



**UNIVERSIDAD
DE GRANADA**

FACULTAD DE FARMACIA
DEPARTAMENTO DE FISCOQUÍMICA

Programa de Doctorado en Farmacia

TESIS DOCTORAL CON MENCIÓN INTERNACIONAL

*** * ***

**DISEÑO, SÍNTESIS Y FOTOFÍSICA DE NUEVOS
SENSORES FLUORESCENTES APLICABLES A
LA DETECCIÓN DE EVENTOS BIOLÓGICOS EN
CÉLULAS VIVAS Y TEJIDOS**

Javier Valverde Pozo

Directores de Tesis:

Eva María Talavera Rodríguez

José Manuel Paredes Martínez

Granada, 2023

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales
Autor: Javier Valverde Pozo
ISBN: 978-84-1117-867-9
URI: <https://hdl.handle.net/10481/82122>

El trabajo recogido en la presente Tesis Doctoral ha sido realizado en el grupo de investigación “Fotoquímica y Fotobiología” (FQM-247) de la Universidad de Granada, bajo la supervisión de la Dra. Eva María Talavera Rodríguez y el Dr. José Manuel Paredes Martínez. Su consecución ha sido posible gracias al programa de ayudas para la Formación del Profesorado Universitario (Ref. FPU17/04749) del Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades, así como al programa de ayudas complementarias de movilidad para estancias breves y traslados temporales para beneficiarios del programa FPU (Ref. EST21/00396) del Ministerio de Universidades. Además, los gastos experimentales derivados de la misma han sido sufragados por los proyectos de investigación CTQ2017-85658-R y A-FQM-230-UGR20 del Ministerio de Economía, Industria y Competitividad, y de la Consejería de Economía, Innovación y Ciencia de la Junta de Andalucía, respectivamente.

Índice

Abreviaturas y acrónimos	1
Summary/resumen	5
I. Introducción	13
I.1. Justificación del trabajo	14
I.2. Objetivos	16
II. Antecedentes bibliográficos	18
II.1. Enzimas como sensores en el diagnóstico biomédico ...	19
II.1.1. Enzimas de interés como marcadores de distintas patologías	19
II.1.2. Sistemas de detección de la actividad enzimática	32
II.1.2.1. <i>Sistemas de detección mediante fluorescencia</i>	37
II.2. Espectroscopía de fluorescencia	38
II.2.1. Descripción general del fenómeno luminiscente	38
II.2.2. Microscopía de fluorescencia	41
II.2.2.1. <i>Microscopía confocal de fluorescencia</i>	42
II.2.2.2. <i>Microscopía con excitación por dos fotones</i>	43
II.2.2.3. <i>Microscopía de superresolución</i>	56
II.3. Reacciones de transferencia de carga intramolecular (ICT)	64
II.4. Derivados del Dicianometileno-4H-Pirano como sensores ICT	71
III. Materiales y Métodos	75
III.1. Instrumentación	76
III.1.1. Balanza	76
III.1.2. pH-metro	76
III.1.3. Sonificador	76
III.1.4. Agitador magnético	76
III.1.5. Agitador	76
III.1.6. Espectrofotómetro de absorción UV-Vis	77
III.1.7. Nanodrop	77
III.1.8. Espectrofotómetro de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR)	78
III.1.9. Espectrofotómetro de estado estacionario	79
III.1.10. Fluorímetro con resolución temporal	79
III.1.11. Incubador de CO ₂	82

III.1.12. Campana de flujo laminar vertical	82
III.1.13. Microscopios	82
III.1.13.1. <i>MicroTime 200</i>	82
III.1.13.2. <i>Leica TCS-SP5 II</i>	88
III.1.13.3. <i>Abberior Expert Line</i>	88
III.1.13.4. <i>Estereomicroscopio Nikon SMZ18</i>	90
III.1.14. Espectrómetro de resonancia magnética nuclear	91
III.1.15. Espectrómetro de masas	91
III.2. Reactivos	91
III.3. Metodología	93
III.3.1. Síntesis: aspectos generales	93
III.3.2. Preparación de disoluciones	94
III.3.3. Clonación y generación de vectores para la expresión de pepN bacteriano. Producción y purificación del mismo	95
III.3.4. Preparación de las muestras de bacterias para microscopía	96
III.3.5. Preparación de las muestras de suero sanguíneo	97
III.3.6. Preparación de las muestras de células eucariotas para microscopía	98
III.3.7. Preparación de los tejidos para microscopía ...	99
III.3.8. Preparación de los peces cebrá para microscopía	100
III.3.9. Procedimientos experimentales	102
III.3.9.1. <i>Medidas de absorción</i>	102
III.3.9.2. <i>Medidas de fluorescencia en estado estacionario</i>	102
III.3.9.3 <i>Medidas de fluorescencia con resolución temporal</i>	103
III.3.9.4. <i>Medidas de microscopía de fluorescencia</i>	103
III.3.9.5. <i>Medidas de RMN</i>	105
III.3.9.6. <i>Ensayo de viabilidad celular, MTT</i>	105
III.3.9.7. <i>Cálculo del CLogP</i>	106
III.3.10. Métodos de análisis	106
III.3.10.1. <i>Métodos de análisis de datos</i>	106
III.3.10.2. <i>Métodos de análisis de imágenes</i>	110
IV. Resultados y Discusión	111

IV.1. Síntesis del fluoróforo y sensores	112
IV.1.1. Fluoróforo DCM-NH ₂	112
IV.1.2. Sonda DCM-NH-Ala	115
IV.1.3. Sonda DCM-NH-Pro-Gly	118
IV.1.4. Sonda DCM-HBU	120
IV.2. Caracterización y aplicaciones biológicas del compuesto DCM-NH-Ala	121
IV.2.1. Caracterización fotofísica del sensor y de la reacción enzimática	121
IV.2.1.1. <i>Caracterización fotofísica del fluoróforo y del sensor.....</i>	<i>121</i>
IV.2.1.2. <i>Caracterización fotofísica de la reacción enzimática</i>	<i>128</i>
IV.2.2. Parámetros cinéticos según el modelo de Michaelis-Menten de la reacción enzimática DCM-NH-Ala – pepN	138
IV.2.3. Aplicaciones biológicas del DCM-NH-Ala	143
IV.2.3.1. <i>Seguimiento ratiométrico de la actividad endógena de la pepN en bacterias</i>	<i>143</i>
IV.2.3.2. <i>Estudio de la actividad pepN en biofilms bacterianos</i>	<i>156</i>
IV.3. Caracterización y aplicaciones biológicas del compuesto DCM-NH-Pro-Gly	160
IV.3.1. Caracterización fotofísica del sensor y de la reacción enzimática	160
IV.3.2. Parámetros cinéticos de la reacción enzimática DCM-NH-Pro-Gly – DPP IV	172
IV.3.3. Aplicaciones biológicas del DCM-NH-Pro-Gly	175
IV.3.3.1. <i>Detección de DPP IV en suero humano...</i>	<i>175</i>
IV.3.3.2. <i>Imágenes de fluorescencia de DPP IV en células tumorales</i>	<i>187</i>
IV.3.3.3. <i>Imagen de DPP IV en tejidos tumorales.....</i>	<i>194</i>
IV.3.3.4. <i>Imagen in vivo de DPP IV en pez cebra...</i>	<i>198</i>
IV.4. Caracterización y aplicaciones biológicas del compuesto DCM-HBU	204
IV.4.1. Caracterización fotofísica del sensor y de la reacción enzimática	204
IV.4.2. Aplicaciones biológicas del DCM-HBU	211

IV.4.2.1. Seguimiento ratiométrico de la actividad TYR en células tumorales	211
IV.4.2.2. Seguimiento ratiométrico de la actividad TYR en tejidos tumorales	219
IV.4.2.3. Imagen in vivo de TYR en pez cebra	222
V. Conclusions/conclusiones	227
VI. Bibliografía	234
VII. Anexos	257
VIII. Publicaciones	270

Abreviaturas y acrónimos

A	Grupo aceptor o electrón-atrayente
AChE	Acetilcolinesterasa
Ala	Alanina
ALP	Fosfatasa alcalina
ALT	Alanina transaminasa
APN/pepN	Alanina aminopeptidasa
AST	Aspartato transaminasa
BChE	Butirilcolinesterasa
CCs	Catepsinas de cisteína
CK	Creatina quinasa
COX-2	Ciclooxigenasa-2
CT	Transferencia de carga
D	Grupo dador o electrón-donante
DCM-NH-Ala	DCM-NH-alanina
DCM-NH-Pro-Gly	DCM-NH-prolina-glicina
DCM-HBU	DCM-hidroxibencilurea
DIPEA	N, N-Diisopropiletilamina
DMABN	4,4'-dimetilaminobenzonitrilo
dpf	día post-fecundación
DPP IV	Dipeptidil peptidasa IV
DPP VIII	Dipeptidil peptidasa VIII
EF	Estado fundamental
FAP	Proteína de activación de fibroblastos α

FLIM	Microscopía de imagen de tiempo de vida de fluorescencia (<i>Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy</i>)
FRET	Transferencia de energía de resonancia de Förster (<i>Förster Resonance Energy Transfer</i>)
GGT	Gamma glutamil transferasa
GM	Unidad Goëppert-Mayer
G6PD	Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa
HATU	Hexafluorofosfato Azabenzotriazol Tetrametil Uronio
HBU	4-hidroxibencilamina
Hyp	Hidroxi prolina
ICT	Transferencia de carga intramolecular (<i>Intramolecular Charge Transfer</i>)
LAP	Leucina aminopeptidasa
LDH	Lactato deshidrogenasa
LE	Localmente excitado (<i>Locally Excited</i>)
MMP-9	Metaloproteinasa de la matriz 9
MPE	Excitación multifotónica (<i>Multiphoton Excitation</i>)
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
NA	Apertura numérica (<i>Numerical Aperture</i>)
NAG	N-acetil- β -D-glucosaminidasa
NIR	Infrarrojo cercano (<i>Near-Infrared</i>)
OPE	Excitación monofotónica (<i>One-Photon Excitation</i>)

OPM	Microscopía de fluorescencia con excitación monofotónica (<i>One-Photon Excitation Fluorescence Microscopy</i>)
PALM	Microscopía de localización fotoactivada (<i>Photo-Activated Localization Microscopy</i>)
PAP	Fosfatasa ácida prostática
PepN/APN	Alanina aminopeptidasa
PICT	Transferencia de carga intramolecular plana (<i>Planar Intramolecular Charge Transfer</i>)
PNLIP	Lipasa pancreática
Pro	Prolina
Pro-Gly	Prolina-glicina
PSF	Función de dispersión de punto (<i>Point Spread Function</i>)
RICT	Rehibridación por Transferencia Intramolecular de Carga (<i>Rehybridization Intramolecular Charge Transfer</i>)
RMN	Resonancia magnética nuclear
SD	Desviación estándar (<i>Standard Deviation</i>)
SE	Error estándar (<i>Standard Error</i>)
STED	Microscopía de depleción de emisión estimulada (<i>Stimulated Emission Depletion Microscopy</i>)
STORM	Microscopía de reconstrucción óptica estocástica (<i>Stochastic Optical Reconstruction Microscopy</i>)
TCSPC	Contaje de fotones individuales correlacionados con el tiempo (<i>Time-correlated Single Photon Counting</i>)

TE	Transferencia electrónica
TICT	Transferencia de carga intramolecular girada (<i>Twisted Intramolecular Charge Transfer</i>)
Ti:Sa	Titanio:zafiro
TLC	Cromatografía en capa fina (<i>Thin-Layer Chromatography</i>)
TPA	Absorción por dos fotones (<i>Two-Photon Absorption</i>)
TPE	Excitación bifotónica (<i>Two-Photon Excitation</i>)
TPM	Microscopía de fluorescencia con excitación bifotónica (<i>Two-Photon Excitation Fluorescence Microscopy</i>)
TRAP	Fosfatasa ácida tartrato-resistente
TYR	Tirosinasa
UA	Unidad de Ayri
WICT	Transferencia de carga intramolecular oscilante (<i>Wagging Intramolecular Charge Transfer</i>)

SUMMARY
/
RESUMEN

Summary/Resumen

Summary

Abnormality of the enzyme metabolism system leads to a multitude of diseases of diverse aetiology. Therefore, the detection of the activity of certain enzymes provides valuable information useful for diagnosis, prognosis, or assessment of response to therapy. Among the different enzymes used as markers, there are three that occupy relevant positions given their implications in health: alanine aminopeptidase (pepN), dipeptidylpeptidase IV (DPP IV) and tyrosinase (TYR). Thus, pepN is a protease involved in several pathological processes, including the survival, growth and development of microorganisms, in particular Gram-negative or Gram (-) bacteria. DPP IV is a transmembrane glycoprotein found in the blood circulation, which plays a key role in processes such as glucose metabolism and T-cell stimulation. Additionally, it is overexpressed in colon, kidney, prostate and thyroid cancers, and may even serve as a diagnostic marker in patients with lysosomal storage diseases. Finally, TYR is an enzyme whose abnormal expression or activation is associated with diseases such as melanoma or Parkinson's disease. For all these reasons, the detection of these enzymes is of great interest to the scientific community since, in addition to allowing the diagnosis and monitoring of the disease in which they are involved, they can become very attractive targets for pharmacological therapy. Among the different enzyme activity assays, fluorimetric techniques, and more specifically, fluorescence imaging microscopy, are of great interest due to their high sensitivity and non-invasive nature. In addition, two-photon excitation fluorescence microscopy (TPM) at near-infrared wavelengths (NIR) allows for in-depth imaging of the interior of the organism under study, while super-resolution fluorescence microscopy (among the various existing methods, the STED method, Stimulated Emission Depletion) achieves, as its name suggests, the acquisition of images with an associated improvement in resolution. Therefore, the synthesis and application of new NIR fluorescent probes, excitable by two photons and useful for super-resolution microscopy, is of great interest in biological analysis.

As a consequence of the above introduction, this Doctoral Thesis has been proposed with the aims of synthesising, photophysically characterising and

applying to the study of cells, tissues and living organisms, three new fluorescent sensors that are specific for each of the three enzymes mentioned above and that meet the aforementioned requirements. For this purpose, by starting from the dicyanomethylene-4H-pyran (DCM-NH₂) derivative, well known as a NIR sensor in which there is an intramolecular charge transfer (ICT), the DCM-NH-Ala, DCM-NH-Pro-Gly and DCM-HBU sensors have been obtained by coupling an alanine residue, a proline-glycine dipeptide, and a 4-hydroxybenzylamine group, respectively, as pepN, DPP IV and TYR-acting groups. The addition of the aforementioned groups quenches the NIR fluorescence of the DCM-NH₂ fluorophore due to the strong electron acceptor effect of the amide bond. Subsequently, when the enzyme in question acts, DCM-NH₂ is released, restoring the intramolecular charge transfer and emitting an intense fluorescent signal with a maximum above 660 nm. Since the fluorescent signals of the sensors occur in the range between 500 and 550 nm, which is the wavelength range where the DCM-NH- compound bound to the various electronic acceptors shows a weak signal, the synthesised sensors can be considered as ratiometric probes, which supposes an additional advantage in detection, as it allows the calculation of enzyme activity through the ratio between the signal around 660 nm (corresponding to the DCM-NH₂ generated when the enzyme breaks the amide bond) and the signal in the range 500-550 nm.

With the synthesis and application of the DCM-NH-Ala sensor, a new methodology for the identification of Gram-negative bacteria expressing pepN has been proposed. Thus, hydrolysis of this substrate by pepN produces a strong increase in the fluorescence band with peak at 662 nm when excited by a single photon of 480 nm or by two NIR photons (of approximately 800 nm). The rate of increase of the emission signal depends on the intracellular concentrations of pepN, providing a powerful tool to detect various virulent bacteria within a few minutes and with the inherent advantages of biphoton excitation. The enzyme kinetics has been solved, Michaelis-Menten parameters have been obtained and the photophysics of the released DCM-NH₂ fluorophore has been studied. Furthermore, DCM-NH₂ meets the requirements for use in super-resolution microscopy. This methodology has shown that in bacteria with high pepN activity, the enzyme production sites are mainly located in the bacterial membrane, as well as in

some structures inside the bacterial body. In addition, this sensor has been shown to be useful in the measurement of enzyme activity during bacterial biofilm formation.

With regard to the DCM-NH-Pro-Gly sensor, when the dipeptide group is released by the specific enzymatic action of DPP IV, again the ICT of DCM-NH₂ is restored, forming a system that shows a high ratiometric fluorescence. With this new probe, it has been possible to detect, rapidly and efficiently, the enzymatic activity of DPP IV in live cells and human cancerous tissues, both colon and kidney, as well as in whole organisms, using zebrafish, in which the quantitative expression of DPP IV activity has been followed with the days post-fertilisation (dpf) of the fish, by quantitative calculation of the NIR fluorescence intensity. In addition to these results and due to the possibility of multiphoton excitation, it has been possible to quantitatively detect DPP IV activity in human serum in a direct way, without the need for additional treatments to eliminate the autofluorescence (and subsequent uncontrollable photobleaching) that human serum shows when excited by a single photon of visible light.

Finally, the DCM-HBU substrate releases the aforementioned NIR fluorescent signal after TYR-mediated oxidation followed by hydrolysis of the ureic bond. As indicated in the previous cases, the released dye shows the characteristic ratiometric fluorescence. In this case, the possibility of multiphoton excitation allows fluorescence imaging in melanoma tissues (in which TYR is overexpressed) at greater tissue depths than previously proposed probes, because both excitation and emission light have a wavelength that avoids the drawbacks of UV and Visible light in biological systems, such as cellular absorption, autofluorescence and scattering. In addition, the probe is also useful for quantitative detection of TYR activity in whole organisms, as demonstrated in zebrafish larvae with TYR activity. It is expected that this new NIR, biphotonic, ratiometric fluorescent probe will be useful for the accurate detection of TYR in complex biosystems at greater depths than other previously proposed fluorescent probes.

It should be noted that inhibition studies for all three enzymes, both in vitro and in vivo, clearly reveal that the sensors are sensitive to the action of their

corresponding enzyme. Thus, when the enzyme is inhibited, the substrate does not suffer significant alterations in its photophysical properties.

Resumen

Multitud de enfermedades de diversa etiología son producidas por anomalías en el metabolismo del sistema enzimático. Por lo tanto, la detección de la actividad de ciertas enzimas proporciona información útil para el diagnóstico, el pronóstico, o la evaluación de la respuesta a la terapia. Entre las diferentes enzimas utilizadas como marcadores, existen tres que ocupan unas posiciones relevantes dadas sus implicaciones en la salud: la alanina aminopeptidasa (pepN), la dipeptidilpeptidasa IV (DPP IV) y la tirosinasa (TYR). Así, la pepN es una proteasa implicada en varios procesos patológicos, entre los que se encuentra la supervivencia, el crecimiento y el desarrollo de microorganismos, en concreto las bacterias gramnegativas o Gram (-). Por su parte, la DPP IV es una glicoproteína transmembrana encontrada en la circulación sanguínea, la cual juega un papel clave en procesos como el metabolismo de la glucosa y la estimulación de las células T. Adicionalmente, se encuentra sobreexpresada en cáncer de colon, riñón, próstata y tiroides, y puede servir incluso como marcador de diagnóstico en pacientes con enfermedades de depósito lisosomal. Finalmente, la TYR es una enzima cuya expresión o activación anómala está asociada con enfermedades como el melanoma o el Parkinson. Por todo ello, la detección de las mismas suscita un gran interés en la comunidad científica dado que, además de permitir el diagnóstico y seguimiento de la enfermedad en la que estén implicadas, pueden convertirse en dianas muy atractivas para la terapia farmacológica. Entre los distintos ensayos de actividad enzimática, las técnicas fluorimétricas, y más concretamente, la microscopía de imagen de fluorescencia, son de gran interés dada su alta sensibilidad y su carácter no invasivo. Adicionalmente, la microscopía de fluorescencia con excitación por dos fotones (*Two-photon microscopy*, TPM) de longitud de onda cercana al infrarrojo (por sus siglas en inglés, NIR) permite lograr imágenes a mayor profundidad del interior del organismo estudiado, mientras que la microscopía de fluorescencia de superresolución (entre las distintas existentes, el método STED, *Stimulated Emission Depletion*) consigue, como su nombre indica, la adquisición de imágenes con una mejoría asociada en su

resolución. Por ello, la síntesis y aplicación de nuevas sondas fluorescentes NIR, excitables por dos fotones y útiles para microscopía de superresolución adquiere un gran interés en el análisis biológico.

Como consecuencia de la anterior introducción, se ha planteado la presente Tesis Doctoral con los objetivos de sintetizar, caracterizar fotofísicamente y aplicar al estudio de células, tejidos y organismos vivos, tres nuevos sensores fluorescentes que sean específicos para cada una de las tres enzimas citadas y que cumplan los requisitos mencionados con anterioridad. Para ello, partiendo del derivado del dicianometileno-4H-pirano (DCM-NH₂), bien conocido como sensor NIR en el que existe una transferencia de carga intramolecular (por sus siglas en inglés, ICT), se han obtenido los sensores DCM-NH-Ala, DCM-NH-Pro-Gly y DCM-HBU, mediante el acoplamiento de un residuo alanina, un dipéptido de prolina-glicina, y un grupo 4-hidroxibencilamina, respectivamente, como grupos sensibles a la actuación de pepN, DPP IV y TYR. La adición de los grupos mencionados extingue (quenchea) la fluorescencia NIR del fluoróforo DCM-NH₂ debido al fuerte efecto como aceptor electrónico del enlace amida. Posteriormente cuando actúe la enzima en cuestión, se libera el DCM-NH₂ restaurándose la transferencia de carga intramolecular y emitiendo una intensa señal fluorescente con máximo sobre los 660 nm. Debido a que las señales fluorescentes de los sensores se presentan en el intervalo entre 500 y 550 nm, que es el intervalo de longitudes de onda donde muestra una débil señal el compuesto DCM-NH- unido a los distintos aceptores electrónicos, los sensores sintetizados se pueden considerar como sondas ratiométricas, lo que supone una ventaja adicional en la detección, ya que permite el cálculo de la actividad enzimática a través de la relación entre la señal alrededor de 660 nm (correspondiente al DCM-NH₂ que se genera cuando la enzima rompe el enlace amida) y la señal en el intervalo 500-550 nm.

Con la síntesis y aplicación del sensor DCM-NH-Ala se ha propuesto una nueva metodología para la identificación de bacterias gramnegativas que expresan pepN. Así, la hidrólisis de este sustrato por pepN produce un fuerte aumento de la banda de fluorescencia con pico a 662 nm cuando es excitada por un único fotón de 480 nm o por dos fotones NIR (de aproximadamente 800 nm). La velocidad de aumento de la señal de emisión depende de las concentraciones intracelulares de pepN, lo que proporciona una potente

herramienta para detectar diversas bacterias virulentas en pocos minutos y con las ventajas inherentes a la excitación bifotónica. Se ha resuelto la cinética enzimática, obteniéndose los parámetros de Michaelis-Menten y se ha estudiado la fotofísica del fluoróforo DCM-NH₂ liberado. Además, el DCM-NH₂ cumple los requisitos para su uso en microscopía de superresolución. Con esta metodología se ha conseguido mostrar que en bacterias con alta actividad pepN, los sitios de producción de la enzima se encuentran situados principalmente en la membrana bacteriana, así como en algunas estructuras del interior del cuerpo bacteriano. Adicionalmente, se ha demostrado la utilidad de este sensor en la medida de la actividad enzimática durante la formación de biofilms bacterianos.

En lo que respecta al sensor DCM-NH-Pro-Gly, cuando el grupo dipéptido es liberado por la acción enzimática específica de la DPP IV, de nuevo el ICT del DCM-NH₂ se restablece, formando un sistema que muestra una elevada fluorescencia ratiométrica. Con esta nueva sonda, se ha podido detectar, rápida y eficazmente, la actividad enzimática de la DPP IV en células vivas y tejidos humanos cancerígenos, tanto de colon como de riñón, así como en organismos enteros, utilizando el pez cebra, en el que se ha seguido la expresión cuantitativa de la actividad de DPP IV con los días post fecundación (dpf) de los peces, mediante el cálculo cuantitativo de la intensidad de fluorescencia NIR. En adición a estos resultados y debido a la posibilidad de la excitación multifotónica, se ha podido detectar cuantitativamente, la actividad de DPP IV en el suero humano de una forma directa, sin la necesidad de tratamientos adicionales que eliminen la autofluorescencia (y el posterior e incontrolable fotoblanqueo) que muestra el suero humano cuando se excita por un solo fotón de luz visible.

Por último, el sustrato DCM-HBU libera la ya mencionada señal fluorescente NIR tras una oxidación mediada por TYR seguida de la hidrólisis del enlace ureico. Como se ha indicado en los casos anteriores, el colorante liberado muestra la característica fluorescencia ratiométrica. En este caso, la posibilidad de la excitación multifotónica permite la obtención de imágenes de fluorescencia en tejidos de melanoma (en los que TYR está sobre-expresada) a mayores profundidades tisulares que las sondas hasta ahora propuestas, debido a que tanto la luz de excitación como la de emisión tienen una longitud de onda que evita los inconvenientes que acarrea la luz UV y

Visible en los sistemas biológicos, como son la absorción celular, la autofluorescencia y la dispersión. Además, la sonda también es útil para la detección cuantitativa de la actividad TYR en organismos completos, como se ha demostrado en larvas de pez cebra con actividad TYR. Se espera que esta nueva sonda fluorescente NIR, bifotónica y ratiométrica sea útil para la detección precisa de TYR en biosistemas complejos a mayor profundidad que otras sondas fluorescentes anteriormente propuestas.

Se debe resaltar que los estudios de inhibición para las tres enzimas, tanto *in vitro* como *in vivo*, revelan claramente que los sensores son sensibles a la actuación de su enzima correspondiente. Así, cuando esta es inhibida, el sustrato no sufre alteraciones significativas en sus propiedades fotofísicas.

INTRODUCCIÓN

I. Introducción

I.1. Justificación del trabajo

Las enzimas juegan un papel muy significativo en el campo del diagnóstico y la terapéutica dada su implicación en el metabolismo celular. Con frecuencia, multitud de patologías de distinta índole están asociadas a desordenes enzimáticos, ya sea por cursar con un aumento o, por el contrario, con una disminución en la expresión y/o actividad de una o varias enzimas específicas (1-3). Por ello, su detección en un medio biológico resulta de gran interés clínico por la valiosa información que puede proporcionar. Entre las muchas enzimas interesantes, la alanina aminopeptidasa (pepN), la dipeptidil peptidasa IV (DPP IV) y la tirosinasa (TYR) ocupan una posición relevante y a su detección en diferentes sistemas vivos, se ha dedicado la presente Tesis Doctoral.

Como es conocido, el estudio y comprensión de los procesos biológicos se puede lograr a través de la adquisición y análisis de imágenes de microscopía. Para obtener imágenes representativas de moléculas específicas que están presentes a bajas concentraciones en células y tejidos vivos, las técnicas de imagen deben de ser altamente sensibles. Por esta razón, atrae en la actualidad mucha atención el empleo de sondas fluorescentes moleculares para monitorizar la actividad biológica a través de la medida de la concentración de iones y moléculas de importancia, en el interior de células, tejidos y organismos vivos, mediante imágenes de microscopía de fluorescencia, tanto de intensidad como de tiempos de vida (4). En adición a su gran sensibilidad, se debe de citar el carácter no invasivo de las sondas fluorescentes en general. Así, mediante la información que estas técnicas proporcionan, se están logrando avances únicos en el análisis biológico y en la visualización de acontecimientos dinámicos en el interior de los organismos investigados, por lo que la síntesis y aplicación de nuevas sondas fluorescentes adquiere gran relevancia en la actual investigación de procesos intracelulares e intercelulares (5).

Uno de los requisitos fundamentales que han de tener estos sensores para que las imágenes de fluorescencia puedan revelar con suficiente sensibilidad la función que se desea explorar es que la emisión de la sonda no solape con la de ningún otro compuesto en el organismo estudiado al objeto

de que no distorsione la estimación que se persigue. Asimismo, es necesario una señal suficientemente alta para que las imágenes sean brillantes y destaquen del fondo con claridad. Con estos requerimientos, se han diseñado sondas fluorescentes que emiten a longitudes de onda y con tiempos de decaimiento de fluorescencia diferentes de la autofluorescencia que presentan las células y tejidos (6). Así, se han sintetizado moléculas fluorescentes que emiten en el rojo y cerca del infrarrojo (NIR, “*near infra-red*”) (7-9), lo que consigue evitar en gran medida el posible solapamiento con la autofluorescencia de los fluidos biológicos. En un buen número de casos, dichas sondas fluorescentes que requieren la excitación de la luz ultravioleta-visible (UV-Vis) se han empleado con la microscopía de un fotón (OPM, “*one-photon microscopy*”). Esto limita prácticamente su uso a la investigación *in vivo*, siendo difícil obtener imágenes claras en las muestras biológicas a cierta profundidad debido a la absorción de la luz de excitación, las propiedades de dispersión de los tejidos y su autofluorescencia, todo lo cual provoca una degradación de la resolución de la imagen. No obstante, suele ser una solución aceptable cuando se pretenden obtener imágenes en fluidos biológicos o en células. Sin embargo, para lograr una penetración profunda en el interior del organismo, es requisito indispensable que la luz incidente sea también de longitud de onda larga. Para alcanzar este objetivo, se puede utilizar la metodología consistente en excitar el fluoróforo mediante la absorción de dos fotones (TPA) simultáneos de una longitud de onda NIR que duplique o exceda la que se necesitaría para excitar ese mismo fluoróforo con un solo fotón (10, 11), técnica conocida con el nombre de microscopía de fluorescencia por dos fotones (TPM, “*two-photon microscopy*”).

Además de estos progresos, otros avances recientes en la instrumentación de la microscopía, junto con la combinación de diferentes enfoques fotofísicos y matemáticos, han permitido superar el límite de difracción de la luz en lo que a resolución de las imágenes se refiere, lo que ha ampliado el campo de la microscopía de fluorescencia hasta la escala nanométrica. Entre estas técnicas, el denominado método STED (*Stimulated Emission Depletion*), introducido por Hell y Wichmann en 1994 (12), es uno de los más interesantes.

Para alcanzar la detección cuantitativa de la actividad enzimática en el interior de sistemas vivos tales como células, tejidos y organismos completos,

una de las estrategias más interesantes es el diseño de sondas ratiométricas. Las sondas fluorescentes ratiométricas están constituidas por dos fluoróforos en la misma molécula que proporcionan dos señales independientes, una activable en presencia de la diana y otra que no se altera en presencia de esta última. Así se consigue eliminar los errores debidos a los cambios en las concentraciones locales de sonda que alteran la intensidad de la fluorescencia, ya que la cuantificación de la diana se efectúa mediante la relación entre la señal activable y la inerte, en vez del empleo exclusivo de la intensidad de la señal correspondiente al fluoróforo activable con la diana.

Aunque se han propuesto varias sondas fluorescentes para detectar la actividad de las tres enzimas objeto de estudio en esta Tesis, hasta la fecha no se ha formulado ninguna que reúna las características de emitir intensa fluorescencia NIR, poder excitarse mediante dos fotones NIR simultáneos, producir una señal dual ratiométrica y resultar útiles en microscopía de superresolución, junto a una buena biocompatibilidad y la alta especificidad característica de las reacciones enzimáticas.

I.2. Objetivos

Teniendo en cuenta las anteriores ideas, el objetivo general de la presente Tesis Doctoral es la síntesis, caracterización fotofísica y aplicación de tres nuevos sensores fluorescentes útiles para la detección de pepN, DPP IV y TYR en células vivas, tejidos y organismos completos, no sólo mediante microscopía convencional de fluorescencia confocal, sino también con excitación multifotónica y de superresolución. Para ello, se llevarán a cabo los siguientes objetivos específicos:

- 1) Sintetizar el derivado del benzopirano, dicianometileno-4H-pirano (DCM-NH₂) como fluoróforo con emisión cercana al infrarrojo (NIR). Se trata de un fluoróforo del tipo D- π -A (grupo dador-puente π -grupo aceptor) con alta fotoestabilidad y que muestra un desplazamiento de Stokes de aproximadamente 170 nm, gracias a la transferencia de carga interna que se produce tras su excitación electrónica. Además, posee grandes ventajas, no sólo en lo que se refiere a sus propiedades fotofísicas sino también en

la facilidad con la que se puede etiquetar con un buen número de sustituyentes.

- 2) Partiendo de dicho derivado como núcleo común, sintetizar los sensores DCM-NH-Ala, DCM-NH-Pro-Gly y DCM-HBU, útiles para la detección de las enzimas: pepN, DPP IV y TYR.
- 3) Realizar la caracterización fotofísica y enzimática necesarias de las sondas sintetizadas en disolución, al objeto de proponerlas como posibles sensores útiles de las enzimas citadas en sistemas biológicos, aprovechando su conocida biocompatibilidad.
- 4) Aplicar dichos sensores a diversos sistemas biológicos como son, el suero humano, diversas líneas celulares vivas, tejidos tumorales y organismos completos, para la detección de la actividad enzimática correspondiente.
- 5) En la aplicación de las nuevas sondas a los distintos sistemas biológicos, se ensayarán las metodologías de microscopia con excitación por dos fotones y microscopia de superresolución, debido a que las estructuras de los nuevos sensores predicen unas características fotoquímicas favorables para el empleo de las metodologías mencionadas.

**ANTECEDENTES
BIBLIOGRÁFICOS**

II. Antecedentes bibliográficos

II.1. Enzimas como sensores en el diagnóstico biomédico

II.1.1. Enzimas de interés como marcadores en distintas patologías

Las enzimas, como biocatalizadores, se han utilizado ampliamente en procesos industriales como la elaboración de alimentos, la fermentación de la cerveza, los detergentes para la ropa, procesos de decapado, y para controlar, así como para acelerar, las reacciones catalíticas con el fin de obtener rápidamente y con precisión diversos productos finales con interés comercial (13). Además, las enzimas se utilizan ampliamente tanto a escala de laboratorio como a nivel industrial para una amplia gama de aplicaciones, como la bioconversión estereoespecífica, la utilización de residuos en productos finales beneficiosos y/o respetuosos con el medio ambiente, la mejora de las materias primas, etc. (14-16) El potencial exacto de estos notables catalizadores aún no se ha determinado por completo, por lo que se están explorando más a fondo nuevos usos de las enzimas existentes (17).

A nivel metabólico, las enzimas desempeñan un papel clave en la supervivencia de todos los organismos puesto que su función específica es catalizar las reacciones químicas. La anomalía en el metabolismo del sistema enzimático conduce a muchas enfermedades. Por lo tanto, debido a las notables propiedades de las enzimas, éstas se utilizan en el examen clínico como un marcador específico para el diagnóstico de dichos trastornos. En las últimas dos décadas, investigadores de todo el mundo se han centrado más en las aplicaciones clínicas de las enzimas, como la fosfatasa ácida y alcalina, la alanina transaminasa, la aspartato transaminasa, la creatina quinasa MB, la gelatinasa B, la lactato deshidrogenasa, etc. (18) Las enzimas actúan como biomarcadores específicos de enfermedad, como el infarto de miocardio, la enfermedad renal, la enfermedad hepática, la artritis reumatoide, la esquizofrenia, el cáncer, etc. Proporcionan información sobre el estado de la enfermedad mediante el diagnóstico, el pronóstico o la evaluación de la respuesta a la terapia.

El diagnóstico y el seguimiento de las enfermedades necesita de exámenes rutinarios de muestras clínicas y otras pruebas asociadas. Estos requieren métodos analíticos típicos que exigen habilidad y tiempo para recoger el volumen de muestra necesario para realizar las pruebas clínicas.

Las enzimas que se utilizan para la detección/diagnóstico o el pronóstico de enfermedades se denominan "enzimas de diagnóstico" (18). Debido a su especificidad de sustrato y a su actividad cuantificada en presencia de otras proteínas, las enzimas son las preferidas en el diagnóstico y, por tanto, pueden utilizarse con este fin en la detección de enfermedades. Un estado de enfermedad suele provocar daños en los tejidos, dependiendo de la gravedad de la misma. En tales condiciones, las enzimas específicas de los órganos enfermos se liberan en la circulación sanguínea con una mayor actividad enzimática. La medida de dicha actividad en la sangre/plasma, o en cualquier otro fluido corporal, se ha empleado en el diagnóstico de tejidos/órganos enfermos (19).

La evaluación del nivel sérico de determinadas enzimas se ha utilizado como indicador de daños celulares que dan lugar a la liberación de componentes intracelulares en el torrente sanguíneo. Así, por ejemplo, cuando un especialista revela que una persona tiene que someterse a un ensayo enzimático neurológico, el propósito es determinar si existe o no un daño cerebral. Las enzimas que se analizan habitualmente para el diagnóstico de diversas enfermedades son la fosfatasa alcalina, la creatina quinasa, las aminotransferasas (alanina aminotransferasa y aspartato aminotransferasa), las deshidrogenasas (sorbitol deshidrogenasa y lactato deshidrogenasa), la colinesterasa, la ciclooxigenasa, la fosfatasa ácida tartrato-resistente, etc.). Aunque existen muchas otras que también se utilizan en el diagnóstico clínico de diferentes enfermedades tanto a nivel humano como en veterinaria.

Algunas enzimas que facilitan el diagnóstico rápido de diversas patologías son las siguientes:

Enfermedades óseas, trastornos autoinmunes e inflamatorios

Hay diferentes enzimas que se utilizan como marcadores en este tipo de enfermedades. La fosfatasa alcalina (ALP) se correlaciona con la tasa de crecimiento óseo (20). Su aumento en suero indica un incremento de la actividad osteoblástica o una formación ósea activa como en el caso de la enfermedad de PAGET o la artritis reumatoide. Otras patologías que pueden dar lugar a niveles elevados de ALP son el raquitismo, la osteomalacia, el hipertiroidismo y el hiperparatiroidismo. También el nivel de catepsina D aumenta significativamente con la progresión de la artritis reumatoide (21),

así como los niveles séricos de lisozima, lo que sirve de indicador de la actividad de los monocitos/macrófagos (22). La gelatinasa B (metaloproteinasa de la matriz 9, MMP-9) está implicada en una serie de procesos patológicos que se producen en las enfermedades autoinmunes (23). La MMP-9 humana es una enzima marcadora de la artritis reumatoide (24) y también desempeña un papel clave en la patogénesis del lupus eritematoso sistémico (25). La detección de la esterasa leucocitaria en el líquido sinovial es una herramienta muy valiosa en el diagnóstico de la infección de la articulación periprotésica (26). La fosfatasa ácida tartrato-resistente (TRAP) se encuentra en los osteoclastos y se libera a la circulación durante la resorción ósea. Su nivel aumenta en la artritis reumatoide, la osteoporosis y los trastornos óseos metabólicos (27).

Cáncer

Numerosos tipos de cáncer están íntimamente ligados a la sobreexpresión de una o varias enzimas. El nivel de fosfatasa ácida en la glándula prostática masculina (PAP) es 100 veces mayor que en cualquier otro tejido corporal y se expresa fuertemente en las células del cáncer de próstata, especialmente en las metástasis óseas (28). Por otra parte, la expresión anómala de las isoenzimas de la ALP, genéticamente diferenciadas, es útil en el seguimiento del cáncer, especialmente de tumores de células germinales. Los niveles elevados de alanina transaminasa (ALT) también se asocian a un mayor riesgo de carcinoma hepatocelular (29). La catepsina D en el tejido de la mama es útil para predecir cáncer de mama en mujeres que corren el riesgo de una recidiva temprana (30). Se ha demostrado una mayor expresión de catepsinas de cisteína (CCs) en muchos tumores humanos, incluyendo mama, ovario, cuello uterino, pulmón, cerebro, cabeza, cuello, melanoma y cáncer gastrointestinal. La expresión de la ciclooxigenasa-2 (COX-2) es un acontecimiento temprano en la tumorigénesis y desempeña un papel en la progresión del tumor en general (31). La sobreexpresión de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD) está estrechamente relacionada con la progresión del cáncer gástrico (32). La lactato deshidrogenasa (LDH) está ampliamente expresada en diferentes tejidos humanos y de ahí su asociación con múltiples tipos de cáncer (33-40).

Diabetes

Además de los factores de riesgo convencionales, como la edad, la diabetes y el sexo femenino, los niveles más altos de ALP pueden considerarse un factor de riesgo relacionado con la fibrosis hepática en pacientes con esteatohepatitis no alcohólica y diabetes de tipo 2 (41).

Infarto de miocardio

Cuando el músculo cardíaco muere durante un infarto de miocardio, libera muchas moléculas en el torrente sanguíneo, una de las cuales es la creatina quinasa (CK), cuyos niveles son significativamente más altos en pacientes con infarto agudo que en los de control. Se ha demostrado que la CK existe en tres formas moleculares: MM, MB y BB. Mientras que la CK total se reconoce como inespecífica, la CK-MB es el medio más específico, preciso y rentable de detectar el infarto de miocardio (42).

Enfermedad hepática

Niveles elevados de determinadas enzimas se asocian a todas las formas de trastornos hepato biliares primarios y secundarios. Así, el aumento del nivel sérico de la ALT indica una enfermedad hepática grave, generalmente una hepatitis viral y una necrosis hepática tóxica (43). Niveles altos de ALP en suero indican un incremento de la actividad hepatocítica en la enfermedad hepatobiliar. Un aumento significativo del nivel sérico (10-100 veces lo normal) de la aspartato transaminasa (AST) denota daños graves en el hígado (hepatitis viral o necrosis hepática tóxica) o en las células del corazón. La enfermedad hepatobiliar también produce un aumento de la actividad de la gamma glutamil transferasa (GGT) en suero.

Pancreatitis

Está demostrado que el aumento de amilasa sérica es un marcador sensible de pancreatitis agudas en las primeras 24 h al inicio de los síntomas (44). Por otro lado, los niveles de lipasa sérica también sirven como indicador para detectar pancreatitis aguda y daño pancreático (45).

Enfermedad renal

Para la detección temprana de la nefropatía diabética, se utiliza principalmente como indicador la N-acetil- β -D-glucosaminidasa (NAG), una glicosidasa lisosomal urinaria (46). Además, se ha visto que la concentración de lisozima en orina es un indicador sensible de daño renal (47).

Trastornos dentales

La enfermedad periodontal es una de las enfermedades inflamatorias más comunes de la cavidad oral, caracterizada por la destrucción progresiva del hueso alveolar y de los tejidos blandos que rodean los dientes. Se observan niveles más altos de AST en los fluidos creviculares gingivales de las zonas enfermas. La relación entre los niveles de AST en la saliva y el líquido crevicular gingival con la progresión de la enfermedad periodontal se ha estudiado en un gran número de pacientes (48).

Esquizofrenia

La butirilcolinesterasa (BChE) es una enzima que se ha investigado por su posible papel en los trastornos neurodegenerativos y neuropsiquiátricos. Los pacientes con esquizofrenia tienen una actividad de BChE en plasma más alta que los controles (49).

El interés por las enzimas en investigación está en auge, dado que, como se ha visto, una actividad enzimática desregulada puede asociarse íntimamente con multitud de enfermedades de diversa etiología (50), convirtiéndolas además en dianas muy atractivas para la terapia farmacológica (51, 52). Entre las diferentes enzimas utilizadas como marcadores, existen tres que ocupan una posición relevante dadas sus implicaciones en distintos procesos patológicos: la alanina aminopeptidasa (pepN), la dipeptidilpeptidasa IV (DPP IV) y la tirosinasa (TYR). Dado que estas enzimas son objeto de estudio en esta Tesis Doctoral a continuación se describirán con más detalle.

Alanina aminopeptidasa

Las aminopeptidasas son una familia de metaloproteasas (dependientes de Zn), que tras la acción del proteosoma intervienen intracelularmente en las etapas finales de la degradación de proteínas, siendo una función importante para la presentación de antígenos asociados al sistema de histocompatibilidad celular. Además, la actividad de estas aminopeptidasas está asociada a la aparición, proliferación y diseminación de tumores (53). En la actualidad, inhibidores de las aminopeptidasas se encuentran en ensayos de fase clínica como fármacos antitumorales en leucemia y linfoma. Por otro lado, la implicación de las proteasas bacterianas es relevante en determinadas patologías, ya que la proteólisis está implicada en los procesos fundamentales para la supervivencia, el crecimiento y el desarrollo de los microorganismos (54).

Dentro de las aminopeptidasas, la alanina aminopeptidasa ocupa una posición notoria. Esta enzima, también conocida como aminopeptidasa N (APN/CD13) es una exopeptidasa proteolítica que hidroliza selectivamente péptidos con alanina en posición N-terminal y libera aminoácidos N-terminales (55, 56). Presenta una amplia especificidad de sustrato que hace que tenga un papel fundamental en el procesamiento de péptidos bioactivos como bradiquininas y encefalinas, por lo que se ha asociado con la progresión tumoral en cáncer de mama (57). Adicionalmente, su sobreexpresión se ha asociado con desórdenes proinflamatorios, por lo que se considera una diana molecular para el tratamiento de artritis reumatoide, nefropatía diabética y la inflamación asociada a procesos tumorales (58, 59).

En lo que respecta a la alanina amino peptidasa bacteriana homóloga codificada por el gen pepN está presente en bacterias Gram (-), como *Escherichia coli* (*E. coli*), pero no en bacterias Gram (+) (60). La alanina aminopeptidasa de *E. coli* (o pepN) es una metaloaminopeptidasa de amplia especificidad que depende de Fe y, en menor medida, de Zn. En *E. coli*, la pepN es la única alanil aminopeptidasa responsable de la degradación de proteínas citosólicas independiente del ATP (61), por lo que está muy implicada en funciones importantes como el mantenimiento del proteoma y el uso de nutrientes. Su estructura se muestra en la figura II.1.

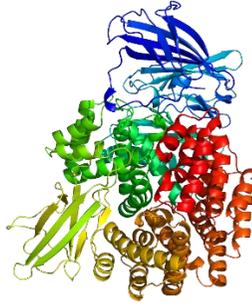


Figura II.1. Estructura pepN (AlphaFold Database, AF-A0A7I2V2X8). Figura realizada mediante PyMOL.

Resulta de gran interés el hecho de que los patógenos bacterianos utilizan las proteasas y peptidasas para dirigirse a funciones específicas del huésped (62), como es el caso de la proteasa pepN, que está implicada en una mayor patogenicidad en *Mycobacterium tuberculosis*, probablemente debido a su interacción directa con los macrófagos del huésped (63, 64). Además, se ha destacado previamente la importancia de la localización de pepN en la interacción macrófago-bacteria (65), lo que revela la importancia de desarrollar métodos para detectar proteasas en bacterias. En otras situaciones, la pepN puede facilitar la eliminación de patógenos bacterianos por parte de los organismos, ya que los neutrófilos son capaces de dirigirse directamente a la proteína pepN bacteriana para opsonizar bacterias como *Streptococcus pneumoniae* (66).

Especial atención merecen las biopelículas o más comúnmente conocidas como biofilms bacterianos. Se entiende por biofilm toda colonia organizada de células bacterianas que crece embebida en una matriz extracelular polimérica fabricada por ellas mismas y adherida a una superficie inerte o tejido vivo (67). Presentados como la forma más común de crecimiento de las bacterias en la naturaleza, los biofilms se pueden desarrollar, en condiciones óptimas, por cualquier tipo de bacteria. Aunque su composición es variable, normalmente, el 15 % de su volumen está constituido por las propias colonias bacterianas, mientras que el resto es matriz extracelular (85 %), cuya composición a su vez consiste mayoritariamente en agua y otras sustancias poliméricas, principalmente exopolisacáridos (68), de tipo neutro/polianiónico (en biofilms de tipo gramnegativos) o catiónico (para los grampositivos) (69), y en menor medida, proteínas, DNA, RNA, lípidos y otras biomoléculas (70, 71). En relación a su

grosor y tamaño, pueden ser muy variables (72). Su formación, que requiere de una señalización intracelular, conocida como *quorum sensing* así como de la transcripción de diferentes genes, ocurre en varias etapas: 1) contacto/adhesión inicial a la superficie; 2) formación de microcolonias; 3) secreción de la matriz del biofilm; 4) crecimiento y maduración del biofilm (mediante la formación de intersticios y canales en su interior de la matriz para el transporte de agua, nutrientes y oxígeno) y 5) finalmente el desprendimiento/liberación del biofilm para la colonización y diseminación en un nuevo lugar (73).

Se estima que sobre el 65 % de las infecciones bacterianas están asociadas con la formación de biofilms (74). Estas incluyen endocarditis de válvula nativa, otitis media, osteomielitis, y fibrosis quística, entre otras (75); así como aquellas asociadas a dispositivos médico-quirúrgicos permanentes, como catéteres venosos centrales, válvulas cardíacas mecánicas, lentes de contacto, prótesis articulares, dispositivos intrauterinos, etc. (76). En el caso de las bacterias gramnegativas, estas son las principales responsables de la formación de biofilms en periodontitis (*Pseudomonas aerobius* y *Fusobacterium nucleatum*, principalmente), prostatitis bacteriana (*E. coli* o *Pseudomonas aeruginosa*), e infecciones nosocomiales, como neumonía en cuidados intensivos (bacilos gramnegativos) o cistitis por catéteres urinarios (*E. coli* y otros bacilos gramnegativos).

Si por algo se caracterizan los biofilms, es por su capacidad para soportar los tratamientos antimicrobianos, siendo hasta 1000 veces más resistentes a los mismos que las bacterias en cuestión en su forma aislada. De ahí su difícil erradicación y su implicación en la aparición de resistencias. Se estima que son responsables de más del 80 % de las infecciones microbianas crónicas y recurrentes en humanos (77).

Pese a su evidente connotación negativa, se debe resaltar que, en algunas ocasiones, los biofilms tienen una función positiva. Así, por ejemplo, los biofilms generados por lactobacilos presentes en la flora vaginal previenen la colonización por microorganismos patógenos, ejerciendo una función protectora para el organismo. Por otro lado, se está investigando sobre su uso como agentes de biorremediación (78).

Por todo ello, en los últimos tiempos se están llevando a cabo multitud de investigaciones dirigidas a descifrar los mecanismos que hay detrás de la formación de los biofilms al objeto de, en último lugar, identificar dianas específicas para el arsenal terapéutico disponible, o potenciar sus efectos beneficiosos (79-82).

Por lo tanto, estas peptidasas, incluida la pepN, pueden servir de diana en la búsqueda de inhibidores antimicrobianos para luchar contra las infecciones bacterianas que son difíciles de tratar debido al aumento de la resistencia a los antibióticos (83). En la actualidad, existe escasez de dichos inhibidores, siendo la mayoría de ellos producidos por microorganismos y purificados a partir de cultivos de estos. El inhibidor más utilizado es la bestatina, que también se ha utilizado como modelo para estudiar las funciones fisiológicas de esta enzima (84). Por lo tanto, debido a la falta de inhibidores y a la necesidad de entender el mecanismo de acción de esta enzima, el uso de sondas que pueden interactuar con ella proporciona un nuevo método para estudiar la función de esta enzima. Adicionalmente, puede convertirse en una nueva estrategia de diagnóstico para discriminar entre los diferentes tipos de infecciones causadas por bacterias Gram (-) (85).

Dipeptidilpeptidasa IV

Otra peptidasa de gran interés por sus implicaciones biológicas es la dipeptidilpeptidasa IV (DPP IV), también conocida como antígeno de superficie de linfocitos CD26. La DPP IV fue descrita por primera vez como glicilprolina naftilamidasa por Hopsu-Havu y Glenner (86). Se trata de una glicoproteína transmembrana de 110 kDa de masa molar que se expresa de forma constitutiva como dímero (220 kDa) en una variedad de tipos celulares (próstata, riñón, hígado y células epiteliales). La DPP IV está anclada en la membrana plasmática con una orientación de tipo II mediante una corta cola citoplasmática (aminoácidos 1-6), un dominio transmembrana (TMD) (aminoácidos 7-28), una región flexible (residuos 29-39) y un dominio extracelular C-terminal (residuos 40-766) que contiene la actividad catalítica (87, 88). Su estructura se muestra en la figura II.2. Además de estar unida a la membrana, también se encuentra en la circulación sanguínea. La forma soluble presente en el plasma carece de la cola intracelular y del dominio transmembrana de la proteína, pero conserva una actividad enzimática sustancial (89). La DPP IV muestra actividad enzimática específica para un

residuo de prolina (Pro) en la penúltima posición de la cadena peptídica e hidroliza el lado carboxilo de este residuo. El residuo Pro puede ser sustituido por alanina (Ala) o hidroxiprolina (Hyp), aunque las tasas de hidrólisis para estos sustratos son mucho menores que para el sustrato correspondiente que contiene Pro (90, 91).

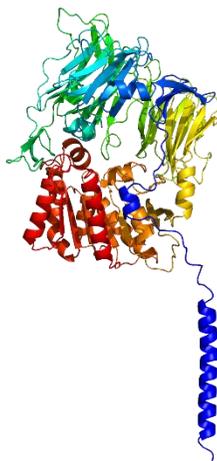


Figura II.2. Estructura DPP IV (AlphaFold Database, AF-A0A838ARP3). Figura realizada mediante PyMOL.

Implicada en numerosos procesos patológicos al regular la estimulación de las células T (92), desempeña un papel importante en varias rutas bioquímicas, como en el metabolismo de la glucosa; por ello, la DPP IV se ha considerado una diana para el tratamiento de la diabetes de tipo 2 (93). Sus inhibidores se han introducido en la clínica como una clase de fármacos hipoglucemiantes orales, denominados gliptinas, que se utilizan habitualmente para tratar la diabetes mellitus de tipo 2 y que han demostrado mejorar eficazmente la secreción endógena de insulina (94). Adicionalmente, se ha asociado previamente con el inicio y la progresión de varios tipos de cáncer humano; por ello, se considera un importante marcador molecular y una diana terapéutica para el cáncer (95, 96). Así, se sobreexpresa en los tejidos de carcinoma renal humano, por lo que su bloqueo ha reducido varios procesos relacionados con este tipo de cáncer, concretamente en la línea celular Caki-2 (97). También se ha demostrado que la DPP IV está sobreexpresada en varios tejidos de cáncer de colon humano y en la línea celular de cáncer colorrectal humana Caco-2 (98, 99). En la próstata cancerosa, la actividad de la DPP IV se duplicó en comparación con la hiperplasia

prostática benigna. Además, también se ha encontrado una elevación de su actividad en la zona periférica de la próstata, donde surgen la mayoría de los cánceres de este órgano (100). En los seres humanos, los niveles más altos de DPP IV en el tejido prostático canceroso frente al normal se correlacionaron con el nivel de antígeno prostático específico (PSA), la fase del cáncer y tanto el tamaño del tumor como el residuo que queda del mismo (101). Además, la actividad de la DPP IV se ha propuesto como marcador de los carcinomas de tiroides (102) y también puede servir como procedimiento de diagnóstico de primer nivel para reconocer a los pacientes con enfermedades de almacenamiento lisosómico (103).

Por último, en investigaciones de los últimos años, se ha detectado actividad DPP IV en pez cebra (*Danio rerio*) (104). Se trata de un modelo animal idóneo para investigación biomédica dadas sus características anatómicas, fisiológicas y genéticas muy similares a los humanos y mamíferos en general. Así pues, no sólo comparte la mayoría de los órganos principales (105), sino que también existe un elevado porcentaje (de aproximadamente un 70 %) de similitud genética con el ser humano (106). Se estima que un 84 % de los genes asociados a enfermedades humanas tienen un homólogo en el pez cebra, haciéndolo útil como modelo de enfermedad. Todo ello lo convierte en una especie muy trasladable a muchos tipos de estudios, entre ellos, el cribado de fármacos (107), cuya administración a través del medio acuático en el que viven, facilita enormemente el proceso. De gran interés resulta su casi transparencia corporal (108) que ayuda a la observación directa de sus estructuras internas y el análisis de sus procesos fisiológicos *in vivo* y en tiempo real. Además, estos vertebrados de pequeño tamaño poseen una rápida tasa de reproducción, siendo posible el mantenimiento de un gran número de ellos en un área bastante limitada. Los huevos se desarrollan fuera del cuerpo de la madre, lo que permite en gran medida el estudio del desarrollo temprano mediante microscopía (109). Por otro lado, comparado con los roedores, de extendido uso en experimentación animal, poseen un coste más barato de cría y mantenimiento.

Tirosinasa

La tirosinasa (TYR), también llamada monofenol monooxigenasa, es una cuproproteína con dos iones de cobre en el sitio activo, ambos coordinados por tres residuos de histidina. Pertenece, junto a las catecol oxidasas y hemocianinas, al grupo de proteínas de cobre de tipo 3. Su estructura se muestra en la figura II.3.

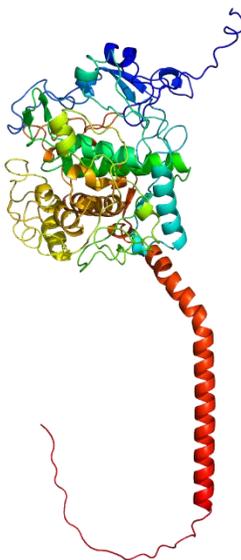


Figura II.3. Estructura TYR (AlphaFold Database, AF-U3M8N0). Figura realizada mediante PyMOL.

TYR cataliza la conversión de monofenoles en ortodifenoles (actividad monofenolasa), seguido de la oxidación de los ortodifenoles a los correspondientes derivados de ortoquinonas (actividad difenolasa) en presencia de oxígeno molecular (110) (ver figura II.4).

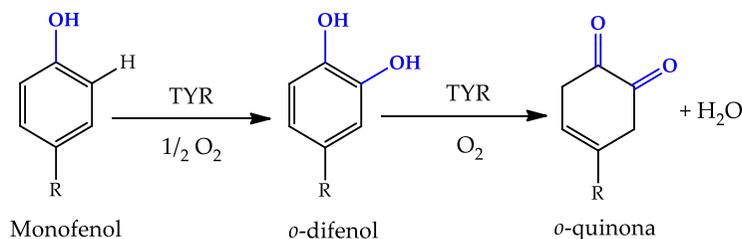


Figura II.4. Esquema mecanismo actuación de TYR.

Partiendo de la tirosina, el producto final de la reacción catalizada por TYR es la dopaquinona, un precursor de la melanina. Así, esta enzima se encuentra en los melanosomas e interviene en los dos primeros pasos de la melanogénesis en mamíferos (111, 112). Aunque la melanina tiene una función principalmente fotoprotectora en la piel humana, la acumulación de mayores cantidades de melanina en partes específicas de la piel da lugar a pecas y manchas marrones en el cuerpo humano. Además, es la causa del pardeamiento enzimático en frutas y hongos, lo que tiene un gran impacto visual que disminuye la calidad comercial y el valor de los productos (113). Sin embargo, aún más importante para la salud humana es la expresión anómala o activación de TYR, ya que se asocia con varias patologías, como el melanoma y la enfermedad de Parkinson. Por lo tanto, la monitorización de la actividad de TYR ayuda a un diagnóstico y tratamiento precisos de estas enfermedades (114).

Fruto de un gran número de investigaciones dentro del campo, cada vez son más los inhibidores de TYR que se encuentran como posibles fármacos potenciales en clínica (115). En la actualidad, algunos ya se utilizan muy satisfactoriamente en cosmética como despigmentantes de la piel, entre los cuales se encuentran el ácido kójico y la arbutina (116). Adicionalmente, debido a su baja toxicidad, el efecto inhibidor de los flavonoides sobre la tirosinasa ha despertado un gran interés en los últimos años. Entre ellos, la quercetina, encontrada en frutas, verduras y té, tiene un especial interés, no sólo por esa capacidad inhibitoria de la enzima en cuestión, sino por sus actividades antioxidantes, antiinflamatorias, antivirales y antiaterogénicas (117, 118).

Uno de los modelos animales que presenta pigmentos de melanina es el pez cebra (119). Debido a la importancia de realizar estudios de actividad enzimática *in vivo*, existen numerosos trabajos sobre la tirosinasa y el efecto de posibles inhibidores en el proceso de pigmentación en estos modelos animales (119-122)

II.1.2. Sistemas de detección de actividad enzimática

El principio general de un ensayo de actividad enzimática, entendido como cualquier método de laboratorio útil para la medida de la actividad de una enzima, es el uso de sustratos enzimáticos específicos que interactúan con la enzima para luego identificar el cambio de alguna señal. Tienen una gran importancia en estudios cinéticos y de inhibición, fundamentales para el cribado de inhibidores y estudios de selectividad, cobrando en última instancia, un gran interés para el desarrollo de nuevos fármacos en clínica.

Factores que afectan a los ensayos enzimáticos

Antes de tratar los distintos tipos de ensayos que se pueden utilizar, conviene describir los factores que pueden influir en el resultado obtenido y que, por ende, requieren de un control riguroso. Así pues, en ocasiones, las condiciones de medida *in vitro* de actividad enzimática no se aproximan a las que se dan *in vivo*, obteniéndose distintos resultados. De ahí, la necesidad de conocer los parámetros que afectan a dicha actividad y su posterior consideración, al objeto de que los datos adquiridos sean comparables, reproducibles y precisos. Dichos factores incluyen, entre otros, el pH, la temperatura, la fuerza osmótica, la saturación de sustrato, o el tipo de disolvente.

- pH. Por lo general, casi todas las enzimas muestran sensibilidad al pH. Así, el perfil de la actividad de éstas se ajusta, usualmente, a una curva gaussiana, incrementándose su valor desde cero (en un entorno fuertemente ácido) hasta un valor máximo de actividad, donde el pH es considerado como óptimo, y a partir del cual vuelve a disminuir hasta llegar de nuevo a cero (en condiciones de extrema basicidad) (123). Ese valor de pH óptimo (responsable de alcanzar una velocidad máxima de reacción) es el considerado como estándar en los ensayos. Dicho valor suele coincidir con el pH fisiológico (7.4); no obstante, para la mayoría de las enzimas suele estar comprendido entre 7 y 8. De hecho, como el ancho de banda gaussiana suele ser amplio, se puede oscilar entre dichos valores de pH sin que se reduzca la actividad enzimática significativamente. No obstante, otras enzimas tienen un valor

de pH muy distinto. Entre ellas, la pepsina estomacal o la ALP con valores de pH óptimo de 2 y 10.5, respectivamente. De cualquier modo, cualquier pH que se aleje demasiado del óptimo puede dar lugar a una desnaturalización y una consiguiente reducción de la actividad enzimática.

- Temperatura. La dependencia de la actividad enzimática con la temperatura sigue una tendencia similar a la mencionada con el pH. A medida que aumenta la temperatura, también lo hace la velocidad de la reacción (al igual que ocurre en otras reacciones químicas) hasta llegar a un valor máximo. Generalmente, cada aumento de 10 °C en la temperatura conlleva una duplicación aproximada de la actividad enzimática, aunque esto puede variar entre unas enzimas y otras. Llegado a ese valor máximo, la actividad decrece drásticamente debido al efecto desnaturalizante de la estructura proteica. La temperatura óptima de las enzimas humanas se encuentra entre los 35 y 40 °C. Por ello, en la mayoría de los ensayos, especialmente de mamíferos, se utilizan tres temperaturas distintas: la fisiológica (alrededor de los 37 °C), la ambiental (situada en torno a los 25 °C) y una última por encima de los 40 °C, como temperatura extrema. No obstante, existen algunas enzimas como la CK o la alcohol deshidrogenasa cuya desnaturalización se produce incluso a la temperatura corporal normal. Aunque los componentes celulares juegan, en este caso, un papel fundamental como estabilizadores, su tiempo de vida es muy corto, por lo que se renuevan de forma frecuente mediante síntesis *de novo* (124). Otras enzimas, como la Taq polimerasa o algunas procedentes de microorganismos extremófilos, son estables hasta temperaturas de 95-100 °C. Por todo ello, queda claro que resulta imposible establecer una temperatura estándar para los ensayos de actividad enzimática.
- Fuerza osmótica. Aunque si bien es cierto que, cuanto mayor es la concentración del buffer en el que se encuentre la enzima

mayor es la capacidad de amortiguar los cambios de pH, se sabe que su actividad catalítica puede verse alterada. En términos generales se establece que una fuerza iónica moderada de entre 0.05 y 0.2 M es aceptada por prácticamente todas las enzimas, siendo inhibidas a concentraciones bastante mayores de sales (> 0.5 M), debido al efecto desnaturizante de proteínas a tales concentraciones. En cambio, algunas otras (principalmente halófilas) pueden funcionar a concentraciones de hasta 1 M (125).

- Saturación de sustrato. Si se incrementa la concentración de sustrato, la velocidad de la reacción enzimática también lo hará. No obstante, se sabe que, alcanzado el punto de saturación, en el cual todos los sitios activos de las moléculas de enzima están ocupados, no se podrá seguir aumentando la velocidad, permaneciendo constante, aún adicionando más cantidad de sustrato.
- Tipo de disolvente. Teniendo en cuenta el medio celular, el agua sería el disolvente óptimo para un ensayo de actividad enzimática. No obstante, en ocasiones resulta imprescindible el uso de disolventes orgánicos (126) dada la baja solubilidad del sustrato o del producto generado tras la acción de la enzima. Sea cual sea el disolvente utilizado, es necesario asegurarse de que está libre de material contaminante que podría afectar a la actividad enzimática, como la presencia de metales pesados que actúan como inhibidores de la mayoría de enzimas.

Tipos de ensayos enzimáticos

Para determinar la actividad de una enzima, se puede medir la velocidad de aparición de producto o la de consumo de sustrato. Usualmente, es más fácil medir pequeños aumentos de producto que pequeñas disminuciones en la concentración relativamente alta de sustrato.

Los ensayos enzimáticos se pueden categorizar en dos grupos: continuos y discontinuos.

- En los continuos se hace una lectura de la actividad, monitorizando sin interrupción la cantidad de producto generado. También son denominados como “de punto final”, puesto que se sigue continuamente el curso de la reacción hasta su finalización, visualizando una curva de progreso. El ajuste lineal del primer tramo de dicha curva permite el cálculo de la velocidad inicial de la reacción enzimática. Los ensayos continuos directos son aquellos en los que se mide cualquier cambio entre las propiedades de los sustratos y los productos, como en la absorbancia, la fluorescencia, la turbidez, el pH, la rotación óptica, la conductividad, o la entalpía, entre otros parámetros. Por ende, entre los métodos continuos se encuentran los ensayos espectrofotométricos, fluorimétricos, turbidimétricos, potenciométricos, polarimétricos, conductimétricos o calorimétricos.

Entre todos ellos, los espectrofotométricos son bastante empleados (127) debido a su amplia aplicabilidad, a su sencillo manejo y a la reproducibilidad y exactitud en sus resultados. Además, prácticamente todas las sustancias muestran absorción en el rango UV-Vis, por lo que los espectrofotómetros forman parte del equipamiento estándar de cualquier laboratorio. Así, si la reacción enzimática se caracteriza por la aparición (o desaparición) de un compuesto coloreado, éste podría observarse incluso a simple vista. Sin embargo, para poder llevar a cabo una cuantificación, es necesario el empleo de un espectrofotómetro. Entre sus diferentes usos, se suelen emplear para la monitorización de reacciones enzimáticas en las que participan NADH y NADPH, coenzimas que, en su forma reducida, absorben luz UV, pero no en su forma oxidada (NAD⁺ y NADP⁺). Por ejemplo, la LDH cataliza la reducción de piruvato a lactato en presencia de NADH. Dicha reacción se monitoriza cinéticamente a 340 nm a través de la disminución de la absorbancia resultante de la oxidación del NADH a NAD⁺ proporcional a la actividad LDH en la muestra (128).

No obstante, cuando la enzima no produce ningún cambio en un parámetro físico fácilmente detectable, es necesario entonces el uso de un método continuo acoplado (129). En este proceso, el producto de la

reacción a estudiar se usa como sustrato de una segunda reacción, normalmente mediante la adición de otras enzimas que se añaden a la mezcla, hasta que se obtiene un producto final que puede observarse físicamente. Un ejemplo de ello es la determinación de actividad hexoquinasa mediante el acoplamiento de la producción de glucosa 6-fosfato a la producción de NADPH usando la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (figura II.5).

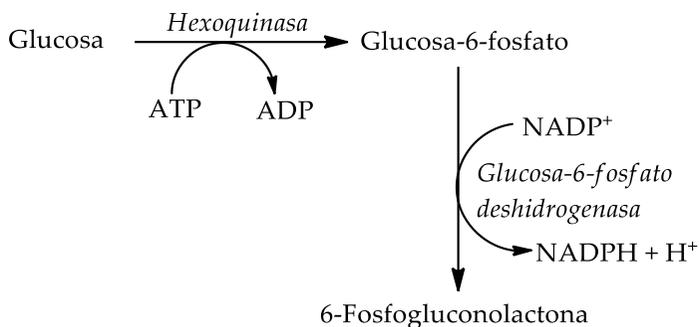


Fig. II.5. Ensayo continuo acoplado para detección de hexoquinasa.

- En los discontinuos se interrumpe la reacción tras un tiempo determinado y se procede entonces a la medida en ese punto. Así, la velocidad se determina tras ese tiempo mediante la medida de la cantidad de producto formado o sustrato consumido a través de una reacción química indicadora o método de separación. En lugar de una curva de progreso continua, estos métodos solo proporcionan un único punto y la velocidad se calcula mediante una línea que conecta ese punto con el blanco antes de iniciar la reacción, no garantizando que la medida se produzca dentro de la parte lineal de la curva de la cinética enzimática. Para la detención de la reacción, son empleados diferentes procedimientos como el uso de desnaturalizantes (ácidos fuertes, álcali o detergentes), el calor, o tratamientos con inhibidores irreversibles, entre otros. Entre los métodos discontinuos se incluyen los ensayos radioquímicos (130, 131), en los que se mide la incorporación de radiactividad en los sustratos o su liberación desde sustratos, siendo los radioisótopos más empleados el ¹⁴C, ³H, ³²P, ³⁵S y ¹²⁵I. Por otro lado, el desarrollo de sistemas de cromatografía líquida (normalmente, de alta resolución o HPLC) para una rápida separación

y cuantificación de los reactivos presentes en la mezcla ha permitido el desarrollo de numerosos ensayos basados en esta técnica (132).

Los ensayos continuos poseen la ventaja de permitir la observación de la evolución de las curvas cinéticas posibilitando el seguimiento de la reacción directamente y detectando cualquier posible desviación de la tasa inicial con respecto a la linealidad. Usualmente son los de elección, especialmente para medidas cuantitativas, mientras que los discontinuos únicamente se suelen emplear para determinaciones cualitativas.

II.1.2.1. Sistemas de detección mediante fluorescencia

En el caso de que en la reacción enzimática estén involucradas moléculas fluorescentes (ya sean sustratos o productos) y se produzca un cambio en la señal correspondiente, pueden utilizarse ensayos fluorimétricos. Estos ensayos son, por lo general, mucho más sensibles (unas 100 veces) que los espectrofotométricos, debido a una diferencia fundamental en la forma en que se realizan las medidas. Las medidas de valores bajos de absorbancia son intrínsecamente difíciles de realizar porque se basan en la determinación de dos valores de luz transmitida que son altos y casi iguales (la del blanco y la de la propia muestra). Sin embargo, las pequeñas cantidades de luz emitida por concentraciones bajas de compuestos fluorescentes son más fáciles de medir porque la comparación se realiza con la ausencia total de luz emitida cuando no hay un fluoróforo presente. Por ello, este ensayo puede ser especialmente útil incluso en las condiciones más desfavorables, como cuando hay pequeñas cantidades de enzima (133).

II.2. Espectroscopia de fluorescencia

II.2.1. Descripción general del fenómeno luminiscente

La fluorescencia es un proceso de emisión luminiscente en el cual las moléculas son previamente excitadas a un estado de energía superior (estado electrónico excitado) por la absorción de radiación electromagnética de una frecuencia adecuada. La radiación fluorescente es debida a que las especies excitadas se relajan al estado inicial de menor energía (estado fundamental) liberando su exceso de energía en forma de una nueva radiación electromagnética. La Técnica Instrumental que lleva a cabo la medida de fluorescencia se denomina fluorimetría, y utiliza para ello, equipos instrumentales denominados espectrofluorímetros. Las ventajas sustanciales que presenta la fluorimetría frente a otras Técnicas Instrumentales son su especificidad y su gran sensibilidad.

En la emisión fluorescente por tanto hay que distinguir dos procesos:

- **Excitación.** Si se considera un sistema en su estado fundamental, es decir el de menor energía, al interactuar con una radiación electromagnética de energía de una magnitud adecuada (generalmente visible o ultravioleta), ésta puede ser absorbida por el sistema, pasando el compuesto a un estado de mayor energía, o estado excitado.
- **Emisión:** Los estados excitados son inestables y la molécula tiende a volver a su estado fundamental. En este proceso hay una liberación de energía en forma de radiación cuya longitud de onda dependerá de la diferencia de energía entre los dos niveles involucrados en la transición.

Los procesos que ocurren entre la absorción y la emisión de la luz se suelen ilustrar con el modelo del diagrama de Jablonski (figura II.6).

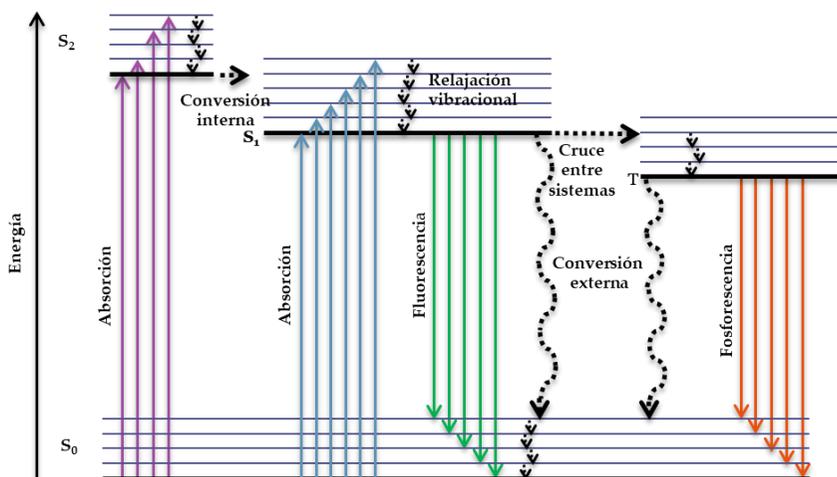


Figura II.6. Diagrama de Jablonski.

En este diagrama se representan los distintos estados electrónicos: el estado singlete fundamental (S₀) y los estados singletes excitados primero y segundo (S₁ y S₂, respectivamente). En cada uno de estos niveles energéticos, los fluoróforos pueden encontrarse en uno de los niveles de energía vibracionales. Las transiciones entre estados se representan como líneas verticales para ilustrar la naturaleza instantánea de la absorción de la luz.

Tras la absorción de la luz, suelen ocurrir varios procesos. Un fluoróforo suele ser excitado a algún nivel vibracional superior de S₁ o S₂, dándose después diversos procesos de desactivación molecular, ya sean de tipo radiativo (fluorescencia, o fosforescencia) o no radiativo (relajación vibracional, conversión interna, cruce entre sistema, o conversión externa).

La relajación vibracional es el paso al nivel vibracional más bajo dentro de cada nivel electrónico por la transferencia de energía en forma de calor debido a su interacción con el disolvente.

Por su parte, la conversión interna es un proceso por el que la molécula pasa a un estado electrónico de más baja energía de la misma multiplicidad sin emisión de radiación (S₂ → S₁) y puede ocurrir cuando los niveles de energía electrónicos están próximos entre sí (solapamiento de los niveles vibracionales) y siempre entre dos estados singletes excitados, ocurriendo generalmente en un tiempo de 10⁻¹² s o menos.

En el cruce entre sistemas se invierte el spin del electrón excitado pasando a un estado triplete ($S_1 \rightarrow T_1$). La probabilidad aumenta si los niveles vibracionales de los dos niveles excitados en este caso de distinta multiplicidad solapan. La presencia de especies con átomos pesados (como yodo o bromo) u oxígeno en disolución favorece el cruce entre sistemas.

Por último, la conversión externa son los procesos de desactivación del estado electrónico excitado de menor energía (singlete o triplete) al fundamental mediante interacción y transferencia de energía entre la molécula excitada y el disolvente u otros solutos ($S_1 \rightarrow S_0$, $T_1 \rightarrow S_0$), pero sin emisión de radiación.

En cuanto a los procesos radiativos, en la fluorescencia, la emisión ocurre desde el estado excitado S_1 al fundamental S_0 . Dado que los tiempos de vida de fluorescencia son típicamente cercanos a 10^{-8} s, la conversión interna se completa generalmente antes de la emisión. Por lo tanto, la emisión de fluorescencia generalmente resulta desde un estado excitado equilibrado térmicamente, es decir, el estado vibracional de menor energía de S_1 . Existe un número relativamente pequeño de moléculas con características estructurales determinadas para emitir fluorescencia. Raramente se observa fluorescencia debido a transiciones $\sigma^* \rightarrow \sigma$ ($\lambda_{ex} < 250$ nm), en su lugar, la emisión se restringe a los procesos $\pi^* \rightarrow \pi$ y $\pi^* \rightarrow n$, que son menos energéticas. Por su parte, la emisión por fosforescencia ocurre desde el nivel vibracional más bajo del estado excitado T_1 al fundamental S_0 , siendo el tiempo de vida medio mucho más largo (10^{-4} a varios segundos). Tanto la banda de emisión de fluorescencia como de fosforescencia están desplazadas hacia mayores longitudes de onda que la de la radiación absorbida (menor energía), efecto conocido con el nombre de desplazamiento de Stokes, y el cual es originado por el proceso de relajación vibracional, anteriormente descrito.

Las medidas de fluorescencia pueden clasificarse a grandes rasgos en dos tipos: de estado estacionario y de tiempo resuelto. Las de estado estacionario, el tipo más común, son aquellas que se realizan con iluminación y observación constantes. La muestra se ilumina con un haz de luz continuo, y se registra la intensidad o el espectro de emisión. Debido a la escala temporal en que se emite la fluorescencia (del orden del ns) la mayoría de las medidas son de estado estacionario.

El segundo tipo es la emisión resuelta en el tiempo, que se utiliza para medir los decaimientos de intensidad de fluorescencia. Para estas medidas, la muestra se expone a un pulso de luz, cuya anchura es típicamente más corta que el tiempo de decaimiento de la muestra. Esta intensidad se registra con un sistema de detección de alta velocidad que permite medir la intensidad que se mide en la escala de tiempo del ns (134).

II.2.2. Microscopía de fluorescencia

Para llevar a cabo la detección de actividad enzimática y su concentración a través de las técnicas hasta ahora referidas es necesario someter las muestras biológicas a un complicado proceso de homogeneización (135), resultando, por tanto, algo difícil la medida de actividad de las enzimas en tiempo real en su forma nativa dado que se pierde la integridad de la muestra.

Así pues, para la determinación de actividad enzimática *in vivo*, actualmente se utilizan métodos de imagen que incluyen la espectroscopía por resonancia magnética y la resonancia magnética de imagen, ultrasonidos, la tomografía computarizada por emisión monofotónica, o la tomografía por emisión de positrones (o PET) (136-138). Aunque todas estas técnicas permiten determinar, sin necesidad de procedimientos invasivos, niveles de enzima, tienen algunas desventajas, entre ellas: elevado coste, largo tiempo de medida, sensibilidad no demasiado alta, riesgo para la salud debido a la radiación ionizante, e imposibilidad de obtener resolución subcelular.

En este sentido, entre todas las modalidades de imagen disponibles, la microscopía óptica ha supuesto una revolución en el campo de la investigación biológica. En particular, la microscopía de imágenes de fluorescencia representa una técnica esencial para estudiar y comprender los procesos biológicos, ya que permite un estudio repetitivo, no invasivo, uniforme y relativamente automatizado, con un uso muy extendido, entre otros, en la detección de enzimas. Para tal fin, se hace imprescindible el empleo de sondas enzimáticas fluorescentes (139), las cuales permiten el mapeo de enzimas en su entorno nativo, con una gran sensibilidad y especificidad gracias a su diseño específico. Así, éstas son capaces de generar una señal suficiente y distinguible del resto de componentes biológicos de la

muestra y, lo que es más interesante aún, procedente en exclusiva de la reacción catalizada por la enzima de interés, siendo por tanto una medida directa de la actividad enzimática y no de la cantidad de enzima.

II.2.2.1. Microscopía confocal de fluorescencia

El concepto de microscopía confocal de fluorescencia fue patentado por Marvin Minsky en 1957 (140). Hasta entonces, en un microscopio de fluorescencia convencional, como el de campo amplio, las imágenes obtenidas eran producto de la excitación de toda la muestra y la concomitante recogida de emisión de fluorescencia total, procedente de diversos planos de la muestra, enfocados y desenfocados. Con la microscopía confocal se logra ir un paso más allá y superar esta limitación a través de la recogida únicamente de la luz emitida por moléculas fluorescentes ubicadas en el plano focal. Para ello, se requiere, por un lado, de un láser como fuente de excitación que permite iluminar las muestras con una intensidad muy elevada y estable; y por otro, de una pieza llamada *pinhole* o agujero estenopeico, que consiste en una apertura en el canal detector de la fluorescencia que impide el paso de la luz proveniente de los planos fuera del foco. Se consigue así pues eliminar el resto de información que no sea la del plano focal y obtener imágenes nítidas, es decir, de mejor resolución. Puesto que sólo se ilumina un punto cada vez en el microscopio confocal, se requiere una exploración (scanning) a través de un barrido en la muestra para obtener las imágenes.

No obstante, pese a la novedad de la técnica, no fue hasta 1968 cuando se demostró su validez por Egger y Petran (141), y casi 20 años más tarde, con el lanzamiento del primer microscopio comercial de White y Amos (142), cuando la comunidad científica comenzó a hacer un uso generalizado del mismo, suponiendo una auténtica revolución en el mundo de la microscopía.

Hoy en día se trata de una técnica utilizada de forma universal en el campo de la biología molecular y celular debido a sus potenciales aplicaciones, entre las que, como ya se ha mencionado anteriormente, se encuentran la detección de actividad enzimática. En la gran mayoría de casos, para la microscopía confocal, se emplean sondas enzimáticas fluorescentes que requieren excitación con luz UV-Vis, la cual, debido a su corta longitud de onda, da lugar a una limitada penetración en la muestra, a una autofluorescencia y también a daño celular, y dispersión de la luz (5),

dificultando los ensayos *in vivo*, en los que se pretende la obtención de imágenes de distribución de enzimas en tejidos. De ahí, que sus aplicaciones se vean reducidas al estudio de actividad de enzimas *in vitro*. Por ello, un requisito fundamental es que tanto la luz de excitación como la de emisión de dichas sondas sea de longitud de onda larga, roja o cercana al infrarrojo (por sus siglas en inglés, NIR), para obtener una profunda penetración en el interior del organismo, así como una baja autofluorescencia del mismo, permitiendo una mejor localización tridimensional de la sonda (143).

II.2.2.2. Microscopía con excitación por dos fotones

Fundamento teórico

En el proceso de absorción de la luz comúnmente una molécula absorbe un único fotón con una energía igual a la diferencia de energía entre el estado fundamental y el primer estado excitado de la molécula. Así, en la microscopía confocal de fluorescencia convencional (también conocida como OPM o "*one-photon microscopy*"), el fluoróforo es excitado por la absorción de ese fotón para llegar al estado excitado desde donde volverá al estado fundamental a través de la emisión de un fotón de fluorescencia.

Aunque poco común, la mecánica cuántica para la interacción entre la luz y los materiales también posibilita que una molécula absorba dos fotones de forma simultánea, cada uno con aproximadamente el doble de la longitud de onda (es decir, la mitad de la energía de excitación) que se necesitaba para excitar esa misma molécula con un único fotón, proceso conocido con el nombre de excitación bifotónica. Asimismo, también es posible que una molécula absorba simultáneamente tres fotones que tengan cada uno aproximadamente un tercio de la energía de excitación; esto se denomina excitación trifotónica o, de forma más general, excitación multifotónica (por sus siglas en inglés, MPE)(144) (ver figura II.7).

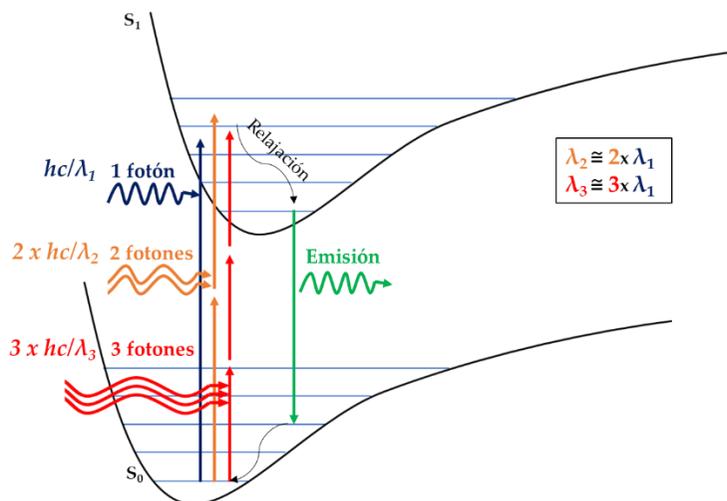


Figura II.7. Proceso de excitación multifotónica. Diagrama energético de una molécula fluorescente durante el proceso de excitación mono-, bi-, y tri-fotónica; donde h representa la constante de Planck, c la velocidad de la luz, y λ la longitud de onda.

En 1931, la MPE fue predicha teóricamente por la premio Nobel Maria Göppert-Meyer en los inicios de la era de la mecánica cuántica (145), sin embargo, las densidades de fotones necesarias para demostrar experimentalmente esta teoría eran tan altas que se necesitaron 30 años y la invención del láser para conseguirlo. Así, la MPE fue demostrada experimentalmente por Kaiser y Garrett en 1961 (146) quienes publicaron el primer trabajo sobre la excitación por dos fotones (TPE) del $\text{CaF}_2:\text{Eu}^{2+}$. Posteriormente demostraron que la TPE también podía excitar colorantes orgánicos fluorescentes, surgiendo desde entonces múltiples ejemplos de procesos de TPE en espectroscopia molecular (147, 148). La espectroscopia de dos fotones se convirtió por tanto en una herramienta importante para continuar con el estudio de la estructura electrónica de los estados excitados moleculares (149, 150). Los procesos de absorción de tres fotones fueron comunicados por primera vez por Singh y Bradley en 1964 (151). Finalmente, en 1990 un trabajo del grupo del Dr. Webb originó una amplia aplicación de la MPE a la microscopía de fluorescencia en campos biológicos, también llamada microscopía de fluorescencia con excitación multifotónica (por sus siglas en inglés, TPM) (10).

En el caso de la excitación bifotónica, existe una dependencia cuadrática de la intensidad de la luz láser, en lugar de la dependencia lineal que existe en la excitación con un solo fotón. Sin tener en cuenta la saturación

de la excitación, la tasa media de TPE por molécula viene dada por la ecuación II.1:

$$N_{abs}(t) \equiv \frac{1}{2} \delta \langle I^2 \rangle \quad (\text{Ec. II.1})$$

donde $\langle I^2 \rangle$ es la media temporal de la segunda potencia de la intensidad del láser local en unidades de fotones $\text{cm}^{-2} \text{s}^{-1}$ y δ es la sección transversal de absorción de dos fotones en unidades de $\text{cm}^4 \text{s fotón}^{-1}$ ($10^{-50} \text{ cm}^4 \text{s fotón}^{-1}$ equivale a 1 GM, o Göppert-Mayer). La sección transversal TPE es una medida cuantitativa de la probabilidad de que una molécula absorba dos fotones (TPA) simultáneamente y resulta del producto de la sección transversal de absorción molecular y la eficiencia cuántica de emisión de fluorescencia; es decir, $\delta\Phi$. La dependencia de la intensidad al cuadrado de la TPE confiere a esta técnica su intrínseca resolución tridimensional. Dado que la energía de un solo fotón de longitud de onda larga es insuficiente para excitar los colorantes fluorescentes utilizados habitualmente, no se produce una absorción lineal por parte de los fluoróforos por encima del plano focal. La excitación (y, por tanto, la emisión) se limita a un pequeño volumen elipsoidal alrededor del punto focal (ver figura II.8), donde el flujo de fotones es lo suficientemente alto como para dar lugar a eventos de absorción de dos fotones. Puesto que nunca se genera fluorescencia fuera de foco, la microcopia TPE permite el seccionamiento óptico sin necesidad de introducir un *pinhole* en la trayectoria de detección del microscopio, como en la microscopia confocal. Así, toda la señal generada por la muestra puede ser recogida por un detector de gran superficie y contribuir a la imagen final.

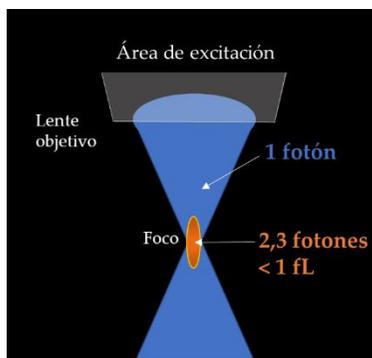


Figura II.8. Áreas de emisión fluorescente bajo la lente objetivo durante un proceso de excitación mono-, bi- o tri-fotónica. El volumen en la excitación bi- y tri-fotónica usualmente se limita a un volumen finito alrededor del foco y menor a 1 fL.

En la figura II.9, se observa un ensayo para comparar la excitación mono- y bi-fotónica sobre una disolución concentrada de safranina O, cuya emisión de fluorescencia es amarilla tras la excitación en la región verde del espectro. La lente del objetivo superior hace incidir luz con una λ de 543 nm en la muestra (procedente de un láser de helio-neón de onda continua), produciendo el típico patrón cónico de excitación, que se desvanece hacia la izquierda por un fenómeno de autoabsorción. Por el contrario, el objetivo inferior enfoca un haz infrarrojo pulsado con una λ de 1046 nm (procedente de un láser de Nd-YLF). El volumen focal (señalado por la flecha) puede escanearse en cualquier punto de la cubeta, creando así una representación tridimensional secuencial de la intensidad de la fluorescencia.

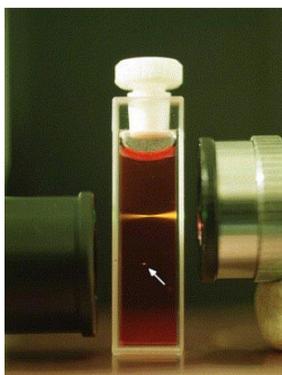


Figura II.9. Comparación de la excitación mono- ($\lambda_{exc} = 543$ nm) y bi-fotónica ($\lambda_{exc} = 1046$ nm) sobre una disolución de Safranina O en cubeta (152).

El tamaño del volumen (y , por tanto, la resolución óptica del sistema TPE) depende críticamente de la apertura numérica (por sus siglas en inglés, NA) de la lente del objetivo y de la longitud de onda de la iluminación (ver figura II.10). Así, utilizando la microscopía TPE con un objetivo de alta NA uniformemente iluminado, la excitación de fluorescencia se limita a volúmenes menores al femtolitro alrededor del punto focal del objetivo, con $<1 \mu\text{m}$ de resolución en la dirección z . Por ello, la microscopía TPE proporciona imágenes de fluorescencia con resolución subcelular (153).

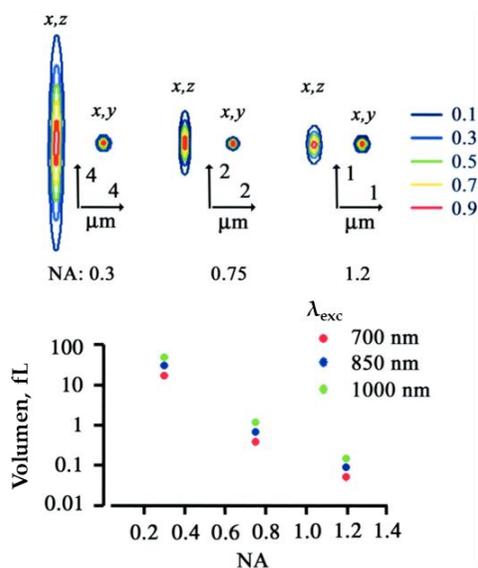


Figura II.10. Efectos simulados de la longitud de onda de excitación y la NA sobre las tres dimensiones del volumen TPE (153).

Con respecto a la instrumentación utilizada, existen microscopios comerciales de fluorescencia con excitación bifotónica; no obstante, también pueden ser construidos por modificación de un microscopio confocal, teniendo en cuenta la necesidad de un láser que suministre un alto flujo de fotones a la muestra para generar una absorción bifotónica eficaz. Esto se consigue normalmente utilizando una excitación láser pulsada ultracorta. Se ha señalado que el número de fotones absorbidos por fluoróforo por pulso, n_a , viene dado por la siguiente ecuación II.2.

$$n_a \approx \frac{p_0^2 \delta}{\tau_p f_p^2} \left(\frac{(NA)^2}{2hc\lambda} \right)^2 \quad (\text{Ec. II.2})$$

donde τ_p es la duración del pulso, δ la absorción bifotónica del fluoroforo a la λ , p_0 es la intensidad media del láser, f_p la tasa de repetición del láser, NA la apertura numérica del objetivo de enfoque, h la constante de Plack, y c la velocidad de la luz. Se demuestra que, para una misma potencia media del láser y una misma frecuencia de repetición, la probabilidad de excitación aumenta, al incrementar la NA de la lente de enfoque y al reducir la anchura de pulso del láser. Así, como ya se ha indicado anteriormente, el aumento de la NA corresponde al confinamiento espacial de la potencia de excitación en un volumen focal más pequeño.

Los láseres de femtosegundos, picosegundos y de onda continua han sido usados para TPM. Sin embargo, actualmente, las fuentes de luz más utilizadas son los láseres de femtosegundos de estado sólido, concretamente de titanio:zafiro (Ti:Sa) bombeados por diodos, los cuales suministran pulsos estables y muy cortos (≈ 100 fs de duración, a una tasa de repetición de 80 MHz), lo que permite una observación directa con TPM (ver figura II.11). Otros láseres de femtosegundos son Cr-LiSAF y láseres de pulso-comprimido Nd-YLF.

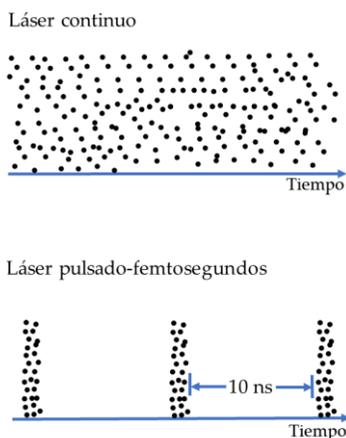


Figura II.11. Comparación de láser continuo *vs* láser pulsado de femtosegundos.

Ventajas de la microscopía de excitación multifotónica

Las propiedades fotofísicas y químicas del proceso de MPE tienen como consecuencia que la microscopía de fluorescencia con excitación bifotónica tenga una serie de ventajas.

La fluorescencia se genera sólo en una pequeña región del foco del haz, con un volumen de <1 fL, por lo tanto, la región de excitación está extremadamente localizada, lo que constituye una de las ventajas más importantes de la microscopía de fluorescencia con excitación multifotónica, permitiendo un seccionamiento óptico con resolución subcelular a mayores profundidades. Así, cuando un rayo láser es escaneado horizontalmente, el tejido será excitado en capas, permitiendo la realización de imágenes tomográficas. Esta implementación de la imagen tomográfica difiere notablemente con la de la microscopía confocal. De hecho, las observaciones sistemáticas en una variedad de muestras biológicas han proporcionado pruebas experimentales de que la TPE mejora la profundidad de penetración de las imágenes en al menos 2 veces en relación con las imágenes confocales (154-156). Varias razones explican el aumento de la profundidad de penetración. En primer lugar, la dependencia de la excitación del fluoróforo con la segunda potencia de la intensidad de la luz láser confina la absorción de fotones a una región estrecha en el plano de enfoque, donde el flujo de fotones es mayor. En la microscopía confocal, las imágenes tomográficas en el plano focal se obtienen utilizando un *pinhole* "confocal" para seleccionar sólo los fotones de fluorescencia procedentes del foco. Esto bloquea tanto la luz de fluorescencia generada en regiones fuera del plano focal como la luz dispersada por el tejido. En cambio, la TPM emplea los fotones de fluorescencia dispersados en la profundidad de la muestra; no requiere un *pinhole* confocal debido a la naturaleza altamente localizada de la MPE. Por lo tanto, y como ya se ha comentado previamente, a diferencia de la microscopía confocal monofotónica, la microscopía TPE carece de absorción lineal del haz de excitación por parte de los fluoróforos que se encuentran por encima del plano de enfoque, lo que puede reducir significativamente la luz de excitación antes de que llegue a los fluoróforos que se encuentran en las regiones tisulares más profundas (154).

En teoría, un microscopio confocal ofrece una mejor resolución espacial que un microscopio de fluorescencia de excitación por dos fotones,

pero en el uso real, un microscopio confocal debe utilizarse, a veces, con una resolución inferior a su límite teórico. Esto se debe a que el número de fotones de fluorescencia que pasan a través del *pinhole* disminuye rápidamente a medida que el plano focal se hace más profundo dentro de la muestra; entonces debe utilizarse un *pinhole* más grande para obtener una señal fluorescente suficientemente fuerte. Por lo tanto, en la microscopía confocal existe un compromiso entre el tamaño del *pinhole* y la resolución espacial; en otras palabras, el aumento del *pinhole* sacrifica la resolución. La intensidad del rayo láser de excitación no puede aumentarse, porque esto causaría graves daños a la célula o al tejido.

Otra ventaja de gran interés es que los láseres de excitación utilizados (Ti:Sa, Nd:YLF, etc.) emiten en la región del infrarrojo cercano, y su radiación se absorbe y dispersa en los tejidos *in vivo* en menor medida que la luz visible (157), lo que permite obtener imágenes de partes más profundas del tejido. Con los láseres comunes de Ti:Sa con bloqueo de modo o *mode-locking* (técnica para que un láser produzca pulsos de luz de duración extremadamente corta), las profundidades de obtención de imágenes en una variedad de tejidos suelen ser $< 500 \mu\text{m}$ dependiendo del procedimiento de etiquetado. Oheim et al. han conseguido una profundidad de penetración de la microscopía de dos fotones en $\approx 100 \mu\text{m}$ mediante una lente de objetivo de bajo aumento y alta apertura numérica (157). Theer et al. pudieron aumentar el alcance de la microscopía multifotónica a $\approx 1 \text{ mm}$ en el tejido cerebral mediante el uso de la amplificación regenerativa de pulsos de 200 kHz para lograr altas potencias de pico manteniendo potencias medias razonables (158). Finalmente, Webb y sus colaboradores demostraron que la microscopía multifotónica permite obtener imágenes con resolución subcelular a varios milímetros de profundidad en el cerebro de animales intactos anestesiados (159). Es importante destacar que la resolución espacial de la microscopía TPE se mantiene con el aumento de la profundidad del tejido (154, 160) siempre que la saturación de la excitación sea insignificante (161), ya que si esta es considerable la resolución óptica se degrada sustancialmente. Aunque el aumento de la potencia media del láser incidente es un medio común para lograr una mayor profundidad de penetración del haz de excitación (157, 158, 162), también aumenta la probabilidad de la saturación de la excitación, lo que resulta en una disminución de la resolución óptica y un fotodaño más extenso, respectivamente (163-165). Estos láseres, además, causan menos daño térmico

a las células debido a la absorción de la radiación, lo que permite realizar observaciones durante un mayor tiempo, algo de gran importancia para la obtención de imágenes *in vivo*. Otra ventaja es que hay menos dispersión de la luz en el fondo, que se manifiesta como ruido de la señal, y que las longitudes de onda de excitación están muy alejadas de las de la emisión de fluorescencia; como resultado, se puede utilizar toda la señal del espectro para obtener imágenes de la muestra de tejido, mejorando la relación señal/ruido (por sus siglas en inglés, S/N). Es decir, la luz dispersa emitida por un fluoróforo excitado dentro del volumen focal no contribuye a la imagen final en la microscopía confocal porque no se distingue de la luz fluorescente generada en las zonas desenfocadas y es rechazada por el *pinhole*. Por el contrario, dado que la TPE nunca genera fluorescencia fuera de foco, los fotones dispersos de la emisión de fluoróforos pueden utilizarse para generar la imagen de la TPE, lo que da lugar a una mayor eficiencia de recogida de fluorescencia y, por tanto, a una mayor intensidad de la señal a cualquier profundidad del tejido (157).

En resumen, la excitación del fluoróforo con pulsos láser NIR en la TPM proporciona claras ventajas sobre la excitación por un solo fotón de mucha mayor energía en la OPM como son la menor fluorescencia de fondo en células y tejidos, el reducido daño causado en estos debido a la menor energía de la radiación incidente, la práctica ausencia de fotoblanqueamiento de la sonda, y el aumento en la profundidad de penetración en organismos vivos, permitiendo una mejor localización espacial en tres dimensiones de la sonda (166). Por todo esto, está ganando un gran interés para las aplicaciones de imagen óptica en clínica (167).

Sondas fluorescentes utilizadas en la microscopía de dos fotones

Es importante examinar las características de absorción no lineal de las moléculas fluorescentes. En general, la mayoría de los cromóforos pueden ser excitados con dos fotones al doble de su máximo de absorción de un fotón. Sin embargo, debido a que los procesos de absorción de uno y dos fotones tienen diferentes reglas de selección de mecánica cuántica, el espectro TPE de un fluoróforo escalado a la mitad de la longitud de onda no es necesariamente equivalente a su espectro OPE. Si bien no hay diferencias entre los espectros de emisión de OPE y TPE, los espectros de absorción de TPE pueden diferir sustancialmente de sus homólogos de OPE. Así pues, la excitación no lineal

permite a los electrones acceder a estados excitados como S_2 y S_4 , más altos que los accesibles con OPE, lo que da lugar a espectros de absorción TPE más amplios para muchos fluoróforos (ver figura II.12). Es necesario estudiar en profundidad las propiedades espectroscópicas de los fluoróforos bajo excitación no lineal para optimizar su uso en TPM.

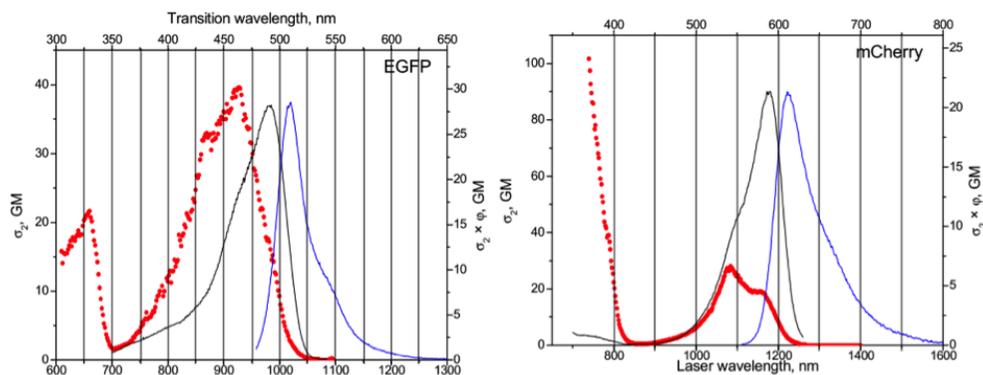


Figura II.12. Espectros de absorción mono- (negro) y bi-fotónica (rojo) y de emisión (azul) de las proteínas EGFP y mCherry. Figura adaptada de Mikhail Drobizhev, et al., 2011 (168).

El estudio espectroscópico de la rodamina bajo TPE fue uno de los primeros estudios realizados en esta área (169). Con la llegada de la TPM, se aceleró la caracterización espectral de los fluoróforos bajo excitación no lineal (170, 171). De hecho, si bien es cierto que ha habido importantes logros en la adaptación instrumental de la excitación bifotónica a aplicaciones específicas, hasta hace poco, la optimización y síntesis de “fluoróforos excitables por dos fotones” tenía un menor interés. Así, algunas de las sondas fluorescentes disponibles en el mercado presentan valores de sección transversal de absorción de dos fotones relativamente bajos en el rango de sintonización del láser de Ti:Sa (172), y/o incluso algunos de ellos poseen un bajo rendimiento cuántico de fluorescencia y/o un alto fotoblanqueamiento. De ahí que haya habido un creciente interés y esfuerzo en el diseño y síntesis de fluoróforos adaptados para TPM. Dichos fluoróforos no están basados en el esqueleto clásico de la fluoresceína, la rodamina o la tetrametilrodamina, sino en un sistema de anillos de fluoreno (173) o en compuestos organoborados (compuestos de tipo dador- π -aceptor (D- π -A)), con un boro trivalente, protegido por dos grupos mesitil, como aceptor, y con varios donantes típicos y diferentes puentes π -conjugados (174), que emiten en la región azul-verde del visible. Sin embargo, también se han descrito fluoróforos derivados del

2,1,3-benzotiadiazol (BTD) de tipo D- π -A- π -D con emisión naranja-roja (175). Otra estrategia diferente utiliza novedosos fluoróforos octopolares con forma de hélice derivados de la funcionalización simétrica de un núcleo de trifenilamina con fuertes grupos periféricos aceptores a través de fenileno-etinileno para obtener altos rendimientos cuánticos de fluorescencia, secciones transversales de excitación por dos fotones elevadas en la región roja-NIR, y una fotoestabilidad adecuada (176) o utilizar la química de click para obtener una amplia gama de moléculas con alta absorción de dos fotones en la región NIR. Se han descubierto moléculas con secciones transversales de excitación por dos fotones de > 1000 GM (177).

Por otro lado, el descubrimiento de agentes terapéuticos excitables por dos fotones ha supuesto una novedad en este campo. El poder controlar la distribución de un principio activo que resulta ser fluorescente posibilita evaluar la eficacia de su administración, algo de gran interés en el campo de la terapéutica (178), y que difícilmente sería posible con excitación monofotónica dada la menor profundidad de la imagen y la contribución de la autofluorescencia (179). En este sentido, el citostático Topotecán se ha caracterizado como una buena sonda excitable por dos fotones con una sección transversal de absorción por dos fotones de > 20 GM a una excitación de 840 nm. Así, ha sido posible la detección de su fluorescencia en plasma a una concentración de 0.05 μ M y en sangre total a 1 μ M (179).

Además de todos los anteriores fluoróforos de tipo sintético, en la naturaleza también existen los conocidos como de tipo intrínseco, es decir moléculas fluorescentes naturales presentes en los organismos y que, a través de su excitación bifotónica, revelan propiedades de los mismos sin necesidad de etiquetado. Así, por ejemplo, se ha medido la fluorescencia de los aminoácidos triptófano y tirosina (180, 181), del pigmento ficoeritrina (182), del neurotransmisor serotonina (183), e incluso de la proteína GFP (184).

Principios para el diseño de sondas enzimáticas excitables por dos fotones

Dado que la actividad enzimática puede variar enormemente con una pequeña modificación de la unidad de reconocimiento enzimático construida sobre la sonda (llamado sustrato), el diseño de una sonda enzimática excitable por dos fotones resulta decisivo y por tanto requiere una especial atención.

Los sustratos sufren transformaciones específicas mediadas por enzimas generando otras especies químicas. Dicha transformación produce cambios en la longitud de onda del máximo en el espectro de emisión o en la intensidad de fluorescencia (cuando se incrementa, se denominan *turn-on*, mientras que, si disminuye, *turn-off*). Estas respuestas pueden conseguirse mediante la construcción cuidadosa de un grupo de reconocimiento enzimático en el fluoróforo excitable por dos fotones a través de varios mecanismos, como la transferencia de energía de resonancia de Förster (por sus siglas en inglés, FRET) o la transferencia de carga intramolecular (por sus siglas en inglés, ICT), entre otros (185).

En el caso de las sondas regidas por un mecanismo FRET, estas se basan en la interacción de un par de fluoróforos, uno que actúa como dador y otro como aceptor de energía, unidos entre sí con una cierta distancia (1-10 nm) a través de un enlace escindible por enzimas. Para que se produzca dicha transferencia de energía, el espectro de emisión del fluoróforo dador se solapa parcialmente con el espectro de excitación del aceptor. Aunque usualmente, tanto el dador como el aceptor son fluorescentes, la FRET también puede ser detectada mediante la extinción de la fluorescencia del dador utilizando un colorante aceptor no fluorescente. Con independencia de esto, finalmente la actuación del enzima hace que se restablezca la fluorescencia del dador, permitiendo su detección (186).

Aunque más adelante, serán descritas en mayor profundidad, las sondas ICT, en cambio, se basan en un fluoróforo en el que existe una transferencia de carga intramolecular desde un grupo dador a uno aceptor. En dicho sistema, se acopla un sustrato sensible a la enzima al fluoróforo en cuestión perturbando sus propiedades espectrales. Así, la actividad catalítica de la enzima restaura el ICT, proporcionando una fluorescencia ratiométrica entre la señal del fluoróforo libre y el ligado al sustrato.

Sea cual sea el mecanismo, una sonda enzimática excitable por dos fotones debe sufrir un cambio en su fluorescencia detectable tras la modificación química catalizada por la enzima diana.

Además, en su diseño se deben de tener en cuenta una serie de criterios (11):

- 1) Tener elevados valores de TPA ($\Phi\delta > 50 \text{ GM}$) para obtener imágenes brillantes con una adecuada relación señal-ruido, a bajas concentraciones de sonda y así poder evitar incluso altas intensidades del láser de dos fotones.
- 2) Ser altamente sensible y selectiva a la enzima.
- 3) Mostrar una buena estabilidad química con las altas potencias utilizadas del láser incidente.
- 4) Ser biocompatible (solubilidad en agua, permeabilidad celular y alta estabilidad química con la mínima citotoxicidad).
- 5) Idealmente, de fácil síntesis química o disponibilidad.

Actualmente son numerosas las sondas excitadas por dos fotones dirigidas a la monitorización de reacciones mediadas por enzimas. Así, se han diseñado y sintetizado sondas para detectar la actividad de algunas:

- a) hidrolasas, por ejemplo las fosfatasas (187-189), β -galactosidasa (190-192), sulfatasa esteroidea (193), acetilcolinesterasa (194), carboxilesterasa (195), histona deacetilasas (196) y proteasas (197-199);
- b) oxidorreductasas: entre ellas, monoamino oxidasas (200, 201), NADPH: quinona oxidorreductasa 1 humana (202), ciclooxigenasa-2 (203), nitroreductasa (204), citocromo P450 (205), tioredoxina reductasa (206);
- c) transferasas: como la gamma-glutamyltranspeptidasa (207).

Por todo ello, el desarrollo de sondas enzimáticas excitables por dos fotones es de gran interés en el diagnóstico temprano de enfermedades (208-210).

Condiciones experimentales en TPM

Los parámetros que ha de tener la fuente láser y las características que deben poseer las sondas TPM han sido motivo de investigaciones recientes (11, 211). En principio, como se ha comentado, es necesaria una radiación de alta intensidad perfectamente localizada en el punto focal del microscopio de fluorescencia para inducir el proceso de MPE. Sin embargo, a tales potencias

láser, la absorción monofotónica asociada causa fototoxicidad y daños térmicos en las células y tejidos vivos. Por lo tanto, es esencial suprimir la absorción monofotónica en la medida de lo posible durante la MPE, y de ahí la necesidad de utilizar pulsos láser ultracortos.

Por otro lado, es esencial optimizar las propiedades de absorción de dos fotones en los fluoróforos. Por ello, se deben buscar sondas fluorescentes que posean un alto valor de sección transversal de absorción por dos fotones, lo que se consigue aumentando la extensión de la ICT. Así, el desarrollo de fluoróforos eficientes puede reducir la intensidad del láser de excitación necesaria para la obtención de imágenes y, por tanto, reducir el fotodeterioro de la muestra. Por otra parte, con secciones transversales de dos fotones elevadas, se puede lograr una excitación significativa con los láseres de onda continua, más económicos, reduciendo así el coste de los sistemas de dos fotones que suelen utilizar láseres de femtosegundo de Ti:Sa.

No obstante, una ICT demasiado mejorada usualmente viene acompañada por una reducción en la brillantez de la imagen, por lo que resulta necesario alcanzar un compromiso entre las características de la sonda y los parámetros de la luz incidente. En lo que se refiere a esta última como pauta general se debería emplear un láser de unos 5 mW en la lente objetivo, y respecto a las sondas, éstas deberían tener una sección transversal de absorción igual o mayor de 50 GM. Con estas condiciones se pueden alcanzar imágenes brillantes mediante TPM sin causar daños apreciables en la muestra (11, 211).

II.2.2.3. Microscopía de superresolución

La caracterización celular de estructuras y biomoléculas con alta resolución espacio-temporal es un requisito indispensable para un adecuado conocimiento molecular de la biología. Como se ha comentado anteriormente, la microscopía de fluorescencia es, en ese sentido, la herramienta de obtención de imágenes más empleada, debido a las características no invasivas de la microscopía óptica, que permite sondear estructuras y funciones de células vivas en el espacio tridimensional a escala submicrónica. Además, la microscopía de fluorescencia proporciona una alta sensibilidad hasta el nivel de una sola molécula, lo que permite la observación de moléculas y señales específicas de orgánulos.

Sin embargo, el poder de resolución, definido como la distancia mínima por debajo de la cual ya no es posible distinguir la separación entre dos puntos, de la microscopía óptica de campo lejano (que engloba tanto el microscopio de campo amplio convencional como el microscopio de fluorescencia confocal) se ve limitado por la difracción de la luz, tal y como explicó Ernst Karl Abbe en 1873 (212). Según los principios de óptica básica, la resolución de un microscopio óptico está limitada por el ensanchamiento por difracción debido a la naturaleza ondulatoria de la luz. Así, la microscopía óptica fusiona imágenes de moléculas fluorescentes etiquetadas individualmente en una sola imagen borrosa si la extensión o separación estructural en la muestra, d , está más cerca que el límite de Abbe (ver ecuación II.3):

$$d = \lambda / (2n \operatorname{sen} \alpha) = \lambda / 2NA \quad (\text{Ec. II.3})$$

donde n describe el índice de refracción de la muestra, α mide el semiángulo sólido a partir del cual la luz es recogida por un objetivo, λ es la longitud de onda de la luz utilizada para excitar la muestra y NA es la apertura numérica de las lentes del objetivo.

Así pues, en las mejores condiciones posibles (longitud de onda más corta y mayor apertura numérica disponible en la actualidad), la difracción no permite separar dos puntos en un volumen inferior a aproximadamente la mitad de la longitud de onda de la luz a lo largo de las direcciones laterales (x,y) y tres veces mayor a lo largo del eje óptico (z) (alrededor de 200 y 600 nm, respectivamente) con luz visible (213, 214), impidiendo la visualización de muchas estructuras subcelulares. Por todo ello, durante décadas los investigadores han centrado su atención en encontrar técnicas ópticas que superen dicho límite.

Los recientes avances en la instrumentación de la microscopía, junto con la combinación de diferentes enfoques fotofísicos y matemáticos, han puesto sobre la mesa diversos métodos para superar dicho límite de difracción de la luz mediante el empleo de óptica de campo lejano, lo que ha ampliado el uso de la microscopía de fluorescencia hasta la escala nanométrica, suponiendo una auténtica revolución en el mundo de la imagen biológica (215-217). Así pues, ha permitido el estudio de funciones biológicas complejas, como las interacciones proteína-proteína, el movimiento de las

biomoléculas, la dinámica de los orgánulos, información sobre el metabolismo celular, etc. (218-222).

El factor común inherente a estas técnicas es la conmutación transitoria de los fluoróforos entre (como mínimo) dos estados diferenciables, es decir, estados con diferentes respuestas espectrales, temporales o cualquier otra respuesta detectable a la iluminación (223). Usualmente un estado fluorescente encendido, "on", y un estado apagado, "off", pudiendo ser este segundo el estado de un fluoróforo que no puede emitir fotones de fluorescencia, o un estado que emite en una región espectral no detectada en el experimento. La transición entre estos dos estados distinguibles permite el registro secuencial de la señal que se origina en regiones de la muestra cuyo tamaño es mucho más pequeño que el límite de difracción. Dichas técnicas se clasifican en dos grupos: estocásticas y no estocásticas (o deterministas) (224).

Las estocásticas están basadas en la localización con enorme exactitud de las moléculas fluorescentes individuales en la muestra. En términos generales, una estructura biológica marcada con un fluoróforo posee miles o millones de moléculas distribuidas con una gran densidad, lo cual hace imposible la determinación de su posición individual debido a que las imágenes de dichas moléculas se superponen en el espacio. A través del empleo de sondas fluorescentes que puedan tornar entre un estado de fluorescencia "on" y un estado "off", esta limitación puede ser superada mediante la separación en el tiempo de las imágenes. Las moléculas en una región limitada pueden ser activadas en diferentes tiempos, y detectadas y localizadas individualmente, aplicando posteriormente una reconstrucción de la imagen con resolución nanométrica. Al ser diversos los mecanismos de transición que pueden darse entre ambos estados, también lo son las técnicas estocásticas existentes, aunque como ya se ha indicado todas usan fluoróforos que se van activando y desactivando de manera aleatoria, y, por lo tanto, se irán captando las moléculas aisladas gracias a las técnicas de alta resolución. Así, la detección de un número suficiente de eventos de una sola molécula permite la reconstrucción a través de puntos (o puntillista) de la distribución de los fluoróforos. Entre estas técnicas, las dos más comúnmente conocidas son la microscopía de localización fotoactivada (PALM) y la técnica de microscopía de reconstrucción óptica estocástica (STORM). Las diferencias entre estas dos técnicas radican principalmente en la naturaleza del fluoróforo

utilizado, tratándose en el caso de STORM de un colorante fotoactivable (un par de colorantes sintéticos, como por ejemplo Cy3 y Cy5, que muestran una conmutación cuando están localizados cerca) (225), y de una proteína fotoactivable para la técnica de PALM (226).

Por su parte las no estocásticas están basadas en la respuesta no-lineal de los fluoróforos, la cual puede aprovecharse para mejorar la resolución (227). Se trata de técnicas de lectura única, donde las imágenes se captan de manera similar a las imágenes confocales pero con el incremento en la resolución que conllevan. Dentro de este grupo, cobra especial importancia la microscopía de depleción (o agotamiento) por emisión estimulada (por sus siglas en inglés, STED), no sólo por ser la primera técnica de nanoscopia que se desarrolló, sino también por ser la primera en conseguir imágenes celulares con una resolución espacial por debajo del límite de difracción (228).

Es tal la importancia que cobran estas tres técnicas mencionadas que ello ha dado lugar en 2014 a la concesión conjunta del Premio Nobel de Química a los investigadores responsables de las mismas, los estadounidenses Eric Betzig y William E. Moerner, junto alemán Stefan W. Hell, quienes, habiendo trabajado de forma independiente, han sido capaces de romper la barrera que la óptica física había impuesto durante toda la historia de la microscopía (229, 230)

Si bien es cierto la utilidad de todas ellas, el método STED introducido por Hell y Wichmann en 1994 (12), es uno de los más interesantes, principalmente por su gran velocidad de adquisición en comparación con las técnicas estocásticas, lo cual facilita realizar medidas *in vivo* o analizar procesos dinámicos, y además por no depender del post-procesado computacional o matemático para obtener las imágenes de superresolución.

El principio básico de este método es que el tamaño del punto de fluorescencia, o función de dispersión de punto (por sus siglas en inglés, PSF), puede reducirse (y, por ende, conseguir una resolución a nanoescala) mediante el empleo de dos haces láser sincronizados y superpuestos que llegan a la posición de la muestra consecutivamente, y de los cuales el primero (láser de excitación) excita, mientras que el segundo (láser de depleción o STED) desexcita (o agota la excitación) dentro de la muestra. En la región donde están presentes ambos rayos láser, se produce emisión estimulada y en

la región focal que contiene sólo el primer haz de excitación, se observa emisión espontánea (es decir, fluorescencia). El uso de este concepto en microscopía implica que la PSF del segundo haz deba tener campos nulos en el centro y no nulos en la periferia. Para ello, el perfil STED se esculpe ópticamente, mediante un modulador de fase, generando una distribución de la luz en forma de "donut" en el plano focal (es decir, un anillo de alta intensidad láser que rodea una zona de intensidad cero). Es decir, la superposición del perfil STED a un perfil de haz láser de excitación de forma gaussiana permite la supresión selectiva. De este modo, las moléculas fluorescentes se apagan mediante la emisión estimulada en las zonas exteriores (inducida a través del haz STED) o se les permite generar una señal de fluorescencia detectable a partir de las pocas moléculas centrales que están ópticamente "no suprimidas", dando lugar en definitiva a que la fluorescencia se produzca sólo dentro de un área a nanoescala, separando y resolviendo así las moléculas vecinas marcadas con fluorescencia. En resumen, se escanea un donut de desexcitación alrededor del haz de excitación y se consigue el confinamiento de la excitación en algunos colorantes en el orificio central del donut, con una concomitante mejora asociada de la resolución. La figura II.13 refleja el principio básico de este tipo de microscopía.

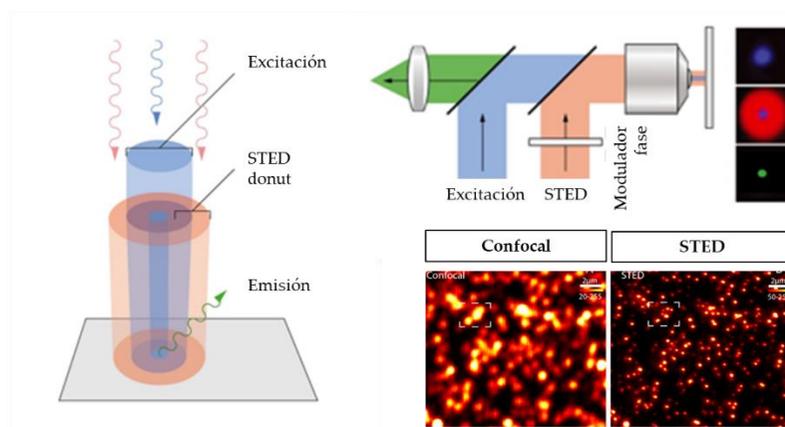


Figura. II.13. Principio básico de la microscopía STED (231, 232).

Para una mayor comprensión del método, resulta necesario explicar el proceso que sufre la molécula en términos de estados electrónicos y transiciones entre los mismos (ver figura II.14). Como ya se comentó, cuando un fluoróforo absorbe luz (fotón azul), su organización electrónica es alterada

mediante la excitación de un electrón a un estado de mayor energía. Posteriormente, en un tiempo de nanosegundos, la energía absorbida es espontáneamente liberada, volviendo dicho electrón al estado fundamental y generándose con ello un fotón (verde), lo que se traduce en la emisión de fluorescencia propiamente dicha. Debido a la pérdida de energía, entre otras causas, por las relajaciones vibracionales, el fotón emitido (verde) es desplazado hacia la región roja del espectro electromagnético (menos energético que el fotón absorbido). Pues bien, hasta aquí, y extrapolándolo al esquema anterior, esto sería lo que ocurriría en el centro del donut. Ahora bien, si un segundo láser emite otro fotón (rojo) de excitación mientras que la molécula se encuentra aún en el estado excitado (pues ya había sido excitada previamente por la absorción de dicho fotón azul), se estimulará el paso de la molécula desde el estado excitado al estado fundamental, sin que se produzca fluorescencia. En su defecto, dicho exceso de energía será liberado mediante una copia exacta del fotón excitador (lo que se conoce como emisión estimulada), el cual no será recogido por el detector. Todo este proceso, sería el que se daría en la periferia (ver figura II.14).

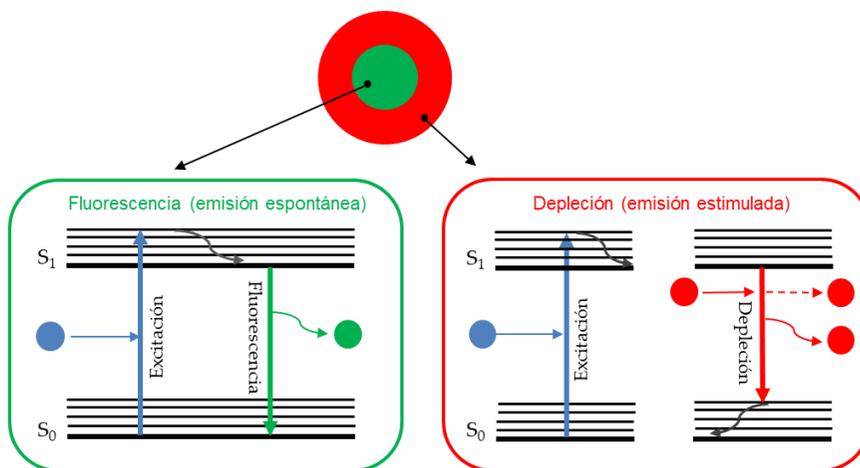


Figura. II.14. Comparación de los diagramas de energía entre la fluorescencia y la depleción (emisión estimulada) con microscopios confocal y STED.

Para obtener imágenes de superresolución en microscopía STED, se deben tener en cuenta una serie de parámetros. En primer lugar, un adecuado tiempo de retardo entre los láseres de excitación y depleción, pues este último debe incidir en la muestra cuando la molécula está aún en el estado excitado. Por otro lado, la anchura del pulso temporal del láser STED, no pudiendo ser

más larga que el tiempo de vida del estado excitado. En tercer lugar, la longitud de onda del mismo, que debe estar en el rango de la emisión del fluoróforo, idealmente, en la cola del espectro de emisión, al objeto de que no solape con el espectro de absorción y no se produzca una re-absorción (figura II.15).

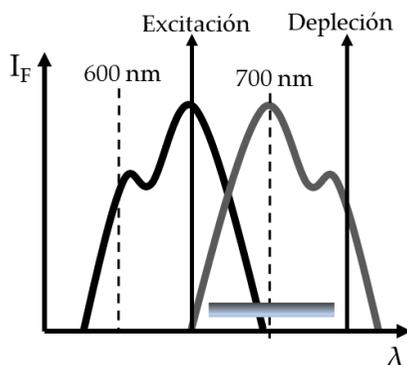


Figura. II.15. Espectros posibles de excitación y emisión de un colorante para microscopía de STED. Las flechas indican las longitudes de onda ideales para los láseres de excitación y depleción. La barra sólida representa el rango de emisión recogido por el detector.

La resolución de la microscopía STED puede ser descrita matemáticamente en la ecuación II.4 como:

$$d = \frac{\lambda}{2NA \sqrt{1 + \frac{I}{I_s}}} \quad (\text{Ec. II.4})$$

donde NA es la apertura numérica de la lente del objetivo, λ es la longitud de onda de la luz, I es la intensidad máxima del haz de depleción STED e I_s es la intensidad STED utilizada para reducir la intensidad de fluorescencia a la mitad (233).

Así, la reducción de la PSF (o aumento de la resolución) depende del grado de agotamiento en la periferia, que a su vez depende de la intensidad del láser de agotamiento, tal y como se muestra en la figura II.16.

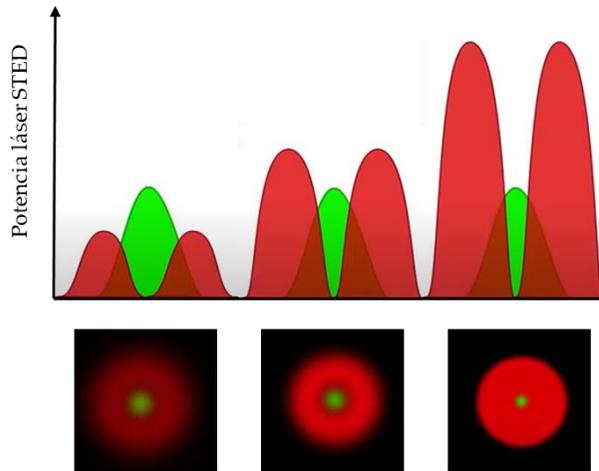


Figura. II.16. Reducción en PSF con el aumento de la intensidad del láser STED.

Para lograr la mejor reducción posible de la PSF, se utilizan láseres de agotamiento muy intensos y generalmente desplazados al rojo para aumentar la sección transversal de depleción estimulada y no interferir con la excitación. Así, mientras que las intensidades de luz del láser de excitación son las mismas que en microscopía confocal convencional (1-10 μW), la emisión estimulada requiere intensidades de luz bastante elevadas de 1-10 MW/cm^2 a unos 740-780 nm del láser STED añadido (por ejemplo, suministrado por una potencia media de 100-300 mW de pulsos de ~ 100 -300 ps de duración de un láser de Ti:Sa), lo que introduce la necesidad de prestar atención a la absorción de calor y a las reacciones no deseadas inducidas por la luz. Sin embargo, las máximas intensidades implicadas son menores que las utilizadas en la microscopía de dos fotones, que como hemos visto se trata de una herramienta bien establecida en la microscopía de células vivas (228).

Aunque teóricamente, la resolución de la microscopía STED puede alcanzar el tamaño de la molécula (el límite último de un microscopio fluorescente), en la práctica el fotodaño de la muestra suele establecer el límite de intensidad del haz de agotamiento, especialmente en el caso de las muestras biológicas. Usualmente, un microscopio STED comercial o fabricado a medida suele generar una resolución máxima de 20-50 nm, permitiendo obtener imágenes a nanoescala del interior subcelular. No obstante, se ha llegado a alcanzar una resolución de 5.8 nm en nanocristales (234).

Si bien es cierto que se ha ralentizado el empleo de la técnica debido a la creencia durante muchos años de sus limitaciones por el posible efecto de fotodaño celular, junto con el elevado coste y dificultad de los primeros equipos, en la última década los increíbles hallazgos derivados de su uso han propiciado su extensión entre la comunidad científica (235).

El potencial de las imágenes de superresolución en la investigación biológica radica no sólo en la posibilidad de visualizar nanoestructuras, incluso tridimensionales, en organismos vivos, como células o bacterias, sino también de contribuir a la determinación de procesos moleculares en los organismos estudiados y, por tanto, poder ofrecer una caracterización funcional más amplia (221, 236). En concreto, un área en la que puede aplicarse la microscopía de superresolución es la obtención de imágenes de localización de puntos de mayor actividad catalítica (también conocidos como *hot pots*) en estructuras vivas. Dado que este objetivo requiere las propiedades fotofísicas específicas de la sonda fluorescente (237, 238), el desarrollo de nuevos sensores emisivos para estudiar este aspecto es un tema de investigación actual.

II.3. Reacciones de transferencia de carga intramolecular (ICT)

En el campo de la biología y la química, y más concretamente en el de la fotoquímica, las reacciones de transferencia de electrones son consideradas uno de los procesos elementales más fundamentales (239, 240). Han pasado más de 50 años desde que Mulliken (241-243) presentara por primera vez el concepto de transición de transferencia de carga (por sus siglas en inglés, CT), para hacer referencia a una excitación directa a un estado donde un electrón es transferido desde un grupo dador o electrón-donante (a partir de ahora, simplificado como D) a uno aceptor o electrón-atrayente (o estado A). Desde entonces, la reacción de transferencia de carga ha recibido una atención sin precedentes y ha inspirado amplios esfuerzos de investigación (244).

Concretamente, las reacciones de transferencia de carga intramolecular son un caso específico, las cuales ocurren en moléculas que contienen en su estructura ambos grupos unidos mediante un enlace o puente π que permite la deslocalización de los electrones. Estos fluoróforos, también conocidos como *push-pull* (245), en disolventes polares y tras ser excitados,

pueden llegar a un estado localmente excitado (por sus siglas en inglés, LE) o también llamado estado Frank-Condon de tipo (π - π^*); y/o a un estado de transferencia intramolecular de carga (por sus siglas en inglés, ICT), donde el grupo D cede un electrón al grupo A, produciéndose una separación de cargas e incrementándose el momento dipolar del fluoróforo en el estado excitado (figura II.17), el cual se relaja dada la interacción con los dipolos de las moléculas del disolvente de la esfera de solvatación, dando lugar a una disminución energética del mismo con su consiguiente emisión desplazada hacia longitudes de ondas más largas (245).

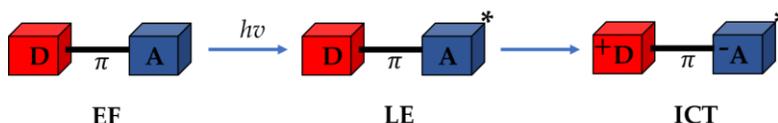


Figura II.17. Esquema simplificado del mecanismo de los fluoróforos ICT.

Entre los diferentes grupos D, se encuentran, principalmente, los siguientes grupos funcionales: $-\text{NH}_2$, $-\text{NHR}$, $-\text{NR}_1\text{R}_2$, $-\text{OR}$ y $-\text{OH}$. Por el contrario, entre los diversos grupos A están: $-(\text{C}=\text{O})$, $\text{C}\equiv\text{N}$ y $-\text{SHO}_2$. Por último, el puente π está formado por anillos aromáticos, donde sus orbitales π pueden dar lugar a una deslocalización electrónica y, por ende, a la transferencia electrónica (desde el grupo D al A).

Así pues, una vez excitado el sistema, estos fluoróforos con mecanismos ICT en disolventes polares, podrían emitir radiativamente desde ambos estados, dando lugar a la posible existencia espectral de dos bandas de fluorescencia, fenómeno conocido como fluorescencia tipo dual, vulnerando así el principio fotoquímico postulado por Michael Kasha en 1950 (246) (también conocido como regla de Kasha), el cual establece que la emisión radiativa de un fluoróforo sucede desde el estado excitado de menor energía (S_1), originando un espectro de emisión constituido por una única banda sencilla.

La banda de fluorescencia “normal” es la procedente de la emisión de la especie LE, mientras que la segunda banda “anómala”, desplazada hacia valores de longitud de onda mayores, procede de la emisión de la especie ICT (247, 248) (figura II.18).

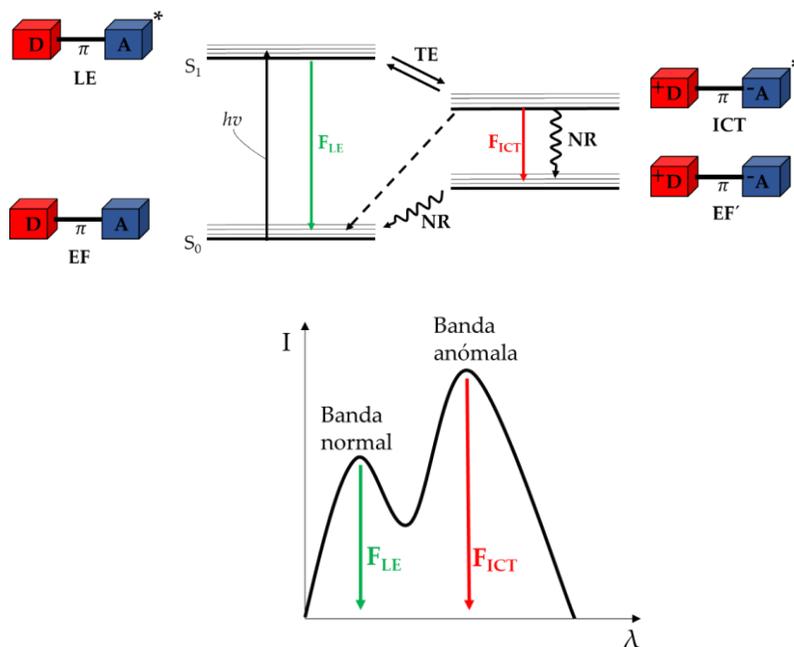


Figura II.18. Imagen superior: diagrama de Jablonsky de las principales transiciones en ICT, donde EF representa el estado fundamental de la especie inicial, LE la especie localmente excitada, ICT la especie donde ha ocurrido la transferencia de carga y EF' el estado fundamental de esta última. $h\nu$ simboliza el proceso de absorción, F_{LE} la fluorescencia emitida por la transición LE-EF, TE es la transferencia electrónica, F_{ICT} la desactivación radiativa de la especie ICT y NR su desactivación no radiativa. Imagen inferior: bandas de emisión de fluoróforos ICT en disolventes polares.

Este fenómeno depende fundamentalmente de la energía relativa de estos dos estados y de la energía de activación del proceso, que puede ser modificada con la polaridad del disolvente. Así pues, a medida que se incrementa la polaridad del medio, la intensidad de la banda de fluorescencia "anómala" aumenta en detrimento de la emisión "normal".

Por el contrario, en disolventes apolares, la emisión de este tipo de fluoróforos principalmente ocurrirá desde el estado donde no se ha dado la separación de cargas, originando, en general, una única banda, la correspondiente al estado LE. Por otro lado, en fase gaseosa no se contempla la banda de fluorescencia ICT, puesto que, probablemente, el estado ICT se localiza a una energía ligeramente mayor que el estado LE, observándose también una sola banda (ver figura II.19).

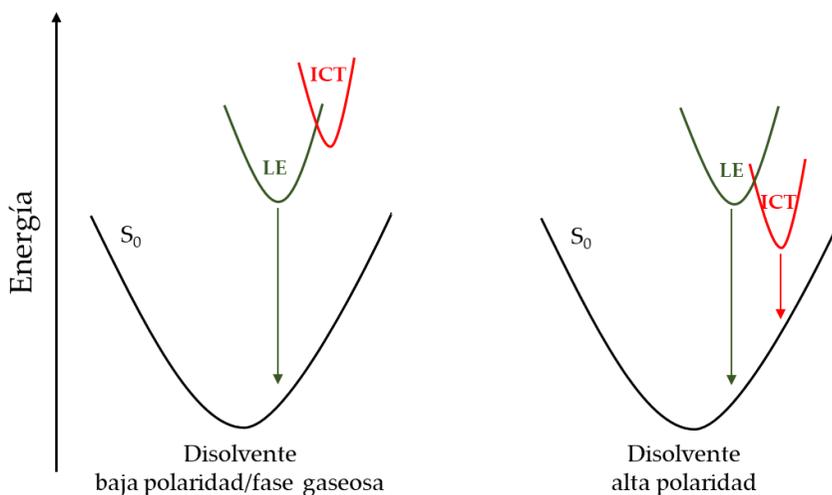


Figura II.19. Efecto de la naturaleza del disolvente en las energías de los estados LE e ICT.

En términos generales, la mayoría de los fluoróforos de tipo dador-aceptor presentan un comportamiento solvatocrómico y obedecen la ley de la brecha de energía simultáneamente, mostrando una disminución de la emisión al aumentar la polaridad del disolvente (249). Así, los fluoróforos con un fuerte ICT, si bien, en disolventes próticos, presentan bandas de emisión desplazadas hacia el rojo, no poseen elevadas eficiencias cuánticas de fluorescencia debido a los enlaces de hidrógeno formados entre el soluto y el disolvente que promueven la desactivación del fluoróforo de tipo no radiativo (250), los cuales son clasificados como *downhill type* (249). No obstante, existen algunos otros a los que le ocurre todo lo contrario, clasificados como *uphill type*, debido a que, justamente, los enlaces de hidrógeno dificultan la desactivación no radiativa por entrecruzamiento de sistemas y conversión interna (251-253).

La fluorescencia dual fue descubierta por Lippert (254) en el 4,4'-dimetilaminobenzonitrilo (más comúnmente conocida como DMABN), siendo considerada como molécula modelo de dicho fenómeno por su simplicidad estructural (figura II.20). Desde entonces, ha suscitado un enorme interés por sus diversas utilidades no sólo en el campo de los sensores fluorescentes (255-257) y el de la bioimagen (258) sino también en de la ciencia de los materiales (259-262).

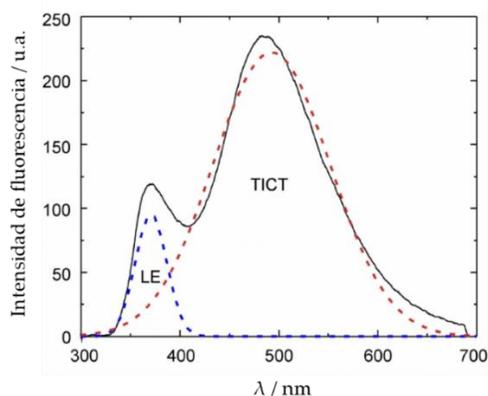
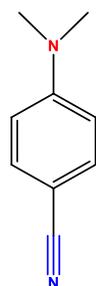


Figura II.20. Estructura química de la molécula DMABN (azul: grupo A; rojo: grupo D). Espectro de emisión de la fluorescencia dual de ~5 mM en acetonitrilo ($\lambda_{exc} = 266$ nm) (263).

De hecho, son numerosos los fluoróforos *push-pull* que, desde entonces, han sido reportados por la comunidad científica. Algunos de ellos se muestran en la figura II.21.

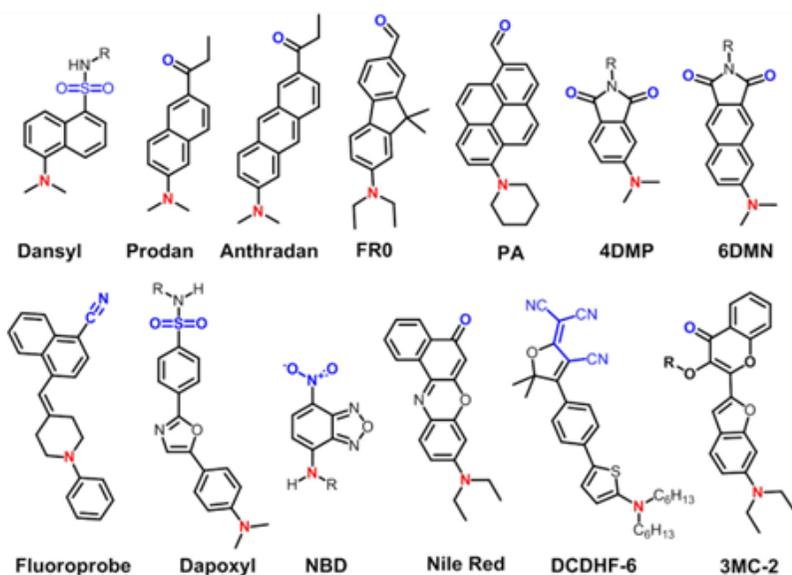


Figura II.21. Ejemplos de fluoróforos *push-pull* (azul: grupo A; rojo: grupo D) (245).

Son varios los modelos sobre el estado ICT: girado o “twisted” (por sus siglas en inglés, TICT), doblado o “wagged” (por sus siglas en inglés, WICT), rehibridizado (por sus siglas en inglés, RICT) y plana (por sus siglas en inglés, PICT).

Transferencia de carga intramolecular girada (TICT)

Es el modelo que caracteriza al mecanismo del DMABN y fue descrito por Grabowski et al. (264). De acuerdo al mismo, el compuesto en el estado fundamental con geometría planar, tras ser excitado, entra en un estado LE aún con dicha geometría. Tras ello, se produce un giro del grupo dimetilamino hacia una configuración perpendicular, provocando con ello, que el grado de ICT se intensifique y se llegue a ese estado TICT (265).

Se trata pues de un estado en el que la ICT ocurre por un cambio en la conformación que proviene de una rotación de 90° a través del enlace que une el sistema dador y aceptor, provocando que el grupo amino se encuentre perpendicular al anillo bencénico. Para que este giro suceda, lo más usual es emplear una amina alifática como grupo D, puesto que el átomo de nitrógeno de este grupo tiene una hibridación sp^3 , mientras que la pérdida de un electrón produce un cambio a una hibridación plana tipo sp^2 , algo que ocurre en picosegundos (266). La molécula por tanto quedaría cargada positivamente sobre el átomo de nitrógeno del grupo amino y con carga negativa deslocalizada en el anillo aromático (ver figura II.22).

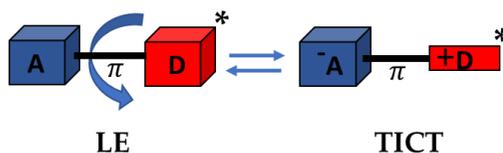


Figura II.22. Esquema simplificado del mecanismo TICT.

Al objeto de confirmar este mecanismo, fueron sintetizados, por los investigadores anteriormente mencionados, derivados del DMABN en los que varía la geometría molecular del grupo D. En algunos de ellos, al igual que en la molécula original, los grupos electrón-donantes podían rotar de forma libre. En otros, sin embargo, dichos grupos, a través de la ciclación, fueron fusionados de forma coplanar al grupo benzonitrilo, como por ejemplo en la 1-metilindolina-5-carbonitrilo, dando lugar a una única banda de emisión correspondiente al estado LE incluso en disolventes altamente polares, muy al contrario de lo que ocurre en otros últimos derivados, donde dicho grupo está dispuesto perpendicularmente al grupo benzonitrilo de forma fija, como en el caso de la 3,5-dimetil-4(dimetilamino)benzonitrilo,

dando lugar, por tanto, a una única banda correspondiente al estado TICT (265).

Usualmente, los fluoróforos tipo TICT son empleados como sensores de microambiente, dada su sensibilidad a la polaridad del entorno o la viscosidad, entre otras variables (267). Tanto es así, que se habla incluso de polaridad crítica para referirnos a un valor de polaridad, por encima del cual se favorece el estado TICT, mientras que, por debajo, es el estado LE el predominante (268).

Transferencia de carga intramolecular oscilante (WICT)

Propuesto por Schuddeboom et al. (269), este mecanismo de transferencia de carga se caracteriza por la piramidalización del átomo de nitrógeno del grupo amino mediante un cambio en su hibridación, pasando de una estructura plana sp^2 a una piramidal sp^3 , y provocando una modificación en el ángulo de oscilación de los sustituyentes de la amina alifática.

Rehibridación por Transferencia de carga intramolecular (RICT)

Otro de los mecanismos postulados para dar respuesta a la fluorescencia dual del DMABN fue el propuesto por Sobolewski et al. (270). Este modelo implica una rehibridación, pero en esta ocasión en el átomo de carbono del grupo aceptor, de sp a sp^2 originando una torsión en el enlace C-N del grupo ciano.

Transferencia de carga intramolecular plana (PICT)

En una serie de trabajos desde 1993 (271-273), Zachariasse et al. propusieron la formación de un doble enlace entre el átomo de nitrógeno del grupo dador y el átomo de carbono del puente π , generando una estructura plana como especie emisora ICT, llamada PICT, en el que el grupo amino se encuentra en el mismo plano bencénico, y cuyo átomo de nitrógeno queda con carga positiva.

Finalmente, cabe destacar que, a pesar de la propuesta de estos cuatro mecanismos (figura II.23), el modelo TICT, bien establecido en la comunidad científica, es el considerado como más defendido para explicar el fenómeno

de transferencia de carga intramolecular, refrendado por los resultados experimentales obtenidos y los cálculos teóricos llevados a cabo (274).

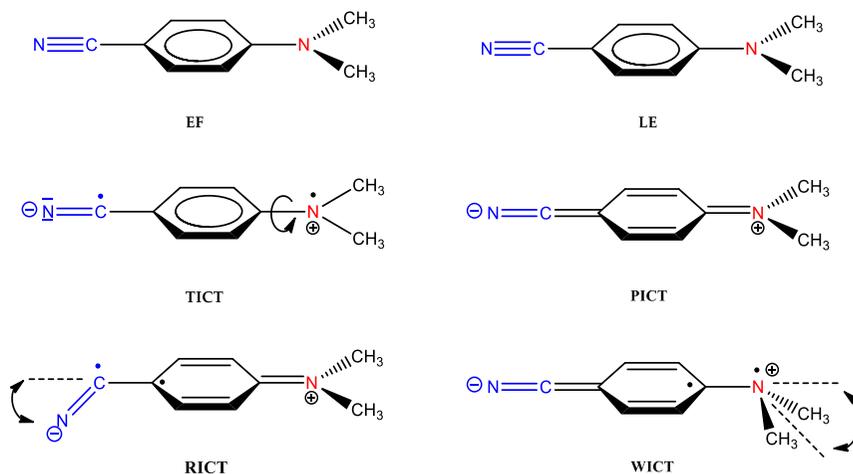


Figura. II.23. Modelos basados en cambios estructurales para explicar la naturaleza del estado ICT (azul: grupo A; rojo: grupo D).

II.4. Derivados del Dicianometileno-4H-Pirano como sensores ICT

Entre los distintos fluoróforos existentes conocidos por sus buenas propiedades fotofísicas y fotoquímicas destacan los derivados del dicianometileno-4H-pirano (DCM), también llamado como el colorante láser arilideno (275, 276). Con un gran desplazamiento de Stokes, una alta fotoestabilidad (277), una ajustable emisión NIR, y una sección transversal de absorción bifotónica adecuada (278), resultan de gran interés como demuestra su amplio número de aplicaciones. Así, se han sintetizado derivados útiles en la fabricación de emisores OLED (279), circuitos electrónicos, láseres (280), células fotovoltaicas (281) y también como sensores fluorescentes. Recientemente, se han sintetizado incluso derivados en estado sólido para la visualización de huellas dactilares latentes, de gran interés en investigación criminalística (282). Merece la pena resaltar su emisión en el NIR, pues ello le confiere propiedades excelentes para convertirse en buen candidato para la imagen biológica. Por todo ello, suscita un enorme interés en diversos campos, principalmente en el de la química y la ingeniería.

Con respecto a la estructura química del fluoróforo, el DCM es una molécula con una conformación D- π -A, con un grupo dimetil-amino como grupo D y un grupo diciano como grupo A, los cuales se separan mediante un puente conjugado formado por dos anillos aromáticos y enlaces sencillos y dobles alternados que se extiende desde el dador hasta el aceptor. Esto le convierte en un sistema ICT, en el que, tras la excitación, se produce un movimiento de carga desde el grupo D hasta el A, provocando una alteración de la fluorescencia (figura II.24).

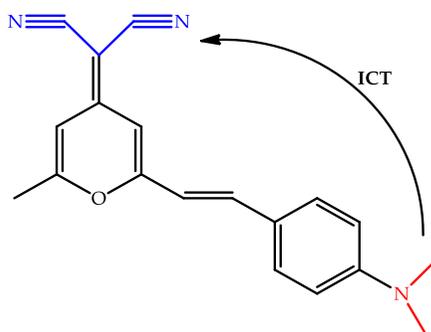


Figura II.24. Esquema del proceso ICT en el fluoróforo DCM (azul: grupo A; rojo: grupo D).

Aunque se han llevado a cabo experimentos que proponen la existencia de un estado excitado CT para el DCM, la naturaleza de este aún no está tan clara, siendo muchos los trabajos que proponen diferentes teorías para explicar la evolución del DCM desde un estado de excitación local (LE) a un estado CT (283-289).

En cuanto a las estrategias de diseño de derivados del DCM para el control de sus propiedades fotofísicas, se incluye la introducción de grupos donantes y/o aceptores más fuertes, o la extensión del sistema π -conjugado mediante la adición de anillos aromáticos, provocando así el estrechamiento de la brecha de energía de banda entre el estado fundamental y el excitado, algo que permite el desplazamiento de la emisión hacia mayores λ en la región NIR.

Por otro lado, la introducción de grupos capaces de extinguir la fluorescencia (conocidos comúnmente en inglés como grupos *quencher*) permite la obtención de sondas de tipo "off-on". Así, en presencia de la diana, se produce la separación de dicho grupo y se restaura el mecanismo ICT del fluoróforo. Teniendo en cuenta esta consideración, son numerosos los

sensores fluorescentes derivados del DCM que se han desarrollado para el reconocimiento de distintos analitos con alta sensibilidad y selectividad, no sólo en disolución sino también a nivel celular:

- Iones. Partiendo del DCM-OH y acoplándole distintos *quenchers* a través del grupo hidroxilo fenólico, se han sintetizado un buen número de sensores para la detección de iones específicos. Así, por ejemplo, la unión al grupo protector difenil fosfinato ha dado lugar a un sensor útil para la detección de peroxinitrilo (290), mientras que la unión al grupo tiocarbamato, originó el sensor DCM-OCl para hallar iones hipoclorito (291), una especie reactiva de oxígeno con papeles esenciales en diversos procesos fisiológicos y patológicos, como la respuesta a patógenos, la edad, la respuesta antiinflamatoria, y la regulación inmunitaria. En estudios de los últimos años se ha trabajado en otro sensor de cianuro con una alta selectividad y sensibilidad en presencia de otros iones interferentes comunes y pequeñas moléculas, y cuyo mecanismo de acción está asociado a la adición nucleofílica del cianuro acoplada a la eliminación del 2-tiofenocarbonilo, presente en el sensor (292); y en el desarrollo de otro para el ion cúprico, participante en diversos catalizadores enzimáticos y en la transducción de electrones como cofactor de enzimas relacionadas, para lo cual se ha acoplado el DCM-OH al ácido picolínico, originando el DCM-Cu, con un límite de detección de 25.4 nM. Por otro lado, a partir del derivado DCM-NH₂ se ha sintetizado el sensor DCM-Si, para la detección cuantitativa de iones fluoruro exógenos en células HeLa y embriones de pez cebra mediante la obtención de imágenes de fluorescencia (293).
- Especies reactivas de oxígeno (por sus siglas en inglés, ROS). Recientemente, Ling et al. (2019) partiendo del derivado DCM-OH y utilizando n-butenil como grupo de reconocimiento, han sintetizado el sensor DCM-O₃ para la detección de ozono *in vitro* e *in vivo* (294), especie causante de un gran número de trastornos respiratorios como asma, bronquitis, disnea e incluso problemas cardiopulmonares. Otra ROS de gran importancia por su implicación en el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas es el peróxido de hidrogeno, y para cuya detección también se ha reportado la sonda DCM-B2, con una respuesta de emisión

de fluorescencia tras la conversión de su unidad de aril boronato en fenol en presencia de esta especie (295).

- Especies reactivas de nitrógeno. El nitroxilo es uno de los derivados más importantes del óxido nítrico, e interviene como una molécula activa en muchos procesos biológicos y farmacológicos. Para monitorizar nitroxilo en muestras biológicas vivas, se ha sintetizado el compuesto DCM-P, una sonda fluorescente libre de metales en la región NIR que contiene el núcleo de DCM y una triarilfosfina como fracción de reconocimiento (296).
- Tioles. Entre ellos, el glutatión, cobra un especial interés por su gran abundancia como tiol intracelular, donde juega un papel defensivo fundamental. Por consiguiente, alteraciones en sus niveles se han correlacionado con multitud de patologías de diversa etiología. Por ello, su detección ha sido el objeto perseguido en muchas investigaciones. Li et al. (2014) han trabajado en el diseño de un sensor, mediante el ensamblaje al grupo fenólico del DCM-OH de un grupo 2,4-dinitrobenceno-1-sulfonido, sensible a este tiol (297).
- Enzimas. Conjugando el fluoróforo DCM con N,N-dimetilanilina a través de un enlace azo, se ha sintetizado el sensor “off-on” AZO-DCM que, en presencia de NADPH, muestra una alta selectividad hacia la citocromo P450 reductasa frente a otros biorreductores en condiciones de hipoxia. Con esta molécula, se puede distinguir las células en hipoxia de las que se encuentran en normoxia de forma rápida y sensible (298). Por otro lado, mediante el ensamblaje de trifenilfosfato en el DCM-OH, se ha conseguido desarrollar una sonda, llamada DCPOP, sensible a lisozima en muestras de orina, cuya concentración podría utilizarse para el diagnóstico de la sarcoidosis y varias enfermedades tubulares renales (299).
Por todo ello, la sonda NIR basada en DCM y activable por enzimas puede ser una potente herramienta para investigar las importantes funciones de éstas en sistemas biológicos.

MATERIALES & MÉTODOS

III. Materiales y Métodos

III.1. Instrumentación

III.1.1. Balanza

Se ha utilizado una Balanza Analítica Electrónica Sartorius modelo A-120 S, provista de un sistema de calibración interno y externo. Presenta una desviación estándar de ± 0.1 mg y tiempo de respuesta de 3 s.

III.1.2. pH-metro

Las medidas de pH han sido realizadas con un pH-metro Crison pH-Meter BASIC 20+ que permite los intervalos de medidas siguientes: pH entre -2 y 16, mV: ± 2000 , temperatura entre -20 y -150 °C. Para su calibración se han utilizado tampones standard: 4.01, 7 y 9.21, con un error de medida (± 1 dígito): ≥ 0.01 pH, ≥ 1 mV, ≥ 0.2 °C.

III.1.3. Sonificador

Se ha empleado un baño de ultrasonidos Ultrasons Selecta P modelo 513 con un generador de 150 W que produce ondas de sonido de 40 KHz. Dispone de un temporizador sincronizado con lámpara de señalización.

III.1.4. Agitador magnético

Se ha utilizado un agitador magnético Bungen modelo MC8 para algunos experimentos.

III.1.5. Agitador

Para la realización de esta Tesis Doctoral se ha utilizado un termoagitador ELMI SkyLine DTS-2 para 2 microplacas (ELME 10023). Las características del agitador son una velocidad de rotación entre 100-1300 rpm,

una amplitud de rotación de 1.5 mm y un rango de control de temperatura desde ambiente +3 °C hasta 60 °C.

III.1.6. Espectrofotómetro de absorción UV-Vis

Los espectros de absorción se registraron principalmente en un espectrofotómetro Lambda 650 UV-Vis (Perkin Elmer, Waltham, MA, EE.UU.) con una resolución de 0.17 nm. Es un espectrofotómetro de doble haz con dos compartimentos, uno para la propia muestra y otro para la referencia, que permite corregir la interferencia del disolvente, ambos de 1 cm de paso de luz. Se trata de un equipo compatible con las medidas de transmisión y reflectancia. Permite realizar barridos desde 190-900 nm de longitud de onda. Cuenta con un sistema de control de temperatura Peltier (ETC-273T). Las fuentes de excitación continua consisten en una lámpara de deuterio para la región ultravioleta y otra de tungsteno halógena para el visible que está prealineada y preenfocada para una rápida sustitución y un máximo tiempo de funcionamiento. El cambio de lámpara se produce a 319.2 nm. Posee un sistema doble de monocromadores de rejilla halográficos, y una rendija que asegura el ajuste de la altura del haz de luz para que pase justo por el centro de la cubeta. Además, está equipado con un despolarizador de haz que corrige el sesgo instrumental y un fragmentador dinámico del mismo, también conocido como *chopper*. Por último, el detector del instrumento es un tubo fotomultiplicador R955. Todo el sistema se controla por un ordenador que cuenta con un software específico.

III.1.7. Nanodrop

Algunos espectros de absorción, dependiendo del tipo de muestra, se recogieron en un espectrofotómetro Thermo Scientific™ NanoDrop 2000 (Waltham, Massachusetts, Estados Unidos). Se trata de un espectrofotómetro UV-Vis compacto de espectro completo utilizado para cuantificar y evaluar la pureza de ADN, ARN, proteínas, etc. Es el único espectrofotómetro de microvolúmenes con tecnología patentada de retención de muestras que mide volúmenes que oscilan entre 0.5 y 2 μL , permitiendo pipetear una muestra directamente sobre una superficie de medida óptica o pedestal, sin necesidad de diluir la muestra, lo que permite su recuperación para otro tipo de medida. Posee un tiempo de respuesta inferior a 5 s. El rango espectral comprende

desde 190 hasta 840 nm. Cuenta con métodos preconfigurados para A260, A280, proteínas y ADN etiquetados, etc., así como de un software sencillo que incluye métodos personalizados y capacidades de exportación de datos.



Fig. III.1. Fotografía del NanoDrop 2000.

III.1.8. Espectrofotómetro de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR)

Los espectros de infrarrojo fueron adquiridos mediante el empleo de un espectrofotómetro JASCO FT/IR-4600 (Jasco, Tokio, Japón). Este instrumento cuenta con ventanas no higroscópicas de KRS-5 (Bromuro de Talio-Ioduro) que impiden el daño por humedad, un detector DLaTGS (sulfato de triglicina dopado con L-alanina deuterada) estabilizado por sistema peltier, un láser HeNe (helio-neón) de alta estabilidad de emisión y una fuente de cerámica de alto rendimiento para una máxima sensibilidad. La alineación óptica permanente del interferómetro está garantizada por la óptica con espejos “Corner Cube Mirrors” y el sistema de autoalineamiento para maximizar la energía que alcanza el detector. Posee una resolución de 0.7 cm^{-1} , una señal/ruido $> 25000:1$, y un rango de medida de 7800 a 350 cm^{-1} . Cuenta además con un dispositivo de ATR (Reflectancia Total Atenuada).

III.1.9. Espectrofluorímetro de estado estacionario

Los espectros de emisión de fluorescencia en estado estacionario fueron recogidos mediante un espectrofluorímetro Jasco FP-8300 (Jasco, Japón). El sistema óptico está constituido por dos monocromadores de red cóncava de difracción para excitación y emisión. Dicho equipo cuenta, además, con una lámpara de arco de xenón de 150 W como fuente de excitación y con tubo fotomultiplicador de silicio como detector. Posee un rango de medida que va desde 200 a 900 nm. La resolución es de 1 nm, la precisión de longitud de onda ± 1.5 nm, y la repetibilidad ± 1 nm. El ancho de banda de las rendijas de excitación y emisión se puede seleccionar entre 1, 2.5, 5, 10 y 20 nm. A través de su software *Spectra Manager* también se puede controlar la velocidad de barrido de longitud de onda entre 20 y 20000 nm/min, en función de la respuesta y la sensibilidad seleccionadas. Es también posible seleccionar filtros para las diferentes longitudes de onda o el atenuador de la transmitancia. Tiene un soporte de celdas rectangular de 10 mm como compartimento de muestras, el cual se puede purgar por nitrógeno, siendo también termostatizable mediante un baño externo.



Fig. III.2. Fotografía del espectrofluorímetro de estado estacionario JASCO FP-8300.

III.1.10. Fluorímetro con resolución temporal

Las mediciones de fluorescencia resueltas en el tiempo se llevaron a cabo en un fluorímetro con resolución temporal FluoTime 200 (PicoQuant GmbH) basado en la metodología de recuento de fotones individuales relacionados con el tiempo (TCSPC), y equipado con varias fuentes láser para

la excitación. A continuación, se describe la excitación láser y el sistema TCSPC.

- *Fuentes de excitación láser*

Las fuentes de excitación empleadas en la recogida de los decaimientos de luminiscencia consisten en láseres de diodos de picosegundos pulsados de alta potencia, bien de 375 nm (LDH-375), 405 nm (EPL-405), 440 nm (LDH-440), 470 nm (LDH-P-470), 485 nm (LDH-P-C-485), 530 (LDH-530), o 635 nm (LDH-P-635). Excepto el de 405 nm (Edinburgh Instruments), todos ellos son de PicoQuant GmbH. La frecuencia de pulso de la fuente de excitación se controla mediante un sistema PDL 800 (PicoQuant GmbH), que cuenta con un oscilador de cristal que genera fluctuaciones inferiores a la frecuencia madre, lo que permite dividir la frecuencia de los pulsos entre factores binarios (1, 2, 4, 8 o 16) para generar un rango de frecuencias de pulso de 40, 20, 10, 5 y 2.5 MHz. En esta Tesis, se ha utilizado una tasa de repetición de 40 MHz y un ancho de pulso entre 20 y 120 ps. Para tener estabilidad en las medidas, la temperatura de la sala está controlada por un termostato que mantiene estable la temperatura de la fuente láser.

- *Sistema TCSPC*

Mediante la técnica TCSPC se adquieren las curvas de decaimiento de fluorescencia, construyendo un histograma del tiempo de llegada de fotones individuales al detector a lo largo de muchos ciclos de excitación/emisión. En el histograma se registra el tiempo transcurrido entre la generación del pulso láser de excitación y la llegada al detector de los fotones emitidos correspondientes a esa excitación. Esta técnica se ha llevado a cabo en el mencionado espectrofotómetro de fluorescencia resuelta en el tiempo Fluotime 200, con una geometría en L, y controlado por un ordenador equipado con la tarjeta de adquisición de datos TCSPC TimeHarp 200 (PicoQuant GmbH).

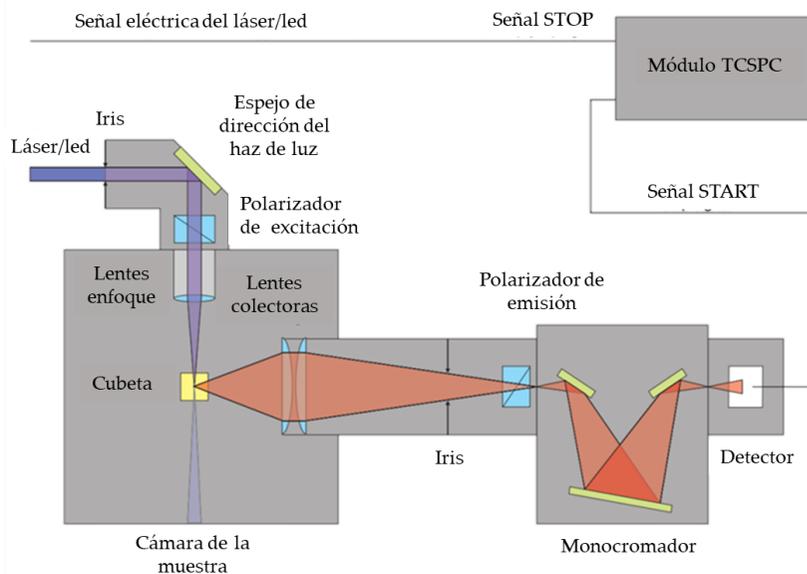


Fig. III.3. Esquema del fluorímetro con resolución temporal FluoTime 200 (PicoQuant).

Como se muestra en la figura III.3, la radiación de excitación pulsada del láser se dirige a la cámara de la muestra a través de una fibra óptica. Allí, mediante una lente, el haz se enfoca hacia la muestra. La emisión se recoge y se colima a través de lentes en ángulo recto con respecto a la excitación. La luz emitida pasa a través de un polarizador laminar colocado en un ángulo de 54.7° con respecto a la dirección de polarización de la luz excitadora, con el fin de eliminar los efectos de la difusión rotacional de los fluoróforos en los decaimientos de fluorescencia. Posteriormente, la luz emitida se enfoca en un monocromador Science Tech 9030, cuyas especificaciones técnicas son: $f/3.5$, rejilla de difracción holográfica cóncava de 1200 líneas/mm, 8 nm de dispersión angular y rango espectral de 350 a 800 nm. Tras pasar por dos rendijas de anchura controlable, la detección de los fotones emitidos se realiza en un fotomultiplicador de placa de microcanal, cuya señal sirve de pulso de START. El pulso de STOP procede del oscilador PDL 800 B. Ambos pulsos están conectados a un ordenador equipado con la tarjeta TimeHarp 200 y al programa informático de control que dispone de los dos módulos de discriminación de fracción constante (por sus siglas en inglés, CDF): el convertidor tiempo-amplitud (por sus siglas en inglés, TAC) y el

convertidor analógico-digital (por sus siglas en inglés, ADC). Los histogramas de los decaimientos de fluorescencia se recogen a lo largo de 1036 canales.

III.1.11. Incubador de CO₂

Las células y tejidos se mantuvieron en un incubador de CO₂ Panasonic IncuSafe MCO-18AC-PE en condiciones de 5 % de CO₂ y 37 °C hasta inmediatamente antes de las medidas, con el fin de mantenerlas el mayor tiempo posible en sus condiciones óptimas de vida.

III.1.12. Campana de flujo laminar vertical

Las células y tejidos fueron lavados y tratados en una campana de flujo laminar vertical Telstar PV-100 para su preparación y posterior uso en los ensayos de microscopía.

III.1.13. Microscopios

III.1.13.1. MicroTime 200

Para realizar las medidas de imagen de intensidad de fluorescencia e imágenes de tiempos de vida de fluorescencia (FLIM) se ha utilizado un microscopio confocal invertido con excitación láser pulsada, MicroTime 200 (PicoQuant GmbH, Berlín, Alemania). El instrumento no sólo es capaz de realizar imágenes FLIM, sino también espectroscopia de fluorescencia de una sola molécula, y técnicas relacionadas, como la espectroscopia de correlación de fluorescencia (FCS). El MicroTime 200 consta de cuatro partes principales:

- Microscopio Olympus IX71 (Olympus, Tokio, Japón). Se trata de un microscopio óptico invertido que incluye un sistema óptico con corrección infinita (por sus siglas en inglés, UIS), que permite no reducir el campo de visión cuando se añaden accesorios intermedios. Está equipado con un sistema de lentes ópticas WHN10x y los siguientes objetivos Plan-N-x40, Plan-N-x60, y de inmersión U-Plan-S-Apo-x100 (1.4 de apertura numérica, NA), siendo este último

utilizado con aceite de inmersión tipo DF, un tipo de aceite de muy baja fluorescencia útil para microscopía de fluorescencia con resolución muy alta, y con un índice de refracción de 1.515. Las características generales del microscopio se pueden observar en la figura III.4. Para obtener una imagen de una región, la muestra se escanea con un dispositivo piezoeléctrico x-y (Physik Instrumente).

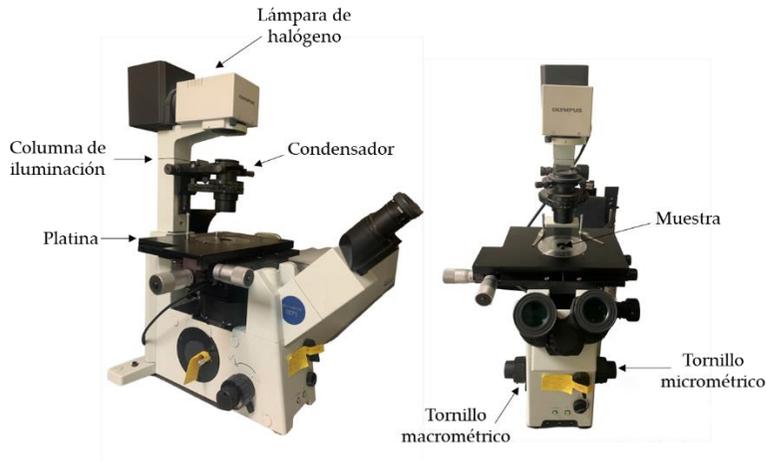


Fig. III. 4. Fotografía de las partes del microscopio invertido Olympus IX71.

- Sistema de excitación. Consiste en los mismos láseres pulsados de diodos descritos anteriormente para el instrumento Fluotime 200. Así pues, se conectan a través de una fibra al FluoTime 200 o al MicroTime 200 dependiendo de las medidas experimentales que se quiera realizar. Los láseres se manejan con un controlador "Sepia II" (PicoQuant GmbH), que permite el uso simultáneo de dos cabezales láser diferentes. El driver 'Sepia II' también permite generar frecuencias de pulsos de 40, 20, 10, 5 y 2.5 MHz. Además, se puede operar con un láser multifotón Chameleon Discovery NX (Coherent Laser Group, Santa Clara, CA, EE.UU.).
- Unidad óptica principal (por sus siglas en inglés, MOU). A su vez, comprende las siguientes subunidades:

- El segmento de excitación. Es la parte por donde entra en la MOU el haz de luz láser que proviene del sistema de excitación. Se incorpora por una fibra óptica mediante un conector FC/APC y tras reflejarse en un espejo pasa por el *shutter* de excitación (que puede ser controlado por *software* o manualmente). Una vez que el haz pasa por el *shutter*, el 10-20 % de la intensidad se dirige a un fotodiodo que mide la potencia de excitación.
- La unidad confocal básica. Tras pasar por el segmento de excitación, el haz de luz se refleja en el espejo dicróico principal con una geometría de 45 ° que redirige la luz al objetivo del microscopio Olympus IX71 que enfoca la luz en la muestra.
- La emisión de fluorescencia, así como la luz de excitación reflejada, es recogida de nuevo por el objetivo del microscopio y redirigida otra vez al espejo dicróico, que está optimizado para dejar pasar principalmente la radiación fluorescente. La luz transmitida en el dicróico pasa por una rueda de filtros, en la que se puede utilizar un filtro de corte específico para eliminar los restos de la luz de excitación que llegan a la vía de detección. A continuación, la luz se dirige hacia una lente acromática que la enfoca en un *pinhole* de apertura de 75 µm de diámetro. La distancia entre la lente y el *pinhole* es fácilmente controlable para optimizar el plano confocal. Tras el *pinhole*, el haz es colimado por una segunda lente y guiado hacia los detectores de fotones, que se describirán más adelante.
- Diagnóstico del plano focal. Parte de la luz de excitación reflejada y redirigida hacia el dicróico es, a su vez, reflejada hacia el segmento de diagnóstico del plano focal. El diseño óptico del MicroTime 200 permite un análisis continuo de la luz de excitación, lo que hace posible controlar la posición y la calidad del plano focal y el volumen excitable en la muestra. Hay una cámara CCD (GANZ ZC-F10C2, con 500x 582 píxeles (1/3")) que permite el diagnóstico y monitoriza permanentemente la imagen vista por el objetivo. Las

imágenes obtenidas se visualizan en el ordenador. La luz que llega a la cámara se puede regular mediante filtros de diferente densidad óptica.

- Canales de detección: El haz colimado de la emisión fluorescente llega a los detectores a través de la unidad confocal básica. Se dispone de hasta dos canales de detección diferentes, y la luz emitida puede dirigirse a uno solo de los detectores, o a los dos utilizando un divisor de haz 50/50 o espejos dicroicos de geometría específica de 45 °. Cada canal de detección tiene un obturador mecánico y una lente para enfocar la radiación incidente en la sección sensible de los detectores. Los detectores utilizados son diodos de avalancha de un solo fotón (SPAD), SPCM-AQR-14 (PerkinElmer), con un rango de longitud de onda de detección de 400 a 1100 nm, y una alta eficacia de detección (más del 70 %) a 630 nm. Es posible utilizar un filtro de paso de banda delante de los detectores para seleccionar las bandas de emisión en cada canal.

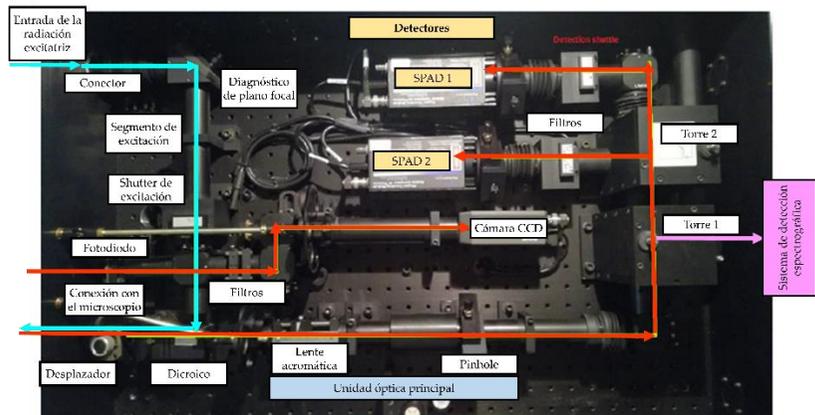


Fig. III. 5. Esquema de la unidad óptica principal.

- Adquisición de datos y etiquetado electrónico de fotones: la información del tiempo de llegada de los fotones resuelta en el tiempo se recoge mediante dos tarjetas de recogida de datos TimeHarp 200 (una para cada canal de detección). Se trata de

un sistema TCSPC que puede funcionar de varias maneras, la más relevante para nuestras aplicaciones es la metodología Time-Tagged-Time-Resolved (TTTR). El método TTTR permite registrar el tiempo de llegada de cada fotón individual a los detectores. Por un lado, se determina el tiempo de START-STOP de cada fotón con resolución de picosegundos, más concretamente es el tiempo transcurrido entre el pulso de excitación (START) y la llegada del fotón (señal de STOP), tal y como se hace en el tiempo de fluorescencia resuelto por el modo TCSPC. Por otro lado, la llegada de cada fotón es registrada por un reloj independiente que mide el tiempo total de cada experimento y etiqueta cada fotón a su hora global de llegada al detector, respecto al tiempo global de medida. Esto permite identificar los fotones que provienen de la misma molécula y también discriminar las fluctuaciones de fluorescencia que son una característica de los experimentos de moléculas individuales.

A menudo es deseable sincronizar las mediciones del TCSPC con otra información o con otros registros. Para realizar, por ejemplo, imágenes de los tiempos de vida de la fluorescencia, también es necesario registrar la localización espacial de los fotones. Para conseguirlo, se necesita un mecanismo que asigne la información de sincronización externa a los datos TCSPC recogidos de forma independiente. Para resolver este problema, el conjunto de datos generado por el TimeHarp 200 puede contener marcadores para la información de sincronización derivada de las imágenes capturadas. La figura III.6. muestra cómo se registra la señal del marcador externo en la secuencia de datos.

2700 mW (a 800 nm). En cambio, para la salida B (fija) la longitud de onda es 1040 nm, la duración de pulso es de 140 fs, la tasa de repetición es de 80 ± 0.5 MHz y la potencia de salida > 2800 mW (a 1040 nm).



Figura III.7. Sistema Discovery Laser. Fotografía del cabezal láser (no se muestra la MRU, la fuente de alimentación ni el refrigerador).

III.1.13.2. Leica TCS-SP5 II

El otro sistema utilizado para la adquisición de imágenes con excitación por dos fotones consistió en un Microscopio Confocal Espectral de Alta Velocidad y Multifotón Leica TCS-SP5 II (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania). Se trata de un microscopio invertido Leica DMI6000B con platina motorizada y sistema de incubación con control de la temperatura y del CO₂. Cuenta con los siguientes láseres: láser Diodo azul 405 nm, láser de Argón (458, 476, 488, 496, 514 nm), láser DPSS 561 nm, láser de Helio-Neón 633 nm, y láser Mai Tai HP Deep See (690-1040 nm) pulsátil (100 fs). Los objetivos disponibles son: PL APO 10x/0.40 CS; PL APO 40x/1.3 CS aceite; PL APO lambda blue 63x/1.4 aceite; PL APO 63x/1.2 CS agua; IR APO L 25x/0.95 agua.

III.1.13.3. Abberior Expert Line

El Abberior Expert Line (Abberior GmbH, Göttingen, Alemania) es un microscopio de barrido con excitación láser pulsada útil no sólo para imágenes de fluorescencia con resolución limitada por difracción (imágenes confocales), sino también para imágenes de superresolución de fluorescencia

basadas en la técnica de depleción estimulada de la emisión (por sus siglas en inglés, STED), el cual permite además el uso de otras técnicas de microscopía en tiempo resuelto, entre las que cabe destacar, microscopía de imagen de tiempo de vida de fotoluminiscencia (por sus siglas en inglés, PLIM). El Abberior Expert Line consta de las siguientes partes principales:

- Microscopio Olympus IX83 (Olympus, Tokio, Japón). Se trata de un microscopio confocal invertido con óptica libre de aberraciones cromáticas y objetivo apocromático de inmersión en aceite, U-Plan-S-Apo-100x, y de 1.4 de NA.
- Sistema de excitación. Consiste en una serie de láseres de diodos pulsados que permiten las excitaciones duales simultáneas o alternadas. El conjunto de láseres cubre un amplio rango de longitudes de onda que abarca desde el ultravioleta cercano (375 nm) y todo el rango espectral del visible. Así, cuenta con láseres de 375, 450, 485, 561 y 640 nm. El módulo de STED consta de un láser pulsado de depleción de ultra alta potencia de 775 nm.
- *Pinhole*, de tipo mecánico controlado por software.
- Sistema de filtros de detección. Cuenta con tres filtros de corte o dicróicos (LP) de 514, 560 y 633 nm, y cuatro filtros de banda de 509/22, 545/25, 605/50 y 685/70 delante de los detectores para seleccionar las bandas de emisión en cada canal.
- Detectores. Incluye dos detectores de fotodiodos de avalancha APD1 (650-720) y APD2 (580-630) y dos tubos fotomultiplicadores híbridos HPMT1 (533-558) y HPMT2 (498-520).



Figura III.8. Fotografía del microscopio Abberior Expert Line.

En este microscopio, la señal de fluorescencia se separa de la luz incidente y es guiada hasta la unidad detectora, donde atraviesa un *pinhole*. Tras abandonar este orificio, la fluorescencia se separa en los distintos canales de detección mediante filtros de emisión fijos (ver figura III.9.)

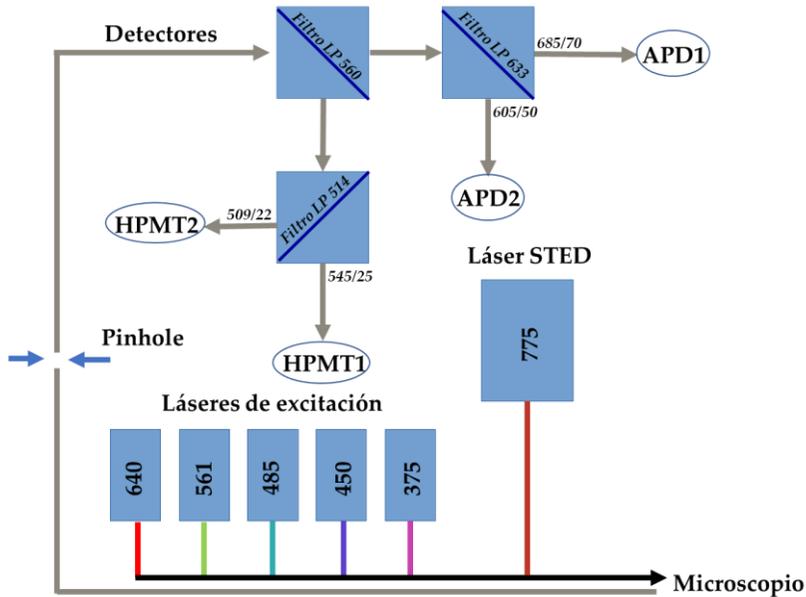


Figura III.9. Esquema del montaje del Abberior Expert Line.

III.1.13.4. Estereomicroscopio Nikon SMZ18

Se trata de una lupa con luz transmitida (base de iluminación diascópica LED P-DSL32) y módulo de epifluorescencia (HG Precentered Fiber illuminator Intensilight C-HGFIE HG/C-HGFI HG (130W)). Cuenta con diferentes filtros (DAPI, GFP y RFP) y un zoom manual con ratio elevado 18:1. Permite la obtención de aumentos en continuo entre 7.5 y 135x con un objetivo 1x y oculares 10x. Dispone de cámara de color de alta sensibilidad DS-Ri2 sensor CMOS y permite una máxima resolución de 16.25 megapíxeles. Se controla por el software NIS-Elements de Nikon.

III.1.14. Espectrómetro de resonancia magnética nuclear

Los espectros de RMN de ^1H y ^{13}C se registraron en un espectrómetro de alta definición Bruker Avance (500 MHz) o Neo Varian Direct Drive (500 MHz).

III.1.15. Espectrómetro de masas

Los espectros de masas de alta resolución (HRMS) se registraron mediante EI en un Micromass GCT Agilent Technologies 6890N (Waters), mediante espectros de masas APCI realizados en un espectrómetro de masas Bruker MAXIS II o por espectrometría de masas ESI realizada en un espectrómetro de masas Waters Xevo G2-XS QTof.

III.2. Reactivos

Los reactivos usados para realizar la parte experimental de esta Tesis Doctoral fueron adquiridos de varias casas comerciales con grado de pureza analítica o bioquímica, y son los que se relacionan a continuación:

- 2-Propanol ($\geq 99.5\%$; Sigma-Aldrich)
- 1,4-Dioxano ($\geq 99.0\%$; Sigma-Aldrich)
- 2-hidroxiacetofenona (Sigma-Aldrich)
- 4-Acetamidabenzaldehído (Sigma-Aldrich)
- 4-Hidroxibencilamina (Sigma-Aldrich)
- Acetato de etilo ($\geq 99.5\%$; Sigma-Aldrich)
- Acetato de etilo anhidro (99.8 %; Sigma-Aldrich)
- Acetilcolinesterasa humana/AChE (recombinante, expresada en células HEK 293, polvo liofilizado, ≥ 1.000 ud/mg proteína; Sigma-Aldrich)
- Acetona ($\geq 99.5\%$; Sigma-Aldrich)
- Acetonitrilo ($\geq 99.5\%$; Sigma-Aldrich)
- Ácido acético glacial (químicamente puro, Panreac)
- Ácido clorhídrico (37 %; Sigma-Aldrich)
- Ácido fosfomolibdico (Sigma-Aldrich)
- Ácido perclórico (disolución acuosa 70 %; Sigma-Aldrich)
- Ácido sulfúrico (98 %; Sigma-Aldrich)
- Ácido trifluoroacético/TFA (99 %; Sigma-Aldrich)

- Agua mili-Q ultrapura (18M Ω c-cm)
- Anhídrido acético (≥ 99.9 %; Sigma-Aldrich)
- Boc-Gly-Pro-OH (Sigma-Aldrich)
- Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio)/MTT (Sigma-Aldrich)
- Carbonato sódico anhidro (Sigma-Aldrich)
- Ciclohexano (≥ 99 %; Sigma-Aldrich)
- Clorhidrato de bestatina (98 %; Thermo Scientific Chemicals)
- Clorhidrato de L-alanina 4-nitroanilida (98 %; Thermo Scientific Chemicals)
- Clorobenceno (≥ 99.5 %; Sigma-Aldrich)
- Cloroformo (99.8 %; Sigma-Aldrich)
- Cloroformo-*d* (Sigma-Aldrich)
- Diclorometano (purísimo p.a; Sigma-Aldrich)
- Diclorometano-*d*₂ (99.9 % isotópico; Thermo Scientific Chemicals)
- Dihidrógeno fosfato monosódico (purísimo p.a; Fluka)
- Dimetilsulfóxido (99.9 %; Sigma-Aldrich)
- Dimetilsulfóxido-*d*₆ (Sigma-Aldrich)
- Dipeptidil Peptidasa IV humana/DPP IV (recombinante, expresada en células *Sf9*; Sigma-Aldrich)
- Dipeptidil Peptidasa VIII humana/DPP VIII (recombinante, expresada en células *Sf9*; Sigma-Aldrich)
- Etanol (purísimo; Sigma-Aldrich)
- Fluoresceína (Sigma-Aldrich)
- Fosfato de sitagliptina (Sigma-Aldrich)
- Hexafluorofosfato O-(7-aza-1H-benzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio/HATU (97 %; Thermo Scientific Chemicals)
- Hexano (≥ 95 %; Sigma-Aldrich)
- Hidrógeno fosfato disódico (purísimo p.a; Fluka)
- Hidróxido sódico (lentejas; Sigma-Aldrich)
- Leucina aminopeptidasa porcina/LAP (tipo VI-S, polvo liofilizado, (≥ 12 ud/mg proteína; Sigma-Aldrich)
- Lipasa humana pancreática / PNLIP (Sigma-Aldrich)
- Malononitrilo (≥ 99 %; Sigma-Aldrich)
- Metanol anhidro (99.8 %; Sigma-Aldrich)
- N,N-Diisopropiletilamina / DIPEA (Sigma-Aldrich)

- *N,N*-Dimetilformamida anhidra (99.8 %; Sigma-Aldrich)
- *N*-(terc-butoxicarbonil)-*L*-alanina/*N*-Boc-Alanina (≥ 99 %; Sigma-Aldrich)
- Piperidina (Sigma-Aldrich)
- Proteína de Activación de Fibroblastos α /FAP (recombinante, expresada en células Sf21, ≥ 95 %; Sigma-Aldrich)
- Quercetina (Sigma-Aldrich)
- Rodamina 6G (Sigma-Aldrich)
- Sodio (en queroseno, trozos grandes, ≥ 99.8 %, base sódica; Sigma-Aldrich)
- Sulfato sódico anhidro (99 %; Thermo Scientific Chemicals)
- Tampón fosfato salino / PBS (10x concentrado; Sigma-Aldrich)
- Tetrahidrofurano (≥ 99.9 %; Sigma-Aldrich)
- Trifosgeno (98 %; Thermo Scientific Chemicals)
- Tisosinasa de champiñón/TYR (polvo liofilizado, ≥ 1000 ud/mg solido; Sigma-Aldrich)
- Tolueno (≥ 99.5 %; Sigma-Aldrich)
- Trietilamina (≥ 99.5 %; Sigma-Aldrich)

III.3. Metodología

III.3.1. Síntesis: aspectos generales

Todos los reactivos y disolventes comercialmente accesibles empleados en las reacciones, extracciones y cromatografías se utilizaron sin purificación adicional. Las reacciones se realizaron en material de vidrio apto para síntesis orgánica. El análisis de cromatografía en capa fina (por sus siglas en inglés, TLC) se realizó con placas de aluminio recubiertas de gel de sílice 60 (230-240 μm) con un indicador F254. Las manchas se visualizaron con luz UV y/o mediante inmersión en ácido fosfomolibdico y posterior secado. La purificación de los productos se realizó mediante cromatografía en columna flash usando las mezclas oportunas de disolventes.

III.3.2. Preparación de disoluciones

Los compuestos DCM-NH₂, DCM-NH-Ala, DCM-NH-Pro-Gly y DCM-HBU se disolvieron en dimetilsulfóxido (DMSO) deuterado para obtener disoluciones madre de 0.5 mM y verificar la estructura química y pureza mediante ¹H-RMN.

Todos los experimentos en disolución se llevaron a cabo en una mezcla de tampón PBS/DMSO (7:3, v/v), a menos que se indique lo contrario. Para ello, en función de la concentración final deseada de la molécula en cuestión, se añadió un volumen concreto de la disolución madre, completándose con DMSO hasta un volumen de 450 µL, y añadiéndose posteriormente 1050 µL de PBS. El volumen final resultante fue de 1500 µL.

Además, en el caso de los experimentos de cinética enzimática en disolución dado que, tanto las enzimas como los inhibidores utilizados están disueltos en tampones acuosos, el volumen utilizado de éstos para obtener una concentración concreta se tuvo en cuenta para respetar en todo momento la proporción de PBS/DMSO (7/3) y el volumen final de 1500 µL.

Para el estudio solvatocrómico del DCM-NH₂ se añadieron 5 µL del compuesto a 1500 µL de 12 disolventes diferentes.

Por otro lado, el stock empleado de tampón fosfato salino (PBS) para la preparación de las muestras se realizó a partir de una disolución comercial concentrada 10x. Para ello, se diluyó hasta una concentración de trabajo de 1x, utilizando agua Mili-Q a pH 7.5 y a temperatura ambiente, siendo posteriormente filtrada mediante filtros Whatman AnotopTM de 0.2 µm.

En los experimentos de influencia de pH, para el ajuste del mismo se prepararon tampones de fosfato monobásico monohidratado, NaH₂PO₄·H₂O, y dibásico heptahidratado, Na₂HPO₄·7H₂O, en una concentración final de 0.5 M. En ocasiones, para dicho ajuste, se empleó además NaOH 0.1 M y HClO₄ 0.1 M.

III.3.3. Clonación y generación de vectores para la expresión del pepN bacteriano. Producción y purificación del mismo

La expresión y purificación de la enzima pepN empleada en esa Tesis fue llevada a cabo por el grupo de investigación BIO-212 de la Universidad de Granada. La secuencia codificante correspondiente al gen pepN de *E. coli* (adhesión del banco de genes #M15676.1) (300) se amplificó por la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando la *Pfu* polimerasa a partir de ADN genómico de la cepa K12 de *E. coli* (Gene Jet Whole Blood Genomic DNA Purification Mini (Thermo Fisher, Massachusetts, EE.UU.)) utilizando los cebadores pepN-f 5'-ggatccatgactcaaccacaagcc-3' y pepN-r 5'-gtcgacagccagtgtcttagttatcttc-3', a los que se han añadido las secuencias de los sitios de restricción *Bam*HI y *Sal*I, respectivamente. Estos cebadores corresponden a las secuencias codificantes 5' y 3' del gen y para la secuencia 3', y se han eliminado los nucleótidos que codifican la secuencia de parada. El fragmento amplificado de 2622-pb se clonó en el vector pJET1.2 (Thermo Fisher), se digirió con *Bam*HI y *Sal*I y se subclonó dentro del marco del vector de expresión pMAL-TEV-His (301), lo que dio lugar al plásmido *pMAL-TEV-pepN-His*. La secuencia del plásmido se confirmó mediante secuenciación automática.

Para la expresión de la proteína recombinante, se transformaron células competentes XL1-Blue con el plásmido *pMAL-TEV-pepN-His* y se cultivaron en medio LB suplementado con antibióticos a 37 °C hasta que alcanzaron una densidad óptica (D.O.) a 600 nm = 0.5; a continuación, el cultivo se enfrió a 32 °C y se añadió isopropil β-d-1-tiogalactopiranosido (IPTG) para obtener una concentración final de 1 mM. El crecimiento se produjo durante un periodo adicional de 12 h a 32 °C.

Tras la inducción, las células se concentraron por centrifugación y los pellets celulares correspondientes a 500 mL de cultivo bacteriano se resuspendieron en 25 mL de un tampón elaborado con Tris HCl 20 mM, NaCl 200 mM y EDTA 1 mM, pH 7.5, y se sonicaron. La suspensión se centrifugó durante 30 minutos a 12000 G para eliminar los restos celulares, y el sobrenadante se incubó durante 24 h a 10 °C con 0.75 mg de proteasa S219V-TEV-Arg8 purificada (302) para procesar la proteína de fusión MBP-TEV-pepN-His.

Se equilibró una columna HisTrap HP de 1 mL (GE Healthcare Life Sciences, Chicago, IL, EE.UU.) en el mismo tampón, y el sobrenadante digerido se cargó en la columna. Tras el lavado, las proteínas se eluyeron utilizando el tampón anterior complementado con 200 mM de imidazol. Las muestras eluidas se agruparon y se dializaron ampliamente con tampón PBS. La concentración de proteína se midió por el método del ácido bicinonínico, ensayo colorimétrico donde la absorbancia es proporcional a la cantidad de proteína presente en la muestra.

III.3.4. Preparación de las muestras de bacterias para microscopía

Las muestras de bacterias de la cepa *E. coli* fueron preparadas y suministradas por el grupo de investigación BIO-212. Dada la gran movilidad de las mismas, para los experimentos en microscopía de superresolución se inmovilizaron colocando un gel de agarosa de bajo punto de fusión que contenía el colorante DCM-NH₂ (5 μM) sobre una alícuota de cultivo bacteriano depositada en un cubreobjetos. En el estudio del seguimiento de la actividad enzimática en los diferentes clones de bacterias, el gel de agarosa, en este caso, contenía el sensor DCM-NH-Ala (5 μM) como sustrato de la enzima pepN. Para el ensayo de inhibición enzimática, en una alícuota del cultivo bacteriano se añadió el inhibidor bestatina (0.5 mM), y sobre eso se depositó el gel con el sustrato (10 μM). Así pues, durante el tiempo que tarda el sustrato en entrar en contacto con las bacterias, el inhibidor ya ha ejercido su acción. En cualquier caso, la estrategia del uso del gel de agarosa facilitó la toma de imágenes de microscopía.

En los experimentos de microscopía con excitación bifotónica, y al objeto de simular la densidad óptica que presentan los medios biológicos, las bacterias fueron crecidas en un medio de cultivo de agar enriquecido con un 15 % de Caldo de Lisogenia (también conocido como LB). Durante la preparación de las muestras, a ese mismo gel se le añadió, además, el sustrato DCM-NH-Ala (5 μM). Dicho gel se depositó en un cubreobjetos para su medida, y se esperó 30 minutos antes de iniciar la toma de imágenes con el fin de que se liberase el producto DCM-NH₂.

Por último, para la preparación de los biofilms se utilizaron placas de cultivo celular de 12 pocillos, en cada uno de los cuales se depositó 100 μL de bacterias y 900 μL de medio de cultivo LB (dilución 1/10) y se insertó un cubre

cuadrado en un ángulo de 45° , quedando, por ende, una parte del cubre totalmente sumergida en el medio con las bacterias y otra totalmente fuera del mismo (ver figura III.10). En dicha disposición, se dejaron incubar el tiempo necesario, en función del día de actividad del biofilm que se quisiera analizar. Para el análisis, sobre dichos cubres en los que el biofilm se había formado, se depositó el sustrato DCM-NH-Ala ($5 \mu\text{M}$) y a continuación se colocó otro cubre redondo encima, para facilitar el reparto homogéneo del sensor sobre toda la muestra.

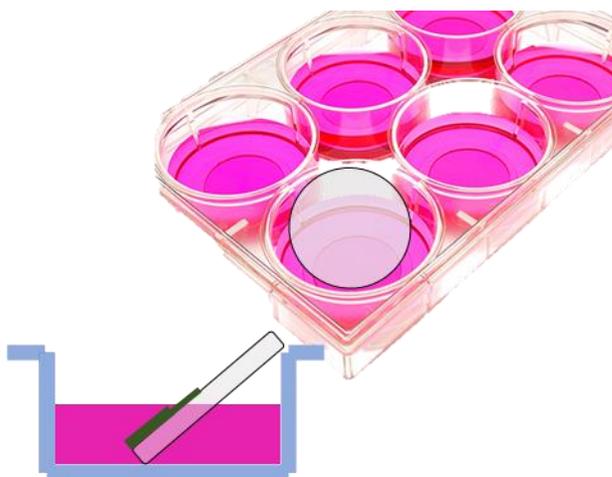


Figura III.10. Esquema de procedimiento para la formación del biofilm bacteriano.

III.3.5. Preparación de las muestras de suero sanguíneo

Las muestras de suero fueron proporcionadas por la Escuela de Análisis Clínicos de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Granada. El protocolo seguido para la obtención de las mismas consistió, en primer lugar, en la extracción de sangre venosa de los diferentes sujetos participantes en el estudio, mediante el empleo de tubos BD Vacutainer con activadores de la coagulación. Inmediatamente tras la extracción, dichos tubos se invirtieron suavemente y se esperó durante 10 min para favorecer la coagulación. Tras ello, se centrifugaron en una centrifuga modelo *Kubota 2010*, a 3500 r.p.m. durante 10 minutos, dando lugar a una fracción superior o sobrenadante, de aspecto claro y transparente y de color amarillento, correspondiente al suero

sanguíneo. Finalmente, se aspiró cuidadosamente con la ayuda de una pipeta Pasteur estéril y se alicuotó en distintos eppendorfs debidamente etiquetados e identificados, los cuales se almacenaron en un congelador a -20 °C.

Para el estudio de la cinética enzimática en suero por espectroscopía de fluorescencia en estado estacionario, las muestras de suero se diluyeron en un 15 % de DMSO, siendo éste el porcentaje más óptimo tras un estudio realizado, y se les adicionó el sensor DCM-NH-Pro-Gly (10 μ M). A excepción de un ensayo donde además se añadió enzima DPP IV (10 μ g mL⁻¹), los demás se realizaron sin enzima externa. Así pues, para un volumen total de 1500 μ L, se añadieron 195 μ L de DMSO, 30 μ L de DCM-NH-Pro-Gly (disuelto en DMSO) y 1275 μ L de suero, resultando en una mezcla, por tanto, de proporción 85/15 (v/v) suero/DMSO.

En el caso del seguimiento de la cinética enzimática con microscopía bifotónica, la muestra de suero se preparó respetando esa proporción indicada. De nuevo el sustrato fue adicionado, a la misma concentración que la indicada en el párrafo anterior, y en esta ocasión, si se adicionó la enzima DPP IV (10 μ g mL⁻¹). Previo a este análisis, y para lograr una visualización rápida de la fluorescencia roja en el suero propia del colorante por microscopía con excitación por dos fotones, a la muestra de suero se le añadió el DCM-NH₂ (10 μ M) en la proporción 85/15 (v/v) suero/DMSO.

III.3.6. Preparación de las muestras de células eucariotas para microscopía

Los experimentos con células eucariotas llevados a cabo se realizaron gracias a la colaboración con el grupo de investigación CTS-963 de la Universidad de Granada, quien suministró las líneas celulares Caco-2, Mel-1 y A-375.

La línea celular Caco-2 de cáncer de colon humano se obtuvo de la American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, EE.UU.), y se cultivó en un Medio Esencial Mínimo Eagle (EMEM; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.) complementado con un 10 % de suero fetal bovino inactivado por calor (FBS) (BioWhittaker; Lonza, Basilea, Suiza) y con un 1 % de una disolución de penicilina/estreptomicina (10000 U mL⁻¹ de penicilina G y 10 mg

mL⁻¹ de estreptomicina; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.), y la disolución se mantuvo a 37 °C en una atmósfera con un 5 % de CO₂.

La línea celular de melanoma humano derivada del paciente Mel-1 procede de una biopsia cutánea de melanoma metastásico maligno (estadio M1a) y fue proporcionada por el Biobanco del Sistema Sanitario Público de Andalucía (España); la línea celular de melanoma (A-375) se obtuvo de American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, EE.UU.). Ambas líneas celulares se cultivaron en medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.) complementado con un 10 % de FBS, 1 % de L-glutamina, 2.7 % de bicarbonato sódico, 1 % de disolución reguladora Hepes y con 1 % de una disolución de penicilina/estreptomicina (10000 U mL⁻¹ de penicilina G y 10 mg mL⁻¹ de estreptomicina; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.) y se mantuvieron a 37 °C en una atmósfera que contenía 5 % de CO₂.

Para llevar a cabo los experimentos con células, éstas se sembraron en placas de cultivo μ -Slide 8 Well IbiTreat, aptas para la medida por microscopía, a una densidad entre 5-11 \times 10⁴ células/pocillo, y se lavaron dos veces con PBS. En función de la concentración final deseada de la molécula en cuestión, se añadió un volumen concreto de la disolución madre en el pocillo, completándose hasta 300 μ L (volumen máximo del pocillo) con PBS. Además, en los experimentos de inhibición celular, el inhibidor específico de la enzima a estudiar (sitagliptina en el caso de la enzima DPP IV y quercetina en la enzima TYR) fue incubado en el pocillo a una concentración determinada, teniendo en cuenta ese volumen máximo permitido, y durante un tiempo concreto.

III.3.7. Preparación de los tejidos para microscopía

Los experimentos con tejidos eucariotas se realizaron en colaboración nuevamente con el grupo de investigación CTS-963 de la Universidad de Granada, quien suministró los tejidos derivados de las líneas celulares BxPC3 y A-375.

Para el establecimiento de tumores xenoinjertados subcutáneos se utilizó un ratón gamma NODSCID de ocho semanas de edad (NOD. Cg-Prkdcscid Il2rgtm1 Wjl/SzJ, NSG). Todos los procedimientos fueron aprobados por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de la

Universidad de Granada (código ético: 03/07/2017/086). Los ratones fueron mantenidos a 20-24 °C, 50 % de humedad relativa (HR), y un ciclo de luz:oscuridad de 10:14 h, con comida y agua proporcionadas ad libitum. Se utilizó una línea celular de cáncer de páncreas humano, BxPC3, y también de melanoma A-375 para generar tumores de xenoinjerto subcutáneos, mediante la inyección de 1×10^6 células en 0.05 mL de Matrigel y 0.05 mL de medio del Roswell Park Memorial Institute (RPMI) utilizando agujas de calibre 26. Cuando el tumor alcanzó los 300 mm³, el ratón fue eutanasiado por dislocación cervical. Para el análisis mediante microscopía con excitación multifotónica (TPM), se extirparon los tumores, se fijaron en paraformaldehído (PFA) al 4 %, se incrustaron en un compuesto de temperatura óptima de corte (OCT) y se seleccionaron utilizando un criótomo con un grosor de 10 mm para su posterior análisis.

En los experimentos de microscopía, los tejidos fueron incubados con la disolución del fluoróforo o de la sonda de interés a la concentración deseada. Para facilitar el reparto del compuesto en todo el tejido, sobre éste se dispuso un cubreobjetos redondo.

III.3.8. Preparación de los peces cebrá para microscopía

Para la realización de los experimentos *in vivo*, se ha contado con la colaboración del grupo de investigación BIO-028 de la Universidad de Granada, quien se ha encargado de la cría y suministro de los peces cebrá (*Danio rerio*).

El pez cebrá se mantuvo en peceras con un flujo de agua constante a 28 °C, siguiendo las recomendaciones de mantenimiento y cría del manual del pez cebrá (https://zfin.org/zf_info/zfbook/zfbk.html) y de acuerdo con la Directiva Europea 2010/63/UE que asegura el bienestar animal (ver figura III.11). Para la puesta de huevos, se instalaron machos y hembras de tipo salvaje en un tanque de cría. La puesta de huevos se produjo poco después del inicio de la luz en la mañana del día siguiente. Los embriones se criaron en el medio embrionario E3 (5 mM NaCl, 0,17 mM KCl, 0,33 mM CaCl₂, 0,33 mM MgSO₄, 10-5 % de azul de metileno) a 28 °C hasta el estadio deseado (1 día después de la fecundación (dpf), 3 dpf, 5 dpf, 7 dpf).



Figura III.11. Mantenimiento en peceras de los peces cebra.

Para el ensayo biológico del sensor DCM-NH-Pro-Gly, los embriones del estadio deseado se incubaron en medio E3 con $5\mu\text{M}$ de DCM-NH-Pro-Gly (1:100 de disolución madre a $500\mu\text{M}$ en DMSO) durante 1 h y luego se lavaron brevemente con medio E3 fresco. Para los experimentos de inhibición de la DPP IV, los embriones se incubaron con $250\mu\text{M}$ de sitagliptina (1:50 de la disolución madre 12.5mM) durante 3 h antes de añadir $5\mu\text{M}$ de DCM-NH-Pro-Gly incubado durante 2 h adicionales. Los controles se incubaron en medio E3 con DMSO (1:100) durante 2 h. A continuación, se tomaron imágenes de embriones vivos anestesiados (0.1 a 0.15mg mL^{-1} de MS222) en un microscopio estereoscópico fluorescente Nikon SMZ18 con una cámara digital DS-Ri2 en color (16.25 megapíxeles) utilizando ajustes de filtro para la proteína roja fluorescente (RFP). Los embriones se montaron en agarosa de bajo punto de fusión en medio E3 y posteriormente se obtuvieron imágenes en un microscopio confocal Zeiss LSM710 (Jena, Alemania) con un objetivo de 10x, registrando la luz de campo claro y la luz fluorescente roja e infrarroja (540 y 680 nm) emitida por el DCM-NH-Pro-Gly tras la excitación con un láser de 458 nm. Se combinaron de tres a cuatro planos-z (distancia-z $5\mu\text{m}$) por embrión de pez cebra utilizando *Fiji Is Just ImageJ*.

Respecto al ensayo del sensor DCM-HBU, los embriones del estadio deseado se incubaron en medio E3 con $10\mu\text{M}$ de DCM-HBU (1:290 de disolución madre a 2.9mM en DMSO) durante 3 h y luego se lavaron brevemente con medio E3 fresco. Para los experimentos de inhibición de la tirosinasa, los embriones se incubaron con $200\mu\text{M}$ de quercetina (1:50 de la disolución madre 10mM) durante 3 h antes de añadir $10\mu\text{M}$ de DCM-HBU incubado durante 3 h más. Los controles se incubaron en medio E3 con DMSO (1:50) durante 6 h. Posteriormente, se tomaron imágenes de embriones vivos

anestesiados (0.1 a 0.15 mg mL^{-1} MS222) en un microscopio estereoscópico fluorescente Nikon SMZ18 con una cámara digital DS-Ri2 en color (16.25 megapíxeles), utilizando ajustes de filtro para campo claro y proteína roja fluorescente (RFP). Las imágenes superpuestas y la cuantificación de la intensidad de la fluorescencia roja se realizaron con *Fiji Is Just Image*].



Figura III.12. Montaje de las muestras de embriones y larvas de pez cebra para su visualización por microscopía.

III.3.9. Procedimientos experimentales

III.3.9.1. Medidas de absorción

Las medidas de absorción se realizaron en el espectrofotómetro Lambda 650 UV-Vis, anteriormente descrito, y empleando cubetas de cuarzo 10×4 mm (Hellma Semi-micro-114F-QS). Como condiciones de medida, se registraron cada 1 nm, con una rendija de 1.5 nm, y con una velocidad de escaneo de 266.75 nm/min. El rango de longitudes de onda usualmente fue desde 320 a 800 nm. Previa a la medida de la muestra en cuestión, se hizo la medida del blanco con el disolvente a medir; en la mayoría de medidas la mezcla de disolventes PBS/DMSO (7:3; v/v).

III.3.9.2. Medidas de fluorescencia en estado estacionario

Las medidas de emisión se realizaron en el espectrofluorímetro Jasco FP-8300, anteriormente descrito, y utilizando cubetas de cuarzo 10×4 mm (Hellma Semi-micro-114F-QS). Como condiciones de medida, se hicieron cada 1 nm, con sensibilidad alta, y con una velocidad de escaneo de 1000 nm/min. Las rendijas de excitación y emisión variaron en función de las condiciones del experimento. El rango de longitudes de onda de emisión fue desde 500 a 800 nm.

Los espectros obtenidos están ligeramente distorsionados debido a que la eficiencia del monocromador de emisión y la respuesta del fotomultiplicador dependen de la longitud de onda, pudiendo originar diferencias entre espectros de emisión de una misma muestra medidos en distintos equipos. Por ello, se realizó una corrección espectral mediante fluoróforos de referencia que absorben y emiten en la misma región que la muestra. En esta Tesis Doctoral se empleó la Rodamina 6G como referencia.

III.3.9.3. Medidas de fluorescencia con resolución temporal

Los decaimientos del tiempo de vida de la fluorescencia se registraron por el método TCSPC utilizando el anteriormente descrito fluorímetro Fluotime 200 (PicoQuant GmbH, Berlín, Alemania). La fuente de excitación fue dos láseres de diodo pulsado, LDH-440 y LDH-485, para los compuestos DCM-HBU y DCM-NH₂, respectivamente; operando a una tasa de repetición de 40 MHz. Se recogieron los histogramas de decaimiento en 1320 canales, con un incremento de tiempo por canal de 34 ps. Se registraron los histogramas de las funciones de respuesta del instrumento (utilizando un dispersor LUDOX) y los decaimientos (tres curvas por muestra) hasta que alcanzaron 2×10^4 cuentas en el canal de pico. Los decaimientos de fluorescencia fueron recogidos a tres longitudes de onda, 659, 664 y 669 nm para el DCM-NH₂ y 565, 570 y 575 nm para el DCM-HBU. Las curvas de decaimiento de la fluorescencia se analizaron globalmente mediante un método de deconvolución iterativo con modelos exponenciales utilizando el software Fluofit (PicoQuant).

III.3.9.4. Medidas de microscopía de fluorescencia

Las medidas de microscopía de fluorescencia de las bacterias se realizaron utilizando distintos equipos y condiciones.

Las imágenes de las intensidades de emisión de fluorescencia con excitación monofotónica se obtuvieron con el sistema de microscopio de fluorescencia confocal Microtime 200, anteriormente descrito, cuya fuente de excitación empleada fue el láser de 375 nm. El haz de luz se dirigió a un espejo dicróico (375 dcmr, Chroma) y luego a través de un objetivo de inmersión en

aceite (1,4 NA, 100×) específico del sistema de microscopio invertido Olympus IX-71. Las emisiones de fluorescencia se llevaron a un filtro de paso largo de 405 nm (AHF/Chroma) y se enfocaron a un *pinhole* confocal de 75 μm . Las emisiones de fluorescencia pasaron por un espejo dicróico (600 dcmr, Chroma) y se enfocaron a dos fotodetectores de diodos de avalancha monofotónicos (SPAD) (SPCM-AQR 14, Perkin Elmer). Los datos se adquirieron con un módulo TimeHarp 200 TCSPC (PicoQuant), y las imágenes de intensidad de fluorescencia en bruto se obtuvieron con un escáner a una resolución de 512 × 512 píxeles.

Las imágenes de dos fotones de las bacterias se realizaron con el microscopio confocal Leica SPS II empleando el láser multifotón Mai Tai ($\lambda = 800 \text{ nm}$) y el láser multilínea de argón ($\lambda = 458 \text{ nm}$). Según las características de las medidas, las longitudes de onda de excitación se cambiaron secuencialmente entre 800 y 458 nm y las bandas de emisión se adquirieron en el intervalo de 500 a 580 y de 580 a 700 nm para los canales verde y rojo, respectivamente. El objetivo utilizado fue un PL APO 63x/1,2 CS de inmersión en agua. La emisión se cuantificó utilizando un detector híbrido (HyD, Leica).

Por último, las imágenes STED y confocal se obtuvieron con el microscopio de barrido Abberior empleando el láser de excitación pulsado de 485 nm (40 MHz), y el láser STED pulsado de 775 nm (40 MHz). En todas las medidas, el tamaño del *pinhole* se fijó en 1 Unidad Airy (UA).

En lo que se refiere a las imágenes de células y tejidos tumorales se emplearon dos tipos de microscopios.

Las imágenes monofotónicas de las células se recogieron con el microscopio Abberior empleando el láser de excitación pulsado de 450 nm (40 MHz) y el láser STED pulsado de 775 nm (40 MHz). El tamaño del *pinhole* se ajustó a 1 UA. La fluorescencia recogida se separó mediante un dicróico 560LP dirigido a un detector de fotodiodos de avalancha (APD) y a un tubo fotomultiplicador híbrido (HPMT) tras pasar por los filtros 685/75 y 545/25, respectivamente.

Las imágenes de dos fotones de los tejidos tumorales se realizaron con el sistema de microscopio de fluorescencia confocal MicroTime 200. La fuente de excitación empleada fue el láser sintonizable Chameleon Discovery NX utilizado a una longitud de onda de excitación de 800 nm. La tasa de

repetición se modificó mediante el selector de pulsos utilizando dos células acústicas-ópticas de Bragg para reducir la frecuencia de 80 MHz a 40 MHz. El haz de excitación pasó por un filtro acromático de cuarto de onda (AQWP05-M-600, Thorlabs, Jessup, MD, EE.UU.) y fue dirigido por un espejo dicróico F73-705SG (AHF/Chroma, Tübingen, Alemania) a un sistema de microscopio invertido (IX-71, Olympus, Tokio, Japón) con un objetivo de inmersión en aceite (1.4 NA, 100x). La emisión de fluorescencia se recogió con un filtro de paso largo de 550 nm (AHF/Chroma, Alemania) y se dirigió a un *pinhole* de 150 μm . La emisión de la muestra se dividió en dos canales de detección tras pasar por un divisor de haz dicróico de 600 DCXR (AHF/Chroma), y luego por un filtro de paso de banda 685/70 (Semrock/AHF) hasta un detector y por otro 520/35 (Semrock/AHF) hasta el otro detector. Los detectores utilizados fueron dos SPAD diferentes.

III.3.9.5. Medidas de RMN

Los espectros de RMN de ^1H y ^{13}C se registraron en los espectrómetros descritos en el apartado III.1.14 a una temperatura constante de 298 K. Los desplazamientos químicos se indican en ppm, utilizando como referencia el pico del disolvente residual (DMSO: $\delta = 2.50$ ppm). Los datos se presentan como sigue: desplazamiento químico, multiplicidad (s: singlete, d: doblete, t: triplete, q: cuarteto, quint: quintuplete, hept: heptuplete, m: multiplete, dd: doblete de dobletes, dt: doblete de tripletes, td: triplete de dobletes, bs: singlete amplio), constante de acoplamiento (J en Hz) e integración; los espectros de RMN de ^{13}C se recogieron a 126 MHz usando desacoplamiento de protones de banda ancha y los desplazamientos químicos se expresan en ppm utilizando los picos del disolvente residual como referencia (DMSO: $\delta = 39.52$ ppm). Las multiplicidades de carbono se determinaron mediante técnicas DEPT.

III.3.9.6. Ensayo de viabilidad celular, MTT

Este ensayo permite determinar la funcionabilidad mitocondrial (dicho de otro modo, la actividad metabólica) de las células tratadas (303). Está basado en la reducción metabólica del bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-

2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) realizada por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa en un compuesto de color azul (formazan). Así, el valor de la absorbancia medida a 570 nm es indicativo de la viabilidad celular.

Para ello, las líneas celulares Caco-2 (cáncer de colon) y BxPC-3 (cáncer de páncreas) se sembraron en placas de 96 pocillos en una concentración de 3000 células/pocillo en medio EMEN y RPMI. Después de 3 días, las células fueron tratadas con el DCM-NH-Pro-Gly (2.5, 5 y 10 μM con un porcentaje de DMSO igual al 0.5, 1 y 2 %, respectivamente), otros pocillos se trataron con DMSO, en los mismos porcentajes (0.5, 1 y 2 %) incubándose ambos durante 15, 30 y 60 min. Además, las células no tratadas se utilizaron como control. Tras estos tiempos, todas las células se incubaron con MTT durante 4 h y se midió la absorbancia a 570 nm en un lector de microplacas Synergy HT, BIO-TEK.

III.3.9.7. Cálculo del CLogP

Para el cálculo del coeficiente de partición n-octanol/agua de las moléculas DCM-NH-Pro-Gly y DCM-NH₂, se ha empleado la herramienta ChemDraw Professional v20 (PerkinElmer, Waltham, MA, USA) que, a través de la aplicación de diferentes modelos matemáticos, es capaz de realizar predicciones de las propiedades químicas de las estructuras de interés.

III.3.10. Métodos de análisis

III.3.10.1. Métodos de análisis de datos

- Enzimáticos

La reacción enzimática para el caso de las sondas DCM-NH-Ala y DCM-NH-Pro-Gly se ajustó siguiendo el modelo de Michaelis-Menten, cuya ecuación de velocidad inicial es la siguiente (ecuación III.1):

$$v_0 = \frac{v_{max}[S]_0}{K_M + [S]_0} \quad (\text{Ec. III.1})$$

donde v_0 representa la velocidad inicial a una concentración específica de sustrato, v_{max} es el valor máximo de la velocidad inicial a altas concentraciones de sustrato, K_M es la constante de Michaelis-Menten y $[S]_0$ es la concentración inicial de sustrato. Dicha ecuación corresponde a la de una hipérbola rectangular, por lo que la representación de v_0 frente a $[S]_0$, tiene esa forma, como se observa en la figura III.13.

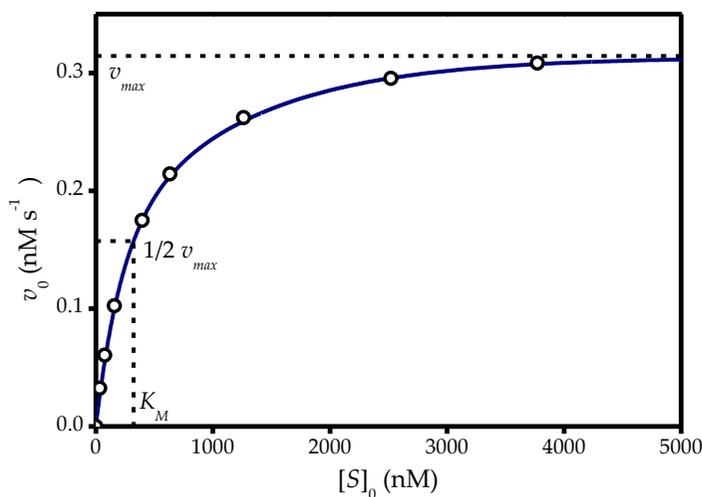


Figura III.13. Representación de la velocidad inicial frente a la concentración inicial de sustrato en la que se observa el valor de la velocidad máxima y el de K_M .

Dado que no siempre se pudo alcanzar el límite de v_{max} , se llevó a cabo también una transformación de la ecuación anterior en la de una línea recta, de mayor facilidad que la hipérbola rectangular inicialmente obtenida. Concretamente se usó la propuesta por Lineweaver-Burk (ver figura III.14), una metodología usual para el cálculo de los parámetros cinéticos, y cuya ecuación (ecuación III.2) es la que sigue:

$$\frac{1}{v_0} = \frac{1}{v_{max}} + \frac{K_M}{v_{max}} \frac{1}{[S]_0} \quad (\text{Ec. III.2})$$

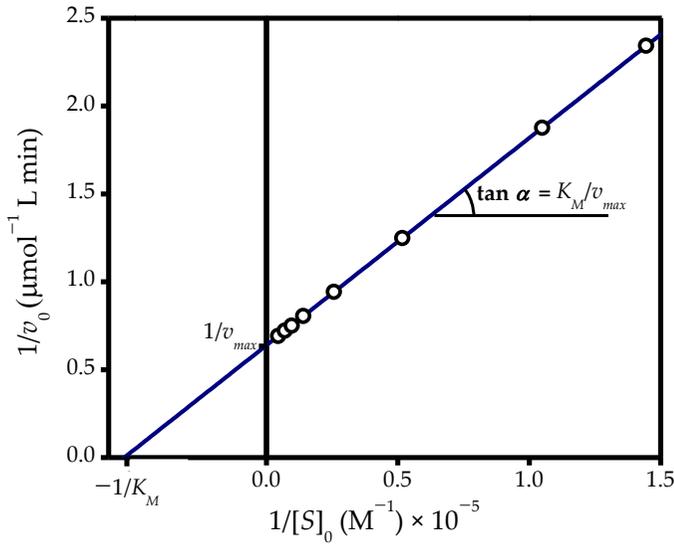


Figura III.13. Representación de Lineweaver-Burk.

A partir de la ordenada del origen se puede obtener el valor de v_{max} , mientras que, la pendiente de la recta, nos permite el cálculo de K_M .

Una vez conocida, la velocidad máxima y sabiendo la concentración de enzima empleada ($[E]$), se puede calcular la constante catalítica (K_{cat}) a partir de la ecuación III.3:

$$K_{cat} = v_{max} [E] \quad (\text{Ec. III.3})$$

- Rendimientos cuánticos

Los datos del rendimiento cuántico de fluorescencia relativo se obtuvieron integrando las áreas bajo las curvas de fluorescencia mediante la expresión:

$$\Phi = \Phi_R \cdot \frac{I}{I_R} \cdot \frac{OD_R}{OD} \cdot \frac{n^2}{n_R^2} \quad (\text{Ec. III.4})$$

donde Φ y Φ_R representan los rendimientos cuánticos de fluorescencia de la muestra y la referencia, respectivamente; I e I_R los espectros de fluorescencia

integrados de la muestra y la referencia, respectivamente; OD y OD_R son la densidad óptica a la longitud de onda de excitación de la muestra y la referencia; y n y n_R son los índices de refracción de los disolventes cuando la muestra y la referencia están disueltas en ellos. Las referencias utilizadas fueron fluoresceína en NaOH 0.1M ($\Phi = 0.91$) en el caso de los sensores DCM-NH-Ala, DCM-NH-Pro-Gly y DCM-HBU, y rodamina 6G en EtOH ($\Phi = 0.95$) para el DCM-NH₂ (304).

- Polaridad

El estudio solvatocrómico del DCM-NH₂ se llevó a cabo siguiendo el procedimiento de Catalán (305). Dicho enfoque se basa en cuatro escalas empíricas de los disolventes: la polarizabilidad (SP) o capacidad para generar un momento dipolar; la dipolaridad (SdP), comúnmente conocida como polaridad; la acidez (SA); y la basicidad (SB). Por lo tanto, considera tanto los efectos generales como las características específicas de enlace de hidrógeno de los disolventes. Matemáticamente se puede resumir en la ecuación III.5

$$A = A_0 + bSA + cSB + dSP + eSd \quad (\text{Ec. III.5})$$

donde A se refiere a una propiedad fisicoquímica dependiente del disolvente en un disolvente específico, A_0 es la cantidad estadística correspondiente al valor de la propiedad en la fase gaseosa y $b-e$ son los coeficientes de regresión que describen la sensibilidad de la propiedad A a las diferentes interacciones disolvente-soluto. Suprimiendo los parámetros de esta ecuación uno a uno y analizando los efectos en el ajuste lineal, se puede obtener el parámetro que afecta más drásticamente a las propiedades espectroscópicas del compuesto.

Este esquema empírico de Catalán, basado en medidas de la dipolaridad, la polarizabilidad, la acidez y la basicidad de los disolventes, permite predecir el comportamiento solvatocrómico de cualquier soluto y proporciona información sobre los efectos del disolvente (305, 306). También representa una de las escalas de disolventes más completas, ya que incluye más de 300 disolventes (307). La mayor ventaja de la metodología de Catalán es que permite separar la contribución relativa de los cuatro parámetros en los desplazamientos solvatocrómicos de $\tilde{\nu}_{abs}$ y $\tilde{\nu}_{em}$, y por tanto, proporciona

información sobre cuál de las características del disolvente es la principal responsable del comportamiento fotofísico del colorante.

III.3.10.2. Métodos de análisis de imágenes

En el caso de las imágenes de las bacterias, todas ellas se exportaron como datos matriciales y se analizaron utilizando macros personalizadas en *Fiji is just imageJ*. En resumen, los dos canales se analizaron por separado. En primer lugar, se aplicó un filtro gaussiano ($\sigma = 1$) a las imágenes sin procesar, y se fijó manualmente un umbral de intensidad seleccionando bacterias en ambos canales. Por debajo de este umbral, los píxeles se fijaron en valores nulos. Cuando era de interés, se representaron los canales rojos siguiendo una escala de colores rojo/amarillo/blanco. En otros casos, se calcularon los valores ratiométricos entre los canales rojo y verde y se representó estas imágenes siguiendo una escala de color azul/gris/amarillo.

Por otro lado, en el caso de las imágenes obtenidas mediante el uso de la sonda DCM-NH-Pro-Gly y DCM-HBU para la detección de la DPP IV y TYR, respectivamente, la cuantificación de imágenes y las medidas de los ratios se realizaron utilizando macros de codificación manual en *Fiji Is Just ImageJ*. En resumen, se aplicó un filtro gaussiano a los datos de las imágenes en bruto de células, tejidos y pez cebra ($\sigma = 2$) y suero ($\sigma = 3$). Para las células, tejidos y pez cebra, se realizó una selección manual de umbral para seleccionar las regiones de interés (ROI). Las imágenes de suero se utilizaron en su totalidad. Fuera de la ROI se asignó un *Not a Number* (NaN) a los píxeles. Estas imágenes se utilizaron para calcular el valor medio de intensidad en cada canal. Se obtuvieron las imágenes de relación dividiendo ambos canales (rojo y verde) píxel a píxel. Las imágenes obtenidas se utilizaron para calcular el valor medio del ratio.

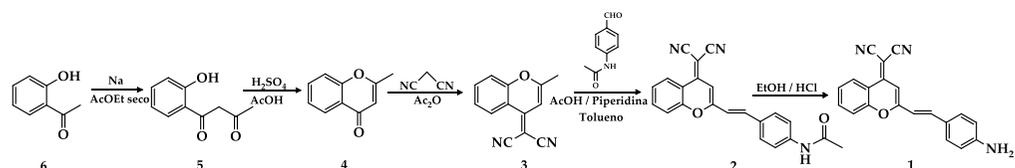
RESULTADOS & DISCUSIÓN

IV. Resultados y Discusión

IV.1. Síntesis del fluoróforo y sensores

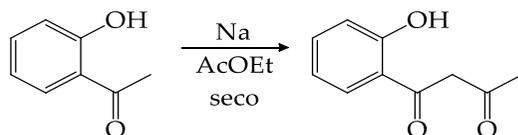
IV.1.1. Fluoróforo DCM-NH₂

La síntesis del compuesto DCM-NH₂ se llevó a cabo siguiendo el procedimiento descrito por Sun et al. (278), en una ruta sintética de cinco pasos:



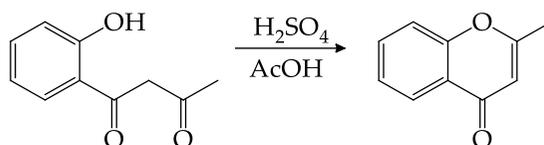
Esquema IV.1. Síntesis del DCM-NH₂.

- Síntesis del 1-(2-hidroxifenil)butano-1,3-diona (5)



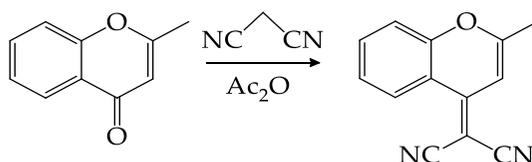
La 1-(2-hidroxifenil)etanon (6) (2.0 g, 14.6 mmol) se disolvió en 50 mL de acetato de etilo seco, añadiendo posteriormente sodio (1.00 g, 43.48 mmol) a la disolución, bajo atmósfera de argón y se dejó agitando durante 5 h a temperatura ambiente. El sólido verde grisáceo formado se filtró y se disolvió en 100 mL de agua desionizada. Seguidamente se ajustó el pH de la disolución a neutro con ácido clorhídrico al 10 % v/v. La disolución acuosa se extrajo con 200 mL de acetato de etilo y las fases orgánicas fueron secadas con sulfato sódico, filtradas y concentradas para obtener el crudo final como un sólido marrón (3.13 g), utilizado directamente en la siguiente reacción sin purificación previa.

- Síntesis del 2-metil-4H-cromen-4-ona (4)



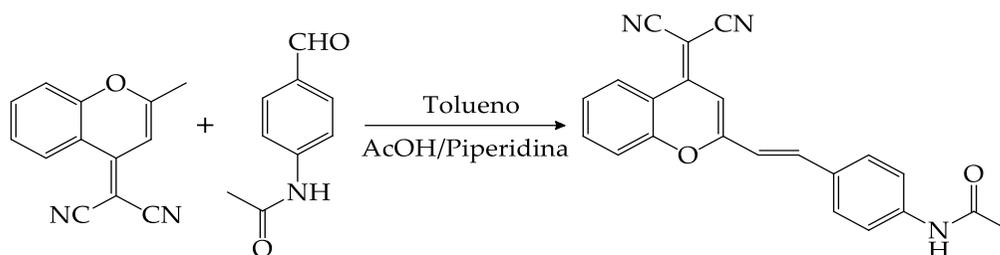
Bajo atmósfera de argón, se añadió lentamente ácido sulfúrico (2.06 mL, 37.83 mmol) a una disolución de ácido acético (30 mL) que contenía 1-(2-hidroxifenil)butano-1,3-diona (3.13 g, 17.56 mmol). La mezcla se puso a reflujo a 120 °C, durante unos 30 min. Transcurrido dicho tiempo, se dejó atemperar unos 15 min y luego se vertió en 800 mL de hielo, seguido del ajuste del pH de la disolución a neutro con carbonato sódico. La disolución acuosa se extrajo con diclorometano dos veces y las fases orgánicas se secaron con sulfato sódico, se filtraron y se concentraron para obtener el producto bruto final como un sólido negro (1.986 g).

- Síntesis del 2-(2-metil-4H-cromen-4-ilideno)malononitrilo (3)



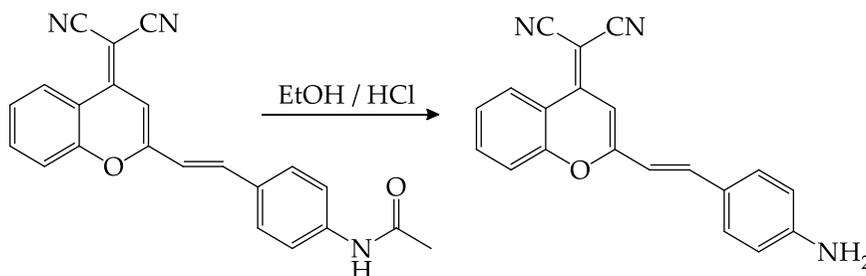
La 2-metil-4H-cromen-4-ona (0.45 g, 2.8 mmol) y el malononitrilo (0.21 g, 3.18 mmol) se disolvieron en 1.8 mL de anhídrido acético. La disolución se sometió a reflujo durante 36 h, a 140 °C. Transcurrido ese tiempo, se dejó enfriar y se añadió 1.8 mL de hexano, lo que dio lugar a un precipitado. Se retiró todo el sobrenadante, y el precipitado se lavó con agua, dando lugar de nuevo a un precipitado tras desechar el sobrenadante. Finalmente, el precipitado se disolvió en una mezcla de etanol-diclorometano evaporando el disolvente a vacío. El producto crudo obtenido se purificó mediante cromatografía flash usando un gradiente de mezclas de hexano-diclorometano como eluyente, para obtener el compuesto como un sólido naranja (0.2 g, 33 %).

- Síntesis del (E)-N-(4-(2-(4-(dicianometileno)-4H-cromen-2-il)vinil)fenil)acetamida



La 2-(2-metil-4H-cromen-4-ilideno)malononitrilo (0.200 g, 0.96 mmol) y 4-acetamidobenzaldehído (0.19 g, 1.16 mmol) fueron disueltos en tolueno (2 mL) con piperidina (0.14 mL) y ácido acético (0.08 mL) bajo atmósfera de argón a temperatura ambiente. A continuación, la mezcla se sometió a reflujo, a 110 °C, durante 15 h. Transcurrido dicho tiempo de reacción, se dejó enfriar, apareció un precipitado y se retiró el sobrenadante. El precipitado se lavó con tolueno, retirándose nuevamente el sobrenadante. Por último, el precipitado se lavó con diclorometano-metanol, y el disolvente se evaporó a vacío, obteniéndose un crudo sólido de color naranja (0.884 g), que se utilizó para el siguiente paso de reacción sin purificación previa.

- Síntesis del (E)-2-(2-(4-aminosteril)-4H-cromen-4-ilideno)malononitrilo o DCM-NH₂ (1)



La (E)-N-(4-(2-(4-(dicianometileno)-4H-cromen-2-il)vinil) fenil) acetamida (0.425 g, 1.2 mmol) se disolvió en etanol (10 mL). A continuación, se añadió HCl (7 mL) y se dejó durante 6 h a reflujo, a 115 °C. La mezcla resultante se dejó enfriar y se neutralizó con carbonato sódico. La disolución acuosa se extrajo con diclorometano y las fases orgánicas se secaron sobre sulfato sódico, se filtraron y se concentraron para obtener el producto bruto,

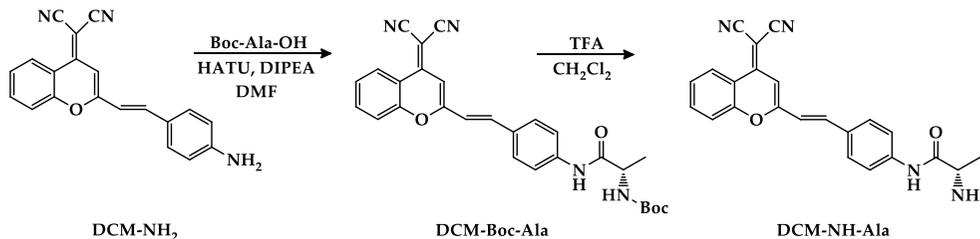
que se purificó por cromatografía en columna flash usando un gradiente de mezclas de diclorometano-metanol para obtener el producto final como un sólido rojizo (0.189 g, 50.54 %; punto de fusión: 243.8-245.2 °C).

El producto final (DCM-NH₂) se aisló como muestra pura, coincidiendo sus espectros de ¹H-RMN y ¹³C-RMN con los previamente descritos por Sun et al. (278).

IV.1.2. Sonda DCM-NH-Ala

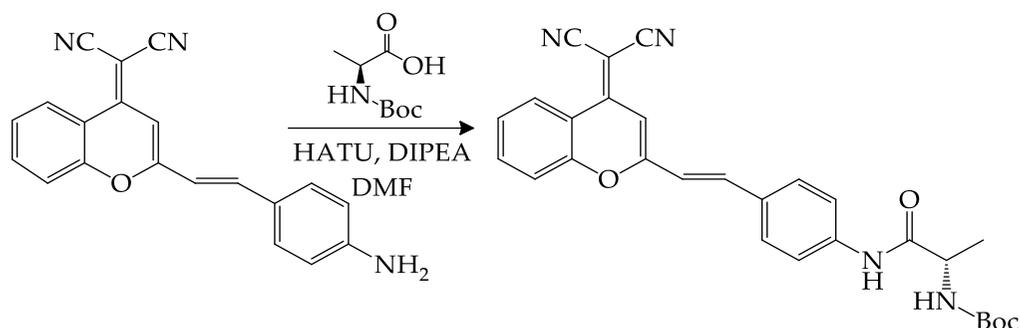
La estrategia de diseño de la sonda DCM-NH-Ala consistió en hacer reaccionar el grupo carboxilo del aminoácido alanina con la amina del DCM-NH₂, al objeto de perturbar el complejo de transferencia de carga intramolecular (ICT) que controla las propiedades espectrales del DCM-NH₂ provocando el desplazamiento de sus espectros de absorción y emisión hacia longitudes de onda más cortas, debido al efecto de la retirada de electrones del enlace amida. Se pretende, por tanto, que la acción catalítica de la alanina aminopeptidasa (pepN) restablezca el ICT de la molécula de DCM-NH₂, proporcionando una notable fluorescencia ratiométrica entre los picos de las bandas de DCM-NH₂ y DCM-NH-Ala.

Así, la síntesis del DCM-NH-Ala se llevó a cabo mediante una ruta de dos pasos (esquema IV.2), partiendo del derivado DCM-NH₂ sintetizado según se ha descrito previamente. La reacción del derivado de anilina (DCM-NH₂) con la N-Boc-Alanina comercial proporcionó la amida correspondiente (DCM-Boc-Ala), que se transformó en DCM-NH-Ala tras la desprotección del grupo terc-butoxicarbonilo (Boc) por tratamiento con ácido trifluoroacético.



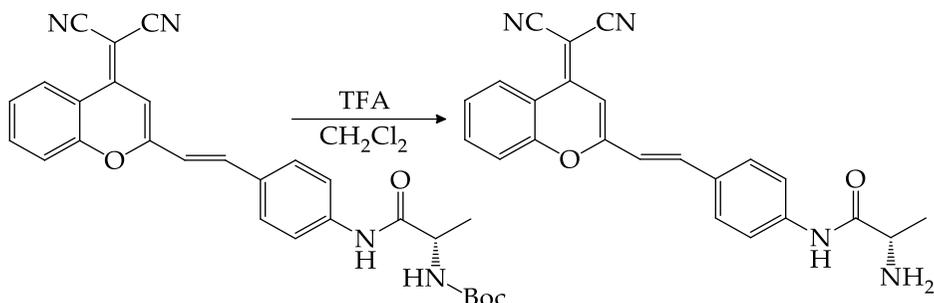
Esquema IV.2. Síntesis del DCM-NH-Ala.

▪ Síntesis del DCM-Boc-Ala:



A una disolución del compuesto DCM-NH₂ (49 mg, 0.16 mmol) en dimetilformamida anhidra (1 mL) bajo una atmósfera de argón, se añadió 1-[bis (dimetilamino) metilen] -1H-1,2,3-triazolo [4,5-b] piridinio 3-óxido hexafluorofosfato (HATU) (0.12 g, 0.32 mmol) y N,N-Diisopropiletilamina (DIPEA) (40 mg, 0.32 mmol). La mezcla se enfrió hasta 0 °C y se agitó durante 10 minutos. A continuación, se añadió gota a gota una disolución de N-Boc-Alanina comercial (30 mg, 0,16 mmol) en dimetilformamida anhidra (1.5 mL), la disolución se agitó durante 24 h y se dejó alcanzar la temperatura ambiente. A continuación, se eliminó el disolvente a vacío y el residuo se sometió a cromatografía en columna flash usando un gradiente de mezclas de diclorometano-metanol para producir DCM-Boc-Ala como un sólido rojo pálido con un rendimiento del 78 %. ¹H-RMN (500 MHz, Cloroformo-*d*₄) δ 9.15 (s, 1H), 8.79 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 7.75 (dd, *J* = 8.5, 7.0 Hz, 1H), 7.58 – 7.48 (m, 4H), 7.46 (d, *J* = 7.1 Hz, 1H), 7.43-7.38 (m, 2H), 6.72 (s, 1H), 6.62 (d, *J* = 15.8 Hz, 1H), 5.20 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 4.48-4.36 (m, 1H), 1.50 (s, 9H), 1.48 (d, *J* = 7.9 Hz, 3H). ¹³C-RMN (126 MHz, Cloroformo-*d*) δ 171.6 (C), 157.5 (C), 156.5 (C), 152.4 (C), 152.1 (C), 140.3 (C), 138.4 (CH), 134.8 (CH), 130.1 (C), 128.8 (CH), 126.1 (CH), 125.7 (CH), 119.9 (CH), 118.5 (CH), 117.6 (C), 117.2 (CH), 116.7 (C), 115.7 (C), 106.3 (CH), 81.0 (C), 62.4 (C), 51.0 (CH), 28.35 (CH₃), 17.31 (CH₃). HRMS (ESI) *m/z* [M+Na]⁺ calculado para C₂₈H₂₆N₄O₄Na 505.1852; encontrado: 505.1851. (Ver anexos 1, 2 y 3).

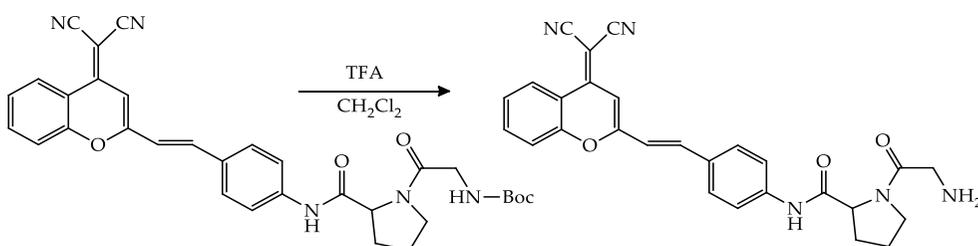
▪ Síntesis del DCM-NH-Ala:



El compuesto DCM-Boc-Ala (15 mg, 34 μ mol) se disolvió en una mezcla 1:1 de ácido trifluoroacético-diclorometano (0.3:0.3 mL), y la mezcla resultante se agitó durante aproximadamente 5 h a temperatura ambiente hasta que no se observó material de partida por TLC. A continuación, se eliminó el disolvente a baja presión y el residuo se sometió a cromatografía flash obteniendo 10 mg (80 %) de DCM-NH-Ala como un sólido naranja. ¹H-NMR (500 MHz, metanol-*d*₄) δ 8.76 (dd, *J* = 8.3, 1.3 Hz, 1H), 7.82 (ddd, *J* = 8.5, 7.0, 1.4 Hz, 1H), 7.69 – 7.64 (m, 3H), 7.62 - 7.55 (m, 3H), 7.47 (ddd, *J* = 8.4, 7.1, 1.3 Hz, 1H), 6.99 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H), 6.81 (s, 1H), 4.12 (q, *J* = 7.1 Hz, 1H), 1.64 (d, *J* = 7.0 Hz, 3H). ¹³C-RMN (126 MHz, Metanol-*d*₄) δ 168.0 (C), 158.2 (C), 152.9 (C), 152.4 (C), 139.8 (C), 138.1 (CH), 134.8 (CH), 131.1 (C), 128.7 (CH), 125.6 (CH), 125.0 (CH), 119.7 (CH), 118.6 (CH), 117.8 (CH), 117.3 (C), 106.2 (CH), 49.6 (CH), 16.2 (CH₃). HRMS (ESI) *m/z* [M+H]⁺ calculado para C₂₃H₁₉N₄O₂ 383.1508; encontrado: 383.1501. (Ver anexos 4, 5 y 6).

disolución de N-Boc-Pro-Gly comercial (0.105 g, 0.385 mmol) en dimetilformamida anhidra (1.8 mL). La disolución se agitó durante 24 h y se dejó alcanzar la temperatura ambiente. A continuación, se realizó una extracción con carbonato sódico (30 mL) y diclorometano (10 mL x 3). Las fases orgánicas se combinaron y luego se lavaron con una disolución de LiCl al 15 % (30 mL x 2), agua (30 mL) y salmuera (30 mL), agua (25 mL x 3) y se secaron con sulfato sódico. Finalmente, el disolvente se eliminó a vacío, y el residuo se sometió a cromatografía flash usando un gradiente de mezclas diclorometano-metanol y trietilamina para producir DCM-Boc-Pro-Gly como un sólido rojo (recuperación cuantitativa).

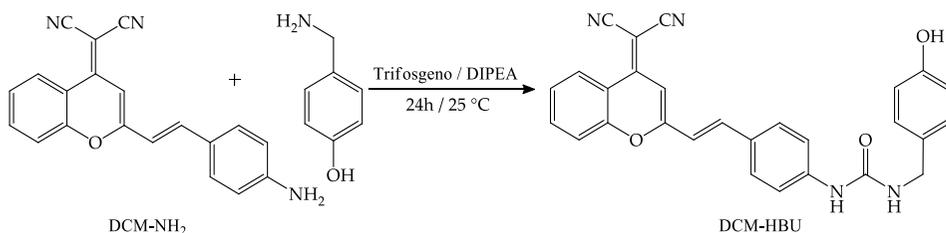
▪ *Síntesis del DCM-NH-Pro-Gly:*



El compuesto DCM-Boc-Pro-Gly (89 mg, 0.156 mmol) se disolvió en una disolución 1:74 de diclorometano-ácido trifluoroacético (2.21:0.89 mL), y la mezcla resultante se agitó durante aproximadamente 5 h a temperatura ambiente hasta que no se observó material de partida por TLC. A continuación, se eliminó el disolvente a vacío y el residuo se sometió a cromatografía flash para producir 65 mg (87 %) del compuesto DCM-NH-Pro-Gly como un sólido naranja. Punto de fusión: 160-170 °C. ¹H-RMN (600 MHz, DMSO-*d*₄) δ 10.29 (s, 1H), 8.73 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 7.92 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H), 7.79 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.75 – 7.70 (m, 5H), 7.61 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H), 7.41 (d, *J* = 15.8 Hz, 1H), 6.99 (s, 1H), 4.47 (s, 1H), 3.49 (s, 2H), 2.11 – 1.74 (m, 6H), 1.21 (s, 2H). ¹³C-RMN (150 MHz, DMSO-*d*₄) δ 158.95 (C), 153.40 (C), 152.51 (C), 141.57 (C), 138.76 (CH), 135.77 (CH), 129.42 (2-CH), 126.64 (CH), 125.26 (CH), 119.74 (2-CH), 119.54 (CH), 118.41 (CH), 117.75 (C), 117.59 (C), 116.40 (C), 106.85 (CH), 61.36 (C), 60.74 (CH), 60.23 (C), 47.18 (C), 46.12 (CH₂), 39.97 (C), 29.81 (CH₂), 29.48 (CH₂), 24.84 (CH₂). HRMS (ESI) *m/z* [M+H]⁺ calculado para C₂₇H₂₃N₅O₃: 466.1879; encontrado: 466.1902. (Ver anexos 7, 8 y 9).

IV.1.4. Sonda DCM-HBU

▪ *Síntesis del DCM-HBU:*



Esquema IV.4. Síntesis del DCM-HBU.

El diseño de esta sonda se basó en la unión de un grupo 4-hidroxibencilamina (muy similar al aminoácido tirosina) al derivado del DCM, con el fin de hacerlo sensible a la acción catalítica de la enzima TYR. Así, la reacción del derivado de anilina DCM-NH₂ con 4-hidroxibencilamina proporcionó la amida correspondiente DCM-HBU. Para ello, a una disolución del compuesto DCM-NH₂ (80 mg, 0.257 mmol, 1 eq) en diclorometano anhidro (12.82 mL) bajo atmósfera de N₂, se añadió trifosgeno (153 mg, 0.513 mmol, 2 eq). A continuación, la mezcla se enfrió a 0 °C para añadir DIPEA (88.9 µL, 0.513 mmol, 2 eq) y se agitó durante 3 h; durante este tiempo, la temperatura se mantuvo cuidadosamente dentro del intervalo de 0-5 °C mediante el uso de un baño de hielo. Seguidamente, se añadió 4-hidroxibencilamina (127 mg, 1.03 mmol, 4 eq) y la reacción se mantuvo a temperatura ambiente durante 24 h, bajo atmósfera de N₂. A continuación, se eliminó el disolvente a vacío y el residuo se sometió a cromatografía flash en gradiente de mezclas de diclorometano-metanol para producir DCM-HBU como un sólido de color amarillo pálido (6 mg), con un rendimiento del 5%. Punto de fusión: 172-173 °C. ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9.88 (s, 1H), 9.29 (s, 1H), 9.16 (s, 1H), 8.74 (dd, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.93 (ddd, *J* = 8.5, 7.2, 1.4 Hz, 1H), 7.82 (dd, *J* = 8.4, 1.1 Hz, 1H), 7.72 (dd, *J* = 15.5, 12.4 Hz, 3H), 7.62 (ddd, *J* = 8.4, 7.2, 1.3 Hz, 1H), 7.57 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 7.33 (d, *J* = 15.9 Hz, 1H), 7.10 (d, *J* = 8.9 Hz, 3H), 7.00 (s, 1H), 6.71 (d, *J* = 8.8 Hz, 3H). ¹³C-RMN (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 159.31, 153.40, 153.18, 153.07, 152.55, 143.34, 139.58, 135.83, 131.54, 129.94, 128.25, 126.58, 125.07, 120.40, 119.56, 117.97, 117.91, 117.61, 117.03, 116.53, 115.71, 106.42, 96.37, 59.62. TOF MS ES⁻, calculado para C₂₈H₂₀N₄O₃Cl: 495.1224 [M+Cl]⁻; encontrado: 495.1241. (Ver anexos 10, 11 y 12).

IV.2. Caracterización y aplicaciones biológicas del compuesto DCM-NH-Ala

IV.2.1. Caracterización fotofísica del sensor y de la reacción enzimática

IV.2.1.1. Caracterización fotofísica del fluoróforo y del sensor

Los espectros de absorción y emisión del DCM-NH₂ y DCM-NH-Ala en disolución PBS/DMSO (7/3, v/v), 50 mM, pH = 7.4 se muestran en la figura IV.1.

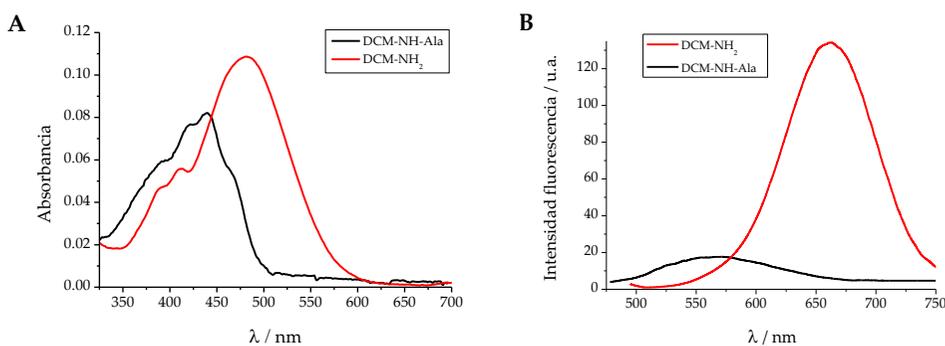


Fig. IV.1. A) Espectros de absorción de los compuestos DCM-NH-Ala (línea negra) y DCM-NH₂ (línea roja) de disoluciones 4 μM en PBS/DMSO 7/3 (v/v). B) Espectros de emisión de los compuestos DCM-NH-Ala (línea negra) y DCM-NH₂ (línea roja) de disoluciones 4 μM en PBS/DMSO 7/3 (v/v) mediante excitación a 440 nm y 480 nm, respectivamente.

Como se puede observar, el espectro de absorción del DCM-NH-Ala muestra una banda con un máximo a 440 nm, mientras que la banda de DCM-NH₂ tiene un máximo de absorción a 480 nm (figura IV.1A). Con respecto a los espectros de emisión (figura IV.1B), el DCM-NH-Ala muestra una banda de emisión débil ($\lambda_{\text{ex}} = 440$ nm) con un máximo alrededor de 571 nm, mientras que el espectro de DCM-NH₂ muestra una banda de emisión intensa ($\lambda_{\text{ex}} = 480$ nm) con un máximo a 662 nm.

La determinación de los coeficientes de absorptividad molar (ϵ) a las λ del máximo de absorción de ambos compuestos se muestra en la figura IV.2.

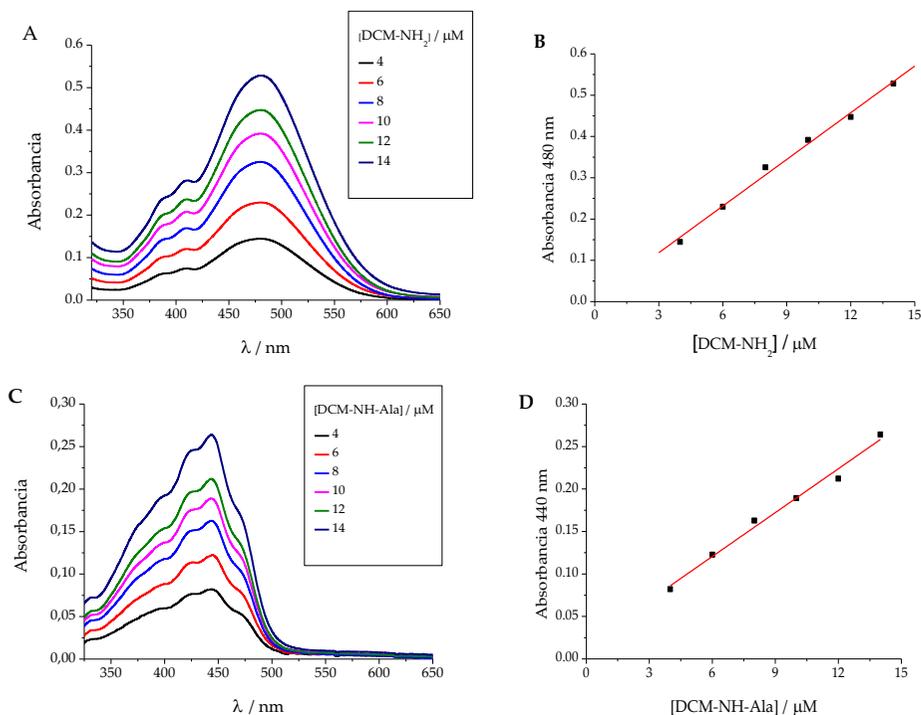


Fig. IV.2. Espectros de absorción de los compuestos DCM-NH₂ (A) y del DCM-NH-Ala (C) a diferentes concentraciones en disolución PBS/DMSO (7/3, v/v). Ajuste lineal de los máximos de absorción del DCM-NH₂ (480 nm) y del DCM-NH-Ala (440 nm) de disoluciones de distinta concentración (B y D, respectivamente).

Los resultados obtenidos tras el ajuste lineal de la Ley de Lambert-Beer proporcionaron un valor de ϵ para el DCM-NH₂ de $37700 \pm 1600 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ con un R^2 de 0.99 (figura IV.2B) mientras que para el DCM-NH-Ala de $17200 \pm 950 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ con R^2 igual a 0.98 (figura IV.2D).

Por otro lado, siguiendo la metodología descrita en el apartado III.3.10.1 (ecuación III.4), se calcularon los rendimientos cuánticos de fluorescencia (Φ). Así, el valor de Φ para el DCM-NH₂ (utilizando rodamina 6G como referencia) fue de $0.63 \pm 0.09 \%$, mientras que el obtenido para el DCM-NH-Ala fue de $0.09 \pm 0.01 \%$, siendo en esta ocasión la fluoresceína la referencia usada. Por tanto, existe un aumento de 7 veces del Φ del colorante con respecto al del sensor.

Como la influencia del ambiente sobre las propiedades fluorescentes es esencial para entender el comportamiento de los colorantes en muestras

biológicas y poder realizar una correcta interpretación de la señal de fluorescencia, se realizó un estudio solvatocrómico utilizando diferentes disolventes.

En primer lugar, se registraron los espectros de absorción y emisión, (figura IV.3), los tiempos de vida de fluorescencia, y se calcularon los rendimientos cuánticos y el coeficiente de absorptividad molar en 12 disolventes diferentes (ver tabla IV.1).

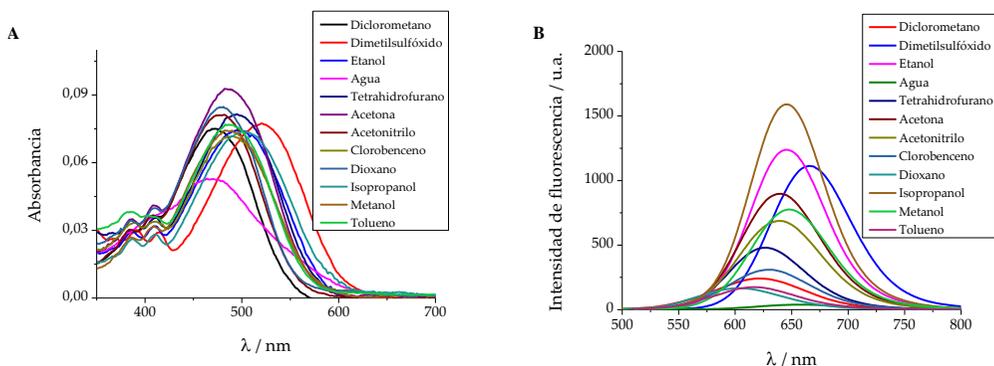


Fig. IV.3. Espectros de absorción (A) y de emission (B) de DCM-NH₂ (1.7 μM) en diferentes disolventes.

Tabla IV.1. Rendimientos cuánticos de fluorescencia y tiempos de vida de fluorescencia del DCM-NH₂ en diferentes disolventes.

Disolvente	λ_{abs}^{max} / nm	λ_{em}^{max} / nm	Despl. Stokes/nm	$\epsilon^*/M^{-1} cm^{-1}$	Φ (%)	τ/ns
Diclorometano	472	622	150	44155	3.4	0.35
Dimetilsulfóxido	521	665	144	45511	14.6	0.58
Etanol	494	646	152	43747	13.6	0.50
Agua	469	660	191	31052	0.4	0.44
Tetrahidrofurano	495	627	132	47919	5.2	0.30
Metanol	483	648	165	54381	9.2	0.32
Clorobenceno	491	630	139	42144	5.9	0.32
Acetonitrilo	478	641	163	47655	10.7	0.26
Tolueno	490	617	127	45142	2.8	0.27
Isopropanol	503	646	143	43396	12.1	0.70
Dioxano	481	603	122	49856	1.9	0.51
Acetona	486	640	154	54381	7.2	0.30

*en el máximo de absorción

Utilizando el análisis desarrollado por Catalán (305), descrito en el apartado III.3.10.1. Métodos de análisis-polaridad, se hicieron los ajustes lineales observados en la figura IV.4, donde se representan la λ en el máximo obtenida experimentalmente en los diferentes disolventes frente a la λ en el máximo de esos mismos disolventes calculada teóricamente mediante el modelo de Catalán, en el cual se tienen en cuenta cuatro parámetros de los disolventes: ácida (SA), basicidad (SB), dipolaridad (SdP) y la polarizabilidad (SP). El ajuste de los datos a una línea recta se hizo tanto para absorción como para emisión, obteniéndose unos valores para el coeficiente de correlación de Pearson (r) iguales a 0.92 y 0.95, respectivamente.

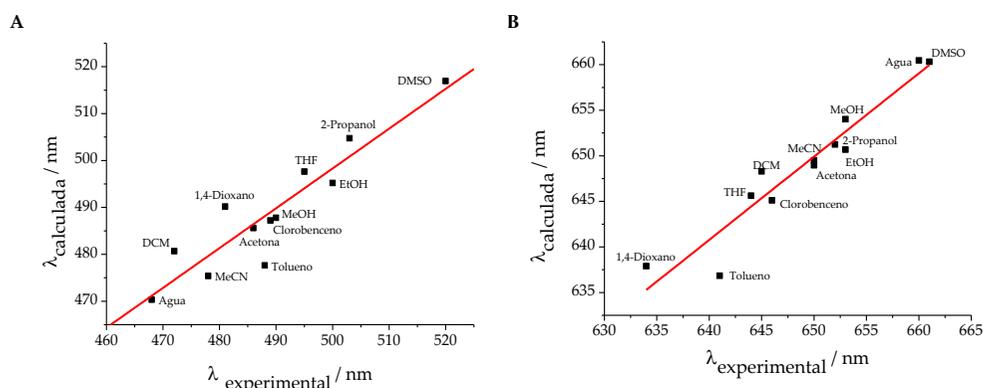


Fig. IV.4. A) Representación de los λ máximos de absorción calculados mediante el ajuste lineal de Catalán frente a los λ máximos de absorción experimentales ($r = 0.92$). B) Representación de los λ máximos de emisión calculados mediante el ajuste lineal de Catalán frente a los λ máximos de emisión experimentales ($r = 0.95$).

Dichos valores demuestran la bondad del ajuste lineal y, por ende, del método de Catalán. A continuación, eliminando uno a uno los parámetros de la ecuación de Catalán (ver sección III.3.10.1-ecuación III.5) y analizando los efectos en el ajuste lineal, se puede determinar el parámetro que tiene mayor influencia sobre las propiedades fotofísicas del DCM-NH₂.

Tabla IV.2. Valores del análisis de Catalán.

Absorción	r	Emisión	r
Todos los parámetros	0.9179	Todos los parámetros	0.9542
sin SA	0.9135	sin SA	0.8906
sin SP	0.7900	sin SP	0.9034
sin SB	0.3581	sin SB	0.9349
sin SdP	0.9148	sin SdP	0.6913

El análisis detallado de los resultados muestra que el parámetro que exhibe mayor influencia en los espectros de absorción es la basicidad (SB) del disolvente, aunque la polarizabilidad (SP) también influye. Por el contrario, los parámetros que más afectan a los espectros de emisión son la dipolaridad (SdP) y la acidez (SA) (ver tabla IV.2).

El desplazamiento al rojo del máximo de emisión con el aumento de la polaridad del disolvente se debe a una transferencia de carga intramolecular y al aumento concomitante del momento dipolar durante la excitación (284). Los estudios del tiempo de vida de fluorescencia del DCM en un gran número de disolventes confirmaron además que la naturaleza del disolvente desempeña un papel importante en los procesos de decaimiento del estado excitado (308); por lo tanto, la elección del disolvente para los estudios *in vitro* con DCM es de gran importancia (309). Basándonos en el trabajo previo y en los resultados obtenidos, el DMSO parece ser el más adecuado en vista del mayor tiempo de decaimiento de la fluorescencia y de la baja eficiencia de fotoisomerización (308), además de su mayor Φ . Además, dicho cosolvente presenta la ventaja de ser miscible en agua en cualquier proporción.

No obstante, para conocer cuál es realmente la cantidad mínima necesaria de DMSO a utilizar, se midió la intensidad de fluorescencia a 662 nm de disoluciones de DCM-NH₂ con diferentes porcentajes de DMSO, excitando por un lado a 480 nm, correspondiente al máximo de absorción del DCM-NH₂; y por otro a 458 nm que, como se ha visto en la figura IV.1A, es la longitud de onda coincidente con el punto isobéptico entre el sustrato y el colorante (ver figura IV.5).

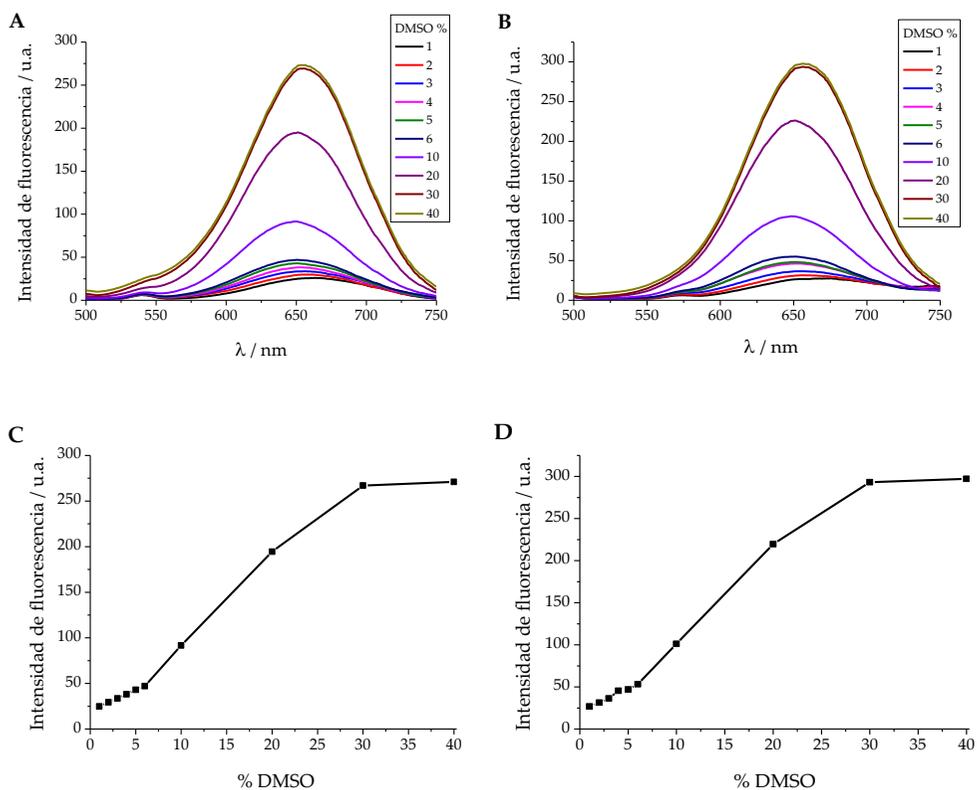


Fig. IV.5. Espectros de emisión de disoluciones de DCM-NH₂ (5 μM) con diferentes porcentajes de DMSO excitando a 458 nm (A) y 480 nm (B). Valores máximos de intensidad de fluorescencia frente a las concentraciones de DMSO excitando a 458 nm (C) y 480 nm (D).

Como se puede comprobar, las señales de intensidad de fluorescencia, por un lado, no variaron sensiblemente utilizando una u otra longitud de onda de excitación. Por otro, se demuestra que éstas son mucho mayores a medida que se aumenta la proporción de DMSO utilizada, hasta llegar al máximo empleando el 30 %, donde a partir de ahí el aumento es poco significativo. Por debajo del 30 % de DMSO se produce la precipitación del colorante a las concentraciones de trabajo empleadas, tal y como se observa en la figura IV.6.



Fig. IV.6. Fotografía tomada durante la preparación de la disolución del DCM-NH₂ en DMSO al 20 %.

Finalmente, y para completar el análisis fotofísico del colorante, se llevó a cabo un estudio de fotoestabilidad y sensibilidad al pH del mismo. En la figura IV.7A se muestran los espectros de emisión ($\lambda_{exc} = 480$ nm) de disoluciones de DCM-NH₂ (7 μ M), además de los valores de intensidad obtenidos en el máximo de emisión (a 662 nm), en función del pH. La figura IV.7B, en cambio, muestra la intensidad normalizada en el máximo valor del DCM-NH₂ ($\lambda_{exc} = 480$ nm), así como de un patrón estándar utilizado, en este caso, la fluoresceína ($\lambda_{exc} = 494$ nm), continuamente irradiados con una lámpara de Xenón.

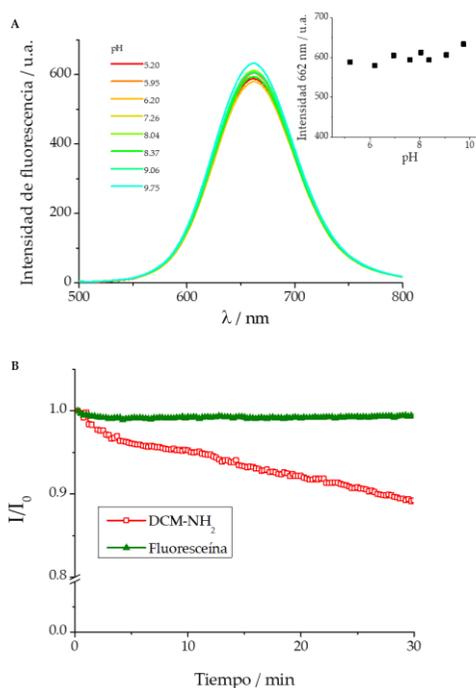


Fig. IV.7. A) Espectros de emisión del DCM-NH₂ (7 μ M) en PBS/DMSO (7/3, v/v) a diferentes valores de pH. La figura insertada representa el máximo de la intensidad de fluorescencia en función del pH. B) Intensidad de fluorescencia normalizada en su máximo al tiempo inicial de fluoresceína y DCM-NH₂ continuamente irradiada con una lámpara de Xenon.

Los resultados en la figura IV.7 obtenidos revelan, por un lado, una baja influencia en el rango de pH entre 5.20 y 9.75 en la emisión del fluoróforo, y por otro, una adecuada fotoestabilidad, si se compara con la fluoresceína, una de las referencias más empleadas por su elevado rendimiento cuántico, y poco fotoblanqueamiento. Así, después de 30 min, se detecta una disminución en la intensidad del 10 %.

IV.2.1.2. Caracterización fotofísica de la reacción enzimática

Una vez caracterizado espectralmente el fluoróforo, se procedió al estudio de la reacción enzimática. La adición de pepN ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$) purificada a la disolución de DCM-NH-Ala $10 \mu\text{M}$ en PBS/DMSO (7/3, v/v), 10 mM , y pH = 7.4, dio lugar a una disminución con el tiempo de la banda de absorción con $\lambda_{\text{max}} = 440 \text{ nm}$, que corresponde al derivado de la alanina, junto con un aumento concomitante de la banda de absorción con máximo a 480 nm , que se atribuye al DCM-NH₂, así como a la aparición de un punto isobéptico a 458 nm . De forma cuantitativa, se muestra la disminución, durante el transcurso de la reacción enzimática, del valor de absorbancia a 440 nm y el aumento del valor a 480 nm , tal y como se muestra en la figura IV.8.

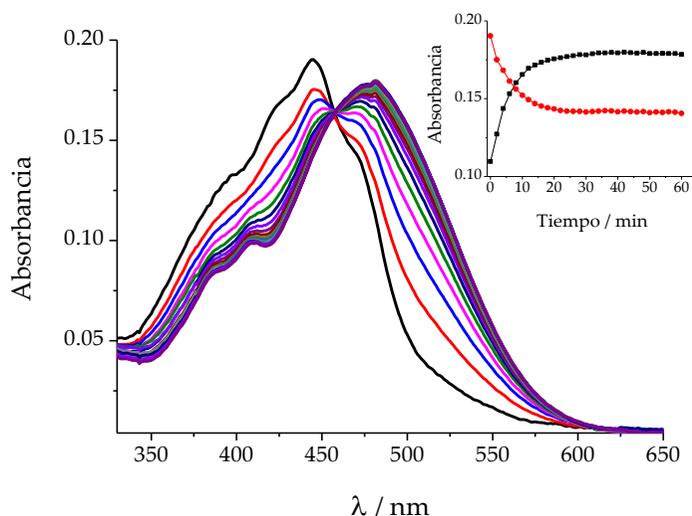


Fig. IV.8. Evolución de los espectros de absorción de DCM-NH-Ala ($10 \mu\text{M}$) con pepN ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$) cada 2 min durante 1 h a $37 \text{ }^\circ\text{C}$. La representación insertada muestra los valores máximos de absorbancia a 480 nm (línea negra) y 440 nm (línea roja) frente al tiempo.

Como se puede observar en la figura IV.9, el espectro de absorción normalizado que resulta tras la adición de la enzima cuando ha transcurrido 1 h coincide con el del DCM-NH₂ libre, lo que indica sin ambigüedad que la banda que se genera a 480 nm corresponde con la aparición del colorante DCM-NH₂.

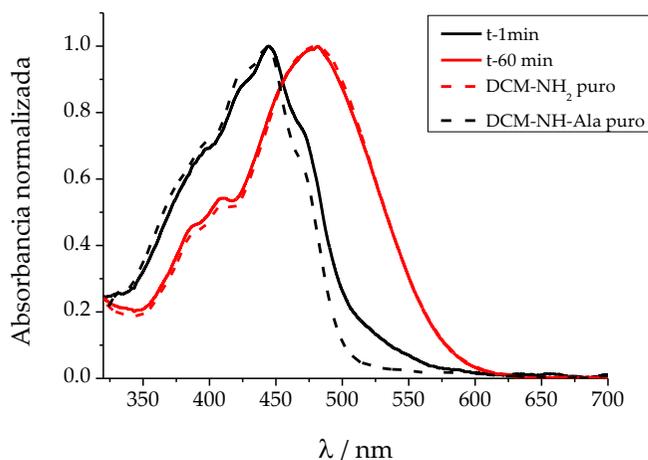


Fig. IV.9. Espectros de absorción normalizados de los compuestos puros DCM-NH-Ala (línea negra discontinua) y DCM-NH₂ (línea roja discontinua), y de los espectros recogidos a 1 min (línea negra) y a los 60 min (línea roja) desde que se inició la reacción.

En consonancia, los espectros de emisión de las disoluciones cuando se excitan en el punto isobéptico muestran una disminución de la señal a 540 nm y el aumento simultáneo de la banda con pico a 662 nm, cuyos valores pueden observarse en la gráfica insertada (figura IV.10).

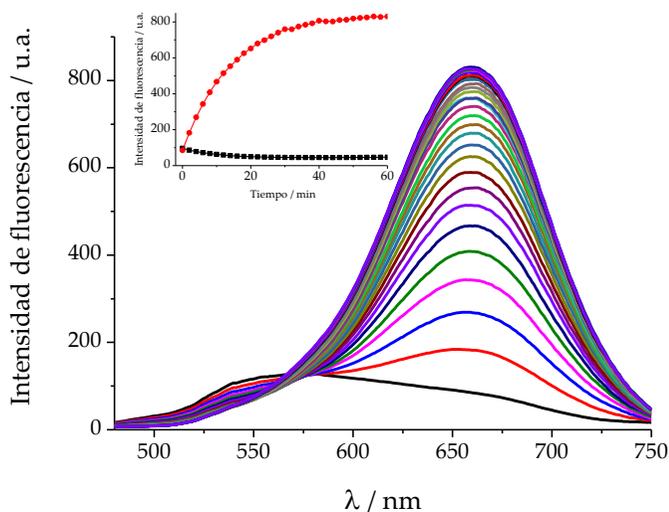


Fig. IV.10. Evolución de los espectros de emisión de DCM-NH-Ala ($10 \mu\text{M}$) con pepN ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$) observados cada 2 min durante 1 h mediante excitación a 458 nm a $37 \text{ }^\circ\text{C}$. La representación insertada muestra la intensidad máxima de fluorescencia a 662 nm (línea roja) y la disminución de intensidad a 540 nm (línea negra) frente al tiempo.

Es interesante hacer notar que para el estudio de la reacción enzimática del DCM-NH-Ala se utiliza la intensidad de fluorescencia a la longitud de onda de 540 nm, en lugar de la del máximo del sensor ($\sim 571 \text{ nm}$). Esto se debe a que en el máximo se produce inicialmente una ligera disminución, seguida de un aumento con el tiempo debido a la influencia de la fuerte emisión del DCM-NH₂ liberado, tal y como se demuestra en la figura IV.11.

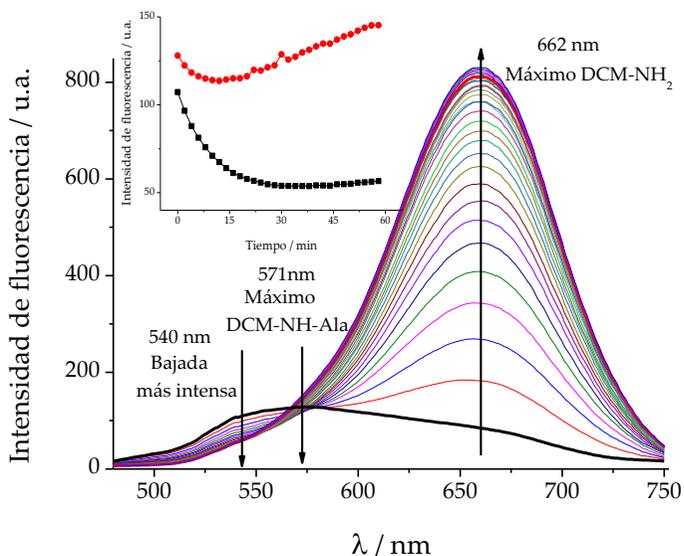


Fig. IV.11. Evolución de los espectros de emisión de DCM-NH-Ala ($10 \mu\text{M}$) con pepN ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$) cada 2 min durante 1 h mediante excitación a 458 nm a $37 \text{ }^\circ\text{C}$. La representación insertada muestra el aumento de la intensidad de fluorescencia a 571 nm (línea roja) y la disminución de la intensidad a 540 nm (línea negra) frente al tiempo.

En la figura IV.12 se puede observar la representación gráfica del cociente entre las intensidades de la señal a 662 y la de 540 nm frente al tiempo tras la adición de la enzima alanina aminopeptidasa.

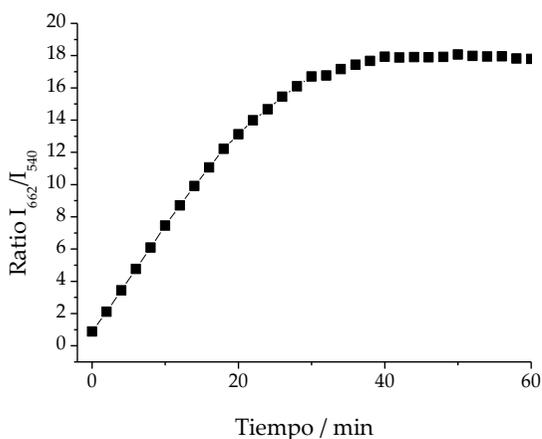


Fig. IV.12. Medidas ratiométricas de las señales de fluorescencia de I_{662}/I_{540} de la figura IV.10 a diferentes tiempos.

Es importante destacar que la relación entre estas dos señales de fluorescencia I_{662}/I_{540} alcanza la máxima sensibilidad, aumentando en 18 veces, después de 40 min y manteniéndose constante después de este tiempo.

Para determinar de forma inequívoca que el aumento de la relación de fluorescencia mencionada era debida a la actividad de la pepN, se mezclaron diferentes concentraciones del inhibidor específico bestatina con disoluciones de sustrato a la misma concentración y de enzima. En la figura IV.13, se muestran los espectros de absorción de esas disoluciones, recogidos cada 5 min, durante 1 h.

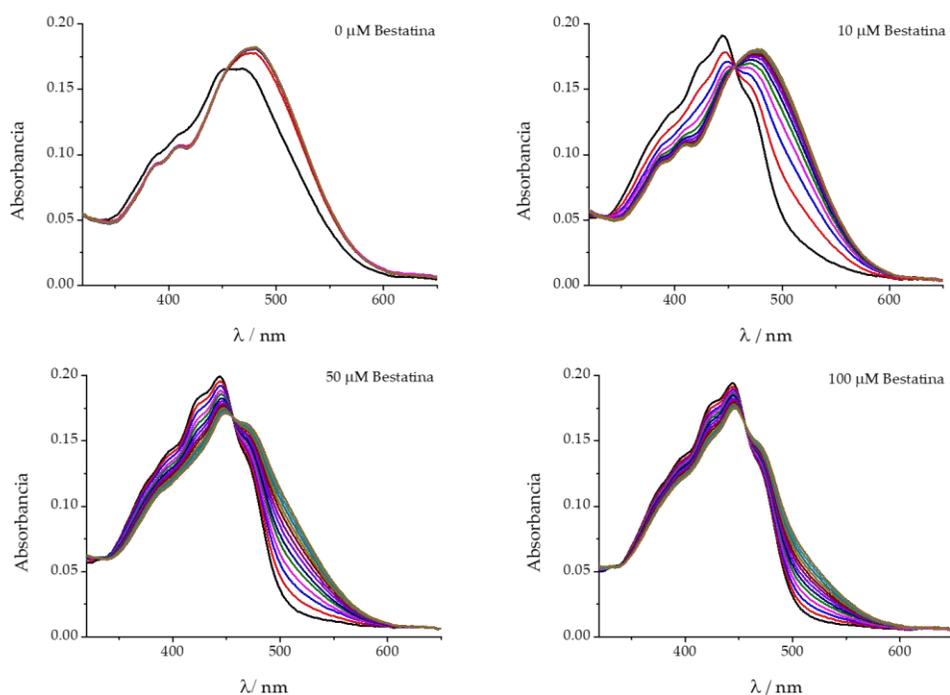


Fig. IV.13. A) Espectros de absorción de DCM-NH-Ala ($10 \mu\text{M}$) en presencia de alanina aminopeptidasa ($5 \mu\text{g mL}^{-1}$) y bestatina a diferentes concentraciones durante 1 h.

La representación de la absorbancia registrada a 480 nm frente al tiempo a diferentes concentraciones de bestatina se recoge en la figura IV.14.

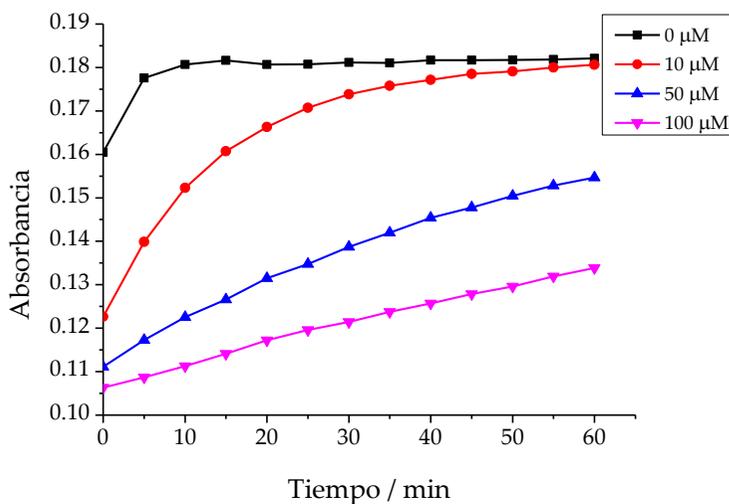


Fig. IV.14. Representación de la absorbancia a $\lambda = 480$ nm frente al tiempo para las diferentes disoluciones de la sonda (DCM-NH-Ala) con alanina aminopeptidasa a diferentes concentraciones de bestatina.

Los espectros de absorción mostraban una rápida velocidad de liberación del fluoróforo DCM-NH₂ cuando no había bestatina; sin embargo, la adición del inhibidor producía una disminución en la velocidad de aparición de la banda roja ($\lambda = 480$ nm) dependiente de la concentración de bestatina.

Sin inhibidor, la reacción es casi instantánea, alcanzándose a los cinco minutos prácticamente el máximo valor de absorbancia.

Los espectros de emisión en presencia del inhibidor de la alanina aminopeptidasa se recogen en la figura IV.15.

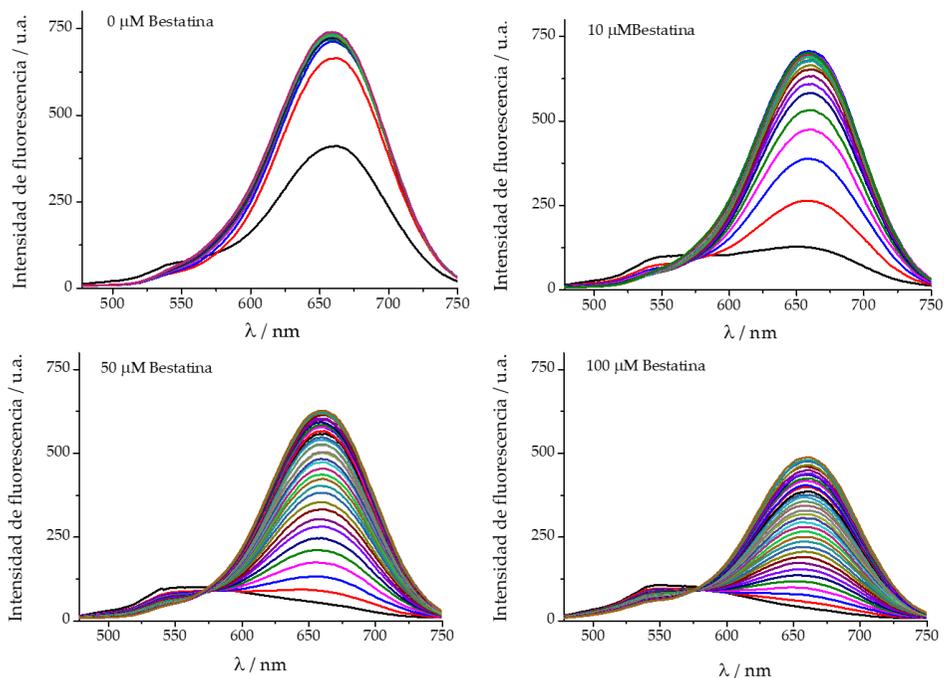


Fig. IV.15. Espectros de emisión de DCM-NH-Ala ($10 \mu\text{M}$) en presencia de alanina aminopeptidasa ($5 \mu\text{g mL}^{-1}$) y bestatina a diferentes concentraciones durante 1 h con excitación a $\lambda=458 \text{ nm}$.

La representación de la intensidad de fluorescencia a 662 nm frente al tiempo a diferentes concentraciones de bestatina se recoge en la figura IV.16.

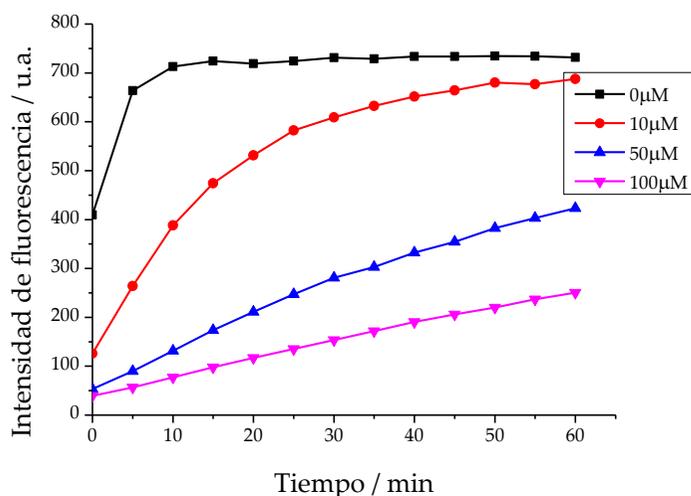


Fig. IV.16. Representación de la emisión en el máximo $\lambda = 662$ nm frente al tiempo para las diferentes disoluciones de sonda (DCM-NH-Ala) con alanina aminopeptidasa a las diferentes concentraciones de bestatina.

De forma similar a la absorbancia, la señal de fluorescencia a 662 nm disminuye en presencia del inhibidor de pepN. Esta disminución depende de la concentración de bestatina. En ausencia del inhibidor, se observa una rápida aparición del pico a 662 nm, que se asocia con el DCM-NH₂ liberado. La incorporación de bestatina ralentiza la velocidad de reacción y produce una disminución de la señal de fluorescencia a 662 nm en el mismo tiempo. Dado que la bestatina no afecta a la emisión del DCM-NH₂, el pico significativo de la banda fluorescente NIR a 662 nm se atribuye al DCM-NH₂ liberado por la escisión específica del enlace amida debido a la actividad de pepN.

Considerando la figura IV.8, la concentración máxima de DCM-NH₂ se alcanzó después de aproximadamente 20 min y el aumento del tiempo a un valor considerablemente superior ($t = \infty$) no proporcionó una concentración de DCM-NH₂ equivalente al sustrato inicialmente añadido (10 μM). Así, se puede comparar el espectro resultante final con el espectro de absorción del producto DCM-NH₂ a esa misma concentración (figura IV.2A). Este resultado posiblemente se debe al efecto desnaturizante del DMSO sobre la estructura de la proteína.

Dado que la influencia del DMSO es diferente según la proteína (310), para establecer el efecto de una concentración del 30 % de DMSO en la actividad de la pepN, se realizó un experimento en el que se añadieron 0.15 mL de sustrato a 1.5 mL de enzima disuelta en PBS y a los mismos 1.5 mL de enzima pero previamente incubados durante 20 min en 7/3 PBS/DMSO. Los espectros de absorción y fluorescencia (excitando a 550 nm para ver sólo el producto de la reacción DCM-NH₂) de cada disolución se registraron a diferentes tiempos, lo que permitió comparar las velocidades a las que la enzima generaba el producto de reacción en ambas muestras. Los espectros registrados se representan en las figuras IV.17.

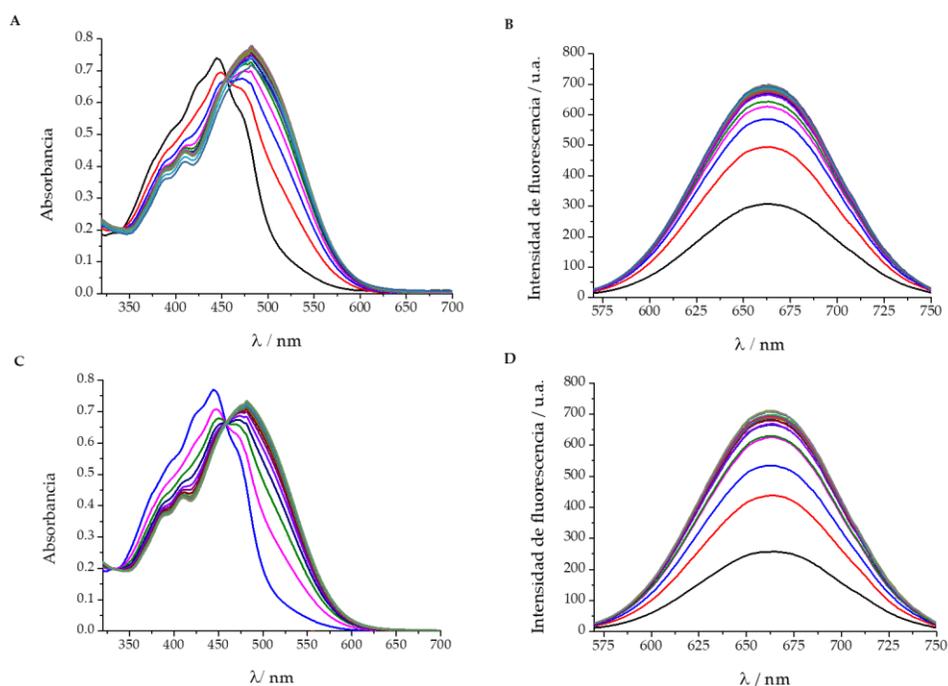


Fig. IV.17. Espectros de absorción (A) y fluorescencia (B) ($\lambda_{exc}= 550$ nm) a diferentes tiempos de disoluciones de DCM-NH-Ala con PBS/DMSO (7/3) añadidas a la pepN $5\mu\text{g mL}^{-1}$ sin incubación previa en PBS/DMSO (7/3). Espectros de absorción (C) y fluorescencia (D) a diferentes tiempos de disoluciones de DCM-NH-Ala en PBS/DMSO (7/3) añadidas a la pepN $5\mu\text{g mL}^{-1}$ previamente incubada durante 20 min en PBS/DMSO (7/3). Los espectros se registraron cada 5 min hasta un tiempo total de 90 min.

La representación de los valores de absorbancia y emisión (derivados de la figura IV.17) a lo largo del tiempo son representados en la figura IV.18.

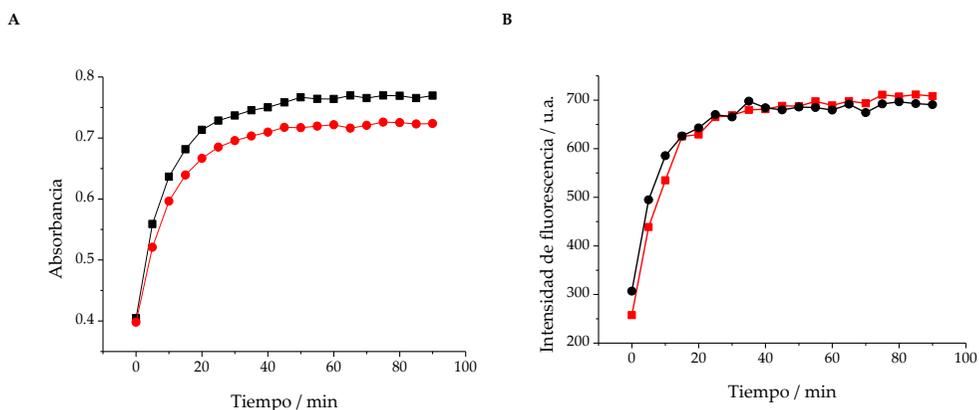
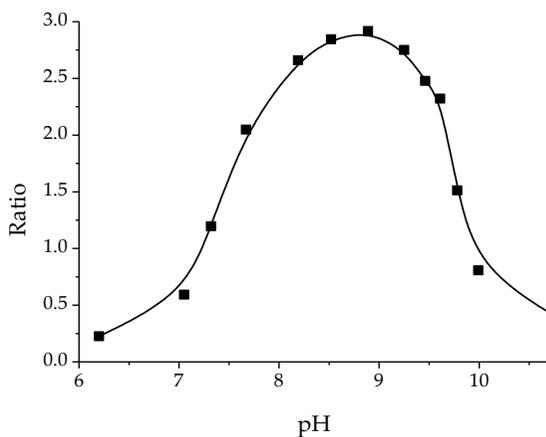


Fig. IV.18. Valores máximos de absorbancia a $\lambda = 480$ nm de la reacción con la enzima incubada previamente en DMSO (línea roja), y con la enzima sin incubación previa en DMSO (línea negra) frente al tiempo. Datos de las figuras IV.16A y IV.17A, respectivamente. B) Valores máximos de fluorescencia a $\lambda = 662$ nm de la reacción con la enzima que se incubó previamente en DMSO (línea roja), y con la enzima sin incubación previa en DMSO (línea negra) frente al tiempo. Datos de las figuras IV.16B Y IV.17B, respectivamente.

De la observación de las figuras IV.16 a IV.18 se infiere claramente que la incubación previa del enzima con DMSO, apenas afecta a la velocidad inicial de la reacción enzimática. Además, después de 25 min se alcanzó una señal similar en ambas disoluciones. A la luz de estos resultados, se puede concluir que distintos tiempos de incubación con un 30 % de DMSO, necesario para una adecuada solubilidad de la sonda, para realizar estudios *in vitro* no produciría errores sustanciales en los parámetros que describen la reacción enzima-sustrato.

Por otro lado, se comprobó la eficacia de la actividad enzimática a diferentes valores de pH. Para ello, se prepararon 12 disoluciones de distinto pH con DCM-NH-Ala (10 μ M) y pepN (5 μ g/mL), y se recogieron sus espectros de emisión, transcurridos 40 min de incubación. En la figura IV.19A se representan los valores ratiométricos de las señales I_{662}/I_{540} de las diferentes muestras, que es concordante con la tonalidad que adquiere la disolución, mostrada en la figura IV.19B.

A



B

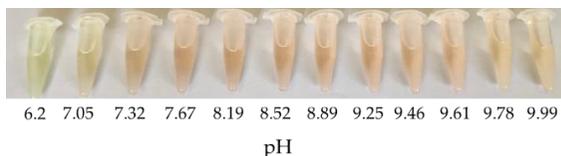


Fig. IV.19. A) Medidas ratiométricas de disoluciones de DCM-NH-Ala ($10 \mu\text{M}$) y pepN ($5 \mu\text{g mL}^{-1}$) a diferentes valores de pH, tras 40 min de incubación. B) Fotografías de las muestras.

A partir de los resultados obtenidos, se puede deducir que a un pH entre 8.52 y 9.25 se obtienen los mayores valores en las medidas ratiométricas, y por ende, donde la enzima presenta mayor actividad (figura IV.19A). Del mismo modo, se observa que la mayor coloración rojiza, debida al producto DCM-NH₂, se manifiesta en esos valores de pH (ver figura IV.19B).

No obstante, pese a ello, se decidió trabajar en condiciones de pH igual a 7.5, coincidente con el pH fisiológico, y donde la pepN presenta una actividad bastante razonable.

IV.2.2. Parámetros cinéticos según el modelo de Michaelis-Menten de la reacción enzimática DCM-NH-Ala – pepN

Como ya se ha comentado, ambas especies DCM-NH₂ y DCM-NH-Ala son excitadas por igual a la longitud de onda del punto isobéptico (458 nm). Sin embargo, al excitar a esta longitud de onda, la señal ratiométrica no es una medida directa del colorante libre liberado en la reacción enzimática, no siendo por tanto una medida fiable para el cálculo de las constantes cinéticas.

Por ello, sería necesario realizar correcciones basadas en los coeficientes de extinción molar y los rendimientos cuánticos de ambas especies para conseguir un valor preciso de la velocidad inicial de la reacción enzimática. Para evitar hacer estas correcciones, las disoluciones utilizadas para calcular los parámetros característicos de la cinética de reacción enzimática se excitaron a una longitud de onda de 550 nm en la que el DCM-NH-Ala prácticamente no absorbe, tal y como se muestra en la figura IV.8. Así, la excitación a 550 nm genera espectros de emisión esencialmente iguales, independientemente de las cantidades relativas de sustrato y producto que haya en la disolución a diferentes tiempos de reacción y, por lo tanto, genera señales de fluorescencia que son proporcionales a la concentración del producto de reacción (ver figuras IV.17 B y D).

Teniendo en cuenta la información anterior, se estudió la cinética de la reacción enzimática siguiendo el modelo de Michaelis-Menten. En primer lugar, se hizo un ajuste no lineal entre la intensidad de la fluorescencia a 662 nm y la cantidad de DCM-NH₂ (figura IV.20).

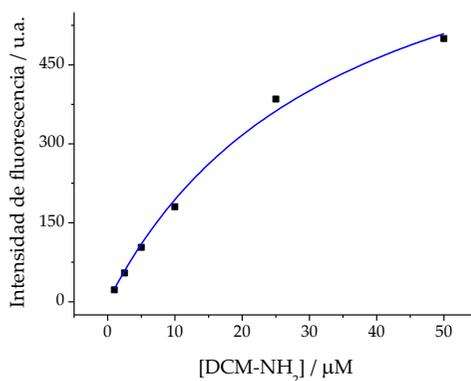


Fig. IV.20. Relación experimental entre las intensidades de fluorescencia y las concentraciones de DCM-NH₂. El ajuste se logró utilizando la ecuación de una hipérbola rectangular ($R^2 = 0.994$).

Seguidamente, se recogieron las intensidades de emisión a $\lambda = 662$ nm (máximo de emisión del producto liberado DCM-NH₂) de disoluciones con distinta concentración de sustrato e igual de enzima. Mediante el ajuste no lineal de la figura IV.20, se transformó esta intensidad de fluorescencia en la concentración del producto de la reacción (ver figura IV.21). Para ello, las condiciones instrumentales del fluorímetro fueron las mismas.

Para resolver la cinética, se calcularon las velocidades iniciales de la reacción mediante ajustes lineales de las cinéticas de las diferentes concentraciones iniciales de sustrato a partir de la señal de fluorescencia del DCM-NH₂ liberado. Los datos de las velocidades iniciales se contemplan en la tabla IV.3.

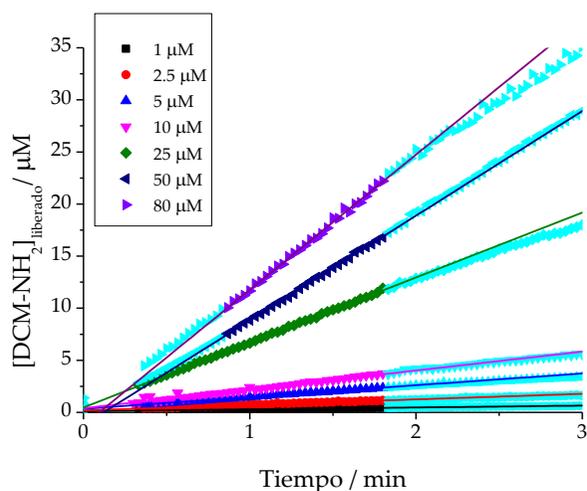


Fig. IV.21. Aumento de DCM-NH₂ a distintos tiempos con DCM-NH-Ala a diferentes concentraciones (indicadas en la figura) y pepN (5 μg mL⁻¹).

Tabla IV.3. Velocidades iniciales obtenidas a las distintas concentraciones de sustrato.

[DCM-NH-Ala] / μM	Velocidad inicial / mM min ⁻¹	R ²
1	0.002	0.99
2.5	0.009	0.99
5	0.019	0.99
10	0.029	0.97
25	0.104	0.99
50	0.168	0.99
80	0.215	0.99

La representación de las velocidades iniciales determinadas en la figura IV.21 frente a la concentración inicial de sustrato de acuerdo al modelo de Michaelis-Menten se muestra en la figura IV.22.

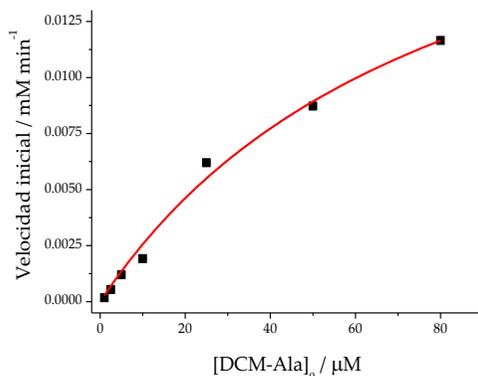


Fig. IV.22. Representación de Michaelis Menten de la reacción enzimática entre pepN y el sustrato DCM-NH-Ala.

El ajuste de regresión no lineal por mínimos cuadrados proporcionó los valores de K_M y v_{max} listados en la tabla IV.4, a través de la ecuación III.1 (sección III.3.10.1). A partir de la v_{max} y la concentración inicial de enzima se calculó la k_{cat} de acuerdo a la ecuación III.3 descrita en la sección III.3.10.1.

Como referencia, se calcularon los mismos parámetros con un método colorimétrico estándar que utiliza clorhidrato de L-alanina-4-nitroanilida como sustrato. Los resultados obtenidos figuran en la figura IV.23, y en la tabla IV.4.

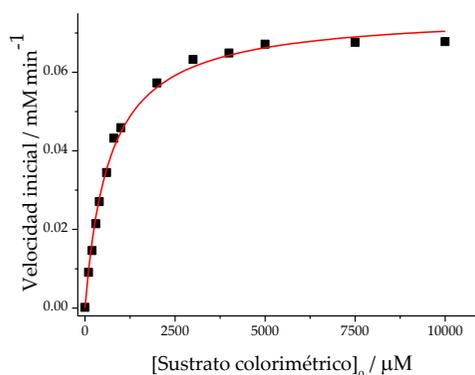


Fig. IV.23. Representación de Michaelis-Menten de la reacción enzimática entre pepN y el sustrato clorhidrato de L-Alanina 4-nitroanilida.

Tabla IV.4. Parámetros cinéticos enzimáticos del DCM-NH-Ala.

	Sustrato	
	DCM-NH-Ala	Clorhidrato de L-alanina-4-nitroanilida
K_M	$0.082 \pm 0.021 \text{ mM}$	$0.68 \pm 0.04 \text{ mM}$
v_{\max}	$(4.8 \pm 0.8) \times 10^{-3} \text{ mM min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$	$(7.3 \pm 0.1) \times 10^{-3} \text{ mM min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$
k_{cat}	$0.47 \pm 0.08 \text{ mM min}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$	$0.72 \pm 0.01 \text{ mM min}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$

El valor de K_M obtenido con el método colorimétrico fue mayor que el obtenido con DCM-NH-Ala y, por tanto, indicó que, para las condiciones experimentales utilizadas, el DCM-NH-Ala tenía una mayor afinidad por el sitio activo de la enzima. Sin embargo, la k_{cat} del DCM-NH-Ala fue significativamente menor que la del sustrato colorimétrico. Estos resultados sugieren que la alta afinidad de pepN por el DCM-NH-Ala también se traduce en una constante cinética de salida del DCM-NH₂ del sitio activo que probablemente ralentiza la velocidad de reacción. Esta diferencia podría verse potenciada por el uso de DMSO para el DCM-NH-Ala en el medio de reacción. Así, el uso de este cosolvente produce una ligera pérdida de rigidez de la enzima y proporciona una mayor penetrabilidad del sustrato y, por lo tanto, una disminución de la K_M . Sin embargo, esta pérdida de rigidez también puede causar un ligero deterioro de su eficacia disminuyendo la k_{cat} . Efectos similares se han reportado previamente para otras enzimas (311, 312).

Por último, también se midieron las emisiones DCM-NH-Ala y DCM-NH₂ excitadas en el punto isobéptico a diferentes concentraciones de sustrato. Aunque los valores de ratio no pueden utilizarse para calcular los parámetros cinéticos, tal y como se ha comentado anteriormente, los resultados confirman que las medidas ratiométricas pueden utilizarse como señales para monitorizar la actividad de pepN (ver figura IV.24).

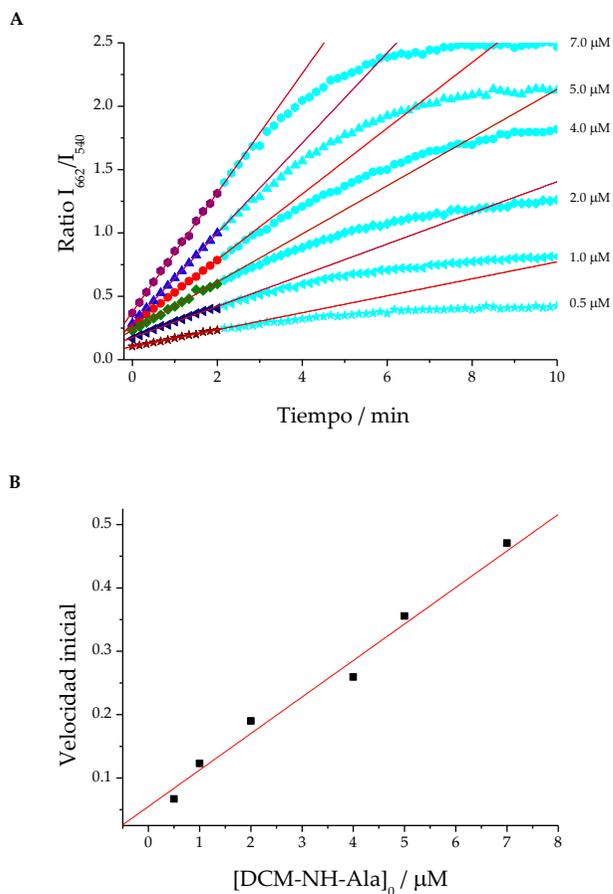


Fig. IV.24. Representación de las medidas ratiométricas frente al tiempo de disoluciones de DCM-NH-Ala a diferentes concentraciones. (B) Velocidades iniciales de las medidas ratiométricas frente a la concentración de sustrato.

De la observación de la figura IV.24 se puede decir que un aumento en la concentración de sustrato implica un aumento en la velocidad inicial de la reacción enzimática.

IV.2.3. Aplicaciones biológicas del DCM-NH-Ala

IV.2.3.1. Seguimiento ratiométrico de la actividad endógena de la pepN en bacterias

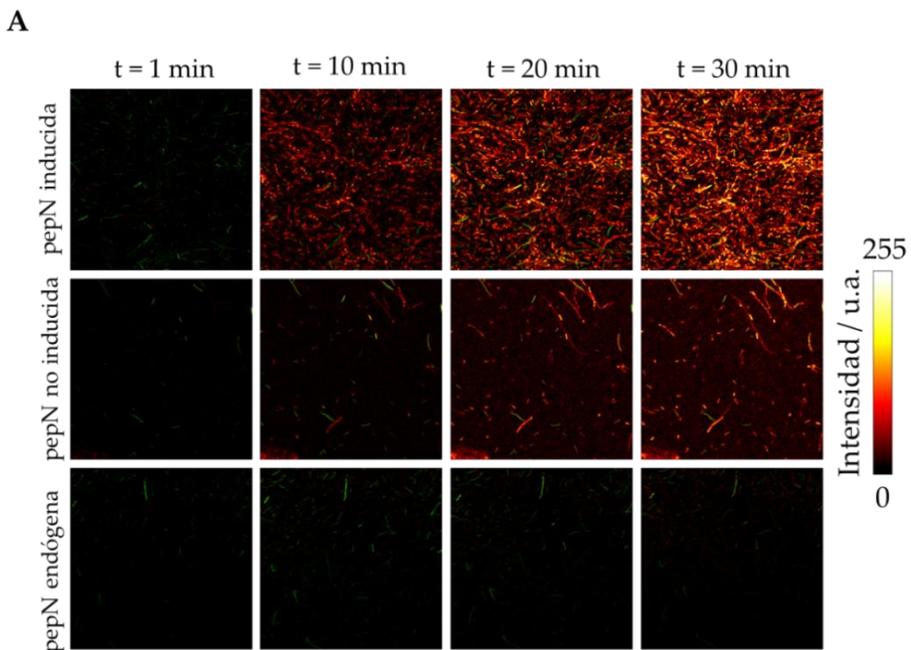
Una vez determinadas las características espectrales y cinéticas de la reacción enzimática entre el DCM-NH-Ala y la alanina aminopeptidasa *in*

vitro y dado que el propósito de esta investigación es desarrollar una nueva metodología para la identificación de las bacterias Gram (-) que expresen actividad pepN, se examinó el rendimiento de la sonda en bacterias mediante microscopía de fluorescencia de uno y dos fotones, teniendo en cuenta la excelente biocompatibilidad que el DCM-NH₂ ha mostrado en estudios previos en células vivas (313).

Se eligió *E. coli* como modelo bacteriano. Para los ensayos, se seleccionaron dos clones. Como bacteria control, se utilizaron células XL1-azul transformadas con un plásmido (pequeña molécula de ADN circular extracromosómico capaz de replicarse de forma independiente del cromosoma bacteriano) que codifica una proteína verde fluorescente GFP. En estas bacterias, se detectó el nivel basal de actividad de pepN endógena. Además, la fluorescencia de la GFP permite diferenciar estas bacterias de otras. El segundo clon utilizado se corresponde con células competentes XL1-azul transformadas con el plásmido pMAL-TEV-pepN-His. En estas bacterias se pudo detectar una mayor expresión del producto génico pepN incluso sin la adición de isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) como inductor debido a la incorporación del plásmido de expresión (314). Finalmente, un tercer grupo de muestras fue aquel en el que las bacterias que albergaban el plásmido pMAL-TEV-pepN-His fueron inducidas con IPTG para aumentar la actividad de pepN. Las diferentes muestras se excitaron con dos fotones de 800 nm, y se registró la fluorescencia en los canales verde (500-580 nm) y rojo (580-700 nm).

La figura IV.25 muestra imágenes de las bacterias a cuatro tiempos distintos (A) junto con la fluorescencia medida en el canal rojo a cada minuto para las tres cepas de *E. coli* (B). Como se ha comentado, como control, se emplearon bacterias de *E. coli* que expresan GFP para enfocar el microscopio a tiempo cero. Cabe señalar que en esta figura no se muestra la fluorescencia en el canal verde porque al añadir la GFP, no se puede utilizar la emisión en verde del DCM-NH-Ala para obtener una señal ratiométrica, debido a que interfiere significativamente en los cálculos de la relación. Además, la GFP fue útil para identificar las bacterias que sobreexpresaban (o no) pepN. De hecho, las bacterias que sobreexpresan pepN muestran una señal roja cuya intensidad es el doble de la correspondiente a las bacterias con expresión de pepN no inducida y diez veces mayor que la intensidad de la señal de las

bacterias que carecen de este plásmido. Por tanto, la cinética de aparición de la emisión depende de las concentraciones intracelulares de pepN. Todos estos resultados indican que la sonda penetra espontáneamente en las bacterias Gram (-) y es capaz de revelar con gran sensibilidad la presencia de pepN en el interior de las bacterias mediante la fluorescencia emitida tras la excitación con dos fotones de 800 nm. En este punto, dado que la mayor virulencia de la patogenicidad en microorganismos está relacionada con una mayor actividad en la enzima pepN (315), cabe destacar que la ventaja de poder detectar diferentes expresiones de esta enzima proporciona una poderosa herramienta para localizar diversos agentes bacterianos virulentos, además de permitir discriminar entre diferentes microorganismos patógenos.



B

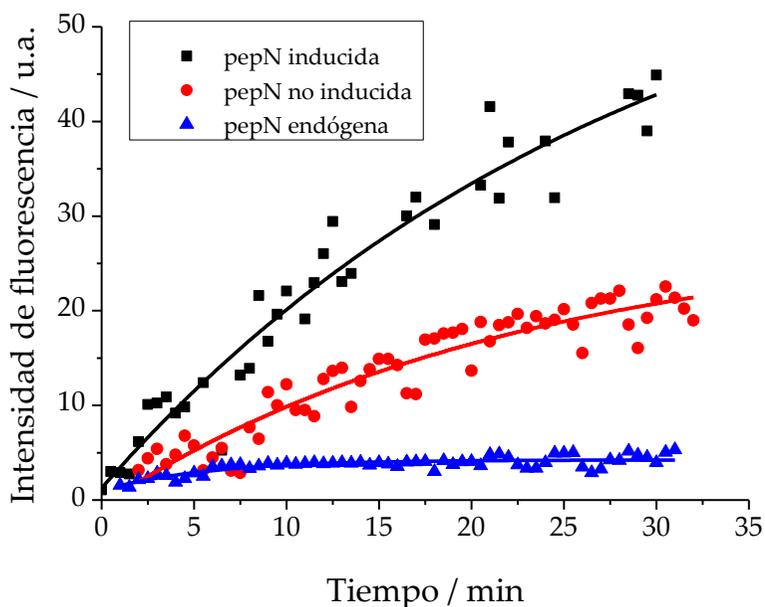


Fig. IV.25. A) Imágenes de distintas cepas de *E. coli* incubadas con DCM-NH-Ala ($5 \mu\text{M}$) a diferentes tiempos mediante microscopía multifotónica ($\lambda_{\text{ex}} = 800 \text{ nm}$). B) Representación de la intensidad de fluorescencia en el canal rojo ($\lambda_{\text{em}} = 580\text{-}700 \text{ nm}$) de las diferentes cepas bacterianas a distintos tiempos.

Para demostrar sin lugar a dudas que la emisión NIR se debe al DCM-NH₂ liberado por la reacción enzimática de la pepN intrabacteriana, se realizó el siguiente experimento. Por un lado, se preincubó *E. coli* de la cepa sobreexpresada de pepN con el inhibidor competitivo bestatina (0.5 mM) durante 10 min , y posteriormente se le adicionó la sonda DCM-NH-Ala ($10 \mu\text{M}$) en PBS/DMSO ($7/3, \text{ v/v}$), $\text{pH } 7.4$ y se incubó durante 30 min más. Por otro, en ausencia de inhibidor, se incubó otra muestra de esta misma cepa con la misma concentración de sonda y durante el mismo tiempo. Seguidamente, se tomaron imágenes de ambas muestras hasta un tiempo total de 20 min . En la figura IV.26, se muestran las imágenes ratiométricas calculadas.

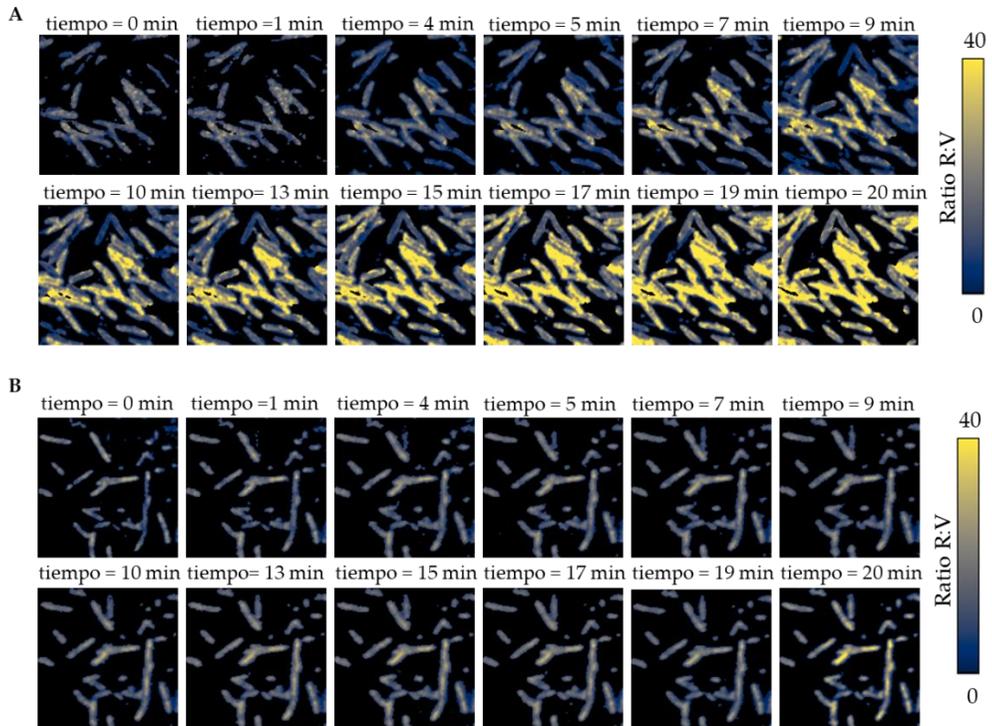


Fig. IV.26. A) Imágenes ratiométricas de la cepa de *E. coli* con pepN inducida a diferentes tiempos. B) La misma cepa de *E. coli* tras la incubación con bestatina (0.5 mM) en diferentes tiempos.

Las cepas de *E. coli* con actividad pepN exhiben una señal de fluorescencia decreciente en el canal verde junto con un aumento concomitante de la señal de fluorescencia NIR en el canal rojo, lo cual es coherente con los cambios espectrales observados *in vitro* y, por tanto, en sus ratios entre los canales rojo:verde, mostrados en la figura IV.26A. Sin embargo, la figura IV.26B muestra que las bacterias incubadas en presencia de bestatina muestran una reducción considerable en el aumento de la fluorescencia NIR debido a la liberación de DCM-NH₂ y exhiben una disminución de 4 veces en la señal ratiométrica tras ~20 min de reacción; este hallazgo demuestra que la formación de DCM-NH₂ es causada por la actividad enzimática de pepN. Para una mejor comparación, los valores medios de la ratio de intensidad de fluorescencia entre los canales rojo y verde de las bacterias se representan en la figura IV.27.

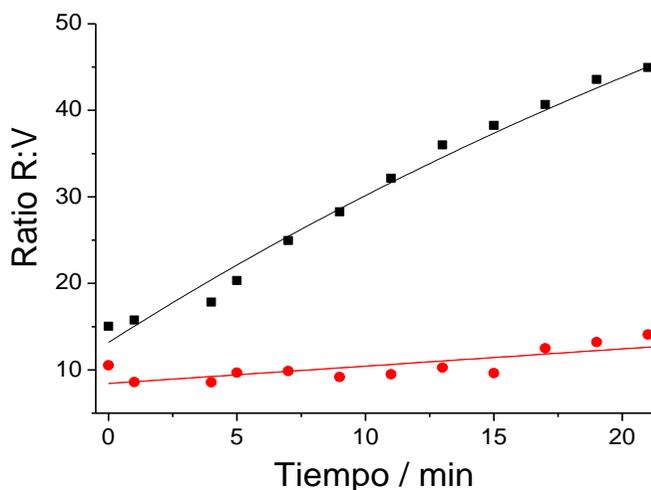


Fig. IV.27. Representación de los valores de la ratio R:V tanto del control sin inhibidor (línea negra) como de las bacterias con bestatina (línea roja) a diferentes tiempos.

La microscopía multifotónica permite la imagen tridimensional *in vivo* con una resolución submicrónica y una alta relación señal/ruido en materiales con alta dispersión. Como las infecciones con microorganismos Gram (-) pueden producirse en tejidos, resulta de gran utilidad detectar la señal fluorescente a distintas profundidades, es decir a distintos planos z. Para ello, se realizaron experimentos para comparar los resultados obtenidos mediante la excitación con dos fotones de 800 nm o con un solo fotón de 458 nm. De este modo, se pudo cuantificar la fluorescencia de fondo de los materiales con alta dispersión y el aumento de la profundidad de penetración en estos. Para simular la absorción a partir de medios biológicos (316), en lugar de los medios de cultivo habituales utilizados en el crecimiento de las cepas bacterianas, se utilizó un medio de agar enriquecido con un 15 % de caldo de lisogenia (LB), tal y como se ha relatado en la sección III.3.4, de materiales y métodos. Los resultados obtenidos en tres posiciones z diferentes se muestran en la figura IV.28. El panel A muestra imágenes registradas en el rango de longitudes de onda entre 580 y 700 nm en tres posiciones z arbitrarias diferentes de *E. coli* excitada por un fotón de longitud de onda de 458 nm o dos fotones de longitud de onda de 800 nm. Para una mejor visualización, el panel B muestra imágenes ampliadas.

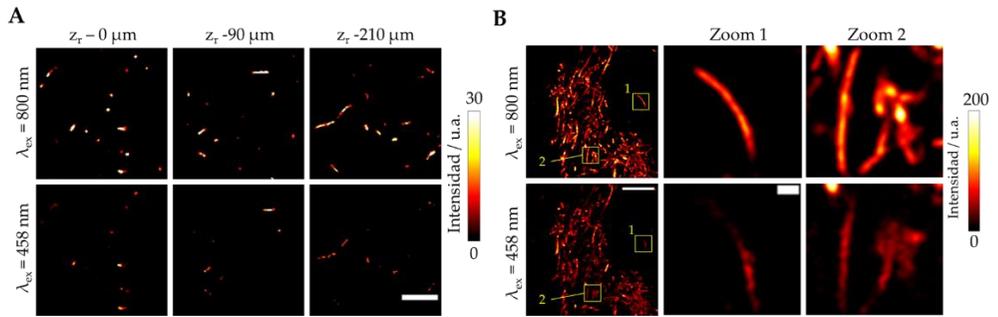


Fig. IV.28. A) Imágenes de *E. coli* obtenidas en un medio de agar extra-enriquecido con LB 15 % ($\lambda_{emisión} = 580-700 \text{ nm}$) a dos longitudes de onda diferentes de excitación $\lambda_{ex} = 800 \text{ nm}$ (panel superior) y 458 nm (panel inferior) en tres posiciones z diferentes. La primera columna indica la z relativa = 0, la segunda columna indica el aumento de la profundidad hasta $90 \mu\text{m}$ y la tercera columna indica el aumento de la profundidad hasta $210 \mu\text{m}$. La barra de escala representa $100 \mu\text{m}$. B) Imágenes ampliadas de *E. coli*. En la primera columna, la barra de escala corresponde a $20 \mu\text{m}$ y las dos columnas siguientes son extra-zoom de los diferentes recuadros en la imagen de la primera columna. La barra de escala en las imágenes aumentadas representa $2 \mu\text{m}$.

En la figura IV.29, se observa la intensidad media del canal rojo y el valor de la intensidad relativa (normalizada por la señal máxima de emisión) entre las imágenes recogidas por excitación con dos fotones y con un fotón obtenidas cada $3 \mu\text{m}$.

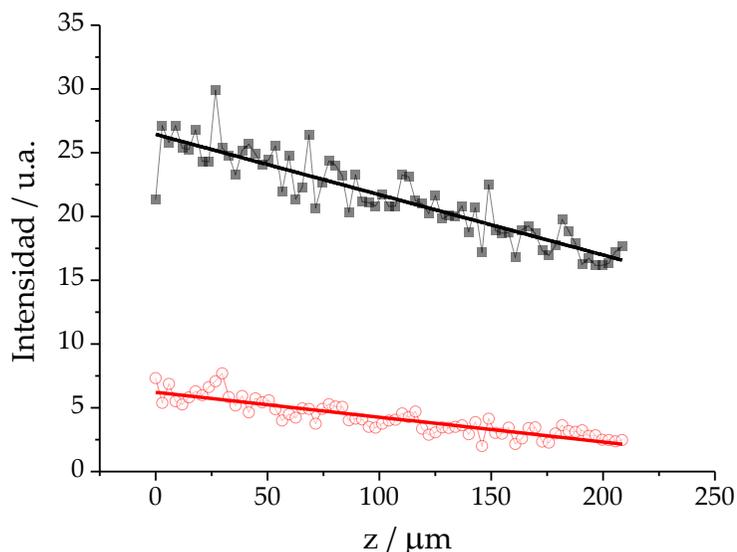


Fig. IV.29. Intensidades medias del canal rojo ($\lambda_{\text{emisión}} = 580\text{-}700\text{ nm}$) de un cultivo bacteriano en medio LB (15 %) en diferentes posiciones z . Se muestra la disminución de la intensidad con el aumento de la profundidad con la excitación por dos fotones (línea negra, $\lambda_{\text{ex}} = 800\text{ nm}$) y con la excitación por un fotón (línea roja, $\lambda_{\text{ex}} = 458\text{ nm}$). Todas las imágenes se obtuvieron tras 30 min de incubación con DCM-NH-Ala para asegurar la presencia de DCM-NH₂.

Es evidente que la intensidad de la fluorescencia emitida cuando la muestra se excita con un solo fotón de 458 nm es menor que la obtenida cuando se excita con dos fotones de 800 nm. Además, ambas intensidades disminuyen cuando aumenta el valor relativo de z_r , aunque la disminución es más pronunciada a mayor profundidad cuando se excita con un solo fotón. A $z_r = 210\ \mu\text{m}$, la fluorescencia procedente de la excitación por un fotón de 458 nm casi desaparece por completo.

Además, otra ventaja importante de la excitación con dos fotones es el aumento de la relación señal-ruido debido no sólo asociado a la mejora de la señal sino también a la disminución del ruido. La figura IV.30 muestra tres imágenes diferentes en tres posiciones arbitrarias de z_r . En este análisis, se generó un perfil de trazado de intensidad frente a la distancia a partir de los tres segmentos indicados en las imágenes, que se muestra en el panel inferior. Cuando un segmento cruza una célula bacteriana, se corresponde con un pico en el perfil de intensidad. Los perfiles superior, medio e inferior corresponden

a los segmentos uno, dos y tres, respectivamente. Los perfiles de las imágenes tras la excitación con dos fotones se representan con el color negro, y los de excitación de un fotón se muestran en rojo.

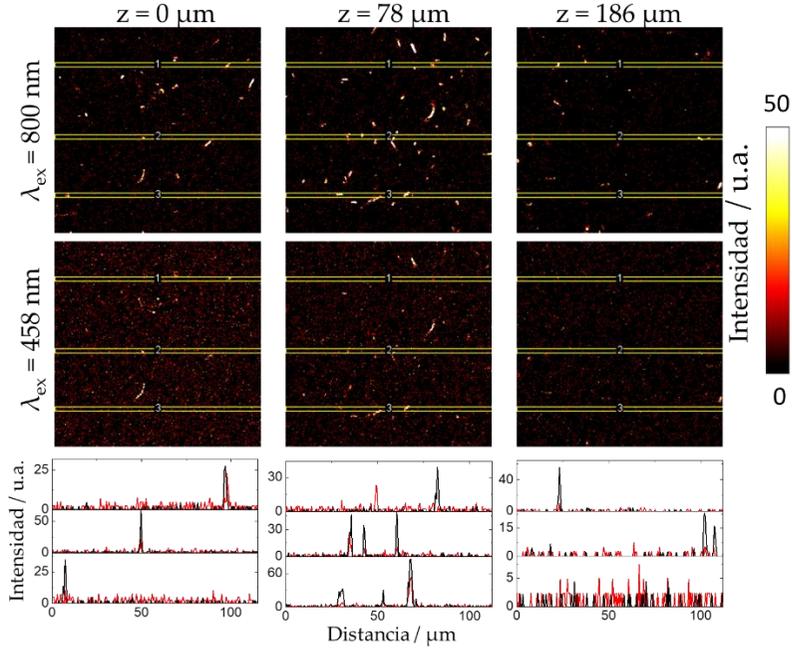


Fig. IV.30. Imágenes obtenidas de *E. coli* en un medio de agar extraenriquecido con LB 15 % ($\lambda_{emisión} = 580-700$ nm) a longitudes de onda de $\lambda_{ex} = 800$ nm (panel superior) y 458 nm (panel inferior) en tres posiciones z diferentes. El panel inferior muestra el perfil de intensidad del canal rojo para las tres marcas indicadas en el panel superior a $\lambda_{ex} = 800$ nm (líneas negras) y $\lambda_{ex} = 458$ nm (líneas rojas) en tres posiciones z diferentes.

De nuevo, y en concordancia con la figura IV.29, la señal de la excitación por dos fotones es más intensa que la correspondiente a la excitación con un fotón. Además, el nivel de ruido observado en la excitación por dos fotones es significativamente menor. Por lo tanto, la combinación de la mayor intensidad junto con la disminución del ruido obtenida tras la excitación de la sonda por dos fotones hace que el empleo de esta técnica proporcione una notable mejora en la determinación de la actividad de la pepN en tejidos o *in vivo*.

La tecnología STED es una técnica de superresolución que permite la superación del límite de difracción de la luz, lo que ha ampliado el campo de la microscopía de fluorescencia hasta la escala nanométrica, permitiendo el

estudio de procesos y estructuras a nivel subcelular no posibles hasta el momento con microscopía óptica de fluorescencia confocal. Para obtener una buena resolución en microscopía STED, es esencial conseguir una buena relación señal/ruido (238). En este sentido, es importante registrar suficientes fotones fluorescentes de las regiones de subdifracción fluorescente y, por lo tanto, el alto brillo y la fotoestabilidad del fluoróforo son requisitos esenciales para su aplicación como sonda de nanoscopia STED. Uno de los inconvenientes para la aplicabilidad de las sondas STED que contienen fluoróforos con propiedades fotofísicas adecuadas es que no son permeables a la membrana celular y, por tanto, no son apropiadas para el etiquetado de organismos vivos, ya que es necesario lavar las muestras para evitar la fluorescencia de fondo. Por tanto, es fundamental para utilizar esta técnica el desarrollo de nuevas sondas fluorescentes que, además de tener las características fotofísicas descritas, presenten una alta permeabilidad celular.

Para demostrar que el DCM-NH₂ cumple los requisitos para su uso como sonda eficaz en microscopía de superresolución, se añadió una disolución de sonda (500 μM) en DMSO, a un cultivo de bacterias de *E. coli* para lograr una concentración final de 5 μM e, inmediatamente, se realizó la medida. Las figuras IV.31 y IV.32 muestran que el fluoróforo penetra rápidamente en el cuerpo bacteriano y se acumula selectivamente en la membrana, lo que es consecuente con el carácter apolar de la sonda. Además, también se observan puntos de mayor intensidad, que probablemente corresponden a regiones de mayor lipofilia y reflejan la heterogeneidad de la membrana.

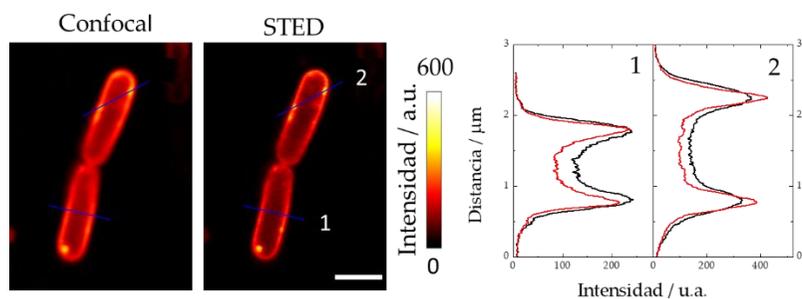


Fig. IV.31. Imágenes obtenidas de *E. coli* mediante microscopía confocal y STED. Las gráficas representan el perfil del trazado (el color negro corresponde a las imágenes confocales y el rojo a las imágenes STED) para las líneas 1 y 2 que se trazan en las imágenes. La barra de escala representa 2 μm.

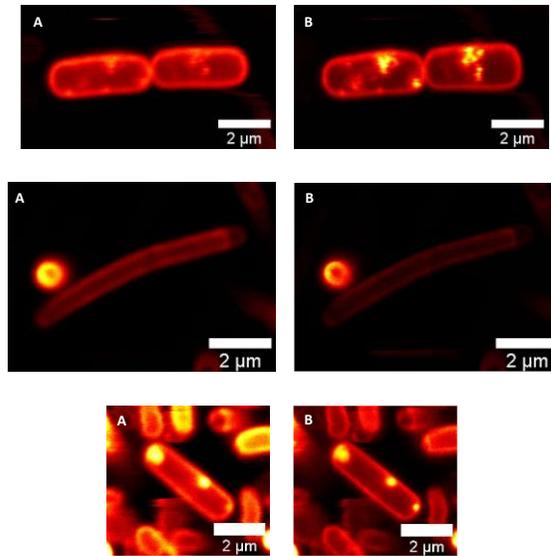


Fig. IV.32. Imágenes obtenidas de *E. coli* mediante microscopía confocal (A) y STED (B) en otros campos de la muestra.

Comparando las imágenes confocal y STED en las figuras IV.31 (en la que además se incluyen los perfiles de trazado de ambas imágenes) y IV.32, se demuestra inequívocamente la utilidad del fluoróforo en la nanoscopía STED.

Al objeto de observar la dinámica de la reacción enzimática en bacterias, una cepa con pepN inducida y otra endógena fueron incubadas con una disolución de DCM-NH-Ala 5 μM , recogándose, mediante microscopía STED, imágenes de las mismas a distintos tiempos (5, 15 y 35 min) (figura IV.33).

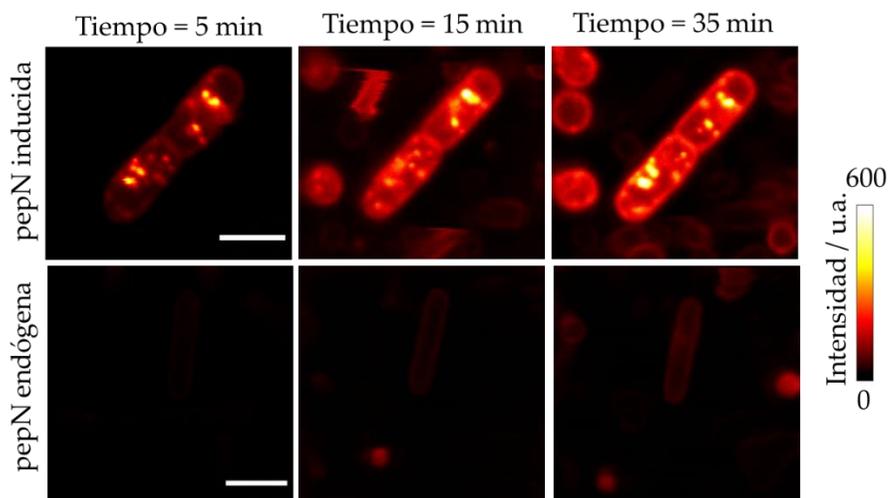


Fig. IV.33. Imágenes STED de la cepa de *E. coli* con pepN inducido (línea superior) y con pepN endógena (línea inferior) incubadas con DCM-NH-Ala 5 μ M, y recogidas a diferentes tiempos.

De la observación de la figura IV.33 se puede concluir que, con respecto a la cepa de pepN inducida, la sonda inició rápidamente la reacción enzimática en sitios específicos localizados en la membrana bacteriana y en algunas estructuras dentro del cuerpo bacteriano y, posteriormente, el colorante liberado difundió al resto de la bacteria (ver figura IV.34). De forma similar al comportamiento con el DCM-NH₂ mostrado en la figura IV.31, el compuesto liberado se acumuló en la membrana bacteriana debido a su naturaleza lipofílica. En cambio, tal y como era de esperar, la cepa pepN endógena mostró un aumento más lento de la fluorescencia, aunque el colorante liberado también se concentró en la membrana. Asimismo, se puede afirmar que las reacciones enzimáticas rápidas no se producen en las estructuras internas.

En la figura IV.34 se puede observar imágenes obtenidas de *E. coli* con pepN inducida en diferentes planos xx, xz e yz.

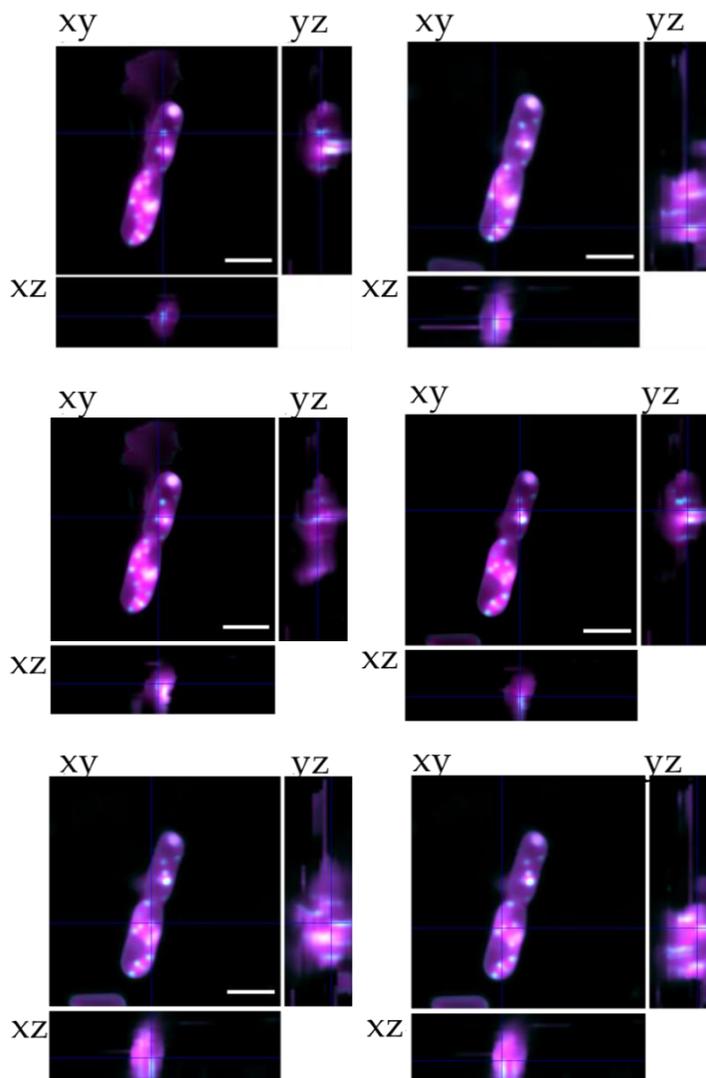


Fig. IV.34. Imágenes xy obtenidas de *E. coli* con pepN inducida (imágenes cuadradas) en diferentes planos z (yz y xz, imágenes rectangulares). Los cuerpos bacterianos están coloreados en magenta y las estructuras en las que el aumento de fluorescencia es elevado están coloreadas en cian/blanco. Las cruces marcan las estructuras celulares que no están unidas a la membrana bacteriana. La barra de escala representa 2 μ m.

El interés por la detección de la alanina aminopeptidasa en la identificación de bacterias patógenas Gram (-) ha llevado a la síntesis de sondas colorimétricas y fluorométricas. Así, se han sintetizado sustratos

fluorogénicos (317), y fluoróforos que muestran un considerable cambio de longitud de onda de sus espectros de emisión antes y después de la reacción con la enzima (318). Váradi et al. (2019) han propuesto una sonda que aprovecha la transición fluorescente del azul al amarillo cuando se produce la reacción enzimática (319). La sonda aquí desarrollada tiene las ventajas sobre las anteriores de su emisión en el rojo, su carácter ratiométrico y la posibilidad de excitación por dos fotones NIR, obviando la posible autofluorescencia del medio, así como aumentando la penetración tanto en los medios de cultivo como en los tejidos. Además, su excepcional fluorescencia y su acumulación en sitios determinados ha permitido su uso en microscopía de superresolución.

IV.2.3.2. Estudio de la actividad pepN en biofilms bacterianos

Como es conocido, la formación de biofilms es una estrategia adaptativa de las bacterias que les permite incrementar sus posibilidades de supervivencia en el medio ambiente. Dada las implicaciones negativas que ello puede conllevar para la salud humana, es de especial interés estudiar la actividad enzimática en estas complejas comunidades microbianas, con el fin último de intentar ampliar el conocimiento sobre los mecanismos que entrañan su formación.

Al objeto de ver si es posible la detección enzimática en dichas estructuras, se obtuvo en primer lugar una muestra de biofilm de un día de maduración, a partir de *E.coli* con actividad pepN inducida, según el procedimiento descrito en la sección III.3.4, observándose tres zonas diferenciadas de desarrollo del mismo en el propio cubreobjetos del biofilm. Así pues, en la zona completamente sumergida en el medio contenido en el pocillo de la placa de cultivo, es donde mayor masa de biofilm se contempla, seguido de la zona de transición en la interfaz líquido-aire. Finalmente, en la zona exterior o aérea existe un nulo o escaso biofilm, debido a una menor disponibilidad de nutrientes. Tras ello, se incubó con una disolución 5 μ M de DCM-NH-Ala durante 30 min y se tomaron imágenes del mismo. La figura IV.35A muestra las imágenes en los canales rojo y verde, y también las imágenes ratiométricas R:V de las tres zonas del cubre, anteriormente indicadas, donde el biofilm fue crecido, con $\lambda_{exc} = 488$ nm. La figura IV.35B

muestra las imágenes de luz transmitida del biofilm, vista a través del ocular, así como la recogida a través de la cámara del microscopio.

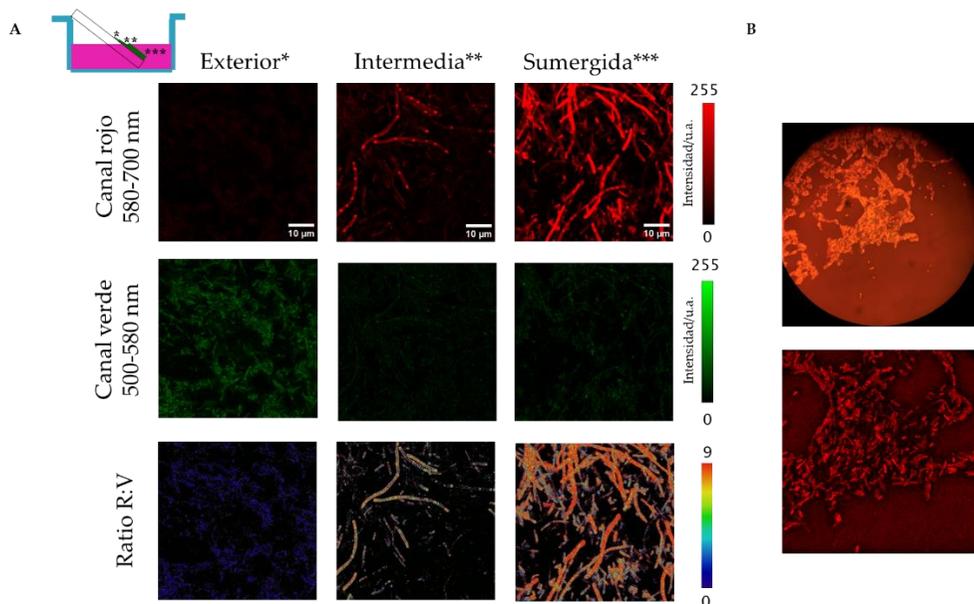


Figura IV.35. A) Imágenes de las distintas zonas del cobre donde se creció el biofilm en los canales rojo y verde, e imágenes del ratio mediante excitación a 488 nm. B) Imagen de luz transmitida del biofilm vista a través del ocular (arriba) y recogida mediante la cámara del microscopio (abajo).

Los datos de microscopía de fluorescencia obtenidos muestran en la zona sumergida una máxima fluorescencia en el canal rojo, resultante de la liberación del fluoróforo DCM-NH₂, y, con ello, mayores valores de ratio. En la zona intermedia, donde visualmente hay una formación de biofilm menos desarrollada, se observa, en cambio, una menor fluorescencia roja que en la zona anterior. Finalmente, en la zona exterior, la medida de fluorescencia en los canales rojo y verde mostraron la menor intensidad registrada correspondiente al compuesto DCM-NH₂ y la máxima señal en el canal verde correspondiente al sensor DCM-NH-Ala. Las imágenes ratiométricas calculadas identifican diferente actividad en función de la zona de desarrollo del biofilm siendo mayor en la zona sumergida que en la zona intermedia y ésta mayor a su vez que en la zona exterior. La actividad enzimática está directamente relacionada con la cantidad y complejidad de biofilm desarrollado en cada zona.

Una vez comprobado que, pese a la compleja arquitectura del biofilm, formada por matriz extracelular polimérica, las bacterias embebidas en la misma pueden entrar en contacto con el sustrato y así liberar el producto de la reacción enzimática DCM-NH₂, se decidió llevar a cabo un estudio comparativo de detección de actividad enzimática en biofilms de distintos días de maduración, pero en esta ocasión de *E.coli* con actividad endógena. Para ello, dichos biofilms fueron incubados con una disolución de DCM-NH-Ala 5 μM durante un tiempo de 15 min. La figura IV.36 muestra, por un lado, las imágenes ratiométricas obtenidas (fila superior) y, por otro, sus correspondientes imágenes tridimensionales del canal rojo, con λ_{exc} = 450 nm, de cinco días.

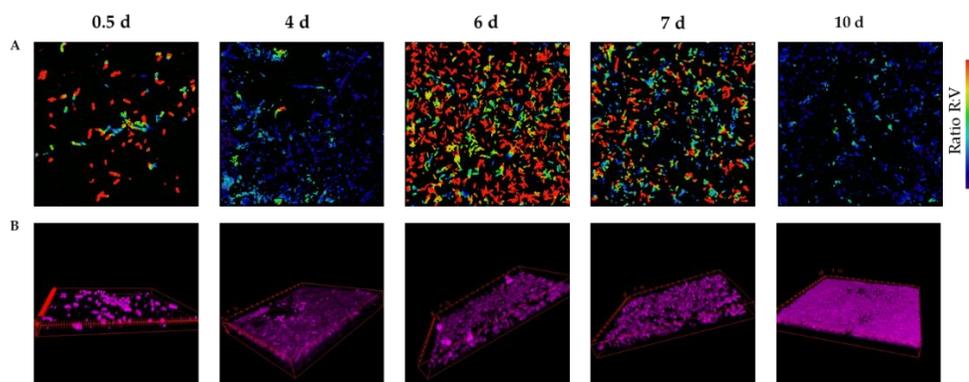


Figura IV.36. A) Imágenes ratiométricas de biofilms de *E.coli* con actividad pepN endógena de distintos días de maduración incubados con DCM-NH-Ala 5 μM durante 15 min mediante excitación a 450 nm. B) Imágenes tridimensionales del canal rojo (λ_{em} = 650-720 nm) de los mismos biofilms.

Los resultados revelan como, a medida que el biofilm se forma, se obtiene diferente actividad enzimática a lo largo del tiempo. Inicialmente, la actividad enzimática baja a un valor mínimo entre los días 2-5, para posteriormente durante el 6° día alcanzar un pico de máxima actividad enzimática. Tras este máximo, la actividad vuelve a disminuir hasta alcanzar los valores mínimos los días 10-13 (ver figura IV.37). Esta tendencia con un pico de actividad los días 5-6 se han obtenido con iguales resultados en tres experimentos independientes.

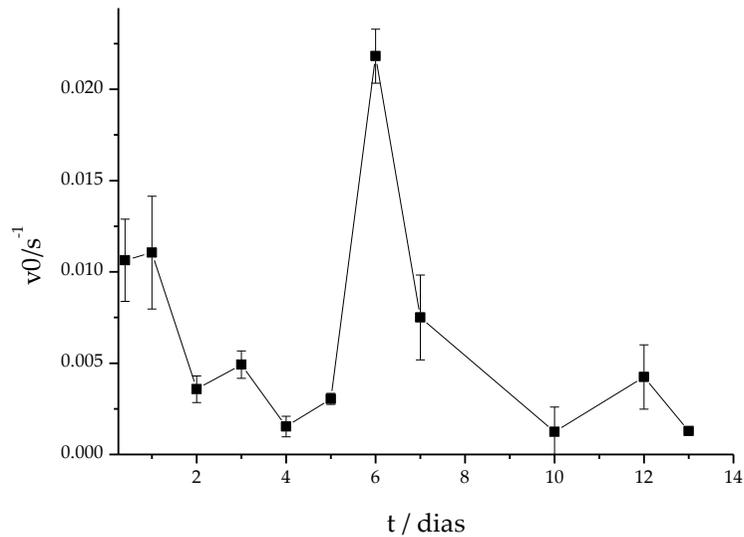


Figura IV.37. Velocidades iniciales de la reacción enzimática de biofilms de *E.coli* con actividad pepN endógena de distintos días de maduración.

Según los resultados obtenidos durante los primeros 14 días de desarrollo de biofilm, la enzima pepN muestra distintos niveles de actividad, y sugieren que la actividad está relacionada con la propia formación del biofilm. En esta Tesis Doctoral, se ha demostrado la utilidad de este sensor en la medida de la actividad enzimática durante la formación de biofilms bacterianos y por tanto su potencial uso como herramienta de detección de actividad para microbiólogos y bioquímicos.

IV.3. Caracterización y aplicaciones biológicas del compuesto DCM-NH-Pro-Gly

IV.3.1. Caracterización fotofísica del sensor y de la reacción enzimática

Los espectros de absorción y emisión del DCM-NH-Pro-Gly, 10 μM en disolución PBS/DMSO (7/3, v/v), 50 mM, pH = 7.4 se muestran en la figura siguiente

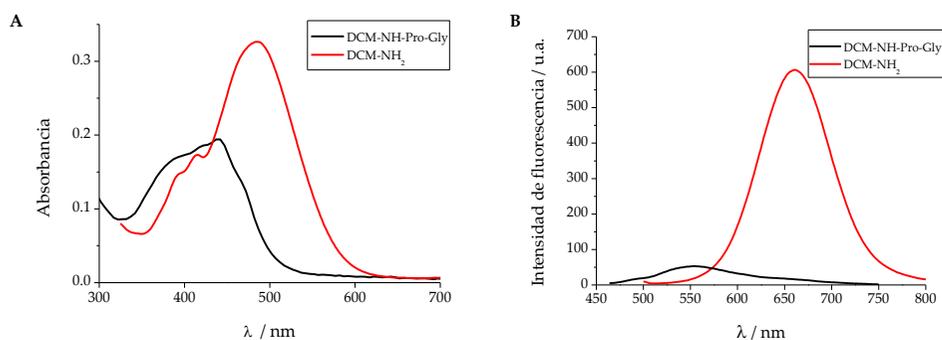


Fig. IV.38. A) Espectros de absorción de los compuestos DCM-NH-Pro-Gly (línea negra) y DCM-NH₂ (línea roja), 10 μM , en PBS/DMSO 7/3; (B) Espectros de emisión de los compuestos DCM-NH-Pro-Gly (línea roja) y DCM-NH₂ (línea negra), 10 μM , en PBS/DMSO 7/3 obtenidos mediante excitación a 440 nm y 480 nm, respectivamente.

El espectro de absorción del DCM-NH-Pro-Gly muestra un máximo a 442 nm, mientras la emisión se caracteriza por presentar un máximo a 550 nm. El rendimiento cuántico de fluorescencia obtenido (Φ), utilizando como referencia Fluoresceína en NaOH 0.1M (con $\Phi = 0.91$) es de 0.1 ± 0.01 %.

La respuesta de la sonda a la enzima DPP IV se recoge en la figura IV.39 que muestra los espectros de absorción y emisión de disoluciones de DCM-NH-Pro-Gly en PBS/DMSO (7/3, v/v), 100 mM, pH= 7.4, cada 30 min después de la adición de $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ DPP IV.

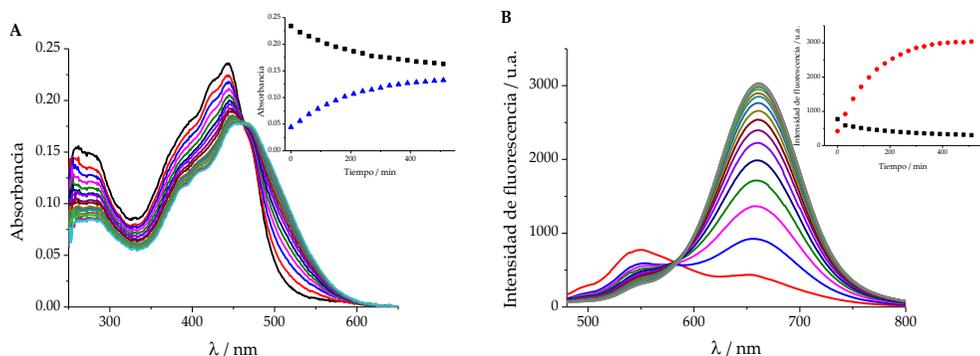


Fig. IV.39. A) Evolución de los espectros de absorción de DCM-NH-Pro-Gly ($10 \mu\text{M}$) con DPP IV ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$) cada 30 min durante 8.5 h a 37°C . La gráfica insertada muestra los valores máximos de absorbancia a 440 nm (línea negra) y 500 nm (línea azul) frente al tiempo. B) Evolución de los espectros de emisión de DCM-NH-Pro-Gly ($10 \mu\text{M}$) con DPP IV ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$) observados cada 30 min durante 8.5 h mediante excitación a 463 nm a 37°C . La gráfica insertada muestra el aumento de la intensidad de fluorescencia a 662 nm (línea roja) y la disminución a 550 nm (línea negra) frente al tiempo.

Como se muestra en la figura IV.39A, la sonda presenta una banda de absorción con un pico agudo a ~ 440 nm. Tras la adición de DPP IV, la absorción se desplaza al rojo, formando una nueva banda con un máximo a aproximadamente 480 nm, característico del DCM-NH₂, y dando lugar a un punto isobéptico a 463 nm. La gráfica insertada de la figura A representa la evolución de los valores de absorbancia a las longitudes de onda de interés (440 y 480 nm) con el tiempo. La determinación del coeficiente de extinción molar de la sonda fluorescente DCM-NH-Pro-Gly a $\lambda = 440$ nm se recoge en la figura IV.40. El ajuste de la absorbancia medida a 440 nm frente a la concentración proporcionó un valor de $\epsilon = 17\,600 \pm 300 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

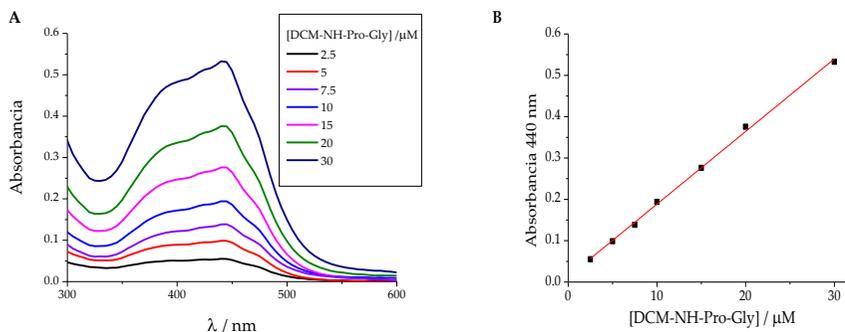


Fig. IV.40. A) Espectros de absorción del compuesto DCM-MH-Pro-Gly a distintas concentraciones en PBS/DMSO 7/3. B) Cálculo del coeficiente de extinción molar de DCM-NH-Pro-Gly ($\epsilon = 17\,600 \pm 300 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$; $R^2 = 0.99$).

Los resultados obtenidos en el cálculo del coeficiente de extinción molar indican que, a un tiempo de reacción muy largo, la absorbancia del producto de reacción cuyo coeficiente de extinción molar ya se indicó en la sección IV.2.1 ($\epsilon = 37\,700 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) debería superar la absorbancia de la sonda ($\epsilon = 17\,600 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$); sin embargo, esto no llega a suceder, probablemente debido al efecto desnaturizante del DMSO sobre la enzima, impidiéndose así la liberación total del producto.

El espectro de emisión de la sonda obtenido tras la excitación en el punto isobéptico ($\lambda_{\text{ex}} = 463 \text{ nm}$), muestra una banda de fluorescencia poco intensa ($\Phi = 0.1 \pm 0.01 \%$) centrada en 550 nm que, tras la adición de $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ DPP IV, desaparece gradualmente con el tiempo dando lugar a otra banda de emisión muy intensa con un máximo a 662 nm , como se muestra en la Figura IV.39B. La disminución del máximo de DCM-NH-Pro-Gly (550 nm) fue aproximadamente 2.5 veces, mientras que el aumento a 662 nm alcanzó 6.8 veces tras 8.5 h de incubación. La forma de los espectros de emisión registrados después de añadir la enzima es igual a los obtenidos a partir de disoluciones de DCM-NH₂ libre. La gráfica insertada en la figura IV.39B muestra la variación de la intensidad de fluorescencia a la longitud de onda de ambos máximos. En particular, la relación entre las señales de fluorescencia a 662 y 550 nm , I_{662}/I_{550} , aumentó 18 veces tras 8.5 h desde la adición de la DPP IV como se observa en la figura IV.41.

Para verificar si la relación I_{662}/I_{550} puede utilizarse como medida para cuantificar la actividad enzimática, se realizó el mismo experimento anterior pero a diferentes concentraciones de DPP IV, registrando la evolución de la

fluorescencia cada 30 min durante 8.5 h, permitiendo de esta forma determinar la actividad enzimática (320) (321) (322). La representación de la relación I_{660}/I_{550} frente a las distintas concentraciones de enzima ensayadas al tiempo se observa en la figura IV.41.

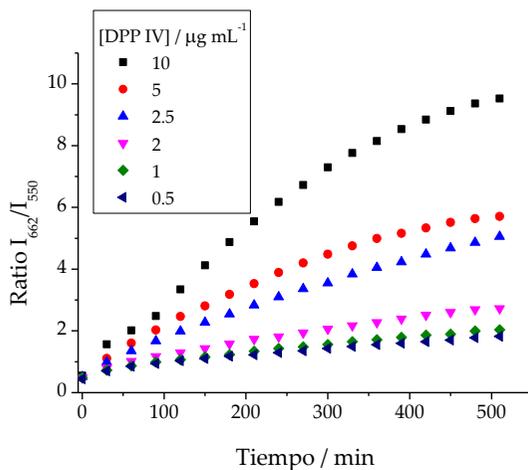


Fig. IV.41. Relación ratiométrica de la señal de fluorescencia (I_{662}/I_{550}) de DCM-NH-Pro-Gly ($10 \mu\text{M}$) a diferentes concentraciones de enzima frente al tiempo.

De acuerdo a la teoría de Michaelis-Menten, la velocidad inicial determinada a partir de la representación de las medidas ratiométricas a diferentes concentraciones de enzima frente al tiempo aumenta con la concentración de la enzima, como se comprueba en la visualización de la figura IV.42, la cual recoge, por un lado, los valores del ratio en los ocho primeros minutos de la cinética para las distintas concentraciones de enzima, y por otro, la representación gráfica de las velocidades iniciales (obtenidas a través de la pendiente de las representaciones del ratio a lo largo de ese tiempo) frente a la concentración de enzima, mostrando una excelente linealidad ($R^2 = 0.99$) en el rango de concentraciones medido (0.5 y $10 \mu\text{g mL}^{-1}$).

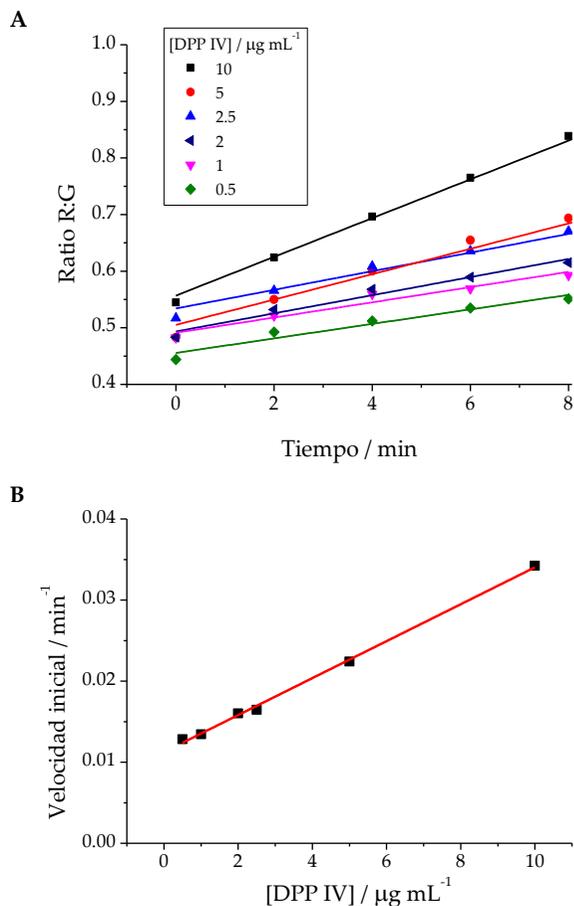


Fig. IV.42. A) Relación ratiométrica de la señal de fluorescencia (I_{662}/I_{550}) de DCM-NH-Pro-Gly ($10 \mu\text{M}$) a diferentes concentraciones de enzima durante los primeros ocho minutos de la cinética; B) Velocidades iniciales de las medidas ratiométricas frente a las concentraciones de enzima.

Para confirmar que la reacción enzimática libera el fluoróforo DCM-NH₂, se realizó en primer lugar un espectro de masas del colorante (figura IV.43). Como se puede comprobar el ión molecular $[M+H]^+$ 312.14 coincide con la masa molar del fluoróforo que es de 311.11.

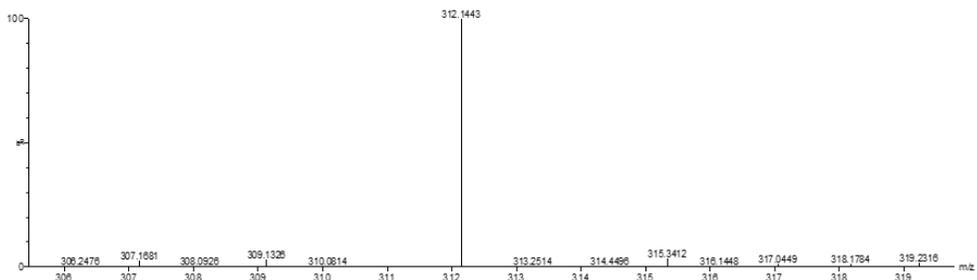
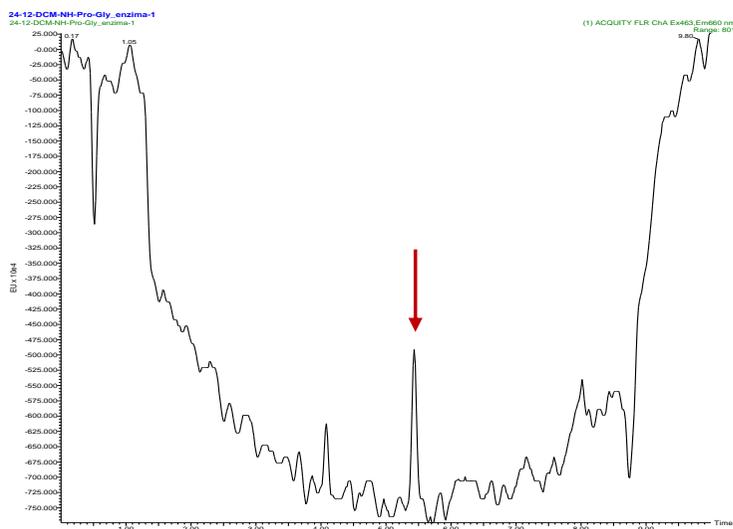
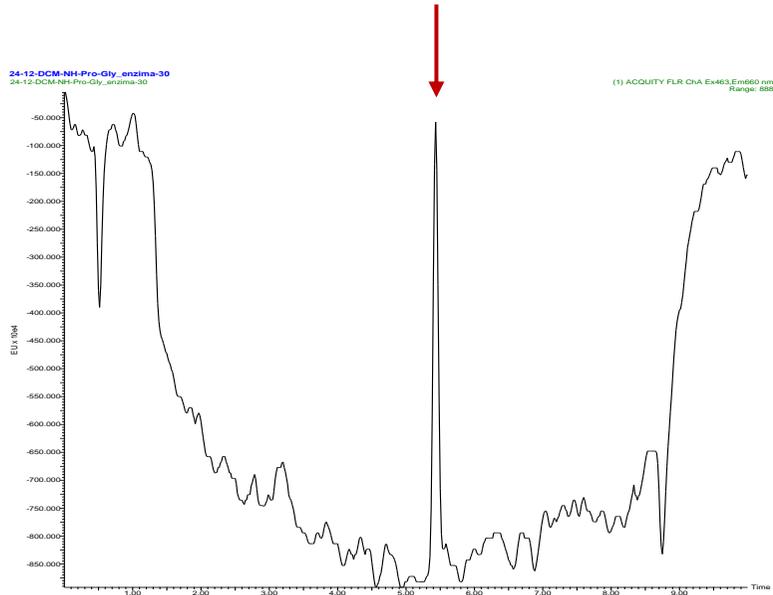


Fig. IV.43. Espectro de masas del compuesto DCM-NH₂.

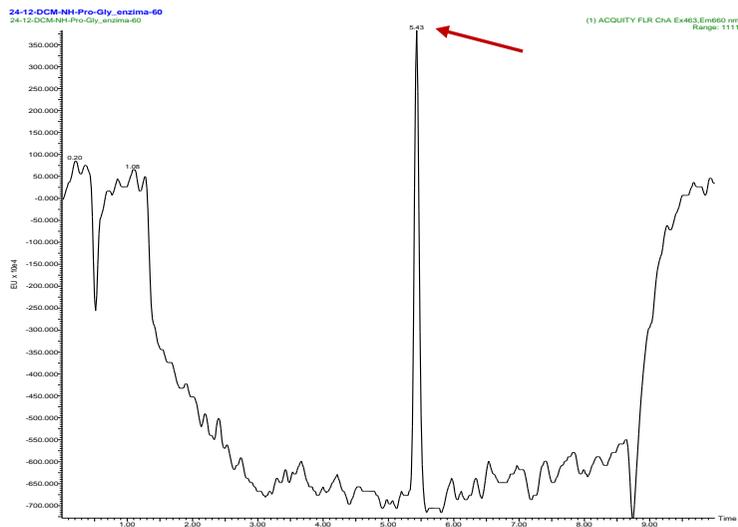
Una vez identificado el M⁺, se incubó el compuesto DCM-NH-Pro-Gly 10 μM con DPP IV 10 μg mL⁻¹ y se monitorizó este pico en diferentes momentos mediante una HPLC-MS (figura IV.44) mostrando un incremento a lo largo del tiempo (inicial, 30, 60 y 90 min).



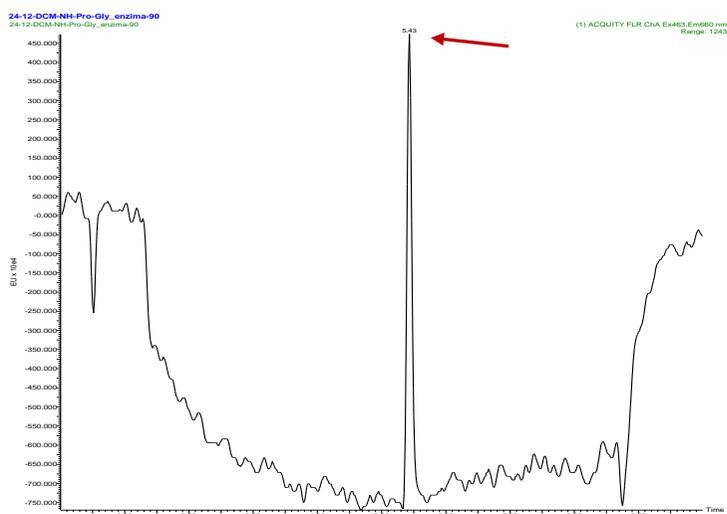
t = 0 min



t = 30 min



t = 60 min



t = 90 min

Fig. IV.44. HPLC-MS de la sonda. La flecha indica el $M^+ = 312.14$ a diferentes tiempos de incubación con $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ DPP IV.

Al objeto de poder cuantificar la cantidad de DCM-NH₂ liberado a los distintos tiempos de incubación de la sonda con la enzima (figura IV.46), se realizó previamente una curva de calibrado mediante HPLC-MS a diferentes concentraciones del colorante (ver figura IV.45).

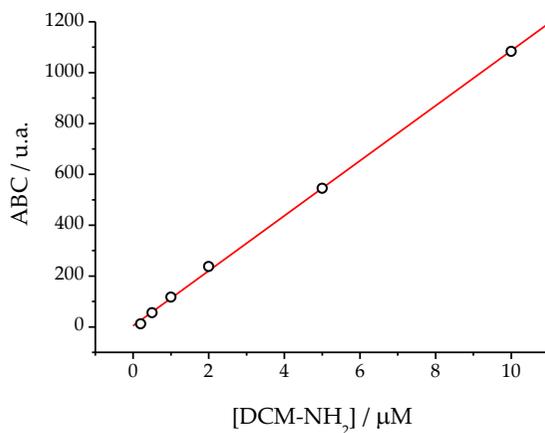


Fig. IV.45. Calibración del HPLC-MS con diferentes concentraciones de DCM-NH₂.

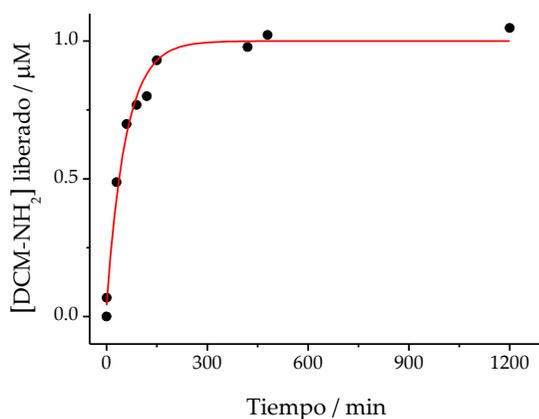


Fig. IV.46. DCM-NH₂ liberado a diferentes tiempos de incubación con DPP IV utilizando [DCM-Pro-Gly] = 1 μM y [DPP IV] = 5 μg mL⁻¹ en PBS /DMSO, 7/3 v/v.

Los resultados reflejan una meseta aproximadamente a los 300 min, un valor similar obtenido por espectroscopia de absorción y emisión.

Adicionalmente, y con el fin de comprobar que el aumento de la fluorescencia es debido a la acción de la DPP IV, se realizó un estudio de inhibición utilizando sitagliptina, un inhibidor selectivo de la DPP IV (323) (324). Los resultados de este análisis se contemplan en las figuras IV.47 y IV.48.

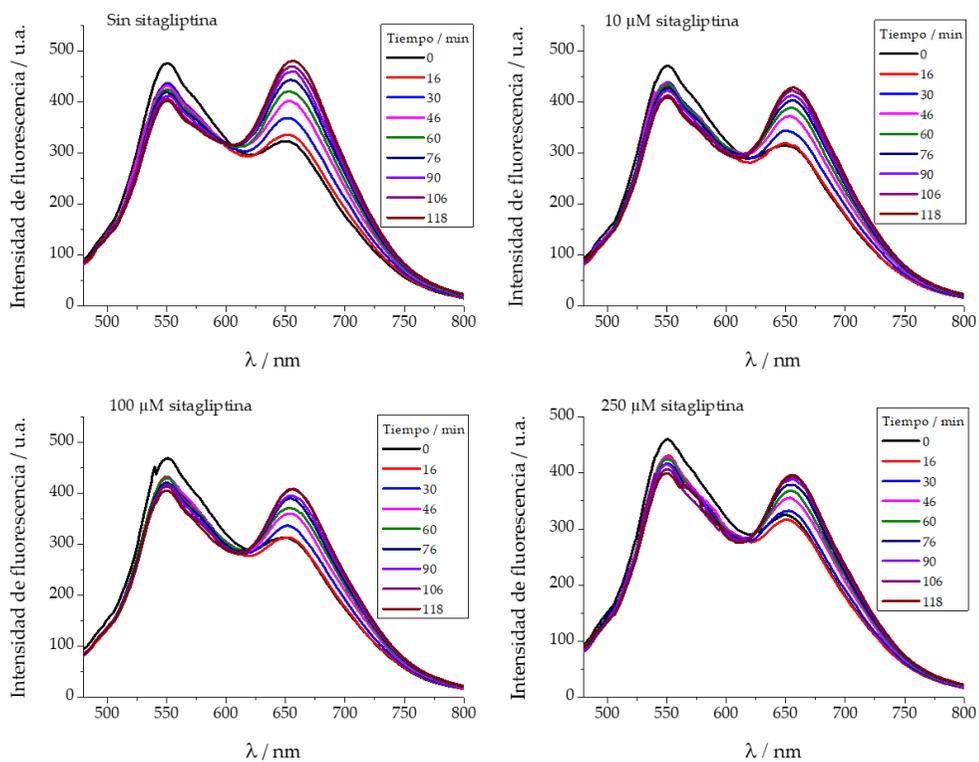


Fig. IV.47. Cinética por espectroscopía de emisión de DCM-NH-Pro-Gly (10 μM) con DPP IV (5 μg mL⁻¹) a diferentes concentraciones de sitagliptina durante 2 h; espectros obtenidos mediante excitación a 463 nm y a 37 °C.

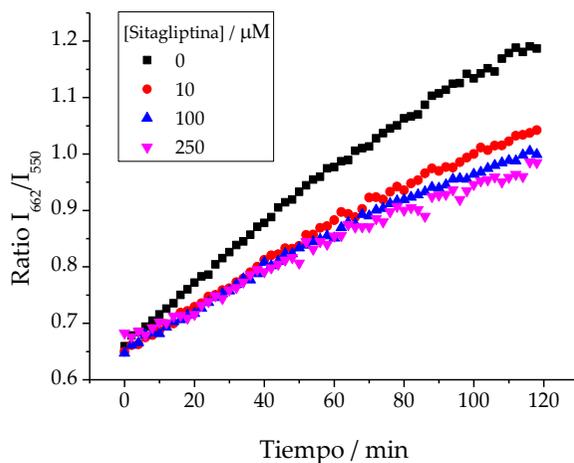


Fig. IV.48. Medidas ratiométricas de las señales de fluorescencia de I₆₆₂ / I₅₅₀ de DCM-NH-Pro-Gly a lo largo del tiempo con diferentes concentraciones de sitagliptina.

Como se observa, la incorporación de sitagliptina ralentiza la velocidad de reacción y produce una disminución en el aumento de la intensidad de fluorescencia del máximo a 662 nm, lo que es indicativo de la inhibición de la acción de la enzima. Por lo tanto, dado que la sitagliptina no afecta a la emisión del DCM-NH₂, la banda fluorescente NIR con máximo a 662 nm debe atribuirse al DCM-NH₂ liberado por la escisión específica del enlace amida debido a la actividad de la DPP IV.

Asimismo, se determinó la eficacia de la actividad enzimática en función del pH y a diferentes temperaturas. Estos resultados se recogen en la figura IV.49.

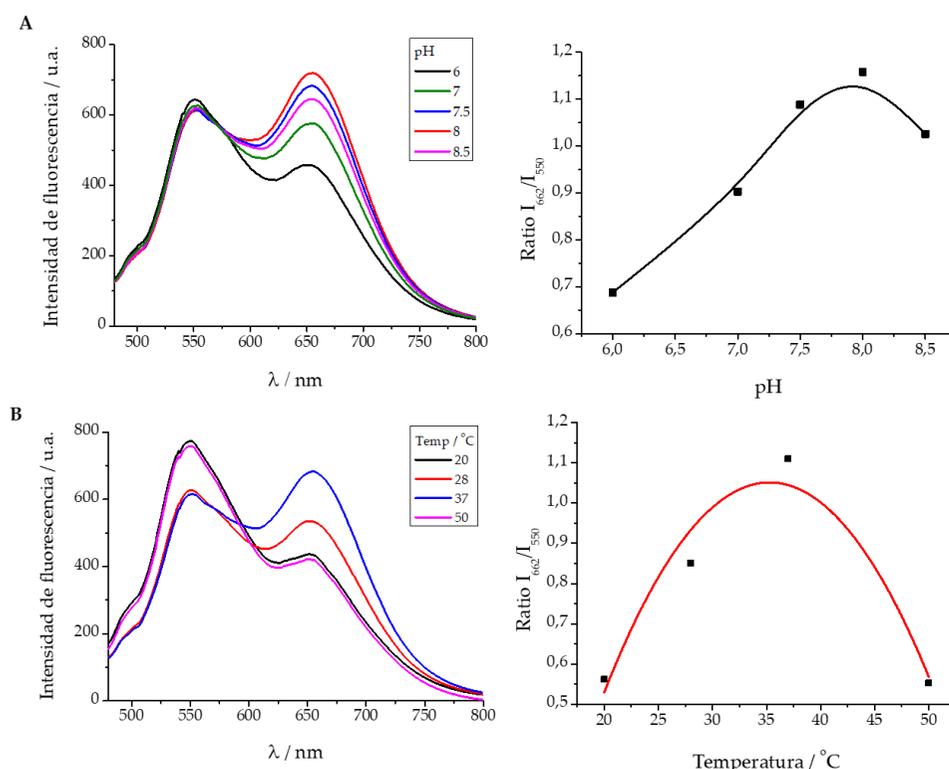


Fig. IV.49. A) Espectros de emisión ($\lambda_{exc} = 463$ nm) de DCM-NH-Pro-Gly (10 μ M) con DPP IV (5 μ g mL⁻¹) tras 60 min de incubación a 37 °C a diferentes pHs, y su correspondiente representación ratiométrica I_{662}/I_{550} . B) Espectros de emisión ($\lambda_{exc} = 463$ nm) de DCM-NH-Pro-Gly (10 μ M) con DPP IV (5 μ g mL⁻¹) tras 60 min de incubación a diferentes temperaturas y a pH 7.5, y su correspondiente representación ratiométrica I_{662}/I_{550} .

Los resultados obtenidos revelan que el pH óptimo para la mayor actividad de la enzima está comprendido entre 7.5 y 8. Con respecto a la temperatura, la actividad enzimática óptima se produce en torno a una temperatura de 37 °C.

Otro aspecto interesante a tener en cuenta al objeto de examinar la aplicabilidad del compuesto DCM-NH-Pro-Gly en muestras biológicas, es la especificidad del mismo. En la figura IV.50 se compara el aumento de la relación de fluorescencia I_{662}/I_{550} en presencia de DPP IV cuando la sonda se incubó durante 80 minutos a 37 °C con diferentes enzimas relacionadas, como APN, TYR, AChE, PNLIP, DPP VIII, FAP y LAP.

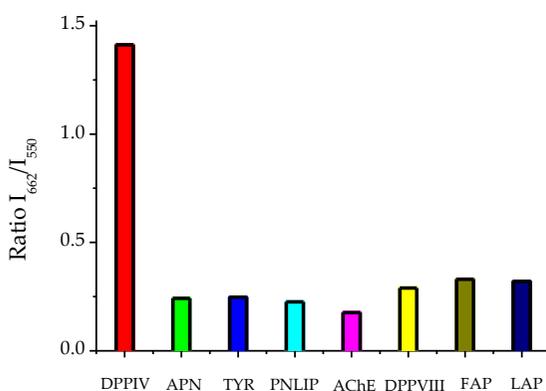


Fig. IV.50. Relaciones ratiométricas de las señales de fluorescencia de I_{662}/I_{550} obtenidas mediante excitación del DCM-NH-Pro-Gly (10 μ M) a 463 nm tras 80 min de incubación en presencia de diferentes enzimas a la misma concentración de 5 μ g mL⁻¹ a 37 °C.

El aumento evidente de la relación I_{662}/I_{550} cuando el sensor se incubó en presencia de DPP IV frente a la misma relación de fluorescencia cuando se emplearon otras enzimas demuestra inequívocamente la alta especificidad de la sonda desarrollada en la Tesis Doctoral hacia la acción enzimática de DPP IV.

IV.3.2. Parámetros cinéticos de la reacción enzimática DCM-NH-Pro-Gly – DPP IV

Para evitar correcciones tediosas, motivados por la diferente absorbancia de la sonda a medida que transcurre el tiempo, las disoluciones utilizadas en el cálculo de los parámetros característicos de la cinética enzimática se excitaron a la longitud de onda de 550 nm, en la que prácticamente se excita sólo el producto de reacción DCM-NH₂, generando señales de fluorescencia proporcionales a la concentración de éste.

En primer lugar y a fin de determinar la concentración liberada de DCM-NH₂ durante la cinética, se elaboró la Ley de Kavanagh que se muestra en la figura IV.51.

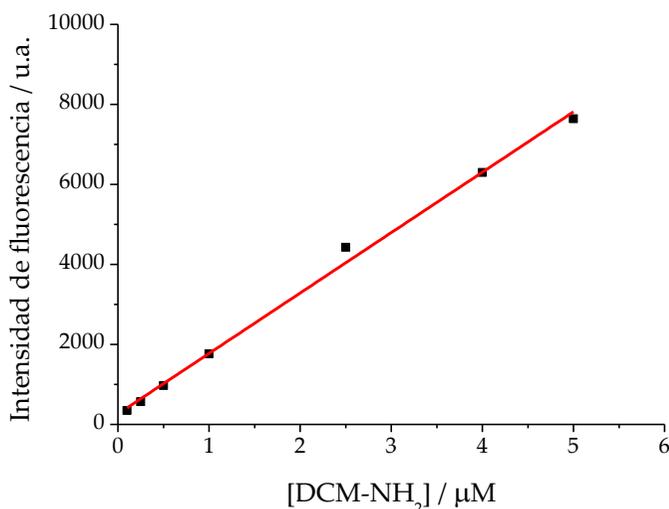


Fig. IV.51. Intensidades de fluorescencia medidas a 662 nm de diferentes concentraciones de DCM-NH₂ por excitación a 550 nm. Del ajuste lineal de los datos se obtiene una pendiente de 1707 ± 27 u.a. μM^{-1} y una ordenada en el origen de 129 ± 33 u.a. ($R^2 = 0.996$).

Seguidamente, se transformó la intensidad de fluorescencia de la reacción enzimática a diferentes concentraciones de sonda con DPP IV $2.5 \mu\text{g mL}^{-1}$, que se observa en la figura IV.52, en valores de concentración de DCM-NH₂ liberado a distintos tiempos tal y como se recoge en la figura IV.53.

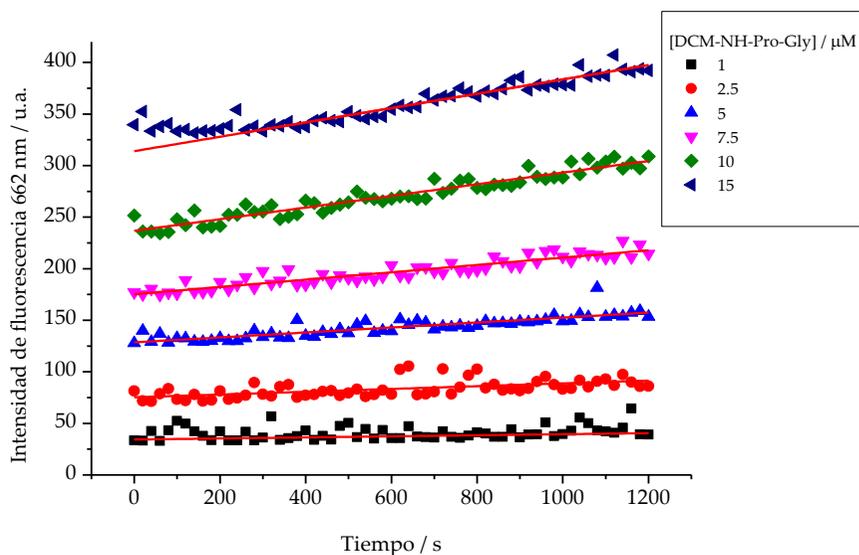


Fig. IV.52. Intensidades de fluorescencia a 662 nm de DCM-NH-Pro-Gly a diferentes concentraciones (1 μM - 15 μM) con DPP IV (2.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$) a lo largo del tiempo obtenidas por excitación a 550 nm.

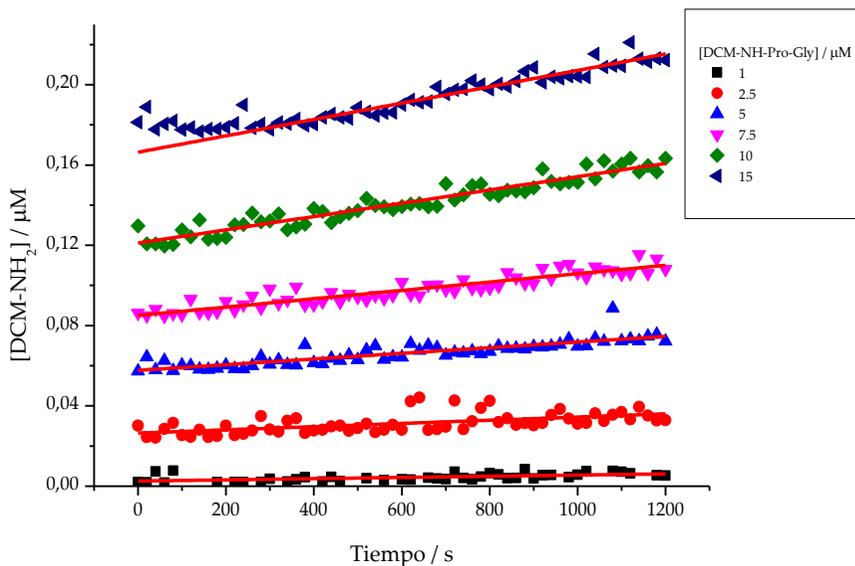


Fig. IV.53. Aumento de la concentración de DCM-NH₂ con el tiempo, a diferentes concentraciones de DCM-NH-Pro-Gly (1.00 μM - 15.00 μM) con DPP IV (2.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$).

Para calcular los parámetros cinéticos siguiendo el modelo de Michaelis-Menten, tras transformar la intensidad de fluorescencia en concentración de producto de reacción, se calcularon las velocidades iniciales de la reacción enzimática a través de las pendientes de las rectas a diferentes concentraciones iniciales de sustrato. Estos valores se recogen en la figura IV.54.

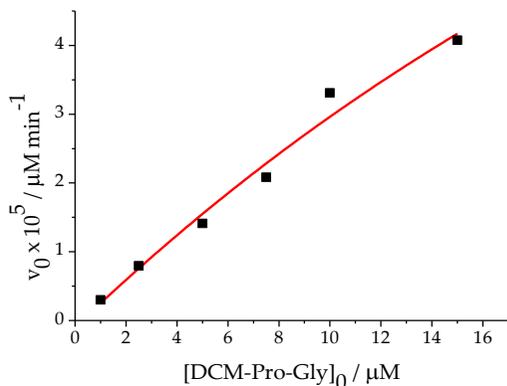


Fig. IV.54. Representación de la velocidad inicial frente a la concentración de sustrato de la reacción enzimática del DCM-NH-Pro-Gly con DPP IV (2.5 µg mL⁻¹).

El ajuste por regresión lineal basado en la ecuación de Lineweaver-Burk (ecuación III.2 – sección III.3.10.1) proporcionó los siguientes valores: K_M = 486 ± 46 µM y v_{max} = 0.588 ± 0.044 µM min⁻¹ mg⁻¹.

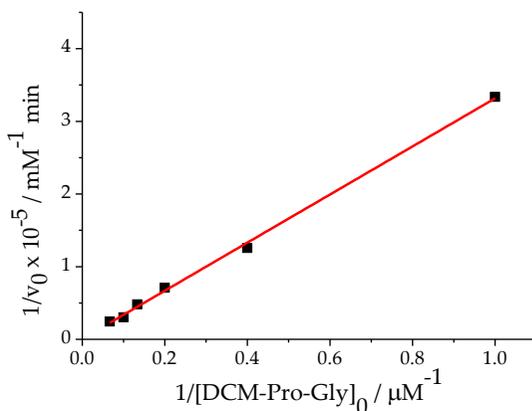


Fig. IV.55. Representación Lineweaver-Burk de la reacción enzimática entre DPP IV y el sustrato DCM-NH-Pro-Gly. El ajuste lineal proporciona una pendiente de 331 000 ± 6 300 min y una ordenada en el origen de 680 ± 50 min µM⁻¹, (R² = 0.998).

Como resultado, la constante catalítica calculada teniendo en cuenta la concentración inicial de enzima, mediante la ecuación III.3 (sección III.3.10.1) es $k_{\text{cat}} = 5 \times 10^{-4} \pm 0.2 \times 10^{-4} \mu\text{M min}^{-1} \mu\text{g}^{-1} \text{mL}$.

IV.3.3. Aplicaciones biológicas del DCM-NH-Pro-Gly

IV.3.3.1. Detección de DPP IV en suero humano

Debido a la gran importancia de la DPP IV como potencial biomarcador en el diagnóstico y tratamiento de tumores, diabetes mellitus tipo 2 y otras enfermedades graves, así como en el desarrollo de fármacos hipoglucemiantes, resulta de interés investigar la aplicabilidad del DCM-NH-Pro-Gly para la determinación cuantitativa y precisa de la actividad de la DPP IV en suero humano.

Para comprobar la actividad de la DPP IV en el suero con la sonda objeto de estudio, se dispuso de muestras de individuos sanos y con diabetes mellitus. Debido a la fluorescencia nativa del suero a partir de los fluoróforos endógenos que tiene en disolución, se hizo necesario realizar un estudio tanto de los espectros de excitación como de emisión para encontrar las condiciones más favorables para el análisis de la actividad de la DPP IV en suero.

El espectro de excitación del suero, en la región visible, con detección a 580 nm (en la que la sonda y el producto de la reacción enzimática muestran un punto isoemisivo), consta de dos bandas con máximos a 350 nm y 510 nm, y con un hombro a 440 nm (figura IV.56).

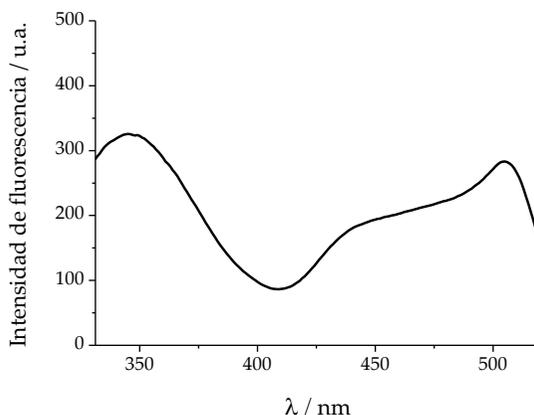


Fig. IV.56. Espectro de excitación del suero con emisión a 580 nm.

La longitud de onda de 480 nm, que es donde la sonda DCM-NH₂ tiene el máximo de absorción, está situada entre los dos picos para la posible excitación del suero, por lo que, en los análisis de actividad realizados, la muestra siempre se ha excitado a 480 nm para obtener la máxima intensidad de fluorescencia.

En la figura IV.57 se representa el espectro de emisión del suero ($\lambda_{\text{ex}} = 480 \text{ nm}$) en las condiciones experimentales utilizadas, el cual muestra un máximo de emisión sobre los 550 nm, en concordancia con el espectro de fluorescencia nativo del suero sanguíneo de individuos normales. Normalmente, el suero humano muestra dos bandas de emisión en el espectro visible, una de ellas con un máximo a aproximadamente 460 nm (atribuida a fluoróforos como las riboflavinoproteínas, la vitamina A, la bilirrubina y las lipoproteínas) y otra en el rango espectral entre 550 y 650 nm, que puede atribuirse a la presencia de porfirinas endógenas (325), como la hematoporfirina y la protoporfirina, que fluorescen en ese rango de longitudes de onda dependiendo de la polaridad del disolvente (326).

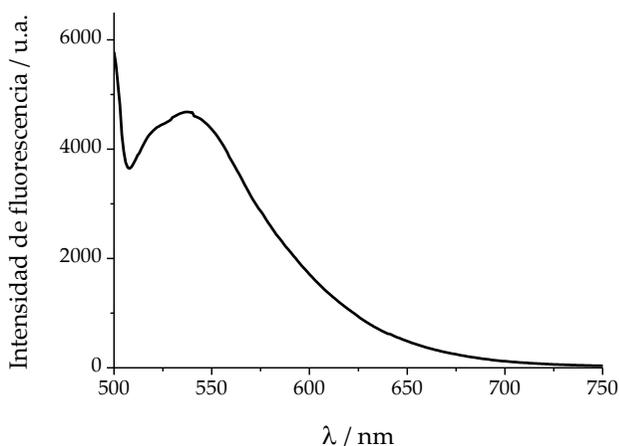


Fig. IV.57. Espectro de emisión del suero por excitación a 480 nm.

Por otra parte, la presencia de un cierto porcentaje de DMSO aumenta la fluorescencia del DCM-NH₂, tal y como ya se ha justificado en la sección IV.2.1. Pero al mismo tiempo, a medida que aumenta la cantidad de DMSO se genera una desnaturalización creciente de la enzima. A fin de conocer cuál es

la mínima cantidad de DMSO posible en que vehiculizar la sonda en estos experimentos, se añadió diferente cantidad de DMSO a una disolución que contenía los productos de la reacción enzimática en suero entre la DPP IV plasmática y la sonda después de reaccionar durante 48 h a 37 °C. La siguiente figura (figura IV.58) muestra que la máxima emisión se obtuvo cuando se añadió entre un 15 % y un 20 % de DMSO, mientras que la adición de un 30 %, utilizada normalmente en los estudios en disolución, provocó una pérdida de la señal fluorescente y la precipitación de algunos componentes del suero. En consecuencia, para reducir la posible desnaturalización de la DPP IV y lograr la máxima sensibilidad posible, se empleó un porcentaje de DMSO igual al 15 % en los siguientes experimentos.

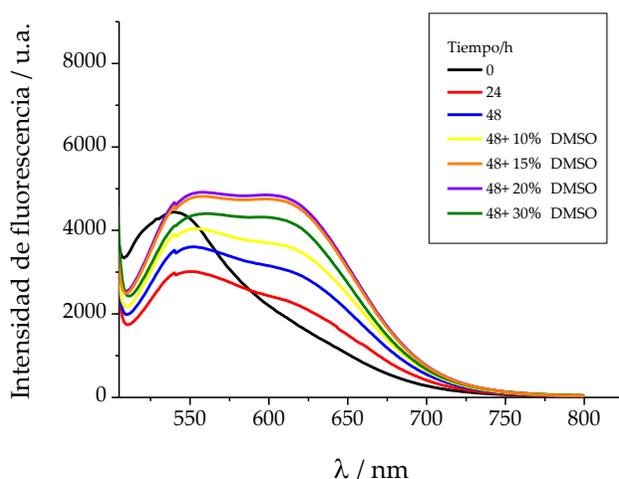


Fig. IV.58. Comparación de los espectros de emisión obtenidos mediante excitación a 480 nm de la cinética en diferentes condiciones de tiempo de incubación 0, 24, 48 h, y 48 h con diferentes concentraciones de DMSO.

Además de estas características espectrales, es conocido el fuerte efecto de fotoblanqueamiento en las porfirinas cuando se irradian con haz de luz de potencia lumínica no demasiado elevadas (327). Este hecho se ha observado en los experimentos en los que se registraron los espectros solamente del suero durante el mismo tiempo que el empleado en los experimentos en que se siguió la cinética enzimática en suero realizados al objeto de estudiar cómo

afecta la viscosidad, la polaridad y la presencia de la gran cantidad de solutos que se encuentran dispersos en un medio biológico de estas características.

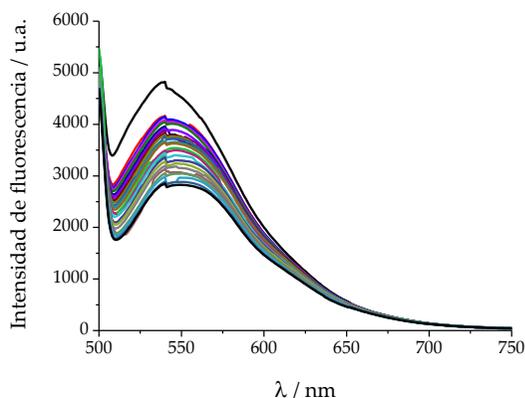


Fig. IV.59. Espectros de emisión ($\lambda_{exc} = 480$ nm) del suero/DMSO 85/15, v/v, cada hora, durante un tiempo total de 24 h.

La figura IV.59 muestra el considerable efecto de aproximadamente un 50 % de fotoblanqueamiento en la banda de fluorescencia sobre los 550 nm del suero después de 24 h registrando los espectros cada hora. Por lo tanto, para minimizar el error que esta influencia provocaría en los resultados cuantitativos, en los experimentos de la cinética de la reacción enzimática, las muestras de los sujetos sanos se dividieron en dos alícuotas. A una de ellas se le añadió la sonda, DPP IV y DMSO hasta el 15 %. La otra alícuota estaba compuesta únicamente por suero a la misma dilución y DMSO al 15 %. Los espectros de emisión (excitados a 480 nm) de las dos alícuotas se registraron cada hora durante 24 h. En la figura IV.60 se representan los espectros de la alícuota con la sonda.

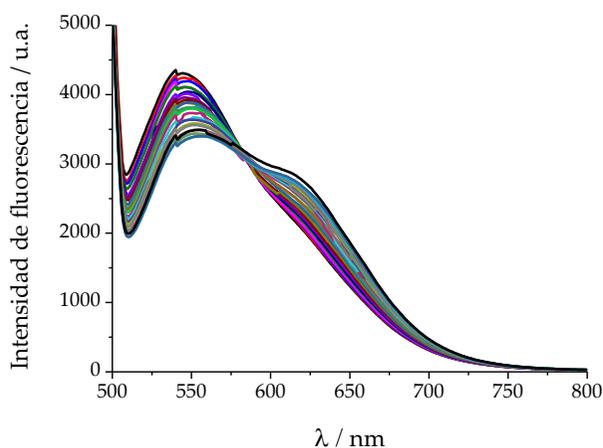


Fig. IV.60. Espectros de emisión ($\lambda_{exc} = 480$ nm) de DCM-NH-Pro-Gly $10 \mu\text{M}$ con DPP IV $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ en suero/DMSO 85/15, v/v, cada hora, durante 24 h.

Con el fin de eliminar en la banda de 550 nm la influencia del fotoblanqueamiento del suero, los espectros correspondientes al suero/DMSO se restaron, a cada tiempo de reacción, de los recogidos de la disolución de DCM-NH-Pro-Gly $10 \mu\text{M}$ y DPP IV $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ en suero/DMSO. Como se observa en la figura IV.61, el cálculo realizado muestra una banda de fluorescencia con un máximo a aproximadamente 635 nm y una forma similar a la del DCM-NH₂ aunque ligeramente desplazada hacia el azul, probablemente debido a la menor polaridad del suero.

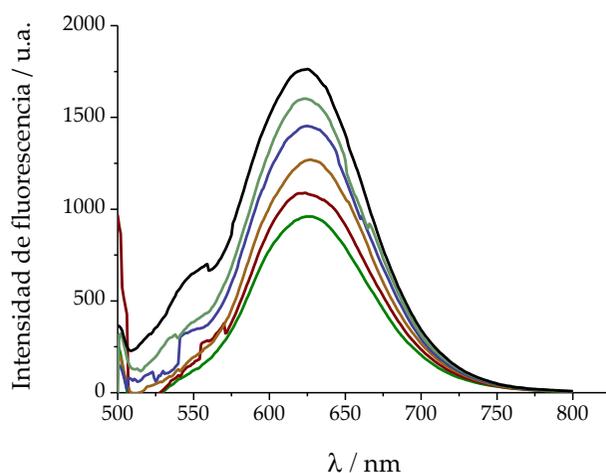


Fig. IV.61. Resultado de restar a los espectros de la figura 59, los espectros de la figura 58. La figura incluye sólo los resultados cada 4 h para permitir una visualización más clara.

Del mismo modo, se realizaron una serie de experimentos similares a los descritos con suero de sujetos sanos sin añadir enzima externa, así como de pacientes diabéticos, ya que la DPP IV se encuentra sobreexpresada en el suero de pacientes afectados por diabetes mellitus. Los espectros recogidos correspondientes a ambas muestras de suero sanguíneo adicionados con la sonda se representan en las figuras IV.62 y IV.63, respectivamente.

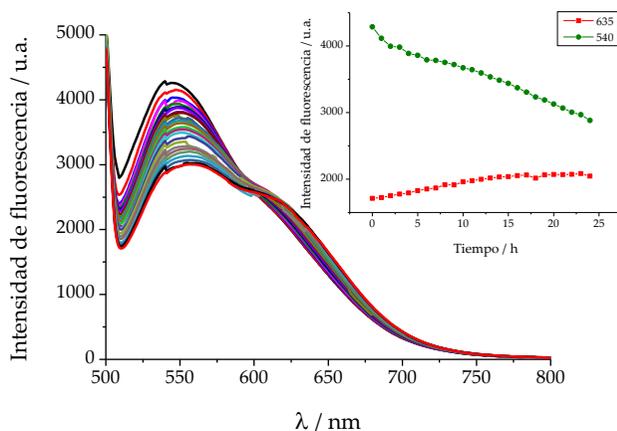


Fig. IV.62. Espectros de emisión ($\lambda_{exc} = 480$ nm) de DCM-NH-Pro-Gly $10 \mu\text{M}$ en suero/DMSO 85/15, v/v, cada hora, durante 24 h. La gráfica insertada muestra los valores de emisión a las λ de 635 nm (línea roja) y 540 nm (línea verde) en esos tiempos.

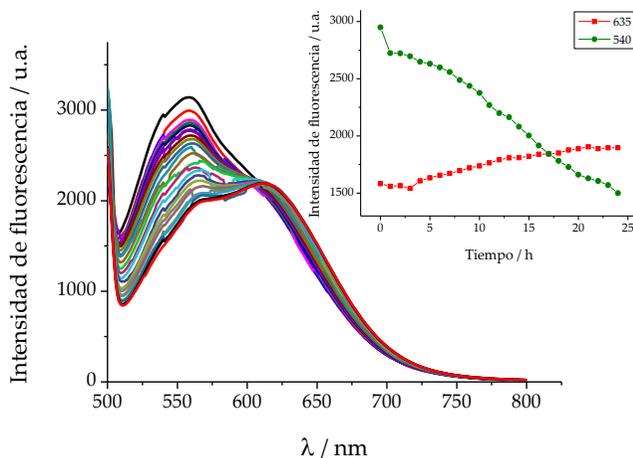


Fig. IV.63. Espectros de emisión ($\lambda_{exc} = 480$ nm) de DCM-NH-Pro-Gly $10 \mu\text{M}$ en suero de individuo diabético/DMSO 85/15, v/v, cada hora, durante 24 h. La gráfica insertada muestra los valores de emisión a las λ de 635 nm (línea roja) y 540 nm (línea verde) en esos tiempos.

En ambos experimentos, tanto en los realizados en suero de sujetos sanos como en suero de pacientes diabéticos, aparece una nueva banda de emisión con un máximo a aproximadamente 635 nm, igual que el mostrado en la figura IV.61 en la que además de la sonda se adicionó DPP IV. Es interesante destacar que resulta de interés la ratio I_{635}/I_{540} derivada de los espectros de emisión medidos en las mismas condiciones de sujetos sanos y pacientes diabéticos. Se muestra un incremento significativo de la intensidad a 635 nm en el caso del suero de los individuos diabéticos, debido a la mayor presencia de DPP IV. El ligero aumento de la intensidad de fluorescencia a la misma longitud de onda en el suero de los sujetos sanos demuestra que la sonda desarrollada es una herramienta útil como sensor para el análisis de trazas de DPP IV en el suero humano.

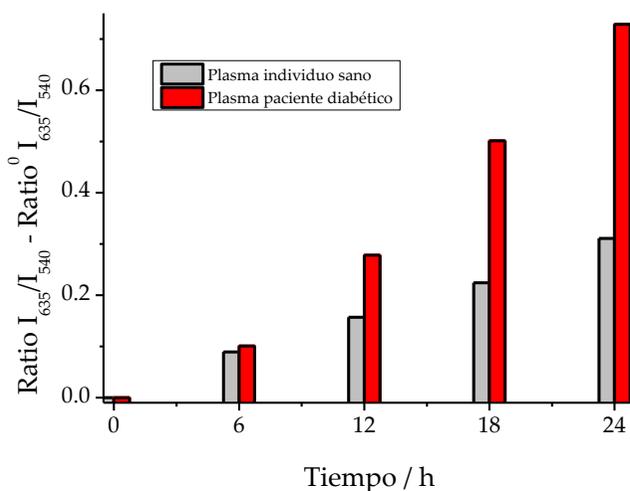


Fig. IV.64. Medidas ratiométricas normalizadas en el tiempo de las señales de fluorescencia de I_{635}/I_{540} de DCM-NH-Pro-Gly en sueros de sujetos diabéticos y sanos.

De la discusión anterior, se deduce que el principal inconveniente para medir la actividad de la DPP IV en el suero por medio de la fluorescencia en estado estacionario es la fuerte autofluorescencia del suero que aparece aproximadamente a 540 nm y su fotoblanqueamiento con el tiempo de irradiación, lo que hace imposible realizar medidas ratiométricas cuantitativas fiables entre la señal de fluorescencia a 635 nm y 540 nm.

Como se ha comentado, los componentes del suero emiten fluorescencia en el rango comprendido entre 550 y 650 coincidiendo

justamente con el intervalo de interés para la detección de la actividad enzimática de DPP IV con el sensor fluorescente diseñado. Para eliminar la autofluorescencia procedente del suero, se consideró utilizar la excitación de la sonda mediante dos fotones. En primer lugar, se comprobó la longitud de onda de excitación óptima para conseguir la máxima señal en los canales de detección rojo y verde. Para ello, se registraron las señales fluorescentes de DCM-NH₂ y DCM-NH-Pro-Gly a diferentes longitudes de onda de excitación entre 720 y 1000 nm y recogiendo la emisión en el intervalo comprendido entre 650 y 720 para el compuesto DCM-NH₂ y 520 a 538 para la sonda. Como la intensidad depende de la potencia de la excitación, las señales se calcularon mediante una normalización en función de dicha potencia de la fuente de excitación medida. La señal más alta de ambos compuestos se obtuvo a 800 nm (figura IV.65) y, por tanto, se seleccionó esta longitud de onda en todos los experimentos realizados por TPM.

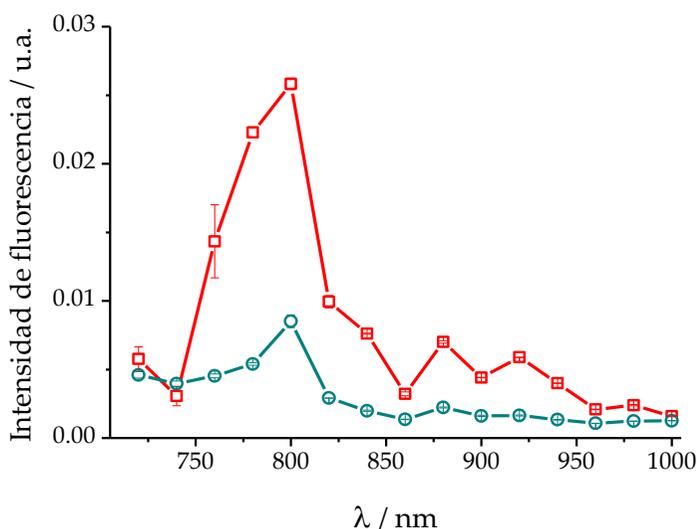


Fig. IV.65. Espectros de excitación por dos fotones de DCM-NH₂ (cuadrado en rojo) y DCM-NH-Pro-Gly (círculos en azul) medidos en PBS/DMSO 7/3 v/v. Emisión recogida a 650-720 nm (para DCM-NH₂) y 502-538 nm (para DCM-NH-Pro-Gly), y excitación entre 720 y 1000 nm, medida cada 20 nm. Las intensidades fueron calculadas por normalización de la potencia de la fuente de excitación. Las barras representan el error estándar (SE) de tres réplicas.

Una vez escogida 800 nm como la longitud de onda de excitación más adecuada para excitar el suero, se midieron las intensidades de fluorescencia

en los canales de detección verde y rojo con un láser de esta longitud de onda y con otro de 488 nm, que es el láser del que se dispone en el laboratorio de longitud de onda más próxima a 480 nm utilizada en los experimentos realizados por espectroscopía de fluorescencia monofotónica en estado estacionario. El resultado obtenido se puede observar en la figura IV.66.

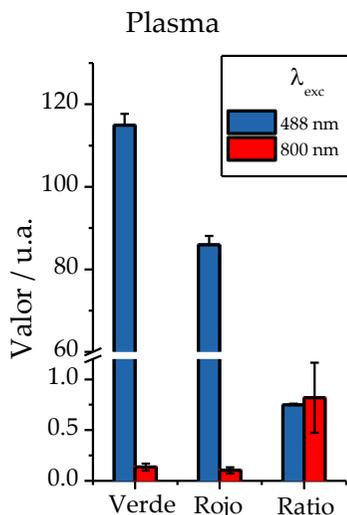


Fig. IV.66. Valores de intensidad fluorescencia de la muestra de suero sanguíneo medida en los canales verde y rojo, así como la ratio rojo/verde utilizando longitudes de onda de excitación de 488 y 800 nm. Los bigotes representan el SE.

Como se puede observar claramente, el uso de la excitación con dos fotones reduce notablemente la autofluorescencia del suero en ambos canales de detección, ya que la fluorescencia medida, cuando se utilizó 800 nm como longitud de onda de excitación, es prácticamente insignificante. Este hecho probablemente sea debido a la muy baja sección transversal de absorción de dos fotones de los componentes fluorescentes del suero.

Una vez demostrado que la excitación a 800 nm elimina prácticamente la autofluorescencia del suero, se añadió el colorante DCM-NH₂ a otra muestra de suero y se recogió de nuevo la emisión de fluorescencia en ambos canales. En el rojo, para cuantificar la emisión del producto de la reacción, el DCM-NH₂, y en el verde para la emisión procedente principalmente del

DCM-NH₂ y del suero. De nuevo se calcularon los valores del cociente de ambos canales. Estos resultados se recogen en la figura IV.67.

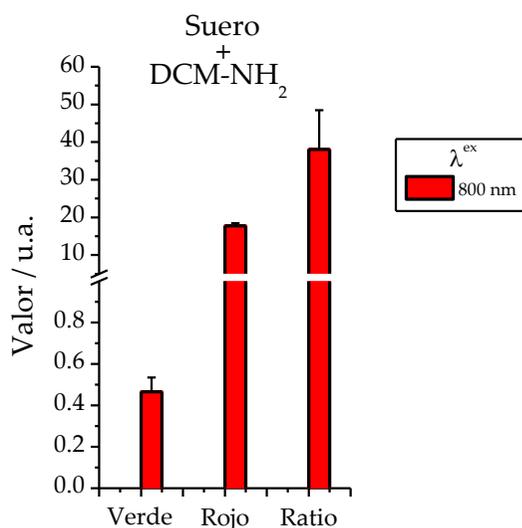


Fig. IV.67. Valores de intensidad medida en los canales verde y rojo y la ratio rojo/verde utilizando las longitudes de onda de excitación de 488 y 800 nm de la muestra de suero sanguíneo con DCM-NH₂. Los bigotes representan el SE.

Como se observa, la adición del producto DCM-NH₂ al suero resulta en un aumento considerable en el valor del ratio, en comparación con el valor obtenido en la figura IV.66. Concretamente, el valor se incrementó ~47 veces.

Del mismo modo, se realizaron experimentos en los que se añadió la sonda DCM-NH-Pro-Gly al suero (figura IV.68), obteniendo la respuesta esperada correspondiente a la sonda prácticamente sin reaccionar ($t \approx 0$ min), es decir, menor intensidad de fluorescencia roja, mayor verde y, por tanto, menor relación de la ratio R:V que la correspondiente al DCM-NH₂, mostrada en la figura IV.68.

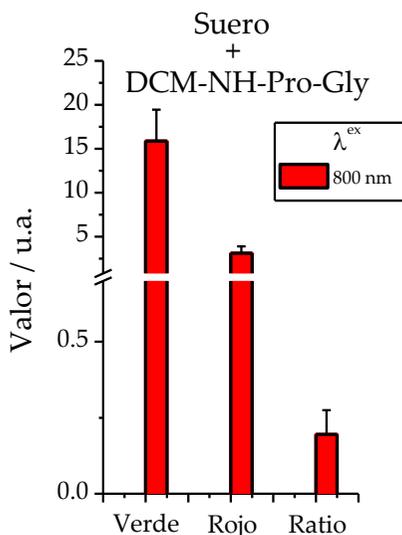


Fig. IV.68. Valores de intensidad de los canales verde y rojo y valores de ratio rojo/verde de la muestra de suero sanguíneo con DCM-NH-Pro-Gly, utilizando las longitudes de onda de excitación de 488 y 800 nm. Los bigotes representan el SE.

Por último, se midió la intensidad de fluorescencia tras la excitación por dos fotones de una muestra de suero a la que se adicionó la sonda y la enzima DPP IV, dejándola reaccionar durante 24 h. En la figura IV.69 se muestran algunas imágenes representativas de la ratio rojo/verde, a diferentes tiempos.

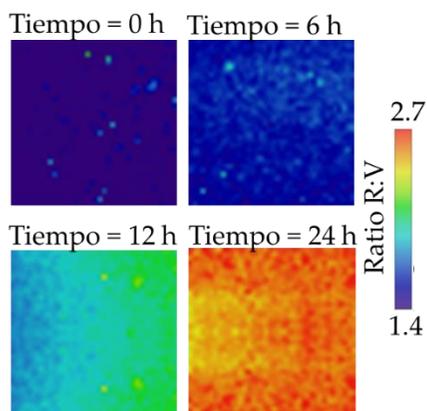


Fig. IV.69. Mapas representativos de la ratio R:V del suero sanguíneo humano sano con DCM-NH-Pro-Gly con DPP IV ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$) a diferentes tiempos de reacción ($\lambda_{\text{ex}} = 800 \text{ nm}$).

En esta figura, es posible visualizar las diferencias de color en las imágenes a diferentes tiempos de reacción, donde el cambio de color es causado por la progresiva escisión de DCM-NH-Pro-Gly generándose el colorante DCM-NH₂.

La velocidad de aparición de los productos de la reacción enzimática entre la DPP IV y un determinado sustrato se ha utilizado para calcular la actividad de la DPP IV en el suero de pacientes con diabetes (199) (104).

Los resultados de la medida de la muestra a diferentes tiempos se representan en la figura IV.70, donde se comprueba que la relación R:V aumenta gradualmente de forma lineal ($R^2 = 0.99$), lo que ha permitido el cálculo de la velocidad de reacción, expresada como la relación R:V frente al tiempo.

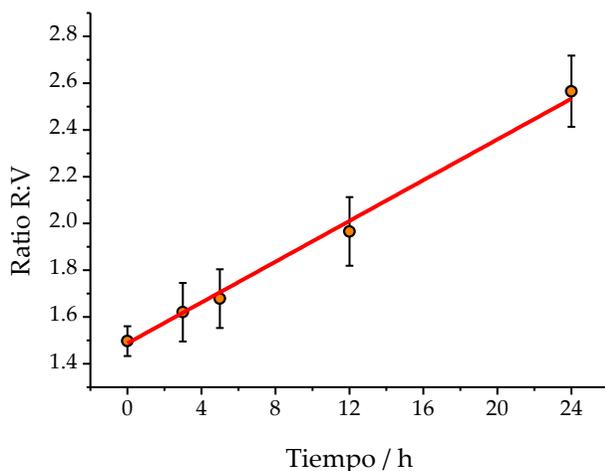


Fig. IV.70. Valores medios de la ratio R:V del suero sanguíneo de las imágenes de la sonda DCM-NH-Pro-Gly registradas a diferentes tiempos de reacción ($\lambda_{\text{ex}} = 800 \text{ nm}$). Los bigotes representan el SE.

La eficacia de la metodología desarrollada con la sonda DCM-NH-Pro-Gly abre una puerta a su futuro uso en la detección *in situ* de DPP IV, permitiendo el diagnóstico de enfermedades en las que la enzima está sobreexpresada en la sangre. Por supuesto, la metodología propuesta debe ser optimizada al objeto de proporcionar la cuantificación de la actividad de la enzima. En la actualidad, se están diseñando los experimentos necesarios para ello.

IV.3.3.2. Imágenes de fluorescencia de DPP IV en células tumorales

Una de las principales ventajas de las sondas ópticas es la posibilidad de detectarlas en tiempo real, *in vivo* e *in situ*. Esta característica las hace muy atractivas para su uso en muestras biológicas. Para probar la eficacia del DCM-NH-Pro-Gly como sensor intracelular de DPP IV, se seleccionó la línea celular Caco-2 como cultivo celular de interés. Las células Caco-2 proceden de un adenocarcinoma colorrectal humano, una enfermedad de la que se conoce que tiene una mayor actividad de DPP IV (99, 328).

Antes de hacer el estudio de la sonda desarrollada en células, se hizo un ensayo de viabilidad celular MTT en esta línea celular, siguiendo el procedimiento descrito en la sección III.3.9.6. Los resultados se pueden observar en la figura IV.71.

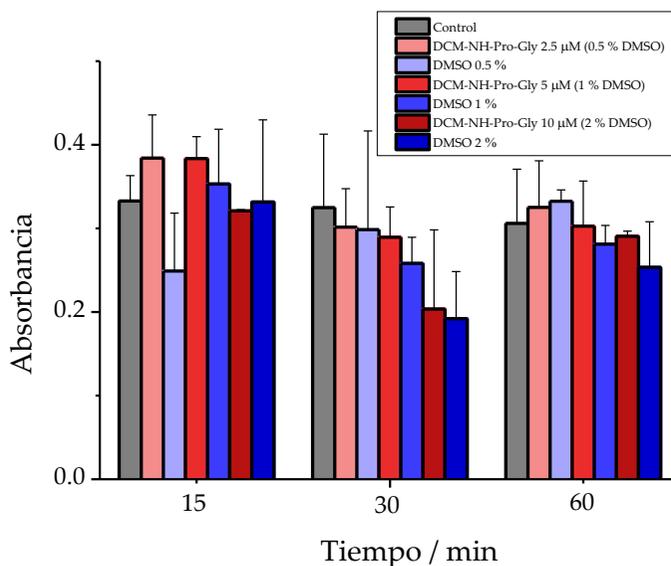


Fig. IV.71. Ensayo de proliferación de células Caco-2. Histogramas a lo largo del tiempo utilizando diferentes concentraciones de DCM-NH-Pro-Gly (2.5, 5 y 10 μM , correspondientes a un porcentaje de DMSO igual a 0.5, 1 y 2 %, respectivamente) y DMSO en los mismos porcentajes (0.5, 1 y 2 %) y con un control. Los datos se representan como absorbancia a 570 nm y se muestran como media \pm SE.

Como se puede observar no hay diferencias significativas en los valores de absorbancia (traducidos en actividad metabólica celular) cuando se emplea la sonda a distintas concentraciones (lo que implica un diferente porcentaje de DMSO), respecto a las células incubadas con DMSO en ese

mismo porcentaje, e incluso con aquellas que no fueron incubadas con DMSO y que se han utilizado como controles. Tampoco se aprecia que haya una menor viabilidad celular a medida que aumenta el tiempo de incubación. Por tanto, a partir de los resultados obtenidos, se concluye que el compuesto DCM-NH-Pro-Gly no resulta tóxico en las células Caco-2.

Tras la adición de DCM-NH-Pro-Gly al medio extracelular, la sonda penetra en el interior de las células de forma rápida y espontánea, al igual que otras sondas químicas similares descritas en la literatura (9, 329).

En cuanto se adicionó la sonda, y a medida que transcurría el tiempo, se observó un aumento de la emisión registrada en el canal rojo, mientras que el canal verde registró una muy ligera disminución. En consecuencia, las imágenes de la relación R:V mostraron un aumento evidente (figura IV.72).

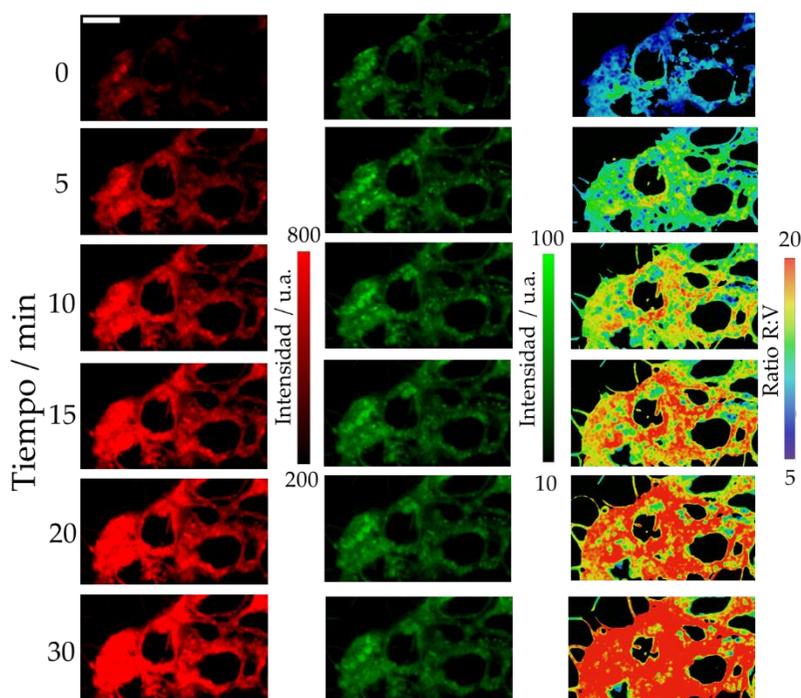


Fig. IV.72. Imágenes de una muestra representativa de la línea celular Caco-2 viva incubada con DCM-NH-Pro-Gly ($2.5 \mu\text{M}$) registradas en los canales rojo (izquierda, $\lambda_{\text{ex}} = 450 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 648\text{-}722 \text{ nm}$) y verde (centro, $\lambda_{\text{ex}} = 450 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 533\text{-}557 \text{ nm}$) en seis momentos diferentes. Imágenes de la relación R:V (derecha) obtenidas en el mismo tiempo. La barra de escala representa $10 \mu\text{m}$.

En la figura IV.73, se representan los valores medios de la relación R:V con respecto al tiempo.

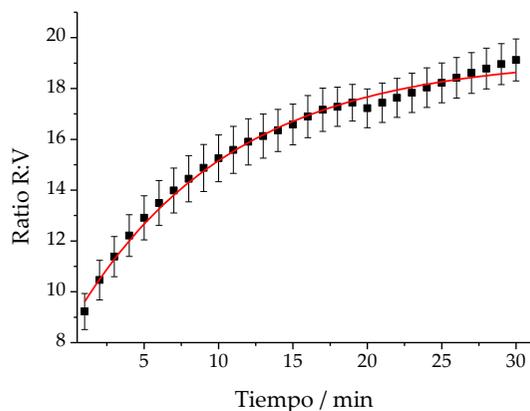


Fig. IV.73. Representación de los valores medios de la relación R:V de cinco experimentos independientes. Las barras de error representan el SE.

Como se esperaba, la cinética mostró un buen patrón del aumento del ratio, útil para realizar un adecuado análisis cuantitativo de la actividad enzimática. La representación de estos datos en una escala doble logarítmica (figura IV.74) se ajusta mediante una línea recta, por lo que la evidencia indica que la relación R:V surge sólo de la escisión de la sonda y no de la entrada lenta de ésta en las células, lo que confirma la hipótesis de la rápida penetración intracelular de la sonda.

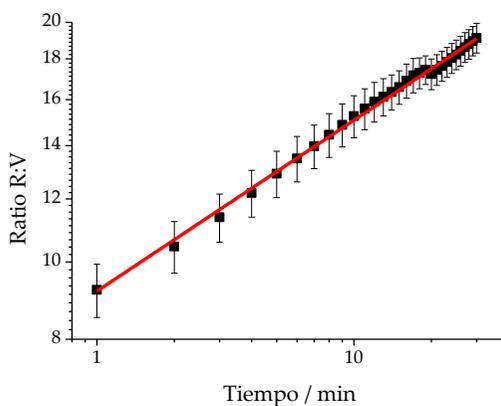


Fig. IV.74. Representación doble logarítmica de los datos de la figura IV.73. Las barras de error representan el SE. La línea roja es un ajuste lineal con un $R^2=0.99$.

La buena permeabilidad de la membrana celular también se puede confirmar con el cálculo de los valores de CLogP, el coeficiente entre el n-octanol y el agua, una medida bien establecida de la hidrofilia del compuesto. Los valores obtenidos de acuerdo al procedimiento descrito en la sección III.3.9.6 fueron 2.615 y 2.877 para DCM-NH-Pro-Gly y DCM-NH₂, respectivamente. Estos datos están dentro del rango de la regla de Lipinski para sustancias con buena permeabilidad celular ($-0,5 < \text{LogP} < 5$)(330).

Por último, para confirmar que la actividad de la DPP IV es responsable de la generación de la fluorescencia roja, se midió la cinética de la relación R:V durante 30 min en células Caco-2 con la sonda, en presencia y ausencia de sitagliptina. La figura IV.75 muestra las imágenes de la relación R:V de una muestra representativa. Comparando con la escala de color seleccionada, se observa una más baja transición hacia los valores más altos de ésta en el cultivo celular con sitagliptina.

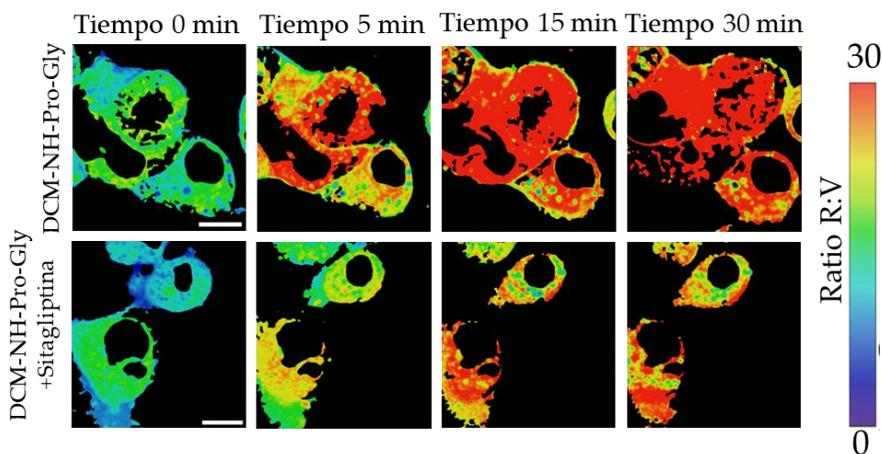


Fig. IV.75. Imágenes de la ratio R:V de la línea celular Caco-2 viva después de añadir DCM Pro-Gly (5 μM) sin (panel superior) y con (panel inferior) el inhibidor de DPP IV sitagliptina (50 μM). La barra de escala representa 10 μm .

En la figura IV.76 se representa el aumento de la relación R:V con respecto al tiempo.

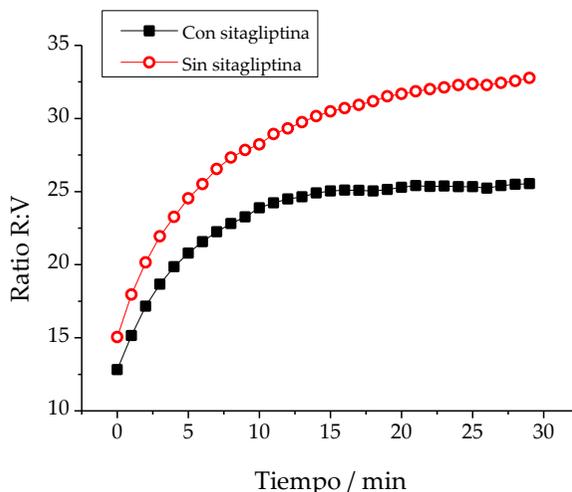


Fig. IV.76. Representación de los valores de ratio R:V a partir de imágenes de microscopía sin (círculos) y con (cuadrados) sitagliptina.

La adición del inhibidor produce una velocidad de reacción más lenta, como puede observarse por la pendiente inicial de ambas curvas, y la producción de una menor cantidad del producto de la reacción, DCM-NH₂, tal y como se observa en el valor final de meseta alcanzado en ambos casos.

Como ya se comentó en el apartado IV.2.3. sobre las aplicaciones biológicas del sensor DCM-NH-Ala, el DCM-NH₂ es un fluoróforo que puede utilizarse en la obtención de imágenes de bacterias, no sólo mediante la excitación por dos fotones, sino también por microscopía de superresolución (STED). Con respecto a la superresolución, se comprobó su capacidad de uso en células eucariotas tumorales. En la figura IV.77, se hace un análisis comparativo de la resolución de las imágenes adquiridas con microscopía confocal y de superresolución. Así, además de las imágenes obtenidas, se muestran los perfiles de intensidad de fluorescencia frente a la distancia trazada en las imágenes.

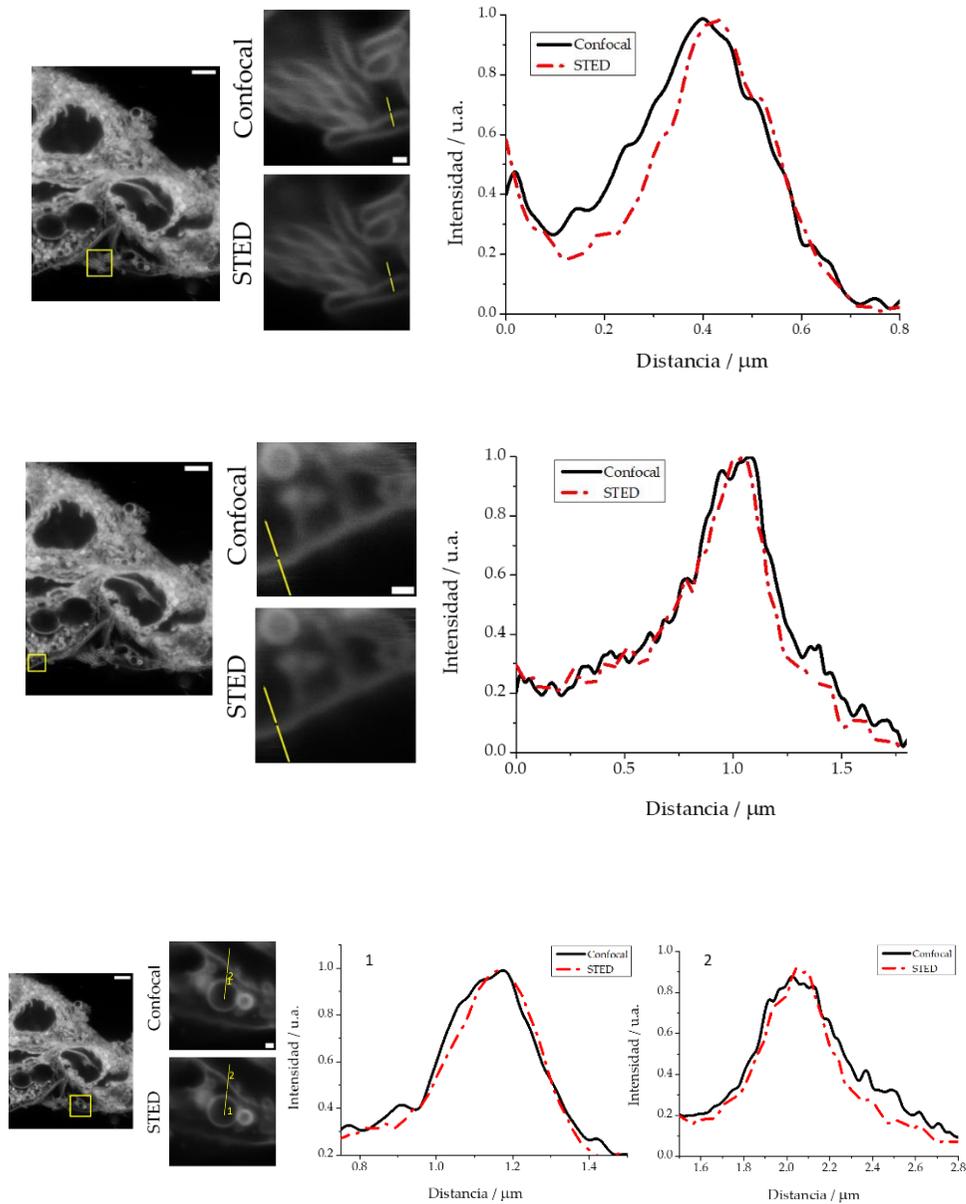


Fig. IV.77. Imágenes obtenidas de células Caco-2 vivas mediante microscopía confocal y STED. La imagen de la izquierda es una visión general de las células y el cuadrado indica la zona donde se midió con el confocal/STED. La barra de escala representa 5 μm . En el centro, se presenta las imágenes obtenidas mediante microscopía confocal/STED. La barra de escala en estas imágenes representa 0.5 μm . A la derecha, se representa el perfil del trazado (el negro corresponde a las imágenes confocales y el rojo a las imágenes STED) para la línea marcada en las imágenes del centro de la figura.

Los resultados muestran una leve mejora en la resolución espacial utilizando la microscopía STED con respecto a las imágenes confocales (ver figura IV.77). A pesar de la buena resolución lograda con la microscopía confocal debido a la excelente respuesta fluorescente del fluoróforo en las células, la conseguida con la microscopía de superresolución es sólo ligeramente superior. Además, en comparación con lo que ocurre en bacterias, la acumulación en determinados sitios de las células es menor que en éstas, produciendo una intensidad suficiente e impidiéndose la obtención de imágenes STED similares a las obtenidas en bacterias con la sonda DCM-NH-Ala.

En relación a la capacidad del fluoróforo para utilizarlo en microscopía con excitación bifotónica se recogieron también imágenes de células Caco-2 vivas a la longitud de onda de excitación de 800 nm, tal y como se observa en la figura IV.78.

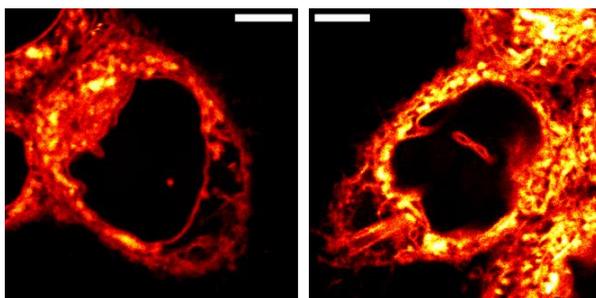


Fig. IV.78. Imágenes obtenidas de células Caco-2 vivas mediante excitación con dos fotones de 800 nm. La barra de escala representa 5 μm .

Por otro lado, en la figura IV.79 se representan las imágenes FLIM de las mismas células Caco-2 anteriormente representadas.

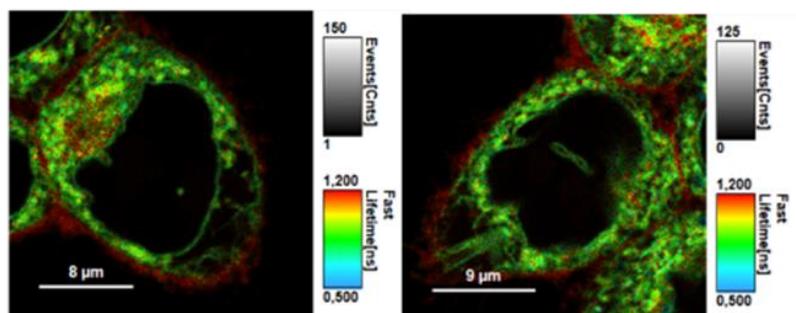


Fig. IV.79. Imágenes FLIM de la figura IV.78.

La figura IV.79 reveló que en las células Caco-2 el colorante tiene un tiempo de vida por encima de 1.2 ns en la periferia celular, compatible con su presencia en la membrana citoplasmática, una de las estructuras celulares de mayor lipofilia. Sin embargo, el aumento de la polaridad en otras estructuras citoplasmáticas provocan una desexcitación más rápida que se corresponde con un tiempo de vida de fluorescencia menor (alrededor de 0.9 ns). El tiempo de vida de fluorescencia del DCM-NH₂ ya fue estudiado previamente en diferentes disolventes, y aunque los cambios en el tiempo de vida de fluorescencia pueden estar motivados por la diferencia en la polaridad que rodea el lugar donde está presente el colorante, se deben realizar más experimentos para determinar si existen causas adicionales que justifiquen la disminución del tiempo de vida.

Además, todas las imágenes obtenidas por las distintas técnicas de microscopía de fluorescencia utilizadas muestran el típico patrón de acumulación de DCM-NH₂ en las células, principalmente en los lisosomas, tal y como se describe en la literatura (331).

El patrón de acumulación, así como la diferencia en el tiempo de vida de fluorescencia del DCM-NH₂ en las diferentes estructuras, son comportamientos prometedores para realizar estudios más profundos mediante FLIM de aislamiento de orgánulos y de la lipofilia celular interna.

Por lo tanto, los experimentos *in cellulo*, confirman la aplicabilidad de esta sonda como sensor intracelular de la actividad de DPP IV. Estos resultados, que combinan la capacidad de excitación por dos fotones y la emisión NIR del DCM-NH₂, son características prometedoras para seguir investigando en sus aplicaciones biológicas.

IV.3.3.3. Imagen de DPP IV en tejidos tumorales

La imagen en los tejidos puede resultar de gran utilidad en múltiples aspectos, incluyendo aplicaciones médicas como el diagnóstico o la cirugía. Por esta razón, se examinó también la capacidad del sensor DCM-NH-Pro-Gly para detectar la actividad de la DPP IV en tejidos. Para ello, se seleccionaron tumores BxPC-3, en los que está sobreexpresada esta enzima. Como paso previo al ensayo biológico del compuesto en estos tejidos, y al

igual que con las células Caco-2, se hizo un ensayo de viabilidad celular MTT en esta línea celular (BxPC-3). Los resultados se pueden observar en la figura IV.80.

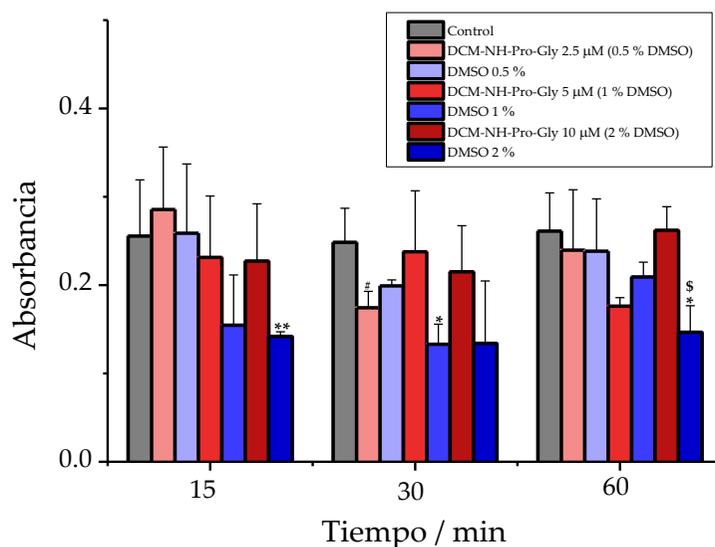


Fig. IV.80. Ensayo de proliferación de células BxPC-3. Histogramas a lo largo del tiempo utilizando diferentes concentraciones de DCM-NH-Pro-Gly (2.5, 5 y 10 μM, correspondientes a un porcentaje de DMSO igual a 0.5, 1 y 2 %, respectivamente) y DMSO en los mismos porcentajes (0.5, 1 y 2 %). Los valores estadísticamente significativos se representan con **p < 0.01; #p < 0.05 (comparando DMSO frente a control), *p < 0.05 (comparando DCM-NH-Pro-Gly frente a control), \$p < 0.05 (comparando DMSO frente a DCM-NH-Pro-Gly), mediante la prueba T-Student. Los datos se representan como absorbancia a 570 nm y se muestran como media ± SE.

Del análisis de los datos obtenidos, se deduce que la toxicidad mínima se debe al DMSO necesario para la solubilidad del DCM-NH-Pro-Gly, y no a la estructura química de este sensor en sí.

Una vez realizado el ensayo, MTT, y al objeto de comprobar la detección del colorante liberado en la reacción enzimática en los tejidos, se incubaron éstos en PBS con una disolución sólo de DCM-NH₂ durante 24 h.

Tras este periodo, se lavó con PBS y se recogieron imágenes utilizando 800 nm como longitud de onda de excitación (figura IV.81).

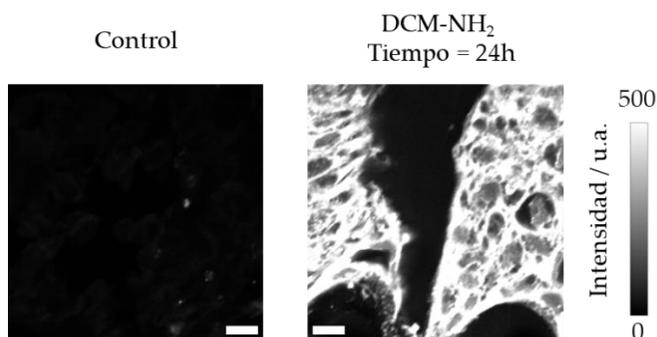


Fig. IV.81. Imágenes representativas medidas en el canal rojo de tumores BxPC3 incubados con DCM-NH₂ (10 μ M) durante 24 h, obtenidas mediante microscopía con excitación bifotónica a 800 nm (λ_{em} = 650-720 nm). La barra de escala representa 10 μ m.

Los datos muestran un fuerte incremento de la fluorescencia con respecto al control, que presenta una emisión NIR casi insignificante, lo que demuestra que se puede detectar la emisión del DCM-NH₂.

Seguidamente se incubó este tipo de tejidos con la sonda DCM-NH-Pro-Gly, y se midió la emisión verde y NIR justo después de 1, 2 y 6 h de incubación (figura IV.82).

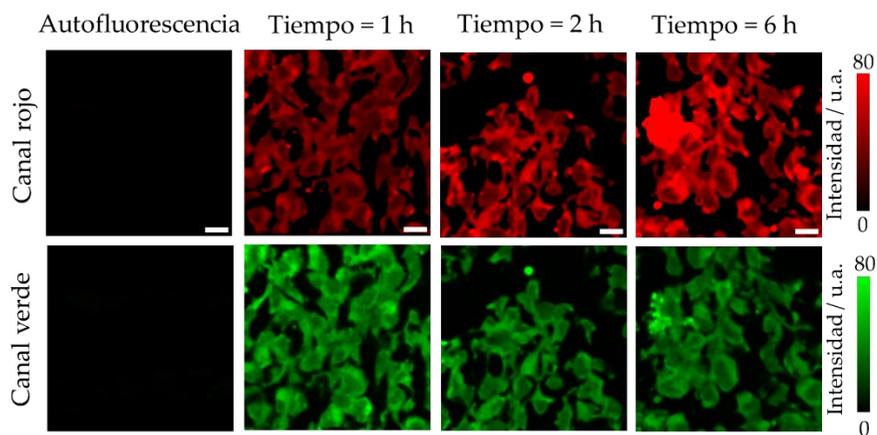


Fig. IV.82. Imágenes representativas de intensidad de los canales rojo (λ_{em} = 650-720 nm) y verde (λ_{em} = 502-538 nm) tras la adición de DCM-NH-Pro-Gly (10 μ M) al tejido procedente del tumor BxPC-3 obtenidas mediante microscopía de dos fotones con excitación a 800 nm. La barra de escala representa 10 μ m.

De la observación de las imágenes, se comprueba una autofluorescencia insignificante y que la sonda al tiempo inicial (1 h) muestra una emisión verde y NIR con una intensidad similar. Tras 2 h de incubación, se registra un aumento de la emisión NIR aunque el canal verde se mantiene con una fluorescencia similar. Este comportamiento continúa tras 6 h de incubación. Dicho aumento se corresponde con la escisión de la sonda DCM-NH-Pro-Gly debido a la presencia de actividad DPP IV en el tejido, liberando el compuesto DCM-NH₂.

Por último, se representaron en la figura IV.83 las imágenes de la ratio R:V a los diferentes tiempos de incubación correspondientes a la figura IV.82.

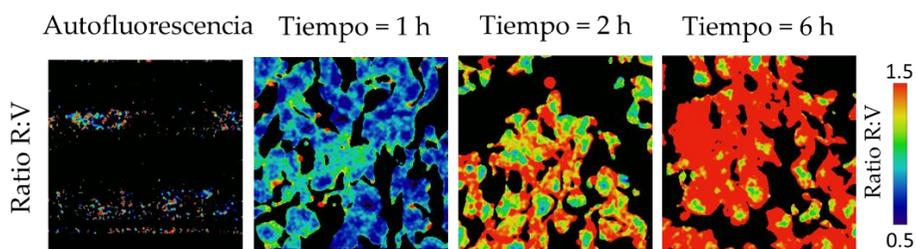


Fig. IV.83. Imágenes ratiométricas R:V tras la adición de DCM-NH-Pro-Gly (10 μ M) al tejido tumoral BxPC-3 obtenidas mediante microscopía de dos fotones con excitación a 800 nm. La barra de escala representa 10 μ m.

Como se muestra en la figura IV.83, y como era de esperar, las imágenes mostraron un aumento en la relación a lo largo del tiempo. La figura IV.84 representa los cambios en los valores de la ratio en estos tres tiempos de incubación. Así, en un período de 6 h, se observó un aumento de la relación de ratio R:V de ~ 1.0 a ~ 1.8 .

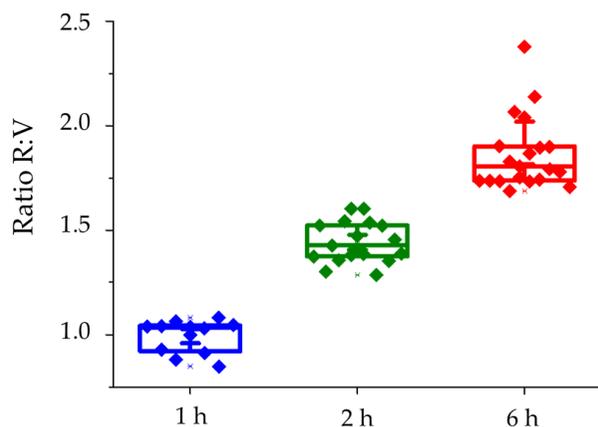


Fig. IV.84. Representación de los valores de ratio R:V de las imágenes. Los recuadros representan los percentiles 25, 50 y 75. Los bigotes representan el SE.

Por lo tanto, los resultados obtenidos confirman el uso exitoso de DCM-NH-Pro-Gly para detectar la actividad de DPP IV en tejidos *ex vivo*.

IV.3.3.4. Imagen *in vivo* de DPP IV en pez cebra

Recientemente, Liu et al. han reportado la actividad de la DPP IV en embriones y larvas de pez cebra (104). Sin embargo, en este estudio, la actividad de la DPP IV se determinó sólo cualitativamente. En esta Tesis Doctoral se ha ido más allá, y se ha completado con un estudio cuantitativo de las diferencias en la actividad DPP IV durante 1, 3, 5 y 7 días post-fecundación (dpf) en embriones y larvas de pez cebra. Para ello, en primer lugar y como control se incubaron las larvas y embriones con DMSO. El resultado se puede observar en la figura IV.85.

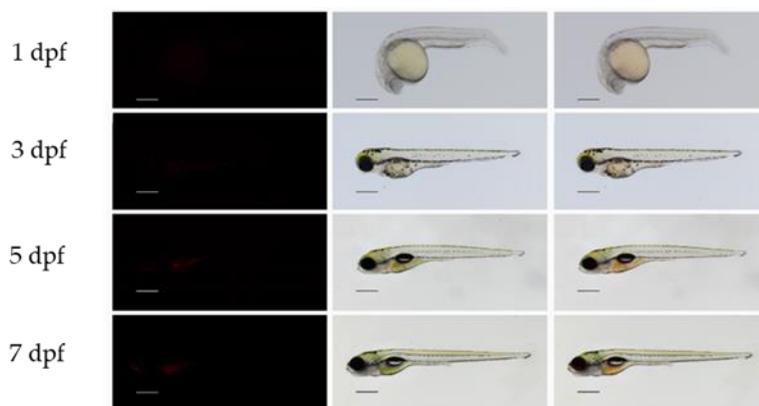


Fig. IV.85. Embriones y larvas de pez cebra vivos incubados con 5 μM de DMSO a diferentes días post-fecundación (dpf); las imágenes de fluorescencia roja (izquierda), campo claro (centro) y fusión (derecha) se toman con un microscopio estereoscópico. Barras de escala: 1 dpf: 250 μm , 3-7 dpf: 500 μm .

Seguidamente, se incubaron las larvas y los embriones con la sonda DCM-NH-Pro-Gly en las mismas condiciones. Las imágenes registradas se pueden contemplar en la figura IV.86.

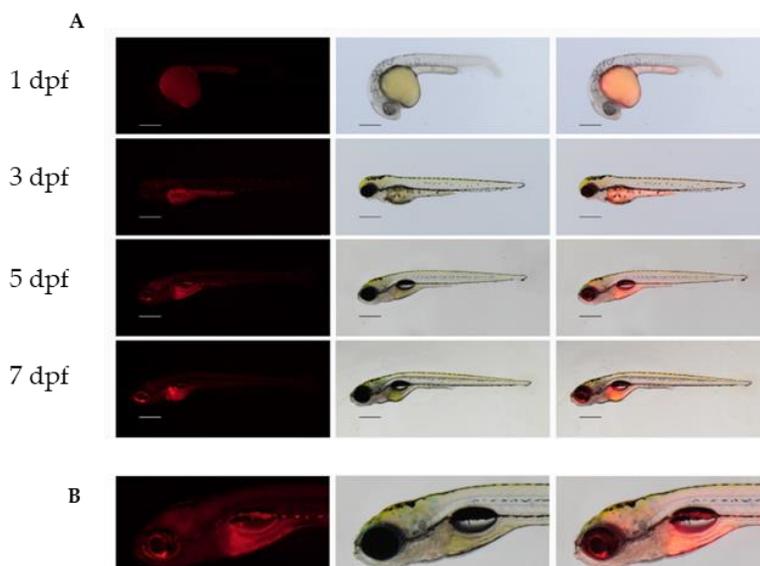


Fig. 86. A) Embriones y larvas de pez cebra vivos incubados con 5 μM de DCM-NH-Pro-Gly en diferentes dpf. Se muestran imágenes de fluorescencia roja (izquierda), campo claro (centro) y fusión (derecha) medidas con el microscopio estereoscópico. Barras de escala: 1 dpf: 250 μm , 3-7 dpf: 500 μm . B) Detalle (cabeza con sistema nervioso central) de una larva viva de pez cebra a los 5 dpf. Barra de escala: 200 μm .

Mientras que los embriones y larvas de control del pez cebra incubados con DMSO mostraron muy poca autofluorescencia roja en el saco vitelino y el ojo (ver figura IV.85), todos los estadios del pez cebra incubados con la sonda metabolizaron el sustrato verde original a un derivado fuertemente fluorescente NIR tanto en el saco vitelino como en los tejidos embrionarios.

Los embriones de pez cebra a 1 dpf mostraron fluorescencia roja principalmente en el saco vitelino (figura IV.86A fila superior), lo que indica una alta actividad de DPP IV y/o una alta permeabilidad de la membrana vitelina para la sonda. Las larvas de pez cebra a los 3 dpf mostraron fluorescencia roja en el saco vitelino y comienzan a mostrar una acumulación de metabolitos fluorescentes rojos en otros tejidos larvales (figura IV.86A, segunda fila). En etapas medidas de desarrollo más avanzadas (5 y 7 dpf), se generó más derivado fluorescente rojo en los peces (figura IV.86A, tercera y cuarta filas), lo que indica un aumento de los niveles de actividad de DPP IV con la etapa de maduración. Los tejidos larvales más afectados son el sistema nervioso central (SNC), especialmente el mesencéfalo, el rombencéfalo y la médula espinal, el ojo y los órganos internos, como la garganta y el tracto digestivo. Por el contrario, la piel y los músculos no mostraron fuertes señales de fluorescencia roja (figuras IV.86A y IV.86B). Por lo tanto, se predice que la DPP IV es activa en el saco vitelino a partir de los estadios embrionarios del pez cebra, mientras que, en los estadios larvares, la enzima es posiblemente más activa en el saco vitelino, los órganos internos y el SNC.

Además, se realizó un control adecuado con sitagliptina, como inhibidor de la DPP IV. Para ello, se utilizó un pez cebra de 5 dpf preincubado con el inhibidor, y luego incubado con la misma concentración de sustrato y durante el mismo tiempo. La figura IV.87 revela los resultados adquiridos.



Fig. IV.87. Larva de pez cebra de 5 dpf preincubada durante 3 h con 250 μM de sitagliptina e incubada con 5 μM de DCM-NH-Pro-Gly durante 2 h. Barra de escala: 500 μm .

En comparación con las imágenes obtenidas con el pez cebra de 5 dpf que no fue inhibido antes de la adición del sustrato (ver figura 86A, tercera fila), el pez muestra una fluorescencia roja fuertemente reducida. Se concluye finalmente y sin ambigüedad alguna que la fluorescencia roja es debida al producto generado tras la acción de la enzima.

Además de describir cualitativamente la acumulación de DCM-NH₂ liberado en los diferentes tejidos del pez cebra, se cuantificó la intensidad procedente de la emisión NIR del compuesto a partir de las imágenes recuperadas con el microscopio estereoscópico a diferentes dpf. Los resultados se recogen en la figura IV.88.

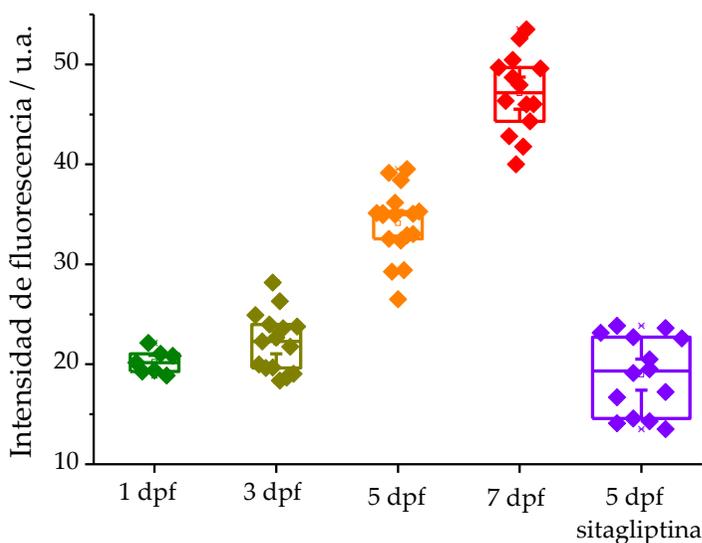


Fig. IV.88. Valores de intensidad de la emisión NIR del pez cebra en diferentes dpf, incubado con 5 μ M DCM-NH-Pro-Gly en presencia o ausencia del inhibidor sitagliptina. Los recuadros representan los percentiles 25, 50 y 75. Los bigotes representan el SE.

A partir de los mismos se pone de manifiesto una actividad similar (con diferencias insignificantes) a 1 y 3 dpf, aunque se aprecia un ligero incremento de la emisión roja en el 3 dpf con respecto al 1 dpf, lo que podría indicar un pequeño incremento de la actividad DPP IV.

La mayor diferencia en la emisión roja aparece durante 5 y 7 dpf. El análisis mostró un aumento significativo de la actividad DPP IV con respecto a las etapas anteriores. El estadio de 5 dpf evidencia un considerable incremento en la intensidad de la emisión NIR con respecto a 3 dpf, aunque el mayor valor de intensidad se alcanzó a los 7 dpf. Los resultados son compatibles con un aumento de la actividad DPP IV en las larvas de 5 dpf con una actividad enzimática máxima en las larvas de 7 dpf.

Por otro lado, el pez cebra inhibido de 5 dpf muestra una intensidad NIR roja menor que el del mismo estadio sin inhibidor.

El mismo patrón de acumulación de metabolitos rojos se observó también mediante medidas de microscopía confocal. Así, la figura IV.89 muestra las imágenes del pez cebra obtenidas a través de la composición (mosaico) de diferentes campos unidos utilizando la herramienta "*Pairwise stitching*" del plugin *Fiji Is Just ImageJ*.

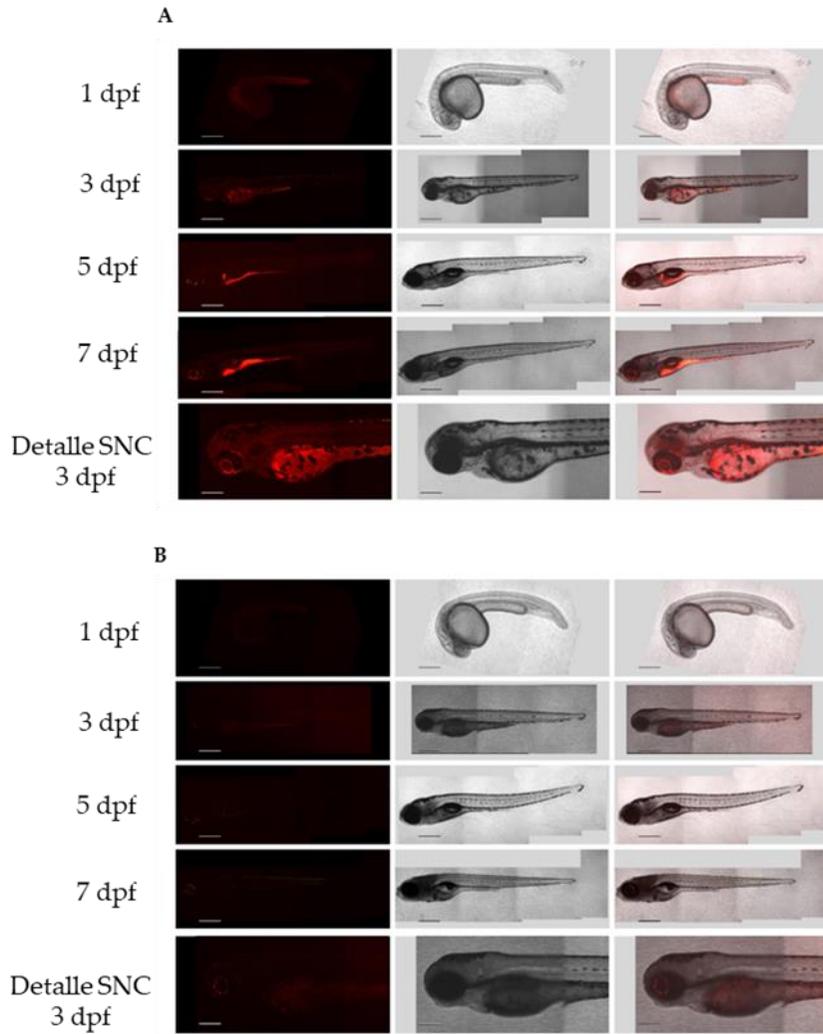


Fig. IV.89. Embriones y larvas de pez cebra vivos incubados con 5 μ M de DCM-NH-Pro-Gly (A) y con 5 μ M DMSO (B) en diferentes dpf; imágenes de fluorescencia roja (izquierda), campo claro (centro) y fusión (derecha) obtenidas por microscopía confocal. Para el canal rojo, se muestran las proyecciones máximas de los planos z (distancia-z 5 μ m) de la señal fluorescente de los embriones y larvas del pez cebra. Barras de escala: 1 dpf: 250 μ m, 3-7 dpf: 500 μ m, detalle 3 dpf: 200 μ m.

IV.4. Caracterización y aplicaciones biológicas del compuesto DCM-HBU

IV.4.1. Caracterización fotofísica del sensor y de la reacción enzimática

En primer lugar, se obtuvieron los espectros de absorción y emisión del DCM-NH₂ y DCM-HBU en la disolución PBS/DMSO (7/3 v/v), 50 mM, pH = 7.4. Los espectros normalizados se muestran en la figura IV.90.

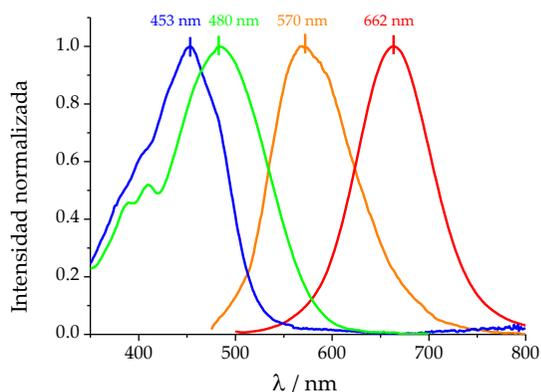


Fig. IV.90. Espectros de absorción normalizados de los compuestos puros DCM-HBU (línea azul) y DCM-NH₂ (línea verde); espectros de emisión normalizados de los compuestos puros DCM-HBU (línea amarilla) y DCM-NH₂ (línea roja) por excitación a 453 nm y 480 nm, respectivamente.

El espectro de absorción del DCM-HBU muestra una banda con un máximo a una λ de 453 nm; mientras que el de emisión una banda ($\lambda_{\text{ex}} = 453$ nm) con un máximo alrededor de 570 nm.

La determinación del coeficiente de extinción molar de la sonda fluorescente DCM-HBU a $\lambda = 453$ nm se recoge en la figura IV.91, proporcionando un valor de $\epsilon = 5409 \pm 400$ L mol⁻¹ cm⁻¹.

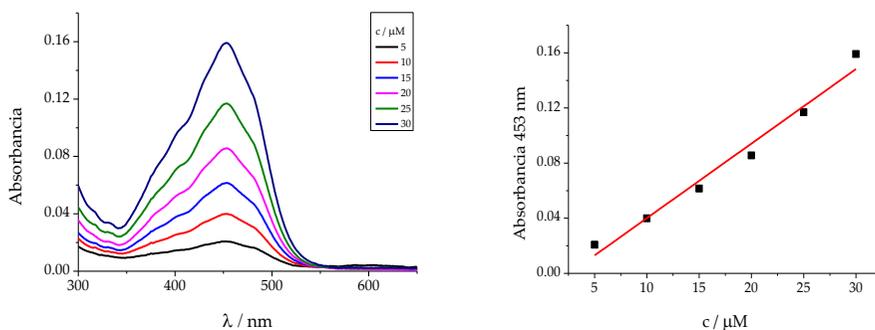


Fig. IV.91. Determinación del coeficiente de absorción molar del compuesto DCM-HBU en PBS /DMSO (7/3, v/v) a $\lambda_{exc} = 453$ nm. Ecuación de ajuste: $y = -0.01402 + 5409x$, $r = 0.97$.

Asimismo, se ha calculado el rendimiento cuántico de la sonda, de acuerdo a la metodología descrita en la sección III.3.10.1, tomando como referencia la Fluoresceína en NaOH 0.1 M. Los espectros de emisión de las disoluciones utilizadas para su cálculo se recogen en la figura IV.92. Así el valor de rendimiento cuántico obtenido fue igual a $0.08 \pm 0.01\%$.

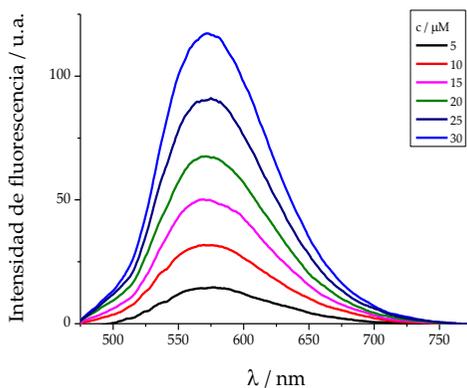


Fig. IV.92. Espectros de emisión del DCM-HBU ($\lambda_{exc} = 453$ nm) a diferentes concentraciones en PBS/DMSO (7/3, v/v).

Además del cálculo del rendimiento cuántico y el coeficiente de absorptividad molar, se ha medido el tiempo de vida de fluorescencia del sensor, cuyo decaimiento se recoge en la figura IV.93.

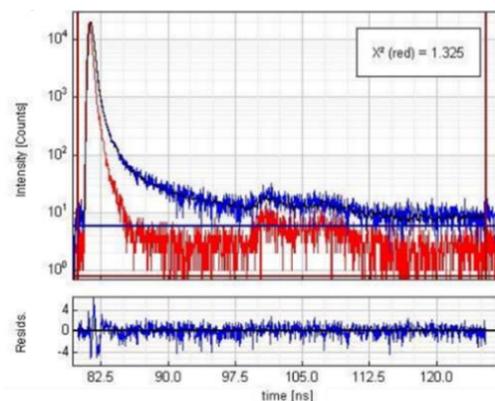


Fig. IV.93. Decaimiento de fluorescencia del DCM-HBU ($\lambda_{exc} = 453 \text{ nm}$).

El valor del tiempo de vida calculado fue de 554.4 ps. La distribución de los residuales en torno a 0 como valor central y el valor del parámetro $\chi^2 = 1.33$, indican la bondad del ajuste realizado.

Una vez caracterizado el sensor, se ha estudiado la respuesta de la sonda a la enzima tirosinasa (TYR). La figura IV.94 muestra los espectros de emisión de una disolución de DCM-HBU ($25 \mu\text{M}$) en PBS/DMSO (7/3, v/v), 100 mM, pH= 7.4, recogidos cada minuto después de la adición de TYR (0.13 mg mL^{-1}), durante un tiempo total de 2 h, a $37 \text{ }^\circ\text{C}$.

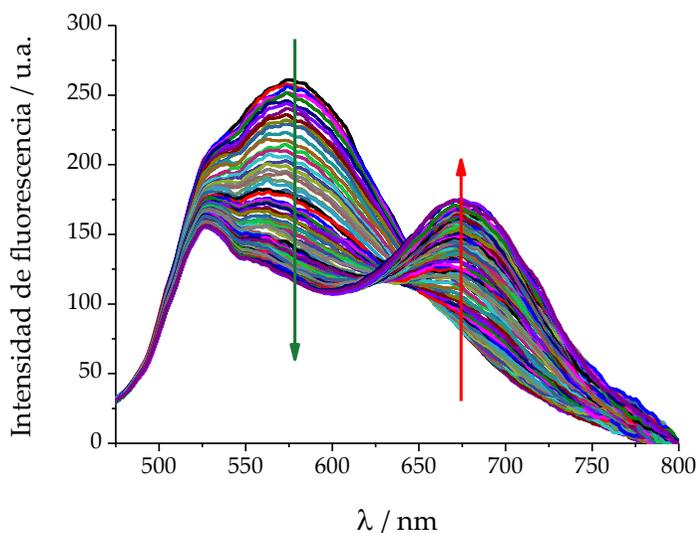


Fig. IV.94. Evolución de los espectros de emisión de DCM-HBU ($25 \mu\text{M}$) con TYR (0.13 mg mL^{-1}) observados cada 1 min durante 2 h mediante excitación a 450 nm a $37 \text{ }^\circ\text{C}$.

Como se muestra en la figura IV.94, la sonda presenta una banda de emisión con un pico a ~ 570 nm ($\lambda_{\text{ex}} = 453$ nm). Tras la adición de la enzima, se produce la disminución de dicha banda, junto con un aumento concomitante de la banda de emisión con máximo a 662, atribuida al producto liberado DCM-NH₂.

Para observar mejor los cambios observados en la evolución espectral del compuesto a lo largo del tiempo, se representan a continuación los espectros cada diez minutos, durante 2 h, tiempo en el cual parece se llega al máximo de intensidad del producto hidrolizado. Los datos se observan en la figura IV.95.

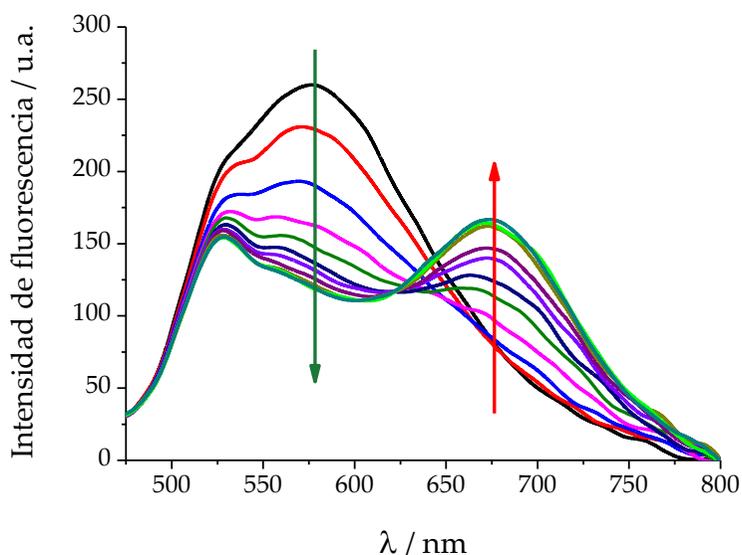


Fig. IV.95. Evolución de los espectros de emisión de DCM-HBU (25 μM) con TYR (0.13 mg mL⁻¹) observados cada 10 min durante 2 h mediante excitación a 450 nm a 37 °C.

En la figura IV.96 se puede observar la representación gráfica del cociente entre las intensidades de la señal a 662 y la de 570 nm frente al tiempo tras la adición de la enzima TYR, derivadas de la figura IV.94.

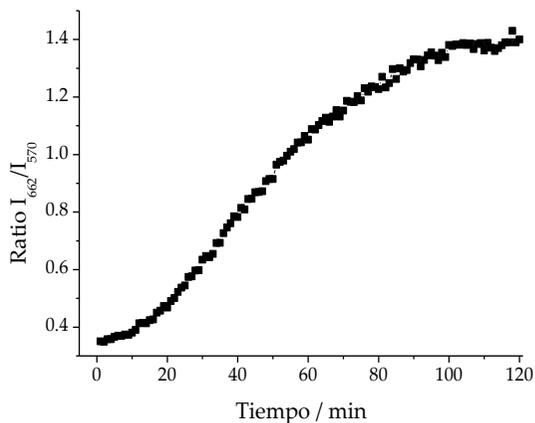


Fig. IV.96. Medidas ratiométricas de las señales de fluorescencia de I₆₆₂ / I₅₇₀ a diferentes tiempos.

La ratio I₆₆₂/I₅₇₀ entre estas dos señales de fluorescencia alcanza la máxima sensibilidad aumentando en 4 veces después de 100 min debido a la adición de la enzima, permaneciendo constante después de este tiempo.

De forma paralela, se ha evaluado la actividad de la enzima al pH y temperatura, con el propósito de conocer las mejores condiciones experimentales para el funcionamiento de la misma. Los datos representados en la figura IV.97 demuestran que la mejor actividad catalítica se da en torno a un pH 7.5 y 37 °C.

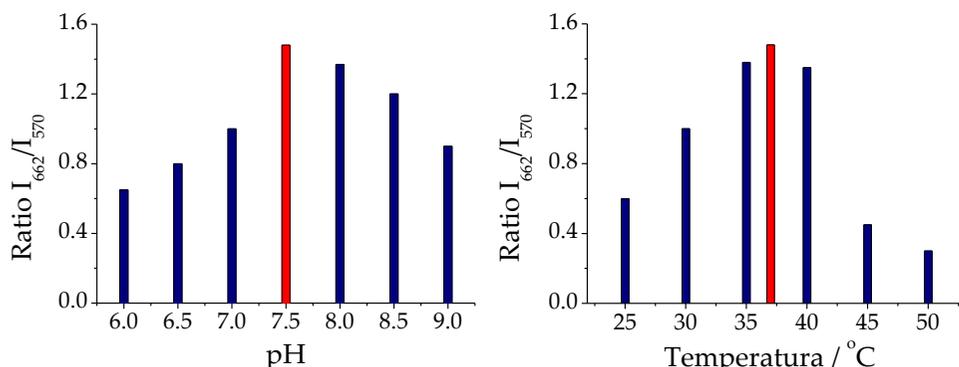
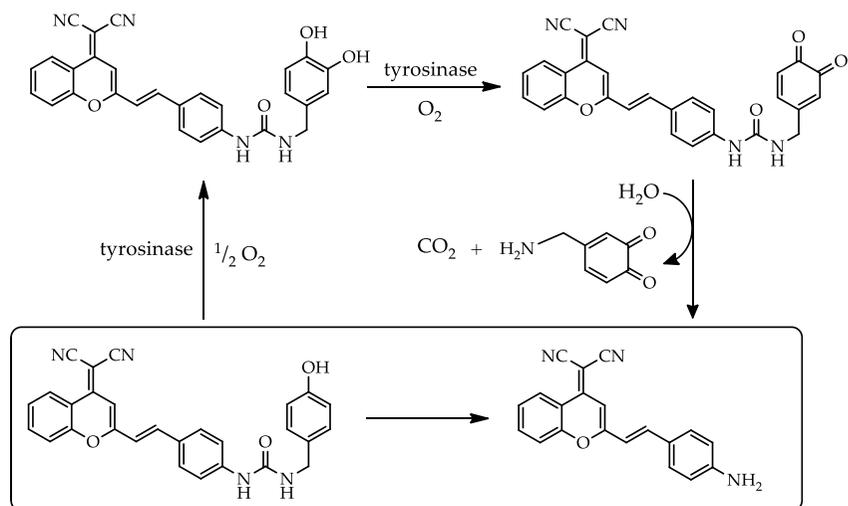


Fig. IV.97. Medidas ratiométricas de las señales de fluorescencia de I₆₆₂/I₅₇₀ de DCM-HBU (25 μM) con DPP IV (0.13 mg mL⁻¹) tras 2 h de incubación a 37 °C y diferentes valores de pH mediante excitación a 450 nm (figura izquierda). Medidas ratiométricas de las señales de fluorescencia de I₆₆₂/I₅₇₀ de DCM-HBU (25 μM) con DPP IV (0.13 mg mL⁻¹) tras 2 h de incubación a diferentes temperaturas y pH 7.5 mediante excitación a 450 nm (figura derecha).

De acuerdo con el mecanismo de reacción de la catálisis de la tirosinasa propuesto por Ma et al (332), y en base a los resultados experimentales obtenidos, el esquema IV.1 muestra los pasos necesarios para detectar la TYR mediante la nueva sonda DCM-HBU.



Esquema IV.1. Mecanismo propuesto de liberación enzimática del fluoróforo DCM-NH₂.

Así, por acción de TYR, la sonda es hidroxilada, seguida de una oxidación enzimática a ortoquinona, que tras un rápido reordenamiento electrónico intramolecular, inicia la escisión de la quinona, tal y como se indica en el esquema IV.1.

Como prueba adicional del mecanismo propuesto, en la figura IV.98 se han registrado los espectros IR del colorante y de la sonda (ambos disueltos en DMSO) junto con una muestra de la mezcla de reacción tras dos horas de reacción en PBS/DMSO como disolvente.

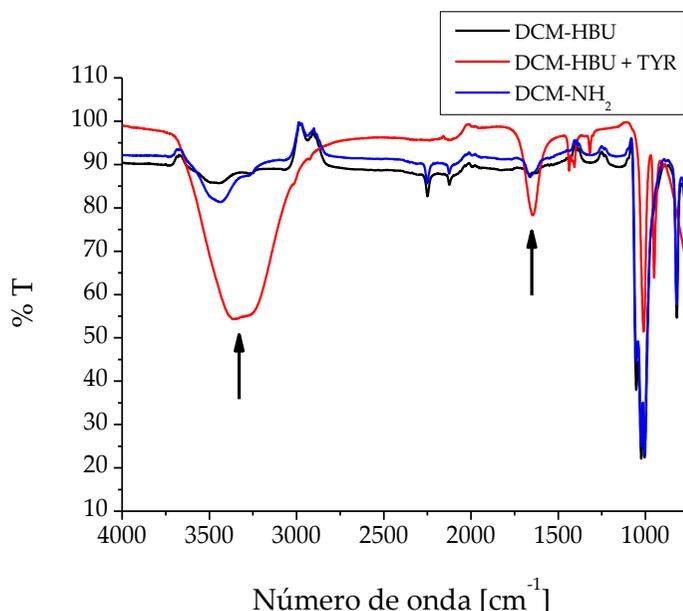


Fig. IV.98. Espectros IR del DCM-NH₂ (en DMSO), DCM-HBU (en DMSO) y DCM-HBU con TYR (en PBS/DMSO 7,3 v/v) tras 2 h de reacción.

Entre las señales más prominentes en el espectro IR de la muestra de reacción se encuentran la banda intensa en la región de tensión de hidrógeno debida al agua del disolvente y una nueva banda de intensidad media a 1680 cm⁻¹ en la región de grupos C = O que es consistente con la presencia de las cetonas. La liberación del grupo de reconocimiento permite que se restablezca el ICT típico del fluoróforo DCM-NH₂, dando lugar a un espectro de emisión NIR que genera la posibilidad de recoger una señal de fluorescencia ratiométrica entre la intensidad de fluorescencia verde de la sonda y la fluorescencia NIR DCM-NH₂.

Siguiendo la misma sistemática que las sondas ya descritas en las secciones anteriores, también en este caso se han realizado los experimentos que demuestran que de forma inequívoca que el DCM-HBU sólo detecta la enzima tirosinasa. Para ello, se ha hecho un ensayo de especificidad de la sonda. En la figura IV.99 se compara la ratio de fluorescencia entre las señales I₆₆₂/I₅₇₀ del DCM-HBU en presencia de tirosinasa con la correspondiente a la fluorescencia registrada cuando la sonda se incubaba en presencia de otras enzimas relacionadas como APN, DPP IV, AChE y PNLIP.

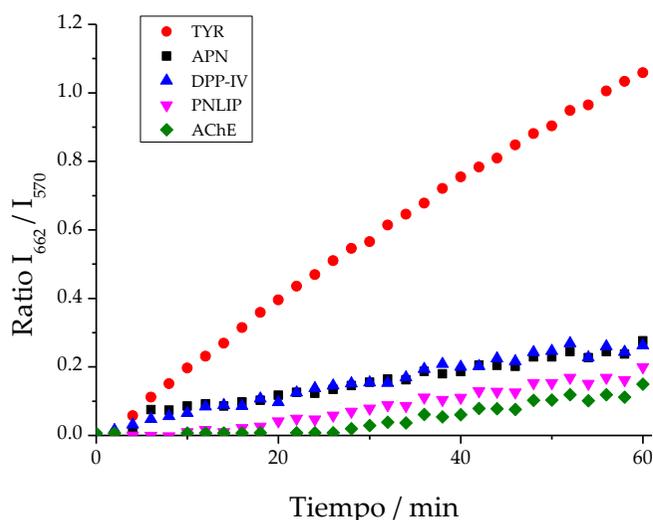


Fig. IV.99. Medidas ratiométricas de las señales de fluorescencia de I_{662}/I_{570} de DCM-HBU (10 μM) tras 60 min de incubación en presencia de diferentes enzimas a la misma concentración (5 $\mu\text{g mL}^{-1}$) mediante excitación a 450 nm a 37 °C.

De los resultados observados en la figura IV.99, se demuestra la gran especificidad del DCM-HBU hacia la acción enzimática de TYR.

IV.4.2. Aplicaciones biológicas del DCM-HBU

IV.4.2.1. Seguimiento ratiométrico de la actividad TYR en células tumorales

El estudio biológico del sensor se ha llevado a cabo en células y tejidos tumorales, concretamente de melanoma, puesto que uno de los objetivos del trabajo es desarrollar un nuevo método para la detección e investigación biomédica de esta patología, caracterizada por una actividad TYR anómala. Para ello, el estudio de células tumorales se ha llevado a cabo mediante excitación mono- y bifotónica. Por su parte, los tejidos *ex vivo* fueron analizados a través de microscopía con excitación por dos fotones.

Para mostrar las propiedades de absorción de dos fotones de la sonda, se midió la emisión de fluorescencia de los compuestos DCM-NH₂ y DCM-HBU a diferentes longitudes de onda de excitación. Así, la Figura IV.100

muestra la intensidad normalizada por la potencia de excitación en el rango de 720-1000 nm.

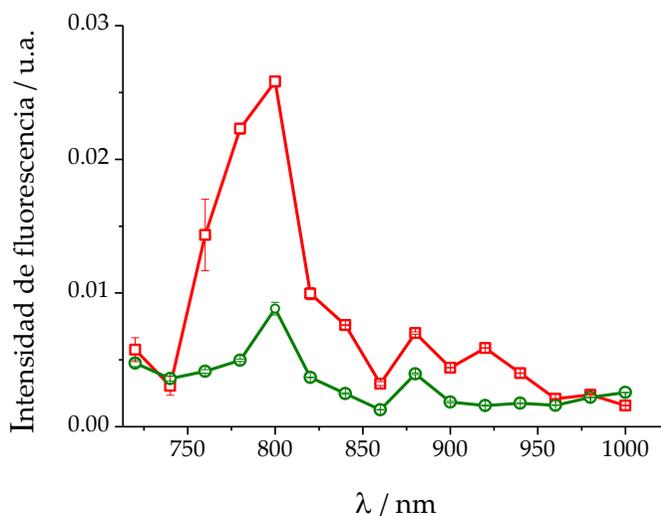


Fig. IV.100. Espectros de excitación bifotónica del DCM-NH₂ (línea roja) y DCM-HBU (línea verde) medidos en PBS/DMSO 7/3 (v/v). Emisión recogida en 650-720 nm (para DCM-NH₂) y 502-538 nm (para DCM-HBU), e intervalo de excitación entre 720 y 1000 nm, medidos cada 20 min. Las intensidades fueron calculadas por normalización de la potencia de la fuente de excitación. Las barras representan el SE de tres réplicas.

Los resultados muestran una emisión máxima de ambos compuestos bajo una excitación de 800 nm.

A continuación, se midió la intensidad de fluorescencia del colorante y del sensor a diferentes potencias de entrada de excitación. En la figura IV. 101 se muestra la representación logarítmica de la dependencia de la potencia con la intensidad de fluorescencia relativa inducida por dos fotones.

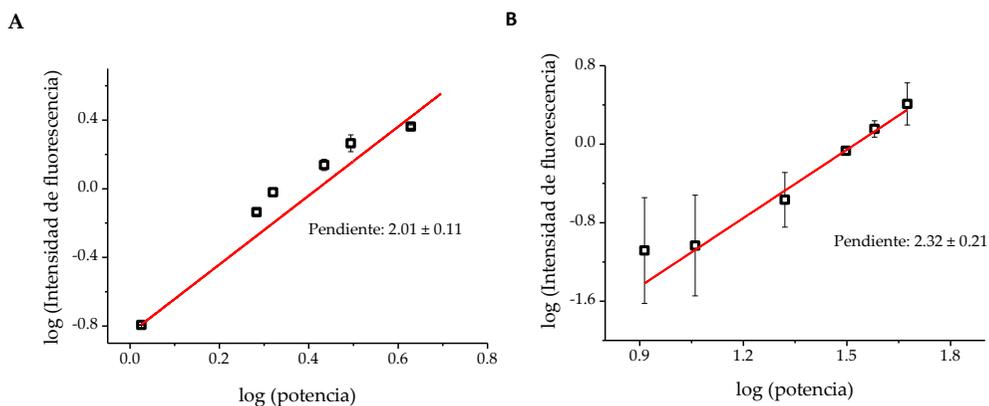


Fig. IV.101. Representación logarítmica de la dependencia de la intensidad de fluorescencia relativa inducida por dos fotones con la potencia del DCM-NH₂ (A) y DCM-HBU (B). Las barras representan el SE de tres réplicas.

Los ajustes lineales de estos datos mostraron pendientes de 2.01 ± 0.11 y 2.32 ± 0.21 , confirmando el proceso de excitación bifotónica en ambos compuestos.

Una vez confirmadas las propiedades de excitación bifotónica, se procedió al ensayo del sensor *in cellulo*. Como modelo de melanoma, se han utilizado las líneas celulares MEL1 (línea celular primaria) y A-375 (línea comercial establecida). En primer lugar, se ha realizado un estudio para confirmar que la sonda es sensible a la actividad TYR intracelular. Para este propósito, se han recogido imágenes de ambas líneas celulares durante 30 min después de añadir DCM-HBU (5 μ M) en PBS/DMSO (7/3, v/v). Dichas imágenes se pueden observar en la figura IV.102.

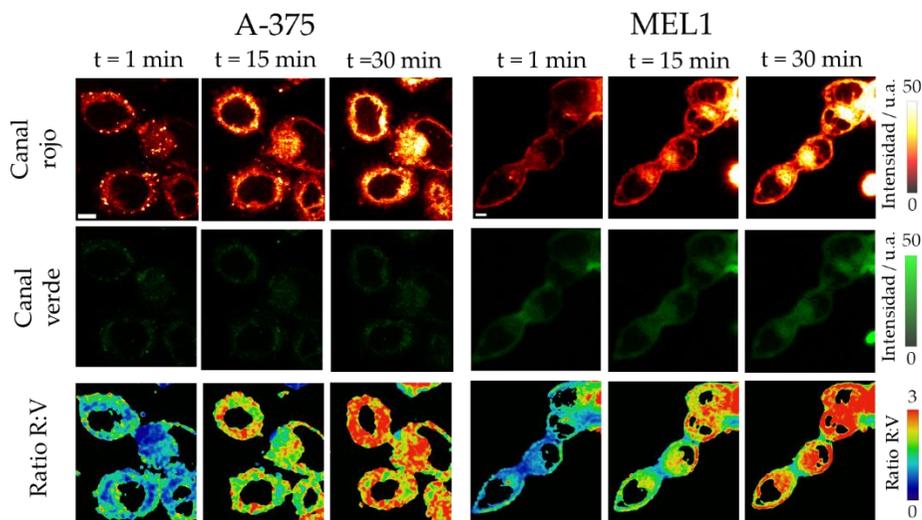


Fig. IV.102. Imágenes representativas de intensidad de los canales rojo ($\lambda_{em} = 650-720$ nm) y verde ($\lambda_{em} = 502-538$ nm) a lo largo del tiempo y del ratio R:V de células A-375 y MEL1 incubadas con DCM-HBU ($5 \mu\text{M}$) tras la excitación a 453 nm. La barra de escala representa $5 \mu\text{m}$.

Los resultados revelan que, en ambas líneas celulares, la fluorescencia roja aumenta con el tiempo, mientras que la fluorescencia verde permanece casi constante, lo que conduce a un aumento progresivo del valor de la ratio R:V de la imagen. Este aumento puede estar causado por la liberación del producto DCM-NH₂ debido a la acción de la enzima tirosinasa sobre la sonda.

Como la velocidad inicial de este aumento depende de la actividad TYR, la medida de la pendiente al principio de la reacción se utiliza para determinar la actividad de la enzima. Por ello, al objeto de cuantificar la velocidad al inicio, se ha representado el incremento de los valores de la ratio frente al tiempo en ambas líneas celulares. Los resultados se muestran en la figura IV.103.

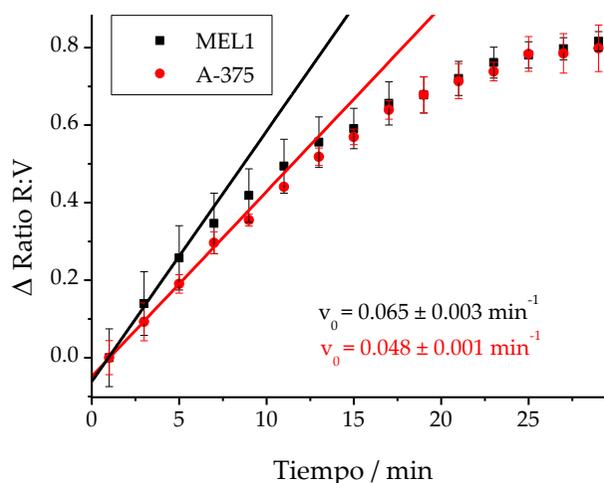


Fig. IV.103. Incremento en el valor de la ratio versus tiempo de las imágenes de las células MEL1 y A-375 de la figura IV.100. Las barras representan el SE de tres réplicas.

De la comparación entre los valores de la velocidad inicial obtenidos en ambas líneas celulares, se comprueba un aumento más rápido de los valores de la ratio en las células MEL1 frente a las A-375. Este hecho puede sugerir una mayor actividad enzimática en esta línea celular primaria humana.

Para demostrar que el aumento de la emisión NIR y, en consecuencia, de los valores de ratio, se debe principalmente a la actividad enzimática, traducida en la cantidad de DCM-NH₂ liberado, también se midió MEL1 en las mismas condiciones anteriores, pero en presencia del inhibidor enzimático quercetina, conocido inhibidor de la enzima TYR (118, 333). Las imágenes recogidas cada 10 min durante un tiempo total de 30 min se muestran en la figura IV.104.

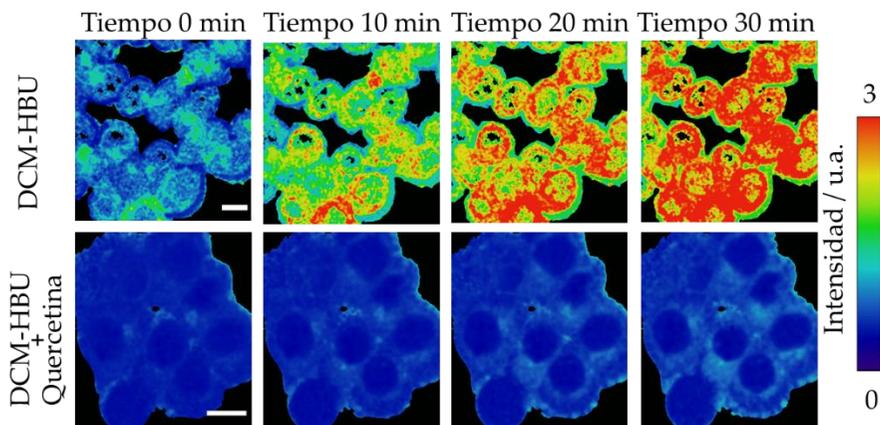


Fig. IV.104. Imágenes ratiométricas R:V de la línea celular MEL1 viva a diferentes tiempos tras añadir DCM-HBU (5 μM) sin (panel superior) y con (panel inferior) el inhibidor de TYR quercetina, 100 μM ($\lambda_{\text{ex}} = 453 \text{ nm}$). La barra de escala representa 10 μm .

En la figura IV.105 se representa gráficamente la evolución de dichos valores de la ratio a lo largo de esos 30 min de reacción tanto para las células sin quercetina como para las expuestas al inhibidor.

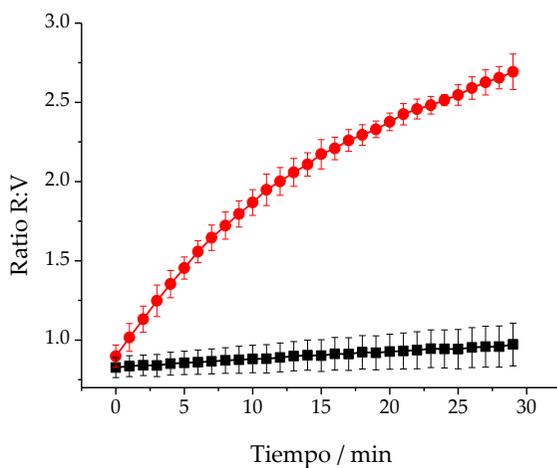


Fig. IV.105. Representación de los valores de ratio R:V de las imágenes de microscopía sin (datos en color rojo) y con (datos en color negro) quercetina. Las barras de error representan la desviación estándar (SD).

De los resultados obtenidos en ambas figuras, se observa claramente el gran aumento de la señal fluorescente en el canal rojo y, por ende, del valor del ratio, cuando el inhibidor está ausente, mientras que en presencia de quercetina la reacción enzimática está prácticamente inhibida.

La excitación mediante radiación NIR ha sido ampliamente utilizada para evitar o reducir la autofluorescencia de células y tejidos, así como la absorción y dispersión de la luz de excitación, lo que permite obtener imágenes más nítidas a mayor profundidad, aunque su uso está limitado en el rango de longitud de onda de mayor transmitancia en muestras biológicas (334). Por ello, la microscopía de excitación de dos fotones es una técnica de especial importancia en la medida de muestras de alta dispersión, como ocurre en los tejidos biológicos, en primer lugar, porque las longitudes de onda NIR dispersan menos que la luz azul/verde, en segundo lugar, porque hay ausencia de absorción fuera del foco, y en tercer lugar, la excitación de dos fotones evita o reduce la autofluorescencia de las muestras biológicas. La excitación por dos fotones es especialmente relevante para la obtención de imágenes de estructuras que se extienden en el interior de la muestra, para evitar la excitación UV, demasiado energética y para mediciones *in vivo* o cuando es importante una fotoquímica localizada (335).

Para confirmar la capacidad de la sonda de ser excitada por dos fotones que duplican o superen la longitud de onda de excitación del mismo fluoróforo con un solo fotón, se excitó la línea celular viva A-375 a una longitud de onda de 800 nm.

La figura IV.106 muestra imágenes ratiométricas R:V representativas de la línea celular viva A-375 obtenidas tras la adición del sensor DCM-HBU en tres tiempos distintos, mediante el empleo de excitación bifotónica.

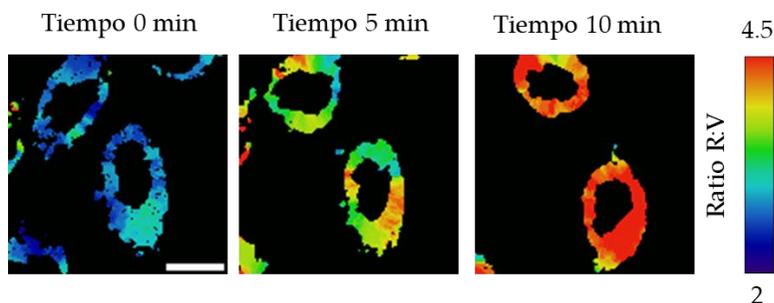


Fig. IV.106. Imágenes ratiométricas R:V por microscopía de fluorescencia de la línea celular A-375 viva a diferentes tiempos después de añadir DCM-HBU (5 μ M) mediante excitación con dos fotones de 800 nm (canal verde: 520/35, canal rojo: 685/70). La barra de escala representa 10 μ m.

La cinética del aumento de la ratio R:V se muestra en la figura IV.107, donde se representan los valores de las relaciones R:V frente al tiempo.

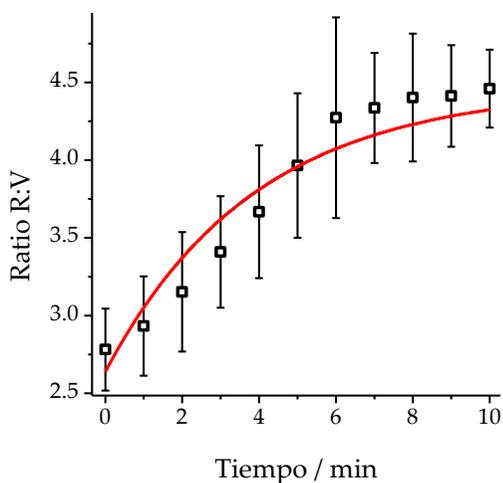


Fig. IV.107. Representación de los valores de ratio R:V frente al tiempo de las imágenes de microscopía tras la excitación bifotónica (800 nm) de la línea A-375 incubada con DCM-HBU (5 μ M). Las barras de error representan la SD.

La observación de ambas figuras demuestra un incremento gradual en el valor de la ratio, llegándose a la máxima relación a partir de los 10 min de medida.

Adicionalmente, se midieron los tiempos de vida del fluoróforo en células A-375. Las imágenes FLIM se recopilan en la figura IV.108.

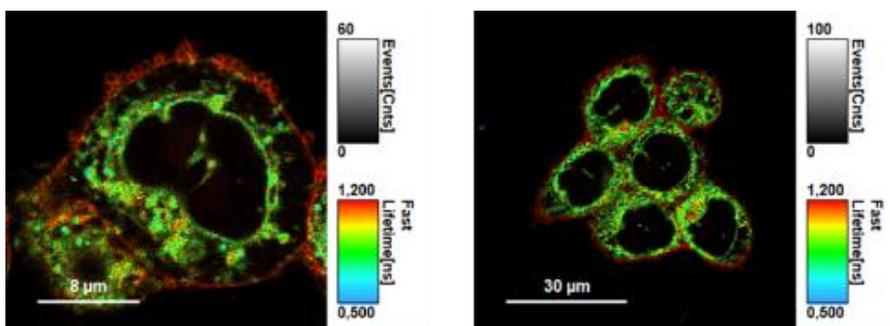


Fig. IV.108. FLIM de la línea celular A-375 viva tras añadir DCM-NH₂ (5 μ M) mediante excitación con dos fotones de 800 nm.

Del análisis de dichas imágenes, se comprueba que el colorante tiene un comportamiento idéntico al ocurrido en las células Caco-2 con la sonda DCM-NH-Pro-Gly, manifestando de nuevo un mayor tiempo de vida en la membrana del citoplasma (de mayor lipofilia) y menor en las estructuras del interior celular.

IV.4.2.2. Seguimiento ratiométrico de la actividad TYR en tejidos tumorales

Como se ha mencionado en el apartado II.2.2.2, el uso potencial de la técnica mediante excitación por dos fotones es la clave para su empleo en estructuras biológicas más complejas, incluyendo tejidos o incluso en animales de cuerpo completo. En este contexto, la primera aproximación consistió en detectar la enzima TYR en tejidos a través del sensor sintetizado. Para ello, se seleccionaron tumores derivados de A-375, como modelo de melanoma humano para este estudio. Así, se incubaron con una disolución de DCM-HBU (5 μM), y se registró la emisión verde y NIR a cuatro tiempos (tiempo inicial, 1, 3 y 14 h). Los resultados obtenidos se muestran en la figura IV.109.

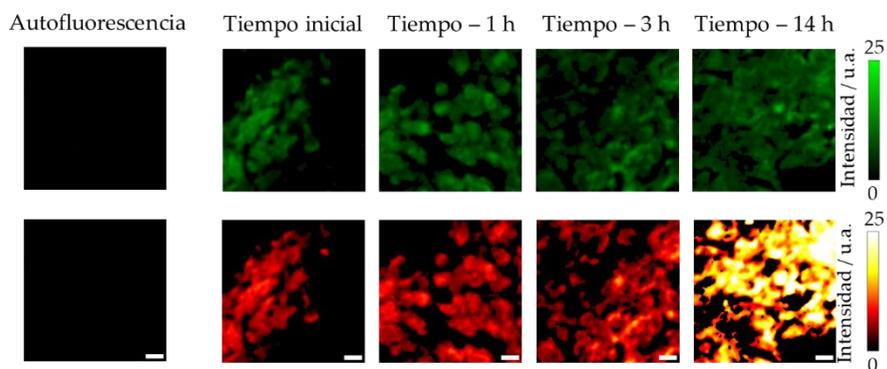


Fig. IV.109. Imágenes representativas de los canales verde ($\lambda_{em} = 502-538 \text{ nm}$) y rojo ($\lambda_{em} = 650-720 \text{ nm}$) de intensidad (primera y segunda líneas, respectivamente) de tumores A-375 tras añadir DCM-HBU (5 μM) mediante microscopía bifotónica con excitación a 800 nm. La barra de escala representa 10 μm .

El uso de una longitud de onda de excitación de 800 nm reduce la autofluorescencia a niveles casi indetectables, una ventaja importante en los

sensores ratiométricos. Una vez añadido el sensor, la intensidad de fluorescencia NIR aumentó con el tiempo, alcanzando su valor máximo a las 14 h. Por otro lado, la fluorescencia verde, permaneció casi constante, sin cambios significativos.

A partir de estos datos se obtuvieron las imágenes ratiométricas, representadas en la figura IV.110.

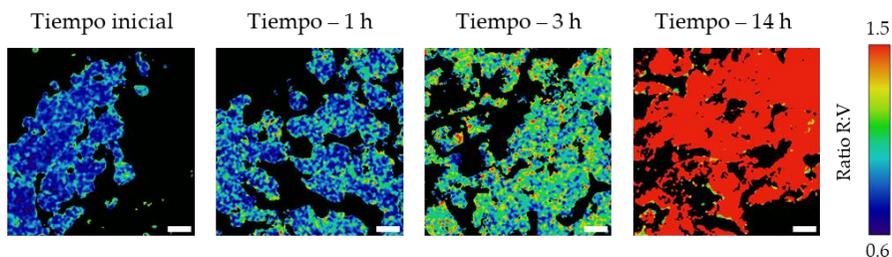


Fig. IV.110. Imágenes ratiométricas derivadas de las imágenes de la figura 107.

Como era de esperar, y en consonancia con lo previamente comentado, los valores de ratio observados en las imágenes aumentaron a lo largo del tiempo. El análisis cuantitativo de dichos valores de ratio se recoge en la figura IV.111.

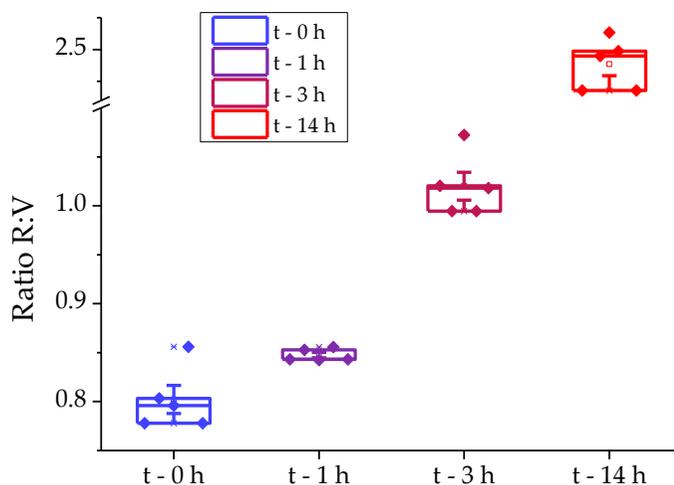


Fig. IV.111. Representación de los valores de la ratio R:V a partir de imágenes de microscopía. Las cajas representan los percentiles 25, 50 y 75. Los bigotes representan el SE.

A partir de los datos obtenidos, se observa un aumento del valor de la relación R:V de 0.8 a 2.5, es decir, de más del triple.

El registro de medidas del tumor, mediante el empleo de excitación bifotónica, en diferentes planos z , es decir, a distinta profundidad relativa, permitió la reconstrucción de imágenes 3D de los mismos.

La figura IV.112 representa las imágenes tridimensionales de los tumores en los canales rojo y verde.

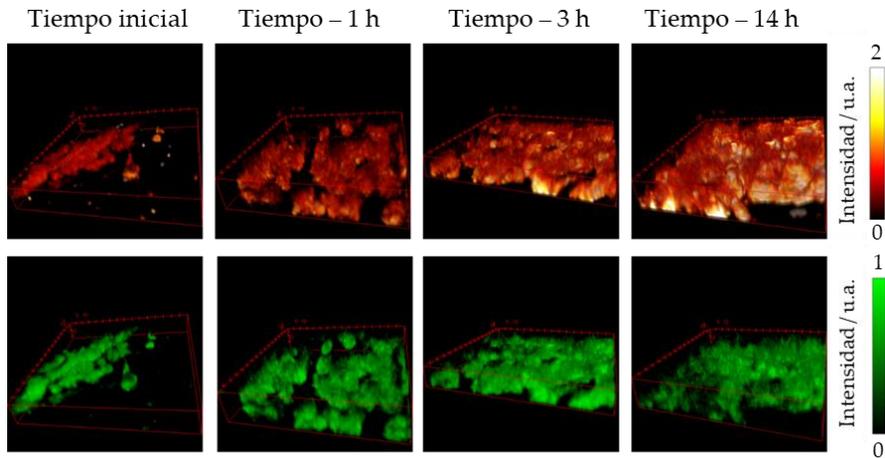


Fig. IV.112. Imágenes 3D de intensidad roja (primera línea) y verde (segunda línea) de tumores A-375 mediante microscopía de dos fotones por excitación a 800 nm.

Del mismo modo, se obtuvieron las imágenes ratiométricas correspondientes, las cuales se representan en la figura IV.113.

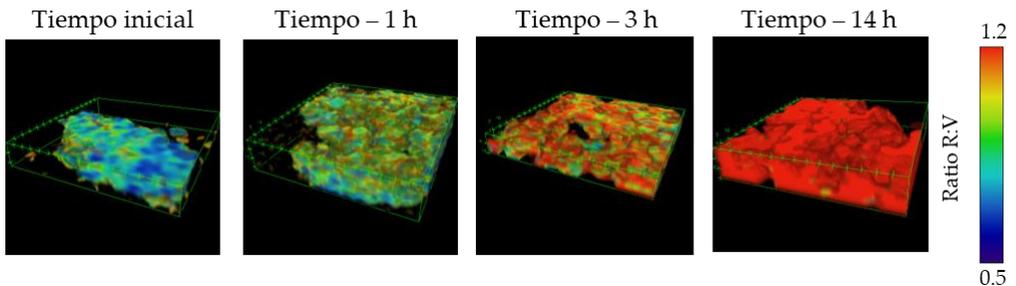


Fig. IV.113. Imágenes ratiométricas en 3D de tumores A-375 mediante microscopía bifotónica por excitación a 800 nm.

En un análisis más profundo de las imágenes anteriores, se comparan los planos superiores e inferiores de cada imagen, en la figura IV.114.

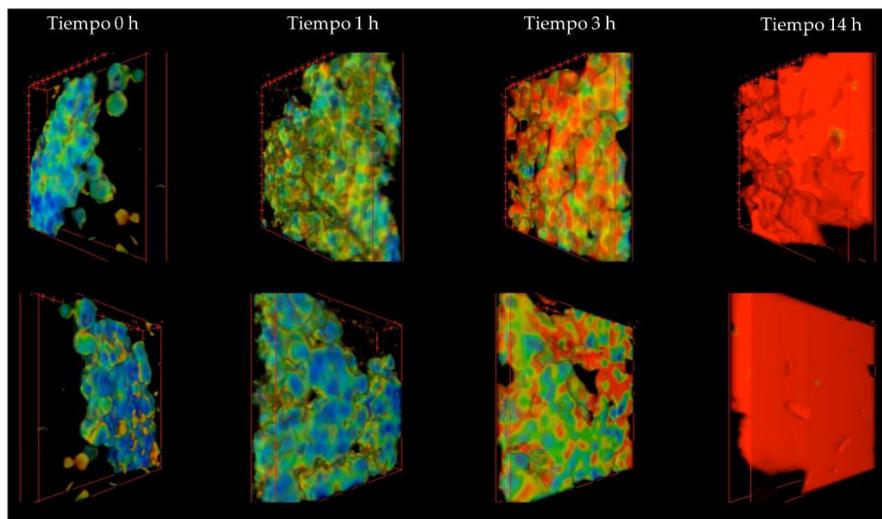


Fig. IV.114. Plano superior (primera fila) e inferior (segunda fila) de las imágenes de la figura IV.111.

Comparando el plano superior e inferior de los tejidos en las imágenes 3D (figura IV.114), es posible observar un valor de ratio mayor en el plano superior que en el inferior. Esto es debido a una penetración más rápida en este nivel y, ya que la sonda debe atravesar todo el tejido para alcanzar el plano inferior, obteniéndose una menor ratio en este último plano en cada tiempo.

Los resultados obtenidos demuestran el uso potencial de esta sonda en tejidos biológicos bajo excitación por dos fotones. Se concluye así que la actividad enzimática TYR tumoral provoca la escisión del sensor DCM-HBU, liberando el producto DCM-NH₂, responsable de la fluorescencia NIR.

IV.4.2.3. Imagen *in vivo* de TYR en pez cebra

Recientemente, se ha descrito la actividad de TYR en larvas de pez cebra, sin embargo, en este estudio se da cuenta de su actividad sólo cualitativamente (332). En esta Tesis Doctoral, se ha ido más allá y se ha completado por primera vez, un estudio más profundo que cuantifica las diferencias en la actividad TYR *in vivo* en larvas y embriones de pez cebra de

diferentes días post-fecundación (dpf) en ausencia y presencia de un inhibidor (quercetina).

En primer lugar, los embriones y larvas de pez cebra de diferentes estadios, fueron incubados con el sensor DCM-HBU ($10 \mu\text{M}$) durante 3 h. Al cabo de este tiempo, se tomaron imágenes de fluorescencia roja, campo claro y fusión de ambas imágenes con un estereo microscopio. Las imágenes obtenidas se muestran en la figura IV.115.

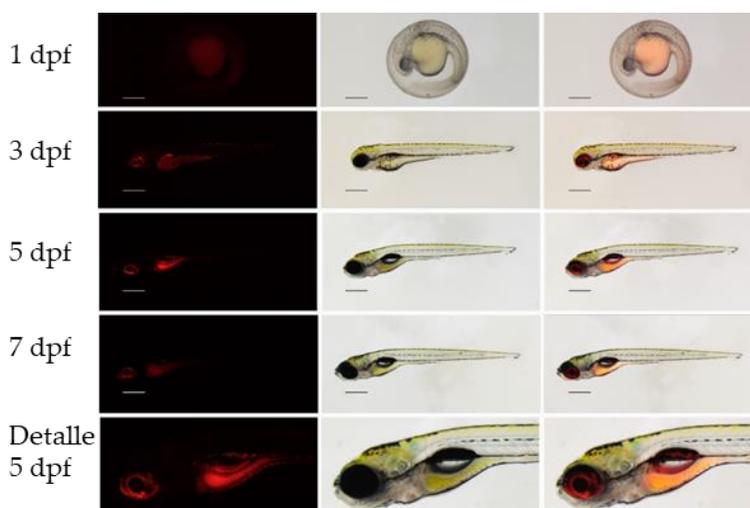


Fig. IV.115. Embriones y larvas vivos de pez cebra a diferentes dpf (1, 3, 5 y 7), incubados con DCM-HBU ($10 \mu\text{M}$) durante 3 h. Imágenes de fluorescencia roja (izquierda), campo claro (centro) y fusionada (derecha) con un estereo microscopio ($\lambda_{\text{ex}} = 458 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 680 \text{ nm}$). También se muestra el detalle (cabeza con sistema nervioso central) de una larva viva de pez cebra a 5 dpf. Barras de escala: 1 dpf: $250 \mu\text{m}$, 3-7 dpf: $500 \mu\text{m}$, detalle: $200 \mu\text{m}$.

De los resultados obtenidos, se infiere que los embriones y larvas de pez cebra de diferentes dpf, cuando se incuban con la sonda DCM-HBU, muestran la fluorescencia NIR característica que indica la liberación del compuesto DCM-NH₂ debido a la acción de la enzima TYR en el saco vitelino y los tejidos larvarios. Tanto el ojo como el sistema nervioso central (SNC) son los tejidos donde se observa una mayor actividad enzimática, mientras que la piel y los músculos no muestran una fluorescencia NIR intensa.

Dado que el sensor está disuelto en DMSO, se llevó a cabo un control de los peces cebra con dicho disolvente, en igualdad de condiciones, es decir, en las mismas etapas de desarrollo del animal, y utilizando la misma concentración de DMSO y durante el mismo tiempo de incubación que en el experimento relatado en el párrafo anterior, llevado a cabo con el compuesto DCM-HBU. Las imágenes se reflejan en la figura IV.116.

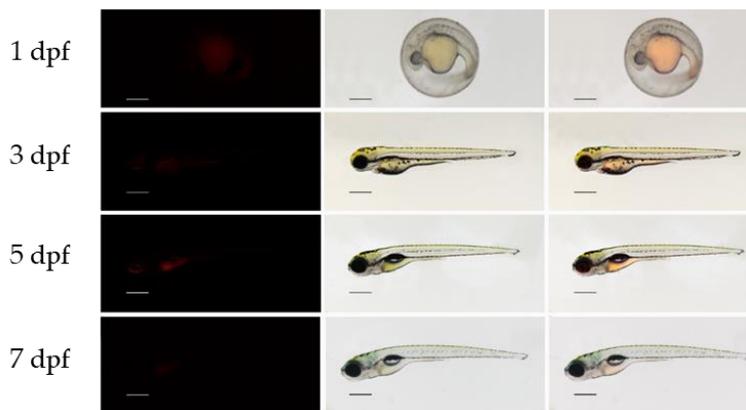


Fig. IV.116. Embriones y larvas vivos de pez cebr a diferentes días postfecundación (dpf) incubados con DMSO (10 μ M) durante 3 h. Imágenes de fluorescencia roja (izquierda), campo claro (centro) y fusionada (derecha) con un estéreo microscopio (λ_{exc} = 458 nm; λ_{em} = 680 nm). Barras de escala: 1 dpf: 250 μ m, 3-7 dpf: 500 μ m.

Como se observa, dichos controles incubados con DMSO muestran un bajo nivel de autofluorescencia.

Para demostrar que la fluorescencia NIR observada con DCM-HBU se debe a la acción de la enzima TYR, se ha realizado un estudio de co-inhibición en cada estadio, empleando quercetina. Así pues, los peces fueron preincubados con dicho inhibidor, 200 μ M, durante 3 h, y a continuación, incubados con DCM-HBU, 10 μ M, durante otras 3 h adicionales. Los datos derivados de dicha experiencia se recogen en la figura IV.117.

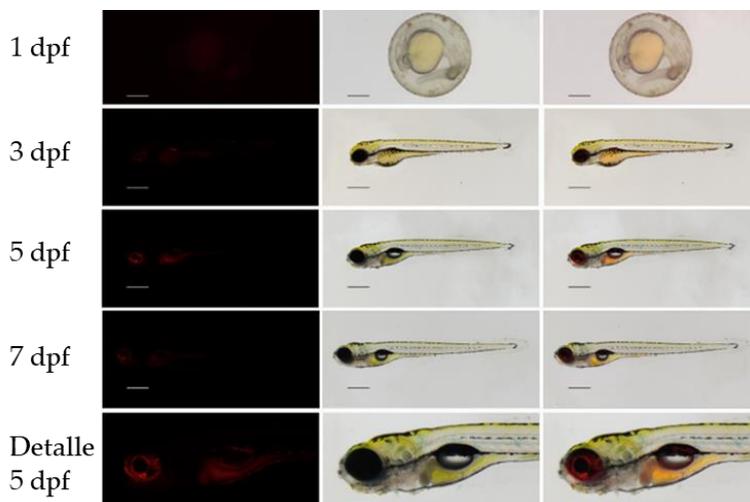


Fig. IV.117. Embriones y larvas vivos de pez cebra en los mismos dpf preincubados durante 3 h con quercetina (200 μ M) e incubados posteriormente con 10 μ M de DCM-HBU durante 3 h. Imágenes de fluorescencia roja (izquierda), campo claro (centro) y fusionada (derecha) con un estéreo microscopio ($\lambda_{exc} = 458$ nm; $\lambda_{em} = 680$ nm). Barras de escala: 1 dpf: 250 μ m, 3-7 dpf: 500 μ m.

A simple vista ya se observa como en presencia del inhibidor, el DCM-HBU no libera DCM-NH₂ y la fluorescencia NIR se suprime casi por completo, lo que demuestra la especificidad del sensor por el enzima. No obstante, se ha realizado un análisis cuantitativo de la emisión NIR de los peces estudiados, tanto en ausencia como en presencia del inhibidor y estos interesantes resultados se recogen en la figura IV.118.

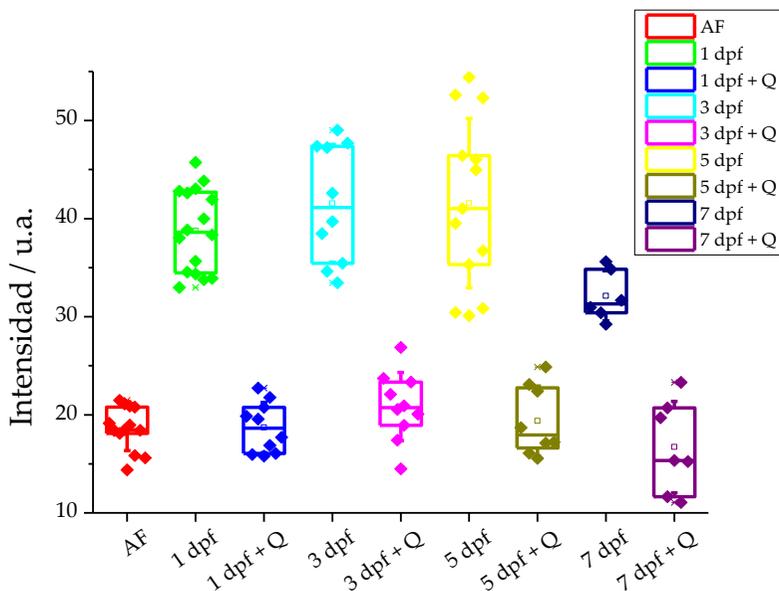


Fig. IV.118. Valores de intensidad de la emisión NIR del pez cebra en diferentes dpf, incubado con DCM-HBU (10 μ M) en presencia y ausencia del inhibidor quercetina. Los recuadros representan los percentiles 25, 50 y 75. AF es la autofluorescencia. Los bigotes representan el SE.

A partir del análisis de la figura IV.118, se puede deducir que la cantidad de la señal fluorescente obtenida tras la incubación con 10 μ M de DCM-HBU es similar durante todos los estadios estudiados (1 dpf, 3 dpf, y 5 dpf), con la excepción de una diferencia ligeramente menor observada en el pez cebra de 7 días, cuando se compara con el control de autofluorescencia. En cambio, la inhibición de la quercetina conduce a una fuerte reducción de la señal fluorescente hasta niveles de la autofluorescencia o incluso inferiores (día 7). Resulta importante destacar que las diferencias en la señal fluorescente entre las muestras sin inhibidor y las preincubadas con quercetina son similares en todos los estadios. Esto sugiere que los niveles de enzima disponibles en las diferentes etapas del desarrollo animal son prácticamente idénticos entre sí.

CONCLUSIONS
/
CONCLUSIONES

V. Conclusions/Conclusiones

Conclusions

The conclusions derived from the development of this Doctoral Thesis, organised according to the enzyme studied, are as follows:

Alanine aminopeptidase (pepN):

-The DCM-NH-Ala sensor has been synthesised, which acts as a substrate for the enzyme alanine aminopeptidase (pepN). When the enzymatic reaction takes place, the sensor releases the fluorophore dicyanomethylene-4H-pyran (DCM-NH₂) which, when suitably excited, emits a very intense fluorescence band with a maximum at 662 nm. The highest fluorophore excitation efficiency can be achieved by a single 480 nm photon, or by two simultaneous 800 nm NIR photons.

-The released fluorophore DCM-NH₂ has the structure A- π -D which, through internal charge transfer, is responsible for the NIR emission and meets the requirements for use as an effective fluorophore in two-photon and super-resolution microscopy.

-The biocompatibility that the probe has demonstrated in living organisms has allowed the proposal of a new methodology for the identification of Gram (-) bacteria expressing pepN activity.

-The kinetics of emission depend on the intracellular concentrations of pepN, making it a powerful tool for detecting various virulent bacterial agents in a few minutes and with the additional advantage of possible biphotonic excitation.

-STED nanoscopy shows that the probe rapidly initiates enzymatic reactions at specific sites on the bacterial membrane and on some structures within the bacterial body; the released dye then diffuses and accumulates in the bacterial membrane due to its lipophilic nature.

-The usefulness of this sensor has been demonstrated in the measurement of enzymatic activity during the formation of bacterial biofilms and therefore its potential use as an activity detection tool for microbiologists and biochemists.

Dipeptidyl peptidase IV (DPP IV):

-By assembling the Gly-Pro recogniser group on the DCM-NH₂ fluorophore, a highly specific and sensitive fluorescent substrate for the DPP IV enzyme has been synthesised. When the enzymatic reaction releases the dipeptide group from the probe, the DCM-NH₂ donor-acceptor system is restored, which shows the NIR spectrum of ITC emission, allowing a ratiometric fluorescence signal to be obtained between the green signal of the substrate and the NIR signal of DCM-NH₂.

-The specificity of the new probe on the DPP IV enzyme versus other related enzymes, together with the possibility of excitation of the substrate and the probe by two simultaneous NIR photons that eliminates the green and red autofluorescence bands of the crude serum, allows the proposal of a unique and novel methodology useful in the analysis of DPP IV activity in crude serum from diabetic patients.

-The aforementioned properties of the probe and dye allow the proposal as an *in vivo* intracellular sensor of DPP IV enzyme activity, as well as its ability to obtain clear fluorescence microscopy images of tumour tissues when excited with two photons. In addition, the fluorophore released by the enzyme action has been found to be suitable for super-resolution fluorescence microscopy imaging.

-Incubation of 1-, 3-, 5- and 7-day post-fertilisation (dpf) zebrafish embryos and larvae with the probe revealed that zebrafish embryos at 1 dpf show red fluorescence mainly in the yolk sac, while zebrafish larvae manifest red fluorescence in the yolk sac and in the central nervous system, eye, throat and digestive tract. Quantification of NIR intensity values in fish of different dpf reveals that 7 dpf fish generate the most red fluorescence, indicating an increase in DPP IV levels with developmental stages.

Tyrosinase (TYR):

-A highly specific and sensitive fluorescent substrate for the enzyme tyrosinase TYR has been synthesised using the enzyme recognition group 4-hydroxybenzylamine binding strategy on the fluorophore DCM-NH₂.

-The mechanism by which enzymatic catalysis of the DCM-HBU probe-substrate occurs is TYR-mediated oxidation followed by hydrolysis of the

ureic bond. The D- π -A DCM-NH₂ system is thus restored, showing the NIR spectrum of ICT emission together with a large Stokes shift, which allows to obtain a ratiometric fluorescence output between the green fluorescent signal of the substrate and the NIR signal of DCM-NH₂.

-Both the substrate and the probe can be excited by two NIR photons, which has made it possible to eliminate the green and red autofluorescence bands in the analysis of biological samples.

-Due to the ability to be excited by two simultaneous photons, the applicability of this new probe as an *in vivo* intracellular TYR sensor has been confirmed, as well as its ability to obtain clear fluorescence microscopy images in melanoma tumour tissues.

-The probe is useful for quantitative detection of TYR activity in whole organisms *in vivo*, as demonstrated in zebrafish larvae of different stages.

-*In vitro* and *in vivo* results clearly reveal that the probe is sensitive to the action of TYR and that when TYR is inhibited, the substrate does not suffer alterations in its photophysical properties.

Conclusiones

Las conclusiones derivadas del desarrollo de la presente Tesis Doctoral organizadas en función de la enzima estudiada, son las siguientes:

Alanina aminopeptidasa (pepN):

-Se ha sintetizado el sensor DCM-NH-Ala, que actúa como sustrato de la enzima alanina aminopeptidasa (pepN). Cuando se produce la reacción enzimática, el sensor libera el fluoróforo dicianometileno-4H-pirano (DCM-NH₂) que, cuando es excitado convenientemente, emite una banda de fluorescencia muy intensa con máximo a 662 nm. La mayor eficacia en la excitación del fluoróforo se puede conseguir mediante un único fotón de 480 nm, o por dos fotones NIR simultáneos de 800 nm.

-El fluoróforo liberado DCM-NH₂, tiene la estructura A- π -D que, a través de una transferencia de carga interna, es la responsable de la emisión NIR y

cumple los requisitos para su empleo como fluoróforo eficaz en microscopía bifotónica y de superresolución.

-La biocompatibilidad que la sonda ha demostrado en organismos vivos, ha permitido la propuesta de una nueva metodología para la identificación de bacterias Gram (-) que expresan actividad pepN.

-La cinética de aparición de la emisión depende de las concentraciones intracelulares de pepN, por lo que representa una potente herramienta para detectar diversos agentes bacterianos virulentos en pocos minutos y con la ventaja adicional de la posible excitación bifotónica.

-Mediante nanoscopía STED se comprueba que la sonda inicia rápidamente reacciones enzimáticas en sitios específicos situados en la membrana bacteriana y en algunas estructuras dentro del cuerpo bacteriano; a continuación, el colorante liberado difunde y se acumula en la membrana bacteriana debido a su naturaleza lipofílica.

-Se ha demostrado la utilidad de este sensor en la medida de la actividad enzimática durante la formación de biofilms bacterianos y por tanto su potencial uso como herramienta de detección de actividad para microbiólogos y bioquímicos.

Dipeptidil peptidasa IV (DPP IV):

-Mediante el ensamblaje del grupo reconocedor Gly-Pro en el fluoróforo DCM-NH₂, se ha sintetizado un sustrato fluorescente altamente específico y sensible a la enzima DPP IV. Cuando la reacción enzimática libera el grupo dipéptido de la sonda, se restablece el sistema donante-aceptor DCM-NH₂, que muestra el espectro NIR de emisión ITC, permitiendo la obtención de una señal ratiométrica de fluorescencia entre la señal verde del sustrato y la señal NIR del DCM-NH₂.

-La especificidad de la nueva sonda a la enzima DPP IV frente a otras enzimas relacionadas, junto a la posibilidad de excitación del sustrato y de la sonda por dos fotones NIR simultáneos que elimina las bandas verde y roja de autofluorescencia del suero crudo, permite la propuesta de una metodología única y novedosa útil en el análisis de la actividad de DPP IV en suero crudo de pacientes diabéticos.

-Las propiedades ya comentadas de la sonda y del colorante permiten la propuesta como sensor intracelular *in vivo* de la actividad de la enzima DPP IV, así como su capacidad para obtener imágenes claras de microscopía de fluorescencia de tejidos tumorales cuando se excitan con dos fotones. Además, se ha descubierto que el fluoróforo liberado por la acción enzimática es adecuado para la obtención de imágenes de microscopía de fluorescencia de superresolución.

-La incubación de embriones y larvas de pez cebra de 1, 3, 5 y 7 días post-fertilización (dpf) con la sonda reveló que los embriones de pez cebra a 1 dpf muestran fluorescencia roja principalmente en el saco vitelino, mientras que las larvas de pez cebra manifiestan fluorescencia roja en el saco vitelino y en el sistema nervioso central, ojo, garganta y tracto digestivo. La cuantificación de los valores de intensidad NIR en los peces de diferentes dpf revela que los de 7 dpf son los que generan una mayor fluorescencia roja, indicando un aumento de los niveles de DPP IV con los estadios de desarrollo.

Tirosinasa (TYR):

-Se ha sintetizado un sustrato fluorescente altamente específico y sensible a la enzima tiroxinasa TYR, utilizando la estrategia de unión del grupo de reconocimiento enzimático 4-hidroxibencilamina en el fluoróforo DCM-NH₂.

-El mecanismo por el cual se produce la catálisis enzimática de la sonda-sustrato DCM-HBU consiste en una oxidación mediada por TYR seguida de la hidrólisis del enlace ureico. Se restablece así el sistema D- π -A del DCM-NH₂, que muestra el espectro NIR de emisión ICT junto con un gran desplazamiento de Stokes, que permite obtener una salida de fluorescencia ratiométrica entre la señal fluorescente verde del sustrato y la señal NIR del DCM-NH₂.

-Tanto el sustrato como la sonda se pueden excitar por dos fotones NIR, lo que ha permitido eliminar las bandas verde y roja de autofluorescencia en los análisis de muestras biológicas.

-Debido a la posibilidad de excitarse por dos fotones simultáneos, se ha confirmado la aplicabilidad de esta nueva sonda como sensor intracelular *in vivo* de TYR, así como su capacidad para obtener imágenes claras de microscopía de fluorescencia en tejidos tumorales de melanoma.

-La sonda es útil para la detección cuantitativa de la actividad de TYR en organismos enteros *in vivo*, como se ha demostrado en larvas de pez cebra de diferentes estadios.

-Los resultados *in vitro* e *in vivo* revelan claramente que la sonda es sensible a la acción de TYR y que cuando esta enzima es inhibida, el sustrato no sufre alteraciones en sus propiedades fotofísicas.

BIBLIOGRAFÍA

VI. Bibliografía

1. Page-McCaw A, Ewald AJ, Werb Z. Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2007;8(3):221-33.
2. Quirós PM, Langer T, López-Otín C. New roles for mitochondrial proteases in health, ageing and disease. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2015;16(6):345-59.
3. Ehrmann M, Clausen T. Proteolysis as a Regulatory Mechanism. *Annual Review of Genetics*. 2004;38(1):709-24.
4. de Silva AP, Gunaratne HQN, Gunnlaugsson T, Huxley AJM, McCoy CP, Rademacher JT, et al. Signaling Recognition Events with Fluorescent Sensors and Switches. *Chemical Reviews*. 1997;97(5):1515-66.
5. Kobayashi H, Ogawa M, Alford R, Choyke PL, Urano Y. New strategies for fluorescent probe design in medical diagnostic imaging. *Chem Rev*. 2010;110(5):2620-40.
6. Berezin MY, Achilefu S. Fluorescence lifetime measurements and biological imaging. *Chem Rev*. 2010;110(5):2641-84.
7. Koide Y, Urano Y, Hanaoka K, Piao W, Kusakabe M, Saito N, et al. Development of NIR fluorescent dyes based on Si-rhodamine for in vivo imaging. *J Am Chem Soc*. 2012;134(11):5029-31.
8. Kushida Y, Nagano T, Hanaoka K. Silicon-substituted xanthene dyes and their applications in bioimaging. *Analyst*. 2015;140(3):685-95.
9. Crovetto L, Orte A, Paredes JM, Resa S, Valverde J, Castello F, et al. Photophysics of a Live-Cell-Marker, Red Silicon-Substituted Xanthene Dye. *J Phys Chem A*. 2015;119(44):10854-62.
10. Denk W, Strickler JH, Webb WW. Two-photon laser scanning fluorescence microscopy. *Science*. 1990;248(4951):73-6.
11. Kim HM, Cho BR. Small-molecule two-photon probes for bioimaging applications. *Chem Rev*. 2015;115(11):5014-55.
12. Hell SW, Wichmann J. Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy. *Opt Lett*. 1994;19(11):780-2.
13. Kirk O, Borchert TV, Fuglsang CC. Industrial enzyme applications. *Current Opinion in Biotechnology*. 2002;13(4):345-51.
14. Kumar D, Bhardwaj R, Jassal S, Goyal T, Khullar A, Gupta N. Application of enzymes for an eco-friendly approach to textile processing. *Environmental Science and Pollution Research*. 2021:1-11.
15. Hayes DG. Enzyme-catalyzed modification of oilseed materials to produce eco-friendly products. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 2004;81(12):1077-103.
16. Ahuja SK, Ferreira GM, Moreira AR. Utilization of Enzymes for Environmental Applications. *Critical Reviews in Biotechnology*. 2004;24(2-3):125-54.

17. Binod P, Palkhiwala P, Gaikawai R, Nampoothiri KM, Duggal A, Dey K, et al. Industrial enzymes-present status and future perspectives for India. 2013.
18. Hemalatha T, UmaMaheswari T, Krithiga G, Sankaranarayanan P, Puvanakrishnan R. Enzymes in clinical medicine: an overview. 2013.
19. Singh RS, Singh T, Singh AK. Enzymes as diagnostic tools. *Advances in enzyme technology*; Elsevier; 2019. p. 225-71.
20. Corathers SD. Focus on diagnosis: the alkaline phosphatase level: nuances of a familiar test. *Pediatr Rev*. 2006;27(10):382-4.
21. Sohar N, Hammer H, Sohar I. Lysosomal peptidases and glycosidases in rheumatoid arthritis. *Biol Chem*. 2002;383(5):865-9.
22. Torsteinsdóttir I, Håkansson L, Hällgren R, Gudbjörnsson B, Arvidson NG, Venge P. Serum lysozyme: a potential marker of monocyte/macrophage activity in rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)*. 1999;38(12):1249-54.
23. Ram M, Sherer Y, Shoenfeld Y. Matrix metalloproteinase-9 and autoimmune diseases. *J Clin Immunol*. 2006;26(4):299-307.
24. Norga K, Grillet B, Masure S, Paemen L, Opdenakker G. Human gelatinase B, a marker enzyme in rheumatoid arthritis, is inhibited by D-penicillamine: anti-rheumatic activity by protease inhibition. *Clin Rheumatol*. 1996;15(1):31-4.
25. Faber-Elmann A, Sthoeger Z, Tcherniack A, Dayan M, Mozes E. Activity of matrix metalloproteinase-9 is elevated in sera of patients with systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Immunol*. 2002;127(2):393-8.
26. Parvizi J, Jacovides C, Antoci V, Ghanem E. Diagnosis of periprosthetic joint infection: the utility of a simple yet unappreciated enzyme. *J Bone Joint Surg Am*. 2011;93(24):2242-8.
27. Chao TY, Wu YY, Janckila AJ. Tartrate-resistant acid phosphatase isoform 5b (TRACP 5b) as a serum maker for cancer with bone metastasis. *Clin Chim Acta*. 2010;411(21-22):1553-64.
28. Kirschenbaum A, Liu XH, Yao S, Leiter A, Levine AC. Prostatic acid phosphatase is expressed in human prostate cancer bone metastases and promotes osteoblast differentiation. *Ann N Y Acad Sci*. 2011;1237:64-70.
29. Ishiguro S, Inoue M, Tanaka Y, Mizokami M, Iwasaki M, Tsugane S. Serum aminotransferase level and the risk of hepatocellular carcinoma: a population-based cohort study in Japan. *Eur J Cancer Prev*. 2009;18(1):26-32.
30. Schwartz MK. Enzymes as prognostic markers and therapeutic indicators in patients with cancer. *Clin Chim Acta*. 1992;206(1-2):77-82.
31. Taketo MM. Cyclooxygenase-2 inhibitors in tumorigenesis (part I). *J Natl Cancer Inst*. 1998;90(20):1529-36.
32. Wang J, Yuan W, Chen Z, Wu S, Chen J, Ge J, et al. Overexpression of G6PD is associated with poor clinical outcome in gastric cancer. *Tumour Biol*. 2012;33(1):95-101.
33. Koukourakis MI, Giatromanolaki A, Sivridis E, Gatter KC, Trarbach T, Folprecht G, et al. Prognostic and predictive role of lactate dehydrogenase 5

- expression in colorectal cancer patients treated with PTK787/ZK 222584 (vatalanib) antiangiogenic therapy. *Clin Cancer Res.* 2011;17(14):4892-900.
34. Hermes A, Gatzemeier U, Waschki B, Reck M. Lactate dehydrogenase as prognostic factor in limited and extensive disease stage small cell lung cancer - a retrospective single institution analysis. *Respir Med.* 2010;104(12):1937-42.
35. Brown JE, Cook RJ, Lipton A, Coleman RE. Serum lactate dehydrogenase is prognostic for survival in patients with bone metastases from breast cancer: a retrospective analysis in bisphosphonate-treated patients. *Clin Cancer Res.* 2012;18(22):6348-55.
36. Ahanthem N, Basavaraju S, Pachipulusu B. Lactate Dehydrogenase as a Tumor Marker in Oral Cancer and Oral Potentially Malignant Disorders: A Biochemical Study. *International Journal of Preventive and Clinical Dental Research.* 2017;4:196-200.
37. Halabi S, Small EJ, Kantoff PW, Kattan MW, Kaplan EB, Dawson NA, et al. Prognostic model for predicting survival in men with hormone-refractory metastatic prostate cancer. *J Clin Oncol.* 2003;21(7):1232-7.
38. Gerlinger M, Wilson P, Powles T, Shamash J. Elevated LDH predicts poor outcome of recurrent germ cell tumours treated with dose dense chemotherapy. *Eur J Cancer.* 2010;46(16):2913-8.
39. Rong Y, Wu W, Ni X, Kuang T, Jin D, Wang D, et al. Lactate dehydrogenase A is overexpressed in pancreatic cancer and promotes the growth of pancreatic cancer cells. *Tumour Biol.* 2013;34(3):1523-30.
40. Walaa Fikry M. Lactate dehydrogenase (LDH) as prognostic marker in acute leukemia quantitative method. *J Blood Disord Transfus.* 2017;8(375):2.
41. Kocabay G, Telci A, Tutuncu Y, Tiryaki B, Ozel S, Cevikbas U, et al. Alkaline phosphatase: can it be considered as an indicator of liver fibrosis in non-alcoholic steatohepatitis with type 2 diabetes? *Bratisl Lek Listy.* 2011;112(11):626-9.
42. Takagi Y, Yasuhara T, Gomi K. [Creatine kinase and its isozymes]. *Rinsho Byori.* 2001;Suppl 116:52-61.
43. Kim HC, Nam CM, Jee SH, Han KH, Oh DK, Suh I. Normal serum aminotransferase concentration and risk of mortality from liver diseases: prospective cohort study. *Bmj.* 2004;328(7446):983.
44. Agarwal N, Pitchumoni CS, Sivaprasad AV. Evaluating tests for acute pancreatitis. *Am J Gastroenterol.* 1990;85(4):356-66.
45. Lott JA, Lu CJ. Lipase isoforms and amylase isoenzymes: assays and application in the diagnosis of acute pancreatitis. *Clin Chem.* 1991;37(3):361-8.
46. Gatsing D, Garba IH, Adoga GI. The use of lysosomal enzymuria in the early detection and monitoring of the progression of diabetic nephropathy. *Indian J Clin Biochem.* 2006;21(2):42-8.
47. Severini G, Aliberti LM. Diagnostic significance of urinary enzymes: development of a high performance liquid chromatographic method for the measurement of urinary lysozyme. *Clin Chim Acta.* 1987;163(1):97-103.

48. Kamma JJ, Nakou M, Persson RG. Association of early onset periodontitis microbiota with aspartate aminotransferase activity in gingival crevicular fluid. *J Clin Periodontol*. 2001;28(12):1096-105.
49. Mabrouk H, Mechria H, Mechri A, Rahali H, Douki W, Gaha L, et al. [Butyrylcholinesterase activity in schizophrenic patients]. *Ann Biol Clin (Paris)*. 2011;69(6):647-52.
50. Hanash S. Disease proteomics. *Nature*. 2003;422(6928):226-32.
51. Rask-Andersen M, Almén MS, Schiöth HB. Trends in the exploitation of novel drug targets. *Nat Rev Drug Discov*. 2011;10(8):579-90.
52. Copeland RA, Harpel MR, Tummino PJ. Targeting enzyme inhibitors in drug discovery. *Expert Opin Ther Targets*. 2007;11(7):967-78.
53. Holstein SA, Heckman CA, Davies FE, Morgan GJ, Gelius SS, Lehmann F. Aminopeptidases in Cancer, Biology and Prospects for Pharmacological Intervention. *Curr Cancer Drug Targets*. 2022;23(1):25-46.
54. Gonzales T, Robert-Baudouy J. Bacterial aminopeptidases: properties and functions. *FEMS Microbiol Rev*. 1996;18(4):319-44.
55. Chen L, Lin Y-L, Peng G, Li F. Structural basis for multifunctional roles of mammalian aminopeptidase N. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2012;109(44):17966-71.
56. Luan Y, Xu W. The structure and main functions of aminopeptidase N. *Current medicinal chemistry*. 2007;14(6):639-47.
57. Wickström M, Larsson R, Nygren P, Gullbo J. Aminopeptidase N (CD13) as a target for cancer chemotherapy. *Cancer Science*. 2011;102(3):501-8.
58. Drag M, Bogyo M, Ellman JA, Salvesen GS. Aminopeptidase fingerprints, an integrated approach for identification of good substrates and optimal inhibitors. *J Biol Chem*. 2010;285(5):3310-8.
59. Hitzerd SM, Verbrugge SE, Ossenkoppele G, Jansen G, Peters GJ. Positioning of aminopeptidase inhibitors in next generation cancer therapy. *Amino Acids*. 2014;46(4):793-808.
60. Cerny G. Studies on the aminopeptidase test for the distinction of gram-negative from gram-positive bacteria. *European journal of applied microbiology and biotechnology*. 1978;5(2):113-22.
61. Golich FC, Han M, Crowder MW. Over-expression, purification, and characterization of aminopeptidase N from *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification*. 2006;47(2):634-9.
62. Potempa M, Potempa J. Protease-dependent mechanisms of complement evasion by bacterial pathogens. *Biological Chemistry*. 2012;393(9):873-88.
63. DeJesus MA, Gerrick ER, Xu W, Park SW, Long JE, Boutte CC, et al. Comprehensive Essentiality Analysis of the *Mycobacterium tuberculosis* Genome via Saturating Transposon Mutagenesis. *mBio*. 2017;8(1).
64. McAdam RA, Quan S, Smith DA, Bardarov S, Betts JC, Cook FC, et al. Characterization of a *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv transposon library reveals

- insertions in 351 ORFs and mutants with altered virulence. *Microbiology (Reading)*. 2002;148(Pt 10):2975-86.
65. Sharma N, Aggarwal S, Kumar S, Sharma R, Choudhury K, Singh N, et al. Comparative analysis of homologous aminopeptidase PepN from pathogenic and non-pathogenic mycobacteria reveals divergent traits. *Plos one*. 2019;14(4):e0215123.
66. Nganje CN, Haynes SA, Qabar CM, Lent RC, Bou Ghanem EN, Shainheit MG. PepN is a non-essential, cell wall-localized protein that contributes to neutrophil elastase-mediated killing of *Streptococcus pneumoniae*. *PLoS One*. 2019;14(2):e0211632.
67. Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell DE, Korber DR, Lappin-Scott HM. MICROBIAL BIOFILMS. *Annual Review of Microbiology*. 1995;49(1):711-45.
68. Sutherland IW. Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. *Microbiology*. 2001;147(1):3-9.
69. Subhadra B. Special Issue: Biofilm Composition and Applications. *Coatings*. 2022;12(7):1026.
70. Branda SS, Vik Å, Friedman L, Kolter R. Biofilms: the matrix revisited. *Trends in microbiology*. 2005;13(1):20-6.
71. Flemming HC, Wingender J. The biofilm matrix. *Nat Rev Microbiol*. 2010;8(9):623-33.
72. Bjarnsholt T, Alhede M, Alhede M, Eickhardt-Sørensen SR, Moser C, Kühl M, et al. The in vivo biofilm. *Trends in Microbiology*. 2013;21(9):466-74.
73. Sutherland IW. The biofilm matrix--an immobilized but dynamic microbial environment. *Trends Microbiol*. 2001;9(5):222-7.
74. Lewis K. Riddle of biofilm resistance. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001;45(4):999-1007.
75. Lasa I, Pozo JLD, Penadés JR, Leiva J. Biofilms bacterianos e infección. *Anales del Sistema Sanitario de Navarra*. 2005;28:163-75.
76. Donlan RM. Biofilms and device-associated infections. *Emerg Infect Dis*. 2001;7(2):277-81.
77. Davies D. Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2003;2(2):114-22.
78. Edwards SJ, Kjellerup BV. Applications of biofilms in bioremediation and biotransformation of persistent organic pollutants, pharmaceuticals/personal care products, and heavy metals. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2013;97(23):9909-21.
79. Bordi C, de Bentzmann S. Hacking into bacterial biofilms: a new therapeutic challenge. *Annals of Intensive Care*. 2011;1(1):19.
80. Smith AW. Biofilms and antibiotic therapy: Is there a role for combating bacterial resistance by the use of novel drug delivery systems? *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2005;57(10):1539-50.
81. Bi Y, Xia G, Shi C, Wan J, Liu L, Chen Y, et al. Therapeutic strategies against bacterial biofilms. *Fundamental Research*. 2021;1(2):193-212.

82. Olson JK, Rager TM, Navarro JB, Mashburn-Warren L, Goodman SD, Besner GE. Harvesting the benefits of biofilms: A novel probiotic delivery system for the prevention of necrotizing enterocolitis. *Journal of Pediatric Surgery*. 2016;51(6):936-41.
83. Culp E, Wright GD. Bacterial proteases, untapped antimicrobial drug targets. *The Journal of Antibiotics*. 2017;70(4):366-77.
84. Wilkes S, Prescott J. The slow, tight binding of bestatin and amastatin to aminopeptidases. *Journal of biological Chemistry*. 1985;260(24):13154-62.
85. Aemaimanan P, Sattayasai N, Wara-aswapati N, Pitiphat W, Suwannarong W, Prajaneh S, et al. Alanine aminopeptidase and dipeptidyl peptidase IV in saliva of chronic periodontitis patients. *Journal of periodontology*. 2009;80(11):1809-14.
86. Hopsu-Havu VK, Glenner GG. A new dipeptide naphthylamidase hydrolyzing glycyl-prolyl-beta-naphthylamide. *Histochemie*. 1966;7(3):197-201.
87. Hong WJ, Doyle D. Membrane orientation of rat gp110 as studied by in vitro translation. *J Biol Chem*. 1988;263(32):16892-8.
88. Hong WJ, Doyle D. Molecular dissection of the NH₂-terminal signal/anchor sequence of rat dipeptidyl peptidase IV. *J Cell Biol*. 1990;111(2):323-8.
89. Cordero OJ, Salgado FJ, Nogueira M. On the origin of serum CD26 and its altered concentration in cancer patients. *Cancer Immunol Immunother*. 2009;58(11):1723-47.
90. Mentlein R. Dipeptidyl-peptidase IV (CD26)--role in the inactivation of regulatory peptides. *Regul Pept*. 1999;85(1):9-24.
91. Klemann C, Wagner L, Stephan M, von Hörsten S. Cut to the chase: a review of CD26/dipeptidyl peptidase-4's (DPP4) entanglement in the immune system. *Clin Exp Immunol*. 2016;185(1):1-21.
92. Ohnuma K, Takahashi N, Yamochi T, Hosono O, Dang NH, Morimoto C. Role of CD26/dipeptidyl peptidase IV in human T cell activation and function. *Frontiers in Bioscience-Landmark*. 2008;13(6):2299-310.
93. Deacon CF, Knudsen LB, Madsen K, Wiberg FC, Jacobsen O, Holst JJ. Dipeptidyl peptidase IV resistant analogues of glucagon-like peptide-1 which have extended metabolic stability and improved biological activity. *Diabetologia*. 1998;41(3):271-8.
94. Gupta R, Walunj SS, Tokala RK, Parsa KV, Singh SK, Pal M. Emerging drug candidates of dipeptidyl peptidase IV (DPP IV) inhibitor class for the treatment of Type 2 Diabetes. *Curr Drug Targets*. 2009;10(1):71-87.
95. Pala L, Rotella CM. The role of DPP4 activity in cardiovascular districts: in vivo and in vitro evidence. *J Diabetes Res*. 2013;2013:590456.
96. Dahan A, Wolk O, Yang P, Mittal S, Wu Z, Landowski CP, et al. Dipeptidyl peptidase IV as a potential target for selective prodrug activation and chemotherapeutic action in cancers. *Mol Pharm*. 2014;11(12):4385-94.
97. Inamoto T, Yamochi T, Ohnuma K, Iwata S, Kina S, Inamoto S, et al. Anti-CD26 monoclonal antibody-mediated G1-S arrest of human renal clear cell carcinoma Caki-2 is associated with retinoblastoma substrate dephosphorylation, cyclin-dependent

- kinase 2 reduction, p27(kip1) enhancement, and disruption of binding to the extracellular matrix. *Clin Cancer Res.* 2006;12(11 Pt 1):3470-7.
98. Darmoul D, Voisin T, Couvineau A, Rouyer-Fessard C, Salomon R, Wang Y, et al. Regional expression of epithelial dipeptidyl peptidase IV in the human intestines. *Biochem Biophys Res Commun.* 1994;203(2):1224-9.
99. Abe M, Havre PA, Urasaki Y, Ohnuma K, Morimoto C, Dang LH, et al. Mechanisms of confluence-dependent expression of CD26 in colon cancer cell lines. *BMC Cancer.* 2011;11:51.
100. Wilson MJ, Haller R, Li SY, Slaton JW, Sinha AA, Wasserman NF. Elevation of dipeptidylpeptidase iv activities in the prostate peripheral zone and prostatic secretions of men with prostate cancer: possible prostate cancer disease marker. *J Urol.* 2005;174(3):1124-8.
101. Lu Z, Qi L, Bo XJ, Liu GD, Wang JM, Li G. Expression of CD26 and CXCR4 in prostate carcinoma and its relationship with clinical parameters. *J Res Med Sci.* 2013;18(8):647-52.
102. Aratake Y, Kotani T, Tamura K, Araki Y, Kuribayashi T, Konoe K, et al. Dipeptidyl aminopeptidase IV staining of cytologic preparations to distinguish benign from malignant thyroid diseases. *Am J Clin Pathol.* 1991;96(3):306-10.
103. Ługowska A, Baydakova G, Ilyushkina A, Zakharova E, Mierzewska H, Szymańska K, et al. Elevated Dipeptidyl Peptidase IV (DPP-IV) Activity in Plasma from Patients with Various Lysosomal Diseases. *Diagnostics (Basel).* 2021;11(2).
104. Liu T, Ning J, Wang B, Dong B, Li S, Tian X, et al. Activatable Near-Infrared Fluorescent Probe for Dipeptidyl Peptidase IV and Its Bioimaging Applications in Living Cells and Animals. *Anal Chem.* 2018;90(6):3965-73.
105. Teame T, Zhang Z, Ran C, Zhang H, Yang Y, Ding Q, et al. The use of zebrafish (*Danio rerio*) as biomedical models. *Animal Frontiers.* 2019;9(3):68-77.
106. Howe K, Clark MD, Torroja CF, Torrance J, Berthelot C, Muffato M, et al. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature.* 2013;496(7446):498-503.
107. Langheinrich U. Zebrafish: A new model on the pharmaceutical catwalk. *BioEssays.* 2003;25(9):904-12.
108. Portugues R, Severi KE, Wyart C, Ahrens MB. Optogenetics in a transparent animal: circuit function in the larval zebrafish. *Current Opinion in Neurobiology.* 2013;23(1):119-26.
109. Feitsma H, Cuppen E. Zebrafish as a Cancer Model. *Molecular Cancer Research.* 2008;6(5):685-94.
110. Lai X, Wichers HJ, Soler-Lopez M, Dijkstra BW. Structure and Function of Human Tyrosinase and Tyrosinase-Related Proteins. *Chemistry – A European Journal.* 2018;24(1):47-55.
111. Decker H, Schweikardt T, Tuczek F. The First Crystal Structure of Tyrosinase: All Questions Answered? *Angewandte Chemie International Edition.* 2006;45(28):4546-50.

112. Solem E, Tucek F, Decker H. Tyrosinase versus Catechol Oxidase: One Asparagine Makes the Difference. *Angewandte Chemie International Edition*. 2016;55(8):2884-8.
113. Artés F, Castañer M, Gil M. Revisión: El pardeamiento enzimático en frutas y hortalizas mínimamente procesadas Review: Enzymatic browning in minimally processed fruit and vegetables. *Food science and technology international*. 1998;4(6):377-89.
114. Qu Y, Zhan Q, Du S, Ding Y, Fang B, Du W, et al. Catalysis-based specific detection and inhibition of tyrosinase and their application. *Journal of Pharmaceutical Analysis*. 2020;10(5):414-25.
115. Chang T-S. An Updated Review of Tyrosinase Inhibitors. *International Journal of Molecular Sciences*. 2009;10(6):2440-75.
116. Funayama M, Arakawa H, Yamamoto R, Nishino T, Shin T, Murao S. Effects of α - and β -Arbutin on Activity of Tyrosinases from Mushroom and Mouse Melanoma. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 1995;59(1):143-4.
117. Fan M, Zhang G, Hu X, Xu X, Gong D. Quercetin as a tyrosinase inhibitor: Inhibitory activity, conformational change and mechanism. *Food Research International*. 2017;100:226-33.
118. Chen QX, Kubo I. Kinetics of mushroom tyrosinase inhibition by quercetin. *J Agric Food Chem*. 2002;50(14):4108-12.
119. Luo Y, Wang J, Li S, Wu Y, Wang Z, Chen S, et al. Discovery and identification of potential anti-melanogenic active constituents of *Bletilla striata* by zebrafish model and molecular docking. *BMC Complementary Medicine and Therapies*. 2022;22(1):9.
120. Veselinović JB, Veselinović AM, Ilic-Tomic T, Davis R, O'Connor K, Pavic A, et al. Potent anti-melanogenic activity and favorable toxicity profile of selected 4-phenyl hydroxycoumarins in the zebrafish model and the computational molecular modeling studies. *Bioorg Med Chem*. 2017;25(24):6286-96.
121. Choi TY, Kim JH, Ko DH, Kim CH, Hwang JS, Ahn S, et al. Zebrafish as a new model for phenotype-based screening of melanogenic regulatory compounds. *Pigment Cell Res*. 2007;20(2):120-7.
122. Chai Z, Shang J, Shi W, Li X, Ma H. Increase of tyrosinase activity at the wound site in zebrafish imaged by a new fluorescent probe. *Chemical Communications*. 2021;57(22):2764-7.
123. Tipton KF, Dixon HBF. [9] Effects of pH on enzymes. *Methods in Enzymology*. 63: Academic Press; 1979. p. 183-234.
124. Hinkson IV, Elias JE. The dynamic state of protein turnover: It's about time. *Trends in Cell Biology*. 2011;21(5):293-303.
125. Rainey FA, Oren A. 1 Extremophile Microorganisms and the Methods to Handle Them. *Methods in Microbiology*. 35: Academic Press; 2006. p. 1-25.
126. Wescott CR, Klibanov AM. The solvent dependence of enzyme specificity. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*. 1994;1206(1):1-9.

127. Lowry OH, Passonneau JV. A flexible system of enzymatic analysis [by] Oliver H. Lowry [and] Janet V. Passonneau. New York: Academic Press; 1972.
128. Farhana A, Lappin SL. Biochemistry, lactate dehydrogenase. StatPearls [Internet]: StatPearls Publishing; 2022.
129. Cleland WW. Optimizing coupled enzyme assays. *Analytical Biochemistry*. 1979;99(1):142-5.
130. Potter LT. A radiometric microassay of acetylcholinesterase. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 1967;156(3):500-6.
131. Pavelka S. Radiometric enzyme assays: development of methods for extremely sensitive determination of types 1, 2 and 3 iodothyronine deiodinase enzyme activities. *Journal of radioanalytical and nuclear chemistry*. 2010;286:861-5.
132. Rossomando EF. HPLC in enzymatic analysis: John Wiley & Sons; 2009.
133. Eisenthal R, Danson MJ. Enzyme assays: a practical approach: Practical Approach; 2002.
134. Lakowicz JR. Principles of fluorescence spectroscopy. New York: Springer; 2006.
135. Powers SK, Criswell D, Lawler J, Ji LL, Martin D, Herb RA, et al. Influence of exercise and fiber type on antioxidant enzyme activity in rat skeletal muscle. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 1994;266(2):R375-R80.
136. Ariza M, Kolb HC, Moechars D, Rombouts F, Andrés JI. Tau positron emission tomography (PET) imaging: past, present, and future. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2015;58(11):4365-82.
137. Haris M, Singh A, Mohammed I, Ittyerah R, Nath K, Nanga RPR, et al. In vivo magnetic resonance imaging of tumor protease activity. *Scientific reports*. 2014;4(1):6081.
138. Fan W, Shi W, Zhang W, Jia Y, Zhou Z, Brusnahan SK, et al. Cathepsin S-cleavable, multi-block HPMA copolymers for improved SPECT/CT imaging of pancreatic cancer. *Biomaterials*. 2016;103:101-15.
139. Komatsu T, Urano Y. Evaluation of enzymatic activities in living systems with small-molecular fluorescent substrate probes. *Anal Sci*. 2015;31(4):257-65.
140. Paddock SW. The Laser-Scanning Confocal Microscope in Biomedical Research. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. 1991;198(3):772-80.
141. Petráň M, Hadravský M, Egger MD, Galambos R. Tandem-Scanning Reflected-Light Microscope*. *J Opt Soc Am*. 1968;58(5):661-4.
142. Amos WB, White JG, Fordham M. Use of confocal imaging in the study of biological structures. *Applied Optics*. 1987;26(16):3239-43.
143. Wang L, Du W, Hu Z, Uvdal K, Li L, Huang W. Hybrid rhodamine fluorophores in the visible/NIR region for biological imaging. *Angewandte Chemie International Edition*. 2019;58(40):14026-43.

144. Nemoto T, Kawakami R, Hibi T, Iijima K, Otomo K. Two-photon excitation fluorescence microscopy and its application in functional connectomics. *Microscopy (Oxf)*. 2015;64(1):9-15.
145. Göppert-Mayer M. Über Elementarakte mit zwei Quantensprüngen. *Annalen der Physik*. 1931;401(3):273-94.
146. Kaiser W, Garrett C. Two-photon excitation in Ca F 2: Eu 2+. *Physical review letters*. 1961;7(6):229.
147. McClain W. Excited state symmetry assignment through polarized two-photon absorption studies of fluids. *The Journal of Chemical Physics*. 1971;55(6):2789-96.
148. Friedrich D, McClain W. Two-photon molecular electronic spectroscopy. *Annual Review of Physical Chemistry*. 1980;31(1):559-77.
149. Friedrich DM. Two-photon molecular spectroscopy. ACS Publications; 1982.
150. Birge RR. Two-photon spectroscopy of protein-bound chromophores. *Accounts of Chemical Research*. 1986;19(5):138-46.
151. Singh S, Bradley L. Three-photon absorption in naphthalene crystals by laser excitation. *Physical Review Letters*. 1964;12(22):612.
152. Oheim M, Michael DJ, Geisbauer M, Madsen D, Chow RH. Principles of two-photon excitation fluorescence microscopy and other nonlinear imaging approaches. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2006;58(7):788-808.
153. Rubart M. Two-photon microscopy of cells and tissue. *Circ Res*. 2004;95(12):1154-66.
154. Centonze VE, White JG. Multiphoton excitation provides optical sections from deeper within scattering specimens than confocal imaging. *Biophysical journal*. 1998;75(4):2015-24.
155. Soeller C, Cannell M. Two-photon microscopy: Imaging in scattering samples and three-dimensionally resolved flash photolysis. *Microscopy research and technique*. 1999;47(3):182-95.
156. Periasamy A, Skoglund P, Noakes C, Keller R. An evaluation of two-photon excitation versus confocal and digital deconvolution fluorescence microscopy imaging in *Xenopus* morphogenesis. *Microscopy research and technique*. 1999;47(3):172-81.
157. Oheim M, Beaurepaire E, Chaigneau E, Mertz J, Charpak S. Two-photon microscopy in brain tissue: parameters influencing the imaging depth. *Journal of neuroscience methods*. 2001;111(1):29-37.
158. Theer P, Hasan MT, Denk W. Two-photon imaging to a depth of 1000 μm in living brains by use of a Ti: Al 2 O 3 regenerative amplifier. *Optics letters*. 2003;28(12):1022-4.
159. Levene MJ, Dombeck DA, Kasischke KA, Molloy RP, Webb WW. In vivo multiphoton microscopy of deep brain tissue. *Journal of neurophysiology*. 2004;91(4):1908-12.

160. Rubart M, Wang E, Dunn KW, Field LJ. Two-photon molecular excitation imaging of Ca²⁺ transients in Langendorff-perfused mouse hearts. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. 2003;284(6):C1654-C68.
161. Zipfel WR, Williams RM, Webb WW. Nonlinear magic: multiphoton microscopy in the biosciences. *Nature biotechnology*. 2003;21(11):1369-77.
162. Kleinfeld D, Mitra PP, Helmchen F, Denk W. Fluctuations and stimulus-induced changes in blood flow observed in individual capillaries in layers 2 through 4 of rat neocortex. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1998;95(26):15741-6.
163. Koester HJ, Baur D, Uhl R, Hell SW. Ca²⁺ fluorescence imaging with pico- and femtosecond two-photon excitation: signal and photodamage. *Biophysical journal*. 1999;77(4):2226-36.
164. Hopt A, Neher E. Highly nonlinear photodamage in two-photon fluorescence microscopy. *Biophysical journal*. 2001;80(4):2029-36.
165. Patterson GH, Piston DW. Photobleaching in two-photon excitation microscopy. *Biophysical journal*. 2000;78(4):2159-62.
166. Yao S, Belfield KD. Two-Photon Fluorescent Probes for Bioimaging. *European Journal of Organic Chemistry*. 2012;2012(17):3199-217.
167. Ragan T, Kadiri LR, Venkataraju KU, Bahlmann K, Sutin J, Taranda J, et al. Serial two-photon tomography for automated ex vivo mouse brain imaging. *Nat Methods*. 2012;9(3):255-8.
168. Drobizhev M, Makarov NS, Tillo SE, Hughes TE, Rebane A. Two-photon absorption properties of fluorescent proteins. *Nature Methods*. 2011;8(5):393-9.
169. Hermann J, Ducuing J. Dispersion of the two-photon cross section in rhodamine dyes. *Optics Communications*. 1972;6(2):101-5.
170. Xu C, Guild J, Webb WW, Denk W. Determination of absolute two-photon excitation cross sections by in situ second-order autocorrelation. *Optics letters*. 1995;20(23):2372-4.
171. Albota MA, Xu C, Webb WW. Two-photon fluorescence excitation cross sections of biomolecular probes from 690 to 960 nm. *Applied optics*. 1998;37(31):7352-6.
172. Wokosin D, Loughrey C, Smith G. Characterization of a range of fura dyes with two-photon excitation. *Biophysical journal*. 2004;86(3):1726-38.
173. Schafer KJ, Belfield KD, Yao S, Frederiksen PK, Hales JM, Kolattukudy PE. Fluorene-based fluorescent probes with high two-photon action cross-sections for biological multiphoton imaging applications. *Journal of Biomedical Optics*. 2005;10(5):051402.
174. Liu Zq, Fang Q, Wang D, Cao Dx, Xue G, Yu Wt, et al. Trivalent Boron as an Acceptor in Donor- π -Acceptor-Type Compounds for Single- and Two-Photon Excited Fluorescence. *Chemistry—A European Journal*. 2003;9(20):5074-84.
175. Kato Si, Matsumoto T, Shigeiwa M, Gorohmaru H, Maeda S, Ishi-i T, et al. Novel 2, 1, 3-benzothiadiazole-based red-fluorescent dyes with enhanced two-

- photon absorption cross-sections. *Chemistry—A European Journal*. 2006;12(8):2303-17.
176. Porrès L, Mongin O, Katan C, Charlot M, Pons T, Mertz J, et al. Enhanced two-photon absorption with novel octupolar propeller-shaped fluorophores derived from triphenylamine. *Organic letters*. 2004;6(1):47-50.
177. Albota M, Beljonne D, Brédas J-L, Ehrlich JE, Fu J-Y, Heikal AA, et al. Design of organic molecules with large two-photon absorption cross sections. *Science*. 1998;281(5383):1653-6.
178. Wang X, Krebs LJ, Al-Nuri M, Pudavar HE, Ghosal S, Liebow C, et al. A chemically labeled cytotoxic agent: two-photon fluorophore for optical tracking of cellular pathway in chemotherapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1999;96(20):11081-4.
179. Gryczynski I, Gryczynski Z, Lakowicz JR, Yang D, Burke TG. Fluorescence spectral properties of the anticancer drug topotecan by steady-state and frequency domain fluorometry with one-photon and multi-photon excitation. *Photochemistry and photobiology*. 1999;69(4):421-8.
180. Lakowicz JR, Gryczynski I. Tryptophan fluorescence intensity and anisotropy decays of human serum albumin resulting from one-photon and two-photon excitation. *Biophysical chemistry*. 1992;45(1):1-6.
181. Lakowicz JR, Kierdaszuk B, Callis P, Malak H, Gryczynski I. Fluorescence anisotropy of tyrosine using one-and two-photon excitation. *Biophysical chemistry*. 1995;56(3):263-71.
182. Chen Z, Kaplan D, Yang K, Kumar J, Marx K, Tripathy S. Two-photon-induced fluorescence from the phycoerythrin protein. *Applied optics*. 1997;36(7):1655-9.
183. Shear JB, Xu C, Webb WW. Multiphoton-excited visible emission by serotonin solutions. *Photochemistry and photobiology*. 1997;65(6):931-6.
184. Potter SM, Wang C-M, Garrity PA, Fraser SE. Intravital imaging of green fluorescent protein using two-photon laser-scanning microscopy. *Gene*. 1996;173(1):25-31.
185. Fu Y, Finney NS. Small-molecule fluorescent probes and their design. *RSC Advances*. 2018;8(51):29051-61.
186. Wu Y, Huang S, Zeng F, Wang J, Yu C, Huang J, et al. A ratiometric fluorescent system for carboxylesterase detection with AIE dots as FRET donors. *Chemical Communications*. 2015;51(64):12791-4.
187. Hu M, Li L, Wu H, Su Y, Yang P-Y, Uttamchandani M, et al. Multicolor, One- and Two-Photon Imaging of Enzymatic Activities in Live Cells with Fluorescently Quenched Activity-Based Probes (qABPs). *Journal of the American Chemical Society*. 2011;133(31):12009-20.
188. Li L, Ge J, Wu H, Xu Q-H, Yao SQ. Organelle-Specific Detection of Phosphatase Activities with Two-Photon Fluorogenic Probes in Cells and Tissues. *Journal of the American Chemical Society*. 2012;134(29):12157-67.

189. Zhou X, Jiang Y, Zhao X, Zhu Y. A New Two-Photon Ratiometric Fluorescent Probe for Detecting Alkaline Phosphatase in Living Cells. *Molecules*. 2016;21(12):1619.
190. Lee HW, Lim CS, Choi H, Cho MK, Noh C-K, Lee K, et al. Discrimination between Human Colorectal Neoplasms with a Dual-Recognitive Two-Photon Probe. *Analytical Chemistry*. 2019;91(22):14705-11.
191. Li Z, Ren M, Wang L, Dai L, Lin W. Development of a red-emissive two-photon fluorescent probe for sensitive detection of beta-galactosidase in vitro and in vivo. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2020;307:127643.
192. Wei X, Hu X-X, Zhang L-L, Li J, Wang J, Wang P, et al. Highly selective and sensitive FRET based ratiometric two-photon fluorescent probe for endogenous β -galactosidase detection in living cells and tissues. *Microchemical Journal*. 2020;157:105046.
193. Li W, Yin S, Gong X, Xu W, Yang R, Wan Y, et al. Achieving the ratiometric imaging of steroid sulfatase in living cells and tissues with a two-photon fluorescent probe. *Chemical Communications*. 2020;56(9):1349-52.
194. Wu X, An JM, Shang J, Huh E, Qi S, Lee E, et al. A molecular approach to rationally constructing specific fluorogenic substrates for the detection of acetylcholinesterase activity in live cells, mice brains and tissues. *Chemical Science*. 2020;11(41):11285-92.
195. Wang Y, Yu F, Luo X, Li M, Zhao L, Yu F. Visualization of carboxylesterase 2 with a near-infrared two-photon fluorescent probe and potential evaluation of its anticancer drug effects in an orthotopic colon carcinoma mice model. *Chemical Communications*. 2020;56(32):4412-5.
196. Liu X, Xiang M, Tong Z, Luo F, Chen W, Liu F, et al. Activatable fluorescence probe via self-immolative intramolecular cyclization for histone deacetylase imaging in live cells and tissues. *Analytical chemistry*. 2018;90(9):5534-9.
197. Chai Y, Gao Y, Xiong H, Lv W, Yang G, Lu C, et al. A near-infrared fluorescent probe for monitoring leucine aminopeptidase in living cells. *Analyst*. 2019;144(2):463-7.
198. Liu X, Zhang Q-Y, Wang F, Jiang J-H. A near infrared fluorescent probe for the detection and imaging of prolyl aminopeptidase activity in living cells. *Analyst*. 2019;144(20):5980-5.
199. Zou L-W, Wang P, Qian X-K, Feng L, Yu Y, Wang D-D, et al. A highly specific ratiometric two-photon fluorescent probe to detect dipeptidyl peptidase IV in plasma and living systems. *Biosensors & bioelectronics*. 2017;90:283-9.
200. Kim D, Sambasivan S, Nam H, Hean Kim K, Yong Kim J, Joo T, et al. Reaction-based two-photon probes for in vitro analysis and cellular imaging of monoamine oxidase activity. *Chemical Communications*. 2012;48(54):6833-5.
201. Mei Y, Liu Z, Liu M, Gong J, He X, Zhang Q-W, et al. Two-photon fluorescence imaging and ratiometric quantification of mitochondrial monoamine oxidase-A in neurons. *Chemical Communications*. 2022;58(46):6657-60.

202. Cho MK, Juvekar V, Lim CS, Noh C-K, Shin SJ, Kim HM. A Highly Sensitive Two-Photon Ratiometric Probe for Rapid Detection of the hNQO1 Enzyme in Colon Cancer Tissue. *Asian Journal of Organic Chemistry*. 2019;8(9):1707-12.
203. Zhang H, Fan J, Wang J, Zhang S, Dou B, Peng X. An Off-On COX-2-Specific Fluorescent Probe: Targeting the Golgi Apparatus of Cancer Cells. *Journal of the American Chemical Society*. 2013;135(31):11663-9.
204. Zhou L, Gong L, Hu S. Construction of an efficient two-photon fluorescent probe for imaging nitroreductase in live cells and tissues. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2018;199:254-9.
205. Ning J, Tian Z, Wang B, Ge G, An Y, Hou J, et al. A highly sensitive and selective two-photon fluorescent probe for real-time sensing of cytochrome P450 1A1 in living systems. *Materials Chemistry Frontiers*. 2018;2(11):2013-20.
206. Zhao J, Qu Y, Gao H, Zhong M, Li X, Zhang F, et al. Loss of thioredoxin reductase function in a mouse stroke model disclosed by a two-photon fluorescent probe. *Chemical Communications*. 2020;56(90):14075-8.
207. Reo YJ, Dai M, Yang YJ, Ahn KH. Cell-Membrane-Localizing, Two-Photon Probe for Ratiometric Imaging of γ -Glutamyl Transpeptidase in Cancerous Cells and Tissues. *Analytical Chemistry*. 2020;92(18):12678-85.
208. Kim HM, Cho BR. Two-Photon Probes for Intracellular Free Metal Ions, Acidic Vesicles, And Lipid Rafts in Live Tissues. *Accounts of Chemical Research*. 2009;42(7):863-72.
209. Bort G, Gallavardin T, Ogden D, Dalko PI. From One-Photon to Two-Photon Probes: "Caged" Compounds, Actuators, and Photoswitches. *Angewandte Chemie International Edition*. 2013;52(17):4526-37.
210. Cahalan MD, Parker I, Wei SH, Miller MJ. Two-photon tissue imaging: seeing the immune system in a fresh light. *Nature Reviews Immunology*. 2002;2(11):872-80.
211. Liu HW, Liu Y, Wang P, Zhang XB. Molecular engineering of two-photon fluorescent probes for bioimaging applications. *Methods Appl Fluoresc*. 2017;5(1):012003.
212. Abbe E. Beiträge zur Theorie des Mikroskops und der mikroskopischen Wahrnehmung. *Archiv für mikroskopische Anatomie*. 1873;9:413-8.
213. Grimaldi FM. Physico-mathesis de lumine, coloribus, et iride, aliisque adnexis libri duo, in quorum primo afferuntur noua experimenta, & rationes ab ijs deductae pro substantialitate luminis. In secundo autem dissoluuntur argumenta in primo adducta, & probabiliter sustineri posse docetur sententia peripatetica de accidentalitate luminis.... Auctore P. Francisco Maria Grimaldo Societatis Iesu. Opus posthumum: ex typographia haeredis Victorij Benatij; 1963.
214. Helmholtz, Fripp H. On the Limits of the Optical Capacity of the Microscope. *The Monthly Microscopical Journal*. 1876;16(1):15-39.
215. Sigal YM, Zhou R, Zhuang X. Visualizing and discovering cellular structures with super-resolution microscopy. *Science*. 2018;361(6405):880-7.

216. Pennacchietti F, Serebrovskaya EO, Faro AR, Shemyakina, II, Bozhanova NG, Kotlobay AA, et al. Fast reversibly photoswitching red fluorescent proteins for live-cell RESOLFT nanoscopy. *Nat Methods*. 2018;15(8):601-4.
217. Gwosch KC, Pape JK, Balzarotti F, Hoess P, Ellenberg J, Ries J, et al. MINFLUX nanoscopy delivers 3D multicolor nanometer resolution in cells. *Nat Methods*. 2020;17(2):217-24.
218. Sauer M, Heilemann M. Single-Molecule Localization Microscopy in Eukaryotes. *Chemical Reviews*. 2017;117(11):7478-509.
219. Fornasiero EF, Opazo F. Super-resolution imaging for cell biologists: concepts, applications, current challenges and developments. *Bioessays*. 2015;37(4):436-51.
220. Turkowyd B, Virant D, Endesfelder U. From single molecules to life: microscopy at the nanoscale. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2016;408(25):6885-911.
221. Sahl SJ, Hell SW, Jakobs S. Fluorescence nanoscopy in cell biology. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2017;18(11):685-701.
222. Lu M, van Tartwijk FW, Lin JQ, Nijenhuis W, Parutto P, Fantham M, et al. The structure and global distribution of the endoplasmic reticulum network are actively regulated by lysosomes. *Sci Adv*. 2020;6(51):eabc7209.
223. Hell SW. Far-field optical nanoscopy. *Science*. 2007;316(5828):1153-8.
224. Hell SW. Microscopy and its focal switch. *Nat Methods*. 2009;6(1):24-32.
225. Rust MJ, Bates M, Zhuang X. Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM). *Nature Methods*. 2006;3(10):793-6.
226. Betzig E, Patterson GH, Sougrat R, Lindwasser OW, Olenych S, Bonifacino JS, et al. Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution. *Science*. 2006;313(5793):1642-5.
227. Blom H, Widengren J. Stimulated Emission Depletion Microscopy. *Chemical Reviews*. 2017;117(11):7377-427.
228. Eggeling C, Willig KI, Barrantes FJ. STED microscopy of living cells – new frontiers in membrane and neurobiology. *Journal of Neurochemistry*. 2013;126(2):203-12.
229. Betzig E, Hell SW, Moerner WE. The nobel prize in chemistry 2014. *Nobel Media AB*. 2014.
230. Orrit M. Celebrating optical nanoscopy. *Nature Photonics*. 2014;8(12):887-8.
231. Blom H, Brismar H. STED microscopy: increased resolution for medical research? *J Intern Med*. 2014;276(6):560-78.
232. Chacko JV, Canale C, Harke B, Diaspro A. Sub-Diffraction Nano Manipulation Using STED AFM. *PLOS ONE*. 2013;8(6):e66608.
233. Nägerl UV, Bonhoeffer T. Imaging living synapses at the nanoscale by STED microscopy. *J Neurosci*. 2010;30(28):9341-6.
234. Rittweger E, Han KY, Irvine SE, Eggeling C, Hell SW. STED microscopy reveals crystal colour centres with nanometric resolution. *Nature Photonics*. 2009;3(3):144-7.

235. Bianchini P, Peres C, Oneto M, Galiani S, Vicidomini G, Diaspro A. STED nanoscopy: a glimpse into the future. *Cell and Tissue Research*. 2015;360(1):143-50.
236. Pujals S, Albertazzi L. Super-resolution Microscopy for Nanomedicine Research. *ACS Nano*. 2019;13(9):9707-12.
237. Müller T, Schumann C, Kraegeloh A. STED microscopy and its applications: new insights into cellular processes on the nanoscale. *Chemphyschem*. 2012;13(8):1986-2000.
238. Vicidomini G, Bianchini P, Diaspro A. STED super-resolved microscopy. *Nat Methods*. 2018;15(3):173-82.
239. M D Newton a, Sutin N. Electron Transfer Reactions in Condensed Phases. *Annual Review of Physical Chemistry*. 1984;35(1):437-80.
240. Marcus RA, Sutin N. Electron transfers in chemistry and biology. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Bioenergetics*. 1985;811(3):265-322.
241. Mulliken RS. Structures of complexes formed by halogen molecules with aromatic and with oxygenated solvents1. *Journal of the American Chemical Society*. 1950;72(1):600-8.
242. Mulliken RS. Molecular compounds and their spectra. II. *Journal of the American Chemical Society*. 1952;74(3):811-24.
243. Mulliken RS. Molecular compounds and their spectra. III. The interaction of electron donors and acceptors. *The Journal of Physical Chemistry*. 1952;56(7):801-22.
244. Adam AMA, Refat MS, Altalhi TA, Aldawsari FS. Charge-transfer (CT) dynamics of triamterene with 2,3-dichloro-5,6-dicyano-p-benzoquinone acceptor: A $n \rightarrow \pi^*$ model CT complex generated by liquid- and solid-state reactions. *Journal of Molecular Liquids*. 2021;334:116119.
245. Klymchenko AS. Solvatochromic and Fluorogenic Dyes as Environment-Sensitive Probes: Design and Biological Applications. *Accounts of Chemical Research*. 2017;50(2):366-75.
246. Kasha M. Characterization of electronic transitions in complex molecules. *Discussions of the Faraday Society*. 1950;9(0):14-9.
247. Rappoport D, Furche F. Photoinduced Intramolecular Charge Transfer in 4-(Dimethyl)aminobenzonitrile – A Theoretical Perspective. *Journal of the American Chemical Society*. 2004;126(4):1277-84.
248. Sun M. Charge transfer state induced from locally excited state by polar solvent. *Chemical Physics Letters*. 2005;408(1):128-33.
249. Yin G, Li Y, Li S, Xu B, Yang Q, Zhang Y, et al. Hexaphenylbenzene based push-pull fluorophores displaying intriguing polarity-dependent fluorescence behavior, AIE(E) characteristics and mega-large Stokes shifts. *Dyes and Pigments*. 2022;198:110013.
250. Popczyk A, Cheret Y, El-Ghayoury A, Sahraoui B, Mysliwiec J. Solvatochromic fluorophores based on thiophene derivatives for highly-precise water, alcohols and dangerous ions detection. *Dyes and Pigments*. 2020;177:108300.

251. Kellmann A. Intersystem crossing and internal conversion quantum yields of acridine in polar and nonpolar solvents. *The Journal of Physical Chemistry*. 1977;81(12):1195-8.
252. Kalyanasundaram K, Thomas JK. Solvent-dependent fluorescence of pyrene-3-carboxaldehyde and its applications in the estimation of polarity at micelle-water interfaces. *The Journal of Physical Chemistry*. 1977;81(23):2176-80.
253. Seixas de Melo JS, Becker RS, Macanita AL. Photophysical Behavior of Coumarins as a Function of Substitution and Solvent: Experimental Evidence for the Existence of a Lowest Lying $1(n,\pi^*)$ State. *The Journal of Physical Chemistry*. 1994;98(24):6054-8.
254. Mangini A. *Advances in molecular spectroscopy: proceedings of the IVth International Meeting on Molecular Spectroscopy*; Elsevier; 2013.
255. Rettig W, Baumann W. Luminescent and nonluminescent twisted intramolecular charge transfer (TICT) states: Dipole moments and application. *Photochemistry and photophysics*. 1992;6:79-134.
256. Malval J-P, Lapouyade R. Derivatization of 4-(Dimethylamino)benzamide to Dual Fluorescent Ionophores: Divergent Spectroscopic Effects Dependent on N or O Amide Chelation. *Helvetica Chimica Acta*. 2001;84(9):2439-51.
257. Su D, Teoh CL, Wang L, Liu X, Chang Y-T. Motion-induced change in emission (MICE) for developing fluorescent probes. *Chemical Society Reviews*. 2017;46(16):4833-44.
258. Tan P, Li C, Wang Y, Zhuang W, Chen M, Zhou L, et al. A biheteroaryl-bridged fluorescence probe enables lipid droplets-specific bioimaging and photodynamic therapy in clinical clear cell renal cell carcinoma. *Dyes and Pigments*. 2021;188:109215.
259. La Clair JJ. Synthesis of a New Class of Solvent-Sensitive Fluorescent Labels. *Angewandte Chemie International Edition*. 1998;37(3):325-9.
260. La Clair JJ. An Atmospherically Driven Optical Switch. *Angewandte Chemie International Edition*. 1999;38(20):3045-7.
261. Błaszczuk A. Strategies to improve the performance of metal-free dye-sensitized solar cells. *Dyes and Pigments*. 2018;149:707-18.
262. Liu W, Liu Z, Yan J, Wang L, Xu H, Wang H, et al. A quinoxaline-based charge-transfer compound for efficient deep-red organic light emitting diodes. *Dyes and Pigments*. 2021;191:109305.
263. Kalcic CL, Harris DA, Dantus M, editors. Controlling the excited state charge transfer in DMABN using shaped femtosecond pulses. 2007 Quantum Electronics and Laser Science Conference; 2007 6-11 May 2007.
264. Rotkiewicz K, Grellmann KH, Grabowski ZR. Reinterpretation of the anomalous fluorescence of p-n,n-dimethylamino-benzonitrile. *Chemical Physics Letters*. 1973;19(3):315-8.
265. Wang C, Chi W, Qiao Q, Tan D, Xu Z, Liu X. Twisted intramolecular charge transfer (TICT) and twists beyond TICT: from mechanisms to rational designs of bright and sensitive fluorophores. *Chemical Society reviews*. 2021.

266. Guido CA, Mennucci B, Jacquemin D, Adamo C. Planar vs. twisted intramolecular charge transfer mechanism in Nile Red: new hints from theory. *Phys Chem Chem Phys*. 2010;12(28):8016-23.
267. Sasaki S, Drummen GPC, Konishi Gi. Recent advances in twisted intramolecular charge transfer (TICT) fluorescence and related phenomena in materials chemistry. *Journal of Materials Chemistry C*. 2016;4:2731-43.
268. Zhang Z, Gou Z, Dong B, Tian M. Tuning the “critical polarity” of TICT dyes: Construction of polarity-sensitive platform to distinguish duple organelles. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2022;355:131349.
269. Schuddeboom W, Jonker SA, Warman JM, Leinhos U, Kuehnle W, Zachariasse KA. Excited-state dipole moments of dual fluorescent 4-(dialkylamino) benzonitriles: influence of alkyl chain length and effective solvent polarity. *The Journal of Physical Chemistry*. 1992;96(26):10809-19.
270. Sobolewski AL, Domcke W. Charge transfer in aminobenzonitriles: do they twist? *Chemical Physics Letters*. 1996;250(3):428-36.
271. Zachariasse K. Th. von der Haar, A. Hebecker, U. Leinhos, and W. Kühnle. *Pure Appl Chem*. 1993;65:1745.
272. Zachariasse KA, Grobys M, von der Haar T, Hebecker A, Il'ichev YV, Jiang YB, et al. Intramolecular charge transfer in the excited state. Kinetics and configurational changes. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*. 1996;102(1, Supplement 1):59-70.
273. Zachariasse KA. Comment on “Pseudo-Jahn–Teller and TICT-models: a photophysical comparison of meta-and para-DMABN derivatives” [*Chem. Phys. Lett*. 305 (1999) 8]: The PICT model for dual fluorescence of aminobenzonitriles. *Chemical Physics Letters*. 2000;320(1):8-13.
274. Grabowski ZR, Rotkiewicz K, Rettig W. Structural Changes Accompanying Intramolecular Electron Transfer: Focus on Twisted Intramolecular Charge-Transfer States and Structures. *Chemical Reviews*. 2003;103(10):3899-4032.
275. Hammond PR. Laser dye DCM, its spectral properties, synthesis and comparison with other dyes in the red. *Optics Communications*. 1979;29(3):331-3.
276. Webster F, Mccolgin W. Arylidene dye lasers. Google Patents; 1974.
277. Wang X, Guo Z, Zhu S, Liu Y, Shi P, Tian H, et al. Rational design of novel near-infrared fluorescent DCM derivatives and their application in bioimaging. *Journal of Materials Chemistry B*. 2016;4(27):4683-9.
278. Sun W, Fan J, Hu C, Cao J, Zhang H, Xiong X, et al. A two-photon fluorescent probe with near-infrared emission for hydrogen sulfide imaging in biosystems. *Chem Commun (Camb)*. 2013;49(37):3890-2.
279. Guo Z, Zhu W, Tian H. Dicyanomethylene-4H-pyran chromophores for OLED emitters, logic gates and optical chemosensors. *Chemical Communications*. 2012;48(49):6073-84.
280. Pommeret S, Gustavsson T, Naskrecki R, Baldacchino G, Mialocq J-C. Femtosecond absorption and emission spectroscopy of the DCM laser dye. *Journal of Molecular Liquids*. 1995;64(1):101-12.

281. Batchelder JS, Zewail AH, Cole T. Luminescent solar concentrators. 2: Experimental and theoretical analysis of their possible efficiencies. *Applied Optics*. 1981;20(21):3733-54.
282. Cai Y, Hou T-T, Wang C-Y, Tang Y-H, Zhang Z-Y, Zhang D, et al. Fluorescence Enhancement of Dicyanomethylene-4H-Pyran Derivatives in Solid State for Visualization of Latent Fingerprints. *Frontiers in Chemistry*. 2022;10.
283. Meyer M, Mialocq JC, Perly B. Photoinduced intramolecular charge transfer and trans-cis isomerization of the DCM styrene dye: Picosecond and nanosecond laser spectroscopy, high-performance liquid chromatography, and nuclear magnetic resonance studies. *Journal of Physical Chemistry*. 1990;94(1):98-104.
284. Meyer M, Mialocq J. Ground state and singlet excited state of laser dye DCM: Dipole moments and solvent induced spectral shifts. *Optics communications*. 1987;64(3):264-8.
285. Marguet S, Mialocq J-C, Millié P, Berthier G, Momicchioli F. Intramolecular charge transfer and trans-cis isomerization of the DCM styrene dye in polar solvents. A CS INDO MRCI study. *Chemical physics*. 1992;160(2):265-79.
286. Mialocq J, Armand X, Marguet S. A new sensitive chemical actinometer for time-resolved and continuous photochemistry: the DCM styrene dye. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*. 1993;69(3):351-6.
287. Martin MM, Plaza P, Meyer YH. Ultrafast intramolecular charge transfer in the merocyanine dye DCM. *Chemical physics*. 1995;192(3):367-77.
288. Zhang H, Jonkman A, Van der Meulen P, Glasbeek M. Femtosecond studies of charge separation in phot-excited DCM in liquid solution. *Chemical physics letters*. 1994;224(5-6):551-6.
289. Nabavi SH, Khodabandeh MH, Golbabaee M, Moshaii A, Davari MD. Excited states study reveals the twisted geometry induced large stokes shift in DCM fluorescent dye. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*. 2018;354:127-38.
290. Mulay SV, Kim Y, Lee KJ, Yudhistira T, Park H-S, Churchill DG. A fluorogenic and red-shifted diphenyl phosphinate-based probe for selective peroxynitrite detection as demonstrated in fixed cells. *New Journal of Chemistry*. 2017;41(20):11934-40.
291. Zhang Y-Y, Chen X-Z, Liu X-Y, Zhang X-Y, Gao G, Hou S-C, et al. A highly selective and ultrafast near-infrared fluorescent turn-on and colorimetric probe for hypochlorite in living cells. *Analytica Chimica Acta*. 2019;1078:135-41.
292. Wang B-B, Wang Y, Wu W-N, Xu Z-H, Zhao X-L, Xu Z-Q, et al. A near-infrared colorimetric and fluorescent dual-channel probe for cyanide detection based on dicyanomethylene-4H-pyran. *Inorganic Chemistry Communications*. 2020;122:108245.
293. Feng A, Jia Y, Huang L, Wang L, Zhou G, Wang S, et al. 1,6-Elimination reaction induced detection of fluoride ions in vitro and in vivo based on a NIR fluorescent probe. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2019;220:117108.

294. Ling C, Liu T, Li R, Wang S, Zhang J, Li S, et al. A novel DCM-based NIR fluorescent probe for detecting ozone and its bioimaging in live cells. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2021;248:119192.
295. Wang P, Wang K, Chen D, Mao Y, Gu Y. A novel colorimetric and near-infrared fluorescent probe for hydrogen peroxide imaging in vitro and in vivo. *RSC advances*. 2015;5(104):85957-63.
296. Wang T, Chai Y, Chen S, Yang G, Lu C, Nie J, et al. Near-infrared fluorescent probe for imaging nitroxyl in living cells and zebrafish model. *Dyes and Pigments*. 2019;166:260-5.
297. Li M, Wu X, Wang Y, Li Y, Zhu W, James TD. A near-infrared colorimetric fluorescent chemodosimeter for the detection of glutathione in living cells. *Chemical communications*. 2014;50(14):1751-3.
298. Cui L, Shi Y, Zhang S, Yan L, Zhang H, Tian Z, et al. A NIR turn-on fluorescent probe applied in cytochrome P450 reductase detection and hypoxia imaging in tumor cells. *Dyes and Pigments*. 2017;139:587-92.
299. Yang Y, Wang L, Xu M, Chen J, Qu Y. Triphenyl phosphate end-capped dicyanomethylene-4H-pyran as a near infrared fluorescent sensor for lysozyme in urine sample. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2019;284:553-61.
300. Foglino M, Gharbi S, Lazdunski A. Nucleotide sequence of the pepN gene encoding aminopeptidase N of *Escherichia coli*. *Gene*. 1986;49(3):303-9.
301. Torres M, Uroz S, Salto R, Fauchery L, Quesada E, Llamas I. HqiA, a novel quorum-quenching enzyme which expands the AHL lactonase family. *Scientific reports*. 2017;7(1):1-15.
302. Kapust RB, Tözsér J, Fox JD, Anderson DE, Cherry S, Copeland TD, et al. Tobacco etch virus protease: mechanism of autolysis and rational design of stable mutants with wild-type catalytic proficiency. *Protein engineering*. 2001;14(12):993-1000.
303. Stockert JC, Horobin RW, Colombo LL, Blázquez-Castro A. Tetrazolium salts and formazan products in Cell Biology: Viability assessment, fluorescence imaging, and labeling perspectives. *Acta Histochem*. 2018;120(3):159-67.
304. Brouwer AM. Standards for photoluminescence quantum yield measurements in solution (IUPAC Technical Report). *Pure and Applied Chemistry*. 2011;83(12):2213-28.
305. Catalán J. Toward a generalized treatment of the solvent effect based on four empirical scales: dipolarity (SdP, a new scale), polarizability (SP), acidity (SA), and basicity (SB) of the medium. *J Phys Chem B*. 2009;113(17):5951-60.
306. Catalán J. On the empirical scales of organic solvents established using probe/homomorph pairs. *Journal of Physical Organic Chemistry*. 2021;34(8):e4206.
307. Babusca D, Benchea AC, Morosanu AC, Dimitriu DG, Dorohoi DO. Solvent empirical scales and their importance for the study of intermolecular interactions. *AIP Conference Proceedings*. 2017;1796(1):030011.
308. Meyer M, Mialocq J, Rougee M. Fluorescence lifetime measurements of the two isomers of the laser dye DCM. *Chemical physics letters*. 1988;150(5):484-90.

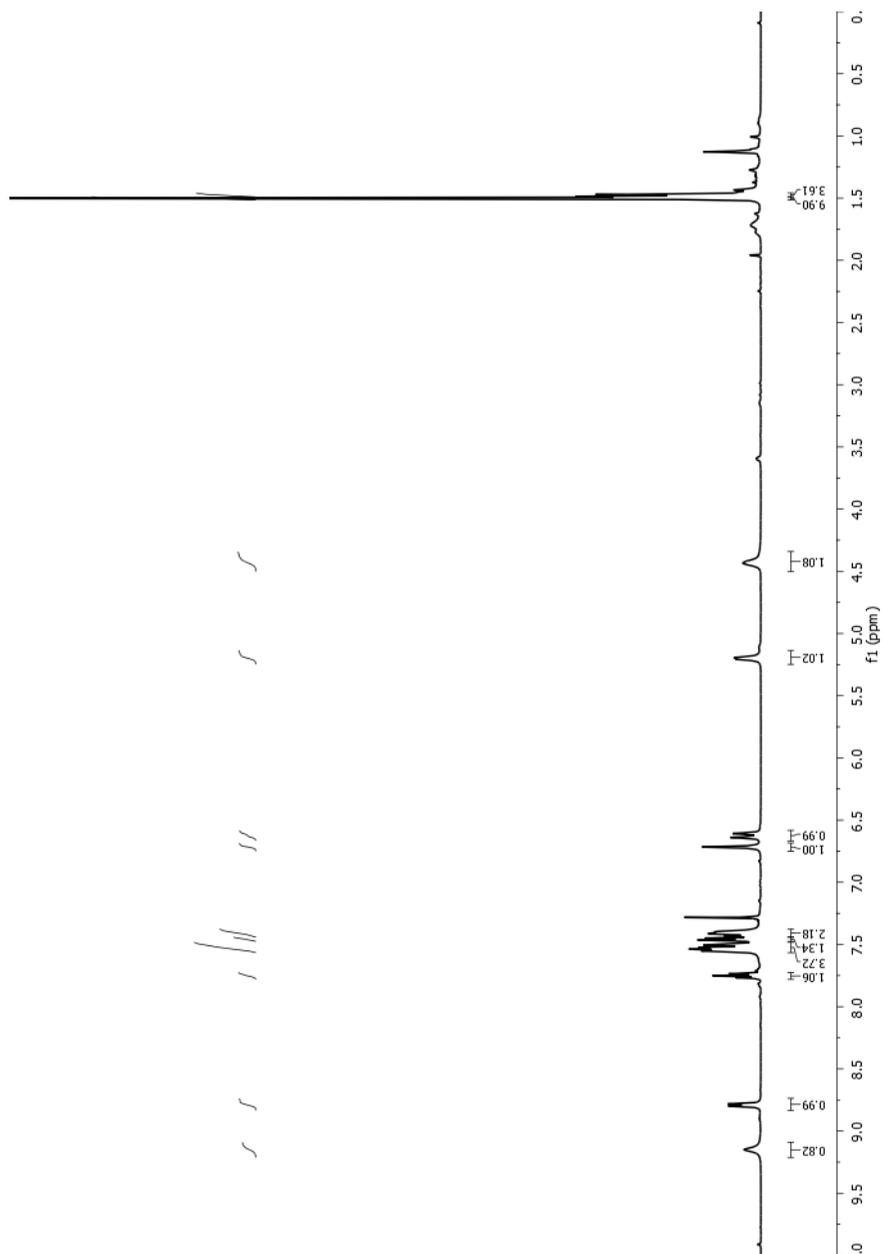
309. Birch D, Hungerford G, Imhof R, Holmes A. The fluorescence properties of DCM. *Chemical physics letters*. 1991;178(2-3):177-84.
310. Chan DS, Kavanagh ME, McLean KJ, Munro AW, Matak-Vinković D, Coyne AG, et al. Effect of DMSO on Protein Structure and Interactions Assessed by Collision-Induced Dissociation and Unfolding. *Anal Chem*. 2017;89(18):9976-83.
311. Demchenko AP, Rusyn OI, Egorov AM, Tishkov VI. The solvent effects on the kinetics of bacterial formate dehydrogenase reaction. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*. 1990;1039(3):290-6.
312. Wiggers HJ, Cheleski J, Zottis A, Oliva G, Andricopulo AD, Montanari CA. Effects of organic solvents on the enzyme activity of *Trypanosoma cruzi* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in calorimetric assays. *Analytical Biochemistry*. 2007;370(1):107-14.
313. Gu K, Liu Y, Guo Z, Lian C, Yan C, Shi P, et al. In Situ Ratiometric Quantitative Tracing of Intracellular Leucine Aminopeptidase Activity via an Activatable Near-Infrared Fluorescent Probe. *ACS Applied Materials & Interfaces*. 2016;8(40):26622-9.
314. Rosano GL, Morales ES, Ceccarelli EA. New tools for recombinant protein production in *Escherichia coli*: A 5-year update. *Protein science*. 2019;28(8):1412-22.
315. Wang L, Zhang X, Wu G, Qi Y, Zhang J, Yang J, et al. *Streptococcus pneumoniae* aminopeptidase N contributes to bacterial virulence and elicits a strong innate immune response through MAPK and PI3K/AKT signaling. *Journal of Microbiology*. 2020;58(4):330-9.
316. Jacques SL. Optical properties of biological tissues: a review. *Physics in Medicine & Biology*. 2013;58(11):R37.
317. Varadi L, Wang M, Mamidi RR, Luo JL, Perry JD, Hibbs DE, et al. A latent green fluorescent styrylcoumarin probe for the selective growth and detection of Gram negative bacteria. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 2018;26(16):4745-50.
318. Cellier M, James AL, Orega S, Perry JD, Turnbull G, Stanforth SP. The synthesis of l-alanyl and β -alanyl derivatives of 2-aminoacridone and their application in the detection of clinically-important microorganisms. *Plos one*. 2016;11(7):e0158378.
319. Váradi L, Najib EY, Hibbs DE, Perry JD, Groundwater PW. A Selective, Dual Emission β -Alanine Aminopeptidase Activated Fluorescent Probe for the Detection of *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia*, and *Serratia marcescens*. *Molecules*. 2019;24(19):3550.
320. Wang Y, Wu X, Cheng Y, Zhao X. A fluorescent switchable AIE probe for selective imaging of dipeptidyl peptidase-4 in vitro and in vivo and its application in screening DPP-4 inhibitors. *Chem Commun (Camb)*. 2016;52(17):3478-81.
321. Liu Z-M, Feng L, Hou J, Lv X, Ning J, Ge G-B, et al. A ratiometric fluorescent sensor for highly selective detection of human carboxylesterase 2 and its application in living cells. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2014;205:151-7.

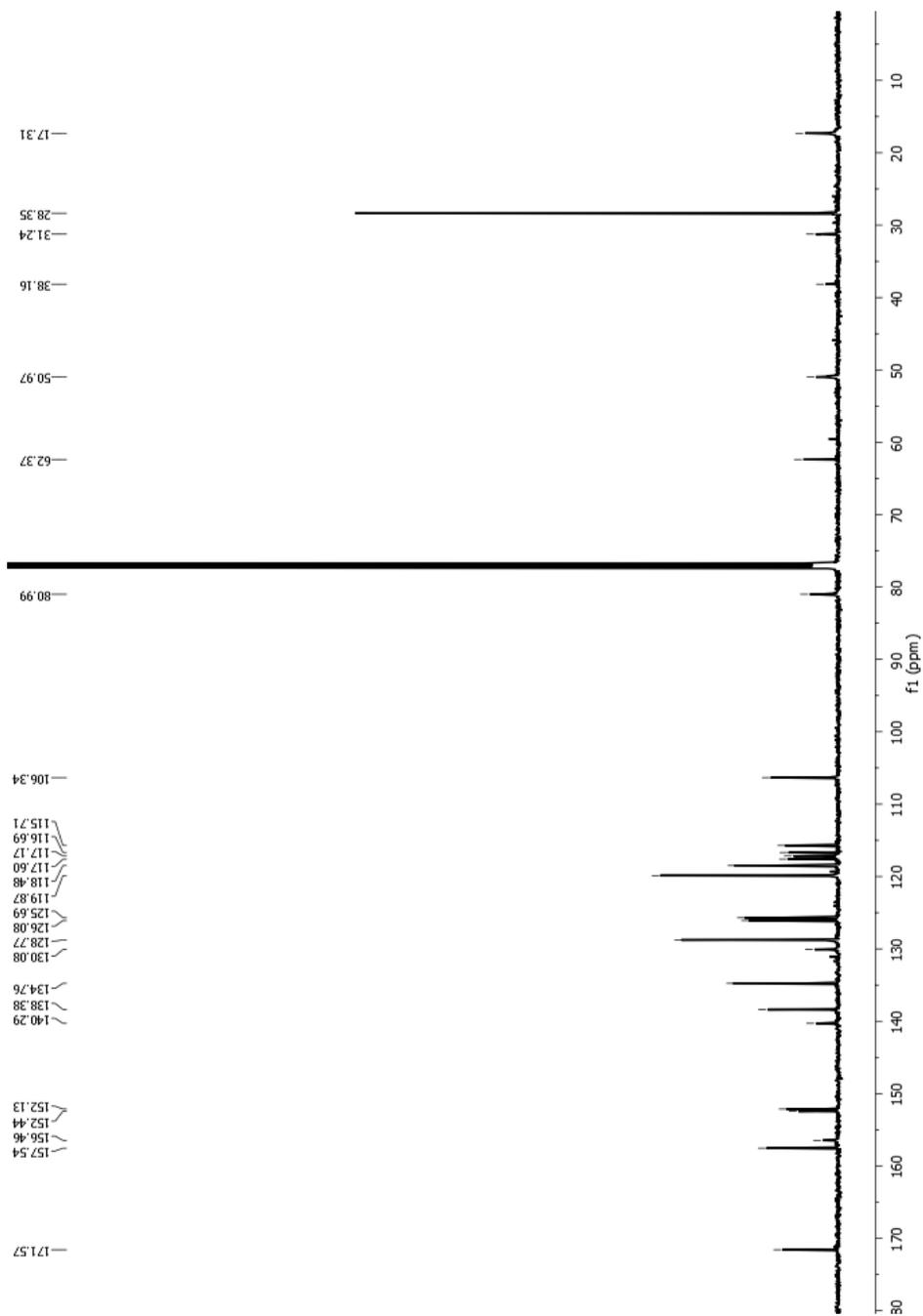
322. Liu ZM, Feng L, Ge GB, Lv X, Hou J, Cao YF, et al. A highly selective ratiometric fluorescent probe for in vitro monitoring and cellular imaging of human carboxylesterase 1. *Biosens Bioelectron.* 2014;57:30-5.
323. Miller S, St Onge EL. Sitagliptin: a dipeptidyl peptidase IV inhibitor for the treatment of type 2 diabetes. *Ann Pharmacother.* 2006;40(7-8):1336-43.
324. Lyseng-Williamson KA. Sitagliptin. *Drugs.* 2007;67(4):587-97.
325. Lualdi M, Colombo A, Leo E, Morelli D, Vannelli A, Battaglia L, et al. Natural fluorescence spectroscopy of human blood plasma in the diagnosis of colorectal cancer: feasibility study and preliminary results. *Tumori.* 2007;93(6):567-71.
326. Moan J. Fluorescence and absorption properties of the components of hematoporphyrin derivative. 1981.
327. Moan J. Effect of bleaching of porphyrin sensitizers during photodynamic therapy. *Cancer Lett.* 1986;33(1):45-53.
328. Larrinaga G, Perez I, Sanz B, Beitia M, Errarte P, Fernández A, et al. Dipeptidyl-Peptidase IV Activity Is Correlated with Colorectal Cancer Prognosis. *PLOS ONE.* 2015;10(3):e0119436.
329. Paredes JM, Giron MD, Ruedas-Rama MJ, Orte A, Crovetto L, Talavera EM, et al. Real-time phosphate sensing in living cells using fluorescence lifetime imaging microscopy (FLIM). *J Phys Chem B.* 2013;117(27):8143-9.
330. Benet LZ, Hosey CM, Ursu O, Oprea TI. BDDCS, the Rule of 5 and drugability. *Adv Drug Deliv Rev.* 2016;101:89-98.
331. Chao X, Qi Y, Zhang Y. Highly Photostable Fluorescent Tracker with pH-Insensitivity for Long-Term Imaging of Lysosomal Dynamics in Live Cells. *ACS Sens.* 2021;6(3):786-96.
332. Wu X, Li L, Shi W, Gong Q, Ma H. Near-Infrared Fluorescent Probe with New Recognition Moiety for Specific Detection of Tyrosinase Activity: Design, Synthesis, and Application in Living Cells and Zebrafish. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2016;55(47):14728-32.
333. Fan M, Zhang G, Hu X, Xu X, Gong D. Quercetin as a tyrosinase inhibitor: Inhibitory activity, conformational change and mechanism. *Food Res Int.* 2017;100(Pt 1):226-33.
334. Shaw PA, Forsyth E, Haseeb F, Yang S, Bradley M, Klausen M. Two-Photon Absorption: An Open Door to the NIR-II Biological Window? *Frontiers in chemistry.* 2022;10:921354.
335. Ustione A, Piston DW. A simple introduction to multiphoton microscopy. *J Microsc.* 2011;243(3):221-6.

ANEXOS

VII. Anexos

Anexo 1. Espectro ^1H -RMN del compuesto DCM-NBOC-Ala



Anexo 2. Espectro ^{13}C -RMN del compuesto DCM-NBOC-Ala

Anexo 3. Análisis masas del compuesto DCM-NBOC-Ala

Page 1

Elemental Composition Report

Single Mass Analysis

Tolerance = 5.0 PPM / DBE: min = -180.0, max = 180.0

Element prediction: Off

Number of isotope peaks used for i-FIT = 3

Monoisotopic Mass, Even Electron Ions

466 formula(e) evaluated with 4 results within limits (all results (up to 1000) for each mass)

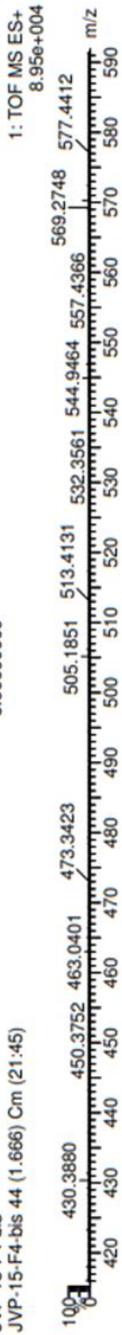
Elements Used:

C: 1-30 H: 1-35 N: 1-10 O: 1-10 Na: 0-1

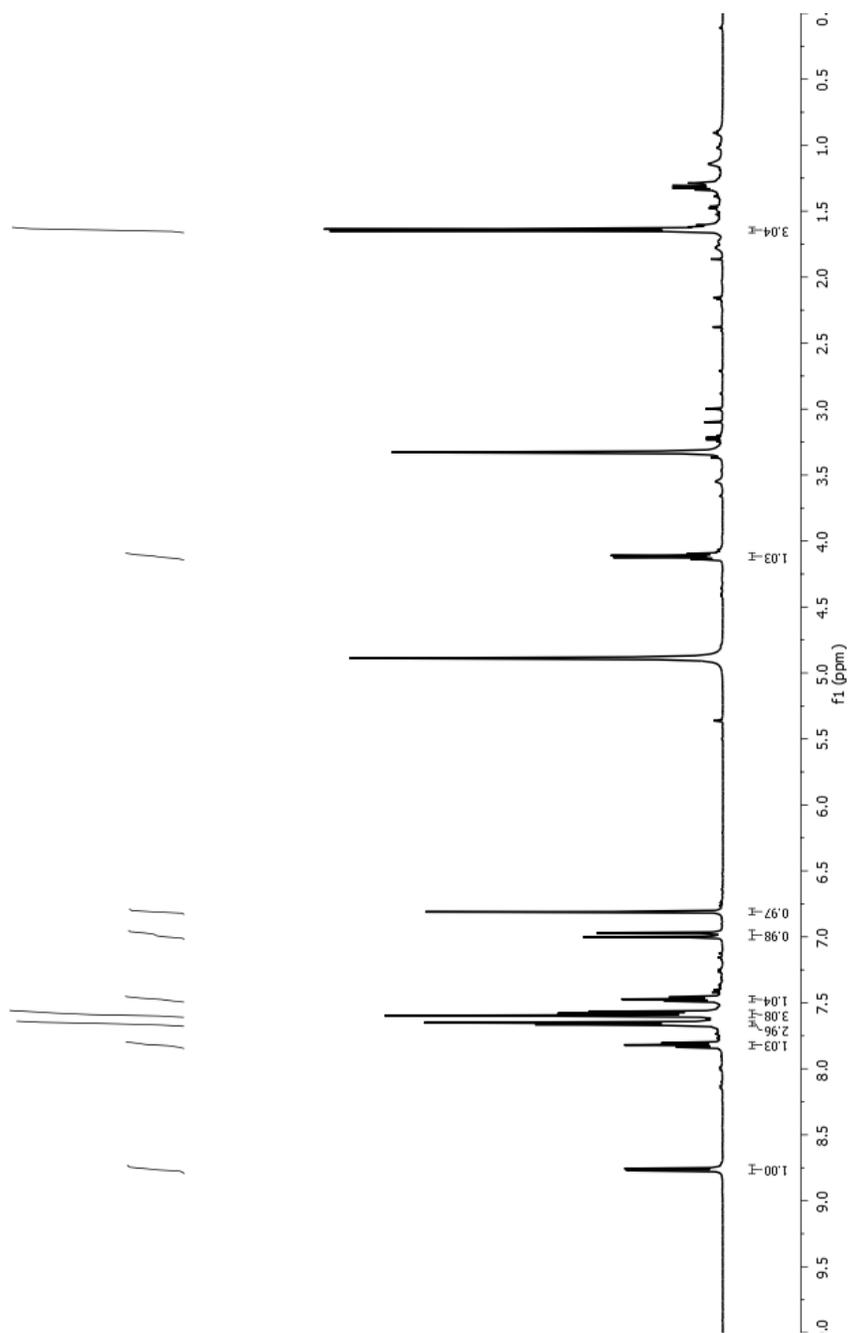
JVP-15-F4-bis

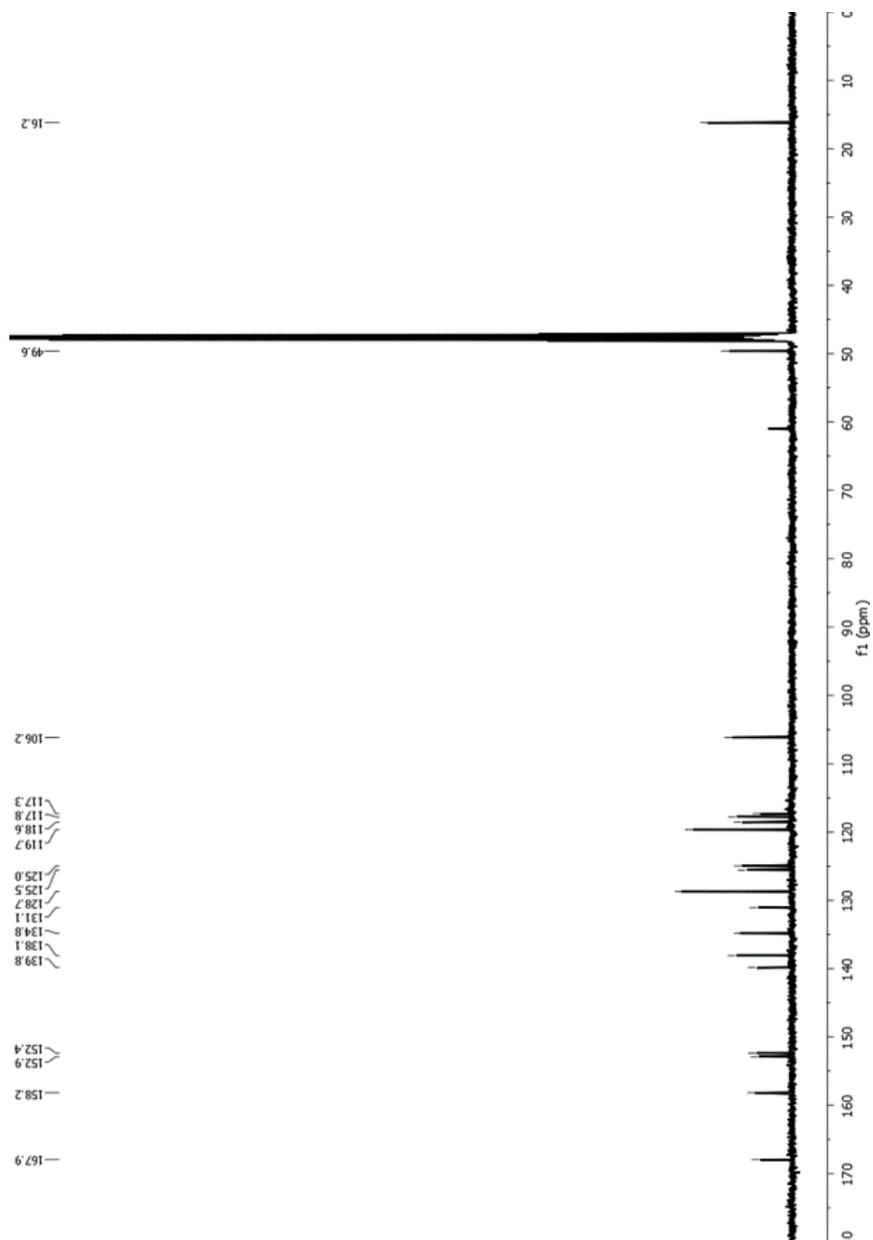
JVP-15-F4-bis 44 (1.666) Cm (21:45)

6.000000000

Minimum: -180.0
Maximum: 180.0

Mass	Calc. Mass	mDa	PPM	DBE	i-FIT	Norm	Conf (%)	Formula
505.1851	505.1852	-0.1	-0.2	17.5	1222.0	2.745	6.43	C28 H26 N4 O4 Na
505.1849	0.2	0.4	21.5	1220.5	1.241	28.90		C26 H21 N10 O2
505.1836	1.5	3.0	16.5	1219.7	0.445	64.08		C25 H25 N6 O6
505.1876	-2.5	-4.9	20.5	1224.4	5.122	0.60		C30 H25 N4 O4

Anexo 4. Espectro ^1H -RMN del compuesto DCM-NH-Ala

Anexo 5. Espectro ^{13}C -RMN del compuesto DCM-NH-Ala

Anexo 6. Análisis masas del compuesto DCM-NH-Ala

Page 1

Elemental Composition Report

Single Mass Analysis

Tolerance = 5.0 PPM / DBE: min = -180.0, max = 180.0

Element prediction: Off

Number of isotope peaks used for i-FIT = 3

Monoisotopic Mass, Even Electron Ions
 800 formula(e) evaluated with 3 results within limits (all results (up to 1000) for each mass)

Elements Used:

C: 1-60 H: 1-80 N: 1-6 O: 1-10 Na: 0-1

JVP16-F1-C

JVP16-F1-C 56 (2:132) Cm (22:57)

6.00000000

1: TOF MS ES+
3.17e+006

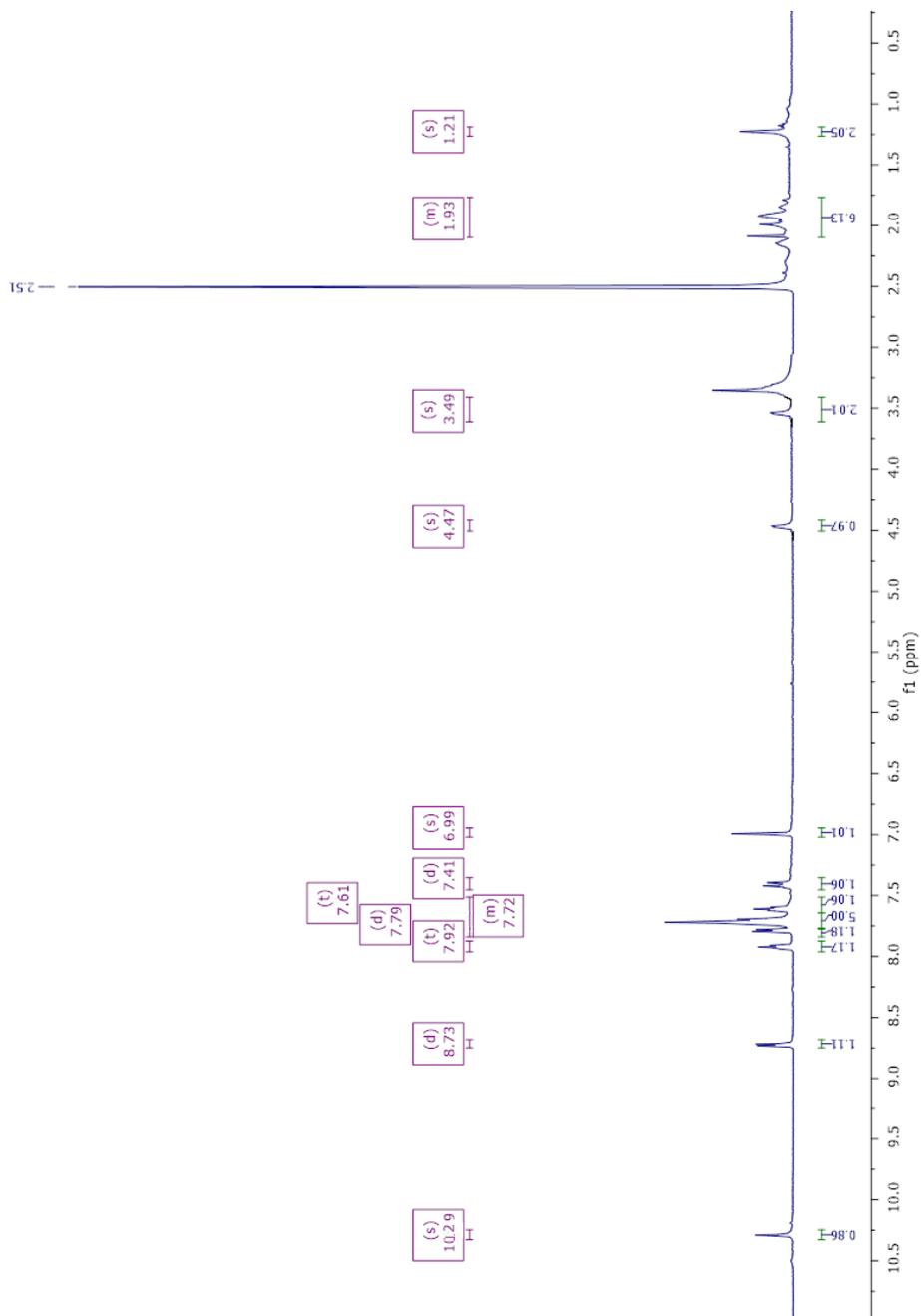
Mass	Calc. Mass	mDa	PPM	DBE	i-FIT	Norm	Conf (%)	Formula
383.1501	383.1502	-0.1	-0.3	0.5	1596.2	16.121	0.00	C9 H24 N6 O9 Na
	383.1508	-0.7	-1.8	16.5	1580.1	0.000	99.99	C23 H19 N4 O2
	383.1484	1.7	4.4	13.5	1589.1	9.043	0.01	C21 H20 N4 O2 Na

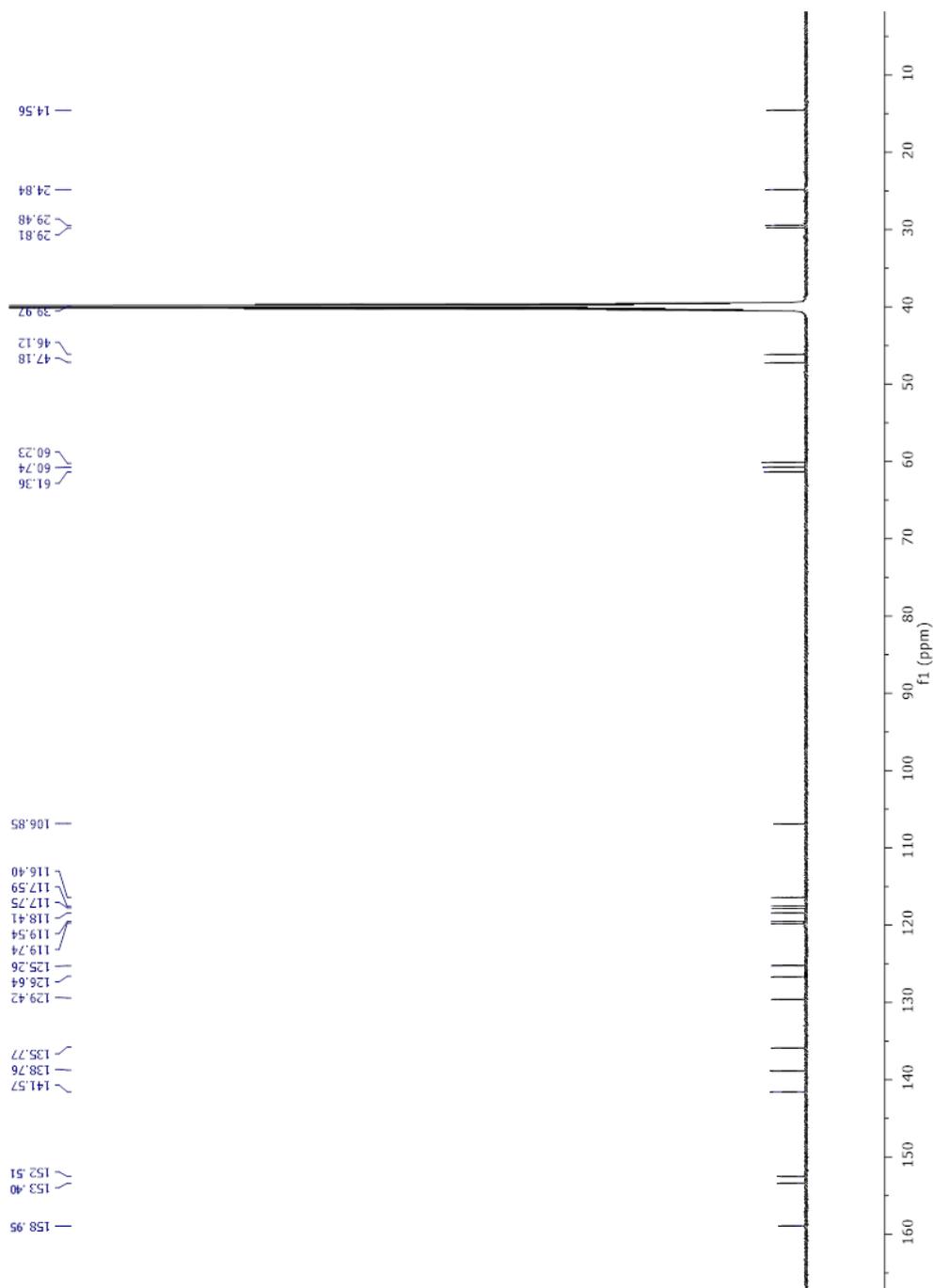
Minimum:

-180.0

Maximum:

180.0

Anexo 7. Espectro ^1H -RMN del compuesto DCM-NH-Pro-Gly

Anexo 8. Espectro ^{13}C -RMN del compuesto DCM-NH-Pro-Gly

Anexo 9. Análisis masas del compuesto DCM-NH-Pro-Gly

Elemental Composition Report

Single Mass Analysis

Tolerance = 10.0 PPM / DBE: min = -1.5, max = 50.0

Element prediction: Off

Number of isotope peaks used for i-FIT = 3

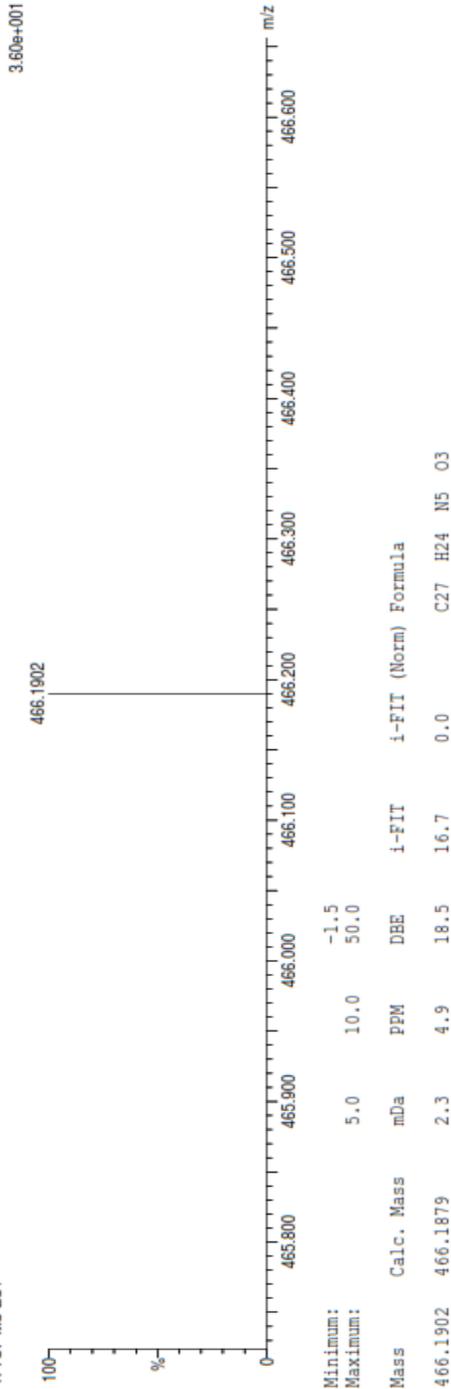
Monoisotopic Mass, Even Electron Ions
 34 formula(e) evaluated with 1 results within limits (up to 50 best isotopic matches for each mass)

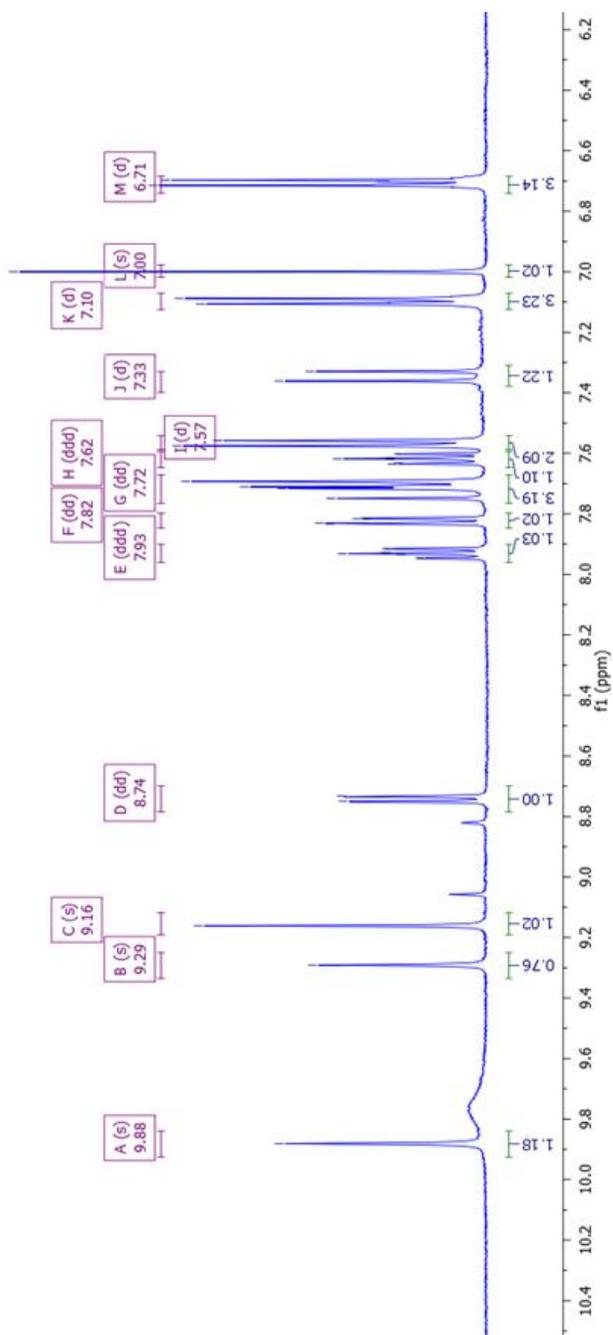
Elements Used:

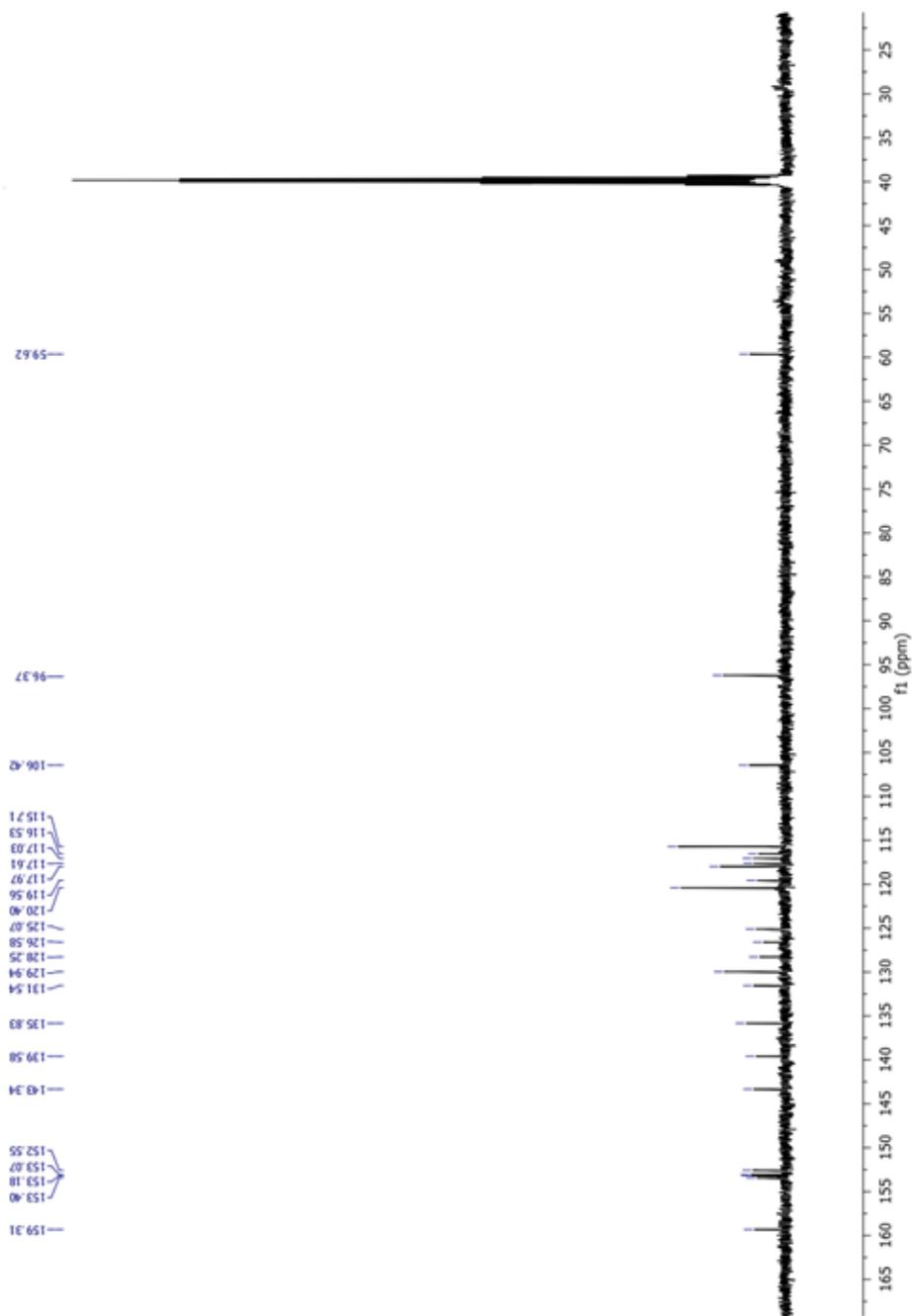
C: 0-27 H: 0-1000 N: 0-5 O: 0-3

Muestra Perugia Javier 13 (0.304) AM (Top1, Ht.5000.0,0.00,1.00)

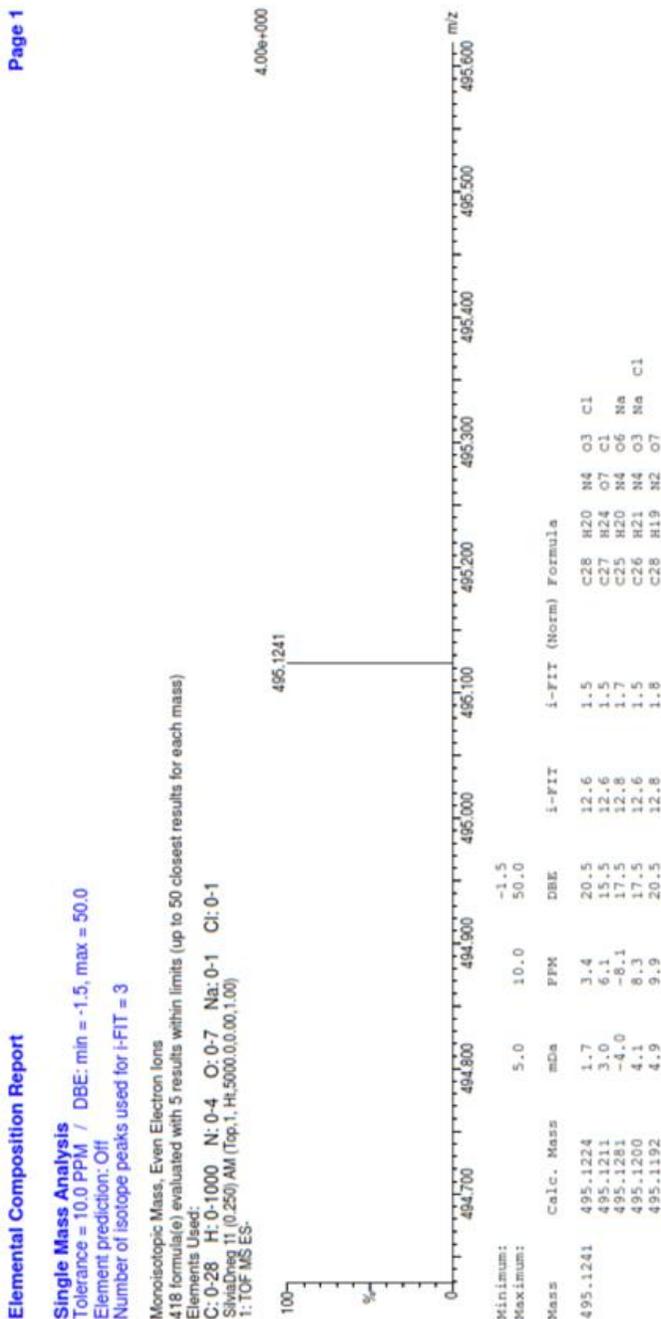
1: TOF MS ES+



Anexo 10. Espectro ^1H -RMN del compuesto DCM-HBU

Anexo 11. Espectro ^{13}C -RMN del compuesto DCM-HBU

Anexo 12. Análisis masas del compuesto DCM-HBU



PUBLICACIONES

Detection by fluorescence microscopy of N-aminopeptidases in bacteria using an ICT sensor with multiphoton excitation: Usefulness for super-resolution microscopy

Javier Valverde-Pozo, Jose M. Paredes*, Carmen Salto-Giron, Pilar Herrero-Foncubierta, María D. Giron, Delia Miguel, Juan M. Cuerva, Jose M. Alvarez-Pez, Rafael Salto, Eva M. Talavera

Sensors and Actuators B: Chemical, 321 (2020) 128487

<https://doi.org/10.1016/j.snb.2020.128487>

Journal Impact Factor: 7.460

Ranking JCR: Q1 (7/87)

Category: Chemistry, Analytical



Contents lists available at ScienceDirect

Sensors and Actuators B: Chemical

journal homepage: www.elsevier.com/locate/snb



Detection by fluorescence microscopy of N-aminopeptidases in bacteria using an ICT sensor with multiphoton excitation: Usefulness for super-resolution microscopy



Javier Valverde-Pozo^a, Jose M. Paredes^{a,*}, Carmen Salto-Giron^a, Pilar Herrero-Foncubierta^b, María D. Giron^c, Delia Miguel^a, Juan M. Cuerva^b, Jose M. Alvarez-Pez^a, Rafael Salto^c, Eva M. Talavera^a

^a Department of Physical Chemistry, Faculty of Pharmacy, Unidad de Excelencia en Química Aplicada a Biomedicina y Medioambiente (UEQ), University of Granada, C. U. Cartuja, 18071, Granada, Spain

^b Department of Organic Chemistry, Faculty of Sciences, Unidad de Excelencia en Química Aplicada a Biomedicina y Medioambiente (UEQ), University of Granada, C. U. Puente Nueva s/n, 18071, Granada, Spain

^c Department of Biochemistry and Molecular Biology II, Faculty of Pharmacy, Unidad de Excelencia en Química Aplicada a Biomedicina y Medioambiente (UEQ), University of Granada, Cartuja Campus, 18071, Granada, Spain

Ratiometric Two-Photon Near Infrared Probe to Detect DPP IV in Human Plasma, Living Cells, Human Tissues and Whole Organisms using Zebrafish

Javier Valverde-Pozo, Jose M. Paredes*, Thomas J. Widmann, Carmen Griñan-Lison, Giada Ceccarelli, Antimo Gioiello, M. Eugenia Garcia-Rubiño, Juan A. Marchal, Jose M. Alvarez-Pez, and Eva M. Talavera*

ACS Sensors, 2023, 8, 3, 1064-1075

<https://doi.org/10.1021/acssensors.2c02025>

Journal Impact Factor: 9.618 (in 2021)

Ranking JCR: Q1 (5/87)

Category: Chemistry, Analytical



pubs.acs.org/acssensors

Article

Ratiometric Two-Photon Near-Infrared Probe to Detect DPP IV in Human Plasma, Living Cells, Human Tissues, and Whole Organisms Using Zebrafish

Javier Valverde-Pozo, Jose M. Paredes*, Thomas J. Widmann, Carmen Griñan-Lison, Giada Ceccarelli, Antimo Gioiello, M. Eugenia Garcia-Rubiño, Juan A. Marchal, Jose M. Alvarez-Pez, and Eva M. Talavera*



Cite This: <https://doi.org/10.1021/acssensors.2c02025>



Read Online

New ICT-Based Ratiometric Two-Photon near Infrared Probe for Imaging Tyrosinase in Living Cells, Tissues, and Whole Organisms

Javier Valverde-Pozo, Jose Manuel Paredes*, Maria Eugenia García-Rubiño, Thomas J. Widmann, Carmen Griñan-Lison, Silvia Lobon-Moles, Juan Antonio Marchal, Jose Maria Alvarez-Pez and Eva Maria Talavera*

Chemosensors, 2023, 11(2), 145

<https://doi.org/10.3390/chemosensors11020145>

Journal Impact Factor: 4.229 (in 2021)

Ranking JCR: Q1 (16/64)

Category: Instruments & Instrumentation



Article

New ICT-Based Ratiometric Two-Photon near Infrared Probe for Imaging Tyrosinase in Living Cells, Tissues, and Whole Organisms

Javier Valverde-Pozo ¹, Jose Manuel Paredes ^{1,*} , Maria Eugenia García-Rubiño ¹, Thomas J. Widmann ² , Carmen Griñan-Lison ^{2,3,4} , Silvia Lobon-Moles ¹, Juan Antonio Marchal ^{3,5,6} , Jose Maria Alvarez-Pez ¹ and Eva Maria Talavera ^{1,*}

¹ Nanoscopy-UGR Laboratory, Department of Physical Chemistry, Faculty of Pharmacy, Unidad de Excelencia en Química Aplicada a Biomedicina y Medioambiente (UEQ), University of Granada, C. U. Cartuja, 18071 Granada, Spain

² GENYO, Centre for Genomics and Oncological Research, Pfizer/University of Granada/Andalusian Regional Government, 18016 Granada, Spain

³ Instituto de Investigación Biosanitaria (ibs.GRANADA), 18012 Granada, Spain

⁴ UGC de Oncología Médica, Complejo Hospitalario de Jaen, 23007 Jaen, Spain

⁵ Centre for Biomedical Research (CIBM), Biopathology and Regenerative Medicine Institute (IBIMER), University of Granada, 18100 Granada, Spain

⁶ Department of Human Anatomy and Embryology, Faculty of Medicine, University of Granada, 18016 Granada, Spain

* Correspondence: jmparedes@ugr.es (J.M.P.); etalaver@ugr.es (E.M.T.);
Tel.: +34-958243829 (J.M.P.); +34-958243828 (E.M.T.)

Otras publicaciones en las que he contribuido durante mis estudios de doctorado:

- Pilar M. Luque-Navarro, M. Paz Carrasco-Jiménez, Laura Goracci, Jose M. Paredes, Laura Espinar-Barranco, Javier Valverde-Pozo, Archimede Torretta, Emilio Parisini, Elena Mariotto, Chiara Marchioro, Alejandro Laso, Carmen Marco, Giampietro Viola, Daniela Lanari, Luisa Carlota López Cara. **New Bioisosteric Sulphur-containing Choline Kinase inhibitors with a tracked mode of action.** *European Journal of Medicinal Chemistry*, 246 (2023) 115003. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2022.115003>
- Rafael Salto, Maria D. Giron, Virginia Puente-Muñoz, Jose D. Vilchez, Laura Espinar-Barranco, Javier Valverde-Pozo, Daniele Arosio, and Jose M. Paredes. **New Red-Emitting Chloride-Sensitive Fluorescent Protein with Biological Uses.** *ACS Sensors*, 2021, 6, 2563-2573. <https://doi.org/10.1021/acssensors.1c00094>