



**UNIVERSIDAD
DE GRANADA**

Facultad de Farmacia

Departamento de Fisicoquímica

Programa de Doctorado en Farmacia

**Nuevos colorantes fluorescentes para
la detección de agregados amiloides y
el estudio de su efecto citotóxico**

Tesis Doctoral presentada por

Álvaro Ruiz Arias

Directores:

Dr. Juan Antonio González Vera

Dr. Juan Manuel Cuerva Carvajal

Tutor:

Dr. Ángel Orte Gutiérrez

Granada, Enero 2024

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales
Autor: Álvaro Ruiz Arias
ISBN: 978-84-1195-190-6
URI: <https://hdl.handle.net/10481/89803>

El trabajo presentado en esta Tesis Doctoral ha sido realizado en el grupo de investigación “Fotoquímica y Fotobiología” (FQM-247) de la Universidad de Granada, bajo la supervisión del Dr. Juan Antonio González Vera, el Dr. Ángel Orte Gutiérrez y el Dr. Juan Manuel Cuerva Carvajal. Su consecución ha sido posible gracias al programa de ayudas para la Formación del Profesorado Universitario (Ref. FPU17/02651) del Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades. Además, los gastos experimentales derivados de la misma han sido financiados por los proyectos de investigación CTQ2017-85454-C2-1-P y CTQ2017-85658-R del Ministerio de Economía, Industria y Competitividad.



A mi abuela María Castro Luna, por iluminarme la senda en los momentos de máxima oscuridad y acompañarme siempre.

El fenómeno de la luminiscencia es una representación de la vida misma. Existen personas que emiten luz por sí solas durante largos períodos de tiempo, e iluminan a las que están a su alrededor transfiriéndoles su energía. Existen personas que, al ser iluminadas, son capaces de aceptar esa energía y brillar con gran intensidad. Y existen personas que atenúan la luminiscencia de todo cuanto orbita en torno a ellas, absorbiendo su energía y disipándola para crear tiniebla.

Agradecimientos

Por fin llegó el momento de escribir este apartado. Allá vamos. Me gustaría empezar la sección de agradecimientos de mi Tesis Doctoral dando las gracias a mis directores de tesis y a mi tutor, por haberme dado la oportunidad de embarcarme en el apasionante mundo de la ciencia, en el de verdad, y haber sido fuente de inspiración constante y continua. En este intenso y largo viaje me he dado cuenta de que el conocimiento del mundo que nos rodea es tan vasto, que sería imposible adentrarse en él sin unos buenos capitanes de navío que sepan dirigir con maestría los pasos firmes a seguir. Por ello, y porque me han permitido averiguar el verdadero significado de la expresión “caminar a hombros de gigantes”, les doy las gracias de corazón.

Gracias a Juan Antonio González Vera por haber sido un gran maestro, por haberme transmitido todos sus conocimientos con pasión, por haberme enseñado los entresijos de la investigación de alto nivel, por haberme formado desde el principio para convertirme en científico, pero también gracias por estar ahí siempre en los momentos más difíciles, apoyándome incondicionalmente bajo cualquier circunstancia y siempre dispuesto a escucharme y dar su mejor consejo. Gracias por el constante ánimo y por el énfasis en la transmisión de los valores del esfuerzo, la dedicación y la pasión por la ciencia. Gracias de corazón.

Gracias a Ángel Orte Gutiérrez por ser el precursor de esta gran aventura, por haberme dado la oportunidad de pertenecer a un gran equipo de profesionales que con gran pasión definen diariamente los significados de las palabras ciencia, maestría, profesionalidad, investigación, Universidad, esfuerzo, trabajo y pundonor. Gracias por haberme transmitido el sentido del pensamiento crítico, la pasión por el avance del conocimiento, la paciencia de haberme enseñado tantísimo desde el principio tanto a nivel teórico como práctico, y gracias también por tu infinita comprensión y apoyo en todo momento. Gracias de corazón.

Gracias a Juan Manuel Cuerva Carvajal por todo el apoyo recibido siempre, por haber creído en mí desde el principio, por haberme permitido divulgar todo el conocimiento generado y por haberme dado la oportunidad de realizar este trabajo en las mejores condiciones. Gracias de corazón.

Gracias a Emilio García Fernández por estar siempre siempre ahí, en todo momento, dispuesto a ayudar tanto en el plano profesional como en el personal, con profesionalidad, maestría y saber hacer, pero también con humor, comprensión,

amabilidad y cariño. Gracias por todo el apoyo y ayuda recibidos, por tus acertados consejos y por todos los buenos momentos. Recuerda... ¡sólo una! Gracias de corazón.

Gracias a José Manuel Paredes Martínez por todo el apoyo, la ayuda, el interés, la dedicación y el cariño constantes e incondicionales que siempre siempre me ha demostrado, haciendo de este viaje científico una experiencia realmente agradable y enriquecedora. Gracias por los consejos, por todos los buenos momentos y por haberme enseñado tanto. Gracias de corazón.

Gracias a María José Ruedas Rama por todo cuanto me ha enseñado con paciencia, cariño y dedicación, por haberme dado los mejores consejos para llevar a cabo una docencia excelente, por haberme revelado todos los “secretos”, “intrínquilis” y “tips” para que la labor docente en el laboratorio fuera la mejor posible de todas y por estar siempre siempre dispuesta a ayudarme, apoyarme y a darme su mejor consejo. Muchas gracias por todo. Gracias de corazón.

Gracias a Eva María Talavera Rodríguez por todo el incondicional apoyo, ayuda y cariño recibidos siempre siempre, por todos sus valiosos consejos, por su gran amabilidad, comprensión e interés y por todos los buenos momentos que hemos compartido. Muchas gracias por todo. Gracias de corazón

Gracias a José María Álvarez Pez por su apoyo, amabilidad, cariño, interés y buenos consejos que siempre me ha dado. Por todos los enriquecedores momentos de encuentro, reunión y disfrute, y por supuesto por las deliciosas perdices. Muchas gracias por todo, de corazón.

Gracias a Delia Miguel Álvarez y a Luis Crovetto González por el apoyo, ayuda, interés, cariño, amabilidad y buena disposición que siempre han tenido hacia mí, haciendo mi estancia en el Departamento más amena y agradable. Gracias de corazón.

Gracias a Ángel Pérez Lara por todos sus consejos, su ayuda, su apoyo, por su amabilidad y cariño, y por los “debates amiloides” que me han enriquecido y me han ayudado a tener una visión más amplia del tema. Gracias de corazón.

Gracias a María Eugenia García Rubiño por todo el apoyo y ayuda recibidos, por su cariño y simpatía, por su optimismo y espíritu de superación, que sin duda me han servido de inspiración. Gracias de corazón.

Gracias a María Isabel Martínez Puentedura, a Teresa del Castillo Santaella y a Oscar Hernando Laguna Espitia por su amabilidad, simpatía y compañerismo que siempre han mostrado hacia mí. Muchas gracias de corazón.

Gracias a Indalecio Gijón Benítez y a Ester Muñoz Villegas por su simpatía, por su amabilidad y por estar siempre dispuestos a ayudar en todo, facilitando el trabajo y haciéndolo siempre más agradable. Gracias de corazón.

Gracias a Francisco Fueyo González por toda la ayuda recibida.

Ahora llega el turno de agradecer a los becarios, que más que compañeros, se han convertido ciertamente en buenos amigos, y que han jugado un papel clave y fundamental en hacer de mi estancia en el Departamento y a lo largo de todo el Doctorado una experiencia única, inolvidable y enriquecedora a partes iguales. Por su apoyo, comprensión, empatía, ayuda, cariño y afecto, ¡¡un millón de gracias a tod@s!!

Gracias a Laura por todo el apoyo, ánimo, comprensión y ayuda que siempre siempre me ha dado, por nuestras confidencias y largas conversaciones constructivas, por su empatía, por todos todos los buenos momentos (que no han sido pocos) y, en definitiva, por ser una buena amiga, ¡muchas gracias de corazón!

Gracias a Javier por todo el apoyo y ayuda recibidos, por nuestras largas e interesantes tertulias durante los desayunos y comidas, por todos los buenos momentos vividos, por su cariño, empatía y buena disposición siempre, por ser un buen amigo, por todo eso y mucho más, ¡muchas gracias de corazón!

Gracias a Carmen González por toda la ayuda recibida a lo largo de estos años, por sus buenos consejos para realizar un buen trabajo siempre, por el apoyo, los buenos momentos y todo lo que hemos compartido juntos, por ser una buena amiga, ¡muchas gracias de corazón!

Gracias a Carmen Salto por todo, todo cuanto ha hecho por mí. Por escucharme siempre, por aconsejarme en todo, por su apoyo, por su ayuda, por su simpatía, gracias de corazón. Gracias por haber sido una buena compañera, por alegrar los días más tristes y por su gran optimismo bajo cualquier circunstancia. Gracias por todos los buenos momentos y por ser una gran amiga. ¡Muchas gracias!

Gracias a Fernando, a Antonio, a Esther y a Irene por todo cuanto han hecho por mí. Por ser buenos amigos, por los buenos momentos que hemos pasado, por su comprensión, empatía y cariño. Por haber estado ahí también en los momentos más difíciles dispuestos a ayudarme con todo siempre y por ser únicos y auténticos, ¡muchísimas gracias de corazón!

Gracias a Giulia, Anabel, Marina, Patricia y Darío por su simpatía, por todo cuanto hemos compartido, por los buenos momentos y por el apoyo recibido, ¡muchas gracias de corazón!

Por otra parte, agradecer a Belén, a Soraya, a Claudia y a Estrella por todos los buenos momentos vividos, todas nuestras conversaciones y por supuesto, todo el apoyo y cariño incondicionales recibidos, ¡muchísimas gracias de corazón!

Gracias a mis amigos de toda la vida, a los del pueblo. Por haberme apoyado en esta aventura de esa forma tan increíble, por haber estado siempre siempre ahí bajo cualquier circunstancia, por haberme levantado el ánimo en los momentos más difíciles, por ser los mejores amigos del mundo... Gracias a Chema, Felipe, Angie, Sergio, Juan, Pablo, Jorge, Luis, Alejandro, Joseda, Carlitos, Sebas, Lorena, Torcuato, Henar, Angelillo, Bodegas, Cintia, Anita Greca, las Natalias, Sarita y Laura. ¡Muchísimas gracias por todo de corazón!

Gracias a Lydia Valentina por haberme acompañado en esta aventura siempre, por haberme escuchado y apoyado tanto, por haberme animado en los peores momentos, por ser una excelente amiga íntima de las que siempre estarán ahí, por su empatía, por su comprensión, por su paciencia, por absolutamente todo cuanto ha hecho por mí... ¡Muchísimas gracias de corazón!

Gracias a mis amigos Andrés, Luismi, José y Xavi por todo su apoyo, por estar ahí siempre, por quererme así, por demostrármelo cada día, por todo, chicos... ¡Un millón de gracias!

Gracias a mi hermana postiza más allá del Atlántico, Andrea, por su apoyo, amor y comprensión, y por haber estado ahí siempre que lo he necesitado. ¡Muchas gracias de corazón!

Por último, pero no por ello menos importante, queda agradecer a mi familia por todo el apoyo que he recibido durante esta etapa, y que ha sido fundamental para mí. En primer lugar, agradecer a mis padres Ángel y Juani por todo cuanto han hecho por mí, que no ha sido poco. Gracias por su maestría, por su consejo, por la educación recibida, por hacerme libre, por hacerme feliz, por estar ahí siempre, por ser mi inspiración, por motivarme cada día, por el apoyo, cariño y amor que me habéis regalado siempre, por todo eso y mucho más... ¡Muchísimas gracias! Gracias a mis hermanas Ángela y Paula, por haber sido siempre, y en esta etapa más aún, pilares fundamentales que incansablemente me han ayudado, apoyado, querido, mimado y motivado. Gracias a Lili

y a Jaime por vuestro apoyo, por vuestro cariño, por vuestro amor y por pintar de colores nuestro mundo. ¡Muchísimas gracias!

Gracias a mis titos José María y Soledad, por todo el apoyo, cariño, afecto, motivación y amor que me han dado durante toda mi vida y especialmente en esta etapa. Gracias por sus consejos, por su orientación y por estar ahí. Gracias a mis primas Isabel y Elena, por su apoyo, cariño, amor y afecto. Por nuestras conversaciones y confianzas y por todo lo que han hecho por mí. ¡Muchísimas gracias de corazón!

Y gracias a los que ya no están por acompañarme siempre en el corazón: a mi tito Antonio, a mi abuela Mercedes y a la Tata María. Gracias.

Abreviaturas y símbolos

α Syn: α -sinucleína

λ_{em} : longitud de onda de emisión

λ_{ex} : longitud de onda de excitación

τ_D : tiempo de vida del fluoróforo dador

τ_F : tiempo de vida de fluorescencia

τ_L : tiempo de vida de luminiscencia

Φ : rendimiento cuántico

A β : péptido β -amiloide

APO: apoferritina

CPL: luminiscencia polarizada circularmente

DLS: dispersión dinámica de la luz

DMEM: medio de Eagle modificado de Dulbecco

DO3A: ácido 1,4,7,10 tetraciclodeceno-1,4,7-triacético

DOTA: ácido 2,2',2'',2'''-(1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10-tetraail) tetraacético

DTPA: ácido dietilentriaminopentaacético

Dy³⁺: disprosio

EA: enfermedad de Alzhéimer

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético

EH: enfermedad de Huntington

EP: enfermedad de Parkinson

Er³⁺: erbio

Eu³⁺: europio

FCS: espectroscopía de correlación de fluorescencia

FL: fotoluminiscencia

FLIM: microscopía de imágenes de tiempos de vida de fluorescencia

FRET: transferencia de energía de resonancia de Förster

FTIR: espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier

FWHM: ancho completo a la mitad del máximo

ICT: transferencia de carga intramolecular

IRF: función de respuesta del instrumento

ISC: cruce entre sistemas

LCR: líquido cefalorraquídeo

Ln^{3+} : cationes de lantánidos trivalentes

MF: técnicas de imagen de microscopía de fluorescencia

Nd^{3+} : neodimio

NIR: región espectral del infrarrojo cercano

PCD: enfermedades conformacionales proteicas

PIE-FLIM: microscopía de imágenes de tiempos de vida de fluorescencia con excitación intercalada pulsada

PLIM: microscopía de imágenes de tiempos de vida de fosforescencia/luminiscencia

PPA: proteína transmembrana precursora amiloidea

QD: punto cuántico (*quantum dot*)

RC: rojo congo

ROS: especies reactivas de oxígeno

S_0 : estado fundamental singlete

S_1 : primer estado excitado singlete

S_2 : segundo estado excitado singlete

SAP: componente sérico P amiloide

SIM: microscopía de iluminación estructurada

Sm^{3+} : samario

SMFM: microscopía de fluorescencia de moléculas individuales

SPT: recuento de fotones individuales correlacionado con el tiempo

STED: microscopía de depleción de emisión estimulada

STORM: microscopía de reconstrucción óptica estocástica

T₁: estado excitado triplete

Tb³⁺: terbio

TCCD: detección por coincidencia de dos colores

TCLM: estados de transferencia de carga ligando-metal

TE: transferencia de energía fotoexcitada

TEM: microscopía electrónica de transmisión

TG: análisis con ventana temporal

TGLM: microscopía de luminiscencia con ventana temporal

ThT: Tioflavina T

TIRF: microscopía de reflexión interna total de fluorescencia

UV: ultravioleta

vis: visible

Yb³⁺: iterbio

YFP: proteína fluorescente amarilla

Resumen

Esta tesis doctoral se ha realizado en el Departamento de Fisicoquímica de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Granada, en el marco de los proyectos “*Synthesis and applications of homochiral photoactive organic systems*” (CTQ2017-85454-C2-1-P) y “*TG-DiAG: Nuevas estrategias de diagnóstico basadas en fluorescencia con ventana temporal*” (CTQ2017-85658-R), y se planteó con el objetivo general de estudiar los procesos de agregación amiloide implicados en el desarrollo de las enfermedades neurodegenerativas y su citotoxicidad, mediante el uso de nuevos colorantes fluorescentes y técnicas avanzadas de espectroscopía y microscopía de fluorescencia. Para la lograr este objetivo se han realizado varios estudios centrados tanto en los procesos de amiloidogénesis de la proteína apoferritina (APO) como del péptido β -amiloide (A β). Así, se ha realizado un cribado de fluoróforos derivados de quinolimida que pueden actuar como posibles indicadores de la agregación proteica de la APO, comprobándose que el compuesto 9-azetidil-quinolimida (**AQui**) era el mejor candidato entre todos los estudiados como sensor de agregación. Para incrementar la sensibilidad de la detección del proceso de agregación de la APO se seleccionó un par adecuado de fluoróforos consistente en el fluoróforo dador **AQui** y el fluoróforo aceptor Nile Blue A (**NBA**) que, mediante la microscopía FLIM multiparamétrica y el análisis de la transferencia de energía de resonancia de Förster (FRET) originada entre ellos, permitieron investigar dicho proceso de agregación eficazmente. Paralelamente, se ha estudiado la interacción y el efecto citotóxico de agregados de A β con la membrana celular mediante microscopía PIE-FLIM, demostrándose que existen dos tipos de poblaciones de agregados con diferente toxicidad celular. Asimismo, se ha evaluado el estrés celular generado por los agregados de A β en células neuronales con una sonda de biotioles (GG-DNBS) mediante microscopía FLIM multiparamétrica, concluyéndose que los agregados formados a 0.5 h de incubación eran los que más niveles de biotioles generan y, por tanto, los que provocan un mayor estrés en las células neuronales. Por otra parte, se han caracterizado dos nuevos colorantes luminiscentes derivados de la quinolin-2(1*H*)-ona portadores de grupos carboxilato o fosfonato (**CAnt** y **PAnt**), y se han evaluado como antenas de lantánidos biocompatibles capaces de autoensamblarse directamente en disolución acuosa *in vitro* e *in cellulo*. Mientras **CAnt** se coordina con el catión Tb³⁺, **PAnt** es capaz de coordinarse con los cationes Eu³⁺ y Tb³⁺. Mediante el empleo de los complejos formados por **PAnt** y los lantánidos Eu³⁺ y Tb³⁺ se ha conseguido obtener la emisión de luz blanca en disoluciones acuosas y en geles de agarosa. Además, se han utilizado como sondas intracelulares para bioimagen mediante microscopía PLIM, así como para la obtención de luz blanca *in cellulo*.

Índice de contenidos

1. BLOQUE I	1
1.1. Introducción	3
1.1.1. Fotofísica de los iones lantánidos.....	3
1.1.2. Diferentes tipos de complejos de lantánidos.....	12
1.1.3. Complejos de lantánidos autoensamblables.....	19
1.1.4. Complejos de lantánidos luminiscentes autoensamblables en disolventes orgánicos.....	23
1.1.5. Complejos de lantánidos luminiscentes autoensamblables en disolución acuosa.....	29
1.1.6. Referencias.....	35
1.2. Objetivos	45
1.2.1. Objetivo general.....	45
1.2.2. Objetivos específicos.....	45
1.3. Resultados	47
1.3.1. Propiedades fotofísicas de CAnt y PAnt	48
1.3.2. Complejos de lantánidos autoensamblables basados en CAnt y PAnt	50
1.3.3. Emisión de luz blanca en disoluciones acuosas y geles.....	65
1.3.4. Microscopía PLIM <i>in cellulo</i> utilizando los complejos luminiscentes de PAnt con Tb ³⁺ y Eu ³⁺	70
1.3.5. Referencias.....	80
1.4. Conclusiones	83
2. BLOQUE II	84
2.1. Introducción	86
2.1.1. Enfermedades neurodegenerativas amiloides.....	86
2.1.2. Proteínas amiloides y agregación amiloidogénica.....	88
2.1.3. Agregación del péptido A β	93

2.1.4.	Agregación de la apoferritina.....	97
2.1.5.	Sondas luminiscentes y metodologías para el estudio de la agregación amiloide.....	98
2.1.5.1.	Fluoróforos utilizados para el estudio de la agregación amiloide.....	100
2.1.5.2.	Espectroscopía de fluorescencia y otras técnicas para el estudio de la agregación amiloide.....	108
2.1.5.3.	Técnicas de imagen de microscopía de fluorescencia.....	113
2.1.6.	Referencias.....	126
2.2.	Objetivos.....	138
2.2.1.	Objetivo general.....	138
2.2.2.	Objetivos específicos.....	138
2.3.	Resultados.....	140
2.3.1.	Cribado de compuestos fluorescentes de quinolimida como indicadores de agregación proteica.....	140
2.3.2.	Ensayo con AQui para el estudio de la agregación de APO.....	143
2.3.3.	Ensayo de pares FRET para el estudio de agregación de la APO.....	147
2.3.4.	Estudio de agregación de la APO con el par FRET de fluoróforos AQui/NBA	156
2.3.5.	Estudio de la interacción de agregados de A β con la membrana celular.....	163
2.3.6.	Estudio del estrés celular causado por agregados de A β utilizando una sonda de biotioles.....	173
2.3.7.	Referencias.....	187
2.4.	Conclusiones.....	191
3.	Materiales y métodos.....	194
3.1.	Referencias.....	205

4. Publicaciones.....	207
------------------------------	------------

BLOQUE I. Nuevos colorantes luminiscentes y su aplicación como antenas de lantánidos

1.1. Introducción

1.1. Introducción de los nuevos colorantes luminiscentes y su aplicación como antenas de lantánidos

1.1.1. Fotofísica de los iones lantánidos

El uso de la fluorescencia en multitud de disciplinas científicas como la biología, la química, la fisicoquímica, la bioquímica, la farmacia o la medicina ha experimentado un notable crecimiento en las últimas décadas.¹⁻³ Actualmente, la espectroscopía de fluorescencia y la fluorescencia resuelta en el tiempo son consideradas herramientas fundamentales para el fructífero avance de estas áreas, habiéndose ampliado considerablemente sus aplicaciones en biotecnología, citometría de flujo, diagnóstico médico, secuenciación de ADN, medicina forense o análisis genético, entre otras.^{1, 4-7} Estas técnicas ofrecen una combinación única de sensibilidad y resolución, permitiendo sustituir el uso de isótopos radiactivos, empleados en un gran número de determinaciones bioquímicas. Asimismo, las técnicas fluorescentes empleadas para la obtención de imágenes celulares y moleculares se utilizan cada vez más, permitiendo realizar medidas de moléculas intracelulares y revelar su localización, a veces a nivel de detección de una sola molécula.⁸ Las sondas más comunes para la obtención de imágenes de fotoluminiscencia (FL) son los fluoróforos, que generalmente emiten desde el estado excitado singlete con tiempos de vida cortos (0.1-10 ns) y pequeños desplazamientos de Stokes (<100 nm), y que pueden provocar una fuerte interferencia de su emisión con la autofluorescencia de fluoróforos endógenos.¹ Por el contrario, los complejos luminiscentes de metales de transición y de lantánidos, cuya emisión está mediada por estados triplete, presentan tiempos de vida más largos (hasta ms) y mayores desplazamientos de Stokes (>100 nm) que facilitan una separación eficiente entre sus señales y la fluorescencia de fondo.^{9, 10} Así, el empleo de los cationes de lantánidos trivalentes (Ln^{3+}) como sondas luminiscentes es cada vez más utilizado, ya que permite mejorar la relación señal-ruido en los experimentos en los que se utilizan.¹¹ Esta mejora de la relación señal-ruido es especialmente importante para medir la intensidad de emisión de los luminóforos de interés, que es un parámetro cuya aplicación puede limitar llevar a cabo medidas cuantitativas debido a la desigual distribución espacial de la sonda y a las variaciones en las propiedades de absorción

1.1. Introducción

del medio.¹⁰ Por otro lado, la aplicación de las técnicas basadas en el tiempo de vida de luminiscencia (τ_L) permiten utilizar este parámetro para investigar cambios de otros parámetros del microentorno biológicamente relevantes como el pH, los niveles de oxígeno o la concentración de ciertos iones.^{10, 12, 13} El τ_L es un parámetro que depende básicamente del tiempo promedio que permanece la molécula en su estado excitado antes de emitir un fotón. Para destacar la importancia de la FL de los Ln^{3+} , primero es necesario definir que son los términos de luminiscencia, fluorescencia y fosforescencia, comentando también de forma general las diferentes técnicas de imagen existentes para estudiar dicha FL.

De esta forma, según la definición de la IUPAC, se entiende por **luminiscencia** a la "emisión espontánea de radiación de una especie electrónicamente excitada (o de una especie vibracionalmente excitada) que no está en equilibrio térmico con su entorno".¹⁴ Generalmente, la emisión de luz se debe al movimiento de electrones entre distintos niveles de energía dentro de un átomo tras su excitación por factores externos.¹ Con respecto al fenómeno de **fluorescencia**, se entiende como un tipo particular de luminiscencia que caracteriza a las sustancias que son capaces de absorber energía en forma de radiación electromagnética, y que después emiten parte de esa energía también como radiación electromagnética, pero de una longitud de onda diferente.¹⁵ La energía total absorbida es siempre mayor que la energía total emitida en forma de luz, y la diferencia entre ambas se disipa en forma de calor. Generalmente la longitud de onda emitida es mayor –lo que supone que es de menor energía- que la absorbida.^{1, 16} No obstante, es posible que un electrón absorba dos fotones si la radiación de excitación es lo suficientemente intensa, de forma que en esta absorción bifotónica la longitud de onda emitida es menor que la absorbida.¹⁵ El proceso de fluorescencia (Figura I.1) comprende tres pasos secuenciales: absorción, relajación vibracional y emisión.¹ En la Figura I.1 se muestra el paso del estado excitado singlete S_2 al estado excitado singlete S_1 . En el estado singlete todos los espines de todos los electrones de un átomo o molécula se encuentran apareados. El ciclo completo es muy breve, considerándose prácticamente instantáneo ya que transcurre en tiempos del orden de los nanosegundos.¹⁵ Por otro lado, la **fosforescencia** es la emisión de luz a partir de estados excitados tripletes (T_1), en los que el electrón del orbital excitado tiene la misma orientación de espín que el electrón del estado fundamental. Las transiciones al estado fundamental están prohibidas y la velocidad de emisión es lenta (10^3 a 10^0 s⁻¹), por lo que la fosforescencia suele durar entre milisegundos y segundos o incluso más.^{1, 16} Tras la exposición a la luz, las sustancias fosforescentes brillan durante varios minutos mientras sus estados excitados vuelven lentamente al estado básico. Por otra parte, la

1.1. Introducción

fosforescencia no suele observarse en soluciones fluidas a temperatura ambiente. Esto se debe a que existen muchos procesos de desactivación que compiten con la emisión, como la desactivación no radiativa y otros procesos de quenching o apagamiento.¹⁷ Es importante señalar que la diferencia entre fluorescencia y fosforescencia no siempre está clara. Por ejemplo, los complejos de coordinación metal-ligando que contienen un metal y uno o más ligandos orgánicos presentan estados mixtos singlete-triplete. Estos complejos presentan τ_L intermedios de cientos de nanosegundos a varios microsegundos. En estos casos es más conveniente entonces hablar de luminiscencia.¹

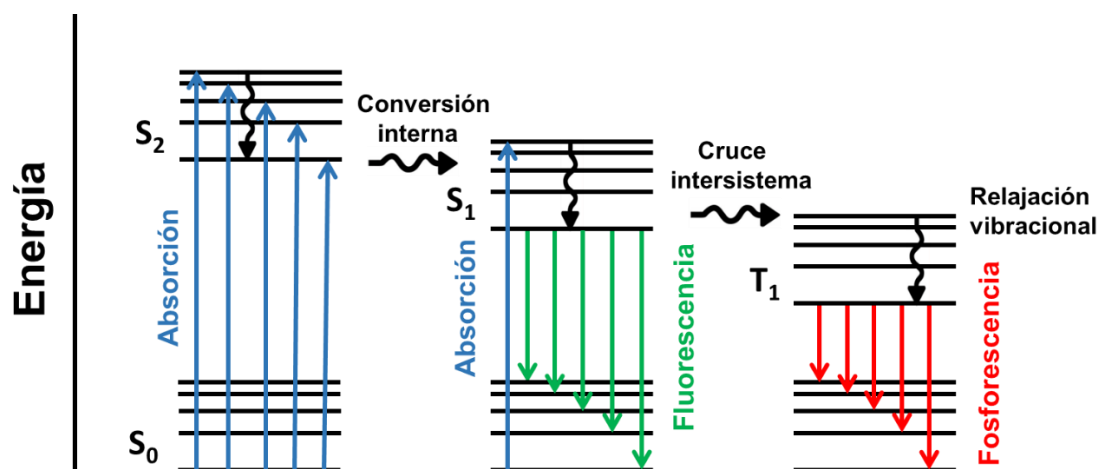


Figura I.1. Diagrama simplificado de Jablonski en el que se muestran los procesos de fluorescencia y fosforescencia.

Las técnicas de imagen existentes para estudiar la FL de los Ln^{3+} basadas en el τ_L son conocidas como microscopía FLIM (por sus siglas en inglés *Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy*) y microscopía PLIM (por sus siglas en inglés *Phosphorescence Lifetime Imaging Microscopy*), y deben considerarse como técnicas de "imagen funcional", en contraposición a las diversas formas de imagen de "localización", ya que no sólo proporcionan información sobre el patrón de distribución de la sonda en la muestra, sino que también determinan su "estado" mediante el informe del τ_L .¹⁰ Si bien la microscopía FLIM es una metodología cada vez más establecida, la microscopía PLIM se considera un área emergente, que se comentará con mayor profundidad más adelante. En cuanto a los lantánidos, estos son conocidos por sus propiedades fotofísicas intrínsecas únicas, las cuales los hacen muy atractivos para una amplia variedad de aplicaciones, como la fabricación de dispositivos de alta tecnología,^{18, 19} la generación de luz blanca a partir de nuevos materiales luminiscentes²⁰ o su uso en

1.1. Introducción

química biológica, análisis médicos u obtención de imágenes de células y tejidos vivos.^{11, 21-30} Sin embargo, el uso comercial (no académico) de la FL de los Ln^{3+} se ha restringido principalmente al campo de los materiales y los dispositivos optoelectrónicos, mientras que su aplicación en biología y medicina sigue siendo limitada debido a su complejo comportamiento químico y fotofísico en disolución, especialmente en agua, lo que dificulta la mejora de sus propiedades fotofísicas. Estos elementos se encuentran, cuando están en disolución, en su estado trivalente (Ln^{3+}) la gran mayoría de las veces debido al bajo potencial de oxidación que presentan. Aunque los números de coordinación de los Ln^{3+} más comunes son 8 y 9, estos varían desde 3 hasta 12 dependiendo del volumen estérico de los ligandos.³¹ Los Ln^{3+} tienen una configuración electrónica característica debido a sus transiciones f-f, las cuales están prohibidas según la regla de selección de paridad de Laporte, ya que los orbitales 4f están apantallados por los orbitales completos $5s^2$, $5p^6$ y $6s^2$.^{11, 23, 32} Este apantallamiento de los electrones 4f provoca que interactúen de forma limitada con el entorno. Por lo tanto, los Ln^{3+} presentan bajos coeficientes de absorción molar y largos τ_L . La baja absorción de los lantánidos hace que la emisión luminiscente a través de la excitación directa del ion metálico sea un proceso muy poco eficiente, que sólo se consigue a través de rayos láser muy potentes.²³ Por este motivo, es necesario utilizar una vía de excitación indirecta. Una de las estrategias más conocidas para lograrlo, consiste en el uso de ligandos orgánicos con un alto coeficiente de absorción molar capaces de sensibilizar la FL de los Ln^{3+} mediante la transferencia de energía fotoexcitada (TE), lo que se conoce como "efecto antena" (Figura I.2).

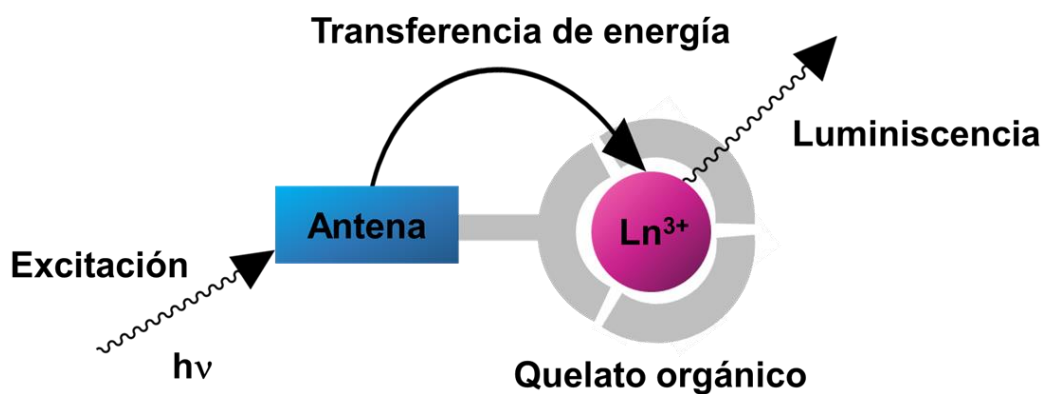


Figura I.2. Esquema del "efecto antena" que representa la sensibilización de la FL de un ion Ln^{3+} mediante la transferencia energética producida desde un ligando orgánico conocido como antena tras su excitación.

Tras la excitación fotónica, los electrones de la antena se excitan desde el estado fundamental singlete S_0 , alcanzando el primer estado excitado singlete S_1 por absorción

1.1. Introducción

de fotones. A continuación, para conseguir que la antena se mantenga durante el mayor tiempo posible en un estado electrónico excitado (es decir, de τ_L largo), maximizándose así la probabilidad de TE entre la antena y el Ln^{3+} , el electrón puede ser impulsado al estado triplete T_1 mediante el cruce entre sistemas (ISC, por su terminología en inglés *intersystem crossing*) (Figura I.3), ya que su transición cuánticamente prohibida hacia el estado fundamental es cinéticamente lenta. Para que este proceso sea eficiente, el salto energético entre el estado S_1 y el estado T_1 de la antena debe ser de unos 5000 cm^{-1} .^{23, 33} Desde el estado T_1 la energía puede ser transferida a uno de los orbitales luminiscentes 4f del Ln^{3+} a través de diferentes mecanismos, entre los que destacan los procesos de transferencia de energía de *Förster* y *Dexter*.^{23, 34-36} La transferencia de energía de *Förster* es un mecanismo a través del espacio basado en una interacción coulombica entre los cambios multipolares asociados con la transición del estado excitado al estado basal en el dador de energía, y la transición del estado basal al estado excitado en el aceptor de energía. Así, como componente principal de esta transferencia se considera generalmente a la interacción dipolo-dipolo.³⁶ Debido a la dependencia lineal del campo eléctrico asociado con los momentos dipolares de transición del dador y del aceptor, esta TE depende de la distancia. Su eficacia depende del solapamiento integrado entre el espectro de emisión normalizado del dador y el espectro de absorción del aceptor.³⁷ En cambio, el mecanismo *Dexter* es un mecanismo de intercambio doble de electrones por el que se transfiere un electrón en cada dirección entre los componentes dadores y aceptores de energía.³⁸ Esto requiere un acoplamiento electrónico a través de enlace, exactamente igual que para la transferencia de un solo electrón, y por lo tanto se ve facilitado por un buen solapamiento orbital en los sistemas conjugados. Como consecuencia de esto se permite la TE en situaciones en las que el mecanismo de *Förster* no puede funcionar debido a las reglas de selección de espín.³⁸ Convencionalmente, se ha establecido que la diferencia de energía entre el estado T_1 de la antena y el estado luminiscente más bajo del Ln^{3+} debe ser superior a 1500 cm^{-1} , estando el estado T_1 de la antena aproximadamente 2500 cm^{-1} por encima del nivel de emisión del Ln^{3+} .^{34, 39-42} Así pues, se sabe que este factor evita la transferencia de energía de retorno del Ln^{3+} al ligando, aumentando el rendimiento cuántico.⁴³ El proceso de sensibilización de la luminiscencia de los lantánidos Tb^{3+} y Eu^{3+} a través de una antena se resume en la Figura I.3, donde también se muestra el quenching por osciladores vibracionales, el cual se explicará más adelante en esta Introducción del Bloque I.

1.1. Introducción

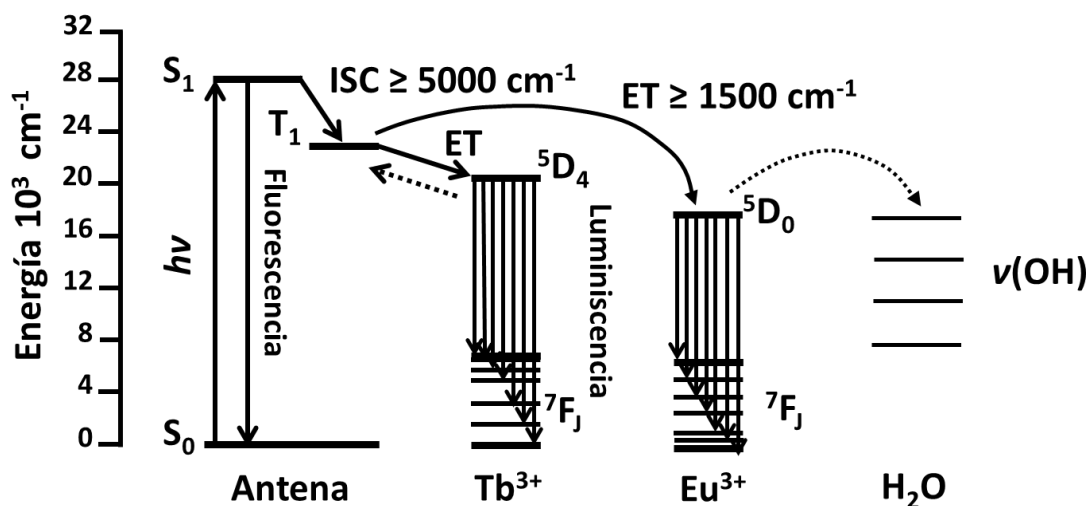


Figura I.3. Diagrama simplificado de Jablonski en el que se muestra el flujo de energía en el proceso de sensibilización del Tb^{3+} y del Eu^{3+} por una antena y el proceso de desactivación no radiativa del Ln^{3+} por acoplamiento con los estados vibracionales del entorno (acuoso). Reproducido de la Tesis Doctoral del Dr. Francisco José Fueyo González.

Por otro lado, en algunos casos el salto energético entre los niveles anteriormente mencionados puede no ser lo suficientemente alto, pero aun así producirse la sensibilización. En estos casos puede haber otros mecanismos que conduzcan a la sensibilización de la FL del Ln^{3+} , pudiendo producirse una TE desde el estado singlete excitado, S_1 , como estado dador hacia el nivel emisor del Ln^{3+} .^{33, 44, 45} Igualmente, la antena puede aumentar la intensidad de la luminiscencia del Ln^{3+} hasta un factor de 10^6 , teniendo en cuenta que los cromóforos orgánicos suelen tener absorancias en el rango 10^3 - 10^6 $M^{-1} cm^{-1}$, en comparación con las absorancias de los Ln^{3+} , del orden de 1 - 10 $M^{-1} cm^{-1}$.^{11, 46} Por último, la desactivación del sistema puede producirse por la emisión de luz cuando el Ln^{3+} pasa a uno de los estados fundamentales 4f (Figura I.4). Las particulares transiciones f-f responsables de la emisión de los Ln^{3+} dan lugar a una serie de propiedades únicas en sus espectros de FL. De este modo presentan bandas de emisión específicas de cada ion, con picos muy finos, nítidos y lineales, lo que hace que sea fácil discriminarlas de las bandas de emisión anchas de los clásicos fluoróforos orgánicos. Además, esto hace que las emisiones de los lantánidos sean multiplexables, lo que permite hacer un seguimiento de varias señales luminiscentes simultáneamente.¹¹ Sin embargo, sus intensidades y forma pueden variar en función de la matriz en la que se encuentren o de la geometría del campo ligando circundante, a diferencia de sus posiciones espectrales, que son independientes.³²

1.1. Introducción

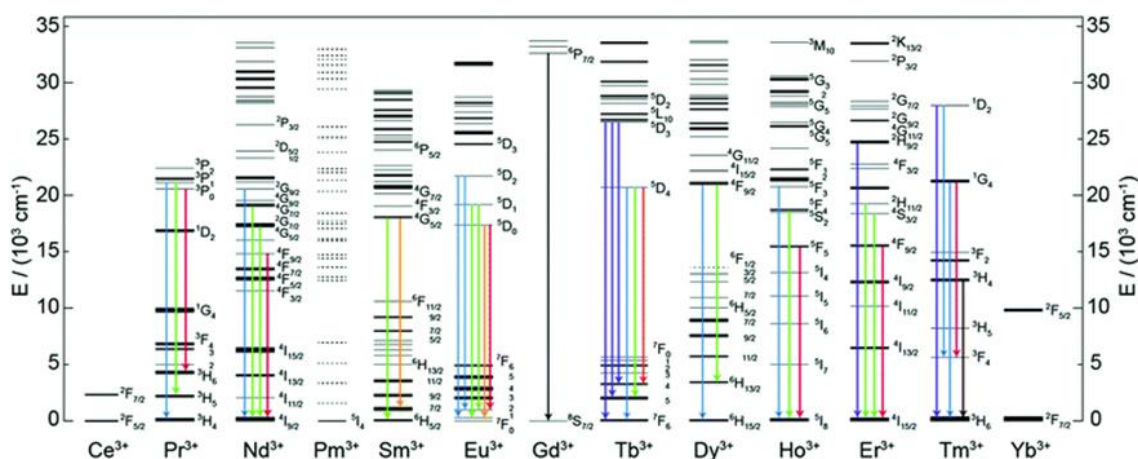


Figura I.4. Diagrama de los niveles parciales de energía de los iones Ln^{3+} y las transiciones radiativas correspondientes a las emisiones típicas. Reproducido de la referencia ⁴⁷ con permiso de la Royal Society of Chemistry.

Como ya se ha comentado, la regla de selección de paridad de Laporte implica que las transiciones $4f-4f$ están prohibidas. Sin embargo, cuando el Ln^{3+} sufre la influencia de un campo ligando (entorno de coordinación como un cristal o un ligando orgánico), se genera un campo eléctrico que relaja un poco la regla de selección, y las transiciones pasan a estar parcialmente permitidas.³² Así, estas transiciones se denominan transiciones eléctricas dipolares inducidas. Las contribuciones a su intensidad provienen de varias fuentes, pero las principales son los estados de transferencia de carga ligando-metal (TCLM), la mezcla de la configuración $4f^n$ con la configuración $4f^{n-1}5d^1$ de paridad opuesta, y/o los niveles vibracionales.³² Por otra parte, en función del rango espectral de emisión, pueden distinguirse dos grupos de Ln^{3+} : los que emiten en la región espectral visible y/o infrarroja cercana con bajo rendimiento de emisión de PL y los que emiten en el rango espectral visible con alto rendimiento de emisión de PL. Los ejemplos más comunes de estos últimos son el europio (Eu^{3+} , con emisión roja) y el terbio (Tb^{3+} , con emisión verde), ya que la brecha energética entre el estado luminiscente más bajo y el estado no luminiscente más alto en estos metales es mayor que en los otros Ln^{3+} , y este hecho determina la región de emisión y promueve altos rendimientos de PL. Estos Ln^{3+} son también los más utilizados para estudios biológicos.^{48, 49} Como se muestra en la Figura I.4, en el caso del Eu^{3+} y del Tb^{3+} , los orbitales luminiscentes $4f$ implicados son los 5D_j , que pasan a uno de los estados fundamentales $4f$ 7F_j al desactivarse el sistema por emisión de luz.

Por otro lado, como consecuencia del apantallamiento de los orbitales $4f$, estos Ln^{3+} presentan τ_L excepcionalmente largos, del orden de ms, en contraste con los bajos tiempos de vida de los clásicos fluoróforos orgánicos (del orden de ns), lo que los hace

1.1. Introducción

especialmente atractivos para desarrollar aplicaciones tanto biológicas como tecnológicas.^{11, 50-52} Estas interesantes propiedades fotofísicas hacen que se esté investigando, tanto en ciencia básica como en el ámbito comercial, una amplia variedad de compuestos capaces de sensibilizar la luminiscencia de iones Ln^{3+} , tales como la azaxantona, la azatiaxantona, la acridona, la fenantridina, el tetraazatrifenileno, la terpiridina (ATBTA), las 1,2-benzopironas (cumarinas) o la tetraciclina, que se analizarán en detalle más adelante.^{23, 34, 35, 51, 53, 54} Debido a la dificultad de las transiciones entre orbitales 4f, existen varios mecanismos de desactivación no radiativa que pueden competir con la emisión PL de los Ln^{3+} , como el quenching del estado triplete T_1 de la antena por el oxígeno disuelto en el medio o la desactivación no radiativa del Ln^{3+} por acoplamiento con los estados vibracionales de los osciladores de alta frecuencia. Este origen principal de la desactivación no radiativa tanto para el ligando como para los estados excitados del Ln^{3+} es de especial importancia en la disminución del τ_L del estado excitado del Ln^{3+} , donde el mayor efecto es originado por el ligando y los grupos osciladores X-H de las moléculas del disolvente o del medio circundante ($\text{N-H} > \text{O-H} \gg \text{C-H}$).^{11, 23, 54-60} Para que se produzca este acoplamiento, el salto energético entre el estado excitado y el estado basal del Ln^{3+} debe ser del mismo orden que la energía del conjunto de estados vibracionales de los grupos que actúan como quenchers.⁶¹ El Tb^{3+} es el Ln^{3+} menos sensible a este tipo de quenching debido a que su brecha energética es la mayor. Este mecanismo de desactivación no radiativo es especialmente importante cuando se utilizan complejos basados en Ln^{3+} en medios acuosos. Para evitar este tipo de quenching, es conveniente que la esfera de coordinación del Ln^{3+} esté completamente ocupada por el ligando.⁶² Como regla general, el τ_L varía linealmente con el número de moléculas de agua de coordinación. En este sentido, el parámetro q permite predecir y cuantificar el número de moléculas de agua en la primera esfera de coordinación, utilizando los τ_L en agua y en deuterio, y siguiendo la ecuación $q = A*(1/\tau_{\text{H}_2\text{O}} - 1/\tau_{\text{D}_2\text{O}} - B)$, donde A (constante de proporcionalidad, en moléculas de agua*ms) y B son parámetros intrínsecos del Ln^{3+} .^{46, 63, 64} Por ejemplo, para complejos de Eu^{3+} en disoluciones acuosas existe la ecuación simplificada $q = 1.11(1/\tau_{\text{H}_2\text{O}} - 1/\tau_{\text{D}_2\text{O}} - 0.31)$ según las ecuaciones de Horrock.⁶⁵ Sin embargo, otros autores informan de otros valores para A (1.2 moléculas de agua*ms).⁶⁵⁻⁷⁰

Como ya se ha comentado, tanto el Eu^{3+} como el Tb^{3+} presentan estados excitados con largos τ_L , en el rango de los milisegundos. Este hecho permite medir su emisión después de un corto retardo (normalmente decenas de microsegundos) tras el pulso de excitación de una fuente de luz pulsada, evitando así las interferencias de la

1.1. Introducción

fluorescencia de fondo y la dispersión de la luz, y por tanto, mejorando enormemente la relación señal-ruido y la sensibilidad de la detección (Figura I.5).^{9, 25, 51, 71-73}

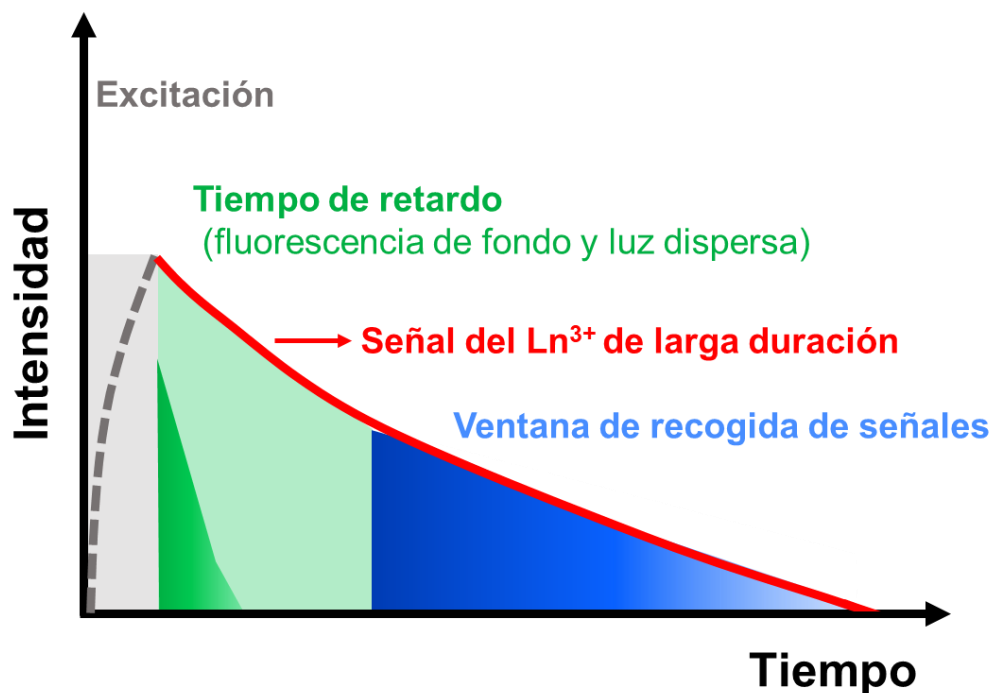


Figura I.5. Detección de la PL de los Ln³⁺ mediante ventana temporal.

De esta forma, el uso del *análisis con ventana temporal* (TG, por su terminología en inglés *time-gate*) y la implementación de la medida de los τ_L en el campo de la bioimagen ha dado lugar a la técnica de microscopía PLIM. El enfoque más establecido para la integración de la microscopía PLIM es el uso de técnicas de escaneo confocal junto con el recuento de fotones individuales correlacionado con el tiempo (SPT, por su terminología en inglés *Single Photon Timing*) o el uso de detectores rápidos.^{9, 10, 46} Mediante la técnica PLIM, se adquiere una imagen escaneando la muestra píxel a píxel, de forma que para cada píxel se recoge el decaimiento completo, obteniendo así un mapa con todos los τ_L , pudiendo filtrar temporalmente los τ_L largos. Durante el tiempo de permanencia del píxel, las moléculas fosforescentes primero se excitan por un láser pulsado de alta frecuencia. A continuación, el láser se apaga y en ese momento se recogen los fotones de la PL y se obtienen las distribuciones de los τ_L .⁹ Generalmente, los diferentes valores de τ_L se representan con diferentes colores, obteniéndose así una imagen mapeada de los τ_L .⁴⁶ Así, utilizando sondas que muestren diferentes τ_L en respuesta a cambios en el entorno, esta técnica puede proporcionar imágenes que aportan información sobre variaciones de temperatura y pH o concentraciones de oxígeno e iones.^{46, 74-78} Asimismo, el uso de la microscopía PLIM también puede

1.1. Introducción

reportar cambios en la eficacia de transferencia de energía o electrones entre la sonda y su entorno.⁷⁹⁻⁸¹ De esta manera es posible hacer uso de la luminiscencia de los Ln^{3+} que, al combinarla con la técnica PLIM, permite recomponer imágenes multidimensionales que incluyen información tanto de la intensidad como de los τ_L de los Ln^{3+} , minimizando así las interferencias de autofluorescencia y permitiendo una amplia gama de opciones en múltiples áreas de investigación.^{9, 11, 82}

Una de las ventajas más importantes de la microscopía PLIM cuando se utiliza en sistemas biológicos consiste en que los τ_L son independientes de la concentración de la sonda intracelular utilizada y de la potencia del láser de excitación.¹⁰ Otra de las técnicas que analiza las señales luminiscentes utilizando TG y que se utiliza para la obtención de imágenes de alta calidad es la microscopía de luminiscencia con ventana temporal (TGLM, por sus siglas en inglés *Time-Gated Luminescence Microscopy*), la cual filtra la emisión luminiscente de τ_L cortos y sólo recoge para su análisis la luminiscencia de τ_L largos, obteniendo una imagen de intensidad con una relación señal-ruido aumentada y minimizando así las interferencias de autofluorescencia. Sin embargo, en la TGLM y a diferencia de la microscopía PLIM, la intensidad es proporcional a la concentración de la sonda en un rango de concentración determinado.⁹ En comparación, la técnica PLIM resulta más apropiada para el análisis de analitos que inducen grandes cambios en los τ_L cuando se estudian en sistemas biológicos ya que mientras la TGLM emplea sólo una ventana temporal, la PLIM distingue los τ_L en cada píxel individual, presentando así una mejor resolución temporal. Sin embargo, cuando se emplean sondas con τ_L extremadamente largos, la TGLM resulta más adecuada, ya que en este sentido la PLIM requiere de una duración de adquisición de fotones muy larga, lo que podría afectar a la medida.

1.1.2. Diferentes tipos de complejos de lantánidos

Aunque son muchos los estudios que han descrito una amplia gama de ligandos capaces de sensibilizar la luminiscencia de los Ln^{3+} tanto en estado sólido como en disolución, los requisitos para una adecuada transferencia de energía mediante una coordinación eficaz son muy exigentes.^{59, 83, 84} Estos requisitos implican: (i) que la antena posea una alta absorbancia (ϵ), (ii) que el rendimiento del ISC de la antena sea alto, (iii) que la esfera de coordinación del Ln^{3+} esté completamente ocupada por los ligandos para evitar el quenching de luminiscencia y (iv) que la distancia entre la antena y el Ln^{3+} sea pequeña para que de esta forma la TE sea eficiente. De esta forma existen diferentes tipos de complejos orgánicos de Ln^{3+} capaces de sensibilizar su emisión

1.1. Introducción

luminiscente en disolución dependiendo de la propia estructura y posición de la antena, que comprende la distancia más adecuada con el Ln^{3+} para la adecuada TE. ^{30, 85, 86} Así, los complejos de Ln^{3+} se pueden clasificar en dos tipos: **antenas colgantes** (Figura I.6A) o **antenas quelantes** (Figura I.6B), dependiendo de la disposición estructural de la antena en el complejo formado. Asimismo, dentro del grupo de antenas quelantes se diferencian entre *criptatos* y *antenas autoensamblables*, dependiendo de si la antena está precoordiinada o se coordina *in situ* con el lantánido en disolución.

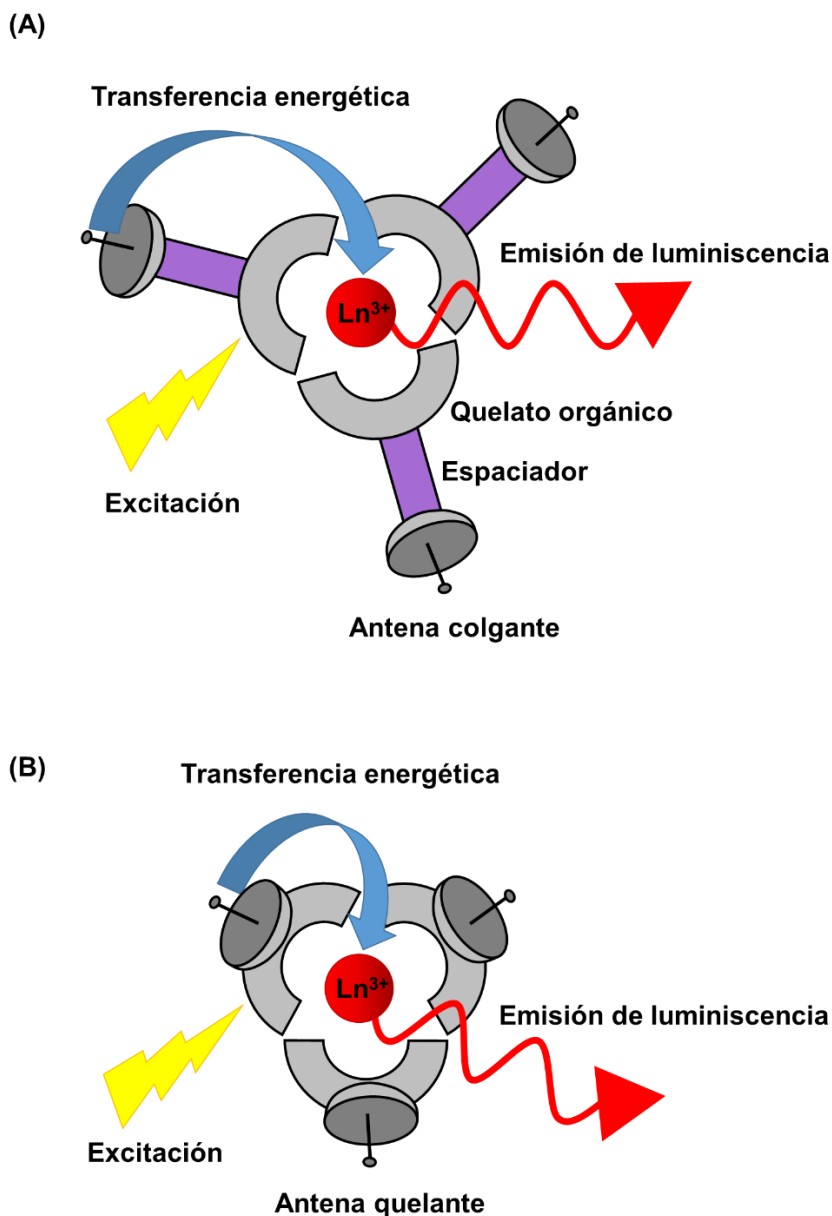


Figura I.6. Clasificación general de los complejos de Ln^{3+} en (A) antenas colgantes o (B) antenas quelantes.

Las **antenas colgantes** son cromóforos orgánicos que necesitan un espaciador para alcanzar la distancia apropiada con el metal para una TE eficiente, y un quelato que

1.1. Introducción

permita proteger al Ln^{3+} del quenching producido por los osciladores X-H de las moléculas del disolvente o del medio circundante.^{50, 87} En estos casos la antena no participa directamente en la esfera de coordinación del Ln^{3+} , uniéndose al metal, el cual está protegido en forma de quelato, a través de un espaciador.⁴⁶ Algunos ejemplos de cromóforos empleados para el desarrollo de antenas colgantes son las *N*-alquilacridonas (**I.1**), las tetraciclinas (**I.2**), las azaxantonas (**I.3**), las azatiaxantonas (**I.4**), los biarilos (**I.5**), las arilalquilpiridinas (**I.6**), los tetraazatrifenilenos (**I.7**), los carbostirilos (**I.8**), y las fenantridinas (**I.9**) (Figura I.7). Estos cromóforos son sensibilizadores de la luminiscencia de diferentes Ln^{3+} , especialmente del Tb^{3+} y del Eu^{3+} , y se utilizan en bioensayos e imágenes celulares.^{46, 88, 89} Como compuestos protectores de coordinación capaces de alojar al ion Ln^{3+} en el centro del complejo, se utilizan con frecuencia quelatos abiertos nona- u octadentados como el EDTA (ácido etilendiaminetetraacético) (**I.10**), el DTPA (ácido dietilentriaminopentaacético) (**I.11**) o macrociclos como los derivados DOTA (ácido 2,2',2'',2'''-(1,4,7,10-Tetraazaciclododecano-1,4,7,10-tetrail)tetraacético) (**I.12**) u otros derivados ciclénicos.^{23, 28, 51, 87, 90-92}

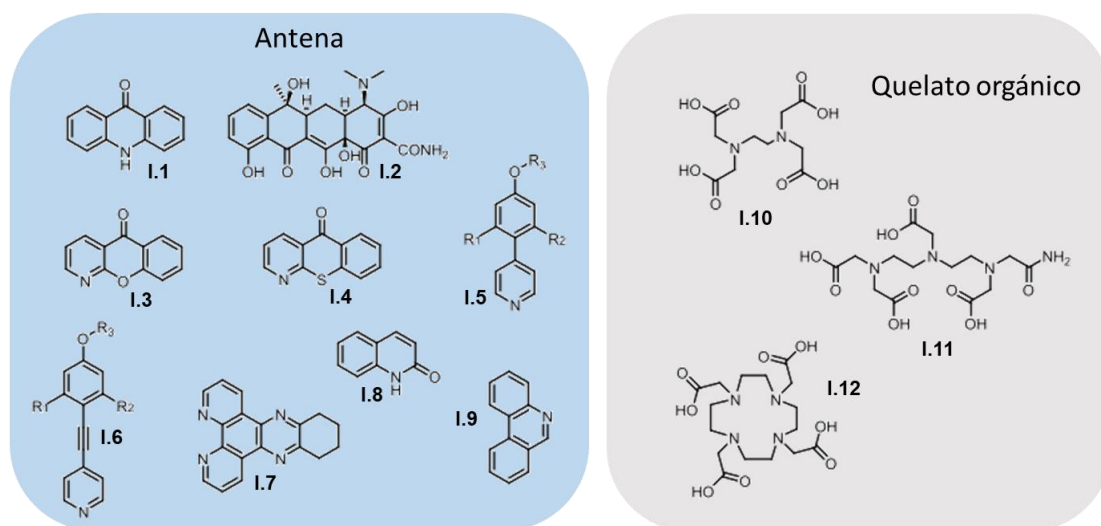


Figura I.7. Antenas (izquierda) y quelatos de Ln^{3+} (derecha) comúnmente utilizados en el desarrollo de antenas colgantes.

En cuanto a las **antenas quelantes**, la antena forma parte de la estructura que coordina el Ln^{3+} , participando directamente en la esfera de coordinación y facilitando así la transferencia de energía debido a la corta distancia entre la antena y el Ln^{3+} .⁹³ Sin embargo, diseñar una única antena que pueda cubrir completamente toda la esfera de coordinación del Ln^{3+} y sensibilizar eficazmente su PL puede ser difícil debido a los fenómenos de quenching comentados anteriormente, especialmente en disolventes como el agua. Por ello se han desarrollado diferentes estrategias para incrementar la

1.1. Introducción

afinidad de la antena por el metal, de cara a mejorar la estabilidad termodinámica de los complejos, como es el empleo de ácidos carboxílicos y ácidos fosfónicos. Las antenas quelantes pueden clasificarse en *criptatos* o *antenas autoensamblables*. Los *criptatos* son complejos en los que la antena se encuentra ya previamente coordinada con el Ln^{3+} , mientras que los complejos autoensamblables son aquellos que se coordinan *in situ* con el lantánido en disolución. Así, algunos ejemplos de criptatos son el *N,N,N',N'*-[2, 6-bis(3'-aminometil-1'-pirazolil)-4- fenilpiridina]tetrakis(acetato) de terbio(III) (BPTA- Tb^{3+}) (**I.13**), el 2''-[[4'-(aminobifenil-4-il)-2,2':6',2''-terpiridina-6,6''-diil]bis(metilenenitrilo)-tetraquis(acetato)] de europio(III) (ATBTA- Eu^{3+}) (**I.14**), los ácidos dipicolínicos (DPA), como el $\text{Tb}(\text{DPA})_3$ (**I.15**), la 2-hidroxi-isoftalamida (IAM) (**I.16**) y la 1-hidroxi-piridin-2-ona (1,2-HOPO) (**I.17**) (Figura I.8).

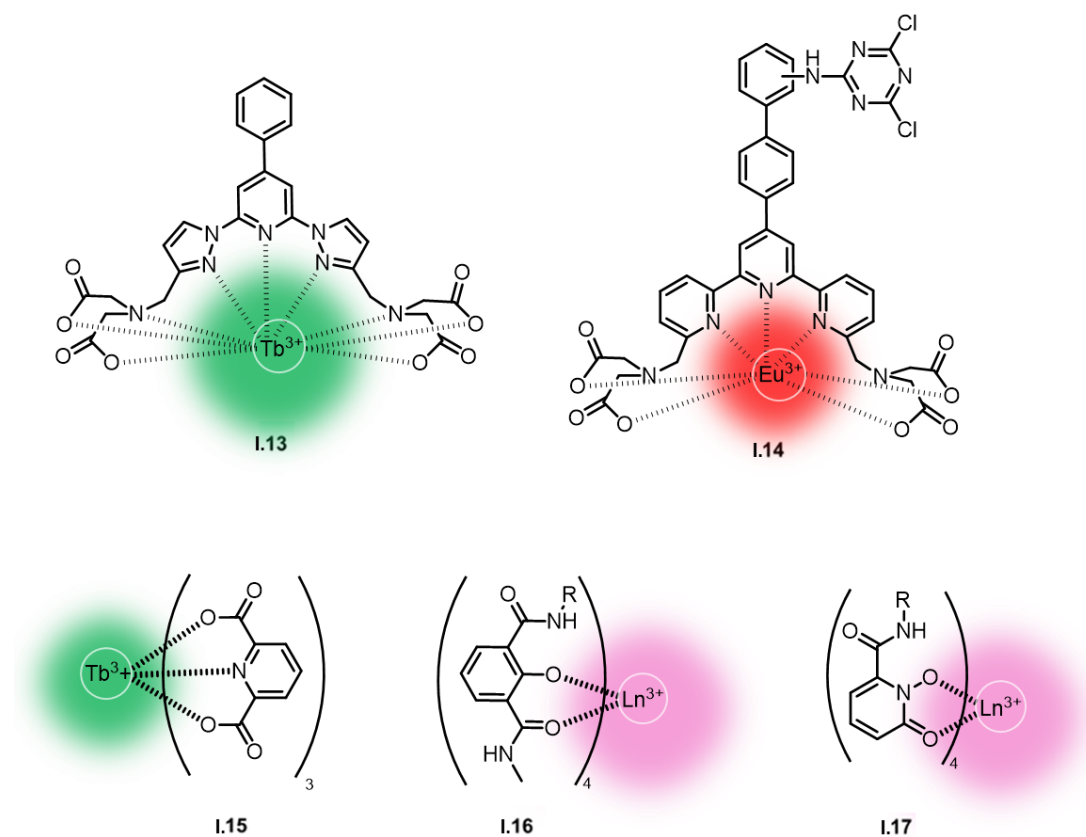


Figura I.8. Ejemplos de algunos criptatos de Ln^{3+} .

Uno de los principales factores a tener en cuenta en el diseño de complejos de Ln^{3+} basados en antenas colgantes consiste en que uno o más cromóforos se encuentran unidos a través de un espaciador a un ligando quelante generalmente multidentado (como el DTPA o el ácido 1,4,7,10 tetraciclodecano-1,4,7-triacético (DO3A)), que se une al ion Ln^{3+} y satura la esfera de coordinación del metal. En este sentido presentan

1.1. Introducción

un mayor nivel de complejidad que las antenas quelantes cuando se comparan en términos de síntesis y protocolos de preparación. Así, las antenas quelantes tienen la ventaja de que son capaces de coordinarse directamente con el Ln^{3+} , formando ellas mismas la esfera de coordinación, sin necesidad de grupos quelantes adicionales. Otro factor importante que debe considerarse para que se produzca una transferencia de energía eficiente es la distancia entre la antena y el Ln^{3+} . En el caso de las antenas colgantes, se cree que sensibilizan la luminiscencia del Ln^{3+} a través de una TE resonante de Förster.⁸⁷ Por otro lado, la distancia entre la antena y el Ln^{3+} suele ser menor en las antenas quelantes, y generalmente en este tipo de antenas la transferencia de energía al Ln^{3+} se produce principalmente a través de un mecanismo de Dexter, que es más eficaz.⁸⁷ Es importante destacar que el medio en el que los complejos de Ln^{3+} son estables y capaces de sensibilizar la luminiscencia condiciona completamente sus potenciales aplicaciones, siendo un factor fundamental a tener en cuenta en el diseño y desarrollo de los complejos. De esta forma, aquellos complejos que son capaces de sensibilizar la luminiscencia de los Ln^{3+} tanto en agua como en otros disolventes polares aumenta significativamente sus potenciales aplicaciones en sistemas biológicos. Así, se ha conseguido obtener complejos robustos de Ln^{3+} trisquelato trihelicoidales funcionales en agua, mediante la coordinación de Ln^{3+} con dos ligandos tridentados de piridina-tetrazolato (dianiónicos) (H_2pytz y H_2pytzc) (**I.18** y **I.19**), que son análogos del conocido ligando ácido dipicolínico (H_2DPA) (Figura I.9).⁹⁴ Se ha demostrado que las estructuras formadas por el ligando bis-tetrazolato-piridina H_2pytz son capaces de sensibilizar la emisión de diferentes Ln^{3+} (Eu^{3+} , Tb^{3+} y Nd^{3+}) tanto en el espectro visible como en el infrarrojo cercano, con rendimientos cuánticos en agua del 63% para el Tb^{3+} y del 18% para el Eu^{3+} . De forma similar, se han examinado las propiedades estructurales y luminiscentes de un complejo de Eu^{3+} en agua que utiliza un ligando orgánico hexadentado consistente en dos moléculas de bipyridina unidas por una unidad de etilendiamina (**I.20**).⁵⁶ Este complejo muestra una luminiscencia extraordinaria en una amplia región de pH. Igualmente, en otro trabajo se evalúan fotofísica y biológicamente varios complejos de Ln^{3+} estabilizados por un derivado de la fenantrolina (RPhen) y tres unidades de β -diketonato (DBM) (**I.21**).⁹⁵ Así, los Ln^{3+} implicados son el Sm^{3+} , el Eu^{3+} y el Tb^{3+} . Su potencial aplicación como agente anticancerígeno lo convierte en un sistema prometedor en la investigación biomédica. Este trabajo evalúa la capacidad del complejo para interactuar con el ADN mediante absorción UV-vis y espectroscopía de fluorescencia. Además, estos complejos son capaces de sensibilizar la luminiscencia de Ln^{3+} tanto en DMSO como en buffer PBS, lo que los hace realmente interesantes para sus aplicaciones en sistemas biológicos.⁹⁵ Por otro lado, Raymond *et al.* obtuvieron una

1.1. Introducción

familia de complejos quirales de Ln^{3+} utilizando ligandos octadentados quirales capaces de generar luminiscencia polarizada circularmente (CPL, por su terminología en inglés *Circularly Polarized Luminescence*) y empleando metanol como disolvente (**I.22**).⁸⁶ La generación de CPL a partir de complejos quirales de Ln^{3+} se ha aplicado con éxito para el desarrollo de dispositivos electrónicos o herramientas bioanalíticas.^{96, 97} Centrándonos en los complejos quelantes en agua capaces de generar CPL, ha sido posible estudiar las huellas dactilares de proteínas como la nucleasa de *Staphylococcus aureus* (SNasa), la albúmina de suero bovino (BSA), y la insulina (Ins) utilizando un quelato de β -diketonato con Eu^{3+} ,⁹⁸ así como la detección quiral específica de aminoácidos utilizando complejos formados por el ácido 1,10-fenantrolina-2,9-dicarboxílico (pda) o el ácido 2,2'-bipiridina-6,6'-dicarboxílico (bda) y el Eu^{3+} como Ln^{3+} .⁹⁹ También se han sintetizado nuevos ligandos de Ln^{3+} basados en las 5-aryl-2,2'-bipiridinas con residuos de ácido dietilentriamina tetracarboxílico (DTTA) (**I.23**) en la posición C6 de la piridina.^{100, 101} Utilizando estos ligandos se obtuvieron complejos funcionales en agua de Eu^{3+} , Tb^{3+} , Sm^{3+} y Dy^{3+} , entre los que destacó el complejo con Eu^{3+} por su elevado rendimiento cuántico (Φ) (12.8%) y τ_L (1.09 ms), frente a los valores obtenidos con los demás Ln^{3+} que fueron mucho menores.

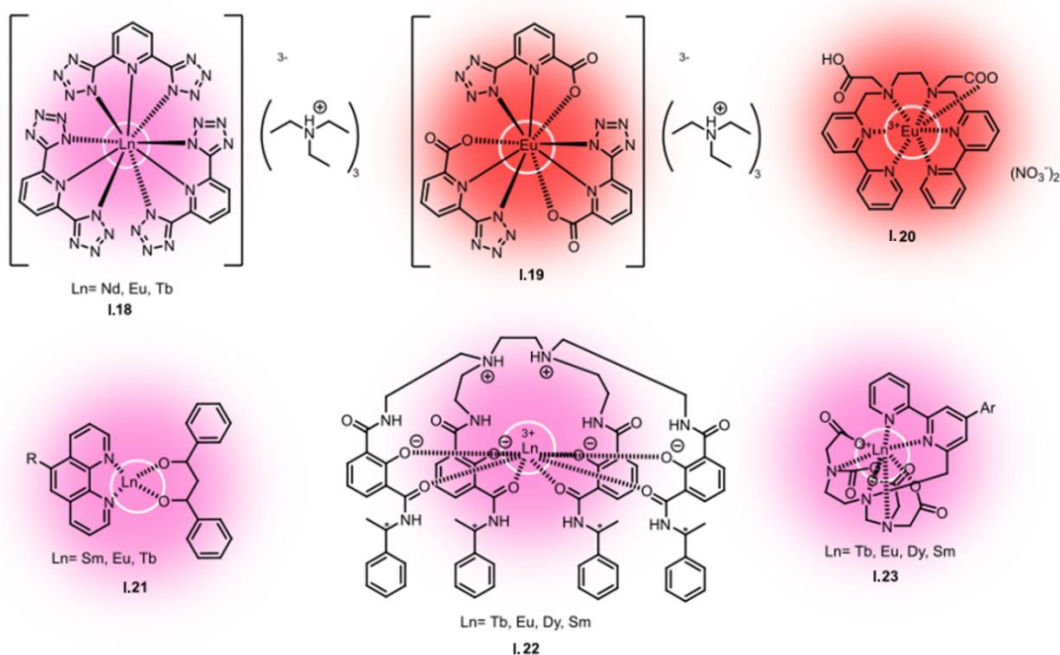


Figura I.9. Ejemplos de complejos basados en Ln^{3+} capaces de sensibilizar la luminiscencia de diferentes Ln^{3+} tanto en agua como en otros disolventes polares.

1.1. Introducción

Por otra parte, modificando complejos de Eu^{3+} que utilizan los ligandos piridina-2,6-dicarboxilato es posible sensibilizar la luminiscencia del Eu^{3+} mediante la formación de complejos que presentan largos τ_L no sólo en metanol (entre 1.30 y 2.90 ms) sino también en agua (entre 1.16 y 1.71 ms) ofreciendo la posibilidad de actuar como sondas luminiscentes para sistemas biológicos.¹⁰² En cuanto a las posibles aplicaciones de los complejos, además de las ya comentadas, la posibilidad de que determinados aniones puedan coordinarse con los centros de los Ln^{3+} en un medio acuoso parece ser un método eficaz para detectar la presencia de dichos aniones. Los cambios en la concentración de aniones pueden monitorizarse de forma rápida y precisa utilizando complejos de Ln^{3+} , facilitando así la medición de aniones como fosfato,¹⁰³ receptores de flúor¹⁰⁴ o ácido salicílico¹⁰⁵ en una gran variedad de disoluciones acuosas o fluidos biológicos. Así, en otro trabajo Gao *et al.* reportan un sistema único para la detección de iones fosfato que consiste en la encapsulación de un complejo de Ln^{3+} (**1.24**) dentro de micelas surfactantes, aunque requiere de la asistencia de Triton X-100 (surfactante no iónico) (Figura I.10).¹⁰³ Paralelamente se han desarrollado complejos autoensamblables de Eu^{3+} , Tb^{3+} e Yb^{3+} capaces de coordinarse directamente en agua y formar dímeros en presencia de aniones fluoruro, sirviendo como sistemas para la detección de estos iones.¹⁰⁴ Del mismo modo se han desarrollado complejos de Tb^{3+} cinéticamente estables en disoluciones acuosas que permiten sensar aniones carboxílicos aromáticos como el ácido salicílico. Para ello, se han empleado derivados ciclénicos DOTA que permiten obtener complejos de Tb^{3+} heptadentados en los que dos moléculas de agua ocupan las posiciones de coordinación restantes.¹⁰⁵ De esta manera las moléculas de agua que se coordinan con el Tb^{3+} son rápida y reversiblemente desplazadas por el ácido salicílico, dando lugar a la formación de aductos ternarios que potencian notablemente la luminiscencia de los complejos.

Por otra parte, aunque en esta Introducción del Bloque I se comentan principalmente los complejos de Ln^{3+} en disolución, también es interesante examinar aquellos complejos capaces de sensibilizar la luminiscencia de los Ln^{3+} en otros estados de la materia como el gel. De este modo, en un trabajo de Pangkuan Chen *et al.* se han sintetizado metalogeles luminiscentes funcionalizados con complejos de Ln^{3+} (**1.25**).¹⁰⁶ Así se han podido obtener redes poliméricas capaces de emitir luz de todos los colores del espectro visible, siendo muchos de ellos materiales capaces de responder a diferentes estímulos térmicos, químicos y mecánicos proporcionando así una amplia variedad de aplicaciones.¹⁰⁷⁻¹⁰⁹

1.1. Introducción

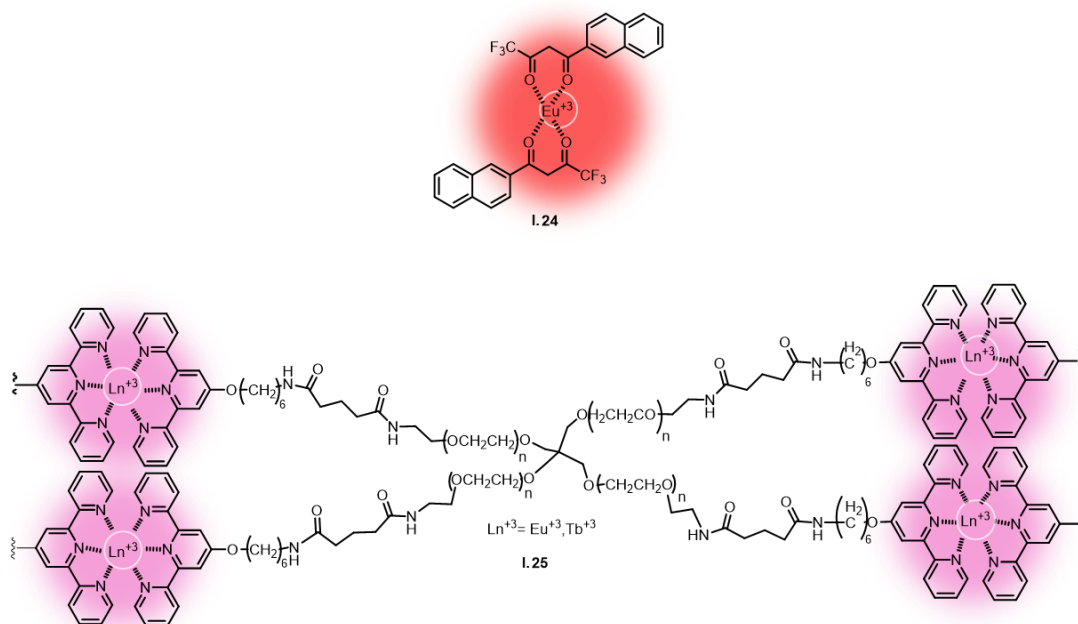


Figura I.10. Estructuras de los complejos basados en Ln^{3+} capaces de detectar iones fosfato (I.24) y de metalogeles luminiscentes funcionalizados con complejos de Ln^{3+} (I.25).

1.1.3. Complejos de lantánidos autoensamblables

De entre todos los complejos capaces de sensibilizar la FL de los Ln^{3+} en disolución, aquellos capaces de coordinarse espontáneamente, directamente *in situ*, dando lugar a los denominados complejos autoensamblables, son de especial interés debido a que su preparación resulta sencilla, representando generalmente sistemas menos voluminosos que el resto de complejos. Los complejos autoensamblables se pueden clasificar en tres grupos principales en función de la forma en la que la antena se une al Ln^{3+} en el autoensamblaje, así como en función de los componentes o estructuras que intervienen en dicho ensamblaje o coordinación.

- ❖ El primer grupo (tipo 1) incluye los complejos formados por antenas capaces de coordinarse directamente con el Ln^{3+} en disolución, transfiriendo su energía al ion metálico sin necesidad de estructuras quelantes adicionales (Figura I.11A). Estos complejos son generalmente sistemas más simples y menos voluminosos que el resto de antenas autoensamblables, lo que repercute en su facilidad de obtención y su versatilidad para el desarrollo de aplicaciones tanto biológicas como tecnológicas.

1.1. Introducción

- ❖ El segundo grupo (tipo 2) está constituido por complejos en los que la antena se autoensambla con el Ln^{3+} , el cual se encuentra previamente protegido de las moléculas de disolvente en forma de quelato (como DOTA, EDTA...), que generalmente deja una o dos posiciones de coordinación libres que son ocupadas por moléculas de disolvente (por ejemplo, H_2O) que quenchea la luminiscencia del metal (Figura I.11B). De esta forma, la coordinación de la antena con el quelato en disolución retiraría las moléculas de disolvente, dando lugar a un incremento en la luminiscencia del Ln^{3+} mediante TE.
- ❖ El tercer grupo de complejos autoensamblables (tipo 3) son aquellos en los que la antena se coordina directamente con el Ln^{3+} en disolución, pero que con el fin de dar lugar a una coordinación y sensibilización efectivas, se requieren moléculas quelantes adicionales que completen la esfera de coordinación (Figura I.11C).

1.1. Introducción

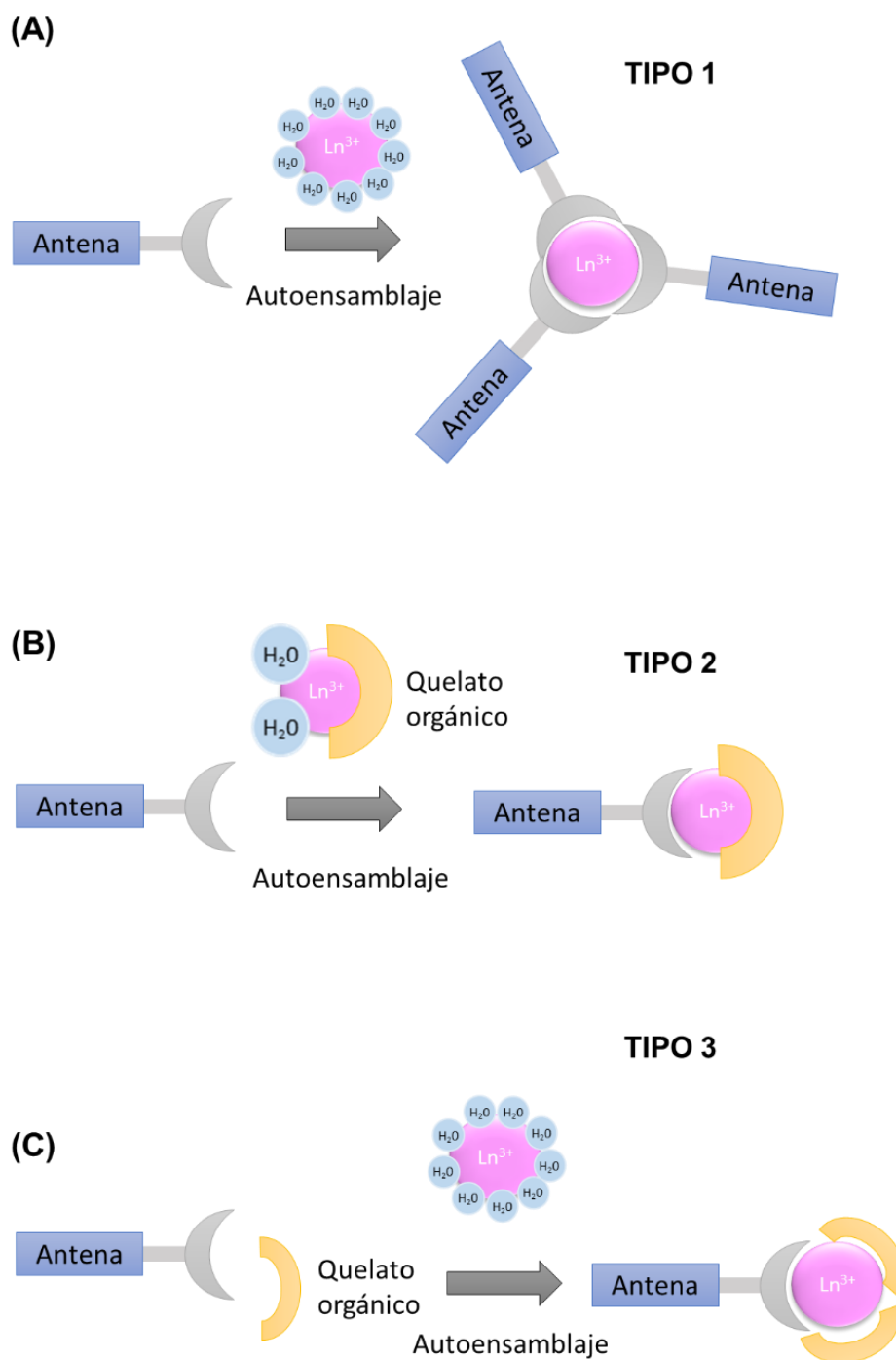


Figura I.11. Clasificación de los distintos complejos de Ln³⁺ autoensamblables en disolución acuosa.

Los compuestos luminiscentes capaces de autoensamblarse con Ln³⁺ en disolución son, por tanto, una de las opciones más interesantes y atractivas debido a sus características únicas y a sus potenciales aplicaciones, como el desarrollo de sondas biomoleculares, entre otras.¹¹⁰ En este sentido, Faulker *et al.* consiguieron por primera vez en 2002 la sensibilización de la PL del Yb³⁺ mediante un complejo autoensamblable utilizando la

1.1. Introducción

unidad tetratriafulvaleno como antena y DO3A como grupo quelante.¹¹¹ Desde entonces, muchos otros trabajos han reportado el desarrollo de complejos de Ln^{3+} autoensamblables directamente en disolución.^{112, 113} Sin embargo, hasta la fecha no se han descrito muchos casos de complejos de Ln^{3+} del primer grupo (tipo I) capaces de autoensamblarse en agua.^{102, 113} Estos últimos son de gran relevancia debido a sus potenciales aplicaciones biológicas, además de ofrecer, como ya se ha comentado, las ventajas de ser sistemas menos voluminosos y más sencillos de obtener. En las siguientes secciones nos centraremos en los complejos de Ln^{3+} autoensamblables en disolución, con especial énfasis en aquellos capaces de hacerlo en disoluciones acuosas, debido a su potencial uso en la detección de analitos de relevancia biológica, imagen y otras aplicaciones tecnológicas. Se discutirán diferentes trabajos seleccionados que tratan sobre complejos basados en Ln^{3+} capaces de coordinarse *in situ*, y se clasificarán en función de su comportamiento en diferentes disolventes, distinguiendo entre disolventes orgánicos y disoluciones acuosas (Figura I.12).



Figura I.12. Clasificación de los distintos complejos de Ln^{3+} autoensamblables en disolventes orgánicos o en disoluciones acuosas y sus principales aplicaciones.

1.1.4. Complejos de lantánidos luminiscentes autoensamblables en disolventes orgánicos

La generación de complejos de Ln^{3+} autoensamblables en disolventes orgánicos resulta útil para el desarrollo de diferentes aplicaciones, como la obtención de nuevos materiales luminiscentes y de sensores de agua altamente sensibles.¹¹³ Sin embargo, los complejos autoensamblables capaces de sensibilizar la FL de los Ln^{3+} exclusivamente en disolventes orgánicos limita enormemente sus potenciales aplicaciones para el estudio de sistemas biológicos. Además, la polaridad y la polarizabilidad del disolvente desempeñan un papel clave en la formación de los complejos de Ln^{3+} autoensamblables. Por ejemplo, los disolventes orgánicos polares próticos (como los alcoholes) disuelven eficazmente cationes y aniones, facilitando el autoensamblaje de los complejos en disolución. En este sentido se han sintetizado complejos de Ln^{3+} capaces de sensibilizar la FL en la región espectral del infrarrojo cercano del Nd^{3+} y el Er^{3+} cuando son excitados por luz UV cercana utilizando el ligando 1-(antraceno-2-il)-4,4,4-trifluoro-1,3-butanediona (**I.26**) en diferentes disolventes orgánicos (Figura I.13).¹¹² En este caso, la energía se transfiere a los niveles emisivos de los iones Ln^{3+} desde el estado excitado singlete del antraceno. En este trabajo se demuestra como la eficacia de la FL de estos complejos aumenta al aumentar la polaridad del disolvente, excepto en el caso del metanol. En este caso, el grupo OH del metanol actúa como quencher de la FL a través del acoplamiento con los niveles vibracionales de los grupos -OH. Así pues, el porcentaje de rendimiento de luminiscencia del complejo de Er^{3+} obtenido en metanol es de sólo el 0.05%.

Por otra parte, otra forma alternativa de complejos de Ln^{3+} autoensamblables en disolventes orgánicos es la descrita por Fréchet *et al.*, que consiste en tres dendrímeros de poliéter convergentes (cada uno con un punto focal de anión carboxilato) alrededor del catión trivalente central Ln^{3+} (**I.27**). De este modo se ha logrado cubrir toda la esfera de coordinación del Er^{3+} , el Tb^{3+} y el Eu^{3+} , logrando así sensibilizar su FL. La evidencia del autoensamblaje de los complejos dendríticos se obtiene mediante espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR, por sus siglas en inglés *Fourier Transform Infrared Spectroscopy*), espectrometría de masas MALDI-TOF (por sus siglas en inglés *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization* con el detector de iones acoplado *Time-Of-Flight*) y las medidas de espectroscopía de luminiscencia en disolución orgánica.¹¹⁴ Por otro lado, aunque los derivados de carboestirilo son ampliamente utilizados como antenas para sensibilizar la PL de los Ln^{3+} , sólo algunos compuestos de esta familia (los

1.1. Introducción

derivados de quinolin-2(1H)-ona) son capaces de autoensamblarse con Ln^{3+} en disolución (**I.28**, **I.29**).¹¹³ Curiosamente, la sensibilidad de estos complejos al quenching producido por las moléculas de agua se ha propuesto como base para desarrollar sensores de agua. En un trabajo de nuestro grupo de investigación se describieron dos nuevas familias de antenas de Ln^{3+} (8-metoxi-4,5-dihidrociclopenta[de]quinolin-2(1H)-ona fosfonatos o carboxilatos), capaces de sensibilizar la luminiscencia del Eu^{3+} y del Tb^{3+} en acetonitrilo (CH_3CN), pero cuya emisión se ve atenuada con la adición de agua, lo que los hace útiles para detectar impurezas de agua en disolventes orgánicos, incluso con aplicaciones en la industria alimentaria.¹¹³

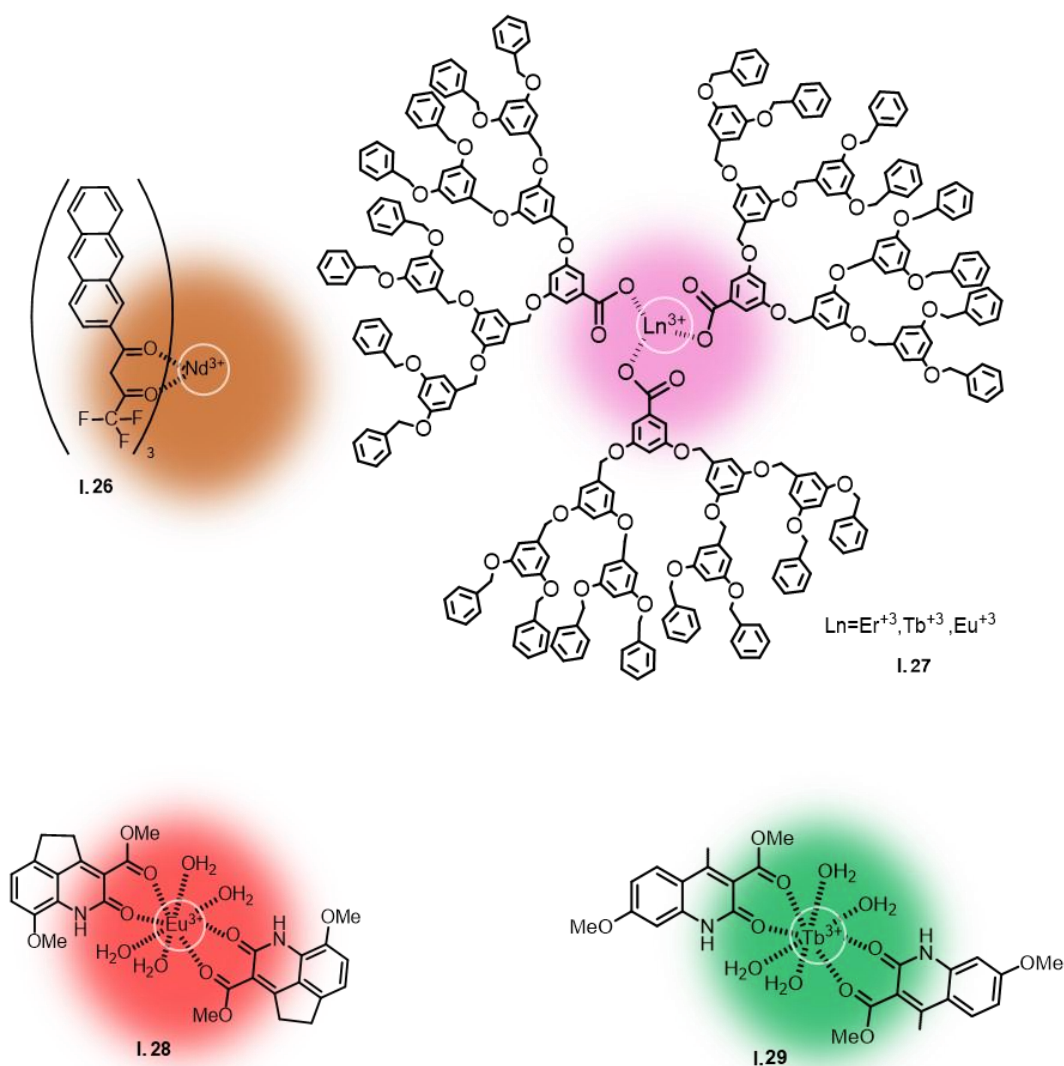


Figura I.13. Complejos de Ln^{3+} luminiscentes autoensamblables en disolventes orgánicos.

Como se comentó anteriormente, Faulkner y colaboradores llevaron a cabo por primera vez la sensibilización de la PL del Yb^{3+} a través de un complejo organometálico

1.1. Introducción

autoensamblable en metanol.¹¹¹ El tetratíafulvaleno es capaz de coordinarse en metanol a través del grupo carboxilato directamente (**I.30**) o con el complejo DO3A-Yb (**I.31**) (Figura I.14).

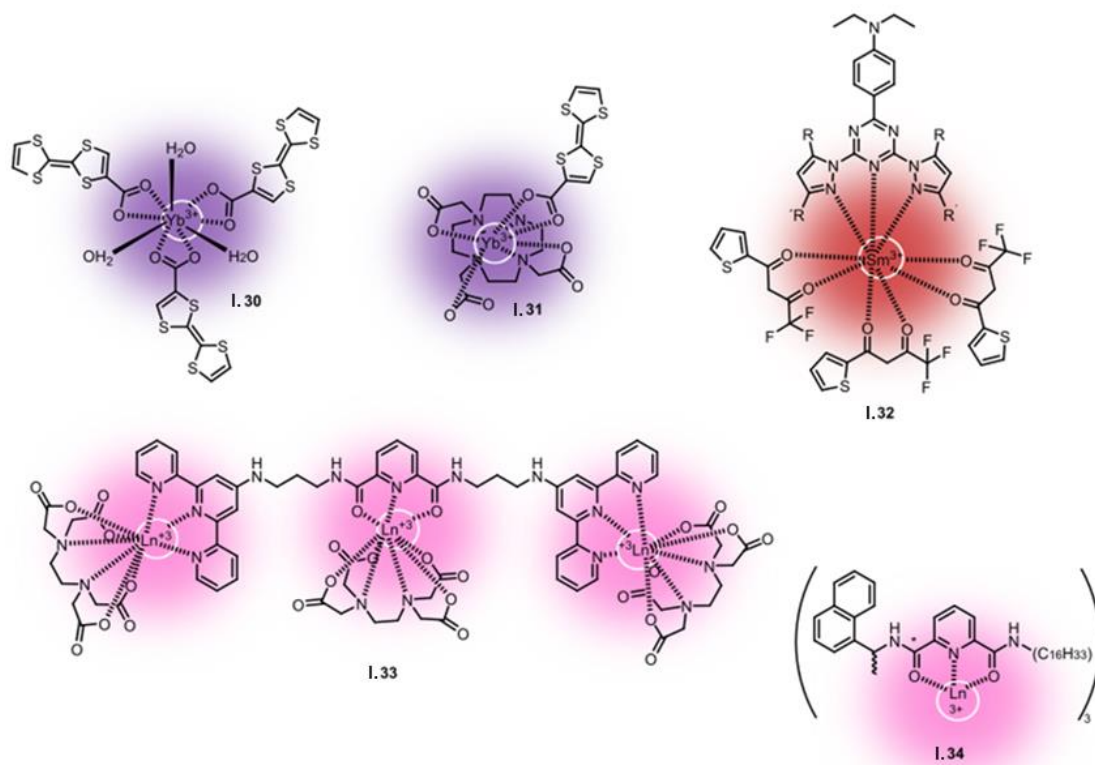


Figura I.14. Diferentes complejos de Ln³⁺ luminiscentes autoensamblables en disolventes orgánicos.

Asimismo se han sintetizado complejos de Ln³⁺ basados en la antena 2-(*N,N*-dietilanilino-4-il)-4,6-bis(pirazol-1-il)-1,3,5-triazina, capaces de sensibilizar la luminiscencia del Sm³⁺ en 12 disolventes orgánicos diferentes (**I.32**).¹¹⁵ Los complejos presentan rendimientos cuánticos que oscilan entre el 4.9% en benceno y el 0.14% en metanol. Estos complejos de Ln³⁺ pueden presentarse como posibles nuevos materiales capaces de modular el color de su emisión en diferentes disolventes orgánicos. De forma similar, Gunnlaugsson *et al.* han desarrollado un sistema basado en complejos de Ln³⁺ autoensamblables capaces de emitir luz blanca pura utilizando un ligando multidentado al que han denominado tdt, compuesto por una unidad central de ácido dipicolínico conectada a dos moléculas de 2,2':6',2''-terpiridilo en solución (**I.33**). En estos complejos el Ln³⁺ está protegido de las moléculas de agua por tres moléculas de EDTA, dando lugar a unidades voluminosas capaces de autoensamblarse en metanol. Sin embargo, su estabilidad en medios acuosos no se reporta, lo que eleva ciertas dudas sobre su empleabilidad en estudios biológicos.¹¹⁶ Siguiendo en la línea de este tipo de complejos, se han estudiado

1.1. Introducción

y evaluado complejos autoensamblables compuestos por ligandos anfífilos quirales basados en ácidos 2,6-piridinadicarboxílicos con diversas sales de $\text{Ln}(\text{CF}_3\text{SO}_3)_3$ ($\text{Ln}^{3+} = \text{Tb}^{3+}, \text{Sm}^{3+}, \text{Lu}^{3+}, \text{Dy}^{3+}$) en CH_3CN (**I.34**).¹¹⁷ Como propiedad particular, la quiralidad de los ligandos aporta a estos compuestos la capacidad de emitir CPL en películas de Langmuir-Blodgett. A propósito del uso de la cumarina anteriormente mencionada como compuesto capaz de sensibilizar la FL de los Ln^{3+} , existen ligandos quelantes derivados de la cumarina que pueden sensibilizar la luminiscencia del Sm^{3+} , el Dy^{3+} , el Tb^{3+} y el Eu^{3+} en disoluciones de etanol y THF mediante autoensamblaje.⁵⁴ Del mismo modo, otros complejos de Ln^{3+} autoensamblables en metanol [$\text{Eu}(\text{bpcd})(\text{tta})$] (**I.35**), [$\text{Eu}(\text{bpcd})-(\text{Coum})$] (**I.36**) y [$\text{Tb}(\text{bpcd})(\text{Coum})$] (**I.36**) [tta = 2-tenoiltrifluoroacetil-acetonato, Coum = 3-acetil-4-hidroxicumarina, y bpcd = *N,N*-bis(2-piridilmetil)-*trans*-1,2-diaminociclohexano-*N,N'*-diacetato] desarrollados por S. Ruggieri *et al.* son capaces de emitir CPL de color rojo o verde de forma eficiente, dependiendo de si el Ln^{3+} implicado es el Eu^{3+} o el Tb^{3+} (Figura I.15).¹¹⁸

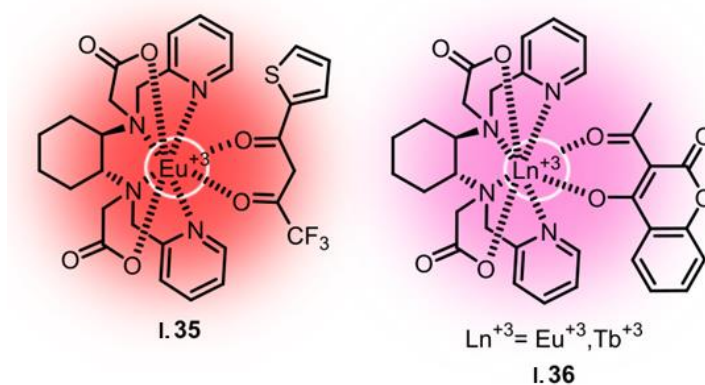


Figura I.15. Complejos [$\text{Eu}(\text{bpcd})(\text{tta})$] (**I.35**), [$\text{Eu}(\text{bpcd})-(\text{Coum})$] (**I.36**) y [$\text{Tb}(\text{bpcd})(\text{Coum})$] (**I.36**).

Por otro lado, se han sintetizado dos ligandos tridentados (HL^{AB1} y HL^{AB2}) que presentan una acridona fusionada a un esqueleto de benzimidazolpiridina (**I.37**, **I.38**) (Figura I.16). Estos complejos se autoensamblan con Eu^{3+} e Yb^{3+} en CH_3CN .¹¹⁹ Igualmente, en otro trabajo se ha descrito un ligando que contiene un núcleo de 1,3,5-bencenotricarboxamida y 4-(feniletinil)piridin-2,6-dicarboxilato de dietilo (**I.39**), y se han estudiado sus propiedades fotofísicas en disolventes orgánicos de polaridades diferentes incluyendo CH_3OH , CH_3CN , DMSO y CHCl_3 . En la disolución de CH_3CN se pudo confirmar la formación de especies autoensambladas entre el ligando y el Eu^{3+} .¹²⁰

1.1. Introducción

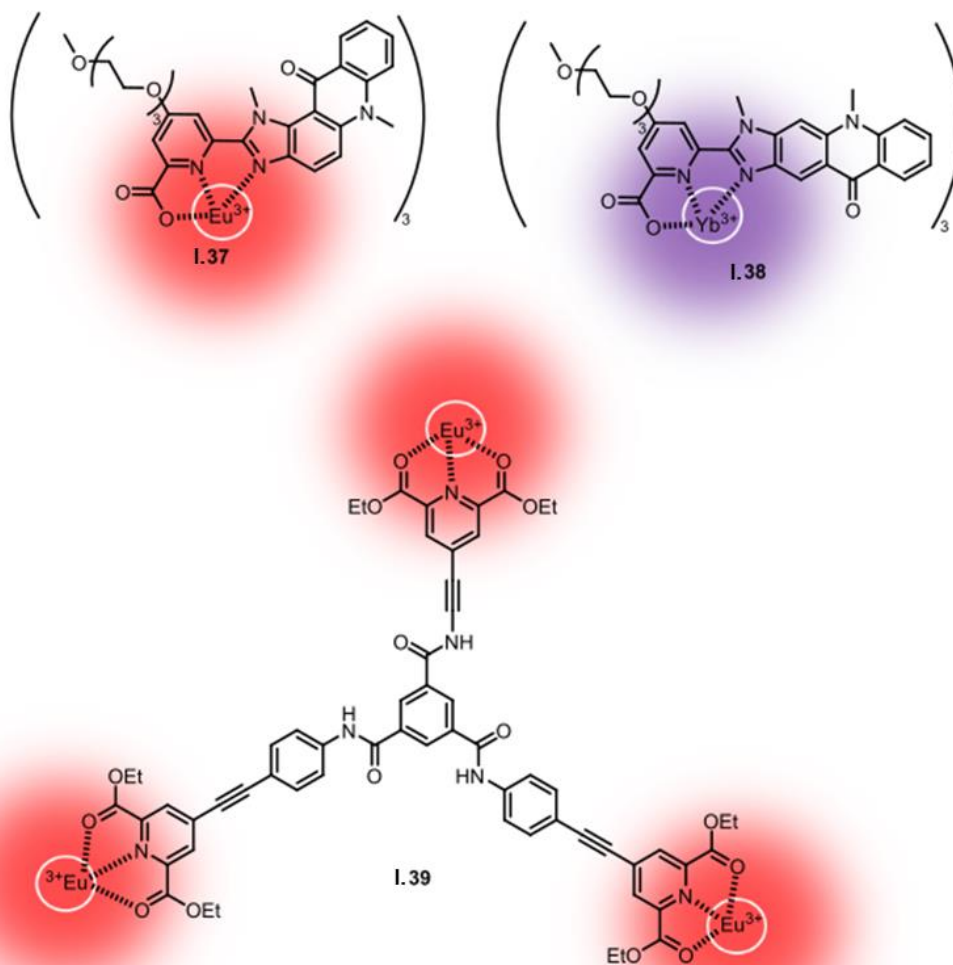


Figura I.16. Complejos de Ln³⁺ autoensamblables en disolventes orgánicos.

Los complejos de Ln³⁺ autoensamblables en disolventes orgánicos también pueden emplearse para el desarrollo de organogeles. En este sentido es interesante conocer el primer ejemplo conocido de geles poliméricos basado en lantánidos, donde se obtuvieron cuatro geles supramoleculares utilizando el ligando bis-tridentado basado en piridina bis(2,6-bis(1'-metil bencimidazolil)-4-hidroxipiridina) (**I.40**), iones de metales de transición (Co²⁺ o Zn²⁺) y los Ln³⁺ (La³⁺ o Eu³⁺) mediante métodos sencillos de calentamiento y enfriamiento con una mezcla de CHCl₃/CH₃CN como disolvente (Figura I.17).¹²¹ El ligando **I.40** actúa como antena para los iones Eu³⁺, de modo que estos geles sensibilizan su luminiscencia. Además, muestran respuestas reversibles a diversos estímulos térmicos, químicos y mecánicos.

1.1. Introducción

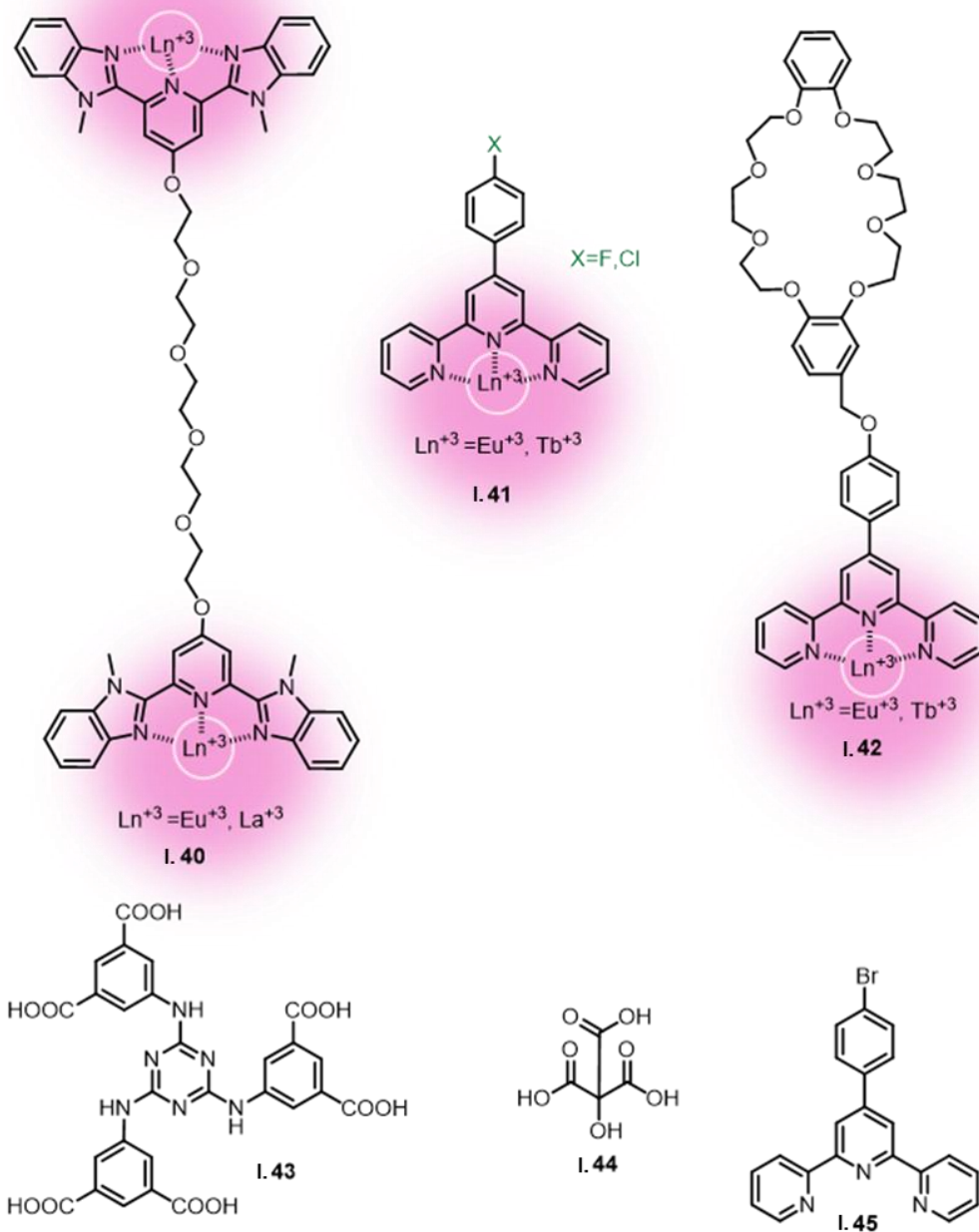


Figura I.17. Estructuras de complejos de Ln^{3+} autoensamblables en disolventes orgánicos empleados para la obtención de geles.

Asimismo, Singha Mahapatra *et al.* consiguieron obtener metalogeles termorreversibles utilizando 4'-*p*-Halofenil-2,2':6',2''-terpiridina (I.41) como ligando, los lantánidos Eu^{3+} y Tb^{3+} , y CH_3CN , DMF y $\text{CH}_3\text{CN}/\text{DMF}$ (1:1, v/v) como disolventes. Estos geles opacos presentaban una luminiscencia modulable mediante el ajuste de la estequiometría del ligando y del Ln^{3+} , pudiendo generar emisión de luz amarilla y blanca.¹⁰⁷ Por otra parte, Quan Li *et al.* desarrollaron un nuevo ligando con una unidad de terpiridina y moléculas

1.1. Introducción

de 24-corona-8 (**I.42**) capaz de coordinarse con Eu^{3+} o Tb^{3+} con una estequiometría de 1:1 a través de la unidad de terpiridina, obteniendo metalogeles capaces de emitir luz roja o verde bajo irradiación UV ($\lambda_{\text{ex}} = 365 \text{ nm}$), utilizando una mezcla de tolueno/ CH_3CN (1:1) como disolvente y procesos repetidos de calentamiento-enfriamiento.¹⁰⁸ Por tanto, en relación con lo anteriormente comentado, resulta evidente que el uso de ligandos basados en piridina para la obtención de complejos de Ln^{3+} autoensamblables en geles luminiscentes no acuosos está ampliamente extendido.^{109, 122-124} Este hecho ha llevado al desarrollo de nuevos materiales luminiscentes capaces de emitir luz blanca con potencial uso en LEDs,¹⁰⁹ o al desarrollo de tinta de seguridad invisible para mensajes secretos en papel normal.¹²² Paralelamente existen otras familias de ligandos basados en piridina que se han utilizado para obtener metalogeles luminiscentes autoensamblables utilizando los lantánidos Eu^{3+} y Tb^{3+} ,¹²⁵ como los ligandos tetrakis-tridentados basados en piridina,^{106, 126}.

También se han descrito geles supramoleculares basados en Ln^{3+} utilizando ligandos de colato sódico y sensibilizadores dopados,¹²⁷⁻¹³⁰ así como otros ligandos capaces de autoensamblarse en estado gel que sensibilizan la FL de los Ln^{3+} . Este es el caso del ligando 5,5',5''-(1,3,5-triazina-2,4,6-triil)tris(azanediil) triisofalato (**I.43**) utilizado por Hong Wang *et al.* para sensibilizar la emisión del Tb^{3+} en metalogeles de DMF/ CH_3OH .¹³¹ Asimismo, Edamana Prasad *et al.* consiguieron obtener el autoensamblaje de complejos de Ln^{3+} en geles utilizando metalogeles mixtos que contenían ácido cítrico como ligando ensamblador (**I.44**), el co-ligando 4'-(4-bromofenil)-2,2':6',2''-terpiridina (**I.45**) como antena, acetatos de Tb^{3+} y de Eu^{3+} como lantánidos, y DMF como disolvente.¹³² De esta forma se puede concluir que son muchos los trabajos que reportan la obtención de complejos de Ln^{3+} autoensamblables en disolventes orgánicos con multitud de aplicaciones tanto en disolución como en organogeles.

1.1.5. Complejos de lantánidos luminiscentes autoensamblables en disolución acuosa

Cuando se utiliza la FL de los Ln^{3+} para la detección de moléculas biológicas, los complejos formados deben ser compatibles con los entornos biológicos y acuosos, y los luminóforos deben ser lo suficientemente pequeños como para interferir lo mínimo posible con la diana a estudiar.¹¹ Entre todos los complejos de Ln^{3+} reportados hasta la fecha, los compuestos orgánicos capaces de autoensamblarse con los iones en disolución acuosa y sensibilizar su FL son de especial interés debido al gran número de

1.1. Introducción

potenciales aplicaciones que presentan. Entre estas aplicaciones destacan su uso en bioimagen como sondas para la visualización celular o como biosensores, así como la obtención de nuevos materiales capaces de emitir luz blanca.^{22, 46, 71, 133, 134} En cuanto a los complejos autoensamblables formados por antenas capaces de coordinarse directamente con el Ln^{3+} en disolución y sensibilizar su FL sin necesidad de estructuras quelantes adicionales (complejos tipo I), cabe destacar que a pesar de las ventajas que presentan, el número reportado hasta la fecha de este tipo de complejos es escaso. A pesar de ello, Anne-Sophie Chauvin *et al.* diseñaron un complejo de este tipo consistente en una serie de receptores hexadentados que incorporan moléculas de benzimidazol, a las que se añadieron como grupos de coordinación el ácido fosfónico o el grupo fosfoéster (**I.46**).¹³⁵ Además, para aumentar la solubilidad en agua, se introdujeron unidades de poli(oxietileno) en el esqueleto del benzimidazol (Figura I.18). Así, los ligandos eran capaces de autoensamblarse con los Ln^{3+} en disolución acuosa dando lugar a heli-catos homobimetálicos de triple cadena, que presentaron una elevada estabilidad termodinámica y que eran capaces de sensibilizar la luminiscencia del Eu^{3+} y del Tb^{3+} de forma efectiva. Siguiendo en esta línea, en un trabajo de nuestro grupo de investigación se ha desarrollado un compuesto autoensamblable tipo I en disolución acuosa, el ácido 8-metoxi-2-oxo-1,2,4,5-tetrahidrociclopenta[de]quinolina-3-carboxílico (**I.47**), que se comporta como un aceptor de Michael no fluorescente. Sin embargo, el compuesto se vuelve fluorescente en presencia de biotioles al reaccionar con ellos. Además, **I.47** es capaz de coordinarse directamente con Eu^{3+} en agua mediante autoensamblaje, de forma que la antena sensibiliza la emisión luminiscente del lantánido cuando detecta biotioles. Este comportamiento permite su uso en el estudio de células humanas del sistema inmune por citometría de flujo, ya que los niveles de biotioles generados pueden medirse a través de la fluorescencia del compuesto fluorescente o a través de la PL sensibilizada del Ln^{3+} .¹¹⁰ Por otra parte, también se ha desarrollado un sistema basado en el ácido dipicolínico (**I.48**) para el cribado o screening de potenciales antenas tipo I capaces de sensibilizar la luminiscencia de los Ln^{3+} en agua.⁹¹ Asimismo, Jagannath B. Lamture *et al.* compararon las propiedades espectrales de varios complejos de Ln^{3+} obtenidos a partir de análogos 4-sustituidos del ácido dipicolínico (**I.49**) y del Tb^{3+} en disoluciones acuosas.⁶¹ Los compuestos análogos se obtuvieron por 4-sustitución en el ácido dipicolínico por los grupos -H, -OH, -Cl, -Br, -NH₂, o -NHCOCH₃. Al excitarse con luz ultravioleta, todos los análogos sensibilizaron la emisión de Tb^{3+} , concluyéndose que los rendimientos cuánticos globales de la emisión sensibilizada del Tb^{3+} iban desde el 13.6% hasta el 4.03% siguiendo el orden -NH₂ > -OH > -NHCOCH₃ > -Cl > -H > -Br.

1.1. Introducción

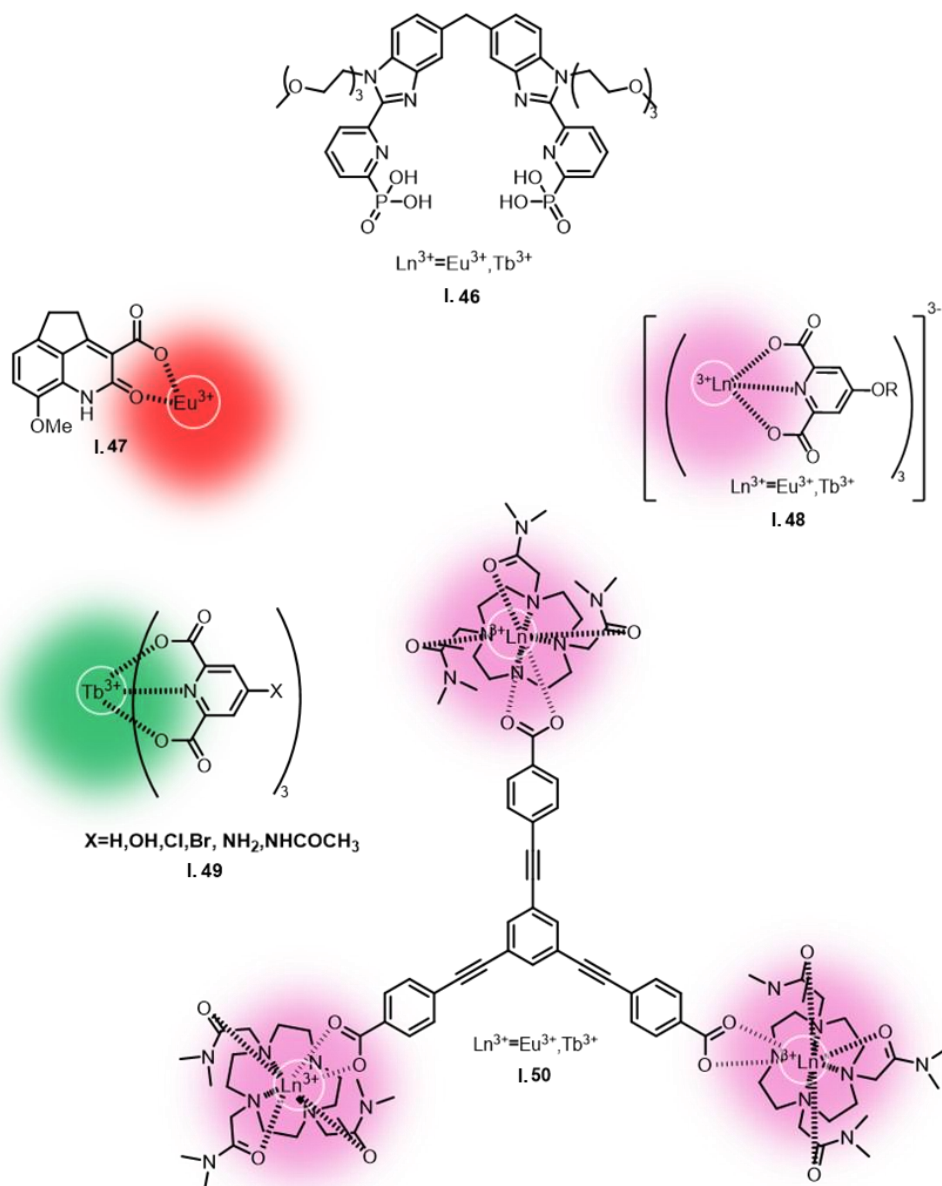


Figura I.18. Diferentes complejos de Ln³⁺ luminiscentes autoensamblables en disolución acuosa.

Igualmente se han desarrollado complejos de Ln³⁺ con cicleno heptadentado (DOTA) de Eu³⁺ y de Tb³⁺ formando parte de estructuras supramoleculares con el ligando 1,3,5-benceno-trisetinilbenzoato (**I.50**) capaces de autoensamblarse, habiéndose estudiado su luminiscencia en estado sólido y en disolución.¹³⁶ Otro ejemplo interesante de complejos de Ln³⁺ autoensamblables en disoluciones acuosas es el descrito por Wei-Lei Zhou *et al.*, el cual consiste en un interruptor supramolecular fotosensible a partir de un ácido dicarboxílico de 2,6-piridina modificado con pilar[5]areno capaz de autoensamblarse con Tb³⁺ y Eu³⁺ y un derivado dicatiónico del diariletano, permitiendo así la sensibilización de estos Ln³⁺ en soluciones acuosas.¹³⁷ Este sistema permite la

1.1. Introducción

formación de polímeros supramoleculares, aumentando así tanto la intensidad de FL como los τ_L de los complejos. Además, con este sistema se puede obtener emisión de luz blanca en soluciones acuosas y CH_2Cl_2 . Una de las aplicaciones directas más llamativas es la obtención de tintas multicolor de escritura inteligente para la lucha contra la falsificación. Gunnlaugsson *et al.* consiguieron también obtener nuevos materiales luminiscentes en forma de hidrogeles basados en complejos de Ln^{3+} , compuestos de cuadruplex de guanósina estabilizados con K^+ (**I.51**), que son capaces de autoensamblarse con Eu^{3+} , sensibilizando así su luminiscencia y haciendo posible el uso de la espectroscopía de luminiscencia con TG (Figura I.19).¹³⁴ Estos hidrogeles de guanósina son, además, capaces de emitir CPL centrada en la luminiscencia del Eu^{3+} .

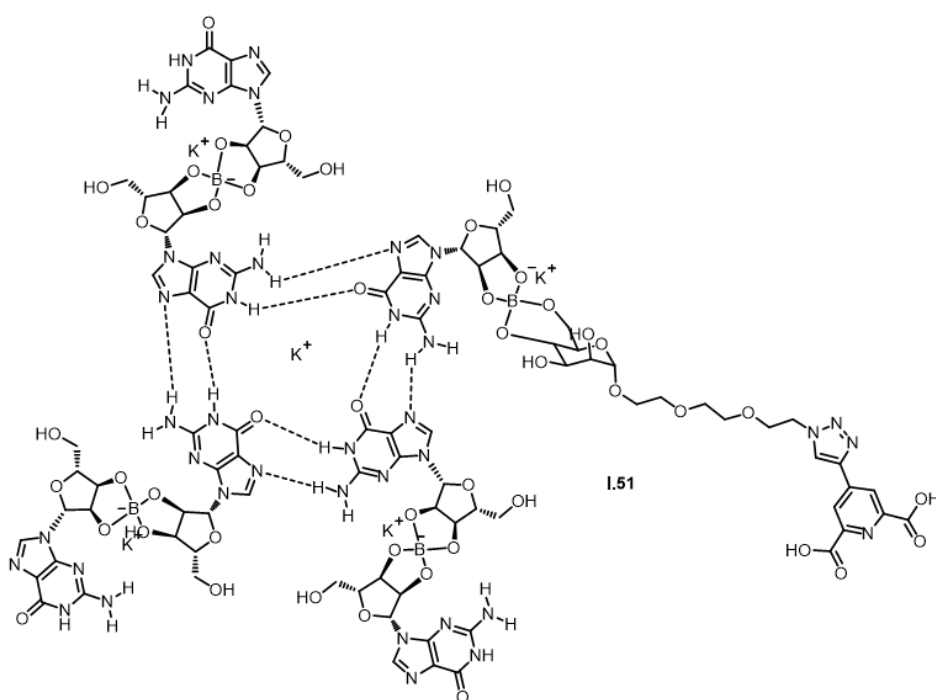


Figura I.19. Estructura del complejo I.51.

La versatilidad de los complejos de Ln^{3+} capaces de autoensamblarse en disolución acuosa se ha empleado también para el desarrollo de biosensores luminiscentes para el estudio de la actividad proteínica quinasa, evitando así el uso de isótopos radiactivos, anticuerpos u otros agentes de etiquetado.¹³⁸⁻¹⁴² De esta forma, se ha conseguido estudiar la actividad tirosina quinasa empleando un sustrato peptídico de reconocimiento por la quinasa a estudiar que incluye un residuo de tirosina y varios restos de aminoácidos ácidos (ácido aspártico y ácido glutámico). Así, tras la reacción de fosforilación por la correspondiente quinasa, la fosfotirosina incorporada (antena) es capaz de coordinarse con iones Tb^{3+} , sensibilizando su luminiscencia y reportando por

1.1. Introducción

tanto la actividad de la quinasa. Esta actividad puede detectarse midiendo la luminiscencia del Tb^{3+} mediante ventana temporal (TG), ya que al coordinarse se produce un notable incremento tanto de la intensidad como del τ_L del lantánido (Figura I.20).^{138, 140}

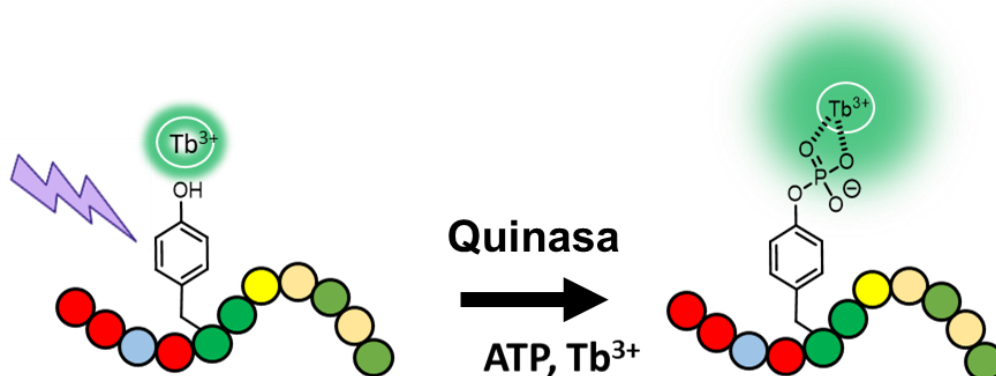


Figura I.20. Esquema del sistema que contiene un péptido con tirosina el cual, al ser fosforilado por la quinasa, es capaz de coordinar iones Tb^{3+} sensibilizando así su luminiscencia.

Otras modificaciones de este diseño implican la incorporación de un fluoróforo al péptido sustrato que contiene un residuo de tirosina. Así, tras la reacción de fosforilación por la quinasa, la fosfotirosina (antena) se coordina con el Tb^{3+} , sensibilizando su luminiscencia, la cual se transfiere al fluoróforo incorporado, indicando por tanto la actividad de la quinasa. En este caso, la actividad quinasa se mide mediante la emisión del fluoróforo, que puede ser verde o roja dependiendo del fluoróforo incorporado. (Figura I.21).¹³⁹

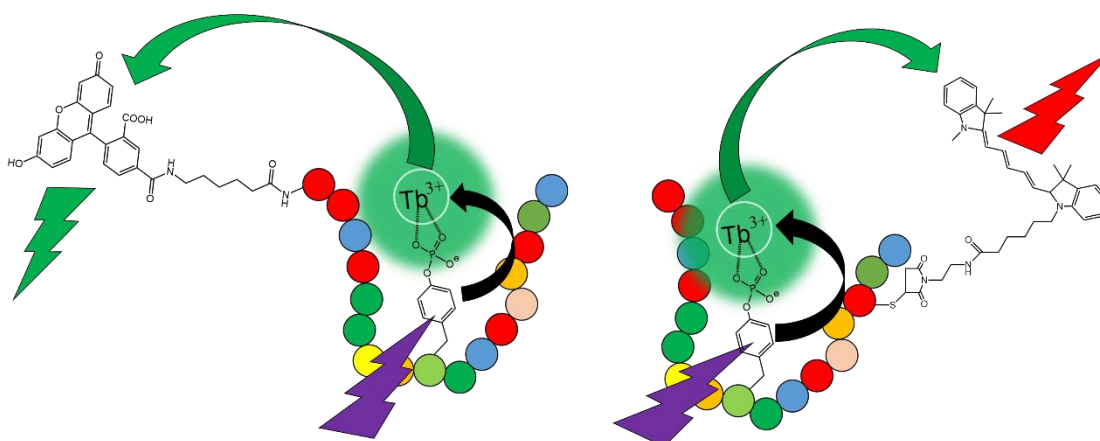


Figura I.21. Esquema del sistema que contiene un péptido sustrato con un fluoróforo y una tirosina la cual, al ser fosforilada por la quinasa, es capaz de coordinar iones Tb^{3+} sensibilizando su luminiscencia, que se transfiere al fluoróforo.

1.1. Introducción

De manera similar, otra forma de estudiar la actividad quinasa consiste en el empleo de un péptido sustrato que contiene tirosina, Tb^{3+} y QDs (por sus siglas en inglés *Quantum Dots*). Cuando el péptido sustrato es fosforilado por la quinasa, la tirosina, que actúa como antena, sensibiliza la emisión luminiscente del Tb^{3+} coordinado. Esta emisión del Tb^{3+} se transfiere a los QDs mediante transferencia de energía por resonancia de luminiscencia resuelta en el tiempo, que a su vez producen una emisión resuelta en el tiempo que se analiza, permitiendo así detectar la actividad de la enzima quinasa.¹⁴¹ Por último, otro sistema para la detección de la actividad quinasa se basa en el empleo de un péptido sustrato que contiene un residuo de tirosina, un resto de iminodiacetato cerca del lugar de fosforilación y una antena de lantánidos derivada de carboestirilo. Tras la reacción de fosforilación por la quinasa, el lantánido correspondiente (Tb^{3+} o Eu^{3+}) se coordina con la tirosina fosforilada y el resto de iminodiacetato, y el fluoróforo unido al péptido transfiere su energía al Ln^{3+} dando lugar a un fuerte aumento de la luminiscencia (Figura I.22).¹⁴²

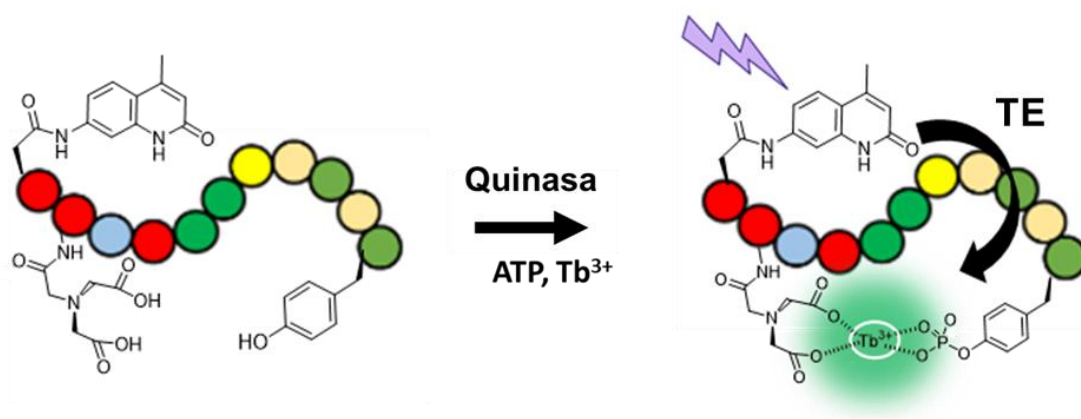


Figura I.22. Biosensor que contiene un péptido sustrato con tirosina, un resto de iminodiacetato cerca del lugar de fosforilación y un derivado de carboestirilo capaz de actuar como antena de Ln^{3+} .

1.1.6. Referencias

1. Lakowicz, J., *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. 2006; Vol. 1.
2. Briddon, S. J.; Hill, S. J., Pharmacology under the microscope: the use of fluorescence correlation spectroscopy to determine the properties of ligand-receptor complexes. *Trends Pharmacol Sci* **2007**, *28* (12), 637-45.
3. Marcu, L., Fluorescence lifetime techniques in medical applications. *Ann Biomed Eng* **2012**, *40* (2), 304-31.
4. Zacharioudaki, D.-E.; Fitolis, I.; Kotti, M. Review of Fluorescence Spectroscopy in Environmental Quality Applications *Molecules* [Online], 2022.
5. Veerapathiran, S.; Wohland, T., Fluorescence techniques in developmental biology. *J Biosci* **2018**, *43* (3), 541-553.
6. McKinnon, K. M., Flow Cytometry: An Overview. *Current Protocols in Immunology* **2018**, *120* (1), 5.1.1-5.1.11.
7. Ju, J.; Ruan, C.; Fuller, C. W.; Glazer, A. N.; Mathies, R. A., Fluorescence energy transfer dye-labeled primers for DNA sequencing and analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1995**, *92* (10), 4347-51.
8. Berezin, M.; Achilefu, S., Fluorescence Lifetime Measurements and Biological Imaging. *Chemical reviews* **2010**, *110*, 2641-84.
9. Zhang, K. Y.; Yu, Q.; Wei, H.; Liu, S.; Zhao, Q.; Huang, W., Long-Lived Emissive Probes for Time-Resolved Photoluminescence Bioimaging and Biosensing. *Chemical Reviews* **2018**, *118* (4), 1770-1839.
10. Chelushkin, P. S.; Tunik, S. P., Phosphorescence Lifetime Imaging (PLIM): State of the Art and Perspectives. In *Progress in Photon Science: Recent Advances*, Yamanouchi, K.; Tunik, S.; Makarov, V., Eds. Springer International Publishing: Cham, 2019; pp 109-128.
11. Werts, M. H. V., Making sense of Lanthanide Luminescence. *Science Progress* **2005**, *88* (2), 101-131.
12. Kalinina, S.; Rück, A., FLIM and PLIM in biomedical research – An innovative way to combine autofluorescence and oxygen measurements. **2016**, *5* (4), 257-266.
13. Ruedas-Rama, M. J.; Alvarez-Pez, J. M.; Crovetto, L.; Paredes, J. M.; Orte, A., FLIM Strategies for Intracellular Sensing. In *Advanced Photon Counting: Applications, Methods, Instrumentation*, Kapusta, P.; Wahl, M.; Erdmann, R., Eds. Springer International Publishing: Cham, 2015; pp 191-223.
14. Valeur, B.; Berberan-Santos, M. N., A Brief History of Fluorescence and Phosphorescence before the Emergence of Quantum Theory. *Journal of Chemical Education* **2011**, *88* (6), 731-738.
15. Skoog, D. A.; Holler, F. J.; Crouch, S. R., *Principles of Instrumental Analysis*. Cengage Learning: 2017.
16. Mondal, P. P.; Diaspro, A., Basics of Fluorescence and Photophysics. In *Fundamentals of Fluorescence Microscopy: Exploring Life with Light*, Mondal, P. P.; Diaspro, A., Eds. Springer Netherlands: Dordrecht, 2014; pp 111-134.
17. Wilson, D. F.; Vinogradov, S. A., Recent Advances in Oxygen Measurements Using Phosphorescence Quenching. In *Oxygen Transport to Tissue XVI*, Hogan, M. C.; Mathieu-Costello, O.; Poole, D. C.; Wagner, P. D., Eds. Springer US: Boston, MA, 1994; pp 61-66.
18. Wu, J.; Fujii, K.; Yashima, M.; Staykov, A.; Akbay, T.; Ishihara, T.; Kilner, J. A., A systematic evaluation of the role of lanthanide elements in functional complex oxides; implications for energy conversion devices. *Journal of Materials Chemistry A* **2018**, *6* (25), 11819-11829.

1.1. Introducción

19. Bünzli, J.-C. G., Rising Stars in Science and Technology: Luminescent Lanthanide Materials. *European Journal of Inorganic Chemistry* **2017**, 2017 (44), 5058-5063.
 20. SeethaLekshmi, S.; Ramya, A. R.; Reddy, M. L. P.; Varughese, S., Lanthanide complex-derived white-light emitting solids: A survey on design strategies. *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews* **2017**, 33, 109-131.
 21. Cotruvo, J. A., Jr., The Chemistry of Lanthanides in Biology: Recent Discoveries, Emerging Principles, and Technological Applications. *ACS Central Science* **2019**, 5 (9), 1496-1506.
 22. Mathieu, E.; Sipos, A.; Demeyere, E.; Phipps, D.; Sakaveli, D.; Borbas, K. E., Lanthanide-based tools for the investigation of cellular environments. *Chemical Communications* **2018**, 54 (72), 10021-10035.
 23. Parker, D.; Fradgley, J. D.; Wong, K.-L., The design of responsive luminescent lanthanide probes and sensors. *Chemical Society Reviews* **2021**, 50 (14), 8193-8213.
 24. Safdar, M.; Ghazy, A.; Lastusaari, M.; Karppinen, M., Lanthanide-based inorganic-organic hybrid materials for photon-upconversion. *Journal of Materials Chemistry C* **2020**, 8 (21), 6946-6965.
 25. dos Santos, C. M. G.; Harte, A. J.; Quinn, S. J.; Gunnlaugsson, T., Recent developments in the field of supramolecular lanthanide luminescent sensors and self-assemblies. *Coordination Chemistry Reviews* **2008**, 252 (23), 2512-2527.
 26. Sy, M.; Nonat, A.; Hildebrandt, N.; Charbonnière, L. J., Lanthanide-based luminescence biolabelling. *Chemical Communications* **2016**, 52 (29), 5080-5095.
 27. Bünzli, J.-C. G., Lanthanide Luminescence for Biomedical Analyses and Imaging. *Chemical Reviews* **2010**, 110 (5), 2729-2755.
 28. Montgomery, C. P.; Murray, B. S.; New, E. J.; Pal, R.; Parker, D., Cell-Penetrating Metal Complex Optical Probes: Targeted and Responsive Systems Based on Lanthanide Luminescence. *Accounts of Chemical Research* **2009**, 42 (7), 925-937.
 29. New, E. J.; Parker, D., The mechanism of cell uptake for luminescent lanthanide optical probes: the role of macropinocytosis and the effect of enhanced membrane permeability on compartmentalisation. *Organic & Biomolecular Chemistry* **2009**, 7 (5), 851-855.
 30. Pope, S. J.; Coe, B. J.; Faulkner, S.; Bichenkova, E. V.; Yu, X.; Douglas, K. T., Self-assembly of heterobimetallic d-f hybrid complexes: sensitization of lanthanide luminescence by d-block metal-to-ligand charge-transfer excited states. *J Am Chem Soc* **2004**, 126 (31), 9490-1.
 31. Armelao, L.; Quici, S.; Barigelletti, F.; Accorsi, G.; Bottaro, G.; Cavazzini, M.; Tondello, E., Design of luminescent lanthanide complexes: From molecules to highly efficient photo-emitting materials. *Coordination Chemistry Reviews* **2010**, 254 (5), 487-505.
 32. Bünzli, J.-C. G.; Eliseeva, S. V., Intriguing aspects of lanthanide luminescence. *Chemical Science* **2013**, 4 (5), 1939-1949.
 33. Kasprzycka, E.; Trush, V. A.; Amirkhanov, V. M.; Jerzykiewicz, L.; Malta, O. L.; Legendziewicz, J.; Gawryszewska, P., Contribution of Energy Transfer from the Singlet State to the Sensitization of Eu³⁺ and Tb³⁺ Luminescence by Sulfonylamidophosphates. *Chemistry – A European Journal* **2017**, 23 (6), 1318-1330.
 34. Hänninen, P. E.; Härmä, H.; Ala-Kleme, T. In *Lanthanide luminescence : photophysical, analytical and biological aspects*, 2011.
 35. Mara, M. W.; Tatum, D. S.; March, A.-M.; Doumy, G.; Moore, E. G.; Raymond, K. N., Energy Transfer from Antenna Ligand to Europium(III) Followed Using Ultrafast Optical and X-ray Spectroscopy. *Journal of the American Chemical Society* **2019**, 141 (28), 11071-11081.
 36. Ward, M. D., Mechanisms of sensitization of lanthanide(III)-based luminescence in transition metal/lanthanide and anthracene/lanthanide dyads. *Coordination Chemistry Reviews* **2010**, 254 (21), 2634-2642.
-

1.1. Introducción

37. Förster, T., 10th Spiers Memorial Lecture. Transfer mechanisms of electronic excitation. *Discussions of the Faraday Society* **1959**, 27 (0), 7-17.
38. Sykes, D.; Cankut, A. J.; Ali, N. M.; Stephenson, A.; Spall, S. J. P.; Parker, S. C.; Weinstein, J. A.; Ward, M. D., Sensitisation of Eu(III)- and Tb(III)-based luminescence by Ir(III) units in Ir/lanthanide dyads: evidence for parallel energy-transfer and electron-transfer based mechanisms. *Dalton Transactions* **2014**, 43 (17), 6414-6428.
39. Karns, J. P.; Eliseeva, S. V.; Ward, C. L.; Allen, M. J.; Petoud, S.; Lutter, J. C., Near-Infrared Lanthanide-Based Emission from Fused Bis[Ln(III)/Zn(II) 14-metallacrown-5] Coordination Compounds. *Inorg Chem* **2022**, 61 (15), 5691-5695.
40. Ha-Thi, M.-H.; Delaire, J. A.; Michelet, V.; Leray, I., Sensitized Emission of Luminescent Lanthanide Complexes Based on a Phosphane Oxide Derivative. *The Journal of Physical Chemistry A* **2010**, 114 (9), 3264-3269.
41. Babetto, L.; Carlotto, S.; Carlotto, A.; Rancan, M.; Bottaro, G.; Armelao, L.; Casarin, M., Antenna triplet DFT calculations to drive the design of luminescent Ln³⁺ complexes. *Dalton Transactions* **2020**, 49 (41), 14556-14563.
42. Cosby, A. G.; Woods, J. J.; Nawrocki, P.; Sørensen, T. J.; Wilson, J. J.; Boros, E., Accessing lanthanide-based, in situ illuminated optical turn-on probes by modulation of the antenna triplet state energy. *Chemical Science* **2021**, 12 (27), 9442-9451.
43. Bünzli, J.-C.; Eliseeva, S., Basics of Lanthanide Photophysics. 2010; Vol. 7, pp 1-45.
44. Hasegawa, Y.; Kitagawa, Y.; Nakanishi, T., Effective photosensitized, electrosensitized, and mechanosensitized luminescence of lanthanide complexes. *NPG Asia Materials* **2018**, 10 (4), 52-70.
45. Salerno, E. V.; Carneiro Neto, A. N.; Eliseeva, S. V.; Hernández-Rodríguez, M. A.; Lutter, J. C.; Lathion, T.; Kampf, J. W.; Petoud, S.; Carlos, L. D.; Pecoraro, V. L., Tunable Optical Molecular Thermometers Based on Metallacrowns. *J Am Chem Soc* **2022**, 144 (40), 18259-18271.
46. Heffern, M. C.; Matosziuk, L. M.; Meade, T. J., Lanthanide Probes for Bioresponsive Imaging. *Chemical Reviews* **2014**, 114 (8), 4496-4539.
47. Wang, Y.; Zheng, K.; Song, S.; Fan, D.; Zhang, H.; Liu, X., Remote manipulation of upconversion luminescence. *Chemical Society Reviews* **2018**, 47 (17), 6473-6485.
48. Richardson, F. S., Terbium(III) and europium(III) ions as luminescent probes and stains for biomolecular systems. *Chemical Reviews* **1982**, 82 (5), 541-552.
49. Cho, U.; Chen, J. K., Lanthanide-Based Optical Probes of Biological Systems. *Cell Chemical Biology* **2020**, 27 (8), 921-936.
50. Pershagen, E.; Nordholm, J.; Borbas, K. E., Luminescent Lanthanide Complexes with Analyte-Triggered Antenna Formation. *Journal of the American Chemical Society* **2012**, 134 (24), 9832-9835.
51. Bünzli, J.-C. G.; Piguet, C., Taking advantage of luminescent lanthanide ions. *Chemical Society Reviews* **2005**, 34 (12), 1048-1077.
52. Muller, G., Luminescent chiral lanthanide(III) complexes as potential molecular probes. *Dalton Transactions* **2009**, (44), 9692-9707.
53. Nishioka, T.; Yuan, J.; Yamamoto, Y.; Sumitomo, K.; Wang, Z.; Hashino, K.; Hosoya, C.; Ikawa, K.; Wang, G.; Matsumoto, K., New Luminescent Europium(III) Chelates for DNA Labeling. *Inorganic Chemistry* **2006**, 45 (10), 4088-4096.
54. Guzmán-Méndez, Ó.; González, F.; Bernès, S.; Flores-Álamo, M.; Ordóñez-Hernández, J.; García-Ortega, H.; Guerrero, J.; Qian, W.; Aliaga-Alcalde, N.; Gasque, L., Coumarin Derivative Directly Coordinated to Lanthanides Acts as an Excellent Antenna for UV-Vis and Near-IR Emission. *Inorganic Chemistry* **2018**, 57 (3), 908-911.
55. Monguzzi, A.; Milani, A.; Mech, A.; Brambilla, L.; Tubino, R.; Castellano, C.; Demartin, F.; Meinardi, F.; Castiglioni, C., Predictive modeling of the vibrational quenching in emitting lanthanides complexes. *Synthetic Metals* **2012**, 161 (23), 2693-2699.

1.1. Introducción

56. Ogata, S.; Shimizu, T.; Ishibashi, T.; Ishiyone, Y.; Hanami, M.; Ito, M.; Ishii, A.; Kawaguchi, S.; Sugimoto, K.; Hasegawa, M., Water-soluble lanthanide complexes with a helical ligand modified for strong luminescence in a wide pH region. *New Journal of Chemistry* **2017**, *41* (14), 6385-6394.
57. Hübner, C. G.; Renn, A.; Renge, I.; Wild, U. P., Direct observation of the triplet lifetime quenching of single dye molecules by molecular oxygen. *The Journal of Chemical Physics* **2001**, *115* (21), 9619-9622.
58. Galland, M.; Riobé, F.; Ouyang, J.; Saleh, N.; Pointillart, F.; Dorcet, V.; Le Guennic, B.; Cador, O.; Crassous, J.; Andraud, C.; Monneréau, C.; Maury, O., Helicenic Complexes of Lanthanides: Influence of the f-Element on the Intersystem Crossing Efficiency and Competition between Luminescence and Oxygen Sensitization. *European Journal of Inorganic Chemistry* **2019**, *2019* (1), 118-125.
59. Shavaleev, N. M.; Scopelliti, R.; Gumy, F.; Bünzli, J. C., Benzothiazole- and benzoxazole-substituted pyridine-2-carboxylates as efficient sensitizers of europium luminescence. *Inorg Chem* **2009**, *48* (13), 6178-91.
60. Doffek, C.; Alzakhem, N.; Bischof, C.; Wahsner, J.; Güden-Silber, T.; Lügger, J.; Platas-Iglesias, C.; Seitz, M., Understanding the Quenching Effects of Aromatic C–H- and C–D-Oscillators in Near-IR Lanthanoid Luminescence. *Journal of the American Chemical Society* **2012**, *134* (39), 16413-16423.
61. Lamture, J. B.; Zhou, Z. H.; Kumar, A. S.; Wensel, T. G., Luminescence Properties of Terbium(III) Complexes with 4-Substituted Dipicolinic Acid Analogs. *Inorganic Chemistry* **1995**, *34* (4), 864-869.
62. Yakimanskii, A. V.; Goikhman, M. Y.; Podeshvo, I. V.; Anan'eva, T. D.; Nekrasova, T. N.; Smyslov, R. Y., Luminescence of Ln³⁺ lanthanide complexes in polymer matrices. *Polymer Science Series A* **2012**, *54* (12), 921-941.
63. Parker, D., Excitement in f block : structure, dynamics and function of nine-coordinate chiral lanthanide complexes in aqueous media. *Chemical Society Reviews* **2004**, *33* (3), 156-165.
64. Horrocks, W. D., Jr.; Sudnick, D. R., Lanthanide ion probes of structure in biology. Laser-induced luminescence decay constants provide a direct measure of the number of metal-coordinated water molecules. *Journal of the American Chemical Society* **1979**, *101* (2), 334-340.
65. Supkowski, R. M.; Horrocks, W. D. J., On the determination of the number of water molecules, q, coordinated to europium(III) ions in solution from luminescence decay lifetimes. *Inorganica Chimica Acta* **2002**, *340*, 44-48.
66. Beeby, A.; M. Clarkson, I.; S. Dickens, R.; Faulkner, S.; Parker, D.; Royle, L.; S. de Sousa, A.; A. Gareth Williams, J.; Woods, M., Non-radiative deactivation of the excited states of europium, terbium and ytterbium complexes by proximate energy-matched OH, NH and CH oscillators: an improved luminescence method for establishing solution hydration states. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2* **1999**, (3), 493-504.
67. Hasegawa, M.; Ohmagari, H.; Tanaka, H.; Machida, K., Luminescence of lanthanide complexes: From fundamental to prospective approaches related to water- and molecular-stimuli. *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews* **2022**, *50*, 100484.
68. Mara, D.; Artizzu, F.; Smet, P. F.; Kaczmarek, A. M.; Van Hecke, K.; Van Deun, R., Vibrational Quenching in Near-Infrared Emitting Lanthanide Complexes: A Quantitative Experimental Study and Novel Insights. *Chemistry – A European Journal* **2019**, *25* (69), 15944-15956.
69. Lis, S., Luminescence spectroscopy of lanthanide(III) ions in solution. *Journal of Alloys and Compounds* **2002**, *341* (1), 45-50.
70. Wong, H.-Y.; Lo, W.-S.; Yim, K.-H.; Law, G.-L., Chirality and Chiroptics of Lanthanide Molecular and Supramolecular Assemblies. *Chem* **2019**, *5* (12), 3058-3095.
-

1.1. Introducción

71. Pazos, E.; Vázquez, M. E., Advances in lanthanide-based luminescent peptide probes for monitoring the activity of kinase and phosphatase. *Biotechnology Journal* **2014**, *9* (2), 241-252.
72. Bünzli, J.-C., Lanthanide Luminescent Bioprobes (LLBs). *Chemistry Letters* **2009**, 38.
73. Gudgin Dickson, E. F.; Pollak, A.; Diamandis, E. P., Time-resolved detection of lanthanide luminescence for ultrasensitive bioanalytical assays. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **1995**, *27* (1), 3-19.
74. Szmecinski, H.; Lakowicz, J. R., Sodium Green as a potential probe for intracellular sodium imaging based on fluorescence lifetime. *Anal Biochem* **1997**, *250* (2), 131-8.
75. Agronskaia, A. V.; Tertoolen, L.; Gerritsen, H. C., Fast fluorescence lifetime imaging of calcium in living cells. *J Biomed Opt* **2004**, *9* (6), 1230-7.
76. Sud, D.; Mycek, M. A., Calibration and validation of an optical sensor for intracellular oxygen measurements. *J Biomed Opt* **2009**, *14* (2), 020506.
77. Hanson, K. M.; Behne, M. J.; Barry, N. P.; Mauro, T. M.; Gratton, E.; Clegg, R. M., Two-photon fluorescence lifetime imaging of the skin stratum corneum pH gradient. *Biophys J* **2002**, *83* (3), 1682-90.
78. Wang, X.-d.; Wolfbeis, O. S.; Meier, R. J., Luminescent probes and sensors for temperature. *Chemical Society Reviews* **2013**, *42* (19), 7834-7869.
79. Savitsky, A. P.; Rusanov, A. L.; Zherdeva, V. V.; Gorodnicheva, T. V.; Khrenova, M. G.; Nemukhin, A. V., FLIM-FRET Imaging of Caspase-3 Activity in Live Cells Using Pair of Red Fluorescent Proteins. *Theranostics* **2012**, *2* (2), 215-26.
80. Hinde, E.; Digman, M. A.; Welch, C.; Hahn, K. M.; Gratton, E., Biosensor Förster resonance energy transfer detection by the phasor approach to fluorescence lifetime imaging microscopy. *Microsc Res Tech* **2012**, *75* (3), 271-81.
81. Wallrabe, H.; Periasamy, A., Imaging protein molecules using FRET and FLIM microscopy. *Current Opinion in Biotechnology* **2005**, *16* (1), 19-27.
82. Bui, A. T.; Grichine, A.; Duperray, A.; Lidon, P.; Riobé, F.; Andraud, C.; Maury, O., Terbium(III) Luminescent Complexes as Millisecond-Scale Viscosity Probes for Lifetime Imaging. *Journal of the American Chemical Society* **2017**, *139* (23), 7693-7696.
83. Piguet, C.; G. Bünzli, J.-C., Mono- and polymetallic lanthanide-containing functional assemblies: a field between tradition and novelty. *Chemical Society Reviews* **1999**, *28* (6), 347-358.
84. Chauvin, A. S.; Comby, S.; Baud, M.; De Piano, C.; Duhot, C.; Bünzli, J. C., Luminescent lanthanide helicates self-assembled from ditopic ligands bearing phosphonic acid or phosphoester units. *Inorg Chem* **2009**, *48* (22), 10687-96.
85. Berezhnytska, O. S.; Ivakha, N. B.; Trunova, O. K.; Savchenko, I. O.; Rusakova, N. V., The new nir-emitting compounds based on β -dicarbonyl ligands. *Molecular Crystals and Liquid Crystals* **2018**, *670* (1), 20-30.
86. Petoud, S.; Muller, G.; Moore, E. G.; Xu, J.; Sokolnicki, J.; Riehl, J. P.; Le, U. N.; Cohen, S. M.; Raymond, K. N., Brilliant Sm, Eu, Tb, and Dy Chiral Lanthanide Complexes with Strong Circularly Polarized Luminescence. *Journal of the American Chemical Society* **2007**, *129* (1), 77-83.
87. Moore, E. G.; Samuel, A. P. S.; Raymond, K. N., From Antenna to Assay: Lessons Learned in Lanthanide Luminescence. *Accounts of Chemical Research* **2009**, *42* (4), 542-552.
88. Atkinson, P.; Findlay, K. S.; Kielar, F.; Pal, R.; Parker, D.; Poole, R. A.; Puschmann, H.; Richardson, S. L.; Stenson, P. A.; Thompson, A. L.; Yu, J., Azaxanthenes and azathioxanthenes are effective sensitizers for europium and terbium luminescence. *Organic & Biomolecular Chemistry* **2006**, *4* (9), 1707-1722.
89. Beeby, A.; Faulkner, S.; Parker, D.; Williams, J. A. G., Sensitized luminescence from phenanthridine appended lanthanide complexes: analysis of triplet mediated

1.1. Introducción

energy transfer processes in terbium, europium and neodymium complexes. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2* **2001**, (8), 1268-1273.

90. Isaac, M.; Raibaut, L.; Cepeda, C.; Roux, A.; Boturyn, D.; Eliseeva, S. V.; Petoud, S.; Sénèque, O., Luminescent Zinc Fingers: Zn-Responsive Neodymium Near-Infrared Emission in Water. *Chemistry – A European Journal* **2017**, 23 (46), 10992-10996.

91. Andres, J.; Borbas, K. E., Expanding the Versatility of Dipicolinate-Based Luminescent Lanthanide Complexes: A Fast Method for Antenna Testing. *Inorganic Chemistry* **2015**, 54 (17), 8174-8176.

92. Gunnlaugsson, T.; Stomeo, F., Recent advances in the formation of luminescent lanthanide architectures and self-assemblies from structurally defined ligands. *Org Biomol Chem* **2007**, 5 (13), 1999-2009.

93. Woods, M.; Payne, K. M.; Valente, E. J.; Kucera, B. E.; Young Jr, V. G., Crystal Structures of DOTMA Chelates from Ce³⁺ to Yb³⁺: Evidence for a Continuum of Metal Ion Hydration States. *Chemistry – A European Journal* **2019**, 25 (42), 9997-10005.

94. Andreiadis, E. S.; Imbert, D.; Pécaut, J.; Demadrille, R.; Mazzanti, M., Self-assembly of highly luminescent lanthanide complexes promoted by pyridine-tetrazolate ligands. *Dalton Transactions* **2012**, 41 (4), 1268-1277.

95. Cabral Campello, M. P.; Palma, E.; Correia, I.; Paulo, P. M. R.; Matos, A.; Rino, J.; Coimbra, J.; Pessoa, J. C.; Gambino, D.; Paulo, A.; Marques, F., Lanthanide complexes with phenanthroline-based ligands: insights into cell death mechanisms obtained by microscopy techniques. *Dalton Transactions* **2019**, 48 (14), 4611-4624.

96. Zinna, F.; Di Bari, L., Lanthanide circularly polarized luminescence: bases and applications. *Chirality* **2015**, 27 (1), 1-13.

97. Deng, Y.; Wang, M.; Zhuang, Y.; Liu, S.; Huang, W.; Zhao, Q., Circularly polarized luminescence from organic micro-/nano-structures. *Light: Science & Applications* **2021**, 10 (1), 76.

98. Yuasa, J.; Ohno, T.; Tsumatori, H.; Shiba, R.; Kamikubo, H.; Kataoka, M.; Hasegawa, Y.; Kawai, T., Fingerprint signatures of lanthanide circularly polarized luminescence from proteins covalently labeled with a β -diketonate europium(iii) chelate. *Chemical Communications* **2013**, 49 (41), 4604-4606.

99. Okutani, K.; Nozaki, K.; Iwamura, M., Specific Chiral Sensing of Amino Acids Using Induced Circularly Polarized Luminescence of Bis(diimine)dicarboxylic Acid Europium(III) Complexes. *Inorganic Chemistry* **2014**, 53 (11), 5527-5537.

100. Krinochkin, A. P.; Kopchuk, D. S.; Kim, G. A.; Ganebnykh, I. y. N.; Kovalev, I. S.; Santra, S.; Zyryanov, G. V.; Majee, A.; Rusinov, V. L.; Chupakhin, O. N., Highly-Luminescent DTTA-Appended Water-Soluble Lanthanide Complexes of 4-(Het)aryl-2,2'-bipyridines: Synthesis and Photophysical Properties. *ChemistrySelect* **2019**, 4 (20), 6377-6381.

101. Krinochkin, A. P.; Kopchuk, D. S.; Kim, G. A.; Shevyrin, V. A.; Santra, S.; Rahman, M.; Taniya, O. S.; Zyryanov, G. V.; Rusinov, V. L.; Chupakhin, O. N., Water-soluble luminescent lanthanide complexes based on C6-DTTA-appended 5-aryl-2,2'-bipyridines. *Polyhedron* **2020**, 181, 114473.

102. George, M. R.; Golden, C. A.; Grossel, M. C.; Curry, R. J., Modified dipicolinic acid ligands for sensitization of europium(III) luminescence. *Inorg Chem* **2006**, 45 (4), 1739-44.

103. Gao, H.; Zhang, P.; Guan, T.; Yang, Y.; Chen, M.; Wei, J.; Han, S.; Liu, Y.; Chen, X., Rapid and accurate detection of phosphate in complex biological fluids based on highly improved antenna sensitization of lanthanide luminescence. *Talanta* **2021**, 231, 122243.

104. Nonat, A.; Liu, T.; Jeannin, O.; Camerel, F.; Charbonnière, L. J., Energy Transfer in Supramolecular Heteronuclear Lanthanide Dimers and Application to Fluoride Sensing in Water. *Chemistry – A European Journal* **2018**, 24 (15), 3784-3792.

1.1. Introducción

105. Gunnlaugsson, T.; Harte, A. J.; Leonard, J. P.; Nieuwenhuyzen, M., Delayed lanthanide luminescence sensing of aromatic carboxylates using heptadentate triamide Tb(III) cyclen complexes: the recognition of salicylic acid in water. *Chemical Communications* **2002**, (18), 2134-2135.
106. Chen, P.; Li, Q.; Grindy, S.; Holten-Andersen, N., White-Light-Emitting Lanthanide Metallogels with Tunable Luminescence and Reversible Stimuli-Responsive Properties. *Journal of the American Chemical Society* **2015**, 137 (36), 11590-11593.
107. Singha Mahapatra, T.; Singh, H.; Maity, A.; Dey, A.; Pramanik, S. K.; Suresh, E.; Das, A., White-light-emitting lanthanide and lanthanide-iridium doped supramolecular gels: modular luminescence and stimuli-responsive behaviour. *Journal of Materials Chemistry C* **2018**, 6 (36), 9756-9766.
108. Tao, X.; Chen, X.; Chen, T.; Du, G.; Wang, Y.; Li, Q., Building multi-color emitters with tailored lanthanide-based supramolecular metallogels. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **2022**, 634, 127910.
109. Sutar, P.; Suresh, V. M.; Maji, T. K., Tunable emission in lanthanide coordination polymer gels based on a rationally designed blue emissive gelator. *Chemical Communications* **2015**, 51 (48), 9876-9879.
110. Fueyo-González, F.; Espinar-Barranco, L.; Herranz, R.; Alkorta, I.; Crovetto, L.; Fribourg, M.; Paredes, J. M.; Orte, A.; González-Vera, J. A., Self-Assembled Lanthanide Antenna Glutathione Sensor for the Study of Immune Cells. *ACS Sensors* **2022**, 7 (1), 322-330.
111. Faulkner, S.; Burton-Pye, B. P.; Khan, T.; Martin, L. R.; Wray, S. D.; Skabara, P. J., Interaction between tetrathiafulvalene carboxylic acid and ytterbium DO3A: solution state self-assembly of a ternary complex which is luminescent in the near IR. *Chem Commun (Camb)* **2002**, (16), 1668-9.
112. Kang, J.; Leung, K.; Nah, M.-K.; Jung Sik, S.; Kang, M.-H.; Shong, B.; Kang, J.-G.; Lee, J.; Sohn, Y., Neighbour-sensitized near-infrared emission of new Nd(III) and Er(III) complexes with 1-(anthracene-2-yl)-4,4,4-trifluoro-1,3-butanedione. *New J. Chem.* **2016**, 40, 9702-9710.
113. Fueyo-González, F.; Garcia-Fernandez, E.; Martínez, D.; Infantes, L.; Orte, A.; González-Vera, J. A.; Herranz, R., Smart lanthanide antennas for sensing water. *Chemical Communications* **2020**, 56 (41), 5484-5487.
114. Kawa, M.; Fréchet, J. M. J., Self-Assembled Lanthanide-Cored Dendrimer Complexes: Enhancement of the Luminescence Properties of Lanthanide Ions through Site-Isolation and Antenna Effects. *Chemistry of Materials* **1998**, 10 (1), 286-296.
115. Lo, W. S.; Zhang, J.; Wong, W. T.; Law, G. L., Highly luminescent Sm(III) complexes with intraligand charge-transfer sensitization and the effect of solvent polarity on their luminescent properties. *Inorg Chem* **2015**, 54 (8), 3725-7.
116. Kotova, O.; Comby, S.; Lincheneau, C.; Gunnlaugsson, T., White-light emission from discrete heterometallic lanthanide-directed self-assembled complexes in solution. *Chemical Science* **2017**, 8 (5), 3419-3426.
117. Barry, D. E.; Kitchen, J. A.; Merces, L.; Peacock, R. D.; Albrecht, M.; Gunnlaugsson, T., Chiral luminescent lanthanide complexes possessing strong (samarium, Sm(III)) circularly polarised luminescence (CPL), and their self-assembly into Langmuir-Blodgett films. *Dalton Transactions* **2019**, 48 (30), 11317-11325.
118. Ruggieri, S.; Mizzoni, S.; Nardon, C.; Cavalli, E.; Sissa, C.; Anselmi, M.; Cozzi, P. G.; Gualandi, A.; Sanadar, M.; Melchior, A.; Zinna, F.; Willis, O. G.; Di Bari, L.; Piccinelli, F., Circularly Polarized Luminescence from New Heteroleptic Eu(III) and Tb(III) Complexes. *Inorganic Chemistry* **2023**.
119. Deiters, E.; Gummy, F.; Bünzli, J.-C. G., Acridone-Benzimidazole Ring-Fused Ligands: A New Class of Sensitizers of Lanthanide Luminescence via Low-Energy Excitation. *European Journal of Inorganic Chemistry* **2010**, 2010 (18), 2723-2734.
-

1.1. Introducción

120. Klangwart, N.; Ruijs, C.; Hawes, C. S.; Gunnlaugsson, T.; Kotova, O., Tripodal 1,3,5-benzenetricarboxamide ligand with dipicolinic acid units and its binding with Eu(III) ions. *Supramolecular Chemistry* **2023**, 1-10.
 121. Beck, J. B.; Rowan, S. J., Multistimuli, Multiresponsive Metallo-Supramolecular Polymers. *Journal of the American Chemical Society* **2003**, 125 (46), 13922-13923.
 122. Verma, P.; Singh, A.; Maji, T. K., Photo-modulated wide-spectrum chromism in Eu³⁺ and Eu³⁺/Tb³⁺ photochromic coordination polymer gels: application in decoding secret information. *Chemical Science* **2021**, 12 (7), 2674-2682.
 123. Kotova, O.; Daly, R.; dos Santos, C. M. G.; Boese, M.; Kruger, P. E.; Boland, J. J.; Gunnlaugsson, T., Europium-Directed Self-Assembly of a Luminescent Supramolecular Gel from a Tripodal Terpyridine-Based Ligand. *Angewandte Chemie International Edition* **2012**, 51 (29), 7208-7212.
 124. Sutar, P.; Maji, T. K., Coordination Polymer Gels with Modular Nanomorphologies, Tunable Emissions, and Stimuli-Responsive Behavior Based on an Amphiphilic Tripodal Gelator. *Inorganic Chemistry* **2017**, 56 (16), 9417-9425.
 125. Martínez-Calvo, M.; Kotova, O.; Möbius, M. E.; Bell, A. P.; McCabe, T.; Boland, J. J.; Gunnlaugsson, T., Healable Luminescent Self-Assembly Supramolecular Metallogels Possessing Lanthanide (Eu/Tb) Dependent Rheological and Morphological Properties. *Journal of the American Chemical Society* **2015**, 137 (5), 1983-1992.
 126. Suresh, V. M.; De, A.; Maji, T. K., High aspect ratio, processable coordination polymer gel nanotubes based on an AIE-active LMWG with tunable emission. *Chemical Communications* **2015**, 51 (78), 14678-14681.
 127. Bhowmik, S.; Banerjee, S.; Maitra, U., A self-assembled, luminescent europium cholate hydrogel: a novel approach towards lanthanide sensitization. *Chemical Communications* **2010**, 46 (45), 8642-8644.
 128. Banerjee, S.; Kandanelli, R.; Bhowmik, S.; Maitra, U., Self-organization of multiple components in a steroidal hydrogel matrix: design, construction and studies on novel tunable luminescent gels and xerogels. *Soft Matter* **2011**, 7 (18), 8207-8215.
 129. Bhowmik, S.; Maitra, U., A novel "pro-sensitizer" based sensing of enzymes using Tb(III) luminescence in a hydrogel matrix. *Chemical Communications* **2012**, 48 (38), 4624-4626.
 130. Gorai, T.; Maitra, U., Luminescence Resonance Energy Transfer in a Multiple-Component, Self-Assembled Supramolecular Hydrogel. *Angewandte Chemie International Edition* **2017**, 56 (36), 10730-10734.
 131. Zhang, B.; Dong, X.; Xiong, Y.; Zhou, Q.; Lu, S.; Liao, Y.; Yang, Y.; Wang, H., A heat-set lanthanide metallogel capable of emitting stable luminescence under thermal, mechanical and water stimuli. *Dalton Transactions* **2020**, 49 (9), 2827-2832.
 132. Sebastian, A.; Mahato, M. K.; Prasad, E., A mixed ligand approach towards lanthanide-based gels using citric acid as assembler ligand: white light emission and environmental sensing. *Soft Matter* **2019**, 15 (16), 3407-3417.
 133. Parker, D.; Senanayake, P. K.; Williams, J. A. G., Luminescent sensors for pH, pO₂, halide and hydroxide ions using phenanthridine as a photosensitizer in macrocyclic europium and terbium complexes. *Journal of The Chemical Society-perkin Transactions 1* **1998**, 2129-2140.
 134. Kotova, O.; O'Reilly, C.; Barwich, S. T.; Mackenzie, L. E.; Lynes, A. D.; Savyasachi, A. J.; Ruether, M.; Pal, R.; Möbius, M. E.; Gunnlaugsson, T., Lanthanide luminescence from supramolecular hydrogels consisting of bio-conjugated picolinic-acid-based guanosine quadruplexes. *Chem* **2022**, 8 (5), 1395-1414.
 135. Chauvin, A.-S.; Comby, S.; Baud, M.; De Piano, C.; Duhot, C.; Bünzli, J.-C. G., Luminescent Lanthanide Helicates Self-Assembled from Ditopic Ligands Bearing Phosphonic Acid or Phosphoester Units. *Inorganic Chemistry* **2009**, 48 (22), 10687-10696.
 136. Savyasachi, A. J.; Caffrey, D. F.; Byrne, K.; Tobin, G.; D'Agostino, B.; Schmitt, W.; Gunnlaugsson, T., Self-assembled bright luminescent hierarchical materials from a
-

1.1. Introducción

tripodal benzoate antenna and heptadentate Eu(III) and Tb(III) cyclen complexes. *Frontiers of Chemical Science and Engineering* **2019**, *13* (1), 171-184.

137. Zhou, W.-L.; Dai, X.-Y.; Lin, W.; Chen, Y.; Liu, Y., A pillar[5]arene noncovalent assembly boosts a full-color lanthanide supramolecular light switch. *Chemical Science* **2023**, *14* (23), 6457-6466.

138. Lipchik, A. M.; Parker, L. L., Time-resolved luminescence detection of spleen tyrosine kinase activity through terbium sensitization. *Anal Chem* **2013**, *85* (5), 2582-8.

139. Lipchik, A. M.; Perez, M.; Cui, W.; Parker, L. L., Multicolored, Tb³⁺-Based Antibody-Free Detection of Multiple Tyrosine Kinase Activities. *Anal Chem* **2015**, *87* (15), 7555-8.

140. Lipchik, A. M.; Perez, M.; Bolton, S.; Dumrongprechachan, V.; Ouellette, S. B.; Cui, W.; Parker, L. L., KINATEST-ID: a pipeline to develop phosphorylation-dependent terbium sensitizing kinase assays. *J Am Chem Soc* **2015**, *137* (7), 2484-94.

141. Cui, W.; Parker, L. L., Modular, Antibody-free Time-Resolved LRET Kinase Assay Enabled by Quantum Dots and Tb³⁺-sensitizing Peptides. *Scientific Reports* **2016**, *6* (1), 28971.

142. Tremblay, M. S.; Lee, M.; Sames, D., A Luminescent Sensor for Tyrosine Phosphorylation. *Organic Letters* **2008**, *10* (1), 5-8.

1.2. Objetivos

1.2. Objetivos del Bloque I

1.2.1. Objetivo general

Caracterizar los nuevos colorantes luminiscentes derivados de la quinolin-2(1H)-ona y aplicarlos como antenas de lantánidos biocompatibles capaces de autoensamblarse directamente en disolución acuosa *in vitro* e *in cellulo*.

1.2.2. Objetivos específicos

1. Estudio de las propiedades fotofísicas de los fluoróforos derivados de quinolin-2(1H)-ona (**CAnt** y **PAnt**) en H₂O y en CH₃CN para investigar su posible aplicación como antenas sensibilizadoras de lantánidos.
2. Estudio de los complejos de lantánidos autoensamblables formados por las antenas derivadas de la quinolin-2(1H)-ona (**CAnt** y **PAnt**) y los lantánidos Tb³⁺, Dy³⁺, Sm³⁺ y Eu³⁺ en disolución acuosa, mediante la realización de cribados y valoraciones utilizando la espectroscopía de fluorescencia en estado estacionario y la espectroscopía de fosforescencia resuelta en el tiempo.
3. Obtención de la emisión de luz blanca en disolución acuosa y en geles de agarosa mediante el ajuste de los componentes (antena **PAnt**, Tb³⁺ y Eu³⁺) de los complejos de lantánidos estudiados.
4. Aplicación de los complejos de lantánidos estudiados como sondas intracelulares para bioimagen mediante microscopía PLIM, así como para la obtención de luz blanca *in cellulo* mediante microscopía PLIM.

1.3. Resultados

1.3. Resultados del Bloque I

Este capítulo del Bloque I se centra en el desarrollo de nuevas antenas de lantánidos biocompatibles capaces de autoensamblarse directamente con el metal en disolución acuosa. Para ello, en el grupo de la Dra. Rosario Herranz del Instituto de Química Médica del CSIC en Madrid, se preparó el ácido carboxílico **CAnt** derivado de la quinolin-2(1H)-ona (ácido 8-metoxi-2-oxo-1,2,4,5-tetrahidrociclopenta[de]quinolina-3-carboxílico, Figura I.23). Además, con el objetivo de incrementar la afinidad por los Ln^{3+} , se preparó el compuesto derivado de ácido fosfónico **PAnt** (ácido 8-metoxi-2-oxo-1,2,4,5-tetrahidrociclopenta[de]quinolina-3-fosfónico, Figura I.23) en el que el grupo carboxílico se sustituyó por un grupo fosfónico. Los nuevos luminóforos se han empleado exitosamente para la obtención de luz blanca en disolución acuosa y en geles de agarosa, así como en bioimagen como sondas intracelulares.

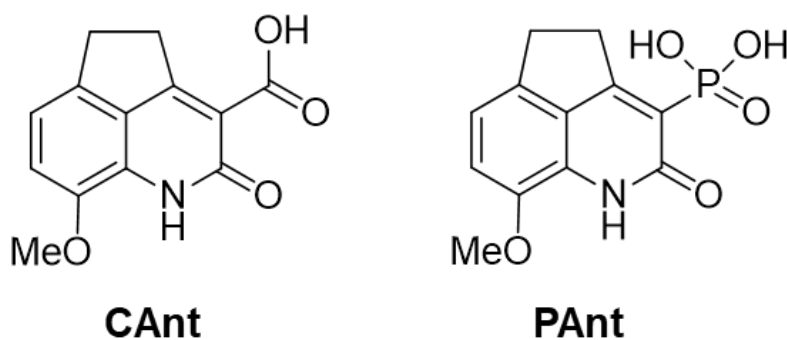


Figura I.23. Estructura de los compuestos **CAnt** y **PAnt**.

1.3.1. Propiedades fotofísicas de CAnt y PAnt

En primer lugar, se llevó a cabo la determinación de las propiedades fotofísicas de **CAnt** y **PAnt** en H₂O y en un disolvente orgánico como el CH₃CN. Así, los espectros de absorción (UV-Vis) mostraron que **CAnt** y **PAnt** presentaban dos máximos de absorción similares tanto en H₂O (a 320 y 373 nm para **CAnt** y a 310 y 345 nm para **PAnt**) como en CH₃CN (a 320 y 375 nm para **CAnt** y a 310 y 350 nm para **PAnt**) (Figura I.24 y Tabla I.1). Los espectros de emisión de fluorescencia mostraron, sin embargo, que tanto **CAnt** como **PAnt** presentaban un único máximo de emisión ($\lambda_{\text{ex}} = 320$ nm), en la región azul del espectro visible (Figura I.24 y Tabla I.1). Dado que las dos bandas de absorción están bien discriminadas, fue posible asignarlas a dos posibles transiciones desde el estado electrónico fundamental singlete (S_0) al estado electrónico S_1 o S_2 : $S_0 \rightarrow S_1$ o $S_0 \rightarrow S_2$. Además, la presencia de una única banda de emisión independiente de la longitud de onda de excitación confirmó la emisión directa desde el primer estado singlete excitado (S_1).

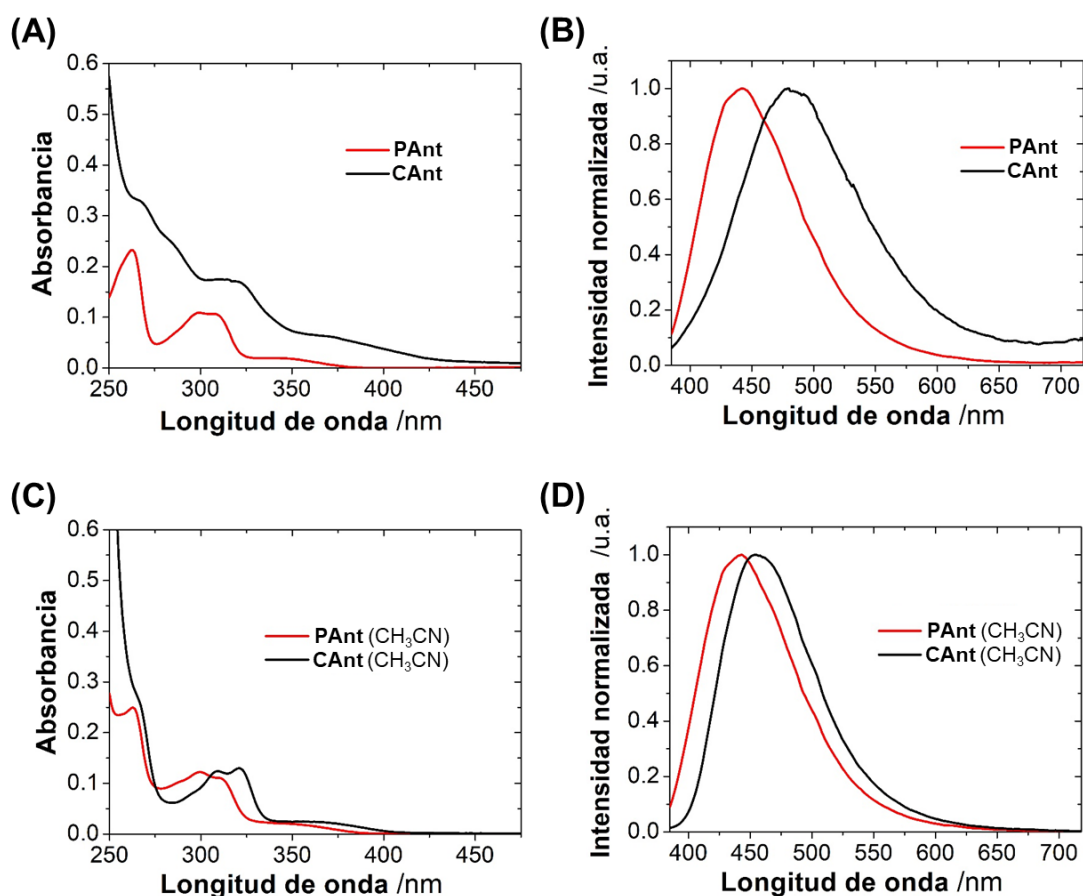


Figura I.24. Espectros de absorción (A) y de emisión de fluorescencia (B) de **CAnt** y **PAnt** en H₂O y espectros de absorción (C) y de emisión de fluorescencia (D) de **CAnt** y **PAnt** en CH₃CN.

1.3. Resultados

Los coeficientes de extinción molar (ϵ) de **CAnt** y **PAnt** fueron del orden de 10^3 tanto en H_2O como en CH_3CN (Tabla I.1). Los ϵ de **PAnt** resultaron ser mayores que los de **CAnt** en ambos disolventes. Estos valores se encuentran dentro del mismo rango que los ϵ de otras antenas de Ln^{3+} descritas en la bibliografía.^{1,2,3,4} Asimismo, los rendimientos cuánticos de fluorescencia (Φ_F) de **CAnt** y **PAnt** fueron mayores en H_2O que en CH_3CN , siendo similares a los descritos en la bibliografía para otros derivados de quinolin-2(1H)-onas.⁵

Tabla I.1. Propiedades fotofísicas de los compuestos **CAnt** y **PAnt**.

Compuesto ^a	Disolvente	λ_{abs}^{max} /nm	ϵ / $M^{-1}cm^{-1}$	λ_{em}^{max} /nm	Φ_F^b
CAnt ^c	CH_3CN	320, 375	4720	450	0.09
	H_2O	320, 373	5451	472	0.11
PAnt	CH_3CN	310, 350	9329	436	0.08
	H_2O	310, 345	8434	441	0.14

^a Medido por duplicado a una concentración de 167 μM para el compuesto **CAnt** y de 29 μM para el compuesto **PAnt**. ^b Los rendimientos cuánticos se calcularon utilizando como referencia sulfato de quinina (en H_2SO_4 , 0.1 M). ^c Valores obtenidos de la referencia ⁶.

1.3.2. Complejos de lantánidos autoensamblables basados en CAnt y PAnt

Los rangos de energía de los espectros de absorción y de emisión de **CAnt** y **PAnt** indicaban que ambos compuestos podrían ser candidatos a antenas de lantánidos.^{7,8,9,6} Para confirmarlo, en primer lugar, se realizó un cribado para determinar si **CAnt** y **PAnt** eran capaces de sensibilizar la luminiscencia de los lantánidos con emisión en el visible Tb^{3+} , Eu^{3+} , Sm^{3+} y Dy^{3+} . Para ello se emplearon los compuestos **CAnt** y **PAnt** ($54 \mu M$) y 1 o 2 equivalentes de $TbCl_3$, $SmCl_3$, $DyCl_3$ y $EuCl_3$ en disolución acuosa con tampón HEPES (1 mM) a pH 7.4. Como se muestra en la Figura I.25, se observó que **CAnt** era capaz de sensibilizar exclusivamente la luminiscencia del Tb^{3+} , mientras que **PAnt** era capaz de mostrar una notable emisión fotoluminiscente tanto para el Eu^{3+} como para el Tb^{3+} (Figura I.26).

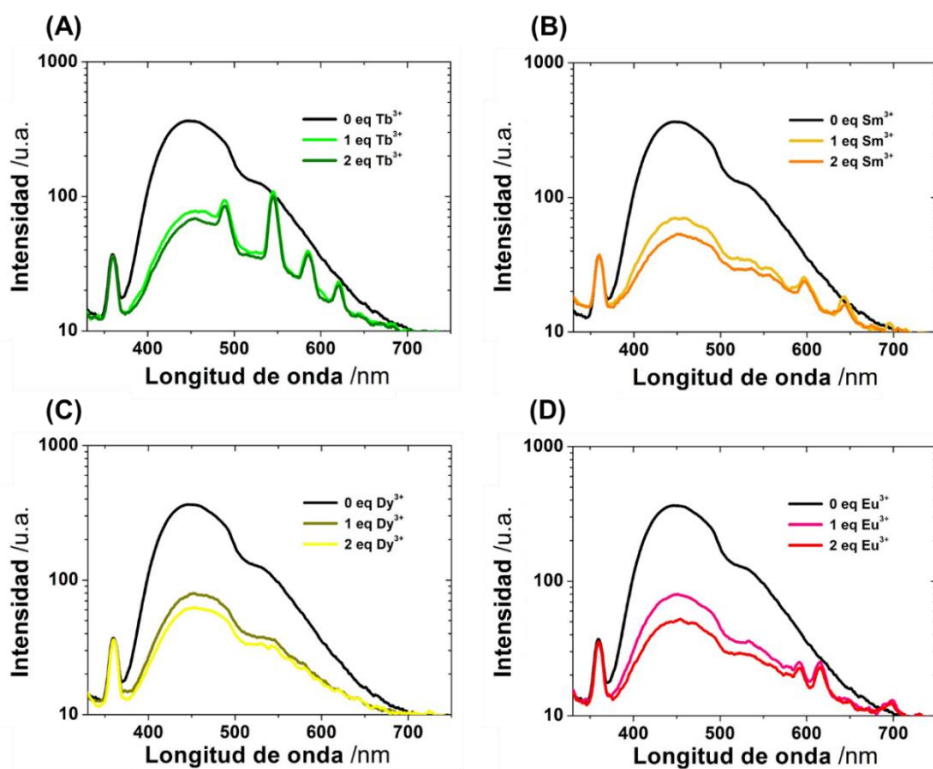


Figura I.25. Espectros de emisión de luminiscencia en estado estacionario ($\lambda_{ex} = 320 \text{ nm}$) de **CAnt** ($54 \mu M$), y tras la adición de 1 y 2 equivalentes de $TbCl_3$ (A), $SmCl_3$ (B), $DyCl_3$ (C) y $EuCl_3$ (D), en tampón HEPES (1 mM) a pH 7.4.

1.3. Resultados

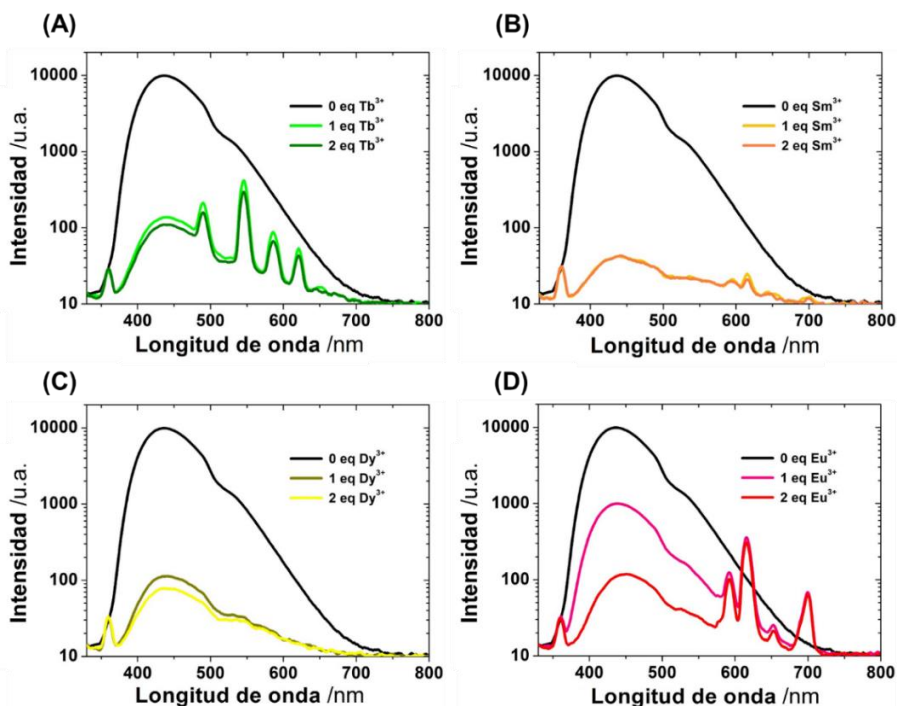


Figura I.26. Espectros de emisión de luminiscencia en estado estacionario ($\lambda_{ex} = 320$ nm) de **PANT** (54 μ M), y tras la adición de 1 y 2 equivalentes de TbCl₃ (A), SmCl₃ (B), DyCl₃ (C) y EuCl₃ (D), en tampón HEPES (1 mM) a pH 7.4.

A continuación, se estudió la estabilidad y estequiometría de los complejos formados por **PANT** y Eu³⁺, **PANT** y Tb³⁺ y **CANT** y Tb³⁺. Para ello se llevaron a cabo diferentes valoraciones directas e inversas en disolución acuosa con tampón HEPES (1 mM) a pH 7.4. En las valoraciones directas la antena permanecía a una concentración fija y el Ln³⁺ se iba adicionando a diferentes concentraciones, mientras que en las valoraciones inversas el Ln³⁺ permanecía a una concentración fija y la antena se adicionaba a diferentes concentraciones. La Figura I.27 muestra los espectros de emisión de luminiscencia en estado estacionario de las valoraciones directas realizadas con concentraciones fijas de **PANT** (54 μ M, 43 μ M o 27 μ M) a las que se añadieron concentraciones crecientes de EuCl₃, que variaban desde 0 hasta 4.5 equivalentes. La formación del complejo autoensamblado entre **PANT** y los iones Eu³⁺ se puso de manifiesto como resultado del quenching en la emisión de la antena a 445 nm debido a la transferencia de energía (99.6 \pm 0,1% de eficacia de quenching con 2 equivalentes de Eu³⁺ añadidos), así como por la aparición de las típicas bandas definidas y estrechas de emisión de la luminiscencia roja del Eu³⁺, con un máximo a 616 nm. Esta banda corresponde a la transición ⁵D₀ \rightarrow ⁷F₂ del Eu³⁺. Para visualizar tanto la contribución de la antena como la emisión sensibilizada de los Ln³⁺, se seleccionó la escala logarítmica en todas las representaciones gráficas mostradas.

1.3. Resultados

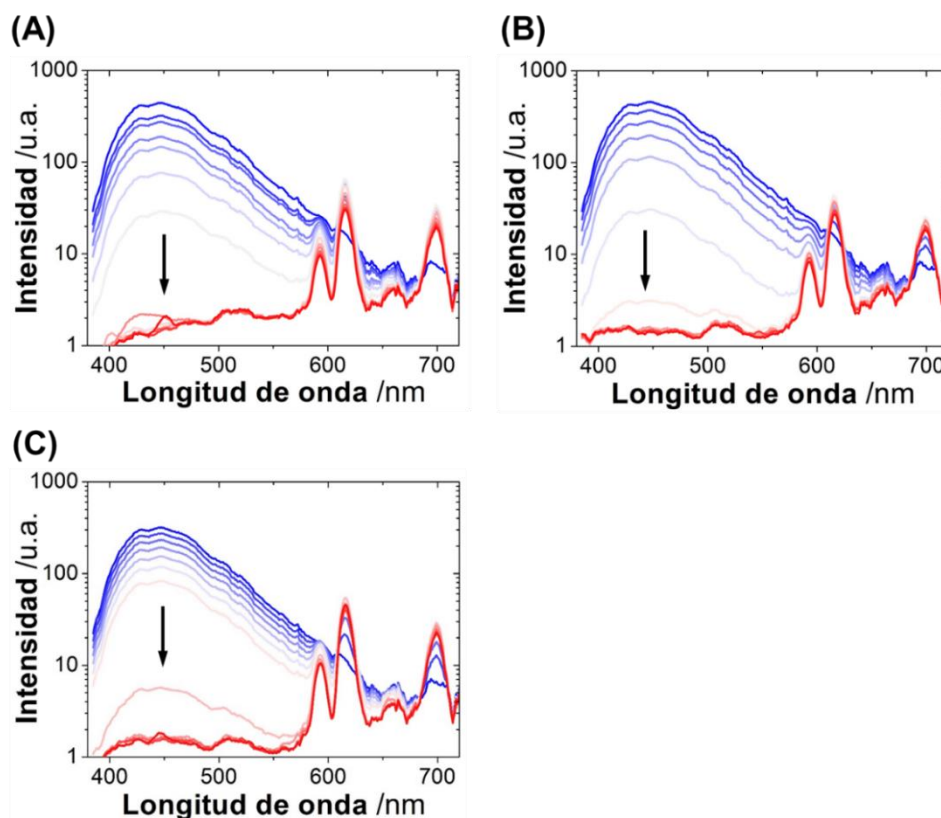


Figura I.27. Espectros de emisión de luminiscencia en estado estacionario ($\lambda_{\text{ex}} = 320 \text{ nm}$) de las valoraciones directas de **PAnt** a $54 \mu\text{M}$ (A), $43 \mu\text{M}$ (B) o $27 \mu\text{M}$ (C), con concentraciones crecientes de EuCl_3 (desde 0 hasta 4.5 equivalentes). Las flechas negras indican concentraciones crecientes de Eu^{3+} .

En las valoraciones inversas se añadieron concentraciones crecientes de **PAnt** (desde 0 hasta 4.5 equivalentes) a concentraciones fijas de EuCl_3 (54 , 43 o $27 \mu\text{M}$) (Figura I.28). En estos casos, conforme aumentaba la concentración de **PAnt**, se hacía más evidente la aparición de la emisión de la antena a 445 nm , cuya contribución modificaba la forma de las bandas de emisión de luminiscencia del Eu^{3+} .

1.3. Resultados

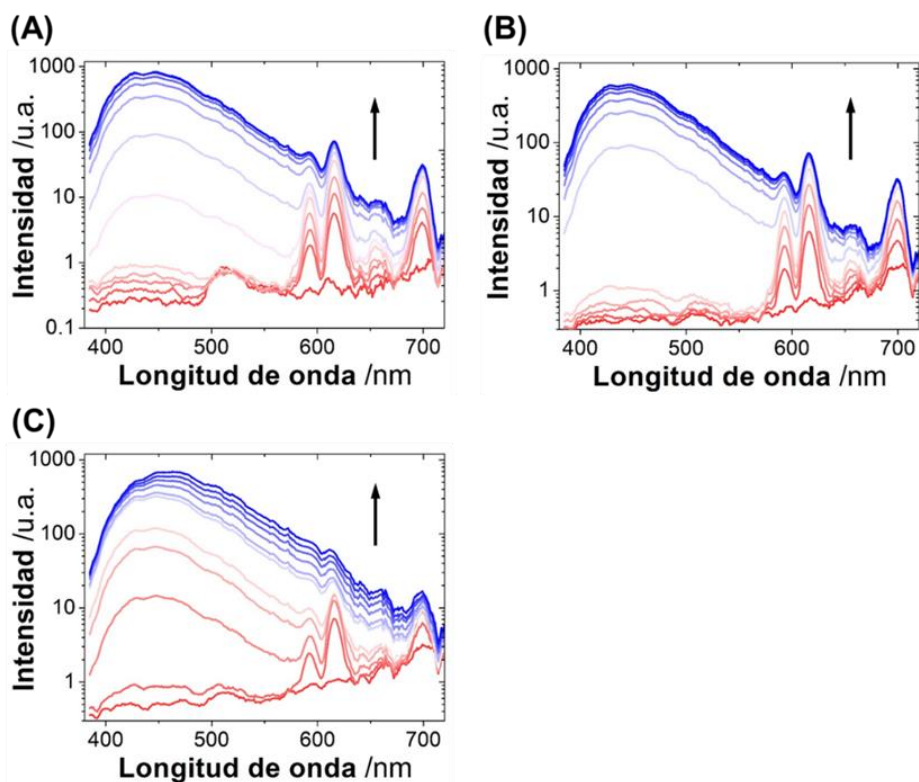


Figura 1.28. Espectros de emisión de luminiscencia en estado estacionario ($\lambda_{\text{ex}} = 320 \text{ nm}$) de las valoraciones inversas de EuCl_3 a $54 \mu\text{M}$ (A), $43 \mu\text{M}$ (B) o $27 \mu\text{M}$ (C), con concentraciones crecientes de **PAnt** (desde 0 hasta 4.5 equivalentes). Las flechas negras indican concentraciones crecientes de Eu^{3+} .

Los resultados de las valoraciones directas e inversas demostraron la transferencia efectiva de energía producida entre la antena y el Eu^{3+} . Para el análisis de las curvas de valoración centramos nuestra atención en las propiedades de emisión duales de los complejos. Para ello, empleamos la relación de intensidades I_{616}/I_{445} correspondientes a la emisión de fluorescencia de la antena en el azul a 445 nm y la emisión sensibilizada del Eu^{3+} en el rojo a 616 nm . Esto nos permitió disponer de un parámetro normalizado para estudiar la formación de los complejos emisivos, ya que esta relación refleja simultáneamente la eficiencia del quenching de la emisión de la antena, la transferencia de energía, la sensibilización del Ln^{3+} y la subsiguiente emisión fotoluminiscente. Las Figuras I.29A y I.29B muestran la relación de intensidades I_{616}/I_{445} en las valoraciones directas e inversas, respectivamente. Las valoraciones directas con EuCl_3 a concentraciones fijas de **PAnt** muestran un incremento de la relación I_{616}/I_{445} con el aumento de la concentración subequimolar del ion hasta una estequiometría 1:1. Después, se produce un cambio en la pendiente de crecimiento, mostrando un marcado aumento hasta la saturación a una proporción de 1.5:1 ($\text{Eu}^{3+}:\text{PAnt}$). Asimismo, la adición suplementaria de Eu^{3+} da lugar a una disminución de la relación I_{616}/I_{445} .

1.3. Resultados

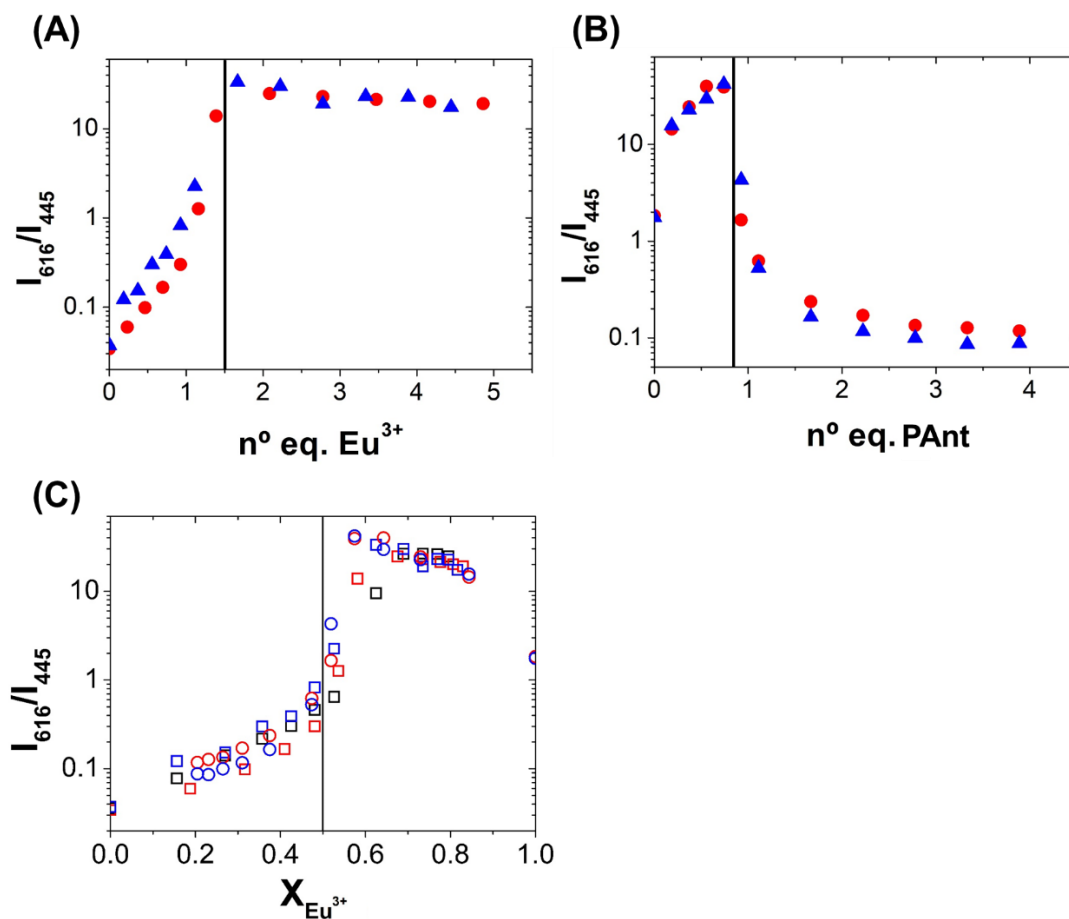


Figura I.29. (A) Relación de intensidades I_{616}/I_{445} de las valoraciones directas de **PAnt** a 54 μM (triángulos azules) o 43 μM (círculos rojos) con Eu^{3+} . (B) Relación de intensidades I_{616}/I_{445} de las valoraciones inversas de Eu^{3+} a 54 μM (triángulos azules) o 43 μM (círculos rojos) con **PAnt**. (C) Gráfico de Job de la relación de intensidades I_{616}/I_{445} en función de la fracción molar de Eu^{3+} a partir de las valoraciones directa (cuadrados) e inversa (círculos) de **PAnt** con EuCl_3 a diferentes concentraciones fijas de **PAnt** o de EuCl_3 (54 μM , azul; 43 μM , rojo; y 27 μM , negro).

1.3. Resultados

Las valoraciones inversas muestran que a medida que aumenta la concentración de **PAnt**, la emisión del Eu^{3+} aumenta hasta aproximadamente una adición equivalente del compuesto **PAnt**. Análogamente a las valoraciones directas, una adición suplementaria de **PAnt** da lugar a una marcada disminución de la relación I_{616}/I_{445} . Consecuentemente, los puntos de datos obtenidos tanto para las titulaciones directas como para las inversas coinciden perfectamente entre sí, como se muestra en el gráfico de Job (Figura I.29C), lo que indica que se alcanza el equilibrio completo del sistema durante las mediciones. El comportamiento anterior se puede justificar de la siguiente manera: cuando hay un exceso de Eu^{3+} , el hecho de que más del 99% de la emisión del compuesto **PAnt** esté atenuada indica tanto una coordinación efectiva en agua como una adecuada transferencia de energía. Asimismo, el exceso estequiométrico del compuesto **PAnt** da lugar claramente a una menor relación I_{616}/I_{445} , lo que indica la presencia de antenas libres. En los regímenes de concentración estudiados no pudimos descartar la existencia de estequiometrías superiores que incluyeran más de una única antena en la esfera de coordinación del lantánido. Estas especies aumentarían aún más la emisión fotoluminiscente del Eu^{3+} al proteger adicionalmente al lantánido del quenching por H_2O .¹⁰ Para comprobar la posible presencia de estequiometrías superiores empleamos la espectroscopía de fosforescencia en las valoraciones directas (Figura I.30). De esta forma, la emisión de la antena se elimina al aplicar una ventana temporal de detección retardada, dejando sólo las emisiones sensibilizadas de los Ln^{3+} . Para ello se añadieron concentraciones crecientes de Eu^{3+} (de 0 a 5 equivalentes) a concentraciones fijas de **PAnt** (54, 43 o 27 μM) en disolución acuosa con tampón HEPES (1 mM) a pH 7.4.

1.3. Resultados

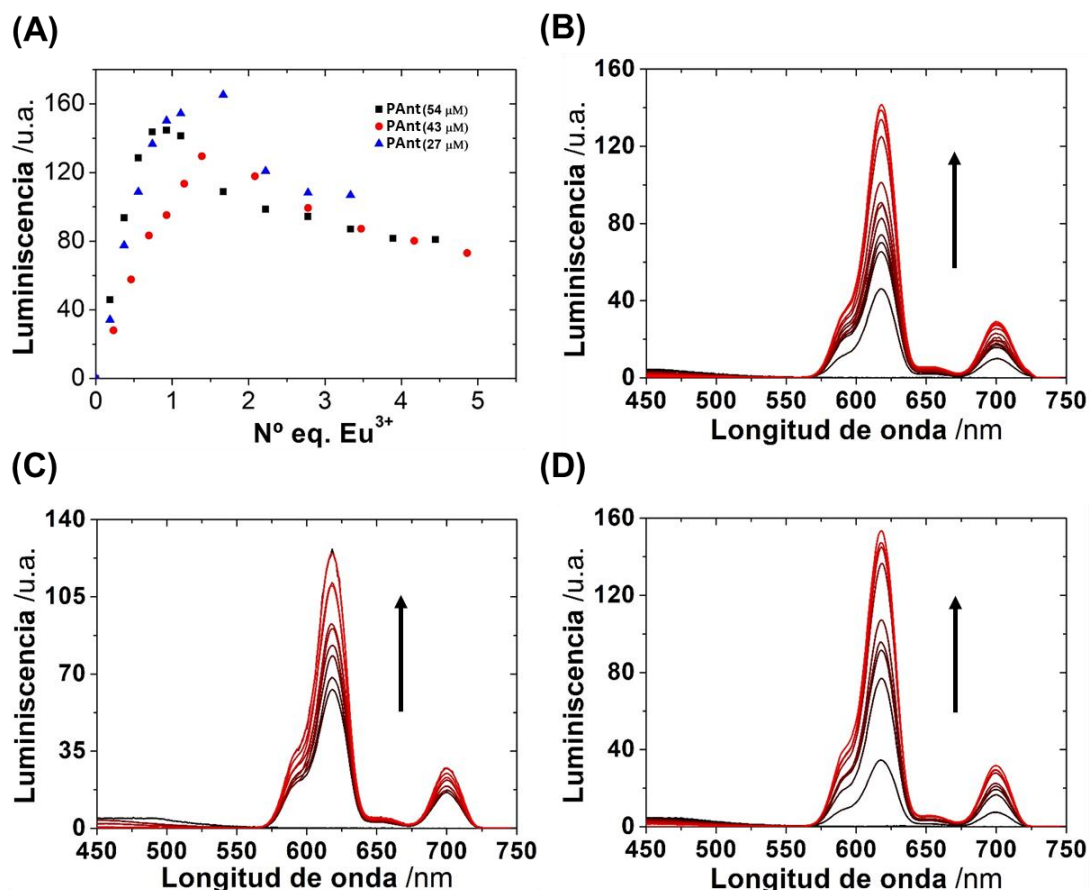


Figura I.30. Valoraciones de **PAnt** con EuCl_3 medidas mediante espectroscopía de fosforescencia con ventana temporal. (A) Intensidad de luminiscencia a 616 nm de la emisión sensibilizada del Eu^{3+} ($\lambda_{\text{ex}} = 320$ nm) a diferentes concentraciones fijas de **PAnt** (54 μM , cuadrados negros; 43 μM , círculos rojos y 27 μM , triángulos azules) y concentraciones crecientes de EuCl_3 de 0 a 5 equivalentes. (B-D) Espectros de fosforescencia con ventana temporal de las valoraciones de **PAnt** a diferentes concentraciones fijas (54 μM , (B); 43 μM , (C) y 27 μM , (D)) con concentraciones crecientes de EuCl_3 , de 0 a 5 equivalentes. Las flechas indican concentraciones eq. crecientes de EuCl_3 .

Los resultados de las valoraciones directas obtenidas mediante espectroscopía de fosforescencia se encuentran en consonancia con los mostrados en la Figura I.29. Así, existe un pico en la emisión del Eu^{3+} (analizada a 616 nm, Figura I.30A) cuando la proporción es 1.5:1, mientras que un exceso de Eu^{3+} produce una disminución de la emisión fotoluminiscente. Esto sugiere que, efectivamente, se forman complejos con estequiometrías superiores formados por varias antenas y un único ion Eu^{3+} . Sin embargo, un exceso de iones Eu^{3+} desplaza probablemente los equilibrios de complejación hacia una estequiometría de 1:1 Eu^{3+} :**PAnt**, que es un complejo menos emisivo.

1.3. Resultados

Por otro lado, para evaluar la estabilidad y estequiometría de los complejos formados por **PAnt** y Tb^{3+} se llevaron a cabo valoraciones directas e inversas de forma análoga a las descritas con Eu^{3+} . En la Figura I.31 (valoraciones directas) se observa como a medida que aumenta la concentración de Tb^{3+} añadida (de 0 hasta 4.5 equivalentes) a concentraciones fijas de **PAnt** (54, 43 o 27 μM), la señal de la antena a 445 nm se atenúa y las bandas de emisión de luminiscencia del Tb^{3+} se intensifican.

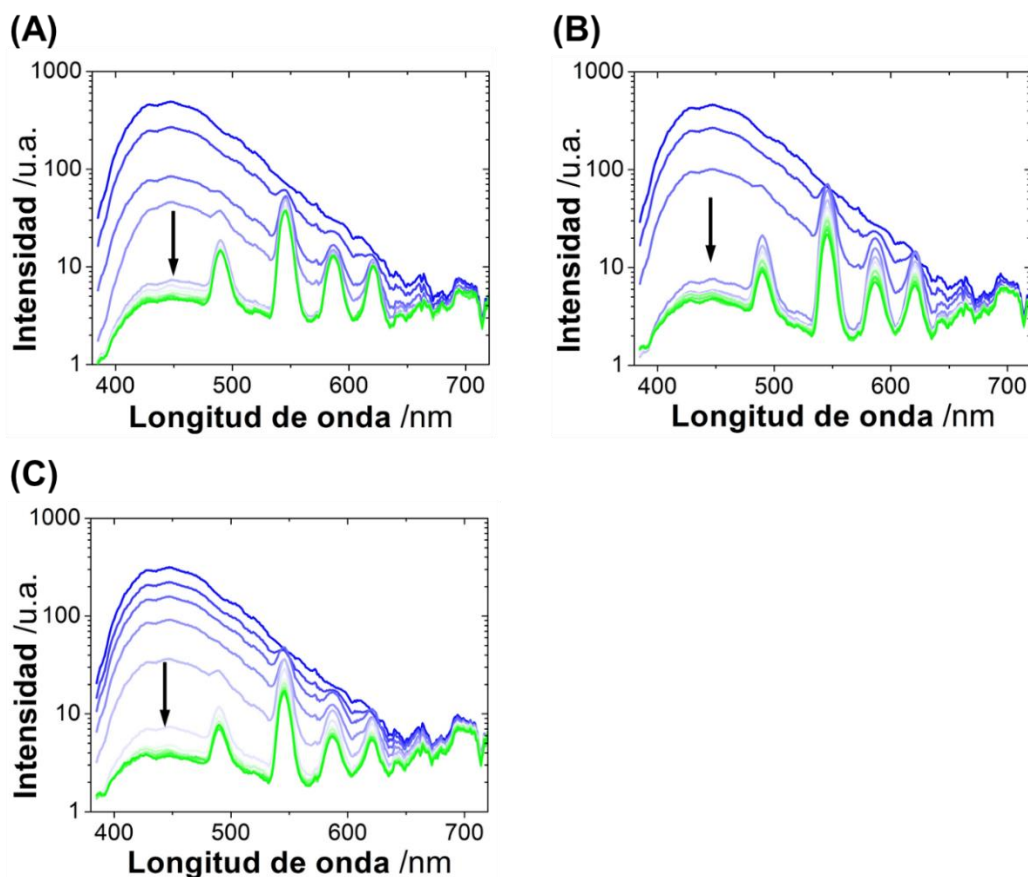


Figura I.31. Espectros de emisión de luminiscencia en estado estacionario ($\lambda_{ex} = 320$ nm) de las valoraciones directas de **PAnt** a 54 μM (A), 43 μM (B) o 27 μM (C), con concentraciones crecientes de $TbCl_3$ representadas por flechas negras (desde 0 hasta 4.5 equivalentes).

Asimismo, en las gráficas de las valoraciones inversas (Figura I.32) se puede apreciar como a medida que se añade más concentración de **PAnt** (de 0 hasta 4.5 equivalentes) a concentraciones fijas de Tb^{3+} (54, 43 o 27 μM) la señal de la antena a 445 nm aumenta y las señales de emisión del Tb^{3+} disminuyen.

1.3. Resultados

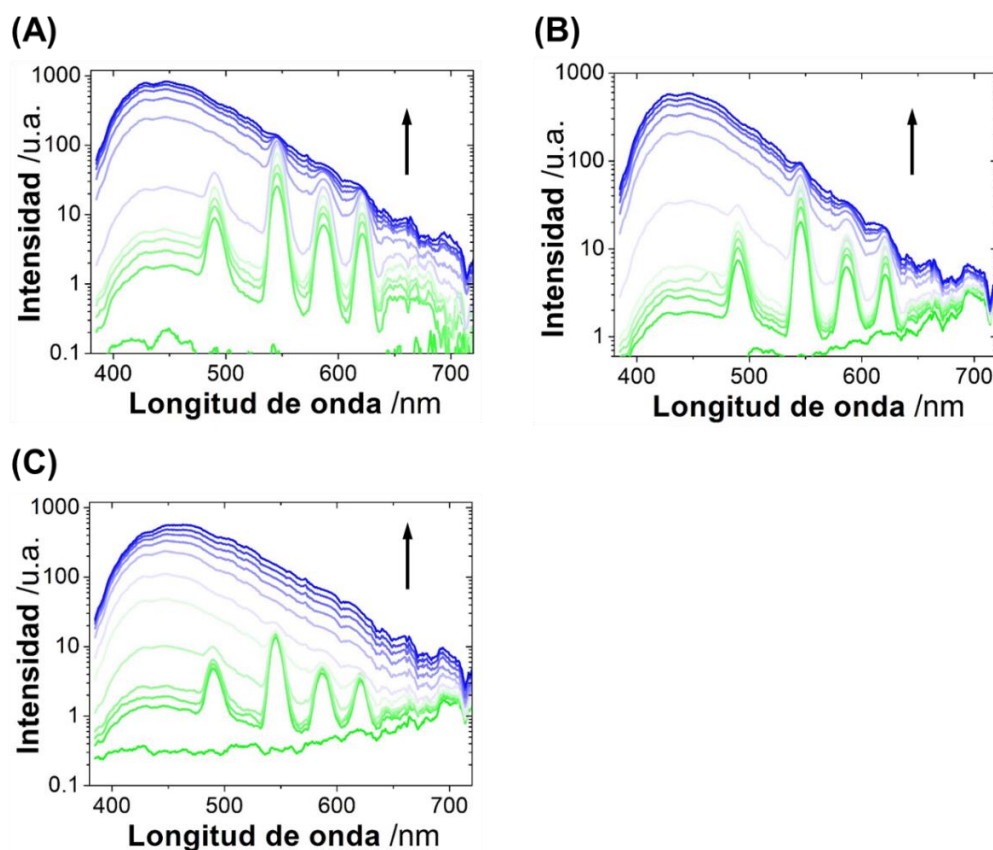


Figura I.32. Espectros de emisión de luminiscencia en estado estacionario ($\lambda_{\text{ex}} = 320 \text{ nm}$) de las valoraciones inversas de TbCl_3 a $54 \mu\text{M}$ (A), $43 \mu\text{M}$ (B) o $27 \mu\text{M}$ (C), con concentraciones crecientes de **PAnt** representadas por flechas negras (desde 0 hasta 4.5 equivalentes).

Para el análisis de las curvas de valoración, en este caso empleamos la relación de intensidades I_{545}/I_{445} correspondientes a la emisión de la antena (445 nm) y a la emisión del Tb^{3+} en el verde a 545 nm. En el análisis de las curvas de valoración directas (Figura I.33A) la emisión del Tb^{3+} se saturó a una estequiometría de aproximadamente 1:1. Sin embargo, en este caso un exceso de Tb^{3+} no provocó una disminución de los valores de la relación I_{545}/I_{445} . Por otro lado, en el análisis de las curvas de valoración inversas se produce una disminución de la relación I_{545}/I_{445} a una estequiometría 1:1, indicando la presencia de antenas libres cuando existe un exceso de **PAnt** (Figura I.33B). Estos resultados indican que la estequiometría más probable para el complejo $\text{Tb}^{3+}:\text{PAnt}$ es 1:1. Los puntos de datos obtenidos tanto para las titulaciones directas como para las inversas coincidieron entre sí de forma similar a la ocurrida con los complejos de **PAnt** y Eu^{3+} (Figura I.33C). Este hecho indica que durante las medidas se alcanzó el equilibrio completo del sistema.

1.3. Resultados

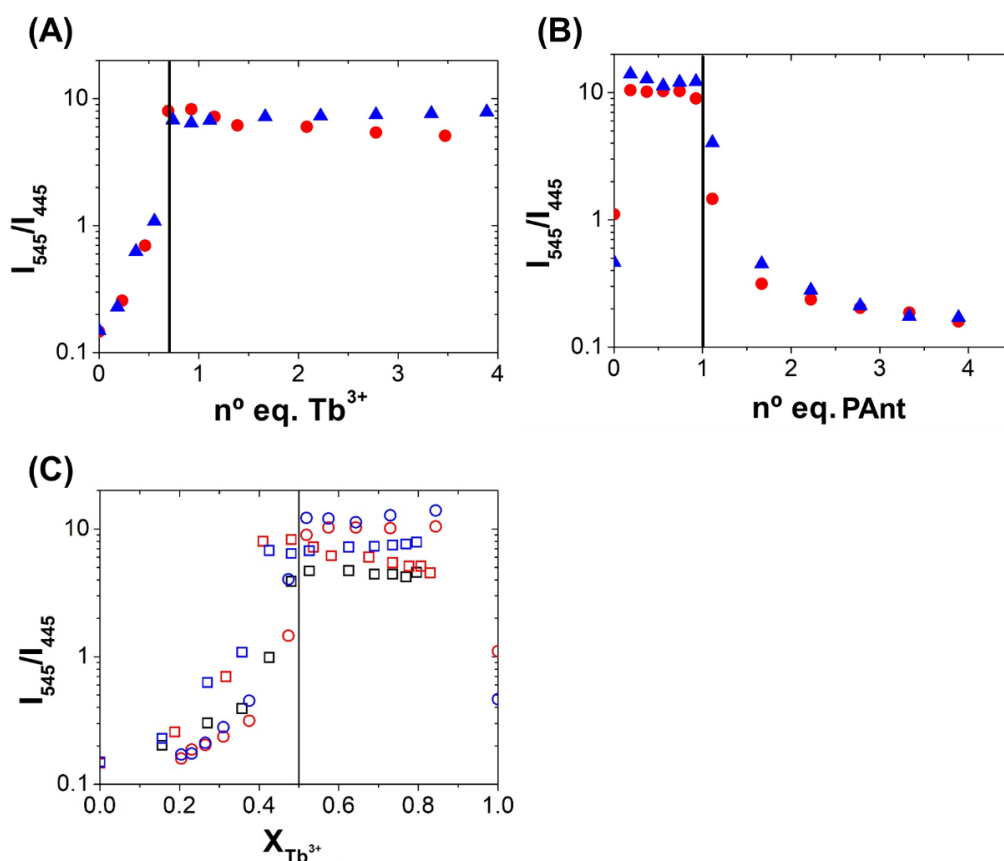


Figura I.33. (A) Relación de intensidades I_{545}/I_{445} de las valoraciones directas de **PAnt** a 54 μM (triángulos azules) o 43 μM (círculos rojos) con Tb^{3+} . (B) Relación de intensidades I_{545}/I_{445} de las valoraciones inversas de Tb^{3+} a 54 μM (triángulos azules) o 43 μM (círculos rojos) con **PAnt**. (C) Gráfico de Job de la relación de intensidades I_{545}/I_{445} en función de la fracción molar de Tb^{3+} a partir de las valoraciones directas (cuadrados) e inversas (círculos) de **PAnt** con TbCl_3 a diferentes concentraciones fijas de **PAnt** o de TbCl_3 (54 μM , azul; 43 μM , rojo; y 27 μM , negro).

Para comprobar que la estequiometría de los complejos $\text{Tb}^{3+}:\text{PAnt}$ era 1:1, empleamos la espectroscopía de fosforescencia en las valoraciones directas, analizando la emisión del Tb^{3+} a 545 nm con ventana temporal (Figura I.34A). Para ello se añadieron concentraciones crecientes de Tb^{3+} (de 0 a 5 equivalentes) a concentraciones fijas de **PAnt** (54, 43 o 27 μM). Se observó que esta señal era creciente hasta aproximadamente 3.5 equivalentes de Tb^{3+} añadidos. Estos resultados sugieren que la estequiometría más probable de estos complejos era de 1:1 para las concentraciones estudiadas.

1.3. Resultados

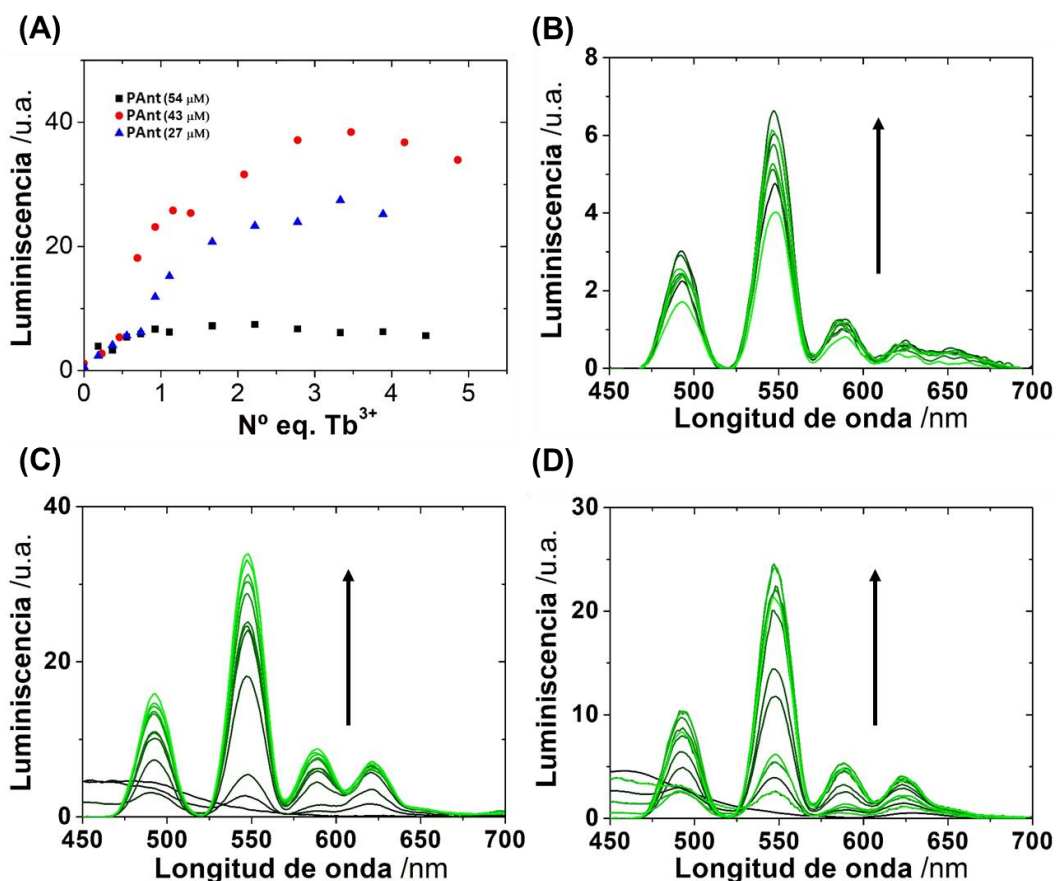


Figura I.34. Valoraciones de **PAnt** con TbCl_3 medidas mediante espectroscopía de fosforescencia con ventana temporal. (A) Intensidad de fosforescencia a 545 nm de la emisión sensibilizada del Tb^{3+} ($\lambda_{\text{ex}} = 320$ nm) a diferentes concentraciones fijas de **PAnt** (54 μM , cuadrados negros; 43 μM , círculos rojos y 27 μM , triángulos azules) y concentraciones crecientes de TbCl_3 de 0 a 5 equivalentes. (B-D) Espectros de fosforescencia con ventana temporal de las valoraciones de **PAnt** a diferentes concentraciones fijas (54 μM , (B); 43 μM , (C) y 27 μM , (D)) con concentraciones crecientes de TbCl_3 de 0 a 5 equivalentes. Las flechas indican concentraciones crecientes de TbCl_3 .

El punto medio de las curvas de valoración se puede utilizar como una estimación aproximada de la estabilidad de los complejos autoensamblados. Los valores de los puntos medios de las curvas de valoración medidas en estado estacionario obtenidos mediante ajuste empleando la ecuación de Hill fueron de $52 \pm 8 \mu\text{M}$ y $26 \pm 7 \mu\text{M}$ para los complejos $\text{Eu}^{3+}:\text{PAnt}$ y $\text{Tb}^{3+}:\text{PAnt}$, respectivamente. También obtuvimos los valores de τ_L de los complejos $\text{Eu}^{3+}:\text{PAnt}$ y $\text{Tb}^{3+}:\text{PAnt}$. Para ello medimos por triplicado los τ_L de los complejos, añadiendo a la antena 1 y 2 equivalentes de Eu^{3+} o Tb^{3+} en disolución acuosa con HEPES 1mM a pH 7.4. Los valores medios de τ_L obtenidos fueron de 0.307 ± 0.007 ms para los complejos $\text{Eu}^{3+}:\text{PAnt}$ y de 0.117 ± 0.003 ms para los complejos $\text{Tb}^{3+}:\text{PAnt}$.

1.3. Resultados

El estudio de las interacciones entre el compuesto **CAnt** y los iones Tb^{3+} mediante valoraciones directas e inversas también mostró la formación de complejos autoensamblados en disolución acuosa dando lugar a una emisión luminiscente sensibilizada del Tb^{3+} . La Figura I.35 muestra los espectros de emisión de luminiscencia en estado estacionario de las valoraciones directas en disolución acuosa con tampón HEPES (1 mM) a pH 7.4 realizadas con concentraciones fijas de **CAnt** (54 o 43 μM) a las que se añadieron concentraciones crecientes de $TbCl_3$, que variaban desde 0 hasta 8.5 equivalentes. En este caso se observó como a medida que avanzaban las valoraciones, la intensidad correspondiente a la antena (señal a 450 nm) se atenuaba mientras que la señal luminiscente del Tb^{3+} se incrementaba, indicando así una sensibilización efectiva del lantánido. Las relaciones de intensidades I_{545}/I_{450} correspondientes a las valoraciones directas (Figura I.35C) mostraron un aumento continuo durante toda la valoración, indicando la formación del complejo emisor $Tb^{3+}:\text{CAnt}$ sin alcanzar la saturación.

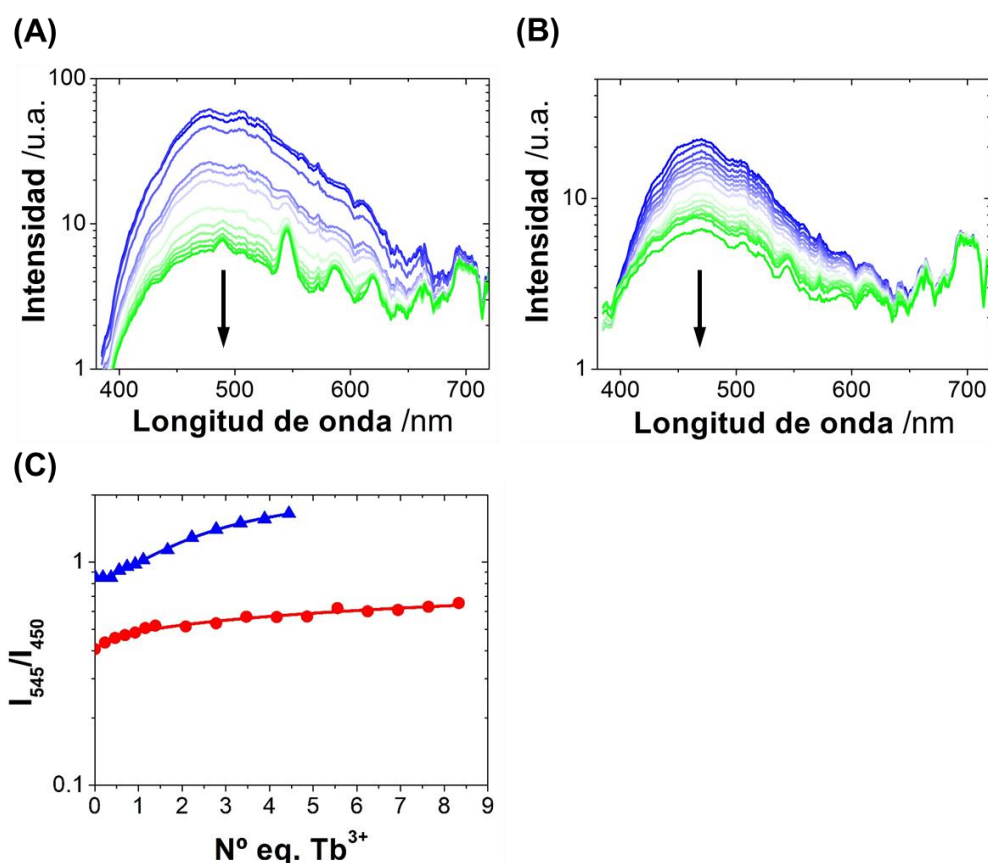


Figura I.35. Espectros de emisión de luminiscencia en estado estacionario ($\lambda_{ex} = 320$ nm) de las valoraciones directas de **CAnt** con $TbCl_3$ a diferentes concentraciones fijas de **CAnt**: 54 μM (A) y 43 μM (B). Las flechas negras indican concentraciones crecientes de Tb^{3+} desde 0 hasta 8.5 equivalentes. (C) Relaciones I_{545}/I_{445} correspondientes de las valoraciones directas de **CAnt** a 54 μM (triángulos azules) o 43 μM (círculos rojos) con Tb^{3+} .

1.3. Resultados

En las titulaciones inversas se añadieron concentraciones crecientes de **CAnt** (desde 0 hasta 4.5 equivalentes) a concentraciones fijas de TbCl_3 (54 o 43 μM). En los espectros de emisión (Figura I.36) se observa como conforme aumentaba la concentración de **CAnt** añadida, se hacía más evidente la aparición de la emisión de la antena a 450 nm, cuya contribución atenúa las bandas de emisión de luminiscencia del Tb^{3+} . Las relaciones de intensidades I_{545}/I_{450} mostraron una disminución de la emisión del Tb^{3+} hasta la adición de 1 equivalente de **CAnt**, aunque después se produjo un aumento en los valores de dichas relaciones.

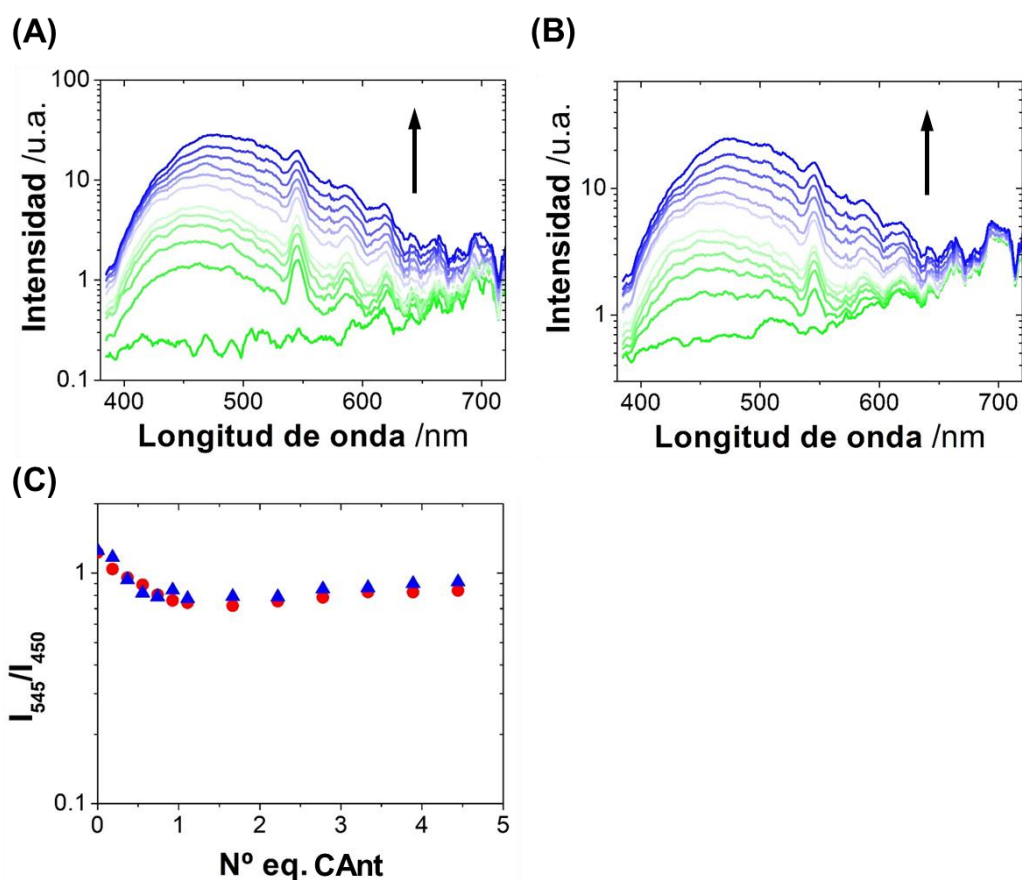


Figura I.36. Espectros de emisión de luminiscencia en estado estacionario ($\lambda_{\text{ex}} = 320 \text{ nm}$) de las valoraciones inversas de **CAnt** con TbCl_3 a diferentes concentraciones fijas de TbCl_3 : 54 μM (A) y 43 μM (B). Las flechas negras indican concentraciones crecientes de **CAnt** desde 0 hasta 4.5 equivalentes. (C) Relaciones de intensidad I_{545}/I_{445} correspondientes a las valoraciones inversas con Tb^{3+} a 54 μM (triángulos azules) o 43 μM (círculos rojos) con **CAnt**.

1.3. Resultados

Asimismo, los valores de intensidad de luminiscencia de la emisión sensibilizada del Tb^{3+} a 545 nm en las valoraciones directas de **CAnt** con Tb^{3+} medidas mediante espectroscopía de fosforescencia con ventana temporal (Figura I.37A) confirmaron que no se alcanzó la saturación.

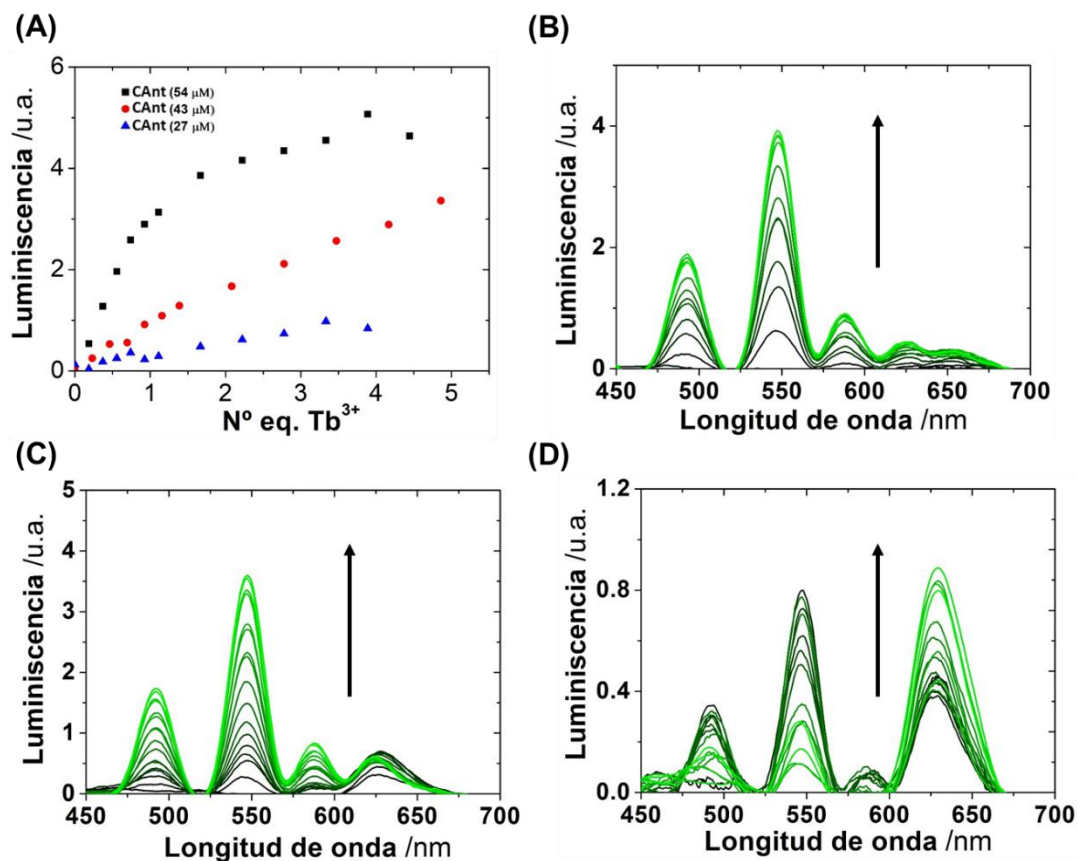


Figura I.37. Valoraciones de **CAnt** con $TbCl_3$ medidas mediante espectroscopía de fosforescencia con ventana temporal. (A) Intensidad de luminiscencia a 545 nm de la emisión sensibilizada del Tb^{3+} ($\lambda_{ex} = 320$ nm) a diferentes concentraciones fijas de **CAnt** (54 μM , cuadrados negros; 43 μM , círculos rojos y 27 μM , triángulos azules) y concentraciones crecientes de $TbCl_3$ de 0 a 5 equivalentes. (B-D) Espectros de luminiscencia con ventana temporal de las valoraciones de **CAnt** a diferentes concentraciones fijas (54 μM , (B); 43 μM , (C) y 27 μM , (D)) con concentraciones crecientes de $TbCl_3$ de 0 a 5 equivalentes. Las flechas indican concentraciones crecientes de $TbCl_3$.

1.3. Resultados

Estos experimentos mostraron que los complejos $Tb^{3+}:\mathbf{CAnt}$ son más lábiles que los formados con \mathbf{PAnt} , ya que en ninguna valoración se alcanzaba la saturación. Así, para obtener una estimación aproximada de la estabilidad de los complejos autoensamblados, se llevó a cabo el ajuste de los datos de las valoraciones directas mediante la ecuación de Hill. Estos ajustes proporcionaron una constante de disociación microscópica aparente de $180 \pm 30 \mu\text{M}$, lo que indica que los complejos $Tb^{3+}:\mathbf{CAnt}$ son casi un orden de magnitud menos estables que los complejos formados con el compuesto \mathbf{PAnt} . Este fenómeno es de esperar debido a la mejor complejación con los Ln^{3+} del compuesto \mathbf{PAnt} que posee un grupo fosfonato. El valor medio de los τ_L de los complejos $Tb^{3+}:\mathbf{CAnt}$ obtenidos por triplicado añadiendo a la antena 1 y 2 equivalentes de Tb^{3+} en disolución acuosa con tampón HEPES 1mM a pH 7.4 fue de 0.126 ± 0.007 ms. Los valores de τ_L de los complejos $\text{Eu}^{3+}:\mathbf{PAnt}$, $Tb^{3+}:\mathbf{PAnt}$ y $Tb^{3+}:\mathbf{CAnt}$ obtenidos resultan relativamente bajos en comparación con otros criptatos de Eu^{3+} y Tb^{3+} descritos en la bibliografía, que presentan τ_L de aproximadamente 1 ms.^{8,10,11,12} Esto puede deberse a que aunque nuestros complejos son capaces de autoensamblarse en disoluciones acuosas incluso en condiciones de saturación, quedan varias posiciones en la esfera de coordinación sin cubrir en las que es factible el quenching a través de la interacción con moléculas de H_2O . Sin embargo, la principal ventaja de nuestros complejos radica en que el tamaño de las antenas \mathbf{CAnt} y \mathbf{PAnt} es mucho menor que el de los criptatos, así como en su capacidad para autoensamblarse en disoluciones acuosas sensibilizando la emisión de los correspondientes lantánidos.

1.3.3. Emisión de luz blanca en disoluciones acuosas y geles

Dada la capacidad del luminóforo **PAnt** para autoensamblarse con Tb^{3+} y Eu^{3+} y sensibilizar su luminiscencia, a continuación, decidimos explorar la posibilidad de obtener la emisión de luz blanca en disoluciones acuosas mediante el uso de una combinación de **PAnt** junto con concentraciones específicas de ambos lantánidos. La emisión de luz blanca tras la excitación a 375 nm se obtuvo como resultado de la combinación de las emisiones del Tb^{3+} (emisión verde) y del Eu^{3+} (emisión roja) y la contribución de la emisión de la antena (emisión azul). Las concentraciones de cada especie para conseguir luz blanca se optimizaron mediante una metodología iterativa de ensayo y error, ajustando las concentraciones relativas de cada componente en función de la dirección en la que cada componente desplazaba las coordenadas dentro del diagrama de cromaticidad de la Commission Internationale de l'éclairage (CIE) de 1931 (Tabla I.2 y Figura I.38).

Tabla I.2. Ejemplos de diferentes mezclas probadas para lograr la emisión de luz blanca en disoluciones acuosas.

Medio	PAnt / μ M	Tb^{3+} / μ M	Eu^{3+} / μ M	Coordenadas CIE
Acuoso				
1	64.1	84.8	3.4	(0.323, 0.291)
2	62.1	88.5	2.3	(0.315, 0.308)
3	60.4	87.8	2.3	(0.314, 0.295)
4	60.3	88.6	2.5	(0.324, 0.336)
5	60.4	88.6	2.6	(0.323, 0.328)
6	60.6	88.6	2.4	(0.338, 0.329)

1.3. Resultados

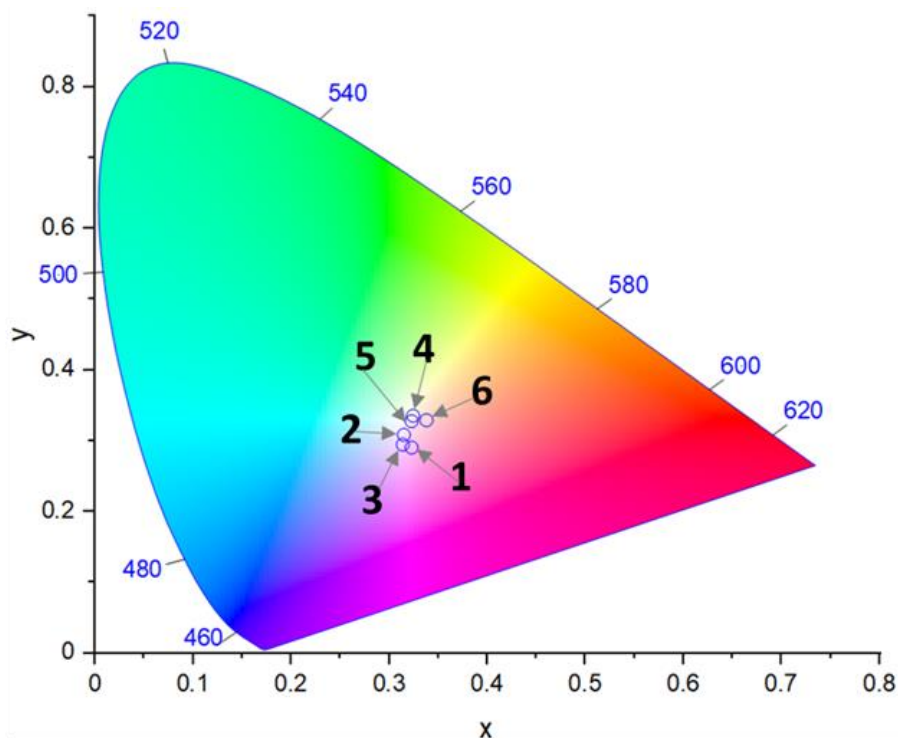


Figura I.38. Coordenadas del diagrama de cromaticidad CIE 1931 de diferentes mezclas acuosas del ligando **PAnt**, Tb^{3+} y Eu^{3+} . Los números corresponden a los de la Tabla I.2.

En concreto, la emisión de luz blanca se obtuvo empleando $2.4 \mu M$ de Eu^{3+} , $88.6 \mu M$ de Tb^{3+} y $60.3 \mu M$ de **PAnt** en una disolución acuosa con tampón HEPES 0.94 mM a pH 7.4 . La Figura I.39 muestra el diagrama de cromaticidad CIE con las coordenadas obtenidas $(0.328, 0.332)$ para esta disolución, indicativas de la obtención de luz blanca, así como el correspondiente espectro de emisión.

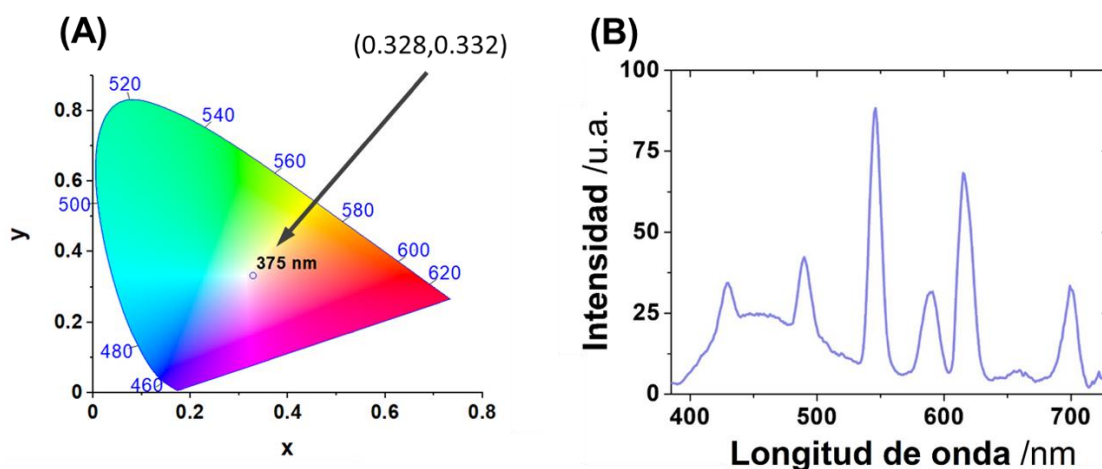


Figura I.39. Diagrama de cromaticidad CIE 1931 con las coordenadas $(0.328, 0.332)$ correspondientes a la luz blanca (A) y espectro de emisión (B; $\lambda_{ex} = 375 \text{ nm}$) obtenidos a partir de la mezcla de **PAnt** ($60.3 \mu M$), Eu^{3+} ($2.4 \mu M$) y Tb^{3+} ($88.6 \mu M$) en disolución acuosa con tampón HEPES 0.94 mM a pH 7.4 .

1.3. Resultados

Además, se evaluó la capacidad de los complejos formados por **PAnt**, Tb^{3+} y Eu^{3+} para emitir luz blanca en geles de agarosa al 1%. De manera análoga, se realizó una optimización iterativa (Tabla I.3 y Figura I.40) en la que la emisión de luz blanca se obtuvo (con coordenadas en el diagrama de cromaticidad CIE 1931 de 0.329, 0.339) ajustando ligeramente las concentraciones relativas de los componentes a 10.4 μM para el ligando **PAnt**, 8.7 μM para el Eu^{3+} y 200 μM para el Tb^{3+} (Figura I.41).

Tabla I.3. Ejemplos de diferentes mezclas probadas para lograr la emisión de luz blanca en geles de agarosa al 1%.

Medio	PAnt / μM	Tb^{3+} / μM	Eu^{3+} / μM	Coordenadas CIE
Gel				
1	8.7	182.6	26.1	(0.329, 0.339)
2	13.3	160.0	26.7	(0.318, 0.275)
3	13.3	159.9	27.5	(0.330, 0.293)
4	10.5	196.5	17.0	(0.335, 0.304)
5	8.8	175.1	28.0	(0.338, 0.279)
6	13.7	137.0	27.4	(0.339, 0.295)

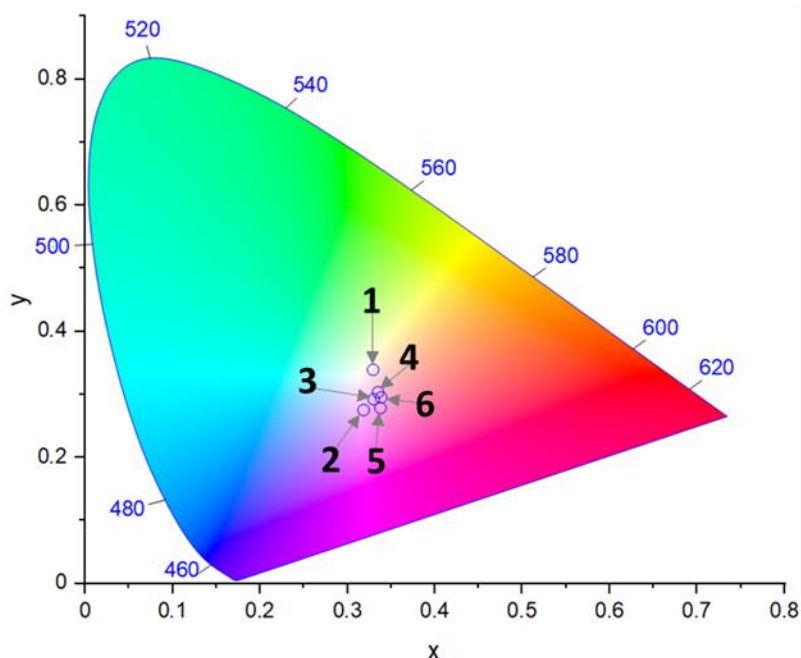


Figura I.40. Coordenadas del diagrama de cromaticidad CIE 1931 de diferentes mezclas del ligando **PAnt**, Tb^{3+} y Eu^{3+} en gel de agarosa al 1%. Los números corresponden a los de la Tabla I.3.

1.3. Resultados

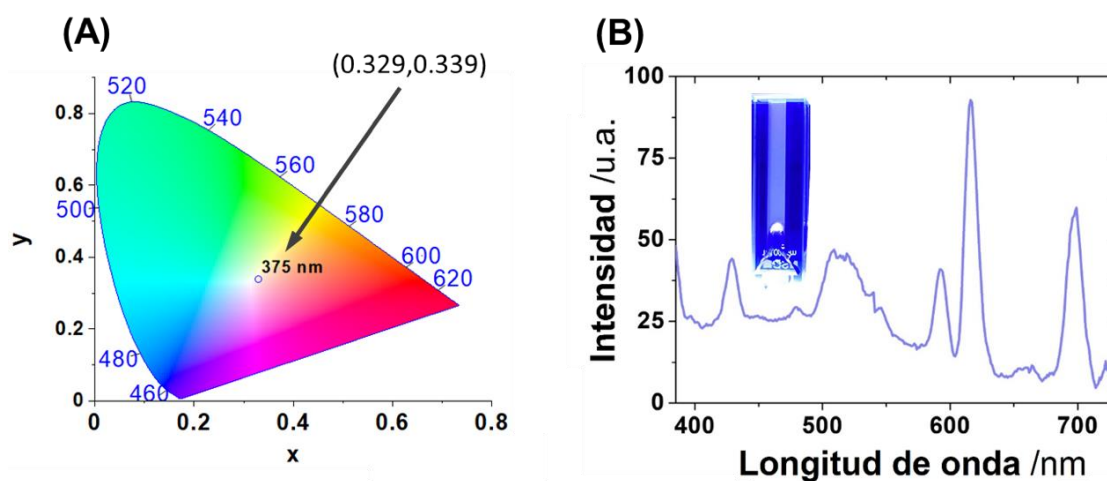


Figura I.41. Diagrama de cromaticidad CIE 1931 con las coordenadas (0.329, 0.339) correspondientes a la luz blanca (A) y espectro de emisión (B; $\lambda_{\text{ex}} = 375 \text{ nm}$) obtenidos a partir de la mezcla de **PAnt** (10.4 μM), Eu^{3+} (8.7 μM) y Tb^{3+} (200 μM) en gel de agarosa al 1%.

1.3. Resultados

Los resultados obtenidos en los experimentos anteriores ofrecen la posibilidad de obtener nuevos materiales capaces de emitir luz blanca tanto en disolución acuosa como en gel, resultando de especial interés en el desarrollo de fuentes de iluminación, dispositivos electrónicos o sensores.^{13, 14} Nuestros resultados se encuadran en el contexto de otros trabajos en los que se ha descrito la generación de luz blanca con diferentes ligandos y mezclas de Ln^{3+} . Por ejemplo, Gunnlaugsson *et al.* describieron la emisión de luz blanca mediante el desarrollo de un sistema basado en complejos de Ln^{3+} en disolución de metanol utilizando un ligando multidentado cuya estructura contiene una unidad de dipicolinato central conectada a dos moléculas 2,2':6',2''-terpiridilo.¹⁴ Sin embargo, en esos complejos, el Ln^{3+} se encuentra protegido de las moléculas de disolvente en forma de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), lo que da lugar a estructuras muy voluminosas que aunque son capaces de autoensamblarse en metanol, no son capaces de hacerlo en disolución acuosa. De manera análoga se han desarrollado metalogeles funcionalizados con complejos de Ln^{3+} empleando polímeros de polietilenglicol con terpiridilo, Eu^{3+} y Tb^{3+} .¹⁵ Estos geles son capaces de emitir luz verde, roja o blanca modulando la estequiometría de los Ln^{3+} utilizados. Sin embargo, los procesos de preparación de estos geles son bastante complejos. Por otro lado, Papri Sutar *et al.* desarrollaron geles de bajo peso molecular consistentes en núcleos de 9,10-difenilantraceno con dos moléculas de terpiridina terminales capaces de coordinarse con Tb^{3+} y Eu^{3+} mediante autoensamblaje. Estos geles fueron capaces de generar luz blanca mediante el ajuste de la estequiometría de los componentes del sistema.¹⁶ Destacar que nuestros geles, además de obtenerse de forma sencilla mediante autoensamblaje y control de las proporciones relativas de cada componente, presentan la ventaja de que el luminóforo **PAnt** es una molécula mucho menos voluminosa que las empleadas en los trabajos anteriormente comentados, lo que simplifica enormemente la composición química del sistema.

1.3.4. Microscopía PLIM *in cellulo* utilizando los complejos luminiscentes de PAnt con Tb³⁺ y Eu³⁺

Las propiedades fotoluminiscentes de los complejos de Ln³⁺, y especialmente sus largos valores de τ_L , los convierte en herramientas muy interesantes en el campo de la bioimagen.^{17,18,19,20} En concreto, es posible realizar un filtrado de la imagen por ventana temporal, lo que permite eliminar cualquier contribución de la autofluorescencia celular, obteniéndose, por tanto, exclusivamente la luminiscencia de larga duración de los lantánidos.²¹ Sin embargo, los complejos de Ln³⁺ deben cumplir una serie de condiciones para ser utilizados como sondas biológicas.^{22,19} Uno de los requisitos más importantes es que los complejos deben ser completamente solubles y termodinámicamente estables en agua. Sin embargo, como se ha comentado anteriormente, existen pocos ligandos capaces de sensibilizar la FL de los Ln³⁺ en agua que puedan ser empleados en medios biológicos.⁵ En este sentido cabe destacar que los complejos de lantánidos obtenidos con la antena **PAnt** son termodinámicamente estables y solubles en agua, lo que permite su empleo en la obtención de imágenes celulares mediante microscopía PLIM. De esta forma se puede visualizar el interior de células vivas y examinar los compartimentos subcelulares específicos a los que se dirigen los complejos. Para llevar a cabo estos experimentos se añadió la antena **PAnt** (15 μ M) y Tb³⁺ o Eu³⁺ (30 μ M) a células de riñón embrionario humano HEK-293. A continuación, tomamos imágenes de microscopía PLIM de los complejos en el interior de las células, lo que permitió confirmar que esta metodología es especialmente eficaz para eliminar la autofluorescencia celular (Figura I.42A). Las imágenes de microscopía PLIM proporcionan simultáneamente información tanto de la intensidad de emisión como de los τ_L de los complejos, de forma que se obtienen dos capas de contraste en la visualización completa de las células. En todas las imágenes celulares analizadas la emisión fotoluminiscente de los Ln³⁺ se detecta inequívocamente tanto dentro del citoplasma como en el núcleo celular, como demuestran los valores de τ_L obtenidos a partir del ajuste de las curvas de decaimiento de luminiscencia de los datos experimentales (Figuras I.42B, I.43, I.44 y I.45).

1.3. Resultados

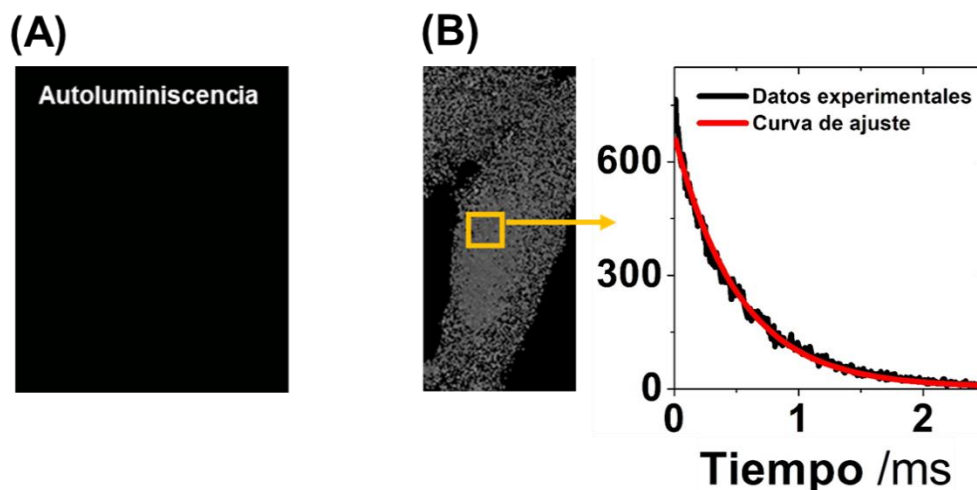


Figura 1.42. Imagen obtenida de la autoluminiscencia de las células (A) y proceso de obtención de los valores de τ_L a partir del decaimiento de luminiscencia de los complejos $\text{Eu}^{3+}:\text{PAnt}$ (B).

En las imágenes, la intensidad de emisión luminiscente de los complejos se representa mediante una escala arbitraria de grises (u.a.), mientras que los τ_L (en ms) se representan con una escala de color arbitraria. Las imágenes de las Figuras 1.43 y 1.44 muestran las células HEK-293 con los complejos $\text{Eu}^{3+}:\text{PAnt}$ (30:15 μM) y $\text{Tb}^{3+}:\text{PAnt}$ (30:15 μM), respectivamente, los cuales presentan pequeñas diferencias entre los τ_L del citoplasma celular y los de la región nuclear, lo que permite diferenciar estas regiones.²⁰ De esta forma cuantificamos los valores medios de τ_L de ambos complejos, diferenciando en las imágenes entre citoplasma y núcleo (Figura 1.45).

1.3. Resultados

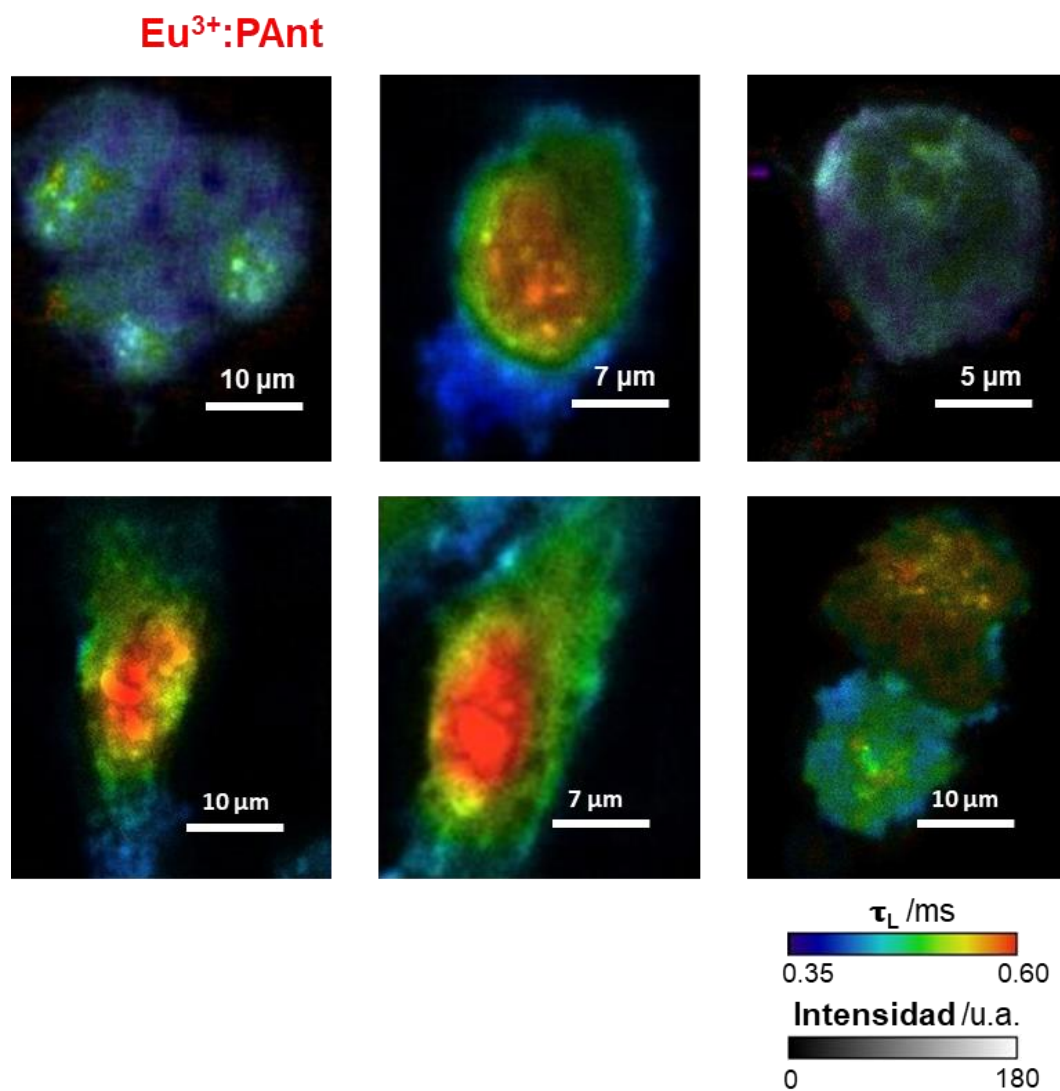


Figura I.43. Imágenes PLIM de células HEK-293 con los complejos Eu³⁺:PAnt (30:15 μM) empleando un tren de pulsos de excitación ($\lambda_{\text{ex}} = 375 \text{ nm}$) durante 200 μs , seguido de una ventana de detección de 5 ms. La detección se realizó utilizando un filtro de paso de banda de 580-630 nm para el Eu³⁺.

1.3. Resultados

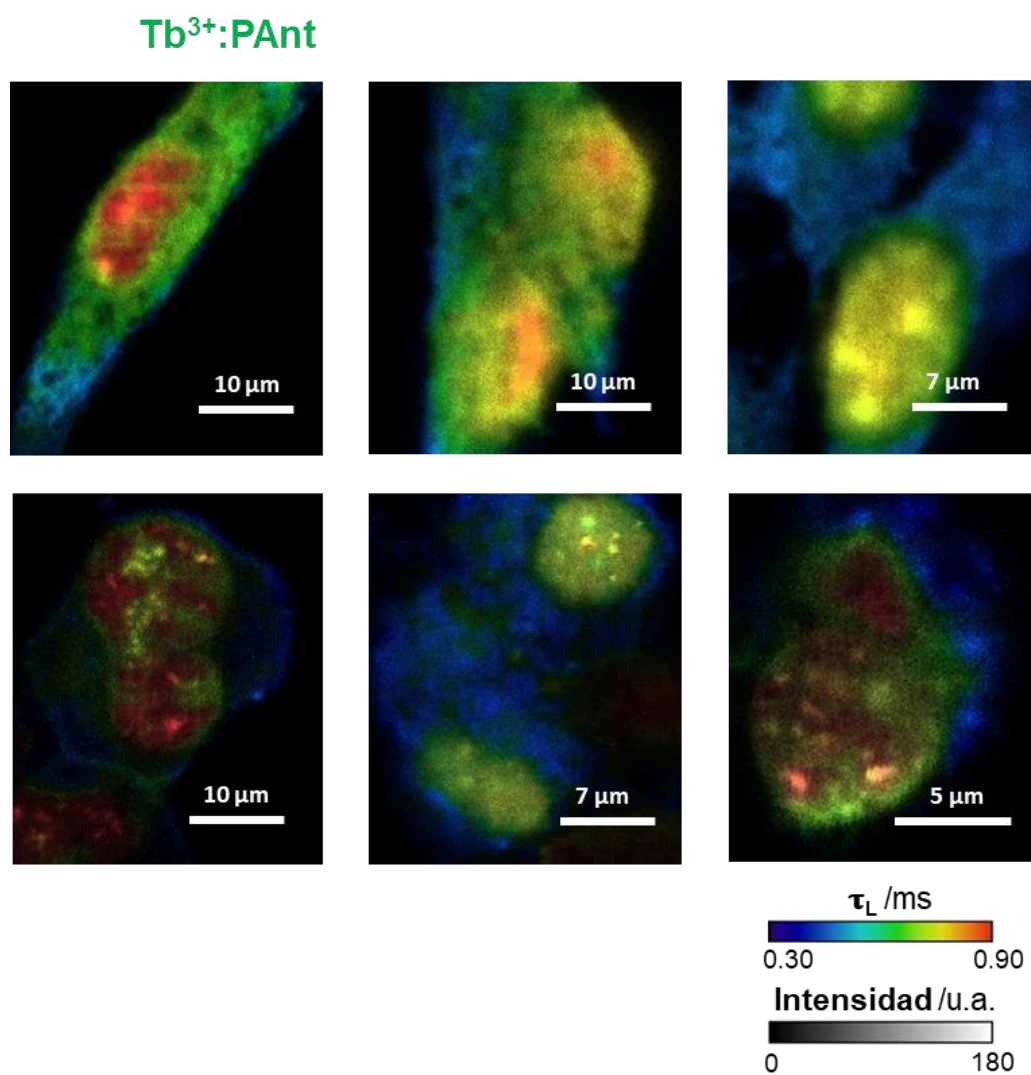


Figura I.44. Imágenes PLIM de células HEK-293 con los complejos Tb³⁺:PAnt (30:15 μM) empleando un tren de pulsos de excitación ($\lambda_{\text{ex}} = 375 \text{ nm}$) durante 200 μs , seguido de una ventana de detección de 5 ms. La detección se realizó utilizando un filtro de paso de banda de 533-558 nm para el Tb³⁺.

1.3. Resultados

Para el complejo $\text{Eu}^{3+}:\text{PAnt}$ se obtuvieron unos valores medios de 0.46 ± 0.01 ms y 0.50 ± 0.02 ms en el citoplasma celular y en el núcleo, respectivamente, mientras que para el complejo $\text{Tb}^{3+}:\text{PAnt}$ se obtuvieron distribuciones más amplias, con valores medios de τ_L de 0.55 ± 0.07 ms y 0.69 ± 0.05 ms para el citoplasma celular y el núcleo, respectivamente. En lo que respecta a toda la población de células estudiadas con un mismo tipo de complejo ($\text{Eu}^{3+}:\text{PAnt}$ o $\text{Tb}^{3+}:\text{PAnt}$), no se encontró diferencia estadísticamente significativa entre los valores de τ_L recogidos en el núcleo o en el citoplasma. El hecho de que los complejos presenten unos valores de τ_L mayores dentro del núcleo que en el citoplasma (Figuras I.43 y I.44) puede ser debido a que el núcleo es un orgánulo membranoso menos acuoso que el citoplasma, lo que proporciona un entorno más protegido de las moléculas de H_2O que pueden quenchar la luminiscencia de los complejos. Además, se puede observar que, especialmente para el complejo $\text{Tb}^{3+}:\text{PAnt}$, los valores de τ_L obtenidos en medios celulares son mayores que los obtenidos directamente en disoluciones acuosas, confirmando así la mayor protección de la esfera de coordinación frente a las moléculas de H_2O en el interior celular.

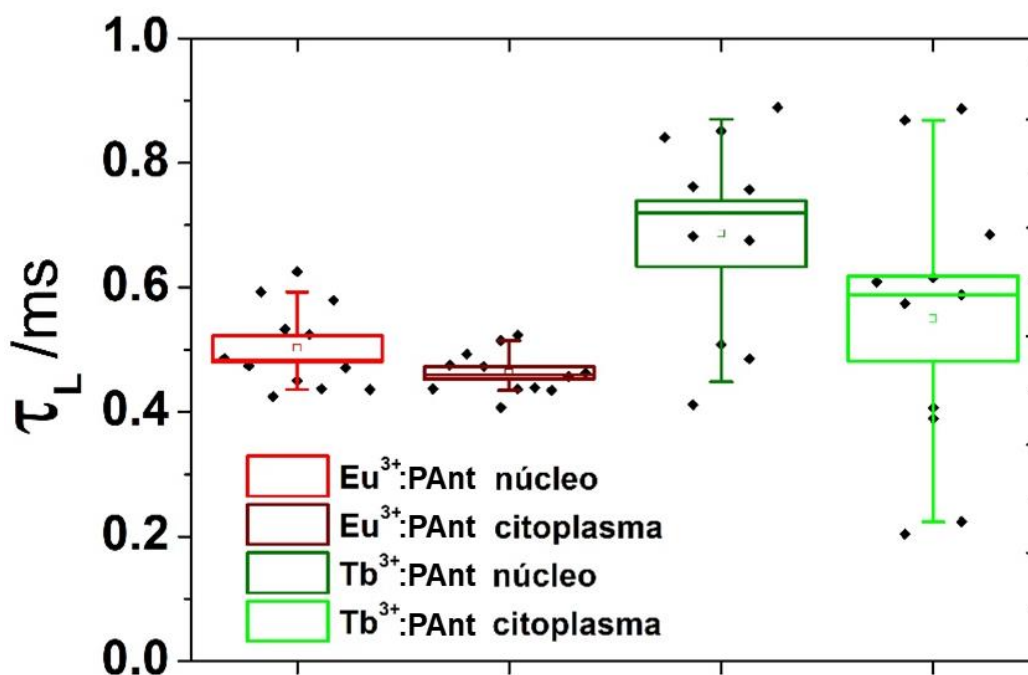


Figura I.45. Gráfico de cajas y bigotes de los valores medios de τ_L de los complejos $\text{Eu}^{3+}:\text{PAnt}$ y $\text{Tb}^{3+}:\text{PAnt}$ a partir de regiones segmentadas del citoplasma y el núcleo de células HEK-293. Las cajas representan el error estándar de la media y los bigotes representan el 90% de los resultados.

1.3. Resultados

Una vez demostradas las capacidades de los complejos $\text{Eu}^{3+}:\text{PAnt}$ y $\text{Tb}^{3+}:\text{PAnt}$ de emitir luz blanca tanto en disoluciones acuosas como en geles y de ser utilizadas como sondas intracelulares aplicables en bioimagen, decidimos explorar la posibilidad de obtener luz blanca en el interior de células vivas. Este concepto se ha propuesto como una plataforma avanzada para el desarrollo de diferentes estrategias de detección de diversos analitos de relevancia biológica.^{23,24} Para ello tomamos imágenes de microscopía PLIM con detección espectral de células HEK-293 vivas a las que añadimos simultáneamente los complejos formados por $\text{Eu}^{3+}:\text{PAnt}$ y los complejos formados por $\text{Tb}^{3+}:\text{PAnt}$, utilizando $31 \mu\text{M}$ de **PAnt**, $46 \mu\text{M}$ de Tb^{3+} y $2.1 \mu\text{M}$ de Eu^{3+} (Figuras I.46, I.47 y I.48). Estas concentraciones mantienen unas proporciones similares a las utilizadas en la obtención de luz blanca en disolución acuosa.

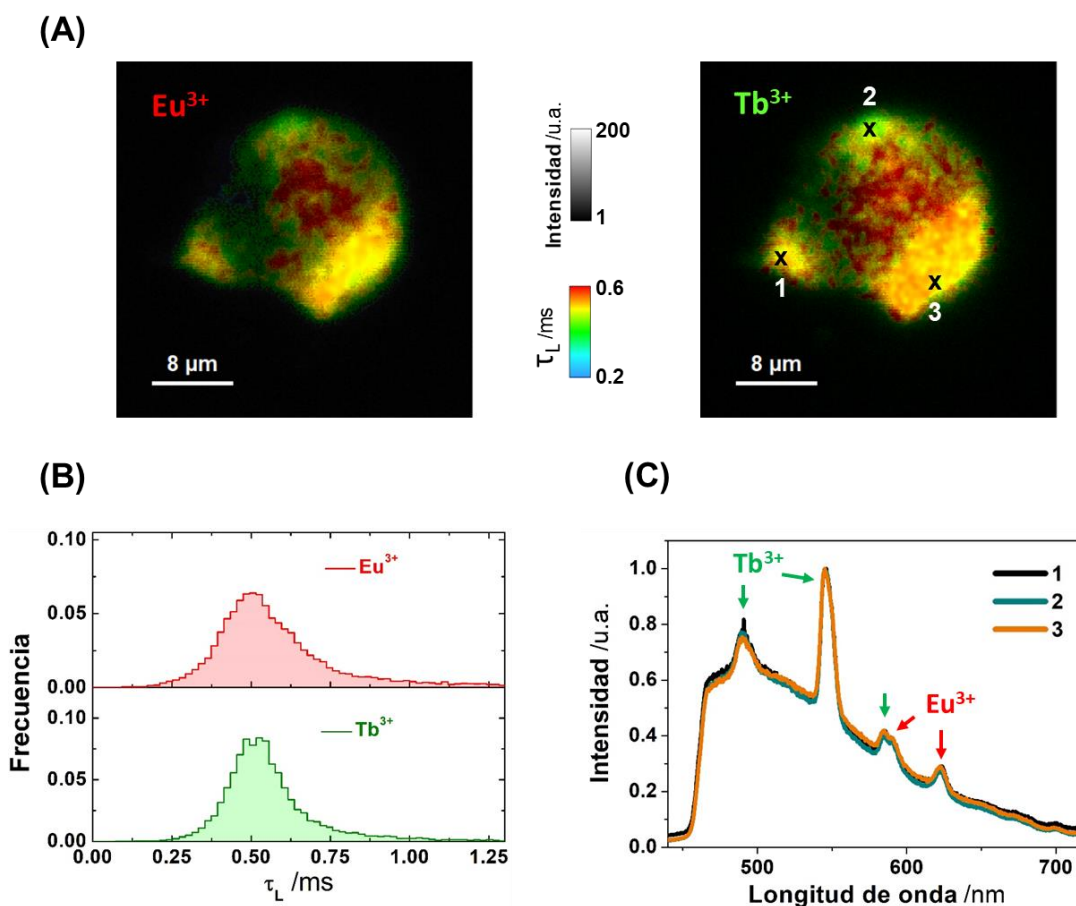


Figura I.46. (A) Imágenes PLIM de células HEK-293 vivas incubadas con $\text{Eu}^{3+}:\text{PAnt}$ y $\text{Tb}^{3+}:\text{PAnt}$ a las siguientes concentraciones: $31 \mu\text{M}$ de **PAnt**, $46 \mu\text{M}$ de Tb^{3+} y $2,1 \mu\text{M}$ de Eu^{3+} recogidas en el canal del Eu^{3+} (izquierda) y en el del Tb^{3+} (derecha). (B) Distribuciones de los τ_L en los canales del Eu^{3+} y del Tb^{3+} de los píxeles de las imágenes mostradas. (C) Espectros de emisión normalizados recogidos irradiando en los puntos 1-3 marcados en las imágenes mostradas. Las flechas rojas y verdes indican las líneas de emisión típicas del Eu^{3+} y del Tb^{3+} , respectivamente.

1.3. Resultados

Los valores medios de τ_L mostraron un máximo de aproximadamente 0.5 ms, presentando unos valores ligeramente superiores dentro del núcleo (Figuras I.46B, I.47B y I.48B). El τ_L medio de los complejos Tb^{3+} :**PAnt** formados es ligeramente inferior a los mostrados en las Figuras I.44 y I.45 debido a que la concentración de Tb^{3+} empleada en estos experimentos es mayor (46 μM frente a 30 μM), y mayor que la concentración de **PAnt** y de Eu^{3+} , lo que podría favorecer la formación de complejos subestequiométricos que dieran lugar a un mayor quenching. Asimismo, nuestro microscopio está equipado con un espectrógrafo que permite recoger, dentro de las imágenes obtenidas, espectros de emisión en diferentes puntos dentro de las células (Figuras I.46C, I.47C, I.48C y I.49C). Su empleo demostró claramente la emisión simultánea de ambos complejos en todas las regiones celulares. Las células utilizadas como control (a las que no añadimos ni antena ni lantánidos) confirmaron que este sistema permite eliminar la autofluorescencia natural. (Figura I.49B).

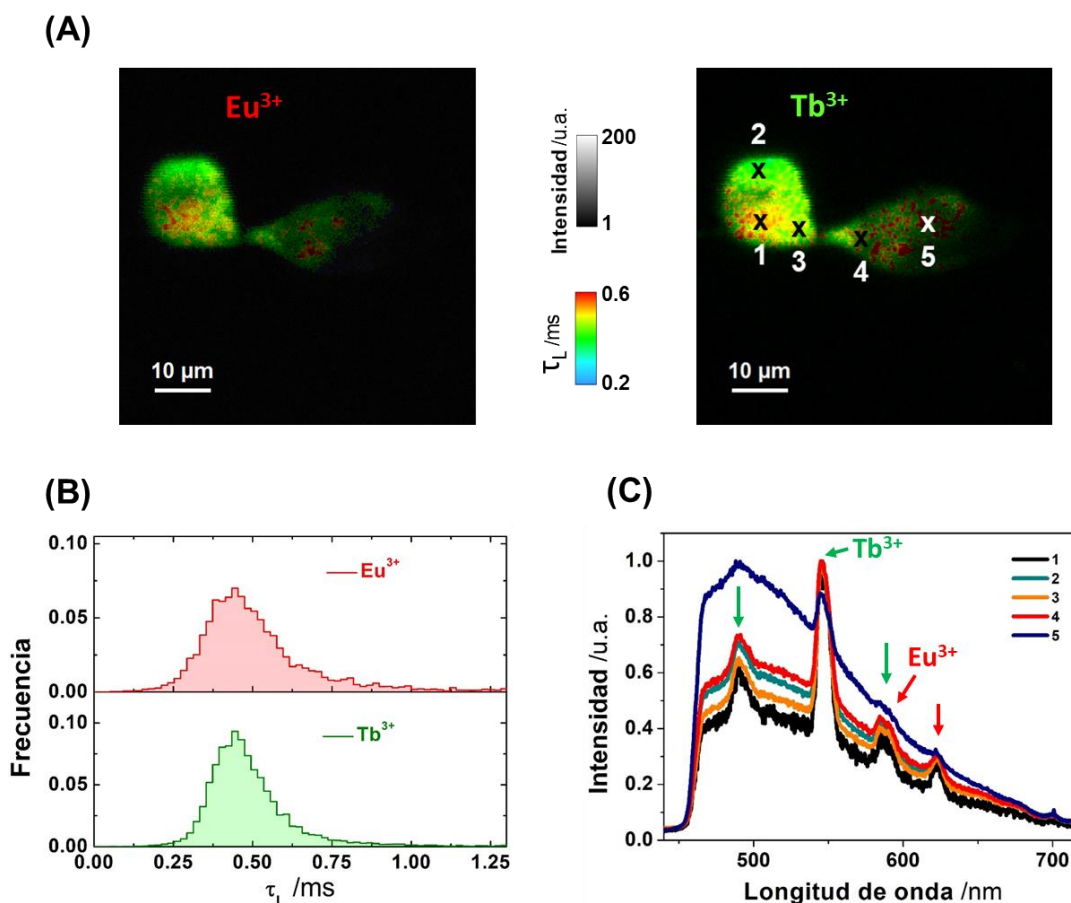
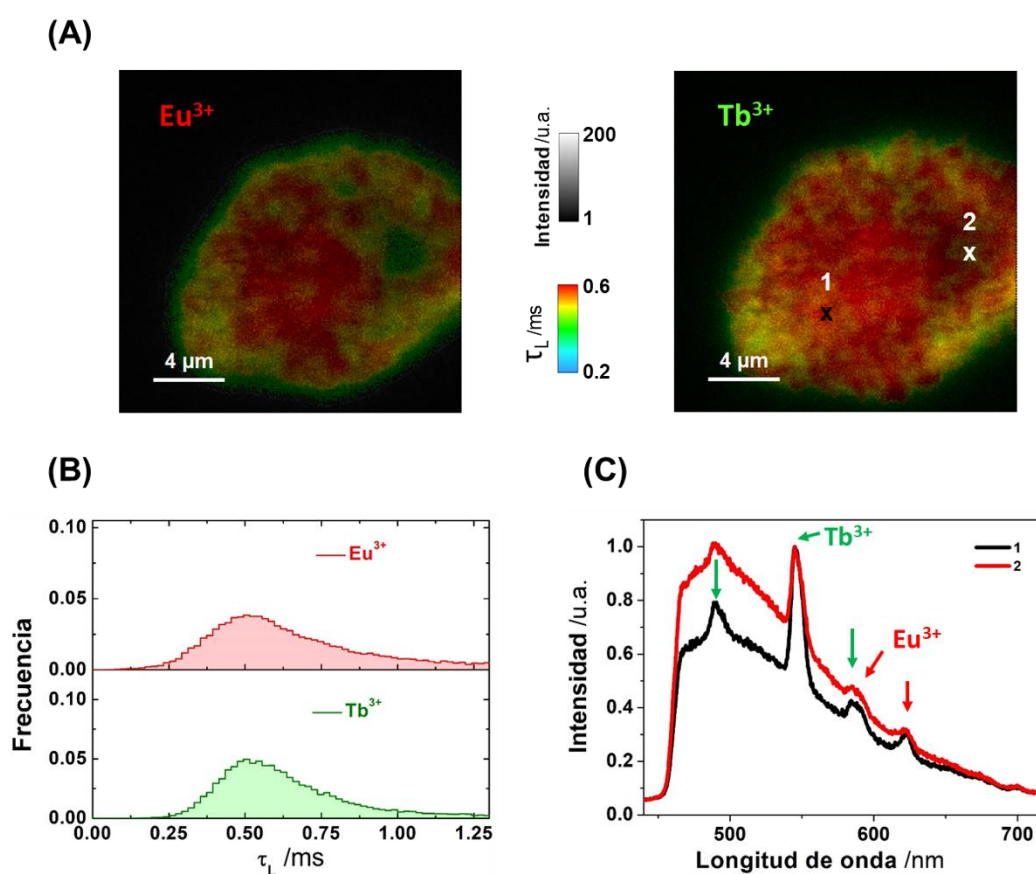


Figura I.47. (A) Imágenes PLIM de células HEK-293 vivas incubadas con Eu^{3+} :**PAnt** y Tb^{3+} :**PAnt** a las siguientes concentraciones: 31 μM de **PAnt**, 46 μM de Tb^{3+} y 2.1 μM de Eu^{3+} recogidas en el canal del Eu^{3+} (izquierda) y en el del Tb^{3+} (derecha). (B) Distribuciones de los τ_L en los canales del Eu^{3+} y del Tb^{3+} de los píxeles de las imágenes mostradas. (C) Espectros de emisión normalizados recogidos irradiando en los puntos 1-5 marcados en las imágenes mostradas. Las flechas rojas y verdes indican las líneas de emisión típicas del Eu^{3+} y del Tb^{3+} , respectivamente.

1.3. Resultados

Debido a las características del equipo, los espectros de emisión de las imágenes obtenidas no se pudieron detectar con ventana temporal, sino bajo iluminación continua. Además, aunque en estos experimentos fue necesario emplear un espejo dicróico de corte para eliminar las emisiones por debajo de 460 nm, y la contribución de la autofluorescencia celular desplazaba las coordenadas de emisión en el diagrama de cromaticidad, pudimos demostrar que nuestros complejos eran capaces de generar la emisión de luz casi blanca dentro de células vivas. El empleo de la microscopía PLIM para obtener imágenes libres de ruido de fondo junto con el uso de los complejos $\text{Eu}^{3+}:\text{PAnt}$ y $\text{Tb}^{3+}:\text{PAnt}$, allana el camino para el desarrollo de aplicaciones de detección *in cellulo*²⁵ multicanal, así como de etiquetado y codificación por colores.²⁶



1.3. Resultados

Finalmente, para abrir la puerta a posteriores aplicaciones en células vivas fue necesario comprobar la citotoxicidad de nuestros complejos. Estas medidas, realizadas por Chiara Burgio y Antonio Reinoso en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Granada, mostraron una citotoxicidad insignificante a las concentraciones empleadas. En estos experimentos se incubaron células HEK-293 con Eu^{3+} (12.5, 25, 50, 100 y 200 μM), Tb^{3+} (12.5, 25, 50, 100 y 200 μM), la antena **PAnt** (2.5, 12.5, 25 y 50 μM), así como combinaciones del compuesto **PAnt** (12,5 μM) con Eu^{3+} o Tb^{3+} (12.5, 25 y 50 μM) durante 1 o 24 h (Figura I.50). Los resultados mostrados se presentan como el porcentaje de viabilidad celular respecto a las células de control no tratadas, a las que se asume una viabilidad del 100%.

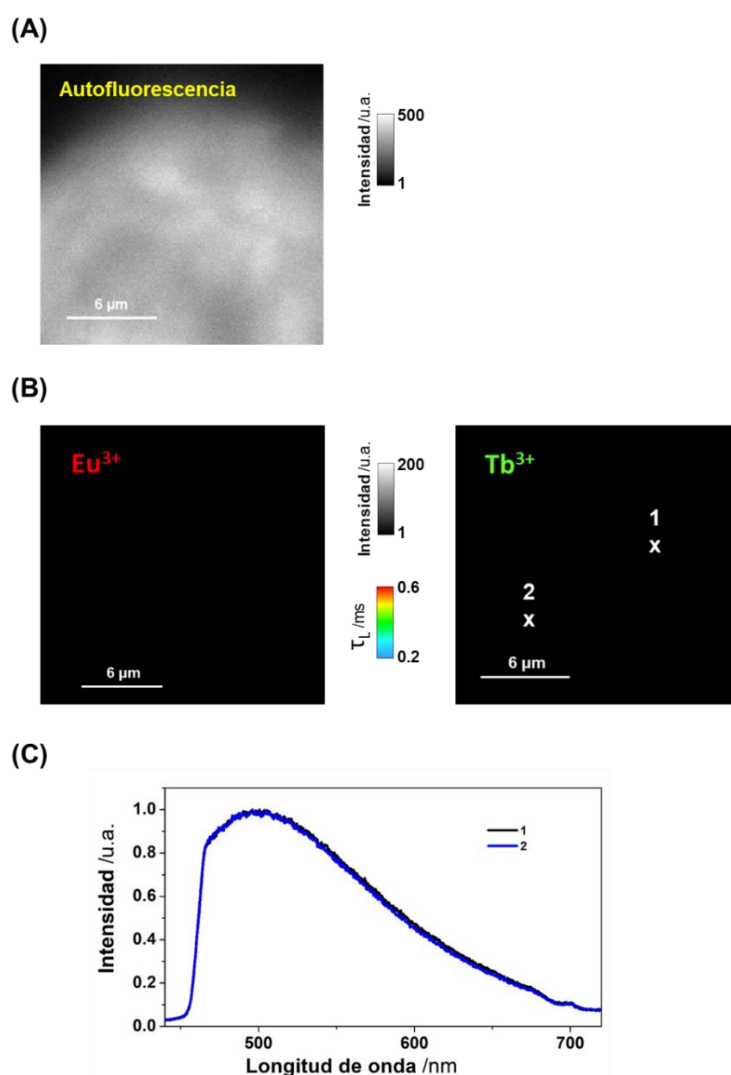


Figura I.49. Autoluminiscencia de las células HEK-293 en ausencia del ligando **PAnt**, Eu^{3+} o Tb^{3+} . (A) Imágenes de la autofluorescencia celular recogidas en el canal del Tb^{3+} , utilizando $\lambda_{\text{ex}} = 375$ nm en modo de iluminación continua. (B) Imágenes PLIM en los canales del Eu^{3+} (izquierda) y Tb^{3+} (derecha) que muestran una ausencia total de autofluorescencia trabajando en régimen PLIM. (C) Espectros de emisión normalizados, recogidos irradiando en los puntos 1 y 2 de la célula, marcados en la imagen (B, derecha), en el canal del Tb^{3+} .

1.3. Resultados

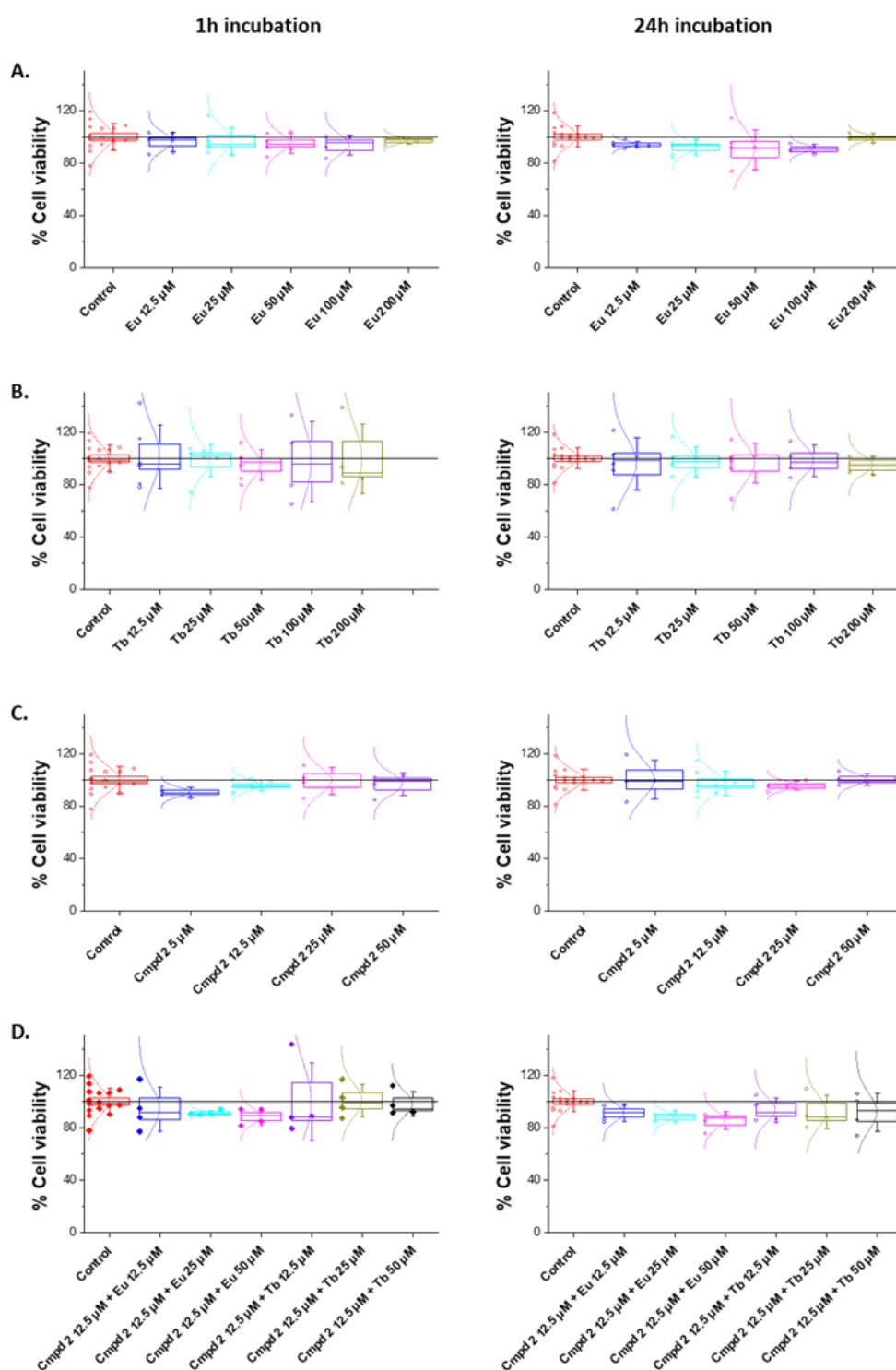


Figura 1.50. Estudio de citotoxicidad de células HEK-293 con (A) Eu^{3+} , (B) Tb^{3+} , (C) compuesto **PAnt** (llamado **2** en las gráficas de viabilidad celular), y (D) combinaciones de compuesto **PAnt** (12,5 μM) y Eu^{3+} o Tb^{3+} , tras 1 h (paneles de la izquierda) o 24 h (paneles de la derecha) de incubación. Los recuadros representan el error estándar de la media y los bigotes representan el 90% de los resultados.

1.3.5. Referencias

1. Werts, M. H. V., Making sense of Lanthanide Luminescence. *Science Progress* **2005**, *88* (2), 101-131.
2. Parker, D.; Fradgley, J. D.; Wong, K.-L., The design of responsive luminescent lanthanide probes and sensors. *Chemical Society Reviews* **2021**, *50* (14), 8193-8213.
3. Fueyo-González, F.; Garcia-Fernandez, E.; Martínez, D.; Infantes, L.; Orte, A.; González-Vera, J. A.; Herranz, R., Smart lanthanide antennas for sensing water. *Chemical Communications* **2020**, *56* (41), 5484-5487.
4. Moore, E. G.; Samuel, A. P. S.; Raymond, K. N., From Antenna to Assay: Lessons Learned in Lanthanide Luminescence. *Accounts of Chemical Research* **2009**, *42* (4), 542-552.
5. Fueyo-González, F.; Garcia-Fernandez, E.; Martínez, D.; Infantes, L.; Orte, A.; González-Vera, J. A.; Herranz, R., Smart lanthanide antennas for sensing water. *Chem. Commun.* **2020**, *56*, 5484-5487.
6. Fueyo-González, F.; Espinar-Barranco, L.; Herranz, R.; Alkorta, I.; Crovetto, L.; Fribourg, M.; Paredes, J. M.; Orte, A.; González-Vera, J. A., Self-Assembled Lanthanide Antenna Glutathione Sensor for the Study of Immune Cells. *ACS Sensors* **2022**, *7* (1), 322-330.
7. Hänninen, P.; Härmä, H., *Lanthanide Luminescence: Photophysical, Analytical and Biological Aspects*. Springer Berlin Heidelberg: 2013.
8. Parker, D.; Fradgley, J. D.; Wong, K. L., The design of responsive luminescent lanthanide probes and sensors. *Chem. Soc. Rev.* **2021**, *50* (14), 8193-8213.
9. Moore, E. G.; Samuel, A. P. S.; Raymond, K. N., From Antenna to Assay: Lessons Learned in Lanthanide Luminescence. *Acc. Chem. Res.* **2009**, *42* (4), 542-552.
10. Li, M.; Zhou, Y.; Yao, Y.; Gao, T.; Yan, P.; Li, H., Designing water-quenching resistant highly luminescent europium complexes by regulating the orthogonal arrangement of bis-beta-diketone ligands. *Dalton Trans.* **2021**, *50* (28), 9914-9922.
11. Rochowiak, W.; Kasprzycka, E.; Assunção, I. P.; Kynast, U.; Lezhnina, M., Long-lifetime green-emitting Tb³⁺ complexes for bacterial staining. *Australian Journal of Chemistry* **2022**, *75* (9), 754-759.
12. Thor, W.; Wu, Y.; Wang, L.; Zhang, Y.; Tanner, P. A.; Wong, K.-L., Charging and ultralong phosphorescence of lanthanide facilitated organic complex. *Nature Communications* **2021**, *12* (1), 6532.
13. Singha Mahapatra, T.; Singh, H.; Maity, A.; Dey, A.; Pramanik, S. K.; Suresh, E.; Das, A., White-light-emitting lanthanide and lanthanide-iridium doped supramolecular gels: modular luminescence and stimuli-responsive behaviour. *Journal of Materials Chemistry C* **2018**, *6* (36), 9756-9766.
14. Kotova, O.; Comby, S.; Lincheneau, C.; Gunnlaugsson, T., White-light emission from discrete heterometallic lanthanide-directed self-assembled complexes in solution. *Chemical Science* **2017**, *8* (5), 3419-3426.
15. Chen, P.; Li, Q.; Grindy, S.; Holten-Andersen, N., White-Light-Emitting Lanthanide Metallogels with Tunable Luminescence and Reversible Stimuli-Responsive Properties. *Journal of the American Chemical Society* **2015**, *137* (36), 11590-11593.
16. Sutar, P.; Suresh, V. M.; Maji, T. K., Tunable emission in lanthanide coordination polymer gels based on a rationally designed blue emissive gelator. *Chemical Communications* **2015**, *51* (48), 9876-9879.
17. Zhu, X.; Wang, X.; Zhang, H.; Zhang, F., Luminescence Lifetime Imaging Based on Lanthanide Nanoparticles. *Angewandte Chemie International Edition* **2022**, *61* (42), e202209378.

1.3. Resultados

18. Bünzli, J.-C. G., Lighting up cells with lanthanide self-assembled helicates. *Interface Focus* **2013**, 3 (5), 20130032.
19. Monteiro, J. H. S. K., Recent Advances in Luminescence Imaging of Biological Systems Using Lanthanide(III) Luminescent Complexes. *Molecules* **2020**, 25 (9), 2089.
20. Yu, J.; Parker, D.; Pal, R.; Poole, R. A.; Cann, M. J., A Europium Complex That Selectively Stains Nucleoli of Cells. *Journal of the American Chemical Society* **2006**, 128 (7), 2294-2299.
21. Garcia-Fernandez, E.; Pernagallo, S.; González-Vera, J. A.; Ruedas-Rama, M. J.; Díaz-Mochón, J. J.; Orte, A., Time-Gated Luminescence Acquisition for Biochemical Sensing: miRNA Detection. In *Fluorescence in Industry*, Pedras, B., Ed. Springer International Publishing: Cham, 2019; pp 213-267.
22. Muller, G., Luminescent chiral lanthanide(iii) complexes as potential molecular probes. *Dalton Transactions* **2009**, (44), 9692-9707.
23. Wang, J.; Lin, W.; Li, W., Three-channel fluorescent sensing via organic white light-emitting dyes for detection of hydrogen sulfide in living cells. *Biomaterials* **2013**, 34 (30), 7429-36.
24. Yang, Y.-S.; Yuan, Z.-H.; Zhang, X.-P.; Xu, J.-F.; Lv, P.-C.; Zhu, H.-L., A selective fluorescent sensor for cysteine detection with potential as a white light emitting fluorophore in living cell imaging. *Journal of Materials Chemistry B* **2019**, 7 (18), 2911-2914.
25. Tremblay, M. S.; Halim, M.; Sames, D., Cocktails of Tb³⁺ and Eu³⁺ Complexes: A General Platform for the Design of Ratiometric Optical Probes. *Journal of the American Chemical Society* **2007**, 129 (24), 7570-7577.
26. Wartenberg, N.; Raccurt, O.; Bourgeat-Lami, E.; Imbert, D.; Mazzanti, M., Multicolour Optical Coding from a Series of Luminescent Lanthanide Complexes with a Unique Antenna. *Chemistry – A European Journal* **2013**, 19 (10), 3477-3482.

1.4. Conclusiones

1.4. Conclusiones Bloque I

Las conclusiones del Bloque I de esta tesis doctoral que trata sobre la aplicación de nuevos compuestos fluorescentes como antenas de lantánidos son las siguientes:

- ❖ Se ha realizado el estudio fotofísico de dos fluoróforos derivados de quinolin-2(1H)-ona (**CAnt** y **PAnt**) para evaluar su potencial como antenas de lantánidos, demostrándose que reúnen las características fotofísicas adecuadas para ello.
- ❖ Se ha realizado un screening de los fluoróforos **CAnt** y **PAnt** con los lantánidos Tb^{3+} , Sm^{3+} , Dy^{3+} y Eu^{3+} , y se ha comprobado que ambos compuestos pueden actuar como antenas de lantánidos autoensamblables en disoluciones acuosas. Se ha concluido que el ácido fosfónico **PAnt** es capaz de sensibilizar la luminiscencia tanto del Eu^{3+} como del Tb^{3+} , mientras que el ácido carboxílico **CAnt** solo actúa como antena de Tb^{3+} .
- ❖ A través de las valoraciones directas e inversas de antenas con lantánidos llevadas a cabo se ha concluido que los complejos autoensamblables formados en disoluciones acuosas siguen estequiometrías diferentes. Así, mientras que los complejos $Eu^{3+}:\mathbf{PAnt}$ siguen una estequiometría 1.5:1, los complejos formados por $Tb^{3+}:\mathbf{PAnt}$ y $Tb^{3+}:\mathbf{CAnt}$ siguen una estequiometría 1:1.
- ❖ La combinación de los complejos formados por $Eu^{3+}:\mathbf{PAnt}$ y $Tb^{3+}:\mathbf{PAnt}$ en las concentraciones adecuadas permite la obtención de la emisión de luz blanca en disoluciones acuosas y en geles de agarosa.
- ❖ Los complejos $Eu^{3+}:\mathbf{PAnt}$ y $Tb^{3+}:\mathbf{PAnt}$ pueden actuar como sondas luminiscentes para bioimagen mediante microscopía PLIM.
- ❖ La combinación de los complejos $Eu^{3+}:\mathbf{PAnt}$ y $Tb^{3+}:\mathbf{PAnt}$ puede aplicarse para obtener la emisión de luz blanca en el interior celular mediante microscopía PLIM.

BLOQUE II. Estudio de la agregación amiloide mediante técnicas de fluorescencia

2.1. Introducción

2.1. Introducción del estudio de la agregación amiloide mediante técnicas de fluorescencia

2.1.1. Enfermedades neurodegenerativas amiloides

En las últimas décadas se ha confirmado un claro incremento de la incidencia de las enfermedades neurodegenerativas tales como la esclerosis lateral amiotrófica, la enfermedad de Huntington (EH), la enfermedad de Parkinson (EP) o la enfermedad de Alzheimer (EA), entre otras, debido al aumento significativo de la esperanza de vida en los países desarrollados.¹⁻³ Estas enfermedades están íntimamente ligadas a desarreglos metabólicos y fisiológicos a nivel celular, y se caracterizan porque el inicio de la enfermedad y su progreso comienzan algunos años antes de la aparición de los primeros síntomas clínicos.^{2,4} Esto hace que sea extremadamente difícil proporcionar un diagnóstico temprano y efectivo a los pacientes afectados por estas enfermedades. Estas patologías se conocen como “enfermedades conformacionales proteicas” (PCD, por su traducción del inglés, “*Protein Conformational Diseases*”) o “amiloidosis”.⁵ El primero en utilizar la palabra amiloide fue el físico alemán Rudolph Virchow en 1854, cuando descubrió anomalías macroscópicas (inclusiones proteicas) en el cerebro de pacientes afectados por diversas amiloidosis.⁶ Así, la palabra amiloide (del latín *amylum* y del griego *amylo*, que significa almidón) viene dado porque inicialmente se pensaba que los depósitos observados eran similares al almidón.^{6,7} Por lo tanto, el término amiloidosis utilizado para definir el conjunto de estas enfermedades se refiere al hecho de que estas son debidas al depósito de proteínas anómalas, que tienen su origen en un mal plegamiento de las proteínas nativas o en un procesamiento erróneo de las mismas, lo que lleva a la generación de estructuras tridimensionales aberrantes.⁸ Por otro lado, la presencia de estos depósitos insolubles en los tejidos afectados es un rasgo común de aproximadamente cuarenta patologías neurodegenerativas y sistémicas de gran importancia socioeconómica, lo que ha despertado un gran interés científico hacia ellos.^{1,2} Cada enfermedad neurodegenerativa amiloide se asocia con la acumulación de fibrillas o fibras amiloides provenientes de una proteína específica, tal y como se refleja en la Tabla II.1.

2.1. Introducción

Tabla II.1. Proteínas asociadas a las principales enfermedades neurodegenerativas.

Proteína implicada	Enfermedad neurodegenerativa
A β	Enfermedad de Alzhéimer
Tau	Enfermedad de Alzhéimer Degeneración del lóbulo frontotemporal Enfermedad de Párkinson Parálisis supranuclear progresiva Degeneración corticobasal
α -sinucleína	Enfermedad de Párkinson Demencia con cuerpos de Lewy Atrofia multisistémica
Huntingtina (poliglutamina)	Enfermedad de Huntington
TDP-43	Degeneración del lóbulo frontotemporal Esclerosis lateral amiotrófica
FUS	Degeneración del lóbulo frontotemporal Esclerosis lateral amiotrófica

De esta forma, las amiloidosis componen un grupo heterogéneo de enfermedades y trastornos asociados con la edad, que suelen afectar a sistemas neuronales concretos o a sistemas anatómico funcionales.^{1, 2, 9} Estas enfermedades afectan al sistema nervioso central y se caracterizan por una pérdida progresiva de neuronas con alteraciones secundarias, debido a que la presencia de los diferentes agregados, estructuras oligoméricas y fibras amiloides de las proteínas mal plegadas provocan un daño celular irreparable.¹⁰⁻¹² Algunas de estas enfermedades causan deficiencias cognitivas y en la memoria, mientras que otras afectan a la respiración, la habilidad de hablar o a la movilidad.

En su estudio histológico, los depósitos proteicos se reconocen como inclusiones, siendo la característica definitoria en el diagnóstico de estas patologías.² En este sentido, durante la segunda mitad del siglo XX, los estudios químicos y físicos de las fibrillas amiloides que habían sido aisladas y purificadas de tejidos y órganos cargados de acumulaciones amiloides llevaron al reconocimiento de que existe una asociación única entre la identificación química de la proteína formadora de fibrillas y el patrón de

2.1. Introducción

síntomas clínicos localizados o sistémicos.^{4, 6, 8} Así, el proceso de fibrilación o formación de fibras amiloides, que conlleva ciertas consecuencias patológicas, es la implicada en multitud de enfermedades tanto comunes como raras (trastornos y enfermedades neurodegenerativas, diabetes mellitus tipo II de inicio en la edad adulta, discrasias de células B plasmáticas, hemodiálisis a largo plazo, polineuropatías hereditarias y síndromes hereditarios de fiebre periódica).^{1, 2, 7} Sin embargo, a pesar de sus diferencias bioquímicas y clínicas, cada una de las amiloidosis comparte características fisiopatológicas comunes debido principalmente a la acumulación de agregados proteicos, como poseer un precursor de proteína amiloidogénica, antecedentes genéticos del hospedador que permitan el desarrollo de la enfermedad, anomalías en la proteólisis que permiten la acumulación de la proteína precursora de la enfermedad y/o de sus intermediarios, y la alteración en la química de las matrices extracelulares.^{9, 13-15} Cada uno de los más de 20 tipos distintos de depósitos amiloides conocidos que son químicamente diferentes contiene un conjunto común de constituyentes de la matriz extracelular, glicosaminoglicanos, proteínas que no forman fibrillas, componente amiloide P sérico y apolipoproteína E.^{16, 17} Hasta ahora se han desarrollado en paralelo tanto los estudios clínicos como los ensayos a nivel de laboratorio, y en la actualidad se está realizando un gran esfuerzo para integrar y utilizar el conocimiento obtenido de la estructura, fisiología y patología de las proteínas para prevenir o mejorar las consecuencias clínicas de las amiloidosis.^{7, 9} De esta manera, utilizando las condiciones adecuadas para alterar artificialmente el plegamiento de las proteínas, se han podido obtener fibras amiloides a partir de más de 30 proteínas, posibilitando así el estudio de su agregación.^{7, 8}

2.1.2. Proteínas amiloides y agregación amiloidogénica

La caracterización de las proteínas amiloides ha sido un tema que ha interesado a numerosos científicos a lo largo del tiempo. Durante muchos años se creyó que los depósitos proteicos eran una sustancia única y singular, a pesar de que Cohen y Calkins demostraron en 1959 que estos depósitos tenían una morfología fibrilar, empleando para ello la microscopía electrónica.¹⁸ Por otra parte, durante mucho tiempo la comprensión de la estructura de las fibrillas y fibras amiloides estaba limitada a la interpretación y análisis de los patrones de difracción de rayos X, los cuales informaban sobre la elevada concentración de estructuras secundarias de lámina- β (Figura II.1), hecho que ha supuesto un importante paso para entender cómo se forman las fibras amiloides.¹⁹⁻²¹

2.1. Introducción

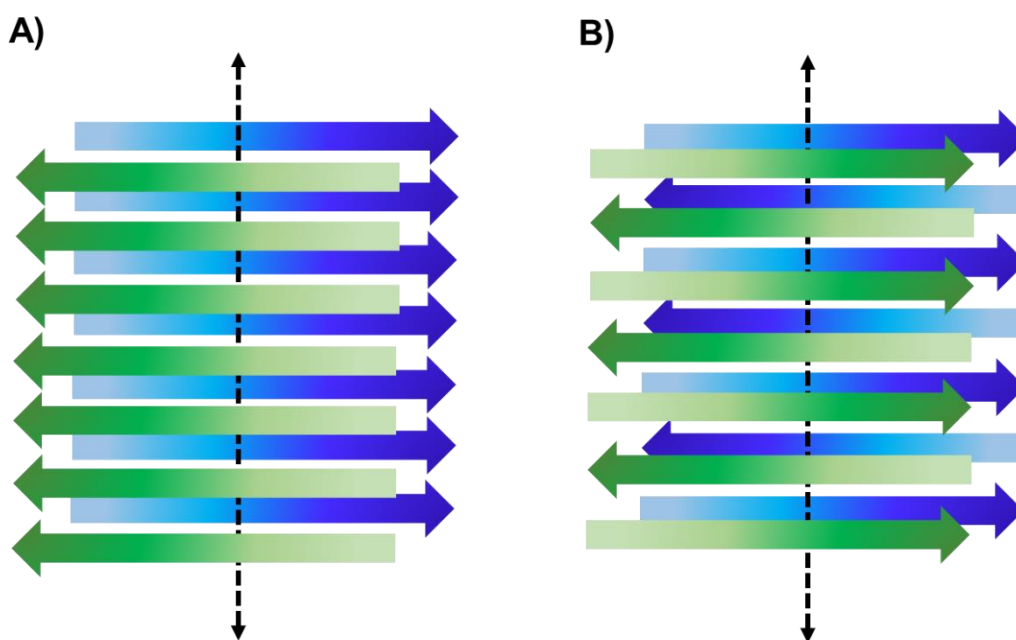


Figura II.1. Representación de las disposiciones tridimensionales de las estructuras lámina- β paralela (A) y antiparalela (B) más comunes en la conformación amiloide. En cada estado (paralela o antiparalela), dos lámina- β intermoleculares (representadas como flechas verdes y azules) discurren a través del eje perpendicular de la fibrilla en crecimiento (flecha punteada).

No obstante, los avances técnicos en el uso de la radiación de sincrotrón,²² el desarrollo de técnicas de criopreservación,²³ el análisis de imágenes de microscopía electrónica,^{24, 25} el uso de la resonancia magnética nuclear multidimensional (RMN)²⁶ y, más recientemente, de la RMN en estado sólido²⁷⁻²⁹ han conseguido aportar una visión más clara de la estructura amiloide y de los potenciales motivos de unión del componente sérico P amiloide SAP (del inglés, *Serum Amyloid P component*), presente en todas las placas amiloides.³⁰

Las proteínas experimentan, durante y después de su síntesis en el interior celular, un proceso de plegamiento que determina la estructura secundaria y terciaria, lo que les permite cumplir sus funciones biológicas al convertirse en estructuras tridimensionales específicas dentro del cuerpo.^{8, 31-33} Como se ha comentado anteriormente los agregados proteicos (estructuras tridimensionales aberrantes) pueden originarse a partir de anomalías en el plegamiento de las proteínas (llamado mal plegamiento), pero también por anomalías surgidas entre proteínas correctamente ensambladas.⁴ Esto lleva a la formación de intermediarios parcialmente plegados, que exponen al entorno o disolvente zonas hidrofóbicas que normalmente estarían escondidas en el interior de la estructura tridimensional nativa de la proteína y que están sometidos a auto-

2.1. Introducción

interacciones dentro de su propia estructura aberrante.^{8, 15} Este hecho determina una eventual agregación de las cadenas polipeptídicas en conformaciones más organizadas ricas en estructuras secundarias de lámina- β .²⁰ El producto de esta agregación resulta en agregados de dimensiones variables, desde dímeros y trímeros solubles hasta estructuras fibrilares insolubles.³⁴ Estos agregados de estructura aberrante no pueden ejercer las mismas funciones que las proteínas que proceden de una síntesis normal y que han tenido un plegamiento correcto.^{7, 9, 15, 34} De los millones de proteínas codificadas en el genoma humano, alrededor de treinta son susceptibles de sufrir errores conformacionales en su estructura polipeptídica nativa que conllevan la pérdida de la función fisiológica y que conducen a la formación de agregados proteicos que pueden dar lugar a la formación de estructuras amiloides que presentan la característica estructura de lámina- β .^{6, 7, 35} Asimismo, el mayor o menor grado de plegamiento en forma de estructura de lámina- β de las proteínas mal plegadas se asocia con una enfermedad o trastorno amiloide específico.^{7, 8} Además, los agregados proteicos pueden aparecer por otras causas diferentes, como mutaciones a nivel genético, lo que conlleva la modificación de la conformación nativa, alteración de las vías implicadas en el procesamiento o de su eliminación.^{1, 8} Independientemente de su origen, estos agregados proteicos resultan resistentes a los mecanismos de degradación y proteólisis, presentan una localización aberrante en las neuronas, pueden alterar la composición química de la matriz extracelular y generan en la célula afectada una respuesta de estrés, resultando directamente tóxicos para las neuronas.^{1, 13, 16, 17} De esta manera parece que las especies más reactivas y tóxicas para las células son los agregados amiloides iniciales, responsables de la interacción maligna con las neuronas, y que pueden provocar una disrupción en la función de las mismas, e incluso su lisis.^{11, 36} Así, en las enfermedades neurodegenerativas el daño es debido a la interacción de los agregados proteicos con diferentes componentes celulares, los cuales van perdiendo su función fisiológica.^{8, 37}

En las PCD se forman inicialmente, bajo ciertas condiciones, agregados proteicos pequeños y solubles a partir de monómeros proteicos,³⁸ que resultan tóxicos para las células, y que pueden provocar daño en las mismas.^{10, 11} Posteriormente algunos de estos agregados continúan la vía amiloidogénica, y forman agregados tardíos insolubles de mayor tamaño que también pueden resultar tóxicos para las células.^{12, 39, 40} El proceso de transformación de agregados pequeños tempranos y solubles a agregados tardíos e insolubles representa un paso clave en el entendimiento y comprensión de las enfermedades neurodegenerativas amiloides, ya que un control de este proceso

2.1. Introducción

supondría un gran avance en el control de la enfermedad.^{1, 12} Los agregados tardíos e insolubles que continúan con la vía amiloidogénica forman protofibras amiloides de mayor tamaño que, al agregarse, componen las conocidas como fibras o fibrillas amiloides, que también resultan tóxicas.⁴¹ Estas fibras amiloides se depositan en forma de placas amiloides (de entre 20 y 100 μm) en los espacios interneuronales de la materia gris del cerebro de las personas afectadas por la enfermedad.⁴¹ Pese a que tradicionalmente se pensaba que estas placas neuríticas eran las responsables del daño tisular y afección neuronal, actualmente se cree que representan estructuras de protección contra el avance de la enfermedad.⁶ En la Figura II.2 se muestra de forma esquemática el proceso de agregación amiloide.

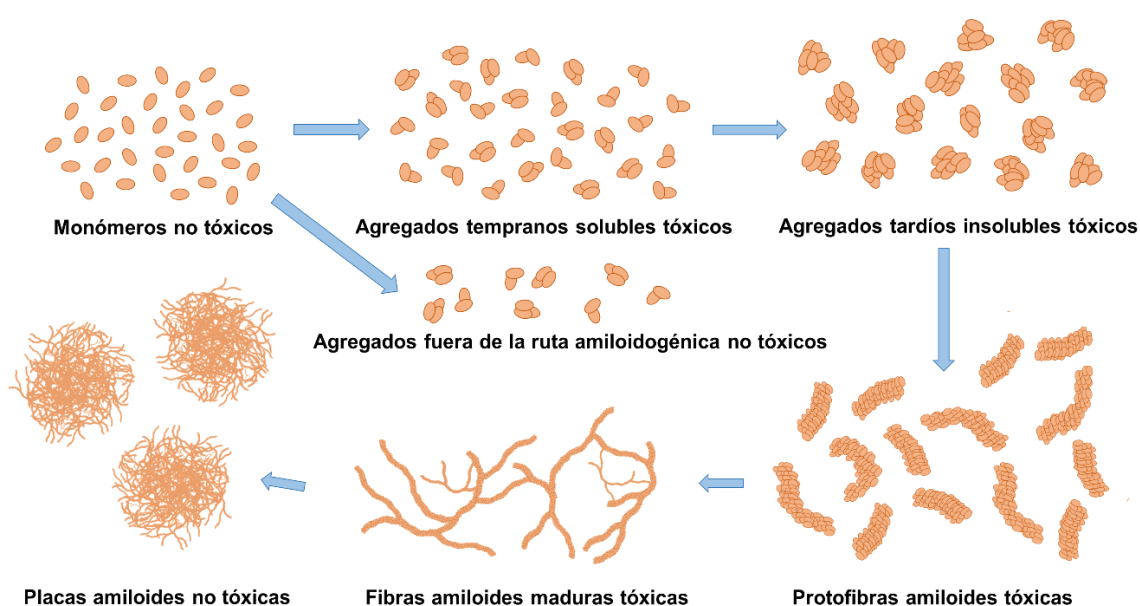


Figura II.2. Representación esquemática del proceso de la agregación proteica amiloide.

De esta manera se cree que las fibrillas amiloides se forman mediante un patrón de crecimiento nucleado y dependiente de la concentración, análogo al crecimiento de cristales.^{8, 42-44} Los precursores proteicos aberrantes forman redes intermoleculares estables, enlazadas por puentes de hidrógeno, los cuales probablemente implican un intercambio de dominios.^{8, 40} Este hecho potencia la formación de la característica lámina- β extendida en las fibrillas y fibras amiloides.^{20, 34} Asimismo, se piensa que las hebras se extienden paralelamente al eje de crecimiento de las fibrillas.¹⁵ Por lo tanto, la estructura descrita es la responsable de los patrones característicos de difracción de rayos X de las fibrillas.^{19, 20} Igualmente se piensa que el crecimiento de las fibrillas es mucho más complejo que la simple adición de monómeros, ya que la microscopía electrónica y la microscopía de fuerza atómica han demostrado la presencia de

2.1. Introducción

componentes similares a micelas y de protofilamentos durante el crecimiento.^{45, 46} Las fibras amiloides maduras se suelen ensamblar como estructuras en forma de cuerda, cuyos filamentos entrelazados presentan una estructura helicoidal con el núcleo hueco.⁴⁷ Estas fibras pueden ser muy largas, aunque generalmente tienen un diámetro de entre 100 y 150 Å.^{6, 8} Por otra parte, la desestabilización de las fibras y de sus precursores durante el crecimiento no resulta demasiado difícil, mostrando una estabilidad térmica reducida.⁴⁸ De hecho, las condiciones experimentales que promueven el crecimiento de fibras *in vitro* pueden conducir a una desnaturalización parcial de las mismas y a desplazamientos específicos de las hebras desde sus pliegues nativos.^{48, 49}

De esta forma, todos los procesos explicados anteriormente que tienen lugar en el interior del cuerpo determinan los signos y síntomas propios de las PCD a lo largo del tiempo.^{1, 2} Debido a ello, la comunidad científica está realizando actualmente un gran esfuerzo para entender y comprender en su totalidad los mecanismos que gobiernan dichas enfermedades, así como para desarrollar nuevas técnicas y herramientas que permitan un diagnóstico precoz de las mismas. Dentro de estas nuevas herramientas para el estudio de las enfermedades neurodegenerativas, destacan las técnicas de imagen, las cuales facilitan el descubrimiento de fármacos y permiten monitorizar su eficacia.^{42, 50, 51} Asimismo, estas técnicas permiten estudiar también los procesos que tienen lugar a nivel celular relativos a estas enfermedades. Una de las técnicas más ampliamente utilizada en el estudio de las enfermedades neurodegenerativas amiloides es el empleo de moléculas fluorescentes que permiten realizar un seguimiento específico de los procesos relacionados con dichas enfermedades, como la agregación proteica.⁵² Esta metodología resulta altamente útil y ventajosa debido a su baja invasividad.⁵¹ A lo largo de esta Introducción se explicarán y analizarán las técnicas más novedosas para la detección, caracterización y estudio de los agregados amiloides.

Asimismo, el fenómeno de agregación amiloide que da como resultado, en última instancia, la formación de fibras no es una característica exclusiva de las proteínas ligadas a las enfermedades neurodegenerativas amiloides, sino que la gran mayoría de proteínas puede experimentar este proceso bajo las condiciones experimentales adecuadas, ya que contienen secuencias que las predisponen a ello.⁵³ Estas secuencias proporcionan una serie de ventajas estructurales y funcionales siempre que la agregación se mantenga bajo control.⁵⁴ De hecho, se sabe que la conformación más estable que puede adoptar una proteína no es el estado nativo, sino la fibra amiloide

2.1. Introducción

altamente repetitiva y estructurada. Así, las fibras amiloides constituyen un sumidero termodinámico en el que pueden quedar atrapadas múltiples proteínas.⁵⁵ Existen múltiples ejemplos en bibliografía de agregación amiloide de proteínas no ligadas a enfermedades, como por ejemplo apoferritina (APO, cuya agregación se estudia en la presente Tesis Doctoral) y β -lactoglobulina.^{56, 57}

2.1.3. Agregación del péptido A β

La EA representa actualmente uno de los problemas de salud más importantes en el mundo industrializado. Es un trastorno neurodegenerativo, progresivo y multifactorial, caracterizado por una aparición gradual que conlleva un desgaste cognitivo global.⁵⁸ Esta patología afecta principalmente a la corteza cerebral, por eso es definida como una enfermedad neurodegenerativa cortical, y su principal manifestación clínica es la demencia.⁵⁹ Esta enfermedad se suele manifestar clínicamente a través del deterioro inicial de la función intelectual superior, presentando deficiencias en la memoria y en la orientación visoespacial, junto con la discapacidad de juicio, trastornos de la personalidad y del lenguaje.⁶⁰ Posteriormente se produce una pérdida grave de la memoria y afasia, que indican una disfunción cortical casi total. Finalmente, tras un largo período que puede alcanzar hasta los 10 años o más, el paciente queda incapacitado, mudo y/o inmóvil.^{3, 60} Hoy en día es la causa más frecuente de demencia en la población anciana, aumentando su incidencia conforme lo hace la edad, siendo esta el factor de riesgo más importante para los trastornos del sistema nervioso central.³⁷ La característica patológica principal de la EA es la acumulación de depósitos o placas formadas por fibras de péptido β -amiloide (A β) y de ovillos neurofibrilares en el neocórtex y el hipocampo del cerebro.⁶ Históricamente, esta relación se estableció cuando el neurólogo bávaro Alois Alzheimer comunicó en 1907 los hallazgos histológicos de un caso inusual de demencia, que fueron el descubrimiento de placas extracelulares y ovillos intraneuronales en el cerebro.⁶¹ En ese momento se desconocía la naturaleza proteica de las placas amiloides. Sin embargo, los estudios químicos de proteínas realizados casi 80 años después (1984) por Glenner y Wong demostraron la naturaleza proteica de las placas amiloides, y proporcionaron la primera información sobre la estructura primaria del A β .⁵⁹ Después, en 1987 se comunicó el logro de la clonación del gen que codifica para el precursor del A β , la proteína transmembrana precursora amiloidea (PPA).⁶² Esta es una glicoproteína integral de membrana que se produce en tres formas predominantes; de 695, 751 o 770 aminoácidos de longitud, y que cuando es degradada por la β - y la γ -secretasa mediante endoproteólisis postraducciona se rompe en pequeños fragmentos de 36 a 43 aminoácidos, los que

2.1. Introducción

conocemos como péptido A β .^{4, 7, 63} El gen estructural de la PPA está localizado en el cromosoma 21, el mismo que está triplicado en el síndrome de Down. De hecho, los pacientes con síndrome de Down que alcanzan a vivir 50 años o más desarrollan invariablemente EA, habiéndose detectado depósitos amiloides en algunos pacientes de tan sólo 12 años.⁵⁹ Esta observación sugirió que el gen de la PPA y la EA estaban relacionados, confirmándose posteriormente mediante estudios que han aportado pruebas sólidas que respaldan esta hipótesis.^{7, 59, 63}

El conocimiento que se tiene hasta ahora de las placas amiloides revela que es una estructura dinámica que comprende una acumulación de fibrillas y fibras amiloides, dentro y alrededor de las cuales se encuentran neuritas distróficas (hinchadas); una variedad de macromoléculas como componentes del SAP, apolipoproteína E y proteoglicanos; un infiltrado de células fagocíticas que incluye astrocitos y microglía y neuronas muertas y dismórficas.^{4, 8, 15} Es por ello que se pensaba que las placas eran neurotóxicas, llevando en 1992 a Hardy y Higgins a proponer la "hipótesis de la cascada amiloide".⁶⁴ El principio central de esta hipótesis es que la EA es un "resultado directo de la deposición de A β ". Sin embargo, el conocimiento obtenido en las últimas décadas ha debilitado el fundamento de esta hipótesis.⁷ Por un lado, el desarrollo temporal y anatómico de las placas es incoherente con el curso de la enfermedad en humanos, y con la progresión de la disfunción neuronal y la pérdida de neuronas en animales transgénicos.⁶ Así, estudios realizados en ratones transgénicos que expresan la PPA humana y que producen A β con una abundante deposición amiloide en las etapas más maduras y finales de su vida, revelan déficits neurológicos anteriores a la observación de los depósitos.⁶⁵ En este contexto la formación de ovillos neurofibrilares (depósitos fibrilares intracelulares de proteína Tau) es un mejor indicador del estado de la enfermedad.^{13, 63, 66} Por otro lado, también se han establecido correlaciones entre la concentración de A β soluble y no fibrilar en el cerebro, plasma y líquido cefalorraquídeo (LCR) y la gravedad de la EA.⁶⁷⁻⁶⁹ De esta forma se ha producido un cambio de paradigma, pasando de la primacía de las fibras y placas amiloides como causa de la EA a la primacía de los precursores de dichas fibras y conjuntos oligoméricos. Consecuentemente, el péptido A β y sus estados oligoméricos iniciales prefibrilares han despertado un gran interés en la comunidad biomédica en las últimas décadas debido su relación causal con la EA, considerándose la principal fuente de citotoxicidad unida a esta patología, y siendo por ello una de las dianas farmacológicas más interesantes.⁵⁰

2.1. Introducción

Así, los estudios básicos de la agregación del A β han revelado un número creciente de formas oligoméricas prefibrilares como diferentes tipos de agregados, protofibrillas y otras estructuras.⁷⁰ Por tanto, la identificación de los diferentes tipos de agregados amiloides tanto en la EA como en el resto de amiloidosis, así como el estudio y comprensión de su papel dentro de las enfermedades neurodegenerativas vinculando su comportamiento biofísico con los efectos clínicos, resulta imprescindible para encontrar la cura de dichas enfermedades.

Paralelamente se ha descubierto recientemente que el A β desempeña diferentes funciones no relacionadas con la EA, tales como la activación de quinasas,⁷¹ la regulación del transporte de colesterol⁷² y la actividad antimicrobiana.⁷³ En cuanto a las formas predominantes de A β que se pueden encontrar *in vivo* están la A β_{40} (residuos 1-40) y la A β_{42} (residuos 1-42).^{38, 52, 74} De entre todas las isoformas de A β , la A β_{42} (Figura II.3) parece ser la especie más neurotóxica comparada con el otro fragmento más común, el A β_{40} .^{75, 76} Resulta llamativo que A β_{42} y A β_{40} difieran significativamente tanto en su toxicidad y funciones fisiológicas como en su mecanismo de agregación, teniendo en cuenta que sólo se diferencian en dos residuos aminoacídicos extra presentes en el extremo C-terminal de la isoforma A β_{42} .^{8, 77}

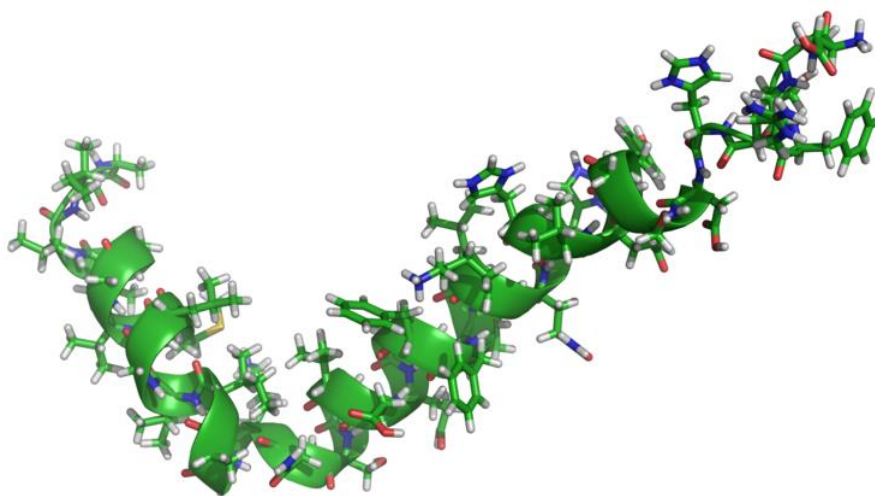


Figura II.3. Estructura tridimensional del péptido A β_{42} . Reproducido con permiso de Antje Meyer (Probiodrug, Halle, Germany), Christoph Siethoff, Filip Sucharski, and Matthias Orth (Swiss BioQuant, Reinach, Switzerland).

Por otra parte, actualmente se han identificado mutaciones dentro de la región A β del gen de la PPA o inmediatamente adyacentes a ella.⁷⁸ Como consecuencia de estas mutaciones se produce un aumento de las concentraciones de A β , aumentando la relación A β_{42} /A β_{40} y la predisposición del péptido a formar fibras amiloides.^{75, 78}

2.1. Introducción

Consecuentemente, los estudios histopatológicos, biológico-moleculares y genéticos respaldan el papel central del A β en la EA. De manera análoga a lo que sucede con la agregación de A β , se ha detectado durante el proceso de agregación y formación de fibras de la α -sinucleína (α Syn), que es una proteína relacionada con el progreso de la EP, que la formación de oligómeros compactos altamente estructurados y resistentes a la proteínasa-K a partir de una lenta conversión de agregados más tempranos inducen unos niveles celulares mucho mayores de especies reactivas de oxígeno (ROS) que los oligómeros tempranos precursores.⁴² Esto constituye un modelo muy importante de qué tipo de agregados u oligómeros constituyen las especies más citotóxicas.

Centrándonos en la agregación del péptido A β , los oligómeros o agregados formados interactúan con lípidos de membrana a través de interacciones electrostáticas débiles que promueven transiciones o cambios conformacionales de estructuras de tipo α -hélice a estructuras de tipo lámina- β .^{79, 80} También se ha observado que el A β altera la fluidez de los fosfolípidos de membrana a través de su propia inserción dentro de las bicapas lipídicas.^{34, 79, 80} Esa inserción, que induce la formación de poros, activa la señalización del calcio y la NADPH oxidasa, estimulando la producción de óxido nítrico, y finalmente produciendo un incremento del estrés oxidativo y la neurodegeneración.^{79, 80} De todas las estructuras amiloides conocidas, el péptido A β quizás sea la más importante a nivel clínico debido a su implicación en la fisiología humana.¹⁴ Asimismo, se produce de forma normal y ubicua en el cuerpo humano a lo largo de toda la vida.^{4, 73} En su estructura primaria no hay cisteínas y, por lo tanto, no es posible el establecimiento por puentes disulfuro intra o intermoleculares.⁷⁴ Por otro lado, el péptido no se modifica postraduccionalmente de forma constitutiva al provenir de la fragmentación de la PPA, siendo además una secuencia anfipática.^{8, 74} En las primeras 28 posiciones se encuentran los aminoácidos polares, y en las últimas 14 posiciones están los aminoácidos apolares.^{8, 74} En 2012, se descubrió que el péptido A β_{42} asociado a la EA formaba oligómeros tóxicos y no tóxicos, aunque en 2003 ya se informó de que los oligómeros de A β_{42} podían agregarse incubando 100 μ M de A β_{42} a 4-8 °C durante 24 h sin agitación, observándose que podían ser tóxicos o no para las células.^{8, 40, 81-83} Continuando con la citotoxicidad de los agregados de A β , D. Klenerman *et al.* describieron un método de ultracentrifugación que genera un gradiente para separar diferentes tipos de oligómeros de A β_{42} acorde con su tamaño y densidad.⁸⁴ Una vez identificados los distintos tipos de agregados amiloides, consiguieron monitorizar su toxicidad empleando dos métodos capaces de medir el efecto citotóxico: un ensayo cuantitativo para determinar la habilidad de los agregados peptídicos para desorganizar

2.1. Introducción

la estructura de bicapas lipídicas y un ensayo que mide la producción de citoquinas en células de microglía, como una estimación de la capacidad inflamatoria de los diferentes agregados. Con estos experimentos se demostró que cuanto más grande es el tamaño de los agregados, más baja es su capacidad para desorganizar bicapas lipídicas. Sin embargo, se observó una mayor habilidad para causar inflamación conforme el tamaño de estos agregados aumentaba. Estos hechos están correlacionados con cambios estructurales en los diferentes agregados, que poseen diferentes tamaños y estructuras. Asimismo, también se estudió el efecto de los agregados de péptido A β ₄₀ y A β ₄₂ en células neuronales en función de su dosis, mostrando un incremento en las ROS generadas por las neuronas conforme se aumentaba la concentración de péptido añadido.

2.1.4. Agregación de la apoferritina

En los seres humanos la apoferritina (APO) es una proteína que se produce en el intestino y se almacena en la mucosa intestinal, el bazo, la médula, el hígado y en el sistema fagocítico mononuclear (antes conocido como sistema retículo-endotelial), y cuya función es captar el hierro contenido en los alimentos permitiendo su paso a través de dicha mucosa intestinal.^{85, 86} Cuando lleva el hierro unido a ella recibe el nombre de ferritina. La ferritina se encarga del almacenamiento del hierro en la mayoría de los organismos, y es relativamente estable a las variaciones de temperatura (sigue siendo estable a los 70°C) y de pH (siendo estable en el rango 3-10).⁸⁵ La APO es una proteína globular y multimérica de 24 subunidades polipeptídicas (de 480 kDa en total) cuyo autoensamblaje define una forma esférica hueca.⁸⁷ En eucariotas, la estructura de la APO es el producto del autoensamblaje de dos partes que contienen las subunidades: una parte o subunidad L (de “*light*”, con alrededor de 20 kDa) y otra parte o subunidad H (de “*heavy*”, con alrededor de 21 kDa).⁸⁷ Las dos subunidades tienen papeles diferentes; en las subunidades H se encuentra el centro ferroxidasa, donde ocurre la catálisis de la oxidación del Fe²⁺ a Fe³⁺, mientras que en las subunidades L se realiza la formación de oxihidróxidos de hierro. Cualquier ruptura en la proporción H/L de la ferritina o mutación en las subunidades H o L está relacionada con un principio patogénico. De hecho, la mutación en las subunidades L de la ferritina humana lleva a trastornos neurodegenerativos llamados neuroferritinopatías.^{86, 88} Así, la ferritina tiene un papel fundamental en el metabolismo del hierro, oxida el Fe²⁺ y genera el Fe³⁺, que se almacena en la cavidad interna de la misma proteína. La cavidad interna posee un diámetro de 8 nm, y tiene la capacidad de retener hasta 4500 átomos de Fe³⁺.⁸⁷ Además,

2.1. Introducción

su gran habilidad para “secuestrar” este elemento en el organismo hace que tenga una doble función, tanto en el almacenamiento del hierro, como en la detoxificación del Fe^{3+} insoluble y de las ROS.⁸⁶ La importancia de estas funciones resulta evidente por la distribución ubicua de la ferritina entre las diferentes especies, y también por la regulación de la biodisponibilidad del hierro proporcionada por la ferritina, atendiendo a la demanda celular. La APO es la forma sin hierro (vacía) de la ferritina, que resulta de la eliminación del óxido de hierro. Además, se ha observado que los niveles de expresión de ferritina y la cantidad de Fe^{3+} almacenada están alterados en enfermedades como el Párkinson o Alzhéimer.^{89, 90} Paralelamente se ha demostrado que la APO puede sufrir un proceso de formación de fibras bajo las condiciones adecuadas de temperatura y pH, de manera similar al de otras proteínas globulares que se agregan y que resultan en fibras amiloides.^{56, 91, 92} Estas fibras son comparables por morfología, tamaño y rigidez a las fibras amiloides involucradas en las enfermedades neurodegenerativas. Además, las fibras de APO similares a las amiloides tienen unas propiedades que las hacen adecuadas para el desarrollo de nuevos materiales nanohíbridos artificiales.^{93, 94} La comprensión de la estructura tridimensional, morfología y quiralidad de las fibras formadas es fundamental debido a la relación con su actividad bioquímica y potencial toxicidad asociada.⁵⁶

2.1.5. Sondas luminiscentes y metodologías para el estudio de la agregación amiloide

Como se ha comentado anteriormente, las enfermedades neurodegenerativas amiloides como la EA se caracterizan por la agregación anormal de proteínas específicas que, siguiendo la vía amiloidogénica, terminan formando placas y depósitos amiloides.^{36, 42, 95} Por lo tanto, resulta tan fundamental como necesario desarrollar nuevas y avanzadas metodologías de detección, análisis y visualización de las estructuras amiloides, tanto de los monómeros y agregados como de las fibrillas, fibras y otras conformaciones, para así comprender mejor los mecanismos que gobiernan los procesos de agregación y fibrilización.^{40, 96, 97} Las técnicas basadas en fluorescencia son particularmente adecuadas para el seguimiento de interacciones biomoleculares,⁹⁸ resultando fundamentales en biodetección,⁹⁹ con numerosas aplicaciones en la investigación de las enfermedades neurodegenerativas amiloides. De la misma manera, resulta igual de importante el desarrollo, síntesis y obtención de nuevos compuestos fluorescentes, y la

2.1. Introducción

mejora de los ya existentes, que permitan el estudio y monitorización efectivas de dichos procesos involucrados en la amiloidogénesis.

De esta forma, la identificación y caracterización de las diferentes especies formadas representa uno de los pasos más importantes para entender el proceso de la agregación aberrante de proteínas. En este sentido se han desarrollado en los últimos años diferentes técnicas que permiten estudiar las distintas especies de agregados y estructuras amiloides (Figura II.4), permitiendo así caracterizar su estructura y propiedades, separándolas y cuantificándolas para evaluar su potencial toxicidad e implicación en el desarrollo de las amiloidosis.⁵² Asimismo, el desarrollo de una nueva técnica implica la mejora de las capacidades de las ya existentes, aportando así información adicional que de otra forma no sería posible obtener. En esta parte de la Introducción del Bloque II nos centraremos en los fluoróforos utilizados para el estudio de la agregación amiloide. Después comentaremos las técnicas basadas en la espectroscopía de fluorescencia y las técnicas de imagen de microscopía de fluorescencia existentes para el estudio de los procesos amiloidogénicos.

Proceso esquemático de la agregación amiloide de A β



Técnicas para el estudio de la agregación amiloide de A β



Figura II.4. Esquema del proceso de la agregación amiloide de A β (parte superior) y de las diferentes técnicas para el estudio de la agregación amiloide (parte inferior). Hecho con BioRender.com, con permiso del autor de la licencia.

2.1.5.1. Fluoróforos utilizados para el estudio de la agregación amiloide

Actualmente se conocen multitud de sondas fluorescentes extrínsecas que se unen a las proteínas amiloides. De hecho, los colorantes fluorescentes capaces de unirse de forma no covalente a las estructuras amiloides se conocen desde hace décadas, como son el Rojo Congo (RC) o la Tioflavina T (ThT).¹⁰⁰⁻¹⁰³ Asimismo existen otros fluoróforos

2.1. Introducción

como la fluoresceína o la tetrametilrodamina que se encuentran unidos a la estructura de la proteína aberrante mediante enlace covalente (normalmente al grupo -amino de una lisina, al grupo -amino del N-terminal o al grupo tiol de la cisteína) y que se emplean en el estudio de las amiloidosis.^{12, 104} A principios y mediados del siglo XX la detección histológica de estructuras amiloides se realizaba con RC, un colorante carmesí adaptado de la industria textil.¹⁰⁵ Sin embargo, el proceso de tinción con este compuesto resultaba laborioso, tóxico y difícil de interpretar. En 1959, Vassar y Culling describieron el uso de la ThT como marcador fluorescente para las fibrillas y fibras amiloides, demostrando así el potencial de la microscopía fluorescente para el diagnóstico de este tipo de estructuras.¹⁰⁶ De este modo observaron como la ThT aumentaba considerablemente su emisión fluorescente al localizarse en los depósitos amiloides comparado con otros colorantes como el Rojo Congo o el Cristal Violeta. De hecho, la técnica de fluorescencia por excelencia, considerada actualmente como el test de referencia para monitorizar la formación de fibrillas y fibras amiloides es el ensayo de intensidad de fluorescencia utilizando la ThT.¹⁰³ La inserción de este compuesto en las estructuras amiloides produce un aumento en su fluorescencia de varios órdenes de magnitud,¹⁰⁷ debido a que es un rotor molecular (como se explicará más adelante) que frena su rotación al quedar atrapado entre las fibras, facilitando así el proceso de fluorescencia. Por regla general, la gráfica de intensidad de la ThT sigue una tendencia sigmoidea, conforme a la cinética de formación de las especies fibrilares de la proteína amiloide sometida a estudio (Figura II.5).¹⁰² Tradicionalmente se ha pensado que este colorante planteaba el problema de que su unión a los agregados y estructuras primarias era débil, por lo que no se podía utilizar para la caracterización de dichos agregados y estructuras debido a la escasez de lugares de unión.^{12, 108} Sin embargo, se ha confirmado que la ThT se puede utilizar para detectar agregados amiloides eficientemente mediante el uso de las técnicas adecuadas,¹⁰⁹ como el método de molécula única SAVE (por sus siglas en inglés *Single Aggregate Visualization by Enhancement*) desarrollado por Mathew H. Horrocks *et al.* del que se hablará más adelante.¹¹⁰

2.1. Introducción

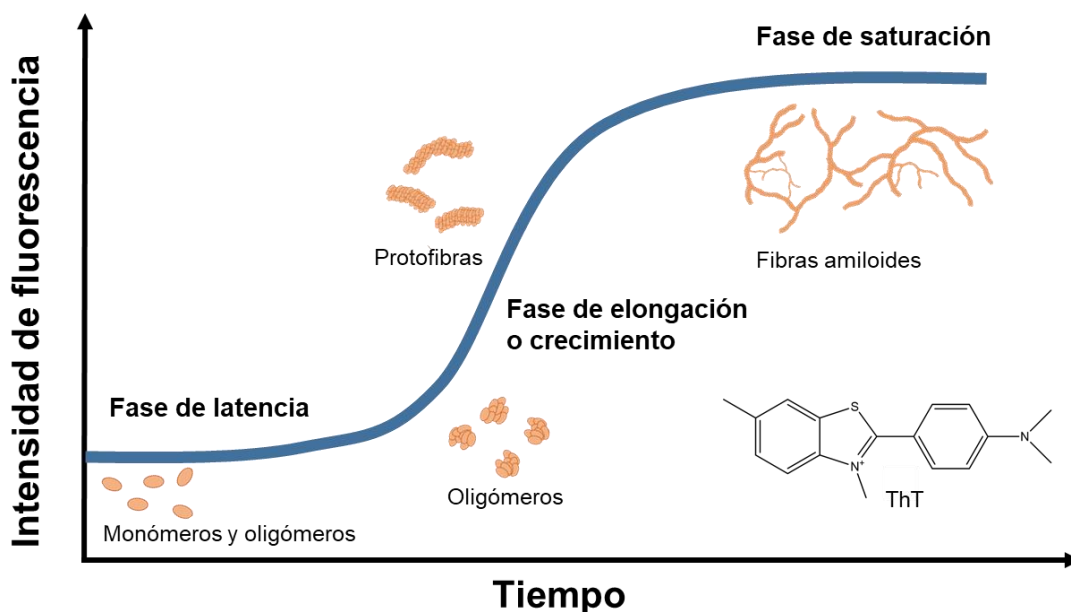


Figura II.5. Gráfica de intensidad de fluorescencia de la ThT monitorizando la cinética de formación de las especies fibrilares de una proteína amiloide.

Otros fluoróforos empleados para la agregación amiloide presentan esta dificultad de unión a oligómeros y estructuras más primarias del proceso de fibrilación, como son el oligotiofeno pentamérico pFTAA o el Rojo Nilo.^{108, 111, 112} Por tanto, es necesaria la búsqueda de otros fluoróforos que sean capaces de unirse eficientemente a las estructuras amiloides surgidas durante los primeros estadios de agregación y que sean compatibles con las diferentes técnicas de estudio existentes. Algunos ejemplos de compuestos fluorescentes que han demostrado ser capaces de detectar diferentes tipos de agregados y fibras amiloides, incluso en células y tejidos, incluyen derivados de curcumina,¹¹³ fluoróforos basados en BODIPY,¹¹⁴ fluoróforos de oxazina,¹¹⁵ derivados de benzimidazol,¹¹⁶ politiofenos conjugados,¹¹⁷ colorantes de tiazol¹¹⁸ y complejos de rutenio,^{119, 120} entre otros. Sin embargo, estos compuestos se limitan por lo general a proporcionar información morfológica sin aportar datos cuantitativos sobre la estructura de los agregados. De esta manera se han desarrollado nuevas estrategias y compuestos capaces de estudiar en mayor profundidad las interacciones proteína-proteína y la estructura de las especies amiloides formadas durante el proceso de agregación, como son los fluoróforos sensibles al medio que los rodea. A diferencia de los colorantes fluorescentes "clásicos", los colorantes fluorescentes sensibles al medio circundante presentan un comportamiento que les permite cambiar sus propiedades fluorescentes como intensidad o color de emisión en respuesta a los cambios en las propiedades fisicoquímicas de su entorno molecular.^{121, 122} Son "moléculas inteligentes"

2.1. Introducción

que se pueden usar como sensores para sondear el entorno biológico local y monitorear las interacciones biomoleculares como la agregación amiloide.^{122, 123} Así, al cambiar las propiedades del sitio local de interacción, estos compuestos cambian también sus propiedades fluorescentes.¹²⁴ La respuesta de estos compuestos viene impulsada por diferentes reacciones del estado excitado (producidas por cambios conformacionales o complejos de transferencia de carga) e interacciones no covalentes con el entorno, como fuerzas intermoleculares universales (fuerzas de Van der Waals, fuerzas ion-dipolo o las producidas por puentes de hidrógeno). Los fluoróforos sensibles al medio que son de interés para el estudio de la agregación amiloide se pueden clasificar en rotores moleculares y compuestos solvatocrómicos, tal y como se indica en la Figura II.6:

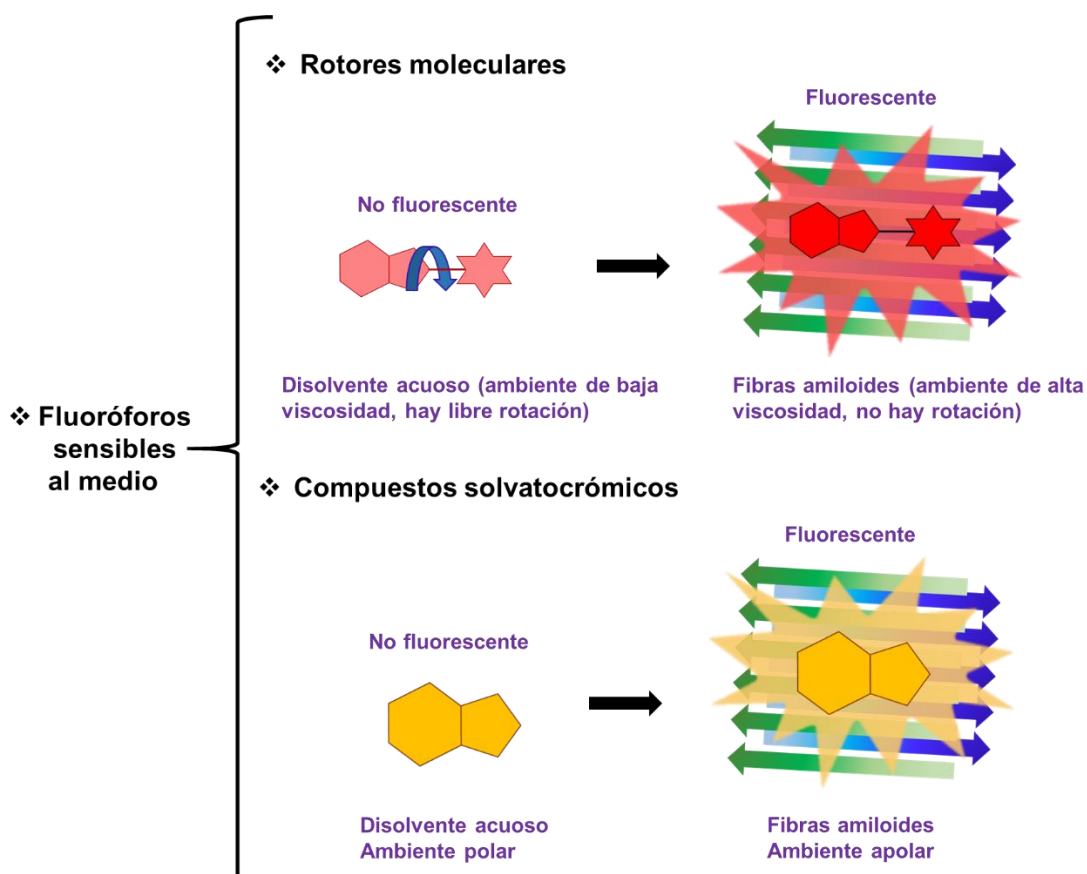


Figura II.6. Clasificación de los colorantes fluorescentes sensibles al medio en rotores moleculares y compuestos solvatocrómicos.

Los rotores moleculares muestran una fotofísica sensible al medio circundante, dependiendo tanto sus intensidades de emisión de fluorescencia como sus tiempos de

2.1. Introducción

vida en gran medida de la viscosidad del entorno en el que se encuentran.^{125, 126} Generalmente estos compuestos aumentan su intensidad de emisión conforme aumenta la viscosidad del medio que los rodea, debido a que se frena su rotación intramolecular, facilitando así el proceso de fluorescencia. Como se ha comentado, la ThT es un colorante que pertenece al grupo de los rotores moleculares (Figura II.7)

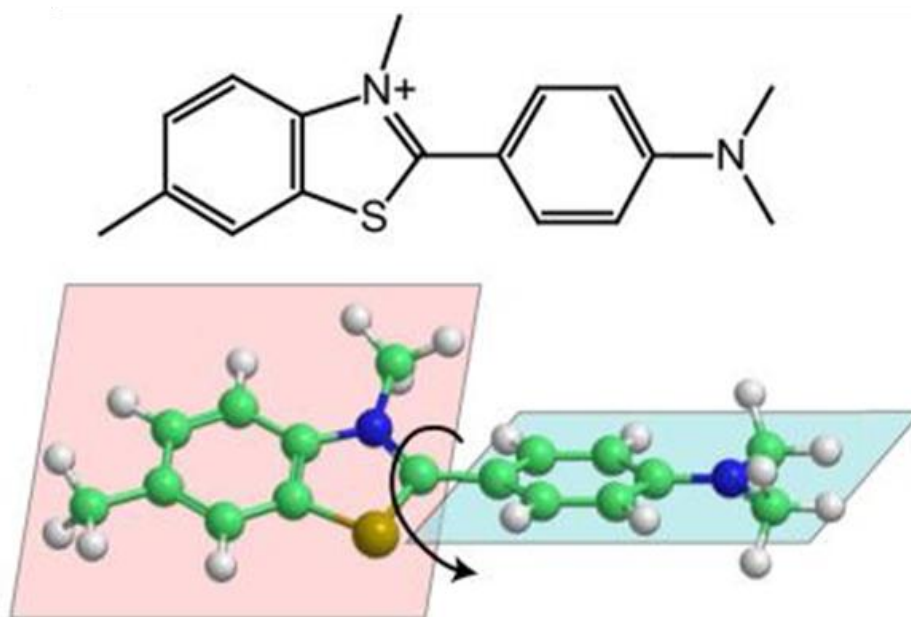


Figura II.7. Estructura de la ThT (arriba) y ambos segmentos de la ThT sobre sus planos (abajo). La rotación se produce en el segmento que está en el plano azul. Reproducido de ¹⁰⁰ con permiso de Copyright 2010 Elsevier B.V.

En este caso, cuando la ThT se encuentra en disolución existe una barrera de baja energía que permite que los anillos de bencilamina y benzotiol giren libremente alrededor del enlace carbono-carbono que comparten. Esta rotación fomenta la desactivación no radiativa del estado excitado del fluoróforo que se genera durante la excitación fotónica, lo que provoca una baja emisión fluorescente.¹⁰⁰ Sin embargo, la inmovilización rotacional del colorante mantiene el estado excitado, lo que da lugar a un incremento en la emisión fluorescente de tres órdenes de magnitud.¹²⁷⁻¹²⁹ Esta inmovilización ocurre cuando las fibrillas y fibras amiloides bloquean estéricamente las moléculas de ThT que se unen a ellas.¹⁰⁰ No obstante, a pesar de que el ensayo de intensidad de fluorescencia utilizando la ThT represente el “*gold standard*” para monitorizar la formación de fibras amiloides, algunos estudios señalan que este colorante promueve por sí mismo la agregación amiloide,¹³⁰ además de ser

2.1. Introducción

autofluorescente cuando se utiliza en concentraciones superiores a 5 μM .^{127, 131} Un ejemplo de sensor amiloide basado en el rotor molecular ThT es AmyBlink-1, presentado por Amandeep Kaur *et al.*¹³² La estructura de AmyBlink-1 comprende una ThT conectada a un fluoróforo Alexa Fluor 647 (AF647) a través de un enlazador alifático (Figura II.8). La emisión de la ThT es de color verdosa, mientras que la de AF647 es de color roja. Mientras que el grupo ThT es fluorescente sólo al unirse a las fibrillas y fibras amiloides, la emisión de AF647 no cambia al detectar tanto fibrillas y fibras amiloides como agregados y otras estructuras surgidas en las primeras etapas del proceso de agregación amiloide. De esta forma, AmyBlink-1 muestra un aumento en la ratio de intensidad de emisión de fluorescencia verde/rojo de 5 veces tras su interacción con las fibrillas y fibras amiloides.

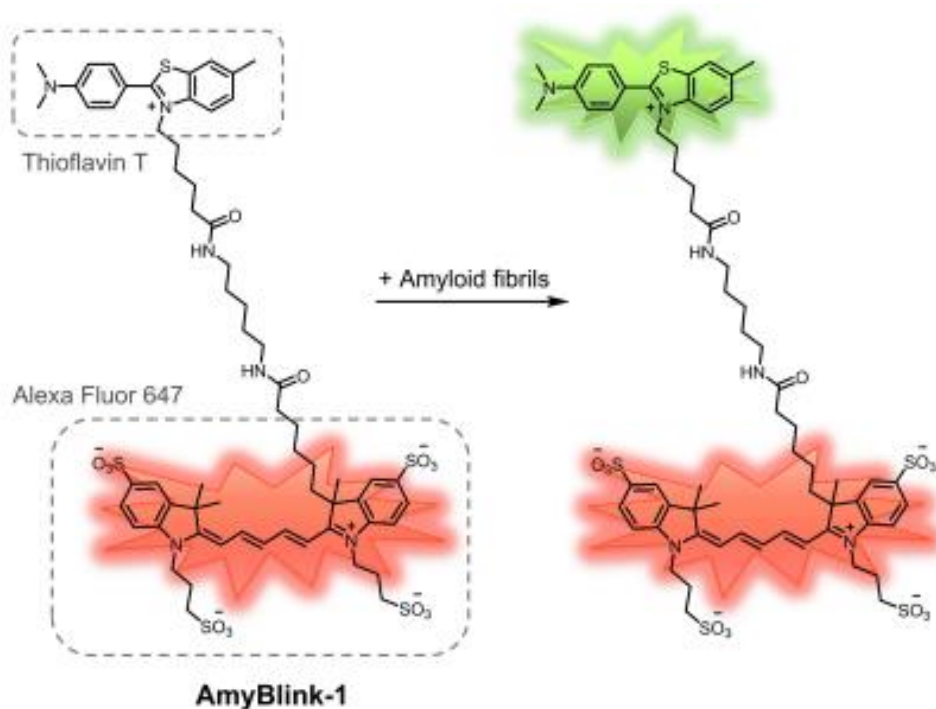


Figura II.8 Estructura del sensor AmyBlink-1 compuesto por ThT unida a AF647 mediante un enlazador alifático. La ThT aumenta su fluorescencia al unirse a las fibrillas y fibras amiloides, mientras que la emisión de AF647 no cambia. Reproducido de ¹³² con permiso de Copyright 2021 Wiley-VCH GmbH.

Asimismo, se han desarrollado rotores moleculares fluorescentes capaces de emitir en la región espectral del infrarrojo cercano (NIR), y que pueden detectar diferentes agregados de A β . Por ejemplo, Misun Lee *et al.* han desarrollado una sonda (yoduro de 2-((1E,3E)-4-(4-(dimetilamino) fenil) buta-1,3-dien-1-il)-1,1,3-trimetil-1H-benzo[e]indol-3-io) que emite fluorescencia en el NIR al detectar agregados de A β en disolución

2.1. Introducción

acuosa.¹³³ Se trata de un sistema dador- π -aceptor (posee un puente π conjugado entre los grupos dimetilaminoestireno y benzo[e]indol), cuya fracción dimetilamino interactúa con los agregados de A β . Esta sonda, además, varía su intensidad de fluorescencia dependiendo del grado de agregación del A β . De manera similar, Jian Wu *et al.* presentan la sonda fluorescente sensible al medio CAQ, cuya estructura está basada en la cumarina, y contiene un rotor intramolecular y una quinolina.¹³⁴ La rotación intramolecular de la sonda en entornos de baja viscosidad da lugar a una baja emisión fluorescente, de forma similar a como ocurre con el ThT. Sin embargo, en entornos donde la viscosidad es alta, el sensor experimenta un significativo aumento de su emisión. Este fluoróforo, que emite en el NIR, es capaz de detectar tanto agregados como placas amiloides de A β *in vivo*, permitiendo monitorizar y obtener imágenes de diferentes estructuras amiloides tanto en modelos de nematodos *Caenorhabditis elegans* como en ratones modificados genéticamente para desarrollar EA. Por otro lado, también se ha logrado obtener imágenes de fibras amiloides maduras de α Syn en células vivas mediante el empleo de rotores moleculares fluorescentes. Así, Pankaj Gaur *et al.* presentan dos rotores moleculares fluorescentes (RB1 y RB2) que son capaces de unirse a las fibras de α Syn respondiendo a su interacción con una respuesta fluorescente.¹¹⁸ El fluoróforo RB1 presenta un desplazamiento hacia el rojo en su máximo de absorción de 76 nm y una amplificación de la fluorescencia de 112 veces cuando se une a las fibras amiloides. Debido a la fuerte afinidad de unión que presenta, RB1 tiñe las fibras amiloides en el citoplasma de células vivas HeLa y SH-SY5Y selectivamente con un alto contraste óptico. Por tanto, resulta evidente el interés de emplear rotores moleculares que emiten una fluorescencia débil cuando presentan rotación libre y no están unidos a las fibras amiloides, pero que sin embargo se vuelven altamente fluorescentes cuando se unen a dichas estructuras, reportando de esta manera su formación. Sin embargo, la aplicación de este tipo de compuestos va más allá, pudiendo ser utilizados para detectar simultáneamente tanto H₂O₂ (una de las principales y más abundantes especies de ROS que interviene en los procesos de señalización celular) como agregados amiloides. Así, Needham *et al.* presentan cuatro sondas fluorescentes bifuncionales de alta sensibilidad (BE01, BE02, mBE01 and mBE02) que son rotores moleculares y que son capaces de detectar tanto H₂O₂ como agregados amiloides de α Syn.¹³⁵ Estos sensores utilizan un núcleo de benzotiazol para la localización de los agregados amiloides, y la oxidación del éster borónico para detectar específicamente el H₂O₂. Las propiedades de estos sensores se han caracterizado utilizando tanto medidas convencionales de fluorescencia como imágenes de fluorescencia de agregados amiloides individuales, cuantificando así los cambios en

2.1. Introducción

sus propiedades fluorescentes al añadir agregados amiloides de α Syn y concentraciones fisiopatológicas de H_2O_2 .

Por otra parte, los fluoróforos solvatocrómicos son aquellos que experimentan un cambio reversible en sus espectros de absorción o de emisión inducido por la acción del disolvente.¹³⁶ En estos compuestos se produce un cambio de color en la emisión como consecuencia del desplazamiento del máximo de absorción, debido a las diferencias de energía de solvatación entre el estado fundamental y el estado excitado en distintos disolventes.¹³⁷ Este tipo de compuestos permiten el desarrollo de biosensores ratiométricos de gran interés para la cuantificación de diversos procesos y analitos biológicos.^{138,139} En este sentido se ha descrito una nueva familia de colorantes altamente solvatocrómicos basados en la estructura de la quinolimida, llamadas 9-amino-quinolimidias.¹³⁹ Estos fluoróforos han demostrado un gran potencial en el estudio de la agregación del péptido A β sobre el modelo de experimentación animal pez cebra, identificándose la formación de diferentes tipos de agregados tempranos gracias al incremento de fluorescencia que experimentan estos compuestos al identificar dichos agregados.¹²³ Asimismo, Anirban Das *et al.* han desarrollado el compuesto fluorescente 6-(dimetilamino) dietil naftaleno-2,3-dicarboxilato (DMNDC), que es un fluoróforo de transferencia de carga intramolecular (ICT), capaz de seguir eficazmente la cinética de formación de fibrillas amiloides de insulina.¹⁴⁰ Este compuesto basado en un sistema donante- π -aceptor cambia sus propiedades fotofísicas dependiendo de si está unido o no a las fibras amiloides. Cuando se une a ellas se produce un gran incremento en su intensidad de emisión, además de un desplazamiento hipsocrómico de 70 nm. Paralelamente, Ambra Dreos *et al.* han dado a conocer una sonda fluorescente derivada del norbornadieno (NBD1) que posee propiedades sensibles al microambiente que lo rodea, con la peculiaridad de que es capaz de delinear estructuralmente placas de A β en ratones modificados genéticamente para desarrollar EA.¹²⁴ Mediante esta sonda se tomaron imágenes de fluorescencia multifuncionales y de superresolución que mostraron bandas de emisión de fluorescencia más anchas en la periferia de las placas y más estrechas en los núcleos densos de las mismas, así como un considerable desplazamiento de dichas bandas fuera de las placas, permitiendo de esta manera delinearlas de una manera eficaz.

Por otra parte, existen otros fluoróforos que no son sensibles al medio que los rodea, pero que son empleados en el estudio de la agregación amiloide debido a que permiten la visualización de moléculas de A β durante intervalos de tiempo más largos que los

2.1. Introducción

fluoróforos convencionales. Este es el caso de los puntos cuánticos (QDs, por sus siglas en inglés *Quantum Dots*).¹⁴¹ Los QDs son nanocristales fluorescentes formados por un material semiconductor (cadmio mezclado con selenio o telurio) rodeados por una cubierta de sulfuro de zinc, y presentan un pequeño tamaño de unos 15-20 nm.¹⁴² Estos materiales pueden emitir fluorescencia sin la participación de transiciones electrónicas, aprovechando la formación de excitones (excitaciones elementales de los sólidos formadas por un electrón y un hueco, ligados a través de interacciones coulombianas) que tienen τ_L mucho más largos que los fluoróforos convencionales. Los QDs se pueden funcionalizar con polietilenglicol y grupos amina para acoplarlos a las moléculas de A β , pudiendo diferenciarse de esta manera entre dímeros, trímeros y tetrámeros.¹⁴³ El empleo de QDs presenta múltiples ventajas, como las bajas concentraciones de A β requeridas (de 1 a 10 nM) y la facilidad de realización de la técnica, ya que sólo se necesita un microscopio de fluorescencia y los propios QDs.¹⁴² Uno de los principales inconvenientes es que, pese a su pequeño tamaño, siguen siendo más grandes que una molécula de A β , pudiendo interferir en los procesos de agregación proteica.^{52, 143}

2.1.5.2. Espectroscopía de fluorescencia y otras técnicas para el estudio de la agregación amiloide

Los ensayos de turbidez no son estrictamente técnicas espectroscópicas, ya que no miden espectros, siendo consideradas en realidad técnicas ópticas. Sin embargo, se utilizan para detectar la presencia de protofibrillas y fibrillas amiloides, aunque resultan inadecuados en el estudio de agregados pequeños. Generalmente las medidas se realizan a 400-420 nm, y dependiendo del tipo de espectrofotómetro utilizado, la muestra puede aplicarse a un pocillo de microplaca o a una cubeta, requiriéndose para este último un volumen mayor de muestra (hasta 1 ml).⁵² Esta técnica requiere concentraciones de alrededor de 50 μ M, y no resulta el método más óptimo para estudiar la oligomerización de A β , ya que debido a su baja sensibilidad sólo es posible detectar estructuras fibrilares.¹⁴⁴ Esta baja sensibilidad viene dada por la incapacidad de dispersar la luz a 400 nm de los oligómeros y estructuras amiloides más pequeñas. Millucci *et al.* investigaron la agregación del A β_{25-35} (que es una especie altamente tóxica), demostrando que los agregados a los que se les cambiaba el pH de 3 a 7.4 reducían significativamente su turbidez y, por tanto, su agregación.¹⁴⁵ Los ensayos de turbidez permiten asimismo observar el efecto de determinados compuestos sobre el

2.1. Introducción

proceso de formación de fibras.¹⁴⁴ De esta manera se demostró que la adición de los cationes Cu^{2+} y Zn^{2+} al $\text{A}\beta$ aumentaba la turbidez y, por tanto, la agregación.¹⁴⁶ Por otra parte, las técnicas espectroscópicas son metodologías ampliamente utilizadas para obtener información sobre las cinéticas de agregación del péptido $\text{A}\beta$. De esta forma se puede investigar en tiempo real el estado de fibrilación de una muestra concreta de $\text{A}\beta$.⁵² Como se ha comentado anteriormente, el ensayo de intensidad de fluorescencia utilizando la ThT se considera una de las técnicas de espectroscopía más utilizadas que permite seguir la cinética de agregación amiloide.^{129, 147} Estos ensayos pueden utilizarse para estudiar la influencia de factores externos en el proceso de fibrilación, por ejemplo, en la búsqueda de inhibidores de la agregación. Sin embargo, se debe tener en cuenta la presencia de agentes como polifenoles exógenos, ya que estos pueden alterar los resultados debido a su fluorescencia intrínseca.¹⁴⁸ En un trabajo de A. M. Streets *et al.*, se combina la dispersión dinámica de la luz (DLS, por sus siglas en inglés *Dynamic Light Scattering*) junto con la detección de fluorescencia de la ThT en estado estacionario para sondear simultáneamente *in vitro* la formación de fibrillas de péptidos de poliglutamina, que es la subunidad agregante asociada a la EH.¹⁴⁹ De esta forma, la ThT es capaz de analizar el contenido de fibrillas ricas en estructuras de lámina- β , mientras que la DLS mide la distribución del tamaño de las partículas. Esta combinación de técnicas permite elucidar la cinética de agregación, revelando diferentes estadios y etapas de la formación de fibrillas amiloides. Por otro lado, el uso del fluoróforo CR en ensayos de fluorescencia en estado estacionario proporciona información sobre el estado de agregación de las proteínas amiloides.¹⁰¹ Aunque su empleo se ha limitado principalmente al estudio de su unión con las fibrillas y fibras amiloides, también puede unirse en menor grado a oligómeros y protofibras.¹⁵⁰ Este colorante ha demostrado ser capaz de inhibir la agregación del $\text{A}\beta$ en neuronas,^{151, 152} macrófagos¹⁵³ y pericitos,¹⁵⁴ probablemente debido a una estabilización de los monómeros. Sin embargo, empleado a bajas concentraciones parece aumentar la formación de fibras.¹⁵⁵

Otra técnica de espectroscopía para el estudio de la agregación amiloide se basa en la anisotropía de fluorescencia, la cual sigue cambios en la movilidad del compuesto fluorescente injertado en uno de los componentes sometido a estudio.¹⁵⁶ La anisotropía de fluorescencia es un fenómeno físico producido cuando la luz emitida por un fluoróforo posee diferentes intensidades en diferentes ejes de polarización.¹⁵⁷ Así, en esta técnica el coeficiente de correlación rotacional del fluoróforo se obtiene detectando dos componentes de emisión de polarización ortogonales tras la excitación polarizada. En el estudio de la agregación amiloide, la rotación cuantificada de los fluoróforos informa

2.1. Introducción

sobre el crecimiento de los agregados, ya que las especies en crecimiento rotan a velocidades más lentas.¹⁰⁷ De esta manera Mancini *et al.* han podido monitorizar la agregación del A β ₄₀ desde su estado monomérico hasta la formación de oligómeros mediante el sondeo de la difusión rotacional de las cadenas laterales de tirosina fluorescentes.¹⁵⁸ También se han podido analizar agregados de A β mediante la anisotropía de FL del compuesto [Ru(bpy)₂(dpqp)]²⁺ (bpy = 2,2'-bipiridina; dpqp = pirazino[2',3':5,6]pirazino[2,3-f][1,10]fenantrolina), la cual aumenta conforme lo hace el tamaño de los agregados.¹²⁰

Las técnicas de fluorescencia que utilizan métodos de molécula única permiten determinar las características de moléculas individuales en una población compleja y heterogénea, permitiendo así revelar posibles eventos que pueden permanecer enmascarados por las medidas en masa.^{159, 160} Una de las técnicas más asentadas dentro de la espectroscopía de molécula única es la espectroscopía de correlación de fluorescencia (FCS, por sus siglas en inglés *Fluorescence Correlation Spectroscopy*). La FCS es un análisis estadístico, mediante correlación temporal, de las fluctuaciones estacionarias de la intensidad de fluorescencia.¹⁶¹ El análisis proporciona parámetros cinéticos de los procesos físicos subyacentes a las fluctuaciones, así como sobre el comportamiento de difusión y de las concentraciones absolutas de las partículas detectadas.¹⁶² Es una herramienta muy sensible porque observa un número reducido de moléculas (concentraciones del orden de nanomolar a picomolar) en un volumen pequeño ($\sim 1\mu\text{m}^3$).^{162, 163} Se emplea en el contexto de la microscopía óptica, en particular la microscopía confocal o la microscopía de excitación de dos fotones.^{162, 163} En la FCS la luz se enfoca sobre una muestra y las fluctuaciones de intensidad de fluorescencia medidas (debidas a difusión, reacciones físicas o químicas, agregación, etc.) se analizan utilizando la autocorrelación temporal. Esta técnica se utiliza para medir parámetros moleculares dinámicos, como el tiempo de difusión (a partir del cual puede calcularse el tamaño de las partículas), la conformación y la concentración de moléculas fluorescentes.¹⁶³ La polimerización de los agregados amiloides se puede estudiar mediante FCS, que permite caracterizar el proceso de agregación y la naturaleza de dichos agregados en solución.^{164, 165} Así, es posible detectar cambios en el tamaño y la concentración de muestras de A β , inicialmente monoméricas, mediante el seguimiento de estas especies marcadas fluorescentemente que difunden libremente en solución.¹⁶⁴ Mediante la FCS se han podido describir paso a paso diferentes protocolos y procedimientos experimentales para el estudio de la formación de complejos moleculares en sistemas de agregación *in vitro*, en extractos celulares y en células

2.1. Introducción

vivas.¹⁶⁶ En concreto se ha estudiado el autoensamblaje de fragmentos de huntingtina (proteína codificada por el gen asociado a la EH), aunque en principio pueden adaptarse a cualquier sistema de agregación. Mediante los parámetros obtenidos a través de esta técnica, como los tiempos de difusión, se pueden diferenciar desde monómeros hasta diferentes tipos de agregados. Por otra parte, el marcaje de proteínas en sitios específicos puede utilizarse para controlar los movimientos e interacciones de las proteínas en tiempo real mediante el análisis de la transferencia de energía de resonancia de Förster (FRET, por sus siglas en inglés, *Förster Resonance Energy Transfer*).¹⁶⁷⁻¹⁶⁹ La FRET es una técnica en la cual los componentes de interés sometidos a estudio son marcados con moléculas fluorescentes dadoras yceptoras de energía.^{170, 171} La interacción entre dadores y aceptores da como resultado una transferencia de energía de dadores a aceptores próximos que se encuentran a la distancia adecuada, y que proporciona una señal analítica medible, en este caso la disminución del tiempo de vida de fluorescencia (τ_D) del fluoróforo dador.¹⁷² En el estudio de la agregación amiloide, la FRET permite la detección y cuantificación de la distribución del tamaño de los agregados. Aunque existe una amplia gama de fluoróforos disponibles para el marcaje de agregados amiloides, sólo unos pocos pares de fluoróforos FRET son adecuados para monitorizar los movimientos intramoleculares de las proteínas sin alterar su plegamiento y función.¹⁷⁰ Entre estos pares FRET se encuentra el binomio metoxicumarina (Mcm) y acridonilalanina (Acd) descrito por Chloe M. Jones *et al.*¹⁶⁸ Este sistema se diseñó mediante la mutagénesis de la α Syn con el aminoácido no natural Acd y una cisteína (Cys), que posteriormente reacciona con la forma reactiva maleimida de la Mcm (Mcm-Mal), pudiendo de esta manera marcarla para obtener un par FRET que permite monitorizar los procesos de agregación amiloide (Figura II.9). Además, este sistema se puede combinar con la fluorescencia del triptófano para monitorizar la agregación amiloide mediante la FRET de tres colores.

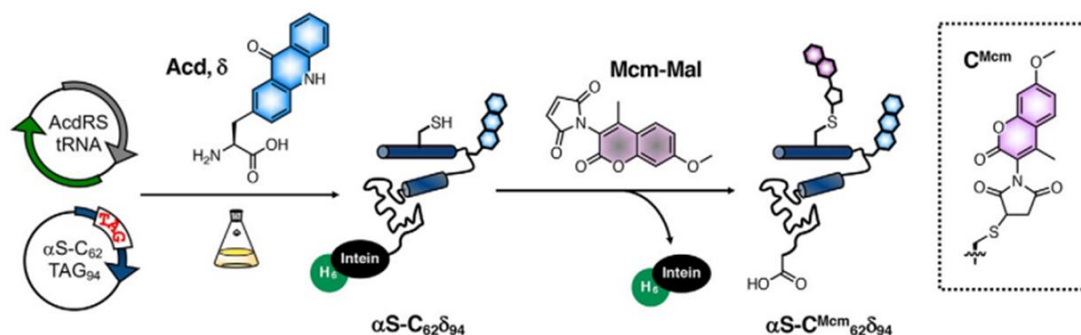


Figura II.9. Marcaje de la α Syn con el par FRET Mcm y Acd para los experimentos de FRET. La α Syn mutada con Cys y Acd se etiqueta con Mcm-Mal en la Cys62. Imagen extraída de ¹⁶⁸ con permiso de Copyright 2020 Elsevier Inc.

2.1. Introducción

En otro estudio se demuestra que la FRET producida entre el par ThT (dador) y la trimetina cianina (aceptor) puede utilizarse para diferenciar los estados fibrilares y no fibrilares de la insulina.¹⁷³ La FRET se evidencia en los espectros de fluorescencia de la ThT unida a las fibrillas amiloides de insulina tras la adición de trimetina cianina. Aunque es un sistema robusto, requiere de doble marcaje, lo cual puede resultar complejo no pudiéndose realizar en algunos ensayos de detección. Asimismo, Gorbenko *et al.* emplean diferentes pares de fluoróforos que provocan una cadena de transferencia energética en cascada, la cual permite la discriminación de agregados fibrilares y no fibrilares de insulina mediante el análisis de la FRET.¹⁷⁴ Los fluoróforos empleados son la ThT como dador, la escuaraina SQ4 y el colorante de fosfonio TDV como mediadores y una de las tres esquarainas (SQ1, SQ2 o SQ4) como acepto. Este sistema presenta un aumento de la fluorescencia terminal de hasta dos órdenes de magnitud que permite diferenciar los diferentes estados de agregación proteica.

Dentro de las metodologías de molécula única, la detección por coincidencia de dos colores (TCCD, por sus siglas en inglés *Two-Colour Coincidence Detection*) permite detectar y caracterizar de forma sensible biomoléculas como los agregados amiloides tanto en disolución como en células vivas.¹⁶⁰ Esta técnica se basa en la detección de fotones de fluorescencia emitidos por dos fluoróforos en dos bandas de frecuencia distintas, surgidas de la excitación continua del volumen confocal por uno o dos láseres. Aunque en el caso de que los fluoróforos presenten una alta FRET se puede utilizar un solo láser, el empleo de dos láseres (normalmente uno rojo y otro azul) suele ser más ventajoso, debido a que permite colocar los fluoróforos en cualquier posición deseada en la biomolécula de interés sin necesidad de que estén cerca para que se produzca la FRET.^{160, 169, 171} De esta manera, el análisis de la frecuencia e intensidad de las ráfagas de fluorescencia coincidentes en ambos canales permite cuantificar y determinar la cantidad de las moléculas asociadas. Uno de los principales factores que se deben tener en cuenta a la hora de usar la TCCD es la determinación del umbral correcto a partir del cual se deben de contar los eventos fluorescentes, ya que si es demasiado alto se puede perder información relevante que alargue el tiempo de las medidas, y si es demasiado bajo se puede incluir información no deseada proveniente del ruido de fondo.¹⁷⁵ En relación con el estudio de la agregación amiloide, Orte *et al.* aplicaron la TCCD para examinar el proceso de agregación del dominio SH3 de la quinasa PI3.¹⁷⁶ En sus experimentos mostraron que los oligómeros formados en la fase del proceso de agregación que presentaba una mayor citotoxicidad estaban formados por una

2.1. Introducción

población heterogénea de agregados con un tamaño medio de 38 ± 10 moléculas, y que su estabilidad aumentaba conforme lo hacía el tiempo de incubación. Asimismo, Chiou *et al.* utilizaron la TCCD para determinar los factores que limitan la velocidad de las primeras etapas de agregación de la neuroserpina, estudiando además la influencia que el $A\beta_{40}$ tenía en estos procesos.¹⁷⁷

2.1.5.3. Técnicas de imagen de microscopía de fluorescencia

Las técnicas de imagen de microscopía de fluorescencia (MF) presentan la ventaja de poder visualizar directamente agregados amiloides de pequeño tamaño y bajo peso molecular, además de fibrillas y fibras maduras mediante el marcaje con fluoróforos, obteniendo así imágenes que pueden ser posteriormente analizadas y que aportan información sobre su tamaño, estructura, grado de agregación... permitiendo de esta manera caracterizar las distintas especies amiloides.^{52, 97, 137} Además, mediante la MF se pueden estudiar las cinéticas de agregación relacionadas con los procesos de fibrilación, desde el estado monomérico de las proteínas aberrantes hasta la formación de fibras amiloides maduras.^{97, 178} En 1957, Marvin Minsky patentó los principios de la microscopía confocal, que pretendía superar algunas limitaciones de los microscopios de fluorescencia de campo amplio tradicionales.¹⁷⁹ En un microscopio de fluorescencia de campo amplio convencional se ilumina toda la muestra, excitándose simultáneamente todas las partes de la misma, llegando así la fluorescencia resultante a un fotodetector, incluida la del fondo desenfocado. Sin embargo, la microscopía confocal permite aumentar la resolución óptica y el contraste de las micrografías obtenidas mediante el uso de un diafragma de detección confocal o “*pinhole*”, el cual consiste en un pequeño orificio en el filtro detector de la luz que impide el paso de aquella procedente de los planos de la muestra que no están enfocados.^{180, 181} De esta manera el microscopio sólo enfoca un pequeño haz de luz a diferentes niveles de profundidad de la muestra estudiada. No obstante, como gran parte de la luz de la fluorescencia de la muestra queda bloqueada, se produce una disminución en la señal de intensidad, por lo que se requieren detectores sensibles como tubos fotomultiplicadores o fotodiodos de avalancha que transforman la señal luminosa en eléctrica.¹⁸⁰ Posteriormente, en 1969 Paul Davidovits y M. David Egger desarrollaron la microscopía confocal de barrido láser, la cual incorpora un láser capaz de escanear la muestra punto por punto para obtener las imágenes.^{182, 183} Una de las múltiples

2.1. Introducción

aplicaciones de la microscopía confocal de barrido láser en el estudio de la agregación amiloide es el reconocimiento de placas de A β . De esta manera, Jian Wu *et al.* utilizaron la sonda CAQ en secciones de corteza cerebral de ratones 5xFAD modificados genéticamente para expresar EA, observando en las imágenes de microscopía confocal obtenidas una notable señal de fluorescencia roja en dichas secciones.¹³⁴ Sin embargo, esta intensa señal fluorescente no fue detectada ni en las imágenes de las secciones de corteza cerebral de ratones no modificados genéticamente a las que añadieron el fluoróforo ni en las imágenes de secciones de corteza cerebral de ratones 5xFAD a los que no añadieron la sonda (Figura II.10). Además, simultáneamente emplearon el anticuerpo 6E10, capaz de detectar específicamente placas de A β . De esta forma, mediante las imágenes de colocalización pudieron comprobar que CAQ es capaz de marcar específicamente placas amiloides en los tejidos cerebrales de ratones 5xFAD.

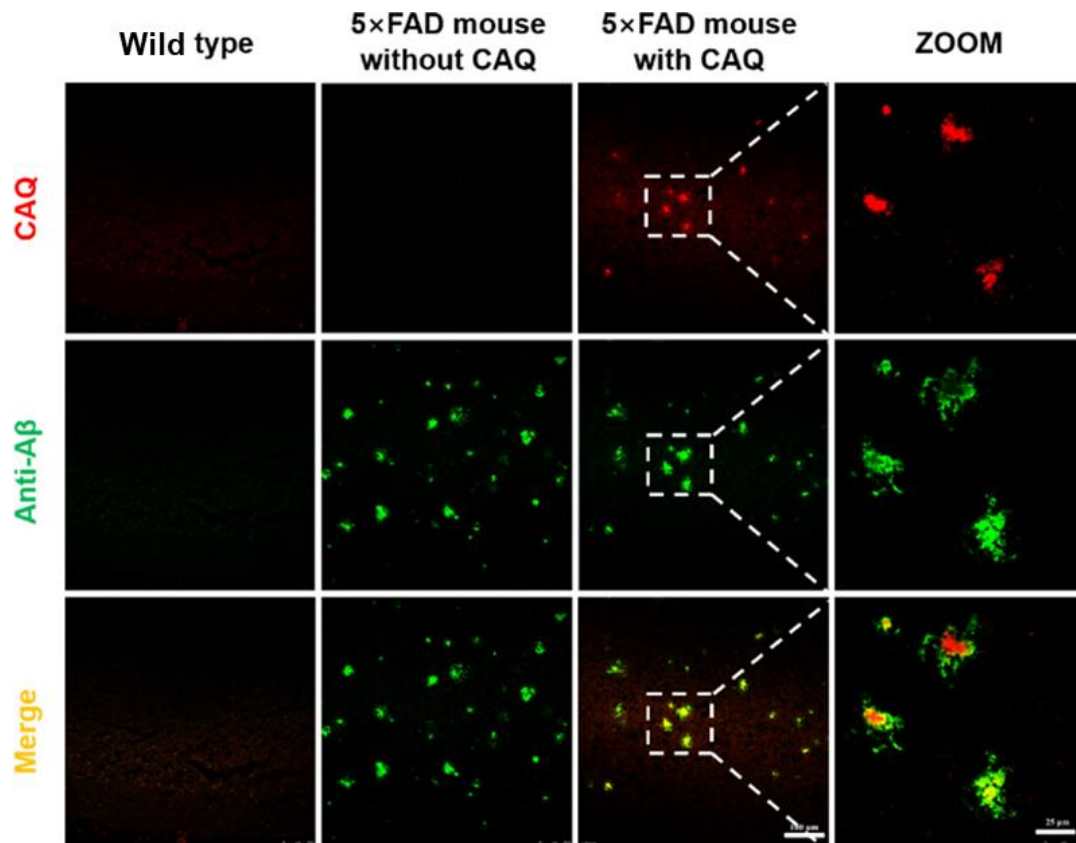


Figura II.10. Imágenes de microscopía confocal de fluorescencia de: secciones de corteza cerebral de ratón no modificado genéticamente (*wild type*) marcadas con CAQ, 6E10 y su colocalización (primera columna); secciones de corteza cerebral de ratón modificado 5xFAD sin CAQ (segunda columna); y secciones de corteza cerebral de ratón modificado 5xFAD con CAQ, 6E10 y su colocalización (tercera columna). La barra de escala representa 100 μ m para las imágenes de las tres primeras columnas, pero 25 μ m en las imágenes ampliadas de ZOOM (cuarta columna). Imagen de la referencia ¹³⁴ reproducida con permiso de Copyright 2021, American Chemical Society.

2.1. Introducción

De manera similar Misun Lee *et al.* consiguieron visualizar mediante microscopía confocal agregados de $A\beta_{40}$ en células vivas (neuroblastos humanos SH-SY5Y).¹³³ Los agregados generados durante una preincubación de 5 h fueron añadidos a las células, con las que fueron incubados durante 1 h. Posteriormente añadieron la sonda fluorescente (yoduro de 2-((1E,3E)-4-(4-(dimetilamino) fenil) buta-1,3-dien-1-il)-1,1,3-trimetil-1H-benzo[e]indol-3-io) durante 30 min. y se tomaron las imágenes de fluorescencia. En los casos en los que las células habían sido incubadas exclusivamente con los agregados sin la sonda, (Figura II.11B) o con la sonda sola sin agregados, (Figura II.11C) no se detectó ninguna señal fluorescente. Sin embargo, en aquellas células incubadas tanto con $A\beta_{40}$ como con el fluoróforo se observó un notable aumento de la fluorescencia roja (Figura II.11A). Estos experimentos confirmaron la capacidad de la sonda para detectar agregados de $A\beta_{40}$.

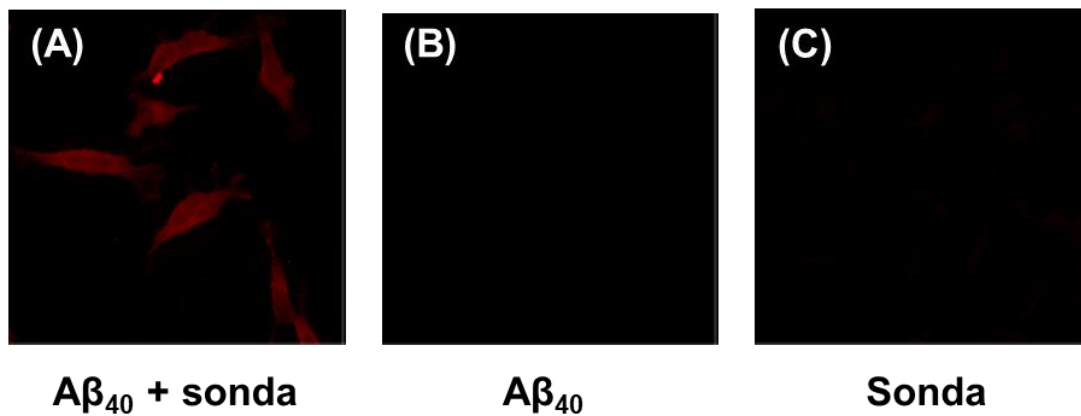


Figura II.11. Imágenes de microscopía confocal de fluorescencia de células SH-SY5Y incubadas tanto con agregados de $A\beta_{40}$ como con la sonda fluorescente (A), sólo con agregados de $A\beta_{40}$ (B) o sólo con la sonda fluorescente (C). Imagen extraída de ¹³³ con permiso de Copyright 0143-7208 2018 Elsevier Ltd.

Paralelamente, Ambra Dreos *et al.* emplearon la microscopía confocal para obtener imágenes de placas de $A\beta$ del córtex prefrontal de ratones modificados genéticamente para desarrollar EA (Figura II.12).¹²⁴ Para ello, utilizaron la sonda fluorescente NBD1 directamente en secciones de tejido cerebral de ratones modificados tgAPP^{Swe}, los cuales presentan un elevado número de placas amiloides sobre los 18 meses de edad. Tras fijar la sonda durante 2 h a los tejidos se pudieron detectar claramente las placas amiloides formadas.

2.1. Introducción

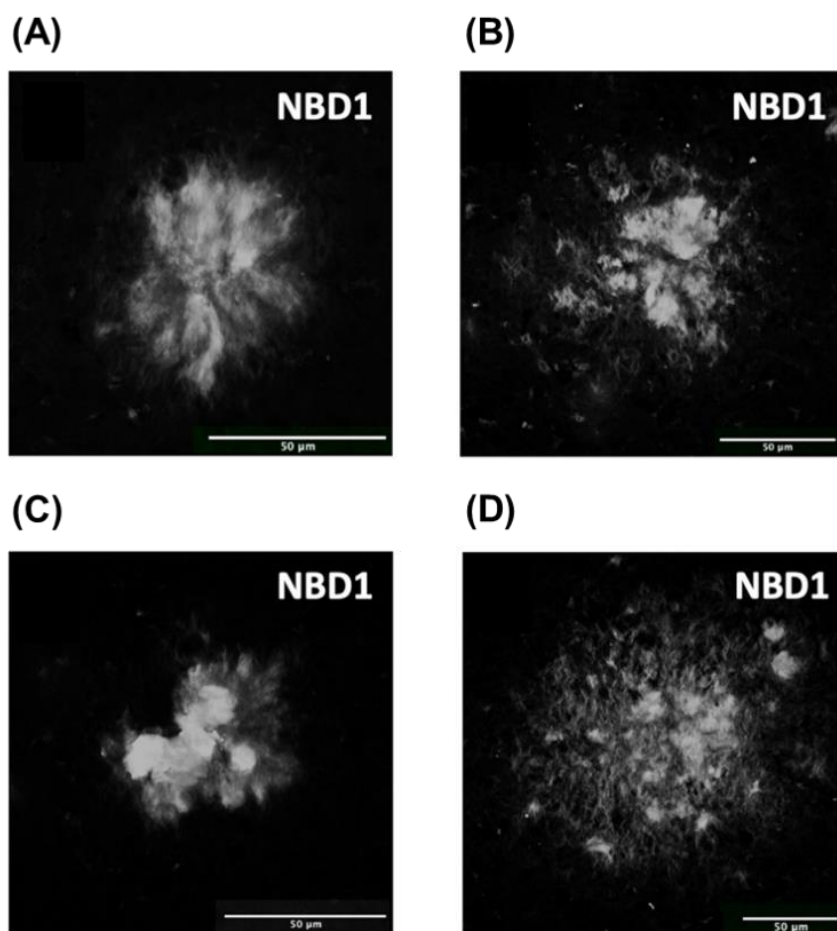


Figura II.12. Imágenes de microscopía confocal de fluorescencia de placas de A β en secciones del córtex prefrontal de ratones tgAPP Swe fijadas con la sonda NBD1. Imagen reproducida de ¹²⁴ con permiso de los autores y Copyright 2023 American Chemical Society con licencia CC-BY 4.0.

Una de las ventajas de utilizar la microscopía confocal de fluorescencia es que permite obtener imágenes ratiométricas de las intensidades de emisión de uno o varios fluoróforos detectadas en dos canales diferentes, pudiendo así seguir los cambios espectrales de fluoróforos solvatocrómicos o de la FRET producida entre dos fluoróforos diferentes. De esta forma Fueyo-González *et al.* pudieron analizar los agregados amiloides de A β_{42} formados a diferentes tiempos de incubación (desde 0 hasta 20 h) empleando un fluoróforo solvatocrómico que permite seguir cambios en la hidrofobicidad de los agregados a través del análisis del cociente de intensidades detectadas en dos canales (rojo y verde).¹²³ Como el fluoróforo experimenta un desplazamiento hipsocrómico del rojo al verde y un aumento en la intensidad de emisión conforme aumenta la hidrofobicidad del ambiente, se analizó el cociente de intensidades I_{630}/I_{550} de los fluoróforos añadidos a los agregados. Así, se comprobó que se producía tanto una disminución de la relación I_{630}/I_{550} como un aumento de la intensidad de

2.1. Introducción

fluorescencia conforme mayor era el tiempo de incubación de los agregados, confirmando el mayor grado de agregación proteica que implica una mayor hidrofobicidad (Figura II.13).

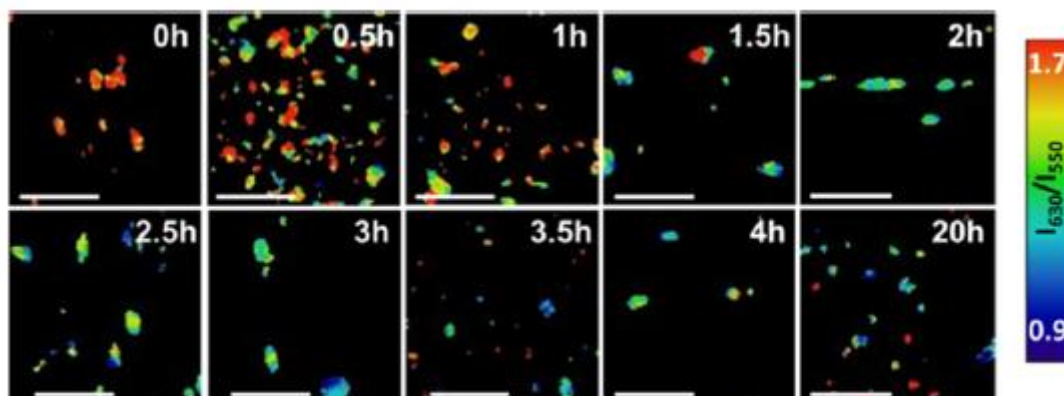


Figura II.13. Imágenes representativas de la relación I_{630}/I_{550} de los agregados de $A\beta_{42}$ tras diferentes tiempos de incubación representados en una escala de color arbitraria. Las barras de escala representan 4 μm . Imagen reproducida de ¹²³ con permiso de Copyright 2020, American Chemical Society.

Por otro lado, la microscopía de excitación de dos fotones o bifotónica es una técnica de obtención de imágenes de fluorescencia especialmente adecuada para obtener imágenes de tejidos vivos de hasta 1 mm de grosor.^{184, 185} A diferencia de la microscopía de fluorescencia convencional, en la que la λ_{ex} del láser utilizada es más corta que la λ_{em} de los fluoróforos empleados, en la microscopía de excitación bifotónica la λ_{ex} es más larga que la λ_{em} .¹⁸⁴ En esta técnica, el láser se enfoca en un punto específico del tejido y se escanea a través de la muestra para producir la imagen, excitándose principalmente los fluoróforos que se encuentran en el foco del haz láser. Una de las ventajas que presenta esta técnica es que la señal de fondo se suprime en gran medida. En comparación con la microscopía confocal, esta técnica permite una penetración más profunda en el tejido analizado y una reducción del fotoblanqueo de los fluoróforos. Haciendo uso de la microscopía de excitación de dos fotones ha sido posible detectar agregados amiloides citotóxicos de γ -sinucleína en embriones de pez cebra tratados con la neurotoxina MPTP y sin tratar.¹²³ Esta neurotoxina induce el daño cerebral, generando en los tejidos cuerpos de inclusión proteicos. Empleando un fluoróforo solvatocrómico basado en la quinolimida se pudieron obtener imágenes de fluorescencia de los agregados presentes en los tejidos del pez cebra (Figura II.14).

2.1. Introducción

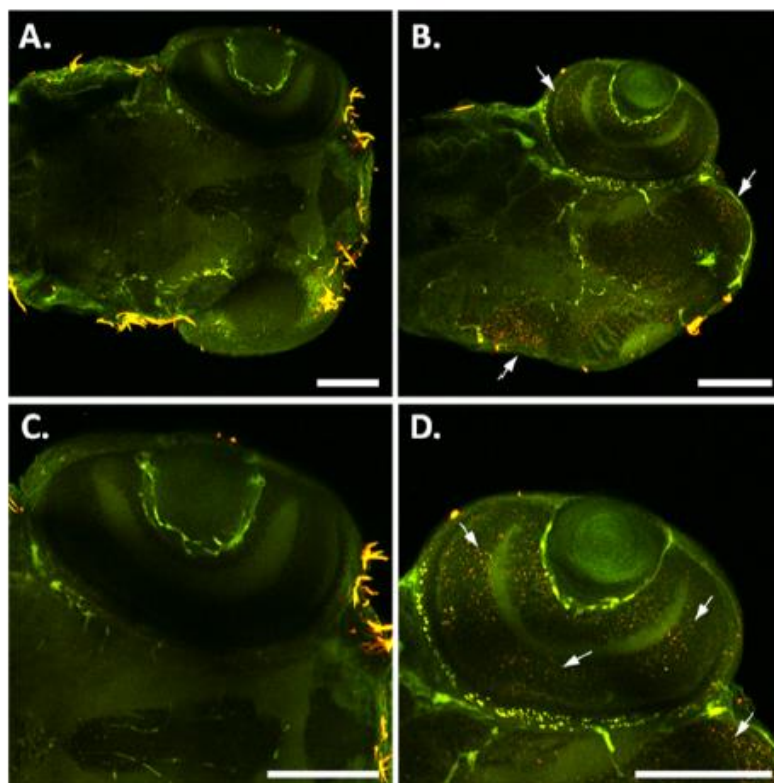


Figura II.14. Imágenes de microscopía de fluorescencia de excitación bifotónica de embriones de peces cebra sin tratar con MPTP (A, C) o tratados con MPTP (B, D) e incubados con el fluoróforo (200 μM) durante 6 h. Las flechas blancas destacan la presencia de agregados amiloides. Las barras de escala representan 100 μm . Imagen extraída de ¹²³ con permiso de Copyright 2020, American Chemical Society.

Asimismo, la microscopía de imágenes de tiempos de vida de fluorescencia (FLIM, por sus siglas en inglés, *Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy*) combina las medidas de intensidad de emisión fluorescente con las medidas de τ_F de los fluoróforos empleados.^{51,186} Esta técnica se basa en el análisis de las diferencias de los valores de los decaimientos exponenciales de la emisión de fotones de uno o varios fluoróforos sometidos a estudio en la muestra de interés. La FLIM utiliza el recuento de fotones individuales correlacionados en el tiempo y permite medir el τ_F de los fluoróforos empleados en cada píxel de la imagen adquirida, obteniendo así un mapa de τ_F .¹⁸⁶ Mediante esta técnica Romain F. Laine *et al.* estudiaron el proceso de agregación intracelular de las proteínas αSyn y huntingtina marcadas con proteína fluorescente amarilla (YFP, por sus siglas en inglés *Yellow Fluorescent Protein*) en modelos de *Caenorhabditis elegans* vivos modificados genéticamente para expresar EP y EH, caracterizando diferentes tipos de agregados y observando diferencias significativas en las cinéticas de agregación mediante el análisis de los τ_F de la YFP.¹⁸⁷ De esta forma concluyeron que las inclusiones de αSyn no mostraban características amiloides hasta

2.1. Introducción

etapas avanzadas de la vida de los nematodos, ya que la disminución de los τ_F que caracteriza a las especies amiloides sólo se producía en estas etapas. Sin embargo, la huntingtina es capaz de formar agregados amiloides en etapas más tempranas, ya que la disminución de los τ_F se observa mucho antes. Una variante de la microscopía FLIM es la microscopía de imágenes de tiempos de vida de fluorescencia con excitación intercalada pulsada (PIE-FLIM, por sus siglas en inglés *Pulsed Interleaved Excitation - Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy*), la cual permite el empleo simultáneo de dos sondas fluorescentes diferentes.¹⁸⁸ En esta técnica se utilizan dos láseres diferentes retardados temporalmente, los cuales hacen posible medir simultáneamente tanto la intensidad como los τ_F de dos fluoróforos distintos en un mismo experimento.⁵⁰ Esta característica es especialmente importante para el estudio de la FRET entre dos fluoróforos (dador y aceptor de energía) que sean capaces de seguir el proceso de agregación amiloide de una proteína aberrante. De esta forma se puede estudiar la formación de agregados fibrilares y estructuras amiloides más compactas, diferenciándolas de oligómeros solubles formados en etapas tempranas mediante el análisis de los cambios en los τ_F del fluoróforo dador.^{50, 188} No obstante, pese a que el estudio de la FRET mediante la FLIM es una técnica robusta de gran potencial, este método necesita que los componentes de interés a estudiar estén marcados tanto con fluoróforos dadores como aceptores, lo que supone un mayor grado de complejidad, y esto no se puede realizar en todos los ensayos de detección. Mediante la técnica PIE-FLIM Fabio Castello *et al.* estudiaron el proceso de agregación amiloide del dominio N47A-SH3 de la proteína α -espectrina empleando el par FRET de fluoróforos ATTO 488 (dador) y ATTO 647N (aceptor), descubriendo que se producía una oligomerización dinámica incluso antes de la incubación. Asimismo, informaron de que las especies amiloides formadas eran muy pequeñas (en su mayoría diméricas), y que presentaban una organización molecular flexible, aportando adicionalmente información cuantitativa sobre la estabilidad de los agregados detectados.¹⁸⁸ Paralelamente, en otro trabajo utilizaron la metodología PIE-FLIM para obtener evidencias de que determinados agregados amiloides inespecíficos de N47A-SH3 eran necesarios para que se llevase a cabo un proceso de nucleación de dos pasos, pudiendo identificar hasta tres tipos de oligómeros diferentes (Figura II.15).⁵⁰

2.1. Introducción

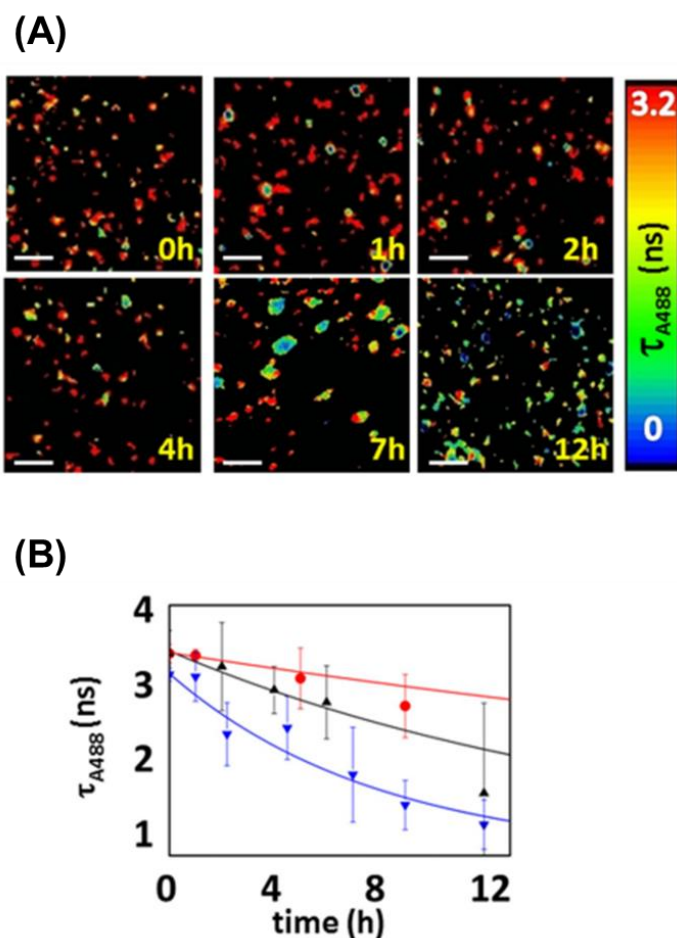


Figura II.15. Estudio FLIM de la agregación del dominio N47A-SH3. (A) Imágenes FLIM de los agregados de N47A-SH3 (280 μM) incubados a diferentes tiempos (0, 1, 2, 4, 7 o 12 h) que reflejan el τ_F del fluoróforo dador (ATTO 488). Las barras de escala blancas representan 2.4 μm . (B) Valores medios de los τ_F de ATTO 488 de los agregados de N47A-SH3 a 24 (rojo), 28 (negro) y 32 μM (azul) frente al tiempo de incubación proteica. Las barras de error representan la desviación estándar de los valores de τ_F de ATTO 488 obtenidos a partir de al menos 10 imágenes FLIM diferentes. Las líneas indican los ajustes a una función exponencial simple. Imagen extraída de ⁵⁰ con permiso de PMC (Open Access).

Es importante destacar que las técnicas de imagen de MF que se centran en el marcaje fluorescente de únicamente uno de los componentes sometidos a estudio son de gran interés debido a la destacada mejora de la resolución espacial que aportan.¹⁸⁹ La microscopía de fluorescencia de moléculas individuales (SMFM, por sus siglas en inglés *Single Molecule Fluorescence Microscopy*) permite investigar el comportamiento de moléculas individuales (o de pequeños grupos) en condiciones estrictas que garantizan que todas las moléculas se encuentran en el mismo estado.^{189, 190} En la SMFM la molécula de interés (proteínas, ADN...) se marca con un fluoróforo, a menos que la molécula sea fluorescente de por sí, para obtener información sobre su entorno, estructura y/o posición.¹⁹⁰ Los fluoróforos utilizados en SMFM han de reunir una serie

2.1. Introducción

de requisitos como: (i) ser capaces de absorber fuertemente la luz de excitación y emitir fluorescencia eficientemente; (ii) han de ser fotoestables, de modo que no se fotoblanqueen rápidamente y puedan visualizarse durante largos periodos de tiempo; (iii) deben ser moléculas pequeñas para no interrumpir la actividad biológica en estudio; y (iv) han de ser capaces de emitir luz en la región visible del espectro. ^{159,189,190}

Entre las diferentes técnicas de SMFM existentes destacaremos la microscopía de fluorescencia de reflexión interna total (TIRF, por sus siglas en inglés *Total Internal Reflection Fluorescence*) y la microscopía de reconstrucción óptica estocástica (STORM, por sus siglas en inglés *Stochastic Optical Reconstruction Microscopy*). La TIRF es considerada actualmente como una de las metodologías de obtención de imágenes más utilizada en SMFM.¹⁸⁹ Esta técnica se basa en la reflexión interna total de la luz de excitación incidente a partir de una interfaz vidrio-agua (por ejemplo, entre un cubreobjetos de vidrio y un tampón fisiológico acuoso) y delimita el campo para excitar selectivamente los fluoróforos situados cerca de la superficie del cubreobjetos en la conocida como profundidad de penetración.¹⁸⁹ Así pues, la TIRF es especialmente valiosa para identificar moléculas individuales marcadas fluorescentemente en membranas de células inmovilizadas en cubreobjetos de vidrio.¹⁹¹ Debido a que esta metodología sólo detecta señales mínimas en las regiones desenfocadas, la relación señal-ruido aumenta significativamente, permitiendo un mejor contraste a la hora de detectar moléculas individuales.¹⁹¹ En relación con el estudio de la agregación amiloide, Mathew H. Horrocks *et al.* presentan un método denominado SAVE (*single aggregate visualization by enhancement imaging*) para la detección ultrasensible de oligómeros individuales y fibrillas amiloides haciendo uso de la TIRF y empleando como fluoróforo la ThT.¹¹⁰ Este método es capaz de contar y detectar la presencia de agregados amiloides de α Syn, Tau y A β , permitiendo así caracterizar la naturaleza estructural de los agregados en fluidos como el líquido cefalorraquídeo humano y teniendo el potencial de estudiar la progresión de la enfermedad tanto en modelos animales como en humanos (Figura II.16).

2.1. Introducción

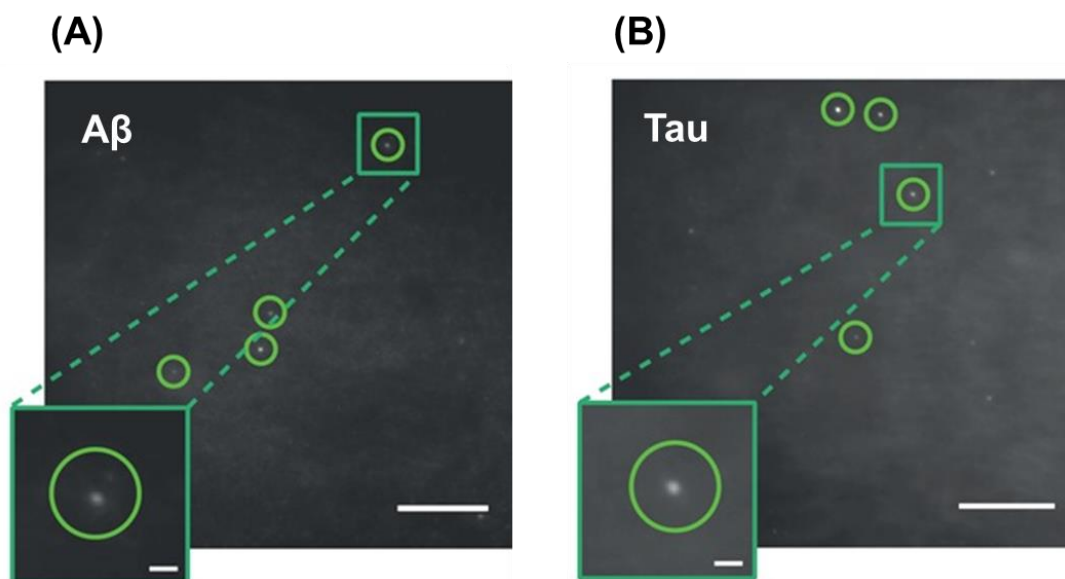


Figura II.16. Imágenes de agregados de A β (100 pM) incubados durante 3 h (A) y de agregados de Tau (37.5 pM) incubados durante 45 min (B) obtenidas con el método SAVE. Las barras de escala representan 10 μ m (1 μ m en los recuadros ampliados). Los círculos verdes resaltan los agregados. Imagen extraída de ¹¹⁰ con permiso de Copyright 2016 American Chemical Society con licencia CC-BY (Open Access).

Por otro lado, la técnica STORM presentada por primera vez en 2006 por Xiaowei Zhuang *et al.* permite obtener imágenes con una resolución espacial de hasta 20 nm.¹⁹² Este método se basa en la activación estocástica de fluoróforos individuales en la cual, durante la adquisición de las imágenes, los fluoróforos individuales "parpadean" mediante un proceso de activación aleatoria que luego se desactiva rápidamente por fotoblanqueo,¹⁹³ y es considerada una de las técnicas de microscopía de superresolución. Para obtener imágenes STORM los fluoróforos activados estocásticamente deben estar lo suficientemente separados entre sí para superar el límite de difracción, que generalmente es de 200-300 nm, obteniéndose imágenes de moléculas individuales en los casos en los que los fluoróforos no se solapan.¹⁹² Repitiendo este proceso miles de veces y superponiendo las imágenes de todas las posiciones de los fluoróforos, se obtiene la imagen final de superresolución de la muestra. Al emplearse miles de ciclos de activación, excitación y fotoblanqueo de los fluoróforos se prolonga considerablemente el periodo de adquisición, lo que limita su aplicación a muestras principalmente fijas y provoca en las mismas una fuerte fototoxicidad.¹⁹⁴ En 2008 Heilemann *et al.* introdujeron una variación de la técnica STORM denominada dSTORM (STORM directa).¹⁹⁵ Esta técnica utiliza luz de excitación con diferentes λ_{ex} y fluoróforos convencionales capaces de alternar de forma cíclica y reversible estados fluorescentes y de oscuridad mediante irradiación, sin necesidad del

2.1. Introducción

proceso de activación y fotoblanqueo de la técnica STORM tradicional. El método dSTORM resulta muy útil en el estudio de la agregación amiloide,¹⁹⁶ habiéndose empleado por Amandeep Kaur *et al.* para la obtención de imágenes de superresolución de fibrillas y fibras amiloides de insulina, las cuales mejoran su resolución 10 veces más comparadas con las obtenidas por MF convencional (Figura II.17).¹³²

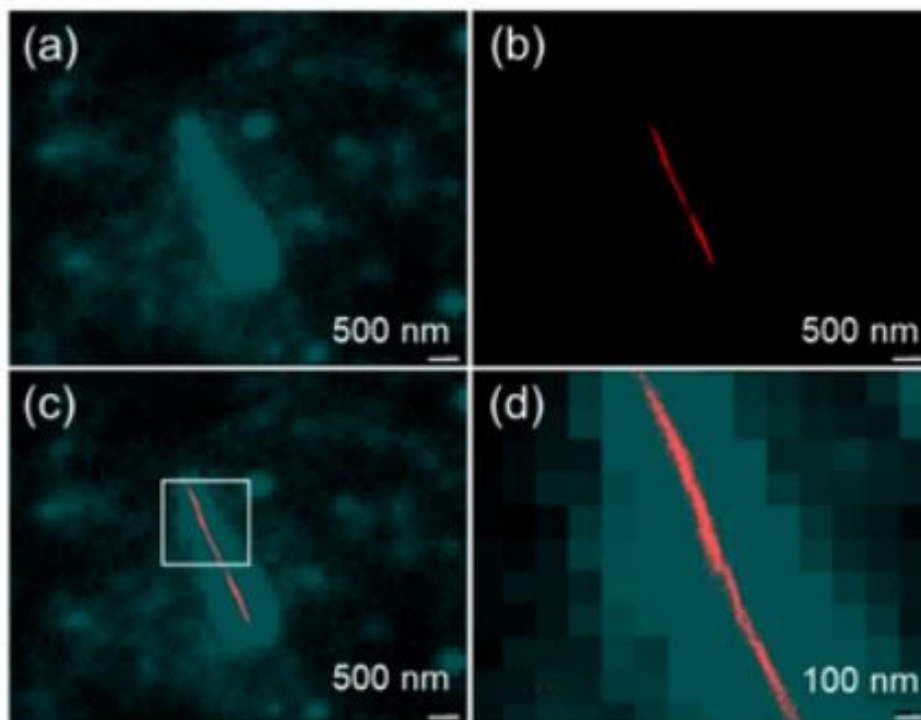


Figura II.17. Imágenes de fluorescencia convencional y de superresolución de fibrillas de insulina (5 μM) utilizando el fluoróforo AmyBlink-1 (100 nM). Imagen de MF convencional de las fibrillas (A), imagen dSTORM correspondiente (B), superposición de la imagen de fluorescencia convencional con la dSTORM (C) y ampliación de la superposición indicada por el cuadrado blanco en (C) que demuestra la mejora de la resolución de dSTORM en comparación con la imagen de fluorescencia convencional. Reproducido de ¹³² con permiso de Copyright 2021 Wiley-VCH GmbH.

Otras técnicas de superresolución que permiten superar el límite de difracción son la microscopía de iluminación estructurada (SIM, por sus siglas en inglés *Structured Illumination Microscopy*) y la microscopía de depleción de emisión estimulada (STED, por sus siglas en inglés *Stimulated Emission Depletion*). La SIM es una técnica de campo amplio que duplica la resolución de las imágenes obtenidas mediante microscopía confocal¹⁹⁷, utilizando para ello un escáner de luz estructurada. Dicho escáner genera la luz de excitación, que se codifica para generar una iluminación con patrones, normalmente rayas, antes de proyectarla sobre las muestras fluorescentes.¹⁹⁴ Tanto la posición como la orientación del patrón se cambian varias veces, y la emisión de fluorescencia se registra para cada una de estas posiciones y orientaciones,

2.1. Introducción

obteniendo imágenes con el efecto Moiré producido como interacción entre la iluminación del patrón y la muestra.¹⁹⁸ La reconstrucción computacional mediante funciones matemáticas de las imágenes permite superar el límite de resolución óptico de dichas imágenes. Para ello se hace uso de la teoría de Fourier, que permite no perder la información adicional de alta frecuencia espacial que contienen las franjas de Moiré de la muestra al pasar de la imagen original a la transformada.¹⁹⁴ La SIM presenta varias ventajas que la hacen especialmente adecuada para estudiar la progresión estructural y la dinámica de los agregados intracelulares *in situ*. En primer lugar, no requiere fluoróforos especializados, por lo que es compatible con otras técnicas de microscopía de fluorescencia pudiendo utilizar el mismo procedimiento de preparación de muestras. Además, como no utiliza láseres sino haces de luz, resulta muy poco fototóxica en los ensayos biológicos.¹⁹⁹ La principal desventaja de la SIM es que sólo mejora moderadamente la resolución en comparación con otras técnicas como la STORM o la STED. Además, su compleja configuración puede introducir errores en las medidas, como la mala posición de las rejillas o el desajuste del índice de refracción. Además, el uso incorrecto de algoritmos de procesamiento posteriores a la adquisición también puede dar lugar a artefactos en las imágenes reconstruidas.¹⁹⁴

Por otro lado, la técnica STED, basada en la microscopía de barrido, supera el límite de difracción mediante la desactivación selectiva de los fluoróforos alrededor del punto de excitación escaneado.²⁰⁰ Esto se consigue superponiendo dos pulsos láser sincronizados. Los fluoróforos son excitados por el primer pulso láser que genera un foco ordinario. A éste le sigue inmediatamente un segundo láser de forma toroidal cuya frecuencia se desplaza hasta la λ_{em} del fluoróforo, con el fin de desactivar la emisión alrededor del foco excitado.¹⁹⁴ Por lo tanto, sólo se mide la fluorescencia de las moléculas en el centro del foco excitado, donde la intensidad del segundo láser es cero, mediante detectores monofotónicos sensibles. La técnica STED supera el límite de difracción estrechando la función de dispersión de puntos durante la adquisición de la imagen. De esta forma no se requiere una reconstrucción posterior de la imagen, generando imágenes de superresolución instantáneas que alcanzan la misma resolución temporal que la microscopía confocal, evitando así posibles artefactos causados por el mal uso de los algoritmos de reconstrucción. Pese a que teóricamente la resolución de la técnica STED permite la visualización de moléculas individuales, en realidad está limitada por la relación señal-ruido que puede verse afectada por múltiples componentes de la configuración del instrumento como la eficiencia del detector monofotónico, la distribución de la intensidad focal y la alineación de los haces láser, así

2.1. Introducción

como la fotoestabilidad de los láseres empleados. Una de las principales desventajas de esta técnica es la compleja y sofisticada arquitectura del equipo, lo que limita su uso generalizado. Además, en comparación con la SIM se produce un mayor fotoblanqueo de los fluoróforos y una mayor fototoxicidad de las muestras estudiadas derivados de la mayor potencia del láser empleada para el agotamiento de la emisión periférica. Mediante esta técnica Björn Johansson *et al.* pudieron visualizar agregados amiloides de $A\beta_{40}$ tanto *in vitro* como en secciones de cerebro de ratones 3xTg-AD modificados genéticamente para desarrollar EA, logrando una resolución espacial de 29 nm *in vitro* y de 62 nm en secciones de tejido cerebral, superando así entre 5 y 10 veces las capacidades de la microscopía confocal convencional.²⁰¹ Además, mediante esta técnica pudieron identificar fibras individuales dentro de las placas amiloides (Figura II.18).

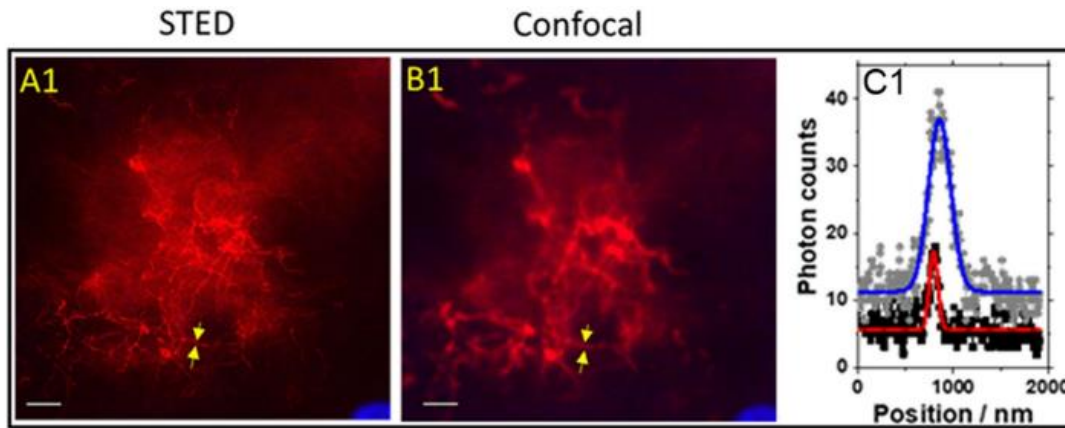


Figura II.18. Imágenes STED (A1) y de microscopía confocal de barrido láser (B1) de una placa amiloide en una sección de tejido cerebral de ratón 3xTgAD. Las flechas amarillas señalan una única fibra amiloide. El perfil de distribución de intensidad de fluorescencia (C1) muestra que la fibra tiene un diámetro aparente de 87 nm en la imagen STED (cuadrados negros con línea roja del correspondiente ajuste gaussiano) y de 320 nm en la imagen de microscopía confocal (diamantes grises con línea azul del correspondiente ajuste gaussiano). Imagen extraída de ²⁰¹ con permiso de los autores y Copyright 2023 BMC con licencia Creative Commons Attribution 4.0 (Open Access).

2.1.6. Referencias

1. Tabrizi, S., *Neurodegenerative diseases neurobiology pathogenesis and therapeutics*. J Neurol Neurosurg Psychiatry. 2006 Feb;77(2):284. doi: 10.1136/jnnp.2005.072710.
 2. Wilson, D. M.; Cookson, M. R.; Van Den Bosch, L.; Zetterberg, H.; Holtzman, D. M.; Dewachter, I., Hallmarks of neurodegenerative diseases. *Cell* **2023**, 186 (4), 693-714.
 3. Lamptey, R. N. L.; Chaulagain, B.; Trivedi, R.; Gothwal, A.; Layek, B.; Singh, J., A Review of the Common Neurodegenerative Disorders: Current Therapeutic Approaches and the Potential Role of Nanotherapeutics. *Int J Mol Sci* **2022**, 23 (3).
 4. Koo, E. H.; Lansbury, P. T., Jr.; Kelly, J. W., Amyloid diseases: abnormal protein aggregation in neurodegeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1999**, 96 (18), 9989-90.
 5. Peng, Y.; Alexov, E., Protein Conformational Disease: Visit the Facts at a Glance. In *Encyclopedia of Life Sciences*, pp 1-7.
 6. Sipe, J. D.; Cohen, A. S., Review: history of the amyloid fibril. *J Struct Biol* **2000**, 130 (2-3), 88-98.
 7. Chiti, F.; Dobson, C. M., Protein Misfolding, Amyloid Formation, and Human Disease: A Summary of Progress Over the Last Decade. *Annu Rev Biochem* **2017**, 86, 27-68.
 8. Sipe, J. D. In *Amyloid proteins : the beta sheet conformation and disease*, 2005.
 9. Merlini, G.; Seldin, D. C.; Gertz, M. A., Amyloidosis: pathogenesis and new therapeutic options. *J Clin Oncol* **2011**, 29 (14), 1924-33.
 10. He, Y.; Zheng, M. M.; Ma, Y.; Han, X. J.; Ma, X. Q.; Qu, C. Q.; Du, Y. F., Soluble oligomers and fibrillar species of amyloid β -peptide differentially affect cognitive functions and hippocampal inflammatory response. *Biochem Biophys Res Commun* **2012**, 429 (3-4), 125-30.
 11. Ruiz-Arias, Á.; Paredes, J. M.; Di Biase, C.; Cuerva, J. M.; Giron, M. D.; Salto, R.; González-Vera, J. A.; Orte, A. Seeding and Growth of β -Amyloid Aggregates upon Interaction with Neuronal Cell Membranes *International Journal of Molecular Sciences* [Online], 2020.
 12. Aliyan, A.; Cook, N. P.; Martí, A. A., Interrogating Amyloid Aggregates using Fluorescent Probes. *Chem. Rev.* **2019**, 119 (23), 11819-11856.
 13. Sun, Y.; Xu, S.; Jiang, M.; Liu, X.; Yang, L.; Bai, Z.; Yang, Q., Role of the Extracellular Matrix in Alzheimer's Disease. *Front Aging Neurosci* **2021**, 13, 707466.
 14. Baker, K. R.; Rice, L., The amyloidoses: clinical features, diagnosis and treatment. *Methodist DeBakey Cardiovasc J* **2012**, 8 (3), 3-7.
 15. Rambaran, R. N.; Serpell, L. C., Amyloid fibrils: abnormal protein assembly. *Prion* **2008**, 2 (3), 112-7.
 16. Ma, J.; Ma, C.; Li, J.; Sun, Y.; Ye, F.; Liu, K.; Zhang, H., Extracellular Matrix Proteins Involved in Alzheimer's Disease. *Chemistry – A European Journal* **2020**, 26 (53), 12101-12110.
 17. Rahman, M. M.; Lendel, C., Extracellular protein components of amyloid plaques and their roles in Alzheimer's disease pathology. *Mol Neurodegener* **2021**, 16 (1), 59.
 18. Cohen, A. S.; Calkins, E., Electron microscopic observations on a fibrous component in amyloid of diverse origins. *Nature* **1959**, 183 (4669), 1202-3.
 19. Kreuzer, A. G.; Samdin, T. D.; Guaglianone, G.; Spencer, R. K.; Nowick, J. S., X-ray Crystallography Reveals Parallel and Antiparallel β -Sheet Dimers of a β -Hairpin Derived from A β (16-36) that Assemble to Form Different Tetramers. *ACS Chem Neurosci* **2020**, 11 (15), 2340-2347.
 20. Makin, O. S.; Serpell, L. C., Structures for amyloid fibrils. *Febs j* **2005**, 272 (23), 5950-61.
-

2.1. Introducción

21. Squires, A. M.; Devlin, G. L.; Gras, S. L.; Tickler, A. K.; MacPhee, C. E.; Dobson, C. M., X-ray Scattering Study of the Effect of Hydration on the Cross- β Structure of Amyloid Fibrils. *Journal of the American Chemical Society* **2006**, *128* (36), 11738-11739.
 22. Briki, F.; Vérine, J.; Doucet, J.; Bénas, P.; Fayard, B.; Delpech, M.; Grateau, G.; Riès-Kautt, M., Synchrotron x-ray microdiffraction reveals intrinsic structural features of amyloid deposits in situ. *Biophys J* **2011**, *101* (2), 486-93.
 23. Ishikawa, Y.; Takekiyo, T.; Yoshimura, Y., Recovery and cryopreservation of insulin amyloid using ionic liquids. *Journal of Molecular Liquids* **2018**, *272*, 1019-1024.
 24. Gras, S. L.; Waddington, L. J.; Goldie, K. N., Transmission electron microscopy of amyloid fibrils. *Methods Mol Biol* **2011**, *752*, 197-214.
 25. Goldsbury, C.; Baxa, U.; Simon, M. N.; Steven, A. C.; Engel, A.; Wall, J. S.; Aebi, U.; Müller, S. A., Amyloid structure and assembly: insights from scanning transmission electron microscopy. *J Struct Biol* **2011**, *173* (1), 1-13.
 26. Klunk, W. E.; Xu, C.-J.; Pettegrew, J. W., NMR Identification of the Formic Acid-Modified Residue in Alzheimer's Amyloid Protein. *Journal of Neurochemistry* **1994**, *62* (1), 349-354.
 27. Tycko, R., Solid-state NMR studies of amyloid fibril structure. *Annu Rev Phys Chem* **2011**, *62*, 279-99.
 28. Loquet, A.; El Mammeri, N.; Stanek, J.; Berbon, M.; Bardiaux, B.; Pintacuda, G.; Habenstein, B., 3D structure determination of amyloid fibrils using solid-state NMR spectroscopy. *Methods* **2018**, *138-139*, 26-38.
 29. Tycko, R., Molecular Structure of Aggregated Amyloid- β : Insights from Solid-State Nuclear Magnetic Resonance. *Cold Spring Harb Perspect Med* **2016**, *6* (8).
 30. Emsley, J.; White, H. E.; O'Hara, B. P.; Oliva, G.; Srinivasan, N.; Tickle, I. J.; Blundell, T. L.; Pepys, M. B.; Wood, S. P., Structure of pentameric human serum amyloid P component. *Nature* **1994**, *367* (6461), 338-345.
 31. Nelson, D. L.; Cox, M. M.; Hoskins, A. A.; Lehninger, A. L., *Lehninger principles of Biochemistry*. Eight edition ed.; Macmillan Learning: New York, 2021.
 32. Littlechild, J. A., Chapter 2 - Protein structure and function. In *Introduction to Biological and Small Molecule Drug Research and Development*, Ganellin, R.; Roberts, S.; Jefferis, R., Eds. Elsevier: Oxford, 2013; pp 57-79.
 33. Martin, A. C.; Orengo, C. A.; Hutchinson, E. G.; Jones, S.; Karmirantzou, M.; Laskowski, R. A.; Mitchell, J. B.; Taroni, C.; Thornton, J. M., Protein folds and functions. *Structure* **1998**, *6* (7), 875-84.
 34. Toyama, B. H.; Weissman, J. S., Amyloid structure: conformational diversity and consequences. *Annu Rev Biochem* **2011**, *80*, 557-85.
 35. Weids, A. J.; Ibstedt, S.; Tamás, M. J.; Grant, C. M., Distinct stress conditions result in aggregation of proteins with similar properties. *Scientific Reports* **2016**, *6* (1), 24554.
 36. Fusco, G.; Chen, S. W.; Williamson, P. T. F.; Cascella, R.; Perni, M.; Jarvis, J. A.; Cecchi, C.; Vendruscolo, M.; Chiti, F.; Cremades, N.; Ying, L.; Dobson, C. M.; De Simone, A., Structural basis of membrane disruption and cellular toxicity by α -synuclein oligomers. *Science* **2017**, *358* (6369), 1440-1443.
 37. Cummings, J. L.; Ross, W.; Absher, J.; Gornbein, J.; Hadjiaghai, L., Depressive symptoms in Alzheimer disease: assessment and determinants. *Alzheimer Dis Assoc Disord* **1995**, *9* (2), 87-93.
 38. Michaels, T. C. T.; Šarić, A.; Curk, S.; Bernfur, K.; Arosio, P.; Meisl, G.; Dear, A. J.; Cohen, S. I. A.; Dobson, C. M.; Vendruscolo, M.; Linse, S.; Knowles, T. P. J., Dynamics of oligomer populations formed during the aggregation of Alzheimer's A β 42 peptide. *Nature Chemistry* **2020**, *12* (5), 445-451.
 39. Sang, J. C.; Lee, J.-E.; Dear, A. J.; De, S.; Meisl, G.; Thackray, A. M.; Bujdoso, R.; Knowles, T. P. J.; Klenerman, D., Direct observation of prion protein oligomer
-

2.1. Introducción

formation reveals an aggregation mechanism with multiple conformationally distinct species. *Chemical Science* **2019**, *10* (17), 4588-4597.

40. Limbocker, R.; Cremades, N.; Cascella, R.; Tessier, P. M.; Vendruscolo, M.; Chiti, F., Characterization of Pairs of Toxic and Nontoxic Misfolded Protein Oligomers Elucidates the Structural Determinants of Oligomer Toxicity in Protein Misfolding Diseases. *Accounts of Chemical Research* **2023**.

41. Verma, M.; Vats, A.; Taneja, V., Toxic species in amyloid disorders: Oligomers or mature fibrils. *Ann Indian Acad Neurol* **2015**, *18* (2), 138-45.

42. Cremades, N.; Cohen, S. I.; Deas, E.; Abramov, A. Y.; Chen, A. Y.; Orte, A.; Sandal, M.; Clarke, R. W.; Dunne, P.; Aprile, F. A.; Bertocini, C. W.; Wood, N. W.; Knowles, T. P.; Dobson, C. M.; Klenerman, D., Direct observation of the interconversion of normal and toxic forms of α -synuclein. *Cell* **2012**, *149* (5), 1048-59.

43. Iljina, M.; Garcia, G. A.; Horrocks, M. H.; Tosatto, L.; Choi, M. L.; Ganzinger, K. A.; Abramov, A. Y.; Gandhi, S.; Wood, N. W.; Cremades, N.; Dobson, C. M.; Knowles, T. P. J.; Klenerman, D., Kinetic model of the aggregation of alpha-synuclein provides insights into prion-like spreading. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2016**, *113* (9), E1206-E1215.

44. Cremades, N.; Chen, S. W.; Dobson, C. M., Structural Characteristics of α -Synuclein Oligomers. *Int Rev Cell Mol Biol* **2017**, *329*, 79-143.

45. Hingant, E.; Fontes, P.; Alvarez-Martinez, M. T.; Arnaud, J. D.; Liautard, J. P.; Pujo-Menjouet, L., A micellar on-pathway intermediate step explains the kinetics of prion amyloid formation. *PLoS Comput Biol* **2014**, *10* (8), e1003735.

46. Morel, B.; Carrasco, M. P.; Jurado, S.; Marco, C.; Conejero-Lara, F., Dynamic micellar oligomers of amyloid beta peptides play a crucial role in their aggregation mechanisms. *Phys Chem Chem Phys* **2018**, *20* (31), 20597-20614.

47. Riek, R., The Three-Dimensional Structures of Amyloids. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2017**, *9* (2).

48. Buell, A. K., Stability matters, too – the thermodynamics of amyloid fibril formation. *Chemical Science* **2022**, *13* (35), 10177-10192.

49. Poshusta, T. L.; Katoh, N.; Gertz, M. A.; Dispenzieri, A.; Ramirez-Alvarado, M., Thermal stability threshold for amyloid formation in light chain amyloidosis. *Int J Mol Sci* **2013**, *14* (11), 22604-17.

50. Castello, F.; Paredes, J. M.; Ruedas-Rama, M. J.; Martin, M.; Roldan, M.; Casares, S.; Orte, A., Two-Step Amyloid Aggregation: Sequential Lag Phase Intermediates. *Sci Rep* **2017**, *7*, 40065.

51. Berezin, M. Y.; Achilefu, S., Fluorescence lifetime measurements and biological imaging. *Chem Rev* **2010**, *110* (5), 2641-84.

52. Bruggink, K. A.; Müller, M.; Kuiperij, H. B.; Verbeek, M. M., Methods for analysis of amyloid- β aggregates. *J Alzheimers Dis* **2012**, *28* (4), 735-58.

53. Knowles, T. P.; Vendruscolo, M.; Dobson, C. M., The amyloid state and its association with protein misfolding diseases. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2014**, *15* (6), 384-96.

54. Newby, G. A.; Lindquist, S., Blessings in disguise: biological benefits of prion-like mechanisms. *Trends Cell Biol* **2013**, *23* (6), 251-9.

55. Jahn, T. R.; Radford, S. E., Folding versus aggregation: polypeptide conformations on competing pathways. *Arch Biochem Biophys* **2008**, *469* (1), 100-17.

56. Jurado, R.; Adamcik, J.; López-Haro, M.; González-Vera, J. A.; Ruiz-Arias, Á.; Sánchez-Ferrer, A.; Cuesta, R.; Domínguez-Vera, J. M.; Calvino, J. J.; Orte, A.; Mezzenga, R.; Gálvez, N., Apoferritin Protein Amyloid Fibrils with Tunable Chirality and Polymorphism. *J. Am. Chem. Soc.* **2019**, *141* (4), 1606-1613.

57. Jurado, R.; Castello, F.; Bondia, P.; Casado, S.; Flors, C.; Cuesta, R.; Domínguez-Vera, J. M.; Orte, A.; Galvez, N., Apoferritin fibers: a new template for 1D fluorescent hybrid nanostructures. *Nanoscale* **2016**, *8* (18), 9648-9656.

58. Breijyeh, Z.; Karaman, R., Comprehensive Review on Alzheimer's Disease: Causes and Treatment. *Molecules* **2020**, *25* (24).

2.1. Introducción

59. Glenner, G. G.; Wong, C. W., Alzheimer's disease and Down's syndrome: Sharing of a unique cerebrovascular amyloid fibril protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **1984**, *122* (3), 1131-1135.
60. Horning, S. M.; Melrose, R.; Sultzer, D., Insight in Alzheimer's disease and its relation to psychiatric and behavioral disturbances. *Int J Geriatr Psychiatry* **2014**, *29* (1), 77-84.
61. Alzheimer, A.; Stelzmann, R. A.; Schnitzlein, H. N.; Murtagh, F. R., An English translation of Alzheimer's 1907 paper, "Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde". *Clin Anat* **1995**, *8* (6), 429-31.
62. Kang, J.; Lemaire, H.-G.; Unterbeck, A.; Salbaum, J. M.; Masters, C. L.; Grzeschik, K.-H.; Multhaup, G.; Beyreuther, K.; Müller-Hill, B., The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature* **1987**, *325* (6106), 733-736.
63. O'Brien, R. J.; Wong, P. C., Amyloid precursor protein processing and Alzheimer's disease. *Annu Rev Neurosci* **2011**, *34*, 185-204.
64. Hardy, J. A.; Higgins, G. A., Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science* **1992**, *256* (5054), 184-5.
65. McKean, N. E.; Handley, R. R.; Snell, R. G., A Review of the Current Mammalian Models of Alzheimer's Disease and Challenges That Need to Be Overcome. *Int J Mol Sci* **2021**, *22* (23).
66. Ashton, N. J.; Benedet, A. L.; Pascoal, T. A.; Karikari, T. K.; Lantero-Rodriguez, J.; Brum, W. S.; Mathotaarachchi, S.; Therriault, J.; Savard, M.; Chamoun, M.; Stoops, E.; Francois, C.; Vanmechelen, E.; Gauthier, S.; Zimmer, E. R.; Zetterberg, H.; Blennow, K.; Rosa-Neto, P., Cerebrospinal fluid p-tau231 as an early indicator of emerging pathology in Alzheimer's disease. *EBioMedicine* **2022**, *76*, 103836.
67. Zaretsky, D. V.; Zaretskaia, M. V.; Molkov, Y. I.; for the Alzheimer's Disease Neuroimaging, I., Patients with Alzheimer's disease have an increased removal rate of soluble beta-amyloid-42. *PLOS ONE* **2022**, *17* (10), e0276933.
68. Fagan, A. M.; Head, D.; Shah, A. R.; Marcus, D.; Mintun, M.; Morris, J. C.; Holtzman, D. M., Decreased cerebrospinal fluid Abeta(42) correlates with brain atrophy in cognitively normal elderly. *Ann Neurol* **2009**, *65* (2), 176-83.
69. Teunissen, C. E.; Chiu, M. J.; Yang, C. C.; Yang, S. Y.; Scheltens, P.; Zetterberg, H.; Blennow, K., Plasma Amyloid- β (A β 42) Correlates with Cerebrospinal Fluid A β 42 in Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis* **2018**, *62* (4), 1857-1863.
70. Zhang, X.; Fu, Z.; Meng, L.; He, M.; Zhang, Z., The Early Events That Initiate β -Amyloid Aggregation in Alzheimer's Disease. *Front Aging Neurosci* **2018**, *10*, 359.
71. Dineley, K. T.; Westerman, M.; Bui, D.; Bell, K.; Ashe, K. H.; Sweatt, J. D., Beta-amyloid activates the mitogen-activated protein kinase cascade via hippocampal alpha7 nicotinic acetylcholine receptors: In vitro and in vivo mechanisms related to Alzheimer's disease. *J Neurosci* **2001**, *21* (12), 4125-33.
72. Grimm, M. O.; Grimm, H. S.; Pätzold, A. J.; Zinser, E. G.; Halonen, R.; Duering, M.; Tschäpe, J. A.; De Strooper, B.; Müller, U.; Shen, J.; Hartmann, T., Regulation of cholesterol and sphingomyelin metabolism by amyloid-beta and presenilin. *Nat Cell Biol* **2005**, *7* (11), 1118-23.
73. Gosztyla, M. L.; Brothers, H. M.; Robinson, S. R., Alzheimer's Amyloid- β is an Antimicrobial Peptide: A Review of the Evidence. *J Alzheimers Dis* **2018**, *62* (4), 1495-1506.
74. Chen, G.-f.; Xu, T.-h.; Yan, Y.; Zhou, Y.-r.; Jiang, Y.; Melcher, K.; Xu, H. E., Amyloid beta: structure, biology and structure-based therapeutic development. *Acta Pharmacologica Sinica* **2017**, *38* (9), 1205-1235.
75. Kuperstein, I.; Broersen, K.; Benilova, I.; Rozenski, J.; Jonckheere, W.; Debulpaep, M.; Vandersteen, A.; Segers-Nolten, I.; Van Der Werf, K.; Subramaniam, V.; Braeken, D.; Callewaert, G.; Bartic, C.; D'Hooge, R.; Martins, I. C.; Rousseau, F.;
-

2.1. Introducción

- Schymkowitz, J.; De Strooper, B., Neurotoxicity of Alzheimer's disease A β peptides is induced by small changes in the A β 42 to A β 40 ratio. *Embo j* **2010**, 29 (19), 3408-20.
76. Yan, Y.; Wang, C., Abeta42 is more rigid than Abeta40 at the C terminus: implications for Abeta aggregation and toxicity. *J Mol Biol* **2006**, 364 (5), 853-62.
77. Qiu, T.; Liu, Q.; Chen, Y. X.; Zhao, Y. F.; Li, Y. M., A β 42 and A β 40: similarities and differences. *J Pept Sci* **2015**, 21 (7), 522-9.
78. Tcw, J.; Goate, A. M., Genetics of β -Amyloid Precursor Protein in Alzheimer's Disease. *Cold Spring Harb Perspect Med* **2017**, 7 (6).
79. Rangachari, V.; Dean, D. N.; Rana, P.; Vaidya, A.; Ghosh, P., Cause and consequence of A β - Lipid interactions in Alzheimer disease pathogenesis. *Biochim Biophys Acta Biomembr* **2018**, 1860 (9), 1652-1662.
80. Accardo, A.; Shalabaeva, V.; Cotte, M.; Burghammer, M.; Krahne, R.; Riek, C.; Dante, S., Amyloid β Peptide Conformational Changes in the Presence of a Lipid Membrane System. *Langmuir* **2014**, 30 (11), 3191-3198.
81. Benilova, I.; Karran, E.; De Strooper, B., The toxic A β oligomer and Alzheimer's disease: an emperor in need of clothes. *Nat Neurosci* **2012**, 15 (3), 349-57.
82. Bieschke, J.; Herbst, M.; Wiglenda, T.; Friedrich, R. P.; Boeddrich, A.; Schiele, F.; Kleckers, D.; Lopez del Amo, J. M.; Grüning, B. A.; Wang, Q.; Schmidt, M. R.; Lurz, R.; Anwy, R.; Schnoegl, S.; Fändrich, M.; Frank, R. F.; Reif, B.; Günther, S.; Walsh, D. M.; Wanker, E. E., Small-molecule conversion of toxic oligomers to nontoxic β -sheet-rich amyloid fibrils. *Nature Chemical Biology* **2012**, 8 (1), 93-101.
83. Lopez del Amo, J. M.; Fink, U.; Dasari, M.; Grelle, G.; Wanker, E. E.; Bieschke, J.; Reif, B., Structural Properties of EGCG-Induced, Nontoxic Alzheimer's Disease A β Oligomers. *Journal of Molecular Biology* **2012**, 421 (4), 517-524.
84. De, S.; Wirthensohn, D. C.; Flagmeier, P.; Hughes, C.; Aprile, F. A.; Ruggeri, F. S.; Whiten, D. R.; Emin, D.; Xia, Z.; Varela, J. A.; Sormanni, P.; Kundel, F.; Knowles, T. P. J.; Dobson, C. M.; Bryant, C.; Vendruscolo, M.; Klenerman, D., Different soluble aggregates of A β 42 can give rise to cellular toxicity through different mechanisms. *Nature Communications* **2019**, 10 (1), 1541.
85. Knovich, M. A.; Storey, J. A.; Coffman, L. G.; Torti, S. V.; Torti, F. M., Ferritin for the clinician. *Blood Rev* **2009**, 23 (3), 95-104.
86. Kotla, N. K.; Dutta, P.; Parimi, S.; Das, N. K., The Role of Ferritin in Health and Disease: Recent Advances and Understandings. *Metabolites* **2022**, 12 (7).
87. Harrison, P. M.; Banyard, S. H.; Hoare, R. J.; Russell, S. M.; Treffry, A., The structure and function of ferritin. *Ciba Found Symp* **1976**, (51), 19-40.
88. Kumar, N.; Rizek, P.; Jog, M., Neuroferritinopathy: Pathophysiology, Presentation, Differential Diagnoses and Management. *Tremor Other Hyperkinet Mov (N Y)* **2016**, 6, 355.
89. Jellinger, K.; Paulus, W.; Grundke-Iqbal, I.; Riederer, P.; Youdim, M. B., Brain iron and ferritin in Parkinson's and Alzheimer's diseases. *J Neural Transm Park Dis Dement Sect* **1990**, 2 (4), 327-40.
90. Raha, A. A.; Biswas, A.; Henderson, J.; Chakraborty, S.; Holland, A.; Friedland, R. P.; Mukaetova-Ladinska, E.; Zaman, S.; Raha-Chowdhury, R., Interplay of Ferritin Accumulation and Ferroportin Loss in Ageing Brain: Implication for Protein Aggregation in Down Syndrome Dementia, Alzheimer's, and Parkinson's Diseases. *Int J Mol Sci* **2022**, 23 (3).
91. Jurado, R.; Gálvez, N., Apoferritin Amyloid-Fibril Directed the In Situ Assembly and/or Synthesis of Optical and Magnetic Nanoparticles. *Nanomaterials (Basel)* **2021**, 11 (1).
92. Ruiz-Arias, Á.; Jurado, R.; Fueyo-González, F.; Herranz, R.; Gálvez, N.; González-Vera, J. A.; Orte, A., A FRET pair for quantitative and superresolution imaging of amyloid fibril formation. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2022**, 350, 130882.
93. Jutz, G.; van Rijn, P.; Santos Miranda, B.; Böker, A., Ferritin: A Versatile Building Block for Bionanotechnology. *Chemical Reviews* **2015**, 115 (4), 1653-1701.
-

2.1. Introducción

94. Fan, K.; Cao, C.; Pan, Y.; Lu, D.; Yang, D.; Feng, J.; Song, L.; Liang, M.; Yan, X., Magnetoferritin nanoparticles for targeting and visualizing tumour tissues. *Nat Nanotechnol* **2012**, *7* (7), 459-64.
 95. Ladiwala, A. R.; Litt, J.; Kane, R. S.; Aucoin, D. S.; Smith, S. O.; Ranjan, S.; Davis, J.; Van Nostrand, W. E.; Tessier, P. M., Conformational differences between two amyloid β oligomers of similar size and dissimilar toxicity. *J Biol Chem* **2012**, *287* (29), 24765-73.
 96. Dzyuba, S. V., BODIPY Dyes as Probes and Sensors to Study Amyloid- β -Related Processes. *Biosensors (Basel)* **2020**, *10* (12).
 97. Rice, L. J.; Ecroyd, H.; van Oijen, A. M., Illuminating amyloid fibrils: Fluorescence-based single-molecule approaches. *Comp. Struct. Biotechnol. J.* **2021**, *19*, 4711-4724.
 98. Royer, C. A.; Scarlata, S. F., Fluorescence approaches to quantifying biomolecular interactions. *Methods Enzymol* **2008**, *450*, 79-106.
 99. Camarca, A.; Varriale, A.; Capo, A.; Pennacchio, A.; Calabrese, A.; Giannattasio, C.; Murillo Almuzara, C.; D'Auria, S.; Staiano, M., Emergent Biosensing Technologies Based on Fluorescence Spectroscopy and Surface Plasmon Resonance. *Sensors (Basel)* **2021**, *21* (3).
 100. Biancalana, M.; Koide, S., Molecular mechanism of Thioflavin-T binding to amyloid fibrils. *Biochim Biophys Acta* **2010**, *1804* (7), 1405-12.
 101. Hawe, A.; Sutter, M.; Jiskoot, W., Extrinsic fluorescent dyes as tools for protein characterization. *Pharm Res* **2008**, *25* (7), 1487-99.
 102. Sabate, R.; Rodriguez-Santiago, L.; Sodupe, M.; Saupe, S. J.; Ventura, S., Thioflavin-T excimer formation upon interaction with amyloid fibers. *Chem. Commun.* **2013**, *49* (51), 5745-5747.
 103. Groenning, M., Binding mode of Thioflavin T and other molecular probes in the context of amyloid fibrils—current status. *J. Chem. Biol.* **2010**, *3*, 1-18.
 104. Garai, K.; Frieden, C., Quantitative analysis of the time course of A β oligomerization and subsequent growth steps using tetramethylrhodamine-labeled A β . *Proc Natl Acad Sci U S A* **2013**, *110* (9), 3321-6.
 105. Steensma, D. P., "Congo" Red: Out of Africa? *Archives of Pathology & Laboratory Medicine* **2001**, *125* (2), 250-252.
 106. Vassar, P. S.; Culling, C. F., Fluorescent stains, with special reference to amyloid and connective tissues. *Arch Pathol* **1959**, *68*, 487-98.
 107. Lindgren, M.; Sörgjerd, K.; Hammarström, P., Detection and Characterization of Aggregates, Prefibrillar Amyloidogenic Oligomers, and Protofibrils Using Fluorescence Spectroscopy. *Biophysical Journal* **2005**, *88* (6), 4200-4212.
 108. Morten, M. J.; Sirvio, L.; Rupawala, H.; Mee Hayes, E.; Franco, A.; Radulescu, C.; Ying, L.; Barnes, S. J.; Muga, A.; Ye, Y., Quantitative super-resolution imaging of pathological aggregates reveals distinct toxicity profiles in different synucleinopathies. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2022**, *119* (41), e2205591119.
 109. Maezawa, I.; Hong, H. S.; Liu, R.; Wu, C. Y.; Cheng, R. H.; Kung, M. P.; Kung, H. F.; Lam, K. S.; Oddo, S.; Laferla, F. M.; Jin, L. W., Congo red and thioflavin-T analogs detect Abeta oligomers. *J Neurochem* **2008**, *104* (2), 457-68.
 110. Horrocks, M. H.; Lee, S. F.; Gandhi, S.; Magdalinou, N. K.; Chen, S. W.; Devine, M. J.; Tosatto, L.; Kjaergaard, M.; Beckwith, J. S.; Zetterberg, H.; Iljina, M.; Cremades, N.; Dobson, C. M.; Wood, N. W.; Klenerman, D., Single-Molecule Imaging of Individual Amyloid Protein Aggregates in Human Biofluids. *ACS Chemical Neuroscience* **2016**, *7* (3), 399-406.
 111. Brelstaff, J.; Ossola, B.; Neher, J. J.; Klingstedt, T.; Nilsson, K. P.; Goedert, M.; Spillantini, M. G.; Tolkovsky, A. M., The fluorescent pentameric oligothiophene pFTAA identifies filamentous tau in live neurons cultured from adult P301S tau mice. *Front Neurosci* **2015**, *9*, 184.
-

2.1. Introducción

112. Sutter, M.; Oliveira, S.; Sanders, N. N.; Lucas, B.; van Hoek, A.; Hink, M. A.; Visser, A. J.; De Smedt, S. C.; Hennink, W. E.; Jiskoot, W., Sensitive spectroscopic detection of large and denatured protein aggregates in solution by use of the fluorescent dye Nile red. *J Fluoresc* **2007**, *17* (2), 181-92.
113. Maiti, P.; Hall, T. C.; Paladugu, L.; Kolli, N.; Learman, C.; Rossignol, J.; Dunbar, G. L., A comparative study of dietary curcumin, nanocurcumin, and other classical amyloid-binding dyes for labeling and imaging of amyloid plaques in brain tissue of 5x-familial Alzheimer's disease mice. *Histochem Cell Biol* **2016**, *146* (5), 609-625.
114. Jameson, L. P.; Dzyuba, S. V., Aza-BODIPY: improved synthesis and interaction with soluble A β 1-42 oligomers. *Bioorg Med Chem Lett* **2013**, *23* (6), 1732-5.
115. Hintersteiner, M.; Enz, A.; Frey, P.; Jaton, A.-L.; Kinzy, W.; Kneuer, R.; Neumann, U.; Rudin, M.; Staufienbiel, M.; Stoeckli, M.; Wiederhold, K.-H.; Gremlich, H.-U., In vivo detection of amyloid-beta deposits by near-infrared imaging using an oxazine-derivative probe. *Nat Biotechnol* **2005**, *23* (5), 577-583.
116. Harada, R.; Okamura, N.; Furumoto, S.; Yoshikawa, T.; Arai, H.; Yanai, K.; Kudo, Y., Use of a benzimidazole derivative BF-188 in fluorescence multispectral imaging for selective visualization of tau protein fibrils in the Alzheimer's disease brain. *Mol Imaging Biol* **2014**, *16* (1), 19-27.
117. Klingstedt, T.; Nilsson, K. P., Luminescent conjugated poly- and oligothiophenes: optical ligands for spectral assignment of a plethora of protein aggregates. *Biochem Soc Trans* **2012**, *40* (4), 704-10.
118. Gaur, P.; Galkin, M.; Kurochka, A.; Ghosh, S.; Yushchenko, D. A.; Shvadchak, V. V., Fluorescent Probe for Selective Imaging of α -Synuclein Fibrils in Living Cells. *ACS Chemical Neuroscience* **2021**, *12* (8), 1293-1298.
119. Hanczyc, P., Binuclear ruthenium(II) complexes for amyloid fibrils recognition. *Chemical Physics* **2014**, *445*, 1-4.
120. Jiang, B.; Aliyan, A.; Cook, N. P.; Augustine, A.; Bhak, G.; Maldonado, R.; Smith McWilliams, A. D.; Flores, E. M.; Mendez, N.; Shahnawaz, M.; Godoy, F. J.; Montenegro, J.; Moreno-Gonzalez, I.; Martí, A. A., Monitoring the Formation of Amyloid Oligomers Using Photoluminescence Anisotropy. *Journal of the American Chemical Society* **2019**, *141* (39), 15605-15610.
121. 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.
122. Wan, W.; Zeng, L.; Jin, W.; Chen, X.; Shen, D.; Huang, Y.; Wang, M.; Bai, Y.; Lyu, H.; Dong, X.; Gao, Z.; Wang, L.; Liu, X.; Liu, Y., A Solvatochromic Fluorescent Probe Reveals Polarity Heterogeneity upon Protein Aggregation in Cells. *Angew Chem Int Ed Engl* **2021**, *60* (49), 25865-25871.
123. Fueyo-González, F.; González-Vera, J. A.; Alkorta, I.; Infantes, L.; Jimeno, M. L.; Aranda, P.; Acuña-Castroviejo, D.; Ruiz-Arias, A.; Orte, A.; Herranz, R., Environment-Sensitive Probes for Illuminating Amyloid Aggregation In Vitro and in Zebrafish. *ACS Sensors* **2020**, *5*, 2792-2799.
124. Dreos, A.; Ge, J.; Najera, F.; Tebikachew, B. E.; Perez-Inestrosa, E.; Moth-Poulsen, K.; Blennow, K.; Zetterberg, H.; Hanrieder, J., Investigating New Applications of a Photoswitchable Fluorescent Norbornadiene as a Multifunctional Probe for Delineation of Amyloid Plaque Polymorphism. *ACS Sensors* **2023**, *8* (4), 1500-1509.
125. Goh, W. L.; Lee, M. Y.; Joseph, T. L.; Quah, S. T.; Brown, C. J.; Verma, C.; Brenner, S.; Ghadessy, F. J.; Teo, Y. N., Molecular Rotors As Conditionally Fluorescent Labels for Rapid Detection of Biomolecular Interactions. *Journal of the American Chemical Society* **2014**, *136* (17), 6159-6162.
126. Haidekker, M. A.; Theodorakis, E. A., Molecular rotors—fluorescent biosensors for viscosity and flow. *Organic & Biomolecular Chemistry* **2007**, *5* (11), 1669-1678.
-

2.1. Introducción

127. Khurana, R.; Coleman, C.; Ionescu-Zanetti, C.; Carter, S. A.; Krishna, V.; Grover, R. K.; Roy, R.; Singh, S., Mechanism of thioflavin T binding to amyloid fibrils. *J Struct Biol* **2005**, *151* (3), 229-38.
128. Rovnyagina, N. R.; Budylin, G. S.; Vainer, Y. G.; Tikhonova, T. N.; Vasin, S. L.; Yakovlev, A. A.; Kompanets, V. O.; Chekalin, S. V.; Priezzhev, A. V.; Shirshin, E. A., Fluorescence Lifetime and Intensity of Thioflavin T as Reporters of Different Fibrillation Stages: Insights Obtained from Fluorescence Up-Conversion and Particle Size Distribution Measurements. *Int J Mol Sci* **2020**, *21* (17).
129. Sulatskaya, A. I.; Kuznetsova, I. M.; Turoverov, K. K., Interaction of thioflavin T with amyloid fibrils: fluorescence quantum yield of bound dye. *J Phys Chem B* **2012**, *116* (8), 2538-44.
130. D'Amico, M.; Di Carlo, M. G.; Groenning, M.; Militello, V.; Vetri, V.; Leone, M., Thioflavin T Promotes A β (1–40) Amyloid Fibrils Formation. *The Journal of Physical Chemistry Letters* **2012**, *3* (12), 1596-1601.
131. Xue, C.; Lin, T. Y.; Chang, D.; Guo, Z., Thioflavin T as an amyloid dye: fibril quantification, optimal concentration and effect on aggregation. *Royal Society Open Science* **2017**, *4* (1), 160696.
132. Kaur, A.; Adair, L. D.; Ball, S. R.; New, E. J.; Sunde, M., A Fluorescent Sensor for Quantitative Super-Resolution Imaging of Amyloid Fibril Assembly. *Angew Chem Int Ed Engl* **2022**, *61* (10), e202112832.
133. Lee, M.; Kim, M.; Tikum, A. F.; Lee, H. J.; Thamilarasan, V.; Lim, M. H.; Kim, J., A near-infrared fluorescent probe for amyloid- β aggregates. *Dyes and Pigments* **2019**, *162*, 97-103.
134. Wu, J.; Shao, C.; Ye, X.; Di, X.; Li, D.; Zhao, H.; Zhang, B.; Chen, G.; Liu, H. K.; Qian, Y., InVivo Brain Imaging of Amyloid- β Aggregates in Alzheimer's Disease with a Near-Infrared Fluorescent Probe. *ACS Sens* **2021**, *6* (3), 863-870.
135. Needham, L.-M.; Weber, J.; Fyfe, J. W. B.; Kabia, O. M.; Do, D. T.; Klimont, E.; Zhang, Y.; Rodrigues, M.; Dobson, C. M.; Ghandi, S.; Bohndiek, S. E.; Snaddon, T. N.; Lee, S. F., Bifunctional fluorescent probes for detection of amyloid aggregates and reactive oxygen species. *Royal Society Open Science* **2018**, *5* (2), 171399.
136. Rijavec, T.; Bračko, S., 7 - Smart dyes for medical and other textiles. In *Smart Textiles for Medicine and Healthcare*, Van Langenhove, L., Ed. Woodhead Publishing: 2007; pp 123-149.
137. Bai, Y.; Zhang, S.; Dong, H.; Liu, Y.; Liu, C.; Zhang, X., Advanced Techniques for Detecting Protein Misfolding and Aggregation in Cellular Environments. *Chemical Reviews* **2023**.
138. Sharma, A.; Sun, J.; Singaram, I.; Ralko, A.; Lee, D.; Cho, W., Photostable and Orthogonal Solvatochromic Fluorophores for Simultaneous In Situ Quantification of Multiple Cellular Signaling Molecules. *ACS Chemical Biology* **2020**, *15* (7), 1913-1920.
139. Gonzalez-Vera, J. A.; Fueyo-Gonzalez, F.; Alkorta, I.; Peyressatre, M.; Morris, M. C.; Herranz, R., Highly solvatochromic and tunable fluorophores based on a 4,5-quinolimine scaffold: novel CDK5 probes. *Chem. Commun.* **2016**, *52* (62), 9652-9655.
140. Das, A.; Dutta, T.; Gadhe, L.; Koner, A. L.; Saraogi, I., Biocompatible Fluorescent Probe for Selective Detection of Amyloid Fibrils. *Analytical Chemistry* **2020**, *92* (15), 10336-10341.
141. Tokuraku, K.; Marquardt, M.; Ikezu, T., Real-Time Imaging and Quantification of Amyloid- β Peptide Aggregates by Novel Quantum-Dot Nanoprobes. *PLOS ONE* **2010**, *4* (12), e8492.
142. Rizvi, S. B.; Ghaderi, S.; Keshtgar, M.; Seifalian, A. M., Semiconductor quantum dots as fluorescent probes for in vitro and in vivo bio-molecular and cellular imaging. *Nano Rev* **2010**, *1*.
143. Medintz, I. L.; Uyeda, H. T.; Goldman, E. R.; Mattoussi, H., Quantum dot bioconjugates for imaging, labelling and sensing. *Nature Materials* **2005**, *4* (6), 435-446.
-

2.1. Introducción

144. Necula, M.; Kaye, R.; Milton, S.; Glabe, C. G., Small Molecule Inhibitors of Aggregation Indicate That Amyloid β Oligomerization and Fibrillization Pathways Are Independent and Distinct*. *Journal of Biological Chemistry* **2007**, *282* (14), 10311-10324.
 145. Millucci, L.; Raggiaschi, R.; Franceschini, D.; Terstappen, G.; Santucci, A., Rapid aggregation and assembly in aqueous solution of A beta (25-35) peptide. *J Biosci* **2009**, *34* (2), 293-303.
 146. Dickens, M. G.; Franz, K. J., A prochelator activated by hydrogen peroxide prevents metal-induced amyloid Beta aggregation. *Chembiochem* **2010**, *11* (1), 59-62.
 147. Naiki, H.; Higuchi, K.; Hosokawa, M.; Takeda, T., Fluorometric determination of amyloid fibrils in vitro using the fluorescent dye, thioflavin T1. *Anal Biochem* **1989**, *177* (2), 244-9.
 148. Hudson, S. A.; Ecroyd, H.; Kee, T. W.; Carver, J. A., The thioflavin T fluorescence assay for amyloid fibril detection can be biased by the presence of exogenous compounds. *Febs j* **2009**, *276* (20), 5960-72.
 149. Streets, A. M.; Sourigues, Y.; Kopito, R. R.; Melki, R.; Quake, S. R., Simultaneous measurement of amyloid fibril formation by dynamic light scattering and fluorescence reveals complex aggregation kinetics. *PLoS One* **2013**, *8* (1), e54541.
 150. Khurana, R.; Uversky, V. N.; Nielsen, L.; Fink, A. L., Is Congo red an amyloid-specific dye? *J Biol Chem* **2001**, *276* (25), 22715-21.
 151. Burgevin, M. C.; Passat, M.; Daniel, N.; Capet, M.; Doble, A., Congo red protects against toxicity of beta-amyloid peptides on rat hippocampal neurones. *Neuroreport* **1994**, *5* (18), 2429-32.
 152. Lorenzo, A.; Yankner, B. A., Beta-amyloid neurotoxicity requires fibril formation and is inhibited by congo red. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1994**, *91* (25), 12243-7.
 153. Gellermann, G. P.; Ullrich, K.; Tannert, A.; Unger, C.; Habicht, G.; Sauter, S. R.; Hortschansky, P.; Horn, U.; Möllmann, U.; Decker, M.; Lehmann, J.; Fändrich, M., Alzheimer-like plaque formation by human macrophages is reduced by fibrillation inhibitors and lovastatin. *J Mol Biol* **2006**, *360* (2), 251-7.
 154. Verbeek, M. M.; de Waal, R. M.; Schipper, J. J.; Van Nostrand, W. E., Rapid degeneration of cultured human brain pericytes by amyloid beta protein. *J Neurochem* **1997**, *68* (3), 1135-41.
 155. Fraser, P. E.; Nguyen, J. T.; Chin, D. T.; Kirschner, D. A., Effects of sulfate ions on Alzheimer beta/A4 peptide assemblies: implications for amyloid fibril-proteoglycan interactions. *J Neurochem* **1992**, *59* (4), 1531-40.
 156. Gradinaru, C. C.; Marushchak, D. O.; Samim, M.; Krull, U. J., Fluorescence anisotropy: from single molecules to live cells. *Analyst* **2010**, *135* (3), 452-459.
 157. Jameson, D. M.; Ross, J. A., Fluorescence polarization/anisotropy in diagnostics and imaging. *Chem Rev* **2010**, *110* (5), 2685-708.
 158. Mancini, O.; Wellbrock, T.; Rolinski, O. J.; Kubiak-Ossowska, K.; Mulheran, P. A., Probing beta amyloid aggregation using fluorescence anisotropy: experiments and simulation. *Physical Chemistry Chemical Physics* **2018**, *20* (6), 4216-4225.
 159. Lelek, M.; Gyparaki, M. T.; Beliu, G.; Schueder, F.; Griffié, J.; Manley, S.; Jungmann, R.; Sauer, M.; Lakadamyali, M.; Zimmer, C., Single-molecule localization microscopy. *Nature Reviews Methods Primers* **2021**, *1* (1), 39.
 160. Orte, A.; Clarke, R.; Klenerman, D., Single-molecule two-colour coincidence detection to probe biomolecular associations. *Biochem Soc Trans* **2010**, *38* (4), 914-8.
 161. Kim, S. A.; Heinze, K. G.; Schwill, P., Fluorescence correlation spectroscopy in living cells. *Nat Methods* **2007**, *4* (11), 963-73.
 162. Elson, E. L., Chapter Two - Brief Introduction to Fluorescence Correlation Spectroscopy. In *Methods in Enzymology*, Tetin, S. Y., Ed. Academic Press: 2013; Vol. 518, pp 11-41.
 163. Elson, E. L., Fluorescence correlation spectroscopy: past, present, future. *Biophys J* **2011**, *101* (12), 2855-70.
-

2.1. Introducción

164. Novo, M.; Freire, S.; Al-Soufi, W., Critical aggregation concentration for the formation of early Amyloid- β (1–42) oligomers. *Scientific Reports* **2018**, *8* (1), 1783.
165. Paredes, J. M.; Casares, S.; Ruedas-Rama, M. J.; Fernandez, E.; Castello, F.; Varela, L.; Orte, A., Early amyloidogenic oligomerization studied through fluorescence lifetime correlation spectroscopy. *Int J Mol Sci* **2012**, *13* (8), 9400-9418.
166. Sahoo, B.; Drombosky, K. W.; Wetzel, R., Fluorescence Correlation Spectroscopy: A Tool to Study Protein Oligomerization and Aggregation In Vitro and In Vivo. *Methods Mol Biol* **2016**, *1345*, 67-87.
167. Trusova, V.; Tarabara, U.; Zhytniakivska, O.; Vus, K.; Gorbenko, G., Förster resonance energy transfer analysis of amyloid state of proteins. *BBA Adv* **2022**, *2*, 100059.
168. Jones, C. M.; Venkatesh, Y.; Petersson, E. J., Protein labeling for FRET with methoxycoumarin and acridonylalanine. *Methods Enzymol* **2020**, *639*, 37-69.
169. Orte, A.; Clarke, R. W.; Klenerman, D., Single-molecule fluorescence coincidence spectroscopy and its application to resonance energy transfer. *Chemphyschem* **2011**, *12* (3), 491-9.
170. Sekar, R. B.; Periasamy, A., Fluorescence resonance energy transfer (FRET) microscopy imaging of live cell protein localizations. *J Cell Biol* **2003**, *160* (5), 629-33.
171. Orte, A.; Clarke, R. W.; Klenerman, D., Fluorescence Coincidence Spectroscopy for Single-Molecule Fluorescence Resonance Energy-Transfer Measurements. *Analytical Chemistry* **2008**, *80* (22), 8389-8397.
172. Ishikawa-Ankerhold, H. C.; Ankerhold, R.; Drummen, G. P. C., Advanced Fluorescence Microscopy Techniques—FRAP, FLIP, FLAP, FRET and FLIM. *Molecules* **2012**, *17* (4), 4047-4132.
173. Zhytniakivska, O.; Kurutos, A.; Shchuka, M.; Vus, K.; Tarabara, U.; Trusova, V.; Gorbenko, G., Förster resonance energy transfer between Thioflavin T and unsymmetrical trimethine cyanine dyes on amyloid fibril scaffold. *Chemical Physics Letters* **2021**, *785*, 139127.
174. Gorbenko, G.; Zhytniakivska, O.; Vus, K.; Tarabara, U.; Trusova, V., Three-step Förster resonance energy transfer on an amyloid fibril scaffold. *Physical Chemistry Chemical Physics* **2021**, *23* (27), 14746-14754.
175. Clarke, R. W.; Orte, A.; Klenerman, D., Optimized threshold selection for single-molecule two-color fluorescence coincidence spectroscopy. *Anal Chem* **2007**, *79* (7), 2771-7.
176. Orte, A.; Birkett, N. R.; Clarke, R. W.; Devlin, G. L.; Dobson, C. M.; Klenerman, D., Direct characterization of amyloidogenic oligomers by single-molecule fluorescence. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2008**, *105* (38), 14424-14429.
177. Chiou, A.; Hägglöf, P.; Orte, A.; Chen, A. Y.; Dunne, P. D.; Belorgey, D.; Karlsson-Li, S.; Lomas, D. A.; Klenerman, D., Probing neuroserpin polymerization and interaction with amyloid-beta peptides using single molecule fluorescence. *Biophys J* **2009**, *97* (8), 2306-15.
178. Kaminski, C. F.; Kaminski Schierle, G. S., Probing amyloid protein aggregation with optical superresolution methods: from the test tube to models of disease. *Neurophotonics* **2016**, *3* (4), 041807.
179. Minsky, M., Memoir on inventing the confocal scanning microscope. *Scanning* **1988**, *10* (4), 128-138.
180. Elliott, A. D., Confocal Microscopy: Principles and Modern Practices. *Curr Protoc Cytom* **2020**, *92* (1), e68.
181. Vesely, P., Handbook of Biological Confocal Microscopy, 3rd ed. By James B. Pawley, Editor. Springer Science + Business Media, LLC, New York (2006). ISBN 10: 0-387-25921-X; ISBN 13: 987-0387-25921-5; hardback; 28 + 985 pages. *Scanning* **2007**, *29* (3), 91-91.
182. Davidovits, P.; Egger, M. D., Scanning Laser Microscope. *Nature* **1969**, *223* (5208), 831-831.
-

2.1. Introducción

183. Davidovits, P.; Egger, M. D., Scanning Laser Microscope for Biological Investigations. *Appl. Opt.* **1971**, *10* (7), 1615-1619.
184. Shaw, P. A.; Forsyth, E.; Haseeb, F.; Yang, S.; Bradley, M.; Klausen, M., Two-Photon Absorption: An Open Door to the NIR-II Biological Window? *Front Chem* **2022**, *10*, 921354.
185. Helmchen, F.; Denk, W., Deep tissue two-photon microscopy. *Nature Methods* **2005**, *2* (12), 932-940.
186. Datta, R.; Heaster, T. M.; Sharick, J. T.; Gillette, A. A.; Skala, M. C., Fluorescence lifetime imaging microscopy: fundamentals and advances in instrumentation, analysis, and applications. *J Biomed Opt* **2020**, *25* (7), 1-43.
187. Laine, R. F.; Sinnige, T.; Ma, K. Y.; Haack, A. J.; Poudel, C.; Gaida, P.; Curry, N.; Perni, M.; Nollen, E. A. A.; Dobson, C. M.; Vendruscolo, M.; Kaminski Schierle, G. S.; Kaminski, C. F., Fast Fluorescence Lifetime Imaging Reveals the Aggregation Processes of α -Synuclein and Polyglutamine in Aging *Caenorhabditis elegans*. *ACS Chem Biol* **2019**, *14* (7), 1628-1636.
188. Castello, F.; Casares, S.; Ruedas-Rama, M. J.; Orte, A., The First Step of Amyloidogenic Aggregation. *J Phys Chem B* **2015**, *119* (26), 8260-7.
189. Shashkova, S.; Leake, M. C., Single-molecule fluorescence microscopy review: shedding new light on old problems. *Biosci. Rep.* **2017**, *37* (4), BSR20170031.
190. Gordon, M. P.; Ha, T.; Selvin, P. R., Single-molecule high-resolution imaging with photobleaching. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2004**, *101* (17), 6462-5.
191. Axelrod, D., Cell-substrate contacts illuminated by total internal reflection fluorescence. *J Cell Biol* **1981**, *89* (1), 141-5.
192. Rust, M. J.; Bates, M.; Zhuang, X., Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM). *Nat Methods* **2006**, *3* (10), 793-5.
193. Betzig, E.; Patterson, G. H.; Sougrat, R.; Lindwasser, O. W.; Olenych, S.; Bonifacino, J. S.; Davidson, M. W.; Lippincott-Schwartz, J.; Hess, H. F., Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution. *Science* **2006**, *313* (5793), 1642-5.
194. Lu, M.; Kaminski, C. F.; Schierle, G. S. K., Advanced fluorescence imaging of in situ protein aggregation. *Physical Biology* **2020**, *17* (2), 021001.
195. Heilemann, M.; van de Linde, S.; Schüttpelz, M.; Kasper, R.; Seefeldt, B.; Mukherjee, A.; Tinnefeld, P.; Sauer, M., Subdiffraction-Resolution Fluorescence Imaging with Conventional Fluorescent Probes. *Angewandte Chemie International Edition* **2008**, *47* (33), 6172-6176.
196. Pinotsi, D.; Kaminski Schierle, G. S.; Kaminski, C. F., Optical Super-Resolution Imaging of β -Amyloid Aggregation In Vitro and In Vivo: Method and Techniques. *Methods Mol Biol* **2016**, *1303*, 125-41.
197. Gustafsson, M. G., Surpassing the lateral resolution limit by a factor of two using structured illumination microscopy. *J Microsc* **2000**, *198* (Pt 2), 82-7.
198. Kim, Y.-H.; So, P. T. C., Three-dimensional wide-field pump-probe structured illumination microscopy. *Opt. Express* **2017**, *25* (7), 7369-7391.
199. Ball, G.; Demmerle, J.; Kaufmann, R.; Davis, I.; Dobbie, I. M.; Schermelleh, L., SIMcheck: a Toolbox for Successful Super-resolution Structured Illumination Microscopy. *Sci Rep* **2015**, *5*, 15915.
200. Hell, S. W.; Wichmann, J., Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy. *Opt. Lett.* **1994**, *19* (11), 780-782.
201. Johansson, B.; Oasa, S.; Muntsant Soria, A.; Tiiman, A.; Söderberg, L.; Amandius, E.; Möller, C.; Lannfelt, L.; Terenius, L.; Giménez-Llort, L.; Vukojević, V., The interwoven fibril-like structure of amyloid-beta plaques in mouse brain tissue visualized using super-resolution STED microscopy. *Cell & Bioscience* **2023**, *13* (1), 142.
-

2.2. Objetivos

2.2. Objetivos del Bloque II

2.2.1. Objetivo general

Estudiar los procesos de agregación amiloide y su citotoxicidad mediante diferentes técnicas espectroscópicas y de microscopía de fluorescencia.

2.2.2. Objetivos específicos

1. Evaluar mediante cribado los compuestos fluorescentes de quinolimida que pueden actuar como posibles indicadores de agregación proteica de la apoferritina.
2. Estudiar el proceso de agregación de la apoferritina con el compuesto fluorescente seleccionado mediante microscopía de fluorescencia convencional y FLIM.
3. Seleccionar el par FRET de fluoróforos más adecuado para estudiar el proceso de agregación de la apoferritina.
4. Estudiar el proceso de agregación de la apoferritina con el par de fluoróforos seleccionado mediante microscopía de fluorescencia convencional y FLIM.
5. Obtener y comparar imágenes de superresolución STED y de microscopía de fluorescencia convencional de fibras maduras de apoferritina.
6. Estudiar la interacción y el efecto citotóxico de agregados de A β con la membrana celular mediante microscopía FLIM.
7. Evaluar el estrés celular generado por agregados de A β en células neuronales con una sonda de biotioles mediante microscopía FLIM.

2.3. Resultados

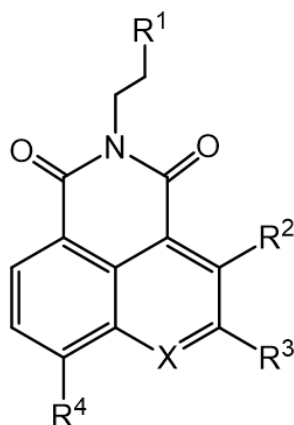
2.3. Resultados Bloque II


Con el fin de estudiar los procesos de agregación amiloide implicados en el desarrollo de las enfermedades neurodegenerativas, hemos realizado varios estudios centrados tanto en los procesos de amiloidogénesis de la proteína apoferritina (APO) como del péptido β -amiloide (A β) mediante diferentes técnicas espectroscópicas y de microscopía de fluorescencia.

2.3.1. Cribado de compuestos fluorescentes de quinolimida como indicadores de agregación proteica

La APO es una proteína que se puede utilizar como modelo de la agregación amiloide, ya que bajo las condiciones adecuadas puede sufrir el proceso de agregación desde su estado monomérico hasta la formación de fibras maduras.^{1,2} Con el fin de estudiar este proceso, probamos diferentes fluoróforos solvatocrómicos derivados de quinolimida y naftalimida previamente desarrollados en el grupo de la Dr. Rosario Herranz del Instituto de Química Médica (IQM-CSIC) de Madrid,³ para ver si podían funcionar como sensores de la agregación amiloide de la APO, ya que estos fluoróforos cambian sus propiedades fotofísicas dependiendo de la polaridad del medio en el que se encuentren (Figura II.19).³⁻⁵ De esta forma, estos compuestos cuya emisión fluorescente en H₂O es insignificante, podrían incrementar significativamente su señal fluorescente y experimentar un desplazamiento hipsocrómico de su emisión si interaccionasen con los ambientes hidrofóbicos de la APO. Asimismo, la hidrofobicidad de las estructuras amiloides detectadas debería aumentar conforme lo hace el grado de agregación de la APO, por lo que tanto la señal fluorescente emitida por la quinolimida como su desplazamiento espectral de emisión deberían ser mayores cuanto mayor fuera el grado de agregación proteica, pudiendo actuar así como sensores de agregación. Para el cribado de los compuestos seleccionados, primero obtuvimos los espectros de emisión de fluorescencia de los diferentes fluoróforos (5 μ M) en disolución acuosa a pH 2 con y sin alícuotas de APO (30 μ M) previamente calentada a 90°C e incubada durante 24 h (Figura II.20), ya que estas son las condiciones establecidas para la agregación de la proteína que permiten la formación de fibras amiloides, tal y como se puede ver en las imágenes de microscopía electrónica de transmisión (TEM, por sus siglas en inglés *Transmission Electron Microscopy*) (Figura II.22).^{1,2}

2.3. Resultados



AQui: X = N; R¹ = CH₃; R² = H; R³ = H; R⁴ = N 

II.1: X = N; R¹ = CH₃; R² = H; R³ = H; R⁴ = OMe

II.2: X = N; R¹ = OH; R² = PO(OEt)₂; R³ = Cl; R⁴ = OMe

II.3: X = N; R¹ = CH₃; R² = H; R³ = H; R⁴ = NH₂

II.4: X = N; R¹ = CH₃; R² = H; R³ = H; R⁴ = NHnBu

II.5: X = CH; R¹ = N(CH₃)₂; R² = H; R³ = H; R⁴ = N(CH₂)₂OH

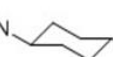

II.6: X = CH; R¹ = N(CH₃)₂; R² = H; R³ = H; R⁴ = HN  NH 

Figura II.19. Estructura de **AQui** y los compuestos **II.1-II.6**.

Los resultados del cribado de las 9-metoxi-quinolimidias **II.1** y **II.2**,³ las 9-amino-quinolimidias **II.3**, **II.4**⁴ y **AQui**, y las 6-amino-naftalimidias **II.5** y **II.6**⁶ se muestran en la Figura II.20. Los compuestos **II.2**, **II.5** y **II.6** mostraron un insignificante aumento de su emisión fluorescente en presencia de la APO, por lo que no se pudieron considerar como candidatos a sensores de la agregación proteica. Por otra parte, los compuestos **II.1**, **II.3** y **II.4** mostraron un mayor aumento de la emisión fluorescente que los anteriores en presencia de APO. Sin embargo, el compuesto **AQui** (9-azetidínil-quinolimida) fue el que mostró el mayor aumento de la emisión fluorescente en presencia de APO, por lo que fue seleccionado como sensor de agregación proteica.⁷

2.3. Resultados

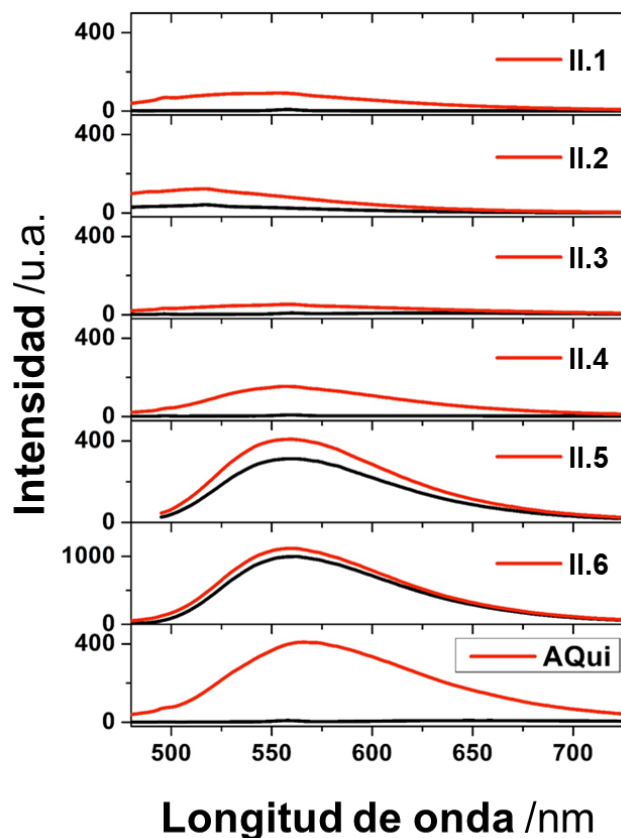


Figura II.20. Espectros de emisión ($\lambda_{\text{ex}} = 485 \text{ nm}$) de las quinolimidias II.1- II.4 y AQui, y de las naftalimidias II.5 y II.6, en H_2O a pH 2 (línea negra) y tras la interacción con APO ($30 \mu\text{M}$) incubada durante 24 h en condiciones amiloidogénicas (línea roja).

El aumento de la intensidad de fluorescencia experimentado por los compuestos estudiados tras su interacción con APO medido a la λ_{em} máxima se muestra en la Figura II.21.

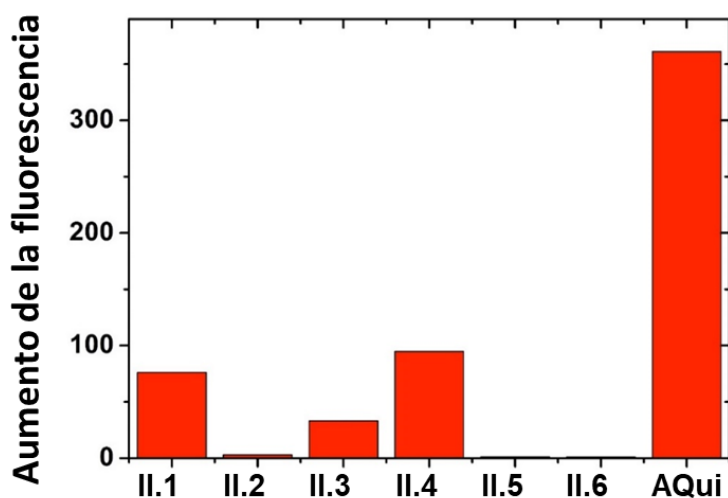


Figura II.21. Aumento de la intensidad de fluorescencia de los compuestos estudiados tras la interacción con APO ($30 \mu\text{M}$) incubada durante 24 h, medida a la λ_{em} máxima de los compuestos II.1- II.6 y AQui.

2.3. Resultados

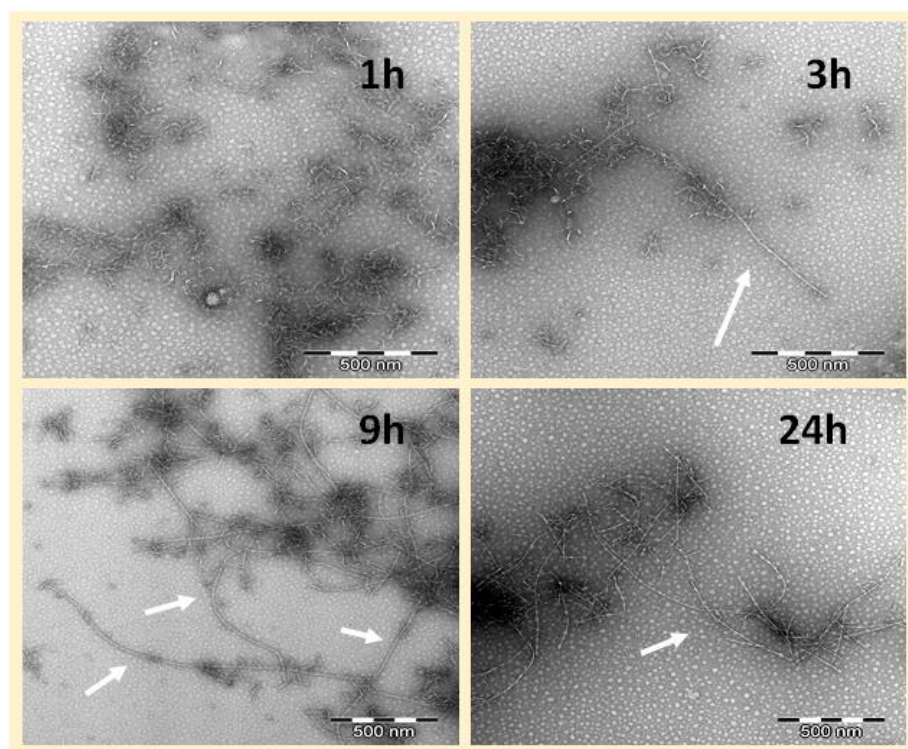


Figura II.22. Imágenes de TEM de muestras de APO en ausencia de fluoróforos, incubadas durante 1, 3, 9 y 24 h, donde se evidencian las diferentes etapas de agregación proteica. Las imágenes de muestras de APO incubadas a 3, 9 y 24 h muestran la formación de fibras maduras (indicadas por flechas blancas). La barra de escala representa 500 nm.

2.3.2. Ensayo con **AQui** para el estudio de la agregación de APO

La 9-azetidil-quinolimida **AQui** fue la elegida para el estudio de la agregación de la APO debido a que resultó ser el compuesto que presentó un mayor contraste en la detección de la proteína, mostrando un gran aumento de la fluorescencia tras interactuar con ella. Además, este compuesto ha sido empleado con anterioridad en el estudio de la agregación del A β mediante microscopía FLIM debido a sus altos valores de τ_F en ambientes hidrofóbicos.⁴ Por ello decidimos emplear la microscopía FLIM multiparamétrica de dos colores, con el objetivo de analizar posibles cambios en los parámetros de **AQui** que permitiesen distinguir los diferentes grados de agregación proteica de la APO. Debido a que este fluoróforo solvatocrómico experimenta tanto un incremento de su intensidad como un desplazamiento hipsocrómico en ambientes hidrofóbicos,⁴ primero realizamos un análisis ratiométrico del cociente de las

2.3. Resultados

intensidades de emisión fluorescentes detectadas en dos canales diferentes correspondientes a dos regiones diferentes del espectro electromagnético visible (el color rojo y el verde) de las imágenes de microscopía obtenidas de alícuotas de APO incubadas durante diferentes tiempos de agregación a las que se le añadió **AQui**. La intensidad fluorescente de **AQui** detectada en el canal verde se denominó I_G , utilizando para su adquisición un filtro paso banda 550/40. Asimismo, la intensidad de fluorescencia de **AQui** detectada en el canal rojo se denominó I_R , y se utilizó para ello un filtro paso banda 670/70. De esta forma **AQui** debería presentar valores del cociente I_G/I_R mayores cuanto mayor fuera el grado de agregación de la APO. Un mayor grado de agregación proteica supondría una mayor hidrofobicidad que cambiaría la polaridad del ambiente de emisión de **AQui**, aumentando así su emisión fluorescente y desplazándola hacia el verde. La Figura II.23 muestra las imágenes ratiométricas de muestras de APO (30 μM) incubadas a diferentes tiempos (1,3,9 y 24 h) a las que se le añadió el compuesto **AQui** (10 μM) para que interaccionara. Estas imágenes se obtuvieron al dividir los valores de intensidad de las imágenes de **AQui** detectados en el canal verde entre los valores de intensidad de las imágenes de **AQui** detectados en el canal rojo. En las imágenes, los valores del parámetro ratiométrico I_G/I_R varían desde 0 hasta 3.9, y están representados por una escala de color arbitraria. Asimismo, también se muestran las distribuciones de frecuencia de los valores de la relación I_G/I_R de los píxeles de las diferentes imágenes analizadas correspondientes a agregados de APO. Contrariamente a lo esperado, en las imágenes ratiométricas analizadas no se apreciaron cambios significativos conforme aumentaba el tiempo de agregación de la APO que permitieran diferenciar distintos grados de agregación proteica. De la misma manera, los histogramas de frecuencia de la relación I_G/I_R tampoco mostraron cambios heterogéneos entre los distintos tiempos de incubación de la APO.

2.3. Resultados

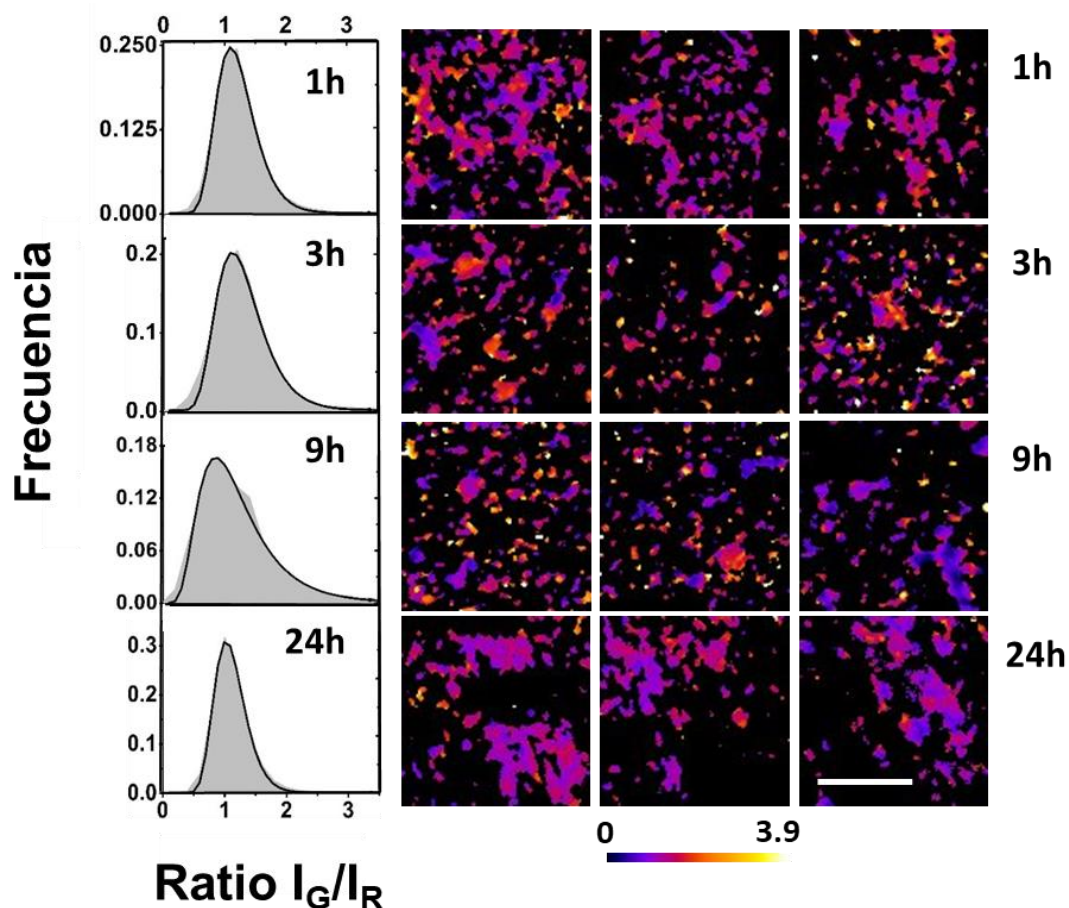


Figura II.23. Imágenes ratiométricas de agregados de APO incubados durante diferentes tiempos (1, 3, 9 y 24 h) a los que se añadió el fluoróforo **AQui**. La barra de escala representa $5 \mu\text{m}$ y el tamaño de cada imagen es igual en todas las imágenes. También se muestran las distribuciones de frecuencia de la relación I_G / I_R de los agregados detectados, promediados sobre al menos 14 imágenes diferentes. Las distribuciones de frecuencia (gris) se ajustaron a una función log-normal (curva negra).

Por otra parte, llevamos a cabo el análisis de los τ_F de las imágenes de **AQui** interaccionando con las muestras de APO obtenidas mediante microscopía FLIM, ya que teóricamente este parámetro también debería cambiar dependiendo de la polaridad del ambiente en el que se encuentra **AQui**, pudiendo diferenciar de esta manera entre los distintos grados de agregación de la APO. La Figura II.24 muestra las imágenes de los τ_F de **AQui** ($10 \mu\text{M}$) interaccionando con muestras de APO ($30 \mu\text{M}$) incubadas a diferentes tiempos (1, 3, 9 y 24 h). En las imágenes, los valores de τ_F varían desde 0 hasta 8.5 ns , y están representados por una escala de color arbitraria. También se muestran las distribuciones de frecuencia de los valores de los τ_F de los píxeles de las diferentes imágenes analizadas correspondientes a agregados de APO. En este caso ni las imágenes de los τ_F de **AQui** ni las distribuciones de frecuencia de los τ_F

2.3. Resultados

mostraron cambios coherentes que permitiesen realizar el seguimiento efectivo de la agregación de la APO. A pesar de que en las imágenes e histograma de las muestras de APO incubadas durante 24 h el τ_F es mayor que en el resto de muestras analizadas, el τ_F de las imágenes e histograma de las muestras de APO incubadas durante 9 h presenta el valor más pequeño, lo que resulta incongruente. Por tanto, no pudimos utilizar **AQui** como único fluoróforo para el estudio de la agregación amiloide de APO.

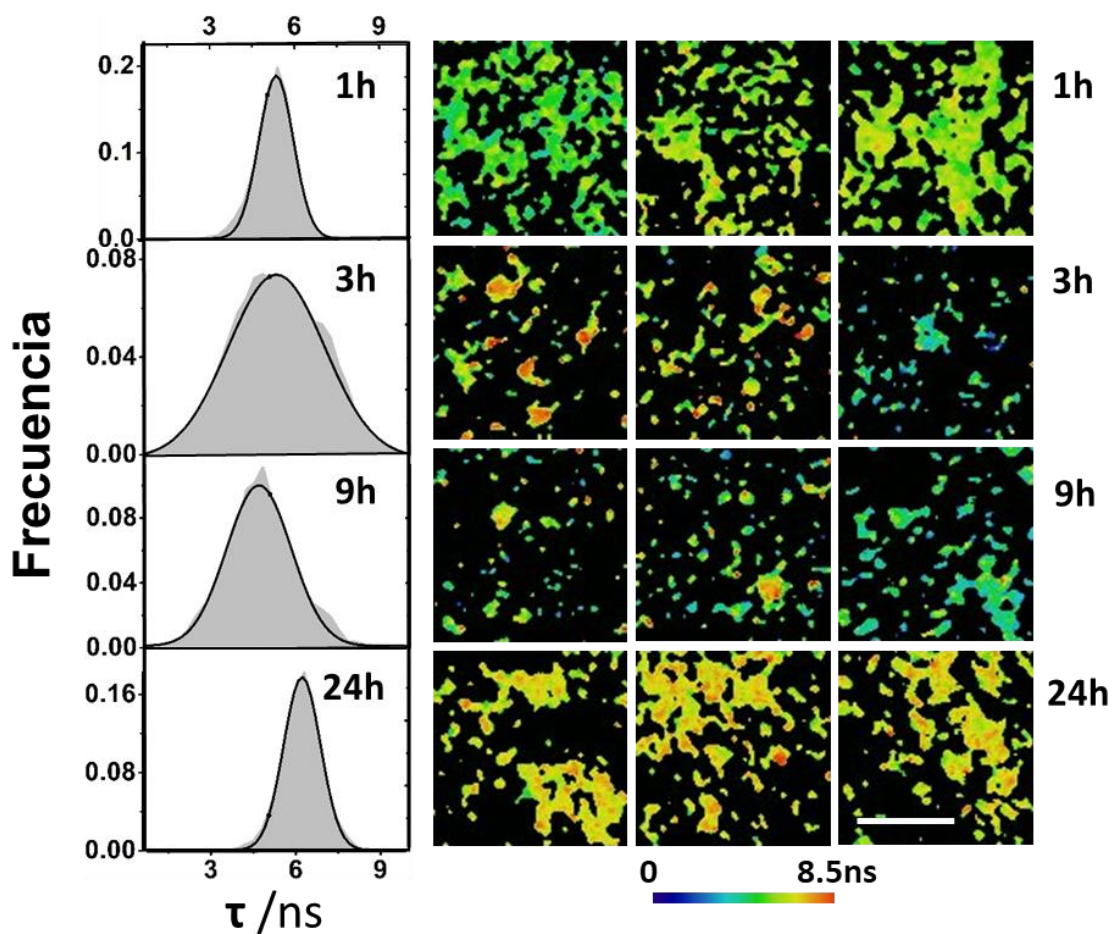


Figura II.24. Imágenes FLIM de agregados de Apo incubados durante diferentes tiempos (1, 3, 9 y 24 h) a los que se añadió el fluoróforo **AQui**. La barra de escala representa 5 μm y el tamaño de cada imagen es igual en todas las imágenes. También se muestran las distribuciones de frecuencia de los τ_F de **AQui** en los agregados detectados, promediados sobre al menos 14 imágenes diferentes. Las distribuciones de frecuencia (gris) se ajustaron a una función gaussiana (curva negra).

2.3.3. Ensayo de pares FRET para el estudio de agregación de la APO

Una vez comprobado que la 9-amino-quinolimida **AQui** era la candidata más sensible para la detección de APO, pero que sólo no era capaz de realizar un seguimiento sensible del proceso de agregación mediante técnicas de microscopía avanzada, decidimos realizar un cambio de estrategia para mejorar dicha detección de los agregados y el contraste de las imágenes obtenidas. Para ello investigamos la posibilidad de obtener un par de fluoróforos que fueran capaces tanto de interactuar con la APO como de seguir el proceso completo de agregación proteica a través del análisis de la FRET producida entre ellos en los diferentes estadios de agregación haciendo uso de la microscopía FLIM multiparamétrica (Figura II.25). De esta manera podríamos obtener una detección ratiométrica más sensible debido a que la FRET provoca simultáneamente una disminución en la emisión fluorescente del dador y un aumento en la emisión sensibilizada del aceptor. Adicionalmente podríamos aumentar la sensibilidad de la microscopía FLIM en la detección de los agregados de APO si la FRET producida entre el fluoróforo dador y el aceptor disminuyera el τ_F del dador conforme aumentara el grado de agregación de la APO.

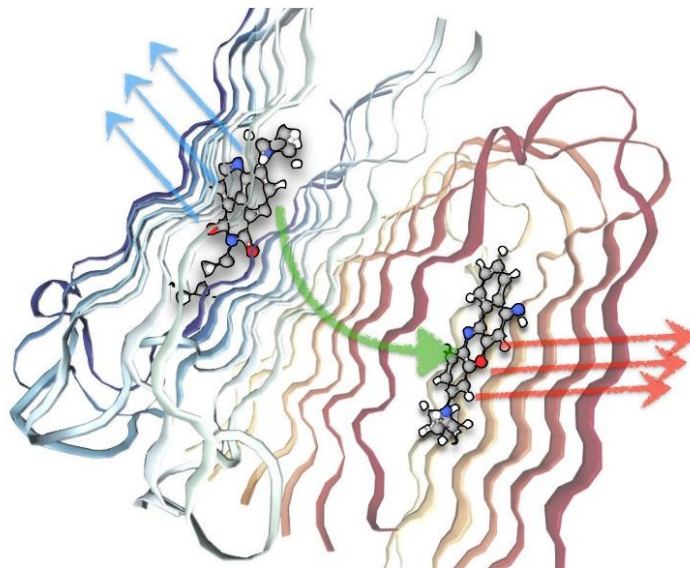


Figura II.25. Concepto de par FRET de fluoróforos dentro de un agregado proteico para mejorar el contraste de la técnica FLIM multiparamétrica mediante el cual el fluoróforo dador transfiere parte de su energía al fluoróforo aceptor.

Con este objetivo llevamos a cabo un proceso de optimización en el cual probamos diferentes pares de fluoróforos que, de acuerdo a su superposición espectral, podrían constituir un par FRET adecuado para el estudio de la agregación de la APO. De esta

2.3. Resultados

manera elegimos dos posibles pares FRET de fluoróforos basándonos tanto en el solapamiento espectral existente entre ellos como en su capacidad para detectar e interactuar con los agregados amiloides. En el primer par elegido establecimos la **ThT** como fluoróforo dador de energía, ya que como se explica en la Introducción del Bloque II es un conocido fluoróforo de unión a fibrillas amiloides,⁸ y **AQui** como aceptor. En el segundo par elegido consideramos a **AQui** como fluoróforo dador, y al fluoróforo comercial Nile Blue A (**NBA**, Figura II.26), un compuesto que también se sabe que se une a biomoléculas,⁹ como aceptor.

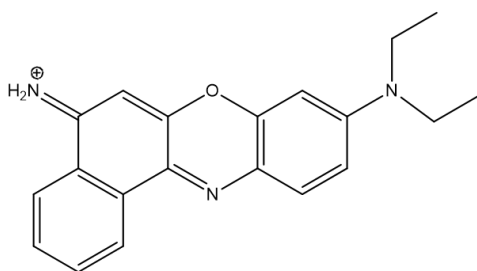


Figura II.26. Estructura del compuesto **NBA**.

En la Figura II.27 se muestran los espectros de absorción y de emisión de los fluoróforos **ThT**, **AQui** y **NBA**. Así, se puede comprobar como existe un solapamiento entre el espectro de emisión de la **ThT** y el espectro de absorción de **AQui**, y entre el espectro de emisión de **AQui** y el espectro de absorción del **NBA**.

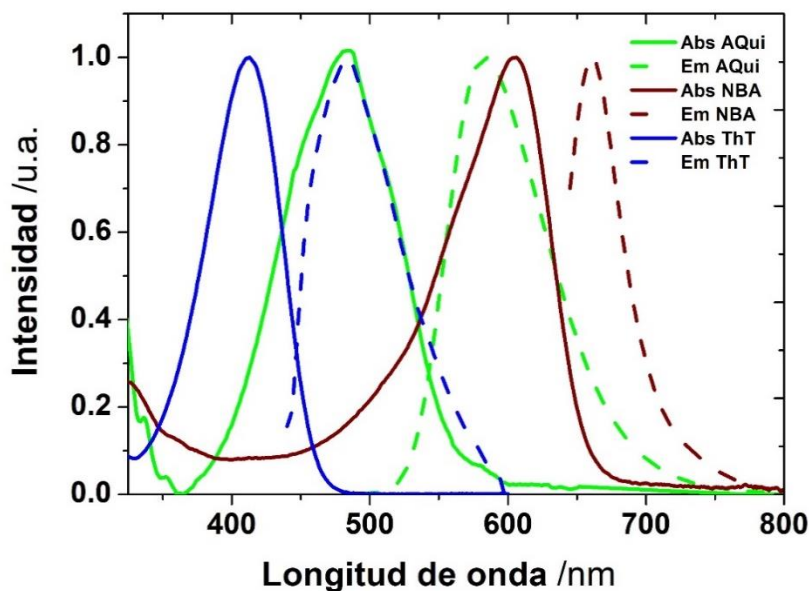


Figura II.27. Espectros de absorción (líneas continuas) y de emisión (líneas discontinuas) de la **ThT** (líneas azules, $\lambda_{\text{ex}} = 400$ nm; reproducido de PhotochemCAD3)¹⁰, **AQui** (líneas verdes, $\lambda_{\text{ex}} = 485$ nm) y **NBA** (líneas marrones, $\lambda_{\text{ex}} = 635$ nm).

2.3. Resultados

Con respecto al primer par FRET de fluoróforos diseñado **ThT** → **AQui**, en la Figura II.28 se muestran tanto los espectros de emisión ($\lambda_{ex} = 470$ nm) de los fluoróforos implicados por separado (realizados como controles para comprobar que la interacción de los fluoróforos con la proteína no interfiere en la señal de emisión fluorescente de los compuestos), como de la APO incubada durante 9 h sola (realizado como control para comprobar que no es fluorescente y que, por tanto, no interfiere en la señal de emisión de los fluoróforos), así como los espectros de los fluoróforos con la adición de APO por separado o mezclados. De esta manera observamos que tanto las emisiones de la **ThT** y de **AQui** por separado como las emisiones de la APO incubada a 9 h sola y junto con la **ThT** son insignificantes respecto a las emisiones de la APO con **AQui** y de la APO con el par **ThT:AQui**. Esto puede deberse a que **AQui** es un compuesto solvatocrómico no fluorescente en disoluciones acuosas, la **ThT** es un rotor molecular que tampoco es fluorescente en disoluciones acuosas, la APO no es una proteína fluorescente y a que, además, la **ThT** no se une a los agregados de APO formados tras 9 h de incubación. También observamos que en el espectro de emisión de la muestra que contenía la APO incubada durante 9 h y ambos fluoróforos no se producía una disminución en la señal fluorescente de la **ThT** (fluoróforo dador) concomitante con un aumento de la señal fluorescente de **AQui** (fluoróforo aceptor) respecto de los espectros de emisión de los fluoróforos con proteína por separado, lo que nos podría indicar que no se producía una FRET efectiva.

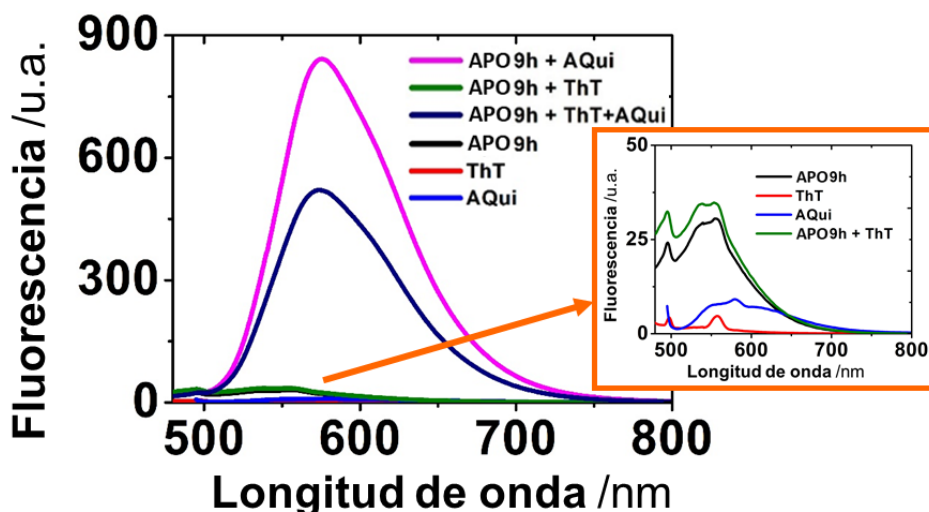


Figura II.28. Espectros de emisión de fluorescencia de **AQui** (10 μ M, línea azul), **ThT** (10 μ M, línea roja) y de las muestras de APO (30 μ M) en disolución acuosa incubada durante 9 h a pH=2 sola (línea negra), junto con la **ThT** (10 μ M, línea verde) y con **AQui** (10 μ M, línea rosa) por separado y con el par **ThT:AQui** a una concentración 1:1 (10 μ M de cada fluoróforo, línea añil). Todos los espectros se registraron a $\lambda_{ex} = 470$ nm.

2.3. Resultados

Asimismo, la Figura II.29 muestra los espectros de emisión ($\lambda_{ex} = 440$ nm) de muestras de APO (30 μ M) incubadas a diferentes tiempos (1, 3, 9 y 24 h) con el par **ThT:AQui** a una concentración equimolar 1:1 (10 μ M). Contrariamente a lo esperado, no se encontró un aumento claro en la FRET conforme avanzaba el tiempo de incubación de la proteína, ya que no se produjo una disminución coherente en la señal fluorescente del **ThT** acompañada con un aumento de la señal fluorescente de **AQui**, pese a que sí se observó una disminución en la señal fluorescente de los espectros de las muestras de APO incubadas a 3, 9 y 24 h respecto de la muestra de APO incubada durante 1 h.

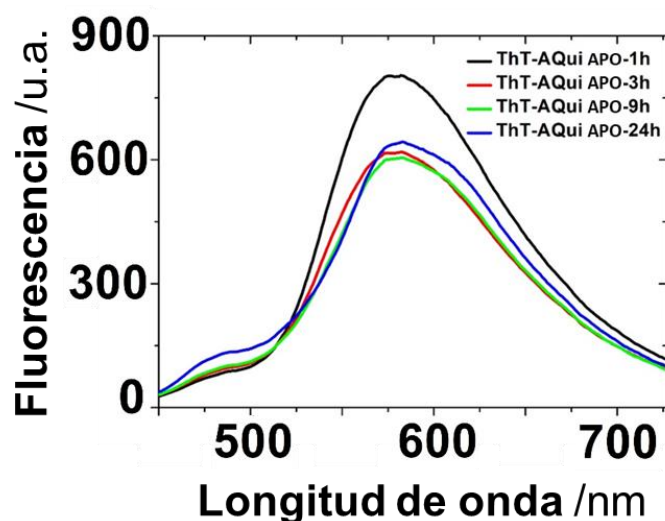


Figura II.29. Espectros de emisión de fluorescencia de las muestras con la APO (30 μ M) en disolución acuosa incubadas a diferentes tiempos (1, 3, 9 y 24 h) a pH=2 a las que se le añadió el par **ThT:AQui** a una concentración 1:1 (10 μ M de cada fluoróforo). Todos los espectros se registraron a $\lambda_{ex} = 440$ nm.

Por otro lado, en la Figura II.30 se pueden ver los valores de las relaciones de intensidad de fluorescencia I_{570}/I_{480} (ya que 570 nm es el máximo de emisión de **AQui** y 480 nm es el máximo de emisión de la **ThT**) de los espectros de emisión de muestras de APO incubadas a diferentes tiempos (1, 3, 9 y 24 h) con el par **ThT:AQui**. Observamos entonces una disminución en los valores de la relación I_{570}/I_{480} conforme aumentaba el tiempo de incubación de la proteína. Esto indicaba que no se producía un aumento en la intensidad de emisión del fluoróforo aceptor concomitante con una disminución de la señal fluorescente del fluoróforo dador conforme mayor era el tiempo de incubación de la APO, y que por tanto no se producía una FRET efectiva entre ambos fluoróforos.

2.3. Resultados

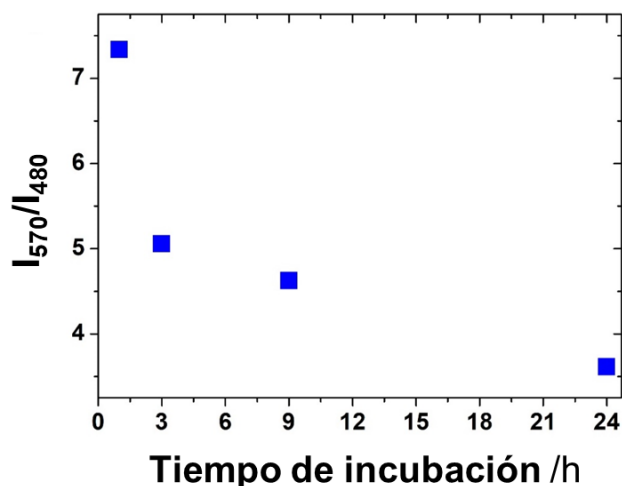


Figura II.30. Relación I_{570}/I_{480} de los espectros de emisión de las muestras de APO incubadas a diferentes tiempos (1, 3, 9 y 24 h) a las que se les añadió el par FRET **ThT:AQui**.

Por todos estos resultados concluimos que el par **ThT:AQui** no se podía utilizar para estudiar el proceso de agregación de la APO. Esto podía deberse al hecho de que la **ThT** sólo se une a fibrillas y fibras amiloides maduras formadas en los mayores tiempos de agregación, mientras que **AQui** se une tanto a fibrillas maduras como a los agregados formados en estadios más tempranos. Por consiguiente, la saturación de los sitios de unión con **AQui** durante el crecimiento de la fibrilla puede impedir la posterior unión de **ThT**, por lo que los cambios espectrales resultan muy pequeños. Decidimos entonces realizar los mismos ensayos con el par FRET **AQui** → **NBA**. En la Figura II.31 se muestra tanto los espectros de emisión de la APO incubada durante 9 h con la adición de **AQui** y de **NBA** por separado, como el de la APO incubada durante 9 h con la adición del par **AQui** → **NBA**, así como el espectro de emisión de **AQui** sola.

2.3. Resultados

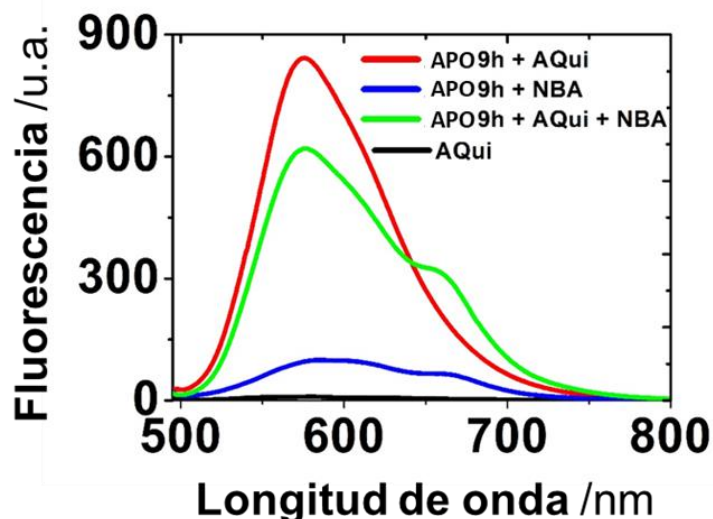


Figura II.31. Espectros de emisión de fluorescencia de **AQui** (10 μM , línea negra) y de las muestras de APO (30 μM) en disolución acuosa incubada durante 9 h a $\text{pH}=2$ junto con **AQui** (10 μM , línea roja) y con **NBA** (10 μM , línea azul) por separado y con el par **AQui:NBA** a una concentración 1:1 (10 μM de cada fluoróforo, línea verde). Todos los espectros se registraron a $\lambda_{\text{ex}} = 470 \text{ nm}$.

De esta manera observamos que en el espectro de emisión correspondiente a la muestra de APO (30 μM) incubada durante 9 h que contenía el par **AQui:NBA** (línea verde) se producía tanto una disminución de la señal fluorescente en el máximo de emisión de **AQui** (570 nm) respecto del espectro de la muestra de APO con **AQui** sola (línea roja), como un aumento de la señal fluorescente en el máximo de emisión del **NBA** (660 nm) respecto del espectro de la muestra de APO con **NBA** solo (línea azul). Estos resultados podrían indicar que se estaba produciendo una FRET efectiva en el par **AQui** \rightarrow **NBA**. Asimismo, la Figura II.32 muestra los espectros de emisión ($\lambda_{\text{ex}} = 485 \text{ nm}$) de muestras de APO (30 μM) incubadas a diferentes tiempos (1, 3, 9 y 24 h) con el par **AQui:NBA** a una concentración equimolar 1:1 (10 μM).

2.3. Resultados

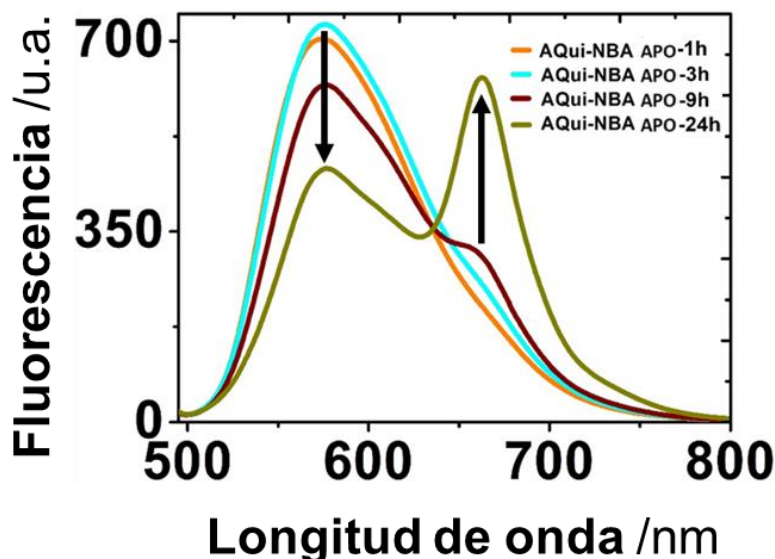


Figura II.32. Espectros de emisión de fluorescencia de las muestras con la APO (30 μM) en disolución acuosa incubadas a diferentes tiempos (1, 3, 9 y 24 h) a pH=2 a las que se le añadió el par **AQui:NBA** a una concentración 1:1 (10 μM de cada fluoróforo). Las flechas negras indican tiempos de incubación crecientes. Todos los espectros se registraron a $\lambda_{\text{ex}} = 485 \text{ nm}$.

En este caso pudimos apreciar que conforme iba aumentando el tiempo de incubación de la proteína se producía un decrecimiento de la señal fluorescente a 570 nm correspondiente a la emisión de **AQui** en conjunción con un aumento de la emisión a 660 nm correspondiente a la señal del **NBA**. Para confirmar que se estaba produciendo un proceso de FRET efectiva entre el par **AQui** \rightarrow **NBA** y que este aumentaba conforme lo hacía el tiempo de incubación de la APO, llevamos a cabo el análisis de los valores de las relaciones de intensidad de fluorescencia I_{660}/I_{570} (ya que 660 nm es el máximo de emisión del **NBA** y 570 nm es el máximo de emisión de **AQui**) de los espectros de emisión de las muestras de APO incubadas a diferentes tiempos con el par **AQui:NBA** (Figura II.33). De esta manera observamos un aumento en los valores de la relación I_{660}/I_{570} conforme aumentaba el tiempo de incubación de la proteína, lo que indicaba que se producía tanto un aumento en la intensidad de emisión del **NBA** (fluoróforo aceptor) como una disminución de la señal fluorescente de **AQui** (fluoróforo dador). Estos resultados confirmaron que se producía una FRET efectiva entre ambos fluoróforos, y que esta era mayor cuanto mayor era el grado de agregación de la APO. Por tanto, confirmamos que el par **AQui** \rightarrow **NBA** era adecuado para seguir el proceso de agregación de la proteína.

2.3. Resultados

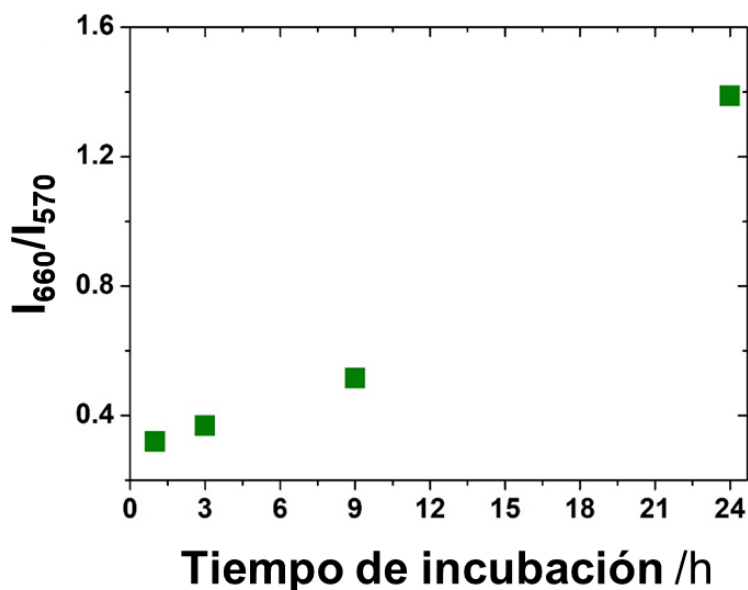


Figura II.33. Relación I_{660}/I_{570} de los espectros de emisión de las muestras de APO incubadas a diferentes tiempos (1, 3, 9 y 24 h) a las que se les añadió el par FRET **AQui:NBA**.

Paralelamente, la existencia de la FRET también puede verificarse inequívocamente midiendo el τ_F del fluoróforo dador, ya que la transferencia de energía da como resultado una dinámica de desactivación más rápida y, por lo tanto, valores de τ_F más cortos. En la Figura II.34 se muestran los valores medios de τ_F de muestras de APO (30 μM) incubadas a diferentes tiempos de agregación (1, 3, 9 y 24 h) a las que se añadieron **AQui** (10 μM), **NBA** (10 μM) y el par **AQui:NBA** (mezcla equimolar de 10 μM para cada fluoróforo), además de los τ_F de muestras de APO en ausencia de fluoróforos tomados como control. De esta manera pudimos confirmar la disminución en el τ_F de **AQui** conforme avanzaba el tiempo de incubación de la proteína cuando se añadía también el fluoróforo **NBA**. Es importante destacar que esta disminución en los valores de los τ_F de **AQui** con el tiempo de incubación indica mayores grados en la eficiencia de la FRET, y podría monitorizarse utilizando técnicas de fluorescencia resueltas en el tiempo como la microscopía FLIM. Por el contrario, con **AQui** sólo en ausencia de **NBA**, no se detectaron cambios significativos en el τ_F de **AQui** tras la agregación de APO, por lo que no se puede utilizar como fluoróforo único en el estudio de agregación de la proteína como ya se ha mostrado en la sección 2.4.2.

2.3. Resultados

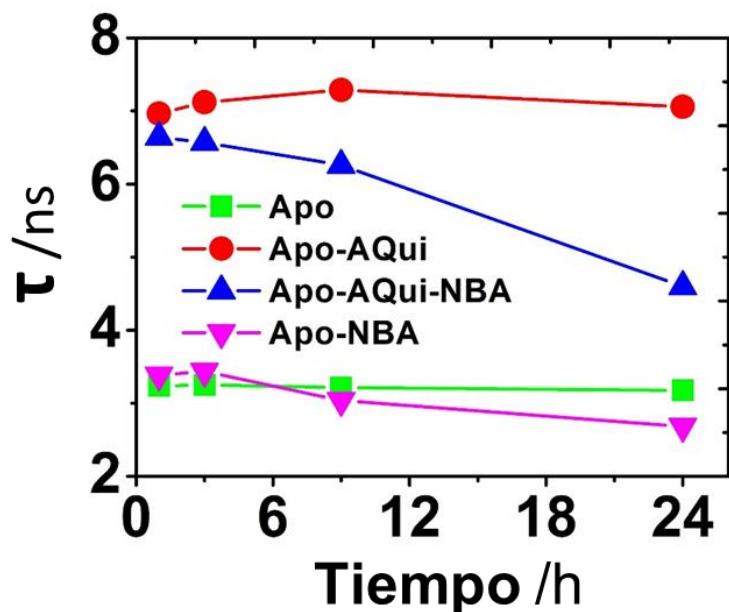


Figura II.34. Valores medios de τ_f (recogidos a $\lambda_{em} = 662$ nm con $\lambda_{ex} = 485$ nm) de muestras de APO (30 μ M) incubadas a diferentes tiempos de agregación (1, 3, 9 y 24 h) a las que se añadieron **AQui** (10 μ M, círculos rojos), **AQui** y **NBA** (mezcla 1:1 de 10 μ M para cada fluoróforo, triángulos azules), **NBA** (10 μ M, triángulos invertidos violetas) y en ausencia de fluoróforos tomados como control (cuadrados verdes).

Para verificar que la agregación de la APO se llevó a cabo en su totalidad hasta la formación de fibras maduras sin que los fluoróforos interfiriesen en su formación, se obtuvieron imágenes de TEM de alícuotas de muestras de APO incubadas a distintos tiempos (1, 9 y 24 h) a las que se añadieron los fluoróforos **AQui** y **NBA** en el momento de montar la rejilla de TEM (Figura II.35). Estas imágenes mostraron la formación de fibrillas amiloides largas y rectas en las muestras de APO incubadas durante 9 y 24 h y son consistentes con las imágenes de TEM realizadas en ausencia de fluoróforos (Figura II.22), e informes previos sobre fibrillas amiloides de APO.^{2, 11}

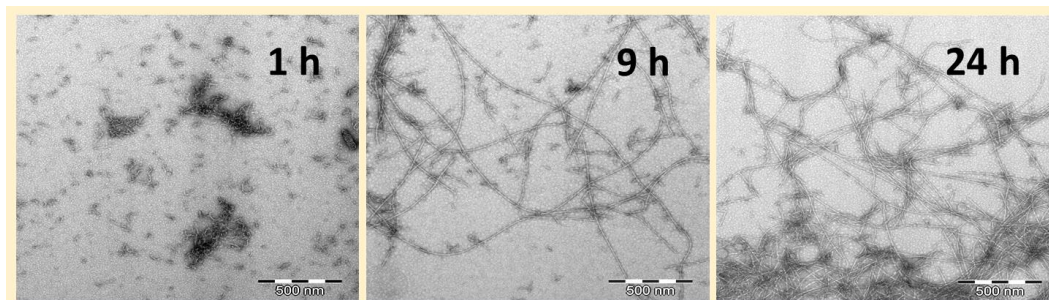


Figura II.35. Imágenes de TEM de muestras de APO incubadas bajo condiciones amiloidogénicas a diferentes tiempos (1, 9 y 24 h) que contienen los fluoróforos **AQui** y **NBA**. Las imágenes de muestras de APO incubadas durante 9 y 24 h muestran la formación de fibras maduras. La barra de escala representa 500 nm.

2.3.4. Estudio de agregación de la APO con el par FRET de fluoróforos AQui/NBA

Una vez que comprobamos el potencial de usar el par FRET **AQui:NBA** para seguir la cinética de agregación de la APO tanto por los cambios espectrales de las medidas espectroscópicas como por las medidas de los valores de τ_F de **AQui**, decidimos emplear la microscopía FLIM multiparamétrica de dos colores con el objetivo de analizar, en las imágenes obtenidas, los posibles cambios en los parámetros de los fluoróforos que permitiesen detectar y distinguir los diferentes grados de agregación proteica de la APO, maximizando de esta manera el contraste entre las diferentes etapas de agregación. Esta técnica no solo es capaz de recomponer imágenes que incluyan información tanto de la intensidad como del τ_F , sino que también permite obtener imágenes ratiométricas de las intensidades de fluorescencia detectadas en dos canales diferentes. De esta forma, en primer lugar, realizamos un análisis ratiométrico de las intensidades de fluorescencia de las imágenes de muestras de APO incubadas a diferentes tiempos (1, 3, 9 y 24 h), y a las que añadimos el par FRET **AQui:NBA**, obtenidas en dos canales de detección diferentes. En uno de los canales se detectaba la emisión de **AQui** (I_G , utilizando para ello un filtro paso banda 550/40) y en el otro canal se detectaba la emisión de **NBA** (I_R , utilizando un filtro paso banda 670/70). Por lo tanto, la relación I_G / I_R sería una representación directa de la eficiencia de FRET en el par **AQui:NBA** que podría analizarse a lo largo de los diferentes tiempos de incubación de la APO. Estas imágenes se obtuvieron al dividir los valores de intensidad de las imágenes detectados en el canal I_G correspondientes a la emisión de **AQui** entre los valores de intensidad de las imágenes detectados en el canal I_R correspondientes a la emisión del **NBA**. En la Figura II.36 se muestran las imágenes ratiométricas de muestras de APO (30 μ M) incubadas a diferentes tiempos (1, 3, 9 y 24 h) a las que se añadió una concentración equimolar 1:1 (10 μ M para cada fluoróforo) del par FRET **AQui:NBA**, representando las estructuras amiloides detectadas con una escala de color arbitraria que representa los valores de la relación I_G/I_R , y que varía de 0 a 10. En estas imágenes pudimos observar cómo la relación I_G/I_R disminuía claramente hacia valores más bajos conforme avanzaba el tiempo de agregación de la APO, de forma que los agregados formados durante las 1-3 h iniciales exhibieron valores de la relación I_G/I_R considerablemente más altos que los agregados detectados tras de 9 o 24 h de incubación. En la Figura II.37 se pueden ver asimismo imágenes ratiométricas de muestras de APO (30 μ M) incubadas a diferentes tiempos (1, 3, 9 y 24 h) con el par FRET **AQui:NBA** (concentración 1:1 de 10 μ M para cada fluoróforo) adicionales que

2.3. Resultados

muestran este fenómeno. Paralelamente, las distribuciones de frecuencia de los valores de la relación I_G/I_R de los píxeles de las diferentes imágenes analizadas correspondientes a agregados de APO de la Figura II.36 muestran cuantitativamente este cambio. La posición central de las distribuciones (X_c) de los agregados detectados tras 1, 3, 9 y 24 h de incubación fueron, respectivamente, 12.24 ± 0.22 , 4.91 ± 0.02 , 1.88 ± 0.02 y 1.00 ± 0.01 , obtenidos ajustando las distribuciones a una función log-normal. Así, este método resulta extremadamente sensible en comparación con otros informes reportados anteriormente en la literatura,^{4, 12-15} ya que los valores de I_G / I_R varían hasta en un orden de magnitud para agregados de diferentes tipos.

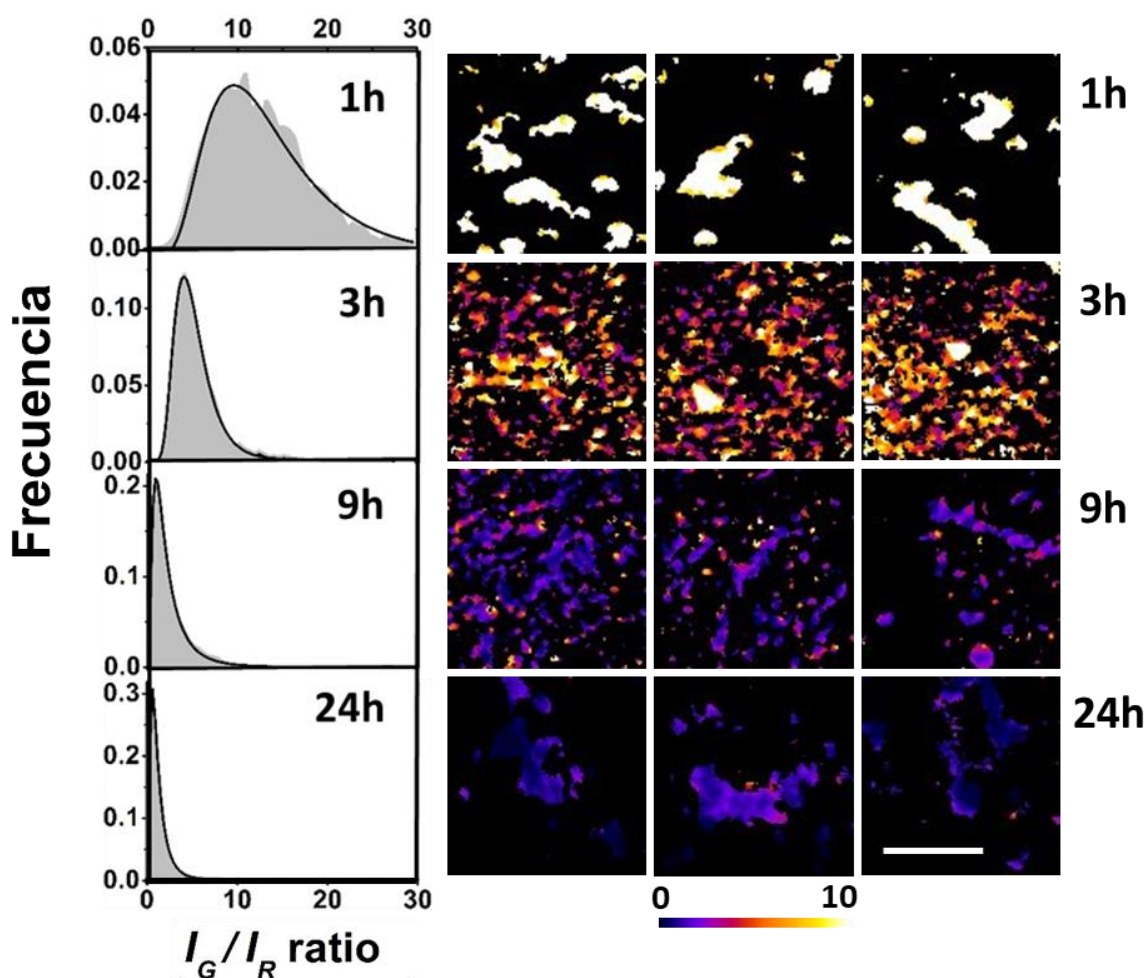


Figura II.36. Imágenes ratiométricas de agregados de APO (30 μ M) incubados durante diferentes tiempos (1, 3, 9 y 24 h) a los que se añadieron los fluoróforos **AQui** y **NBA** (concentración equimolar 1:1 de 10 μ M para cada fluoróforo). La barra de escala representa 5 μ m y el tamaño de la imagen es igual en todas las imágenes. También se muestran las distribuciones de frecuencia de la relación I_G/I_R de los agregados detectados, promediados sobre al menos 14 imágenes diferentes. Las distribuciones de frecuencia (gris) se ajustaron a una función log-normal (curva negra).

2.3. Resultados

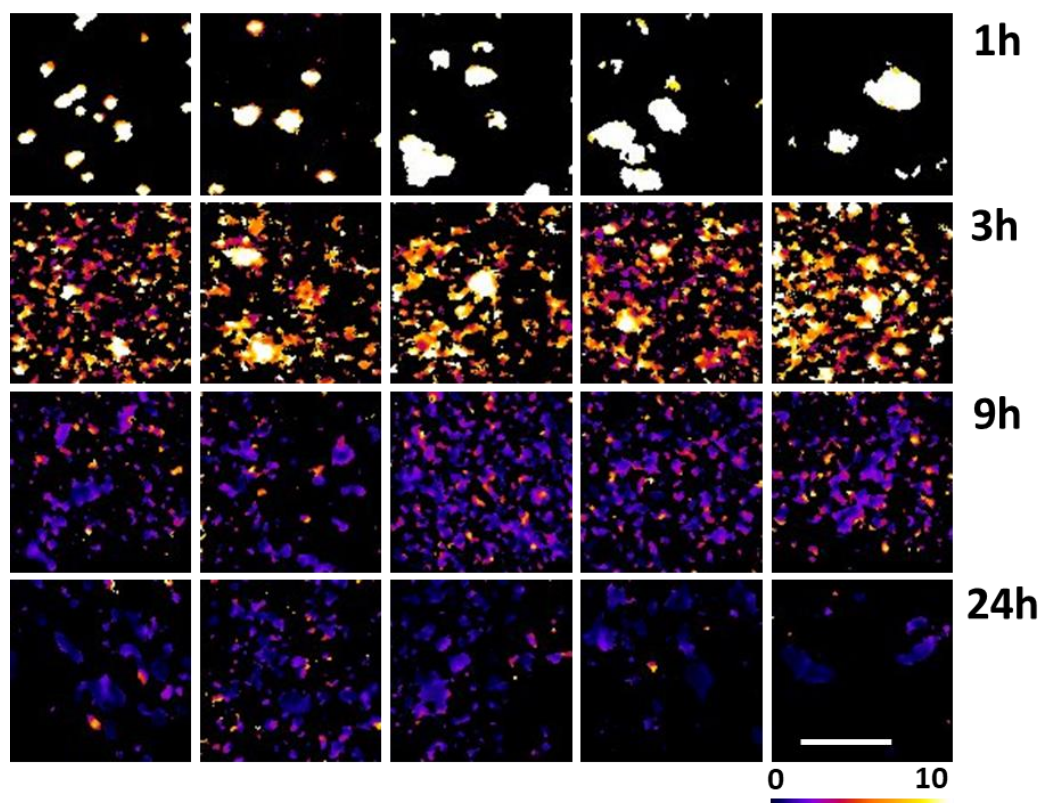


Figura II.37. Imágenes ratiométricas de agregados de APO (30 μM) incubados durante diferentes tiempos (1, 3, 9 y 24 h) a los que se añadieron los fluoróforos **AQui** y **NBA** (concentración equimolar 1:1 de 10 μM para cada fluoróforo). La escala de colores representa la relación I_G/I_R de intensidades de fluorescencia. La barra de escala representa 5 μm y el tamaño de la imagen es igual en todas las imágenes.

Por otro lado, los posibles cambios en el τ_F de **AQui** debido a la FRET producida en el par **AQui** \rightarrow **NBA** dentro de los agregados de APO formados podrían emplearse para seguir el proceso de agregación proteica mediante la microscopía FLIM. En la Figura II.38 se pueden observar diferentes imágenes FLIM de muestras de APO (30 μM) incubadas a diferentes tiempos (1, 3, 9 y 24 h) a las que se añadió una concentración equimolar 1:1 (10 μM para cada fluoróforo) del par FRET **AQui:NBA**. En ellas se puede ver el τ_F de **AQui**, recogido en el canal I_G , de los agregados detectados en una escala de color arbitraria cuyos valores varían entre 4 y 5.3 ns. Estas imágenes muestran una disminución en el τ_F de **AQui** a medida que aumenta el tiempo de incubación de la proteína, lo que indicaría una eficiencia de FRET más alta en los agregados formados en las últimas etapas. Asimismo, la Figura II.38 muestra las distribuciones de frecuencia de los valores de τ_F de **AQui** de los píxeles de las diferentes imágenes analizadas correspondientes a agregados de APO. Las distribuciones de frecuencia de los valores de τ_F de **AQui** también mostraron una disminución con el tiempo de incubación, estando

2.3. Resultados

centradas (parámetro X_c) en 4.85 ± 0.01 , 5.02 ± 0.01 , 4.35 ± 0.01 y 4.34 ± 0.01 ns para los tiempos de incubación de 1, 3, 9 y 24 h., respectivamente.

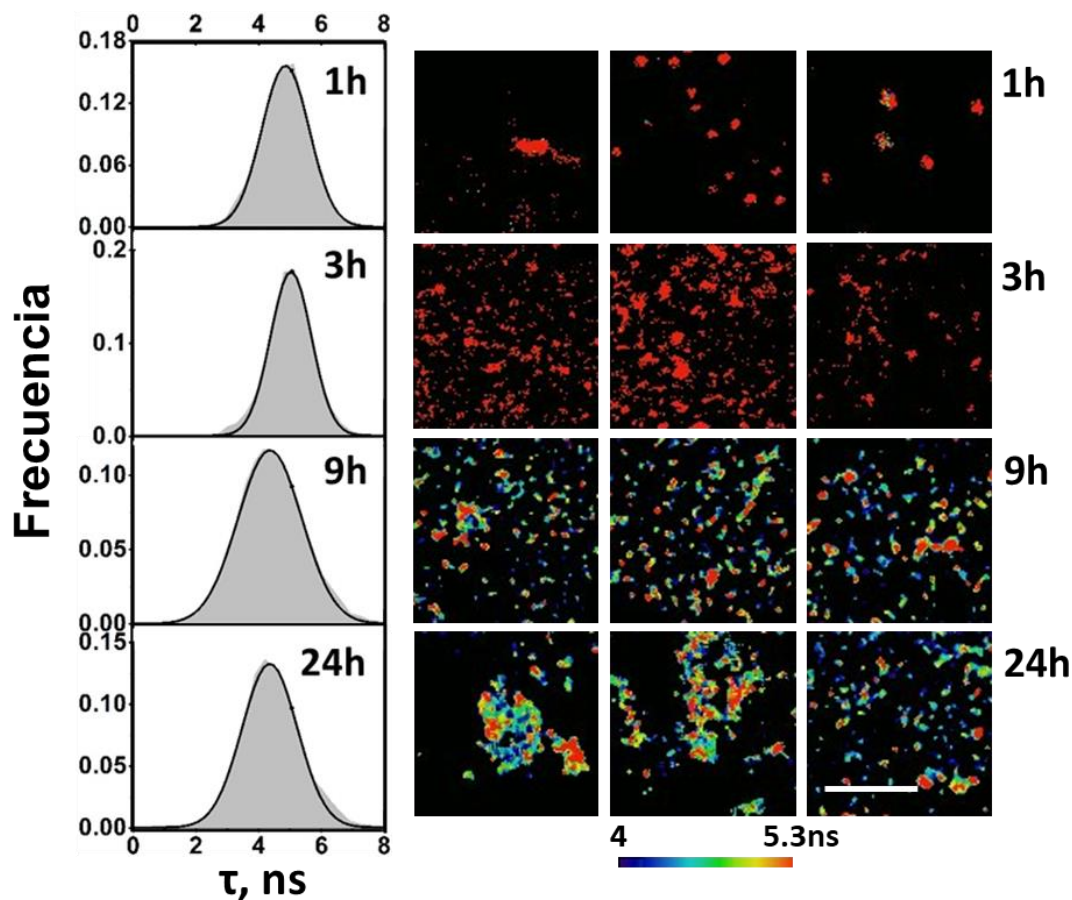


Figura II.38. Imágenes FLIM de agregados de APO incubados durante diferentes tiempos (1, 3, 9 y 24 h) a los que se añadieron los fluoróforos **AQui** y **NBA**. La barra de escala representa $5 \mu\text{m}$ y el tamaño de la imagen es igual en todas las imágenes. También se muestran las distribuciones de frecuencia de los τ_F de **AQui** en los agregados detectados, promediados sobre al menos 14 imágenes diferentes. Las distribuciones de frecuencia (gris) se ajustaron a una función gaussiana (curva negra).

En la Figura II.39 se pueden observar imágenes adicionales de imágenes FLIM que confirman que el τ_F de **AQui** disminuye conforme aumenta el tiempo de incubación de la APO. Pese a que este parámetro nos permitió seguir el proceso de agregación de la APO, los cambios observados resultan muy pequeños, por lo que este estudio resulta menos sensible que el ratiométrico.

2.3. Resultados

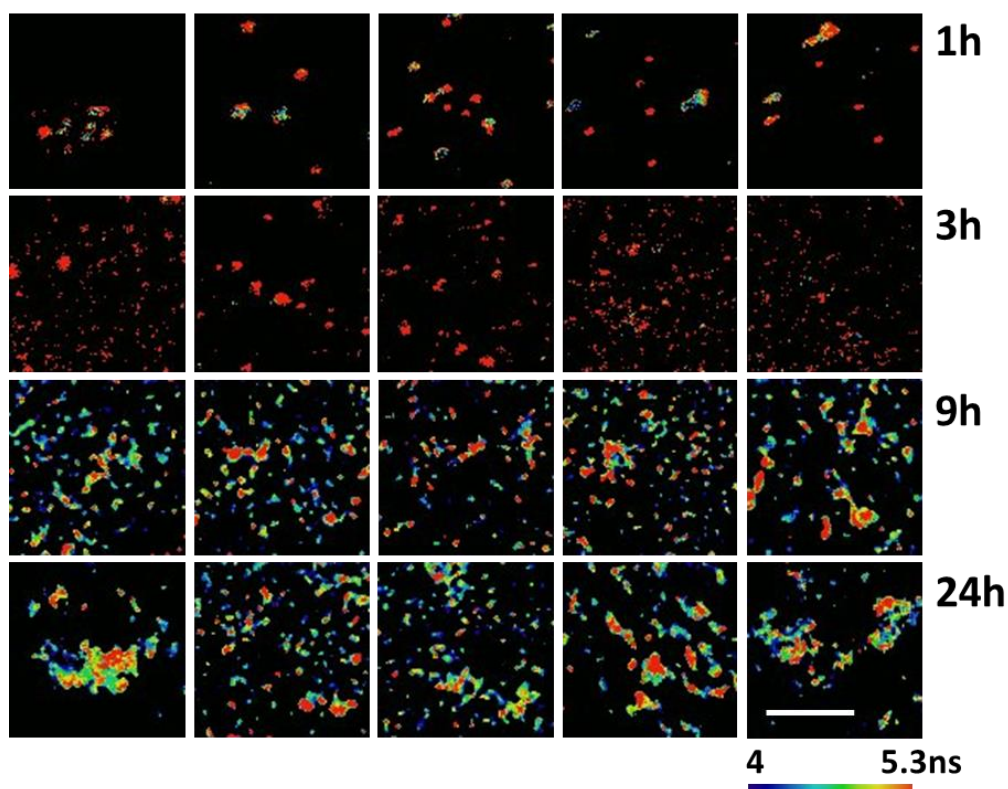


Figura II.39. Imágenes FLIM de agregados de APO incubados durante diferentes tiempos (1, 3, 9 y 24 h) a los que se añadieron los fluoróforos **AQui** y **NBA**. La barra de escala representa 5 μ m y el tamaño de la imagen es igual en todas las imágenes.

Paralelamente, decidimos emplear la nanoscopía STED para obtener imágenes instantáneas de superresolución de fibras amiloides maduras de APO sin necesidad de emplear algoritmos de reconstrucción de imágenes. Mediante esta técnica se han estudiado diferentes procesos relacionados con la agregación proteica, como la obtención de imágenes de superresolución de fibras amiloides de α Syn¹⁶ o la acumulación de A β 42 en los compartimentos presinápticos de las neuronas del hipocampo.¹⁷ De esta forma, debido a que el par FRET **AQui:NBA** es capaz de interactuar con la APO durante su proceso de agregación, pudimos confirmar la formación de fibras maduras mediante la obtención de imágenes de superresolución. En las Figuras II.40 y II.41 se comparan imágenes de microscopía confocal de fluorescencia convencional y de STED de fibras amiloides de APO incubadas en condiciones de agregación durante 24 h y a las que se añadió tanto **AQui** como **NBA**. Las imágenes STED muestran una resolución mucho más alta de las estructuras fibrilares que las imágenes de MF convencional. Esta mejora se puede comprobar en la Figura II.40, donde se compara el ancho completo a la mitad del máximo (FWHM, por sus siglas en inglés *Full Width at Half Maximum*) de la frecuencia de intensidad fluorescente de dos secciones de fibra (1 y 2) señaladas en una de las imágenes

2.3. Resultados

mostradas. Así, mientras que en las imágenes de microscopía confocal los valores del FWHM para las secciones 1 y 2 fueron de 510 y 575 nm respectivamente, en las imágenes de STED estos valores bajaron hasta 319 y 260 nm, respectivamente.

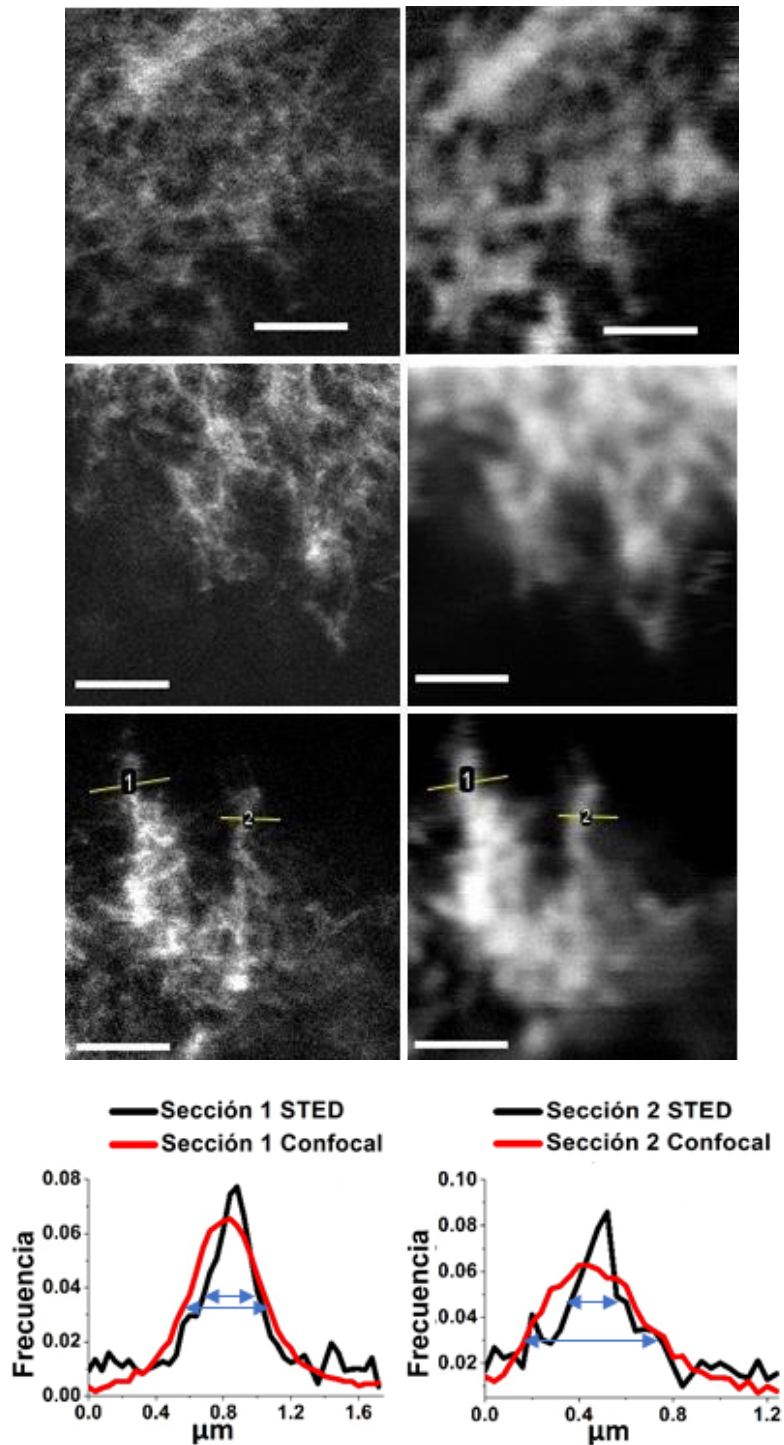


Figura II.40. Imágenes de fibras amiloides maduras de APO. Las imágenes de la izquierda son imágenes STED de superresolución, mientras que las imágenes de la derecha son imágenes de microscopía confocal de fluorescencia convencionales. La barra de escala representa 2 μm . En la parte inferior se pueden ver los

2.3. Resultados

perfiles de intensidad de las secciones 1 y 2 de las fibras de las imágenes inmediatamente superiores, tanto de las imágenes STED (líneas negras) como de las imágenes confocales (líneas rojas).

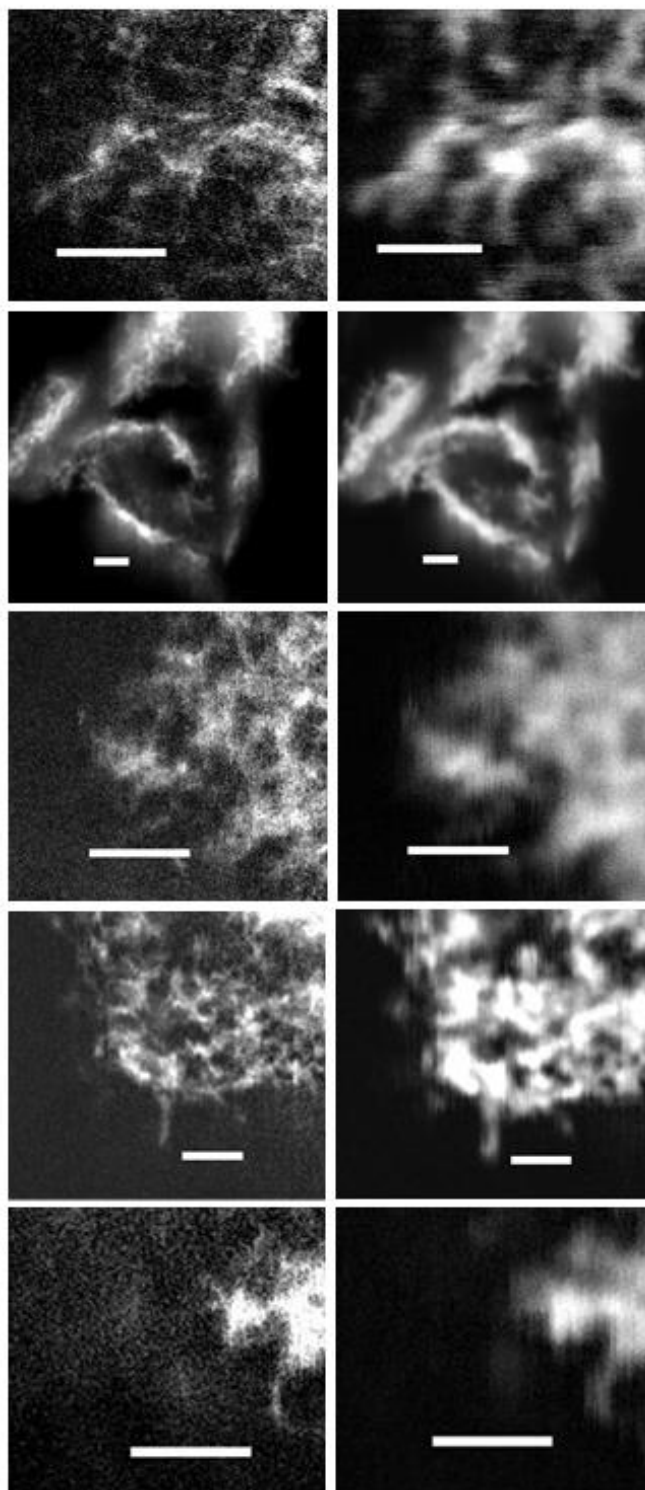


Figura II.41. Imágenes de fibras amiloides maduras de APO. Las imágenes de la izquierda son imágenes STED de superresolución, mientras que las imágenes de la derecha son imágenes de microscopía confocal de fluorescencia convencionales. La barra de escala representa 2 μm .

2.3.5. Estudio de la interacción de agregados de A β con la membrana celular

Existen evidencias claras de que las especies oligoméricas formadas durante las primeras etapas de los procesos de agregación amiloide relacionados con las enfermedades neurodegenerativas son las responsables de la toxicidad e inflamación celular,¹⁸⁻²¹ mientras que los depósitos y placas amiloides parecen ejercer una función protectora,^{22, 23} como ya se ha comentado en la Introducción de este bloque. Asimismo, parece que existen distintos tipos de agregados amiloides e intermediarios con diferentes efectos tóxicos, de forma que algunos tienen una mayor capacidad para inducir estrés celular mientras que otros están más implicados en la propagación de la neurodegeneración.^{24, 25} Igualmente, mediante la microscopía FLIM se han podido detectar y caracterizar diferentes tipos de agregados amiloides acorde con su tamaño y compacidad, estudiándose sus cambios estructurales a lo largo del tiempo e identificando aquellas especies más tóxicas para las células.²⁶ De esta manera decidimos utilizar la microscopía FLIM para visualizar agregados amiloides de A β interactuando con células vivas individuales, con el objetivo de obtener una visión más completa del proceso que nos permitiera identificar diferentes especies oligoméricas. Nos centramos en la interacción entre agregados de A β_{42} y células de neuroblastoma de ratón Neuro-2a (neuroblastos N2a), para analizar el efecto que los agregados tempranos y las estructuras amiloides inducían en las células. Así, la técnica FLIM nos permitiría obtener información sobre la eficiencia de la FRET intraoligomérica como medida de la compacidad de los agregados. Para obtener las imágenes FLIM, los monómeros peptídicos deben estar etiquetados fluorescentemente bien con un fluoróforo dador o bien con un fluoróforo aceptor que reúnan las características fotofísicas adecuadas para generar una FRET eficiente entre ellos. Para este estudio decidimos seguir una estrategia FLIM de excitación pulsada intercalada de dos colores (PIE-FLIM, por sus siglas en inglés *Pulsed Interleaved Excitation - Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy*). En la excitación PIE, uno de los láseres excita directamente al fluoróforo dador y el segundo láser, temporalmente retardado, excita directamente al fluoróforo aceptor, recogiendo entonces la emisión de fluorescencia en dos canales de detección diferentes (uno para el dador y otro para el aceptor) como se puede ver en el esquema de la estrategia PIE-FLIM seguida de la Figura II.42. Esto permite establecer tres ventanas temporales específicas para discriminar fotones y reconstruir así las

2.3. Resultados

imágenes FLIM. De esta manera se obtienen tres imágenes diferentes, una con la información proveniente del fluoróforo dador, otra con la del fluoróforo aceptor y otra en la que aparece la información de la FRET existente entre ambos fluoróforos. Los píxeles que se colocan simultáneamente en las tres imágenes son los seleccionados inequívocamente como agregados. Asimismo, la eficacia de FRET y, por tanto, el grado de compacidad de los agregados, están relacionados con la disminución del τ_F del fluoróforo dador, τ_D .

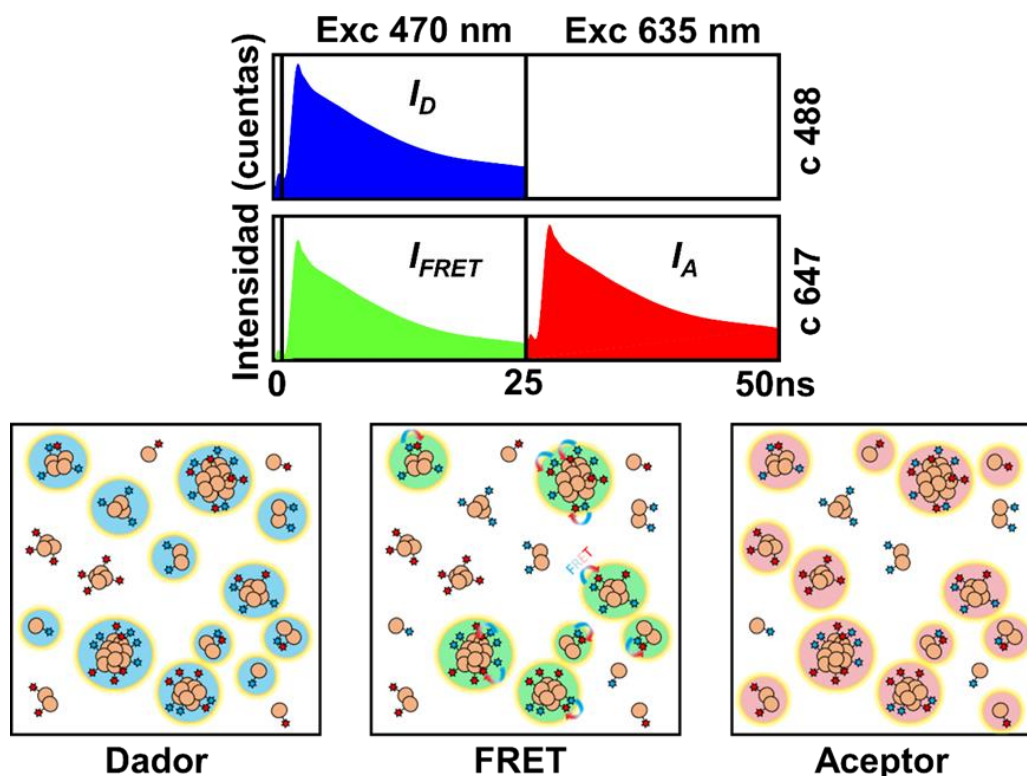


Figura II.42. Esquema de la estrategia PIE-FLIM de dos colores seguida (parte superior) y criterio de selección de agregados (parte inferior). Las tres ventanas temporales distribuidas en los dos canales de detección definen las imágenes reconstruidas I_D , I_{FRET} e I_A . A continuación, las tres imágenes se analizan para identificar los posibles eventos fluorescentes. Solo los píxeles coincidentes en las tres imágenes se seleccionan como agregados (círculos verdes).

En este trabajo se utilizaron los péptidos comerciales de $A\beta_{42}$ marcados con los fluoróforos HiLyte Fluor 488 (fluoróforo dador) y HiLyte Fluor 647 (fluoróforo aceptor), denominados $A\beta$ -488 y $A\beta$ -647 respectivamente. De esta forma se incubaron bajo condiciones de agregación mezclas equimolares de $A\beta$ -488 y $A\beta$ -647 durante 15 horas a una concentración de $0,5 \mu\text{M}$ en tampón SSPE (cloruro de sodio 150 mM, fosfato de sodio 10 mM y EDTA, 1 mM), pH 7,4 y con agitación a 260 rpm. Se tomaron diferentes alícuotas de la mezcla de incubación y se añadieron a la disolución tampón Krebs (NaCl 130 mM, KCl 2.5 mM, NaHCO_3 25 mM, NaH_2PO_4 1.2 mM, MgCl_2 1.2 mM, y CaCl_2 2.5

2.3. Resultados

mM, pH 7.2) que contenía las células N2a, alcanzando una concentración final de péptido de 50 nM. Seguidamente se obtuvieron imágenes PIE-FLIM cada 10 minutos para seguir la evolución de la interacción de los agregados de A β ₄₂ con las células N2a. La Figura II.43 muestra ejemplos representativos de la fuerte interacción de los agregados de A β ₄₂ formados con las células neuronales indiferenciadas. Como fenómeno común en todos los casos estudiados encontramos que los agregados de A β ₄₂ rodean a las membranas celulares e interactúan con ellas después de 20-30 min de haber sido añadidos a las células. Después de 30 min de interacción, el número de agregados de A β ₄₂ que rodean la membrana celular aumenta considerablemente, incluso induciendo la permeabilidad celular y entrando en el citoplasma celular en ciertos casos. Por lo general, en estos casos en los que los agregados entran en el citoplasma, después de 60 min de interacción, las células N2a se lisan por completo. Este comportamiento es particularmente notable en la Figura II.43A, en la que todas las células estudiadas aparecen lisadas después de 60 minutos de interacción con los agregados. Asimismo, en la Figura II.43B también se detecta claramente el efecto mencionado anteriormente. Se trata de la acumulación de agregados de A β ₄₂ en la membrana, que termina provocando la lisis total de una de las células al final del estudio. Sin embargo, se puede observar como en otra célula adyacente de las mismas imágenes los agregados rodean su membrana, y van aumentando el tamaño de los depósitos formados conforme pasa el tiempo, pero no provocan su lisis, dejando la célula intacta. El hecho de que los depósitos de agregados crezcan de tamaño con el tiempo y que, de forma cooperativa, parezcan atraer más agregados a la membrana celular, tiene implicaciones importantes con respecto a la toxicidad celular.²⁷ Es reseñable el hecho de que los primeros agregados que se depositan sobre la membrana celular parecen actuar como núcleos o semillas, que posteriormente reclutan más agregados con el consiguiente crecimiento de los depósitos. La Figura II.43C también muestra resultados interesantes, ya que a los 30 min aparecen agregados que se depositan sobre la membrana celular en una de las células. Conforme pasa el tiempo, estos depósitos primarios de agregados que actúan como núcleos van aumentando progresivamente de tamaño hasta formar acumulaciones considerables. Sin embargo, estos agregados no inducen la lisis celular en ningún momento, manteniendo la célula su integridad estructural. Además, también se puede observar cómo en otra célula adyacente no se produce el depósito o acúmulo de agregados en ningún momento.

2.3. Resultados

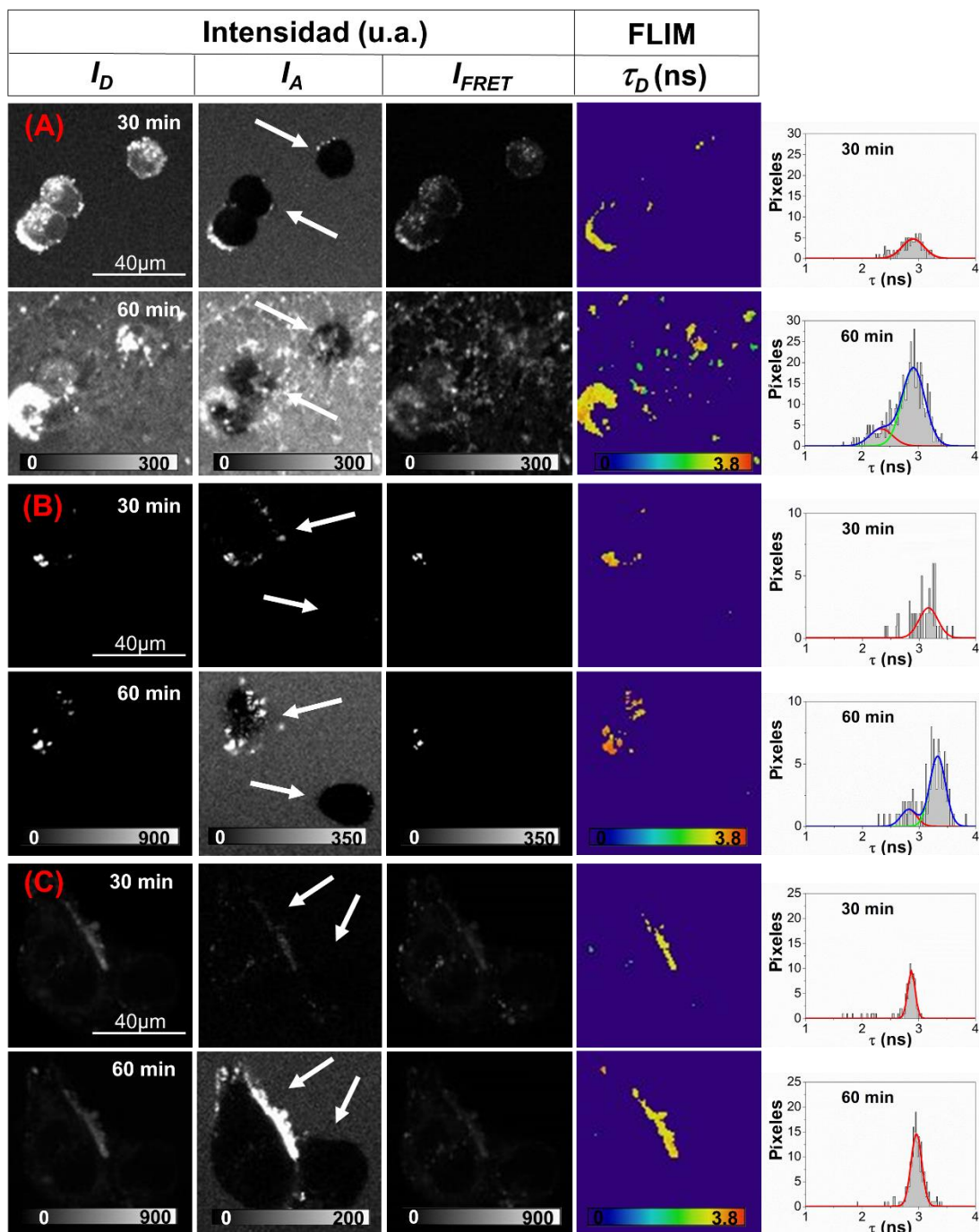


Figura II.43. Imágenes de intensidad de fluorescencia en las tres ventanas de detección (I_D , I_{FRET} e I_A) e imágenes FLIM del τ_D de mezclas equimolares de péptido marcado A β -488 y A β -647, incubados durante 15 h, que interactúan con células N2a durante 30 y 60 min. Los histogramas de la derecha representan las distribuciones de los τ_D para los píxeles de las imágenes seleccionados como agregados. Las distribuciones se ajustaron a una o dos (si fuera necesario) funciones gaussianas (líneas sólidas). La barra de escala representa 40 μ m. Las flechas blancas indican las diferentes células detectadas.

2.3. Resultados

Este fenómeno de depósito de agregados sin lisis celular se observó en todas las repeticiones realizadas. De hecho, dadas las bajas cantidades de péptido utilizado (50 nM), con frecuencia se encontraron células que no mostraban agregados depositados en la membrana plasmática, permaneciendo ilesas hasta el final de los experimentos. A continuación, se muestran las Figuras con todas las imágenes adicionales tomadas cada 10 minutos de las repeticiones de los experimentos comentados anteriormente.

2.3. Resultados

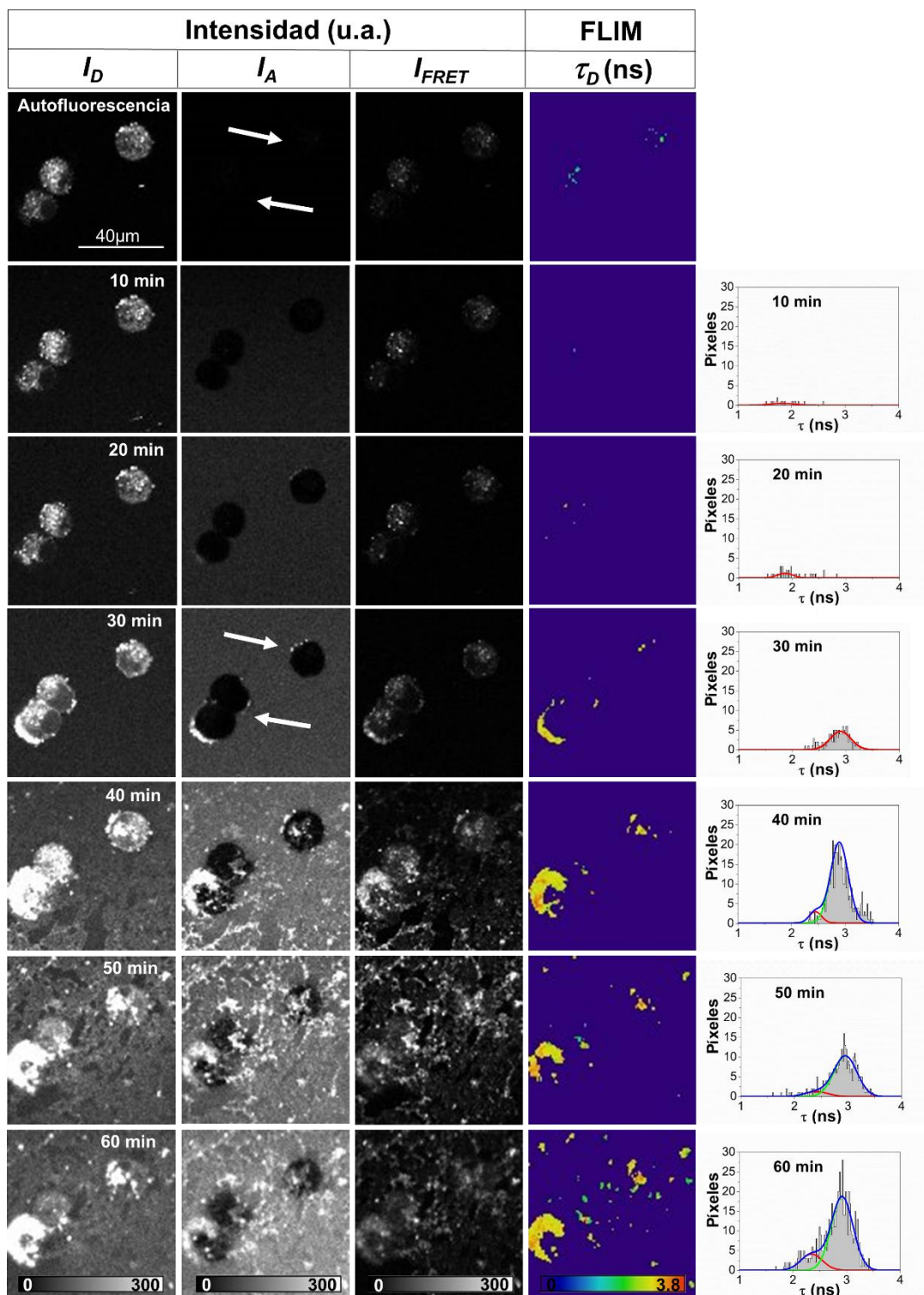


Figura II.44. Imágenes de intensidad de fluorescencia en las tres ventanas de detección (I_D , I_{FRET} e I_A) e imágenes FLIM del τ_D de mezclas equimolares de péptido marcado $A\beta$ -488 y $A\beta$ -647, incubados durante 15 h, que interactúan con células N2a hasta los 60 min. Los histogramas de la derecha representan las distribuciones de los τ_D para los píxeles de las imágenes seleccionados como agregados. Las distribuciones se ajustaron a una o dos (si fuera necesario) funciones gaussianas (líneas sólidas). La barra de escala representa 40 μ m. Las flechas blancas indican las diferentes células detectadas.

2.3. Resultados

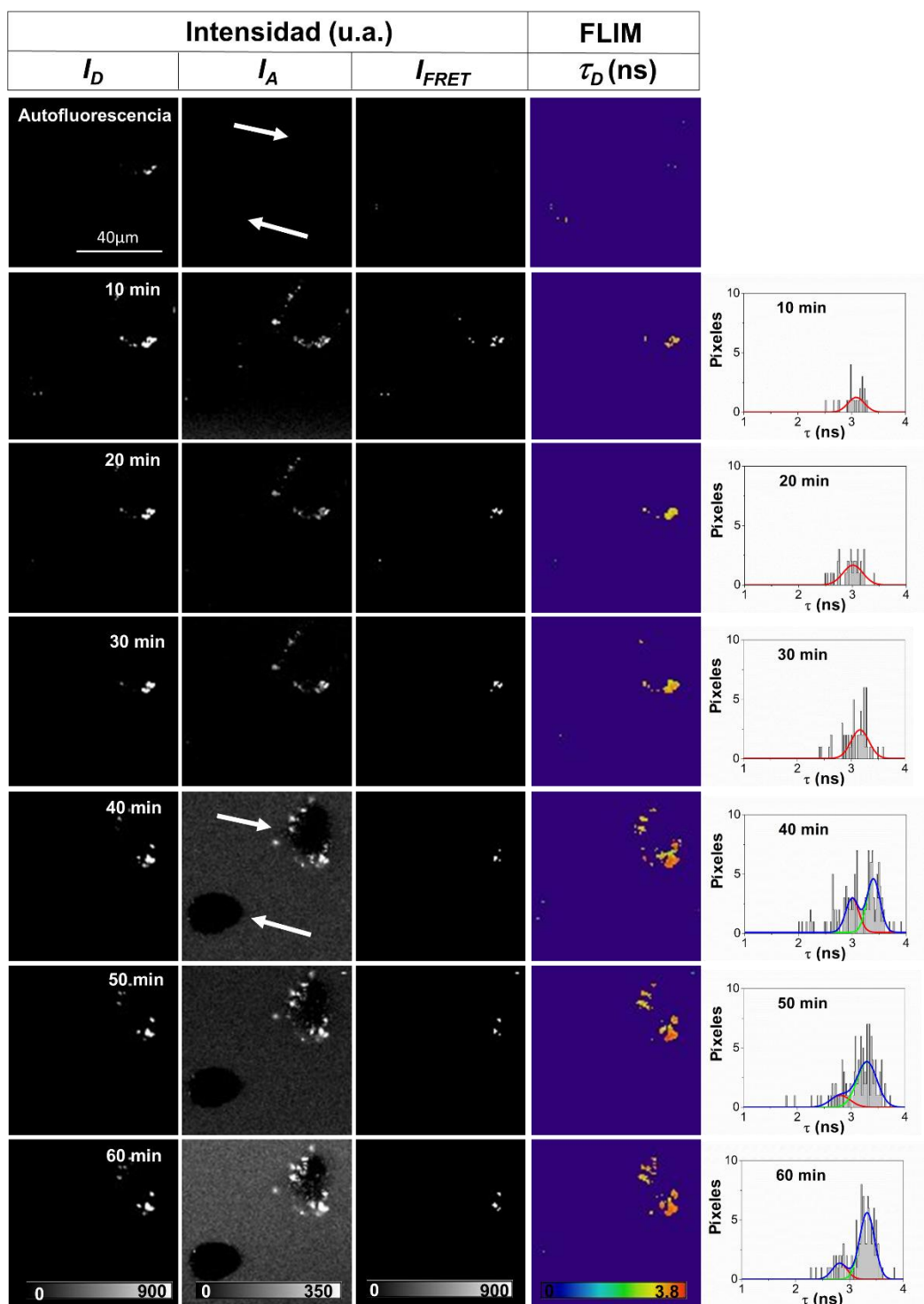


Figura II.45. Imágenes de intensidad de fluorescencia en las tres ventanas de detección (I_D , I_{FRET} e I_A) e imágenes FLIM del τ_D de mezclas equimolares de péptido marcado A β -488 y A β -647, incubados durante 15 h, que interactúan con células N2a hasta los 60 min. Los histogramas de la derecha representan las distribuciones de los τ_D para los píxeles de las imágenes seleccionados como agregados. Las distribuciones se ajustaron a una o dos (si fuera necesario) funciones gaussianas (líneas sólidas). La barra de escala representa 40 μ m. Las flechas blancas indican las diferentes células detectadas.

2.3. Resultados

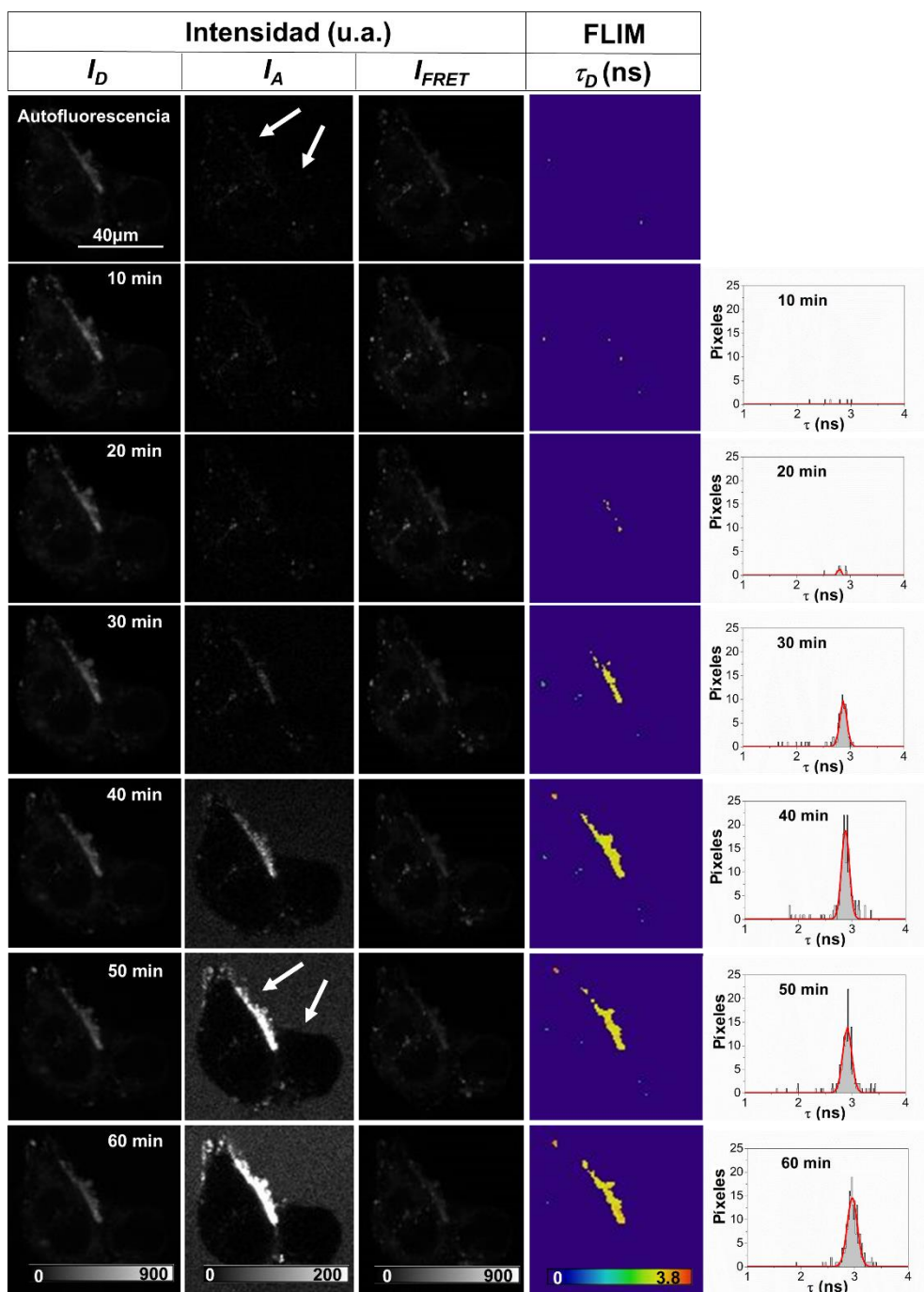


Figura II.46. Imágenes de intensidad de fluorescencia en las tres ventanas de detección (I_D , I_{FRET} e I_A) e imágenes FLIM del τ_D de mezclas equimolares de péptido marcado A β -488 y A β -647, incubados durante 15 h, que interactúan con células N2a hasta los 60 min. Los histogramas de la derecha representan las distribuciones de los τ_D para los píxeles de las imágenes seleccionados como agregados. Las distribuciones se ajustaron a una o dos (si fuera necesario) funciones gaussianas (líneas sólidas). La barra de escala representa 40 μ m. Las flechas blancas indican las diferentes células detectadas.

2.3. Resultados

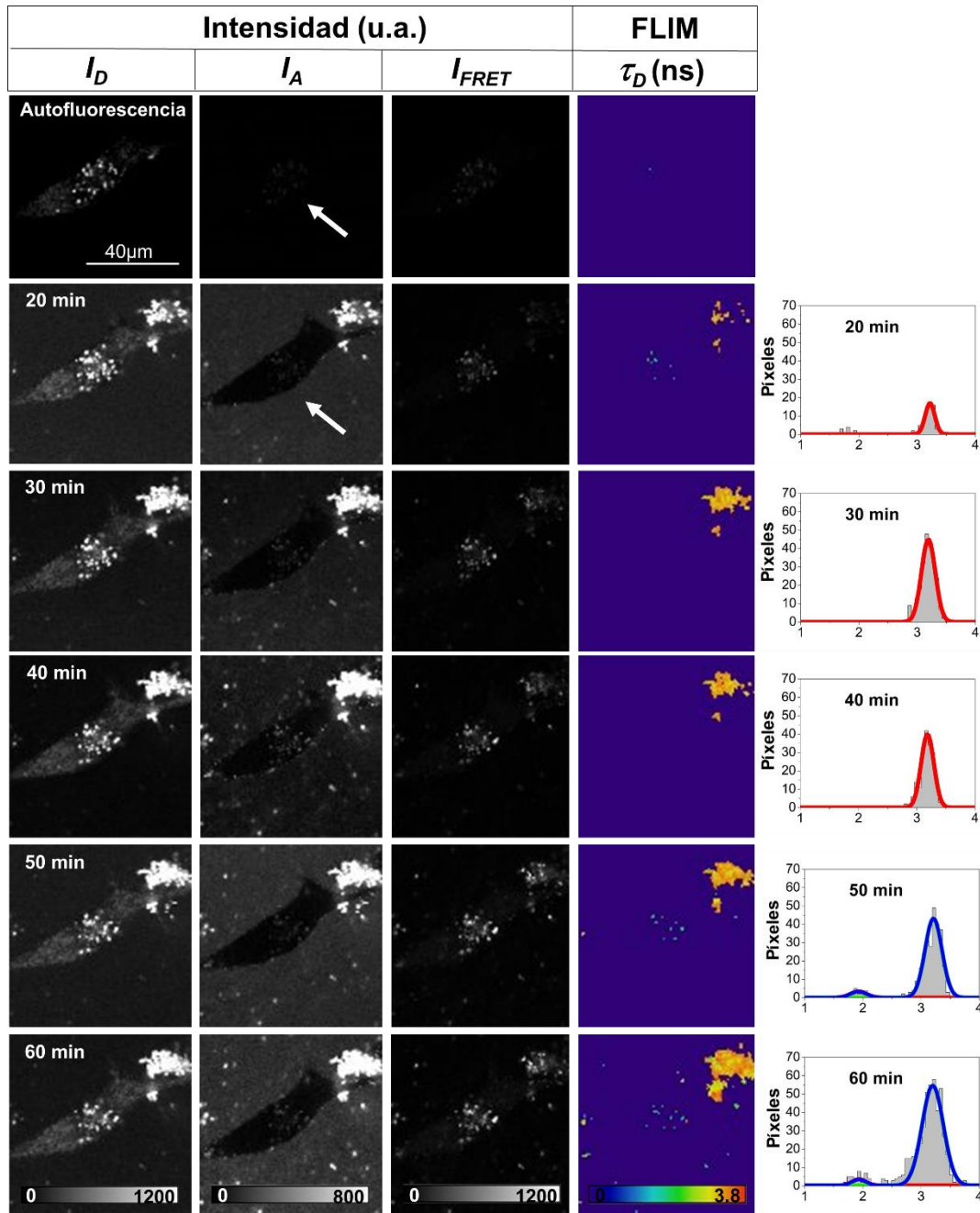


Figura II.47. Imágenes de intensidad de fluorescencia en las tres ventanas de detección (I_D , I_{FRET} e I_A) e imágenes FLIM del τ_D de mezclas equimolares de péptido marcado A β -488 y A β -647, incubados durante 15 h, que interactúan con células N2a hasta los 60 min. Los histogramas de la derecha representan las distribuciones de los τ_D para los píxeles de las imágenes seleccionados como agregados. Las distribuciones se ajustaron a una o dos (si fuera necesario) funciones gaussianas (líneas sólidas). La barra de escala representa 40 μ m. Las flechas blancas indican las diferentes células detectadas.

2.3. Resultados

Asimismo, la Figura II.48 muestra las imágenes de intensidad de fluorescencia en el canal del fluoróforo aceptor (I_A) y los histogramas de frecuencia de los τ_D de una célula que no presenta depósitos de agregados en su membrana celular, sirviendo como control para los fenómenos explicados anteriormente, ya que si no se producen depósitos de agregados en los que su compacidad pueda aumentar con el tiempo, los histogramas de las distribuciones del τ_D apenas reflejan información.

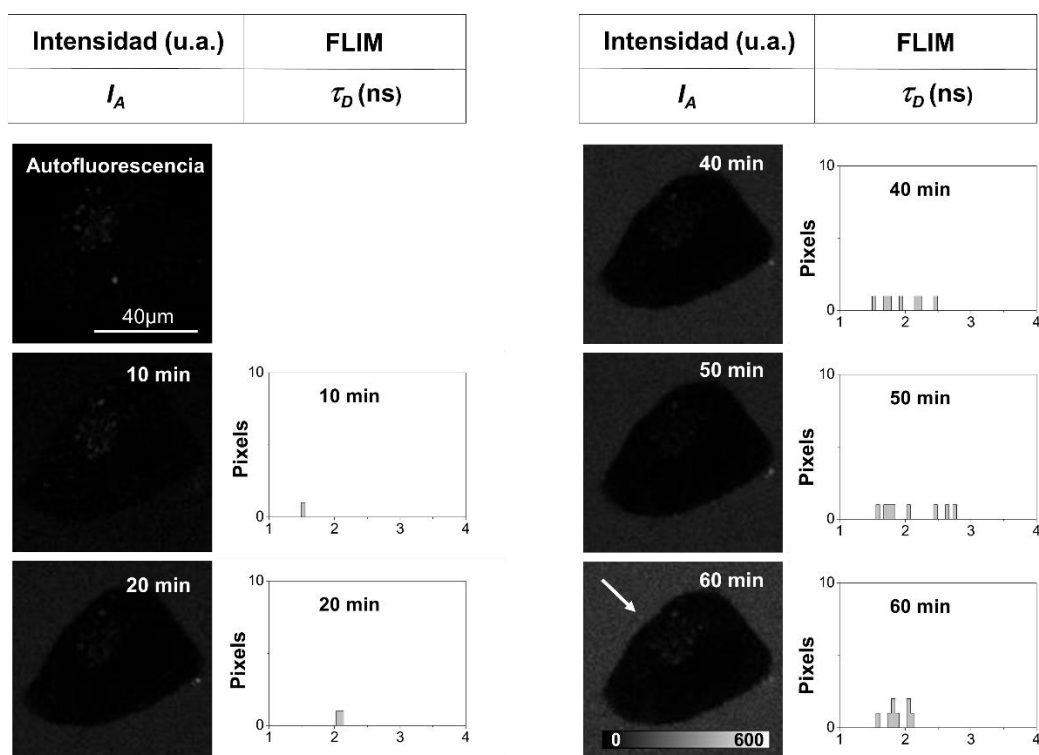


Figura II.48. Imágenes de intensidad de fluorescencia en la ventana de detección I_A e histogramas de frecuencia del τ_D de mezclas equimolares de péptido marcado $A\beta$ -488 y $A\beta$ -647, incubados durante 15 h, que no se acumula en la membrana de la célula N2a en ningún momento del experimento. Los histogramas de la derecha representan las distribuciones de τ_D para los píxeles seleccionados como agregados. La barra de escala representa 40 μ m. La flecha blanca indica la ubicación de la célula.

Este comportamiento de los agregados hacia las células N2a se puede racionalizar analizando las imágenes FLIM del τ_D y los histogramas de frecuencia correspondientes. Como se puede ver en las Figuras II.43, II.44 y II.45, en las imágenes en las que se observan células lisadas por completo encontramos una primera población de agregados que rodea las membranas celulares y genera los primeros depósitos. Sin embargo, hacia el final del proceso estudiado se detecta una segunda población de agregados caracterizada por un menor τ_D , lo que implica que son estructuralmente más compactos. El aumento de la intensidad de fluorescencia en las imágenes I_{FRET} y la

2.3. Resultados

disminución de los valores de τ_D obtenidos a lo largo del tiempo indican una mayor eficiencia de FRET y una mayor compacidad para la segunda población de agregados, como se muestra en otros estudios de FRET de molécula única.²⁶ Sin embargo, esta segunda población de agregados no se detecta en las células que permanecen intactas, como se muestra en las Figuras II.43, II.46 y II.48. Este hecho sugiere que estas poblaciones de agregados más compactos pueden desempeñar un papel crucial en la inducción de la lisis celular, contribuyendo mediante diferentes mecanismos de toxicidad en su permeabilidad y disrupción de la membrana. Esto concuerda con estudios previos que muestran la alta capacidad de los pequeños agregados solubles para permeabilizar y atravesar la membrana, a diferencia de lo que ocurre con los agregados más grandes.²⁸

2.3.6. Estudio del estrés celular causado por agregados de A β utilizando una sonda de biotioles

En la sección anterior se confirma cómo los agregados de péptido A β_{42} pueden interactuar con las células neuronales e inducir su lisis. Por tanto, es razonable relacionar esta interacción péptido-neuroblasto con un aumento del estrés celular. El aumento de los niveles de biotioles en la matriz celular es una respuesta fisiológica común que aparece como mecanismo de defensa asociado con el estrés celular.²⁹ Así, medir la cantidad de biotioles intracelulares generados al interactuar los agregados pre-amiloides con los neuroblastos puede ser una manera efectiva para correlacionar el efecto fisiológico de los diferentes oligómeros citotóxicos. Las especies reactivas de oxígeno (ROS) generadas en una población de células previamente cultivadas tras la adición de agregados amiloides puede utilizarse como una medida de estrés celular y citotoxicidad ²⁷. De esta forma, en el presente trabajo nos enfocamos en medir este efecto en células individuales. Paralelamente, en un trabajo anterior de nuestro grupo de investigación se desarrolló una sonda fluorogénica capaz de medir el estrés oxidativo mediante el seguimiento de los cambios en los niveles de biotioles.³⁰ Esta sonda combina un grupo 2,4-dinitrofenilsulfonilo (DNBS) altamente deficiente en electrones, y que actúa como sumidero de electrones a través de una transferencia electrónica fotoinducida (PET), con un derivado de xanteno fluorescente, 9- [1- (4-terc-butilo -2-metoxifenil)] - 6-hidroxi-3H-xanten-3-ona (Granada Green, GG). La sonda GG-DNBS (Figura II.49) no es fluorescente por sí misma debido a la desactivación inducida por la

2.3. Resultados

PET. Sin embargo, la desulfonación del grupo DNBS en presencia de tioles libera el fluoróforo, lo que aumenta considerablemente la emisión fluorescente. Por otro lado, la sonda GG-DNBS ya se ha utilizado con éxito en células derivadas de fotorreceptores 661W.³⁰

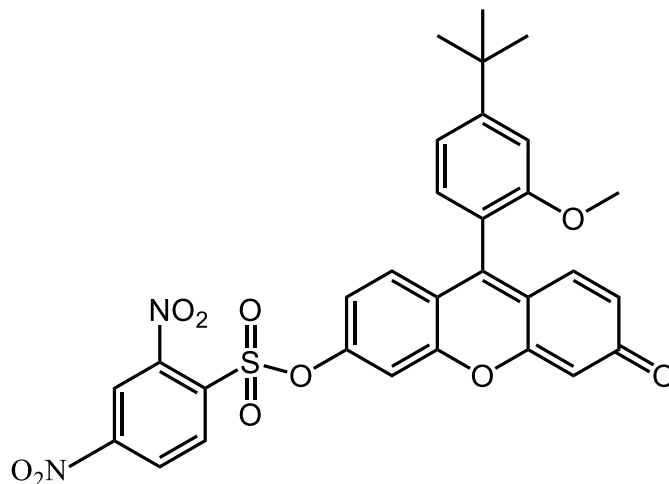


Figura II.49. Estructura de la sonda de biotioles GG-DNBS.

Por consiguiente, con el fin de cuantificar el estrés celular causado por los agregados de $A\beta_{42}$ que interactúan con las células N2a a nivel de célula única, se llevaron a cabo experimentos de microscopía de fluorescencia para la obtención de imágenes utilizando la sonda GG-DNBS, determinando la velocidad a la que las células neuronales generan los biotioles cuando se añaden agregados de $A\beta_{42}$. Para estos experimentos se utilizaron alícuotas de muestras de $A\beta$ -647 incubadas bajo condiciones de agregación durante diferentes tiempos (0, 0.5, 1, 3, 24 y 48 h), para investigar el efecto de las distintas especies formadas durante las diferentes etapas de agregación. Los tiempos de incubación seleccionados permiten abarcar temporalmente todo el proceso de agregación, como se puede observar en las imágenes de TEM y en los experimentos de DLS, (Figuras II.50 y II.51). En las imágenes de TEM se puede observar cómo entre las 0.5 y 3 h de agregación se detectan diferentes estructuras protofibrilares. Sin embargo, a las 24 y 48 h se observan fibras amiloides más largas y rectas.

2.3. Resultados

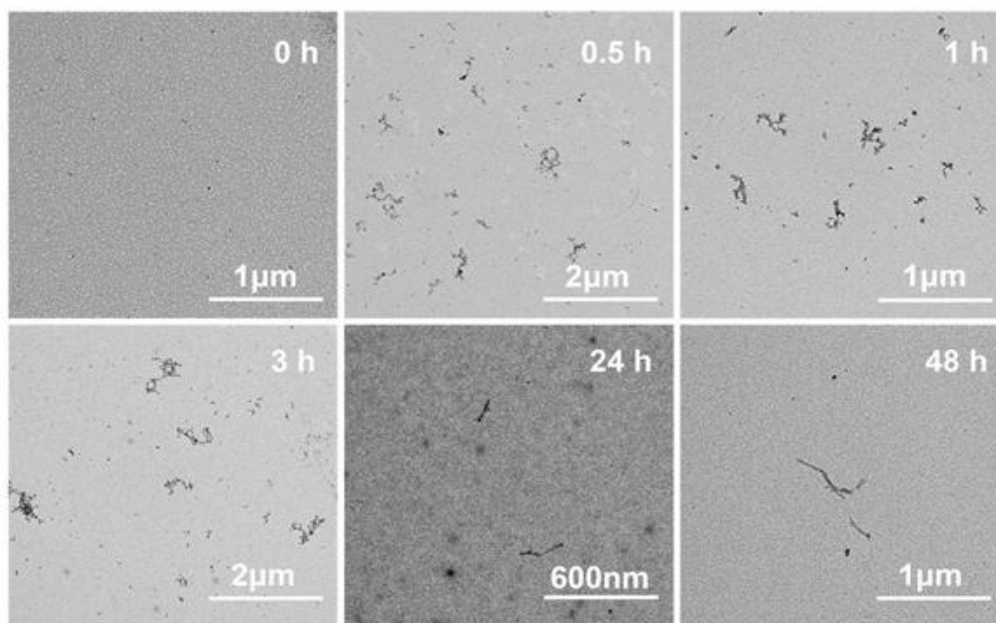


Figura II.50. Imágenes de TEM de agregados y fibras de Aβ marcados fluorescentemente (mezcla equimolar 0,5 μM de Aβ-488 y de Aβ-647) en diferentes tiempos de incubación.

En los experimentos de DLS, realizados por D. José Mata del Pino, los péptidos de Aβ-647 no incubados bajo condiciones de agregación (0 h de incubación) exhibieron cierto grado de agregación amorfa (Figura II.51A), que puede ser atribuido a interacciones hidrofóbicas y a estructuras micelares.²⁰ Sin embargo, el tamaño de los agregados aumenta considerablemente tras 0.3 h de agregación (Figura II.51B).

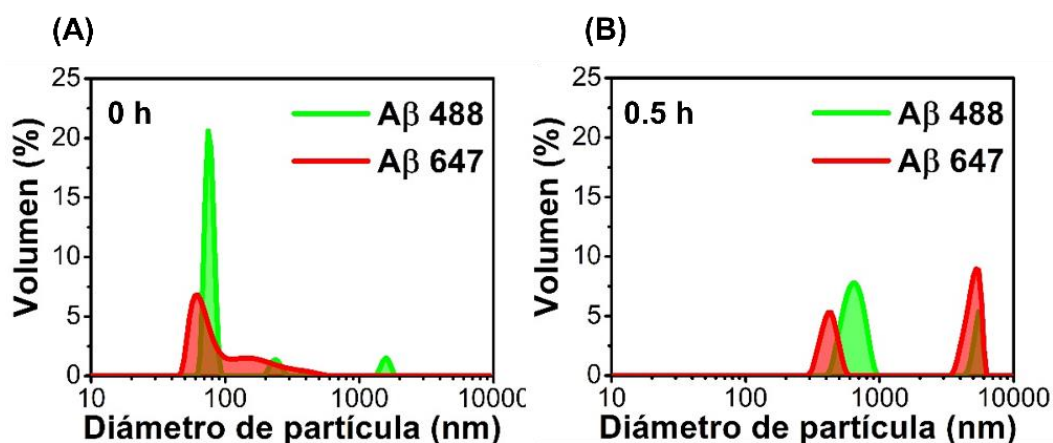


Figura II.51. Gráficas de DLS de péptidos y agregados de Aβ marcados fluorescentemente (Aβ-488: línea verde y Aβ-647: línea roja) formados a las 0 h (A) y a las 0.3 h (B) del proceso de agregación, sonicadas en cubeta de cuarzo en una solución de NH₃ (pH 12) para evitar su agregación (A) y en una solución salina tamponada con fosfato pH 7,4 tras de 20 min de agregación (B).

2.3. Resultados

Para los siguientes experimentos se empleó una estrategia PIE-FLIM de dos colores con doble canal de detección. Debido a que la emisión fluorescente del sensor GG-DNBS está en la región espectral del color verde, se decidió utilizar solamente el péptido A β -647 (y sus agregados formados a diferentes tiempos de incubación), ya que el fluoróforo HiLyte Fluor 647 emite en la región espectral del color rojo. Por consiguiente, una vez obtenidas las diferentes alícuotas de las muestras de A β -647 incubadas a diferentes tiempos (0.5 μ M), se añadieron simultáneamente junto con la sonda de biotioles GG-DNBS (0.25 μ M) a células N2a vivas. De esta manera se utilizaron dos canales de detección de intensidad de fluorescencia, pudiendo así visualizar simultáneamente tanto la respuesta del sensor de biotioles en el canal verde, como los agregados de A β -647 en el canal rojo (Figura II.52).

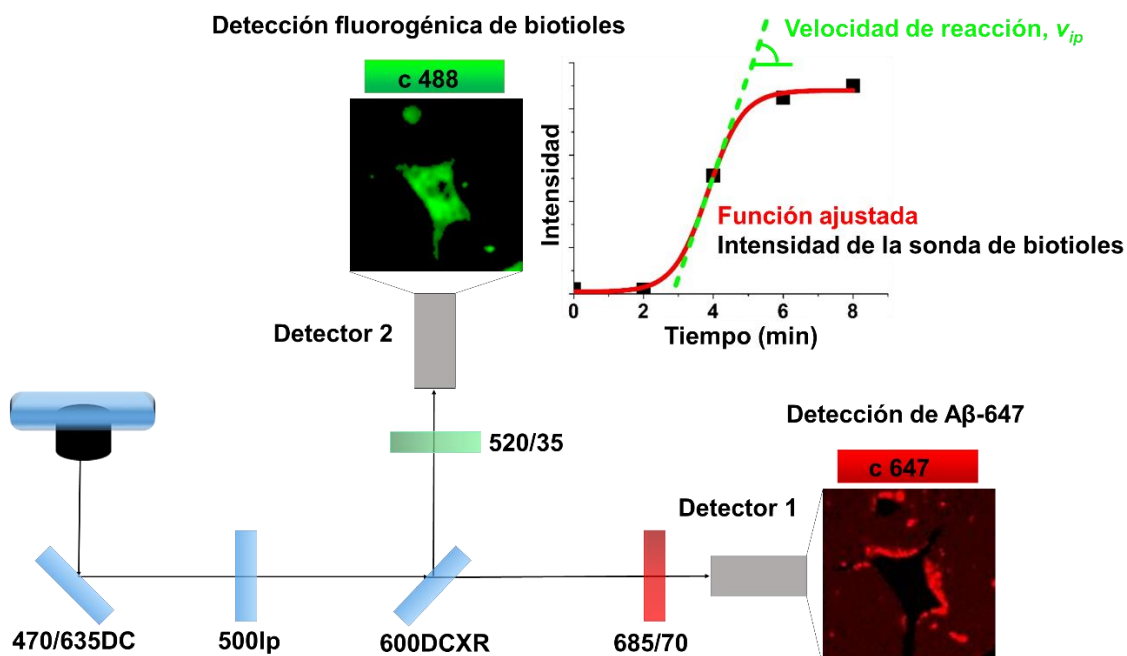


Figura II.52. Esquema de la configuración PIE-FLIM de doble canal para obtener simultáneamente imágenes de la sonda de biotioles GG-DNBS y de los agregados de A β -647. Para determinar la velocidad de la reacción fluorogénica de biotioles, la intensidad promedio de los píxeles en las regiones de interés de las imágenes detectadas en el canal verde (puntos negros) se ajustaron a una función sigmoidea (línea roja) y se calculó la pendiente en el punto de inflexión (línea verde).

Con esta configuración se pudo seguir y estudiar la cinética de la reacción fluorogénica mediada por biotioles de la sonda GG-DNBS durante 1 h, extrayendo la intensidad de

2.3. Resultados

fluorescencia promedio en los píxeles de interés (correspondientes con el citoplasma celular) en función del tiempo de las imágenes recogidas en el canal verde. Se llevaron a cabo diferentes repeticiones en las mismas condiciones experimentales y para cada tiempo de incubación de A β -647, comparando estos resultados con los de las células en estado basal (células control a las que no se añadieron agregados de A β -647). En el presente trabajo tanto el método de análisis de datos como los parámetros de interés estudiados representan una importante innovación respecto a otros estudios previos que utilizan sensores de biotioles fluorogénicos. De esta forma, en trabajos anteriores se mide la intensidad de fluorescencia total alcanzada y/o el área bajo la curva de la reacción fluorogénica, como parámetro relacionado con los niveles de biotioles.³⁰ Sin embargo, nosotros nos enfocamos en la cinética real de la reacción fluorogénica extrayendo de esta manera la tasa de aumento de fluorescencia. Para comparar el efecto causado en las células por los diferentes tipos de agregados obtenidos y con las células control, se seleccionó como parámetro de interés la velocidad máxima de reacción fluorogénica (v_{pi}), que es la velocidad en el punto de inflexión de la gráfica intensidad (I) vs. tiempo (t) (Figura II.52). Para conseguirlo, se obtuvieron las gráficas de I promedio de la sonda GG-DNBS en los puntos (píxeles) seleccionados en función del tiempo (t), y ajustamos estas gráficas a una función dosis-respuesta sigmoidea mediante la ecuación (1):

$$I = I_0 + \frac{I_{max} - I_0}{1 + 10^{p(t_{pi} - t)}} \quad (1)$$

donde I_{max} e I_0 representan los valores de intensidad final e inicial, respectivamente; t_{pi} es el tiempo del punto de inflexión; y p está relacionado con la geometría de la forma sigmoidea. Derivando la ecuación (1), obtuvimos la velocidad de la reacción fluorogénica (v) en cada punto de tiempo:

$$v = \left(\frac{dI}{dt} \right) = \frac{\ln(10) \cdot (I_{max} - I_0) \cdot p \cdot 10^{p \cdot (t_{pi} - t)}}{\left[1 + 10^{p \cdot (t_{pi} - t)} \right]^2} \quad (2)$$

Esta ecuación (2) se puede evaluar en $t = t_{pi}$ para obtener la velocidad en el punto de inflexión (v_{pi}):

2.3. Resultados

$$v_{pi} = \left(\frac{dI}{dt} \right)_{t_{pi}} = \frac{\ln(10) \cdot (I_{max} - I_0) \cdot p}{4} \quad (3)$$

La v_{pi} es un parámetro robusto que se puede comparar directamente entre los diferentes experimentos llevados a cabo, y que se puede relacionar con los niveles intracelulares de biotioles. En la Figura II.53 se muestran diferentes ejemplos representativos de estos experimentos. De esta forma se puede observar la reacción fluorogénica de la sonda al detectar biotioles en el interior celular tanto de la célula control en ausencia de agregados (Figura II.53A) como en células a las que se les añadieron agregados de A β -647 incubados durante 24 y 48 h (Figura II.53B y II.53C, respectivamente). En las imágenes se muestra cómo la sonda difunde a través de la membrana plasmática hasta el citosol, y genera fluorescencia al reaccionar con biotioles, provocando un claro incremento en la emisión fluorescente conforme avanza el tiempo. En las imágenes que muestran células con adición de agregados de A β -647 se puede visualizar claramente cómo los agregados rodean la membrana plasmática en tan sólo unos minutos. Conforme avanza el tiempo, el tamaño de los acúmulos de agregados que interactúan con las células se incrementa considerablemente, lo que resulta consistente con los resultados descritos previamente.

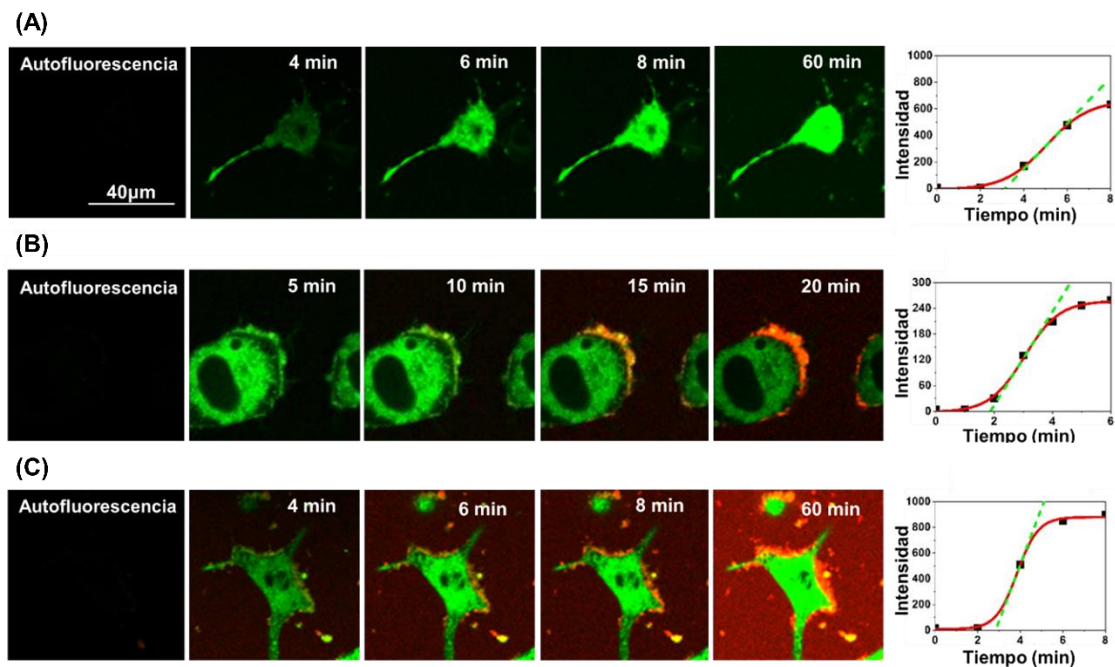


Figura II.53. Imágenes representativas de los ensayos de estrés celular llevados a cabo con la sonda de biotioles (canal verde) en células control sin agregados (A), o con la adición de agregados de A β -647 (canal rojo) previamente incubados durante 24 h (B) o 48 h (C). Los gráficos de la columna de la derecha representan la intensidad media de los píxeles seleccionados de la sonda de biotioles (puntos negros) en

2.3. Resultados

función del tiempo junto con la función sigmoidea ajustada (curva roja) y la pendiente en el punto de inflexión (línea verde discontinua). La barra de escala representa 40 μm .

Se llevaron a cabo varias repeticiones tanto para las células control como para aquellas células a las que se añadieron agregados incubados a diferentes tiempos. En la Figura II.54 se pueden ver ejemplos representativos de estos resultados. Para cada tiempo de incubación medido se hicieron entre 3 y 7 repeticiones usando diferentes cultivos celulares de la línea celular N2a y diferentes preparaciones de agregados fluorescentes para asegurar la reproducibilidad de los resultados.

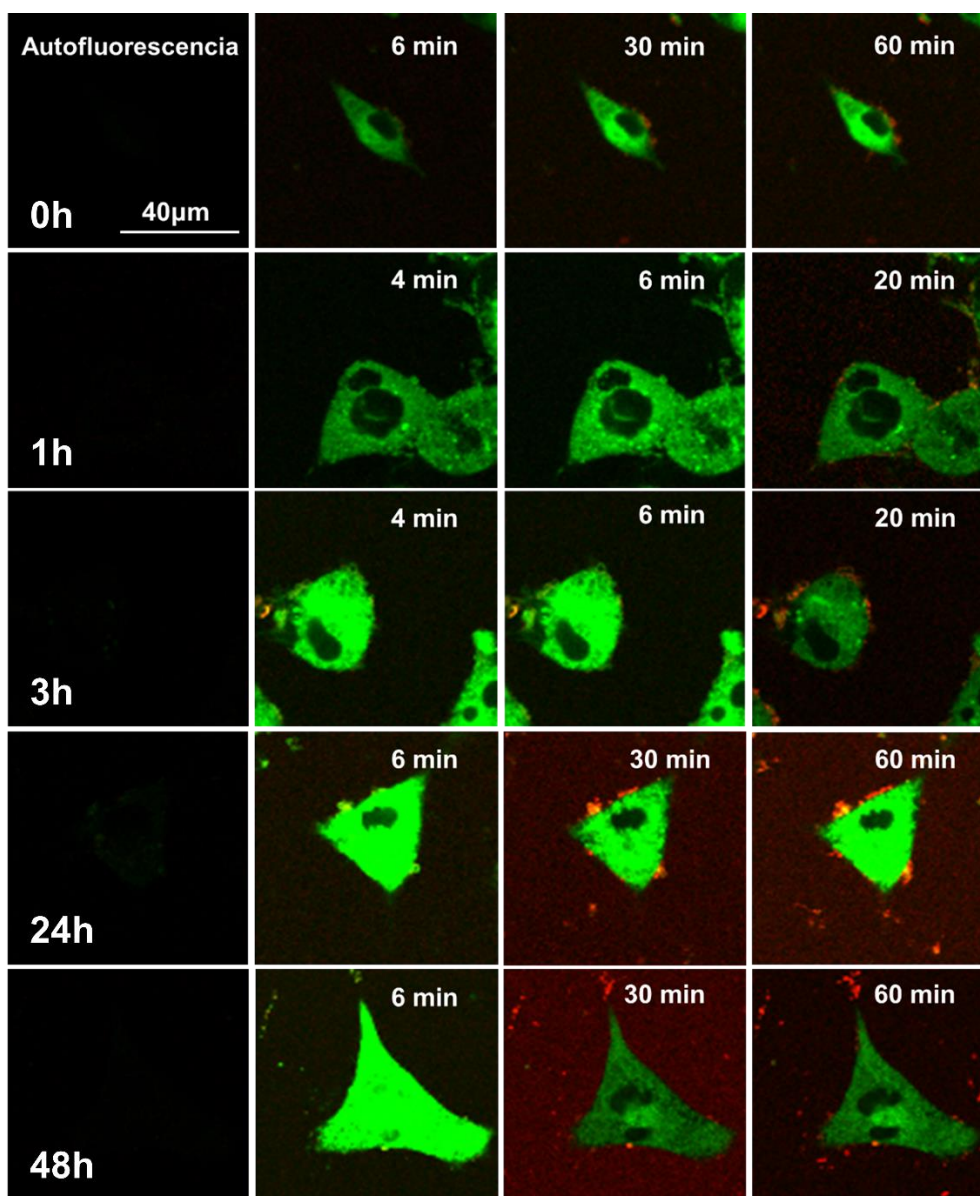


Figura II.54. Ejemplos adicionales de los ensayos de estrés celular con la sonda de biotioles (canal verde), tras la adición de agregados de $\text{A}\beta\text{-647}$ previamente incubados (canal rojo). Las imágenes son ejemplos representativos del efecto de los agregados de $\text{A}\beta\text{-647}$ incubados durante 0, 1, 3, 24 y 48 h. La barra de escala representa 40 μm .

2.3. Resultados

Paralelamente, en la Figura II.55 se muestran los valores medios de v_{pi} obtenidos como medida de los niveles de biotioles generados en la interacción de las células N2a con los agregados A β -647 incubados a diferentes tiempos, y en los correspondientes controles que no contienen agregados. Así, pudimos observar que estos valores medios de v_{pi} fueron mucho mayores en los casos en los que se añadieron agregados incubados durante 0.5, 1, 3 y 48 h que en las células control. Asimismo, los agregados no incubados (0 h) que se añadieron a las células causaron un incremento en la v_{pi} semejante al obtenido para los controles, a pesar de que se detectó una interacción entre estos y la membrana plasmática de las células en las imágenes obtenidas (Figura II.54). Estos resultados reflejan que los agregados de A β -647 formados a los 30 minutos de incubación fueron los que generaron unos niveles de biotioles más altos en las células. De esta forma se puede correlacionar el aumento del estrés celular con el hecho de que la mayoría de las especies citotóxicas se forman durante las primeras etapas de agregación.

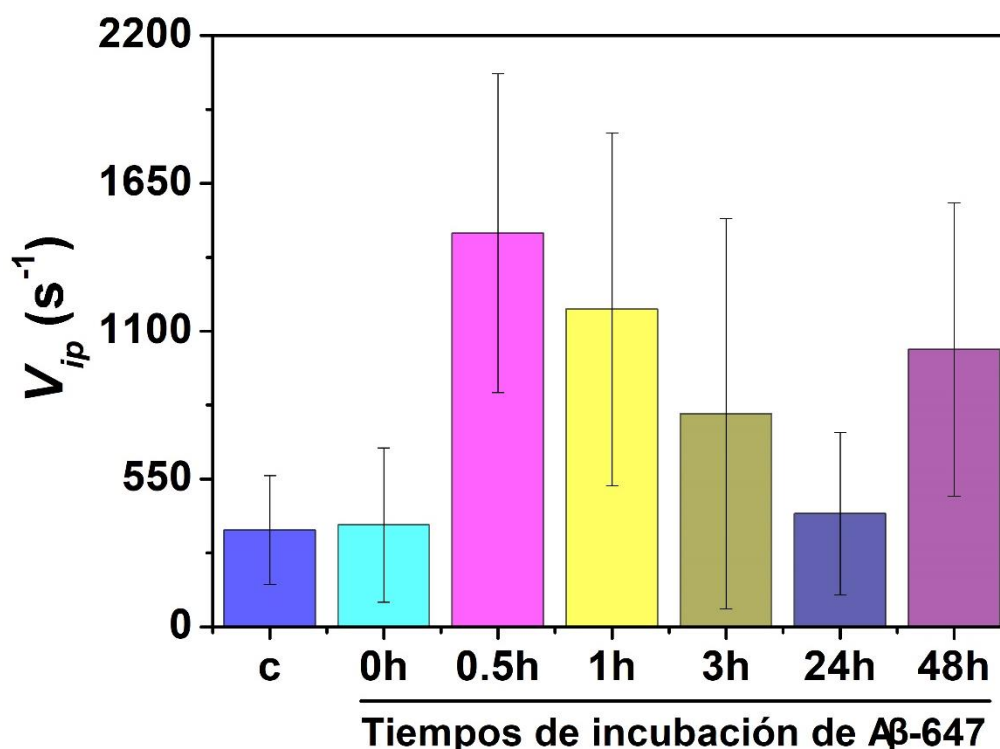


Figura II.55. Detección de biotioles en células que interactúan con agregados de A β -647 formados a diferentes tiempos de incubación. El gráfico de barras representa la velocidad media de la reacción fluorogénica de detección de biotioles en el punto de inflexión (v_{ip}) para los controles (indicado como c) y para las células que interactúan con agregados de A β -647 formados a diferentes tiempos de incubación (0, 0.5, 1, 3, 24 y 48 h). Las barras de error representan el error estándar de la media.

2.3. Resultados

Por otro lado, para entender mejor el efecto que el péptido A β -647 puede ejercer sobre las células neuronales, se llevó a cabo otro ensayo siguiendo una estrategia diferente, en la cual las células N2a interactuaban con los agregados de A β -647 durante 20 min antes de efectuar las medidas de detección de biotioles con la sonda fluorogénica. Estos experimentos confirmaron como durante el tiempo que los agregados están interactuando con las células se forman considerables acumulaciones de A β -647 en diferentes puntos de las membranas plasmáticas, hecho que resulta en consonancia con los demás resultados (Figura II.56). Sin embargo, en el estudio estadístico de los valores de v_{pi} de detección de biotioles llevado a cabo tanto para los controles como para los diferentes tiempos de incubación del péptido no encontramos resultados coherentes que se pudieran relacionar con la toxicidad asociada a las diferentes especies formadas durante los distintos tiempos de agregación, probablemente debido a que durante el tiempo de incubación previo de las células con los agregados ya se generasen las mayores cantidades de biotioles de interés, y por tanto estas no fueron medidas (Figura II.57).

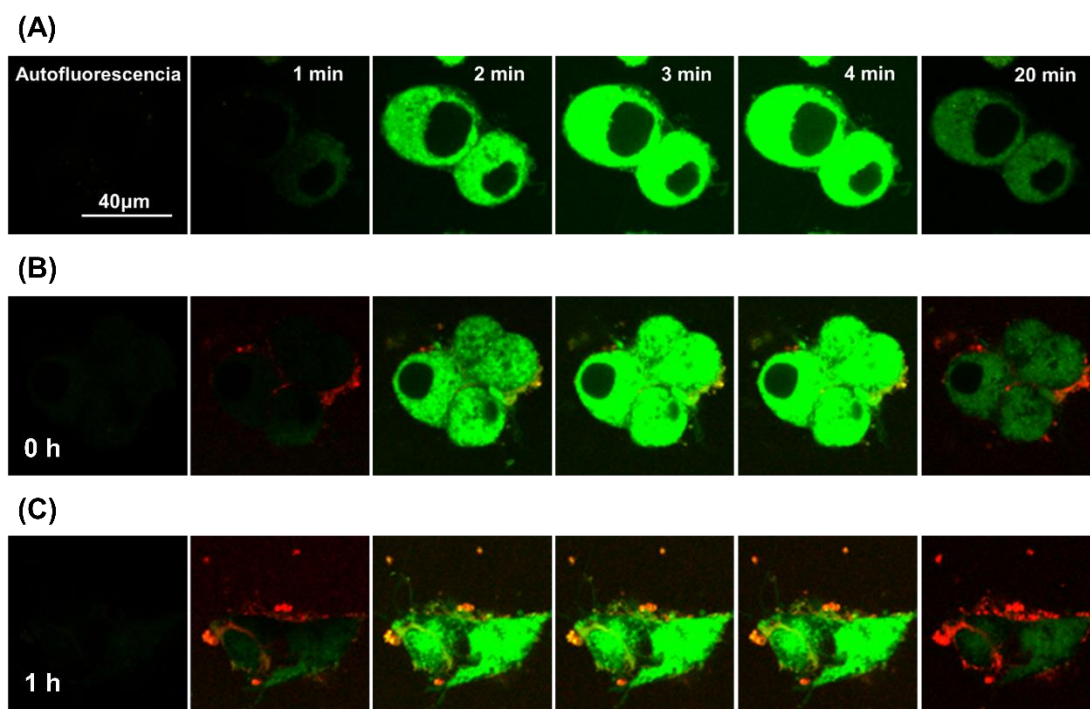


Figura II.56. Segunda estrategia llevada a cabo para el ensayo de estrés celular inducido por los agregados de A β -647. Imágenes del experimento control de células N2a a las que se le añadió la sonda de biotioles sin agregados (A). Imágenes de células N2a a las que se le añadieron agregados de A β -647 incubados durante 0 h (B) y 1 h (C).

2.3. Resultados

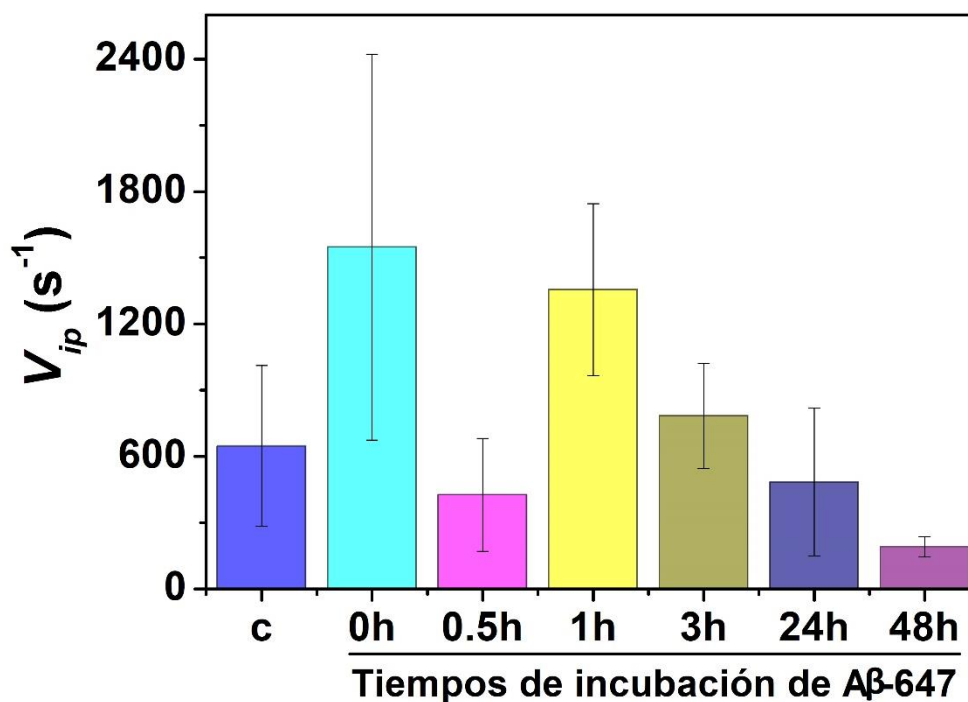


Figura II.57. Detección de biotioles en células N2a tras 20 min de interacción con agregados de Aβ-647 formados a diferentes tiempos de incubación. El gráfico de barras representa la velocidad media de la reacción fluorogénica de detección de biotioles en el punto de inflexión (v_{ip}) para los controles (indicado como c) y para las células que interactuaron durante 20 min con agregados de Aβ-647 formados a diferentes tiempos de incubación (0, 0.5, 1, 3, 24 y 48 h). Las barras de error representan el error estándar de la media.

Para correlacionar los resultados anteriormente descritos con la citotoxicidad causada por los agregados de Aβ-647 sobre las células N2a, se llevó a cabo un ensayo de viabilidad celular usando el reactivo comercial CellTiter-Blue® (Promega). Las medidas fueron realizadas por Dña. Chiara Di Biase. De esta forma se añadieron alícuotas de agregados de Aβ-647 (0.5 μM) incubados durante diferentes tiempos (0, 0.5, 1, 3, 24 y 48 h) a cultivos celulares de células N2a, y se dejaron interactuar durante 76 h. Entonces se añadió el reactivo CellTiter-Blue®, y se comparó la emisión fluorescente entre las células control y las células a las que se les había añadido agregados. En todos los casos la adición de Aβ-647 causó un descenso en la viabilidad celular de entre el 11.6 y el 43.3 %. Posteriormente llevamos a cabo un estudio estadístico para detectar las posibles diferencias significativas en la toxicidad producida por los diferentes agregados, utilizando el test de Holm-Bonferroni, y encontramos que la viabilidad de las células que interactuaron con los agregados incubados durante 1 h fue significativamente más baja que aquellas que habían estado interactuando con agregados incubados durante 0.5, 3 y 24 h, con un intervalo de confianza del 95% (Figura II.58). Estos resultados sugieren

2.3. Resultados

que los agregados de A β -647 son moderadamente tóxicos para las células N2a. Estos valores están en consonancia con estudios previos de toxicidad del péptido A β que interactúa con células N2a, los cuales reportaron unos valores de viabilidad de casi el 50 % para una concentración de péptido mucho más alta (10 μ M) que la utilizada en nuestros ensayos.³¹ Respecto a la toxicidad con otras líneas celulares, también se puede comprobar como agregados de A β ₄₂ (10 μ M) que fueron previamente incubados durante 24 h a 37 ° C provocaron una reducción en la viabilidad celular de casi el 20 % en células neuroblastomas SH-SY5Y.³² Por otra parte, este efecto fue aún mayor en células neuronales primarias de embriones de ratas E16, a las que se les añadieron agregados de A β ₄₂ (20 μ M), provocando una reducción en la viabilidad celular del 65 %.

33

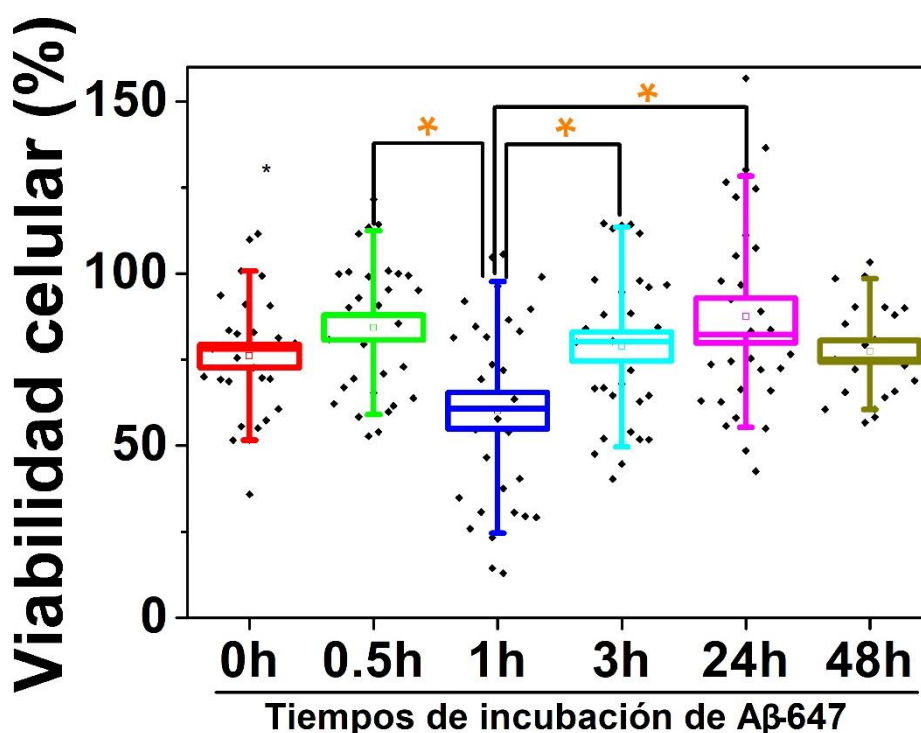


Figura II.58. Gráfico de cajas y bigotes que representa la viabilidad de las células N2a tras la adición de agregados de A β -647 (0.5 μ M) incubados durante diferentes tiempos, expresado como porcentaje de viabilidad celular en comparación con el de las células control en ausencia de agregados, para las que se asume una viabilidad del 100%. Los recuadros representan el error estándar de la media y los bigotes representan el 90% de los resultados. Los asteriscos naranjas indican poblaciones que son significativamente diferentes entre sí, con un intervalo de confianza del 95%.

Con el fin de obtener información adicional respecto al efecto que los diferentes agregados de A β -647 formados ejercen sobre las células neuronales N2a, se

2.3. Resultados

aprovecharon las ventajas que presenta la sonda GG-DNBS al ser un sensor dual capaz de medir simultáneamente los niveles de biotioles generados intracelularmente y de detectar cambios en los niveles globales de aniones fosfato, mediante el análisis del τ_F del fluoróforo liberado (τ_{sonda}) en la reacción fluorogénica.³⁴ De esta forma el fragmento fluorescente liberado sufre cambios en su τ_{sonda} , influenciado por la presencia de aniones fosfato, que promueven una reacción de transferencia de protones en el estado excitado del fluoróforo. Por consiguiente, se llevó a cabo un análisis del τ_{sonda} de las imágenes FLIM obtenidas en los experimentos anteriores, determinando así posibles cambios en los niveles de fosfato intracelulares tras la interacción con agregados de A β -647. La Figura II.59 muestra imágenes FLIM del τ_{sonda} a lo largo del tiempo (hasta 1 h) dentro de las células control y de las células tratadas con agregados de A β -647 incubados durante 24 y 48 h, proporcionando de esta forma una visión global de los niveles de fosfato presentes en el interior de la célula. En este último caso (células tratadas con agregados del péptido incubado durante 48 h), podemos ver que los cambios en el τ_{sonda} se producen hacia el final del período estudiado, disminuyendo su valor como se puede apreciar en la escala de color arbitraria de las imágenes. Este hallazgo sugiere un aumento en las concentraciones globales de iones fosfato, que puede estar causado por la incorporación al citoplasma de medio extracelular enriquecido con fosfato proveniente de otras células previamente permeabilizadas y lisadas.

2.3. Resultados

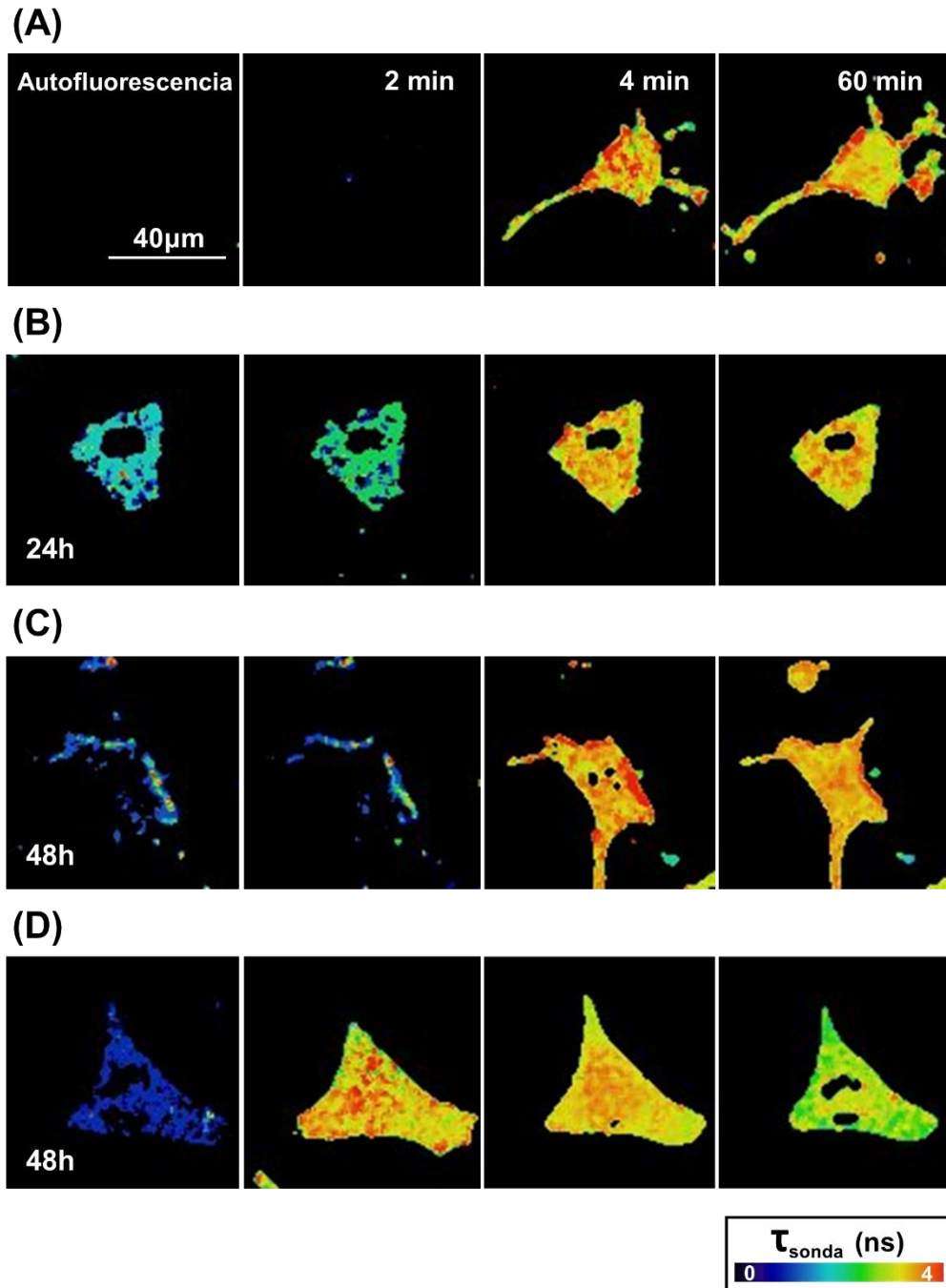


Figura II.59. Imágenes FLIM del fluoróforo liberado tras la reacción fluorogénica de GG-DNBS con biotioles en células N2a sin (A) y con la adición de agregados de A β -647 incubados durante 24 h (B) y 48 h (C y D). La escala arbitraria de colores representa τ_{sonda} entre 0 y 4 ns.

Los resultados de esta sección junto con los de la sección anterior (2.4.5) proporcionan una visión amplia, a través de herramientas de microscopía avanzada, para caracterizar y entender el efecto que los agregados amiloides de péptido A β ₄₂ ejercen sobre las células. Mediante PIE-FLIM hemos visualizado la interacción directa de los agregados

2.3. Resultados

de A β ₄₂ con la membrana celular, actuando como centros de nucleación para el reclutamiento de más agregados en función del tiempo, y resultando en la lisis celular. Además, también hemos explorado la toxicidad celular en tiempo real y a nivel de célula única mediante la monitorización del proceso completo de interacción del péptido con neuronas a lo largo del tiempo, y mediante la evaluación del estrés celular generado a través de la velocidad de la reacción fluorogénica de una sonda de biotioles. Los agregados incubados durante 30 min resultaron ser los que generaban niveles de biotioles más altos, correlacionándose estos resultados con la citotoxicidad causada en los cultivos celulares, medida con técnicas clásicas de biología celular.

2.3.7. Referencias

1. Jurado, R.; Castello, F.; Bondia, P.; Casado, S.; Flors, C.; Cuesta, R.; Dominguez-Vera, J. M.; Orte, A.; Galvez, N., Apoferritin fibers: a new template for 1D fluorescent hybrid nanostructures. *Nanoscale* **2016**, *8* (18), 9648-9656.
2. Jurado, R.; Adamcik, J.; López-Haro, M.; González-Vera, J. A.; Ruiz-Arias, Á.; Sánchez-Ferrer, A.; Cuesta, R.; Domínguez-Vera, J. M.; Calvino, J. J.; Orte, A.; Mezzenga, R.; Gálvez, N., Apoferritin Protein Amyloid Fibrils with Tunable Chirality and Polymorphism. *J. Am. Chem. Soc.* **2019**, *141* (4), 1606-1613.
3. Gonzalez-Vera, J. A.; Fueyo-Gonzalez, F.; Alkorta, I.; Peyressatre, M.; Morris, M. C.; Herranz, R., Highly solvatochromic and tunable fluorophores based on a 4,5-quinolimide scaffold: novel CDK5 probes. *Chem. Commun.* **2016**, *52* (62), 9652-9655.
4. Fueyo-González, F.; González-Vera, J. A.; Alkorta, I.; Infantes, L.; Jimeno, M. L.; Aranda, P.; Acuña-Castroviejo, D.; Ruiz-Arias, A.; Orte, A.; Herranz, R., Environment-Sensitive Probes for Illuminating Amyloid Aggregation In Vitro and in Zebrafish. *ACS Sensors* **2020**, *5*, 2792-2799.
5. Wan, W.; Zeng, L.; Jin, W.; Chen, X.; Shen, D.; Huang, Y.; Wang, M.; Bai, Y.; Lyu, H.; Dong, X.; Gao, Z.; Wang, L.; Liu, X.; Liu, Y., A Solvatochromic Fluorescent Probe Reveals Polarity Heterogeneity upon Protein Aggregation in Cells. *Angew Chem Int Ed Engl* **2021**, *60* (49), 25865-25871.
6. Fueyo-González, F.; Fernández-Gutiérrez, M.; García-Puentes, D.; Orte, A.; González-Vera, J. A.; Herranz, R., Naphthalimide-based macrophage nucleus imaging probes. *Eur. J. Med. Chem.* **2020**, *200*, 112407.
7. Ruiz-Arias, Á.; Jurado, R.; Fueyo-González, F.; Herranz, R.; Gálvez, N.; González-Vera, J. A.; Orte, A., Selecting FRET pairs for visualizing amyloid aggregation. *Results in Chemistry* **2022**, *4*, 100275.
8. Sabate, R.; Rodríguez-Santiago, L.; Sodupe, M.; Saupe, S. J.; Ventura, S., Thioflavin-T excimer formation upon interaction with amyloid fibers. *Chem. Commun.* **2013**, *49* (51), 5745-5747.
9. Mohammad, M.; Al Rasid Gazi, H.; Pandav, K.; Pandya, P.; Islam, M. M., Evidence for Dual Site Binding of Nile Blue A toward DNA: Spectroscopic, Thermodynamic, and Molecular Modeling Studies. *ACS Omega* **2021**, *6* (4), 2613-2625.
10. Taniguchi, M.; Lindsey, J. S., Database of Absorption and Fluorescence Spectra of >300 Common Compounds for use in PhotochemCAD. *Photochem. Photobiol.* **2018**, *94* (2), 290-327.
11. Jurado, R.; Gálvez, N., Apoferritin Amyloid-Fibril Directed the In Situ Assembly and/or Synthesis of Optical and Magnetic Nanoparticles. *Nanomaterials (Basel)* **2021**, *11* (1).
12. Mora, A. K.; Murudkar, S.; Alamelu, A.; Singh, P. K.; Chattopadhyay, S.; Nath, S., Benzothiazole-Based Neutral Ratiometric Fluorescence Sensor for Amyloid Fibrils. *Chemistry* **2016**, *22* (46), 16505-16512.
13. Li, C.; Yang, L.; Han, Y.; Wang, X., A simple approach to quantitative determination of soluble amyloid- β peptides using a ratiometric fluorescence probe. *Biosens Bioelectron* **2019**, *142*, 111518.
14. Freire, S.; Rodríguez-Prieto, F.; Ríos Rodríguez, M. C.; Penedo, J. C.; Al-Soufi, W.; Novo, M., Towards Ratiometric Sensing of Amyloid Fibrils In Vitro. *Chemistry – A European Journal* **2015**, *21* (8), 3425-3434.
15. Zhang, J. D.; Mei, J.; Hu, X. L.; He, X. P.; Tian, H., Ratiometric Detection of β -Amyloid and Discrimination from Lectins by a Supramolecular AIE Glyconanoparticle. *Small* **2016**, *12* (47), 6562-6567.
16. Torra, J.; Bondia, P.; Gutierrez-Erlandsson, S.; Sot, B.; Flors, C., Long-term STED imaging of amyloid fibers with exchangeable Thioflavin T. *Nanoscale* **2020**, *12* (28), 15050-15053.

2.3. Resultados

17. Yu, Y.; Jans, D. C.; Winblad, B.; Tjernberg, L. O.; Schedin-Weiss, S., Neuronal A β 42 is enriched in small vesicles at the presynaptic side of synapses. *Life Sci Alliance* **2018**, *1* (3), e201800028.
18. Lee, D.; Kim, S. M.; Kim, H. Y.; Kim, Y., Fluorescence Chemicals To Detect Insoluble and Soluble Amyloid- β Aggregates. *ACS Chem. Neurosci.* **2019**, *10* (6), 2647-2657.
19. Aliyan, A.; Cook, N. P.; Martí, A. A., Interrogating Amyloid Aggregates using Fluorescent Probes. *Chem. Rev.* **2019**, *119* (23), 11819-11856.
20. Novo, M.; Freire, S.; Al-Soufi, W., Critical aggregation concentration for the formation of early Amyloid- β (1–42) oligomers. *Scientific Reports* **2018**, *8* (1), 1783.
21. Ito, N.; Tsuji, M.; Adachi, N.; Nakamura, S.; Sarkar, A. K.; Ikenaka, K.; Aguirre, C.; Kimura, A. M.; Kiuchi, Y.; Mochizuki, H.; Teplow, D. B.; Ono, K., Extracellular high molecular weight α -synuclein oligomers induce cell death by disrupting the plasma membrane. *npj Parkinson's Disease* **2023**, *9* (1), 139.
22. Treusch, S.; Cyr, D. M.; Lindquist, S., Amyloid deposits: protection against toxic protein species? *Cell Cycle* **2009**, *8* (11), 1668-74.
23. Cheng, I. H.; Scarce-Levie, K.; Legleiter, J.; Palop, J. J.; Gerstein, H.; Bien-Ly, N.; Puoliväli, J.; Lesné, S.; Ashe, K. H.; Muchowski, P. J.; Mucke, L., Accelerating amyloid-beta fibrillization reduces oligomer levels and functional deficits in Alzheimer disease mouse models. *J Biol Chem* **2007**, *282* (33), 23818-28.
24. Gracia, P.; Camino, J. D.; Volpicelli-Daley, L.; Cremades, N., Multiplicity of α -Synuclein Aggregated Species and Their Possible Roles in Disease. *Int J Mol Sci* **2020**, *21* (21).
25. Chen, S. W.; Drakulic, S.; Deas, E.; Ouberai, M.; Aprile, F. A.; Arranz, R.; Ness, S.; Roodveldt, C.; Guilliams, T.; De-Genst, E. J.; Klenerman, D.; Wood, N. W.; Knowles, T. P. J.; Alfonso, C.; Rivas, G.; Abramov, A. Y.; Valpuesta, J. M.; Dobson, C. M.; Cremades, N., Structural characterization of toxic oligomers that are kinetically trapped during α -synuclein fibril formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2015**, *112* (16), E1994-E2003.
26. Castello, F.; Paredes, J. M.; Ruedas-Rama, M. J.; Martín, M.; Roldan, M.; Casares, S.; Orte, A., Two-Step Amyloid Aggregation: Sequential Lag Phase Intermediates. *Sci Rep* **2017**, *7*, 40065.
27. Cremades, N.; Cohen, S. I.; Deas, E.; Abramov, A. Y.; Chen, A. Y.; Orte, A.; Sandal, M.; Clarke, R. W.; Dunne, P.; Aprile, F. A.; Bertocini, C. W.; Wood, N. W.; Knowles, T. P.; Dobson, C. M.; Klenerman, D., Direct observation of the interconversion of normal and toxic forms of α -synuclein. *Cell* **2012**, *149* (5), 1048-59.
28. De, S.; Wirthensohn, D. C.; Flagmeier, P.; Hughes, C.; Aprile, F. A.; Ruggeri, F. S.; Whiten, D. R.; Emin, D.; Xia, Z.; Varela, J. A.; Sormanni, P.; Kundel, F.; Knowles, T. P. J.; Dobson, C. M.; Bryant, C.; Vendruscolo, M.; Klenerman, D., Different soluble aggregates of A β 42 can give rise to cellular toxicity through different mechanisms. *Nature Communications* **2019**, *10* (1), 1541.
29. Baba, S. P.; Bhatnagar, A., ROLE OF THIOLS IN OXIDATIVE STRESS. *Curr Opin Toxicol* **2018**, *7*, 133-139.
30. Puente-Muñoz, V.; Paredes, J. M.; Resa, S.; Vílchez, J. D.; Zitnan, M.; Miguel, D.; Girón, M. D.; Cuerva, J. M.; Salto, R.; Crovetto, L., New Thiol-Sensitive Dye Application for Measuring Oxidative Stress in Cell Cultures. *Sci Rep* **2019**, *9* (1), 1659.
31. Daniels, W. M.; Hendricks, J.; Salie, R.; Taljaard, J. J., The role of the MAP-kinase superfamily in beta-amyloid toxicity. *Metab Brain Dis* **2001**, *16* (3-4), 175-85.
32. Morel, B.; Carrasco, M. P.; Jurado, S.; Marco, C.; Conejero-Lara, F., Dynamic micellar oligomers of amyloid beta peptides play a crucial role in their aggregation mechanisms. *Phys Chem Chem Phys* **2018**, *20* (31), 20597-20614.
33. Castelletto, V.; Ryumin, P.; Cramer, R.; Hamley, I. W.; Taylor, M.; Allsop, D.; Reza, M.; Ruokolainen, J.; Arnold, T.; Hermida-Merino, D.; Garcia, C. I.; Leal, M. C.; Castaño, E., Self-

2.3. Resultados

Assembly and Anti-Amyloid Cytotoxicity Activity of Amyloid beta Peptide Derivatives. *Scientific Reports* **2017**, 7 (1), 43637.

34. Resa, S.; Orte, A.; Miguel, D.; Paredes, J. M.; Puente-Muñoz, V.; Salto, R.; Giron, M. D.; Ruedas-Rama, M. J.; Cuerva, J. M.; Alvarez-Pez, J. M.; Crovetto, L., New Dual Fluorescent Probe for Simultaneous Biothiol and Phosphate Bioimaging. *Chemistry* **2015**, 21 (42), 14772-9.

2.4. Conclusiones

2.4. Conclusiones Bloque II

Las conclusiones del Bloque II de esta tesis doctoral centrado en el proceso de agregación amiloide de la apoferritina y la interacción citotóxica de agregados del péptido A β con células neuronales pueden resumirse en:

1. Se ha comprobado que el compuesto 9-azetidil-quinolimida (**AQui**) es el mejor candidato entre todos los estudiados como sensor de agregación de la apoferritina. Sin embargo, el empleo de **AQui** como único fluoróforo no ha permitido seguir con fiabilidad el proceso de agregación proteica mediante microscopía de fluorescencia convencional y FLIM.
2. Se ha llevado a cabo un estudio para seleccionar el par FRET de fluoróforos más adecuado que permita seguir el proceso de agregación de la apoferritina, concluyéndose que el par **ThT**→**AQui** no se puede emplear para tal fin. Sin embargo, el par **AQui**→**NBA** ha demostrado reunir las características apropiadas para utilizarse como sensor de la agregación proteica.
3. El par **AQui**→**NBA** ha sido capaz de seguir el proceso de agregación amiloide de la apoferritina mediante microscopía de fluorescencia convencional y FLIM. Se han diferenciado distintos tipos de agregados dependiendo del tiempo de incubación de la proteína a través del análisis ratiométrico de las imágenes de intensidad de fluorescencia obtenidas (I_G/I_R) y del análisis del τ_F de **AQui**.
4. Las imágenes de superresolución STED de fibras maduras de apoferritina obtenidas ofrecen una resolución más alta que las imágenes de microscopía de fluorescencia convencional, por lo que el empleo de la microscopía STED permite estudiar las estructuras amiloides formadas tras 24 h de incubación con mayor precisión.
5. El estudio de la interacción y el efecto citotóxico de agregados de A β con la membrana celular mediante microscopía FLIM ha demostrado que existen dos tipos de poblaciones de agregados con diferente toxicidad celular.
6. El estudio del estrés celular generado por los agregados de A β en células neuronales con una sonda de biotioles mediante microscopía FLIM sugiere que los agregados formados a 0.5 h de incubación son los que más niveles de

2.4. Conclusiones

biotioles generan y, por tanto, los que provocan un mayor estrés en las células neuronales.

3. Materiales y métodos

3. Materiales y métodos

Espectroscopía UV-vis. Los espectros de absorción UV-visible de los compuestos **CAnt**, **PAnt**, **AQui**, **ThT** y **NBA** se registraron en un espectrofotómetro UV-visible Lambda 650 (PerkinElmer, Waltham, MA, EE.UU.) provisto con el software UV WinLab. Para ello se utilizaron cubetas de cuarzo (1 cm de paso óptico).

Luminiscencia en estado estacionario. Los espectros de emisión de luminiscencia en estado estacionario se obtuvieron en un espectrofluorímetro Jasco FP-8300 (Jasco, Tokio, Japón).

*Determinación de los espectros de emisión de fluorescencia de las antenas **CAnt** y **PAnt** (Bloque I, sección 1.3.1).* Los espectros se determinaron en cubetas de cuarzo (1 cm de paso óptico) con disoluciones de los compuestos **CAnt** y **PAnt** (25 μM) en H_2O o CH_3CN . Los espectros se registraron entre 330 y 900 nm (con incremento de 1 nm y tiempo de respuesta de 1 s) con $\lambda_{\text{ex}} = 320$ nm. La anchura de las rendijas se fijó en 2.5 nm para la excitación y en 2.5 nm para la emisión. Todos los espectros se corrigieron para detectar la fluorescencia de fondo restando la medida de la emisión del disolvente correspondiente solo (sin compuesto), considerada como blanco, y también fueron corregidos espectralmente utilizando patrones de fluorescencia certificados. Las mismas condiciones instrumentales fueron empleadas para registrar los espectros de emisión de luminiscencia en el cribado de las antenas con los diferentes lantánidos y en las valoraciones de los complejos $\text{Tb}^{3+}:\text{CAnt}$, $\text{Eu}^{3+}:\text{PAnt}$ y $\text{Tb}^{3+}:\text{PAnt}$.

*Determinación de los espectros de emisión de fluorescencia de los compuestos derivados de quinolimida y naftalimida y de los compuestos **ThT** y **NBA**. (Bloque II, secciones 2.3.1 y 2.3.3).* Para los experimentos de cribado de compuestos fluorescentes derivados de quinolimida y naftalimida como indicadores de agregación proteica los diferentes fluoróforos (5 μM) se añadieron a alícuotas de muestras de apoferritina (30 μM) incubada durante 24 h. Los espectros de emisión de fluorescencia se obtuvieron a las longitudes de onda de excitación de $\lambda_{\text{ex}} = 470$ nm y $\lambda_{\text{ex}} = 485$ nm, para la excitación preferencial del compuesto **AQui**. Para los ensayos de pares FRET los fluoróforos se añadieron a las alícuotas de muestras de apoferritina (30 μM) incubadas durante diferentes tiempos (1 h, 3 h, 9 h y 24 h) a una concentración de 10 μM para **AQui**, 10 μM para la **ThT** y 10 μM para el **NBA**, y a continuación se obtuvo el espectro de fluorescencia. Dado que los fluoróforos se añadieron justo antes de las medidas, su

3. Materiales y métodos

fotoestabilidad no se vio comprometida por el tiempo de agregación de la proteína. De hecho, tanto **AQui** como **NBA** mostraron una excelente fotoestabilidad en condiciones de irradiación continua (Figura III.1):

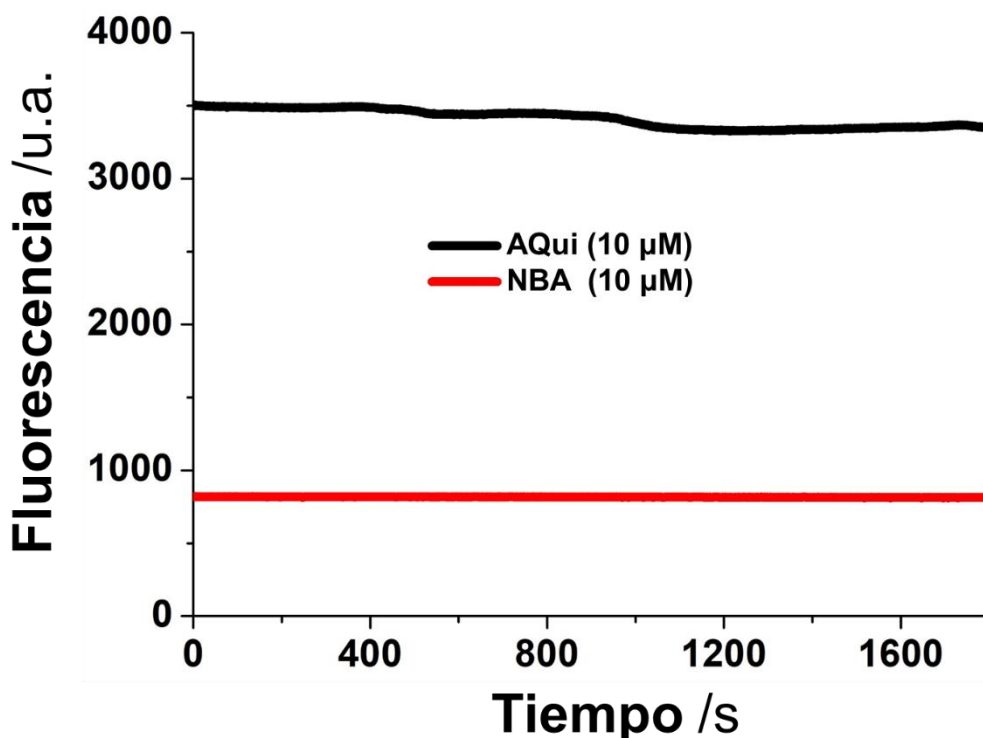


Figura III.1. Experimentos de fotoestabilidad a lo largo del tiempo (30 min) mediante irradiación continua, a $\lambda_{\text{ex}} = 485 \text{ nm}$ y $\lambda_{\text{em}} = 583 \text{ nm}$ para **AQui**, y $\lambda_{\text{ex}} = 635 \text{ nm}$ y $\lambda_{\text{em}} = 661 \text{ nm}$ para el **NBA**. Los experimentos se llevaron a cabo utilizando dioxano como disolvente.

Determinación de los rendimientos cuánticos de fluorescencia. Los rendimientos cuánticos de fluorescencia (Φ_F) de los derivados de quinolin-2(1H)-ona **CAnt** y **PAnt** se determinaron en H_2O o CH_3CN y se calcularon utilizando sulfato de quinina dihidratado (en H_2SO_4 0.1 M) como referencia.¹⁻³ La concentración de la muestra y de la referencia se fijó para asegurar que la absorbancia fuera inferior a 0.1 a longitudes de onda de excitación idénticas. Para calcular el rendimiento cuántico se utilizó la siguiente ecuación:

$$\Phi_F = \frac{I_x * A_r * n_x^2 * \phi_r}{I_r * A_x * n_r^2}$$

donde x y r denotan la muestra y la referencia, respectivamente, A es la absorción a la longitud de onda de excitación ($\lambda_{\text{ex}} = 320 \text{ nm}$), I es la intensidad de fluorescencia

3. Materiales y métodos

integrada, n es el índice de refracción del disolvente y Φ_r es el rendimiento cuántico de la referencia.

Fotoluminiscencia con ventana temporal. Los espectros de emisión de fosforescencia se recogieron en un espectrofotómetro de fluorescencia Varian Cary Eclipse a temperatura ambiente utilizando las siguientes condiciones: $\lambda_{ex} = 320$ nm, tiempo total de decaimiento 20.0 ms, tiempo de retardo 0.2 ms, ventana temporal 5.0 ms, número de destellos = 1 y $\lambda_{em} = 545$ nm para el Tb^{3+} y 616 nm para el Eu^{3+} .

Determinación de los tiempos de vida de luminiscencia. Los experimentos de obtención de los tiempos de vida de fluorescencia (τ_F) de los complejos de lantánidos se llevaron a cabo en un espectrofotómetro Varian Cary Eclipse a temperatura ambiente utilizando las siguientes condiciones: $\lambda_{ex} = 320$ nm, $\lambda_{em} = 545$ nm para el Tb^{3+} o 615 nm para el Eu^{3+} , anchura de la rendija de excitación 20.0 nm, anchura de la rendija de emisión 20.0 nm, tiempo total de decaimiento 5.0 ms, tiempo de retardo 0.1 ms, ventana temporal 0.2 ms, número de ciclos 20, número de destellos 50, voltaje del detector PMT 600 V. Las mediciones se realizaron por triplicado.

Obtención de la emisión de luz blanca. Para obtener la emisión de luz blanca pura en disolución acuosa, mezclamos diferentes concentraciones de ligando **PAnt**, $EuCl_3$ y $TbCl_3$, en tampón HEPES acuoso (0.94 mM). Para todas las mezclas ensayadas, recogimos los espectros de emisión ($\lambda_{ex} = 375$ nm) en una cubeta de cuarzo de 1 cm de paso, realizamos la corrección espectral y luego los transferimos al diagrama de cromaticidad CIE 1931 para comprobar sus coordenadas utilizando el software OriginPro 2021. Se realizaron diferentes ciclos de ensayo y error hasta alcanzar la emisión de luz blanca pura. Una vez obtenidas las coordenadas CIE 1931 para una determinada mezcla, se ajustaban las concentraciones de los diferentes componentes teniendo en cuenta que el aumento de la concentración de **PAnt** desplazaba las coordenadas hacia la región del azul, el aumento de Tb^{3+} hacia la región del verde y el aumento de Eu^{3+} hacia la región del rojo. En este ajuste también hubo que tener en cuenta que, para mantener la contribución de la antena hacia el azul, la concentración de **PAnt** debía estar por debajo de las condiciones de saturación para la formación de los complejos. Para obtener la emisión de luz blanca pura en geles de agarosa se llevó a cabo un proceso similar al realizado en la obtención de luz blanca en disoluciones acuosas, sustituyendo las soluciones acuosas de tampón HEPES por geles de agarosa al 1% y modulando ligeramente las concentraciones del compuesto **PAnt** y de los lantánidos añadidos. Como la emisión en geles presentaba un mayor desplazamiento hacia el azul que en disoluciones acuosas, se necesitaron concentraciones más bajas

3. Materiales y métodos

del ligando **PAnt**. Para la preparación de los geles de agarosa, se pesaron 0.01 g de agarosa para cada muestra ensayada, y se transfirieron a un vial de vidrio junto con 1 ml de tampón HEPES (0.94 mM) a pH 7.4. A continuación, se colocó el vial en un vaso de precipitado con agua y se calentó hasta llegar al punto de ebullición en el microondas. Seguidamente se agitó el vial en un vórtex y se calentó hasta llegar al punto de ebullición por segunda vez en el microondas. Después el vial se enfrió a temperatura ambiente hasta alcanzar los 50°C, considerada como la temperatura de trabajo. La disolución de gel, el compuesto **PAnt**, el Tb³⁺ y el Eu³⁺ se mezclaron cuidadosamente en un tubo Eppendorf, y luego se transfirieron a una cubeta de cuarzo hasta la gelificación.

Preparación de los cultivos celulares. Los cultivos celulares fueron realizados por la Dra. María Dolores Girón González en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Granada.

Preparación de los cultivos celulares (Bloque I, sección 1.3.4). Las células de riñón embrionario humano 293 (HEK-293; ATCC CRL-1573™) fueron suministradas por el Servicio de Cultivos Celulares (Universidad de Granada, España). Las células se cultivaron a 37 °C en medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM, por sus siglas en inglés *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) suplementado con 10% (v/v) de suero bovino fetal (FBS), 2 mM de glutamina, 100 U/mL de penicilina y 0.1 mg/mL de estreptomina. Para los experimentos, las células se sembraron en un portaobjetos con cámara de microscopía de 4 pocillos a una densidad de 1.6×10⁵ células/pocillo durante 24 h hasta alcanzar una confluencia celular del 80-90%.

Preparación de los cultivos celulares (Bloque II, secciones 2.3.5 y 2.3.6). La línea celular N2a (ATCC® CCL-131™) utilizada es una línea celular que procede de neuroblastos cerebrales de *Mus musculus*, y presenta una morfología de célula madre neuronal ameboide. Las células N2a se cultivaron a 37 °C en medio DMEM de Sigma-Aldrich suplementado con un 10% de suero bovino fetal (FBS), 2 mM de glutamina, 100 U/mL de penicilina y 0.1 mg/ml de estreptomina. Para los experimentos, las células se sembraron en portaobjetos circulares de microscopía dentro de placas de cultivo de 6 pocillos.

Ensayos de citotoxicidad celular.

Ensayos de citotoxicidad celular (Bloque I, sección 1.3.4). Los ensayos de citotoxicidad celular fueron realizados por D.^a Chiara Burgio y D. Antonio Reinoso en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Granada. Se sembraron 1.6×10⁵ células/pocillo en placas de 48 pocillos y se incubaron

3. Materiales y métodos

con 0-200 μM de EuCl_3 o TbCl_3 o 0-50 μM del compuesto **PAnt**. Además, para comprobar la potencial citotoxicidad de los complejos autoensamblados, se incubaron diferentes concentraciones (0-50 μM) de Eu^{3+} o Tb^{3+} con una cantidad fija, 12.5 μM , de compuesto **PAnt**. La citotoxicidad se evaluó tras 1 o 24 h de incubación con los distintos tratamientos, utilizando el método del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-2H-tetrazolio (MTT). Los resultados mostrados en el capítulo Resultados del Bloque I (Figura I.50) se presentan como el porcentaje de viabilidad celular respecto a las células de control no tratadas, a las que se asume una viabilidad del 100%.

Ensayos de citotoxicidad celular (Bloque II, sección 2.3.6). Los ensayos de viabilidad celular se realizaron con el test comercial CellTiter-Blue™ (Promega Biotech, Madrid, España). Para los ensayos de viabilidad celular, se utilizó un espectrofluorímetro FP-8500 (Jasco), equipado con un lector de microplacas, para registrar los espectros de emisión de fluorescencia ($\lambda_{\text{ex}} = 550 \text{ nm}$) del reactivo CellTiter-Blue™ en cada pocillo. El ensayo de viabilidad CellTiter-Blue™ está basado en la reacción fluorogénica resazurina \rightarrow resorufina, y permite estudiar la citotoxicidad de los agregados de $\text{A}\beta_{42}$. La viabilidad celular de las muestras tratadas con agregados de $\text{A}\beta_{42}$ se evaluó mediante la comparación con los controles no tratados, para los que se asume una viabilidad celular del 100%. Las células se cultivaron hasta una densidad de población de 10^3 células/pocillo, en placas negras de 96 pocillos con 100 μL de DMEM más 10% de FBS por pocillo. El medio se eliminó tras 24 h de cultivo celular a 37 °C. A continuación, se añadieron a las células alícuotas de 100 μL de $\text{A}\beta_{647}$ incubadas durante diferentes tiempos durante 76 h. Por último, se añadieron 20 μL (20% v/v) del reactivo CellTiter-Blue a cada pocillo y se incubaron durante 20 min a 37 °C antes de medir la emisión de fluorescencia. Estos ensayos fueron llevados a cabo por D.^a Chiara Di Biase.

Preparación de los reactivos (Bloque II, secciones 2.3.5 y 2.3.6). El tampón SSPE (NaCl 150 mM, fosfato 10 mM y EDTA 1 mM) utilizado fue adquirido de Sigma-Aldrich (Madrid, España). Para los experimentos con células neuronales, se preparó el tampón Krebs (NaCl 130 mM, KCl 2.5 mM, NaHCO_3 25 mM, NaH_2PO_4 1.2 mM, MgCl_2 1.2 mM y CaCl_2 2.5 mM, pH 7.2). Para ajustar el pH de los tampones se utilizaron NaOH y HCl (ambos de Sigma-Aldrich). Todos los compuestos químicos se utilizaron sin ninguna purificación adicional. Se preparó una disolución madre (0.36 mM) de la sonda biotioles GG-DNBS (2,4-dinitrofenilsulfonilo de 9- [1- (4-terc-butilo -2-metoxifenil)] - 6-hidroxi-3H-xanten-3-ona) en dimetilsulfóxido (Sigma-Aldrich) a partir del compuesto en polvo. Para los experimentos de microscopía de imágenes, la sonda fluorogénica se diluyó en el tampón que contenía las células (tampón de Krebs), hasta una concentración final de 0.25 μM .

3. Materiales y métodos

Preparación de las muestras para los estudios de agregación amiloide:

Preparación de las muestras de apoferritina (Bloque II, secciones 2.3.1, 2.3.2, 2.3.3 y 2.3.4). La preparación de las muestras de apoferritina fue llevada a cabo por la Dra. Rocío Jurado Palomares. La proteína apoferritina de bazo de caballo se adquirió en Sigma-Aldrich y se utilizó sin más manipulación. Las disoluciones de proteína (0.2 % en peso) se ajustaron a pH 2 con HCl 1 M en agua Milli-Q y luego se calentaron a 90 °C en tubos de vidrio herméticamente cerrados para permitir la fibrilación amiloide como se ha descrito previamente.^{4,5} Se recogieron alícuotas de las muestras a 1 h, 3 h, 9 h y 24 h del inicio de la incubación y se enfriaron inmediatamente en un baño de agua helada para detener la conversión de monómeros en fibrillas. A continuación, estas alícuotas se etiquetaron según el tiempo de incubación, se almacenaron a 4 °C y se utilizaron para el análisis estructural sin más manipulación.

Preparación de las muestras de A β ₄₂ (Bloque II, secciones 2.3.5 y 2.3.6). Los péptidos A β ₄₂ liofilizados y marcados con los fluoróforos HiLyte Fluor 488 y HiLyte Fluor 647 (A β -488 y A β -647) se obtuvieron de Anaspec Peptide (Seraing, Bélgica). Se disolvieron un total de 0.1 mg de cada péptido en NH₃ (1%) a una concentración total de 66 μ M en tubos Eppendorf de plástico, y se sonicaron con hielo en un baño de ultrasonidos durante 30 min, distribuyéndose en alícuotas y congelándose inmediatamente en nitrógeno líquido para evitar la agregación. Los agregados de A β ₄₂ que contenían cantidades equimolares de A β -488 y A β -647 utilizados en el ensayo FRET se prepararon a una concentración total de 0.5 μ M para cada péptido en tampón SSPE (NaCl 150 mM, fosfato 10 mM y EDTA 1 mM) adquirido de Sigma-Aldrich (Madrid, España), y se incubaron durante 15 h a temperatura fisiológica (37 °C) con agitación continua (360 rpm). Los agregados de A β -647, utilizados en los experimentos de estrés celular con la sonda de biotioles, se prepararon a una concentración total de 1 μ M en tampón SSPE. Se recogieron alícuotas a diferentes tiempos de incubación (0, 0.5, 1, 3, 24 y 48 h) y se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido hasta su uso.

Microscopía electrónica de transmisión (TEM). Las imágenes TEM se registraron utilizando un microscopio TEM Libra 120 Plus (Carl Zeiss SMT, Oberkochen, Alemania) del Centro de Instrumentación Científica (CIC) de la Universidad de Granada equipado con un filamento LaB6 y una cámara de acoplamiento directo SSCCD 2 k \times 2 k, operando a 120 kV. Las imágenes TEM de muestras de apoferritina, A β -488 y A β -647 incubadas a diferentes tiempos se recogieron añadiendo alícuotas de las muestras

3. Materiales y métodos

sobre rejillas de cobre de malla 300 con una película de formvar/carbono, se lavaron dos veces con agua Milli-Q y se tiñeron con acetato de uranilo al 1% (p/v).

Dispersión dinámica de la luz (DLS). Las medidas de DLS se llevaron a cabo en un equipo Malvern Zetasizer μ V, equipado con un láser de 850 nm para evitar interferencias de fluorescencia con los péptidos A β -647. Las trazas de DLS de los agregados de A β -488 y A β -647 formados en NH₃, pH 12 tras 0 min de incubación, y en tampón SSPE, pH 7.4, tras 20 min de incubación se recogieron utilizando una cubeta de cuarzo de 2 μ L. Las medidas fueron llevadas a cabo por D. José Mata del Pino.

Obtención de imágenes celulares mediante microscopía de luminiscencia y PLIM (Bloque I, sección 1.3.4). Para la obtención de las imágenes, primero se retiró el medio de cultivo celular de cada pocillo y las células se lavaron dos veces con HEPES 50 mM. Posteriormente, se añadió a cada pocillo la mezcla del ligando **PAnt** con Eu³⁺ y/o Tb³⁺ en HEPES 50 mM a diferentes concentraciones: a) Tb³⁺ 30 μ M y **PAnt** 15 μ M; b) Eu³⁺ 30 μ M y **PAnt** 15 μ M; o c) Tb³⁺ 46 μ M, Eu³⁺ 2.1 μ M y **PAnt** 31 μ M para la emisión de luz blanca dentro de las células. La microscopía de imágenes de tiempos de vida de fotoluminiscencia (PLIM) se llevó a cabo en un microscopio Abberior Expert Line (Abberior Instruments GmbH, Alemania). Como fuente de excitación se utilizó un láser pulsado de 375 nm que funcionaba a una frecuencia de repetición de 40 MHz. Se empleó un tren de pulsos de 200 μ s para mejorar la tasa de excitación de los complejos de lantánidos,⁶ y se utilizó una ventana temporal de colección de 5.1 ms. Se utilizó un detector PMT híbrido con un filtro de paso de banda en el rango espectral de 533-558 nm para la detección de la luminiscencia de Tb³⁺ y un fotodiodo de avalancha (más sensible en la región roja) con un filtro de paso de banda en el rango espectral de 580-630 nm para la detección de Eu³⁺. El área de las imágenes obtenidas sin procesar variaba entre 40x40 μ m² y 80x80 μ m², utilizando una resolución de píxel de 150 nm/píxel, y empleando un tiempo de permanencia por píxel o *dwell time* de 5.01 ms.

Para el análisis de las imágenes PLIM, seleccionamos diferentes regiones de interés (ROI) en el núcleo o el citoplasma de las células fotografiadas, y reconstruimos las trazas de los decaimientos de los tiempos de vida de luminiscencia de los píxeles seleccionados en el software Imspector (Abberior Instruments GmbH). Estas trazas se exportaron y luego se ajustaron a funciones de decaimiento exponencial simple en Origin Pro 2021 para obtener los valores de los tiempos de vida de luminiscencia de las regiones seleccionadas. Para obtener las imágenes PLIM, las imágenes sin procesar se analizaron con el software Fiji (software de distribución de ImageJ)⁷ utilizando el complemento FLIMJ,⁸ que permite realizar el ajuste por píxel de las trazas de

3. Materiales y métodos

decaimiento mediante una función exponencial única. Por último, el mapa de los tiempos de vida de luminiscencia obtenidos mediante el ajuste por píxeles de las trazas fue representado en una escala de color arbitraria, ajustándolo además por la intensidad global mediante el uso de macros caseros (secuencias automatizadas de acciones dentro de la aplicación) de Fiji.

Las imágenes PLIM con medidas espectrales de los experimentos de obtención de luz blanca *in cellulo* se realizaron en un sistema de tiempo resuelto MicroTime 200 (PicoQuant GmbH, Alemania) basado en un microscopio de fluorescencia confocal invertido Olympus IX-71 (Olympus, Japón). Como fuente de excitación empleamos un láser de diodo pulsado (PicoQuant) a $\lambda_{\text{ex}} = 375$ nm, trabajando a una frecuencia de repetición de 80 MHz, controlado por un módulo Sepia II (PicoQuant). La emisión de fluorescencia recogida se filtró mediante un filtro de corte de 405 nm después del filtro dicróico principal (442 DCXR, AHF analysentechnik AG, Alemania) y antes de la apertura confocal de 150 μm . A continuación, la emisión se dividió en dos canales de detección utilizando un espejo dicróico 600 DCXR y se envió a dos fotodiodos de avalancha de silicio (SPCM-AQR-14, Perkin-Elmer) tras ser filtrada por un filtro de paso de banda 630/60 (Chroma) (canal del Eu^{3+}) o un filtro de paso de banda 550/40 (Thorlabs) (canal del Tb^{3+}). Para mejorar la tasa de excitación de los complejos de lantánidos se empleó un tren de pulsos de excitación de 62.5 μs a 80 MHz, y se utilizó una ventana temporal de colección de 5.062 ms

Se recogieron las imágenes PLIM de células HEK-293 con Eu^{3+} :**PAnt** y Tb^{3+} :**PAnt** con una resolución de 250x250 píxeles y un tiempo de permanencia por píxel (*dwell time*) de 3 ms/píxel. El análisis de las imágenes PLIM se realizó con el software SymphoTime 64 (PicoQuant GmbH). El sistema estaba equipado con un espectrógrafo Andor Shamrock 303i-A y una cámara CCD de multiplicación de electrones (EM-CCD) ultrasensible Andor Newton para las imágenes espectrales. Los espectros se obtuvieron apuntando el láser de excitación a diferentes regiones dentro de las células, tras haber escaneado previamente una zona específica. La luminiscencia emitida se desvió a un acoplador de fibra óptica tras el paso por la apertura confocal. El espectrógrafo tenía una rejilla de 150 líneas/mm para dispersar los fotones recogidos a diferentes longitudes de onda y enfocarlos en los píxeles de la cámara EM-CCD. Los espectros de luminiscencia se recogieron con 20 acumulaciones de lecturas de 0.5 s, con una resolución de longitud de onda de 0.351 nm.

3. Materiales y métodos

Microscopía FLIM multiparamétrica: Para adquirir las imágenes FLIM y PIE-FLIM multiparamétricas de dos colores se utilizó un sistema MicroTime 200 (PicoQuant GmbH, Berlín, Alemania).⁹ Como fuente de excitación se utilizaron dos cabezales de diodo láser pulsado a $\lambda_{ex}= 470$ nm y $\lambda_{ex} = 635$ nm, (LDH-470 U AWM Style-20236, PicoQuant, Berlín, Alemania y LDH-635 U AWM Style-20236, PicoQuant, Berlín, Alemania) operados por un driver PDL-800 (PicoQuant, Berlín, Alemania), utilizándose una frecuencia de repetición de 20 MHz. El haz láser se condujo hacia un espejo dicróico (470/635 MD, Chroma, Bellows Falls, VT, EE.UU.) hasta el objetivo de inmersión en aceite 100x, 1.4 de apertura numérica (NA) de un sistema de microscopio invertido (IX71, Olympus, Tokio, Japón), enfocándose en la muestra. La emisión de fluorescencia se dirigió a un filtro de paso largo de 500 nm (AHF analysentechnik AG, Tübingen, Alemania) y se centró en la apertura confocal de 75 μm . A continuación, la emisión de fluorescencia se filtró utilizando un espejo dicróico 600DCXR, y posteriormente se dividió en los canales de detección verde y rojo, cada uno con un filtro de paso de banda (Chroma, Bellows Falls, VT, EE.UU.), 520/35 para el canal verde y 685/70 para el canal rojo. Finalmente, la emisión de fluorescencia de cada canal se enfocó en un detector diodo de avalancha monofotónico (SPCM-AQR 14, PerkinElmer, Hopkinton, MA, EE.UU.). Para el recuento de fotones, la adquisición de datos y la reconstrucción de imágenes se utilizó un módulo de recuento monofotónico correlacionado en el tiempo (TCSPC) TimeHarp 200 (PicoQuant, Berlín, Alemania). Las imágenes sin tratar se obtuvieron con una resolución de 512 \times 512 píxeles sobre un área de 11.4 \times 11.4 μm^2 , utilizando un tiempo de permanencia por píxel (*dwell time*) de 0.60 ms.

Microscopía FLIM multiparamétrica (Bloque II, secciones 2.3.2 y 2.3.4).

Para el análisis de las imágenes se utilizó el software SymphoTime 32 (PicoQuant GmbH), el software AutoHotKey y el software Fiji (software de distribución de ImageJ⁷). Antes del análisis se realizó un binning espacial de 5 \times 5, para un tamaño final de píxel de 0.11 \times 0.11 μm^2 , con el fin de aumentar el número de fotones por píxel, para obtener una mayor robustez estadística en el ajuste de las trazas de decaimiento de fluorescencia. Las imágenes FLIM de **AQui** y **NBA** con apoferritina se realizaron ajustando en cada píxel las trazas de decaimiento de fluorescencia a una función de decaimiento biexponencial, utilizando para el análisis de deconvolución basado en el estimador de máxima probabilidad una función de respuesta del instrumento (IRF, por sus siglas en inglés *Instrument Response Function*) reconstruida. Las matrices con los datos de intensidad y τ_F se exportaron mediante el software SymPhoTime. Para extraer

3. Materiales y métodos

y separar la información de intensidad y τ_F de las matrices de datos proporcionadas por el software SymPhoTime, utilizamos el software AutoHotKey, que contiene diferentes macros (secuencias automatizadas de acciones dentro de la aplicación) que permiten realizar este paso. Posteriormente las imágenes fueron analizadas utilizando el software Fiji, que dispone de macros semiautomáticos que permiten obtener las imágenes ratiométricas al dividir los valores de intensidad de los píxeles de las imágenes recogidas en el canal verde entre los valores de intensidad de los píxeles de las imágenes recogidas en el canal rojo, así como reconstruir las imágenes de τ_F .⁷ Todas las distribuciones de frecuencia de los valores de la relación I_G/I_R de los píxeles de las diferentes imágenes analizadas correspondientes a agregados de APO se ajustaron a una distribución normal logarítmica para obtener el valor exacto de la media de la distribución (parámetro X_c). Los gráficos de las distribuciones de los τ_F de **AQui** se ajustaron a una distribución normal (gaussiana) para obtener el valor central (parámetro X_c) de cada distribución. Las distribuciones de frecuencia ajustadas de los valores de la relación I_G/I_R y de los τ_F de **AQui** se realizaron con el software OriginPro 8.5.

Microscopía FLIM multiparamétrica (Bloque II, secciones 2.3.5 y 2.3.6)

Los dos cabezales de diodo láser pulsado descritos anteriormente se alternaron en el régimen de tiempo de los ns para lograr la excitación PIE. El análisis de las imágenes (separación y reconstrucción de las distintas imágenes e imágenes FLIM) se realizó en el software SymPhoTime 32 (PicoQuant). Para las imágenes FLIM del fluoróforo dador (A β -488), ajustamos los datos de las trazas de decaimiento de fluorescencia obtenidas en cada píxel a una única función de decaimiento exponencial tras un binning espacial de 5×5 , utilizando para el análisis de deconvolución basado en el estimador de máxima probabilidad una IRF reconstruida. Para la selección de los píxeles correspondientes a agregados colocalizados en las tres imágenes (I_D , I_{FRET} e I_A) en los experimentos de FRET intraoligomérica se utilizaron macros codificados internamente en el software Fiji.⁷ También se emplearon macros en Fiji para cuantificar la intensidad de fluorescencia media por píxel de la sonda de biotioles en las regiones de interés.

Microscopía STED de superresolución. Para los experimentos de obtención de imágenes de superresolución con fibras de apoferritina se utilizó un microscopio STED-FLIM (Abberior Expert Line, Abberior Instruments GmbH, Alemania). Para la obtención de imágenes de microscopía confocal se utilizaron dos láseres pulsados a las longitudes de onda de excitación de $\lambda_{ex}= 485$ nm (para **AQui**) y $\lambda_{ex}= 640$ nm (para **NBA**), y se utilizaron dos filtros de paso de banda de detección; 545/25 para **AQui** y 685/70 para **NBA**. Para obtener las imágenes de superresolución STED, se superpuso un láser de

3. Materiales y métodos

depleción toroidal pulsado de 775 nm dentro del volumen confocal. El área de las imágenes sin tratar obtenidas fue de $9.5 \times 9.5 \mu\text{m}^2$, obteniéndose una resolución de 200×200 píxeles. El tamaño de píxel obtenido fue de $40.0 \times 40.0 \text{ nm}^2$, utilizando un tiempo de permanencia por píxel (*dwel time*) de 30 μs .

3.1 Referencias

1. Würth, C.; Grabolle, M.; Pauli, J.; Spieles, M.; Resch-Genger, U., Relative and absolute determination of fluorescence quantum yields of transparent samples. *Nat Protoc* **2013**, *8* (8), 1535-50.
2. Rurack, K.; Spieles, M., Fluorescence Quantum Yields of a Series of Red and Near-Infrared Dyes Emitting at 600–1000 nm. *Analytical Chemistry* **2011**, *83* (4), 1232-1242.
3. Brouwer, A. M., Standards for photoluminescence quantum yield measurements in solution (IUPAC Technical Report). **2011**, *83* (12), 2213-2228.
4. Jurado, R.; Castello, F.; Bondia, P.; Casado, S.; Flors, C.; Cuesta, R.; Dominguez-Vera, J. M.; Orte, A.; Galvez, N., Apoferritin fibers: a new template for 1D fluorescent hybrid nanostructures. *Nanoscale* **2016**, *8* (18), 9648-9656.
5. Jurado, R.; Adamcik, J.; López-Haro, M.; González-Vera, J. A.; Ruiz-Arias, Á.; Sánchez-Ferrer, A.; Cuesta, R.; Domínguez-Vera, J. M.; Calvino, J. J.; Orte, A.; Mezzenga, R.; Gálvez, N., Apoferritin Protein Amyloid Fibrils with Tunable Chirality and Polymorphism. *J. Am. Chem. Soc.* **2019**, *141* (4), 1606-1613.
6. Buschmann, V.; Orthaus, S.; Devaux, A. In *Phosphorescence Lifetime Imaging Microscopy (PLIM) Measurements : Practical Aspects*, 2016.
7. Schindelin, J.; Arganda-Carreras, I.; Frise, E.; Kaynig, V.; Longair, M.; Pietzsch, T.; Preibisch, S.; Rueden, C.; Saalfeld, S.; Schmid, B.; Tinevez, J.-Y.; White, D. J.; Hartenstein, V.; Eliceiri, K.; Tomancak, P.; Cardona, A., Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods* **2012**, *9* (7), 676-682.
8. Gao, D.; Barber, P. R.; Chacko, J. V.; Kader Sagar, M. A.; Rueden, C. T.; Grislis, A. R.; Hiner, M. C.; Eliceiri, K. W., FLIMJ: An open-source ImageJ toolkit for fluorescence lifetime image data analysis. *PLOS ONE* **2021**, *15* (12), e0238327.
9. Castello, F.; Paredes, J. M.; Ruedas-Rama, M. J.; Martin, M.; Roldan, M.; Casares, S.; Orte, A., Two-Step Amyloid Aggregation: Sequential Lag Phase Intermediates. *Sci Rep* **2017**, *7*, 40065.

4. Publicaciones

4. Publicaciones

Artículos

Álvaro Ruiz-Arias; Rocío Jurado; Francisco Fueyo-González; Rosario Herranz; Natividad Gálvez; Juan A. González-Vera; Angel Orte. Selecting FRET pairs for visualizing amyloid aggregation. *Results in Chemistry* **2022**, 4, 100275. <https://doi.org/10.1016/j.rechem.2021.100275>.

Álvaro Ruiz-Arias; Rocío Jurado; Francisco Fueyo-González; Rosario Herranz; Natividad Gálvez; Juan A. González-Vera; Angel Orte. A FRET pair for quantitative and superresolution imaging of amyloid fibril formation. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2022**, 350, 130882. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2021.130882>.

Álvaro Ruiz-Arias; Jose M. Paredes; Chiara Di Biase; Juan M. Cuerva; María D. Girón; Rafael Salto; Juan A. González-Vera; Angel Orte. Seeding and Growth of β -Amyloid Aggregates upon Interaction with Neuronal Cell Membranes. *International Journal of Molecular Sciences* **2020**, 21(14), 5035. <https://doi.org/10.3390/ijms21145035>.

Álvaro Ruiz-Arias; Francisco Fueyo-González; Carolina Izquierdo-García; Amparo Navarro; Marta Gutiérrez-Rodríguez; Rosario Herranz; Chiara Burgio; Antonio Reinoso; Juan M. Cuerva; Angel Orte; Juan A. González-Vera. *Angewandte Chemie International Edition* **2023**, e202314595. <https://doi.org/10.1002/anie.202314595>.

El Gato sonrió al ver a Alicia. Parecía tener buen carácter, consideró Alicia; pero también tenía unas uñas muy largas y un gran número de dientes, de forma que pensó que convendría tratarlo con el debido respeto.

- “Minino de Cheshire”, empezó algo tímidamente, pues no estaba del todo segura de que le fuera a gustar el cariñoso tratamiento; pero el Gato siguió sonriendo más y más. “¡Vaya! Parece que le va gustando”, pensó Alicia, y continuó:

- “¿Me podrías indicar, por favor, hacia dónde tengo que ir desde aquí?”.

- “Eso depende de a dónde quieras llegar”, contestó el Gato.

- “A mí no me importa demasiado a dónde...”, empezó a explicar Alicia.

- “En ese caso, da igual hacia dónde vayas”, interrumpió el Gato.

- “...siempre que llegue a alguna parte”, terminó Alicia a modo de explicación.

- “¡Oh! Siempre llegarás a alguna parte”, dijo el Gato, “si caminas lo bastante”.

A Alicia le pareció que esto era innegable, de forma que intentó preguntarle algo más:

- “¿Qué clase de gente vive por estos parajes?”.

- “Por ahí”, contestó el Gato volviendo una pata hacia su derecha, “vive un sombrero; y por allá”, continuó volviendo la otra pata, “vive una liebre de marzo. Visita al que te plazca: ambos están igual de locos”.

- “Pero yo con locos no quiero tener ningún trato”, observó Alicia.

- “¡Oh!, eso sí que no lo puedes evitar”, repuso el gato; “por aquí todos estamos locos. Yo estoy loco; tú también lo estás”.

- “Y ¿cómo sabes tú si yo estoy loca?”, le preguntó Alicia.

- “Has de estarlo a la fuerza”, le contestó el Gato; “de lo contrario no habrías venido aquí”.

Fragmento de Alicia en el país de las Maravillas, de Lewis Carroll.