



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO**

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

**SÍNTESIS DE SONDAS MOLECULARES FLUORESCENTES PARA MONITOREO DE  
DINÁMICA SUBCELULAR MEDIANTE MICROSCOPIA CONFOCAL**

**TESIS**

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE**

**DOCTORA EN CIENCIAS**

**PRESENTA**

**M. EN C. CINTHIA LAURA HERNÁNDEZ JUÁREZ**

**TUTOR PRINCIPAL:  
DR. ARTURO JIMÉNEZ SÁNCHEZ**

**INSTITUTO DE QUÍMICA, UNAM**

**CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX, NOVIEMBRE, 2023.**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

**SÍNTESIS DE SONDAS MOLECULARES FLUORESCENTES PARA MONITOREO DE  
DINÁMICA SUBCELULAR MEDIANTE MICROSCOPIA CONFOCAL**

TESIS  
PARA OPTAR POR EL GRADO DE

**DOCTORA EN CIENCIAS**

PRESENTA

**M. EN C. CINTHIA LAURA HERNÁNDEZ JUÁREZ**

TUTOR  
**DR. ARTURO JIMÉNEZ SÁNCHEZ**

INSTITUTO DE QUÍMICA, UNAM



Ciudad de México, noviembre 2023

*A mis papás y hermanos por acompañarme a lo largo de esta travesía,  
por su apoyo incondicional y por creer en mí desde el inicio de todo.*

*A mi Adriel, que llegó a alegrar e iluminar mi vida,  
por ser una nueva motivación para seguir en busca de mis sueños.*

## Agradecimientos

A la **Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM)** y al **Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Químicas** por brindarme la oportunidad de realizar mis estudios de doctorado. Al **Instituto de Química** por todos los servicios y recursos brindados para la realización de este trabajo.

Al **CONAHCYT** por la beca otorgada al **CVU 771165**, ya que sin ella la realización de este proyecto de doctorado no habría sido posible. A los financiamientos **DGAPA PAPIIT IA200522** y **CONAHCYT Ciencia de Fronteras No. 319214**.

A mi asesor de doctorado **Dr. Arturo Jiménez Sánchez**, por darme la oportunidad y confianza de formar parte de su grupo de investigación, gracias por creer en mis capacidades, habilidades y por impulsar mi formación de manera interdisciplinaria. Gracias por enseñarme a enfrentar todo lo nuevo y que no sé de manera receptiva, que sin su orientación y ayuda todo lo alcanzado en mi travesía por el doctorado no habría sido posible. Finalmente, gracias porque mi estancia en su laboratorio me demostró que se puede empezar de nuevo y hacerlo mejor que antes si se tiene el apoyo adecuado.

A los miembros de mi comité tutor: **Dra. Martha V. Escárcega Bobadilla** y **Dr. Hiram Beltrán Conde**, por estar presentes a lo largo del desarrollo de este proyecto, por sus valiosas aportaciones cada semestre, por tomarse el tiempo necesario para asesorarme y asistir a cada una de las presentaciones.

A los miembros del jurado: **Dra. Lena Ruiz Azuara**, **Dra. Silvia Castillo Blum**, **Dr. Cecilio Álvarez y Toledano**, **Dr. Hiram Beltrán Conde** y **Dr. Marcos Hernández Rodríguez**, por el tiempo dedicado a la revisión de la presente tesis y por todas sus invaluable aportaciones para el enriquecimiento de esta.

A la **M. en C. Elizabeth Huerta Salazar**, **Dra. Beatriz Quiróz García** y **Dra. Martha Elena García Aguilera** por su apoyo en la obtención de los análisis de Resonancia Magnética Nuclear.

A la **Dra. Adriana Romo Pérez** y la **M. en C. Teresa Ramírez Apán** por su ayuda con los cultivos celulares y la realización de los estudios IR.

Al **Laboratorio Nacional de Ciencias para la Conservación del Patrimonio Cultural (LANCIC)** y al **M. en C. Everardo Tapia Mendoza** por su ayuda en la obtención de los análisis de espectrometría de masas.

A la **Dra. Ruth Rincón Heredia** del Instituto de Fisiología Celular (IFC, UNAM), por su siempre amable ayuda y por todos los conocimientos compartidos sobre microscopía confocal. Gracias por tu invaluable

apoyo profesional y personal durante esta etapa de mi vida, por ser un referente en la pasión que tienes en compartir aquello que amas, gracias por escucharme y motivarme cada vez que me sentí perdida.

Al **Dr. Fernando López**, el **Dr. Tonatiuh Molina** y el **M. V. Z. Gilberto Morales** del IFC por todas sus enseñanzas, asesoría, amable disposición y apoyo para la realización de los estudios en el modelo pez cebra. Así como al **Dr. Antonio Peña** y la **Dra. Martha Calahorra** por todos los conocimientos compartidos y por las facilidades otorgadas para la realización de experimentos en levaduras.

A mi grande compañera, pero sobre todo amiga **Jasmine Bernal**, gracias por tanto que me enseñaste cuando todo era nuevo para mí en el laboratorio, por todo tu apoyo a lo largo de este tiempo y por hacerme sentir acompañada cada que algo no marchaba como quería. A mi compañero y amigo **Ixsoyen Vázquez**, porque fuiste un gran apoyo en la recta final del doctorado, gracias por escucharme y acompañarme en días buenos y no tan buenos. A ambos, los admiro y quiero mucho.

A los compañeros y amigos de laboratorio que conocí a lo largo de estos años. Gracias **Eva Palacios** y **Nitzya Ruíz**, por ayudarme y asesorarme demasiado cuando ingresé al laboratorio, gracias por adoptarme tan rápidamente como una de ustedes. A **Armando López**, **Juan Luis Cortés** y **Óscar Anguiano** por las pláticas, el apoyo recibido y los momentos divertidos que compartimos. A mi niña **Alexa Muñoz**, por tu paciencia y por enseñarme que la mentoría no solo se trata de transmitir conocimientos.

A mis amigos **Luis Manuel Tobón**, **Mayeli Mondragón** y **Mariana Nicolás**, por seguir permaneciendo a mi lado, por creer en mí y recordarme lo mucho de lo que soy capaz, los quiero mucho.

A mi tía **Francisca Juárez** y mi abuelita **Agustina Catarino** por todo su apoyo para que pudiera asistir a un congreso internacional, nunca olvidaré que estuvieron ahí en momentos complicados.

Al **Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP)** por la ayuda económica brindada para asistir a una Gordon Research Conference.

A todos los amigos que he encontrado en la **Red de divulgadores Atomium**, que me han dado un sentido de pertenencia y me han enseñado la importancia que tiene el compartir la ciencia con todo tipo de público, gracias por demostrarme que a través de sumar esfuerzos podemos llegar más lejos.

A mi terapeuta **Marisol Saavedra** que me ha escuchado y acompañado también durante este tiempo, gracias por ayudarme a conocer más sobre mí, hacerme ver todo desde otro punto de vista y por darme herramientas para enfrentar todo aquello que no está bajo mi control.

El desarrollo experimental de este trabajo se llevó a cabo en el laboratorio 5C del departamento de Química Orgánica del Instituto de Química, así como en los laboratorios 202 y 306 oriente del Instituto de Fisiología Celular, ambos institutos de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), bajo la supervisión del Dr. Arturo Jiménez Sánchez, con el apoyo del Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT), CVU: 771165.

Parte de este trabajo se presentó en la modalidad póster en la conferencia virtual LatinXChem edición 2022 y 2023, en el Simposio Interno del Instituto de Química 2021 y 2022 (presencial), así como en la Bioorganic Chemistry Gordon Research Conference obteniendo reconocimiento a cartel destacado, la cual se llevó a cabo del 11 al 16 de junio del 2023 en Nuevo Hampshire, EUA.

Así mismo, se ha llevado a cabo la publicación de los siguientes artículos hasta el momento:

- “Fluorescent Probe for in Vivo Partitioning into Dynamic Lipid Droplets Enables Monitoring of Water Permeability-Induced Edema”; Cinthia Hernández-Juárez, Gilberto Morales-Villafaña, Fernando López-Casillas and Arturo Jiménez-Sánchez; *ACS Sensors*, **2023**, 8 (8), 3076-3085.

DOI: 10.1021/acssensors.3c00725

- “Fluorescent probe for early mitochondrial voltage dynamics”; Cinthia Hernández-Juárez, Ricardo Flores-Cruz and Arturo Jiménez-Sánchez; *Chem. Commun.*, **2021**, 57, 5526-5529.

DOI: 10.1039/D1CC01944A



---

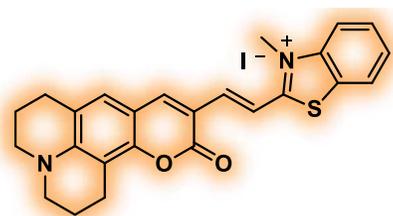
V.º B.º Dr. Arturo Jiménez Sánchez

## Abreviaturas y símbolos

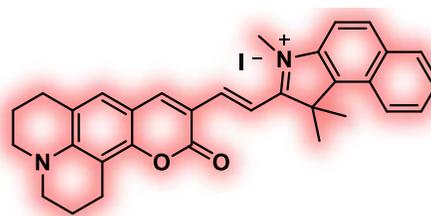
2D	2 dimensiones
a.u.	Unidades arbitrarias
AcOEt	Acetato de etilo
AcOH	Ácido acético
ATV	Atorvastatina
CCCP	Cianuro de carbonilo 3-clorofenilhidrazona
CCF	Cromatografía de capa fina
CDCl <sub>3</sub>	Cloroformo deuterado
COSY	Espectroscopía correlacionada
cP	Centipoise
<i>d</i>	doblete
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
DCM	Diclorometano
DLS	Dispersión dinámica de la luz
DMF	<i>N,N</i> -dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMSO-d <sub>6</sub>	Dimetilsulfóxido deuterado
DOPC	1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfocolina
ESI	Ionización por electrospray
EtOH	Etanol
FosOx	Fosforilación Oxidativa
GFP	Proteína verde fluorescente
hpf	Horas post-fertilización
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficiencia
HSQC	Coherencia cuántica única heteronuclear
HTAB	Bromuro de hexadeciltrimetilamonio
IC	Conversión interna
IE	Impacto electrónico
IR	Infrarrojo
ISC	Cruce intersistemas
LDs	Gotas lipídicas
m	multiplete
m/z	Relación masa-carga

MeCN	Acetonitrilo
MeOH	Metanol
MHz	Megahertz
min	Minutos
MMP	Potencial de membrana mitocondrial
MOPS	Ácido 3-N-morfolino propanosulfónico
MS	Espectrometría de masas
NaAcO	Acetato de sodio
P	Coeficiente de partición observado
$P_0$	Coeficiente de partición intrínseco
pH	Potencial de hidrógeno
$pK_a$	Constante de acidez
ppm	Partes por millón
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
ROS	Especies reactivas de oxígeno
s	singulete
SK-LU-1	Línea celular de adenocarcinoma
STORM	Microscopía de reconstrucción óptica estocástica
t	Tiempo
TCSPC	Recuento de fotones únicos correlacionados con el tiempo
THF	Tetrahidrofurano
TOF	Tiempo de vuelo
U-251	Línea celular de glioblastoma
UV	Ultravioleta
UV-Vis	Ultravioleta-visible
v/v	Relación volumen-volumen
$\delta$	Desplazamiento químico
$\epsilon$	Constante dieléctrica
$\eta$	Viscosidad dinámica
$\lambda_{exc}$	Longitud de onda de excitación
$\lambda_{em}$	Longitud de onda de emisión

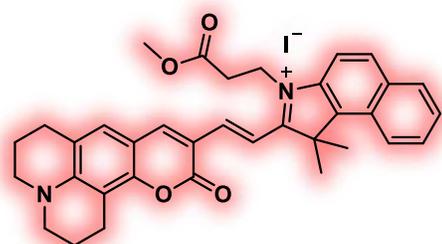
## Estructuras químicas e identificación de los compuestos sintetizados



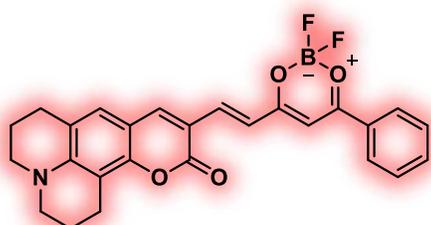
**AzF1**



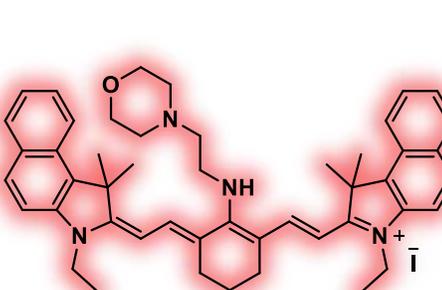
**AzF2**



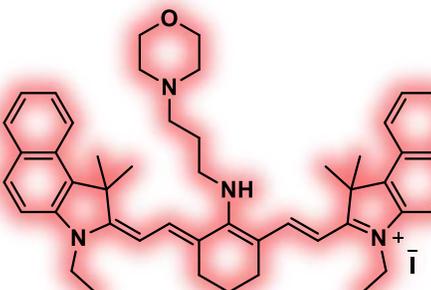
**AzF3**



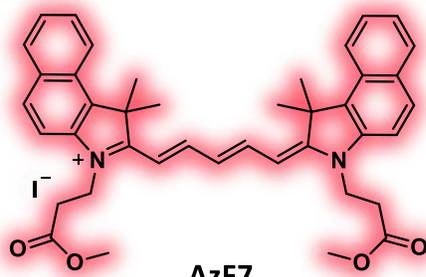
**AzF4**



**AzF5**



**AzF6**



**AzF7**



# Contenido

Resumen.....	1
Abstract.....	3
Introducción.....	5
Capítulo 1 Marco teórico.....	7
1. Principios teóricos de la fluorescencia.....	7
1.1 Moléculas fluorescentes.....	9
1.2 Sondas fluorescentes.....	9
2. Microscopía de fluorescencia.....	10
2.1. Sondas fluorescentes orgánicas y su uso en microscopía.....	11
3. Célula y microambiente celular.....	13
3.1 Mitocondria.....	14
3.2 Gotas lipídicas.....	15
Capítulo 2 Antecedentes.....	17
1. Sondas selectivas a mitocondria.....	17
2. Sondas selectivas a gotas lipídicas.....	21
Hipótesis.....	24
Objetivos.....	24
General.....	24
Específicos.....	24
Justificación.....	24
Capítulo 3 Desarrollo experimental.....	28
1. Reactivos e instrumentación.....	28
2. Síntesis.....	29
2.1 Síntesis de moléculas precursoras.....	29
2.2 Síntesis de sondas fluorescentes.....	33
3. Estudios espectrofotométricos.....	38
4. Estudios <i>in vitro</i> .....	39
5. Estudios <i>in vivo</i> .....	40
6. Experimentos en levaduras.....	41
Capítulo 4 Resultados y análisis.....	42
1. Caracterización.....	42

1.1 AzF1 .....	42
1.2 AzF2 .....	44
1.3 AzF3 .....	46
1.4 AzF4 .....	49
1.5 AzF5 y AzF6.....	52
1.6 AzF7 .....	54
2. Estudios espectroscópicos .....	56
2.1 Efecto del disolvente .....	56
2.2 Efecto de la polaridad del medio .....	61
2.3 Efecto de la viscosidad del medio .....	64
3. Estudios <i>in vitro</i> .....	66
4. <b>AzF4</b> como sonda selectiva a gotas lipídicas.....	71
4.1 Estudios de caracterización complementarios .....	71
4.2 Estudios de colocalización.....	73
4.3 Experimentos <i>in vivo</i> .....	76
4.4 Mecanismo de funcionamiento de <b>AzF4</b> como sonda dual para el monitoreo de gotas lipídicas.....	79
5. <b>AzF2</b> y <b>AzF3</b> como sondas fluorescentes .....	88
5.1 Estudios de caracterización y microscopía complementarios .....	88
5.2 Experimentos con levaduras .....	93
Capítulo 5 Conclusiones .....	98
Apéndice.....	100
Referencias.....	111

## Resumen

Los microambientes subcelulares mantenidos por los organelos desempeñan un papel crucial en las funciones dentro de la célula, alteraciones en estos microambientes pueden contribuir a trastornos y enfermedades; por lo tanto, es esencial monitorear estos cambios como indicadores de salud y enfermedad. El uso de sondas moleculares fluorescentes ha surgido como una estrategia de monitoreo con amplias aplicaciones en microscopía de fluorescencia.

En el presente trabajo se sintetizaron una serie de fluoróforos derivados de cianina y hemicianina con propiedades ópticas y químicas modulables, identificados como **AzF1-7**, los cuales fueron caracterizados y estudiados para ser aplicados como sondas moleculares fluorescentes en modelos *in vitro* e *in vivo* útiles en microscopía confocal.

De manera general los fluoróforos sintetizados presentaron bandas de emisión máxima en el intervalo del rojo ( $\lambda > 600$  nm), además de una excelente capacidad para atravesar las membranas celulares con tiempos de incubación cortos de alrededor de 5 minutos en líneas celulares de mamífero. Los compuestos **AzF1-3** presentaron sensibilidad a cambios de viscosidad del medio. Los fluoróforos catiónicos derivados de hemicianina y cianina 5.5 (**AzF1**, **AzF2** y **AzF7**) presentaron una localización exclusiva hacia las redes mitocondriales, con respuesta en el canal rojo y en algunos casos también en el canal verde ( $\lambda \sim 500$  nm). Por otro lado, los derivados de cianina 7.5 (**AzF5** y **AzF6**), mostraron una localización influenciada por los fragmentos morfolinio a pesar de poseer también cargas catiónicas.

Los destacables resultados observados para el fluoróforo **AzF4** permitieron realizar estudios más especializados para esta molécula. **AzF4** presentó una localización limpia y selectiva en gotas lipídicas observables de forma dual en canal verde y rojo, además de una buena fotoestabilidad. Los diversos estudios espectroscópicos y de microscopía realizados permitieron describir el mecanismo de respuesta dual mediante el planteamiento de un mecanismo de reparto Nernstiano, ya que este fluoróforo se autoasocia en entornos acuosos (emisión roja) y mantiene una forma monomérica en entornos lipídicos (emisión verde). Su emisión dual permitió el seguimiento de la dinámica de gotas lipídicas en embriones de pez cebra tratados con atorvastatina y con desarrollo de edema pericárdico y de saco vitelino.

Por otro lado, **AzF3** presentó un mecanismo de retención mitocondrial no dependiente del potencial de membrana y una localización en dos organelos distintos a la vez, lo cual se ha atribuido a la hidrólisis del grupo éster que posee la molécula, con un valor de  $pK_a$  determinado de 7.31. Finalmente, debido a la localización mitocondrial que este compuesto y **AzF2** presentaron, ambos fueron empleados en diversos experimentos con levaduras para probar su posible aplicación para la determinación de potencial de membrana citoplasmática, estos experimentos corroboraron la retención celular que presenta **AzF3** y la posible utilización de **AzF2** en estas determinaciones al presentar respuestas similares a las previamente reportadas con fluoróforos catiónicos.

En general, los resultados obtenidos en este trabajo destacan la utilidad e importancia de sondas fluorescentes para el monitoreo de procesos biológicos mediante imagenología y de manera específica, el mecanismo de reparto Nernstiano como un acercamiento o punto de partida a la síntesis de compuestos orientados a la localización y análisis de gotas lipídicas.

## Abstract

Subcellular microenvironments maintained by organelles play a crucial role in cellular functions, and alterations in these microenvironments can contribute to disorders and diseases. Therefore, it is essential to monitor these changes as indicators of cellular health and disease. The use of fluorescent molecular probes has emerged as a monitoring strategy with broad applications in fluorescence microscopy.

In this study, a series of fluorophores derived from cyanine and hemicyanine with modifiable optical and chemical properties, identified as **AzF1-7**, were synthesized, characterized, and studied for their application as fluorescent molecular probes in *in vitro* and *in vivo* models useful in confocal microscopy.

In general, the synthesized fluorophores exhibited maximum emission bands in the red range ( $\lambda > 600$  nm) and excellent ability to penetrate cell membranes with short incubation times of around 5 minutes in mammalian cell lines. Compounds **AzF1-3** showed sensitivity to changes in medium viscosity. Cationic fluorophores derived from hemicyanine and cyanine 5.5 (**AzF1**, **AzF2**, and **AzF7**) exhibited exclusive localization towards mitochondrial networks, with responses in the red channel and, in some cases, also in the green channel ( $\lambda \sim 500$  nm). On the other hand, derivatives of cyanine 7.5 (**AzF5** and **AzF6**) showed localization influenced by morpholinium fragments despite also having cationic charges.

The remarkable results observed for the **AzF4** fluorophore allowed for more specialized studies on this molecule. **AzF4** exhibited a clean and selective localization in observable lipid droplets in both the green and red channels, in addition to good photostability. Various spectroscopic and microscopy studies enabled the description of the dual response mechanism by proposing a Nernstian partitioning mechanism, as this fluorophore self-associates in aqueous environments (red emission) and maintains a monomeric form in lipid environments (green emission). Its dual emission allowed for the tracking of lipid droplet dynamics in zebrafish embryos treated with atorvastatin and with the development of pericardial and yolk sac edema.

On the other hand, **AzF3** exhibited a mitochondrial retention mechanism independent of membrane potential and localization in two different organelles simultaneously, which has been attributed to the ester group hydrolysis of the molecule, with a determined  $pK_a$  value of 7.31. Finally, due to the mitochondrial localization that this compound and **AzF2** exhibited, both were used in various experiments with yeast to test their possible application for determining cytoplasmic membrane potential. These experiments confirmed the cellular retention presented by **AzF3** and the potential use of **AzF2** in these determinations, as they exhibited responses like those previously reported with cationic fluorophores.

In summary, the results obtained in this study emphasize the utility and importance of fluorescent probes for monitoring biological processes through imaging, and specifically, the Nernstian partitioning mechanism as an approach or starting point for the synthesis of compounds aimed at the localization and analysis of lipid droplets.

## Introducción

Los fluoróforos son herramientas indispensables para la investigación científica moderna, estas moléculas tienen la capacidad de absorber fotones de energía en una longitud de onda y posteriormente emitir fotones en otra<sup>1</sup>.

Debido a que las mediciones fluorescentes son altamente sensibles, esta propiedad se ha aprovechado para la medición y visualización de compuestos fluorescentes en un contexto de moléculas no fluorescentes<sup>2</sup>, proporcionando así un gran número de aplicaciones como la obtención de imágenes biológicas, que ha dado pauta al desarrollo de técnicas sofisticadas para el estudio de sistemas a nivel celular<sup>3,4</sup>.

Los microambientes subcelulares son mantenidos por el sistema de organelos que comprenden la célula, estos son estructuras ordenadas complejas que desempeñan un papel crucial para garantizar las funciones celulares, también son las fuentes y objetivos principales de diversas especies bioactivas<sup>5</sup>. Cada organelo necesita especies biológicas específicas y el microambiente adecuado para desempeñar sus funciones, por lo que interrupciones en la homeostasis de estas especies o mutaciones en el microambiente contribuyen a la disfunción del organelo causando así trastornos y enfermedades<sup>6</sup>. La alteración de la homeostasis celular produce cambios como por ejemplo en la morfología mitocondrial, ya que la fisión provoca fragmentación de la red mitocondrial y generalmente está asociada a disfunción metabólica y aumento de especies reactivas de oxígeno; por otra parte, la fusión da como resultado una red hiperfusionada que sirve para contrarrestar agresiones metabólicas, preservar la integridad celular y proteger contra autofagia<sup>7</sup>. De este modo el monitoreo de estos cambios resulta crucial como indicadores de salud y enfermedad celular.

Como una estrategia de monitoreo se han utilizado diferentes sondas fluorescentes para cada uno de los parámetros. Las sondas fluorescentes son moléculas que modifican su emisión en respuesta a un evento vinculante, reacción química o cambio en su entorno inmediato<sup>1,3,8</sup>. Estas moléculas pueden identificar un objetivo específico en una muestra compleja para que éste sea visualizado por microscopía de fluorescencia<sup>9</sup>. En años recientes, el uso de las sondas fluorescentes basadas en moléculas pequeñas ha atraído gran atención debido a las ventajas que presentan frente a las basadas en proteínas fluorescentes, el diseño de éstas se basa en las características de los diversos

organelos y la propiedad fisicoquímica que se desea estudiar. Por ejemplo, en el caso de sondas diseñadas para el estudio mitocondrial, el alto potencial negativo de su membrana (-140 a -180 mV)<sup>10</sup> ha sido aprovechado para desarrollar sondas de naturaleza catiónica.

El monitoreo en tiempo real, *in situ*, preciso y reversible de sondas en microambientes subcelulares ha sido un gran desafío debido a diversas limitaciones, las técnicas de imágenes de fluorescencia se han convertido en herramientas poderosas para la visualización no invasiva de procesos biológicos en tiempo real con alta resolución espacial. La emisión en el infrarrojo cercano (NIR, 650-900 nm) facilita la obtención de imágenes *in vivo* de estos procesos, convirtiendo así a las sondas fluorescentes NIR en recursos prometedores para este monitoreo<sup>5,11</sup>.

En este contexto, resulta fundamental el diseño de sondas fluorescentes para su uso en microscopía de fluorescencia que permitan monitorear parámetros fisicoquímicos relacionados con la dinámica subcelular y así poder conocer con mayor precisión el papel que los organelos juegan en la adaptación celular en estados de salud y enfermedad. Lo cual dará pauta al desarrollo de alternativas terapéuticas en padecimientos como el cáncer, la diabetes y enfermedades neurodegenerativas. Es por lo que el presente trabajo está enfocado en el diseño, síntesis y caracterización de fluoróforos, así como su aplicación como sondas fluorescentes útiles en microscopía confocal para el estudio de propiedades fisicoquímicas en organelos celulares.

## Capítulo 1 Marco teórico

### 1. Principios teóricos de la fluorescencia

La luminiscencia es la emisión de fotones ultravioleta, visible o infrarrojos de una especie electrónicamente excitada<sup>12</sup>, es formalmente dividida en dos categorías dependiendo de la naturaleza del estado excitado: fluorescencia y fosforescencia<sup>13</sup>.

El diagrama de Perrin-Jablonski resume el proceso que ocurre entre la absorción y la emisión de luz (Figura 1.1), las flechas rectas representan procesos radiativos y las onduladas procesos no radiativos.

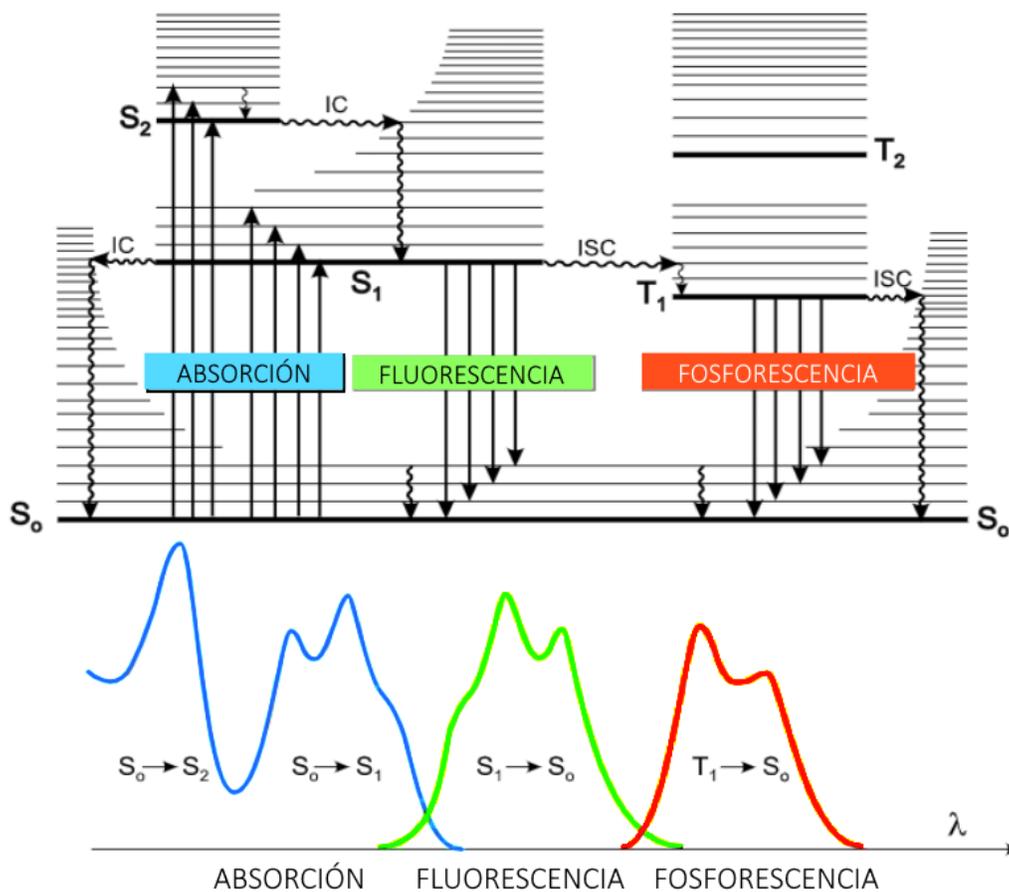


Figura 1.1 Diagrama de Jablonski ilustrando procesos fotofísicos comunes.

Este diagrama es conveniente para visualizar de una manera simple los posibles procesos: absorción de un fotón, conversión interna (IC), fluorescencia, cruce intersistemas (ISC), fosforescencia,

decaimiento de la fluorescencia y transiciones triplete-triplete. Los estados electrónicos singlete se denotan como  $S_0, S_1, S_2, \dots$  y los estados triplete  $T_1, T_2, \dots$ . Las flechas verticales correspondientes a la absorción parten del nivel de energía vibracional más bajo de  $S_0$  ya que la mayoría de las moléculas se encuentran en ese nivel a temperatura ambiente. A continuación, se describen los posibles procesos de desexcitación posteriores<sup>14</sup>:

**Conversión Interna (IC).** Es una transición no radiativa entre dos estados electrónicos con la misma multiplicidad de espín. En disolución, el exceso de energía vibracional se puede transferir a las moléculas de disolvente durante las colisiones con la molécula excitada.

Cuando una molécula se excita a un nivel de energía más alto que el nivel vibratorio más bajo del primer estado electrónico, la relajación vibratoria lleva a la molécula excitada hacia el nivel vibratorio 0 del estado singlete  $S_1$  con una escala de tiempo de  $10^{-13}$ - $10^{-11}$  s.

**Fluorescencia.** Es la emisión de fotones que acompaña a la relajación de  $S_n \rightarrow S_0$ , donde la multiplicidad de espín se mantiene. El espectro de fluorescencia se encuentra en longitudes de onda de menor energía que el espectro de absorción debido a la pérdida de energía en el estado excitado por la relajación vibracional. De acuerdo con la regla de Stokes, la longitud de onda de una emisión de fluorescencia siempre debe ser mayor que la de absorción, la brecha (en números de onda) entre el máximo de la primera banda de absorción y el máximo de fluorescencia se denomina desplazamiento de Stokes. El tiempo de vida de estado excitado  $S_1$  se encuentra en el orden de  $10^{-10}$  a  $10^{-7}$  s.

**Cruce Intersistemas (ISC).** Es la transición no radiativa entre dos niveles vibracionales isoenergéticos pertenecientes a estados electrónicos con diferente multiplicidad. El acoplamiento entre el momento magnético orbital y el momento magnético de espín puede ser lo suficientemente grande como para hacer posible el cruzar entre estados de diferente multiplicidad. La probabilidad de cruce entre sistemas depende de los estados singlete y triplete involucrados, por ejemplo, si la transición  $S_0 \rightarrow S_1$  es del tipo  $n \rightarrow \pi^*$  el cruce intersistemas suele ser eficiente, también la presencia de átomos pesados aumenta el acoplamiento espín-órbita y por lo tanto lo favorece.

**Fosforescencia y desexcitación no radiativa de  $T_1$ .** En disolución, la desexcitación no radiativa del estado triplete  $T_1$  es predominante sobre la desexcitación radiativa llamada fosforescencia. La transición  $T_1 \rightarrow S_0$  es prohibida y, por lo tanto, la constante de radiación es muy baja. Durante este

proceso lento, las colisiones con moléculas de disolvente favorecen el cruce intersistemas y la relajación vibracional en  $S_0$ . Por otra parte, bajas temperaturas y un medio rígido favorecen la fosforescencia.

El tiempo de vida del estado triplete puede ser lo suficientemente largo para observar fosforescencia en una escala de tiempo de segundos o minutos. El espectro de fosforescencia se encuentra a longitudes de onda más altas que el espectro de fluorescencia, ya que la energía del nivel vibratorio más bajo del estado triplete  $T_1$  es menor que la del estado singulete  $S_1$ .

## 1.1 Moléculas fluorescentes

Una molécula fluorescente o fluoróforo es aquella que después de su estimulación por la absorción de luz, es capaz de emitir una fracción de la energía absorbida en forma de luz (fluorescencia)<sup>15</sup>.

Muchos de los compuestos fluorescentes son aromáticos, generalmente hablando, un incremento en la extensión del sistema de electrones  $\pi$  (grado de conjugación) conduce a un cambio de los espectros de absorción y emisión a longitudes de onda más largas y a un aumento del rendimiento cuántico de fluorescencia<sup>12</sup>. El rendimiento cuántico de fluorescencia se refiere a la relación entre el número de fotones emitidos y el número de fotones absorbidos, compuestos con altos rendimientos cuánticos muestran emisiones más brillantes<sup>13</sup>.

## 1.2 Sondas fluorescentes

Las sondas fluorescentes son moléculas que modifican su emisión en respuesta a un evento vinculante, reacción química o una alteración en su entorno inmediato<sup>1,3,8</sup>. Son herramientas moleculares poderosas que pueden ser empleadas como sensores biológicos y con aplicaciones en bioimagenología debido a su especificidad, respuesta rápida y su fácil manejo<sup>6</sup>.

En las últimas décadas se han realizado diversos esfuerzos en el desarrollo de sondas que puedan presentar respuesta a cambios en microambientes como pH, microviscosidad, polaridad, potencial

eléctrico, entre otras. Así mismo, se ha buscado la cuantificación de moléculas de interés como especies reactivas de oxígeno, iones y enzimas.

Las sondas fluorescentes pueden proporcionar visualización directa e información dinámica sobre la localización y cantidad de biomoléculas de interés. Proporcionan alta sensibilidad y gran versatilidad con una perturbación mínima en sistemas celulares, por lo que se han convertido en herramientas imprescindibles en biología celular<sup>6</sup>.

## 2. Microscopía de fluorescencia

A lo largo de los años muchas de las mejoras técnicas en microscopía se han centrado en incrementar el contraste entre lo que se desea observar (señal) y lo que no (fondo). La microscopía de fluorescencia es un claro ejemplo, ya que tiene como objetivo revelar solo los objetos de interés en un fondo negro<sup>16</sup>. La utilización de marcadores fluorescentes es fundamental en esta técnica, ya que permiten la detección y seguimiento de una gran variedad de tipos de células y estructuras subcelulares que no emiten fluorescencia de forma natural<sup>17,18</sup>.

En microscopía de fluorescencia, la muestra es excitada con luz de una longitud de onda relativamente corta, posteriormente se examina a través de un filtro de barrera que absorbe la luz utilizada para la iluminación y transmite la fluorescencia de la muestra<sup>19</sup>. El desplazamiento hacia el rojo de la emisión con respecto a la longitud de onda de excitación se utiliza para discriminar la señal de fluorescencia de un fondo de luz de excitación dispersa<sup>20</sup>. Una de las aplicaciones más importantes es el estudio de células vivas y tejidos, esto es porque se puede revelar la posición de pequeñas cantidades del

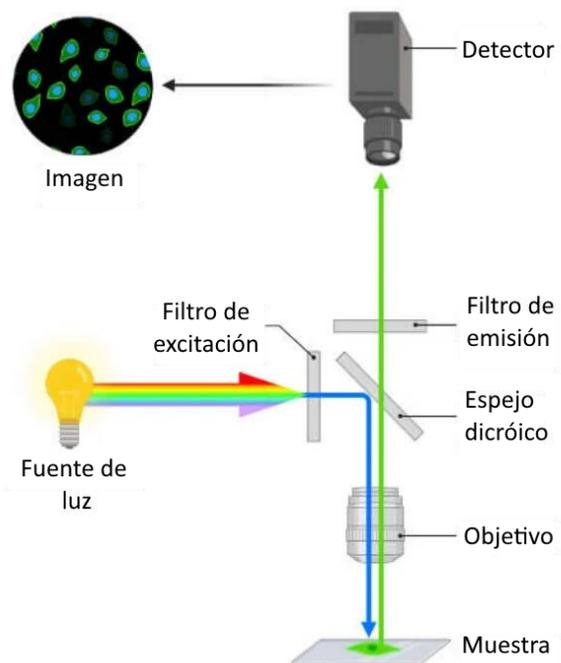


Figura 1.2 Arreglo básico de un microscopio de fluorescencia.

fluoróforo usado, además, al emplear sondas fluorescentes se puede obtener información sobre el entorno de éstos<sup>19,21</sup>.

Existen diferentes tipos de marcadores fluorescentes que se pueden emplear para aplicaciones en microscopía de fluorescencia como<sup>18</sup>: proteínas fluorescentes, puntos cuánticos, nanopartículas y sondas fluorescentes orgánicas, entre otros.

## 2.1. Sondas fluorescentes orgánicas y su uso en microscopía

Muchos compuestos orgánicos poseen fluorescencia intrínseca, estos suelen ser óptimos para la microscopía de fluorescencia porque las diferencias de energía entre el estado excitado y los orbitales del estado fundamental son lo suficientemente pequeñas para que los fotones de longitudes de onda más largas (con menos energía) puedan emplearse en la promoción de electrones a estados excitados. En general, una mayor cantidad de enlaces conjugados requiere una menor energía de excitación<sup>16</sup>.

Su estructura comúnmente consiste en un fragmento fluorescente, un fragmento de anclaje al objetivo de estudio y un fragmento de reconocimiento, aunque en algunos casos éste último también puede ser el sitio de unión, de igual forma se han mencionado a los conectores como otra parte fundamental en la estructura<sup>22</sup>. Una ventaja de los fluoróforos sintéticos orgánicos es que se pueden emplear estrategias modernas de química orgánica para adaptar las estructuras químicas de éstos y, por lo tanto, ajustar de manera racional sus propiedades fotofísicas y funcionalidad<sup>3,22</sup>. La posibilidad de regular su fluorescencia forma la base para la obtención de un gran número de diferentes fluoróforos útiles<sup>2,23</sup>, la Figura 1.3 muestra algunas estructuras de fluoróforos comúnmente usadas en investigación biológica.

Los sistemas orgánicos  $\pi$  con un fragmento donador (D) y un aceptor (A) de electrones son conocidos como sistemas push-pull<sup>24</sup>. Esta arquitectura es de manera general, un marco estructural clave para la señal de fluorescencia de sondas orgánicas pequeñas, debido a que los cambios en la electrónica del fluoróforo pueden causar cambios en la fluorescencia. Un aumento en el efecto push-pull del fluoróforo, cuya excitación involucra la transferencia de carga intramolecular, da como resultado un cambio batocrómico en sus espectros de absorción y emisión<sup>22</sup>.

Para que una sonda fluorescente sea adecuada para la obtención de imágenes existen algunos requisitos que debe cubrir como fotoestabilidad<sup>25</sup>, brillo<sup>15</sup>, citotoxicidad baja, permeabilidad a la muestra, selectividad al objetivo de interés y fotoparpadeo (intermitencia entre estados encendidos y apagados de fluorescencia)<sup>15</sup>, esto último en el caso de técnicas de microscopía de superresolución como STORM (Microscopía de reconstrucción óptica estocástica por sus siglas en inglés).

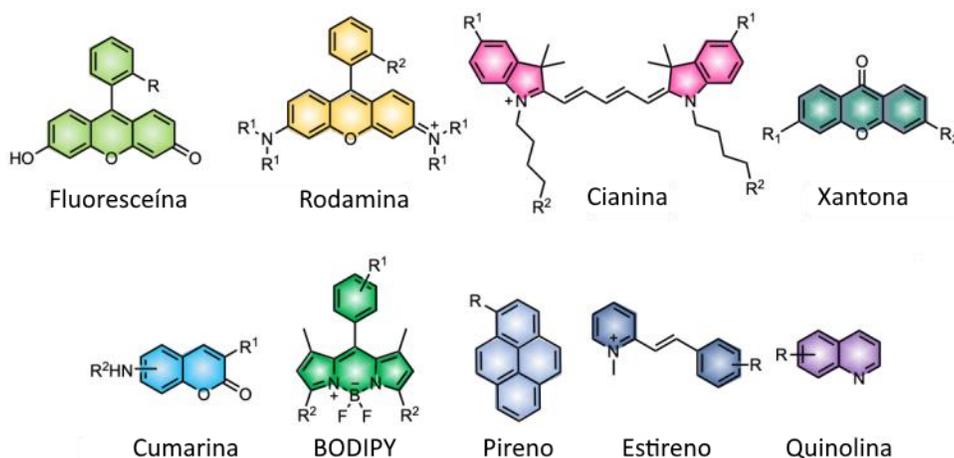


Figura 1.3 Estructuras base de fluoróforos comúnmente usados en el desarrollo de nuevas sondas fluorescentes de molécula pequeña, los grupos R indican los sitios generalmente modificables y/o funcionalizables<sup>22</sup>.

Este tipo de sondas han sido ampliamente usadas en aplicaciones biológicas debido a que su tamaño pequeño les permite participar en estrategias de bioconjugación con biomoléculas sin que presenten interferencias significativas<sup>26</sup>. Además, requieren periodos de tiempo cortos para el etiquetado<sup>27</sup> por su rápida difusión<sup>11</sup> y presentan baja toxicidad ya que se necesitan pequeñas concentraciones ( $\mu\text{M}$ ) de fluoróforo para poder etiquetar una muestra<sup>21</sup>.

La posibilidad de cambiar la estructura química de las sondas fluorescentes sintéticas ha dado lugar a que diversos esfuerzos se hayan centrado en la modificación de las longitudes de emisión de éstas. De este modo, se ha buscado crear sondas fluorescentes que presenten una emisión en el infrarrojo cercano (650-900 nm)<sup>28</sup>, ya que la emisión en este intervalo facilita la obtención de imágenes y monitoreo en tiempo real de procesos *in vitro* e *in vivo*, además, la autofluorescencia del fondo y fototoxicidad son sustancialmente reducidas<sup>16</sup>.

### 3. Célula y microambiente celular

Las células son consideradas las unidades básicas de la vida<sup>29</sup>, son estructuras altamente complejas formadas por subestructuras discretas especializadas llamadas organelos, los cuales se encuentran generalmente separados por sus propias bicapas lipídicas<sup>6</sup>.

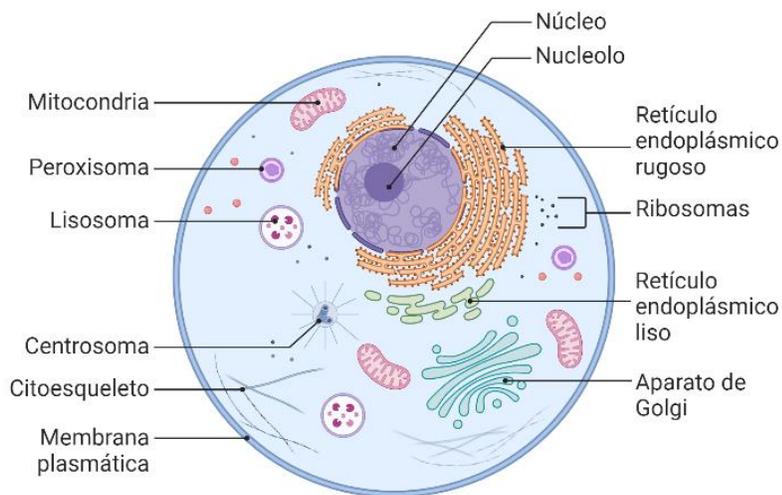


Figura 1.4 Esquemización de la estructura de una célula, cada organelo se encuentra identificado con su nombre. Imagen creada en BioRender.com

Estas estructuras se encargan de mantener el microambiente subcelular y cada una de ellas juega un papel específico y un rol indispensable en procesos celulares, asegurando el progreso en el crecimiento celular, proliferación, fisión, transducción y la apoptosis<sup>5,6</sup>. Una célula eucariótica típica tiene núcleo, membrana plasmática, retículo endoplásmico, aparato de Golgi, múltiples mitocondrias, lisosomas, ribosomas, entre otros organelos<sup>30</sup>. Cada uno necesita especies biológicas específicas y el microambiente adecuado para funcionar, por lo que interrupciones en la homeostasis de estas especies o mutaciones en el microambiente contribuyen a la disfunción del organelo causando así trastornos y enfermedades<sup>6</sup>.

Los organelos generalmente mantienen morfologías particulares para adaptarse a sus funciones, pero pueden cambiar en respuesta a señales metabólicas o de desarrollo, estos cambios permiten adaptaciones funcionales y el mantenimiento de la homeostasis celular. De esta manera, las células están diseñadas para detectar y adaptarse a los cambios de condiciones ambientales, un ejemplo de esto son las células cancerosas que aprovechan tales programas de supervivencia desarrollados evolutivamente para proliferar en condiciones metabólicas adversas<sup>31</sup>.

De acuerdo con los fines perseguidos en el desarrollo del presente trabajo se describirán más a detalle las características e importancia de las mitocondrias y gotas lipídicas.

### 3.1 Mitocondria

Las mitocondrias son organelos cruciales involucrados en la producción de energía celular y la regulación de numerosos aspectos de la actividad en la célula<sup>32</sup>. Estructuralmente constan de dos compartimentos delimitados por membranas, uno dentro del otro, la membrana externa rodea el espacio intermembranal, mientras que la interna rodea la matriz mitocondrial y forma crestas<sup>33</sup>.

Durante mucho tiempo fueron consideradas principalmente como el “centro de energía” de la célula, que produce la energía requerida para el metabolismo celular mediante la fosforilación oxidativa, actualmente se ha demostrado que también están involucradas en más procesos fisiológicos como la muerte celular programada, inmunidad innata, autofagia, oxidación redox, señalización, homeostasis de calcio y reprogramación de células madre<sup>34</sup>. Debido a las transformaciones redox asociadas con la actividad del ciclo de Krebs, el potencial de membrana mitocondrial es negativo<sup>35</sup>, este potencial ha sido reportado con valores de entre -140 y -180 mV<sup>10</sup>.

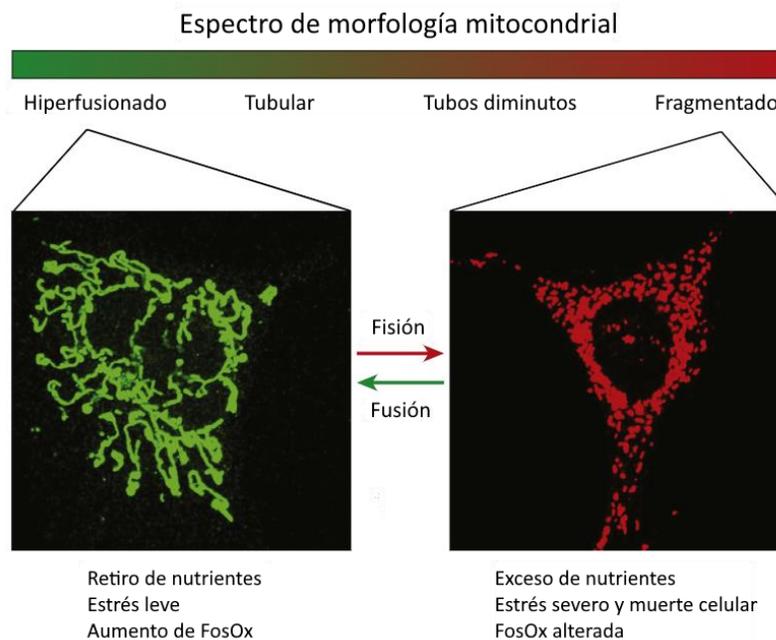


Figura 1.5 Espectro de la morfología mitocondrial<sup>7</sup>.

La bioquímica de estos organelos ha sido ampliamente estudiada, pero muchos estudios se han realizado en sistemas aislados y libres de células, lo cual había llevado a imaginar a la mitocondria como un organelo solitario, sin embargo, en los últimos años esta visión ha cambiado conforme nuevos enfoques han permitido el análisis de la función y comportamiento mitocondrial dinámico en respuesta a las señales celulares de células intactas<sup>10</sup>. Ahora se sabe que las mitocondrias forman una red funcional cuya morfología es estacionaria y está regulada por eventos de fisión, fusión y motilidad, a este conjunto de fenómenos se le conoce como dinámica mitocondrial<sup>36</sup>.

Muchas de las funciones mitocondriales han sido relacionadas con su morfología, la fisión provoca la fragmentación de la red mitocondrial y generalmente está asociada a disfunción metabólica, así como el aumento de producción de especies reactivas de oxígeno (ROS). Por otra parte, la fusión da como resultado una red hiperfusionada que sirve para contrarrestar agresiones metabólicas, preservar la integridad celular y proteger contra autofagia<sup>7</sup>. De acuerdo con lo mencionado anteriormente, una disfunción mitocondrial contribuirá a la aparición de una notable diversidad de enfermedades, que incluyen padecimientos neurovasculares, atrofia óptica, neuropatía, miocardiopatía, diabetes mellitus, entre otras<sup>33</sup>.

### 3.2 Gotas lipídicas

Las gotas lipídicas (LDs) son estructuras celulares que almacenan grasa en forma de lípidos neutros<sup>37</sup>. Tienen una estructura única con un núcleo hidrofóbico de lípidos neutros rodeado por una membrana de fosfolípidos, que separa los lípidos neutros hidrofóbicos del entorno citoplasmático acuoso. Además, en su superficie se encuentran situadas varias proteínas estructurales y funcionales<sup>38,39</sup>. Han sido observadas como estructuras esféricas, su

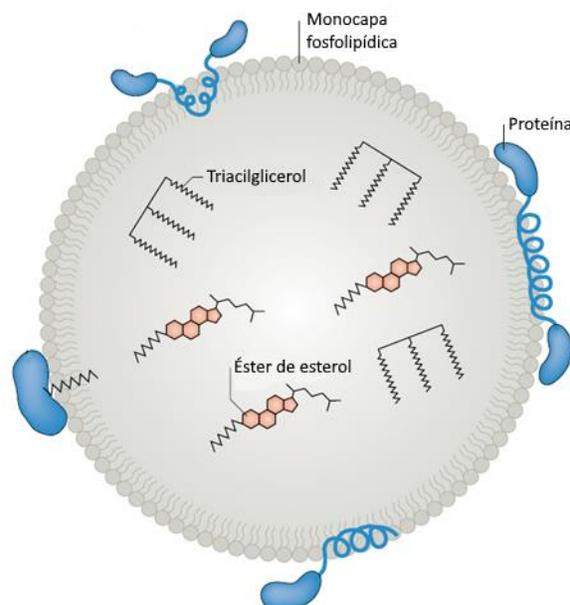


Figura 1.6 Ilustración de la estructura de una gota lipídica.

diámetro varía generalmente de 0.1 a 5  $\mu\text{m}$  en no adipocitos, pero puede llegar a más de 100  $\mu\text{m}$  en adipocitos blancos<sup>40</sup>.

La capacidad de almacenar lípidos es importante para garantizar un suministro continuo independientemente de la disponibilidad de nutrientes externos, así mismo algunos lípidos tienen efectos tóxicos adversos que pueden controlarse esterificándolos y depositándolos de manera segura dentro de las LDs. Además, albergan numerosas enzimas del metabolismo de los lípidos y participan activamente en la formación y descomposición de lípidos neutros, fosfolípidos y esteroides<sup>41</sup>.

Están involucradas en varios eventos patológicos e inmunidad innata, se ha demostrado que son el objetivo de varios patógenos, incluidos virus y parásitos<sup>39</sup>. Así mismo, estos organelos desempeñan papeles importantes en distintos padecimientos, en la enfermedad de hígado graso no alcohólico se ha observado que la lipogénesis y la reducción de la lipólisis provoca un crecimiento desregulado de LDs y la posterior promoción de esteatosis hepática.

Por otra parte, en los procesos neurodegenerativos el incremento de especies reactivas de oxígeno y otros factores estresantes conducen a la formación de gotas lipídicas neuroprotectoras en células gliales, estos organelos pueden prevenir infecciones bacterianas, pero promover la replicación y proliferación viral. También promueven la proliferación, migración y supervivencia de células cancerígenas aliviando el estrés celular y/o proporcionando sustratos para la síntesis de lípidos de membrana y la  $\beta$ -oxidación. En padecimientos cardiovasculares, reducen la lipotoxicidad y proporcionan moléculas de señalización metabólica en macrófagos y cardiomiocitos<sup>42</sup>.

## Capítulo 2 Antecedentes

La aplicación de compuestos fluorescentes en técnicas de bioimagen como la microscopía confocal ha sido pieza clave para el monitoreo de la dinámica subcelular, así como en el avance en el conocimiento sobre sitios de contacto entre organelos dentro de la célula y el comportamiento de estos en presencia de enfermedades. Esto ha generado en los últimos años un interés creciente en la síntesis y desarrollo de nuevos fluoróforos con características óptimas para su aplicación en sistemas biológicos y su observación mediante microscopía de fluorescencia.

Se han reportado distintos ejemplos de sondas fluorescentes diseñadas para la localización selectiva de organelos, estas sondas también pueden responder a distintos estímulos aplicados en el medio que las rodea como cambios en la viscosidad, polaridad, pH, potencial y a moléculas específicas como por ejemplo las especies reactivas de oxígeno (ROS). Estas sondas son desarrolladas con diversos diseños en función a la localización que se desea y el parámetro fisicoquímico o especie química específica que se pretende monitorear.

El presente trabajo tiene como objetivo central la síntesis de fluoróforos de tipo cianina, que puedan ser selectivos a mitocondrias y/o gotas lipídicas, además de su estudio como sondas fluorescentes para su aplicación en microscopía confocal en modelos *in vitro* e *in vivo*. La literatura ofrece múltiples ejemplos de sondas selectivas a los organelos mencionados anteriormente, por ello a continuación se describe la química que hay detrás del diseño de sondas selectivas a cada uno de estos, así como ejemplos recientes de sondas para el estudio de su dinámica, incluyendo también aquellas que son típicamente empleadas por ser comercialmente disponibles.

### 1. Sondas selectivas a mitocondria

El potencial de membrana mitocondrial (MMP) es el componente principal de la dinámica del movimiento de protones, que se forma por los protones bombeados desde la matriz mitocondrial a la membrana, por ello mantienen un valor negativo<sup>43</sup>. Muchas de las sondas dirigidas a mitocondria poseen en su estructura al menos una carga positiva que impulsa la localización dependiente de su

potencial de membrana negativo, además deben poseer un carácter hidrofóbico suficiente ( $\log P > 0$ ) para que se permita su tránsito a través de la membrana mitocondrial interna densamente empaquetada<sup>10</sup>.

Este es el principio que siguen algunas de las sondas comercialmente disponibles más usadas en estudios biológicos, en *The Molecular Probes Handbook: A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies* de Invitrogen, se reporta una de las series más populares para el marcaje de mitocondrias: las sondas MitoTracker®.

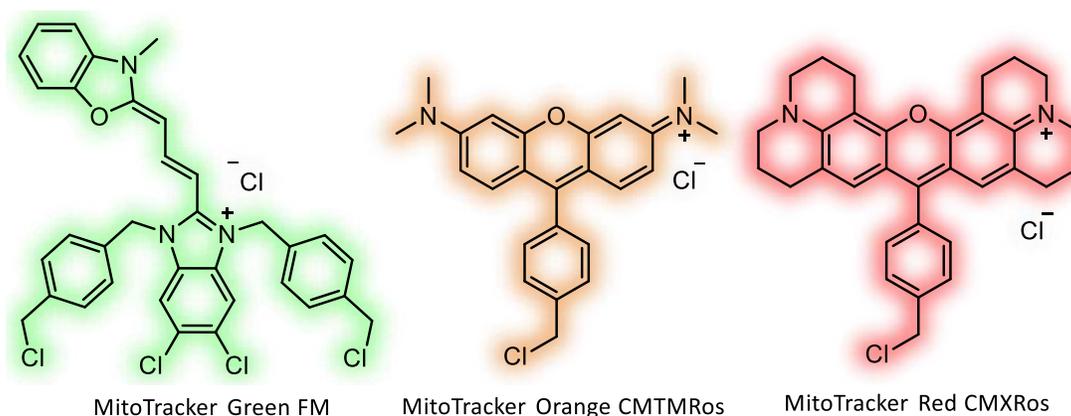


Figura 2.1 Estructuras químicas de algunas sondas pertenecientes a la serie MitoTracker®.

La figura 2.1 muestra la estructura química de algunas moléculas pertenecientes a esta familia, las cuales poseen una carga positiva que las dirige a la red mitocondrial por la diferencia de potencial eléctrico. Esta serie de fluoróforos posee longitudes máximas de absorción entre 490 y 644 nm, así como máximos de emisión localizados entre 516 y 665 nm. Se requieren concentraciones submicromolares para el marcaje mitocondrial y tras este paso es posible realizar fijación celular sin perturbar el patrón de tinción ya que son retenidas durante este proceso<sup>44</sup>.

JC-1 es una sonda radiométrica clásica comercial que ha sido aplicada en biología celular para la detección de MMP (Figura 2.2). Cuando existe un valor normal de MMP, JC-1 puede acumularse en la red mitocondrial para formar agregados J y así emitir fluorescencia roja (590 nm). Cuando las células pasan a un estado apoptótico el MMP disminuye y gran cantidad de fluoróforo sale de la mitocondria, bajo esta condición las bajas concentraciones de JC-1 no pueden formar agregados y de este modo emite fluorescencia verde (520 nm) correspondiente a la formación del monómero, lo cual también

ocurre en células no sanas. La proporción de fluorescencia roja/verde de JC-1 en las mitocondrias se considera una evaluación directa del nivel de MMP<sup>45</sup>.

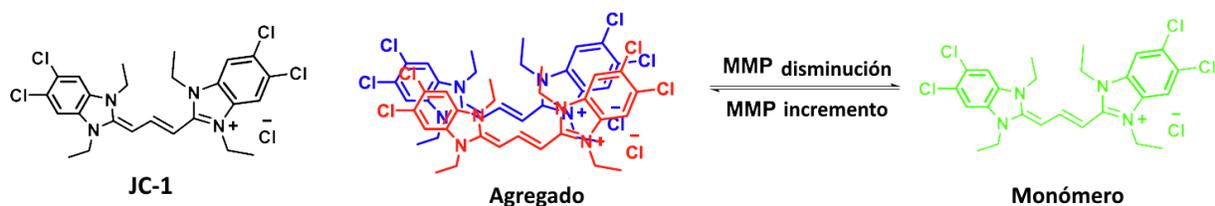


Figura 2.2 Estructura química de JC-1 y su modo de detección de MMP<sup>45</sup>.

Siguiendo esta línea existen otro tipo de sondas que emplean péptidos como fragmentos de anclaje, tal es el caso de la sonda MMP\* ilustrada en la figura 2.3. La cual está conformada por residuos de ciclohexilalanina y D-arginina, el primero fue integrado con la finalidad de proporcionar la hidrofobicidad suficiente para atravesar las membranas y el segundo otorga el carácter catiónico para dirigirse a la mitocondria<sup>46</sup>. Esta sonda combina un rotor molecular derivado de fenilquinoxalina capaz de presentar rotación interna dependiente de la microviscosidad y un fragmento de cumarina que presenta respuesta solvatocrómica a cambios de micropolaridad, de esta manera se reporta una sonda fluorescente funcional con la que se pueden realizar mediciones del ambiente celular a través de monitoreo de perfiles de emisión de la cumarina y el tiempo de vida de fluorescencia de la fenilquinoxalina<sup>47</sup>.

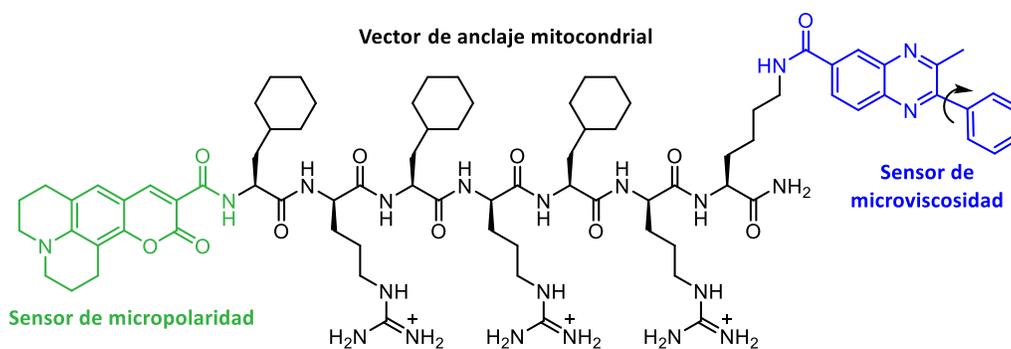
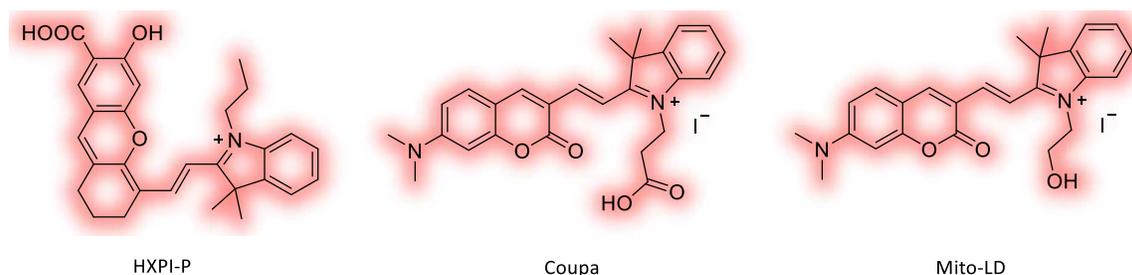


Figura 2.3 Estructura química de MMP\*, se identifican los fragmentos que la componen y el propósito de estos.

En años recientes, fluoróforos derivados de hemicianinas, una clase de cianinas polimetínicas, han surgido como sondas NIR versátiles. Específicamente aquellas que contienen un heterociclo de cromeno exhiben excelentes propiedades de fluorescencia, lo cual las convierte en fluoróforos

atractivos para su aplicación como sondas y sensores fluorescentes<sup>48</sup>. La figura 2.4 muestra algunos ejemplos de sondas selectivas a mitocondria con la inclusión de hemicianinas como núcleo fluorescente.



*Figura 2.4 Sondas mitocondriales con núcleo fluorescente de hemicianina.*

La sonda HXPI-P exhibe fluorescencia en el infrarrojo cercano (730 nm) y presenta sensibilidad a cambios de polaridad, lo cual permite cuantificar la polaridad utilizando la relación de intensidad de fluorescencia en dos longitudes de onda diferentes y el desplazamiento de los máximos de emisión, ya que presenta un desplazamiento hacia el rojo a medida que disminuye la polaridad del medio, a través de esta sonda se pueden estimar las variaciones de la polaridad mitocondrial durante la inanición y la mitofagia inducida por fármacos<sup>49</sup>.

Coupa se ha reportado como una sonda que posee un doble marcaje de acuerdo con las condiciones en las que se encuentre la célula. En condiciones fisiológicas normales se une a lisosomas emitiendo una fluorescencia roja; sin embargo, cuando se expone a especies reactivas de azufre en las mitocondrias Coupa emite fluorescencia azul en estos organelos. De esta manera se logran identificar interacciones entre mitocondrias y lisosomas mediante cambios relacionados con la fluorescencia de la sonda<sup>50</sup>.

Por otra parte, Mito-LD se ha reportado como una sonda capaz de dirigirse a mitocondrias por la carga catiónica que posee pero que también puede dirigirse a gotas lipídicas tras una ciclación de la cadena lateral del fragmento de indol. El mecanismo propuesto para esta sonda se basa en la diferencia de carga que existe en ambos organelos, de este modo la especie abierta se dirige a mitocondrias dando una señal de emisión roja y la especie ciclada a LDs con una fluorescencia verde atribuida a la interrupción de la conjugación como resultado de la ciclación del sistema<sup>51</sup>.

## 2. Sondas selectivas a gotas lipídicas

Debido a la importancia de estos organelos se han desarrollado diversas sondas fluorescentes en pro de la obtención de información acerca de su dinámica. *The Molecular Probes Handbook* de Invitrogen reporta algunas de las sondas dirigidas a gotas lipídicas comercialmente disponibles, en la figura 2.5 se muestra la estructura química y nombre de estos compuestos.

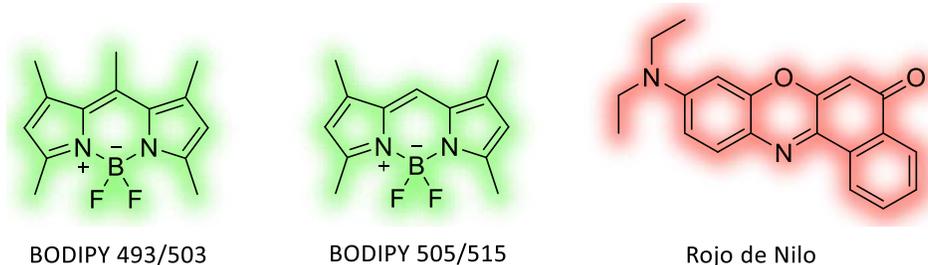


Figura 2.5 Estructura de fluoróforos comercialmente disponibles selectivos a gotas lipídicas.

Fluoróforos derivados de BODIPY ofrecen un desplazamiento de Stokes pequeño, coeficientes de extinción y rendimientos cuánticos altos, al poseer una carga neutra y combinarse con estructuras no polares, estos fluoróforos tienen aplicaciones como marcadores de lípidos neutros y como trazadores para aceites y otros lípidos no polares. Mediante estudios de citometría de flujo se ha observado que el BODIPY 493/503 muestra selectividad a gotas lipídicas y su bajo peso molecular beneficia su velocidad de difusión en las membranas. Por otra parte, el BODIPY 505/515 es destacado por penetrar fácilmente membranas celulares de embriones de pez cebra, marcando de manera adecuada el saco vitelino del pez<sup>44</sup>. Es importante mencionar que los números con los cuales se identifican se atribuyen a los valores de  $\lambda_{\text{absorción}} / \lambda_{\text{emisión}}$ . El rojo de Nilo es selectivo a lípidos neutros como los ésteres de colesterilo y es adecuado para marcar inclusiones de fosfolípidos lisosomales, por estas características es empleado también para localizar y cuantificar gotas lipídicas dentro de las células. Es un fluoróforo que presenta solvatocromismo positivo y en medios acuosos su emisión es baja<sup>44,52,53</sup>.

A pesar de que estos marcadores son comercialmente disponibles, presentan algunas desventajas como un marcaje no muy selectivo, lo cual ocurre con el rojo de Nilo que puede teñir otras estructuras intracelulares, en el caso de los BODIPYs su pequeño desplazamiento de Stokes puede provocar fenómenos de autoabsorción que afecten su fluorescencia<sup>54</sup>.

Contrario a lo que sucede en el diseño de sondas selectivas a mitocondria, en las que se aprovecha el potencial de carga negativo de la membrana y se incluyen cargas positivas en las sondas para promover su orientación hacia estos organelos, para el marcaje de gotas lipídicas no existe un mecanismo general que garantice una localización selectiva. Una característica importante que se debe buscar es que se trate de moléculas lipofílicas y con una carga neutra; sin embargo, la sola inclusión de fragmentos lipofílicos no garantiza la localización selectiva en LDs, ya que moléculas muy lipofílicas pueden no difundirse al interior de la célula.

Un núcleo fluorescente que ha sido ampliamente empleado en la obtención de sondas selectivas a gotas lipídicas es el de cumarina, ésta es utilizada por su gran coeficiente de absorción molar, alta eficiencia cuántica de fluorescencia y su fácil modificación química<sup>55</sup>, en la figura 2.6 se presentan las estructuras químicas de algunas de estas sondas reportadas recientemente.

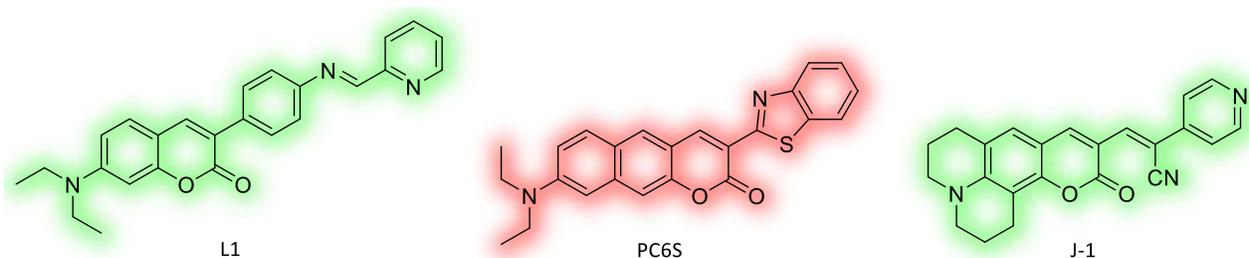


Figura 2.6 Nombre y estructura química de sondas fluorescentes selectivas a gotas lipídicas con núcleo de cumarina.

Liu G. y colaboradores reportaron la sonda L1<sup>56</sup>, la cual presenta emisión a 480-530 nm y una alta fotoestabilidad atribuida a su estructura cumarina-anilina conjugada con un enlace C=N, su selectividad a gotas lipídicas permite el monitoreo de ciclos dinámicos de lípidos en células. La sonda PC6S presenta una conjugación  $\pi$ -extendida que le permite poseer una emisión que varía del verde (500 nm) al rojo (650 nm), ya que presenta solvatocromismo y sus tiempos de vida de fluorescencia dependen fuertemente de la polaridad del disolvente, debido a esta característica se puede estimar la polaridad aparente de las gotas lipídicas en las células mediante el uso de microscopía de tiempo de vida de fluorescencia, dicho método fue aplicado en el monitoreo en tiempo real de la formación de gotas lipídicas en células hepáticas de ratones modelo con hígado graso<sup>57</sup>.

Por otra parte, la sonda J-1 es un derivado de julolidina, estructura que se empleó para aumentar el rendimiento de fluorescencia por la restricción de movimiento del átomo de nitrógeno, lo cual produce un mayor desplazamiento de Stokes. La sonda presentó una emisión superior a los 550 nm y

los experimentos de microscopía demostraron un marcaje selectivo a gotas lipídicas a bajas concentraciones (200 nM), su aplicabilidad solamente se exploró en cultivo celular<sup>58</sup>.

Los fluoróforos estabilizados con un puente de boro rígido han captado atención continua en el campo de la bioimagen<sup>59</sup>, particularmente, el complejo  $\beta$ -dicetonato de difluoroboro es reconocido como un fuerte aceptor de electrones, mejora los coeficientes de extinción molar, promueve una fuerte señal de fluorescencia en disolución y estado sólido, así como una emisión sintonizable, ha sido también empleado como sensor de oxígeno y mecánico<sup>60,61</sup>.

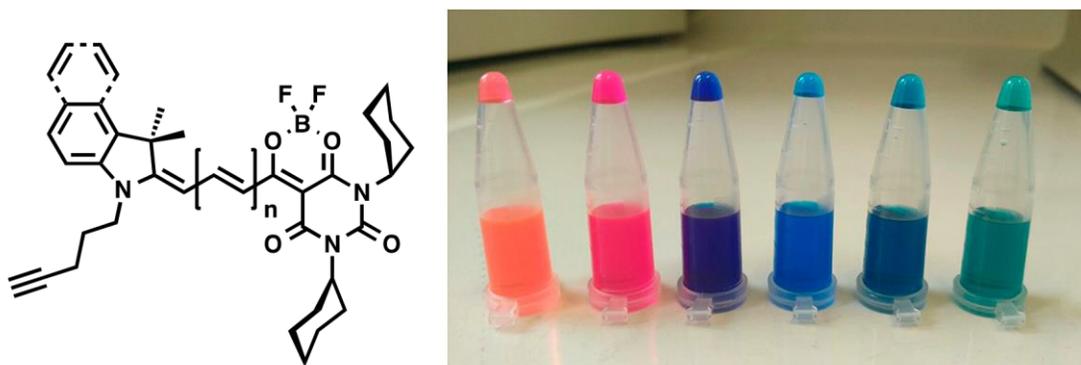


Figura 2.7 Izquierda: estructura química general de la familia de fluoróforos StatoMerocianinas (SMCy) donde  $n=1,2$  y 3. Derecha: SMCys disueltas en DMSO ordenadas de menor a mayor longitud de onda de emisión<sup>62</sup>.

Collot M. y colaboradores reportaron una serie de fluoróforos merocianina basados en un grupo indolenina y un derivado de barbiturato de dioxaborina separados por una cadena de polimetino de diferentes longitudes (Figura 2.7), llamados StatoMerocianinas (SMCy)<sup>62</sup>. Estos abarcan emisiones desde el amarillo hasta el infrarrojo cercano, poseen bandas de absorción y emisión estrechas, no presentan emisión en medios acuosos y marcan lípidos intracelulares de manera selectiva. La diversas longitudes de emisión de la serie permitió rastrear el intercambio de gotas lipídicas entre células, confirmando así mecanismo de comunicación intercelular

## Hipótesis

Moléculas fluorescentes derivadas de cianina que contienen en su estructura grupos donadores y aceptores de electrones pueden ser empleadas como sondas fluorescentes selectivas a organelos y presentar modificaciones en su emisión por cambios de parámetros fisicoquímicos involucrados con la dinámica subcelular mediante el uso de microscopía confocal.

## Objetivos

### General

Desarrollar nuevas moléculas fluorescentes del tipo estímulo-respuesta para evaluar su actividad como sondas moleculares de parámetros fisicoquímicos de la dinámica subcelular en cultivos celulares y sistemas vivos.

### Específicos

- Sintetizar, purificar y caracterizar fluoróforos derivados de cianina y hemicianina.
- Estudiar las propiedades espectroscópicas de los fluoróforos.
- Realizar análisis solvatocrómicos y estudios realizando cambios de viscosidad, polaridad y pH del medio a través de espectroscopía UV-Vis y de fluorescencia.
- Estudiar la localización subcelular de los fluoróforos en cultivo celular mediante microscopía confocal.
- Realizar estudios de colocalización con marcadores comercialmente disponibles.
- Realizar la adición de despolarizadores de membrana y aumento de concentración del fluoróforo al cultivo celular y observar la respuesta óptica para analizar su comportamiento químico.
- Estudiar la localización de los fluoróforos *in vivo* en el modelo pez cebra (*Danio rerio*) y su comportamiento químico.

## Justificación

En este trabajo se aborda el desarrollo de nuevas sondas fluorescentes para el monitoreo de dinámica subcelular que reúnan las características suficientes para poder ser empleadas en microscopía confocal.

Debido al fenómeno de autofluorescencia de tejidos y a la fototoxicidad generada al emplear longitudes de onda cortas en técnicas de microscopía, en este proyecto se propone la síntesis de nuevas moléculas fluorescentes derivadas de cianina. Este fluoróforo puede mantener excelente brillo en cuerpos vivos utilizando bajas concentraciones, además de que el procedimiento su síntesis relativamente sencillo permite modificaciones útiles en su estructura, también de acuerdo con la extensión de su sistema  $\pi$  conjugado sus derivados pueden tener emisión a longitudes de onda largas (550-800 nm) por lo que poseen perspectivas prometedoras para aplicaciones NIR *in vivo*<sup>63,64</sup>.

Su estructura general consta de dos heterociclos que contienen nitrógeno como grupos terminales que están conectados por una cadena de polimetino conjugado (figura J.1), al modificar esta cadena  $\pi$  conjugada o el grupo terminal, las propiedades de este fluoróforo pueden sintonizarse fácilmente<sup>65</sup>. Las hemicianinas son un subgrupo que contienen en su estructura grupos donadores y aceptores de electrones distintos, la principal diferencia que poseen es que en uno de los grupos terminales el nitrógeno no forma parte del núcleo heterocíclico<sup>66</sup>.

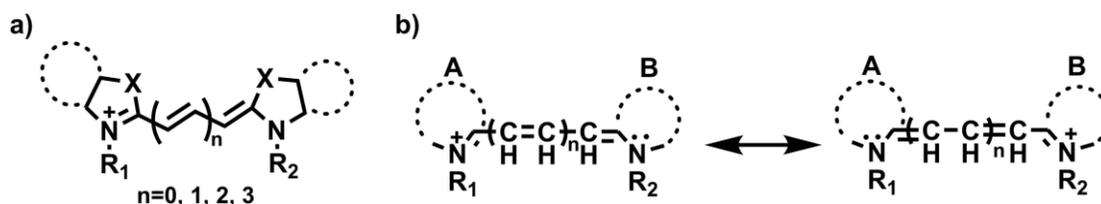


Figura J. 1 a) Estructura química de fluoróforos del tipo cianina. b) Estructuras de resonancia de las cianinas<sup>64</sup>.

En este contexto, en el presente trabajo se explora la síntesis de una serie de fluoróforos del tipo hemicianina utilizando como fragmento donador una cumarina derivada de julolidina, con el fin de obtener moléculas con fluorescencia alta y fotoestables durante más de 30 minutos, y como fragmentos aceptores sales cuaternarias de benzoindol, benzotiazol y un fragmento  $\beta$ -dicetonato de difluoroboro. De igual forma, se plantea la síntesis de cianinas 5.5 y 7.5 derivadas de las mismas sales cuaternarias de benzoindol con el objetivo de obtener fluoróforos con emisión a longitudes de onda largas.

Resulta importante mencionar que la inclusión de las sales cuaternarias se planea desde un inicio con la intención de obtener compuestos cargados positivamente y que por ende se localicen en mitocondrias. Por otra parte, se emplea el complejo de boro para obtener una molécula con carga neutra, que pueda localizarse en otro organelo como gotas lipídicas.

En el caso de las sales cuaternarias empleadas se propone la síntesis de dos derivadas de yoduro de metilo para obtener fluoróforos, uno previamente reportado<sup>67</sup>, que funcionen como controles para las otras moléculas dirigidas a mitocondria. Adicionalmente se incluye una sal cuaternaria con un grupo éster para obtener sondas no dependientes del MMP.

Como se mencionó en capítulos previos, las sondas orientadas a mitocondrias suelen depender de la carga negativa de la membrana mitocondrial por lo que al despolarizarse, los fluoróforos salen y la localización se pierde, esto resulta particularmente desfavorable al trabajar con muestras fijadas, ya que en el proceso de fijación la célula muere y el potencial de membrana se pierde por completo<sup>68</sup>, por lo que resulta importante desarrollar sondas que puedan ser retenidas en este organelo al despolarizarse.

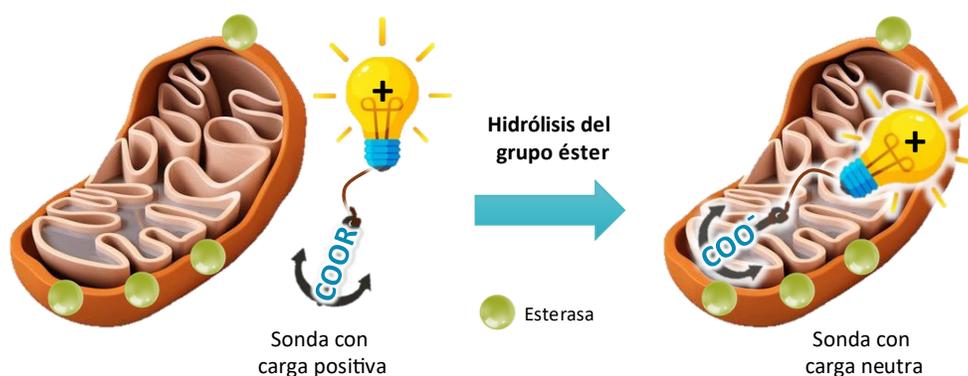


Figura J. 2 Representación del mecanismo de retención mitocondrial de los fluoróforos con fragmentos éster.

La esterasa es un catalizador abundante en la hidrólisis de ésteres en los ácidos y alcoholes correspondientes, la reacción de estas enzimas tiene lugar en fragmentos de una sola membrana, incluidas las membranas mitocondriales interna y externa<sup>69,70</sup>. Aprovechando este mecanismo, la inclusión de fragmentos éster tiene como propósito que la sonda que inicialmente posee carga catiónica se dirija a mitocondria y tras su difusión dentro de ella ocurra la hidrólisis del éster por acción

de las esterasas, para obtener una molécula neutra que permanezca retenida y por lo tanto la localización no se vea afectada por cambios en el MMP (Figura J.2).

También se propone una modificación de las cianinas 7.5 sintetizadas, agregando un fragmento morfolina, con la finalidad de obtener fluoróforos que puedan presentar localización lisosomal.

Finalmente, es importante mencionar que este trabajo es uno de los pioneros de la línea de sondas y marcadores fluorescentes **AztecFluors**, los cuales son una iniciativa en desarrollo en el Instituto de Química que tiene como finalidad crear fluoróforos funcionales útiles para su uso en la comunidad científica de la UNAM y en general la comunidad científica mexicana. Dicho proyecto fue creado en respuesta a las necesidades observadas en la adquisición y uso de fluoróforos útiles en microscopía, ya que actualmente existen diversos fluoróforos comerciales con precios altos y una inversión considerable de tiempo desde su compra hasta su entrega. Además, a través de este proyecto se busca la aplicabilidad de los fluoróforos sintetizados y la creación de proyectos interdisciplinarios con otras áreas de investigación.

## Capítulo 3 Desarrollo experimental

### 1. Reactivos e instrumentación

Todos los reactivos necesarios y las disoluciones amortiguadoras fueron obtenidas de proveedores comerciales y se utilizaron sin previa purificación. Los disolventes empleados se trataron mediante métodos estandarizados según su uso, en el caso de aquellos necesarios para la realización de reacciones fueron empleados disolventes de grado HPLC, estos también fueron empleados para los estudios espectrofotométricos al igual que agua desionizada.

Los porcentajes de rendimiento reportados corresponden al rendimiento de los productos purificados, es importante mencionar que estos no fueron optimizados. El monitoreo de las reacciones se realizó mediante CCF en placas de gel de sílice y reveladas mediante la exposición a lámpara de luz UV ( $\lambda$  254 nm y 365 nm). Los análisis de RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  fueron realizados a 25°C empleando los equipos: Bruker Fourier de 300 MHz y Bruker AVANCE III de 400 MHz, los espectros obtenidos muestran los desplazamientos químicos relativos a  $\text{Si}(\text{CH}_3)_4$ , empleando como disolvente DMSO- $d_6$  o  $\text{CDCl}_3$ . Los espectros de masas en modo de ionización ESI+ de alta resolución fueron adquiridos en un equipo Agilent Technologies 6530 Accurate-Mass Q-TOF LC/MS, usando DMSO o metanol como disolvente. Los espectros de infrarrojo fueron obtenidos en un equipo FT-IR NICOLET IS-50 de Thermo Fisher Scientific, mostrando en el eje de las abscisas el número de onda ( $\text{cm}^{-1}$ ) y el porcentaje de transmitancia en las ordenadas.

Los estudios espectrofotométricos fueron realizados a 25 °C en celdas de cuarzo con paso óptico de 1 cm y volumen de 3 mL. Los espectros UV-Vis fueron obtenidos en un espectrofotómetro de arreglo diodos Cary 100 Agilent. Los espectros de emisión de fluorescencia se obtuvieron en un fluorímetro FS5 Edinburgh Instruments. La medición de absorbancia para el cálculo de coeficientes de partición se realizó en un lector multi-modal y de captura de imágenes celulares Cytation 5 BioTek en placas de 96 pozos. La obtención de imágenes de microscopía se llevó a cabo en un microscopio confocal Zeiss LSM 880 invertido. Los cálculos computacionales hechos se realizaron teniendo acceso al equipo de súper cómputo Mitzli y el programa Gaussian 16, mediante el proyecto LANCAD-UNAM-DGTIC-365.

## 2. Síntesis

La sección experimental sintética se encuentra dividida en dos partes, en la primera se describe la metodología realizada para la obtención de los compuestos precursores (identificados con letras) que fueron necesarios para la síntesis de las sondas fluorescentes.

### 2.1 Síntesis de moléculas precursoras

En el esquema 3.1 se muestra la ruta sintética empleada para la obtención de los compuestos precursores y posteriormente se detalla la metodología realizada para cada molécula.

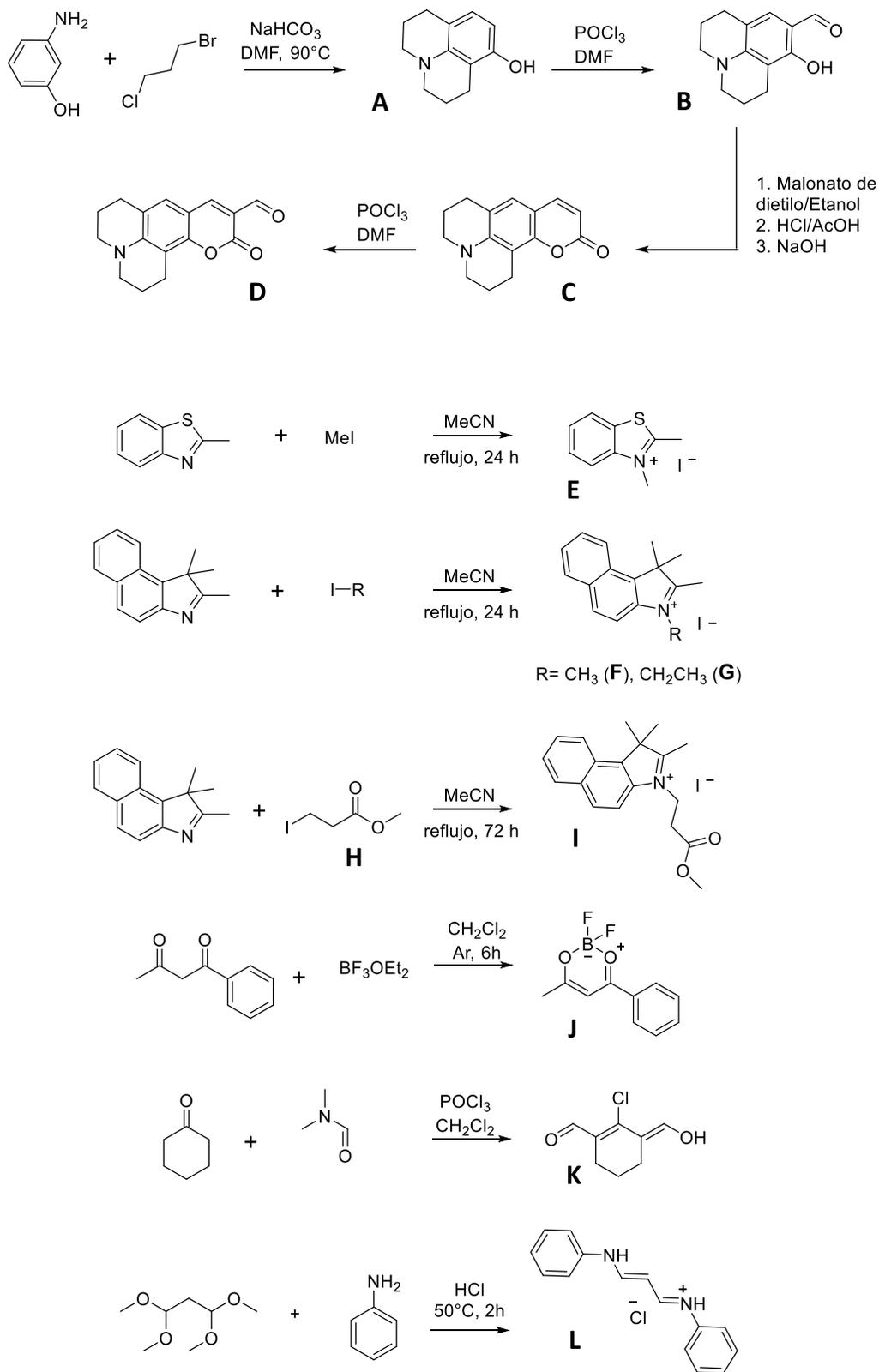
#### **Síntesis de A** (8-hidroxijulolidina)

Se disolvieron 5 g de 3-aminofenol (45.82 mmol), 15 mL de 1-bromo-3-cloropropano (151.49 mmol) y 14 g de NaHCO<sub>3</sub> (166.65 mmol) en 30 mL de DMF anhidra. La mezcla se colocó en agitación y calentamiento a 90°C, una vez transcurridas 24 horas de reacción ésta se dejó enfriar y se realizó una extracción con AcOEt/H<sub>2</sub>O (1:1). La fase orgánica fue recuperada y concentrada, posteriormente se purificó mediante cromatografía de columna (hexano/AcOEt, 9:1). Fue obtenido un sólido blanco cristalino con un rendimiento del 35%.

*RMN <sup>1</sup>H: (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ= 6.65 (d, 1H), 6.05 (d, 1H), 3.10 (m, 4H), 2.66 (m, 4H), 1.97 (m, 4H).*

#### **Síntesis de B** (8-hidroxijulolidina-9-carboxaldehído)

Se agregaron 2.4 mL de POCl<sub>3</sub> (25.67 mmol) gota a gota a 3 mL de DMF (38.75 mmol) previamente colocada en un baño de hielo, esta mezcla se dejó en agitación durante 30 minutos. El compuesto A (3.03 g, 16 mmol) previamente obtenido se disolvió en 4 mL de DMF y fue añadido a la mezcla previa manteniendo el baño de hielo, la nueva mezcla se mantuvo en agitación por otros 30 minutos a temperatura ambiente. La reacción se colocó a reflujo durante una hora y posteriormente se dejó enfriar. Se añadieron 200 g de hielo y la mezcla se agitó hasta observar la formación de precipitado, el precipitado se filtró y dejó secar a vacío para así obtener un sólido azul verdoso que fue empleado en la siguiente reacción sin purificación adicional con un rendimiento del 90%.



Esquema 3.1 Ruta sintética para la obtención de moléculas precursoras.

**Síntesis de C** (2,3,6,7-tetrahidro-1*H*,5*H*,11*H*-[1]benzopirano[6,7,8-*ij*]quinolizin-11-ona)

Se disolvieron 2.9 g de **B** (13.34 mmol) y 4.23 mL de malonato de dietilo (30.39 mmol) en 20 mL de etanol, posteriormente fueron adicionados 1.27 mL de piperidina (13.66 mmol), esta mezcla se colocó en agitación y reflujo durante 24 horas. El disolvente fue removido bajo presión reducida para obtener un sólido al que se agregaron 25 mL de ácido clorhídrico concentrado (295.9 mmol) y 20 mL de ácido acético glacial (349.7 mmol).

La nueva mezcla se agitó y calentó a 80°C durante 12 horas. Una vez transcurrido el tiempo de reacción la mezcla fue enfriada a temperatura ambiente. La reacción se neutralizó, vertiendo el crudo de reacción en 400 mL de agua helada y añadiendo una solución acuosa al 20% de NaOH. La mezcla se mantuvo en agitación y de manera lenta un precipitado amarillo fue apareciendo en la disolución. El precipitado se filtró a vacío y el sólido se lavó con agua pura para así obtener un sólido amarillo con rendimiento del 62%.

*RMN*<sup>1</sup>*H*: (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ= 7.44 (*d*, 1*H*), 6.84 (*s*, 1*H*), 5.97 (*d*, 1*H*), 3.26 (*m*, 4*H*), 2.88 (*t*, 2*H*), 2.75 (*t*, 2*H*), 1.98 (*m*, 4*H*).

**Síntesis de D** (11-oxo-2,3,6,7-tetrahidro-1*H*,5*H*,11*H*-pirano[2,3-*f*]pirido[3,2,1-*ij*]quinolina-10-carbaldehído)

El compuesto **D** fue obtenido siguiendo el mismo procedimiento que se empleó para el compuesto **B** y el crudo de reacción fue purificado mediante cromatografía de columna (hexano/AcOEt, 1:1). La fracción correspondiente al producto se concentró y se obtuvo un sólido naranja con rendimiento del 45%.

**Síntesis de H** (metil 3-yodopropanoato)

El compuesto **H** fue obtenido mediante una reacción de esterificación catalizada por ácido. Se disolvió un gramo de ácido 3-yodopropiónico (5 mmol) en 20 mL de metanol y se adicionó una gota de ácido sulfúrico concentrado, la mezcla se mantuvo en agitación y se calentó a 70°C durante 5 horas, posteriormente se suspendió el calentamiento y se conservó la agitación durante toda la noche. El monitoreo mediante cromatografía de capa fina demostró la formación de un compuesto con menor

polaridad. El crudo de reacción fue concentrado bajo presión reducida, después se agregaron 10 mL de hexano al matraz para disolver el producto deseado y eliminar el ácido remanente de la reacción. Finalmente, el hexano fue removido y se obtuvieron 1.03 g de un líquido viscoso ligeramente naranja que representa un rendimiento de reacción del 96%. Este producto fue empleado así para el siguiente paso.

### Síntesis de E, F, G, I

Se disolvieron 0.7 g de 1,1,2-trimetilbenzo[e]indol (3.34 mmol) y 1.03 g del compuesto **H** (4.81 mmol) en acetonitrilo. La mezcla se colocó en agitación y reflujo durante 72 horas. Se eliminó el disolvente a presión reducida, se agregó una cantidad mínima de metanol para disolver parcialmente el crudo de reacción y se añadió acetato de etilo frío suficiente para precipitar el producto. El precipitado fue filtrado, lavado con acetato de etilo y secado a vacío. Finalmente, se obtuvo el compuesto **I** como un sólido gris-azulado con un rendimiento del 50%.

Los compuestos **E**, **F** y **G** se obtuvieron siguiendo la misma metodología, empleando como halogenuros yoduro de metilo (**E** y **F**) y yoduro de etilo (**G**), así como un tiempo de reacción de 24 horas. Obteniendo un sólido amarillo tenue con rendimiento del 90% para **E**. Mientras que **F** fue un sólido gris y **G** un sólido azul tenue, con rendimiento del 70% y 65% respectivamente.

### Síntesis de J (2,2-difluoro-4-metil-6-fenil-2H-1λ<sup>3</sup>,3,2λ<sup>4</sup>-dioxaborinina)

Se disolvieron 300 mg de 1-fenilbuta-1,3-diona (1.79 mmol) en 10 mL de diclorometano, el matraz se colocó en agitación constante y se añadieron lentamente 0.4 mL de BF<sub>3</sub>·OEt<sub>2</sub> (2.668 mmol). La reacción se llevó a cabo en atmósfera inerte y temperatura ambiente durante 6 horas. Transcurrido el tiempo de reacción el disolvente fue removido bajo presión reducida y el crudo de reacción fue lavado con metanol, obteniendo así un sólido blanco cristalino que fue filtrado y secado a vacío con un rendimiento del 58%.

*RMN <sup>1</sup>H:(400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ= 8.05 (m, 2H), 7.69 (m, 1H), 7.54 (m, 2H), 6.58 (s, 1H), 2.43 (s, 3H).*

**Síntesis de K** ((E)-2-cloro-3-(hidroximetileno)ciclohex-1-eno-1-carbaldehído)

Se adicionaron 1.8 mL de DMF (23.24 mmol) seca en un matraz de fondo redondo previamente colocado en un baño de hielo y se agregaron 1.5 mL de POCl<sub>3</sub> (16.04 mmol) gota a gota. Esta mezcla se dejó en agitación constante a 0°C y atmósfera de argón durante 30 minutos. Se agregaron 750 µL de ciclohexanona (7.24 mmol) gota a gota a la mezcla de reacción. La reacción se conservó en baño de hielo durante 10 minutos más y posteriormente se llevó a temperatura ambiente. La reacción se colocó en agitación y calentamiento a 80°C durante 6 horas observándose una coloración naranja intenso, posteriormente se retiró y se dejó enfriar. Se agregaron 50 g de hielo al crudo de reacción y esta mezcla se dejó en agitación durante una noche. Se observó la formación de un sólido amarillo que se filtró, se lavó con diclorometano y se secó a vacío. El sólido amarillo fue recuperado con un rendimiento del 70% y se empleó inmediatamente en las siguientes reacciones sin purificación adicional.

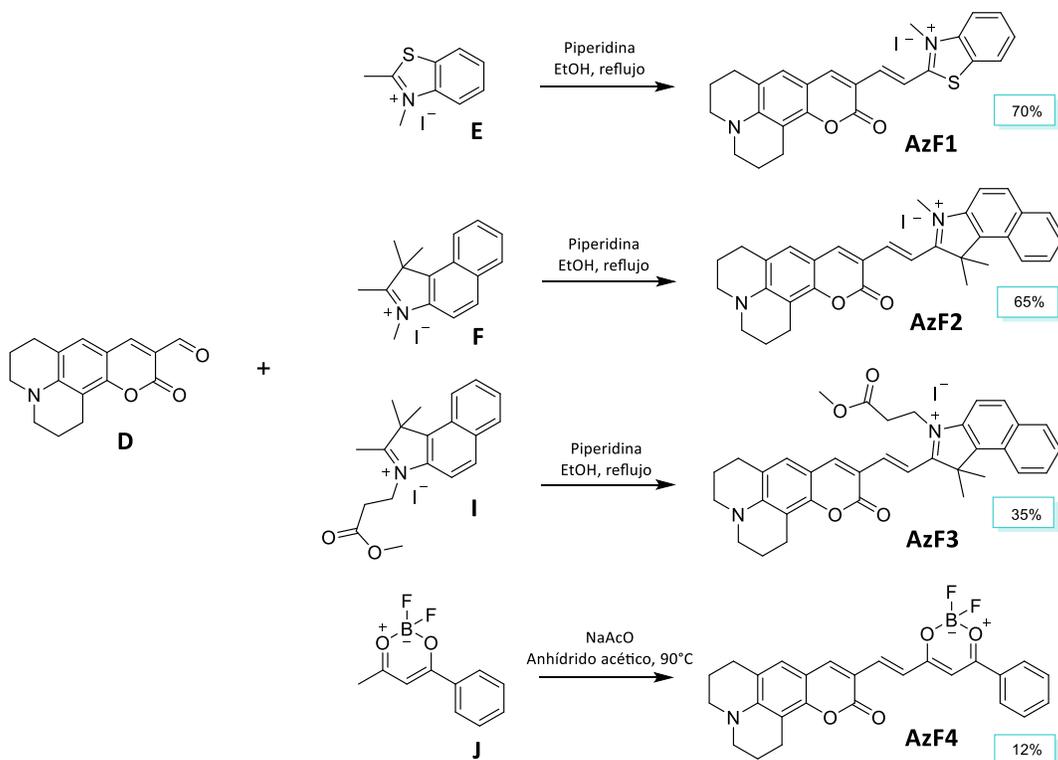
**Síntesis de L** (clorhidrato de N-(3-(fenilamino)aliliden)anilina)

Se disolvieron 4.9 g de 1,1,3,3-Tetrametoxipropano (29.84 mmol) en una mezcla de 4.25 mL de HCl concentrado y 90 mL de agua, la mezcla se colocó en agitación y calentamiento hasta llegar a los 50 °C. Una vez obtenida una temperatura constante, se añadió lentamente una disolución previamente preparada de 4.9 g de anilina (53.67 mmol), 4.25 mL de HCl concentrado y 70 mL de agua. La reacción se conservó en agitación y calentamiento a 50°C durante 2 horas, se observó la formación de un sólido naranja. La mezcla se dejó enfriar, se filtró y se secó a vacío, obteniéndose un sólido naranja correspondiente al compuesto **L** con rendimiento del 75%.

*RMN <sup>1</sup>H: (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ= 12.0 (s, 2H), 8.79 (d, 2H), 7.53 (t, 4H), 7.38 (d, 4H), 7.29 (t, 2H), 6.2 (t, 1H).*

## 2.2 Síntesis de sondas fluorescentes

Una vez obtenidos los fragmentos precursores, se procedió a realizar las reacciones para la obtención de las sondas. En el esquema 3.2 se muestra la ruta sintética para las sondas sintetizadas a partir de la cumarina **D** y la numeración utilizada para la identificación de cada una.



Esquema 3.2 Ruta sintética para la obtención de las sondas **AzF1-4**. En los recuadros se indica el rendimiento de reacción de cada una.

**Síntesis de AzF1** (yoduro de (*E*)-3-metil-2-(2-(11-oxo-2,3,6,7-tetrahidro-1*H*,5*H*,11*H*-pirano[2,3-*f*]pirido[3,2,1-*ij*]quinolin-10-il)vinil)benzo[*d*]tiazol-3-io), **AzF2** (yoduro de (*E*)-1,1,3-trimetil-2-(2-(11-oxo-2,3,6,7-tetrahidro-1*H*,5*H*,11*H*-pirano[2,3-*f*]pirido[3,2,1-*ij*]quinolin-10-il)vinil)-1*H*-benzo[*e*]indol-3-io) y **AzF3** (yoduro de (*E*)-3-(3-metoxi-3-oxopropil)-1,1-dimetil-2-(2-(11-oxo-2,3,6,7-tetrahidro-1*H*,5*H*,11*H*-pirano[2,3-*f*]pirido[3,2,1-*ij*]quinolin-10-il)vinil)-1*H*-benzo[*e*]indol-3-io)

De manera general los compuestos **AzF1-3** fueron obtenidos mediante la misma metodología. Se disolvieron 100 mg de cumarina **D** (0.37 mmol) en 10 mL de etanol y se agregaron 1.5 equivalentes (0.55 mmol) de la sal de yoduro correspondiente según fuese el caso (**E**, **F**, **I**) y 15  $\mu$ L de piperidina (0.16 mmol). Cada mezcla fue colocada a reflujo y agitación de 12 a 18 h de acuerdo con lo observado en el monitoreo seguido con TLC. Una vez observado el consumo de la cumarina **D** se eliminó el disolvente y se impregnó el crudo de reacción en sílice. Cada producto fue purificado mediante cromatografía de columna (DCM/MeOH, 0-10% metanol). Finalmente, se concentraron las fracciones correspondientes a los productos deseados, los cuales se lograron identificar fácilmente por el color

morado (**AzF1**) y azul (**AzF2**, **AzF3**) que poseen, obteniendo así un sólido brillante iridiscente verde (**AzF1**, **AzF2**) y púrpura (**AzF3**). Los rendimientos de reacción se reportan en el esquema 3.2.

**AzF1** RMN  $^1\text{H}$ : (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ = 8.46 (s, 1H), 8.33 (d,  $J$  = 7.18 Hz, 1H), 8.17 (d,  $J$  = 8.42 Hz, 1H), 8.03 – 7.91 (m, 2H), 7.84 – 7.78 (m, 1H), 7.72 (ddd,  $J$  = 8.18, 7.24, 1.06 Hz, 1H), 4.18 (s, 3H), 3.43-3.39 (m, 4H), 2.75 (t,  $J$  = 6.33 Hz, 4H), 1.94 – 1.84 (m, 4H).

**AzF2** RMN  $^1\text{H}$ : (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ = 9.73 (s, 1H), 8.66 (d,  $J$  = 15.76 Hz, 1H), 8.20 (d,  $J$  = 8.49 Hz, 1H), 8.05 (d,  $J$  = 8.88 Hz, 1H), 8.01 (d,  $J$  = 8.27 Hz, 1H), 7.93 (d,  $J$  = 15.76 Hz, 1H), 7.70 (dd,  $J$  = 8.46, 6.86 Hz, 1H), 7.63 – 7.57 (m, 3H), 4.35 (s, 3H), 3.43 (t,  $J$  = 5.71 Hz, 4H), 2.88 (t,  $J$  = 6.38 Hz, 2H), 2.80 (t,  $J$  = 6.27 Hz, 2H), 2.08 (s, 6H), 1.99 (q,  $J$  = 7.39, 6.74 Hz, 4H). RMN  $^{13}\text{C}$ : (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ = 181.84, 161.46, 153.67, 151.06, 150.12, 149.0, 139.11, 137.13, 133.25, 131.42, 130.34, 130.16, 128.53, 127.73, 126.86, 122.78, 121.05, 111.72, 111.43, 107.64, 106.14, 53.57, 51.17, 50.60, 36.11, 27.5, 27.26, 21.09, 20.12, 19.96. ESI HPLCMS  $m/z$ = 415.2320  $[\text{M}]^+$  encontrado, calculado  $m/z$ = 415.24.

**AzF3** RMN  $^1\text{H}$ : (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ = 8.68 (s, 1H), 8.44-8.35 (m, 2H), 8.22 (d,  $J$  = 8.91 Hz, 1H), 8.17 (d,  $J$  = 7.80 Hz, 1H), 8.04 (d,  $J$  = 8.99 Hz, 1H), 7.80 (d,  $J$  = 15.71 Hz, 1H), 7.79 – 7.74 (m, 1H), 7.67 (t,  $J$  = 7.51 Hz, 1H), 7.20 (s, 1H), 4.79 (t,  $J$  = 6.90 Hz, 2H), 3.57 (s, 3H), 3.48-3.46 (m, 4H), 3.07-3.04 (m, 2H), 2.78 (t,  $J$  = 6.28 Hz, 4H), 1.99 (s, 6H), 1.91 (q,  $J$  = 8.02, 6.72 Hz, 4H). RMN  $^{13}\text{C}$ : (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ = 181.55, 170.81, 161.53, 153.87, 151.43, 138.48, 137.18, 133.14, 131.70, 131.18, 130.45, 130.30, 128.77, 128.42, 127.75, 126.80, 122.74, 121.22, 111.95, 111.78, 111.66, 107.08, 106.27, 53.12, 52.37, 51.28, 50.70, 43.04, 33.38, 27.88, 27.23, 21.08, 20.11, 19.93. ESI HPLCMS  $m/z$ = 547.2510  $[\text{M}]^+$  encontrado, calculado  $m/z$ = 547.26.

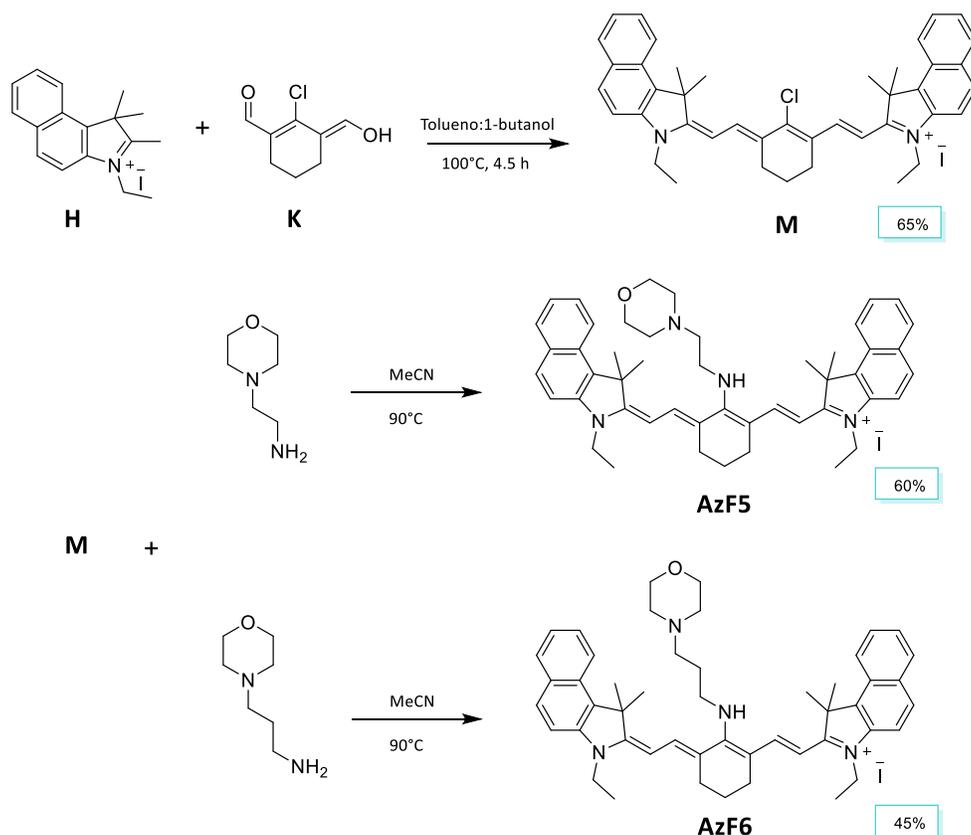
**Síntesis de AzF4** ((*E*)-10-(2-(2,2-difluoro-6-fenil-2*H*-1 $\lambda^3$ ,3,2 $\lambda^4$ -dioxaborinin-4-il)vinil)-2,3,6,7-tetrahidro-1*H*,5*H*,11*H*-pirano[2,3-*f*]pirido[3,2,1-*ij*]quinolin-11-ona)

Se disolvieron 250 mg de **J** (1.19 mmol) y 98 mg de acetato de sodio (1.19 mmol) en 10 mL de anhídrido acético, esta mezcla fue colocada en agitación y calentamiento a 90°C durante una hora. A continuación, 180 mg de la cumarina **D** (0.67 mmol) fueron añadidos y se mantuvieron las mismas condiciones. Después de dos horas la reacción fue enfriada a temperatura ambiente y la mezcla se mantuvo en agitación durante la noche. El producto fue extraído ( $\text{H}_2\text{O}$  /DCM, 1:1), la fase orgánica fue recuperada y concentrada. El crudo de reacción obtenido fue impregnado en sílice y purificado mediante cromatografía de columna (DCM: MeOH, 98:2). Finalmente se obtuvo un sólido verde

oscuro iridiscente. Cabe mencionar que este compuesto fue especialmente llamativo por el cambio de color que muestra en disolución de acuerdo con el disolvente que se use, esta característica fue de mucha utilidad para su identificación posterior.

**AzF4** RMN  $^1\text{H}$ : (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ = 8.07 (d,  $J$ =7.15 Hz, 2H), 7.89 (d,  $J$ =14.94 Hz, 2H), 7.70 (s, 1H), 7.64 (t,  $J$ = 7.37 Hz, 1H), 7.55-7.47 (m, 3H), 6.95 (s, 1H), 6.64 (s, 1H), 3.39-3.35 (m, 4H), 2.90 (t,  $J$ =6.39 Hz, 2H), 2.78 (t,  $J$ =6.32 Hz, 2H), 2.02-1.96 (m, 4H). RMN  $^{13}\text{C}$ :(400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ = 181.49, 180.42, 160.26, 152.38, 148.97, 148.81, 144.48, 134.51, 132.58, 129.13 (2C), 128.72 (2C), 127.09, 120.47, 120.04, 112.77, 109.47, 106.16, 98.49, 50.62, 50.20, 27.56, 21.27, 20.30, 20.21.

**Síntesis de AzF5** (yoduro de 3-etil-2-((*E*)-2-((*E*)-3-((*E*)-2-(3-etil-1,1-dimetil-1,3-dihidro-2*H*-benzo[*e*]indol-2-iliden)etiliden)-2-((2-morfolinoetil)amino)ciclohex-1-en-1-il)vinil)-1,1-dimetil-1*H*-benzo[*e*]indol-3-io) y **AzF6** (yoduro de 3-etil-2-((*E*)-2-((*E*)-3-((*E*)-2-(3-etil-1,1-dimetil-1,3-dihidro-2*H*-benzo[*e*] indol-2-iliden)etiliden)-2-((3-morfolinopropil)amino)ciclohex-1-en-1-il)vinil)-1,1-dimetil-1*H*-benzo[*e*]indol-3-io)



Esquema 3.3 Ruta sintética para la obtención de las sondas AzF5 y AzF6.

El esquema 2.3 muestra la ruta de síntesis de los fluoróforos de la familia de cianinas 7.5 obtenidos. Estas sondas se obtuvieron mediante la condensación de la sal cuaternaria **H** y el precursor **K** para la formación de la cianina **M**, posteriormente ésta se utilizó para las siguientes reacciones de sustitución nucleofílica con el derivado de morfolina correspondiente.

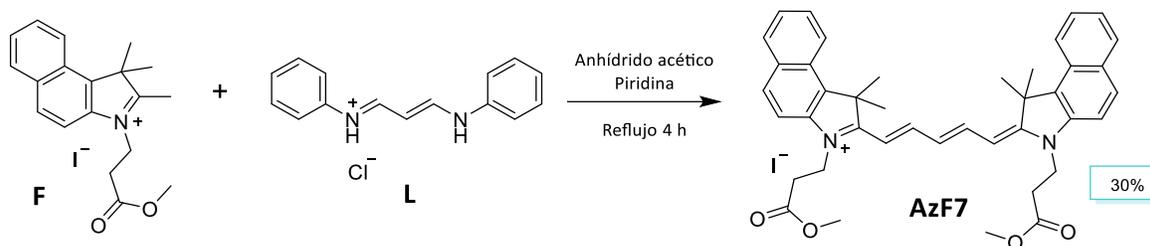
Se disolvieron 400 mg de **H** (1.1 mmol) y 91 mg de **K** (0.53 mmol) en una mezcla de tolueno y 1-butanol (v/v 1:2.5). La mezcla resultante se agitó a 110 °C, después de 4.5 horas de calentamiento se dejó enfriar a temperatura ambiente y se concentró a presión reducida. Se añadió acetato de etilo y se precipitó un sólido. Finalmente, se filtró y se secó a vacío obteniéndose un sólido brillante naranja con rendimiento del 65% correspondiente al compuesto **M**.

Para la sonda **AzF5** se disolvieron 200 mg de **M** (0.27 mmol) y 71 µL de 4-(2-aminoetil)morfolina (0.54 mmol) en 10 mL de acetonitrilo, esta mezcla se calentó a reflujo durante 12 h. La reacción se monitoreó mediante TLC donde se observó la aparición de un compuesto azul. El disolvente se evaporó a presión reducida y el compuesto azul se purificó con cromatografía en columna (DCM/MeOH, 96:4). La fracción azul se concentró y finalmente, se obtuvo un compuesto púrpura oscuro brillante con rendimiento del 60%.

Se siguió el mismo procedimiento para la sonda **AzF6** empleando 2 equivalentes de 3-morfolinopropilamina, aumentando solamente el tiempo de reacción a 36 horas y obteniendo como producto un sólido de apariencia similar al anterior con un rendimiento del 45%.

**Síntesis de AzF7** (yoduro de 3-(3-metoxi-3-oxopropil)-2-((1*E*,3*E*,5*E*)-5-(3-(3-metoxi-3-oxopropil)-1,1-dimetil-1,3-dihidro-2*H*-benzo[*e*]indol-2-iliden)penta-1,3-dien-1-il)-1,1-dimetil-1*H*-benzo[*e*]indol-3-io)

Se disolvieron 500 mg de la sal **F** (1.18 mmol) y 150 mg del compuesto **L** (0.58 mmol) en 4 mL de anhídrido acético, la mezcla fue colocada a reflujo y agitación durante 30 minutos para después agregar 0.2 mL de piridina (2.48 mmol). La reacción se mantuvo a reflujo durante 4 horas más. Posteriormente se evaporó el disolvente a presión reducida y el crudo de reacción fue impregnado para realizar la purificación correspondiente mediante cromatografía de columna (AcOEt:MeOH, 85:15). La fracción azul más polar fue recuperada y concentrada para finalmente obtener un sólido púrpura brillante con rendimiento del 30%.



Esquema 3.4 Ruta sintética para la obtención de la sonda **AzF7**.

### 3. Estudios espectrofotométricos

Una vez que los fluoróforos fueron caracterizados, se realizaron experimentos para conocer su respuesta a cambios del medio en disolución. Este monitoreo se realizó mediante dos técnicas: espectroscopía de absorción y de fluorescencia.

Todos los experimentos se llevaron a cabo a 25°C y empleando disoluciones stock 2 mM de cada compuesto, las cuales se prepararon previamente en DMSO para poder emplear las mismas en los estudios *in vitro* e *in vivo*. Para cada medición se emplearon alícuotas de 5  $\mu$ L de la disolución stock. Dichos estudios se dividen en diferentes secciones, la primera consta de un análisis solvatocrómico, en el que se mide la absorbancia de cada fluoróforo en disolventes con distinta polaridad: dioxano, cloroformo, metanol, DMSO, acetonitrilo, DCM y H<sub>2</sub>O. Mediante estos espectros se determinan los máximos de absorción para posteriormente elegir las longitudes de excitación ( $\lambda_{exc}$ ) adecuada para la obtención de los espectros de emisión. Una vez determinada la  $\lambda_{exc}$  se obtienen también los espectros de emisión en cada disolvente.

Posteriormente se realizaron experimentos para determinar la influencia de los cambios de viscosidad del medio en la intensidad de fluorescencia de cada molécula. Para ello se prepararon mezclas metanol-glicerol en donde la proporción de glicerol fue variando de 0% a 100%. Para la mayoría de los casos se obtuvieron espectros de emisión empleando dos longitudes de excitación con la intención de lograr identificar alguna respuesta dual y/o radiométrica. También se llevó a cabo la determinación del efecto de la polaridad del medio, para lo cual se realizaron mezclas dioxano-H<sub>2</sub>O cambiando la proporción de dioxano de 0 a 100%. Se emplea este sistema de disolventes por ser miscibles y poseer valores de constante dieléctrica muy distintos.

Por otro lado, se realizaron experimentos para observar la influencia del pH del medio en la absorción y emisión de las moléculas, a su vez con estos datos se determinaron sus constantes de acidez. Estas mediciones consistieron en preparar disoluciones del fluoróforo en una disolución acuosa de HTAB 5 mM, una vez obtenida se agregó la cantidad suficiente de ácido clorhídrico 0.5 mM para llevar el pH inicial aproximado a 2.5. A cada mezcla se hicieron adiciones de una disolución 0.2 mM de NaOH hasta observar un cambio de pH (aproximadamente cada 0.5), registrando así cada pH y obteniendo los espectros de absorbancia y emisión en cada punto. Cabe mencionar que ambas disoluciones fueron previamente valoradas.

De acuerdo con lo observado en los experimentos *in vitro* en microscopía confocal, en algunos casos se realizaron experimentos para determinar la formación de agregados, estos se realizan en primer instancia mediante mezclas THF- H<sub>2</sub>O en donde la proporción de THF se varía de 0 a 100%. En cada punto se obtienen los espectros de absorción y emisión. Además, se implementó un sistema distinto intentando emular de mejor manera el microambiente subcelular mediante una mezcla DOPC- H<sub>2</sub>O. DOPC (1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfocolina), es un fosfolípido empleado típicamente para la obtención de liposomas, se preparó una emulsión de DOPC 25 mM y durante estas mediciones se realizó un aumento de la cantidad del fosfolípido en la mezcla (0-1.7 mM), obteniendo espectros de emisión tras cada adición.

#### 4. Estudios *in vitro*

De manera simultánea se realizaron estudios de microscopía en cultivo celular con el primer propósito de verificar que los fluoróforos pudieran difundirse dentro de la célula. La Figura 3.1 esquematiza el proceso que se llevó a cabo en estos experimentos al igual que los realizados en el modelo *in vivo*.

Se utilizaron líneas celulares disponibles U-251 y SK-LU-1, las cuales fueron cultivadas en placas de poliestireno de 15 mm de diámetro NEST con base de vidrio como monocapas a una densidad de 20,000 células por placa. Se utilizó medio RPMI-1640 suplementado con suero fetal bovino (10%) a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>.

Una vez obtenido el cultivo celular se realizó la adición de 1 o 2 µL de una disolución stock 0.2 µM de fluoróforo en DMSO, la caja de fondo de vidrio se dejó en reposo de 3 a 5 minutos, tiempo que se ha

identificado como suficiente para que estos fluoróforos permeen las membranas celulares, transcurrido este tiempo las células se observaron en el microscopio confocal empleando los canales predeterminados para la emisión verde (GFP), roja (Texas red) y campo claro. Para estudios de colocalización se emplearon marcadores comercialmente disponibles: BODIPY 493/503, Rojo de Nilo, Hoechst y MitoTracker Red, los cuales se agregaron antes o después de adicionar los fluoróforos, estos se dejaron incubar de 5 a 20 minutos.

Para algunos otros experimentos se realizaron tratamientos previos al cultivo celular como la adición de ácido oleico o colesterol; por otra parte, también se realizaron experimentos empleando estímulos posteriores a la incubación con el fluoróforo como la adición de CCCP para la despolarización de membrana mitocondrial o esterasas para la hidrólisis de grupos éster.

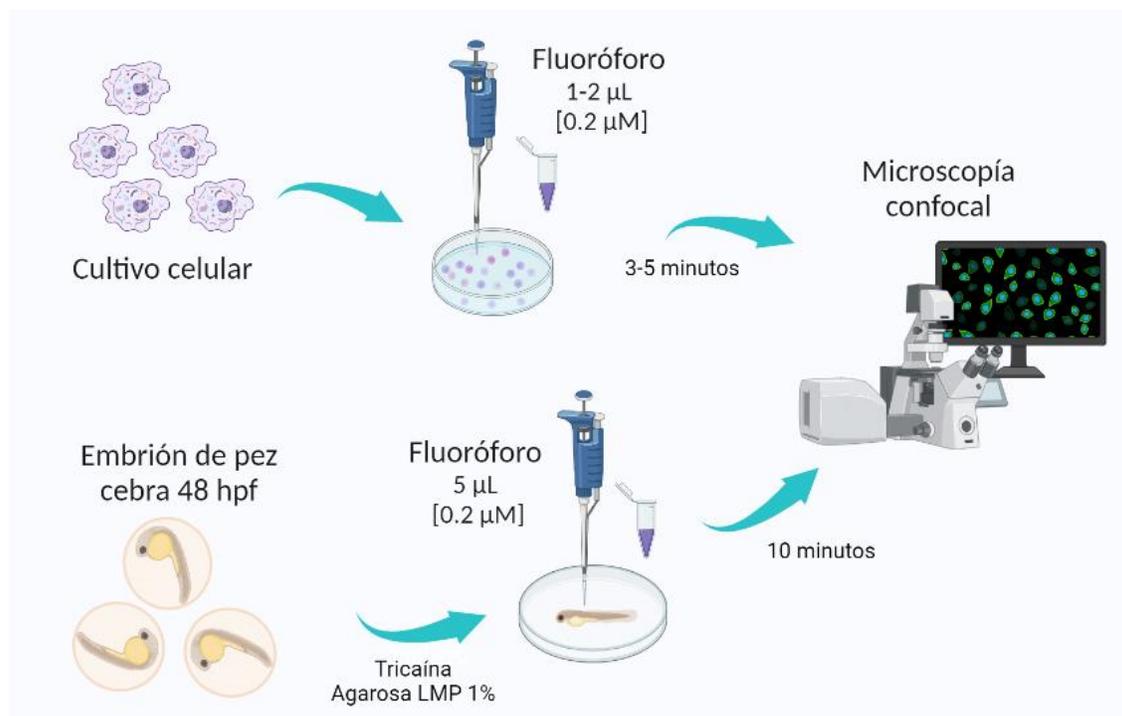


Figura 3.1 Procedimiento realizado para las pruebas en modelo *in vitro* e *in vivo*. Imagen creada en BioRender.com.

## 5. Estudios *in vivo*

Los bioensayos *in vivo* se realizaron utilizando el modelo pez cebra (*Danio rerio*) de la especie Wild Type, bajo el protocolo experimental aprobado por el Comité de Animales de Laboratorio de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo el número de protocolo CICUAL FLC40-14. Los peces cebra fueron mantenidos en peceras con la salinidad adecuada para su desarrollo a una temperatura

de 28°C con sistemas de burbujeo para mantener una saturación de oxígeno adecuada. Los peces fueron colocados en cruces masivas una noche anterior y los huevos fueron recolectados en la mañana, estos fueron lavados y solo fueron seleccionados aquellos en los que se comenzó a observar división celular. Estos se colocaron en cajas Petri procurando mantener no más de 30 por cada caja, se adicionó azul de metileno para evitar la contaminación con otros microorganismos y se dejaron incubando durante 48 horas.

Los embriones de 48 hpf se sacaron del corion empleando agujas delgadas y posteriormente fueron sedados con una disolución acuosa de triclaína al 4.2%, transcurridos 20 minutos se verificó que los embriones permanecieran inmóviles y se montaron en agarosa de bajo punto de fusión al 1% en cajas con fondo de vidrio. Se adicionó disolución sedante para mantener inmóvil al embrión y se adicionaron 5 µL del stock de fluoróforo, se dejó reposar 10 minutos y posteriormente se obtuvieron las imágenes de microscopía de los peces vivos.

Además, se llevaron a cabo otros experimentos en donde fue necesario realizar tratamientos postfertilización, el primero consistió en adicionar atorvastatina, en el segundo se realizaron aumentos de la salinidad del agua de acuario y en el tercero se adicionó manitol. En todos estos casos los tratamientos se realizaron después de una hora postfertilización y los embriones se dejaron incubando el resto del tiempo bajo estas condiciones hasta el día de la observación en microscopio.

## 6. Experimentos en levaduras

Los fluoróforos que presentaron localización mitocondrial fueron además empleados en experimentos con levaduras. Se emplearon dos cepas de levadura, *Saccharomyces cerevisiae* W303 y levadura comercial (La azteca), que tras obtener el cultivo se dejó en ayuno durante 24 horas, se preparó una suspensión acuosa al 50% en peso y se procedió a realizar un monitoreo de la emisión a través del tiempo añadiendo distintas disoluciones a una mezcla stock (1.83 mL de amortiguador MES-TEA 0.1M, 2 µL BaCl<sub>2</sub> 10 mM y 40 µL glucosa 1M) a pH 6.

Desde el tiempo cero se monitoreó la emisión del amortiguador para unos segundos después agregar 100 µL de la suspensión de levadura al 50% w/w, una vez que esta emisión se observó constante se agregó el fluoróforo correspondiente (2 µM), posteriormente se agregaron 5 µL de CCCP 5 mM y finalmente se agregaron 20 µL de KCl 2M.

## Capítulo 4 Resultados y análisis

El capítulo describe los resultados y hallazgos más importantes de este trabajo, enfocados en la obtención de los fluoróforos, su caracterización estructural y espectroscópica, así como aplicación en modelos *in vitro* y/o *in vivo* como sondas fluorescentes en microscopía.

La primer parte está centrada en los estudios de caracterización realizados para corroborar la obtención de las moléculas, posteriormente se presentan experimentos espectroscópicos realizando modificaciones en el medio, así como pruebas de permeabilidad y localización en cultivo celular, finalmente, se presentan estudios más específicos y de aplicación de algunos de los fluoróforos de acuerdo con los resultados previos obtenidos.

### 1. Caracterización

En esta sección se presentan solamente los resultados obtenidos para los fluoróforos finales, sin embargo, durante el desarrollo de la metodología sintética se llevaron a cabo pruebas y estudios para corroborar que los intermediarios necesarios se obtuvieron de acuerdo con la ruta planteada. Los espectros de RMN de protón de estas moléculas precursoras se pueden consultar en el apéndice del escrito.

Una vez que los fluoróforos se purificaron y obtuvieron en cantidades suficientes, fueron caracterizados para verificar su estructura, a continuación, se presentan los resultados obtenidos de los fluoróforos **AzF1-7**, para todos se presentan espectros de RMN y masas, mientras que los espectros IR se encuentran en el apéndice del trabajo y solo se incluyen en esta sección los casos en donde se encontraron señales clave para la identificación del compuesto.

#### 1.1 AzF1

En la Figura 4.1 se presenta el espectro de RMN  $^1\text{H}$  obtenido para **AzF1** en DMSO- $d_6$ , el cual integra para 23 protones en total. A campo alto se observan 4 señales, 3 de ellas corresponden al fragmento de julolidina y la cuarta señal corresponde al metilo de la cuaternización del benzotiazol; una señal clave que corrobora la unión del fragmento cumarina y la sal de benzotiazol es el multiplete observado a 7.96 ppm que corresponde a los H de los metinos obtenidos tras la condensación realizada.

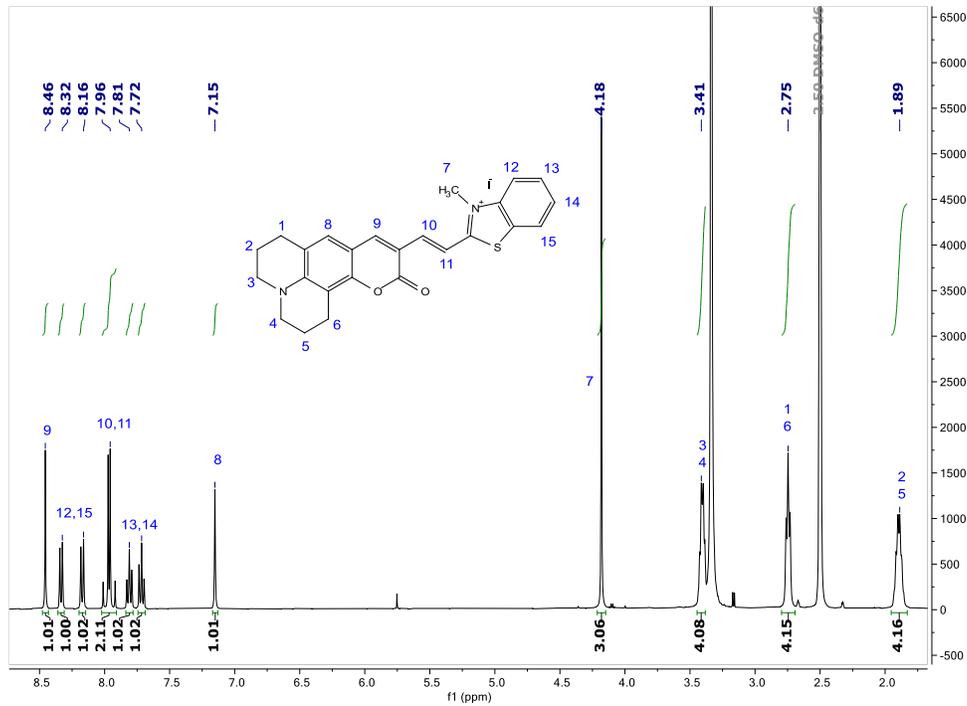


Figura 4.1 Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de AzF1 en DMSO- $d_6$ , se identifican las señales con números.

Se obtuvo también el espectro de  $^{13}\text{C}$ , en el que se lograron identificar 25 señales distintas que concuerdan con los 25 carbonos de la molécula, 7 a campo alto correspondientes a los carbonos  $\text{sp}^3$ .

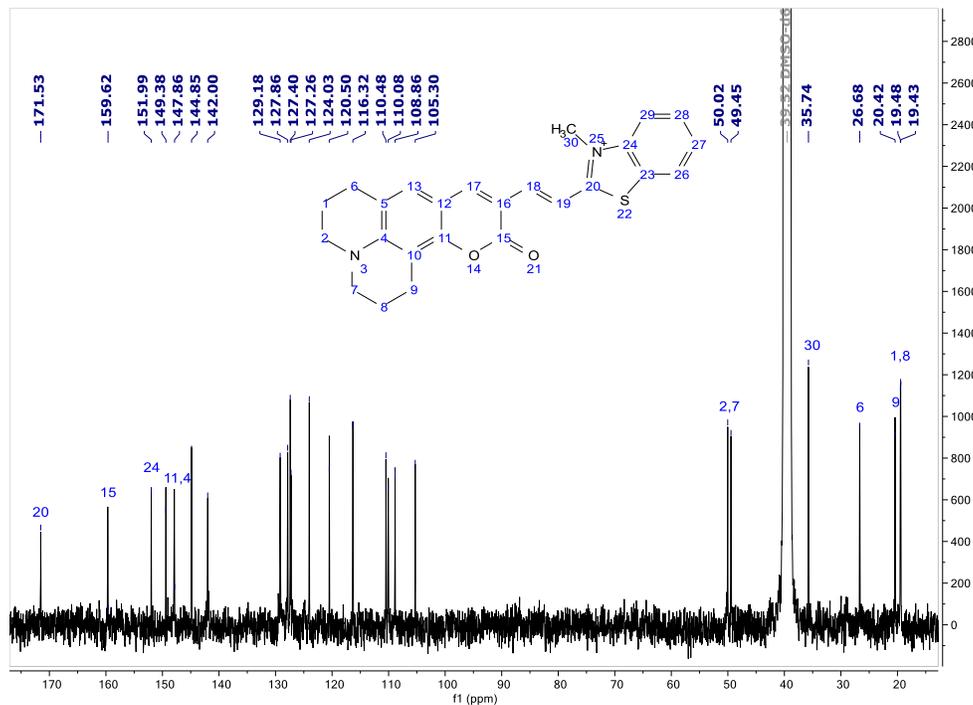


Figura 4.2 Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  de AzF1 en DMSO- $d_6$ .

De igual forma se realizó el análisis de espectrometría de masas (Figura 4.3), la técnica empleada fue ESI+ debido a que al tratarse de una molécula con carga positiva se requiere un modo de ionización más suave que IE para lograr ver picos  $m/z$  de la molécula completa.

En el espectro se observa un solo pico base en  $m/z = 415.1427$ , el cual concuerda con el valor teórico calculado para la especie cargada positivamente, es decir, sin el contraión yoduro, además el patrón de distribución isotópica concuerda tanto en los resultados experimentales como en el espectro calculado, lo cual corrobora los resultados obtenidos en RMN.

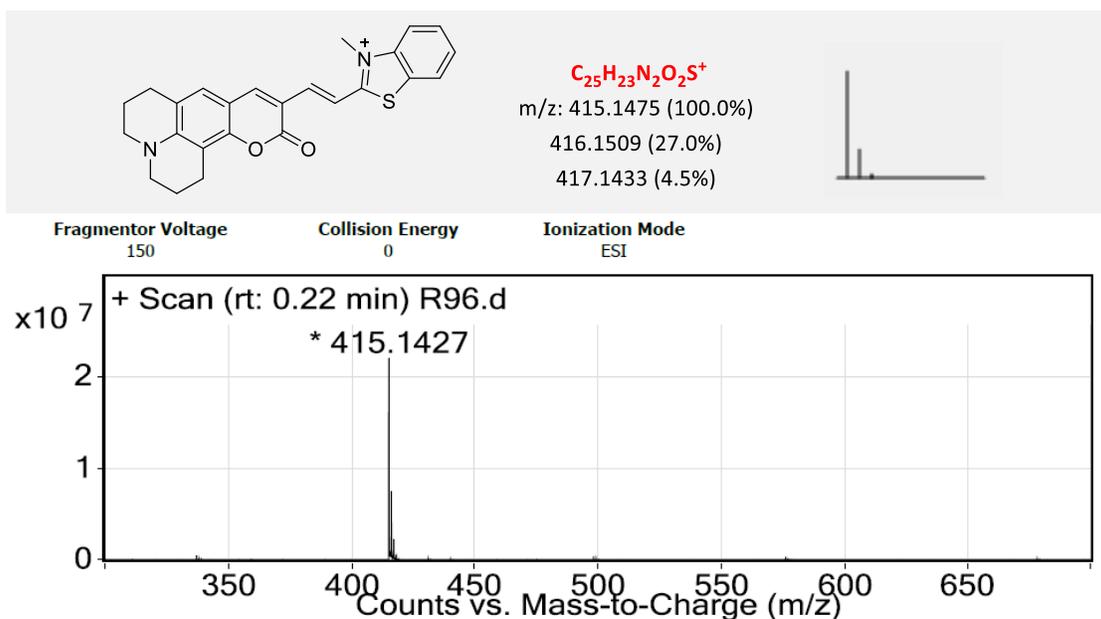


Figura 4.3 Espectro ESI+ de **AzF1** en DMSO y propuesta de la especie detectada con sus valores  $m/z$  y contribución isotópica calculados.

### 1.2 AzF2

En el espectro de RMN de protón obtenido para **AzF2** se observan 5 señales a campo alto correspondientes a los 21 protones alifáticos de la molécula, las señales características de la julolidina poseen desplazamientos similares a los observados en **AzF1** (3.46, 2.78 y 1.92 ppm), adicionalmente se observan dos singuletes, uno en 1.98 y el otro en 4.06 ppm, los cuales corresponden a los metilos de la sal de benzoindol, siendo el más desplazado a campo bajo el metilo de la cuaternización. En la zona aromática se concentran las señales restantes que integran para 10 hidrógenos, los cuales concuerdan con los resultados esperados. En el espectro de RMN  $^{13}C$  se identificaron 30 señales de

carbonos químicamente distintos, las señales con más intensidad localizadas en 111.43 y 27.50 ppm representan a dos carbonos, lo cual resulta en un total de 32 carbonos.

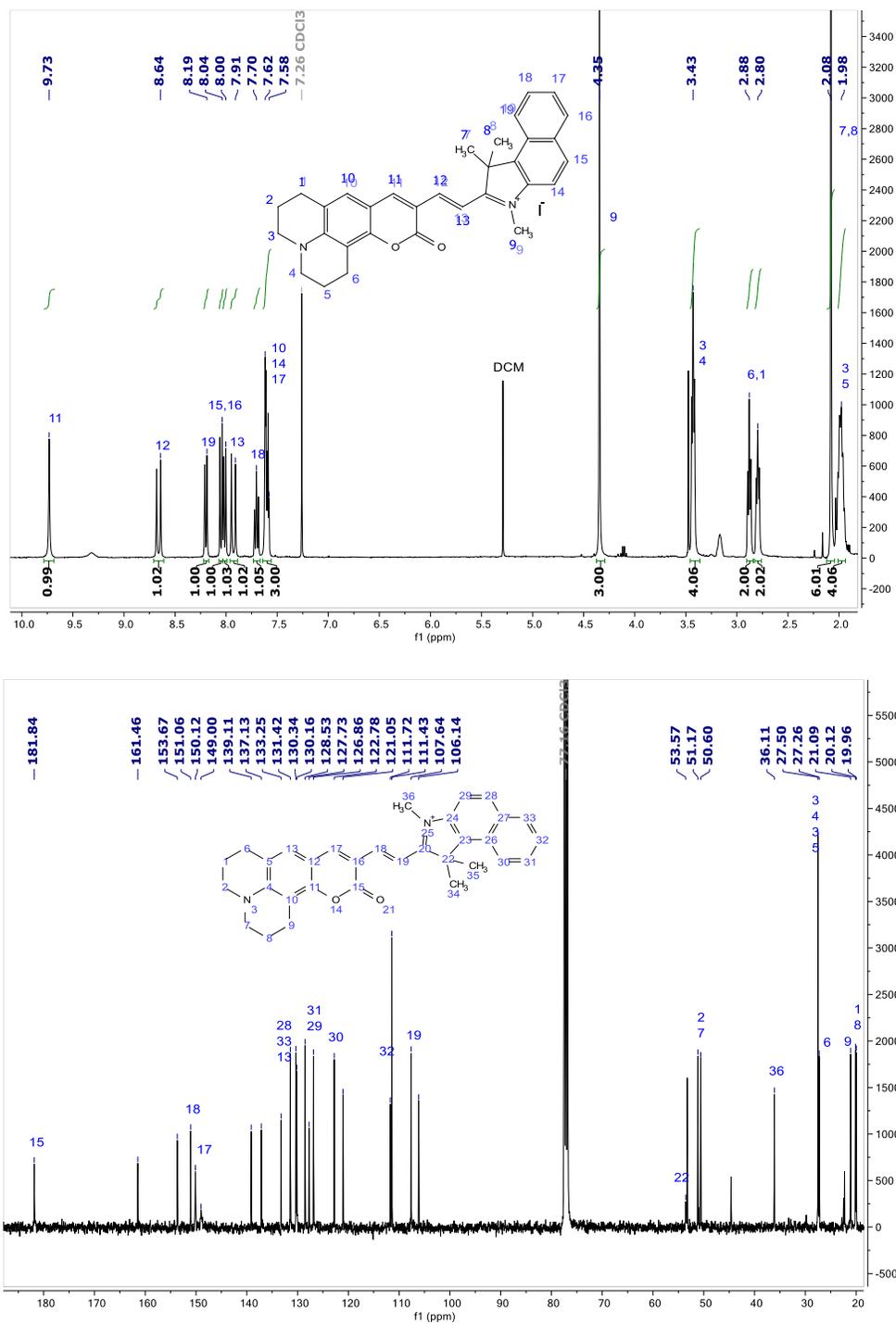


Figura 4.4 Arriba: espectro de RMN  $^1\text{H}$  de AzF2 en  $\text{CDCl}_3$  se identifican las señales con números. Abajo: espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  en  $\text{CDCl}_3$ .

En el espectro de ESI+ obtenido para **AzF2** se identifica un solo pico base en  $m/z = 475.2320$ , que se atribuye a la especie catiónica, este resultado es comparable con las contribuciones isotópicas y valor obtenido de manera teórica.

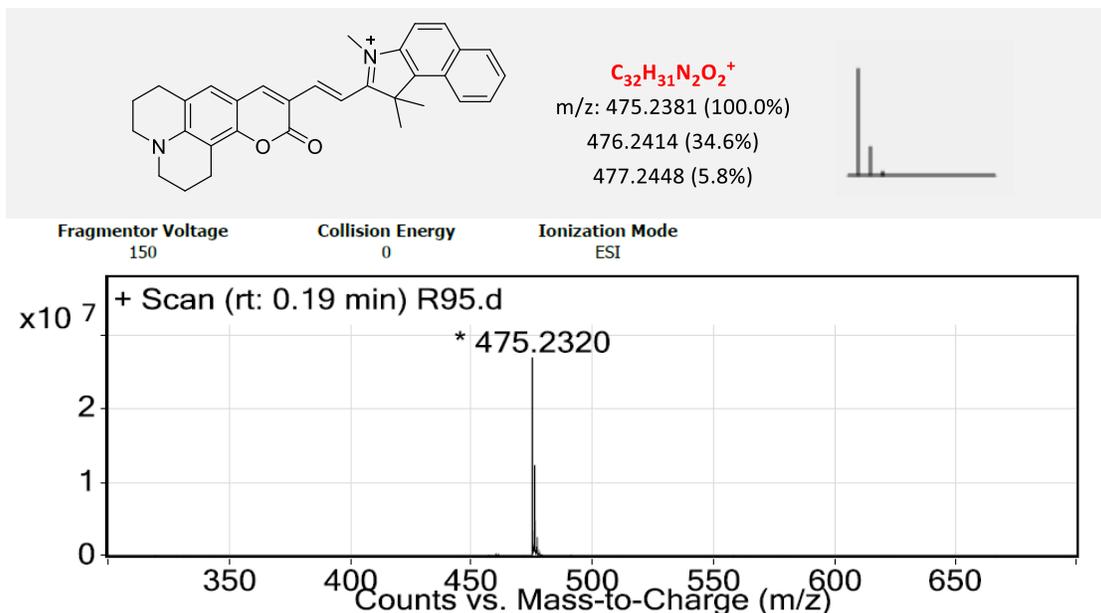


Figura 4.5 Espectro ESI+ de **AzF2** en DMSO y propuesta de la especie detectada con sus valores  $m/z$  y contribución isotópica calculados.

### 1.3 AzF3

La Figura 4.6 muestra el espectro de RMN <sup>1</sup>H del fluoróforo **AzF3**, en él se identifican las señales correspondientes al fragmento julolidina (3.47, 2.78 y 1.91 ppm), adicionalmente se observan dos tripletes en 4.79 y 3.06 ppm, estos se atribuyen a la cadena lateral de la cuaternización del benzoindol, siendo más desplazado a campo bajo el metileno directamente unido al nitrógeno con carga positiva, mientras que la otra señal corresponde a los protones del carbono α al carbonilo del éster. El singulete en 1.99 ppm corresponde a los metilos equivalentes del benzoindol y el de 3.57 ppm al metilo del grupo éster. Todas estas señales integran para 25 protones, los cuales concuerdan con el producto esperado. Por otra parte, se identifican los 10 protones restantes en la zona aromática, cabe mencionar que tanto estas señales como las del fragmento julolidina se encuentran a desplazamientos muy similares que en el compuesto **AzF2** ya que la única variación entre ambas moléculas es el fragmento de la cuaternización del benzoindol. En el espectro de RMN <sup>13</sup>C se identificaron los 35 carbonos correspondientes a la estructura de **AzF3**.

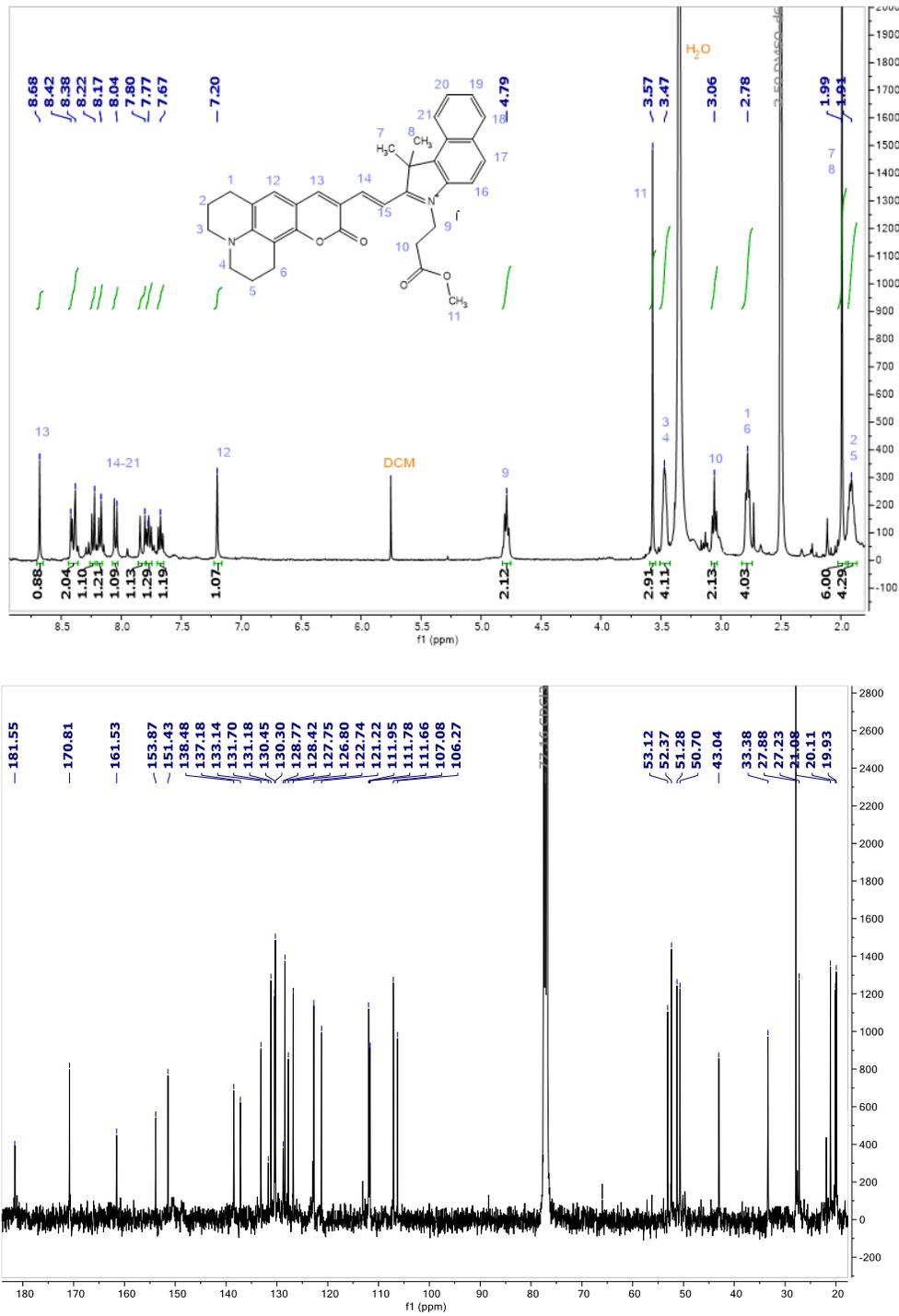


Figura 4.6 Arriba: espectro de RMN  $^1\text{H}$  de **AzF3** en  $\text{DMSO-}d_6$  se identifican algunas de las señales con números. Abajo: espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  en  $\text{CDCl}_3$ .

El espectro de ESI+ obtenido se muestra en la Figura 4.7, donde se identifica un pico base en  $m/z=547.2510$ , el cual se atribuye a la especie cargada positivamente y éste concuerda con el valor teórico calculado. Adicional se observa una segunda señal muy pequeña en  $m/z=296.1595$ , ésta puede relacionarse con la parte catiónica de la sal de benzoindol utilizada.

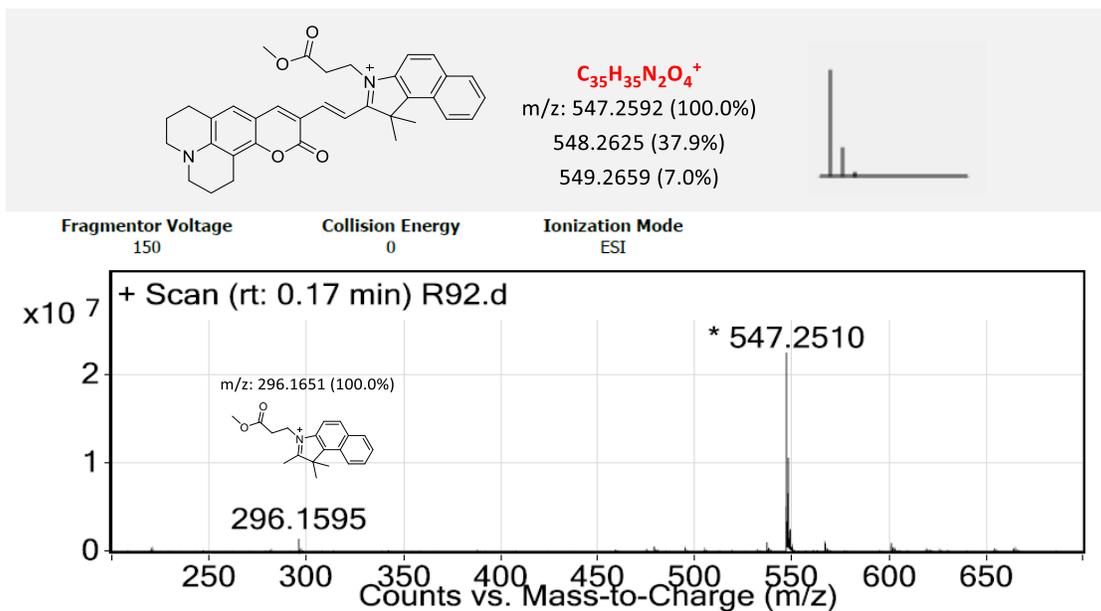


Figura 4.7 Espectro ESI+ de **AzF3** en DMSO y propuesta de la especie detectada con sus valores  $m/z$  y contribución isotópica calculados.

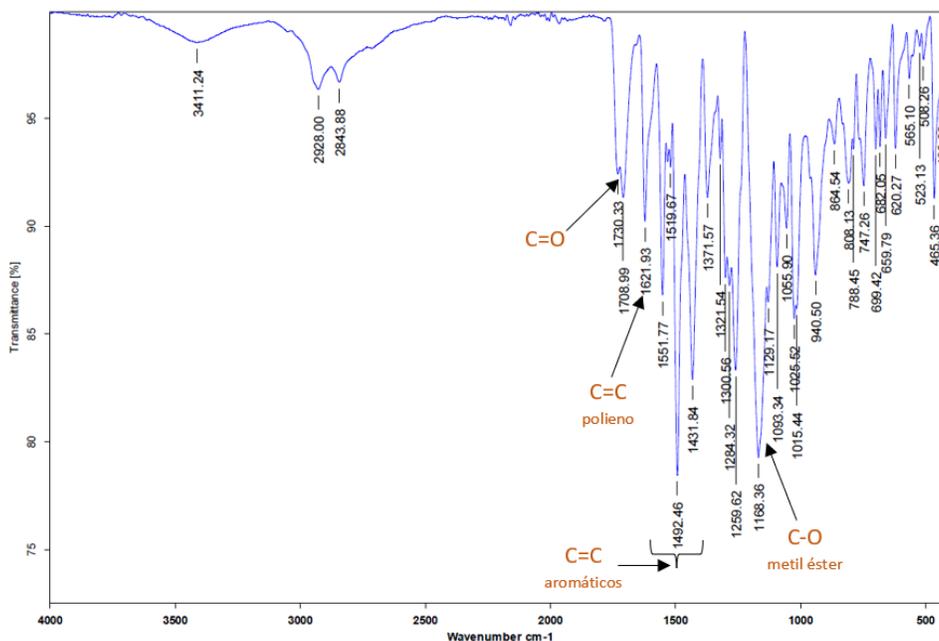


Figura 4.8 Espectro IR de **AzF3**, se señalan algunas de las señales características identificadas.

Adicionalmente, en la Figura 4.8 se presenta el espectro de IR del fluoróforo donde se identifican señales correspondientes a los estiramientos de la molécula, se destaca el pico fuerte localizado en  $1163.36\text{ cm}^{-1}$  ya que es una señal característica de un estiramiento C-O del grupo metil éster.

#### 1.4 AzF4

En el espectro de RMN  $^1\text{H}$  del fluoróforo **AzF4** se observan 7 señales desplazadas a campo bajo, mismas que integran para 10 protones, este número corresponde con la cantidad de hidrógenos aromáticos y vinílicos de la estructura química de la molécula, en la zona alifática se identifican 4 señales correspondientes al núcleo de julolidina.

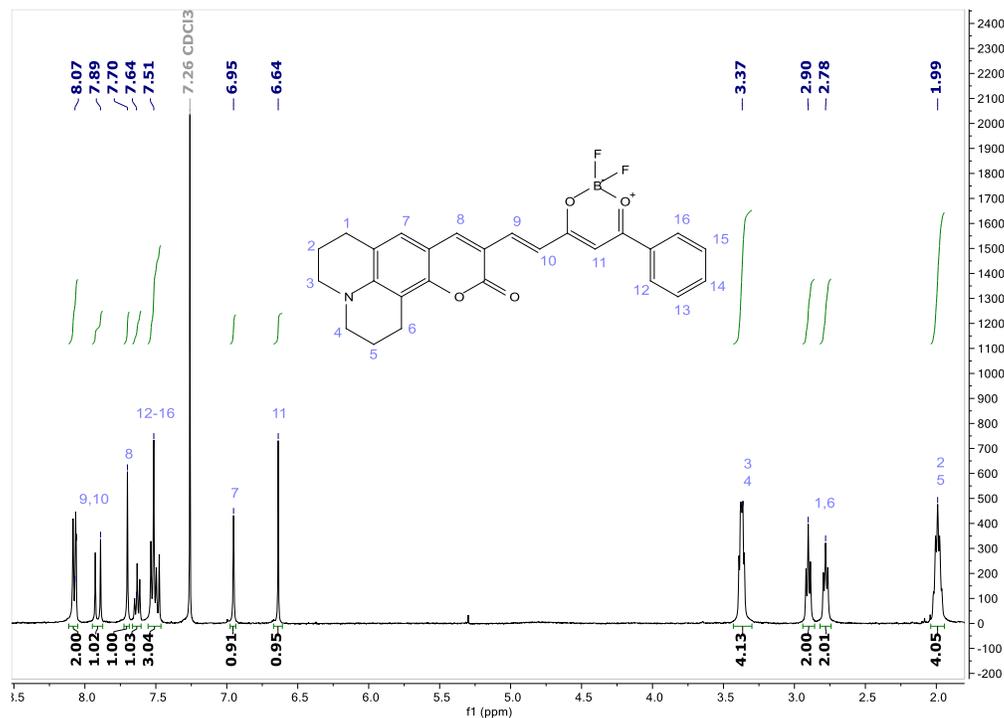


Figura 4.9 Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de **AzF4** en  $\text{CDCl}_3$ , se identifican las señales con números.

En el espectro de  $^{13}\text{C}$  se observan 24 señales diferentes, dos de ellas (129.13 y 128.72 ppm) corresponden a dos carbonos químicamente equivalentes, dando un total de 26 carbonos, este resultado también corresponde con lo esperado.

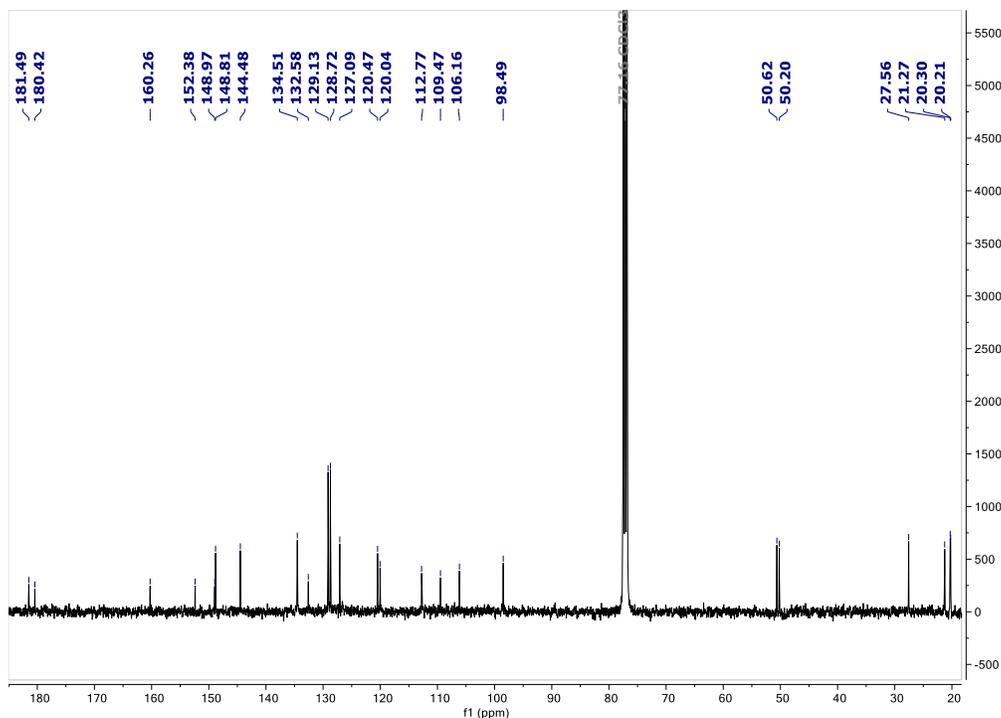


Figura 4.10 Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  de **AzF4** en  $\text{CDCl}_3$ .

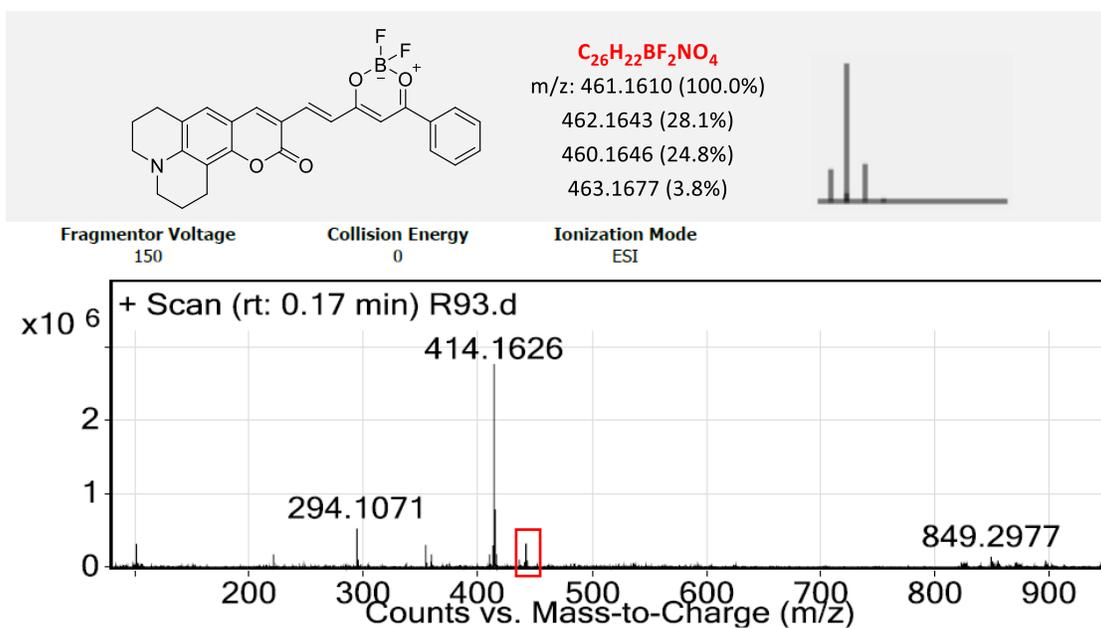


Figura 4.11 Espectro ESI+ de **AzF4** en  $\text{DMSO}$  y estructura esperada con sus valores  $m/z$  y contribución isotópica calculados. Se marca en rojo una especie importante detectada.

El análisis de este fluoróforo mediante ESI+ no resultó en la obtención de una sola señal o dos como en los casos anteriores, en la Figura 4.11 se muestra el espectro obtenido y además la estructura de la molécula con los valores teóricos calculados de la especie esperada; sin embargo, es evidente que estos valores no concuerdan con lo obtenido experimentalmente. Esto se atribuye a la naturaleza del compuesto, ya que se trata de una molécula con carga neutra y las especies detectadas en esta técnica deben poseer una carga positiva.

De acuerdo con las señales observadas se propusieron algunas especies que corresponden con las relaciones m/z obtenidas en el espectro, a partir de la fórmula condensada de cada una se simularon los patrones de contribución isotópica y estos se compararon con los resultados experimentales. La Figura 4.12 muestra dos de las especies detectadas, el pico base m/z=414.1626 corresponde con el valor calculado para la fórmula  $C_{26}H_{24}NO_4^+$ , en esta especie se pierde la coordinación de la dicetona con el difluoroboro, lo cual se atribuye a que no se trata de enlaces covalentes que puedan preservarse tras la ionización de la molécula.

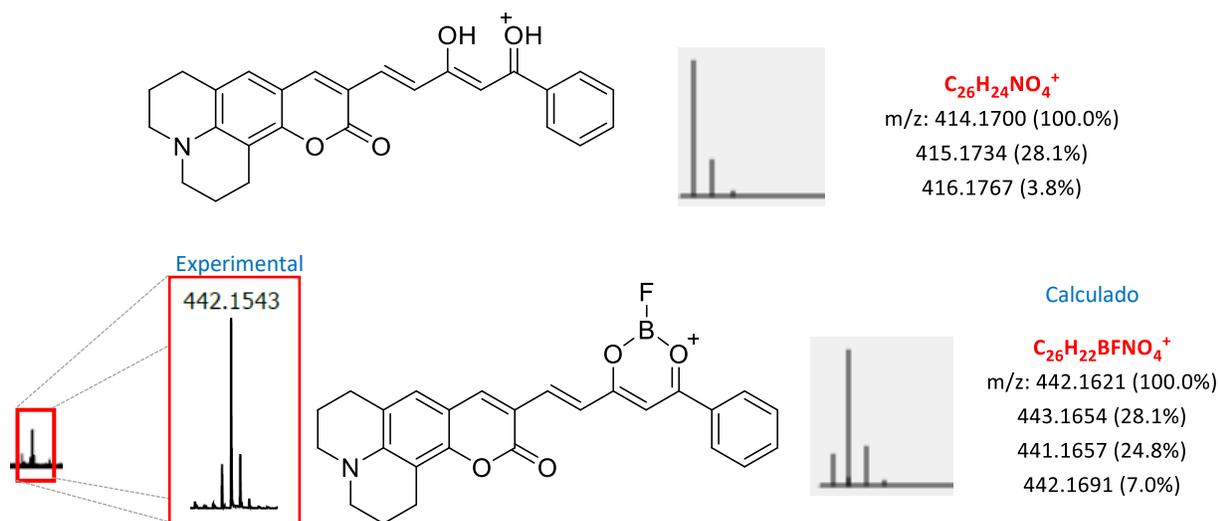


Figura 4.12 Propuesta de las especies detectadas en el espectro ESI+ de AzF4. Se presentan datos teóricos calculados y la ampliación del recuadro rojo de la figura 4.11.

Además, se presenta la ampliación de la sección roja marcada en la Figura 4.11, esta señal resulta de interés ya que m/z=442.1543 corresponde con el valor calculado y el patrón de distribución isotópica teórico para la fórmula  $C_{26}H_{22}BFNO_4^+$ , en esta especie se pierde uno de los átomos de flúor

obteniéndose así una carga positiva en la molécula, haciendo posible su detección mediante esta técnica.

Debido a que en la caracterización de la molécula mediante espectrometría de masas se obtuvo un pico más abundante de la especie descoordinada, el espectro de IR obtenido también fue de mucha utilidad. En la Figura 4.13 se muestra el espectro de IR de **AzF4** en donde se destacan algunas de sus señales características, los picos localizados en 1366 y 991  $\text{cm}^{-1}$  resultan importantes al atribuirse a estiramientos B-O y B-F respectivamente<sup>71,72</sup>, lo cual principalmente corrobora la existencia de estos enlaces en la estructura del compuesto.

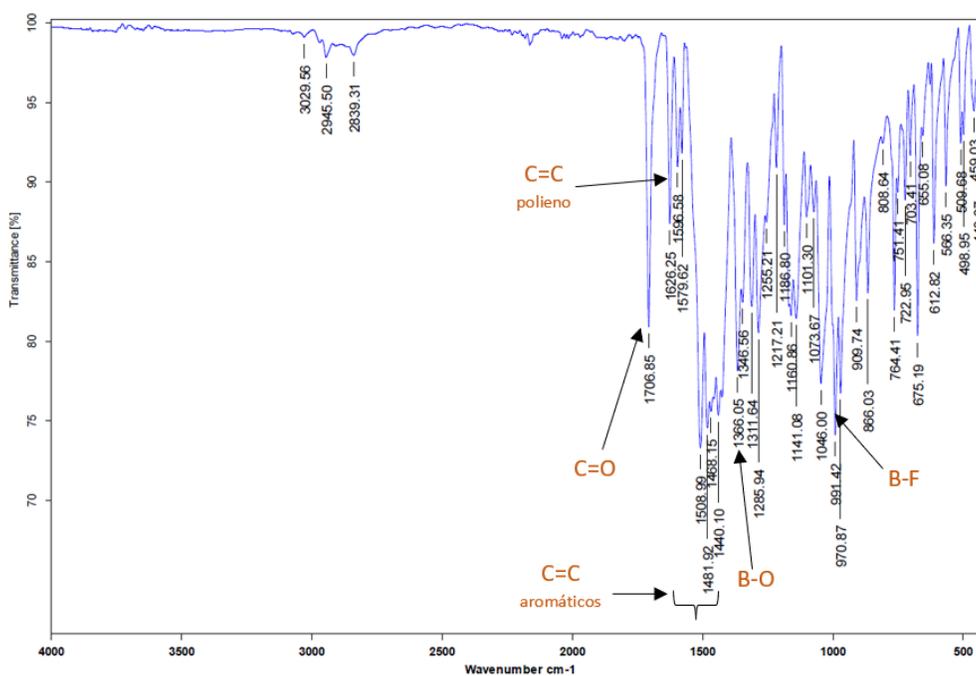


Figura 4.13 Espectro IR de **AzF4**, se señalan algunas de las señales características identificadas.

### 1.5 AzF5 y AzF6

Para fines prácticos en esta sección se presentarán solo los estudios de caracterización de **AzF5**, dado que la única diferencia entre ambos compuestos es la presencia de un metileno adicional en la morfolina utilizada para la síntesis de **AzF6**.

En la Figura 4.14 se muestra el espectro de RMN  $^1\text{H}$ , la zona aromática presenta señales que integran 14 protones, estos corresponden a 12 protones aromáticos y 2 vinílicos, otros 2 protones vinílicos

aparecen en 5.6 y 6.3 ppm. La zona alifática integra 40 protones, los cuales concuerdan con el número esperado.

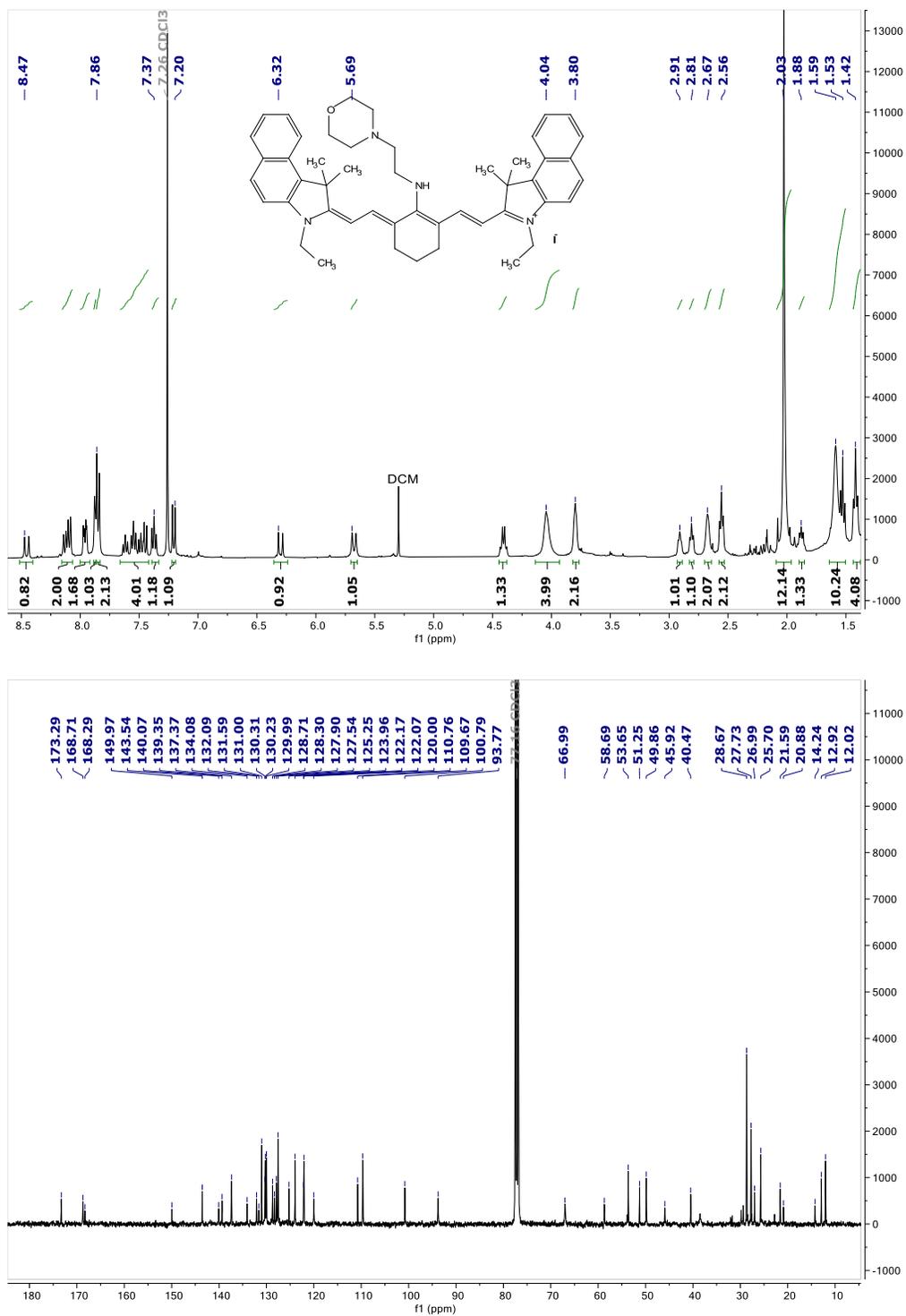


Figura 4.14 Arriba: espectro de RMN  $^1\text{H}$  de AzF5 y abajo: espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ , ambos en  $\text{CDCl}_3$ .

En el espectro RMN  $^{13}\text{C}$  se identificaron 29 señales diferentes para carbonos  $\text{sp}^2$ , localizados a desplazamientos mayores de 90 ppm y 16 señales correspondientes a carbonos  $\text{sp}^3$ , de las cuales se deduce que la localizada en 28.67 ppm corresponde a los 4 metilos de los fragmentos benzoindol de la molécula, dando un total de 48 carbono que corresponden al número esperado.

El análisis de masas se muestra en la Figura 4.15, donde se observa un pico base en  $m/z = 705.4605$ , dicho valor corresponde a la ion positivo de la molécula con fórmula molecular  $\text{C}_{48}\text{H}_{57}\text{N}_4\text{O}^+$ , los valores calculados y patrón de distribución isotópica para esta especie coinciden con el valor experimental obtenido.

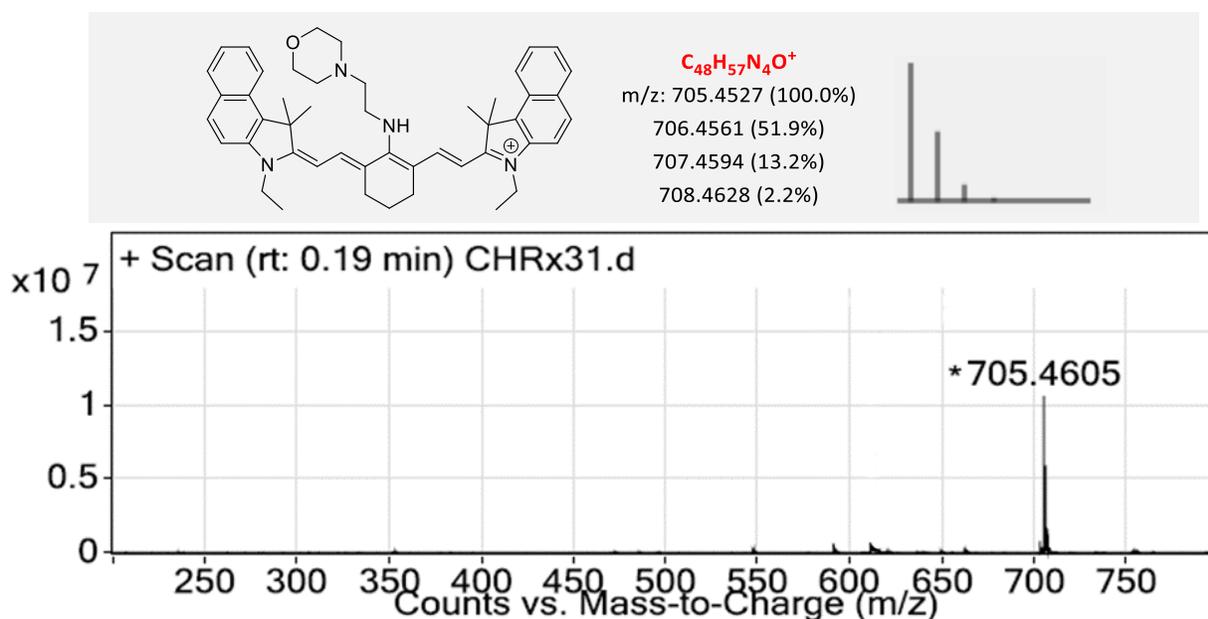


Figura 4.15 Espectro ESI+ de AzF5 en DMSO y propuesta de la especie detectada con sus valores  $m/z$  y contribución isotópica calculados.

Se obtuvieron también espectros para la caracterización de AzF6, estos se pueden consultar en el apéndice del escrito (Figuras A11 y A12).

### 1.6 AzF7

La síntesis de este fluoróforo a diferencia de los anteriores fue más sencilla debido a que se trata de una cianina simétrica, por lo que su purificación también fue menos complicada. La Figura 4.16 muestra los espectros de RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  del compuesto.

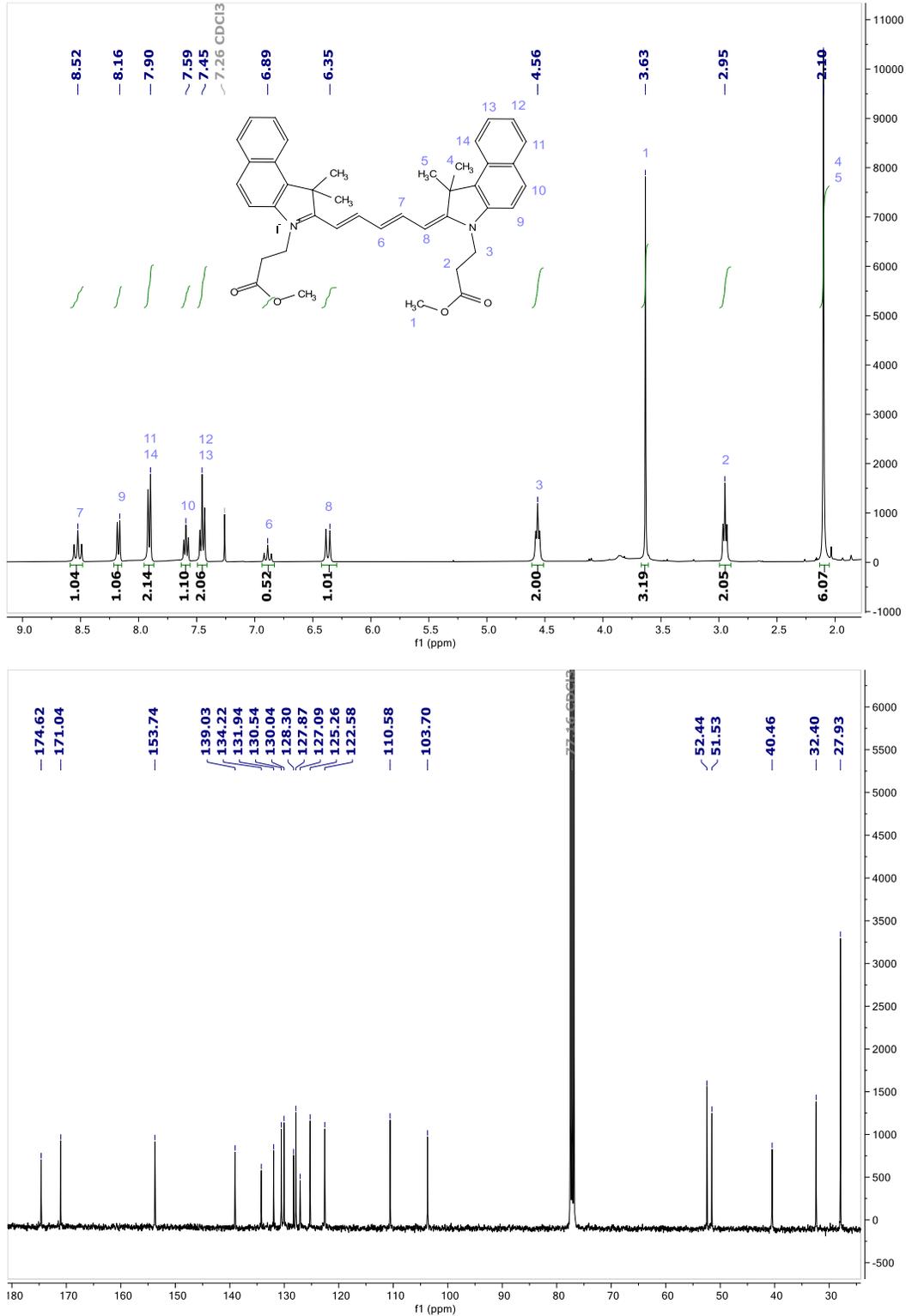


Figura 4.16 Arriba: espectro de RMN  $^1\text{H}$  de AzF7 y abajo: espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ , ambos en  $\text{CDCl}_3$ . Se identifican las señales con números.

Al tratarse de una molécula simétrica el número de protones integrados es igual a la mitad del número total. En el espectro de protón se observan 7 señales con desplazamientos mayores a 6 ppm, las cuales integran para 8.5 H, correspondientes al número de protones aromáticos y vinílicos de la molécula. Las señales localizadas en 6.89 y 6.35 se asignaron a protones vinílicos de la cadena polimetínica, una correspondiente el CH central de la molécula y otro al CH inmediato al heterociclo, éstas se encuentran en desplazamientos típicos para este tipo de protones, mientras que el CH restante de la cadena posee un desplazamiento no común, siendo la señal más desplazada a campo bajo (8.52 ppm). Este desplazamiento se justifica porque en una de sus estructuras de resonancia la carga positiva se deslocaliza en estos carbonos. Por otra parte, a campo alto se observan 4 señales que integran para los 13 H alifáticos esperados, dando un total de 21.5 protones.

En el espectro de  $^{13}\text{C}$  se identificaron 20 señales de carbonos con ambiente químico diferente, siendo el carbono central el localizado en 127.09 ppm. A campo alto se distinguen 5 señales correspondientes a carbonos  $\text{sp}^3$ , mientras que el resto corresponde a carbonos  $\text{sp}^2$ , estos resultados concuerdan con lo esperado según la estructura química del fluoróforo, el espectro ESI+ obtenido se muestra en la Figura A13 del apéndice, en donde el valor experimental concuerda con lo calculado.

## 2. Estudios espectroscópicos

Una vez que los fluoróforos fueron caracterizados se realizaron estudios espectroscópicos UV-Vis y de fluorescencia en disolución, en esta sección se presentan los resultados obtenidos al realizar cambios en el medio.

### 2.1 Efecto del disolvente

Los métodos espectroscópicos basados en las propiedades de absorción y emisión proporcionan información valiosa para explorar la naturaleza y el alcance de las interacciones de solvatación que se desarrollan en la proximidad del soluto, el cambio en las bandas de absorción o emisión de las moléculas de estudio en diferentes disolventes se conoce comúnmente como solvatocromismo y depende de la estructura electrónica de las moléculas de la muestra y el disolvente<sup>73</sup>. Como se indica en la descripción metodológica se emplearon disolventes de distinta polaridad: dioxano ( $\epsilon=2.02$ ), cloroformo ( $\epsilon=4.81$ ), DCM ( $\epsilon=10.70$ ), acetona ( $\epsilon=21.01$ ), metanol ( $\epsilon=33.00$ ), acetonitrilo ( $\epsilon=37.50$ ),

DMSO ( $\epsilon=46.68$ ) y  $H_2O$  ( $\epsilon=80.40$ ), estos se encuentran ordenados de menor a mayor constante dieléctrica.

En la Figura 4.17 se muestran los espectros de absorción de los fluoróforos derivados de cumarina **AzF1-4**. En el caso del fluoróforo **AzF1** se observa en todos los disolventes solo la aparición de una banda de absorción intensa, en donde los máximos se encuentran entre 550 y 610 nm. Para las moléculas **AzF2** y **AzF3** se observa un comportamiento similar, en la mayoría de los disolventes presentan una banda de absorción intensa con máximos de emisión entre 610 y 670 nm, a excepción de DMSO, donde el máximo de emisión es observado en 440 nm para ambos casos y dioxano para **AzF3**, que presenta una muy baja absorción a longitudes de onda mayores y un máximo en 400 nm. Además, para todas las moléculas anteriores se observa que su interacción con DCM promueve una mayor absorbancia.

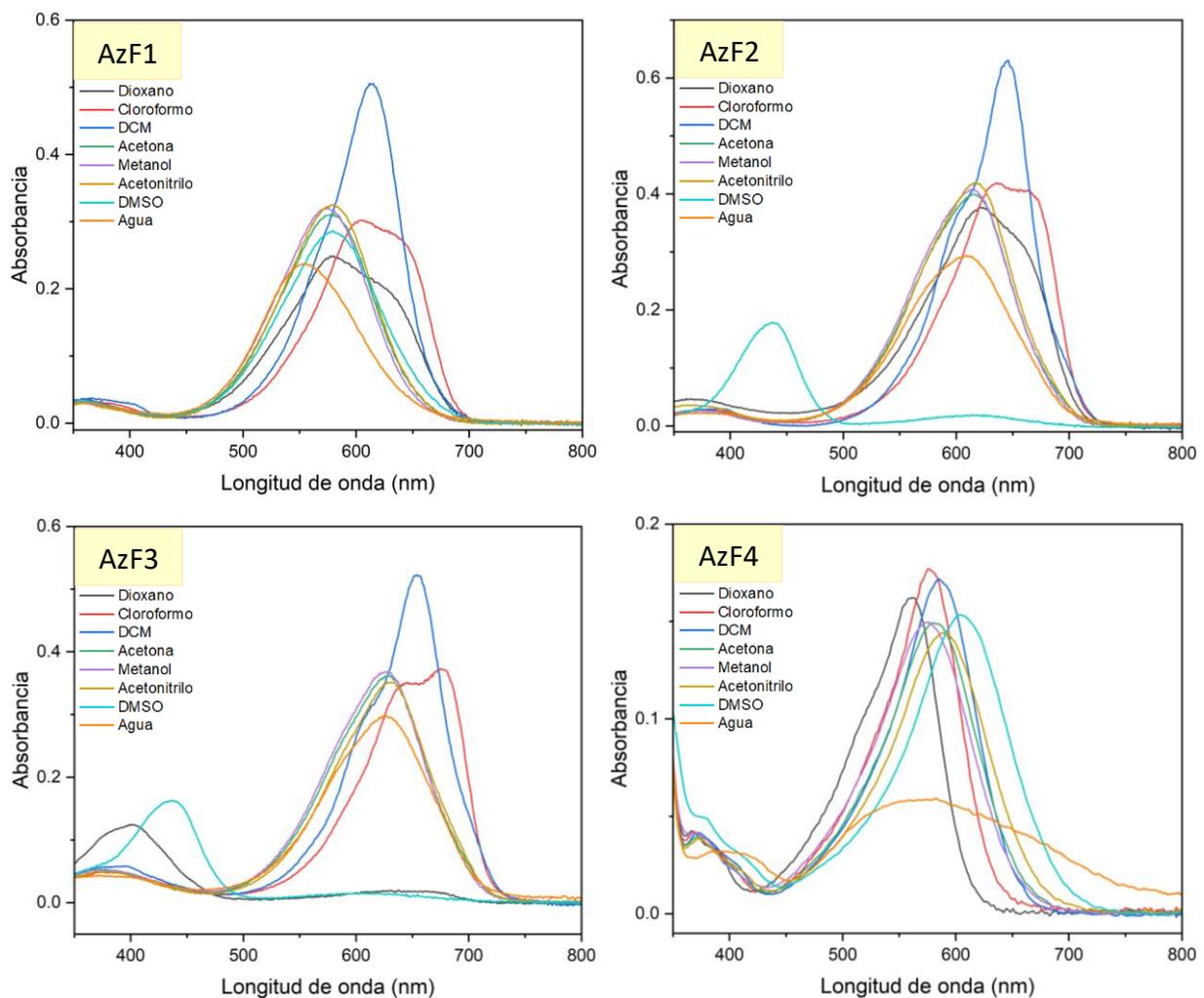


Figura 4.17 Espectros de absorción UV-Vis de los fluoróforos **AzF1** [3mM], **AzF2** [3mM], **AzF3** [3mM] y **AzF4** [1.5mM].

**AzF4** muestra una banda predominante con longitudes de absorción máxima entre 550 y 610 nm, también se observa una pequeña banda de absorción alrededor de los 380 nm. En medio acuoso se muestra un ensanchamiento de la banda con máximo en 580 nm, además de que a longitudes de onda mayores se siguió observando absorción, lo cual puede atribuirse a una menor solubilidad o la formación de especies en agregación.

La Figura 4.18 muestra el resto de los fluoróforos, los cuales son derivados de cianinas simétricas 7.5 y 5.5. Algo interesante se observa en los espectros obtenidos para **AzF5** y **AzF6**, ya que la única diferencia estructural entre ambas moléculas es la presencia de un carbono más en el derivado de morfolina utilizado, para **AzF5** en la mayoría de los disolventes se observan dos bandas de absorción intensas alrededor de los 680 nm (0-1) y 820 nm (0-0), la segunda banda más estrecha que la primera.

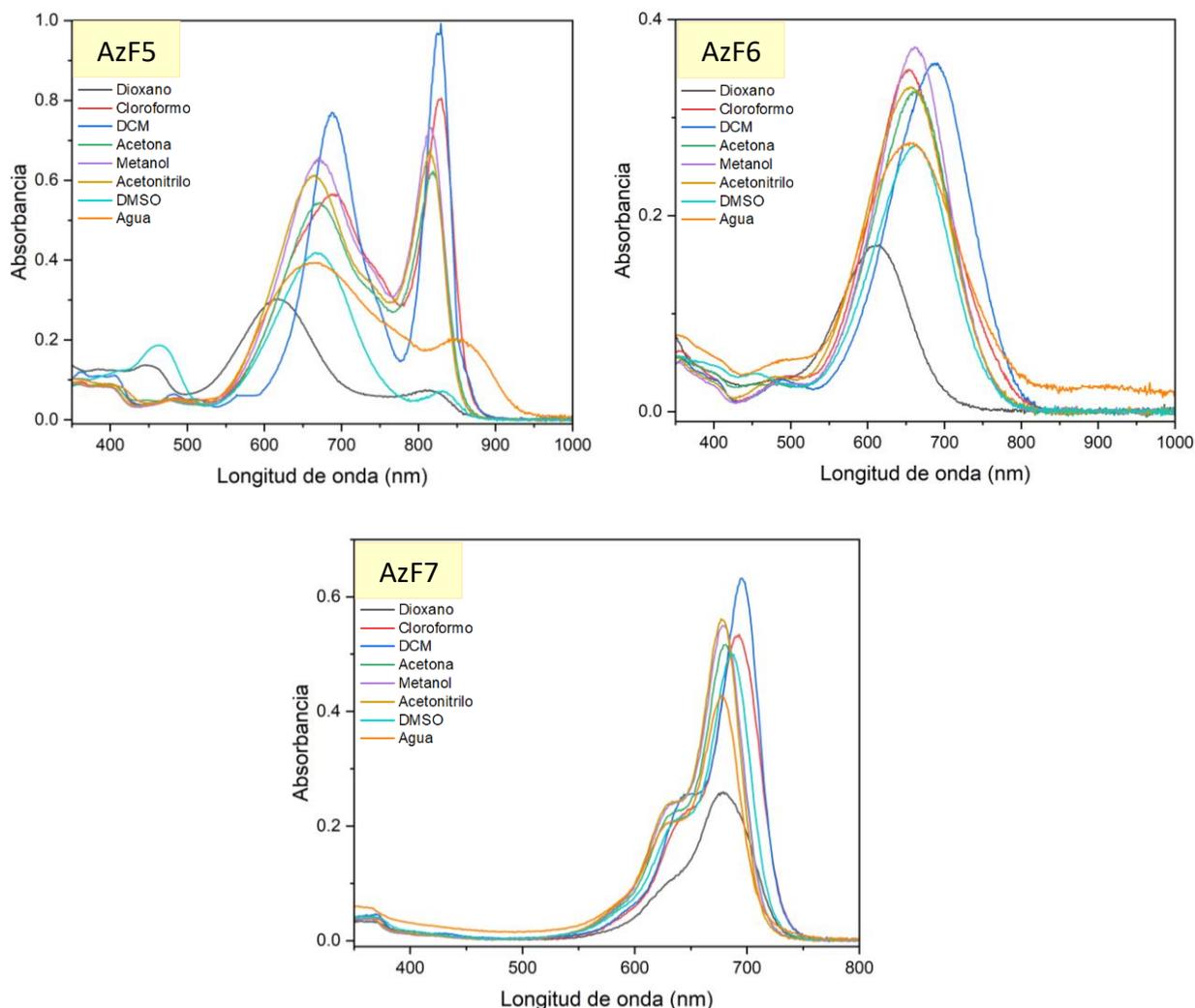


Figura 4.18 Espectros de absorción UV-Vis de los fluoróforos **AzF5** [6 mM], **AzF6** [3 mM] y **AzF7** [3 mM].

Por otra parte, en los espectros obtenidos para **AzF6** se observa solamente una banda intensa de absorción, que posee una forma ensanchada con máximos entre 610 y 690 nm. Es sabido que una cianina en un estado no polar con una distribución electrónica  $\pi$  simétrica y una deslocalización de la carga positiva, exhibe una banda de absorción relativamente nítida y con desplazamiento más hacia el rojo; mientras que un estado polar con una distribución no simétrica de los electrones  $\pi$  y la localización de la carga positiva muestra bandas de absorción amplias y desplazadas más al azul<sup>74,75</sup>.

De acuerdo con lo anterior, se puede decir que la cianina **AzF5** se encuentra en la mayoría de los disolventes en un estado no polar exceptuando a los espectros obtenidos en dioxano, DMSO y H<sub>2</sub>O, en los cuales también se observa un desplazamiento ligero hacia el azul. Mientras que **AzF6** presenta un estado polar en todos los disolventes y máximos de absorción a menores longitudes de onda respecto a las observadas en **AzF5**. Además, el fluoróforo **AzF6** al igual que **AzF4** mostró una menor solubilidad en medio acuoso.

Finalmente, los espectros de **AzF7** muestran bandas de absorción intensas y definidas con máximos de absorción alrededor de 690 nm, este máximo de absorción no se ve significativamente alterado por los distintos disolventes empleados y de acuerdo con la forma espectral que presentan se deduce que la cianina se encuentra en un estado no polar.

También se obtuvieron los espectros de emisión de los fluoróforos, las longitudes de excitación empleadas se determinaron a partir de los máximos de absorbancia observados en las mediciones anteriores. Los espectros obtenidos se normalizaron y se presentan en las Figuras 4.19 y 4.20.

Los fluoróforos **AzF1-AzF3** mostraron pequeñas variaciones en las longitudes máximas de emisión con los diferentes disolventes empleados, no se observa una tendencia respecto a los cambios de disolvente y la forma de sus espectros permaneció sin cambios significativos. Por otra parte, el compuesto **AzF4** presenta un claro desplazamiento de los máximos de emisión al ir incrementando la polaridad de los disolventes, pasando de 660 nm en dioxano a 750 nm en H<sub>2</sub>O. Algo similar se observa en los espectros de emisión obtenidos para **AzF5** y **AzF6**; sin embargo, para ambos casos el desplazamiento de los máximos no se observa de manera gradual como con **AzF4**, existe un desplazamiento marcado a longitud de onda menor con dioxano (740 nm) y el resto de los espectros se observan concentrados entre 770 y 800 nm.

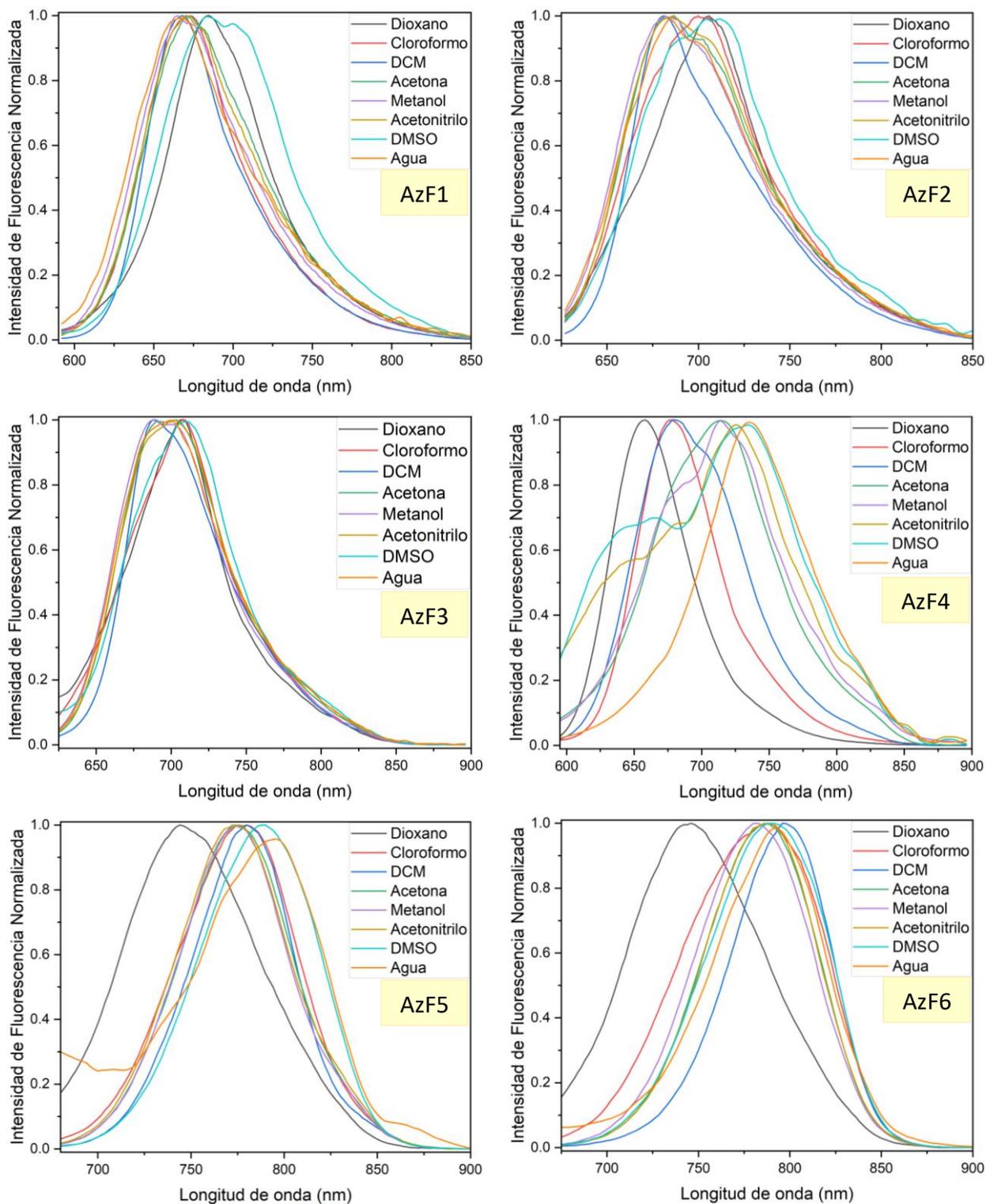


Figura 4.19 Espectros de emisión normalizados 3 mM de **AzF1** ( $\lambda_{exc}=580$  nm), **AzF2** ( $\lambda_{exc}=610$  nm), **AzF3** ( $\lambda_{exc}=610$  nm), **AzF4** ( $\lambda_{exc}=580$  nm), **AzF5** ( $\lambda_{exc}=660$  nm) y **AzF6** ( $\lambda_{exc}=660$  nm) en distintos disolventes.

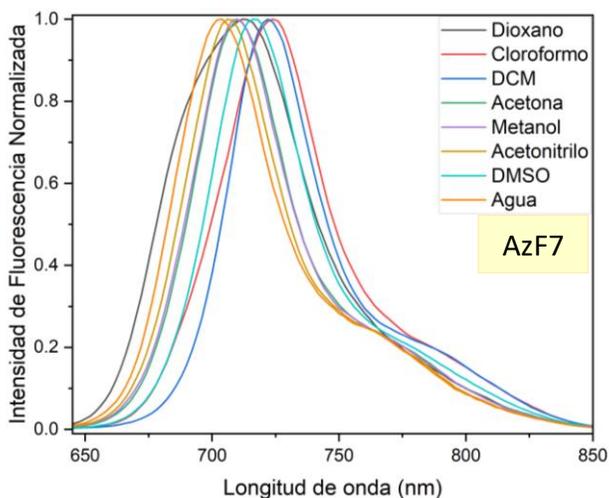


Figura 4.20 Espectros de emisión normalizados 3 mM de AzF7 ( $\lambda_{exc}=630$  nm) en distintos disolventes.

El desplazamiento de los espectros hacia el rojo, también llamado desplazamiento batocrómico, con aumento de la polaridad del disolvente se denomina solvatocromismo positivo; por el contrario, un cambio hipsocrómico (o hacia el azul) con polaridad creciente del disolvente es llamado solvatocromismo negativo. En general, las moléculas con un gran cambio en su momento dipolar permanente tras la excitación exhiben un fuerte solvatocromismo, si el momento dipolar de la molécula aumenta durante la transición electrónica se observa un solvatocromismo positivo<sup>76</sup>.

Por lo tanto, los fluoróforos **AzF4-AzF6** muestran un solvatocromismo positivo, siendo más marcado para el **AzF4**, lo cual se puede atribuir a la presencia del fragmento  $\beta$ -dicetonato de difluoroboro que es reconocido como un fuerte aceptor de electrones<sup>60</sup> que podría propiciar una mayor polarización de la molécula tras excitarse y por lo tanto una mejor estabilización de ésta en disolventes más polares. La molécula **AzF7** mostró cambios ligeros en los máximos de emisión, pero al igual que los primeros fluoróforos no se observa alguna tendencia respecto al aumento de la polaridad de los disolventes, conservándose las longitudes máximas de absorción entre 700 y 730 nm.

## 2.2 Efecto de la polaridad del medio

Una vez conocidas las bandas de absorción de las moléculas se realizó un monitoreo más detallado de los efectos de la polaridad del medio en su emisión, ya que si bien con el análisis solvatocrómico utilizando disolventes con diversas constantes dieléctricas existe un acercamiento al efecto de la

polaridad se requiere una variación de este parámetro mediante un sistema binario de disolventes para observar de mejor manera el efecto. Para ello se empleó el sistema dioxano:H<sub>2</sub>O realizando variaciones en las proporciones de ambos disolventes de 0 al 100% v/v.

La Figura 4.21 muestra los perfiles de fluorescencia obtenidos para **AzF1-4** tras el aumento de dioxano en el medio, en cada espectro se marca con color rojo la emisión a 0% de dioxano y en color azul la emisión correspondiente a 100% de dioxano. Para los primeros tres compuestos se observó un comportamiento similar, en donde el aumento de la fracción de dioxano provoca un incremento gradual de la intensidad de emisión, esta tendencia se observa de 0 a 90% de dioxano, pero al llegar a 100% la emisión se ve drásticamente disminuida.

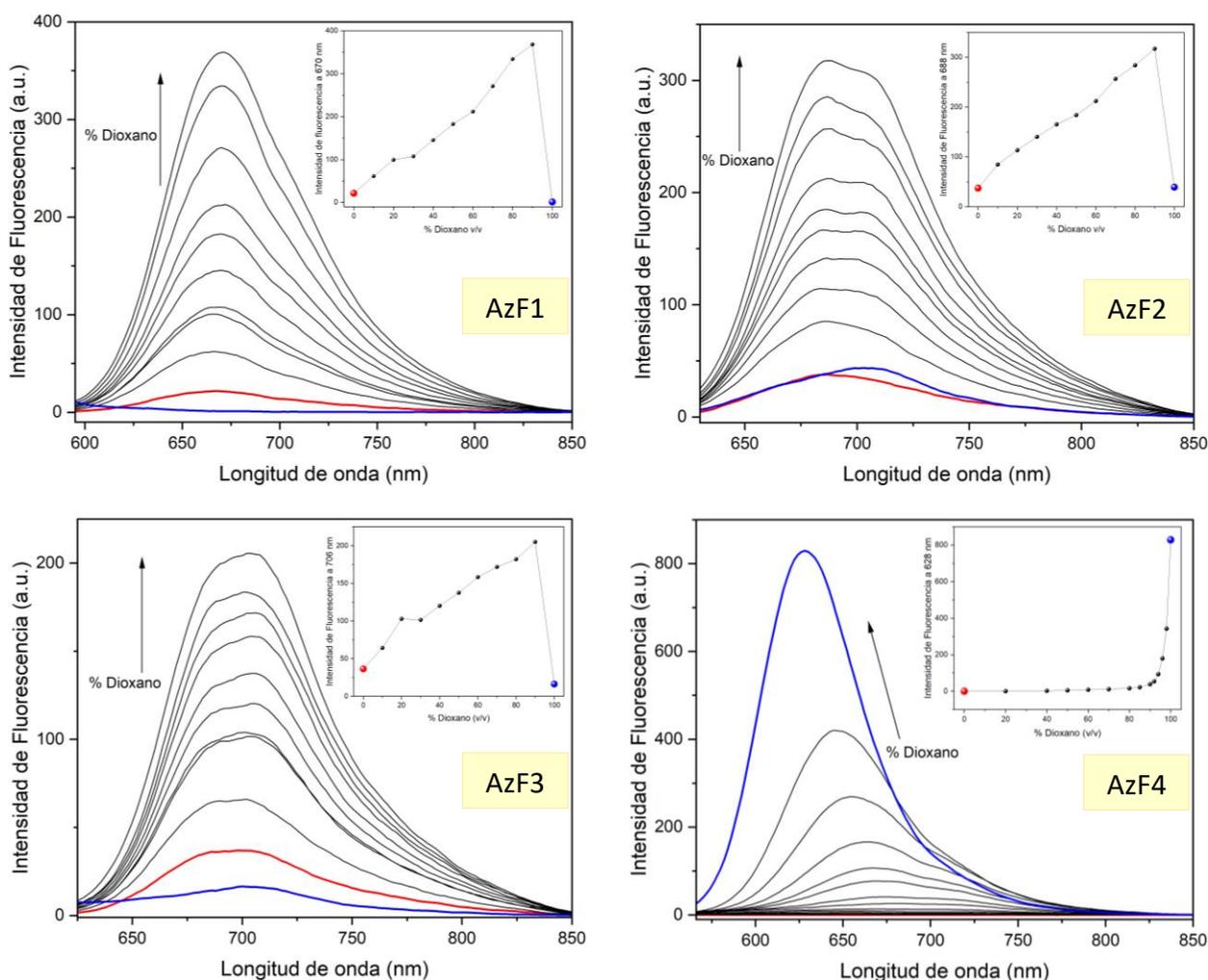


Figura 4.21 Espectros de emisión de **AzF1** ( $\lambda_{exc}=580$  nm), **AzF2** ( $\lambda_{exc}=610$  nm), **AzF3** ( $\lambda_{exc}=610$  nm) y **AzF4** ( $\lambda_{exc}=580$  nm) en mezclas con diversas proporciones dioxano:H<sub>2</sub>O, concentración de los fluoróforos=3mM.

Estos fluoróforos presentan solo una banda de emisión con máximos en 675, 685 y 710 nm para **AzF1**, **AzF2** y **AzF3** respectivamente, estas longitudes se conservan a lo largo de las variaciones realizadas. Por otra parte, **AzF4** mostró un aumento de la intensidad de fluorescencia con comportamiento exponencial de acuerdo a la emisión observada en 628 nm en las distintas proporciones utilizadas, también presentó un desplazamiento hipsocrómico del máximo de emisión al aumentar la proporción de dioxano en el medio, es decir, al incrementar la polaridad de medio con una mayor cantidad de agua en la mezcla existe un desplazamiento de los espectros de emisión hacia el rojo, presentando por lo tanto un solvatocromismo positivo y observándose una mayor fluorescencia en 100% dioxano, lo cual puede atribuirse a efectos de solubilidad.

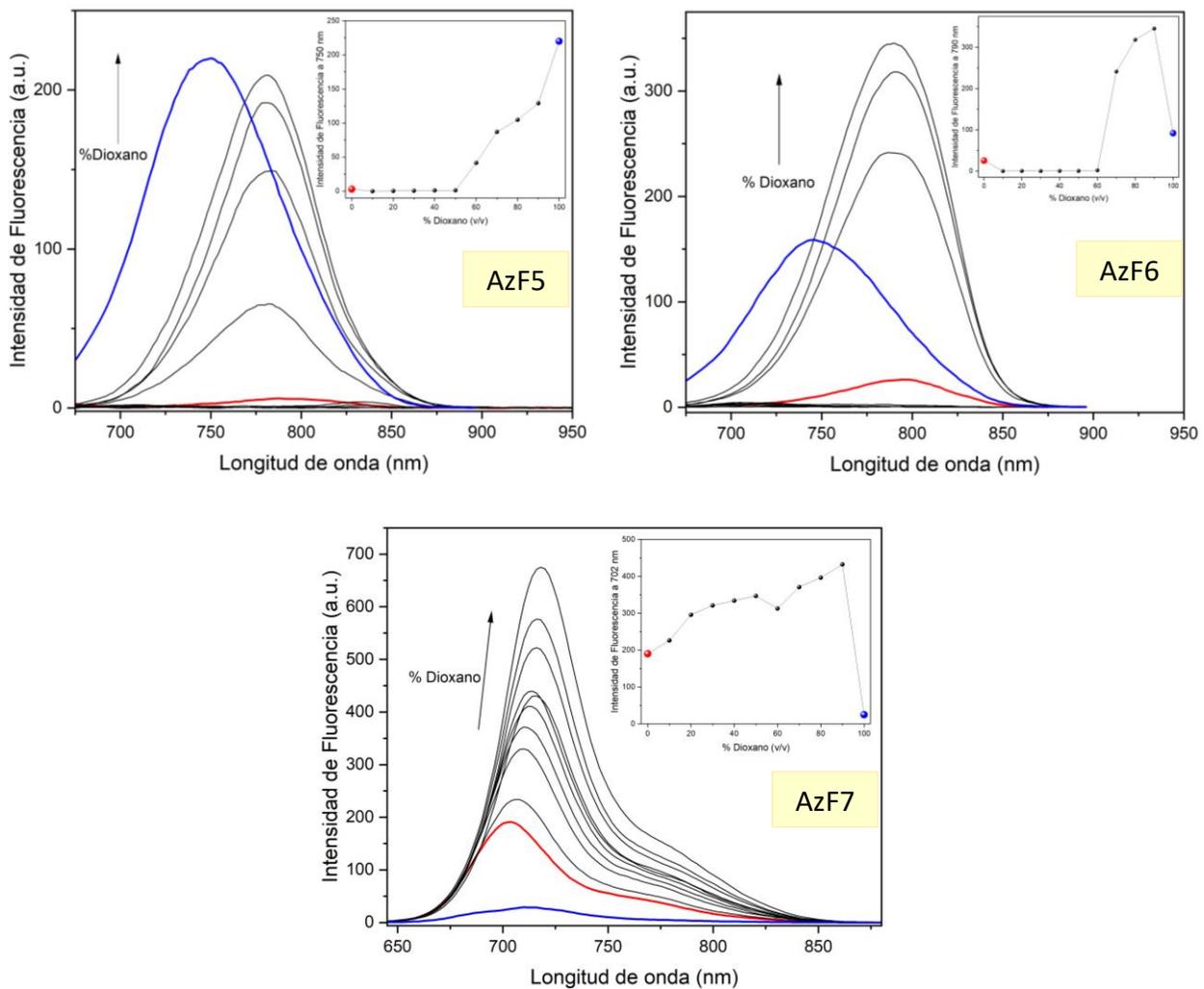


Figura 4.22 Espectros de emisión de **AzF5** ( $\lambda_{exc}=660$  nm), **AzF6** ( $\lambda_{exc}=660$  nm) y **AzF7** ( $\lambda_{exc}=630$  nm) en mezclas con diversas proporciones dioxano:H<sub>2</sub>O, concentración de los fluoróforos= 3mM.

Los fluoróforos **AzF5** y **AzF6** no presentaron cambios en su emisión en proporciones menores a 50% de dioxano, a porcentajes mayores se observa aumento en la emisión hasta llegar al 90%, en los espectros obtenidos tras cada aumento se observa una conservación del máximo de emisión, 780 nm para **AzF5** y 800 nm para **AzF6**, sin embargo, los espectros obtenidos en solo dioxano muestran un desplazamiento hipsocrómico a alrededor de 750 nm. Si bien existe un cambio en la longitud de onda del máximo de emisión en dioxano, este cambio no es gradual conforme se disminuye la polaridad del medio, lo cual sí se observa en el compuesto **AzF4**, de acuerdo con estas observaciones se puede decir que ambos compuestos no presentan una sensibilidad espectral significativa a variaciones en la polaridad del medio. Finalmente, el fluoróforo **AzF7** presentó un aumento en su emisión al disminuir la polaridad del medio, pero además mostró un ligero desplazamiento batocrómico de los máximos de emisión pasando de 700 nm (0% dioxano) a 720 nm (100% dioxano), es decir, un solvatocromismo negativo. Por otra parte, la disminución de emisión en todos los casos con el aumento de la fracción de agua en el sistema puede atribuirse a la formación de enlaces de hidrógeno intermoleculares<sup>77</sup>.

### 2.3 Efecto de la viscosidad del medio

La viscosidad juega un papel importante en el microambiente biológico, este parámetro en diferentes regiones celulares varía mucho, por lo que afecta la difusión de cada región, la transmisión de señales, transporte de materiales y la interacción entre sustancias bioquímicas<sup>78</sup>.

Debido a la relevancia que esta propiedad tiene se realizaron experimentos para determinar la sensibilidad de los fluoróforos a la viscosidad, para ello se emplearon variaciones continuas de metanol ( $\eta=0.6$  cP); glicerol ( $\eta=1410$  cP). En los espectros obtenidos para **AzF1-3** es posible observar un comportamiento similar, las bandas de emisión de cada fluoróforo aumentan significativamente tras un incremento en la cantidad de glicerol en el medio, sus máximos de emisión se conservan y se observa una tendencia lineal en **AzF3** en el intervalo de 10 a 90% de glicerol. Tanto en **AzF1** como en **AzF3** se observa que en 100% glicerol no hay un aumento de emisión, lo cual se podría atribuir a una menor solubilidad en este medio. El fluoróforo **AzF4** no mostró variaciones significativas a los cambios de viscosidad, lo cual se observó también en el compuesto **AzF7**, si bien en este último se observan algunos cambios en la intensidad de emisión, estos no presentan una tendencia clara en su incremento o disminución.

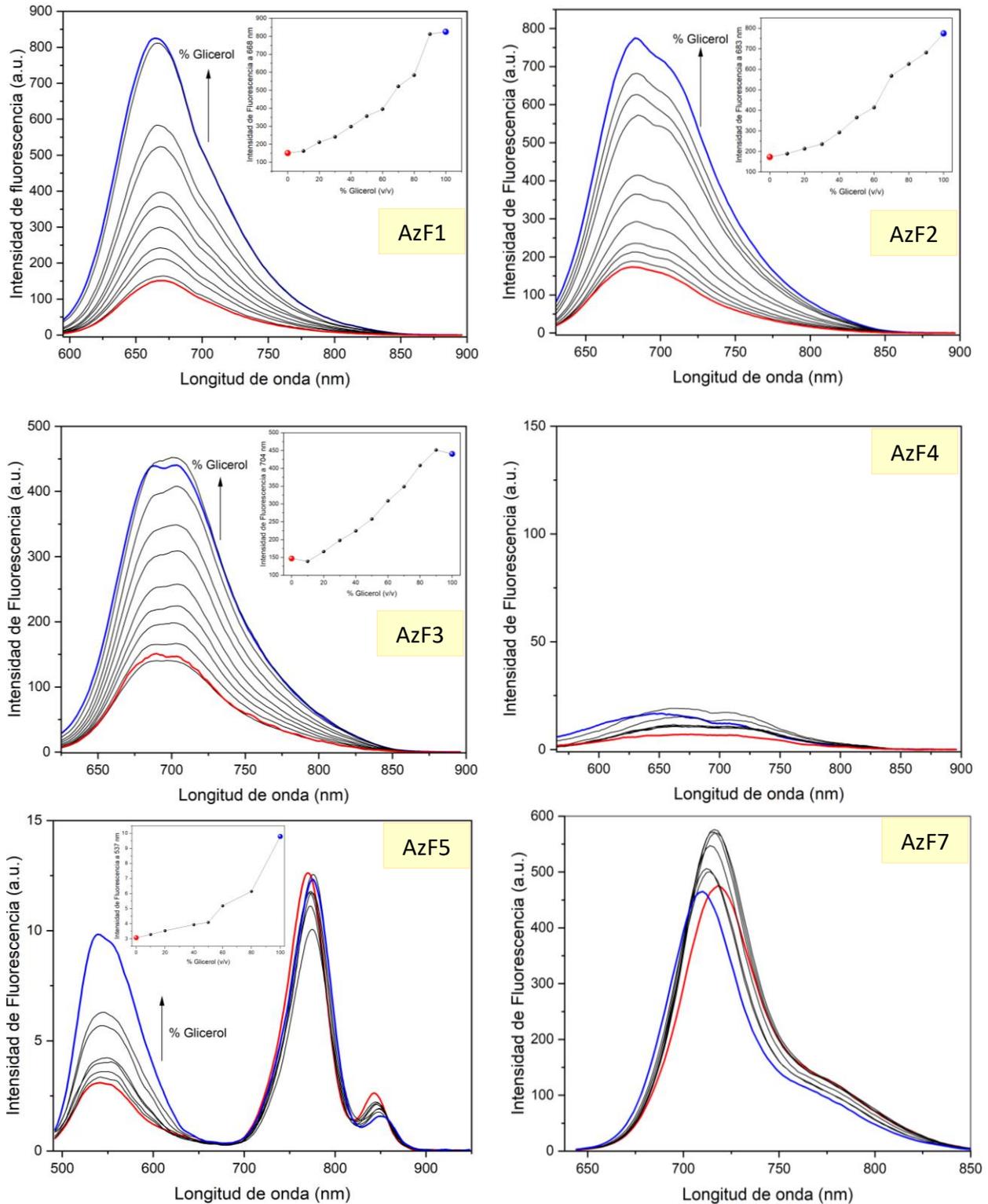


Figura 4.23 Espectros de emisión de **AzF1** ( $\lambda_{exc}=580$  nm), **AzF2** ( $\lambda_{exc}=610$  nm), **AzF3** ( $\lambda_{exc}=610$  nm), **AzF4** ( $\lambda_{exc}=550$  nm), **AzF5** ( $\lambda_{exc}=480$  nm) y **AzF6** ( $\lambda_{exc}=630$  nm) en mezclas con diversas proporciones metanol:glicerol, concentración de los fluoróforos= 3mM.

Por otra parte, se presentan solo los espectros obtenidos para **AzF5** y se omiten los de **AzF6** ya que se observó un comportamiento muy similar, para **AzF5** se empleó una longitud de excitación menor (480 nm) debido a que no se observaron cambios en la emisión al emplear una longitud de excitación de 660 nm. El uso de una longitud menor permitió observar que la banda de emisión localizada en 780 nm no presenta cambios significativos al incrementar la viscosidad, pero existe una banda de emisión en 540 nm que aumenta, presentando así una respuesta radiométrica que puede ser útil; sin embargo, la intensidad de emisión del compuesto en este sistema es muy bajo en comparación con los demás compuestos que presentaron respuesta, lo cual no da certeza de que pueda ser útil como sonda radiométrica para el monitoreo de viscosidad por medio de microscopía.

La respuesta observada por los compuestos **AzF1-3**, es muy similar a resultados obtenidos para sondas ya reportadas por otros grupos con estructura similar D- $\pi$ -A, en donde el aumento de emisión se atribuye al doble enlace C-C incluido en la posición 4 de la cumarina, que puede experimentar cambios en la planaridad del sistema<sup>79,80</sup>. La rotación interna, que interrumpe la planaridad de una molécula, es una fuente de relajación no radiativa, en un entorno viscoso en donde las rotaciones se ralentizan la intensidad de fluorescencia y la vida útil de estas moléculas aumentan considerablemente<sup>81</sup>.

### 3. Estudios *in vitro*

Una vez conocidas algunas de las propiedades fotofísicas de los fluoróforos y de acuerdo con los fines perseguidos en este proyecto resultó imprescindible realizar experimentos para saber si las moléculas sintetizadas podrían permear las membranas celulares, lo cual en un principio haría posible conocer su localización y por ende enfocar los estudios siguientes en el análisis de acuerdo a lo observado en estos experimentos, a su vez, esto presentaría un acercamiento a su posible aplicación en técnicas de microscopía.

Como se indica en la sección experimental, las imágenes obtenidas de cultivos celulares se realizaron sin tiempos de incubación extensos como lo indican diversos protocolos, donde los fluoróforos se colocan en el cultivo celular hasta 30 minutos<sup>82</sup> antes su observación bajo microscopio. En un principio se realizaron pruebas para conocer si estos tiempos de incubación eran necesarios, así como los lavados indicados en los mismos protocolos. De acuerdo con esto se encontró que usar concentraciones del fluoróforo de 0.1-0.3  $\mu$ M en el cultivo celular era suficiente para evitar una

saturación en las células y que a su vez no se requería de lavados adicionales por tratarse de una baja concentración; además, no fueron necesarios largos periodos de incubación para todas las moléculas ya que se pudo realizar la adición del fluoróforo hasta 5 minutos antes de la observación y este tiempo fue suficiente para la difusión de los fluoróforos dentro de las células.

Para todos los fluoróforos se identificaron en primera instancia los canales en los cuales se observaba señal, empleando así los canales predeterminados: azul (DAPI  $\lambda_{exc}=359$  nm,  $\lambda_{em}=461$  nm), verde (GFP  $\lambda_{exc}=488$  nm,  $\lambda_{em}=510$  nm) y rojo (Texas red  $\lambda_{exc}=596$  nm,  $\lambda_{em}=615$  nm). Debido a la conjugación  $\pi$  extendida no se observó emisión en canal azul para ninguno de los compuestos, por lo cual solo se obtuvieron imágenes en canal verde, rojo y campo claro.

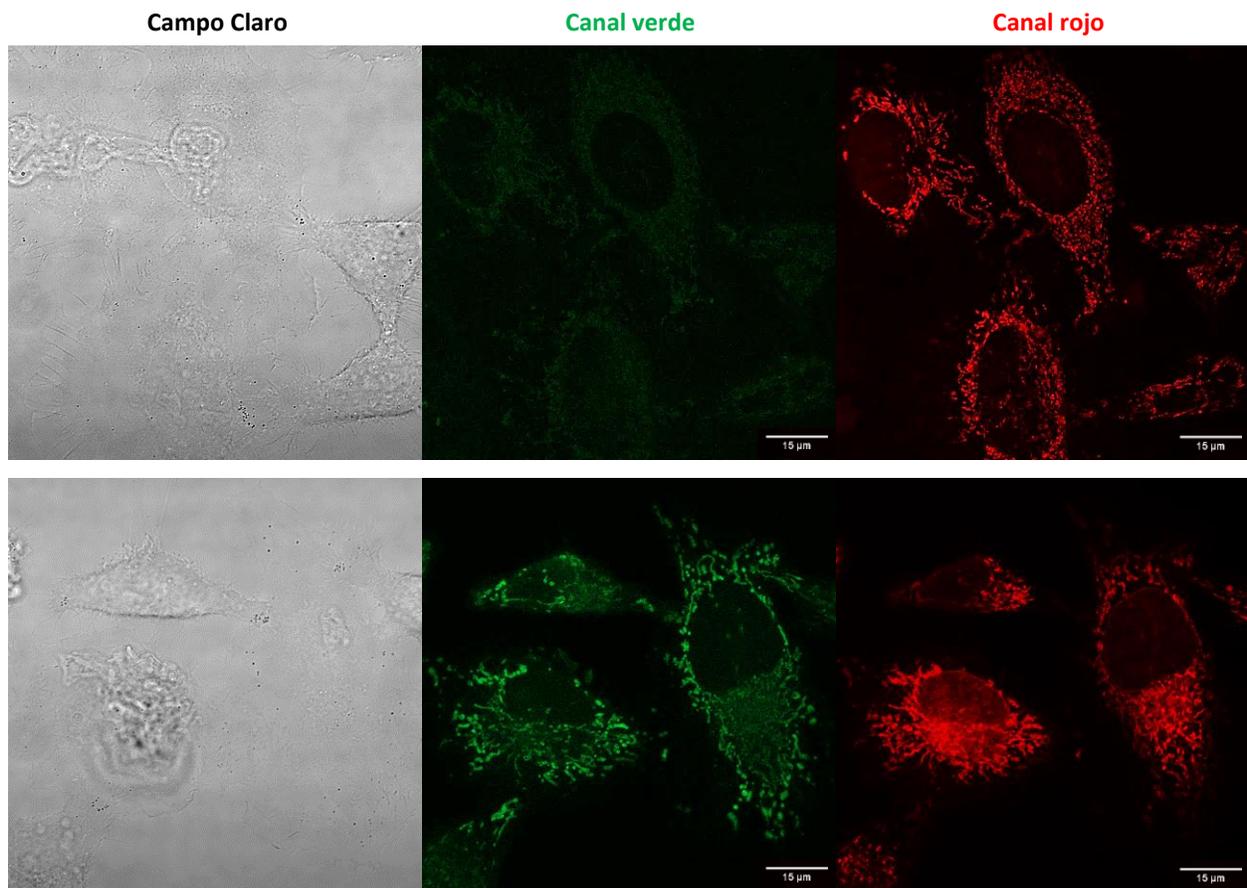


Figura 4.24 Imágenes obtenidas con microscopía confocal en campo claro, canal verde (GFP  $\lambda_{exc}=488$  nm,  $\lambda_{em}=510$  nm) y canal rojo (Texas red  $\lambda_{exc}=596$  nm,  $\lambda_{em}=615$  nm) de cultivo celular U-251 incubado con **AzF1** (arriba) y **AzF2** (abajo) [0.1  $\mu$ M]. La barra de escala representa 15  $\mu$ m.

Es importante resaltar que todas las moléculas permearon la membrana celular y lograron difundirse dentro de las células. Tanto la molécula **AzF1** como en **AzF2** se localizan en estructuras filamentosas parecidas a redes (Figura 4.24), estas estructuras alargadas que se encuentran fuera del núcleo y se pueden observar en toda la célula concuerdan con la estructura característica observada para mitocondrias en células vivas<sup>83,84</sup>. Para **AzF1** solo se observa señal en el canal rojo, mientras que para **AzF2** existe señal de fluorescencia en verde y rojo, en ambos canales se observa el mismo tipo de estructuras marcadas. Estos resultados concuerdan con lo que inicialmente se esperaba, ya que la inclusión de la carga positiva se realizó con la intención de que las moléculas se localizaran en mitocondrias.

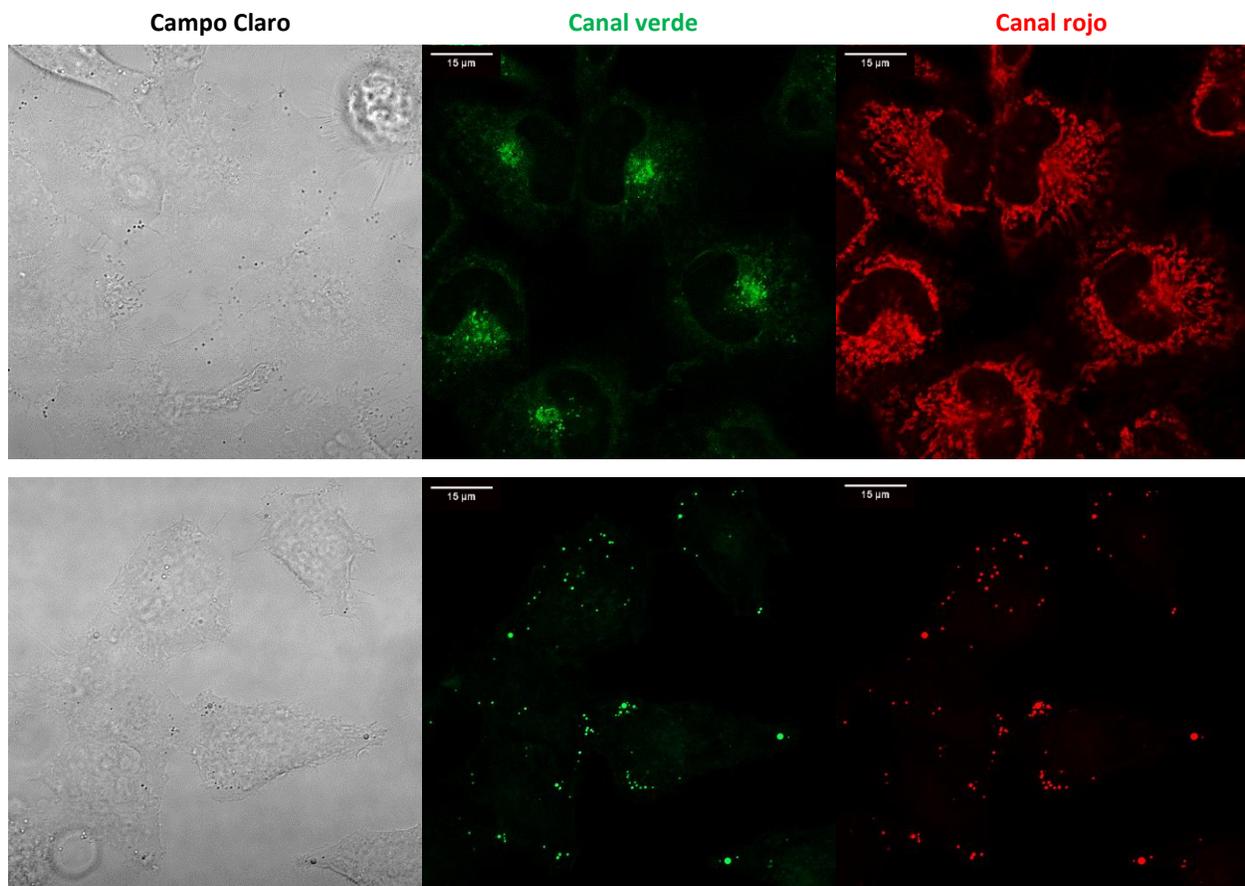


Figura 4.25 Imágenes obtenidas con microscopía confocal en campo claro, canal verde (GFP  $\lambda_{exc}=488$  nm,  $\lambda_{em}=510$  nm) y canal rojo (Texas red  $\lambda_{exc}=596$  nm,  $\lambda_{em}=615$  nm) de cultivo celular U-251 incubado con **AzF3** (arriba) y **AzF4** (abajo) [0.1  $\mu$ M]. La barra de escala representa 15  $\mu$ m.

El compuesto **AzF3** mostró emisión en ambos canales (Figura 4.25), en el canal rojo se observaron de igual manera estructuras filamentosas características de la red mitocondrial, mientras que en canal verde se identificaron estructuras diferentes, teniendo éstas una forma esférica y pequeña, lo cual indicó en principio que esta molécula podría emplearse como una sonda con marcaje múltiple, la localización en mitocondrias al igual que las moléculas anteriores era esperada por la naturaleza catiónica del fluoróforo, mientras que el marcaje observado en el canal verde fue algo que aún debía explorarse a fondo ya que con solo estos experimentos no puede existir un resultado concluyente sobre el mecanismo de funcionamiento de la molécula. Por otra parte, **AzF4** muestra emisión en ambos canales también y una localización muy diferente a las observadas con anterioridad, el marcaje en ambos canales corresponde al mismo tipo de estructuras con forma esférica y pequeñas que se distribuyen en el citoplasma, de acuerdo con lo consultado en la literatura se deduce que estas estructuras podrían ser gotas lipídicas, además de que la inclusión del fragmento de difluoroboro se ha empleado en sondas con localización en LDs.

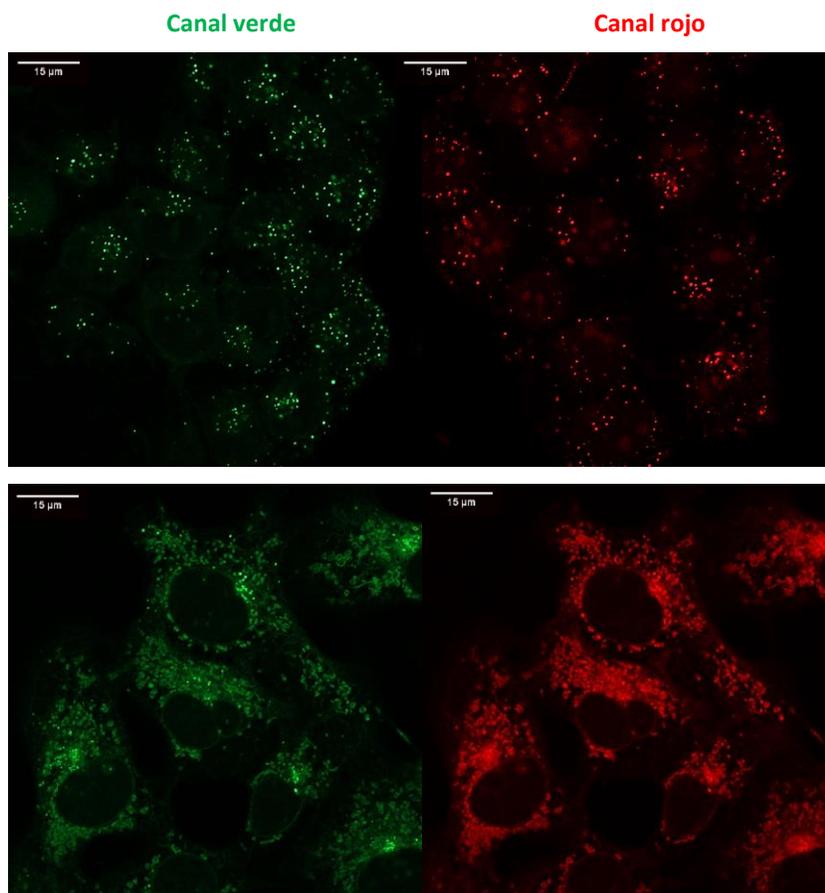


Figura 4.26 Imágenes obtenidas con microscopía confocal en canal verde (GFP  $\lambda_{exc}=488$  nm,  $\lambda_{em}=510$  nm) y canal rojo (Texas red  $\lambda_{exc}=596$  nm,  $\lambda_{em}=615$  nm) de cultivo celular SK-LU-1 incubado con **AzF5** (arriba) y **AzF6** (abajo) [0.1  $\mu$ M]. La barra de escala representa 15  $\mu$ m.

En el caso de los compuestos **AzF5** y **AzF6** exhibieron emisión en ambos canales (Figura 4.26), el primero se localizó en pequeñas estructuras esféricas abundantes en el citoplasma celular, el segundo de igual forma se localizó en estructuras pequeñas con forma semiesférica, debido a la inclusión de fragmentos morfolino en el diseño de ambos compuestos estas estructuras pueden ser lisosomas, ya que poseen una apariencia similar a lo observado en trabajos previamente reportados<sup>85</sup>. Finalmente, la cianina **AzF7** mostró una localización mitocondrial en canal rojo y una baja emisión en el canal verde (Figura 4.27), esta localización se atribuye a la carga positiva de la molécula.

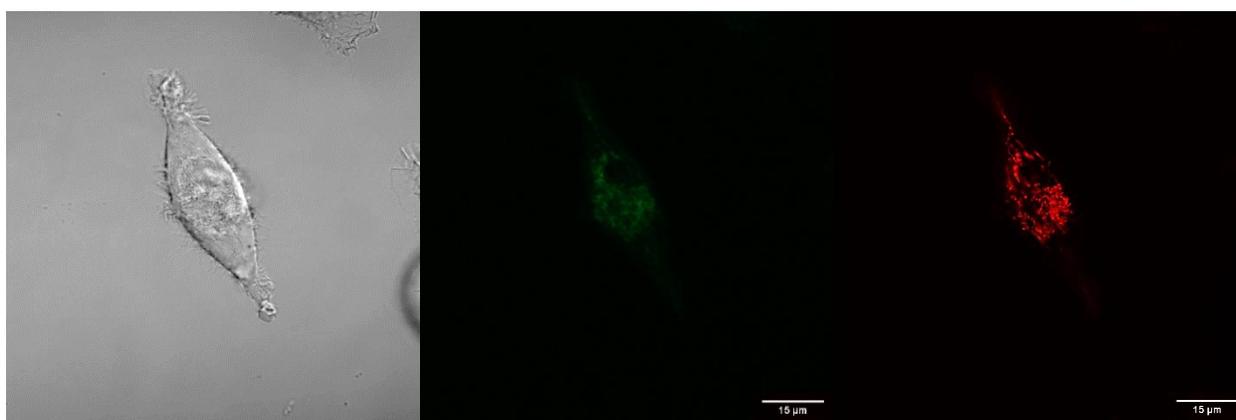


Figura 4.27 Imágenes obtenidas con microscopía confocal en campo claro, canal verde ( $\lambda_{exc}=480$  nm,  $\lambda_{em}=500$  nm) y canal rojo ( $\lambda_{exc}=640$  nm,  $\lambda_{em}=680$  nm) de cultivo celular U-251 incubado con **AzF7** [0.1  $\mu$ M]. La barra de escala representa 15  $\mu$ m.

La realización de estos experimentos otorgó mucha información útil sobre la posible aplicación de los fluoróforos en microscopía de fluorescencia, además de permitir conocer los niveles de concentración suficientes para el etiquetado de las células. De acuerdo con estos resultados se determinó que los experimentos siguientes se harían en función del marcaje que presentaron los fluoróforos, es por ello por lo que los análisis se enfocaron en las moléculas **AzF2-4** para conocer más acerca de sus mecanismos de marcaje y su aplicación en otros modelos además de cultivo celular, se realizó esta selección debido a la interesante localización que tuvieron tanto **AzF3** y **AzF4**, **AzF2** se empleó principalmente como una referencia para **AzF4**. En primera instancia se presentan los datos obtenidos para **AzF4** y posteriormente los de las otras dos moléculas.

#### 4. AzF4 como sonda selectiva a gotas lipídicas

El grupo de investigación se ha centrado en el desarrollo de sondas con localización mitocondrial en trabajos previos, por lo que resultó de mucho interés lo observado en los estudios preliminares de microscopía confocal para la molécula **AzF4**, de este modo se realizaron estudios de caracterización y respuesta más específicos para determinar su aplicación como sonda fluorescente. En esta sección se presentan estudios de caracterización complementarios, experimentos adicionales de espectroscopía, estudios de colocalización con marcadores comerciales, aplicación de la molécula en el modelo *in vivo* pez cebra y la propuesta de funcionamiento de este fluoróforo.

##### 4.1 Estudios de caracterización complementarios

Se obtuvieron los espectros 2D de RMN de **AzF4** (COSY y HSQC), estos se presentan en la Figura A15 del apéndice con los cuales se corroboró la asignación de señales y la estructura del fluoróforo. También se realizó la determinación del rendimiento cuántico y los tiempos de decaimiento de fluorescencia en distintos disolventes, los resultados obtenidos se presentan en la tabla 4.1, en donde también se muestran las longitudes de onda con los máximos de absorción y emisión.

Tabla 4.1 Datos de máximos de absorción y emisión, rendimientos de fluorescencia y tiempo de vida de fluorescencia de **AzF4** en diferentes disolventes.

Disolvente	Abs máx. (nm)	Emisión máx. $\lambda_{exc}=580$ (nm)	Rendimiento cuántico (%)	Tiempo de vida de fluorescencia (ns)
Metanol	580	716	4.12	--
Tetrahidrofurano	572	664	58.19	$1.988 \pm 0.0023$
Acetona	584	716	3.57	--
Acetonitrilo	589	726	1.93	--
Cloroformo	580	648	27.13	$2.30 \pm 0.01$
Diclorometano	590	680	3.78	$2.176 \pm 0.0094$
Dioxano	563	630	22.75	$2.091 \pm 0.0052$
DMSO	606	730	1.71	$1.4 \pm 0.03$
H <sub>2</sub> O	560	750	-	$0.315 \pm 0.013$

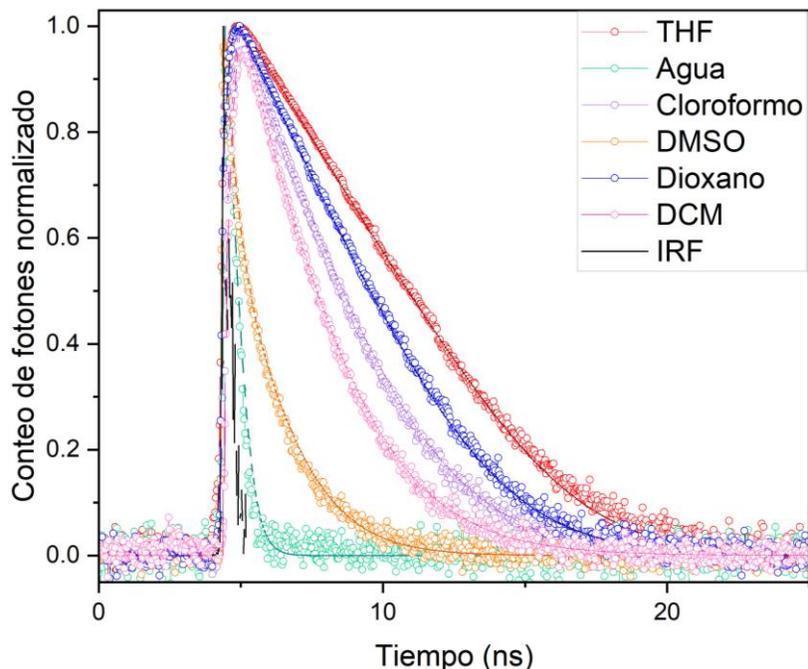


Figura 4.28 Curvas de decaimiento de recuento de fotones únicos correlacionados con el tiempo (TCSPC) a de 488 nm en distintos disolventes. IRF: Función de respuesta instrumental.

En la Figura 4.28 se muestran las curvas de decaimiento obtenidas, a partir de las cuales se determinaron los tiempos de vida de fluorescencia, los datos de la tabla 4.1 muestran que en disolventes poco polares existe un mayor rendimiento de fluorescencia y de tiempos de vida, mientras que en agua esto se ve drásticamente disminuido, ya que mediante el uso de esfera de integración no fue posible determinar el rendimiento de fluorescencia en medio acuoso.

También se determinó la fotoestabilidad del fluoróforo en HTAB 5mM, para ello se irradió la muestra en distintos tiempos empleando una longitud de onda de 580 nm y una longitud de detección de 700 nm, este seguimiento se realizó durante 7 horas y media y las respuestas obtenidas se muestran en la Figura 4.29. La emisión se observa sin una modificación considerable durante los primeros 90 minutos, posteriormente se observa una disminución de la intensidad de fluorescencia, al final del monitoreo se determinó que solo hubo una pérdida del 29% de la fluorescencia inicial, estos resultados indican que en principio este fluoróforo puede emplearse durante monitoreos largos en microscopía de fluorescencia y que se mantiene sin modificaciones significativas durante la primera hora de monitoreo en un medio acuoso.

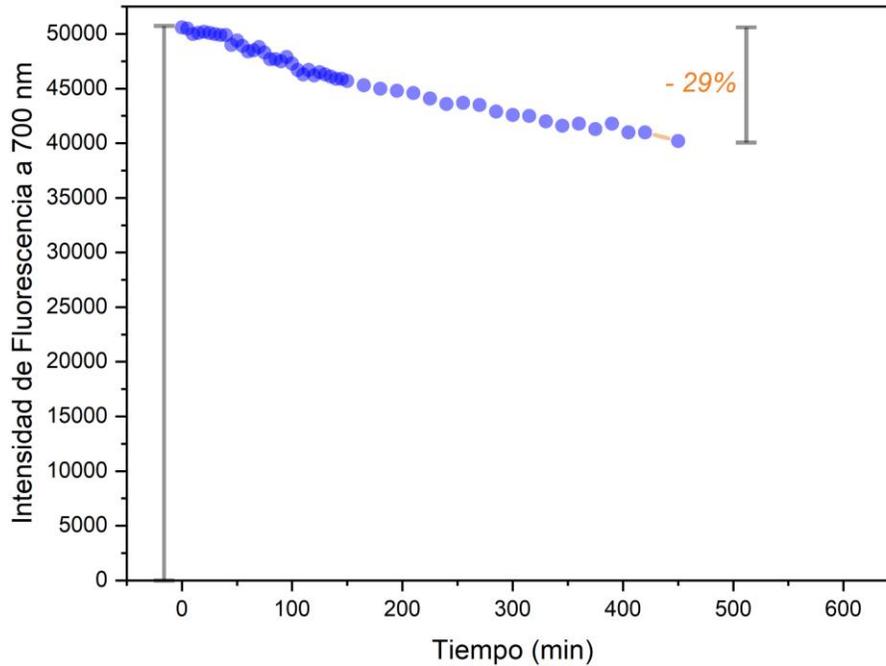


Figura 4.29 Monitoreo de la intensidad de fluorescencia de **AzF4** 6  $\mu\text{M}$  irradiado 580 nm y detectado a 700 nm en diversos tiempos, las lecturas fueron tomadas cada 5, 10, 20 y 30 minutos durante 7 horas y media.

#### 4.2 Estudios de colocalización

Para obtener resultados concluyentes sobre la localización de **AzF4** se realizaron experimentos de colocalización con marcadores comerciales de gotas lipídicas, debido a que **AzF4** tiene emisión en canal verde y rojo se emplearon los fluoróforos BODIPY 493/503 y Rojo de Nilo. Una baja concentración del fluoróforo permitió el análisis en el canal rojo colocalizado con el BODIPY, la Figura 4.30 muestra las imágenes obtenidas en canal verde tras la adición del marcador de LDs, este fluoróforo solo presenta fluorescencia en este canal, tras la adición de **AzF4** se observó fluorescencia en el canal rojo y se realizó una superposición de ambas imágenes para obtener el solapamiento de la señal en ambos canales, esto permitió obtener el coeficiente de Pearson mediante el tratamiento de imágenes en el programa ImageJ. En el análisis de imágenes el coeficiente de Pearson expresa la correlación de intensidad de los objetos de colocalización por píxeles en cada componente de una imagen de dos colores, el resultado es +1 para una correlación perfecta, 0 para ninguna correlación y -1 para una anticorrelación perfecta. Se presenta también el diagrama de dispersión de colocalización con el que se obtuvo un coeficiente de Pearson de 0.948, este resultado permite corroborar que

ambos fluoróforos se localizan en el mismo tipo de organelos, lo cual se puede verificar en la imagen obtenida del solapamiento de ambos canales, en donde se aprecian algunas zonas en donde no hay solapamiento de ambas señales, lo cual se puede atribuir al movimiento de estos organelos dentro de la célula por tratarse de un sistema dinámico. Algo importante a señalar es que en canal rojo se aprecia un marcaje más limpio de LDs que en canal verde con el BODIPY 493/503.

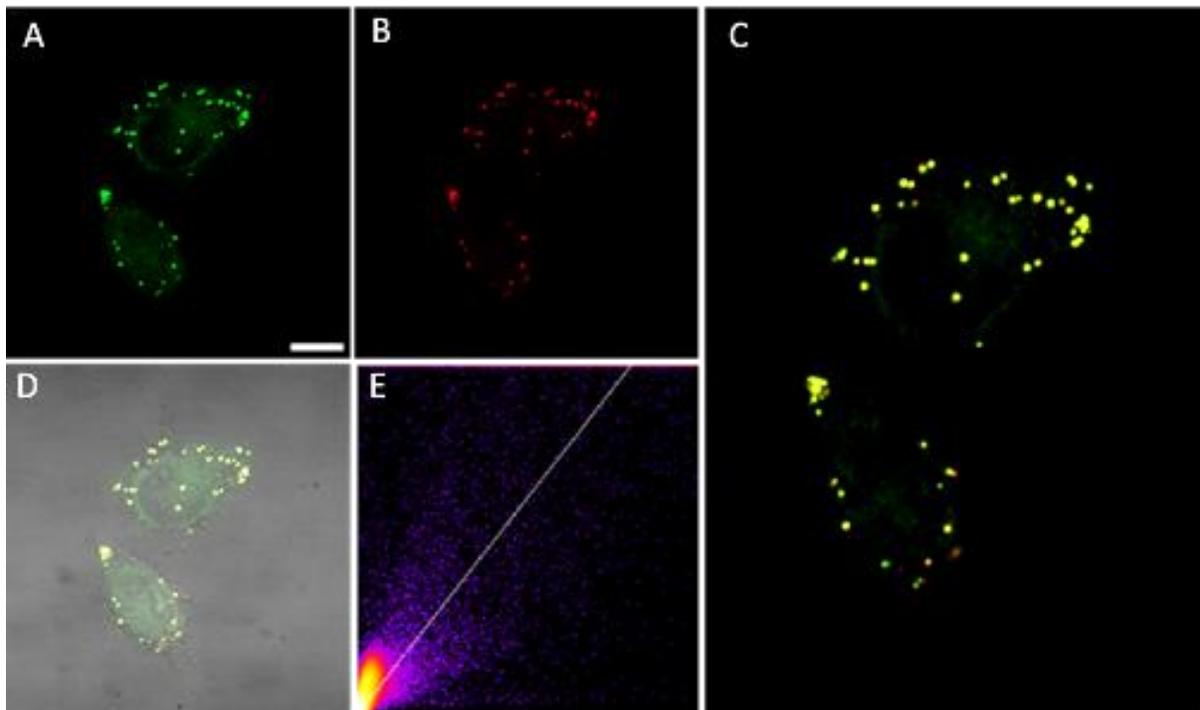


Figura 4.30 Imágenes confocales de células SK-LU-1. (A) Canal verde ( $\lambda_{exc}=480$  nm,  $\lambda_{em}=500$  nm) tras la adición del marcador BODIPY 493/503 [0.1  $\mu$ M] y (B) canal rojo ( $\lambda_{exc}=640$  nm,  $\lambda_{em}=680$  nm) después de agregar AzF4 [0.2  $\mu$ M]. (C) Solapamiento de señal del canal verde y rojo. (D) Solapamiento de ambos canales y campo claro. (E) Diagrama de dispersión de colocalización. La barra de escala representa 20  $\mu$ m.

La Figura 4.31 muestra el experimento de colocalización realizado con Hoechst 33342 como marcador de núcleo celular con señal en canal azul y Rojo de Nilo como marcador de LDs en canal rojo. La imagen obtenida en el canal rojo muestra que Rojo de Nilo marca estructuras esféricas con una mayor intensidad de fluorescencia correspondientes a gotas lipídicas, sin embargo, se observa señal de fondo lo cual indica que este marcador no es tan selectivo, siendo una de sus desventajas. La imagen resultante de la unión de los canales muestra que la señal observada en canal verde (AzF4) presenta solapamiento con las estructuras esféricas marcadas con mayor intensidad usando Rojo de Nilo con

un coeficiente de Pearson de 0.96, con lo cual se corrobora también con este marcador que **AzF4** es selectivo a gotas lipídicas.

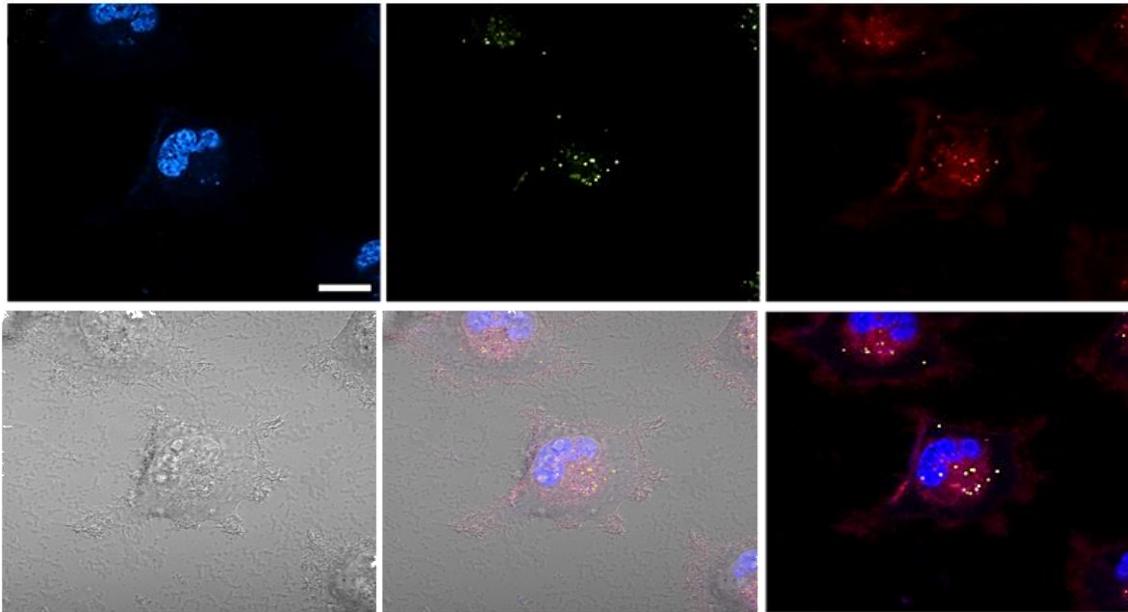


Figura 4.31 Imágenes confocales del experimento de colocalización de **AzF4** con Hoechst 33342 (canal azul), tras la adición de **AzF4** 0.2  $\mu\text{M}$  (canal verde), Rojo de Nilo 0.1  $\mu\text{M}$  (canal rojo) y campo claro. Superposición de canales y campo claro. La barra de escala representa 20  $\mu\text{m}$ .

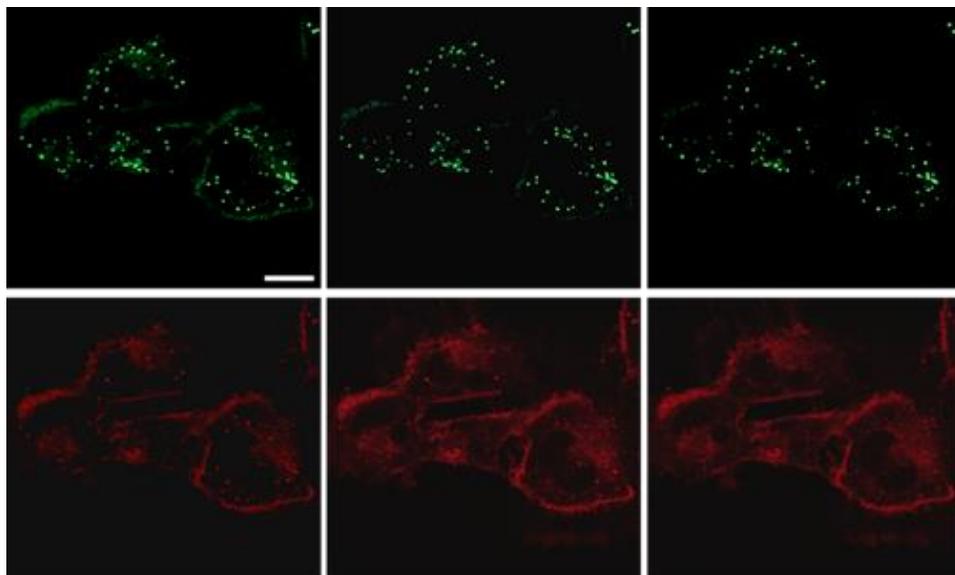


Figura 4.32 Cambios de la emisión del canal verde y rojo tras el incremento de concentración de 0.1 a 4  $\mu\text{M}$  **AzF4** en cultivo celular SK-LU-1.

Al realizar un aumento de la concentración del fluoróforo en el medio de cultivo de 0.1 a 4  $\mu\text{M}$  (Figura 4.32), se observó que la emisión del canal rojo de la sonda localizada inicialmente en LDs comenzó a distribuirse en el citosol e incluso en la membrana plasmática, mientras que en el canal verde se mantuvo la emisión selectiva a LDs y se observó una mejoría en el contraste de la imagen obtenida, estas observaciones sugieren una posible agregación de compuesto que resulta en el aumento de fluorescencia en el canal rojo, la formación de agregados se consideró desde el espectro UV-Vis obtenido en agua para esta molécula (Figura 4.17).

### 4.3 Experimentos *in vivo*

Una vez corroborada la selectividad de **AzF4** a gotas lipídicas se procedió a realizar pruebas para su aplicación en el modelo *in vivo* pez cebra. Los modelos animales proporcionan consistencia y validez de los resultados de la investigación *in vitro*, el uso del modelo *Danio rerio* presenta características ventajosas como su alta fecundidad, tiempo de generación corto, desarrollo embrionario rápido (24h) y fertilización externa; además, el embrión de pez cebra traslúcido permite el estudio de las diferentes etapas de desarrollo a partir de la etapa temprana de la embriogénesis, en el área de microscopía esto facilita su observación<sup>86,87</sup>. Al mismo tiempo, tiene características de gran similitud con el desarrollo fisiológico humano y con nuestros genes, en el que aproximadamente el 70% de los genes humanos tienen ortólogo con el pez cebra<sup>88</sup>.

Inicialmente se realizó una prueba de concentración y tiempo de incubación del fluoróforo con embriones de pez cebra de 48 hpf con la finalidad de observar la localización en el pez y determinar el tiempo de incubación necesario.

La Figura 4.33 muestra que la molécula puede difundirse dentro del pez solo exponiéndolo a bajas concentraciones del fluoróforo en el medio en el que se encuentra, la imágenes de la sección A y B corresponden a una concentración empleada de 2 y 5  $\mu\text{M}$  de **AzF4** respectivamente, se emplearon tres tiempos de incubación  $t_0=10$  min,  $t_1=15$  min y  $t_2 > 60$  min. En ambas concentraciones se evidencia una distribución de la sonda dentro del saco vitelino y la cavidad visceral, observándose así una emisión intensa en el canal verde, mientras que en el canal rojo se aprecia una menor emisión y solamente localizada en lo que parece una zona superficial de saco vitelino y la cavidad visceral, también se aprecia una señal de fluorescencia menos selectiva en el canal rojo. Desde el  $t_0$  de incubación se observa una buena permeabilización del fluoróforo, sin embargo, mayores tiempos de

incubación permiten observar con mayor definición estructuras esféricas dentro del saco vitelino (Figura 4.33 A  $t_1$  y  $t_2$ , canal verde) y dentro de la cavidad visceral (Figura 4.33 B  $t_2$ , canal verde). Al igual que lo observado en los experimentos *in vitro* referentes a la concentración del fluoróforo se pudo observar que el emplear una mayor cantidad de la molécula provoca un marcaje no selectivo del saco vitelino en canal rojo, la aparición de emisión roja en zonas de tejido hidratado del pez sugirió un fenómeno de autoagregación del fluoróforo en entornos acuosos ya que esta emisión no colocaliza con la emisión verde observada dentro del saco vitelino. Para probar esta hipótesis se realizaron experimentos que se presentan más adelante.

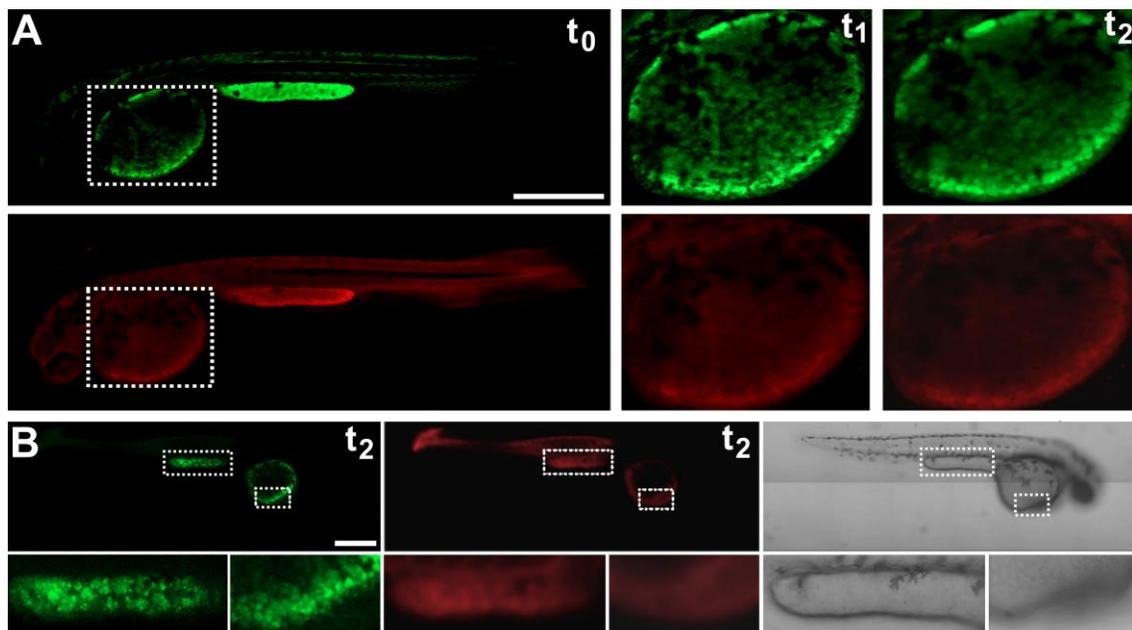


Figura 4.33 Imágenes confocales *in vivo* de embrión de pez cebra de 48 hpf en canal verde y rojo para A) 2  $\mu$ M y B) 5  $\mu$ M de AzF4. Las imágenes fueron tomadas a  $t_0=10$  min,  $t_1=15$  min y  $t_2 > 60$  min de incubación. También se presenta campo claro en el caso B.

Por otra parte, la localización y emisión en verde de la sonda se atribuye a la composición que posee el saco vitelino, el cual es una estructura que proporciona nutrientes durante los primeros 5 días de vida del embrión, consta de un núcleo rico en lípidos y proteínas. Diversos estudios han demostrado que se llevan a cabo funciones importantes en él como: la exportación de aminoácidos, hidrólisis de lípidos complejos para liberar ácidos grasos y síntesis de lipoproteínas, que exportan lípidos al embrión en desarrollo hasta que pueda alimentarse de forma independiente<sup>89,90</sup>. La abundancia de lípidos en esta estructura hace que no sea extraña la localización y fuerte emisión presentada tras la

incubación del embrión con **AzF4**, que presenta selectividad a estructuras ricas en lípidos como las LDs. Esto dio la posibilidad de realizar experimentos para probar el fluoróforo en la exploración de la dinámica de lípidos dentro del pez cebra. Además, se emplearon los marcadores BODIPY 493/503 y Rojo de Nilo para conocer su localización en el pez y no se observó una localización específica en el modelo (Figura A16).

Los peces fueron tratados 48 horas con atorvastatina (ATV) a bajas concentraciones, ya que se ha demostrado que las estatinas reducen notablemente los niveles de lípidos<sup>91</sup>. La estatina ATV es un potente inhibidor de hidroximetilglutaril-CoA reductasa que conduce a la biosíntesis de colesterol<sup>92</sup>, por lo que es ampliamente utilizada en tratamientos clínicos. La Figura 4.34 muestra las imágenes confocales obtenidas tras la incubación del pez previamente tratado con ATV, se observó un marcaje del saco vitelino y la cavidad visceral en el canal verde, a su vez, airyscan permitió observar claramente el marcaje de LDs dentro de ambas estructuras. También se observó que el tratamiento con ATV provocó un aumento en la dinámica de las gotas lipídicas, lo cual incluye fenómenos de coalescencia, división y movimiento de estas estructuras. Por otro lado, la señal en canal rojo mostró aumento de intensidad al finalizar el monitoreo, estas observaciones sugirieron que las variaciones osmóticas cambian y que puede haber un aumento de la cantidad de agua en el saco vitelino.

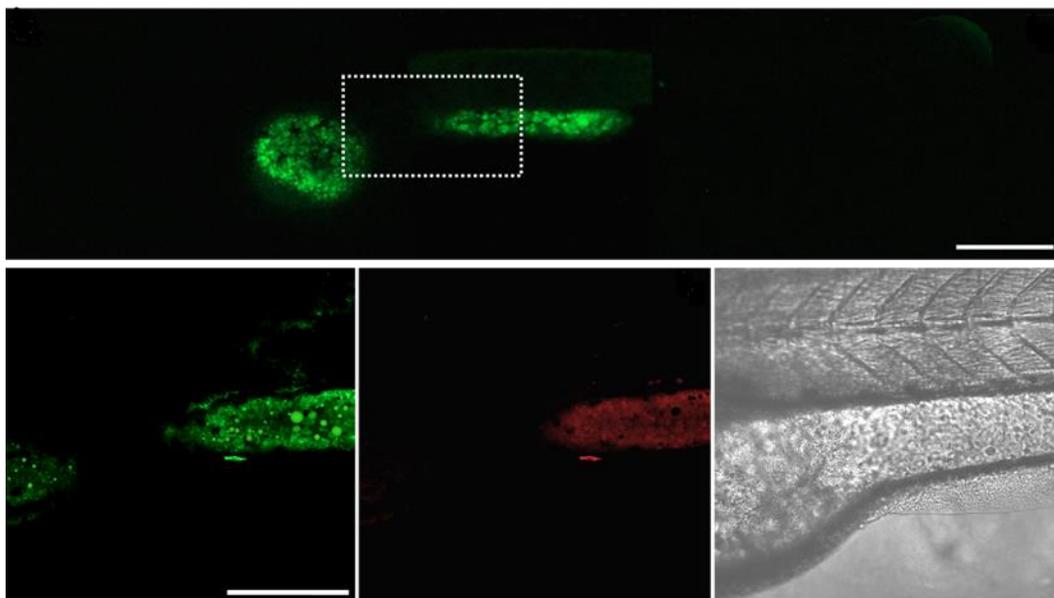


Figura 4.34 Imágenes confocales en canal verde, rojo y campo claro de alta resolución airyscan de pez cebra de 48 hpf tratado con atorvastatina 1.5  $\mu$ M, incubado 60 min con **AzF4** 5  $\mu$ M. La barra de escala representa 200  $\mu$ m.

El tratamiento con ATV mostró otro resultado interesante, ya que se observó que la exposición promovió la formación de un edema pericárdico y del saco vitelino en algunos de los peces, esta enfermedad es conocida como “blue-sac”<sup>93</sup>, se ha demostrado que las estatinas alteran la homeostasis renal de sodio y agua<sup>94</sup>, lo cual sugiere una posible falla en la barrera de agua entrante durante el desarrollo del pez.

#### 4.4 Mecanismo de funcionamiento de **AzF4** como sonda dual para el monitoreo de gotas lipídicas

Los resultados obtenidos en los experimentos *in vitro* fueron concluyentes para poder proponer el mecanismo de respuesta que presenta la molécula **AzF4**, en un principio se especulaba que la sonda solo presentaría emisión en un canal; sin embargo, la respuesta dual en los experimentos de microscopía confocal hizo cuestionar desde ese momento cuál era la razón por la cual se observaba emisión en ambos canales. Si bien los experimentos de espectroscopía indicaban que la sonda presentaba una emisión a longitudes de onda desplazadas hacia el rojo fue muy probable que existiera una longitud de onda de excitación en la cual se favoreciera la emisión en ambos canales, además de que un análisis en diferentes disolventes no se asemeja al microambiente celular en el cual la sonda presentó esa respuesta.

De acuerdo con el espectro UV-Vis obtenido en H<sub>2</sub>O se planteó la idea de que **AzF4** formaba agregados en medio acuoso, sin embargo, fue hasta los experimentos realizados *in vivo* que esta hipótesis se reforzó debido a la separación de señal observada, mientras que el interior del saco vitelino se observó con emisión verde con un marcaje claro de gotas lipídicas, la emisión en canal rojo se identificó con mayor intensidad en zonas de la superficie del saco vitelino y la cavidad visceral, así como zonas con mayor hidratación del pez.

Se realizaron experimentos adicionales para verificar la hipótesis de formación de agregados, de manera particular el efecto de la agregación molecular a través de una variación continua THF:H<sub>2</sub>O fue determinante para proponer un nuevo mecanismo de respuesta de las LDs basado en la partición del monómero y la autoasociación de la sonda molecular (Figura 4.35 arriba), para este estudio se empleó una longitud de excitación menor (410 nm) con la cual se pudo observar una emisión inicial alrededor de 460 nm que disminuyó de intensidad al aumentar la cantidad de agua en el medio y a su vez se observó la formación de una nueva banda alrededor de 670 nm. De esta manera se corroboró

que el efecto de la hidratación del medio está relacionado con la respuesta dual que se observó en los estudios de microscopía. De igual manera se realizó un análisis de esta variación por medio de dispersión dinámica de la luz, con el fin de caracterizar la distribución del tamaño de partícula.

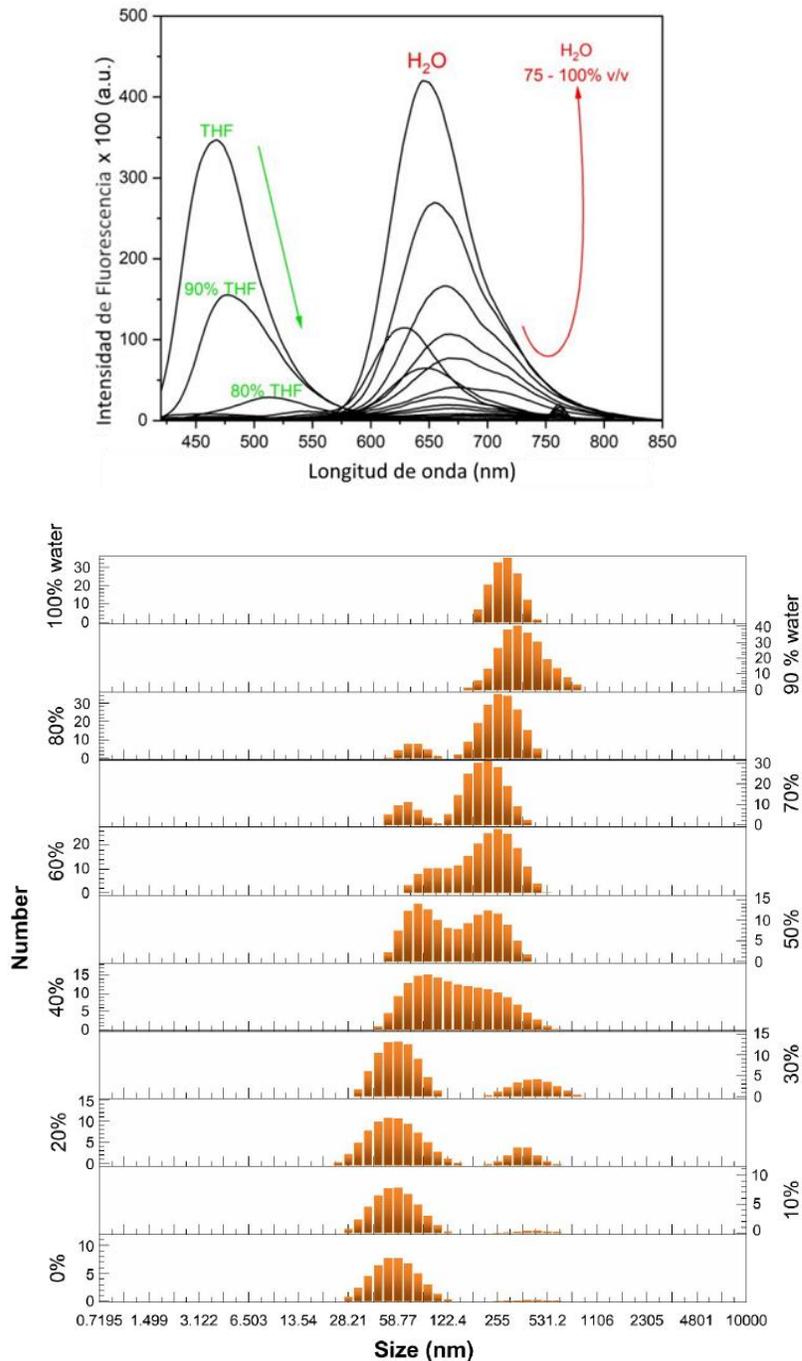


Figura 4.35 Arriba: espectros de emisión de 30  $\mu\text{M}$  de **AzF4** en una variación continua del sistema binario THF:H<sub>2</sub>O. Abajo: perfiles de dispersión dinámica de la luz (DLS) obtenidos en el mismo sistema binario y concentración de **AzF4**, los datos están representados como tamaño (nm) vs número.

Los resultados obtenidos en la variación seguida mediante DLS mostraron una distribución heterogénea de partículas con tamaños que van desde 40 nm a altas concentraciones de THF a 180 nm a alto contenido de agua en el medio (Figura 4.35 abajo). Este resultado indica que, aunque se pueden formar diferentes morfologías tras el aumento de agua en el medio, los tamaños más grandes de estos se ven favorecidos cuando se promueve la agregación del fluoróforo, lo cual concuerda con el aumento de emisión a una longitud de onda mayor en un medio con mayor cantidad de agua.

Además, al usar el sistema *n*-octanol:H<sub>2</sub>O también se corroboró el surgimiento de las propiedades de monómero frente a agregación. La absorción desplazada hacia el rojo con un ancho de banda similar y un aumento en la relación de banda de 0-0/0-1 en comparación con el monómero son características representativas de los agregados *J*. Esta molécula muestra una tendencia de relación aumentada de las bandas 0-0/0-1 al incrementar la cantidad de H<sub>2</sub>O frente a la de *n*-octanol v/v. Este sistema se probó con concentraciones de **AzF4** de 0.01 a 0.2 M, que permitió la expansión del sistema desde el monómero hasta formación de agregados (Figura 4.36).

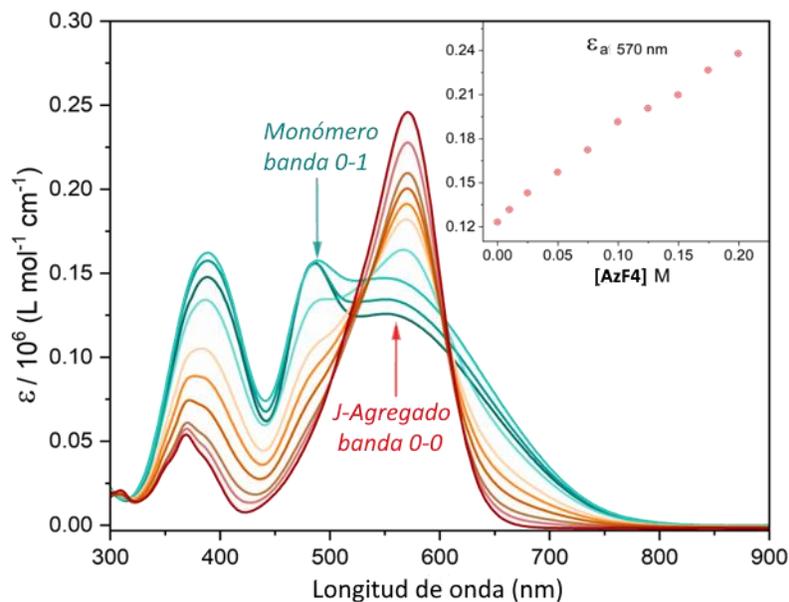


Figura 4.36 Espectros de absorción UV-Vis del aumento de la concentración de **AzF4** de 0.01 a 0.2 M en *n*-octanol:H<sub>2</sub>O (60:40 v/v), destacando el monómero (banda 0-1) frente a la agregación (banda 0-0).

Los estudios realizados en variaciones continuas de este sistema binario representan un medio más realista en términos de interacción lípido-fluoróforo, por lo que se pudieron reproducir con éxito las señales de emisión verde monomérica y de emisión roja de autoasociación (Figura 4.37)

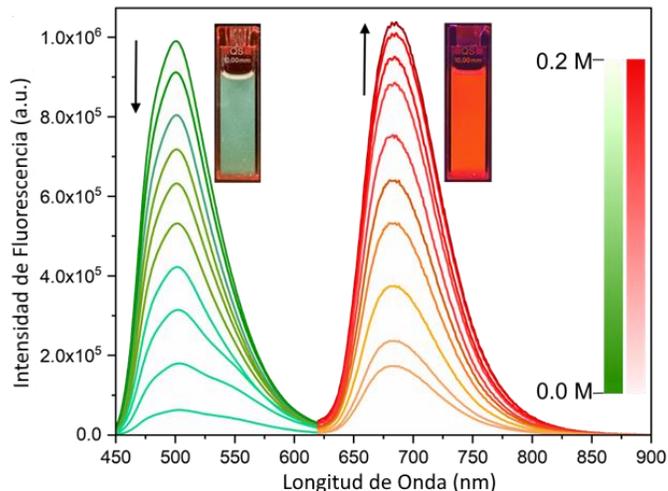


Figura 4.37 Espectros de fluorescencia correspondientes a los canales verde ( $\lambda_{exc}= 450 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{em}= 500 \text{ nm}$ ) y rojo ( $\lambda_{exc}= 620 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{em}= 680 \text{ nm}$ ). Los recuadros indican el intervalo de concentraciones alcanzadas.

El tratamiento de los datos obtenidos dio como origen el planteamiento de un mecanismo similar al mecanismo Nernstiano ampliamente conocido que se emplea para las sondas mitocondriales, donde el potencial de membrana impulsa el direccionamiento mitocondrial mediante interacciones puramente electrostáticas. De esta manera se destaca que la distribución de equilibrio entre dos fases líquidas inmiscibles (ley de distribución de Nernst)<sup>95</sup>, como las presentes en los compartimentos citosólico y LD, podrían ser la fuerza motriz para acumular la sonda molecular en los LD a través de un escenario de partición de monómero (fase lipofílica) y autoasociado (fase acuosa).

El coeficiente de partición de Nernst en LD se define entonces como la constante de equilibrio para la distribución de especies entre la fase de LD y la fase citosólica circundante. Se hizo uso del formalismo de K. A. Connors<sup>96</sup> con el fin de demostrar la partición de la autoasociación, el cual se detalla a continuación:

Supongamos que un sustrato S se asocia para formar agregados  $S_m$  en la fase 1 (fase acuosa). La fase 2 es la sonda o la fase lipídica donde solo se reparten las especies monoméricas, con coeficiente de partición  $P_0= [S]_2/ [S]_1$ , para el equilibrio general:

$$S_1 + S_1 + \dots = S_m \tag{1}$$

Con:

$$\beta_m = \frac{[S_m]_1}{[S_m]_1^m} \quad (2)$$

donde  $S_1, S_2, \dots, S_m$  se refieren a las especies monoméricas, diméricas y m-éricas agregadas en la fase acuosa,  $\beta_1, \beta_2$  y  $\beta_m$  son sus respectivas constantes de asociación. Entonces, K. A. Connors propuso el siguiente esquema general para relacionar el coeficiente de partición observado para un sustrato S entre una fase orgánica donde solo está presente el monómero y la fase acuosa en la que ocurre la asociación:

$$\frac{P_0}{P} = 1 + \frac{2\beta_2[S]_2}{P_0} + \frac{3\beta_3[S]_2^2}{P_0^2} + \dots + \frac{m\beta_m[S]_2^{m-1}}{P_0^{m-1}} \quad (3)$$

donde  $P$  y  $P_0$  son los coeficientes de partición observados e intrínsecos [ $P = (\text{conc. ac.}) / (\text{conc. org.})$ ], respectivamente. La forma más simple de autoasociación es la formación de dímeros en la fase acuosa,  $m = 2$ , entonces la ecuación (3) produce:

$$\frac{P_0}{P} = 1 + \frac{2\beta_2[S]_2}{P_0} \quad (4)$$

donde  $\beta_2$  es la constante de partición de la dimerización.

Si no solo está presente el dímero, es necesario incorporar el modelo isodésmico (asociación por pasos)<sup>97</sup>. Entonces, se supone que este modelo ocurre a través de equilibrios escalonados:



y por lo tanto:

$$\beta_i = \frac{c_i}{(c_{i-1})(c_1)} \quad (6)$$

donde  $i=2$  para  $m$ , mientras que  $A_1, A_2$  y  $A_m$  indican el monómero, dímero y m-mero, respectivamente,  $c_1, c_2, c_m$ , representan las concentraciones de equilibrio correspondientes. Suponiendo que las constantes de asociación parcial son iguales, es decir,  $\beta_2 = \beta_3 = \beta_m = K$ , por lo tanto, la expresión de equilibrio en términos de los datos del coeficiente de partición es de la forma general:

$$P = \frac{[S]_2}{([S] + 2K[S]^2 + 3K^2[S]^3 + \dots + mK^{m-1}[S]^m)_{aq}} \quad (7)$$

Sustituyendo la definición del coeficiente de partición intrínseco (es decir,  $P_0 = [S]_2 / [S]_1$ ) en la ecuación (7) se tiene que:

$$\frac{P_0}{P} = (1 + 2K[S] + 3K^2[S]^2 + \dots + mK^{m-1}[S]^{m-1})_{aq} \quad (8)$$

o:

$$\frac{P_0}{P} = \frac{d}{dK[S]} (1 + (K[S]) + (K[S])^2 + \dots + (K[S])^{m-1})_{aq} \quad (9)$$

En el cual la dimerización es el caso especial más simple y probable, para este caso  $m = 2$  y entonces:

$$\frac{P_0}{P} = (1 + 2K_2[S])_{aq} \quad (10)$$

Desde  $P_0 = [S]_2 / [S]_1$ :

$$\frac{P_0}{P} = 1 + \frac{2K_2[S]_2}{P_0} \quad (11)$$

Entonces, aplicando la regla de la serie geométrica suponiendo que no hay restricción en el tamaño de las especies asociadas y considerando que  $K[S] < 1$ , la ecuación (9) se convierte en:

$$\frac{P_0}{P} = \frac{1}{(1 - K[S])_{aq}^2} \quad (12)$$

Finalmente, como la concentración de monómero en la fase orgánica es medible, la ecuación (10) produce:

$$\left(\frac{P}{P_0}\right)^{0.5} = 1 - \frac{K[S]_2}{P_0} \quad (13)$$

Por lo tanto, la relación del coeficiente de partición respectiva ( $P/P_0$ ) frente a la variación continua de la concentración de fluoróforo tendría un comportamiento lineal para asociaciones mayores de 2, es decir, trímeros a m-meros.

La variación de la concentración de **AzF4** en *n*-octanol se traduce en un aumento en la emisión de fluorescencia roja con una disminución simultánea de la emisión verde en proporciones más grandes de agua, destacando la formación de agregados moleculares. A mayor contenido de fosfolípidos

predomina la emisión en canal verde, la cual es asignada a especies monoméricas, lo cual confirmó lo que también fue observado en el sistema binario THF:H<sub>2</sub>O.

El perfil de fluorescencia obtenido se ajusta al esquema de respuesta de autoasociación mencionado previamente, esto representa una nueva herramienta para la microscopía de imágenes *in vitro* e *in vivo*, ya que la respuesta dual de **AzF4** funciona de manera selectiva en la interfase líquido-líquido distintiva de los ambientes LDs-citosol. Debido a esto se buscó determinar el coeficiente de partición observado (P) empleando el método estándar octanol: H<sub>2</sub>O a diferentes concentraciones (Figura 4.38 izquierda), los valores de P disminuyeron con el aumento de la concentración del fluoróforo en la fase orgánica. El coeficiente de partición intrínseco (P<sub>0</sub>) se determinó a partir de la intersección calculada a una concentración cero de **AzF4**, este valor fue de  $3.36 \pm 0.02$  (n=10).

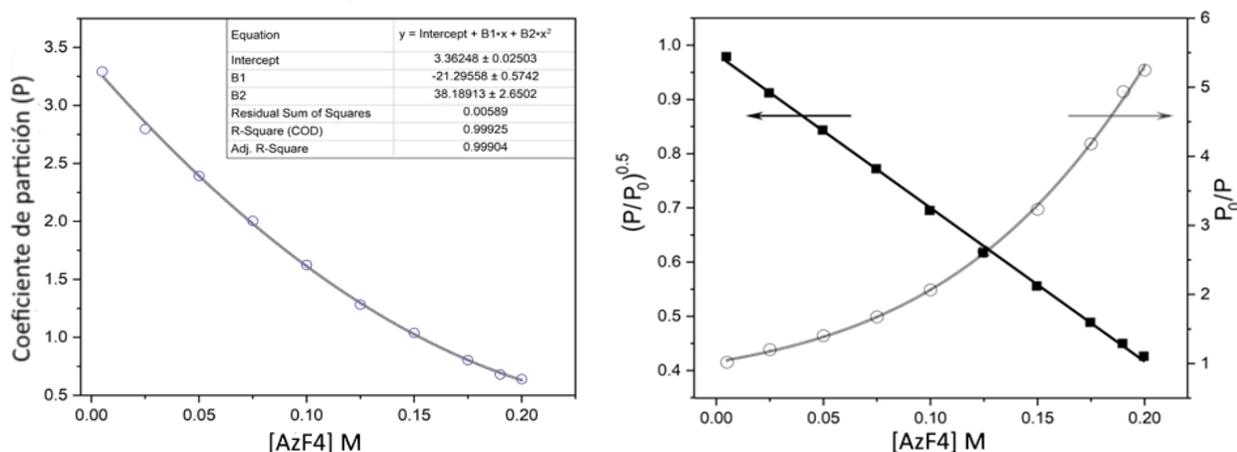


Figura 4.38. Izquierda: Estimación de los coeficientes de partición (P) al variar las concentraciones (0 a 0.2 M) de **AzF4** en *n*-octanol. Derecha: Relación entre los valores calculados para la concentración monomérica de **AzF4** en *n*-octanol frente a  $P_0/P$  (símbolos huecos) y  $(P/P_0)^{0.5}$  (símbolos rellenos).

Los datos del coeficiente de partición de Nernst se trataron de acuerdo con la ecuación lineal 4 y el perfil se graficó como el incremento de concentración de **AzF4** en la fase orgánica *n*-octanol vs ( $P_0/P$ ) (Figura 4.38 derecha, símbolos huecos), este formalismo restringe a la autoasociación a un modelo de dímero en el cual se esperaba una tendencia lineal, al observarse un tendencia no lineal se concluyó que este modelo no era el adecuado.

Por los resultados anteriores, se determinó la autoasociación empleando el modelo isodésmico, considerando asociaciones paso a paso se usó la ecuación 13, se obtuvo una relación lineal (Figura 4.38 derecha, símbolos rellenos) con  $R^2=0.998$  entre las concentraciones de **AzF4** vs  $(P/P_0)^{0.5}$ , con

pendiente de  $-3.12 \text{ M}^{-1}$  y una constante de asociación de  $10.5 \text{ M}^{-1}$ , lo cual concuerda con algunos agregados moleculares orgánicos previamente reportados<sup>98,99</sup>. La obtención de una tendencia lineal indica que el modelo de asociación isodésmico es adecuado para describir las características de partición de **AzF4** entre dos fases inmiscibles ( $\text{H}_2\text{O}$  y *n*-octanol).

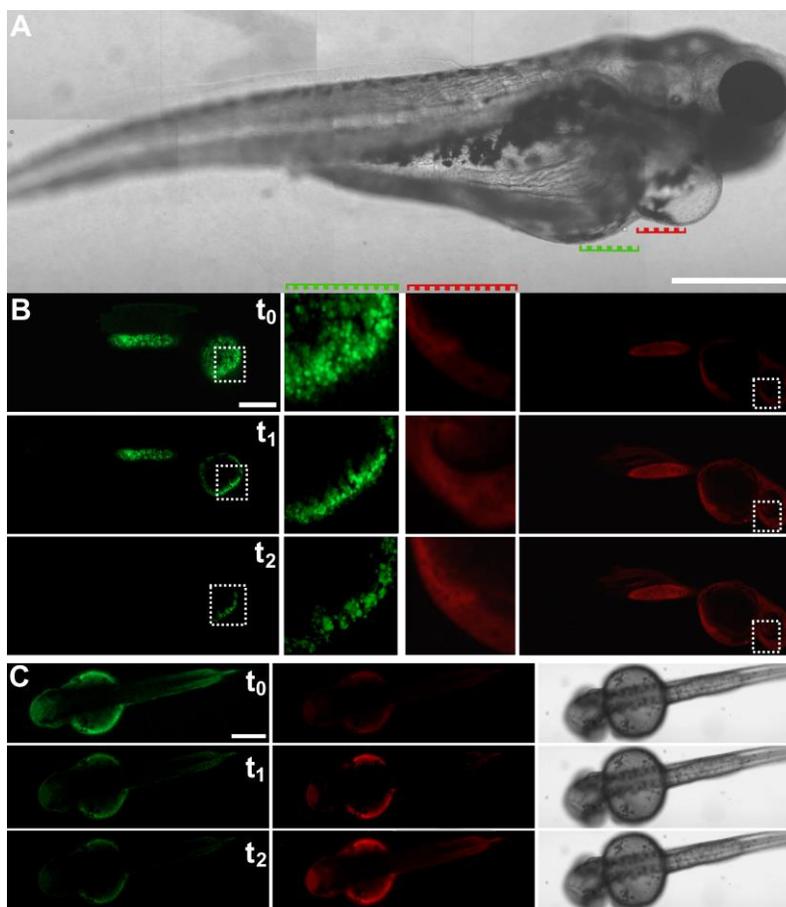


Figura 4.39 Imágenes confocales de embrión de pez cebra de 72 hpf que desarrollan edema pericárdico y del saco vitelino en medio salino (10% NaCl) monitoreados con  $10 \mu\text{M}$  de **AzF4** bajo los canales verde, rojo y (A) campo claro tras 45 min de incubación. (B) Vistas laterales y (C) dorsales, para observar el efecto de la partición Nernstiano de doble canal se tomaron imágenes a diferentes tiempos tras la incubación:  $t_0 = 45 \text{ min}$ ,  $t_1 = 80 \text{ min}$  y  $t_2 = 100 \text{ min}$  después de la incubación. Las barras de escala representan  $200 \mu\text{m}$ .

Una vez analizado y propuesto el mecanismo de funcionamiento de la sonda **AzF4** se aprovecharon algunos resultados que previamente se obtuvieron en los experimentos *in vivo*. Al saber que la

formación de edemas pericárdicos puede relacionarse a una posible falla en la barrera de agua entrante del pez, se procedió a probar la sonda en el monitoreo de este desequilibrio osmótico.

Se modificó el gradiente osmótico entre el agua exterior e interior del embrión en desarrollo, para ello se aumentó el porcentaje de salinidad del medio, empleando un contenido de 5 al 10% de NaCl para promover la entrada de agua al pez. Tras la exposición a ese gradiente osmótico presentó la formación de edema pericárdico y del saco vitelino debido a la falla de la barrera de agua entrante<sup>100</sup>.

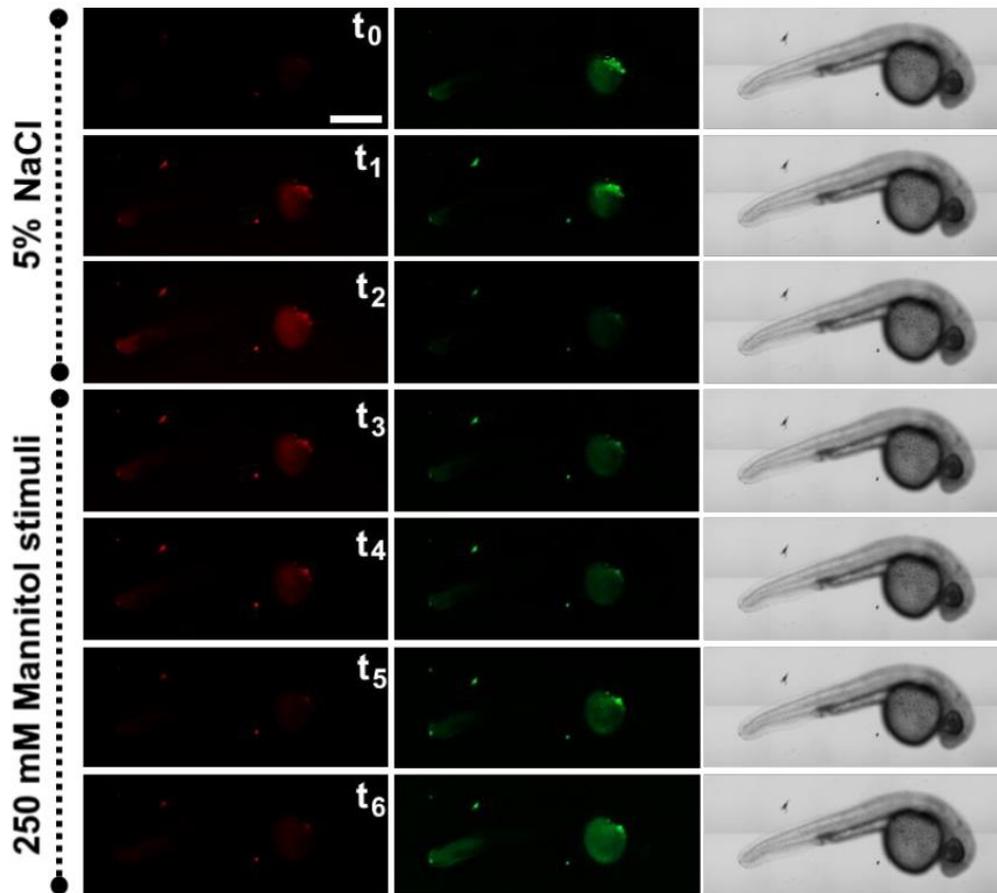


Figura 4.40 Imágenes confocales de embrión de pez cebra de 48 hpf que desarrollan edema pericárdico en medio salino (5% NaCl) monitoreados con  $10 \mu\text{M}$  de **AzF4** bajo los canales verde, rojo y campo claro. Vistas laterales para los tiempos:  $t_0=45 \text{ min}$ ,  $t_1=80 \text{ min}$  y  $t_2=120 \text{ min}$ , luego para estímulos con manitol 250 mM en tiempos:  $t_3=150 \text{ min}$ ,  $t_4=180 \text{ min}$ ,  $t_5=210 \text{ min}$  y  $t_6=240 \text{ min}$ .

El monitoreo en microscopía se realizó en distintos tiempos y se observaron diferencias interesantes, el canal verde mostró una disminución de emisión significativa mientras que de manera simultánea la emisión en canal rojo exhibió un incremento sutil (Figura 4.39), esto muestra en primer instancia

una fuerte dinámica de hidratación entre el edema pericárdico y del saco vitelino, así como evidencia adicional sobre el mecanismo de partición propuesto que opera la distribución de localización y la respuesta óptica de **AzF4**.

Finalmente se evaluó la reversibilidad de la respuesta de la sonda observando el efecto de la concentración de 5% NaCl en el desarrollo del pez cebra, se mantuvo el estímulo continuo de NaCl y 250 mM de manitol. En la Figura 4.40 se observa la misma respuesta tras una exposición continua de 5% de NaCl, una disminución de la emisión en canal verde y un ligero aumento en el canal rojo, posteriormente la incorporación de manitol al medio promueve una recuperación de la emisión inicial, estos resultados indican que con **AzF4** se puede monitorear de manera eficiente el proceso de osmorregulación.

## 5. AzF2 y AzF3 como sondas fluorescentes

De manera simultánea se llevaron a cabo estudios adicionales con las moléculas **AzF2** y **AzF3**. Se trabajaron ambas moléculas a la par debido a que se localizaron en la red mitocondrial y por la pequeña diferencia estructural que ambas presentan entre sí para realizar de este modo un análisis comparativo entre las propiedades de ambas moléculas. Además, se llevaron a cabo estudios de imagenología de ambos compuestos en levadura con el fin de conocer su localización, al igual que su respuesta tras diversos estímulos.

### 5.1 Estudios de caracterización y microscopía complementarios

Se obtuvieron también espectros 2D de RMN de los dos compuestos, los cuales se encuentran en el apéndice (Figuras A17-A20). Se determinaron los tiempos de decaimiento de fluorescencia en DMSO, los cuales tienen valores de  $0.57227 \pm 0.00017$  ns y  $2.880 \pm 0.046$  ns, para **AzF2** y **AzF3** respectivamente.

Debido a la emisión dual que **AzF3** presentó en dos diferentes estructuras celulares se realizó una titulación ácido-base para conocer el efecto del pH del medio y determinar también el  $pK_a$  de la molécula, ya que su hidrólisis podía estar relacionada con la respuesta observada en microscopía.

Se realizó un incremento gradual del pH del medio y los espectros de fluorescencia fueron obtenidos empleando una longitud de excitación de 400 nm. El aumento de pH promovió un incremento de la

emisión en la banda de 500 nm, mientras que la emisión en 720 nm se extinguió. El perfil de emisión obtenido a 500 nm muestra el aumento de intensidad y se observan dos puntos de inflexión, que tras los cálculos y ajuste realizado se obtuvieron dos  $pK_a$ ,  $pK_{a1}=7.31$  y  $pK_{a2}=3.40$ .

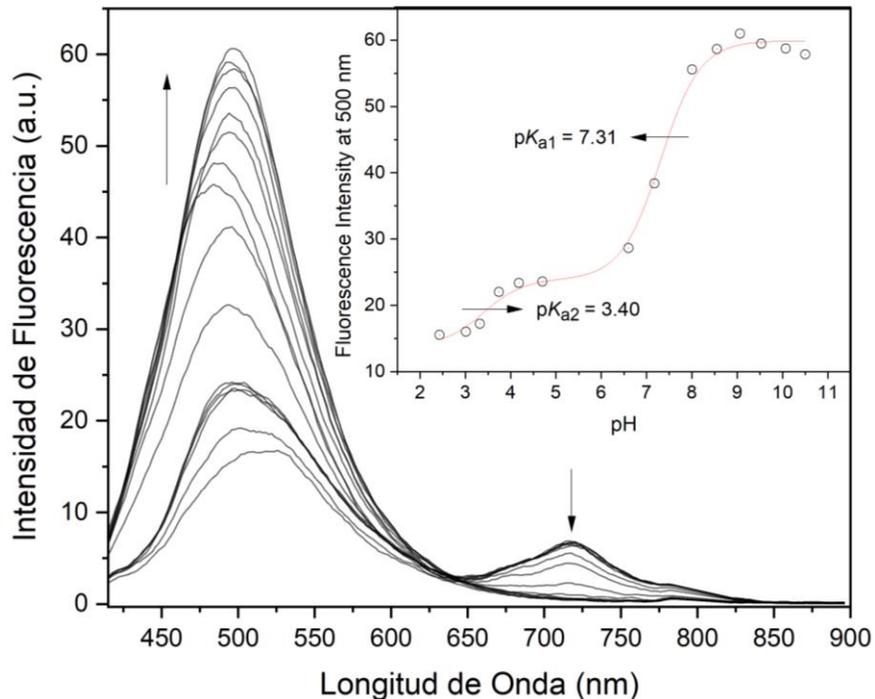


Figura 4.41 Espectros de emisión de la titulación ácido-base de **AzF3** 3 mM empleando  $\lambda_{exc}=400$  nm, las flechas indican el aumento y disminución de las bandas y en el recuadro se muestra la emisión obtenida a 500 nm, así como el ajuste realizado y los valores de  $pK_a$  obtenidos.

El incremento drástico observado en la banda de emisión a 500 nm a pH mayor a 5 es un indicador de que la hidrólisis del grupo éster juega un papel importante en la observación de señal en el canal verde, ya que posterior a la hidrólisis la molécula adquiere un carácter más lipofílico por la neutralización de la carga positiva inicial de la molécula y esto es lo que resulta en una localización en estructuras más lipofílicas como las gotas lipídicas. Si bien la localización puede estar dirigida debido a este cambio de lipofilidad de la molécula, esta hidrólisis también debe estar relacionada con la interrupción de la conjugación  $\pi$  de la molécula, lo cual daría origen a una emisión a menor longitud de onda.

Debido a esta observación se realizó otro monitoreo en donde se empleó el fosfolípido DOPC para crear emulsiones con agua y modificar la lipofilidad del medio, previo a las variaciones continuas se

preparó una disolución de **AzF3** en amortiguador MOPS a pH 7.5 para promover así la hidrólisis del éster y mantener un valor cercano al pH intracelular, el cual se encuentra reportado para la mayoría de las células con valores entre 6.8 y 7.2<sup>101</sup>. Se realizaron adiciones continuas de DOPC (0-1.7 mM) en el medio inicialmente acuoso en donde se observó que las primeras adiciones provocaron un incremento de ambas bandas de emisión (Figura 4.42), lo cual puede atribuirse a efectos de solubilidad, sin embargo, la banda en 500 nm siguió aumentando a mayor cantidad de fase lipídica en el medio, mientras que la banda a 720 nm permaneció constante a concentraciones de DOPC mayores a 0.3 mM. Estos resultados indican que la especie obtenida a pH 7.5 favorece su emisión en canal verde y en un medio más lipofílico, lo cual corrobora que la hidrólisis juega un papel importante en la localización dentro de la célula y, por lo tanto, el marcaje dual de esta molécula.

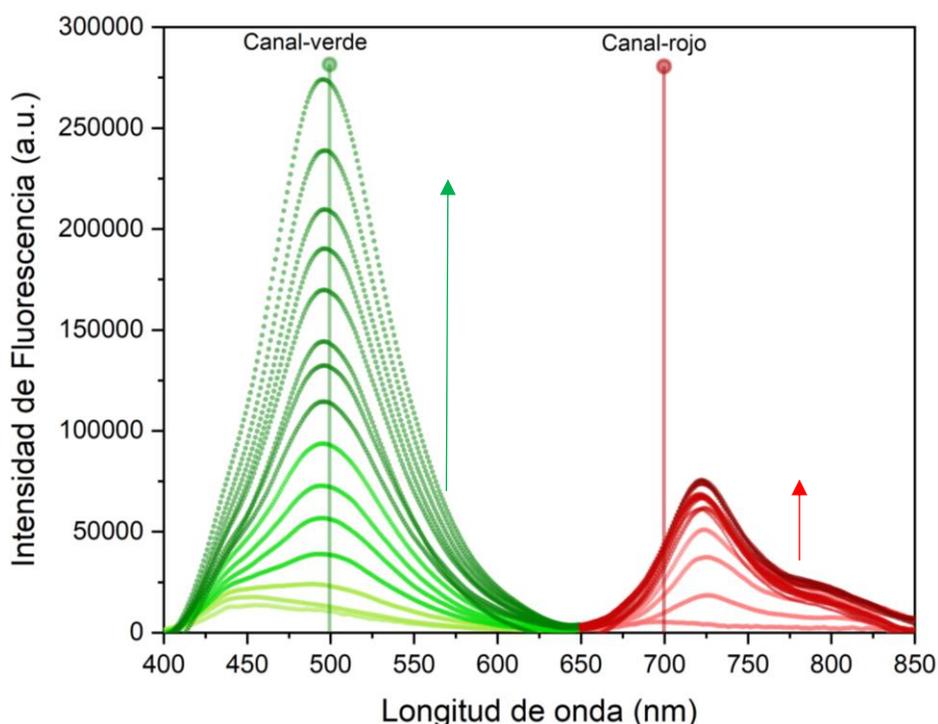


Figura 4.42 Emisión de **AzF3** 7  $\mu$ M a pH 7.5 en una variación continua de DOPC en medio acuoso (de 0 a 1.7 mM), los espectros fueron tomados empleando una longitud de excitación de 380 nm. Se indican las longitudes de onda de detección de los canales verde y rojo.

Además, se realizaron experimentos adicionales de microscopía *in vitro* en donde se emplearon diferentes estímulos para corroborar el efecto de la inclusión del grupo éster en la localización, principalmente para saber si se observa una retención mitocondrial del fluoróforo, que fue la razón

principal para incluirlo en la estructura de la molécula. La Figura 4.43 muestra el marcaje inicial que mostró **AzF3** tras una incubación de 5 minutos en el cultivo celular, estos resultados concuerdan con lo observado en los estudios preliminares realizados, distinguiéndose la red mitocondrial característica en canal rojo, además la imagen obtenida de la fusión de la emisión de ambos canales indica que no existe una correlación entre las dos emisiones de la sonda.

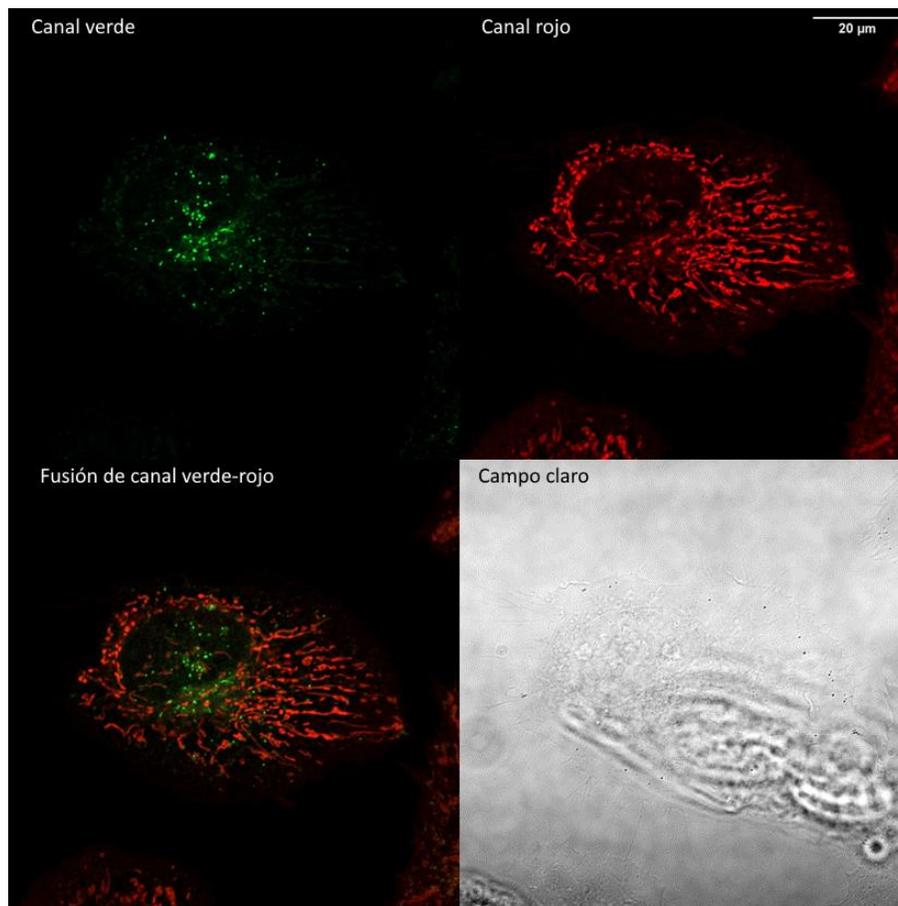


Figura 4.43 Imágenes confocales en canal verde, rojo y campo claro de cultivo celular U-251 incubado con  $0.1 \mu\text{M}$  de **AzF3**, se muestra también la fusión del canal verde y rojo. La barra de escala representa  $20 \mu\text{m}$ .

Posteriormente se realizó la adición de una esterasa para promover la hidrólisis del grupo éster y tras 5 minutos de reposo se adicionó CCCP (cianuro de carbonilo m-clorofenilhidrazona) al cultivo celular, que es un compuesto inductor de la mitofagia, este provoca un gran aumento en la conductancia de protones de la membrana y en consecuencia se obtiene una reducción severa del potencial de membrana mitocondrial<sup>102,103</sup>. Como se muestra en la Figura 4.44, la emisión en ambos canales se conservó, aunque la intensidad de fluorescencia se vio disminuida es importante destacar que la

localización en redes mitocondriales observada en canal rojo se conservó, esto en principio comprueba el mecanismo de retención mitocondrial planteado desde el diseño de esta molécula. Por lo tanto, la carga positiva inicial de **AzF3** dirige la sonda a la mitocondria, pero la hidrólisis del grupo éster promueve la neutralización de la carga positiva de la molécula, haciendo que tras un estímulo despolarizante el fluoróforo no presente una respuesta significativa y se siga localizando en estas estructuras celulares.

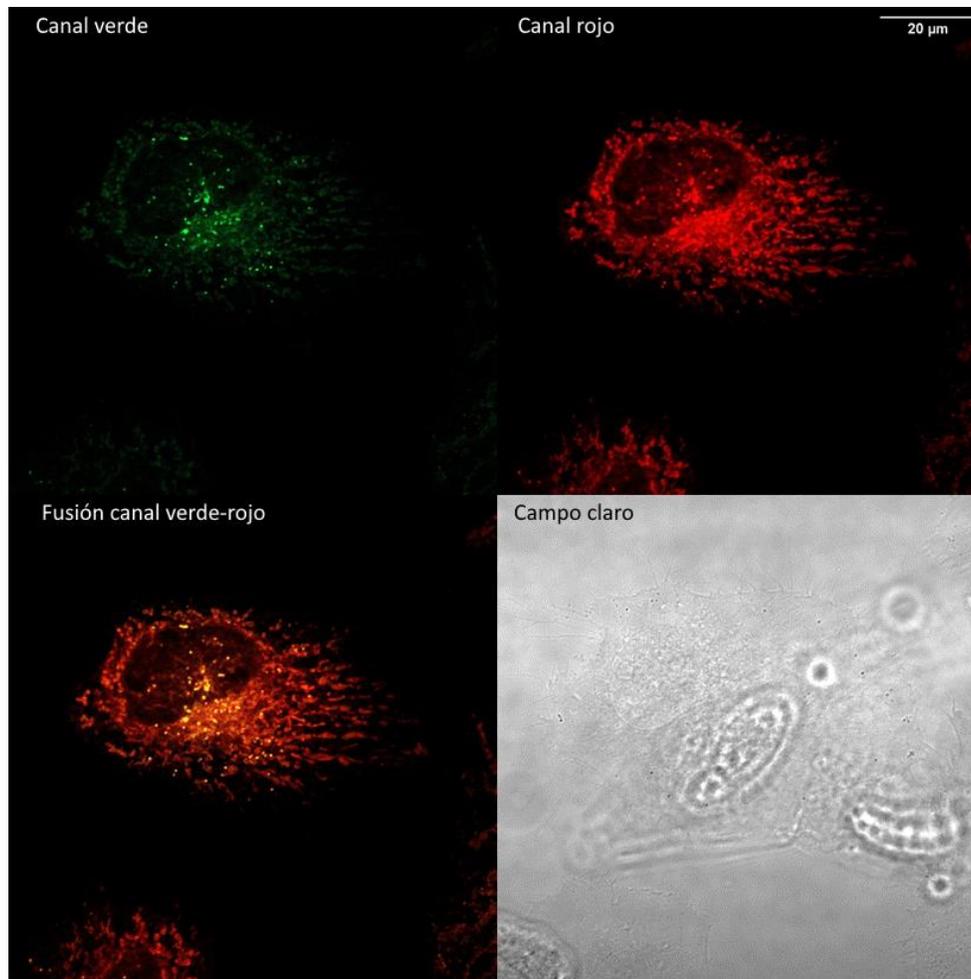


Figura 4.44 Imágenes confocales en canal verde, rojo y campo claro de cultivo celular U-251 incubado con  $0.1 \mu\text{M}$  de **AzF3**, tras la adición de esterasas y CCCP, se muestra la fusión del canal verde y rojo. La barra de escala representa  $20 \mu\text{m}$ .

Aunque se sigue observando una emisión en canal verde en estructuras esféricas, la imagen de la superposición de ambos canales muestra que parte de la emisión roja colocaliza con la emisión verde, lo cual pudo haber sido provocado por el fluoróforo aun catiónico que salió de la red mitocondrial o

por el propio proceso de mitofagia que se promovió con CCCP, ya que tras 5 minutos de exposición se observó la apoptosis de las células. Contrario a lo que sucedió con **AzF3**, la adición de CCCP al medio de cultivo incubado con **AzF2** provocó salida de todo el fluoróforo de las mitocondrias tras su despolarización, lo cual se muestra a detalle en los experimentos realizados con levaduras.

## 5.2 Experimentos con levaduras

Debido a la localización mitocondrial que ambas moléculas presentaron se realizaron algunos experimentos para observar su respuesta en otro modelo biológico *in vitro* como lo son las levaduras y su posible aplicación para la determinación de potencial de membrana plasmática. Estas moléculas son candidatas potenciales para la estimación de este parámetro ya se emplean moléculas catiónicas debido a que las levaduras poseen una bomba en la membrana plasmática que transporta protones hacia el exterior y genera una diferencia de potencial de membrana eléctrica con interior negativo<sup>104</sup>.

Las condiciones experimentales se realizaron siguiendo los métodos reportados por Peña A. y colaboradores<sup>105</sup>, como primera parte se realizó un seguimiento de la señal de emisión del experimento respecto al tiempo, para lo cual se hicieron diferentes adiciones con el fin de observar si estos compuestos presentaban un respuesta similar al fluoróforo derivado de cianina DiSC<sub>3</sub>(5) que es uno de los más utilizados para la determinación del potencial de membrana plasmática<sup>106</sup>.

La Figura 4.45 muestra los cambios de la emisión en cada experimento, se realizaron dos monitoreos con cada molécula ya que se emplearon 2 cepas diferentes de *Saccharomyces cerevisiae*, W303 y levadura comercial “la azteca”. Desde el tiempo cero se monitoreó la emisión del amortiguador para unos segundos después agregar 100  $\mu$ L de la suspensión de levadura al 50% v/v (1), en la cual se observó un pequeño aumento de emisión, una vez que la señal se observó constante se agregó el fluoróforo (2) [2  $\mu$ M], observándose en cada muestra un incremento en la emisión. Posteriormente se agregó CCCP (3) para despolarizar la membrana mitocondrial y promover la liberación de los fluoróforos al citoplasma y observar así un aumento de fluorescencia, este efecto se vio de manera significativa en el fluoróforo **AzF2** que se dirige a mitocondria exclusivamente por la carga catiónica, mientras que en **AzF3** se observó un efecto menor (levadura comercial) o casi nulo (W303), lo cual se atribuye a la hidrólisis del grupo éster y una retención mitocondrial del fluoróforo por la neutralización de su carga positiva. Finalmente, la adición de K<sup>+</sup> (4), dado que el ion debe ser absorbido a través de

un transporte impulsado por la diferencia de potencial de membrana que lo neutraliza parcialmente, produce una disminución de la fluorescencia, que se observa más marcada para **AzF2** con levadura comercial, esta pérdida de emisión fue más lenta para los experimentos realizados con **AzF3**, lo cual puede atribuirse a la retención del fluoróforo dentro de las células.

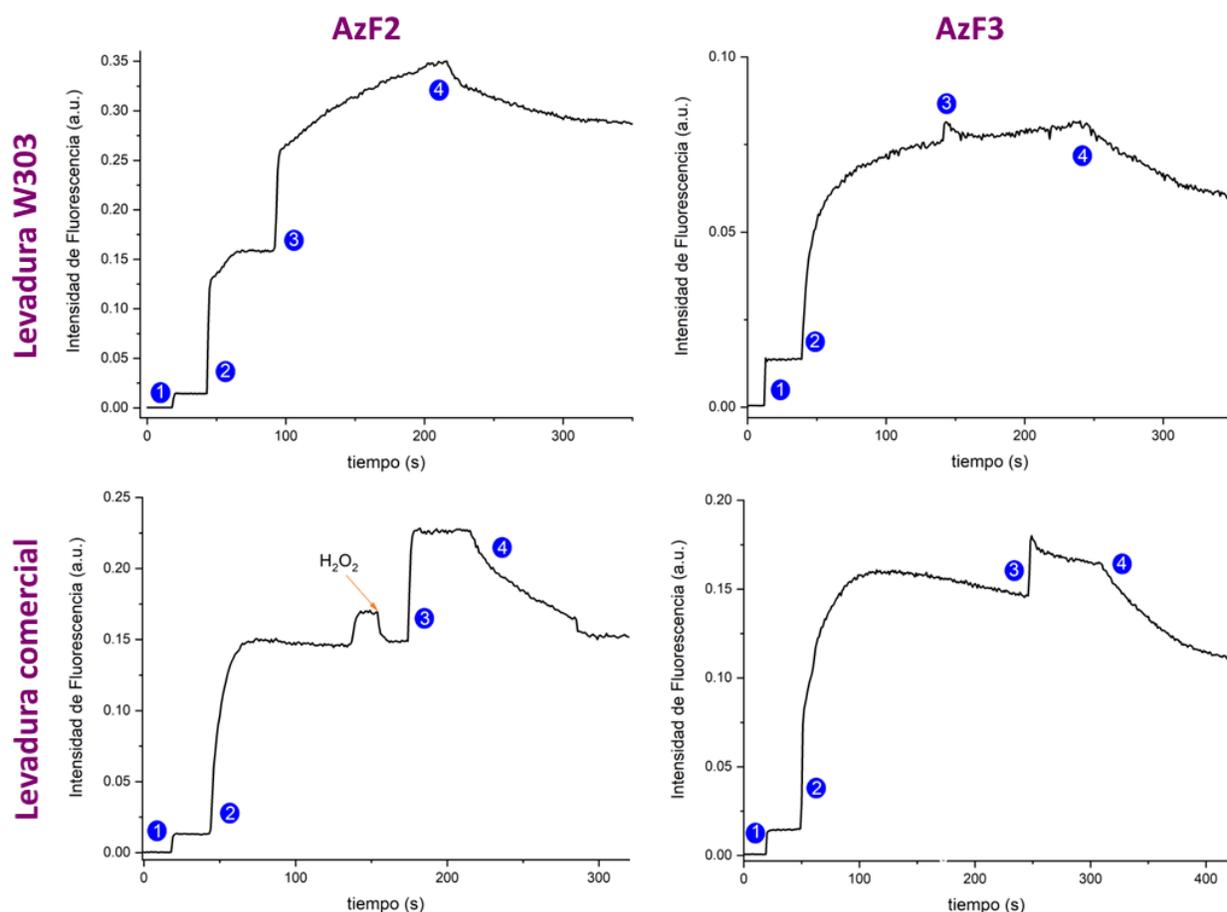


Figura 4.45 Cambios de intensidad de fluorescencia tras la adición de distintos compuestos (indicados con números) en un stock de amortiguador MES-TEA 0.1M, 2  $\mu$ L BaCl<sub>2</sub> 10 mM y 40  $\mu$ L glucosa 1M a pH 6. 1) Adición de levadura (100  $\mu$ L 50% v/v). 2) Adición de fluoróforo [2  $\mu$ M]. 3) Adición de CCCP (5  $\mu$ L 5 mM). 4) Adición de KCl (20  $\mu$ L 2 M). Los monitoreos se realizaron empleando  $\lambda_{exc}=620$  nm,  $\lambda_{em}= 715$  nm para **AzF2** y  $\lambda_{exc}=610$  nm,  $\lambda_{em}= 710$  nm para **AzF3**.

Adicionalmente, debido a que la levadura comercial presenta una respiración celular más rápida que la cepa W303 y por lo tanto el oxígeno del medio se consume con mayor rapidez, se realiza la adición de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (5  $\mu$ L disolución acuosa al 3%) cuando se observa un aumento de la emisión tras la estabilización de la señal después de añadir el fluoróforo. Esto solo fue necesario para el experimento realizado con **AzF2**, lo cual se atribuye a que al agotarse el oxígeno el potencial de membrana

mitocondrial disminuye y el fluoróforo comienza a difundirse al citoplasma<sup>104</sup>, por lo cual se observa un aumento en la señal de emisión, que tras la adición de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> vuelve a disminuir y se mantiene en una emisión similar a la previamente observada. En **AzF3** no se observa este aumento de emisión, lo cual puede estar vinculado al mecanismo de retención mitocondrial.

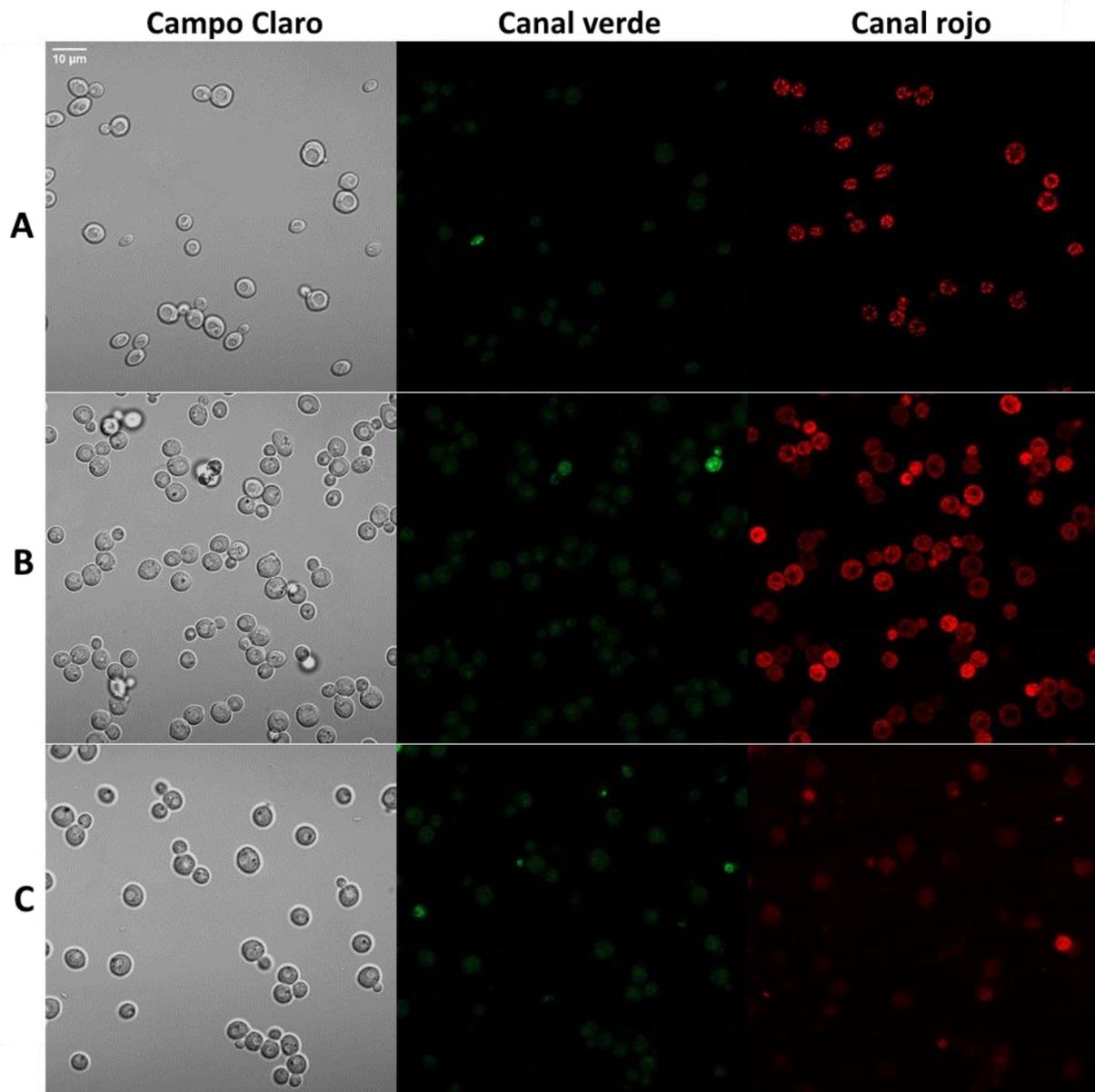


Figura 4.46 Imágenes confocales en canal verde, rojo y campo claro de levadura “azteca”, A: incubada con **AzF2** [2μM], B: tras la adición de CCCP y C: después de la adición de K<sup>+</sup>. La barra de escala representa 10 μm.

Para comprender de mejor manera lo que sucedía en las levaduras se realizaron las mismas adiciones y se obtuvieron imágenes tras cada una, solo se presentan las imágenes obtenidas con la levadura “azteca”. La Figura 4.46 muestra los resultados obtenidos para los experimentos con el fluoróforo

**AzF2**, en los cuales es importante destacar que a diferencia de lo observado en el cultivo celular de mamífero en este modelo solo existe emisión intensa en el canal rojo, lo mismo ocurre con **AzF3** (Figura 4.47), aunque en esta última la emisión en canal verde se observa un poco más intensa.

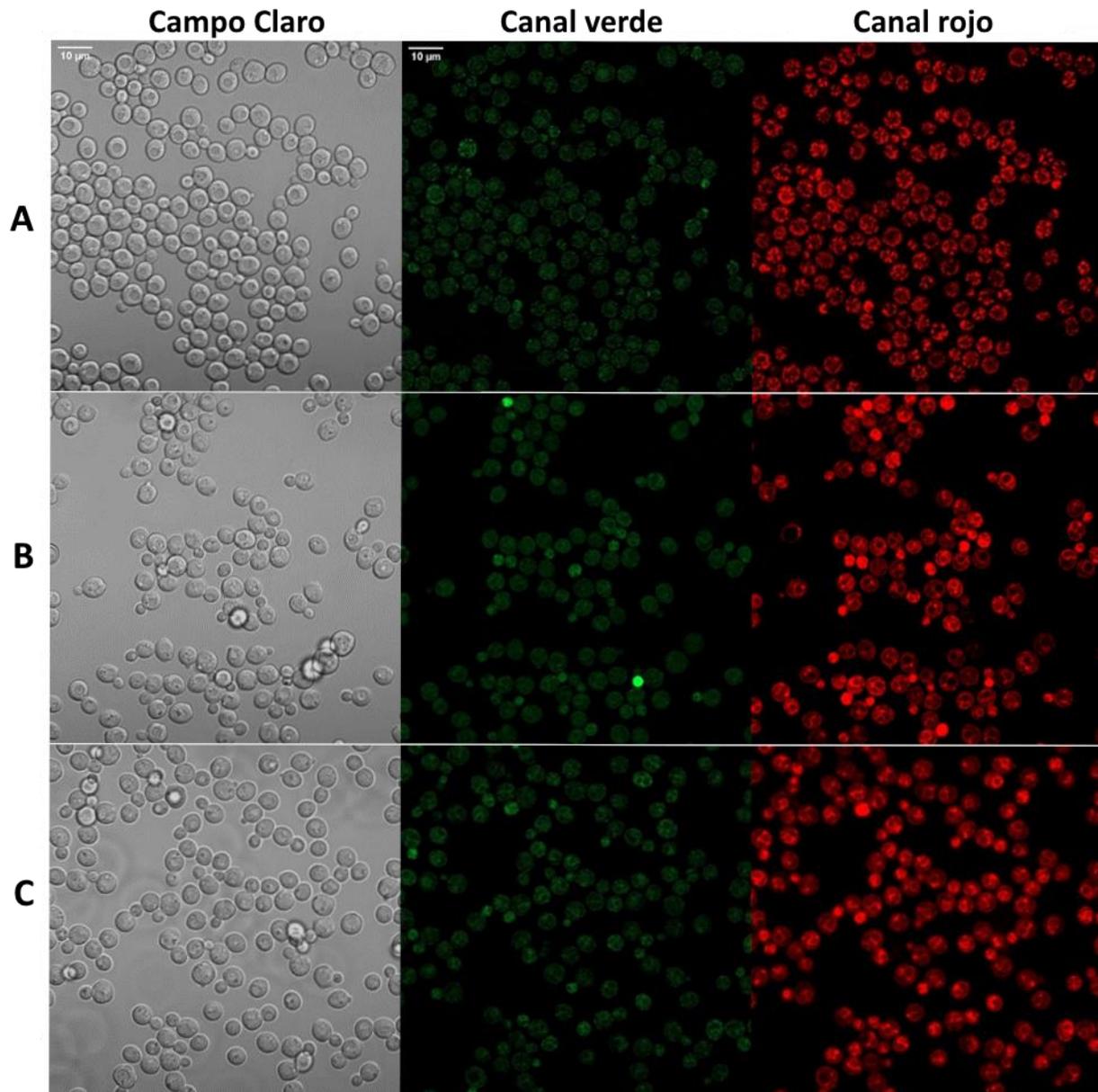


Figura 4.47 Imágenes confocales en canal verde, rojo y campo claro de levadura “azteca”, A: incubada con **AzF3** [2µM], B: tras la adición de CCCP y C: después de la adición de  $K^+$ . La barra de escala representa 10 µm.

Tras la incubación de los fluoróforos en ambos casos se observó emisión en canal rojo, en donde se lograron distinguir estructuras alargadas localizadas en el citoplasma, que de acuerdo con lo

previamente reportado concuerdan con la morfología característica de mitocondrias en levaduras<sup>105</sup>. Como se esperaba, la adición de CCCP promovió la despolarización mitocondrial y se observó una deslocalización drástica de **AzF2**, lo cual se manifestó en el aumento de fluorescencia dentro de las levaduras, por otra parte, **AzF3** mostró una menor deslocalización dentro de las células y parte del fluoróforo se conservó en las mitocondrias, con lo cual se puede justificar entonces el ligero aumento de fluorescencia observado en el monitoreo respecto al tiempo. Finalmente, la adición de  $K^+$  mostró resultados concluyentes respecto al mecanismo de retención mitocondrial propuesto, ya que para **AzF2** la emisión prácticamente se perdió, mientras que la señal de fluorescencia para las levaduras tratadas con **AzF3** no sufrió cambios significativos a las imágenes obtenidas previamente con solo la adición de CCCP.

De acuerdo con los resultados obtenidos, **AzF2** mostró un comportamiento similar al de otras moléculas de naturaleza catiónica reportada previamente<sup>105,106</sup>, mientras que **AzF3** no lo hizo, se corroboró que esta sonda puede retenerse dentro de las levaduras y su localización en un solo organelo se podría atribuir al pH de 6 del medio con el que se realizaron estos experimentos. Por lo tanto, en principio **AzF2** podría emplearse en experimentos convencionales para la determinación de potencial de membrana plasmática en levaduras y **AzF3** abre el panorama para la utilización de fluoróforos con retención mitocondrial que no dependan del MMP en esta aplicación, sin embargo, al no existir reportes previos con moléculas de este tipo se necesita determinar primero las modificaciones pertinentes al protocolo experimental empleado.

## Capítulo 5 Conclusiones

Se comprobó que las moléculas sintetizadas derivadas de cianina pueden ser empleadas como sondas moleculares fluorescentes útiles en microscopía confocal, las cuales presentaron localización selectiva a organelos (mitocondrias y gotas lipídicas) de acuerdo con el grupo electroattractor empleado en la estructura del fluoróforo, a su vez se comprobó que algunas de estas moléculas muestran cambios de emisión tras la aplicación de estímulos a los modelos *in vitro* e *in vivo* empleados.

Las metodologías de síntesis empleadas hicieron posible la obtención de siete fluoróforos derivados de cianina, que fueron caracterizados y que gracias a su conjugación  $\pi$  mostraron emisiones a longitudes de onda desplazadas hacia el rojo, y en la mayoría de los casos una segunda banda de emisión en el canal verde. Además, los fluoróforos sintetizados poseen una óptima permeación de las membranas celulares requiriendo de este modo periodos cortos de incubación (5 minutos). **AzF1-3** presentaron sensibilidad a cambios de viscosidad en el medio. **AzF1**, **AzF2** y **AzF7** mostraron una notable localización exclusivamente mitocondrial, mientras que las cianinas **AzF5** y **AzF6** a pesar de poseer cargas catiónicas mostraron un marcaje altamente influenciado por la introducción de fragmentos morfolinio, en estructuras diferentes a la red mitocondrial.

Por otro lado, **AzF4** presentó un marcaje dual en gotas lipídicas, lo cual fue corroborado mediante experimentos de colocalización con marcadores comercialmente disponibles, siendo este más limpio y específico que la localización observada para Rojo de Nilo y BODIPY 493/503, además no presenta cambios significativos en su emisión en los primeros 90 minutos de uso. Esta molécula presentó un fenómeno de autoasociación entre ambientes acuosos y lipídicos que resulta en una respuesta de doble canal empleando microscopía de imágenes diferenciales y evitando interferencias en las señales de emisión, el proceso de autoasociación se explicó

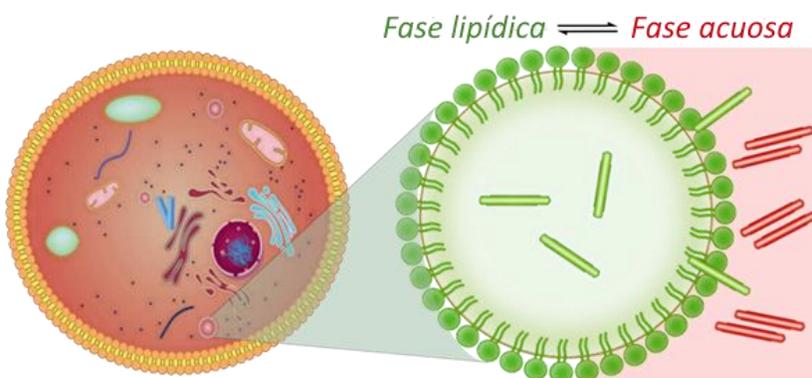


Figura 5.1 Ilustración esquemática de la distribución del monómero y agregados de **AzF4** entre la fase lipídica y acuosa dentro de la célula.

mediante el mecanismo de reparto o distribución de Nernst, abriendo el panorama a la existencia de una nueva clasificación de fluoróforos llamada sondas de reparto Nernstiano, Figura 5.1.

Este mecanismo permitió el seguimiento de la dinámica de LDs en el modelo *in vivo* pez cebra, pudiendo realizar comparaciones entre especímenes sanos y enfermos, por lo que **AzF4** representa una nueva herramienta que permite la visualización funcional de la entrada de agua en la dinámica del saco vitelino de peces cebra que desarrollan edema pericárdico y del saco vitelino. En la búsqueda de un mecanismo de direccionamiento generalizado para el desarrollo de sondas para LDs que sea paralelo al mecanismo de direccionamiento mitocondrial, creemos que el mecanismo de reparto Nernstiano propuesto en este trabajo podría guiar la orientación y el análisis selectivo de LDs.

Además, **AzF3** mostró una localización en dos organelos distintos que se pudieron distinguir por la emisión dual que presentó, atribuyéndose al aumento de lipofilidad del fluoróforo posterior a la hidrólisis del grupo éster que posee, la cual también puede estar relacionada con la interrupción de la conjugación  $\pi$  a través de la ciclación que da como origen el aumento de emisión verde en medio lipofílico (LDs), mientras que la especie no hidrolizada se dirige a la red mitocondrial para observarse en el canal rojo. Esta molécula puede retenerse dentro de las mitocondrias tras la despolarización de la membrana mitocondrial con CCCP tanto en células animales como en levaduras. Finalmente, se determinó que **AzF2** puede ser empleado para experimentos convencionales para la medición de potencial de membrana plasmática en levaduras al presentar un comportamiento similar al de fluoróforos previamente reportados.

## Apéndice

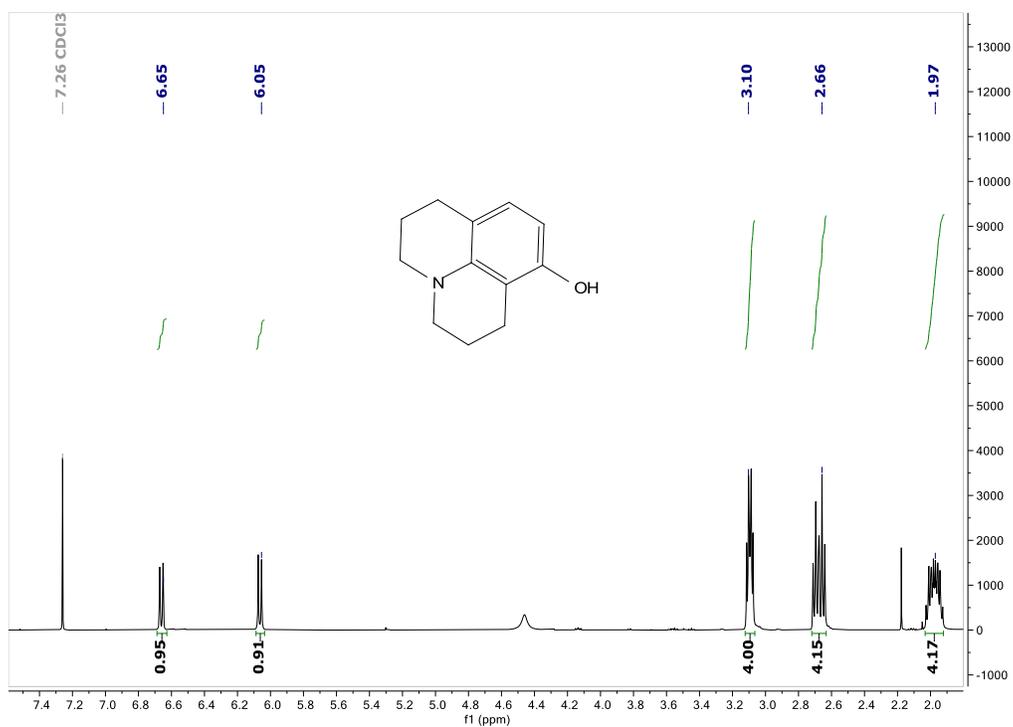


Figura A 1. Espectro  $^1\text{H}$  RMN del compuesto A en  $\text{CDCl}_3$ .

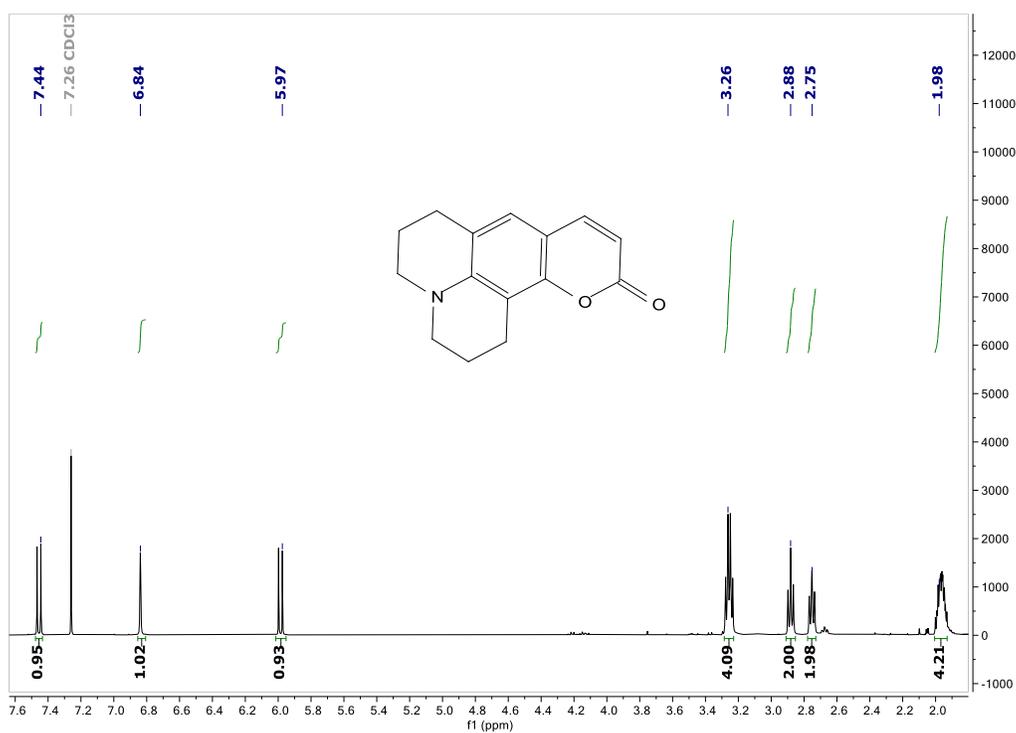


Figura A 2. Espectro  $^1\text{H}$  RMN del compuesto C en  $\text{CDCl}_3$ .

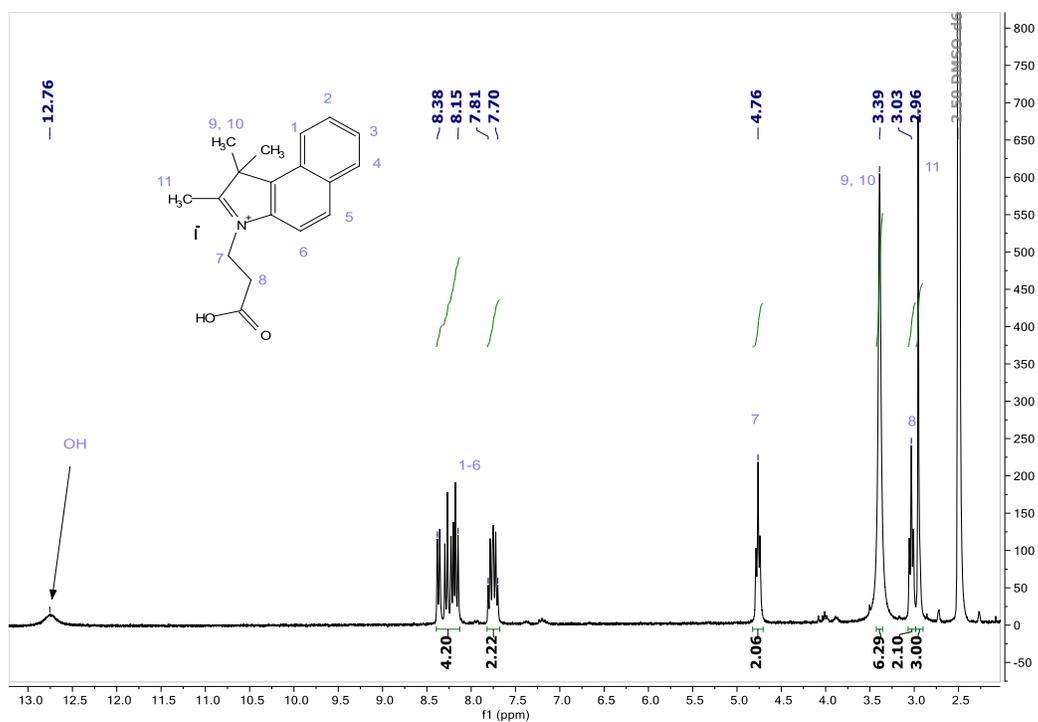


Figura A 3. Espectro  $^1\text{H}$  RMN del precursor de I en  $\text{DMSO-d}_6$ .

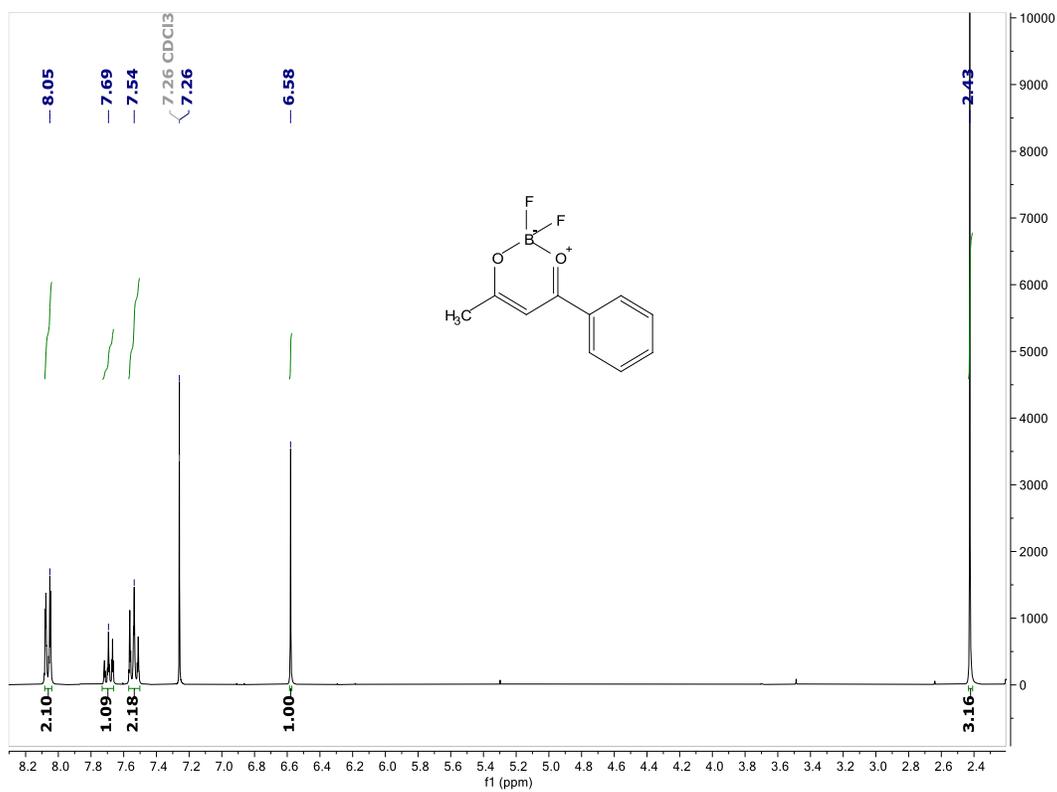


Figura A 4. Espectro  $^1\text{H}$  RMN del compuesto J en  $\text{CDCl}_3$ .

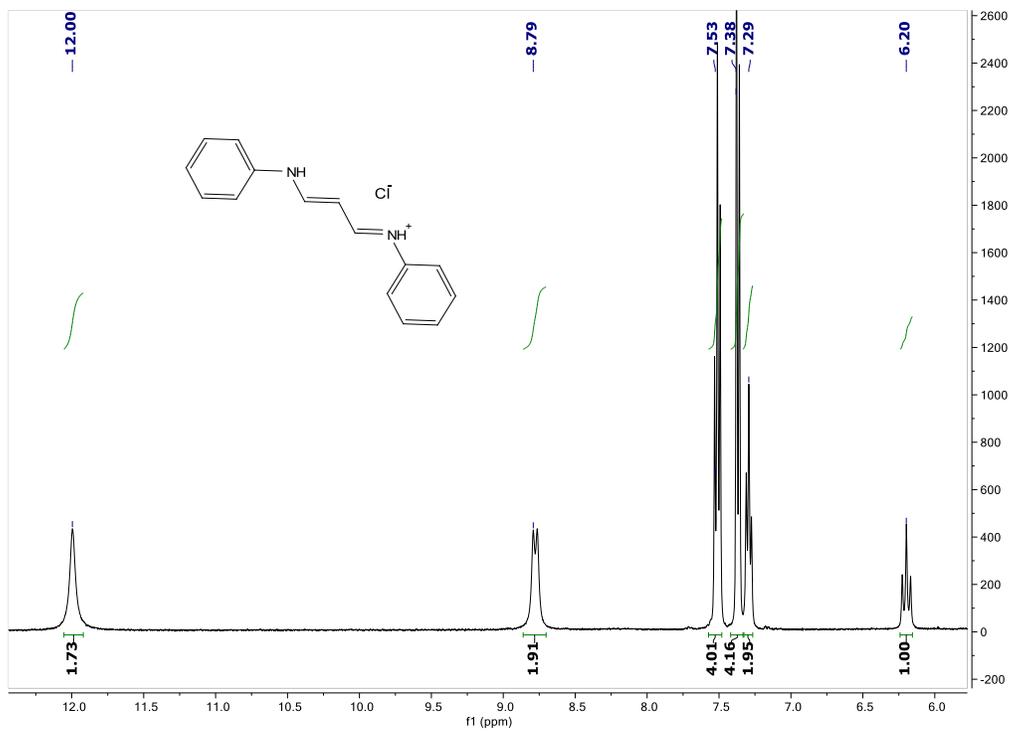


Figura A 5. Espectro  $^1\text{H}$  RMN del compuesto L en  $\text{DMSO-d}_6$ .

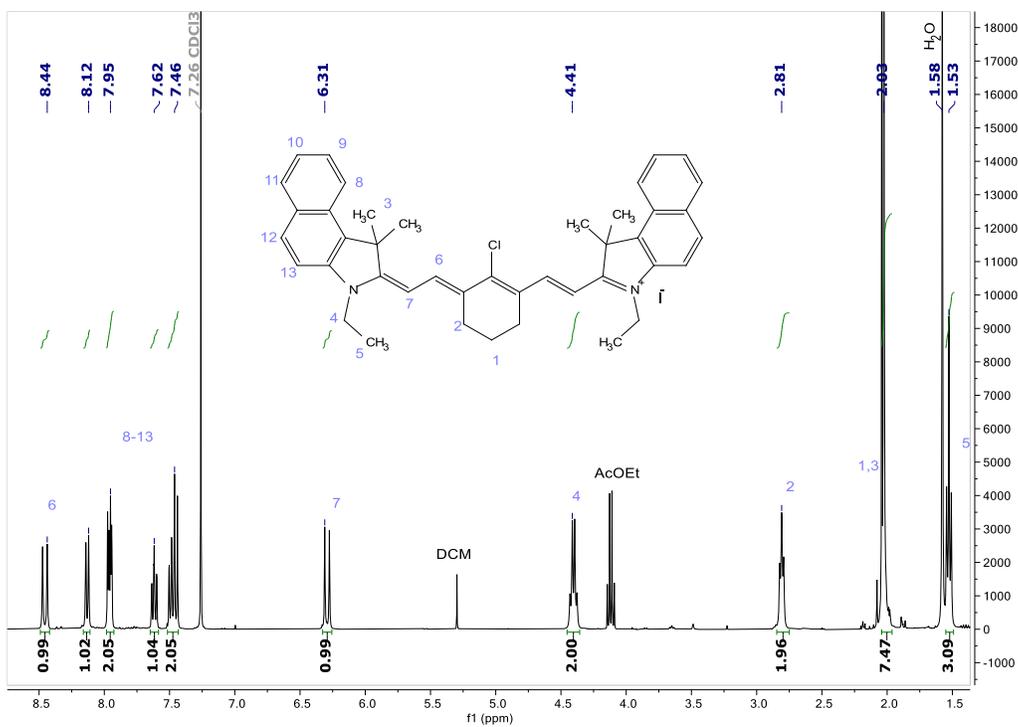


Figura A 6. Espectro  $^1\text{H}$  RMN del compuesto M en  $\text{CDCl}_3$ .

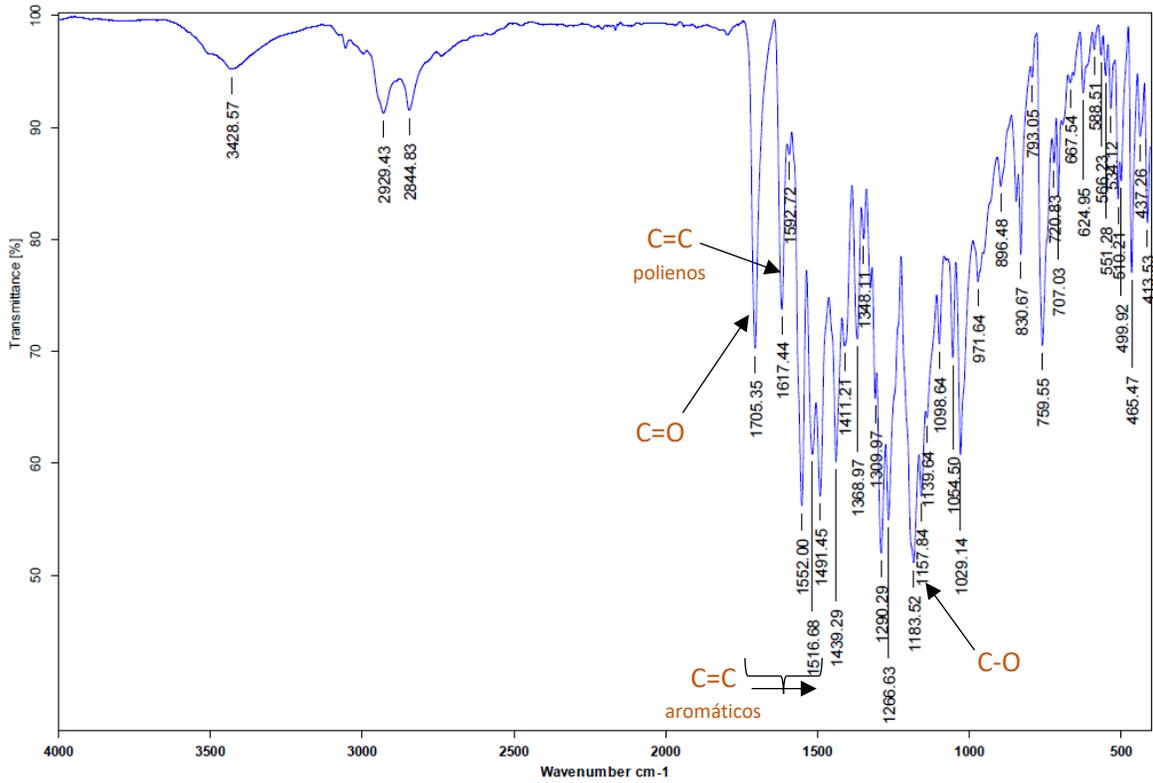


Figura A 7. Espectro IR de AzF1. Se indican algunas señales características.

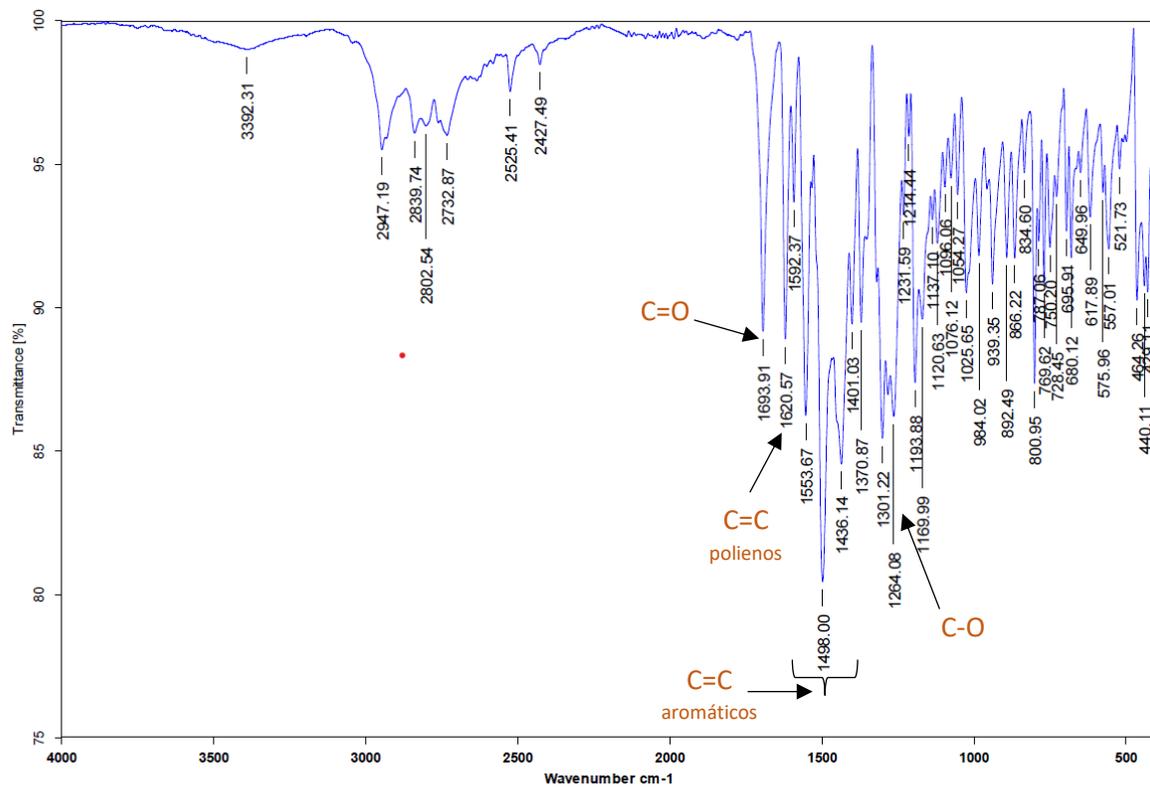


Figura A 8. Espectro IR de AzF2.

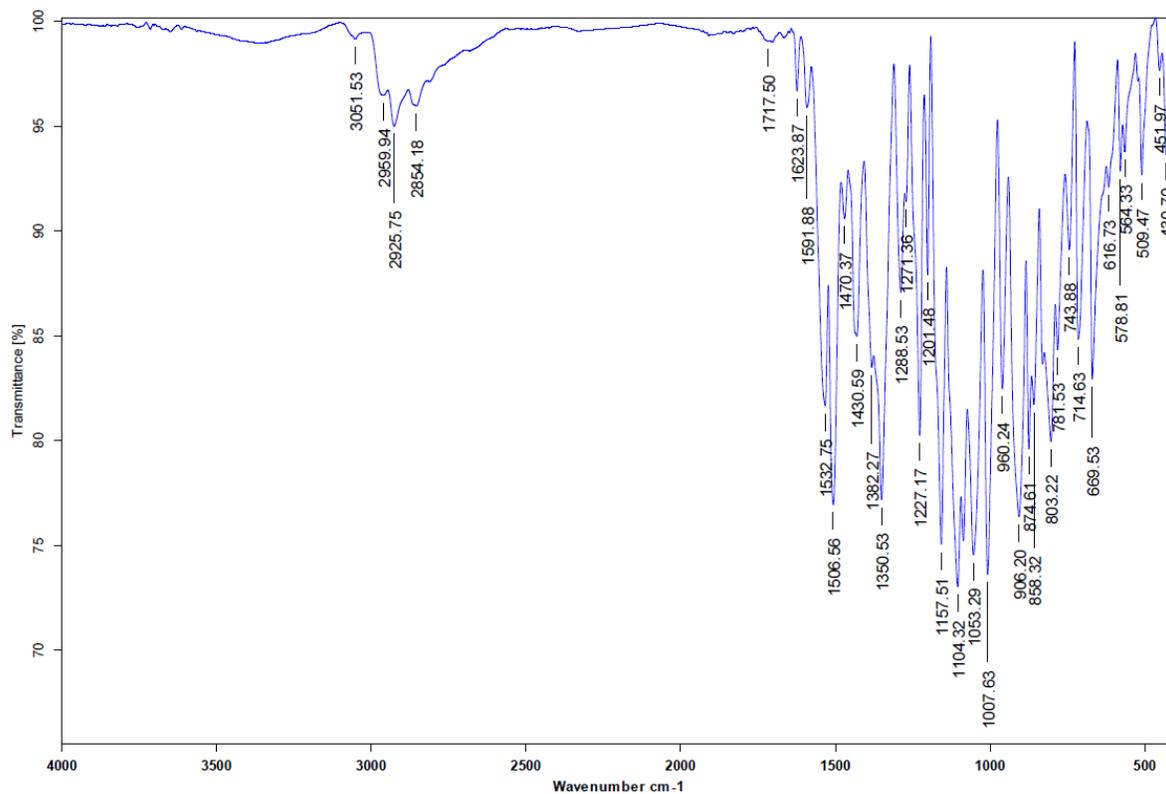


Figura A 9. Espectro IR de AzF5.

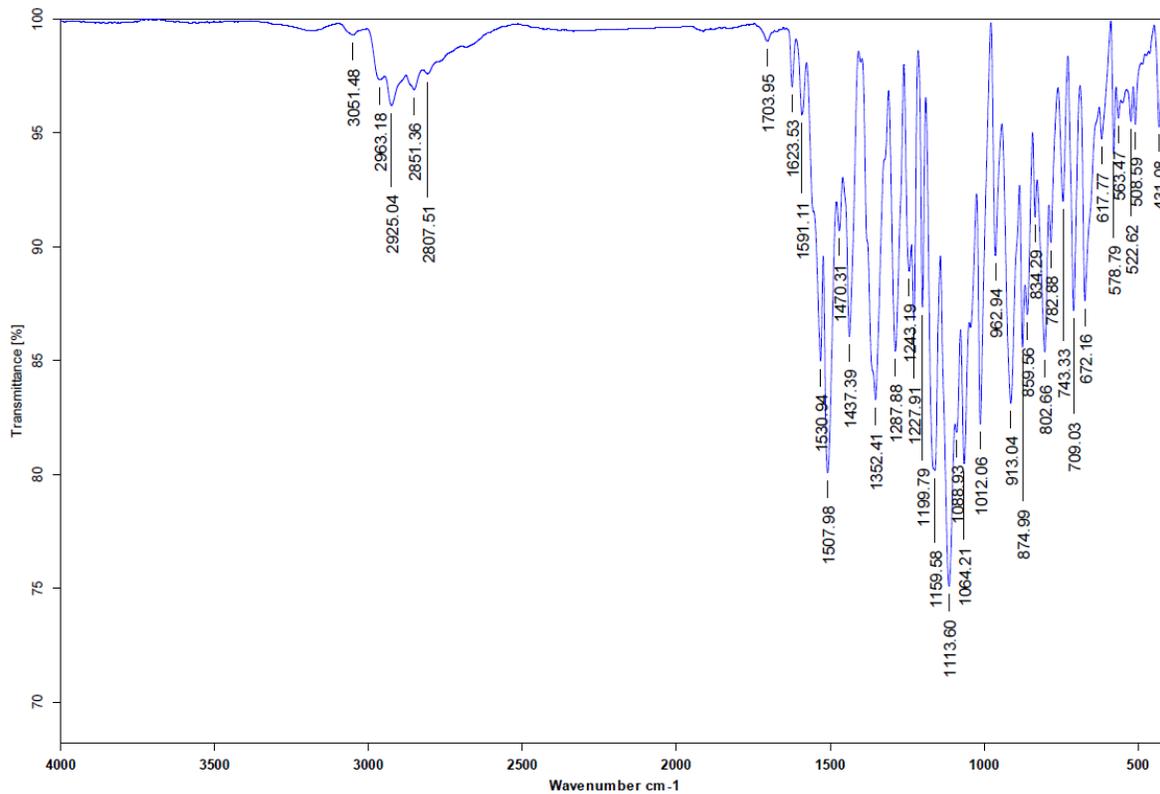
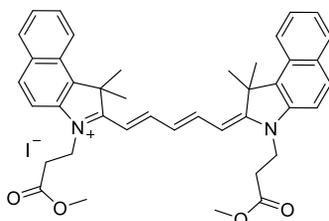


Figura A 10. Espectro IR de AzF6.





Fórmula química:  $C_{41}H_{43}N_2O_4^+$   
 m/z: 627.3218 (100.0%), 628.3251 (44.3%), 629.3285 (9.6%), 630.3318 (1.3%)

### User Spectra

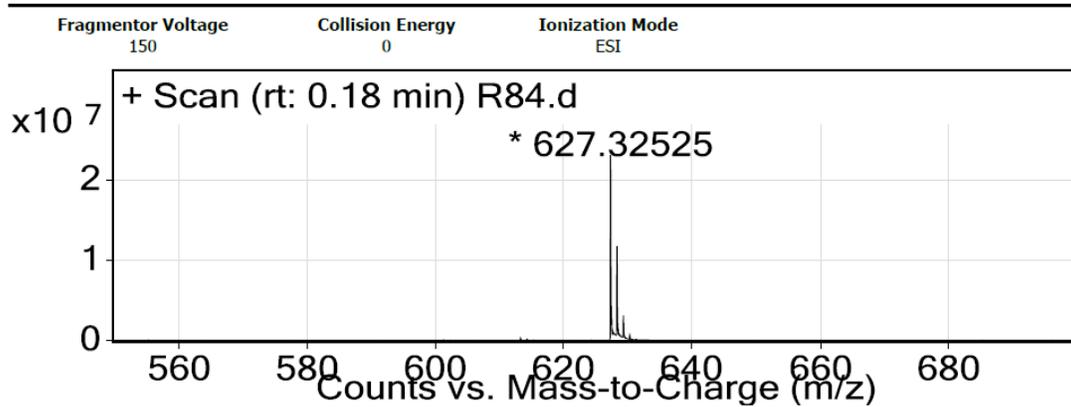


Figura A 13. Espectro ESI+ de AzF7 en DMSO y estructura esperada con valores m/z calculados.

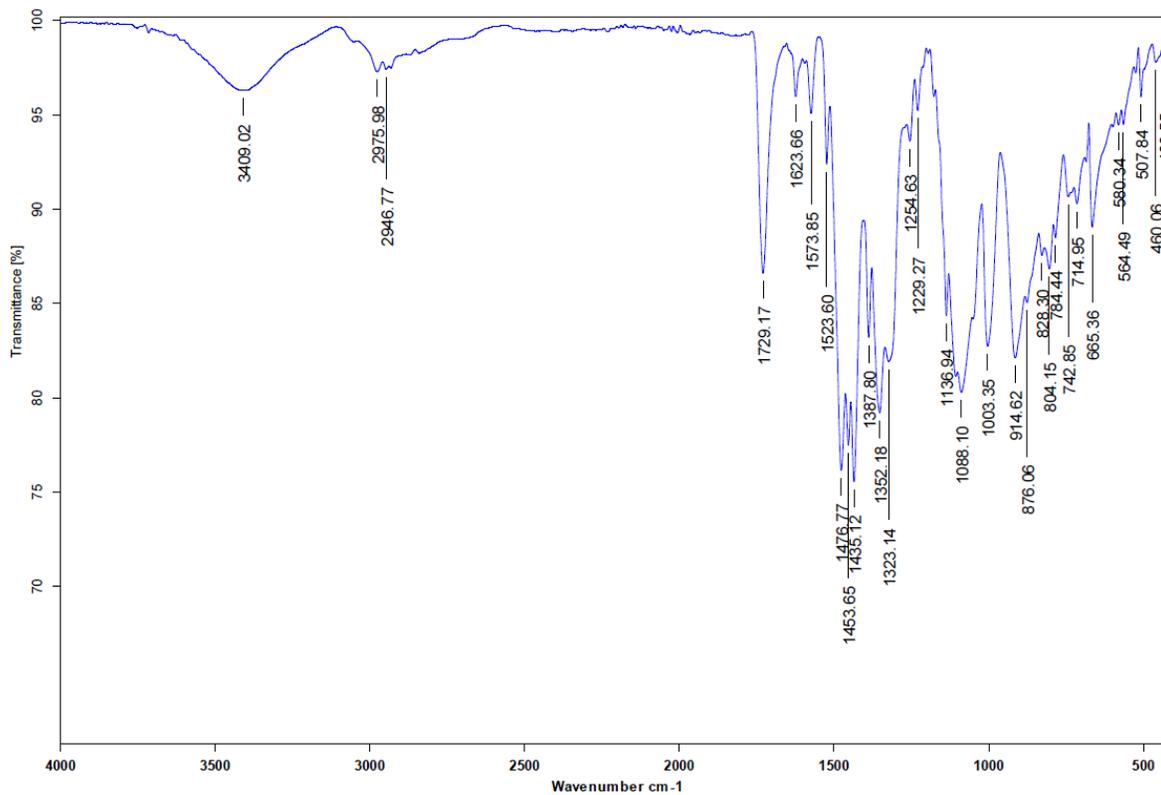


Figura A 14. Espectro IR de AzF7.

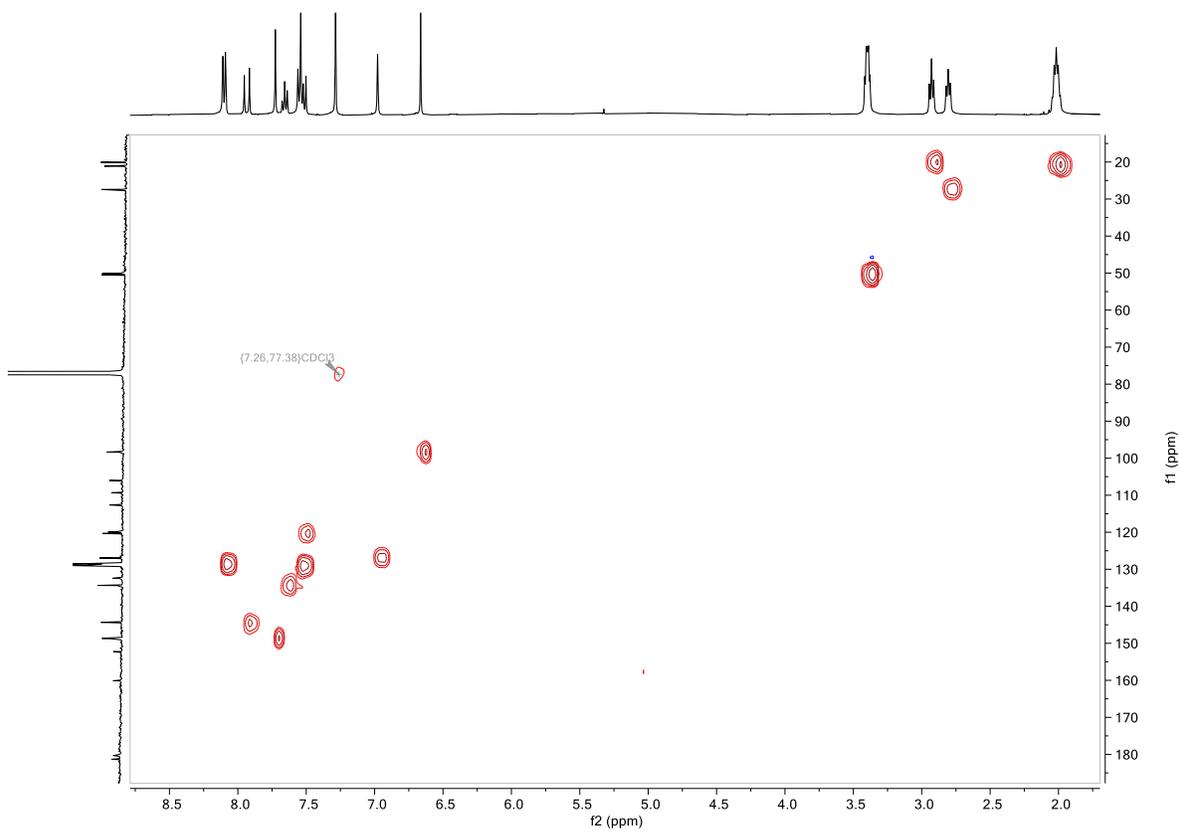
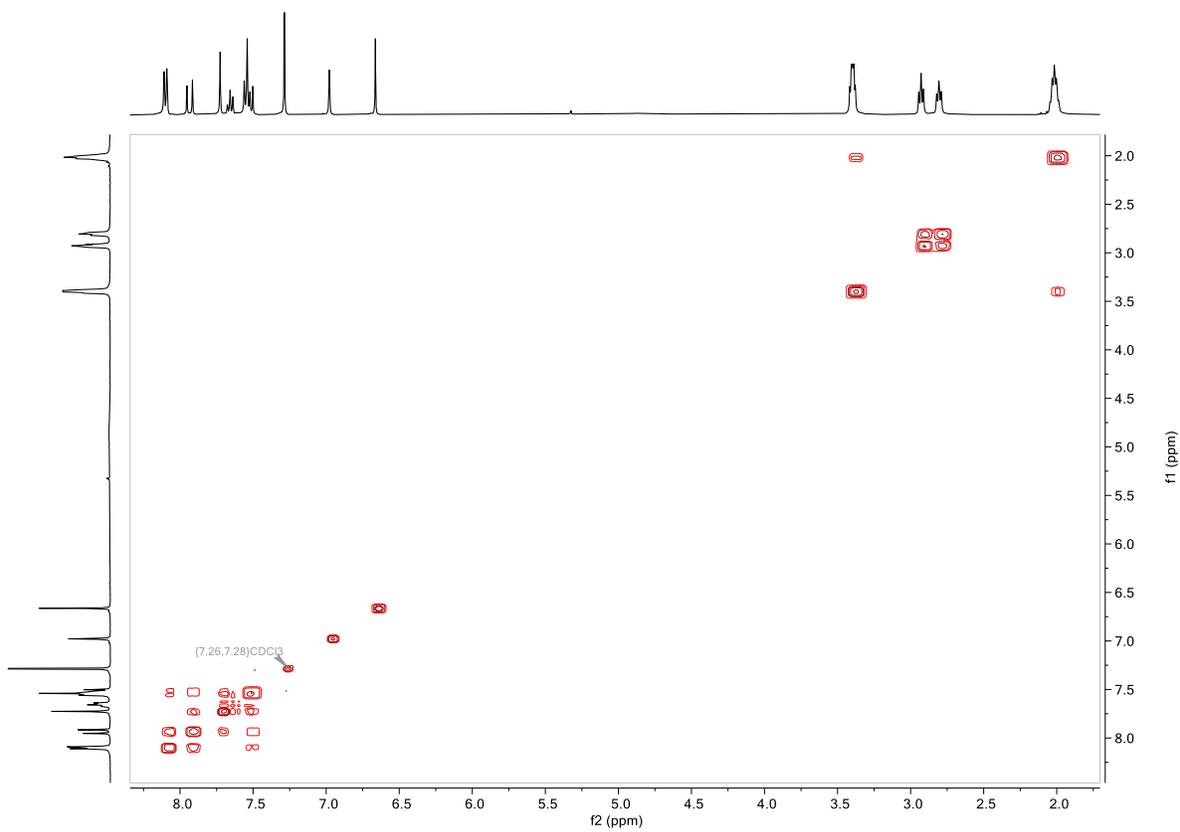


Figura A 15. Espectros RMN COSY (arriba) y HSQC (abajo) de AzF4 en CDCl<sub>3</sub>.

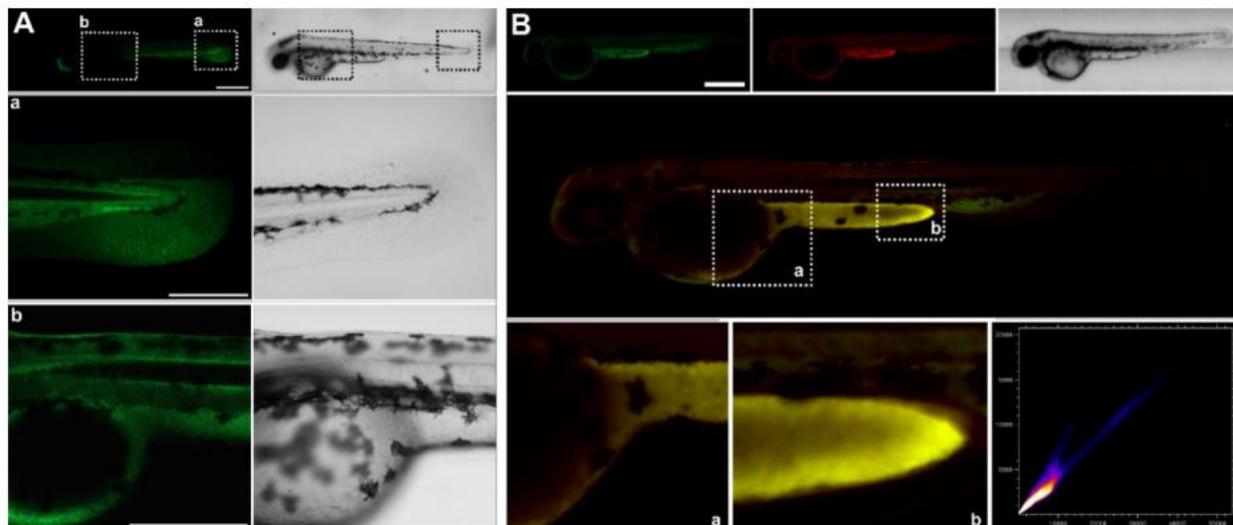


Figura A 16. Imágenes de colocación de (A) tinción con BODIPY 493/503 [5  $\mu$ M] e imágenes de colocación con (B) rojo Nilo [5  $\mu$ M] para pez cebra de 48 hpf, coeficiente de Pearson = 0.88. Los recuadros resaltan las regiones de acercamiento: la aleta caudal y el área del saco vitelino que se registró en un plano confocal diferente debido al volumen diferente del saco vitelino. Canal verde ( $\lambda_{exc}$  = 480 nm), canales rojos ( $\lambda_{exc}$  = 647 nm) e imágenes de campo claro correspondientes. Las barras de escala representan 200  $\mu$ m.

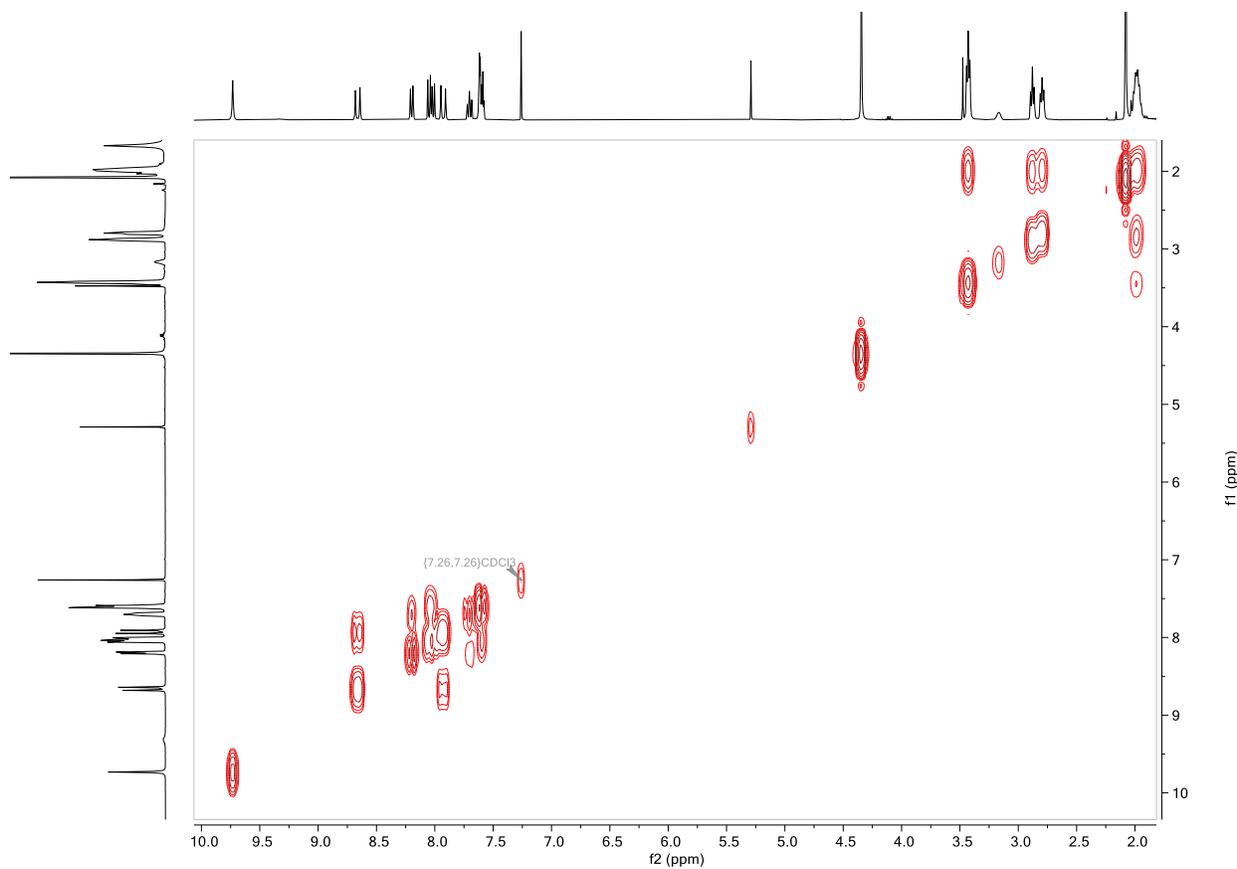


Figura A 17. Espectro RMN COSY de AzF2 en  $CDCl_3$ .

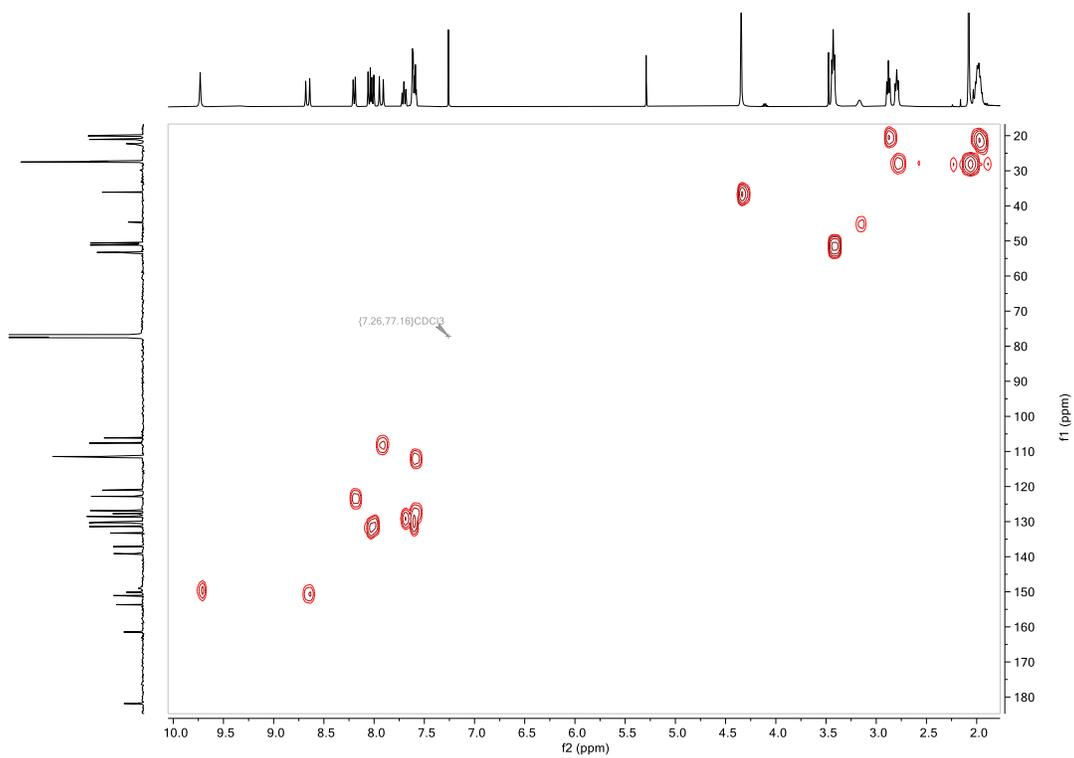


Figura A 18. Espectro RMN HSQC de AzF2 en CDCl<sub>3</sub>.

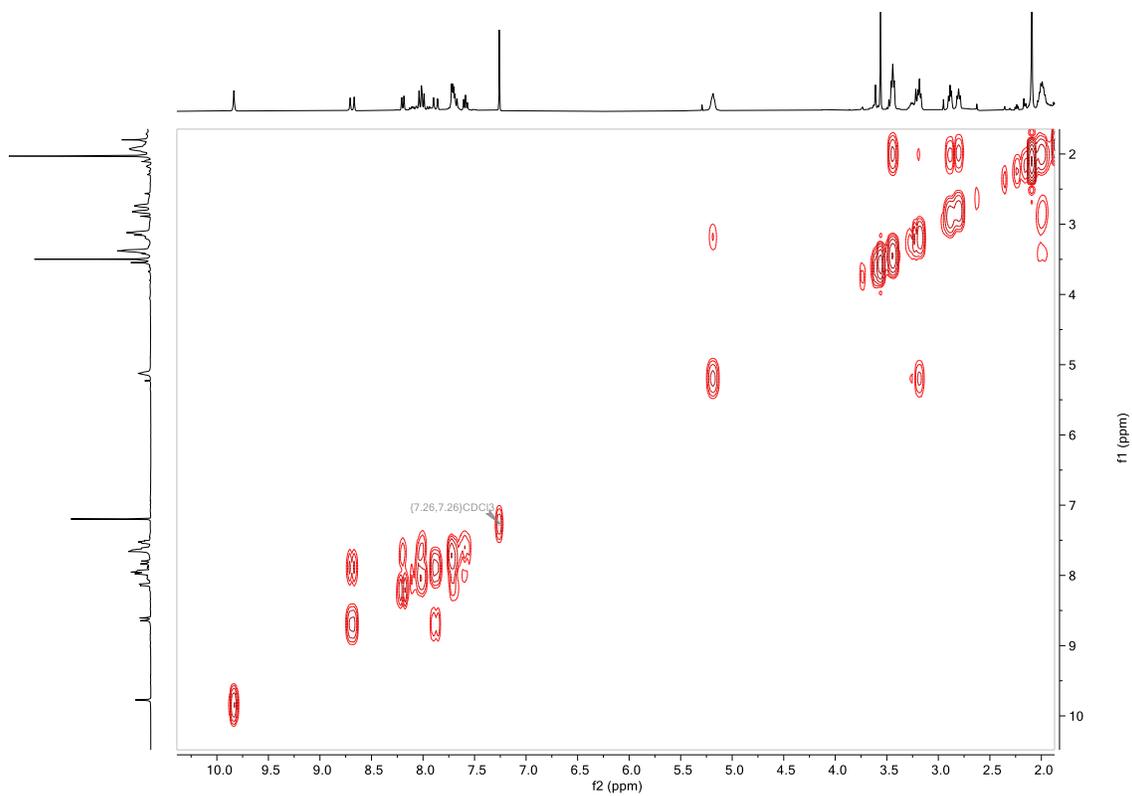


Figura A 19. Espectro RMN COSY de AzF3 en CDCl<sub>3</sub>.

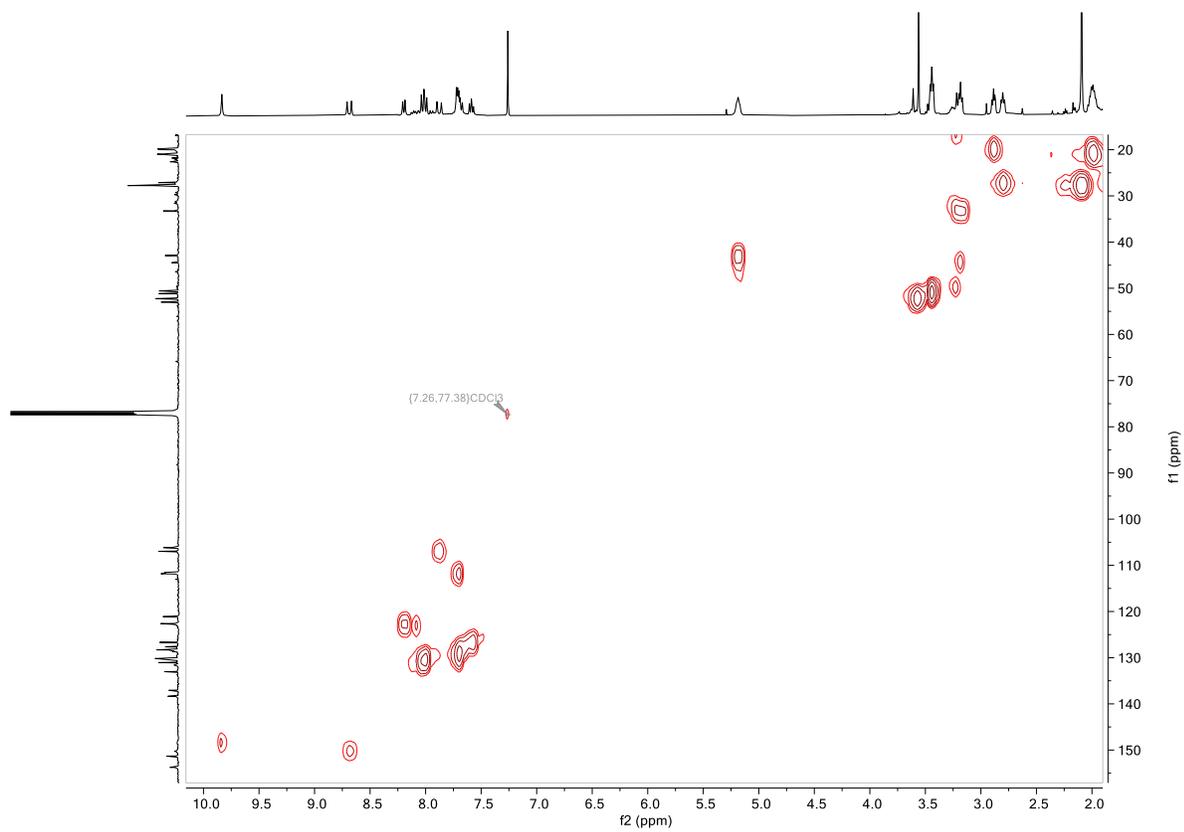


Figura A 20. Espectro RMN HSQC de **AzF3** en CDCl<sub>3</sub>.

## Referencias

1. Hermanson, G. T. Bioconjugate Techniques. in *Bioconjugate Techniques* 395–463 (Academic Press, 2013).
2. Grimm, J. B., Heckman, L. M. & Lavis, L. D. The Chemistry of Small-Molecule Fluorogenic Probes. in *Progress in Molecular Biology and Translational Science* vol. 113 1–34 (Elsevier Inc., 2013).
3. Fu, Y. & Finney, N. S. Small-molecule fluorescent probes and their desing. *RSC Adv.* **8**, 29051–29061 (2018).
4. Adams, F. & Barbante, C. Spectroscopic Imaging. in *Comprehensive Analytical Chemistry* vol. 69 339–384 (Elsevier, 2015).
5. Gao, P., Pan, W., Li, N. & Tang, B. Fluorescent probes for organelle-targeted bioactive species imaging. *Chem. Sci.* **10**, 6035–6071 (2019).
6. Zhang, J., Campbell, R. E., Ting, A. Y. & Tsien, R. Y. Creating new fluorescent probes for cell biology. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**, 906–918 (2002).
7. Wai, T. & Langer, T. Mitochondrial Dynamics and Metabolic Regulation. *Trends in Endocrinology & Metabolism* **27**, 105–117 (2015).
8. Kasten, F. H. Introduction to Fluorescent Probes : Properties , History and Applications. in *Fluorescent and luminescent probes* 17–39 (Academic Press, 1999).
9. Johnson, I. Fluorescent probes for living cells. *Histochemical Journal* **30**, 123–140 (1998).
10. Wisnovsky, S., Lei, E. K., Jean, S. R. & Kelley, S. O. Mitochondrial Chemical Biology: New Probes Elucidate the Secrets of the Powerhouse of the Cell. *Cell Chem Biol* **23**, 917–927 (2016).
11. Guo, Z., Park, S., Yoon, J. & Shin, I. Recent progress in the development of near-infrared fluorescent probes for bioimaging applications. *Chem. Soc. Rev.* **43**, 16–29 (2014).
12. Lakowicz, J. R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. (Springer, 2006).
13. Birk, U. J. *Super-resolution microscopy : a practical guide*. (2017).
14. Valeur, B. *Molecular Fluorescence Principles and Applications*. vol. 8 (Wiley-VCH, 2001).

15. Zhu, H., Fan, J., Du, J. & Peng, X. Fluorescent Probes for Sensing and Imaging within Specific Cellular Organelles. *Acc Chem Res* **49**, 2115–2126 (2016).
16. Lichtman, J. W. & Conchello, J. A. Fluorescence microscopy. *Nat Methods* **2**, 910–919 (2005).
17. Grimm, J. B. *et al.* A general method to improve fluorophores for live-cell and single-molecule microscopy. *Nat Methods* **12**, 244–250 (2015).
18. Hickey, S. M. *et al.* Fluorescence microscopy—an outline of hardware, biological handling, and fluorophore considerations. *Cells* **11**, (2022).
19. Rost, F. Fluorescence microscopy applications. in *Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry* 627–631 (Elsevier, 2016).
20. Slavík, J. *Fluorescence Microscopy and Fluorescent Probes. Fluorescence Microscopy and Fluorescent Probes* (Springer US, 1996).
21. Sanderson, M. J., Smith, I., Parker, I. & Bootman, M. D. Fluorescence microscopy. *Cold Spring Harb Protoc* **2014**, 1042–1065 (2014).
22. Jun, J. V., Chenoweth, D. M. & Petersson, E. J. Rational design of small molecule fluorescent probes for biological applications. *Org Biomol Chem* **18**, 5747–5763 (2020).
23. Grimm, J. B. & Lavis, L. D. Caveat fluorophore: an insiders' guide to small-molecule fluorescent labels. *Nat Methods* **19**, 149–158 (2022).
24. Bureš, F. Fundamental aspects of property tuning in push-pull molecules. *RSC Adv* **4**, 58826–58851 (2014).
25. Kobayashi, H., Ogawa, M., Alford, R., Choyke, P. L. & Urano, Y. New strategies for fluorescent probe design in medical diagnostic imaging. *Chem Rev* **110**, 2620–2640 (2010).
26. *Engineering Materials Functional Properties of Advanced Engineering Materials and Biomolecules*. (Springer, 2021).
27. Gui, R. *et al.* Recent advances in dual-emission ratiometric fluorescence probes for chemo/biosensing and bioimaging of biomarkers. *Coord Chem Rev* **383**, 82–103 (2019).

28. Bolsover, S. R., Hyams, J. S., Shephard, E. A., White, H. A. & Wiedemann, C. G. *Cell Biology: A Short Course*. (John Wiley & Sons, 2003).
29. Rafelski, S. M. & Marshall, W. F. Building the cell: Design principles of cellular architecture. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**, 593–602 (2008).
30. Henne, W. M. Organelle homeostasis principles: How organelle quality control and inter-organelle crosstalk promote cell survival. *Dev Cell* **56**, 878–880 (2021).
31. Picard, M., Shirihai, O. S., Gentil, B. J. & Buelle, Y. Mitochondrial morphology transitions and functions: implications for retrograde signaling? *AJP-Regul Integr Comp Physiol* **304**, R393–R406 (2013).
32. Picard, M., Taivassalo, T., Gouspillou, G. & Hepple, R. T. Mitochondria: isolation, structure and function. *J Physiol* **18**, 4413–4421 (2011).
33. Pollard, T. D., Earnshaw, W. C., Lippincott-Schwartz, J. & Johnson, G. T. Section I Introduction to Cells. in *Cell Biology* 3–14 (Elsevier, 2017).
34. Tilokani, L., Nagashima, S., Paupe, V. & Prudent, J. Mitochondrial dynamics: overview of molecular mechanisms. *Essays Biochem* **62**, 341–360 (2018).
35. Zorova, L. D. *et al.* Mitochondrial membrane potential. *Anal Biochem* **552**, 50–59 (2018).
36. Ferree, A. & Shirihai, O. Mitochondrial Dynamics: the intersection of form and function. *Adv Exp Med Biol* **748**, 13–40 (2012).
37. Cohen, S. Lipid Droplets as Organelles. in *International Review of Cell and Molecular Biology* vol. 337 83–110 (Elsevier Inc., 2018).
38. Olzmann, J. A. & Carvalho, P. Dynamics and functions of lipid droplets. *Nat Rev Mol Cell Biol* **20**, 137–155 (2019).
39. Onal, G., Kutlu, O., Gozuacik, D. & Dokmeci Emre, S. Lipid Droplets in Health and Disease. *Lipids Health Dis* **16**, 1–15 (2017).
40. Fujimoto, T. & Parton, R. G. Not just fat: The structure and function of the lipid droplet. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **3**, 1–17 (2011).

41. Herker, E., Vиейres, G., Beller, M., Krahmer, N. & Bohnert, M. Lipid Droplet Contact Sites in Health and Disease. *Trends Cell Biol* **31**, 345–358 (2021).
42. Zadoorian, A., Du, X. & Yang, H. Lipid droplet biogenesis and functions in health and disease. *Nat Rev Endocrinol* **19**, 443–459 (2023).
43. Chen, H., Yu, Z., Ren, S. & Qiu, Y. Fluorescent Probes Design Strategies for Imaging Mitochondria and Lysosomes. *Front Pharmacol* **13**, (2022).
44. Invitrogen. *The Molecular Probes Handbook: A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies*. (2010).
45. Li, X., Zhao, Y., Yin, J. & Lin, W. Organic fluorescent probes for detecting mitochondrial membrane potential. *Coord Chem Rev* **420**, (2020).
46. Jean, S. R., Ahmed, M., Lei, E. K., Wisnovsky, S. P. & Kelley, S. O. Peptide-Mediated Delivery of Chemical Probes and Therapeutics to Mitochondria. *Acc Chem Res* **9**, 893–902 (2016).
47. Jiménez-Sánchez, A., Lei, E. K. & Kelley, S. O. A Multifunctional Chemical Probe for Local Micropolarity and Microviscosity in Mitochondria. *Angewandte Chemie International Edition* **57**, 8891–8895 (2018).
48. Caldwell, D. R., Usama, S. M. & Schnermann, M. J. Coumarins to Cyanines: Synthesis of Hemicyanines. *Org Lett* **23**, 8857–8861 (2021).
49. Li, X., Li, X. & Ma, H. A near-infrared fluorescent probe reveals decreased mitochondrial polarity during mitophagy. *Chem Sci* **11**, 1617–1622 (2020).
50. Chen, Q. *et al.* A dual-labeling probe to track functional mitochondria–lysosome interactions in live cells. *Nat Commun* **11**, (2020).
51. Li, X. *et al.* Charge-Dependent Strategy Enables a Single Fluorescent Probe to Study the Interaction Relationship between Mitochondria and Lipid Droplets. *ACS Sens* **6**, 1595–1603 (2021).
52. Greenspan, P. & Fowler, S. D. *Spectrofluorometric studies of the lipid probe, nile red*. *Journal of Lipid Research* vol. 26 (1985).

53. Madea, D. *et al.* Structural modifications of nile red carbon monoxide fluorescent probe: Sensing mechanism and applications. *Journal of Organic Chemistry* **85**, 3473–3489 (2020).
54. Xu, H. *et al.* Coumarin-Based Fluorescent Probes for Super-resolution and Dynamic Tracking of Lipid Droplets. *Anal Chem* **91**, 977–982 (2019).
55. Purevsuren, K. *et al.* Blue-emitting lipid droplet probes based on coumarin dye for multi-color imaging of living cells and fatty livers of mice. *J Photochem Photobiol A Chem* **438**, 114562 (2023).
56. Liu, G. *et al.* Dynamic cyclic behaviors of lipid droplets monitored by two-photon fluorescence probe with high photostability. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* **228**, (2020).
57. Yoshihara, T. *et al.* Visualization of Lipid Droplets in Living Cells and Fatty Livers of Mice Based on the Fluorescence of  $\pi$ -Extended Coumarin Using Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy. *Anal Chem* **92**, 4996–5003 (2020).
58. Jana, P., Siva, A., Soppina, V. & Kanvah, S. Live-cell imaging of lipid droplets using solvatochromic coumarin derivatives. *Org Biomol Chem* **18**, 5608–5616 (2020).
59. Wang, H., Hu, L., Shen, S., Yu, K. & Wang, Y. A polarity-sensitive fluorescent probe based on a difluoroboron derivative for monitoring the variation of lipid droplets. *New Journal of Chemistry* **45**, 21553–21556 (2021).
60. Li, Z. *et al.* Near-infrared thermally activated delayed fluorescence of D- $\pi$ -A- $\pi$ -D difluoroboron complex for efficient singlet oxygen generation in aqueous media. *Inorg Chem Front* **9**, 4281–4287 (2022).
61. Xu, S. *et al.* Aromatic difluoroboron  $\beta$ -diketonate complexes: Effects of  $\pi$ -conjugation and media on optical properties. *Inorg Chem* **52**, 3597–3610 (2013).
62. Collot, M. *et al.* Ultrabright and Fluorogenic Probes for Multicolor Imaging and Tracking of Lipid Droplets in Cells and Tissues. *J Am Chem Soc* **140**, 5401–5411 (2018).
63. Ma, X. *et al.* Recent advances in bioprobes and biolabels based on cyanine dyes. *Anal Bioanal Chem* **414**, 4551–4573 (2022).

64. Zhou, H. J. & Ren, T. B. Recent Progress of Cyanine Fluorophores for NIR-II Sensing and Imaging. *Chemistry Asian Journal* **17**, 1–9 (2022).
65. Shindy, H. A. Fundamentals in the chemistry of cyanine dyes: A review. *Dyes and Pigments* **145**, 505–513 (2017).
66. Ren, C. Bin *et al.* Research progress in hemicyanine-based polymers. *Des Monomers Polym* **14**, 541–558 (2011).
67. Xing, P. *et al.* A pocket-escaping design to prevent the common interference with near-infrared fluorescent probes in vivo. *Nat Commun* **11**, (2020).
68. Huang, B. Q. & Yeung, E. C. Chemical and Physical Fixation of Cells and Tissues: An Overview. in *Plant Microtechniques and Protocols* 23–43 (Springer International Publishing, 2015).
69. Shen, T. *et al.* A ratiometric fluorescent probe for mitochondrial esterase specific detection in living cells. *Dyes and Pigments* **178**, 108345 (2020).
70. Prag, H. A. *et al.* Selective Delivery of Dicarboxylates to Mitochondria by Conjugation to a Lipophilic Cation via a Cleavable Linker. *Mol Pharm* **17**, 3526–3540 (2020).
71. Faniran, J. A. & Shurvell, H. F. *Infrared spectra of phenylboronic acid (normal and deuterated) and diphenyl phenylboronate.* *Canadian Journal of Chemistry* vol. 46 (1968).
72. Pretsch, E., Bühlmann, P. & Badertscher, M. *Structure determination of organic compounds: Tables of spectral data.* *Structure Determination of Organic Compounds: Tables of Spectral Data* (Springer, 2009).
73. Airinei, A., Isac, D. L., Homocianu, M., Cojocar, C. & Hulubei, C. Solvatochromic analysis and DFT computational study of an azomaleimide derivative. *J Mol Liq* **240**, 476–485 (2017).
74. Li, D. H. & Smith, B. D. Supramolecular Mitigation of the Cyanine Limit Problem. *Journal of Organic Chemistry* **87**, 5893–5903 (2022).
75. Bouit, P.-A. *et al.* Continuous Symmetry Breaking Induced by Ion Pairing Effect in Heptamethine Cyanine Dyes: Beyond the Cyanine Limit. *J Am Chem Soc* **132**, 4328–4335 (2010).

76. Reichardt, C. Solvatochromic Dyes as Solvent Polarity Indicators. *Chem Rev* **94**, 2319–2358 (1994).
77. Jayabharathi, J., Thanikachalam, V., Vennila, M. & Jayamoorthy, K. Potential fluorescent chemosensor based on L-tryptophan derivative: DFT based ESIPT process. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* **95**, 446–451 (2012).
78. Ma, C. *et al.* A minireview of viscosity-sensitive fluorescent probes: Design and biological applications. *J Mater Chem B* **8**, 9642–9651 (2020).
79. Liang, Y., Zhao, Y., Lai, C., Zou, X. & Lin, W. A coumarin-based TICT fluorescent probe for real-time fluorescence lifetime imaging of mitochondrial viscosity and systemic inflammation *in vivo*. *J Mater Chem B* **9**, 8067–8073 (2021).
80. Deore, P. S., Coman, D. S. & Manderville, R. A. A coumarin-hemicyanine hybrid as a ratiometric fluorescent sensor of microenvironment proticity. *Chemical Communications* **55**, 3540–3543 (2019).
81. Klymchenko, A. S. Solvatochromic and Fluorogenic Dyes as Environment-Sensitive Probes: Design and Biological Applications. *Acc Chem Res* **50**, 366–375 (2017).
82. Del Valle, L. *Immuno histo-chemistry and Immunocyto-chemistry Methods and Protocols*. (Humana Press, 2022).
83. Samanta, S. *et al.* Fluorescent Probes for Nanoscopic Imaging of Mitochondria. *Chem* **5**, 1697–1726 (2019).
84. Jakobs, S. & Wurm, C. A. Super-resolution microscopy of mitochondria §. *Curr Opin Chem Biol* **20**, 9–15 (2014).
85. Yadav, A., Rao, C. & Nandi, C. K. Fluorescent probes for super-resolution microscopy of lysosomes. *ACS Omega* **5**, 26967–26977 (2020).
86. Teame, T. *et al.* The use of zebrafish (*Danio rerio*) as biomedical models. *Animal Frontiers* **9**, 68–77 (2019).
87. Kimmel, C. B., Ballard, W. W., Kimmel, S. R., Ullmann, B. & Schilling, T. F. Stages of embryonic development of the zebrafish. *Developmental Dynamics* **203**, 253–310 (1995).

88. Li, K. *et al.* Morphological characteristics of zebrafish's yolk sac for malformation based on orthogonal-polarization-gating optical coherence tomography. *J Biophotonics* **15**, (2022).
89. Quinlivan, V. H. & Farber, S. A. Lipid uptake, metabolism, and transport in the larval zebrafish. *Front Endocrinol (Lausanne)* **8**, (2017).
90. Fraher, D. *et al.* Zebrafish Embryonic Lipidomic Analysis Reveals that the Yolk Cell Is Metabolically Active in Processing Lipid. *Cell Rep* **14**, 1317–1329 (2016).
91. Economides, P. A. *et al.* The Effects of Atorvastatin on Endothelial Function in Diabetic Patients and Subjects at Risk for Type 2 Diabetes. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **89**, 740–747 (2004).
92. Brown, M. S. & Goldstein, J. L. *The SREBP Pathway: Regulation Review of Cholesterol Metabolism by Proteolysis of a Membrane-Bound Transcription Factor.* *Cell* vol. 89 (1997).
93. Hill, A. J., Bello, S. M., Prasch, A. L., Peterson, R. E. & Heideman, W. Water permeability and TCDD-induced edema in Zebrafish early-life stages. *Toxicological Sciences* **78**, 78–87 (2004).
94. Paulsen, L., Holm, C., Bech, J. N., Starklint, J. & Pedersen, E. B. Effects of statins on renal sodium and water handling. *Nephrology Dialysis Transplantation* **23**, 1556–1561 (2008).
95. Leo, A., Hansch, C. & Elkins, D. Partition coefficients and their uses. *Chem Rev* **71**, 525–615 (1971).
96. Connors, K. A. *Binding Constants. The Measurement of Molecular Complex Stability.* (John Wiley & Sons, 1987).
97. Schellman, J. A. The thermodynamics of urea solutions and the heat of formation of the peptide hydrogen bond. *C R Trav Lab Carlsberg Chim* **29**, 223–9 (1955).
98. Martin, R. B. Comparisons of Indefinite Self-Association Models. *Chem Rev* **96**, 3043–3064 (1996).
99. Charman, W. N., Lai, C. S., Finnin, B. C. & Reed, B. L. Self-association of nicotinamide in aqueous solution: mass transport, freezing-point depression, and partition coefficient studies. *Pharm Res* **8**, 1144–50 (1991).

100. Toth, P. P. New insights in the treatment of dyslipidemia: A focus on cardiovascular event reduction and the antiatherosclerotic effects of atorvastatin. *Curr Atheroscler Rep* **7**, 335–343 (2005).
101. Putnam, R. W. Intracellular pH Regulation. in *Cell Physiology Source Book: Essentials of Membrane Biophysics* 303–321 (Elsevier, 2011).
102. King, L. & Plun-Favreau, H. Mitophagy. in *Parkinson's Disease* 139–177 (Elsevier, 2017).
103. Yoboué, E. D., Manon, S. & Camougrand, N. Mitochondria as Signaling Platforms. in *Mitochondria in Obesity and Type 2 Diabetes* 33–62 (Elsevier, 2019).
104. Peña, A., Sánchez, N. S. & Calahorra, M. The Plasma Membrane Electric Potential in Yeast: Probes, Results, Problems, and Solutions: A New Application of an Old Dye? in *Old Yeasts - New Questions* (InTech, 2017).
105. Peña, A., Sánchez, N. S. & Calahorra, M. Estimation of the electric plasma membrane potential difference in yeast with fluorescent dyes: Comparative study of methods. *J Bioenerg Biomembr* **42**, 419–432 (2010).
106. Peña, A., Uribe, S., Pardo, J. P. & Borbolla, M. The Use of a Cyanine Dye in Measuring Membrane Potential in Yeast'. *Arch Biochem Biophys* **231**, 217–225 (1984).

# Fluorescent Probe for in Vivo Partitioning into Dynamic Lipid Droplets Enables Monitoring of Water Permeability-Induced Edema

Cinthia Hernández-Juárez, Gilberto Morales-Villafaña, Fernando López-Casillas, and Arturo Jiménez-Sánchez\*



Cite This: <https://doi.org/10.1021/acssensors.3c00725>



Read Online

ACCESS |



Metrics & More



Article Recommendations



Supporting Information

**ABSTRACT:** Lipid droplets (LDs) are intracellular organelles found in most cell types from adipocytes to cancer cells. Although recent investigations have implicated LDs in numerous diseases, the current available methods to monitor them in vertebrate models rely on static imaging using fluorescent dyes, limiting the investigation of their rapid in vivo dynamics. Here, we report a fluorophore chemistry approach to enable in vivo LD dynamic monitoring using a Nernstian partitioning mechanism. Interestingly, the effect of atorvastatin and osmotic treatments toward LDs revealed an unprecedented dynamic enhancement. Then, using a designed molecular probe with an optimized response to hydration and LD dynamics applied to Zebrafish developing pericardial and yolk-sac edema, which represents a tractable model of a human cardiovascular disease, we also provide a unique dual method to detect disease evolution and recovery.

**KEYWORDS:** fluorescent probes, lipid droplets, membrane hydration, Nernst partitioning, yolk edema



Lipid droplets (LDs) were considered for decades as a simple cytoplasmic inclusion of fat,<sup>1</sup> but today, they are formally recognized as highly dynamic organelles with crucial functions in lipid and energy homeostasis, which are localized in most cell types and characterized by a monophospholipid membrane surrounding a hydrophobic lipid core.<sup>2</sup> The role of lipid droplets in redox homeostasis and cellular stress has also been correlated to cancer as a pool energy storage.<sup>3</sup> However, in vivo imaging of lipid droplet dynamics either in adipocytes or other cell types is currently highly limited since lipophilic dyes stain most of the subcellular membranes. Understanding the LD dynamics in vivo rather than in fixed adipose tissue (AT) or cultured live cells is crucial since the size of the lipid droplet as well as the alternating periods of growth and consumption can change very rapidly in response to fluctuating metabolic needs.<sup>4</sup>

Screening of the AT pool in mice requires tissue fixation and sectioning, thus losing key features of the tissue structure.<sup>5</sup> Importantly, one of the most promising emerging vertebrate models for lipid-associated diseases such as dyslipidemia, cardiovascular diseases, and cancer is zebrafish.<sup>6</sup>

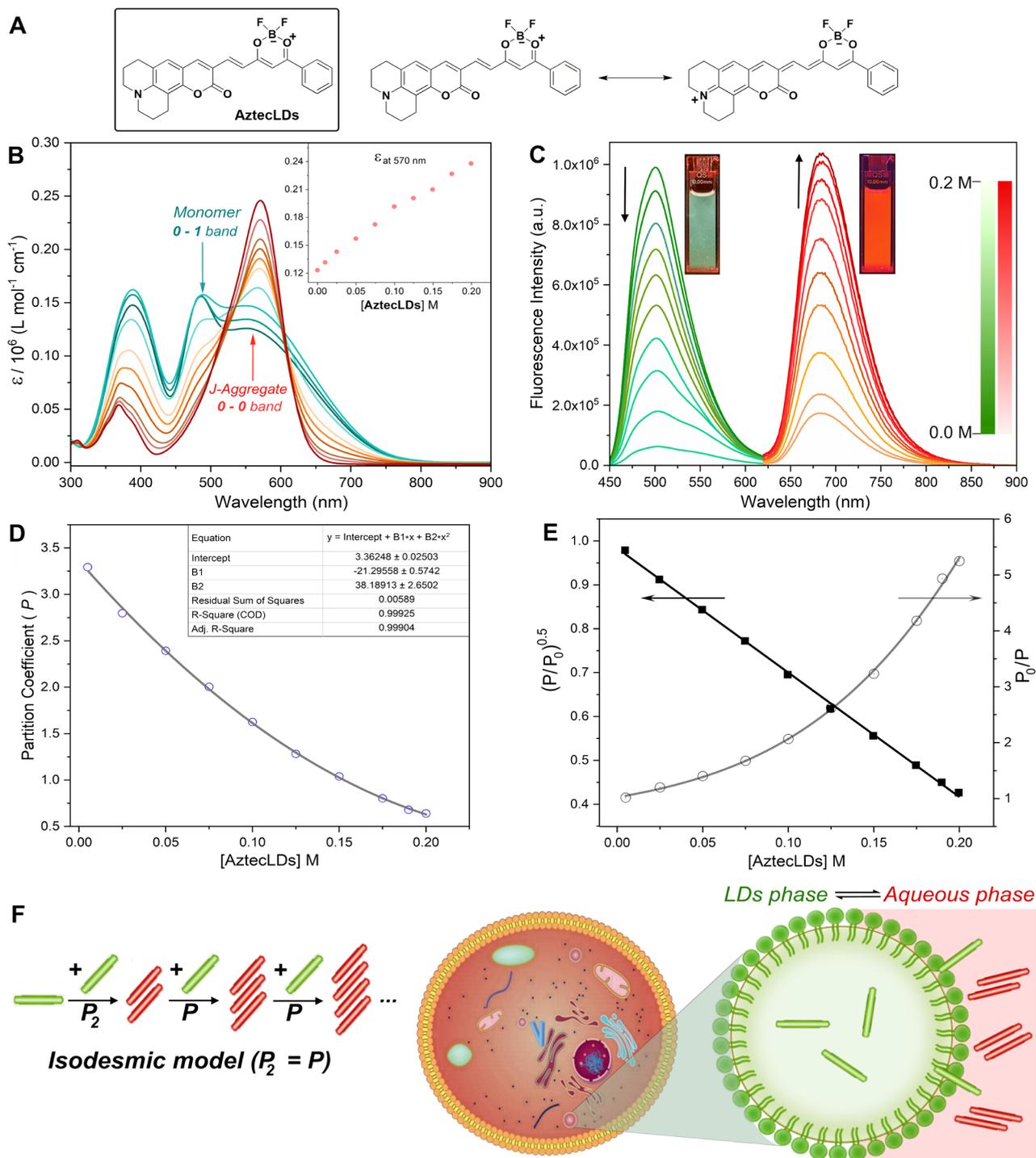
The zebrafish adipose tissue is highly similar to mammalian white adipose tissues, and a comprehensive identification and classification of zebrafish AT has been reported,<sup>7</sup> providing an accurate classification and quantification system of AT development in terms of timing and dynamics. Thus, the embryological stage of zebrafish between 24 and 72 h-post-fertilization (hpf) AT is located in the visceral yolk sac composed of yolk lipids located in the abdominal and pancreatic zones but also asymmetrically localized into the right flank ventral to the

swim bladder and in the subcutaneous caudal fin. Another advantage of zebrafish as a vertebrate model is related to the ability of the larvae to allow the non-invasive monitoring of heart and brain conditions, activities, and morphologies.<sup>8</sup>

In the search toward the first neutral lipid dye for LD dynamics, an interesting approach to label LDs and monitor their behavior in the cells of zebrafish larvae has been described using a perilipin-2 transgenic reporter.<sup>9</sup> However, this model requires a transgenic zebrafish line, restricting the application to a particular model. On their part, available fluorescent dyes require high-dose and repetitive staining for in vivo models, which prevents fluorescence recording required in the continuous monitoring of LD dynamics. Even more, commercial fluorescent dyes such as BODIPY 493/503 and Nile Red have serious limitations in specificity for the in vivo lipid droplet monitoring.<sup>9–11</sup> In this work, we found that BODIPY 493/503 exhibits non-selective LD localization and a low signal-to-noise ratio for in vivo zebrafish staining (Figure S14). In vivo imaging of LD dynamics even in the static domain using lipophilic localizers remains an unmet need, although white adipocytes containing a large unilocular lipid droplet have been successfully labeled by lipophilic dyes.<sup>12</sup>

Received: April 11, 2023

Accepted: July 7, 2023



**Figure 1.** (A) Chemical structure of the AztecLD probe. The synthetic methodology is described in [Scheme S1](#). Stock solutions (1 M) of *n*-octanol in pH 7.4 HEPES solution were used for the following experiments: (B) UV-vis absorption spectra of increased AztecLD concentrations from 0 to 0.2 M in 0.6 M *n*-octanol aq., highlighting the monomer (0–1 band) vs aggregation (0–0 band) features. (C) Corresponding fluorescence spectra recorded at the green ( $\lambda_{\text{exc}} = 450 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 500 \text{ nm}$ ) and red ( $\lambda_{\text{exc}} = 620 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 680 \text{ nm}$ ) channels. Insets indicate the range of concentrations reached. (D) Plot of partition coefficients ( $P$ ) upon varying concentrations (0 to 0.2 M) of AztecLD in *n*-octanol. (E) Relationship between calculated values for the monomeric concentration of AztecLD in *n*-octanol vs  $P_0/P$ , which is the empty symbols, and  $(P/P_0)^{0.5}$ , which is the filled symbols. Data were fitted to [eqs S4 and S13](#). (F) Schematic illustration of the isodesmic model with equal constant  $P_2 = P$  (left) and the LD Nernstian partitioning scheme through the AztecLD monomer:self-association distributions (see the [Supporting Information](#) for details). The optical setup for imaging is described in the [Experimental Section](#).

In terms of metabolism, zebrafish process dietary lipids similar to humans and the drugs used to treat hypercholesterolemia in humans are also effective in this vertebrate model.<sup>13</sup> Embryos treated with the more hydrophobic statin, namely, Lipitor

(atorvastatin, ATV), exhibited primordial germ-cell migration defects, strong LD dynamics, and only mild morphologic abnormalities.<sup>14</sup> These zebrafish-based assays are important tools to understand aspects of lipid biology with significant

clinical implications. Zebrafish retains remarkable similarities with humans in molecular mechanisms associated with hyperlipidemia and atherosclerosis, including lipid metabolism and lipoprotein oxidation.<sup>15</sup> It has also been shown that element-controlled regimen without genetic manipulation is enough to induce hyperlipidemia in zebrafish.<sup>16</sup>

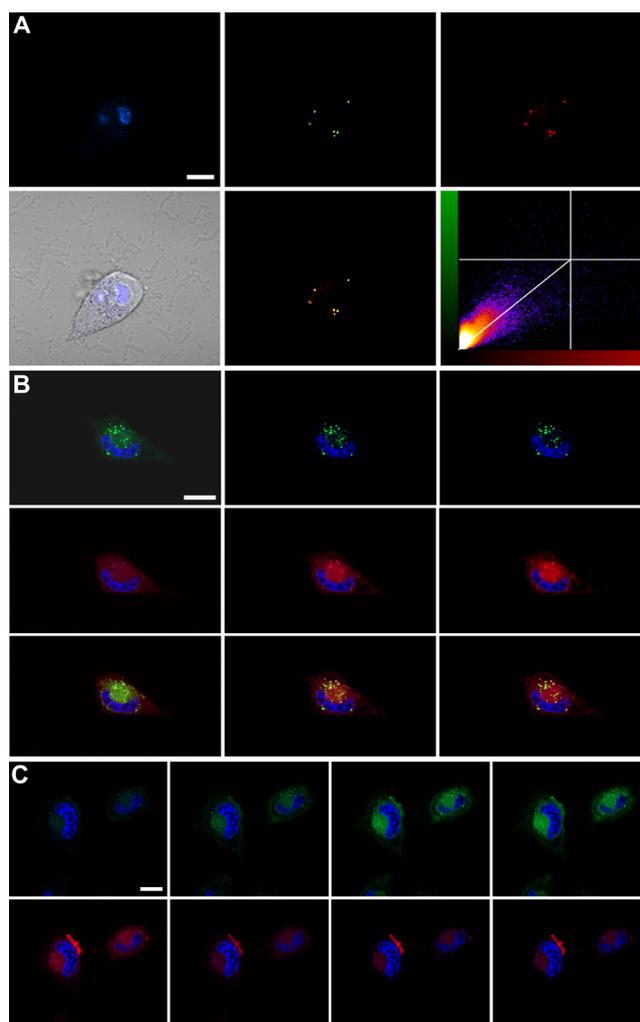
Given the recent interest in lipid droplet metabolism during cellular development and disease and treatment responses, fluorescent probes enabling the visualization and monitoring of metabolic processes involving LD dynamics are meant to provide further understanding of the intriguing role of these lipid organelles in subcellular metabolism. However, most of chemical probe localizers fail to provide selective LD staining both in cellulo and in vivo, resulting in a small amount of successful LD probes that do not share a general targeting mechanism. Consequently, there is no guide to design selective LD localizers. Regardless of whether this is an interesting question that has captured the attention of the fluorophore chemistry community for years, we hypothesize that a mechanism that efficiently exploits the self-association process between aqueous and lipidic environments could be a great starting point.

## RESULTS AND DISCUSSION

**Fluorescent Probe Design.** In an effort to improve the targeting mechanism of LDs, we synthesized a new lipophilic and neutral BF<sub>2</sub>-derived fluorophore named AztecLD as part of our AztecFluors molecular family<sup>17</sup> (Figure 1). The AztecLD presents clear  $\lambda$ -ratiometric dual-emission features when excited at one specific wavelength and displays optimal photophysical signatures such as tunable fluorescent quantum yields and lifetimes, high molar absorptivity, and low dependence on solvent polarity in terms of the dielectric constant (see Table S1). Importantly, to be consistent in the calibration analysis where both the spectral and imaging microscopy data are directly compared, we conducted all our fluorescence spectroscopy recordings equal to the microscope channel setup, that is,  $\lambda_{\text{exc}} = 480$  and  $640$  nm and detected at  $\lambda_{\text{em}} = 500$  and  $680$  nm for the green and red channels, respectively (Figure 1B–D).

As part of our current research on LD biophysics, similar coumarin-derived fluorophores have been developed and tested as LD localizers, and here, the AztecLD probe presented optimized selectivity properties for in cellulo monitoring of LD dynamics even at different probe concentrations (Figure 2). Previously reported coumarin-derived probes are presented in Table S2.

We initially considered that the partition coefficient ( $P$ ) parameter dictates the overall LD targeting mechanism. Nevertheless, although  $P$  clearly plays a role, the molecular geometry and interestingly the feasibility to form molecular aggregates (self-association) are also crucial factors influencing the selectivity toward LDs. The design of AztecLD prioritized the 1,3-diketone-BF<sub>2</sub> scaffold due to its molecular rigidity, high absorptivity, fluorescence emission properties, and also excellent photostability (Figure S7A) for imaging microscopy. Then, the longitudinal axis of AztecLD was designed to contain a  $\pi$ -conjugated hydrophobic system with subtle electronic dipolar properties that were exploited in microenvironmental sensing and analysis but with no strong polarity sensitivity to avoid solvatochromic interference, thus enabling hydrophobic versus hydration interactions. Fortunately, low polarity dependence was observed in AztecLD as corroborated with standard dichloromethane:DMSO continuous variation where only



**Figure 2.** Confocal images of AztecLDs co-stained with Hoechst 33342 (blue channel) in SK-Lu1 cells recorded at the green and red channels and merged images. (A) Co-localization analysis for  $4 \mu\text{M}$  AztecLDs (green channel) with  $6 \mu\text{M}$  Nile Red (red channel) incubated for 30 min. (B) Nernstian dual-channel partitioning upon fluorophore concentration increments of 4, 6, and  $8 \mu\text{M}$ . (C) Osmotic stimuli using 10% NaCl and 250 mM mannitol stimuli. Scale bars represent  $20 \mu\text{m}$ . The optical setup for imaging is described in the Experimental Section.

DMSO solubility influenced the fluorescence intensity of the probe (Figure S8). Thus, the design rationale for AztecLD was based on the hypothesis that a self-association process between aqueous and lipidic environments could be a good starting point for designing selective LD localizers as well as the structures of reported coumarin-based probes, as shown in Table S2. Further, TD-DFT HOMO–LUMO distributions obtained at the B3LYP/6-31G(d,p) level of theory presented in Figure S9A corroborated that the dipolar distribution in the molecule is not spatially efficient (high orbital overlap) and thus no significant solvent effect is expected.

**Spectroscopic Features of AztecLDs.** The spectroscopic properties of AztecLD are represented by dual-band absorption and emission features with  $\lambda_{\text{abs}} = 570$  nm and  $\lambda_{\text{em}} = 680$  nm as maximum intensities in aqueous media. Remarkably, the hydration effect was the most influencing factor changing the AztecLD fluorescence profiles, allowing a dual-band emission pattern even when excited at the TxR channel ( $\lambda_{\text{ex}} = 540$  nm).

Particularly, the hydration effect by means of dioxane:water continuous variation and the molecular aggregation through the THF:H<sub>2</sub>O studies (Figure S10) were determinants in proposing a new response mechanism for LDs based on the monomer and self-association partitioning of the molecular probe. It is worth mentioning that the THF:H<sub>2</sub>O profile, which promotes J-aggregate formation of the AztecLD, was also analyzed by dynamic light scattering (DLS) means in order to characterize the particle size distribution, and we found a heterogeneous distribution of particles with sizes ranging from ca. 40 nm at high THF concentrations to 180 nm at high H<sub>2</sub>O content (Figure S11). This result suggests that although different morphologies can be formed upon aggregation, the larger sizes are favored when dye aggregation is promoted. This is in agreement with the UV-vis absorption THF:H<sub>2</sub>O continuous-variation titration.

When using the standard *n*-octanol:H<sub>2</sub>O liquid system, the monomer versus aggregation properties arose (Figure 1B–D). The red-shifted absorption with a similar bandwidth and enhanced 0–0/0–1 band ratio to the monomer are the representative features of J aggregates as is indeed in the case of AztecLD, which exhibits an increased 0–0/0–1 band ratio trend upon increasing the aqueous content versus *n*-octanol  $\nu/\nu$  (Figure 1B). It is worth mentioning that the system was tested with AztecLD concentrations ranging from 0.01 to 0.2 M, which allowed for the expansion of the system from monomer to aggregate formations. Thus, studies using *n*-octanol:H<sub>2</sub>O continuous variations, which represent a more realistic media in terms of lipid–fluorophore interactions, successfully reproduced the monomeric green emission and the self-association red emission signals (Figure 1C,D).

Similar to the widely known Nernstian mechanism used for mitochondrial probes where the membrane potential drives the mitochondrial targeting by purely electrostatic interactions, we visualized that the equilibrium distribution between two immiscible liquid phases (the so-called Nernst distribution law)<sup>18</sup> such as those present in the cytosolic and LD compartments could be the driving force to accumulate the molecular probe into the LDs via a monomer (highly lipophilic phase) and self-associated (aqueous phase) partitioning scenario.

The Nernst partition coefficient in LDs is then defined as the equilibrium constant for the distribution of species between the LD phase and the surrounding cytosolic phase. To demonstrate the self-association partition, we used Connors' formalism detailed in the Supporting Information.<sup>19</sup>

Variation of the AztecLD concentration in *n*-octanol translates into an increase in the red-fluorescence emission with the simultaneous green-emission decrease at larger aqueous contents, highlighting the formation of molecular aggregates. All the way around at larger phospholipid contents, the green-channel emission predominates, which is assigned to the monomeric species. This was further confirmed since the THF:water variation to form aggregates shows the same trend in the fluorescence spectra. The outstanding fluorescent profile of the AztecLD fits into the abovementioned self-association response scheme, representing a powerful new tool for in cellulo and in vivo imaging microscopy since the AztecLD dual-color pattern is selectively activated by the specific liquid–liquid interphase distinctive of LD–cytosol environments.

Thus, we sought to determine the observed partition coefficient ( $P$ ) of AztecLDs using a standard octanol:water procedure at different concentrations (Figure 1D).<sup>20</sup> As shown, the  $P$  values decreased with increasing concentrations of

AztecLDs in the organic phase. The data of Figure 1D were fitted to a second-order polyexponential equation (Figure 2D inset), and the intrinsic partition coefficient ( $P_0$ ) was determined from the calculated intercept at a zero AztecLD concentration. The  $P_0$  value was  $3.36 \pm 0.02$  ( $n = 10$ ).

The Nernst partition coefficient data were treated according to linear eq S4 and the profile plotted as ( $P_0/P$ ) versus AztecLD increased concentrations in the *n*-octanol organic phase (Figure 1E). Using this formalism, the extent of self-association is constrained to a dimer model (association of two molecules) where a linear trend is expected. To note, the model appeared inadequate as indicated by the non-linear trend. For this reason, we determined the self-association of AztecLDs in a more complex scenario by incorporating an isodesmic model that considers stepwise associations.<sup>21</sup> Using eq S13, which was derived according to the isodesmic model for step association with equal equilibrium constants,<sup>22</sup> a linear relationship with  $R^2 = 0.998$  between  $(P/P_0)^{0.5}$  and AztecLD concentrations was obtained. The slope is equal to  $-3.12 \text{ M}^{-1}$ , giving, from eq S13, an association constant of  $10.5 \text{ M}^{-1}$ , which is in agreement with some organic molecular aggregates previously reported.<sup>19,21,22</sup>

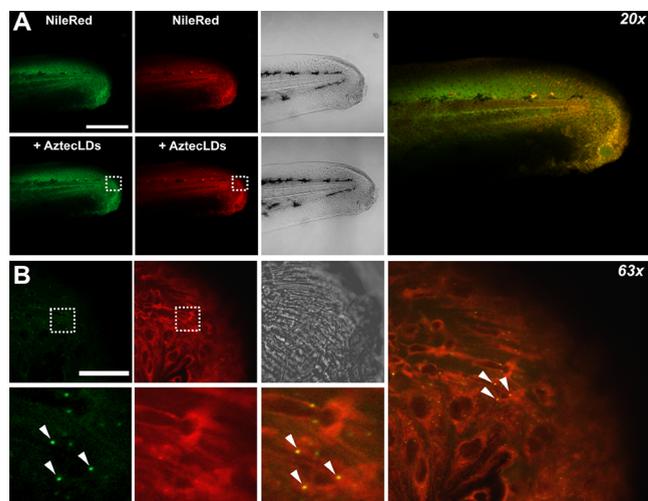
Therefore, such a linear behavior indicates that the step-association model is adequate to describe the partitioning features of the AztecLDs between two immiscible phases, namely, water and *n*-octanol. Importantly, the restriction we considered to derive eq S13 is that the organic phase only contains monomeric AztecLD species, which is a mass balance restriction supported by fluorescence spectroscopy and imaging microscopy data since LDs are seen in the green channel *vide infra*.

**Subcellular Performance of AztecLDs.** Once we have characterized the Nernst partitioning scheme of the AztecLD probe, we next analyzed the in cellulo localization properties. The probe specifically localizes LDs of live SK-Lu-1 cells with a Pearson's co-localization coefficient of 0.948 in the green channel (Figure 2A). Interestingly, we noticed that, upon fluorophore concentration increments from 4, 6, and 8  $\mu\text{M}$ , the red channel emission of the probe localized in LDs began to distribute into the cytosol, even reaching the plasma membrane domain while the green confocal channel kept the same LD localization with better imaging contrast, resulting in a clear Nernstian partitioning (Figure 2B).

At the beginning of the probe-staining protocol, we observed a subtle plasma membrane localization that after 5 min disappears and the probe completely distributes into LDs (in the green channel) and surrounding membranes (in the red channel), highlighting the effect of the concentration (dose-dependent behavior) in the probe aggregation process; see also Figure S15A for 0.1, 2, and 4  $\mu\text{M}$  probe concentrations. This result is indicative of dye aggregation outside the lipid droplet membrane, showcasing a clear self-association Nernstian distribution into the subcellular environment. On the other hand, the co-localization imaging allowed analysis at the red-channel with the standard in cellulo LD localizer Nile Red (figure 2A). Further, the osmotic stimuli using NaCl and mannitol response of AztecLDs in cellulo shown in Figure 2C indicated a green-emission response recovery, evidencing the ability of the probe to efficiently monitor the osmoregulation process (the osmoregulation features of AztecLDs will be discussed below under **Pericardial and Yolk-Sac Edema Monitoring**).

**In Vivo Imaging Properties.** We then proceeded to assess the imaging scope of the probe through in vivo studies

conducted in the zebrafish (*Danio rerio*) model. The AztecLDs exhibited excellent co-localization properties when compared with the Nile Red dye, which is a known LD co-localizer (Figure 3). However, Nile Red was found to exhibit a non-selective LD



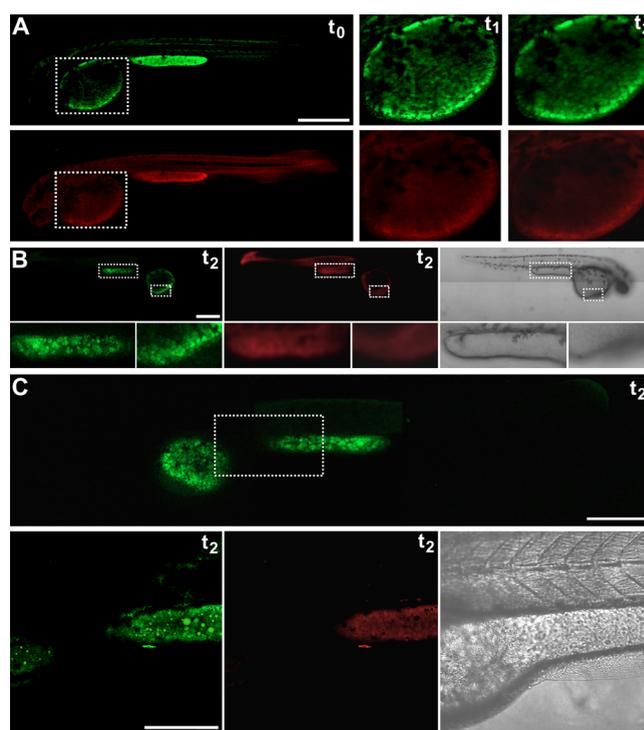
**Figure 3.** Co-localization images of 48 hpf zebrafish for the green and red channels of the  $8 \mu\text{M}$  Nile Red co-localizer and then after 30 min incubation with  $8 \mu\text{M}$  AztecLDs. (A) Using a  $20\times$  microscope objective (scale bar =  $200 \mu\text{m}$ ) and (B) a  $63\times$  objective (scale bar =  $20 \mu\text{m}$ ). Arrowheads show AztecLD staining of LDs at the green channel. The optical setup for imaging is described in the [Experimental Section](#).

distribution in zebrafish epidermal cells, highlighting the AztecLD localization features in cellulo and in vivo. The co-localization properties in zebrafish caudal fin is presented in Figure 3, while the whole-body and yolk-sac areas are presented in Figure S14.

The AztecLDs also allowed for the dual imaging scenario observed in the cell culture. However, a clearer and more conclusive imaging profile was observed in the zebrafish model. As shown in Figure 4A,B, the green channel evidenced the probe distribution exclusively at the yolk sac and visceral cavity. High-resolution confocal imaging also points to a subcutaneous caudal fin AT localization (Figure S12).

Convinced that the fluorescent probe concentration affects its localization in LDs, we then explored the optimal concentration of AztecLDs undergoing self-association outside the LDs. Notably, almost any explored probe concentration provided the same imaging profile and just the imaging quality and contrast varied according to the concentration range from 2 to  $20 \mu\text{M}$ . The dual-channel imaging profile of 2 and  $8 \mu\text{M}$  AztecLD concentrations observed in the yolk area is shown in Figure 4A,B, while similar imaging at different concentrations is presented in Figure S13.

Remarkably, the green-channel imaging clearly shows the spherical morphology of large lipid droplets in the yolk-sac area, and such a visualization of LD dynamics is rather uncommon in fluorescence microscopy; a comparison with commercial BODIPY 493/503 staining is presented in Figure S14A, where no specific localization was observed, making it difficult to analyze the yolk-sac area or LDs using this dye. The red-channel recordings provided consistent data of self-association (dye aggregation) in the aqueous environment surrounding the spherical lipid domains of the yolk area. In the whole fish projection, zones of hydrated tissue can also be visualized in the



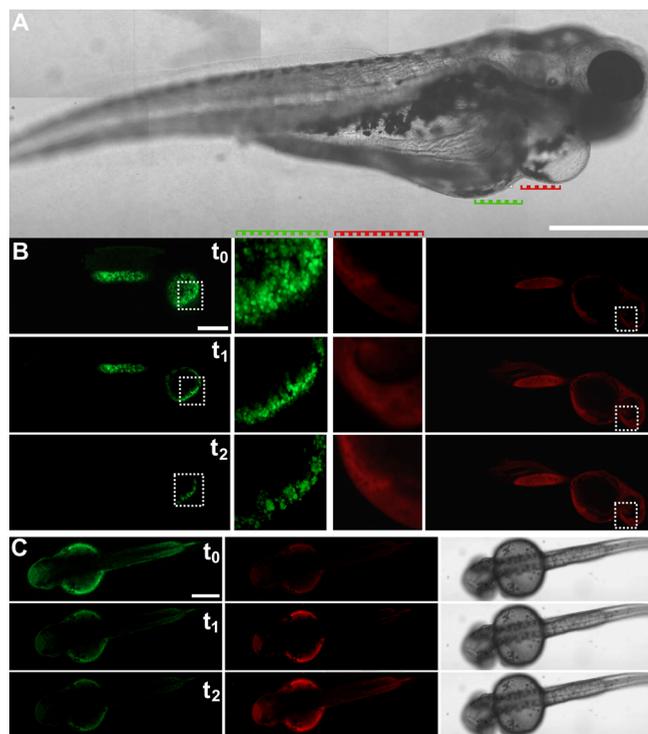
**Figure 4.** Confocal images of in vivo 48 hpf zebrafish localization recorded at the green and red channels for (A)  $2 \mu\text{M}$  and (B)  $8 \mu\text{M}$  AztecLDs. The images were recorded at times  $t_0 = 10 \text{ min}$ ,  $t_1 = 15 \text{ min}$ , and  $t_2 = 120 \text{ min}$  after incubation. (C) Airyscan high-resolution confocal imaging at  $t_2$  of  $8 \mu\text{M}$  AztecLDs for zebrafish treated with  $1.5 \mu\text{M}$  ATV since fertilization. Scale bars represent  $200 \mu\text{m}$ . The optical setup for imaging is described in the [Experimental Section](#).

red channel and, importantly, they do not co-localize with the green subcutaneous AT staining.

**LD Dynamics Monitored with AztecLDs.** Having in mind that AztecLDs allow for excellent spatial-resolution visualization of LD dynamics even for long-time monitoring, we decided to perform statin treatments through a low-dose atorvastatin (ATV; Lipitor) stimulus in born zebrafish, where the ATV statin is a potent inhibitor of hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase (HMGCR), which is the critical enzyme in the mevalonate pathway, leading to cholesterol biosynthesis.<sup>23</sup> For this reason, ATV is clinically used for its significant lipid-lowering effects. Results using Airyscan high-resolution confocal imaging are presented in Figure 4C and Figure S16. Outstanding results were found when monitoring the 24 to 72 hpf zebrafish embryos. The  $1.5 \mu\text{M}$  treatment caused a serious lipid-droplet dynamic increment, namely, LD fusion or coalescence, fission or ripening, and motility or motile behavior (here, it is important to note that both organelle dynamic terminologies were used for clarity reasons since fusion, fission, and motility are not frequently used to define LD dynamics).<sup>24</sup> Treatment with low-dose  $1.5 \mu\text{M}$  ATV is presented in Figure S16 and Movies S1 and S2, and in general, the same trend was observed even at a  $0.5 \mu\text{M}$  ATV stimulus. In addition to a well-defined LD visualization in the green channel, the red confocal recordings also evidenced a significant fluorescence increment. A plausible reason is that internal LD pressure and osmotic variations are changing, driving more water into the yolk-sac area *vide infra*.

Our results suggest that ATV is inducing higher LD dynamics and accumulation in zebrafish prevailing in adipose tissues. Furthermore, ATV is tightly related to cardiovascular events in

humans,<sup>25</sup> and as mentioned above, the dual-channel imaging of AztecLDs could also allow the analysis of hydration zones in vivo, which are related to cardiovascular homeostasis.<sup>26</sup> In fact, we observed that a pericardial and yolk-sac edema began to form, suggesting a failure of the incoming water barrier (Figure 5). To note, statins have demonstrated to alter renal sodium and water homeostasis.<sup>27</sup>



**Figure 5.** Confocal images of 72 hpf zebrafish developing pericardial and yolk-sac edema in 10% NaCl salt conditions and monitored by 10  $\mu\text{M}$  AztecLDs under the green and red channels and (A) bright field view at 45 min incubation. (B) Lateral and (C) dorsal views for the time-lapse effect in the Nernstian dual-channel partitioning of AztecLDs at  $t_0 = 45$  min,  $t_1 = 80$  min, and  $t_2 = 120$  min after incubation. Scale bars represent 200  $\mu\text{m}$ . The optical setup for imaging is described in the [Experimental Section](#).

To assess the efficiency of AztecLDs to continuously monitor such an osmotic imbalance, we modified the osmotic gradient between the interior body fluids and the environmental water of the developing zebrafish. In context, zebrafish are continuously surrounded by a medium of very low osmolarity, and thus, the ability to exclude water is essential. They depend on their skin, gills, and kidney to maintain properly the internal water volume and osmolarity. The skin forms a barrier to water entry, while water that gets past this barrier is constantly being excreted by the kidneys. The cardiovascular function is essential for kidney development;<sup>28</sup> however, during the first two days of development,<sup>29</sup> the embryo must maintain the osmotic balance without the aid of the kidney, and it is unlikely that the edemas are caused by an insufficient excretion of excess water with the plausible reason being that they are caused by an imbalance in the permeability barrier of the skin. Importantly, this biological water barrier comprises two separate barriers, namely, one protecting the embryo and one surrounding the yolk sac.<sup>30</sup>

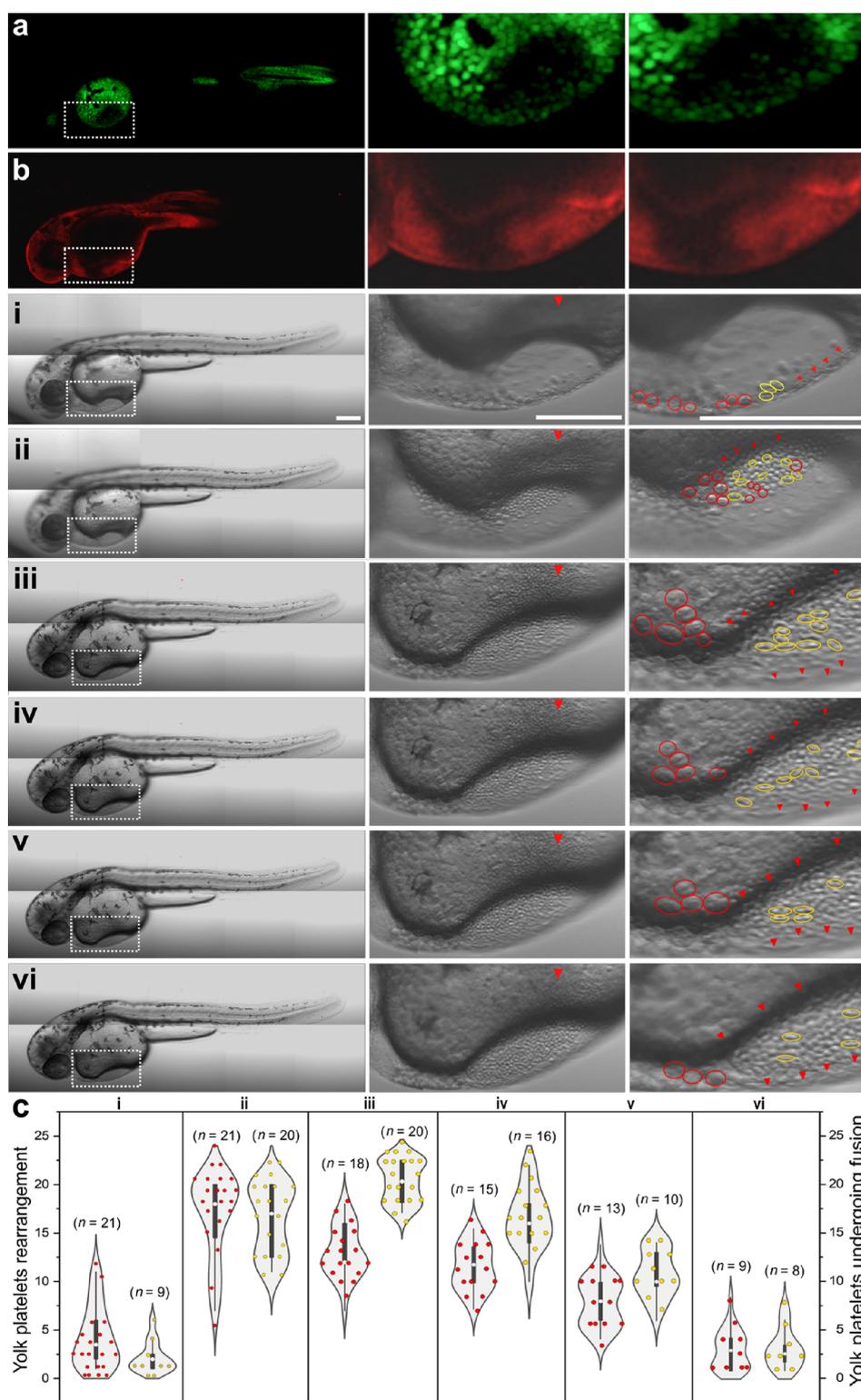
Fluorescent probes that are able to monitor water entry into the yolk sac and pericardial zone are highly desired. Here, we

used 5 and 10% NaCl content to drive water into the fish. Notably, zebrafish treated with such an osmotic gradient exhibited a severe pericardial and yolk-sac edema phenotype because of the incoming-water barrier failure<sup>25</sup> (Figure 5). This condition is called blue-sac syndrome, where the cellular and extra-cellular fluids of the fish are hyperosmotic compared to the surrounding water.<sup>31</sup> Our first attempts to monitor the osmotic imbalance of blue-sac edema failed due to proper dye permeation into the fish epidermal barrier since 10% NaCl content is also misbalancing the medium ionic strength and the water influx competes with dye entry. Then, we increased the incubation time from 15 min to 45 min and the dye concentration to 10  $\mu\text{M}$ , which are also common standard incubation conditions used in most staining protocols. Satisfactorily, we were able to confirm the expected response profile. Interesting differences arose, that is, the green channel exhibited significant quenching while simultaneously the red-channel recordings registered a subtle fluorescence increment, indicating a strong hydration dynamic between pericardial and yolk-sac edemas. These results provide further evidence on the Nernstian partitioning mechanism operating the localization distribution and optical responses of AztecLDs (Figure 5B,C). Finally, as a control experiment, we evaluated the reversibility of the probe response. As mentioned, the 10% NaCl medium concentration slows the probe equilibration, so we were able to monitor a partial recovery of the green-fluorescence response (Figure S17). Also, we evaluated the effect of 5% NaCl in developing zebrafish in order to facilitate the probe to recover the green-emission response upon continuous 5% NaCl and 250 mM mannitol stimuli, finding that the AztecLDs efficiently monitor the osmoregulation process (Figure S18).

**Pericardial and Yolk-Sac Edema Monitoring.** To demonstrate the applicability of the approach, we conducted a study in which we measured the level of rearrangement and fusion of yolk cells (platelets) during edema phenotype development, representing a non-previously assessed yolk dynamic. The structure of zebrafish yolk mass is not uniform, where the yolk volume is occupied by a central mass of yolk cells or platelets surrounded by a thin layer of cytoplasm and nuclei, which is known as the yolk layer.<sup>32</sup>

The challenge in edema monitoring implies several requirements, fundamentally: (1) to stain not only internal yolk lipids but epidermal yolk cells (platelets) as well, (2) to respond to an osmotic imbalance, (3) to allow continuous monitoring (stable signal response overtime) and, (4) to have an internal reference signal or second response channel.<sup>33</sup> Fluorescent probes able to overcome these features using single-molecule assays have not been reported to date, and commercial fluorescent reporters only fulfill points 3 and 4. Bioanalytical protocols using transgenic zebrafish models expressing fluorescent proteins for LDs<sup>9</sup> together with yolk platelet markers could be a viable dual strategy. However, this type of approach requires a complex workflow and separate signal recordings that may cause a yolk phenotypic drift and analytical bias. We take advantage of the unique AztecLD features and monitored a zebrafish developing yolk and pericardial edema (Figure 6).

Using high-resolution confocal microscopy, we set out to evaluate the level of motility, rearrangement (a means of morphology changes upon yolk repair),<sup>23</sup> and fusion of yolk platelets in such a phenotype. We therefore sought to remove the osmotic force through the addition of mannitol as previously indicated for in cellulo studies where suitable osmoregulation features of AztecLDs were observed (Figure 2C). Since



**Figure 6.** Pericardial and yolk-sac edema of 72 hpf zebrafish monitored by 10  $\mu\text{M}$  AztecLDs. Insets are two subsequent Airyscan views. (a) Green and (b) red channels corresponding to panel i (see Figure S19 for full fluorescent views). Panels i–vi show the edema yolk epithelial repair monitored from 10–60 min using mannitol, respectively. Red circles are yolk platelets undergoing motility toward the yolk mass, while yellow circles represent platelet fusion, within 60 min. The red triangles show platelet rearrangement in the yolk-sac border of edema. (c) Violin plots depict the number of yolk platelets undergoing rearrangement (red plots) and fusion (yellow plots), circles represent median values, bars represent 95% confidence intervals, and values in parentheses show the numbers of different cells. Scale bars represent 200  $\mu\text{m}$ . The optical setup for imaging is described in the Experimental Section.

mannitol does not cross biological membranes, it represents an excellent osmolyte after a NaCl stimulus where subtle to strong

hydration effects are expected. Then, 250 mM mannitol was used ( $\sim 250$  mOsm/L) compared to normal aquarium

conditions ( $\sim 1$  mOsm/L). As expected, the green/red fluorescence localization pattern indicated a proper self-association process observed in the whole yolk mass (Figure 6a,b). Interestingly, abolishing the osmotic gradient between the interior body fluids and the water environment by increasing the osmolarity of the surrounding water with mannitol slightly reduced both pericardial and yolk-sac edema (Figure 6i–vi). Such observations resulted in relevance to our work since osmolarity-driven edema repair in zebrafish was only proven few years ago.<sup>29</sup> Thus, although mannitol has only a partially reversed edema phenotype, here, we provide evidence that the osmotic stimulus is synchronized with the yolk platelet dynamics through motility, fusion, and rearrangement. Therefore, 60 min of LD dynamics was analyzed, revealing an activated yolk platelet rearrangement by means of a significant number of cells undergoing morphology changes, while simultaneous platelet fusion was also highly activated (Figure 6i–vi, yellow circles). The platelets' dynamics described a trajectory; the red circles indicate yolk platelets undergoing motility toward the yolk mass, and red triangles show platelet rearrangement in the yolk-sac border of edema (red symbols of Figure 6ic,–vi, which correspond to ca. 20 selected cells). Overall, this trajectory implies a higher dynamic in the edema–yolk interphase.

## CONCLUSIONS

The synthesized AztecLD fluorescent probe represents a new tool allowing for functional visualization of water entry into the yolk dynamics in zebrafish developing pericardial and yolk-sac edema. Here, we also exploited the self-association process of the probe between aqueous and lipidic environments as a dual-channel response mechanism using differential imaging microscopy recordings and avoiding emission signal interferences, thus proposing a new fluorophore classification called Nernstian partitioning probes. Although the observed partition coefficient of a fluorophore is key to localize LD organelles, we demonstrated that Nernstian partitioning mechanism allowed for the monitoring of LD dynamics in healthy models but also was benchmarked against the disease status of developing zebrafish. The changes observed in edemas highlighted a strong increase in LD dynamics with yolk platelets undergoing fusion, motility, and rearrangement during yolk mass repair.

Finally, in a perspective of the work, in the search toward a generalized targeting mechanism of LDs, which traces parallel to the mitochondrial Nernstian targeting mechanism or the lysosomotropic targeting mechanism of lysosomes, it is worth noticing that not all the positively charged molecules are selective to mitochondria and not all the aliphatic weak bases target lysosomes. In this sense, here, we envision that the Nernstian partitioning mechanism could guide LD selective targeting and analysis. Although mitochondrial Nernstian fluorophores are nowadays improved using the acetoxymethyl (AM) retention mechanism<sup>34</sup> or lysosomotropic probes could also be improved using the organelle's membrane potential,<sup>35</sup> the LD targeting probes will be improved. To this end, approaches such as the ground-state monitoring of membrane hydration using optimized fluorophores having  $(CF_3)C=O$  hydrolysable functions<sup>36</sup> as well as switchable probes allowing super-resolution microscopy<sup>37</sup> could be tremendously useful in edema phenotype continuous monitoring.

## EXPERIMENTAL SECTION

**General Information.** General information for the reagents, instruments, and analytical methods in this study is available in the Supporting Information.

**Chemicals and Instruments.** Commercially available starting materials, components of buffer solutions (CHES, MOPS, MES from Sigma, Mexico) and solvents were used as supplied.  $^1H$  and  $^{13}C$  NMR spectra were recorded at room temperature on a 500 MHz Bruker spectrometer with chemical shifts (ppm) relative to  $(CH_3)_4Si$ . High-resolution mass spectrometry (ESI-TOF) was conducted using Agilent Technologies 6530 Accurate-Mass Q-TOF LC/MS equipment. Fluorescence experiments were measured either on a F55 spectrofluorometer from Edinburgh Instruments or in a Cary Eclipse fluorimeter from Agilent, and UV–vis absorption spectra were taken on a Thermo Scientific Evolution diode array UV–vis spectrophotometer.

**Cell Culture.** Live human pulmonary adenocarcinoma epithelial cells (SK-Lu-1) were cultured in RPMI-1640 medium (RPMI Medium 1640 (1 $\times$ ), Gibco, Gaithersburg MD) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS, Invitrogen, Carlsbad CA), L-glutamine (2  $\mu$ M), penicillin G (100 u/mL), and streptomycin sulfate (100  $\mu$ g/mL) at 37  $^\circ$ C with 5% v/v  $CO_2$ . Live SK-Lu-1 cells were seeded on eight Petri dishes of 5 cm in diameter with a glass bottom for 36 h before experiments using RPMI-1640 medium supplemented. Then, specific concentrations of AztecLDs 1–10  $\mu$ M were used. Commercial specific organelle localizers were added on each Petri dish 45 min before imaging experiments. All dishes were washed two times with RPMI.

**Confocal Microscopy.** During confocal imaging, microscope parameters were maintained constant and the excitation light was fully shielded to prevent laser artifacts. The optical detection for the blue channel:  $\lambda_{exc} = 404$  nm,  $\lambda_{em} = 420$  to 440 nm; green:  $\lambda_{exc} = 488$  nm,  $\lambda_{em} = 500$  to 520 nm; and red:  $\lambda_{exc} = 630$  nm,  $\lambda_{em} = 680$  to 700 nm. To avoid cell autofluorescence signal contamination, laser powers were maintained at 0.05 mW (0.2% from a 25 mW laser) and untreated cells were first recorded in order to subtract any native emission signal. Live cells were seeded in eight-well microslides (iBidi, Germany) at a density of 20,000 cells per well one day prior to experiments in MEM alpha with 10% FBS. On treatment day, cells were washed once in MEM alpha with no FBS and incubated with 1–10  $\mu$ M AztecLD probes for 30 min. For experiments with Nile Red, 1  $\mu$ M was added 10 min before AztecLDs (1  $\mu$ M). Cells were then washed twice in MEM alpha with no FBS and imaged maintaining 5%  $CO_2$  and 37  $^\circ$ C during the experiments using an inverted Zeiss LSM 880 microscope upgraded with an incubator or a Nikon AIR upgraded with a spectral detector unit. To achieve better image quality, the whole-body, yolk-sac, and caudal-fin areas were recorded separately. This allows us to obtain the optimal confocal planes specific to each region of the zebrafish. Co-localization studies were performed using BODIPY 558/568  $C_{12}$  (Invitrogen D3835, Waltham, MA, USA) and Nile Red (72,485, Sigma Aldrich, MO, USA).

**IC<sub>50</sub> Determination.** SK-Lu-1 cells were treated with AztecLDs, and untreated cells were considered to have 100% survival. Cell viability was determined by a redox indicator (Alamar Blue). For cytotoxicity assays, the cells were plated in 96-well plates at 5000 cells/well in the RPMI-1640 medium. About 24 h after plating, varied doses of AztecLDs at 0.5, 1, 10, 20, 25, 35, 50, and 60  $\mu$ M concentrations were added in triplicate. Cell viability was evaluated after 48 and 72 h incubation using Alamar Blue fluorescent assay (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). See Figure S1 for details.

**Partition Coefficient (P) Determination.** P values were measured via octanol partitioning by a modification of the shake-flask method. An aliquot of 100 mL of 300 mM of the probe in Tris buffer (10 mM, pH 7.4) and 100 mL of 1-octanol (Aldrich) were added to a 0.5 mL microtube. A buffer was employed in order to measure P of the probe at the physiological pH. The tubes were vortexed for 1 min and centrifuged; 25 mL of each layer was removed and diluted in 100 mL of 3:1 methanol:Tris or methanol:octanol for a final composition of 3:1:1 methanol:octanol:Tris. The aqueous layer was diluted an additional fourfold. Three dilutions were prepared per layer, 100 mL of each

dilution was pipetted into a 96-well plate, and the absorbance ( $A$ ) read at 488 nm and 625 nm wavelengths. The mean  $A_{500}$  of three dilutions was calculated for each layer. The  $\log(A_{500}$  of the organic layer/ $A_{500}$  of the aqueous layer) yielded  $P$ . All absorbance measurements used were within the linear range of the instrument.

**Zebrafish Lines, Maintenance, and Ethical Statement.** The experiments and handling of zebrafish were approved by the Committee for Laboratory Animal of the Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), under the CICUAL-Protocol number: FLC40-14 (CICUAL: "Comité Institucional para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio del Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México"). Zebrafish from the AB strain were maintained in an aquatic-habitat recirculation system at 28 °C with a dark/light period of 14/10 h, respectively. Embryos were obtained from natural mating, and all the embryonic stages were determined according to ref 29. All embryos were treated with 0.2 mM 1-phenyl-2-thiourea (Sigma-Aldrich) to prevent pigmentation and permit posterior imaging.

**Synthesis of AztecLDs.** A detailed synthetic methodology is described in the Supporting Information and Scheme S1. Briefly, 2,2-difluoro-4-methyl-6-phenyl-2H-1 $\lambda^3$ ,3,2 $\lambda^4$ -dioxaborinine (250 mg, 1.19 mmol) and sodium acetate (98 mg, 1.19 mmol) were dissolved in 10 mL of anhydride acetic; this mixture was stirred and heated to 90 °C for 1 h. Then, 11-oxo-2,3,6,7-tetrahydro-1H,5H,11H-pyrano[2,3-f]-pyrido[3,2,1-ij]quinoline-10-carbaldehyde (180 mg, 0.67 mmol) was added. After 2 h, the reaction was cooled to room temperature and the mixture was stirred overnight. The product was extracted ( $H_2O$ : DCM) and purified by column chromatography (DCM:methanol) to obtain an iridescent dark green powder. Yield: 12%.  $^1H$  NMR (400 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  8.07 (d,  $J$  = 7.15 Hz, 2H), 7.89 (d,  $J$  = 14.94 Hz, 2H), 7.70 (s, 1H), 7.64 (t,  $J$  = 7.37 Hz, 1H), 7.55–7.47 (m, 3H), 6.95 (s, 1H), 6.64 (s, 1H), 3.39–3.35 (m, 4H), 2.90 (t,  $J$  = 6.39 Hz, 2H), 2.78 (t,  $J$  = 6.32 Hz, 2H), 2.02–1.96 (m, 4H).  $^{13}C$  NMR (400 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$ : 181.49, 180.42, 160.26, 152.38, 148.97, 148.81, 144.48, 134.51, 132.58, 129.13 (2C), 128.72 (2C), 127.09, 120.47, 120.04, 112.77, 109.47, 106.16, 98.49, 50.62, 50.20, 27.56, 21.27, 20.30, 20.21. mp: 145.4–147.7 °C. HRMS  $ESI^+$  ( $m/z$ ): calcd 461.1610, found 462.1612 for  $[M + H]^+$ .

## ASSOCIATED CONTENT

### Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge at <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acssensors.3c00725>.

Probe synthesis data, UV–vis and fluorescence spectroscopy, self-association partition formalism, cell culture and imaging data, and zebrafish maintenance (PDF)

Visceral adipose tissue green (MP4)

Visceral adipose tissue red (MP4)

## AUTHOR INFORMATION

### Corresponding Author

Arturo Jiménez-Sánchez – Bioorganic Chemistry Laboratory (BioChela) at Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Ciudad Universitaria, Mexico City 04510, Mexico; [orcid.org/0000-0002-8757-4589](https://orcid.org/0000-0002-8757-4589); Email: [arturo.jimenez@iquimica.unam.mx](mailto:arturo.jimenez@iquimica.unam.mx)

### Authors

Cinthia Hernández-Juárez – Bioorganic Chemistry Laboratory (BioChela) at Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Ciudad Universitaria, Mexico City 04510, Mexico

Gilberto Morales-Villafaña – Laboratory of Developmental Biology at Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Ciudad Universitaria, Mexico City 04510, Mexico

Fernando López-Casillas – Laboratory of Developmental Biology at Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Ciudad Universitaria, Mexico City 04510, Mexico

Complete contact information is available at: <https://pubs.acs.org/10.1021/acssensors.3c00725>

### Notes

The authors declare no competing financial interest.

## ACKNOWLEDGMENTS

Financial support with Conacyt grant no. PCC-319214 is greatly acknowledged. C.H.-J. acknowledges Conacyt grant CVU 771165. We also acknowledge the assistance of Ruth Rincón Heredia (Ph.D., Unidad de Imagenología del IFC-UNAM) in imaging microscopy, Adriana Romo Pérez, Ph.D., and Teresa Ramírez Apán, M.Sc., in tissue culture, Everardo Tapia Mendoza, Ph.D., for HRMS studies, Martha Elena García Aguilera, Ph.D., for 700 MHz NMR, Elizabeth Huerta Salazar, M.Sc., for NMR, and Beatriz Quiróz García, Ph.D., of NMR lab: LURMN at IQ-UNAM, which is funded by CONACYT Mexico (0224747), and UNAM.

## REFERENCES

- (1) Fawcett, D. W. *An Atlas of Fine Structure: The Cell, Its Organelles and Inclusions*; Saunders: 1966, p. 448.
- (2) (a) Tauchi-Sato, K.; Ozeki, S.; Houjou, T.; Taguchi, R.; Fujimoto, T. The Surface of Lipid Droplets is a Phospholipid Monolayer with a Unique Fatty Acid Composition. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 44507–44512. (b) Wilfling, F.; Wang, H.; Haas, J. T.; Kraemer, N.; Gould, T. J.; Uchida, A.; Cheng, J. X.; Graham, M.; Christiano, R.; Fröhlich, F.; et al. Triacylglycerol Synthesis Enzymes Mediate Lipid Droplet Growth by Relocalizing from the ER to Lipid Droplets. *Dev. Cell* **2013**, *24*, 384–399.
- (3) (a) Kuniyoshi, S.; Miki, Y.; Sasaki, A.; Iwabuchi, E.; Ono, K.; Onodera, Y.; Hirakawa, H.; Ishida, T.; Yoshimi, N.; Sasano, H. The Significance of Lipid Accumulation in Breast Carcinoma Cells Through Perilipin 2 and its Clinicopathological Significance. *Pathol. Int.* **2019**, *69*, 463–471. (b) Nieman, K. M.; Kenny, H. A.; Penicka, C. V.; Ladanyi, A.; Buell-Gutbrod, R.; Zillhardt, M. R.; Romero, I. L.; Carey, M. S.; Mills, G. B.; Hotamisligil, G. S.; et al. Adipocytes Promote Ovarian Cancer Metastasis and Provide Energy for Rapid Tumor Growth. *Nat. Med.* **2011**, *17*, 1498–1503.
- (4) (a) Bosch, M.; Sánchez-Álvarez, M.; Fajardo, A.; Kapetanovic, R.; Steiner, B.; Dutra, F.; Moreira, L.; López, J. A.; Campo, R.; Marí, M.; et al. Mammalian Lipid Droplets are Innate Immune Hubs Integrating Cell Metabolism and Host Defense. *Science* **2020**, *370*, No. eaay8085. (b) Fam, T.; Klymchenko, A.; Collot, M. Recent Advances in Fluorescent Probes for Lipid Droplets. *Materials* **2018**, *11*, 1768.
- (5) Xue, Y.; Lim, S.; Brakenhielm, E.; Cao, Y. Adipose Angiogenesis: Quantitative Methods to Study Microvessel Growth, Regression and Remodeling *In Vivo*. *Nat. Protoc.* **2010**, *5*, 912–920.
- (6) Ka, J.; Jin, S.-W. Zebrafish as an Emerging Model for Dyslipidemia and Associated Diseases. *J. Lipid Atheroscler.* **2021**, *10*, 42–56.
- (7) Minchin, J. E. N.; Rawls, J. F. A Classification System for Zebrafish Adipose Tissues. *Dis. Model Mech.* **2017**, *10*, 797–809.
- (8) Eisa-Beygi, S.; Hatch, G.; Noble, S.; Ekker, M.; Moon, T. W. The 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA Reductase (HMGCR) Pathway Regulates Developmental Cerebral-Vascular Stability via Prenylation-Dependent Signalling Pathway. *Develop. Biol.* **2013**, *373*, 258–266.
- (9) Lumaquin, D.; Johns, E.; Montal, E.; Weiss, J. M.; Ola, D.; Abuhashem, A.; White, R. M. An *In Vivo* Reporter for Tracking Lipid Droplet Dynamics in Transparent Zebrafish. *eLife* **2021**, *10*, No. e64744.

- (10) Spandl, J.; White, D. J.; Peychl, J.; Thiele, C. Live Cell Multicolor Imaging of Lipid Droplets with a New Dye, LDS40. *Traffic* **2009**, *11*, 1579–1584.
- (11) Ohsaki, Y.; Shinohara, Y.; Suzuki, M.; Fujimoto, T. A Pitfall in Using BODIPY Dyes to Label Lipid Droplets for Fluorescence Microscopy. *Histochem. Cell Biol.* **2010**, *4*, 477–480.
- (12) Chen, J.; Wang, C.; Liu, W.; Qiao, Q.; Qi, H.; Zhou, W.; Xu, N.; Li, J.; Piao, H.; Tan, D.; et al. Stable Super-Resolution Imaging of Lipid Droplet Dynamics through a Buffer Strategy with a Hydrogen-Bond Sensitive Fluorogenic Probe. *Angew. Chem.* **2021**, *60*, 25104–25113.
- (13) Miyares, R. L.; de Rezende, V. B.; Farber, S. A. Zebrafish Yolk Lipid Processing: A Tractable Tool for the Study of Vertebrate Lipid Transport and Metabolism. *Dis. Model. Mech.* **2014**, *7*, 915–927.
- (14) Ho, S.-Y.; Thorpe, J. L.; Deng, Y.; Santana, E.; DeRose, R. A.; Farber, S. A. Lipid Metabolism in Zebrafish. *Method. Cell Biol.* **2004**, *76*, 87–108.
- (15) Liu, C.; Gates, K. P.; Fang, L.; Amar, M. J.; Schneider, D. A.; Geng, H.; Huang, W.; Kim, J.; Pattison, J.; Zhang, J.; et al. Apoc2 Loss-of-Function Zebrafish Mutant as a Genetic Model of Hyperlipidemia. *Dis. Model. Mech.* **2015**, *8*, 989–998.
- (16) Landgraf, K.; Schuster, S.; Meusel, A.; Garten, A.; Riemer, T.; Schleinitz, D.; Kiess, W.; Körner, A. Short-Term Overfeeding of Zebrafish with Normal or High-Fat Diet as a Model for the Development of Metabolically Healthy Versus Unhealthy Obesity. *BMC Physiol.* **2017**, *17*, 4.
- (17) For more information on diversity oriented synthesis of new fluorophores for subcellular imaging ana analysis, see reference: Amador-Sanchez, Y. A.; Aguilar-Granada, A.; Flores-Cruz, R.; González-Calderón, D.; Orta, C.; Rodríguez-Molina, B.; Jiménez-Sánchez, A.; Miranda, L. D. Diversity-Oriented Synthesis of Highly Fluorescent Fused Isoquinolines for Specific Subcellular Localization. *J. Org. Chem.* **2020**, *85*, 633–649.
- (18) Leo, A.; Hansch, C.; Elkins, D. Partition Coefficients and their Uses. *Chem. Rev.* **1971**, *71*, 525–616.
- (19) Connors, K. A. *Binding Constants. The Measurement of Molecular Complex Stability*; John Wiley & Sons: 1987, p. 411.
- (20) Berthod, A.; Carda-Broch, S. Determination of Liquid-Liquid Partition Coefficients by Separation Methods. *J. Chromatogr. A* **2004**, *1037*, 3–14.
- (21) Charman, W. N.; Lai, C. S.; Finin, B. C.; Reed, B. L. Self-Association of Nicotinamide in Aqueous Solution: Mass Transport, Freezing-Point Depression, and Partition Coefficient Studies. *Pharm. Res.* **1991**, *08*, 1144–1150.
- (22) Martin, R. B. Comparisons of Indefinite Self-Association Models. *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 3043–3064.
- (23) Brown, M. S.; Goldstein, J. L. The SREBP Pathway: Regulation of Cholesterol Metabolism by Proteolysis of a Membrane-Bound Transcription Factor. *Cell* **1997**, *89*, 331–340.
- (24) Babu, D.; Katsonis, N.; Lancia, F.; Plamont, R.; Ryabchun, A. Motile Behaviour of Droplets in Lipid Systems. *Nat. Rev. Chem.* **2022**, *6*, 377–388.
- (25) Toth, P. P. New Insights in the Treatment of Dyslipidemia: A Focus on Cardiovascular Event Reduction and the Antiatherosclerotic Effects of Atorvastatin. *Curr. Atheroscler. Rep.* **2005**, *7*, 335–343.
- (26) Hagedorn, M.; Kleinhans, F. W.; Artemov, D.; Pilatus, U. Characterization of a Major Permeability Barrier in the Zebrafish Embryo. *Biol. Reprod.* **1998**, *59*, 1240–1250.
- (27) Paulsen, L.; Holm, C.; Bech, J. N.; Starklint, J.; Pedersen, E. B. Effects of Statins on Renal Sodium and Water Handling: Acute and Short-Term Effects of Atorvastatin on Renal Haemodynamics, Tubular Function, Vasoactive Hormones, Blood Pressure and Pulse Rate in Healthy Normocholesterolemic Humans. *Nephrol. Dial. Transplant* **2008**, *23*, 1556–1561.
- (28) Serluca, F. C.; Drummond, I. A.; Fishman, M. C. Endothelial Signaling in Kidney Morphogenesis: A Role For Hemodynamic Forces. *Curr. Biol.* **2002**, *12*, 492–497.
- (29) Kimmel, C. B.; Ballard, W. W.; Kimmel, S. R.; Ullmann, B.; Schilling, T. F. Stages of Embryonic Development of the Zebrafish. *Dev. Dyn.* **1995**, *203*, 253–310.
- (30) Hill, A. J.; Bello, S. M.; Prasch, A. L.; Peterson, R. E.; Heideman, W. Water Permeability and TCDD-Induced Edema in Zebrafish Early-Life Stages. *Toxicol. Sci.* **2004**, *78*, 78–87.
- (31) Cook, P. M.; Robbins, J. A.; Endicott, D. D.; Lodge, K. B.; Guiney, P. D.; Walker, M. K.; Zabel, E. W.; Peterson, R. E. Effects of Aryl Hydrocarbon Receptor-Mediated Early Life Stage Toxicity on Lake Trout Populations in Lake Ontario during the 20th Century. *Environ. Sci. Technol.* **2003**, *37*, 3864–3877.
- (32) Virta, V. C.; Cooper, M. S. Structural Components and Morphogenetic Mechanics of the Zebrafish Yolk Extension, A Developmental Module. *J. Exp. Zool. B Mol. Dev. Evol.* **2011**, *316*, 76–92.
- (33) Bernal-Escalante, J.; Molina-Villa, T.; López-Casillas, F.; Jiménez-Sánchez, A. Mitochondria-Assisted Photooxidation to Track Singlet Oxygen at Homeostatic Membrane Microviscosity. *ACS Sens.* **2022**, *7*, 2303–2311.
- (34) Klier, P. E. Z.; Martin, J. G.; Miller, E. W. Imaging Reversible Mitochondrial Membrane Potential Dynamics with a Masked Rhodamine Voltage Reporter. *J. Am. Chem. Soc.* **2021**, *143*, 4095–4099.
- (35) Saminathan, A.; Devany, J.; Veetil, A. T.; Suresh, B.; Pillai, K. S.; Schwake, M.; Krishnan, Y. A DNA-Based Voltmeter for Organelles. *Nat. Nanotech.* **2021**, *16*, 96–103.
- (36) García-Calvo, J.; López-Andarias, J.; Maillard, J.; Mercier, V.; Roffay, C.; Roux, A.; Fürstenberg, A.; Sakai, N.; Matile, S. Hydroflipper Membrane Tension Probes: Imaging Membrane Hydration and Mechanical Compression Simultaneously in Living Cells. *Chem. Sci.* **2022**, *13*, 2086–2093.
- (37) Danylchuk, D. I.; Moon, S.; Xu, K.; Klymchenko, A. S. Switchable Solvatochromic Probes for Live-Cell Super-resolution Imaging of Plasma Membrane Organization. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2019**, *58*, 14920–14924.

## Recommended by ACS

### Dual Functional Full-Color Carbon Dot-Based Organelle Biosensor Array for Visualization of Lipid Droplet Subgroups with Varying Lipid Composition in Living Cells

Meng-Xian Liu, Jian-Hua Wang, et al.

MARCH 09, 2023  
ANALYTICAL CHEMISTRY

READ 

### A Lipid Droplet-Specific NIR Fluorescent Probe with a Large Stokes Shift for In Vivo Visualization of Polarity in Contrast-Induced Acute Kidney Injury

Junlan Zhang, Jin Zhou, et al.

JULY 07, 2023  
ANALYTICAL CHEMISTRY

READ 

### pH-Triggered Charge Reversible Fluorescent Probe for Simultaneous Imaging of Lipid Droplets and Nucleoli in Living Cells

Shining Wu, Qiongzhen Hu, et al.

FEBRUARY 16, 2023  
ANALYTICAL CHEMISTRY

READ 

### Far-Red Fluorophore for Monitoring Viscosity In Vitro, In Vivo, and Ex Vivo and Dynamic Tracking of Lipid Droplets in Live Systems

Chuang Liu, Ruiyuan Liu, et al.

FEBRUARY 28, 2023  
ACS APPLIED OPTICAL MATERIALS

READ 

Get More Suggestions >



# Fluorescent probe for early mitochondrial voltage dynamics†

 Cinthia Hernández-Juárez, Ricardo Flores-Cruz and Arturo Jiménez-Sánchez \*

 Cite this: *Chem. Commun.*, 2021, 57, 5526

 Received 12th April 2021,  
 Accepted 4th May 2021

DOI: 10.1039/d1cc01944a

rsc.li/chemcomm

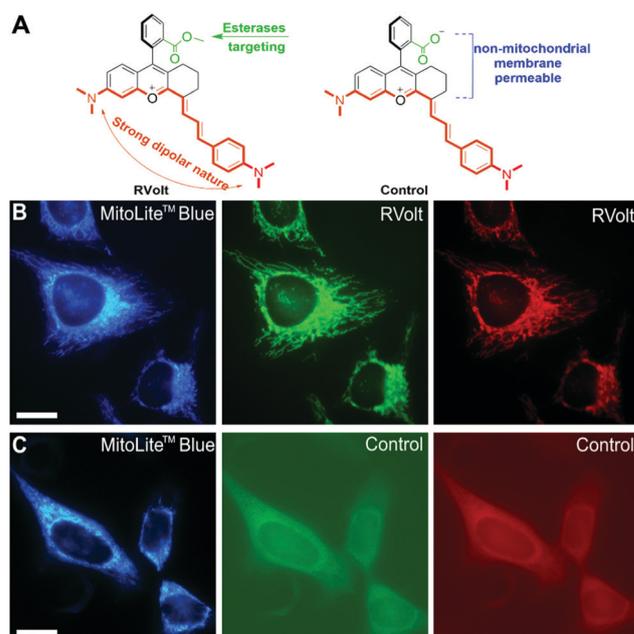
**Mitochondrial voltage dynamics plays a crucial role in cell healthy and disease. Here, a new fluorescent probe to monitor mitochondrial early voltage variations is described. The slowly permeant probe is retained in mitochondria during measurements to avoid interferences from natural membrane potential by incorporating an hydrolyzable ester function. Voltage, local polarity, pH parameters and transmembrane dynamics were found to be deeply correlated opening a approach in mitochondrial sensing.**

Mitochondrial membrane potential ( $\Delta\Psi_m$ ) is now recognized as a universal indicator of mitochondrial function in health and disease.<sup>1</sup>  $\Delta\Psi_m$  status is crucial for normal cell growth and differentiation, its disruption however, is directly associated to all types of mitochondrial-related diseases such as cancer, diabetes mellitus, cardiovascular and neurodegenerative disorders, to mention some of them.<sup>2–4</sup> This membrane potential (or voltage) is mainly a consequence of the ionic gradients between the mitochondrial membrane and cytosol,<sup>5</sup> and the proper monitoring of early voltage variations is highly important for the understanding of the molecular basis that govern cell processes in mitochondrial disfunction. However, although several methods have been developed to quantify  $\Delta\Psi_m$ , most of them are necessarily of the Nernstian behaviour where cationic-lipophilic dyes accumulate in the organelle through the electrochemical gradient (mitochondria has a  $\Delta\Psi_m$  ca.  $-180$  mV at pH about 8), then several analytical interferences arise as a consequence of dye concentration uptake variations due to mitochondrial depolarization (less negative potential) and hyperpolarization (more negative potential). Another key requirement for  $\Delta\Psi_m$  monitoring is that potential variations should be calibrated vs. a fluorescence process directly related to the photophysical mechanism giving the voltage response,

commonly, intramolecular electron transfer (which is voltage sensitive) is coupled with a proton transfer process.

We hypothesized that, by designing a probe that features a local polarity correlation with  $\Delta\Psi_m$  could allow a self-referenced monitoring of the mitochondrial voltage variations with local polarity through the calibrated fluorescence profile of the probe, where such profile can easily be controlled by a photoinduced electron transfer (PET) process inherent of this family of molecular polarity probes.<sup>6,7</sup>

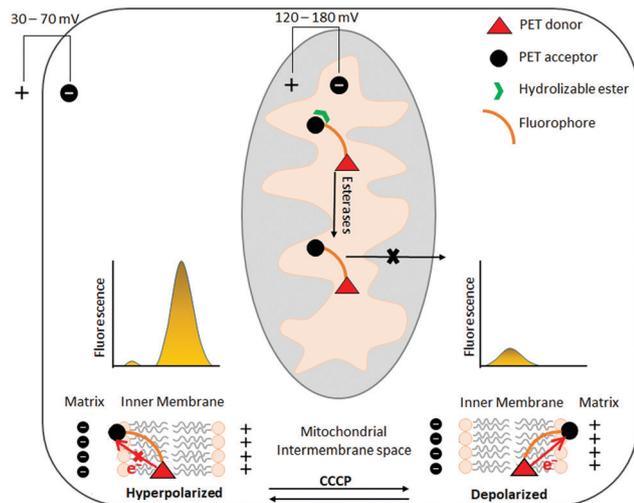
In this work we describe the first molecular probe, called **RVolt**, to monitor early mitochondrial voltage variations through a polarity-referenced and non-releasable mechanism, Fig. 1.



**Fig. 1** (A) Chemical structure of the **RVolt** and **Control** probes. Co-localization imaging in live HeLa cells under the using MitoLite™ Blue (blue panels,  $\lambda_{exc} = 344$  nm,  $\lambda_{em} = 469$  nm) indicating that (B) **RVolt** is mitochondria-specific with Pearson's coefficient of 0.94 and (C) **Control** is a non-permeable exogenous probe. Scale bars represent 20  $\mu$ m.

Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, Circuito Exterior s/n, De. Coyoacán 04510, Ciudad de México, Mexico. E-mail: arturo.jimenez@iquimica.unam.mx

† Electronic supplementary information (ESI) available. See DOI: 10.1039/d1cc01944a



**Scheme 1** Sensing mechanism of **RVolt** to monitor early mitochondrial membrane voltage. The probe is internalized and retained in mitochondria through esterase hydrolysis losing its Nernstian features. Then, the PET process is not active in the hyperpolarized membrane which gives more fluorescence, depolarization activates PET and quenches the NIR fluorescence. This can be achieved by using carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone (CCCP) type uncouplers.

This implies that after loading cells with the Nernstian fluorophore **RVolt** having an acetyl function, mitochondrial membrane is permeabilized. Once the probe is accumulated in the mitochondrial matrix, esterase enzymes could hydrolyze the acetyl ester function,<sup>8</sup> disbalancing the formal charge of the probe and thus trapping **RVolt** between the mitochondrial matrix and the inner membrane. Consequently, the hydrolyzed probe is no longer permeable to the membrane, similar to the slow-equilibrating mitochondrial marker Rhodamine 123,<sup>9</sup> Scheme 1. In fact, **RVolt** is similar to Rhodamine 123 having slowly permeant features,<sup>10</sup> and larger periods of mitochondrial retention, thus allowing almost 1 hour before leaving the mitochondrial outer membrane. Importantly, as **RVolt** is highly dependent on the local polarity, its fluorescent profile calibration towards this physicochemical observable allowed us to have an internal reference to monitor mitochondrial voltage in live cells under conditions promoting membrane potential variations, swelling, permeability transition pore (mPTP) opening and under pH and redox variation controls.

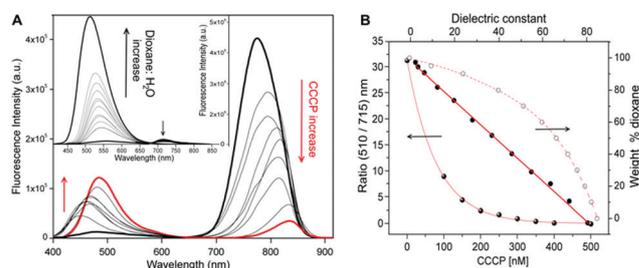
**RVolt** was synthesized and characterized as described in the ESI.† Then, photophysical properties and high-resolution confocal microscopy studies in HeLa and SK-Lu-1 cells were carried out. The chemical structures and subcellular localization of **RVolt** and an **RVolt**-derived control, named **Control**, are presented in Fig. 1A. Specific mitochondrial localization was corroborated by co-localization analysis for **RVolt** using the commercial blue-emitter MitoLite™ marker, Fig. 1B. A highly similar co-localization pattern was also found in HK-Lu-1 cells, Fig. S1 (ESI†). Yet normal incubation (exogenous addition) of **Control** molecule to the cells does not lead to a high cell permeabilization and mitochondrial staining. This can be explained by the presence of a free carboxylate function that neutralizes the oxonium-positive charge of the fluorophore and

simultaneously directs **Control** mostly to the plasma membrane. Also, while **RVolt** has a partition coefficient  $\log P = 1.02$  (and positively charged), **Control** has a  $\log P = 0.31$  (and neutral,  $pK_a = 6.78$  for the carboxylic deprotonation equilibrium, see ESI†) which is still a bit lipophilic due to the large cinnamic fragment tether to the rhodamine-type structure.

To corroborate the PET process, present in the **RVolt**, a robust photophysical analysis was carried out by means of UV-Vis and fluorescence spectroscopies as well as computational studies.

The computational analysis through a three-model scheme of electron density difference,<sup>11</sup> natural transition orbital (NTO) hole-electron distributions<sup>12</sup> and charge transfer extent index upon photoexcitation<sup>11</sup> for the **RVolt** indicated efficient charge transfer features, Fig. S2 (ESI†). Charge-transfer (CT) indexes upon photoexcitation and NTO eigenvalues are summarized in Fig. S2 and Table S1 (ESI†). Inspection of NTO through the HONTO–LUNTO pairs corroborated a dipolar charge transfer redistribution for both probes. Such solvent polarity and proticity dependence on the fluorescence properties is traduced in a dual-emission band pattern that allowed us to calibrate the probe by using the  $\lambda$ -ratiometric principle, Fig. 2.

As organic solvents can exert a strong influence on the probe photophysics by different empirical parameters (*i.e.*, solvent polarity, polarizability, acidity, basicity and viscosity) at the same time, proper calibration should be conducted in a more controlled media, trying to isolate the effect of dielectric constant as much as possible. Then, as dioxane and water have similar dispersion properties but highly different dipolarities, we implemented a dioxane:H<sub>2</sub>O fluorescence titration, Fig. 2, although the solvatochromic analysis in different solvents for **RVolt** is also presented in Table S2 (ESI†). In addition to the dioxane:H<sub>2</sub>O continuous variation, we implemented a carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone (CCCP) titration in 5 mM HTAB micellar medium in order to calibrate both effects. For both, dioxane:H<sub>2</sub>O and CCCP, protonation plays the strongest effect where CCCP promotes a ratiometric change of the Vis and NIR-emission bands corroborating the PET process inhibition, overall less fluorescence emission detected at the NIR band due to the protonation of the dimethylamino(cinnamic)



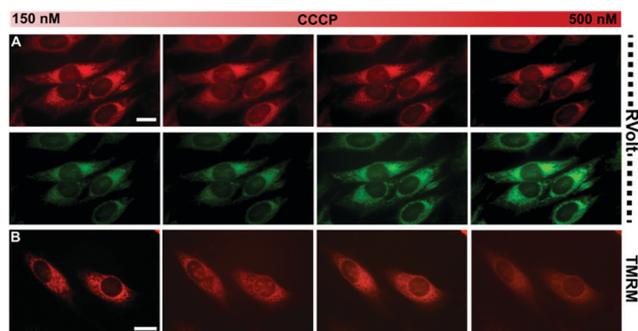
**Fig. 2** CCCP and polarity model parameters. (A) Fluorescence spectra ( $\lambda_{exc} = 400$  nm) of  $40 \mu\text{M}$  **RVolt** at variable CCCP concentration. Inset shows fluorescence spectra of **RVolt** at different dioxane:H<sub>2</sub>O v/v mixtures. (B) Ratiometric calibration plot for fluorescence intensity ratio  $r = 510/715$  nm (straight line, middle) at the corresponding CCCP [nM] (filled circles, left) and correlation with % dioxane v/v (hollow circles, right).

moiety. The dioxane:H<sub>2</sub>O variation introduces a ratiometric pattern although a stronger activation at the Vis emission band was observed. Then, the ratiometric calibration plot for  $r = 510/715$  nm at the corresponding CCCP [nM] and corresponding % dioxane v/v variation is presented in Fig. 2B. Such calibration provides an excellent tool to correlate the proticity effect coming from the CCCP uncoupler and other protonation effects that can occur in the subcellular environment, *i.e.* osmotically driven water into the membranes. On the other side, high-resolution confocal imaging using an Airyscan detector for HeLa and SK-Lu-1 cells stained with the **RVolt** revealed a clean mitochondrial framework localization. Such filamentous-like morphology was visualized in both, the green ( $\lambda_{\text{exc}} = 488$  nm) and red ( $\lambda_{\text{exc}} = 647$  nm) confocal channel setup during the experiments. Interestingly, confocal imaging studies using CCCP uncoupling agent to depolarize mitochondria demonstrated that once **RVolt** is internalized in the organelle, the mitochondrial localization persisted, although with variable fluorescence intensity from low-dose experiments to high concentration of CCCP (150 nM to 500 nM), Fig. 3A. In order to demonstrate that **RVolt** follows a non-Nernstian mitochondrial localization mechanism, we conducted three key experiments, to know, (1) the fluorescence titration of **RVolt** at variable CCCP concentration to corroborate the observed fluorescence intensity variation, (2) cell imaging reversibility study using CCCP-oligomycin A stimuli, (3) a mitochondrial permeability transition pore (mPTP) opening study to confirm that the **RVolt** is trapped between the mitochondrial matrix and the inner membrane. During the experiments, we used the commercial TMRM<sup>®</sup> mitochondrial localizer as control, Fig. 3B, although this dye exhibits self-quenching at high concentrations, thus interfering the interpretation of fluorescence intensity changes.

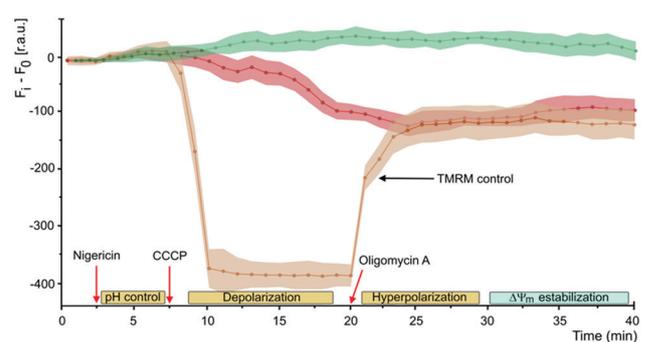
As mentioned, PET process is the photophysical mechanism that allows the probe to report membrane voltage variations without leaving the mitochondria. As protonophores, CCCP or FCCP agents depolarize the mitochondrial inner membrane thus increasing the PET process<sup>13</sup> and changing the fluorescence intensity profile of **RVolt**, Fig. 2 and 3A. As shown, PET is

activated upon CCCP protonophore additions, thus resulting in a decrease in fluorescence intensity. To assess the membrane voltage variation monitoring such fluorescence scenario was calibrated and correlated with the fluorescence imaging in cells by tracking membrane depolarization and hyperpolarization. Another feature of the **RVolt** is that the obtained fluorescence intensities can be directly associated with the intrinsic dipolar nature of the probe. For this reason, the  $\lambda$ -ratiometric profile of **RVolt** vs. CCCP has a strong linear dynamic range and sensitivity, Fig. 2B. It is worth mentioning that PET process in this type of donor-acceptor fluorophores is always inherently associated with a charge transfer state, in this sense is crucial for any analytical calibration to consider the extent to which local polarity influence the observed fluorescence profile.

We pursued an interference-free scenario of the **RVolt** under a controlled mitochondrial pH using a previously reported protocol by our group,<sup>14</sup> the effect of the mitochondrial membrane potential variations was analyzed using CCCP and oligomycin A (OA) which increases  $\Delta\Psi_m$  by inhibition of ATP synthase, leading to a decrease in the reduced respiratory chain intermediates. Thus, we turned to exploring the influence of pH on mitochondrial membrane voltage reversibility by using a 100 nM nigericin stimuli before the depolarization (with CCCP) and hyperpolarization (with OA) treatments.<sup>15</sup> The mitochondrial pH gradient ( $\Delta\text{pH}_m$ ) was substantially abolished since nigericin promotes a  $\text{K}^+/\text{H}^+$  membrane equilibration making  $[\text{K}^+]_{\text{in}} = [\text{K}^+]_{\text{out}}$ , consequently the proton concentration  $[\text{H}^+]_{\text{in}} = [\text{H}^+]_{\text{out}}$  and  $\Delta\text{pH}_m = 0$ . Live-cell experiments with the **RVolt** probe were always corrected by this control parameter as a starting point. To note, oligomycin increases mitochondrial pH (less  $[\text{H}^+]_m$ ), while CCCP decreases mitochondrial pH (more  $[\text{H}^+]_m$ ),<sup>16</sup> Fig. 4. As previous cautionary case studies,<sup>17</sup> it is important to consider that positive charges in the membrane voltage dynamics are not only protonic charges as usually interpreted, but also  $\text{K}^+$  and  $\text{Ca}^{2+}$  charges dumping from mitochondria into the cytosol, for such reason even before



**Fig. 3** Time course monitoring of CCCP depolarization changes. (A) Cells are stained with 10  $\mu\text{M}$  **RVolt** and 150 nM CCCP were added. Then, images were recorded after each 5 min with corresponding CCCP additions until reaching 500 nM ( $\lambda_{\text{exc}} = 488$  and 647 nm). (B) TMRM mitochondrial localizer control experiment ( $\lambda_{\text{exc}} = 605$  nm). Scale bars = 20  $\mu\text{m}$ .



**Fig. 4** Induced mitochondrial voltage changes in HeLa cells. Relative fluorescence intensity ( $F_1 - F_0 \pm \text{SEM}$  in r.a.u.) vs. time (min) for 1  $\mu\text{M}$  **RVolt** (green and red lines) and TMRM<sup>®</sup> mitochondrial localizer control (orange line) upon *in situ* additions of 100 nM nigericin, 150 nM CCCP (after 5 min) and 5  $\mu\text{g mL}^{-1}$  oligomycin A at 20 min. SLM-spectrophotometer setup ( $\lambda_{\text{exc}}/\lambda_{\text{em}}$ ): green (488/510 nm), red (700/715 nm) and orange (605/615 nm). Point recordings were taken by 1 min time-lapse.

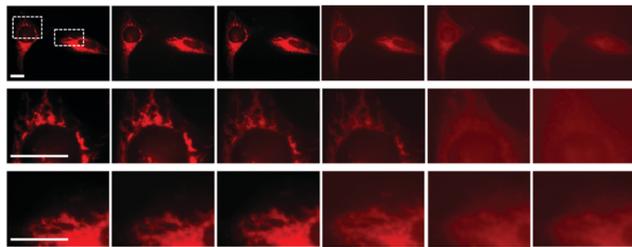


Fig. 5 Effect of mPTP opening detected in the deep-red confocal channel ( $\lambda_{\text{exc}} = 647 \text{ nm}$ ) for HeLa cells before (first panel-left) and after 5 min treatment with  $400 \mu\text{M CaCl}_2$  (panels 2–6). The images were taken each 2 minutes and were manually focused, excitation light was fully shielded between recordings to prevent artefacts and photobleaching. Scale bars =  $20 \mu\text{m}$ .

CCCP stimuli, nigericin does not completely inhibited mitochondrial depolarization (the slight fluorescence increments after nigericin treatment in Fig. 4). Interestingly, this subtle effect was successfully monitored by the **RVolt**, fluorescence profiles in the green and red lines of Fig. 4. Then, the elicited responses upon treatment with CCCP and OA were corroborated as expected, red and green profiles in Fig. 4. As can be seen, CCCP increases the rate of PET process in the **RVolt** causing a fluorescence decrease in the red confocal channel and a slight increment (almost constant) of the fluorescence intensity in the green confocal channel. The OA treatment that slows down such electron transfer resulted in the **RVolt** fluorescence activation inside the organelle. Since the mitochondrial membrane potential is only a part of the transmembrane potential energy coming from the proton gradient ( $\Delta\mu\text{H}^+$ ) on the inner mitochondrial membrane,<sup>18</sup> regulation of the proton gradient is desirable. In fact, experiments without nigericin treatment produced notorious mitochondrial damage and noisy fluorescence variations just after CCCP treatment.

Finally, we envisioned that a promising strategy to release the hydrolyzed **RVolt** probe from the mitochondrial interior, thus corroborating that the probe is trapped inside the organelle by a non-Nernstian mechanism should involve the opening of the mitochondrial permeability transition pore (mPTP) and not through a diffusion driven by CCCP depolarization. Firstly, we conducted a mass spectrometry **RVolt** titration with esterase (carboxyl ester hydrolase) to assess the hydrolysis reaction occurring from **RVolt** to **Control** probe. Fig. S3 (ESI<sup>†</sup>) shows that **Control** probe is in fact formed upon esterase additions, corroborating the effectiveness of this hydrolyzable function, similar to the Calcein AM protocol (MitoProbe™ Transition Pore Assay Kit).<sup>19</sup> Then, experiments with the mPTP opening resulted in the release of the hydrolyzed **RVolt** probe, Fig. 5. mPTP opening is a non-selective mechanism by which small molecules pass out the mitochondrial membrane, for this reason we envisioned that a control experiment to demonstrate that the hydrolyzed version of the fluorophore is the one being released, would be critical. Treatment with  $400 \mu\text{M CaCl}_2$  was used to selectively induce mPTP opening without causing organelle swelling.<sup>20</sup> Comparison between Fig. 1C (green and

red confocal channels) and Fig. 5 indicates that **Control** probe and the *in situ* esterase hydrolyzed **RVolt** probe released by mPTP opening have highly similar imaging patterns, that is, a cytoplasmic localization for both thus suggesting that the **RVolt** can be released by the activation of the mPTP opening process and not by a Nernstian mechanism.

The **RVolt** is a powerful new tool for the monitoring of mitochondrial membrane voltage variations. With a simple electronic dipolar fluorophore as a local polarity reporter, the PET process was successfully correlated with voltage variations and local polarity and under mitochondrial pH control to isolate the fluorescent profiles from factors other than voltage variations. The mPTP opening study is critical to corroborate the non-Nernstian mechanism of voltage probes. The present strategy may find utility in the design and development of new fluorescent probes with slow permeability for multiplexing assays correlating membrane voltage and physicochemical parameters such as local viscosity, polarity and redox status at the subcellular level.

## Conflicts of interest

There are no conflicts to declare.

## Notes and references

- 1 A. A. Bazhin, R. Sinisi, U. Marchi, A. Hermant, N. Sambiagio, T. Maric, G. Budin and E. A. Goun, *Nat. Chem. Biol.*, 2020, **16**, 1385.
- 2 Y. Wang, E. Xu, P. R. Musich and F. Lin, *CNS Neurosci. Ther.*, 2019, **25**, 816.
- 3 V. A. Popkov, E. Y. Plotnikov, D. N. Silachev, I. B. Pevzner, S. S. Jankauskas, V. A. Babenko, S. D. Zorov, A. V. Balakireva, M. Juhaszova, S. J. Sollott and D. B. Zorov, *Anal. Biochem.*, 2018, **552**, 50.
- 4 M. Momcilovic, *et al.*, *Nature*, 2019, **575**, 380. See ESI<sup>†</sup> for the full name list.
- 5 M. Grabe and G. Oster, *J. Gen. Physiol.*, 2001, **117**, 329.
- 6 X. Tian, L. C. Murfin, L. Wu, S. E. Lewis and T. D. James, *Chem. Sci.*, 2021, **12**, 3406.
- 7 D. C. Magri, *Coord. Chem. Rev.*, 2021, **426**, 213598.
- 8 G. A. Rutter, P. Burnett, R. Rizzuto, M. Brini, M. Murgia, T. Pozzan, J. M. Tavaré and R. M. Denton, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1996, **93**, 5489.
- 9 J. J. Lemasters and V. K. Ramshesh, *Methods Cell Biol.*, 2007, **80**, 283.
- 10 H. Rottenberg and S. Wu, *Biochim. Biophys. Acta*, 1998, **1404**, 393.
- 11 M. Savarese, C. A. Guido, E. Brémond, I. Ciofini and C. Adamo, *J. Phys. Chem. A*, 2017, **121**, 7543.
- 12 R. L. Martin, *J. Chem. Phys.*, 2003, **118**, 4775.
- 13 P. E. Z. Klier, J. G. Martin and E. W. Miller, *J. Am. Chem. Soc.*, 2021, **143**, 4095.
- 14 R. Flores-Cruz and A. Jiménez-Sánchez, *Chem. Commun.*, 2018, **54**, 13997.
- 15 S. W. Perry, J. P. Norman, J. Barbieri, E. B. Brown and H. A. Gelbard, *Biotechniques*, 2011, **50**, 98.
- 16 J. P. Norman, S. W. Perry, K. A. Kasischke, D. J. Volsky and H. A. Gelbard, *J. Immunol.*, 2007, **178**, 869.
- 17 J. P. Norman, S. W. Perry, H. M. Reynolds and M. Kiebal, *et al.*, *PLoS One*, 2008, **3**(11), e3731.
- 18 D. Zorova, V. A. Popkov, E. Y. Plotnikov and D. N. Silachev, *et al.*, *Anal. Biochem.*, 2018, **552**, 50.
- 19 MitoProbe™ Transition Pore Assay Kit (M34153). Molecular probes, 2007. For a representative reference please see: A. J. Kowaltowski, S. S. Smaili, J. T. Russell and G. Fiskum, *Am. J. Physiol.: Cell Physiol.*, 2000, **279**, C852.
- 20 M. Panel, B. Ghaleh and D. Morin, *Sci. Rep.*, 2017, **7**, 4283.



GORDON RESEARCH CONFERENCE  
Bioorganic Chemistry

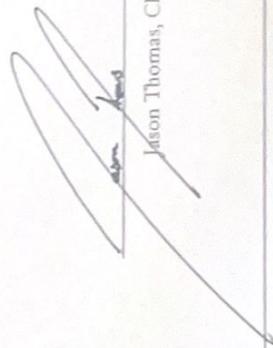
Cinthia Hernandez-Juarez

Outstanding Poster Award

Given at the Gordon Research Conference on Bioorganic Chemistry  
June 11<sup>th</sup> - June 16<sup>th</sup> 2023



Daniel Nomura, Chair 2023



Jason Thomas, Chair 2023