

**DETERMINACIÓN *IN VITRO* DE LA CONSTANTE DE DISOCIACIÓN (K_d) DEL
COLORANTE MAG-FLUO-4, EN PRESENCIA DE Ca^{2+} y Mg^{2+}**



LEIDY BIBIANA ARANGO ALZATE

TRABAJO DE GRADO

**Presentado como requisito para optar por el título de
BIÓLOGA**

ASESOR

**Juan Camilo Calderón, PhD. Departamento de Fisiología y Bioquímica,
Coordinador Grupo PHYSIS, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia**

COASESOR

**Marco Antonio Giraldo, PhD. Instituto de Física.
Coordinador Grupo de Biofísica, Universidad de Antioquia**

**UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
INSTITUTO DE BIOLOGÍA
SECCIONAL ORIENTE**

2020

Contenido

1. Introducción	9
2. Planteamiento del problema	13
3. Objetivos	15
4. Materiales	15
5. Métodos experimentales	18
6. Resultados	33
7. Discusión	43
8. Conclusiones	48
9. Agradecimientos	48
10. Declaración de conflicto de intereses	49
11. Financiación	49
12. Referencias bibliográficas	50
13. Anexos	55

Lista de tablas

Tabla 1. Soluciones comerciales de Ca^{2+} libre usadas para hallar la K_d del indicador Mag-Fluo-4, identificando su valor de pH y su procedencia.	16
Tabla 2. Soluciones de Ca^{2+} y Mg^{2+} usadas para hallar la K_d del indicador Mag-Fluo-4 calculadas en la plataforma MAXCHELATOR.....	17
Tabla 3. Soluciones de HCl y NaOH usadas en los ensayos para ajustar el pH.....	20
Tabla 4. Cálculos para preparación de soluciones a diferentes concentraciones de Ca^{2+} ...	24
Tabla 5. Potenciales de soluciones con concentraciones de Ca^{2+} conocidas y desconocidas.	25
Tabla 6. Ejemplo de elaboración de tablas usadas en las diferentes lecturas de fluorescencia.	28
Tabla 7. Soluciones usadas en el ensayo final para hallar la K_d	30
Tabla 8. Ejemplo de tablas realizadas en OriginPro-8 para el análisis de datos.	31
Tabla 9. Ejemplo de tablas realizadas en OriginPro-8 para el análisis de datos y realización de gráficas para K_d	31
Tabla 10. Concentraciones de Ca^{2+} de soluciones problema obtenidas con electrodo selectivo de Ca^{2+}	39
Tabla 11. Normalización de datos para K_d obtenidas por duplicado en 3 mediciones repetidas realizadas cada 7 días	40
Tabla 12. K_d obtenidas por duplicado en 3 mediciones repetidas realizadas cada 7 días. ...	40

Lista de figuras

Figura 1. Estructura molecular del colorante Mag-Fluo-4	11
Figura 2. Espectro de fluorescencia del colorante Mag-Fluo-4, según el fabricante..	11
Figura 3. Comparación de la cinética de transitorios de Ca^{2+} en fibras musculares de ratón adulto cargadas con diferentes indicadores fluorescentes	14
Figura 4. Diseño experimental para obtener la K_d del Mag-Fluo-4 y calibrar las señales para diferentes estequiometrías.	20
Figura 5. Página de MAXCHELATOR usada para determinar la cantidad de Ca^{2+} a agregar en cada solución.....	21
Figura 6. Ejemplo de resultados arrojados por la plataforma MAXCHELATOR mediante el cálculo de la concentración de Ca^{2+} unido.	22
Figura 7. Interfaz de MAXCHELATOR, en la cual se observan los factores que se tienen en cuenta para realizar los cálculos de las soluciones con Ca^{2+} y Mg^{2+}	23
Figura 8. Metodología empleada para ensayos de fluorescencia.	26
Figura 9. Diagrama de flujo de ensayos de lectura de fluorescencia de Mag-Fluo-4 con soluciones a diferentes concentraciones de Ca^{2+}	28
Figura 10. Pasos ejecutados en OriginPro-8 para obtener el valor de K_d mediante el uso de la ecuación de Boltzmann.	32
Figura 11. Determinación de la longitud de onda de emisión máxima excitando a diferentes longitudes de onda.....	34
Figura 12. Mediciones realizadas para analizar el cambio de fluorescencia en el tiempo. .	34
Figura 13. Espectro de fluorescencia para diferentes concentraciones de Ca^{2+} por duplicado	35
Figura 14. Espectro de fluorescencia para diferentes concentraciones de Ca^{2+} promedio..	36
Figura 15. K_d preliminar estimado mediante la ecuación de Boltzmann.	37
Figura 16. Gráfica patrón con electrodo selectivo de Ca^{2+}	38
Figura 17. Reproducibilidad del K_d en lectura de soluciones de Ca^{2+} por duplicado.....	41
Figura 18. Valor del K_d obtenido de una gráfica promedio de los 3 ensayos realizados	41
Figura 19. Transitorio de Ca^{2+} provisto por Milán et al., 2020 para la calibración.....	42
Figura 20. Comparación de calibración para diferentes estequiometrías.....	43

Lista de anexos

Anexo 1. Comparación de espectro de emisión de fluorescencia de Mag-Fluo-4 en H ₂ O destilada (a) y en tyrode 50000 μM Ca ²⁺ (b).....	55
Anexo 2. Espectros de emisión tomados con el equipo FluoroMax-4 HORIBA scientific de soluciones de Mag-Fluo-4 con soluciones de Ca ²⁺ a diferentes concentraciones.	56
Anexo 3. Datos normalizados en Origin, con los que se realizó la K _d promedio de Ca ²⁺ en la figura 18.....	64
Anexo 4. Coeficiente de variación vs concentración de Ca ²⁺ en medidas repetidas de fluorescencia.....	56

ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxirribonucleico

AEC: Acoplamiento excitación-contracción

AM: Acetoximetiléster

ATP: Adenosina trifosfato

Ca²⁺: Ion Calcio libre

CNSG: Centro Nacional de Secuenciación Genómica

DHPR: Receptores de dihidropiridina

FDB: Flexor Digitorum Brevis

KCl: Cloruro de Potasio

K_d: Constante de disociación

Mg²⁺: Ion Magnesio libre

RyR: Receptores de rianodina

RS: Retículo sarcoplásmico

UA: Unidades arbitrarias

Determinación *in vitro* de la constante de disociación (K_d) del colorante Mag-Fluo-4, en presencia de Ca^{2+} y Mg^{2+}

Leidy Bibiana Arango Alzate¹, Marco A. Giraldo², Juan C. Calderón³

¹Grupo de Investigación en Fisiología y Bioquímica-PHYSIS, Instituto de Biología, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Antioquia, Seccional Oriente, Carmen de Viboral.

²Grupo de Biofísica, Instituto de Física, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.

³Grupo de Investigación en Fisiología y Bioquímica-PHYSIS, Departamento de Fisiología y Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.

Resumen

El adecuado control de las concentraciones de Calcio (Ca^{2+}) intracelular es de vital importancia en el fenómeno de acoplamiento excitación-contracción (AEC) de músculo esquelético en mamíferos. La dinámica de estas concentraciones (i.e. sus valores en el tiempo) ha sido registrada de manera cuantitativa haciendo uso de indicadores fluorescentes de Ca^{2+} en fibras de músculo esquelético. Para esto es necesario conocer la constante de disociación (K_d) del indicador, la cual es una medida de la fuerza de la unión entre el colorante y los iones de Ca^{2+} . Haciendo uso de la naturaleza fluorescente del colorante es posible cuantificar el Ca^{2+} libre en un compartimiento celular como el citoplasma. Esto puede ser determinado asumiendo estequiometrías Ca^{2+} - Colorante de 1:1 y 1:2. Sin embargo, la competencia del Ca^{2+} con otros sitios de unión del colorante es uno de los fenómenos de interés actual en el estudio de la fisiología del músculo cardíaco y esquelético. En particular, la relativa abundancia del ion Mg^{2+} en el citoplasma genera especial interés para avanzar en el objetivo de tener una completa comprensión del fenómeno AEC.

El presente trabajo de grado (en modalidad de investigación) abordó la pregunta ¿Cuál es el valor de K_d *in vitro* para Ca^{2+} del indicador fluorescente Mag-Fluo-4, y cómo cambia en presencia de Mg^{2+} ? Para dar respuesta se propuso determinar la K_d *in vitro* del colorante Mag-Fluo-4 en presencia de diferentes concentraciones de Ca^{2+} y Mg^{2+} y posteriormente comparar el efecto de este K_d sobre calibraciones con estequiometrías 1:1 y 1:2.

Se prepararon soluciones en el laboratorio con la ayuda de un electrodo selectivo de Ca^{2+} , sin embargo, no se obtuvieron resultados confiables con este proceso y se procedió a trabajar con 12 soluciones comerciales con concentraciones de Ca^{2+} libre entre 10 nM y 10 mM. Se llevaron a cabo mediciones a 20 °C con la técnica de espectrofluorimetría y la amplitud de las señales en función de la concentración de Ca^{2+} se ajustó con la ecuación sigmoidea de Boltzmann. Se obtuvo un valor de $K_d = 111,9 \mu\text{M}$. En las calibraciones para estequiometrías 1:1 y 1:2 se obtuvieron concentraciones citoplasmáticas de Ca^{2+} de $\sim 11 \mu\text{M}$ y $\sim 0,037 \mu\text{M}$, respectivamente. Se concluye que no es confiable usar soluciones preparadas en nuestro laboratorio aún, por causas externas como agua con altas concentraciones de Ca^{2+} , que el alto valor de K_d obtenido confirma la baja afinidad del colorante por Ca^{2+} y que la estimación de la concentración citoplásmica de Ca^{2+} depende fuertemente de la estequiometría de la reacción Ca^{2+} -colorante.

Palabras clave: Ca^{2+} , Constante de disociación (K_d), Calibración *in vitro*, Mag-Fluo-4, espectro de fluorescencia.

1. Introducción

Estudio del acoplamiento excitación-contracción con colorantes fluorescentes

El adecuado control de las concentraciones de Ca^{2+} es de vital importancia en el fenómeno de acoplamiento excitación-contracción (AEC) del músculo esquelético en mamíferos. El aumento en la concentración de Ca^{2+} en el medio intracelular puede generar una contracción o también daños que llevan incluso a apoptosis, mientras que una disminución puede causar pérdida de sensibilidad y disminuir las interacciones óptimas entre filamentos (Calderón, Bolaños, & Caputo, 2014b; Gommans, Vlak, de Haan, & van Engelen, 2002; Meissner, 1994).

El proceso fisiológico denominado AEC en el músculo esquelético es resultado de un potencial de acción que viaja hacia el sistema de túbulos T, allí son activados receptores de dihidropiridina (DHPR) y posteriormente receptores de rianodina (RyR), ubicados en el retículo sarcoplásmico (RS) de las células. Estas interacciones generan la liberación de iones de Ca^{2+} en el citosol, los cuales se unen a la troponina C y ésta a su vez genera cambios en la troponina I, involucrada en la inhibición de la unión de la actina a la miosina en ausencia de Ca^{2+} . De esta manera se favorece la interacción entre actina y miosina, proceso que genera la contracción del músculo (Calderón et al., 2014b; Gommans, Vlak, De Haan, & Van Engelen, 2002; Rivera Tejió & Garrido Pertierra, 2006; Sandow, 1952).

La relajación del músculo se obtiene a partir de los mecanismos de recaptura del Ca^{2+} a través de tampones de Ca^{2+} como: troponina, adenosín trifosfato (ATP), parvalbúmina y bomba de Ca^{2+} del RS (SERCA) (Anthony Lai, Erickson, Rousseau, Liu, & Meissner, 1988; Baylor & Hollingworth, 2011).

Las concentraciones de Ca^{2+} intracelular han sido medidas de manera cuantitativa haciendo uso de indicadores fluorescentes de Ca^{2+} en fibras de músculo esquelético. Estos indicadores pueden ser divididos en indicadores de baja y alta afinidad al Ca^{2+} , según el valor de la constante de disociación (K_d) del indicador, la cual refleja qué tan fuerte es la unión del colorante a los iones de Ca^{2+} . La K_d tiene unidades molares que corresponden a las concentraciones de Ca^{2+} a las cuales el indicador está unido con el ion en equilibrio. Esta medida puede estar en un intervalo con variaciones de tres órdenes de magnitud (0,40 nM a 2990 μM) (Baylor & Hollingworth, 2011; Paredes, Etzler, Watts, Zheng, & Lechleiter, 2008) en indicadores de Ca^{2+} y es dependiente de la velocidad de reacción del indicador con Ca^{2+}

o de otros iones como Mg^{2+} , así como de otros parámetros: pH, temperatura, viscosidad, fuerza iónica y presencia de proteínas como parvalbúmina, calbindina-D28K, calretinina, calmodulina, albúmina (Baimbridge, Celio, & Rogers, 1992; Grynkiewicz, Poenie, & Tsien, 1985; Patton, Thompson, & Epel, 2004; Wilson, 2010; Zhao, Hollingworth, & Baylor, 1996). La K_d de un indicador *in vitro* presenta variación frente a la que se puede obtener *in vivo*, dado que en la célula las variables de pH, temperatura, viscosidad, fuerza iónica y unión de proteína con otros iones como Mg^{2+} , suelen ser diferentes a las logradas en un tubo de ensayo (Baylor & Hollingworth, 2011).

Otra variable para clasificar los colorantes es según sus longitudes de onda de excitación y emisión. Estas permiten dividir los indicadores de Ca^{2+} en relacionométricos y no relacionométricos (Grynkiewicz et al., 1985; Wilson, 2010), por lo que su uso se restringe al tipo de estudio a realizar. Los indicadores pueden usarse en diferentes presentaciones químicas según la necesidad; pueden conseguirse en forma de sal, conjugados de dextrano o acetoximetiléster (AM). De éstos la sal es la presentación más simple; sin embargo, para cargar esta forma de los indicadores de Ca^{2+} en las células, es necesario hacer uso de técnicas invasivas como: microinyección, difusión por pipetas de *patch clamp*, electroporación y lipotransferencia usando liposomas. La forma AM es la menos invasiva y más utilizada en el mundo, pues difunde fácilmente a través de la membrana celular (Calderón et al., 2014b).

Se ha propuesto que los colorantes de baja afinidad por el Ca^{2+} son aquellos que presentan un valor de K_d para Ca^{2+} mayor a $25 \mu M$ (Baylor & Hollingworth, 2011). Estos son los más indicados para estudiar el AEC como lo ha mostrado nuestro Grupo (Calderón et al., 2014b), usando ampliamente el colorante Mag-Fluo-4 (Calderón, Bolaños, & Caputo, 2014a; Calderón, Bolaños, Torres, Rodríguez-Arroyo, & Caputo, 2009; Thai et al., 2011) el cual facilita la obtención de señales rápidas que siguen la cinética de liberación de Ca^{2+} del RS. Su fórmula molecular es la siguiente (Fig. 1):



Figura 1. Estructura molecular del colorante Mag-Fluo-4. Forma AM de la molécula. Tomado de (Invitrogen, 2005).

El Mag-Fluo-4 puede excitarse con luz visible y se caracteriza porque al unirse al Ca^{2+} , la longitud de onda a la cual presenta la máxima excitación o emisión no cambia con respecto a la concentración; este colorante presenta cambios solamente en la intensidad de fluorescencia. El espectro de emisión de fluorescencia para la molécula Mag-Fluo-4 se muestra en la figura 2:

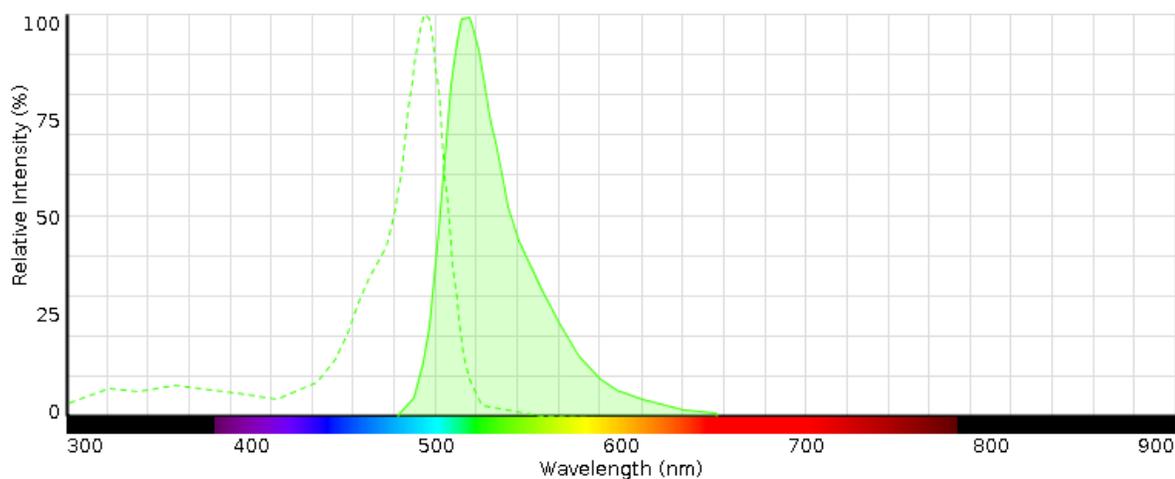


Figura 2. Espectro de fluorescencia del colorante Mag-Fluo-4, según el fabricante. Se observa que tanto la excitación como la emisión son en el rango de luz visible con picos en luz azul y verde respectivamente. Tomada de (Invitrogen, 2005).

Los fenómenos luminiscentes moleculares como fluorescencia, fosforescencia, quimioluminiscencia (González Pérez, 2002), proveen información valiosa para el análisis

de los indicadores de Ca^{2+} . La fluorescencia es un proceso por medio del cual los electrones de una muestra son excitados a un nivel de energía superior, a través de la absorción de radiación, lo cual genera una liberación de energía corta en el tiempo, que pone en evidencia la fluorescencia del colorante. Paso seguido, los resultados obtenidos de fluorescencia se analizan mediante el uso de la técnica de espectrofluorimetría, que es ampliamente aplicada en el estudio de fluoróforos, al igual que en estudios moleculares tales como: análisis de medicamentos, interacciones biomoleculares, relaciones entre estructura y función, secuenciación de ácido desoxirribonucleico (ADN), caracterización genómica, entre otros (Skoog, Holler, & Crouch, 2008).

Haciendo uso de la propiedad fluorescente del colorante, es posible cuantificar el Ca^{2+} libre en un compartimiento celular como el citoplasma. Así, para un colorante cualquiera (D), que reacciona con el Ca^{2+} mediante una estequiometría 1:1, la ecuación se representa de la siguiente manera:



Partiendo de esta relación, y según Grynkiewicz *et al.*, (1985), la concentración de Ca^{2+} depende del K_d , así como de la fluorescencia máxima del colorante (F_{max}), la mínima (F_{min}), y la medida durante el experimento en condiciones fisiológicas (F):

$$[Ca] = K_d \frac{[CaD]}{[D]} = K_d \frac{(F - F_{min})}{(F_{max} - F)} \quad (2)$$

Donde la constante de disociación es (habiendo considerado la ley de acción de masas y en el estado de equilibrio):

$$k_d = \frac{[D][Ca]}{[CaD]} \quad (3)$$

En el evento en que la relación estequiométrica Ca^{2+} -colorante (D) sea 1:2, la ecuación se puede escribir como:



Se define la K_d como:

$$K_d = \frac{[Ca^{2+}][D^2]}{[CaD_2]} \quad (5)$$

Según Rincón *et al.*, 2020 (en preparación), para esta estequiometría, la concentración de Ca^{2+} se puede estimar conociendo diversos parámetros de fluorescencia (F) y la concentración del colorante intracelular $[D]_T$:

$$[Ca^{2+}] = K_d \frac{[CaD_2]}{[D^2]} = \frac{K_d (F-F_{min})(F_{max}-F_{min})}{[D]_T 2(F_{max}-F)^2} \quad (6)$$

A pesar de que tanto nuestro grupo y otros en el mundo han medido señales rápidas de fluorescencia con el indicador de Ca^{2+} de baja afinidad Mag-Fluo-4 (Calderón, Bolaños, & Caputo, 2011; Caputo, Bolaños, & Gonzalez, 2004), no se ha llevado a cabo una caracterización confiable de sus propiedades *in vitro* y se desconoce la estequiometría de la reacción. El proveedor proporciona una K_d para el Ca^{2+} de 22 μ M a 22 °C, así como un pico de excitación a los 490 nm y un pico máximo de emisión a los 517 nm (Invitrogen, 2005). Empero, otros investigadores han reportado valores distintos. (Calderon, Raigosa, Giraldo, Bolaños, & Caputo, 2013) reportaron un K_d de 21,6 μ M, 27,8 μ M, y 29,1 μ M en presencia de 0, 1 y 2 mM de Mg^{2+} respectivamente. En Estados Unidos (Stephen Hollingworth, Gee, & Baylor, 2009) reportaron un K_d de 70 μ M a 21 °C, y un grupo en Uruguay (Olivera & Pizarro, 2018) determinó una K_d de 90 μ M usando soluciones de Ca^{2+} a 0 μ M, 20 μ M, 100 μ M, 10 mM a 20 °C. La disparidad de datos de K_d para Ca^{2+} , así como la ausencia de datos sobre el efecto del Mg^{2+} sobre esta K_d , justifican su estudio y una calibración rigurosa de las señales de fluorescencia a $[Ca^{2+}]$ según las dos estequiometrías de reacción más probables: 1:1 y 1:2.

2. Planteamiento del problema

El colorante Mag-Fluo-4 ha permitido realizar numerosos estudios acerca de la cantidad de Ca^{2+} presente en el músculo esquelético, por su rapidez y alta eficacia en el seguimiento de la cinética de Ca^{2+} intracelular, como se deduce al comparar con otros colorantes como Fura-2, Fluo-3 y Fluo-4 (Fig. 3) (Calderón *et al.*, 2014).

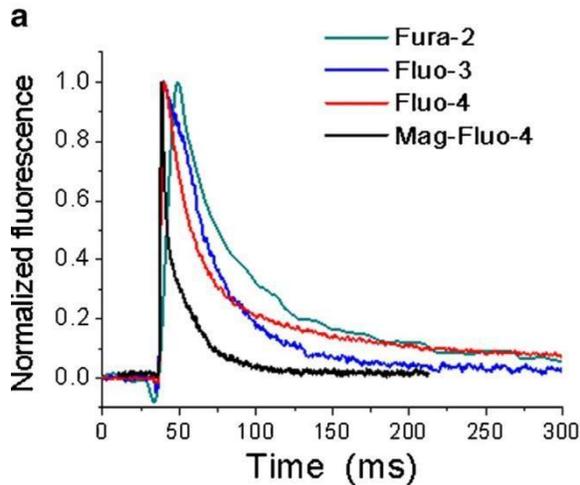


Figura 3. Comparación de la cinética de transitorios de Ca^{2+} en fibras musculares de ratón adulto cargadas con diferentes indicadores fluorescentes. Al normalizar los transitorios obtenidos con todos los colorantes (Fura-2, Fluo-3, Fluo-4, Mag-Fluo-4), se puede observar que la señal más rápida es la de Mag-Fluo-4 y la más lenta la de Fura-2. Tomado de Calderón *et al.*, 2014.

Sin embargo, hasta el momento no ha sido posible realizar una calibración para conocer la concentración de Ca^{2+} según la fluorescencia emitida para este colorante, debido a que en la ecuación del equilibrio entre el indicador y el Ca^{2+} se desconoce el valor de K_d bajo diferentes condiciones experimentales.

Dada la limitación descrita anteriormente, varios grupos incluido el nuestro, han reportado el contenido de Ca^{2+} intracelular, como niveles asociados a la intensidad de fluorescencia del indicador de estudio (Calderón, Bolaños, & Caputo, 2010; Stephen Hollingworth, Kim, & Baylor, 2012).

Para el caso específico del Mag-Fluo-4, la estequiometría de la reacción con el Ca^{2+} se desconoce. Asumiendo que sea 1:1 o 1:2, las ecuaciones de calibración son la (2) y la (6), como se presentó previamente.

De dichas ecuaciones se deduce que es necesario conocer la K_d para estimar las concentraciones de Ca^{2+} intracelulares. Con el presente proyecto buscamos responder las preguntas: ¿Cuál es la K_d *in vitro* del indicador Mag-Fluo-4 y cómo cambia ésta en presencia de Mg^{2+} ? y ¿cómo cambia la concentración de Ca^{2+} citoplasmático según la estequiometría de la reacción Ca^{2+} -colorante cuando utilizamos el mismo K_d en la calibración? Esto lo

podríamos aplicar en el futuro para hallar respuestas a preguntas como: ¿cuál es la cinética de la interacción del Ca^{2+} con las proteínas citoplasmáticas que lo unen, como la SERCA presente en el RS u organelas intracelulares como las mitocondrias?, ¿cuál es la diferencia de la liberación de Ca^{2+} que hay entre los tipos de fibras musculares?, ¿cuáles son los cambios cuantitativos de Ca^{2+} que hay cuando las fibras se fatigan?

3. Objetivos

3.1. Objetivo General

Determinar la K_d *in vitro* del colorante Mag-Fluo-4 en presencia de diferentes concentraciones de Ca^{2+} y Mg^{2+} y comparar el efecto de este K_d sobre calibraciones con estequiometrías 1:1 y 1:2.

3.2. Objetivos específicos

3.2.1. Determinar los espectros de fluorescencia de soluciones *in vitro* con Mag-Fluo-4 a diferentes concentraciones de Ca^{2+} en ausencia y presencia de Mg^{2+} .

3.2.2. Calcular la K_d de Mag-Fluo-4 a partir de las gráficas obtenidas empleando la técnica de espectrofluorimetría en las soluciones *in vitro*.

3.2.3. Determinar la concentración de Ca^{2+} citoplasmático en el músculo esquelético según las estequiometrías de reacción 1:1 y 1:2.

4. Materiales

4.1. Soluciones y reactivos

4.1.1. Indicador Mag-Fluo-4

El indicador fluorescente utilizado para los ensayos fue la sal tetrapotásica Mag-Fluo-4 a una concentración final de 10 μM , partiendo de una solución 1 mM procedente de una solución patrón 15 mM (M14205 lote 1834356, Thermo Fisher Scientific, USA) diluida en agua desionizada proporcionada por el Centro Nacional de Secuenciación Genómica (CNSG).

4.1.2. Soluciones de Ca^{2+}

Inicialmente se prepararon soluciones en el laboratorio con ayuda de un electrodo selectivo de Ca^{2+} , como se describe más adelante en la sección 5.2.1. Simultáneamente, se utilizaron

los kits CALBUF-2 (lote:6J WPI, USA) y CALBUF 1 (lote:1101K de WPI, USA) como patrón de Ca^{2+} y como base para preparar las soluciones con Ca^{2+} y Mg^{2+} . (Tabla 1).

Tabla 1. Soluciones comerciales de Ca^{2+} libre usadas para hallar la K_d del indicador Mag-Fluo-4, identificando su valor de pH y su procedencia. Fuerza iónica 0,15 M, temperatura 20 °C.

Concentración Ca^{2+}	pH	Kit
10 nM	7,82	CALBUF-2
40 nM	7,52	
100 nM	7,31	
250 nM	7,11	
500 nM	8,03	
1 μM	7,73	
4 μM	7,13	
10 μM	6,75	
40 μM	7,84	
100 μM	7,44	
1 mM	7,3	CALBUF-1
10 mM	7,3	

4.1.3. Soluciones de Ca^{2+} y Mg^{2+}

Se realizaron los cálculos respectivos haciendo uso de la plataforma MAXCHELATOR en línea: Two Chelator, two metal calculators.

(<https://somapp.ucdmc.ucdavis.edu/pharmacology/bers/maxchelator/CaMgATPEGTA-NIST.htm>) como se explica más adelante en la sección 5.2. Las soluciones a usar se muestran en la tabla 2.

Tabla 2. Soluciones de Ca^{2+} y Mg^{2+} usadas para hallar la K_d del indicador Mag-Fluo-4 calculadas en la plataforma MAXCHELATOR. Se muestra la concentración de los iones, el valor de pH, temperatura y fuerza iónica. Téngase en cuenta que la tabla presenta concentraciones molares a excepción de la primera fila.

$[\text{Ca}^{2+}]$ libre	10 nM	40 nM	100 nM	250 nM	500 nM	1 μM	4 μM	10 μM	40 μM	100 μM	1 mM	10 mM
$[\text{Ca}^{2+}]$ libre	1E-08	4E-08	1E-07	3E-07	5E-07	1E-06	4E-06	1E-05	4E-05	0,0001	0,001	0,01
$[\text{Ca}^{2+}]$ total según Maxchelator	0,00414	0,00466	0,0047	0,0048	0,0099	0,0098	0,009	0,0088	0,01	0,0101	0,011	0,02
pH	7,82	7,52	7,31	7,11	8,03	7,73	7,13	6,75	7,84	7,44	7,3	7,3
Temperatura (°C)	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
Fuerza iónica	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,1	0,1
$[\text{Mg}^{2+}]$ libre	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001
$[\text{Mg}^{2+}]$ total según Maxchelator	0,00248	0,00162	0,0014	0,0012	0,0011	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001

4.2. Equipos

4.2.1. Lector de fluorescencia

Se hizo uso del espectrofluorímetro Varioskan LUX de Thermo Fisher Scientific (Thermoscientific, 2016).

4.2.2. Electrodo de Ca^{2+}

Se realizaron los ensayos con el electrodo de membrana polímero combinado de Ca^{2+} (Referencia: 6.0510.100) y el pH metro modelo 913 (serial: 1913001011042), ambos de marca Metrohm, de procedencia suiza.

4.2.3. Medidor de temperatura

Se utilizó un termómetro marca OAKTON (Código: Temp 4, USA), para controlar la temperatura ambiente y la temperatura de las soluciones.

5. Métodos experimentales

5.1. Diseño general del estudio

Dado que el presente estudio no requiere muestras humanas o de otros animales no fue necesaria la aprobación de un comité de ética.

Para el cumplimiento de los objetivos se llevaron a cabo las tareas ilustradas en la figura 4. Se realizaron cálculos y se prepararon soluciones a diferentes concentraciones de Ca^{2+} , Ca^{2+} - Mg^{2+} , se midió la temperatura y se ajustó el pH, para posteriormente medir la concentración de Ca^{2+} con un electrodo selectivo. En forma paralela se utilizaron kits con soluciones de calibración comerciales como referencia. Seguidamente, se aplicaron las soluciones en placas para lectura en equipo de espectrofluorimetría y se realizaron las gráficas respectivas. Finalmente, se analizaron y reemplazaron los datos obtenidos en las ecuaciones de interés (ecuaciones 2 y 6).

Pipeteo, medida de pH y temperatura



$[Ca^{2+}]$
 $[Ca^{2+}Mg^{2+}]$



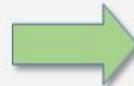
20 °C



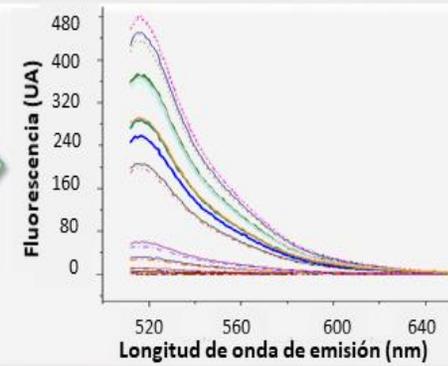
Lectura de fluorescencia



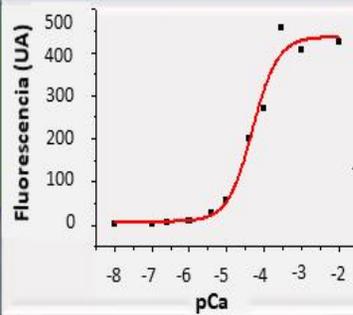
Equipo Varioskan LUX



Excitación: 494 nm
Emisión: 512 nm – 650 nm



Hallazgo y aplicación de K_d



K_d

$[Ca^{2+}]$

$[Ca^{2+}Mg^{2+}]$



$$[Ca^{2+}] = K_d \frac{(F - F_{min})}{(F_{max} - F)}$$

$$[Ca^{2+}] = K_d \frac{[CaD_2]}{[D^2]} = \frac{K_d (F - F_{min})(F_{max} - F_{min})}{[D]_T 2(F_{max} - F)^2}$$

Figura 4 (página anterior). Diseño experimental para obtener la K_d del Mag-Fluo-4 y calibrar las señales para diferentes estequiometrías. En el panel superior se ilustra la obtención de las soluciones, sea preparadas en el laboratorio o por compra de kits de calibración comerciales. En el panel del medio la adquisición de señales de fluorescencia. En el panel inferior el análisis de las señales para obtener el K_d y su aplicación en las ecuaciones de calibración.

5.2. Preparación de soluciones

Para los experimentos de fluorescencia se utilizaron las soluciones de Ca^{2+} de los kits descritos en la sección 4.1.2, a 20 °C. Adicionalmente, se prepararon en el laboratorio del grupo de investigación PHYSIS, soluciones que presentaran concentraciones de Ca^{2+} diferentes a las presentes en el kit de WPI. Para esto se estableció mantener valores estables para los siguientes parámetros: fuerza iónica 0,1 M, temperatura 20 °C y pH 7,2.

Para asegurar la fuerza iónica se trabajó con una solución base de KCl a 150 mM. Para mantener estable la temperatura fue necesario el uso de cavas de hielo dentro de una nevera de icopor y medir constantemente con el termómetro, para controlar la temperatura ambiente y temperatura de la solución.

El pH fue controlado haciendo uso de soluciones de NaOH y HCl (Tabla 3) en agua desionizada proporcionada por CNSG.

Tabla 3. Soluciones de HCl y NaOH usadas en los ensayos para ajustar el pH.

Solución	Concentración
NaOH	3,39 M
	0,56 M
HCl	4,28%

Para las soluciones que se prepararon únicamente con concentraciones de Ca^{2+} libres conocidas, se fijó la concentración de EGTA en 10 mM. Para las soluciones con concentraciones de Ca^{2+} - Mg^{2+} se fijó la concentración de EGTA en 10 mM y la concentración de Mg^{2+} libre en 1 mM.

Teniendo claros todos los parámetros anteriormente mencionados y estableciendo los valores a usar, se realizaron los respectivos cálculos de la cantidad de Ca^{2+} a agregar en cada solución

utilizando la plataforma MAXCHELATOR en la opción Downloads - Two Chelator, two metal calculators (Fig. 5).

MAXCHELATOR

~ Home ~ Other Programs ~ References ~ Constants ~ Understandings ~ FAQ & Disclaimer ~

Downloads and Web Programs

XLS files from 2010 Methods paper.

Web versions that are easy to change constants in. Slight differences in answers are the result of rounding errors in calculations. Javascript is not double precision.

Single Chelator Metal Calculators

MgATP - Free, Total, Bound and Total ATP, constants from NIST database #46 v8 (25°C, 0.1N)
MgATP - Free, Total, Bound and Total ATP, constants from 'Chelator' program (37°C, 0.165N)
CaEGTA - Free, Total, Bound and Total EGTA, constants from NIST database #46 v8 (25°C, 0.1N)
CaEGTA - Free, Total, Bound and Total EGTA, constants from 'Chelator' program (37°C, 0.165N)

Two Chelator, two metal calculators

CaMgATPEGTA - Free & Total, constants from NIST database #46 v8 (25°C, 0.1N)
CaMgATPEGTA - Free & Total, constants from 'Chelator' program (37°C, 0.165N)

EXPERIMENTAL: Two Chelator, two metal calculators w/ pH plot [may not work with IE browser]

CaMgATPEGTA - Free & Total, constants from NIST database #46 v8 (25°C, 0.1N)
CaMgATPEGTA - Free & Total, constants from 'Chelator' program (37°C, 0.165N)

Figura 5. Página de MAXCHELATOR usada para determinar la cantidad de Ca^{2+} a agregar en cada solución. En recuadro rojo se encuentra la opción de la plataforma seleccionada para realizar los respectivos cálculos.

El programa permite ingresar el pH, la fuerza iónica, la temperatura, la concentración de EGTA, concentración de Ca^{2+} y Mg^{2+} libre o unido según el interés del investigador; un ejemplo de esto se observa en la figura 6. En esta figura se observan los datos ingresados al programa para determinar la concentración de Ca^{2+} unido en la solución del kit CALBUF-2 que contenía 10 nM de Ca^{2+} libre.

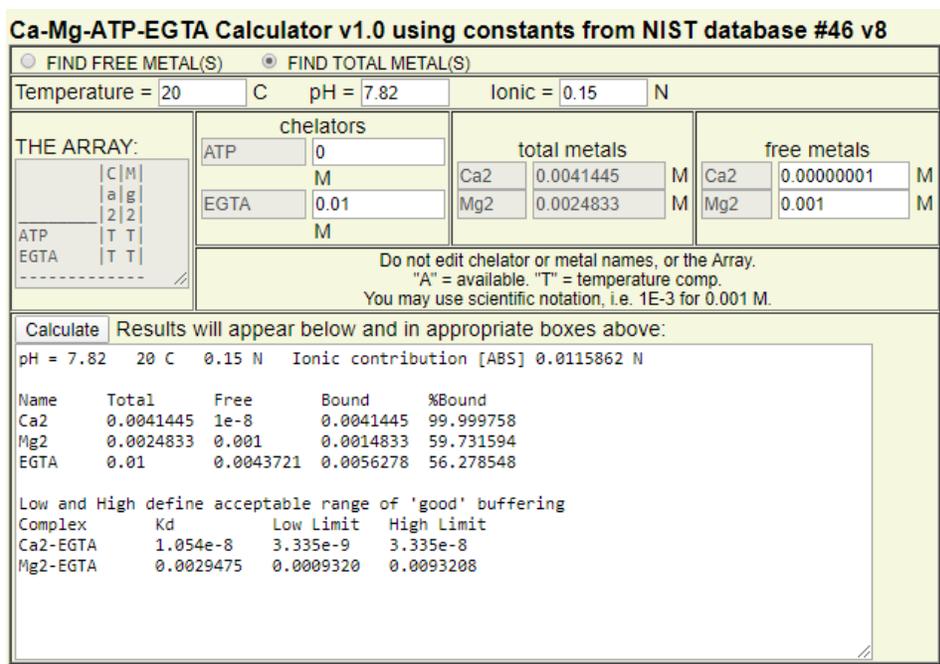


Figura 6. Ejemplo de resultados arrojados por la plataforma MAXCHELATOR mediante el cálculo de la concentración de Ca²⁺ unido. Este ejemplo es de la solución con concentración de Ca²⁺ libre 10 nM del kit CALBUF-2, a una fuerza iónica de 0,15 N, pH 7,82 y temperatura 20 °C.

Teniendo claro lo antes mencionado se ejecutó el siguiente procedimiento para la preparación de las muestras de Ca²⁺ o Ca²⁺-Mg²⁺ según el caso:

1. Se realizó el cálculo de la concentración final de Ca²⁺ en la solución mediante el uso de la plataforma MAXCHELATOR. La Figura 7 muestra la interfaz en la que se pueden observar los parámetros que se tienen en cuenta durante este paso, como son: fuerza iónica, pH, temperatura, concentración de Ca²⁺ libre, concentración de Ca²⁺

total de la solución, concentración de EGTA y Mg^{2+} .

Figura 7. Interfaz de MAXCHELATOR en la cual se observan los factores que se tienen en cuenta para realizar los cálculos de las soluciones con Ca^{2+} y Mg^{2+} . El programa permite seleccionar si se desea hallar la cantidad de Ca^{2+} libre o Ca^{2+} total, en el recuadro rojo se observan las casillas que se deben llenar según la selección de interés.

2. Luego de esto, teniendo en cuenta el volumen de solución a preparar (V_2), las concentraciones de Ca^{2+} total (C_2) arrojadas por MAXCHELATOR y una solución patrón de Ca^{2+} con concentración conocida (C_1), se realizó el cálculo respectivo del volumen de solución patrón de Ca^{2+} a agregar haciendo uso de la siguiente ecuación:

$$C_1 * V_1 = C_2 * V_2 \quad (7)$$
3. Se pesó sobre balanza analítica la cantidad de solutos (EGTA, Ca_2Cl) según la solución a preparar.
4. Se agregó solución de KCl a 150 mM como el solvente a usar en cada caso para ajustar volumen.
5. Se midió y controló el pH.
6. Se midió la cantidad de Ca^{2+} en solución haciendo uso de electrodo selectivo de Ca^{2+} (sección 5.3), a una temperatura constante de 20 °C.

Los valores obtenidos de las soluciones de Ca^{2+} se organizaron en una tabla (Tabla 4) para su preparación, medición con electrodo selectivo de Ca^{2+} y lectura de espectros de

fluorescencia. De la misma forma se organizó una tabla para las soluciones Ca^{2+} - Mg^{2+} (Tabla 2).

Tabla 4. Cálculos para preparación de soluciones a diferentes concentraciones de Ca^{2+} . Los cálculos se realizaron haciendo uso de la plataforma MAXCHELATOR y la preparación se ejecutó en el laboratorio de investigación del grupo PHYSIS U. de A.

Soluciones a preparar	Compuesto	Concentración final de Ca^{2+} total (mM)	Concentración final de Ca^{2+} libre (mM)	Cantidades a pesar (mg)	Volumen final (mL)
Solución 1	Ca^{2+}	10,2874	0,3	75,64	50
	EGTA	10		190	
Solución 2	Ca^{2+}	10,9962	1	80,787	50
	EGTA	10		190	
Solución 3	Ca^{2+}	19,9996	10	146,95	50
	EGTA	10		190	
Solución 4	Ca^{2+}	59,9999	50	440,98	50
	EGTA	10		190	
Solución 5	Ca^{2+}	109,999	100	808,53	50
	EGTA	10		190	

5.3. Medida de Ca^{2+} con electrodo selectivo

Posterior a la preparación de las soluciones se buscó asegurar la concentración de Ca^{2+} calculada haciendo uso de un electrodo de membrana polímero combinado de Ca^{2+} (Referencia: 6.0510.100). El equipo arroja un potencial en mV según la concentración de Ca^{2+} en cada solución.

Se tenían dos grupos de soluciones: soluciones con concentraciones de Ca^{2+} conocidas (CALBUF-2) y soluciones preparadas en el laboratorio del grupo de investigación de PHYSIS. Para este segundo grupo de soluciones se creía conocer la concentración de Ca^{2+} según los cálculos realizados, con este ensayo se buscaba verificar esto. Por tal motivo las soluciones preparadas en el grupo PHYSIS fueron llamadas soluciones problema.

Se realizó una tabla de potenciales de soluciones con concentraciones de Ca^{2+} conocidas para realizar una curva patrón que permitiera hallar la concentración de Ca^{2+} en soluciones problema (Tabla 5). Para esto se sembró 1,2 mL de cada solución de Ca^{2+} en una placa de 24 pozos, se mantuvo una temperatura de 20 °C alrededor de la placa y las soluciones se temperaron a 20 °C. Se midió el potencial de las soluciones enjuagando con agua desionizada entre muestra y muestra. Cada lectura se realizó por triplicado con intervalos de 20 minutos y posterior a esto se halló un potencial promedio por cada solución. Se determinó la desviación estándar para cada punto, el pCa ($-\log [\text{Ca}^{2+}]$) y las concentraciones de Ca^{2+} en cada caso.

Tabla 5. Potenciales de soluciones con concentraciones de Ca^{2+} conocidas y desconocidas. En gris se muestran las soluciones con concentración de Ca^{2+} conocida (datos para gráfica patrón), en naranja se muestran las soluciones problema es decir soluciones con concentraciones de Ca^{2+} desconocidas.

	Potencial equipo (mv) promedio	Desviación estándar	pCa	$[\text{Ca}^{2+}]$ M	$[\text{Ca}^{2+}]$
Valores para gráfica patrón	-351,4	2,465765601	8	0,00000001	10 nM
	-338,3	1,796292478	7	0,0000001	100 nM
	-317,2	0,828653526	6,301029996	0,0000005	500 nM
	-314,6666667	0,38586123	6,124938737	0,00000075	750 nM
	-312,5	0,21602469	6	0,000001	1 μM
	-288,1	0,535412613	5	0,00001	10 μM
	-260,1	1,805547009	4	0,0001	100 μM kit
Valores de soluciones patrón	-225,4	0,326598632	4	0,0001	100 μM patrón 1 M
	-224,7666667	1,713346303	4	0,0001	100 μM
	-223,7333333	0,612825877	3,522878745	0,0003	300 μM patrón 1 M
	-229,27	0,93191559	3,522878745	0,0003	300 μM
	-223,7666667	0,784573486	3	0,001	1000 μM
	-219,3	0,374165739	3	0,001	1000 μM patrón 1 M
	-212,2333333	0,329983165	2,522878745	0,003	3000 μM patrón 1M
	-214,6333333	0,418993503	2,522878745	0,003	3000 μM

5.4. Experimentos de espectrofluorimetría

Se realizaron ensayos iniciales en el equipo de fluorescencia FluoroMax-4 HORIBA scientific del grupo GIBIC en la Universidad de Antioquia seccional oriente con resultados no confiables (Anexos 1-2), por lo cual el resto de las mediciones se llevó a cabo con el Varioskan. El diseño general para los ensayos de espectrofluorimetría se representa en la figura 8.

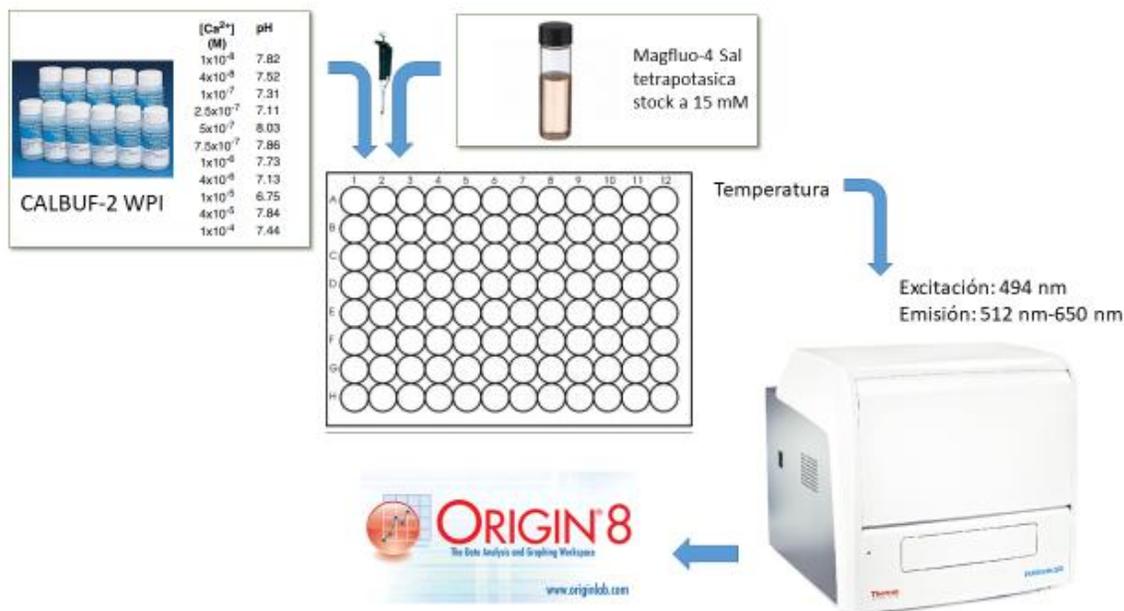


Figura 8. Metodología empleada para ensayos de fluorescencia. Las soluciones de Ca²⁺ y el colorante se pipetearon en placas de 96 pozos, posteriormente se estabilizó la temperatura de dichas muestras conforme a lo preestablecido, esto es 20 °C, paso seguido se llevó la placa a lectura en el equipo de fluorescencia Varioskan LUX excitando a 494 nm y se recogió la emisión en un rango de 512 nm – 650 nm. Los datos recogidos se analizaron en el programa estadístico Origin Pro-8.

5.4.1. Caracterización y ensayos preliminares

Se hizo uso del equipo de fluorescencia Varioskan LUX de Thermo Fisher Scientific, mediante el software Skanlt microplate reader. Este software permite programar la temperatura del equipo, el tipo de placa que se va a usar, los pozos que se van a leer de la placa y si se requiere agitar la solución, así como las longitudes de excitación y de emisión.

El equipo cuenta con una lámpara de xenón como fuente de luz y mediante el uso de filtros o monocromadores selecciona la longitud de onda de medición. En cuanto al parámetro de excitación el equipo presenta dos opciones de ancho de banda: 5 nm y 12 nm. La lectura de emisión se debe recolectar 18 nm arriba de la longitud de excitación, de lo contrario el equipo genera una alerta y las gráficas presentan artefacto.

Teniendo presente todo lo anterior, inicialmente se realizaron ensayos para determinar si la longitud de onda de excitación y el pico máximo de emisión de Mag-Fluo-4 suministradas por el proveedor eran confiables. Para lograr tal fin se realizó lo siguiente: en una microplaca

de 96 pozos se sembraron dos pozos con 73,87 μL de solución de Ca^{2+} 100 μM y 1,12 μL de Mag-Fluo-4 a 1 mM para lograr una concentración final de colorante de 15 μM y un volumen final de 75 μL en cada pozo de la placa. Adicional se sembraron dos pozos con 74,25 μL de solución de Ca^{2+} 100 μM y 0,75 μL de Mag-Fluo-4 a 1 mM para lograr una concentración final de colorante de 10 μM y un volumen final de 75 μL .

Estas muestras se excitaron con longitudes de onda separadas 1 nm en un rango sucesivo de 485 nm – 500 nm.

Además de esto, se midió la variación de fluorescencia con respecto al tiempo y la concentración de Ca^{2+} de la siguiente manera: 2 pozos con soluciones de Ca^{2+} a concentraciones finales de 300 μM y otros 2 con soluciones de Ca^{2+} a concentraciones finales de 10 mM. Las 4 soluciones contaban con Mag-Fluo-4 a una concentración final 10 μM .

5.4.2. Espectros de fluorescencia iniciales

Los espectros iniciales de Mag-Fluo-4 a diferentes concentraciones de Ca^{2+} se realizaron con soluciones del kit CALBUF-2 (lote:6J WPI) y soluciones preparadas en el laboratorio PHYSIS. Además, se midió el blanco en el ensayo.

Estos espectros fueron tomados excitando a 494 nm con un ancho de banda de 5 nm y recogiendo la longitud de emisión en un rango de 512 nm – 650 nm. Adicional a esto, se estabilizó la temperatura de las soluciones a 20 °C para asegurar la cantidad de Ca^{2+} libre proporcionada por el proveedor y el pH de las soluciones, no solo del kit sino también las preparadas en el laboratorio del grupo de investigación PHYSIS. El tiempo aproximado de lectura para las gráficas iniciales fue de 10 minutos. El volumen final en todos los casos fue de 75 μL y para cada ensayo se realizaron diagramas de flujo (Fig. 9) y tablas mostrando las concentraciones finales en cada pozo, los volúmenes a agregar y los pozos de siembra (Tabla

6).

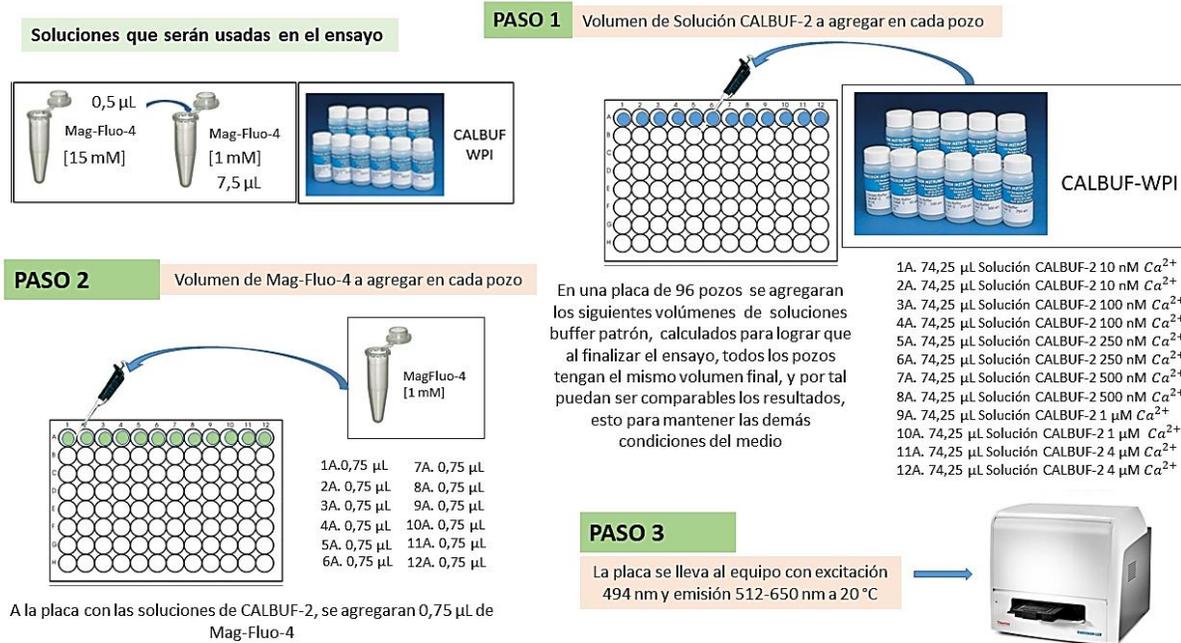


Figura 9. Diagrama de flujo de ensayos de lectura de fluorescencia de Mag-Fluo-4 con soluciones a diferentes concentraciones de Ca^{2+} .

Tabla 6. Ejemplo de elaboración de tablas usadas en las diferentes lecturas de fluorescencia. El símbolo: - representa la concentración de Ca^{2+} desconocida en el agua usada.

Número de pozo	Volumen a agregar de solución de Ca^{2+}	Concentración de solución de Ca^{2+}	Volumen a agregar de solución patrón del indicador [1 mM] Mag-Fluo-4	Concentración final de Mag-Fluo-4
1A	75 µL H ₂ O	-	0	0
2A				
3A	74,25 µL	10 nM	0,75 µL	10 µM
4A				
5A	74,25 µL	100 nM	0,75 µL	10 µM
6A				
7A	74,25 µL	250 nM	0,75 µL	10 µM
8A				
9A	74,25 µL	1 µM	0,75 µL	10 µM

10A				
11A	74,25 μ L	4 μ M	0,75 μ L	10 μ M
12A				
1B	74,25 μ L	10 μ M	0,75 μ L	10 μ M
2B				
3B	74,25 μ L	40 μ M	0,75 μ L	10 μ M
4B				
5B	74,25 μ L	100 μ M	0,75 μ L	10 μ M
6B				
7B	74,25 μ L	300 μ M	0,75 μ L	10 μ M
8B				
9B	74,25 μ L	1 mM	0,75 μ L	10 μ M
10B				
11B	74,25 μ L	10 mM	0,75 μ L	10 μ M
12B				
1C	74,25 μ L H ₂ O	-	0,75 μ L	10 μ M
2C				

5.4.3. Espectros para hallar K_d

Los espectros para realizar las gráficas de K_d se efectuaron excitando a 494 nm con un ancho de banda de 5 nm y la emisión se recolectó en un rango de 512 nm – 522 nm, a 20 °C. Para este ensayo, con el fin de disminuir el tiempo de lectura de la muestra se programó la lectura de dos pozos a la vez (duplicado de la muestra), así sucesivamente hasta leer el total de muestras. Cada lectura se repitió con intervalos de un minuto, esto con el fin de medir la variación de K_d en el tiempo con respecto al momento de siembra de los pozos.

Las soluciones usadas en este ensayo son las ilustradas en la tabla 7.

Tabla 7. Soluciones usadas en el ensayo final para hallar la K_d

Volumen a agregar de solución de Ca^{2+}	Concentración de solución de Ca^{2+}	Volumen a agregar de solución patrón del indicador [1 mM] Mag-Fluo-4	Concentración final de Mag-Fluo-4
74,25 μL	10 nM	0,75 μL	10 μM
74,25 μL	40 nM	0,75 μL	10 μM
74,25 μL	100 nM	0,75 μL	10 μM
74,25 μL	250 nM	0,75 μL	10 μM
74,25 μL	500 nM	0,75 μL	10 μM
74,25 μL	1 μM	0,75 μL	10 μM
74,25 μL	4 μM	0,75 μL	10 μM
74,25 μL	10 μM	0,75 μL	10 μM
74,25 μL	40 μM	0,75 μL	10 μM

74,25 μ L	100 μ M	0,75 μ L	10 μ M
74,25 μ L	1 mM	0,75 μ L	10 μ M
74,25 μ L	10 mM	0,75 μ L	10 μ M

5.5. Procesamiento de datos

Los datos fueron analizados usando el programa estadístico OriginPro-8, se realizaron tablas con las concentraciones, fluorescencias, promedios, desviación estándar (Tabla 8).

Tabla 8. Ejemplo de tablas realizadas en OriginPro-8 para el análisis de datos.

	A(Y)	B(Y)	C(Y)	D(Y)	E(Y)	F(Y)	G(Y)	H(Y)	I(Y)	J(Y)	K(Y)	L(Y)	M(Y)	N(Y)	O(Y)	P(Y)	Q(Y)
Long Name	Longitud de máxima emisión	10 nM	10 nM	Mean	Standard Deviation	40 nM	40 nM	Mean	Standard Deviation	100 nM	100 nM	Mean	Standard Deviation	250 nM	250 nM	Mean	Standard Deviation
Units																	
Comments				Statistics	Statistics			Statistics	Statistics			Statistics	Statistics			Statistics	Statistics
F(x)=																	
1	516	1,843	1,766	1,8045	0,05445	2,561	2,534	2,5475	0,01909	3,283	1,999	2,641	0,90793	2,513	2,73	2,6215	0,15344

Se elaboraron gráficas de fluorescencia en función de la longitud de onda de emisión y se identificó el pico de fluorescencia. Luego de esto, para hallar el valor K_d , se realizaron tablas de los valores pCa y puntos máximos de emisión de fluorescencia (Tabla 9).

Tabla 9. Ejemplo de tablas realizadas en OriginPro-8 para el análisis de datos y realización de gráficas para K_d .

pCa	Fluorescencia máxima (UA)
-8	1,8185
-7,397	2,739
-7	2,9375
-6,602	2,7895
-6,301	6,015
-6	6,319
-5,397	19,935

-5	30,71
-4,397	131,4
-4	202,25
-3	291,9
-2	288,15

Los datos para las respectivas graficas se normalizaron con respecto al valor mayor de fluorescencia para hacer comparables los resultados de K_d obtenidos en cada ensayo.

Estas gráficas fueron analizadas en el programa estadístico OriginPro-8 mediante el uso de la ecuación de Boltzmann siguiendo los pasos señalados en la figura 10, a través de este procedimiento se obtuvo un valor X_0 a partir del cual se halló el K_d en cada caso.

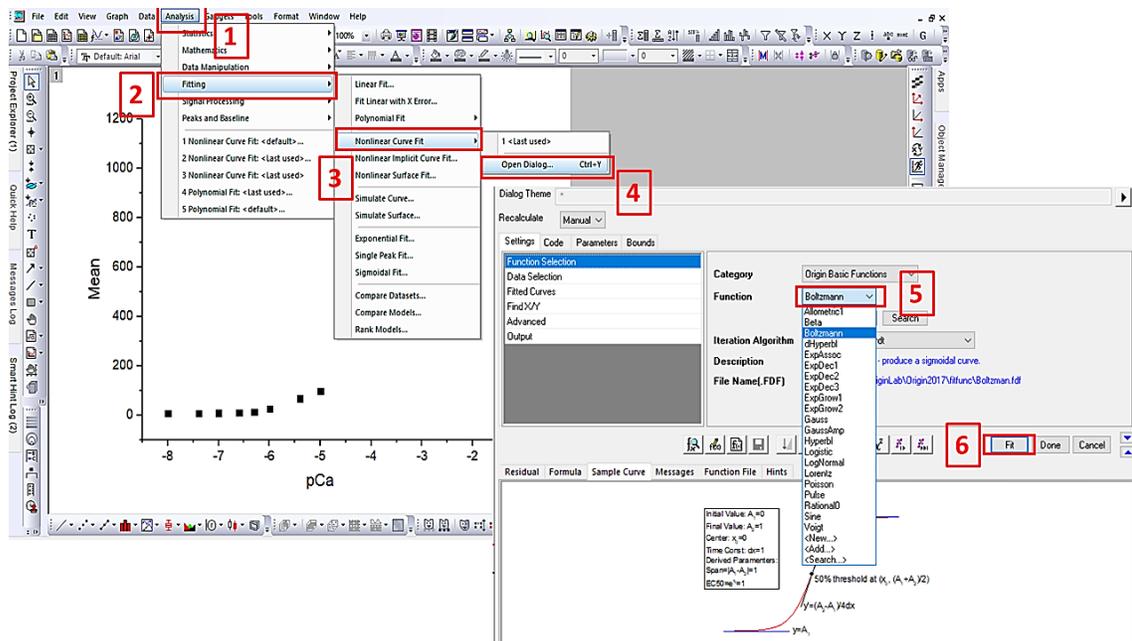


Figura 10. Pasos ejecutados en OriginPro-8 para obtener el valor de K_d mediante el uso de la ecuación de Boltzmann. Se seleccionan los puntos de la gráfica obtenida de la tabla pCa vs fluorescencia máxima (Tabla 9), luego se selecciona la opción análisis, seguido de *fitting*, inmediatamente *Nonlinear Curve Fit* y posteriormente *Open Dialog*. En la categoría de funciones básicas de Origin se selecciona la función Boltzmann y finalmente se aplica el ajuste.

Dado que para hallar los valores de K_d se realizaron ensayos por duplicado, se analizaron los resultados de K_d obtenidos sin normalizar para el promedio de los ensayos, el valor de K_d normalizando el promedio de los ensayos y el K_d obtenido normalizando punto a punto la gráfica (Tabla 11).

Finalmente, la calibración con estequiometrías 1:1 y 1:2 se realizó haciendo uso de OriginPro-18. Se reemplazaron los valores resultantes de los anteriores procedimientos y los obtenidos por Milán *et al.*, 2020 (en preparación) en el grupo de investigación PHYSIS.

6. Resultados

6.1. Parámetros iniciales de medida

A una longitud de onda de excitación de 494 nm, la molécula de Mag-Fluo-4 en interacción con Ca^{2+} presenta el punto máximo de emisión a 516 nm, diferente al valor suministrado por el proveedor. Así mismo, se encontró que es suficiente una concentración de 10 μM de Mag-Fluo-4 para las medidas (Fig. 11). A dicha concentración se puede observar claramente cambio en la intensidad de fluorescencia sin usar una cantidad innecesaria de colorante.

Adicionalmente, se observó que independiente de la concentración de Ca^{2+} , se presenta una pérdida de fluorescencia de 0,13% por minuto (Fig. 12).

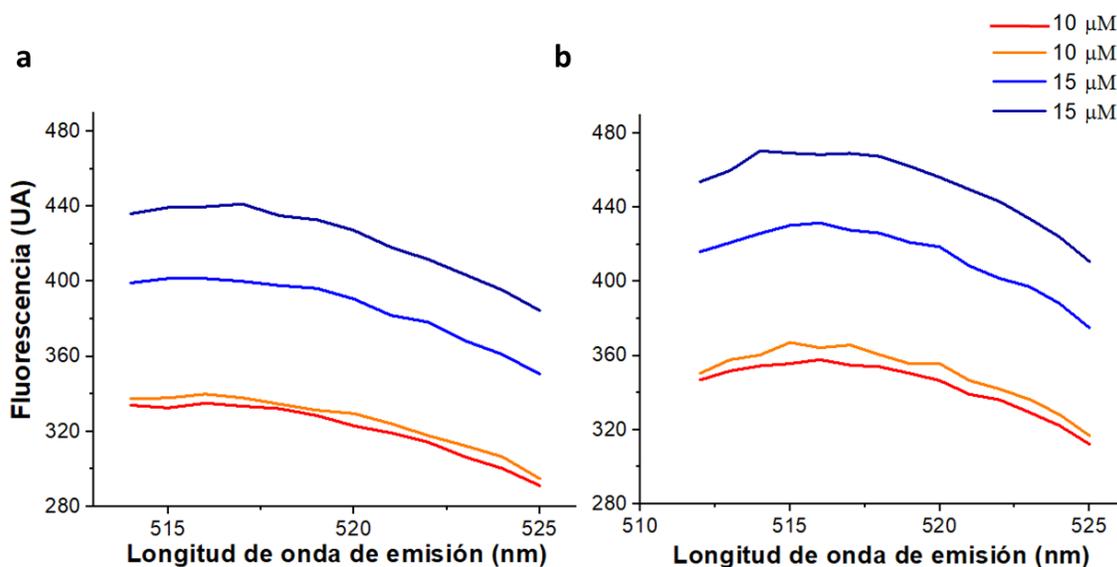


Figura 11. Determinación de la longitud de onda de emisión máxima excitando a diferentes longitudes de onda. En (a) se excitó a 490 nm, y en (b) a 494 nm. Ambos a concentraciones de 10 y 15 μM en una temperatura entre 23.5 y 23.7 $^{\circ}\text{C}$.

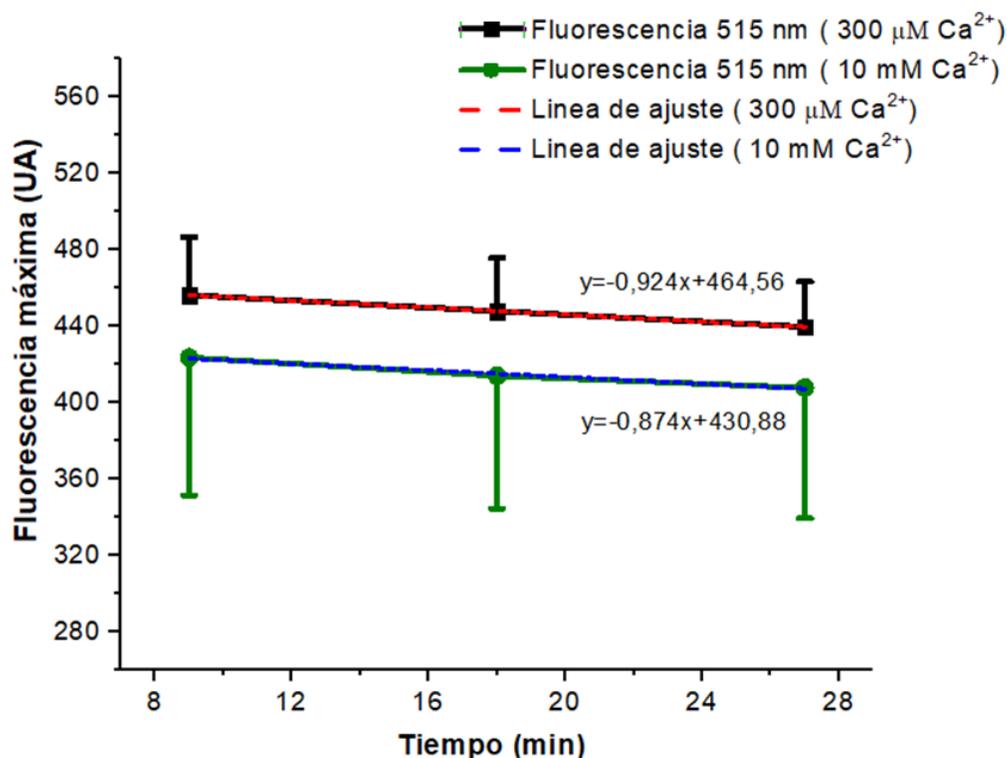


Figura 12. Mediciones realizadas para analizar el cambio de fluorescencia en el tiempo. Se muestra el promedio (cuadrado negro y círculo verde) de mediciones por duplicado, realizadas a tres momentos diferentes en un rango de 18 minutos. La pendiente de la caída de la fluorescencia es muy similar para ambas concentraciones de Ca^{2+} , según los ajustes lineales rojo y azul y las ecuaciones incluidas en la gráfica.

6.2. Espectros de fluorescencia

Se tomaron espectros de fluorescencia excitando a 494 nm y recogiendo la emisión en un rango de 512 nm – 650 nm con las soluciones comerciales y las soluciones preparadas en el laboratorio PHYSIS. Todos los puntos se midieron por duplicado (Fig. 13) y se realizó el promedio en cada caso (Fig. 14). Se encontró que el agua utilizada contenía una concentración inaceptablemente alta de Ca^{2+} , cerca de 500 μM , y por tanto no era la ideal para este ensayo. Como muestra de lo antes dicho, en la figura 13 se observa que la solución 300 μM presentó fluorescencias distintas para los puntos duplicados (440 UA frente a 480 UA) y mayores que en soluciones con concentraciones de Ca^{2+} superiores como 1 mM y 10

mM, igualmente preparadas en el laboratorio y en las cuales también se observaban diferencias en la intensidad de fluorescencia de los puntos duplicados.

Todo esto llevó a realizar ensayos con un electrodo selectivo de Ca^{2+} para determinar con exactitud las concentraciones de Ca^{2+} obtenidas y pesadas en balanza. De esta manera graficar los valores reales de Ca^{2+} que se estaban obteniendo y hallar un valor más confiable de K_d *in vitro*, ya que no lo era el obtenido con la ayuda de MAXCHELATOR.

Se realizó una curva inicial de pCa ($-\log[\text{Ca}^{2+}]$) vs pico de fluorescencia y se ajustó mediante la ecuación sigmoidea de Boltzmann para encontrar un valor preliminar de K_d , el cual de $51,2 \mu\text{M}$ (Fig. 15).

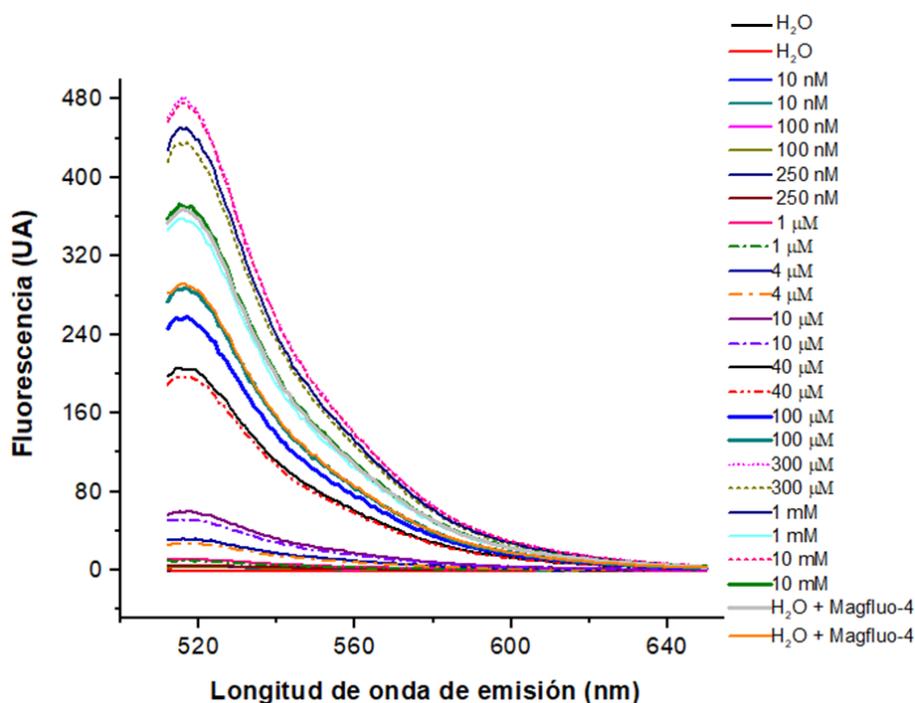


Figura 13. Espectro de fluorescencia para diferentes concentraciones de Ca^{2+} por duplicado. Excitación 494 nm y emisión 512 nm – 650 nm a 21 °C. Se observa diferencias en los puntos duplicados de soluciones con altas concentraciones de Ca^{2+} como 300 μM , 1 mM y 10 mM, soluciones preparadas en PHYSIS.

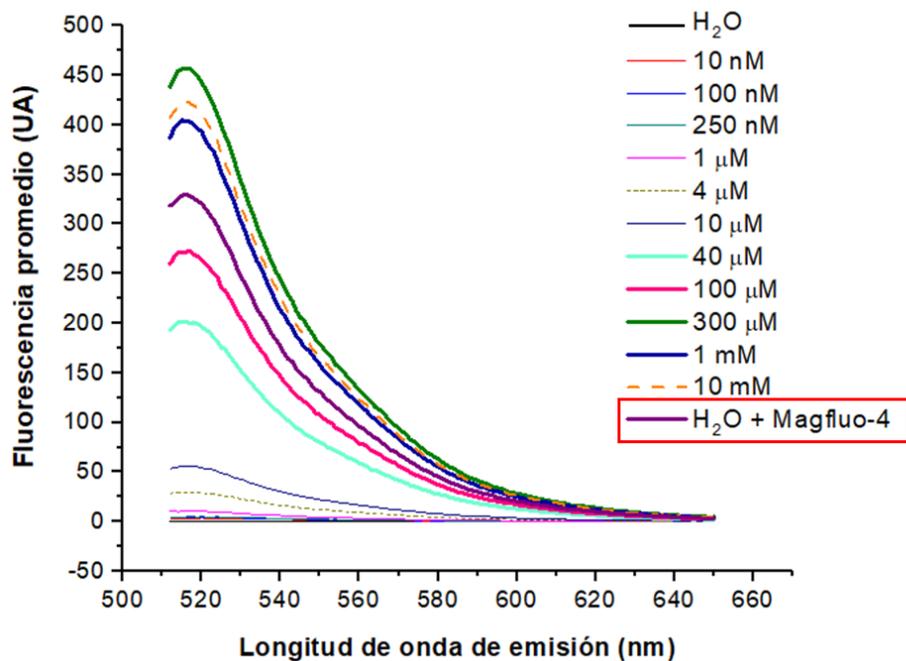


Figura 14. Espectro de fluorescencia para diferentes concentraciones de Ca^{2+} promedio. Excitación 494 nm y emisión 512 nm – 650 nm a 21 °C. Señalado en un recuadro rojo el espectro de emisión del agua usada en el ensayo con el indicador Mag-Fluo-4. Obsérvese que el agua usada fluoresce más que la solución con 100 μM de Ca^{2+} y que la solución de 300 μM estuvo por arriba de soluciones con 1 mM de Ca^{2+} .

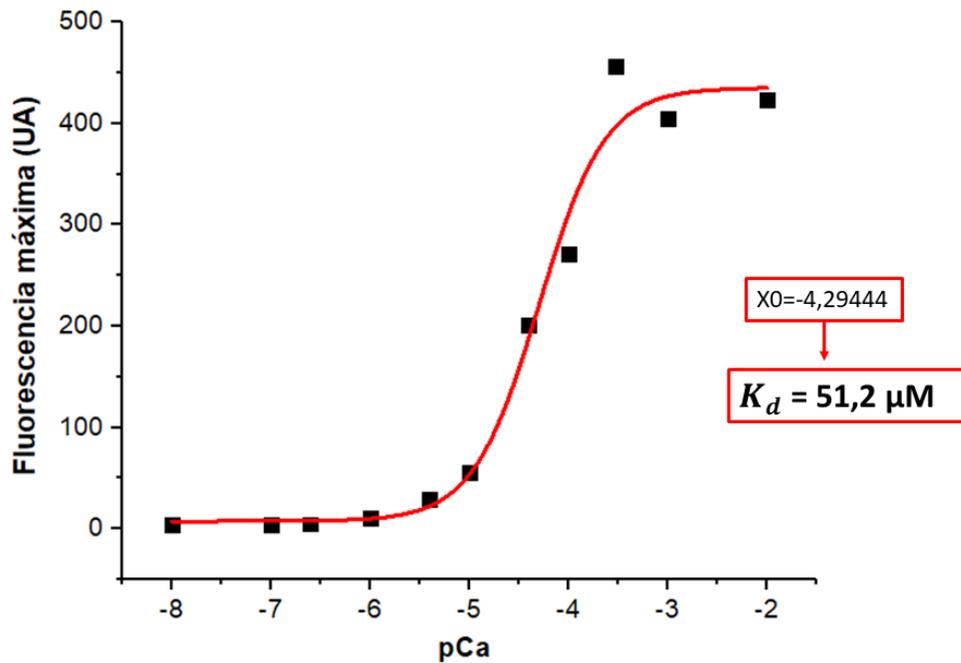


Figura 15. K_d preliminar estimado mediante la ecuación de Boltzmann. Gráfica realizada con los ensayos iniciales (Fig 13-14) para determinar el valor de la K_d usando una ecuación sigmoidea.

6.3. Medida de Ca^{2+} con electrodo selectivo

Con los potenciales de las soluciones con concentraciones de Ca^{2+} conocidas (Tabla 5) se realizó una curva patrón (Fig. 16) de pCa en función del potencial obtenido. Se graficó la línea de tendencia y con la ecuación de regresión se hallaron las concentraciones de Ca^{2+} de las soluciones problema.

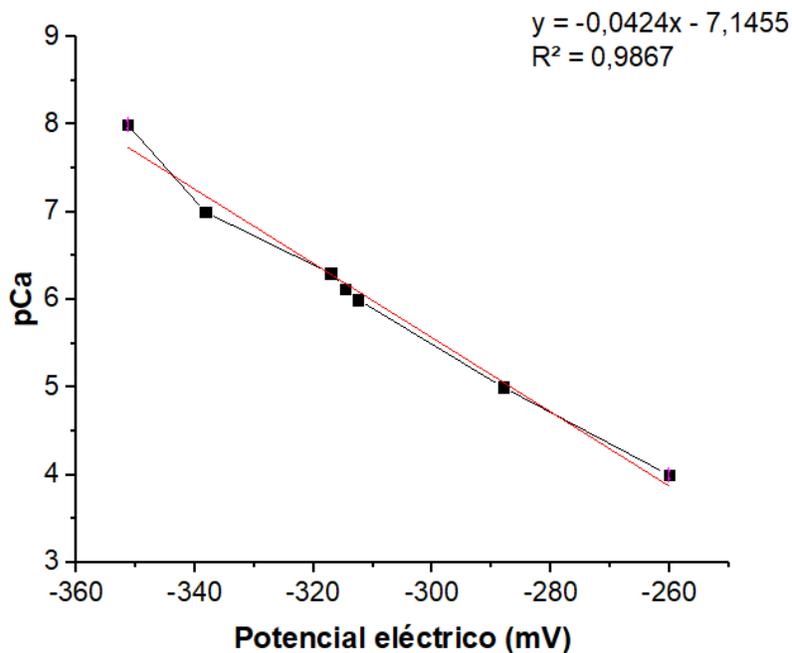


Figura 16. Gráfica patrón con electrodo selectivo de Ca^{2+} . La gráfica se realizó con potenciales de soluciones de concentración de Ca^{2+} conocidas del kit CALBUF-2 a temperatura de 20 °C y pH 7.2. Con la ecuación resultante se calculó la concentración de Ca^{2+} desconocida de soluciones problema.

La función de ajuste de la curva es: $y = -0,0424x - 7,1455$ (8)

Se resolvió la ecuación 14 reemplazando el potencial medido en cada una de las soluciones problema (datos de color naranja en la tabla 5). El valor de pCa obtenido fue comparado con el valor de pCa esperado. Estos datos fueron convertidos en concentraciones de Ca^{2+} , que fueron igualmente comparadas para determinar si los datos obtenidos eran comparables con los esperados (Tabla 10).

Tabla 10. Concentraciones de Ca^{2+} de soluciones problema obtenidas con electrodo selectivo de Ca^{2+} . La tabla expresa la comparación de los valores pCa y por ende las concentraciones de Ca^{2+} esperadas y obtenidas haciendo uso del electrodo selectivo de Ca^{2+} .

pCa esperado	pCa obtenido con ecuación del promedio	Concentración esperada M	Concentración obtenida M	Concentración obtenida	Concentración esperada
4	2,41146	0,0001	0,003877395	3,8773945898 mM	100 μM
4	2,384606667	0,0001	0,004124709	4,1247091775 mM	100 μM
3,522878745	2,340793333	0,0003	0,00456254	4,5625398113 mM	300 μM
3,522878745	2,575548	0,0003	0,00265737	2,6573698299 mM	300 μM
3	2,342206667	0,001	0,004547716	4,5477159723 mM	1000 μM
3	2,15282	0,001	0,007033638	7,0336377937 mM	1000 μM
2,522878745	1,853193333	0,003	0,014021894	14,0218935901 mM	3000 μM
2,522878745	1,954953333	0,003	0,01109294	11,0929400775 mM	3000 μM

Se encontró que las concentraciones obtenidas con el electrodo eran muy diferentes a las esperadas cuando se realizó el cálculo en MAXCHELATOR y se pesó el Ca^{2+} en el laboratorio de PHYSIS. Estas diferencias demostraron que la preparación de las soluciones en el laboratorio no es un método viable para un proceso en el que un mínimo cambio en un parámetro puede arrojar resultados muy distantes de lo esperado. Se decidió continuar los experimentos únicamente con las soluciones de Ca^{2+} de kits comerciales.

6.4. Determinación de K_d

Para determinar el valor de K_d de Mag-Fluo-4 en soluciones de Ca^{2+} libres de Mg^{2+} y de proteínas, se ejecutó lo especificado en la sección 5.4.3. Se analizó el promedio de 3 ensayos por duplicado (Tabla 12), con los cuales se realizaron gráficas de pCa vs punto de máxima emisión de fluorescencia. Con estas gráficas, mediante un ajuste con la ecuación de Boltzmann en el programa OriginPro-8, se obtuvo el promedio y el coeficiente de variación de cada ensayo y se analizó el valor de K_d arrojado con la normalización de los datos (Tabla 11).

Con estos ensayos se analizó la reproducibilidad y el cambio del valor del K_d con respecto al tiempo de lectura. Se halló que el valor de K_d obtenido con respecto al tiempo de lectura puede variar entre 6,3% y 18% en intervalos de un minuto.

La figura 17 corresponde a los resultados del ensayo nombrado “11 febrero” en la tabla 12. Dichas gráficas permiten ver que el tiempo de lectura después del pipeteo influye en el valor del K_d . El panel a de la figura 17 nos muestra la primera lectura de las soluciones propuestas

(Tabla 7) y por tal un valor K_d de 54,2 μM . El panel b muestra el duplicado de lectura de las mismas soluciones leídas anteriormente pasado un minuto, se obtuvo un valor de K_d 50,8 μM .

Finalmente la figura 18 muestra un resultado de K_d 111,9 μM , correspondiente al ajuste de los puntos promedio de los 3 ensayos normalizados (Anexo 3) que fueron ejecutados.

Tabla 11. Normalización de datos para K_d obtenidas por duplicado en 3 mediciones repetidas. Las 3 mediciones se realizaron cada 7 días. Se analizaron los datos de tres formas para seleccionar la K_d ideal. Entre las mediciones 1 y 2 hay un intervalo de un minuto en todos los casos.

	K_d de gráfica promedio sin normalizar ni con desviación estándar	K_d de gráfica promedio normalizando por día con desviación estándar- K_d de gráfica sin normalizar con desviación estándar	K_d de gráfica promedio normalizando cada dato con la desviación estándar
11-feb-20	52,13	67,17	56,73
18-feb-20	57,06	37,27	90,6
25-feb-20	96,09	30,48	112,12
Promedio	81,21	117,5	111,9

Tabla 12. K_d obtenidas por duplicado en 3 mediciones repetidas. Las 3 mediciones se ejecutaron cada 7 días. Entre las mediciones 1 y 2 hay un intervalo de un minuto en todos los casos.

Fecha de medida (2020)	K_d medición 1 minuto 0 (μM)	K_d medición 2 minuto 1 (μM)	K_d Promedio (μM)	Coefficiente de variación
11 febrero	54,2	50,8	52,5	4,579
18 febrero	57	57,1	57,05	0,124
25 febrero	106,3	86,7	96,5	14,362

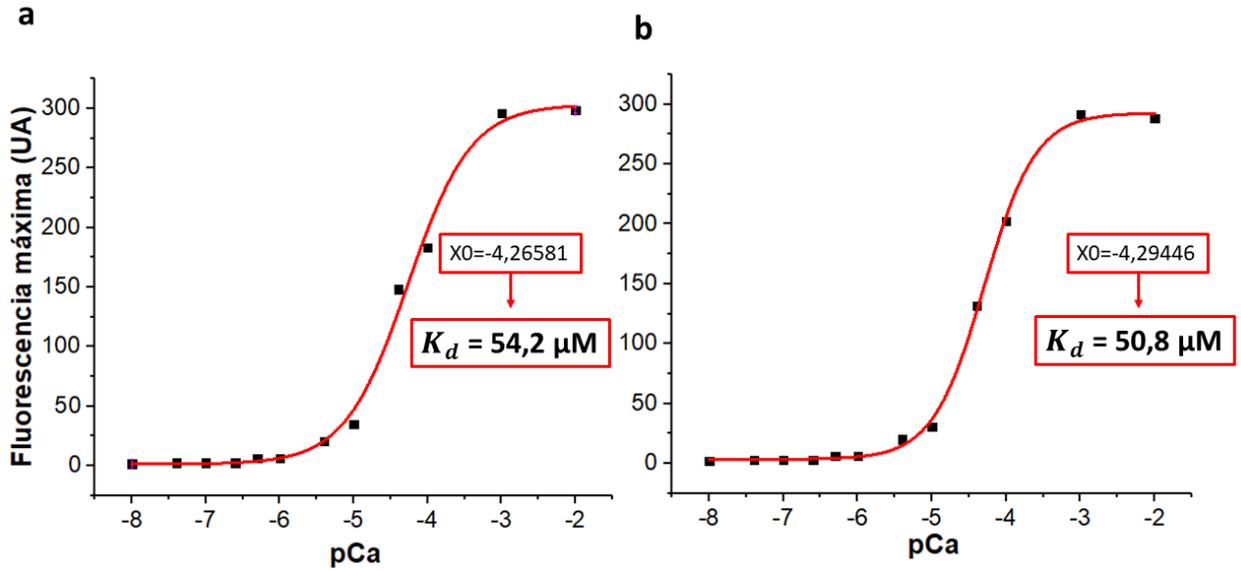


Figura 17. Reproducibilidad del K_d en lectura de soluciones de Ca^{2+} por duplicado.

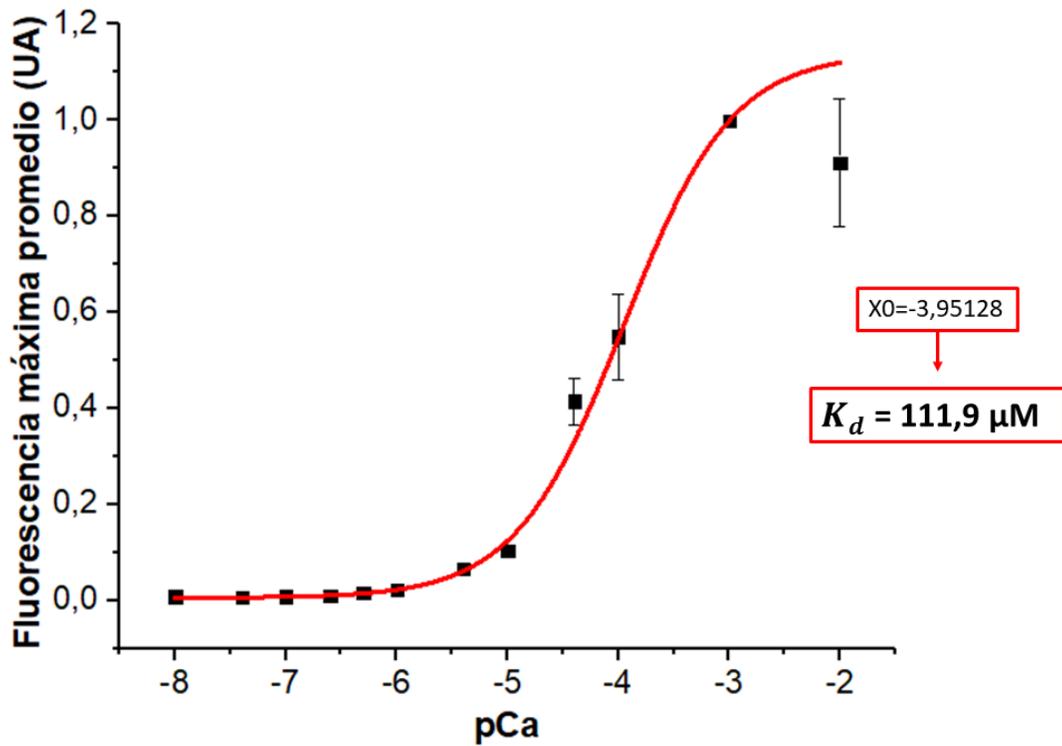


Figura 18. Valor del K_d obtenido de una gráfica promedio de los 3 ensayos realizados. (Tabla 11)

6.5. Calibración

La calibración se realizó reemplazando la ecuación de Grynkiewicz *et al.*, (1985) (eq.2) y la ecuación suministrada por Rincón *et al.*, 2020 (en preparación) (eq. 6) con un transitorio de Ca^{2+} proporcionado por Milán *et al.*, 2020 (en preparación).

Para obtener este transitorio Milán *et al.*, al 2020, estimularon eléctricamente una célula de músculo esquelético del Flexor Digitorum Brevis (FDB) cargada con Mag-Fluo-4 y registraron el cambio en la intensidad de fluorescencia en el tiempo con un fotomultiplicador (Fig. 19).

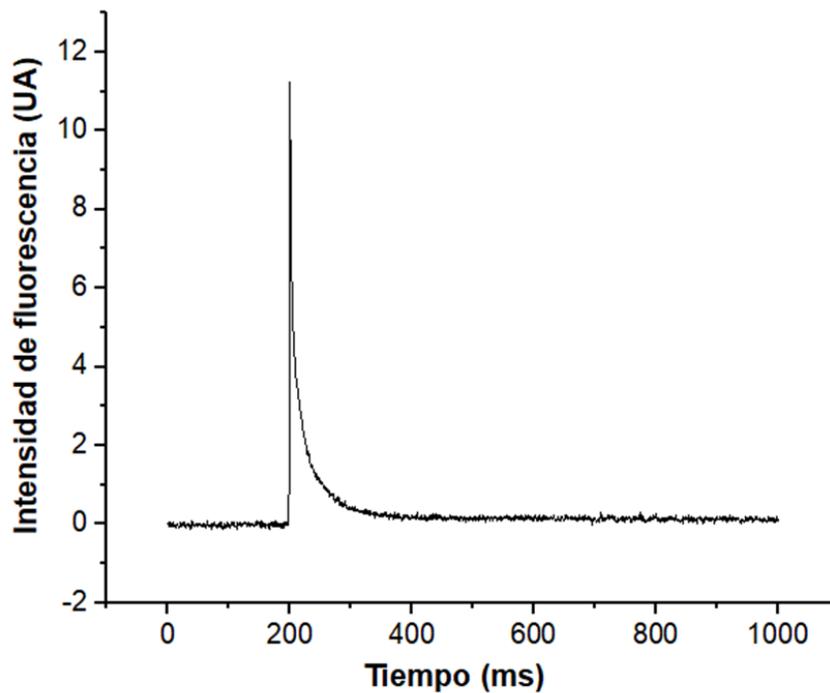


Figura 19. Transitorio de Ca^{2+} provisto por Milán *et al.*, 2020 para la calibración. El cambio en la intensidad de fluorescencia refleja la salida de Ca^{2+} del RS al citoplasma de la célula pasado un estímulo eléctrico y la posterior recaptura del Ca^{2+} por parte del RS y otras organelas como la mitocondria. UA: unidades arbitrarias.

El mencionado arrojó como resultados: un valor para $F_{\min} = 0,1427$ UA, y $F_{\max} = 150,88$ UA; valores necesarios para la calibración.

Estos datos calibrados fueron graficados en función del tiempo (Fig. 20).

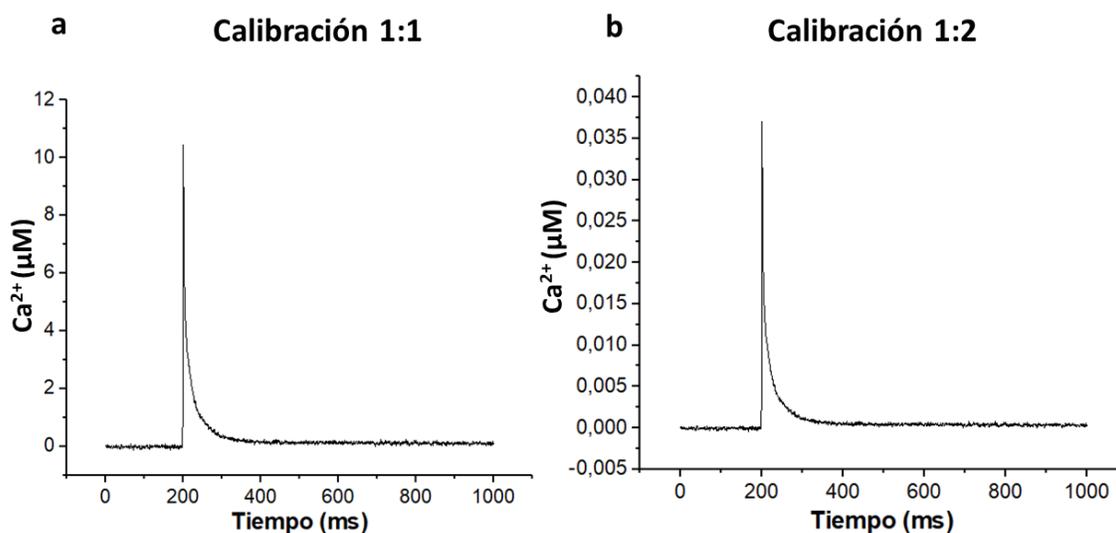


Figura 20. Comparación de calibración para diferentes estequiometrías. El panel a de la figura muestra la calibración realizada con la ecuación 2 (1:1), el panel b es la calibración realizada con la ecuación 6 (1:2).

Nótese una diferencia grande en el valor ΔCa^{2+} con la calibración 1:1 ($\Delta Ca^{2+} \sim 11 \mu M$) en comparación con el valor obtenido con la calibración 1:2 ($\Delta Ca^{2+} \sim 0,037 \mu M$).

7. Discusión

Se siguió un protocolo propio diseñado en el laboratorio de PHYSIS, debido a que varios autores habían presentado valores de K_d de Mag-Fluo-4 para Ca^{2+} muy diferentes (Baylor & Hollingworth, 2011; Stephen Hollingworth et al., 2009; Invitrogen, 2005).

7.1. Preparación de soluciones

Inicialmente se planteó realizar los ensayos haciendo uso del kit de calibración CALBUF-2, para el cual el proveedor reportaba concentraciones conocidas de Ca^{2+} y valores de pH entre 6,75 y 8,03, además de preparar soluciones en el laboratorio PHYSIS con altas concentraciones de Ca^{2+} para la calibración y saturación del colorante.

Se dio inicio a la preparación de las soluciones usando el protocolo del grupo PHYSIS, debido a que la empresa WPI, en la cual se adquirió el kit de calibración, no proporciona un protocolo para la preparación de estas soluciones. Esto deja en entredicho la veracidad de los datos proporcionados, si tenemos en cuenta que la empresa proveedora del kit menciona unas

condiciones que se deben mantener para asegurar la homogeneidad en las concentraciones de Ca^{2+} , pero en ningún lugar mencionan un protocolo de preparación de las mismas.

En las preparaciones realizadas en el laboratorio PHYSIS se conservaron estables los siguientes parámetros: temperatura 20 °C y pH 7,2. Pero a pesar de mantener constantes estos valores al momento de medir la fluorescencia de nuestras soluciones, se hallaba inconsistencia en la intensidad de fluorescencia. Es decir, soluciones preparadas a bajas concentraciones de Ca^{2+} según nuestros cálculos, exhibían mayor fluorescencia que soluciones con concentraciones de Ca^{2+} mayores, esto puede ser explicado por el Ca^{2+} presente en el agua.

Las figuras 13 y 14 muestran lo mencionado anteriormente, se observa una fluorescencia igual o mayor para 300 μM que para 10 mM. Observamos en la figura 13 que las soluciones de concentraciones bajas del kit CALBUF-2 presentaban reproducibilidad en el pipeteo por duplicado, pero en las soluciones preparadas en PHYSIS no ocurría esto. Pensamos en el tiempo de lectura transcurrido después del pipeteo a pesar de observar (Fig. 12) que la fluorescencia en el tiempo disminuía cerca de 0,13% por minuto y que por tal el tiempo si bien es un parámetro de cuidado no estaba afectando de manera notable en los resultados. Se observaba una proporción de pérdida de fluorescencia mínima en el tiempo, que permite un rango de estabilidad adecuado para la maniobrabilidad de las muestras. Teniendo esto presente se realizó el análisis del coeficiente de variación de fluorescencia en el tiempo (Anexo 4) y se identificó un patrón de dispersión constante en el tiempo. Que permite deducir que la dispersión de la fluorescencia presenta un aumento en 1 mM Ca^{2+} y disminución con el aumento de la concentración de Ca^{2+} .

El agua proporcionada por CNSG, contenía altas concentraciones de Ca^{2+} para nuestros ensayos tal y como quedó en evidencia conforme a la figura 13, ya que pretendíamos preparar soluciones de 300 μM , 1 mM. Soluciones que partiendo de un agua con cerca de 500 μM de Ca^{2+} , eran poco confiables de utilizar e inducían al error. Esto nos llevó a plantear conseguir agua con trazas menores de Ca^{2+} , suministro que no fue posible adquirir por limitaciones del proveedor.

El pesaje de CaCl_2 en el laboratorio no es un proceso confiable para la preparación de soluciones que requieren de rigurosa precisión, esta sal se hidrata rápidamente durante el

manejo y dadas las cantidades mínimas que se deben pesar, se corre mucho riesgo de no depositar totalmente la sal pesada en el recipiente de interés.

En conclusión, por limitaciones en la precisión de los equipos y en la calidad del agua, las soluciones con diferentes concentraciones de Ca^{2+} libre preparadas en el laboratorio no fueron confiables.

7.2. Medidas con electrodo de Ca^{2+}

Dadas las dificultades anteriores para la obtención de agua con bajas concentraciones de Ca^{2+} para preparar soluciones confiables con menor margen de error, se propuso como alternativa la posibilidad de efectuar las medidas de Ca^{2+} con un electrodo selectivo de Ca^{2+} . Medidas que se tuvieron en cuenta debido a la fiabilidad mostrada por algunos autores que usaron electrodo selectivo de Ca^{2+} para determinar la concentración de este ion en sus muestras (Tran, Park, & Stricker, 2018).

Adicional a esto otros autores marcan la importancia de estos electrodos selectivos de Ca^{2+} , muestran claros procedimientos para el uso de estos en diferentes ensayos experimentales y muestran resultados confiables (Allen, 2003; Carey & Vogel, 2000; Kodzhahinchev, Biancolin, & Bucking, 2018; Rosenberg et al., 2018). La importancia de estos electrodos radica en que estos miden únicamente el ion de interés permitiendo de algún modo estabilizar la cantidad de Ca^{2+} en las muestras o por lo menos identificar la falta de homogeneidad de las mismas.

No obstante, los ensayos realizados en el laboratorio PHYSIS dan cuenta de la complejidad y el cuidado que conlleva el uso de este equipo. En la tabla 10 se observa el error obtenido en las medidas, errores que muestran que los resultados se esperaban en el orden μM , sin embargo, los datos obtenidos llevaron a contemplar resultados en el orden mM . Esta diferencia puede ser resultado de una medición inadecuada, como enjuagar el electrodo entre medidas de las soluciones con agua desionizada que se conocía que contenía trazas de Ca^{2+} . Esto a pesar de que, entre ensayos, se realizaran medidas iniciales para determinar el Ca^{2+} del agua presente; de esta manera se podría tomar este valor como blanco y determinar los valores reales de Ca^{2+} presente en las soluciones. Adicionalmente, la temperatura ambiente fue un parámetro difícil de controlar en nuestro laboratorio, esto hizo complejo mantener estables las temperaturas en $20\text{ }^\circ\text{C}$, y aunque se logró conservar, esto podría considerarse

como un parámetro que induce error. La temperatura influye en la unión del Ca^{2+} al EGTA, lo que se traduce en una cantidad de Ca^{2+} libre que varía en función de la temperatura. Otro valor que puede variar con los cambios de temperatura es el pH y tal como ocurre en células musculares, en las que un cambio de pH genera cambios en la concentración de Ca^{2+} intracelular (Willoughby, Thomas, & Schwiening, 2001), ocurre en soluciones *in vitro* como las analizadas en este trabajo.

A las soluciones preparadas se les fijó el pH en 7,2 inmediatamente se prepararon las soluciones, simulando el pH intracelular de células musculares (Boron & Henderson, 1976), pero en el momento de lecturas con el electrodo selectivo de Ca^{2+} no se realizó este procedimiento.

Todo esto permitió comprender que las preparaciones de las soluciones en el laboratorio, aún con ayuda de un electrodo de Ca^{2+} , no eran confiables y que lo ideal era conseguir un kit de soluciones con concentraciones de Ca^{2+} conocidas.

7.3. Determinación de longitud de onda de excitación y emisión

Se encontró que el valor de excitación de Mag-Fluo-4 proporcionado por el proveedor no era adecuado para nuestro ensayo; toda vez, que suministró un valor de 490 nm y un pico máximo de emisión a los 517 nm (Invitrogen, 2005). Sin embargo, nuestros ensayos arrojaron un pico de excitación a 494 nm. Esto puede deberse a la resolución de lectura del equipo, ya que el equipo con el que trabajamos (Varioskan LUX) cuenta con una resolución de lectura de 1 nm, esto nos permitió medir un rango amplio (485nm – 500 nm), analizando punto a punto.

Así mismo, nuestro punto máximo de emisión se registró en 516 nm, este resultado también podría explicarse por la resolución del equipo que permite graficar 18 nm por encima de la longitud de excitación, es decir 512, esto nos permite analizar con claridad la fluorescencia en cada longitud de onda de emisión.

7.4. Determinación de K_d

No obstante que el proveedor reportó una K_d para el Ca^{2+} de 22 μM a 22 °C, la K_d calculada experimentalmente en este ensayo es de 111,9 μM (20 °C en ausencia de Mg^{2+}), similar a lo encontrado por (Stephen Hollingworth et al., 2009) quienes reportaron un K_d de 70 μM (21°C

en ausencia de Mg^{2+}). Un valor similar fue reportado por (Olivera & Pizarro, 2018) de 90 μM usando soluciones de Ca^{2+} a 0 μM , 20 μM , 100 μM , 10 mM a 20 °C.

Por otra parte, el presente ensayo pretendía determinar la K_d en presencia de Mg^{2+} . El Mg^{2+} es un ion de suma importancia en variedad de procesos celulares como la unión de Ca^{2+} a regiones intracelulares, la función de canales de Ca^{2+} y regulación de Ca^{2+} citoplasmático; su concentración dentro de la célula es 0,8 – 1,0 mM (Tashiro, Tursun, & Konishi, 2005). Es por ello que en los cálculos realizados para las soluciones de Ca^{2+} - Mg^{2+} la concentración de Mg^{2+} fue fijada en 1 mM. Igualmente se fijó el EGTA en 10 mM.

Se tiene presente que la K_d para Mg^{2+} EGTA es fuertemente influenciada por el pH, la variación del pH induciría un error significativo en la cantidad total de Mg^{2+} (F.J.Brinley, JR., A. Scarpa, 1977). Mantener un pH estable será crucial para la elaboración de estas soluciones. Ya que el presente trabajo busca comparar el valor de K_d *in vitro* con el valor obtenido *in situ* y la concentración de Mg^{2+} libre.

Desafortunadamente, los ensayos con Mg^{2+} no fueron realizados por las limitaciones impuestas por la pandemia generada por el SARS-CoV2.

7.5. Calibración

Se presentó una diferencia notable en el valor ΔCa^{2+} con la calibración 1:1 ($\Delta Ca^{2+} \sim 11 \mu M$) en comparación con el valor obtenido con la calibración 1:2 ($\Delta Ca^{2+} \sim 0,037 \mu M$).

Esto resultado de variedad de factores que se enumeran a continuación:

- La velocidad de reacción de la solución se ve afectada por la concentración del Ca^{2+} y el indicador Mag-Fluo-4; así para la ecuación 4 (estequiometría 1:2), se explica una velocidad doble de reacción en comparación con la ecuación 1 (estequiometría 1:1) (Rodwell, 2013). Velocidad que es desconocida aún.
- El colorante varía la absorbancia o coeficiente de extinción según su concentración.
- Estudios de otros colorantes de Ca^{2+} que han analizado las diferentes estequiometrías para sus moléculas, explican cómo estas pueden verse afectadas por la variedad en el coeficiente de extinción (S. Hollingworth, Aldrich, & Baylor, 1987). Lo anterior, se prestaría para interpretar que, si se tiene una menor concentración de moléculas

fluoresciendo en el medio por la unión a Ca^{2+} , arrojará como consecuencia bajas intensidades de fluorescencia y por ende menor concentración de Ca^{2+} .

8. Conclusiones

- A partir de las gráficas obtenidas por la técnica de espectrofluorimetría, se determinó un valor para la K_d *in vitro* de Ca^{2+} , en ausencia de Mg^{2+} , de $111,9 \mu\text{M}$.
- Los factores ambientales influyen en los procedimientos y por tal en los resultados.
- La cantidad de tiempo empleado en las lecturas genera una reducción en la intensidad de fluorescencia de $0,13\%$ por minuto.
- A pesar de hacer uso de un electrodo selectivo de Ca^{2+} , las soluciones preparadas en el laboratorio no fueron confiables.
- El agua usada comúnmente en varios laboratorios de la Universidad de Antioquia contiene concentraciones de Ca^{2+} aproximadas a $500 \mu\text{M}$, lo cual la hace inadecuada para experimentos que requieren estricto control de la concentración de Ca^{2+} .
- El tiempo de lectura después del pipeteo de las soluciones puede generar hasta un 18% de diferencia en los valores de K_d arrojados.
- Es necesario establecer con certeza la estequiometría para la reacción entre el Ca^{2+} y el Mag-Fluo-4, dado que la calibración definitiva cambia tres órdenes de magnitud en función de la estequiometría usada.

9. Agradecimientos

Agradezco especialmente a mi asesor, el doctor Juan Camilo Calderón Vélez, por el constante apoyo, tiempo invertido y la confianza depositada en mi trabajo de grado.

A mi coasesor el doctor Marco Antonio Giraldo, quien me invitó a hacer parte de este maravilloso equipo de trabajo, por su constante apoyo y compañía.

También doy gracias al Magister Andrés Felipe Milán, sin él nada de esto sería posible debido a su colaboración en todo momento. De igual manera, agradezco a Diana Muñoz, quien me apoyó en el manejo del equipo de fluorescencia.

Doy gracias al grupo PHYSIS, por acogerme con paciencia y cordialidad, me siento orgullosa de pertenecer a tan excelente grupo. Finalmente, al CODI por el financiamiento del proyecto.

10. Declaración de conflicto de intereses

El grupo de trabajo involucrado en este proyecto declara que no tiene conflictos de interés.

11. Financiación

El presente proyecto fue financiado por el CODI, convocatoria Programática, proyecto 2015-7858.

12. Referencias bibliográficas

- Allen, J. R. (2003). pH Electrodes, Ion-Selective Electrodes, and Oxygen Sensors: Electrochemical Sensors Used in the Medical Field. *Laboratory Medicine*, 34(7), 544–547. <https://doi.org/10.1309/xlugkhj85fkbtaff>
- Anthony Lai, F., Erickson, H. P., Rousseau, E., Liu, Q. Y., & Meissner, G. (1988). Purification and reconstitution of the calcium release channel from skeletal muscle. *Nature*, 331(6154), 315–319. <https://doi.org/10.1038/331315a0>
- Baimbridge, K. G., Celio, M. R., & Rogers, J. H. (1992, August 1). Calcium-binding proteins in the nervous system. *Trends in Neurosciences*. Elsevier Current Trends. [https://doi.org/10.1016/0166-2236\(92\)90081-I](https://doi.org/10.1016/0166-2236(92)90081-I)
- Baylor, S. M., & Hollingworth, S. (2011, May). Calcium indicators and calcium signalling in skeletal muscle fibres during excitation-contraction coupling. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*. NIH Public Access. <https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2010.06.001>
- Boron, F., & Henderson, E. K. (1976). Comparison of microelectrode , DMO , and methylamine methods for measuring intracellular pH, 231(3).
- Calderón, J. C., Bolaños, P., & Caputo, C. (2010). Myosin heavy chain isoform composition and Ca(2+) transients in fibres from enzymatically dissociated murine soleus and extensor digitorum longus muscles. *The Journal of Physiology*, 588(Pt 1), 267–279. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2009.180893>
- Calderón, J. C., Bolaños, P., & Caputo, C. (2011). Kinetic changes in tetanic Ca²⁺ transients in enzymatically dissociated muscle fibres under repetitive stimulation. *Journal of Physiology*, 589(21), 5269–5283. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2011.213314>
- Calderón, J. C., Bolaños, P., & Caputo, C. (2014a). Tetanic Ca²⁺ transient differences between slow- and fast-twitch mouse skeletal muscle fibres: a comprehensive experimental approach. *Journal of Muscle Research and Cell Motility*, 35(5–6), 279–293. <https://doi.org/10.1007/s10974-014-9388-7>

- Calderón, J. C., Bolaños, P., & Caputo, C. (2014b, March). The excitation-contraction coupling mechanism in skeletal muscle. *Biophysical Reviews*. Springer. <https://doi.org/10.1007/s12551-013-0135-x>
- Calderón, J. C., Bolaños, P., Torres, S. H., Rodríguez-Arroyo, G., & Caputo, C. (2009). Different fibre populations distinguished by their calcium transient characteristics in enzymatically dissociated murine flexor digitorum brevis and soleus muscles. *Journal of Muscle Research and Cell Motility*, 30(3–4), 125–137. <https://doi.org/10.1007/s10974-009-9181-1>
- Calderon, J. C., Raigosa, D., Giraldo, M., Bolaños, P., & Caputo, C. (2013). Calibration of Ca²⁺ Transients Obtained with the Fast Ca²⁺ and Mg²⁺ Dye Magfluo-4. *Biophysical Journal*, 104(2), 293a. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2012.11.1635>
- Caputo, C., Bolaños, P., & Gonzalez, A. (2004). Inactivation of Ca²⁺ transients in amphibian and mammalian muscle fibres. *Journal of Muscle Research and Cell Motility*, 25(4–5), 315–328. <https://doi.org/10.1007/s10974-004-4071-z>
- Carey, C. M., & Vogel, G. L. (2000). Measurement of calcium activity in oral fluids by ion selective electrode: Method evaluation and simplified calculation of ion activity products. *Journal of Research of the National Institute of Standards and Technology*, 105(2), 267. <https://doi.org/10.6028/jres.105.030>
- F.J.Brinley, JR., A. Scarpa, T. T. (1977). THE CONCENTRATION OF IONIZED MAGNESIUM IN BARNACLE MUSCLE FIBRES.
- Gommans, I. M. P., Vlak, M. H. M., de Haan, A., & van Engelen, B. G. M. (2002). Calcium regulation and muscle disease. *Journal of Muscle Research and Cell Motility*, 23(1), 59–63. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12363286>
- Gommans, I. M. P., Vlak, M. H. M., De Haan, A., & Van Engelen, B. G. M. (2002). Calcium regulation and muscle disease. *Journal of Muscle Research and Cell Motility*, 23(1), 59–63. <https://doi.org/10.1023/A:1019984714528>
- González Pérez, C. (2002). Metodos luminiscentes, 2–30.
- Grynkiewicz, G., Poenie, M., & Tsien, R. Y. (1985). A new generation of Ca²⁺ indicators

- with greatly improved fluorescence properties. *Journal of Biological Chemistry*, 260(6), 3440–3450. <https://doi.org/3838314>
- Hollingworth, S., Aldrich, R. W., & Baylor, S. M. (1987). In vitro calibration of the equilibrium reactions of the metallochromic indicator dye antipyrylazo III with calcium. *Biophysical Journal*, 51(3), 383–393. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(87\)83360-X](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(87)83360-X)
- Hollingworth, Stephen, Gee, K. R., & Baylor, S. M. (2009). Low-affinity Ca²⁺ indicators compared in measurements of skeletal muscle Ca²⁺ transients. *Biophysical Journal*, 97(7), 1864–1872. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2009.07.021>
- Hollingworth, Stephen, Kim, M. M., & Baylor, S. M. (2012). Measurement and simulation of myoplasmic calcium transients in mouse slow-twitch muscle fibres. *The Journal of Physiology*, 590(3), 575–594. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2011.220780>
- Invitrogen, M. probes. (2005). Fluorescent Magnesium Indicators, 1–4.
- Kodzhahinchev, V., Biancolin, A., & Bucking, C. (2018). Quantification of Mg²⁺, Ca²⁺ and H⁺ transport by the gastrointestinal tract of the goldfish, *Carassius auratus*, using the scanning ion-selective electrode technique (SIET). *PLoS ONE*, 13(12), 1–26. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0207782>
- Meissner, G. (1994). RYANODINE RECEPTOR/Ca²⁺ RELEASE CHANNELS AND THEIR REGULATION BY ENDOGENOUS EFFECTORS.
- Olivera, J. F., & Pizarro, G. (2018). A study of the mechanisms of excitation–contraction coupling in frog skeletal muscle based on measurements of [Ca²⁺] transients inside the sarcoplasmic reticulum. *Journal of Muscle Research and Cell Motility*, 39(1–2), 41–60. <https://doi.org/10.1007/s10974-018-9497-9>
- Paredes, R. M., Etzler, J. C., Watts, L. T., Zheng, W., & Lechleiter, J. D. (2008). Chemical calcium indicators. *Methods*, 46(3), 143–151. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2008.09.025>
- Patton, C., Thompson, S., & Epel, D. (2004). Some precautions in using chelators to buffer metals in biological solutions, 35, 427–431. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2003.10.006>

- Rivera Teijón, J. M., & Garrido Pertierra, A. (2006). *Fundamentos de bioquímica estructural - José María Teijón - Google Libros*. Retrieved from <https://books.google.com.co/books?id=avt8LFmp8q4C&pg=PA138&dq=troponina&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwifrICUurjnAhUlqlkKHUG6CXwQ6AEIOTAC#v=onepage&q=troponina&f=false>
- Rodwell, V. W. (2013). *Catabolismo de proteínas y de nitrógeno de aminoácidos*. Harper-Bioquímica Ilustrada.
- Rosenberg, R., Bono, M. S., Braganza, S., Vaishnav, C., Karnik, R., & Hart, A. J. (2018). In-field determination of soil ion content using a handheld device and screen-printed solidstate ion-selective electrodes. *PLoS ONE*, *13*(9), 1–20. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0203862>
- Sandow, A. (1952). EXCITATION-CONTRACTION COUPLING IN MUSCULAR RESPONSE*. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2599245/pdf/yjbm00325-0026.pdf>
- Skoog, D. A., Holler, F. J., & Crouch, S. R. (2008). *Principios de análisis fundamental*.
- Tashiro, M., Tursun, P., & Konishi, M. (2005). Intracellular and Extracellular Concentrations of Na⁺ Modulate Mg²⁺ Transport in Rat Ventricular Myocytes, *89*(November). <https://doi.org/10.1529/biophysj.105.068890>
- Thai, K. T. D., Wismeijer, J. A., Zumpolle, C., de Jong, M. D., Kersten, M. J., & de Vries, P. J. (2011). High incidence of peripheral blood plasmacytosis in patients with dengue virus infection. *Clinical Microbiology and Infection: The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, *17*(12), 1823–1828. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2010.03434.x>
- Thermoscientific. (2016). Varioskan LUX multimode microplate reader Versatility simplified for a range of applications.
- Tran, V., Park, M. C. H., & Stricker, C. (2018). An improved measurement of the Ca²⁺-binding affinity of fluorescent Ca²⁺ indicators. *Cell Calcium*. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2018.01.001>

Willoughby, D., Thomas, R. C., & Schwiening, C. J. (2001). The effects of intracellular pH changes on resting cytosolic calcium in voltage-clamped snail neurones, 405–416.

Wilson, L. (2010). *Methods in Cell Biology. Volume 99. CALCIUM IN LIVING CELLS.* (S. E. P. Matsudaira, Ed.).

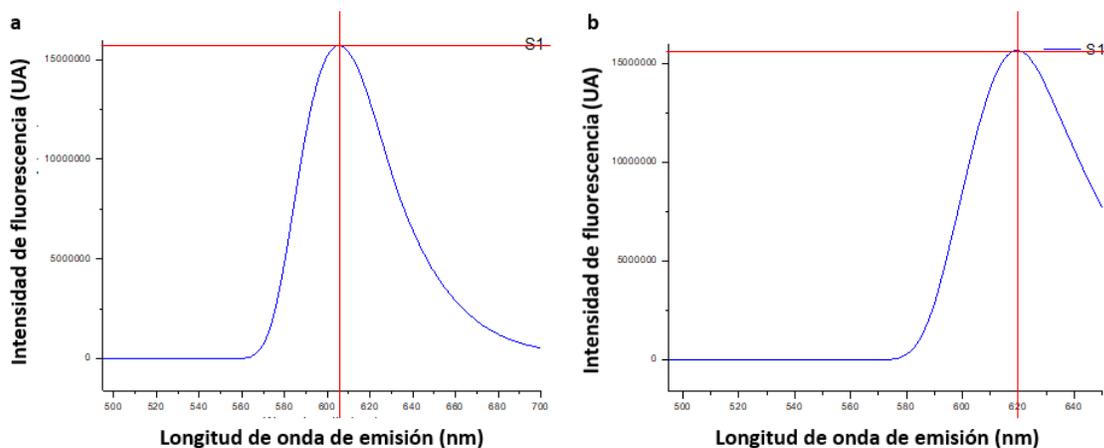
Zhao, M., Hollingworth, S., & Baylor, S. M. (1996). Properties of tri- and tetracarboxylate Ca²⁺ indicators in frog skeletal muscle fibers. *Biophysical Journal*, 70(2), 896–916. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(96\)79633-9](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(96)79633-9)

13. Anexos

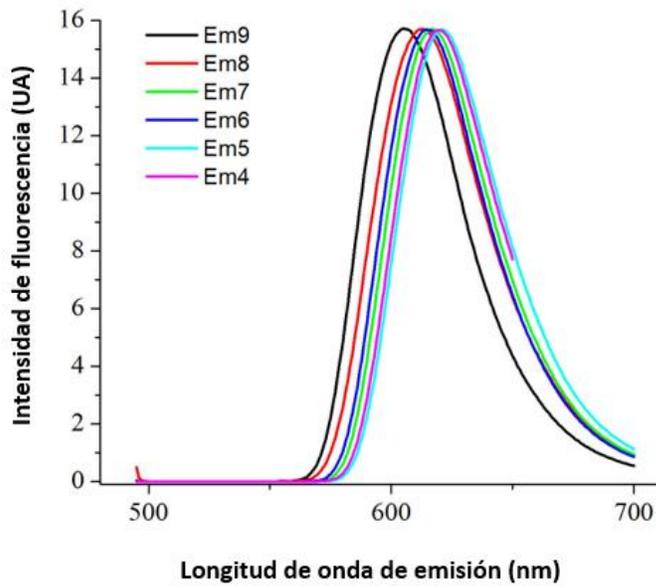
Inicialmente se realizaron ensayos en el equipo de fluorescencia FluoroMax-4 HORIBA scientific del grupo GIBIC en la Universidad de Antioquia seccional oriente, estos ensayos se realizaron midiendo el espectro de emisión en rangos de 495 nm – 700 nm y excitando a 490 nm. Se usaron soluciones de Ca^{2+} a diferentes concentraciones. Sin embargo, el equipo no mostró diferencias en ningún caso.

El anexo 1 muestra en el panel a, el espectro de emisión de Mag-Fluo-4 en H_2O destilada y en el panel b, el espectro de emisión de Mag-Fluo-4 en Tyrode 50000 μM Ca^{2+} . No hay variación en la intensidad de fluorescencia a pesar de existir cambios en la concentración de Ca^{2+} .

En el anexo 2 se analizan diferentes espectros obtenidos en el equipo con soluciones de Ca^{2+} a diferentes concentraciones, y se encontró que no hubo variación en la intensidad de fluorescencia de emisión.



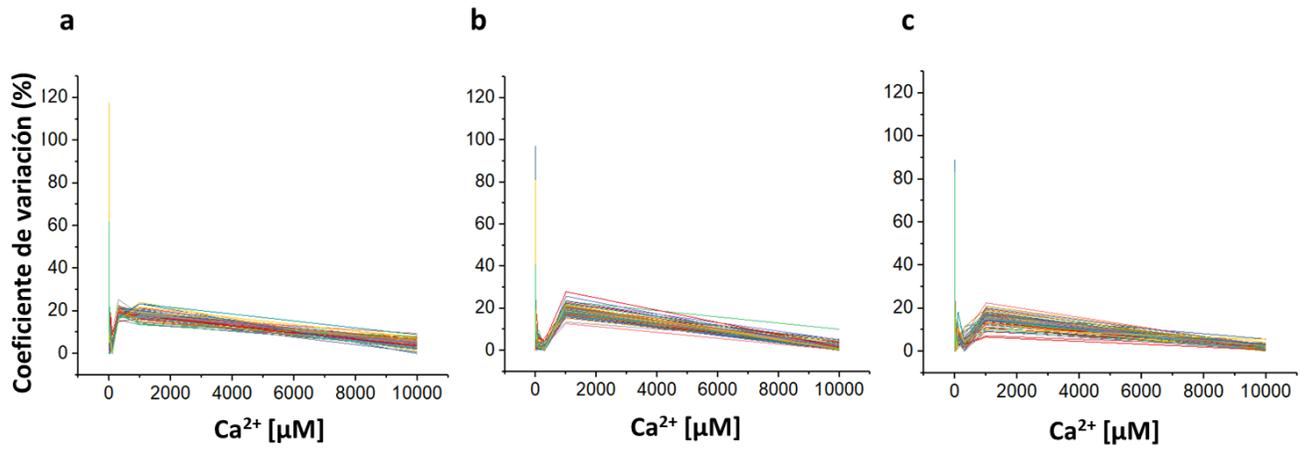
Anexo 1. Comparación de espectro de emisión de fluorescencia de Mag-Fluo-4 en H_2O destilada (a) y en Tyrode 50000 μM Ca^{2+} (b).



Anexo 2. Espectros de emisión tomados con el equipo FluoroMax-4 HORIBA scientific de soluciones de Mag-Fluo-4 con soluciones de Ca^{2+} a diferentes concentraciones.

pCa	11 febrero	11 febrero	11 febrero	11 febrero	18 febrero	18 febrero	18 febrero	18 febrero	25 febrero	25 febrero	25 febrero	25 febrero
		normalizado										
		B/298,6		D/291,9		F/1167,5		H/1152		J/1047		L/1013
-8	1,8045	0,00604	1,8185	0,00623	13,223	0,01133	12,7375	0,01106	5,588	0,00534	6,0525	0,00597
-7,397	2,5475	0,00853	2,739	0,00938	6,3295	0,00542	5,9485	0,00516	6,4085	0,00612	6,1045	0,00603
-7	2,641	0,00884	2,9375	0,01006	7,0155	0,00601	6,9725	0,00605	7,7995	0,00745	7,1825	0,00709
-6,602	2,6215	0,00878	2,7895	0,00956	8,522	0,0073	8,6245	0,00749	9,657	0,00922	9,6345	0,00951
-6,301	6,3945	0,02141	6,015	0,02061	15,895	0,01361	15,45	0,01341	12,425	0,01187	11,65	0,0115
-6	6,4915	0,02174	6,319	0,02165	26,335	0,02256	26,195	0,02274	25,36	0,02422	25,555	0,02523
-5,397	20,595	0,06897	19,935	0,06829	69,86	0,05984	73,025	0,06339	67,065	0,06405	67,43	0,06656
-5	35,025	0,1173	30,71	0,10521	116,6	0,09987	118,7	0,10304	97,81	0,09342	98,395	0,09713
-4,397	148,25	0,49648	131,4	0,45015	453,7	0,38861	452,9	0,39314	392,7	0,37507	386,1	0,38115
-4	183,1	0,61319	202,25	0,69287	603,5	0,51692	593,75	0,51541	462	0,44126	519,2	0,51254
-3	295,75	0,99046	291,9	1	1167,5	1	1152	1	1044,5	0,99761	1012,7	0,9997
-2	298,6	1	288,15	0,98715	858,7	0,7355	857,7	0,74453	1047	1	1013	1

Anexo 3. Datos normalizados en Origin, con los que se realizó la K_d promedio de Ca^{2+} en la figura 18.



Anexo 4. Coeficiente de variación vs concentración de Ca^{2+} en medidas repetidas de fluorescencia. Se realizaron tres lecturas, a los tiempos 0 (a), 7 (b) y 14 (c) min después del pipeteo y se analizó punto a punto el coeficiente de variación para encontrar cómo cambian las muestras en el tiempo.