obtención de una sola, —como sería en el caso de usar solamente filtros para separar las señales— lo cual disminuye el riesgo para las células de presentar un posible daño fotofísico debido a la prolongada exposición a radiación UV.^{43,44}

Para poder establecer una correlación espacial de las señales de FAD y NADH, de la figura 5.6 se seleccionó un FOV correspondiente a una sola célula (57 x 57 μm). De este nuevo FOV se aislaron las señales de los cromóforos con ayuda de un filtro *longpass* de 655 nm, que permite la transmisión de la señal exclusiva de MTR. Para separar las señales de NADH y FAD se siguió el mismo esquema de detección a dos canales. En estas imágenes se consideraron dos ROIs, una región citosólica, que excluye las regiones asociadas a las mitocondrias (Figura 5.7) y otra que incluye sólo las regiones donde existan las mitocondrias (Figura 5.8), ambas ROIs se seleccionaron con un examen visual tomando en cuenta la localización de la señal de fluorescencia de MTR.

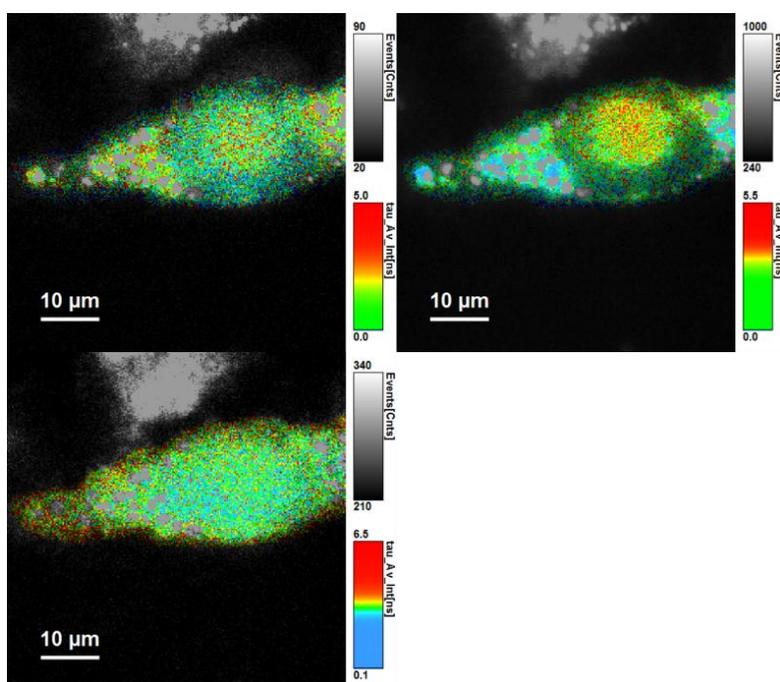


Figura 5.7 Imagen FLIM de una sola célula. Izquierda arriba: Señal de MTR. Izquierda abajo: Señal de NADH. Derecha: Señal de FAD y MTR. Con énfasis en zonas no mitocondriales.

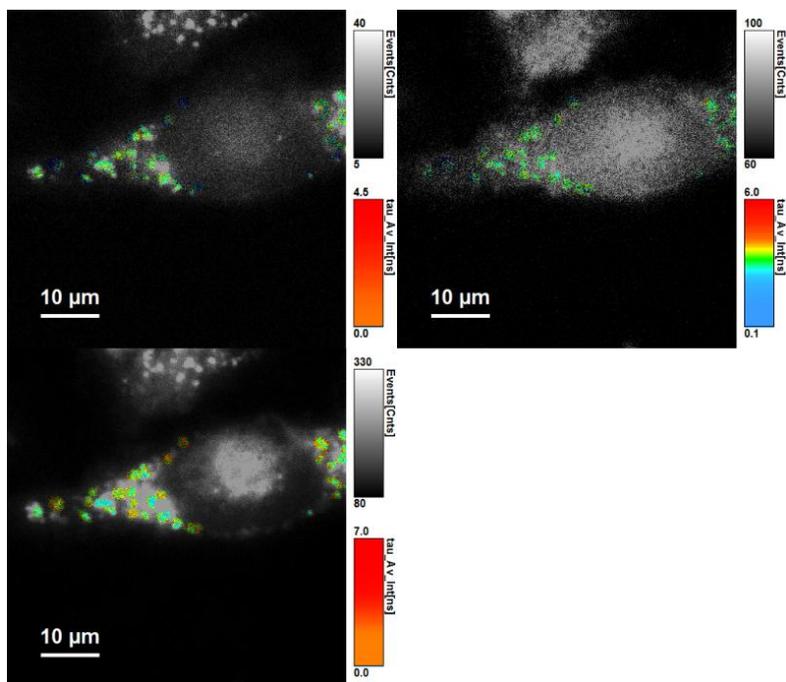


Figura 5.8 Imagen FLIM de una sola célula. Izquierda arriba: Señal de MTR. Izquierda abajo: Señal de FAD y MTR. Derecha: Señal de NADH. Con énfasis en zonas mitocondriales.

La tabla 3 es un resumen de los valores de tiempo de vida encontrados para este FOV. En esta se muestran los resultados de los análisis para cada ROI. El análisis consideró los mismos criterios anunciados anteriormente respecto de la bondad de ajuste.

Tabla 3 Tiempos de vida del análisis FLIM para el FOV de $57 \times 57 \mu\text{m}$. Se presentan los valores de alfa relativos. M se refiere a las ROIs que incluyen a las mitocondrias. C toma en cuenta la zona citosólica. Para la columna τ_i , i puede ser 1,2(canal); 1= MTR, 2=NADH, respectivamente. Lo mismo para α_i .

| ROI | Canal | $\tau_{2,FAD}$ [ns] | τ_i [ns] | $\tau_{1,FAD}$ [ns] | $\tau_{2,MTR}$ [ns] | $\alpha_{2,FAD}$ | α_i | $\alpha_{1,FAD}$ | $\alpha_{2,MTR}$ |
|-----|-------|---------------------|-------------------|---------------------|---------------------|-------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| M | 1 | <0.062 | 0.171 ± 0.022 | 0.753 ± 0.049 | 3.000 ± 0.098 | 0.858 ± 0.023 | 0.085 ± 0.016 | 0.0339 ± 0.0056 | 0.0171 ± 0.0042 |
| | 2 | 0.093 ± 0.017 | 0.944 ± 0.068 | 4.540 ± 0.041 | ----- | 0.819 ± 0.014 | 0.1291 ± 0.0082 | 0.0522 ± 0.0056 | ----- |
| C | 1 | <0.062 | 0.160 ± 0.034 | 0.75 ± 0.08 | 2.90 ± 0.15 | 0.960 ± 0.034 | 0.022 ± 0.019 | 0.0097 ± 0.0083 | 0.006 ± 0.005 |
| | 2 | 0.071 ± 0.021 | 1.00 ± 0.14 | 4.70 ± 0.12 | ----- | 0.840 ± 0.019 | 0.111 ± 0.011 | 0.049 ± 0.009 | ----- |

Al igual que con los datos de la tabla 2, cada valor mostrado se puede asignar a un determinado fluoróforo. Los valores en los errores estándar nos sugieren que las diferencias encontradas en cada análisis se pueden explicar por error aleatorio. En esta tabla se clasificó la información tomando en cuenta el análisis de cada ROI, se esperaba que cada cromóforo participara con dos conformaciones, libre y asociada a proteína, por lo cual, se realizó una primera aproximación tomando en

cuenta un modelo tetraexponencial para el canal 1, es decir, dos exponenciales para FAD y dos exponenciales para MTR. Sin embargo, para el caso del canal que detecta la señal de NADH, como arriba, muestra un mejor ajuste con un modelo triexponencial, la razón de esto se expuso anteriormente, *vide supra*.

Es importante hacer notar aquí la variación de los valores de alfa tan marcados, sobre todo para el MTR de tiempo de vida largo, $\tau_{2,MTR}$, que asignamos a su forma asociada a alguna estructura de la mitocondria. En el caso de la ROI M, este tiempo de vida participa con el 1.7% de la señal total, mientras que en C es menos del 1%. Este resultado se entiende debido a que, en principio, la forma asociada a proteína de MTR no debería participar significativamente en C ya que estamos analizando estructuras completamente ajenas a este orgánulo celular.⁴⁵

Con base en la información de alfa para cada pixel en las imágenes mostradas arriba, se pueden graficar los puntos correspondientes a cada señal de NADH, FAD y MTR detectada y así comprobar si existe alguna correlación que indique, cualitativamente, *colocalización*⁴⁷⁻⁴⁹, ver Figura 5.9. Con esto se pretende evaluar una posible relación entre las señales de los cromóforos. Específicamente, debido a la naturaleza redox del NADH y FAD, se espera observar un comportamiento correlacionado entre estos dos compuestos, tanto por su química redox como por su localización dentro de estructuras sub celulares, como lo son las mitocondrias.

En la figura 5.9 se observan las gráficas de correlación entre los parámetros α_i de cada cromóforo. Los puntos verdes corresponden a la ROI M. Se observa que estos puntos tienen menor dispersión que los valores de la ROI C (puntos azules). Los valores expuestos en la tabla 3 para los tiempos de vida que reflejan conformaciones de los cromóforos asociados con proteínas coinciden con valores reportados para las mitocondrias^{29,37,38,45}, entonces los pixeles que no pertenecen exclusivamente a estas regiones —ROI C— presentan una mayor dispersión de los datos como se muestra en las figuras.

Es destacable que, en ambos casos, haya una coincidencia en los centros de los patrones formados por las gráficas mostradas. Los puntos azules consideran la ROI C que podría incluir algunas mitocondrias que no hayan sido descartadas en el examen visual de la señal del MTR. Esta asociación de los datos puede servir como un índice cualitativo de la capacidad de colocalización de las señales de los cromóforos NADH y FAD.

Una forma de utilizar esto sería conforme la siguiente situación: en un análisis en el que se obtenga un resultado tal que esté dentro de la zona verde, indicaría que se trata de un valor debido a la interacción de alguna estructura supramolecular perteneciente a las mitocondrias, mientras que si este valor se aleja del centro —se corresponde con la zona azul— sería de un pixel que tiene mayor probabilidad de ser parte de la zona citoplasmática. Este pequeño ensayo, sin embargo, no es más que una suposición con base en los resultados obtenidos en esta primera aproximación al problema presentado en este trabajo de investigación.

Al momento se están explorando otras opciones en la presentación de los resultados, como la correlación existente en la intensidad de la señal, el índice redox, etc., en aras de encontrar el mejor parámetro que permita demostrar, más allá de toda duda razonable, que las señales exclusivas de NADH y FAD se pueden utilizar para establecer un procedimiento de localización de estructuras subcelulares individuales sin el uso de cromóforos externos.

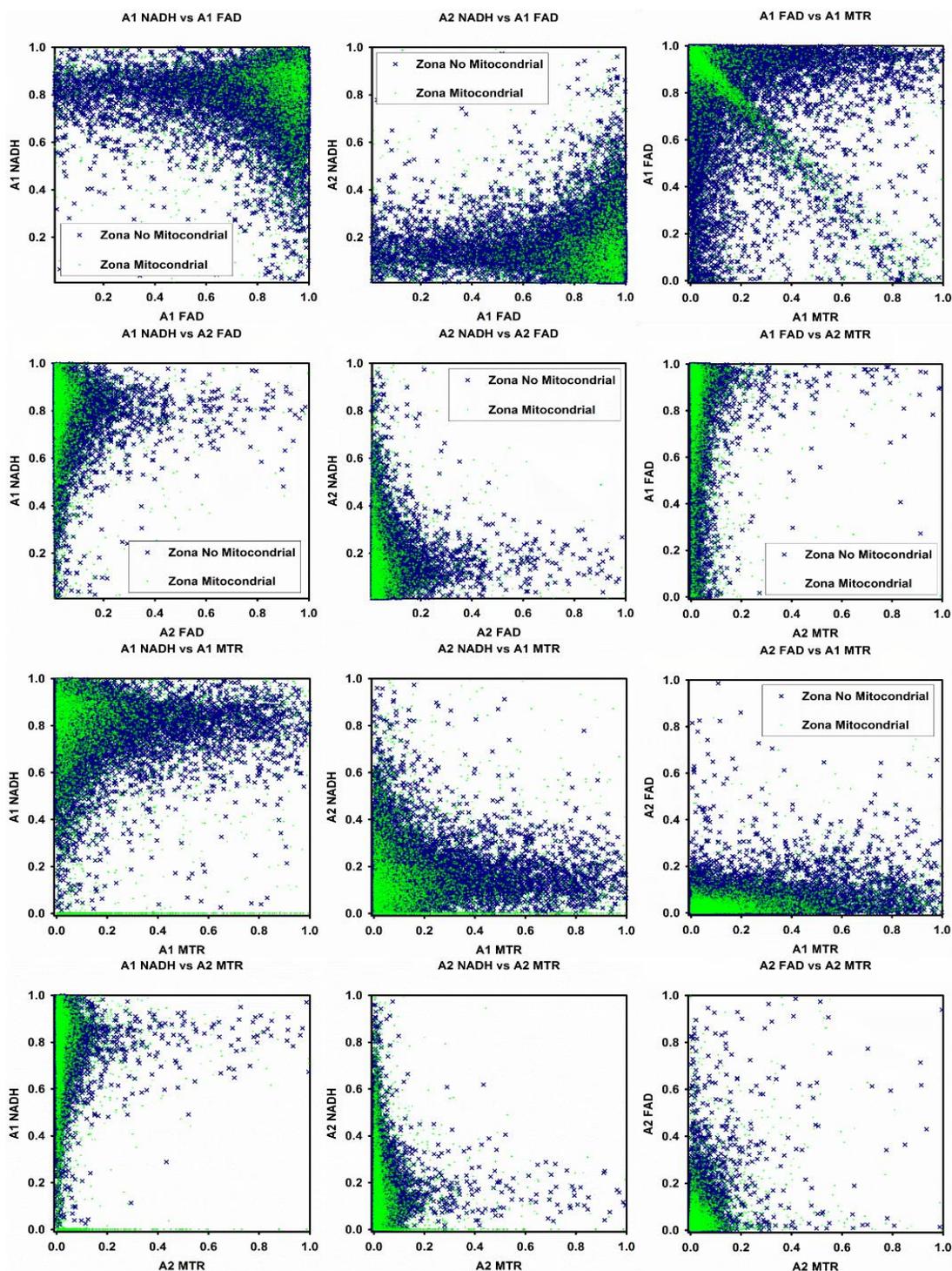


Figura 5.9 Gráficas de correlación entre cromóforos. Izquierda: Componente rápida de NADH. Centro: Componente lenta de NADH. Derecha: FAD.

6. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Los resultados mostrados en esta investigación muestran que la técnica de FLIM nos ofrece la oportunidad de distinguir distintas zonas diferenciadas dentro de las células, ya que los cromóforos estudiados van a presentar diversos tiempos de vida de fluorescencia dependiendo de las conformaciones moleculares que se vean más favorecidas con el microambiente en el que se encuentren.

Por otro lado, debido a la asociación de los cromóforos nativos con distintas redes metabólicas, es posible establecer un procedimiento para estudiar cambios en el metabolismo de una célula. Esto puede servir como un procedimiento estándar para estudiar los efectos de fármacos nuevos.

Sin embargo, hemos reconocido que la sensibilidad de la técnica de FLIM no es suficiente para estudios que pretendan abarcar las redes metabólicas complejas. Es por eso que se sugiere el uso de técnicas auxiliares como la resonancia magnética nuclear (RMN) enfocada en metabolómica, ya que ésta permite la identificación de un mayor número de moléculas; con toda esta información —la obtenida por FLIM y RMN—, y utilizando modelos quimiométricos, será posible la reconstrucción de, lo que denomino, una *historia metabólica*; es decir, los cambios metabólicos inducidos por un determinado tratamiento.

También se está trabajando en la incorporación de un sistema láser de Titanio:Zafiro con el fin de realizar la excitación multifotónica. Esto garantizaría una mayor localización de la excitación, permitiría un mayor grado de penetración de la radiación en la muestra con lo que se podría aplicar en sistemas más complejos que un cultivo celular de monocapa y, además, sería el único sistema en el mundo con la capacidad de realizar escaneos con excitación UV e Infrarrojo al mismo tiempo.

En un futuro, con base en la instalación de otros dos canales de detección, podría ser posible implementar la generación de imágenes con base en anisotropías asociadas a la emisión de las muestras.⁴⁰ En este caso, la señal de fluorescencia procedente del plano focal de la muestra se hace pasar por un polarizador para separar las componentes con orientación horizontal y vertical. La diferencia en intensidades observadas de estas dos imágenes nos brindan información acerca de las componentes *rotacionales* de los eventos de fluorescencia ocurridos, lo cual nos sirve para asociar los valores de tiempo de vida observados a la asociación de un fluoróforo —NADH o FAD— con una proteína específica, ya que cada complejo proteínico es diferente entre sí y, por lo tanto, las variaciones de las interacciones con cada cromóforo responderán a sus conformaciones estructurales.

7. REFERENCIAS

1. Karlsson, R., Milestone 1. (1595) Invention of the microscope. The beginning. *Nat Cell Biol* **2009**, *11*, S6.
2. Yu, Q.; Heikal, A. A., Two-photon autofluorescence dynamics imaging reveals sensitivity of intracellular NADH concentration and conformation to cell physiology at the single-cell level. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **2009**, *95* (1), 46-57.
3. Alberts, B.; Bray, D.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Watson, J., *Molecular biology of the cell*. Garland Pub. Inc., London: 2014.
4. Ghukasyan, V. V.; Heikal, A. A., *Natural biomarkers for cellular metabolism: biology, techniques, and applications*. CRC Press: 2014.
5. Drozdowicz-Tomsia, K.; Anwer, A. G.; Cahill, M. A.; Madlum, K. N.; Maki, A. M.; Baker, M. S.; Goldys, E. M., Multiphoton fluorescence lifetime imaging microscopy reveals free-to-bound NADH ratio changes associated with metabolic inhibition. *Journal of biomedical optics* **2014**, *19* (8), 086016.
6. Braslavsky, S. E., Glossary of terms used in photochemistry, (IUPAC Recommendations 2006). *Pure and Applied Chemistry* **2007**, *79* (3), 293-465.
7. Becker, W., *Advanced time-correlated single photon counting techniques*. Springer Science & Business Media: 2005; Vol. 81.
8. Marcu, L.; French, P. M.; Elson, D. S., *Fluorescence lifetime spectroscopy and imaging: principles and applications in biomedical diagnostics*. CRC Press: 2014.
9. Periasamy, A.; Clegg, R. M., *FLIM microscopy in biology and medicine*. Chapman and Hall/CRC: 2009.
10. Baldeweck, T.; Balu, M.; Batista, A.; Vecker, W.; Belousov, V. V.; Breinig, H. G.; Breymayer, J.; Brizion, S.; Castello, M.; Chandra, D., *Multiphoton Microscopy and Fluorescence Lifetime Imaging: Applications in Biology and Medicine*. Walter de Gruyter GmbH & Co KG: 2018.
11. Lakowicz, J. R., *Principles of fluorescence spectroscopy*. Springer Science & Business Media: 2013.
12. Wardle, B., *Principles and applications of photochemistry*. John Wiley & Sons: 2009.
13. Klessinger, M.; Michl, J., *Excited states and photochemistry of organic molecules*. Wiley-VCH: 1995.
14. Kasha, M., Characterization of electronic transitions in complex molecules. *Discussions of the Faraday society* **1950**, *9*, 14-19.
15. Abbe, E., Beiträge zur Theorie des Mikroskops und der mikroskopischen Wahrnehmung. *Archiv für mikroskopische Anatomie* **1873**, *9* (1), 413-418.
16. Gray, N., Milestone 3. (1873) Diffraction limit theory. Knowing the limit. *Nat Cell Biol* **2009**, *11*, S9.
17. Pawley, J., *Handbook of biological confocal microscopy*. Springer Science & Business Media: 2010.
18. Airy, G. B., On the diffraction of an object-glass with circular aperture. *Transactions of the Cambridge Philosophical Society* **1835**, *5*, 283.
19. Minsky, M., Memoir on inventing the confocal scanning microscope. *Scanning* **1988**, *10* (4), 128-138.
20. Bastiaens, P. I.; Squire, A., Fluorescence lifetime imaging microscopy: spatial resolution of biochemical processes in the cell. *Trends in cell biology* **1999**, *9* (2), 48-52.
21. Suhling, K.; Hirvonen, L. M.; Levitt, J. A.; Chung, P.-H.; Tregidgo, C.; Le Marois, A.; Rusakov, D. A.; Zheng, K.; Ameer-Beg, S.; Poland, S., Fluorescence lifetime imaging (FLIM): Basic concepts and some recent developments. *Medical Photonics* **2015**, *27*, 3-40.
22. Andrae, R.; Schulze-Hartung, T.; Melchior, P., Dos and don'ts of reduced chi-squared. *arXiv preprint arXiv:1012.3754* **2010**.
23. Koenig, K.; Riemann, I., High-resolution multiphoton tomography of human skin with subcellular spatial resolution and picosecond time resolution. *Journal of biomedical optics* **2003**, *8* (3), 432-440.
24. Ramanujam, N., Fluorescence spectroscopy of neoplastic and non-neoplastic tissues. *Neoplasia* **2000**, *2* (1-2), 89-117.
25. Richards-Kortum, R.; Sevick-Muraca, E., Quantitative optical spectroscopy for tissue diagnosis. *Annual review of physical chemistry* **1996**, *47* (1), 555-606.

26. Schweitzer, D.; Schenke, S.; Hammer, M.; Schweitzer, F.; Jentsch, S.; Birckner, E.; Becker, W.; Bergmann, A., Towards metabolic mapping of the human retina. *Microscopy research and technique* **2007**, *70* (5), 410-419.
27. De Beule, P.; Dunsby, C.; Galletly, N.; Stamp, G.; Chu, A.; Anand, U.; Anand, P.; Benham, C.; Naylor, A.; French, P., A hyperspectral fluorescence lifetime probe for skin cancer diagnosis. *Review of scientific instruments* **2007**, *78* (12), 123101.
28. Ogikubo, S.; Nakabayashi, T.; Adachi, T.; Islam, M. S.; Yoshizawa, T.; Kinjo, M.; Ohta, N., Intracellular pH sensing using autofluorescence lifetime microscopy. *The Journal of Physical Chemistry B* **2011**, *115* (34), 10385-10390.
29. Blinova, K.; Carroll, S.; Bose, S.; Smirnov, A. V.; Harvey, J. J.; Knutson, J. R.; Balaban, R. S., Distribution of mitochondrial NADH fluorescence lifetimes: steady-state kinetics of matrix NADH interactions. *Biochemistry* **2005**, *44* (7), 2585-2594.
30. Yaseen, M. A.; Sakadžić, S.; Wu, W.; Becker, W.; Kasischke, K. A.; Boas, D. A., In vivo imaging of cerebral energy metabolism with two-photon fluorescence lifetime microscopy of NADH. *Biomedical optics express* **2013**, *4* (2), 307-321.
31. König, K., Clinical multiphoton tomography. *Journal of biophotonics* **2008**, *1* (1), 13-23.
32. Lakowicz, J. R.; Szmajcinski, H.; Nowaczyk, K.; Johnson, M. L., Fluorescence lifetime imaging of free and protein-bound NADH. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1992**, *89* (4), 1271-1275.
33. Wakita, M.; Nishimura, G.; Tamura, M., Some characteristics of the fluorescence lifetime of reduced pyridine nucleotides in isolated mitochondria, isolated hepatocytes, and perfused rat liver in situ. *The Journal of Biochemistry* **1995**, *118* (6), 1151-1160.
34. Brochon, J. C.; Wahl, P.; Monneuse-Doublet, M. O.; Olomucki, A., Pulse fluorimetry study of octopine dehydrogenase-reduced nicotinamide adenine dinucleotide complexes. *Biochemistry* **1977**, *16* (21), 4594-4599.
35. Visser, A., Kinetics of stacking interactions in flavin adenine dinucleotide from time-resolved flavin fluorescence. *Photochemistry and photobiology* **1984**, *40* (6), 703-706.
36. Berezin, M. Y.; Achilefu, S., Fluorescence lifetime measurements and biological imaging. *Chemical reviews* **2010**, *110* (5), 2641-2684.
37. Islam, M.; Honma, M.; Nakabayashi, T.; Kinjo, M.; Ohta, N., pH dependence of the fluorescence lifetime of FAD in solution and in cells. *International journal of molecular sciences* **2013**, *14* (1), 1952-1963.
38. Chorvat, D.; Chorvatova, A., Spectrally resolved time-correlated single photon counting: a novel approach for characterization of endogenous fluorescence in isolated cardiac myocytes. *European Biophysics Journal* **2006**, *36* (1), 73-83.
39. Bastiaens, P.; Van Hoek, A.; Benen, J.; Brochon, J.-C.; Visser, A., Conformational dynamics and intersubunit energy transfer in wild-type and mutant lipoamide dehydrogenase from *Azotobacter vinelandii*. A multidimensional time-resolved polarized fluorescence study. *Biophysical journal* **1992**, *63* (3), 839-853.
40. Vishwasrao, H. D.; Heikal, A. A.; Kasischke, K. A.; Webb, W. W., Conformational dependence of intracellular NADH on metabolic state revealed by associated fluorescence anisotropy. *Journal of Biological Chemistry* **2005**, *280* (26), 25119-25126.
41. Bastiaens, P. I.; Van Hoek, A.; Wolkers, W. F.; Brochon, J. C.; Visser, A. J., Comparison of the dynamical structures of lipoamide dehydrogenase and glutathione reductase by time-resolved polarized flavin fluorescence. *Biochemistry* **1992**, *31* (31), 7050-7060.
42. Trautmann, S.; Buschmann, V.; Orthaus, S.; Koberling, F.; Ortmann, U.; Erdmann, R., Fluorescence lifetime imaging (FLIM) in confocal microscopy applications: an overview. *PicoQuant GmbH* **2013**, *29*, 12489.
43. Chance, B.; Legallais, V.; Schoener, B., Metabolically linked changes in fluorescence emission spectra of cortex of rat brain, kidney and adrenal gland. *Nature* **1962**, *195* (4846), 1073.
44. Wu, Y.; Zheng, W.; Qu, J. Y., Sensing cell metabolism by time-resolved autofluorescence. *Optics letters* **2006**, *31* (21), 3122-3124.
45. Mujat, C.; Greiner, C.; Baldwin, A.; Levitt, J. M.; Tian, F.; Stucenski, L. A.; Hunter, M.; Kim, Y. L.; Backman, V.; Feld, M., Endogenous optical biomarkers of normal and human papillomavirus immortalized epithelial cells. *International journal of cancer* **2008**, *122* (2), 363-371.

46. Horilova, J.; Mateasik, A.; Revilla-i-Domingo, R.; Raible, F.; Chorvat Jr, D.; Chorvatova, A. M., Fingerprinting of metabolic states by NAD (P) H fluorescence lifetime spectroscopy in living cells: A review. *Medical Photonics* **2015**, *27*, 62-69.
47. Patalay, R.; Talbot, C.; Alexandrov, Y.; Munro, I.; Neil, M. A.; König, K.; French, P. M.; Chu, A.; Stamp, G. W.; Dunsby, C., Quantification of cellular autofluorescence of human skin using multiphoton tomography and fluorescence lifetime imaging in two spectral detection channels. *Biomedical optics express* **2011**, *2* (12), 3295-3308.
48. Levitt, J. M.; Baldwin, A.; Papadakis, A.; Puri, S.; Xylas, J.; Münger, K.; Georgakoudi, I., Intrinsic fluorescence and redox changes associated with apoptosis of primary human epithelial cells. *Journal of biomedical optics* **2006**, *11* (6), 064012.
49. Bower, A. J.; Marjanovic, M.; Zhao, Y.; Li, J.; Chaney, E. J.; Boppart, S. A., Label-free in vivo cellular-level detection and imaging of apoptosis. *Journal of biophotonics* **2017**, *10* (1), 143-150.
50. Chazotte, B., Labeling mitochondria with MitoTracker dyes. *Cold Spring Harbor Protocols* **2011**, *2011* (8), pdb. prot5648.
51. Meleshina, A. V.; Dudenkova, V. V.; Bystrova, A. S.; Kuznetsova, D. S.; Shirmanova, M. V.; Zagaynova, E. V., Two-photon FLIM of NAD (P) H and FAD in mesenchymal stem cells undergoing either osteogenic or chondrogenic differentiation. *Stem cell research & therapy* **2017**, *8* (1), 15.
52. Drozdowicz-Tomsia, K.; Anwer, A. G.; Cahill, M. A.; Madlum, K. N.; Maki, A. M.; Baker, M. S.; Goldys, E. M., Multiphoton fluorescence lifetime imaging microscopy reveals free-to-bound NADH ratio changes associated with metabolic inhibition. *Journal of biomedical optics* **2014**, *19* (8), 086016.