



## SONDA FLUORESCENTE PARA MARCAR DE FORMA DIFERENCIADA CELULAS VIVAS Y MUERTAS

Número de solicitud: Mx/a/2019/007725

(estatus: patente pendiente)



### RESUMEN

La invención proporciona una nueva propuesta tecnológica y científica de gran impacto a nivel mundial, como por ejemplo en ensayos de multiplexación, en donde con una sola molécula o plataforma de monitoreo es posible calibrar el perfil de respuesta frente a diversos estímulos y dar así un resultado inequívoco y sin susceptibilidad de interferencias de señal. La tecnología no solo proporciona un resultado positivo/negativo (vivo/muerto) sino provee información cuantitativa, información de variaciones morfológicas en el proceso de muerte celular mediante la obtención de imágenes de alta resolución, utilizando analitos que se producen en todas las mitocondrias, tales como las especies reactivas de oxígeno.

Los esfuerzos en el descubrimiento de nuevos ensayos *death-live* han sido bastos, no obstante, no se ha logrado abatir la desventaja analítica y económica que representa el uso de estos ensayos. Si bien, los altos costos y la poca accesibilidad en diversos países, incluido México, representa un gran problema, uno de los mayores retos que se tienen al utilizar estos ensayos comercialmente disponibles es que son altamente susceptibles a generar interferencia con el medio subcelular. Lo anterior se debe a que se trata de dos sondas fluorescentes (molecular probes) que no suelen tener localización específica en conjunto, desbordando así una serie de problemas analíticos que impiden monitorear con mayor resolución la muerte celular y así entender lo que está originando dicho proceso. Dichas sondas han sido motivo de errores en la obtención de datos cuantitativos puesto que sus características de tinción obedecen a mecanismos muy diferentes, y la variación de su concentración in situ puede llevar a cometer fácilmente diversos errores analíticos, entre ellos, falsos positivos, cruzamiento de señales, interferencia en la respuesta por saturación de otras señales, entre otros. Lo anterior ha ocasionado que dichas compañías propongan protocolos de tinción demasiado complicados y específicos a ciertas líneas celulares, siendo en su mayoría poco reproducibles y no aptos para la realización de estudios más detallados, por ejemplo, utilizando técnicas de microscopía de bioimagen en tiempo.

### ANTECEDENTES E IMPORTANCIA

Los *death-live cell viability kits* emplean la mezcla de 2 reactivos para la detección de células muertas y células vivas de manera diferenciada. En principio, el reactivo que actúa en células vivas debe interactuar con una enzima como sitio de reconocimiento, típicamente esterasas, mientras que en células muertas el reactivo comúnmente utilizado es yoduro de propidio, el cual permea la membrana nuclear cuando ésta se encuentra comprometida o dañada. Sin embargo, el resultado de estos kits es que además de ser altamente costosos pueden dar lugar a resultados falsos positivos y son altamente específicos, siendo posible su uso únicamente en la tinción de pocos tipos de células.



## SONDA FLUORESCENTE PARA MARCAR DE FORMA DIFERENCIADA CELULAS VIVAS Y MUERTAS

Número de solicitud: Mx/a/2019/007725

(estatus: patente pendiente)



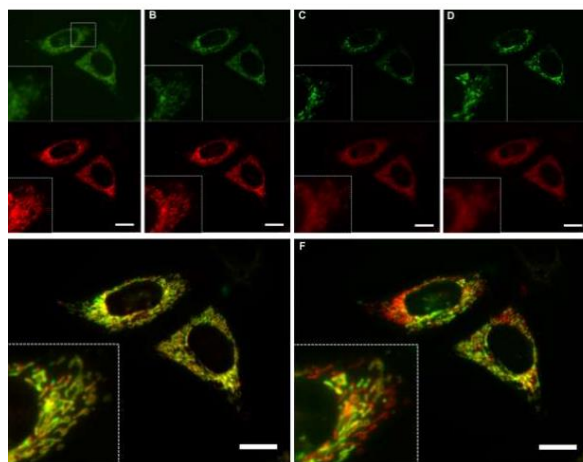
### DESCRIPCIÓN DEL DESARROLLO

La presente invención propone solucionar el problema de la detección de células vivas y muertas con un solo reactivo (un conjugado peptídico), de fácil producción, con localización específica y cuyos perfiles de respuesta permiten visualizar el estado de salud del tejido que se estudia mediante diferenciación de morfología mitocondrial. Una de las ventajas de las sondas fluorescentes propuestas en la presente invención, es que desde el punto de vista fisicoquímico dichos conjugados presentan una distribución mitocondrial homogénea debido a su balance entre lipofilicidad y distribución de cargas positivas, utilizando de esta manera el potencial de carga negativo de la mitocondria. Lo anterior abre una ventana de oportunidad en el monitoreo moderno del estatus de salud de una célula, ya que es posible seguir la dinámica de un organelo de suma importancia en el balance salud enfermedad y muerte celular como es la mitocondria. De manera importante, este tipo de mecanismo de localización mitocondrial no compromete la integridad celular, haciendo que en el proceso de monitoreo muerte/vida no exista interferencia con la sonda fluorescente utilizada, es decir, que no se altere el estatus celular con el propio sistema de estudio.



### CAMPO DE APLICACIÓN

La invención se puede aplicar en microscopía de sistemas vivos, ya que se trata del primer fluoróforo individual que puede marcar de diferente color células vivas y muertas en un tejido. Se puede emplear en diversos estudios, tales como, el diagnóstico de enfermedades como cáncer, neurodegenerativas, relacionadas con la edad y neuropatías en general; estudios de fertilidad; desarrollo de nuevos químicos fertilizantes; estudio de nuevos plaguicidas; utilizando el monitoreo de variaciones de la morfología mitocondrial.





## SONDA FLUORESCENTE PARA MARCAR DE FORMA DIFERENCIADA CELULAS VIVAS Y MUERTAS

Número de solicitud: Mx/a/2019/007725

(estatus: patente pendiente)



### VENTAJAS COMPETITIVAS

La invención aquí presentada hace uso de un vector peptídico de ciclohexilalanina y arginina (Fxr)2 de localización mitocondrial y de secuencia corta el cual ha sido conjugado a un fluoróforo altamente eficiente (cumarina 343, con un rendimiento cuántico de fluorescencia de 0.7 y coeficiente de extinción molar en etanol superior a 40,000 cm<sup>-1</sup>/M) lo que le provee de un excelente contraste, el conjugado obtenido presenta claras ventajas sobre las

versiones comerciales, por ejemplo, 1) es altamente selectivo a la mitocondria, el organelo esencial involucrado en la muerte celular, 2) su producción es más rápida y económica, 3) es sensible a oxidación por especies reactivas de oxígeno (ROS) producidas en la mitocondria, dichas especies se producen en todo tipo de células ya sean animales o incluso vegetales, 4) la ventaja analítica es inmensa, su análisis mediante técnicas de bioimagen es mucho más

sencillo y cuantitativo, ya que se trata de un solo localizador subcelular y éste presenta una localización en mitocondria, la cual posterior a la oxidación por ROS, migra al núcleo si es un proceso de generación excesiva de ROS, o se queda en la mitocondria cuando ésta solo se encuentra morfológicamente alterada. Además, estos ensayos también se pueden realizar mediante el uso de técnicas de citometría de flujo y clasificación celular.

