



La nanoscopía, el reto alcanzado de apreciar las células vivas en su interior

Enrique J. Millán Barrios

Laboratorio de Electroquímica, Departamento de Química, Facultad de Ciencias,
Universidad de Los Andes, Mérida-5101, Venezuela

(*) ejmb@ula.ve

Recibido: 20/04/2015

Aceptado: 29/04/2015

Resumen

Se presenta una breve descripción del proceso y actores involucrados en el desarrollo del supermicroscopio de fluorescencia o nanoscopía. Se intenta mostrar, de manera resumida, la contribución de los investigadores involucrados en el desarrollo de esta técnica, lo cual los llevó a ser reconocidos con el premio Nobel de Química. La participación individual de cada investigador aportó los conocimientos, procesos y resultados experimentales necesarios para lograr observar células de manera individual, al aprovechar la fluorescencia que presentan ciertas moléculas a nivel celular, llegando a obtener una alta resolución a nivel nanométrico. El impacto y nuevos desarrollos, especialmente en el campo de la biología celular y genética, que esta técnica ofrece están por verse en el corto tiempo.

Palabras claves: fluorescencia, nanoscopio, supermicroscopio.

Abstract

A brief description of the process and actors involved in the development of nanoscopy is presented. Contribution of the researchers involved in the development of this technique is discussed. The knowledge processes and experimental results obtained individually by these researchers provided the necessary information to achieve this goal and leading them to be granted with the Nobel prize. The supermicroscopy allows observing cells individually, through the fluorescence of certain molecules at the cellular level, obtaining a high resolution at the nanoscale level. The impact and new developments of this technique, especially in the field of cellular biology and genetics, will be seen in the short time.

Keywords: fluorescence, supermicroscopy, nanoscopy

El hombre siempre ha estado en la búsqueda de conocimiento, siempre queriendo ampliar sus sentidos y llegar a percibir lo más pequeño; es así como en el pasado, la imagen de un investigador era asociada a la caricatura de un personaje con gorro y sobretodo extraño (tipo Sherlock Holmes) apuntando su lupa al infinito, buscando, apreciando el detalle más pequeño de las cosas. Mark Miodownik, en su libro "Stuff Matters"¹, con su óptica inglesa particular, indica que el vidrio, como material, permitió descubrir espacios más allá de la simple escala humana; plantea que la lupa nos permite explorar nuestras casas como un mundo desconocido a una escala incomprensible y considera que el microscopio nos abrió la puerta del mundo de los organismos vivos, permitiéndonos estudiar bacterias y microbios, lo cual condujo a descubrir nuevos caminos a la medicina. Llegamos a pasar de una magnificación de 10 X a 100.000 X con el desarrollo de la microscopía de barrido electrónico; somos capaces de apreciar no solo los detalles topográficos existentes en una determinada superficie, sino también de

identificar los elementos presentes en él con el mismo barrido. Con el avance en los microscopios de fuerza atómica hemos apreciado los detalles de los arreglos atómicos, pero deseamos más, queremos poder apreciar detalles más pequeños en el interior de una célula viva (lo cual no podemos hacer con el microscopio electrónico) y aunque se pensaba que se había alcanzado el límite (de acuerdo a la teoría de Abbe sobre el límite de difracción), afortunadamente eso no es así.

Un conjunto de científicos se planteó llegar más allá de esta frontera y se les ha reconocido con el premio Nobel de Química² 2014, de allí que en la última edición de este prestigioso premio, se galardonaron a los científicos Stefan Hell (Alemania), Eric Betzig y William Moerner (ambos norteamericanos) por sus trabajos en la microscopía del agotamiento de la emisión estimulada (STED, acrónimo derivado del inglés STimulated Emission Depletion) y la microscopía de moléculas individuales (PALM, acrónimo deriva del inglés Photo Activation Localization Microscopy),

todos trabajaron separadamente y desarrollaron métodos enfocados en la búsqueda de poder analizar muestras a una escala impensable, la nanométrica.

En uno de estos métodos se emplean láseres que estimulan moléculas fluorescentes y logran obtener resoluciones del orden de los 10^{-9} m y en el otro, también estimulando moléculas fluorescentes, pero estudiando zonas escaneadas varias veces, permiten identificar moléculas específicas hasta generar una imagen (densa) con resolución nanométrica, en otras palabras, se dispone de un microscopio con super resolución.

Desde el punto de vista químico este nanoscopio funciona basado en la capacidad que tienen ciertas moléculas (y proteínas) de mostrar un tipo especial de luminiscencia, y en donde se activan y desactivan moléculas fluorescentes con la aplicación de láseres logrando confinar la luz en un punto muy pequeño³; al “apagar” la fluorescencia de las moléculas periféricas, y permitiendo de esta manera mantener brillando a las moléculas de tamaño nanométrico, y al escanear la muestra nanómetro a nanómetro se obtiene una imagen (técnica de Hell); mientras que en la técnica desarrollada por Betzig, se emplea un mecanismo similar de “encendido y apagado” de la fluorescencia de las moléculas, logrando localizarlas de manera individual al realizar barridos a tiempos diferentes pero sobre la misma área de la muestra; con estos resultados se elabora y construye un mapa nanométrico de coordenadas, lográndose estudiar moléculas individuales.

La fluorescencia no es un proceso extraño para los químicos, puesto que como herramienta analítica ha sido empleada ampliamente para la caracterización y cuantificación de diferentes fluorocromóforos, en el desarrollo de sensores (pH, pO_2 , pCO_2 , etc.) y biosensores en sangre; en la caracterización de la estructura y dinámica de sistemas vivos y en el análisis no destructivo de materiales, sedimentos, fluidos, química de petróleo, análisis químico de la mayoría de los elementos, etc., empleando fluorescencia de rayos X. El principio de funcionamiento de un microscopio de fluorescencia clásico no se aleja del sistema estándar de magnificación, sólo que en este caso la muestra se expone a una radiación de longitud de onda larga, dependiendo del tipo

de muestra a analizar, y mediante el uso de filtros especiales se logra que la misma emita una luz con un color diferente por la absorción de la radiación incidente sobre los fluoróforos presentes en la muestra. En el caso de análisis de muestras biológicas, de no presentar fluoróforos, las mismas son marcadas con fluorocromos los cuales permiten obtener imágenes de las células, cultivos celulares, micro-filamentos, cromosomas, etc.

Sin embargo, este tipo de sistemas tiene limitaciones para poder apreciar a escala nanométrica las muestras biológicas (algunos equipos comerciales ofrecen magnificaciones hasta de 250 X), ya que cuando varias moléculas se encuentran juntas ocurre una superposición de las imágenes apreciadas como manchas de luz (conocidos como discos de Airy), lo cual pudiese resolverse empleando longitudes de ondas más pequeñas (región UV o rayos-X), pero eso implicaría impactar a las muestras con radiación de alta energía lo cual limita su uso en células vivas, es allí donde el microscopio de fluorescencia con super resolución ofrece un salto tecnológico importante, ya que gracias a este nuevo nanoscopio se pueden observar objetos con tamaños menores a los 20 nm, analizando sistemas biológicos vivos (10 nm) y generando imágenes 3D de las estructuras finas de las células.

El desarrollo de este sistema requirió inicialmente solventar los problemas del límite de difracción (planteado por Abbe), lo cual fue realizado por Hell con el desarrollo del método STED^{4,5} (figura 1), en el cual dos rayos láser iluminan la muestra; uno en una configuración confocal (generando una iluminación puntual) y otro que, actuando en modo transversal, rodea la iluminación generada con el primer laser permitiendo que sólo el área central (del primer laser) sea registrada, midiendo la fluorescencia producida por las moléculas ubicadas allí en el orden nanométrico, lo cual se reporta como que se “apaga” (desactiva) las moléculas en los bordes de la zona estimulada, dejando apreciar la zona de interés en más detalle. El otro aspecto a resolver está relacionado con el posicionamiento de moléculas individuales, ya que tal y como se indicó anteriormente, cuando la distancia entre las moléculas fluorescentes es menor al límite de difracción de Abbe, se obtendrán discos que evitan su resolución (figura 2)⁶, como es

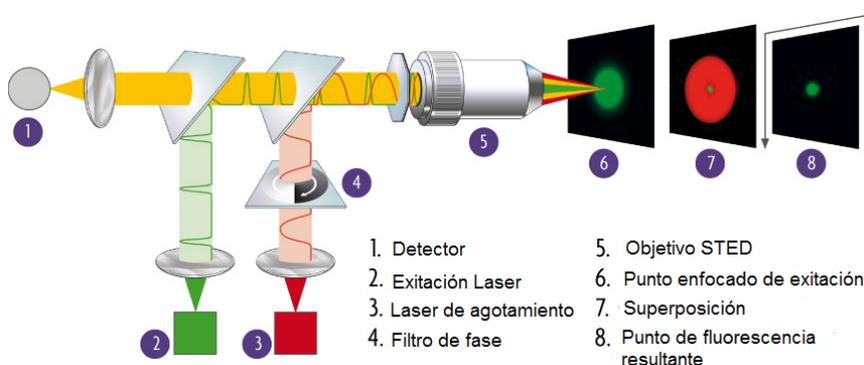


Fig. 1: Representación del funcionamiento de la tecnología STED (www.activemotif.com)

el caso de muestras reales, por lo que para poder observar los emisores individualmente, es necesario que solo una molécula por cada región espacial del orden de un disco de Airy este emitiendo luz, lo que requiere de la existencias de moléculas que pudiesen ser activadas selectivamente por pulsos de radiación y estudiadas transitoriamente hasta que son destruidas por el haz de excitación, logrando “marcar” la posición de cada molécula emisora y procediendo a construir una imagen en forma de mapa (figura 3).

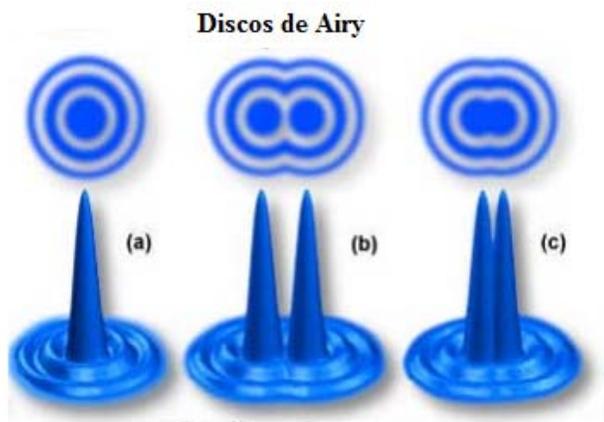


Fig. 2: Representación de los discos de Airy par: a) moléculas individuales, b) moléculas cercanas, c) superposición de anillos. Tomado de: https://www.umassmed.edu/uploadedFiles/research/Included_Content/Sanderson_STED.pdf)

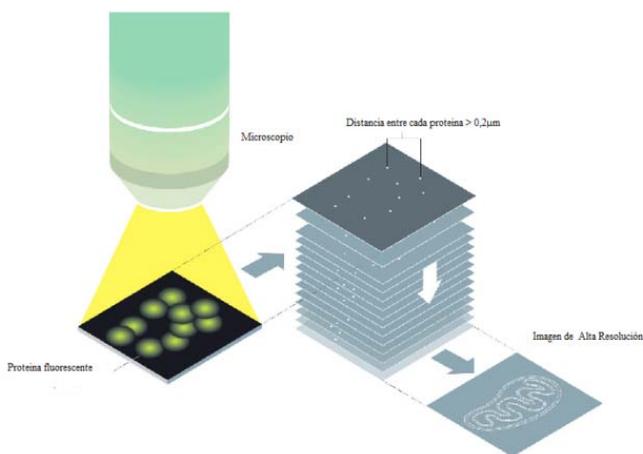


Fig. 3: Representación del funcionamiento de la tecnología PALM. Tomado de Nobel Prize in Chemistry. Laureates. <http://www.nobel.se/chemistry/laureates/index.html>

Aunque ya Moerner, antes de que Hell y Betzig desarrollaran sus técnicas, había logrado medir la absorción de luz de una sola molécula y basado en sus estudios con una variante de la proteína verde, y logró, al dispersar proteínas a distancias superiores a los 0,2 μm , discernir entre el brillo de las moléculas individuales a través del uso de un microscopio óptico normal, el resultado de la investigación de estos tres insignes investigadores y de sus grupos y laboratorios los que condujeron al desarrollo del nanoscopio.

A nivel local, en Venezuela existen varios grupos de investigadores (en el laboratorio de Biología Molecular del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC), en el laboratorio de Genética Molecular y en el Instituto de Biología Experimental de la Universidad Central de Venezuela (UCV) y en el Laboratorio de Enzimología de Parásitos de la Universidad de Los Andes (ULA)), que han estado trabajando con la proteína fluorescente verde en *Leishmania*⁷, en bacterias y en la modificación/identificación de parásitos de la enfermedad de Chagas. En estas investigaciones se ha tratado de monitorizar cambios y modificaciones realizados específicamente en diversas muestras biológicas aprovechando esta propiedad fluorescente, por lo que el desarrollo de este nuevo tipo de supermicroscopios de fluorescencia, ofrecen nuevas rutas para estudiar y evaluar los procesos y mecanismos de acción de parásitos, desarrollar y evaluar nuevas drogas, diseñar nuevos protocolos de cuantificación y establecer mecanismos de acción a nivel celular, de allí que, cuando las autoridades rectoras de la ciencia en el país comprendan la potencialidad de esta nueva herramienta y su impacto futuro, es posible que estos laboratorios cuenten con las mismas y podamos atender y brindar nuevos desarrollos, en las áreas mencionadas, para nuestro país.

En la actualidad hay varias empresas comerciales que ofrecen este tipo de super microscopios, los cuales han permitido apreciar la organización de lípidos y membranas celulares, la comunicación entre neuronas, comprender el proceso de agregación y la respuesta catalítica de ciertos materiales. Lo queda claro es que esta técnica ofrecerá una mejor comprensión de los sistemas biológicos y ayudará a encontrar nuevos medicamentos para enfermedades como el HIV, Alzheimer y Parkinson, nos conducirá a comprender en detalle la estructura de varios virus letales para el ser humano, y esperaremos los nuevos retos que la nanotecnología nos traerá.

Referencias

1. M Miodownik. *Stuff Matters. Exploring the marvelous materials that shape our man-made world.* Houghton Mifflin Harcourt, USA (2014).
2. <http://www.nobelprize.org/>
3. A Arroyo-Pieck, J Peón. Premio Nobel de Química 2014 Microscopía de fluorescencia con super-resolución. **Educ. Quím.**, **26(1)**, 50-51(2015)
4. <http://www.anes.ucla.edu/sted/sted.html>
5. <http://www.kurzweilai.net/the-nobel-prize-in-chemistry-2014-beyond-the-diffraction-limit-in-microscopy>
6. https://www.umassmed.edu/uploadedFiles/research/Included_Content/Sanderson_STED.pdf
7. P Guevara, D Pinto-Santíni, A Rojas, G Crisante, N Añez, JL Ramírez. Green Fluorescent protein-tagged *Leishmania* in phlebotomine sand flies. **J. Med. Entomol.**, **38(1)**, 39-43 (2001).