

Premio Nobel de Química 2014

MICROSCOPIA FLUORESCENTE DE ALTA RESOLUCIÓN

Benjamín Fernández Ruiz
y Jesús Pintor Just



Stefan W. Hell



William E. Moerner



Eric Betzig

La Real Academia Sueca de Ciencias, el miércoles ocho de octubre anunció que el Premio Nobel de Química 2014 había sido concedido al científico alemán **Stefan W. Hell** y los científicos norteamericanos **William E. Moerner y Eric Betzig**, por “el desarrollo de un microscopio fluorescente de alta resolución”. El microscopio citado permite la observación de moléculas individualizadas dentro de las células vivas y es el origen de la conocida en la actualidad como **nanoscopia**. En el informe de la Real Academia Sueca de Ciencias se explicita que “su trabajo innovador ha llevado la microscopía óptica a la nano-dimensión.”

El estadounidense **Eric Betzig**, se encuentra trabajando actualmente en el Instituto Médico Howard Hughes. Nació en Ann Arbor, Michigan, el 13 de enero de 1960. En 1983 se licenció en Ciencias Físicas en el Instituto de Tecnología de California. El doctorado en Ingeniería y Física Aplicadas lo obtuvo en 1988 en la

Universidad de Cornell. Ya doctor, se incorporó a trabajar en los Laboratorios AT&T Bell en su Departamento de Investigaciones en Física de Semiconductores.

Su padre Robert Betzig era el propietario de la “Ann Arbor Machine Company” y él en 1996 dejó el anterior trabajo y se incorporó como Vicepresidente a la empresa familiar. No obtuvo el éxito comercial deseable y se entregó al campo de la microscopía, desarrollando la microscopía de localización fotoactivada (PALM) y en 2006 se incorporó al Campus de Investigación Janelia Farm en Ashburn (Virginia) y es allí en donde trabaja en el desarrollo de técnicas de microscopía de fluorescencia de super-alta resolución.

El estadounidense **William Moerner**, trabaja en la famosa Universidad de Stanford, EE.UU. Nació en la base aérea de Pleasanton (California) el 24 de junio de 1953. Cursó sus estudios universitarios en la Universidad de Washington en St. Louis obteniendo los títulos respectivos en Física, Ingeniería Eléctrica y Matemáticas en 1975. Los estudios de postgrado los realizó en la Universidad de Cornell, realizando un Máster (1978) y un Doctorado en Física (1982).

William Moerner desarrolló distintas responsabilidades científicas, desde 1981 a 1995, en el Centro de Investigación Almadén de IBM en San José, California. En 1995 fue nombrado catedrático de Química Física en la Universidad de California, cargo que ejerció hasta 1998. En 1998 se trasladó a Stanford con su grupo de investigación y obtuvo el nombramiento de Presidente del Departamento de Química. Sus investigaciones están centradas en la microscopía de alta-resolución, la espectroscopía de moléculas individuales, la captura de nanopartículas y la nanofotónica. Su inmensa labor científica ha sido reconocida con la concesión de gran número de premios y distinciones que culminaron recientemente con el merecido Premio Nobel.

El alemán **Stefan Hell**, dirige el Instituto Max Planck de Química Biofísica en Göttingen (Alemania) y el Centro Alemán de Investigación contra el cáncer de Heilderberg. Nació el 23 de diciembre de 1962 en Arad (Rumanía), aunque de nacionalidad alemana. Hasta 1978 vivió en Rumanía donde realizó sus estudios primarios y secundarios. En esta fecha se trasladó a Alemania con su padre, ingeniero, y su madre profesora. Los estudios universitarios los llevó a cabo en la Universidad de Heilderberg donde culminó con su tesis doctoral (1990), titulada *“Imágenes de microestructuras transparentes en un microscopio confocal”*.

Al norte de Alemania, en la Universidad de Turku trabajó con un grupo de investigación dedicado al microscopio de fluorescencia. Años más tarde le ofrecieron una plaza en el Max Planck Instituto de Química Biofísica en Göttingen.

Desde 2003 ha sido además el líder del departamento de “División de Nanoscopía Óptica” en el centro alemán de Investigación Oncológica e Heilderberg. En ésta misma Universidad ha sido Profesor en la Facultad de Física y Astronomía.

Los nombramientos honoríficos, condecoraciones y premios a partir del 2000 en el que le concedió el Premio de la Comisión Internacional de Óptica, han sido continuos hasta concluir este año con la concesión del Nobel y el Premio Kavli en nanociencia por *“las contribuciones transformadoras en el campo de la nano-óptica que han superado las creencias arraigadas acerca de los límites de resolución de la microscopía óptica y las técnicas de imagen”*.

■ Antecedentes

Desde 1838 en que Schleiden y Schwann promulgaran su **teoría celular** es universalmente aceptado “que todo ser vivo, vegetal o animal, está constituido por unidades fundamentales denominadas células”. A partir de ese momento el hombre dedicó sus esfuerzos al estudio de los medios necesarios para conocer la estructura y función de las células. Justo es reconocer que el nombre de célula procede del impuesto por Hooke (1665) a las celdillas que observó en la estructura de una laminilla de corcho observada con un microscopio óptico simple, muy primitivo. Leeuwenhoek (1674) había observado y descrito, igualmente, protozoos y espermatozoides, también con un microscopio rudimentario.

Los microscopios son instrumentos ópticos que permiten ver aumentada la imagen de un determinado objeto. En la historia de la ciencia biológica resulta fundamental el desarrollo del microscopio óptico y más tarde el microscopio electrónico, y ahora dedicaremos a ello una líneas, sin olvidar que estamos asistiendo a una nueva era que es la del **nanoscopio**.

El microscopio óptico es un instrumento que amplifica una imagen y nos permite la observación de estructuras que a simple vista no era posible su observación. Clásicamente se ha considerado el *microscopio simple* formado por una sola lente de aumento y el *microscopio compuesto* formado por varias lentes. Este tipo

de microscopio también llamado fotónico está constituido por unos componentes mecánicos y unos componentes ópticos. Los componentes ópticos incluyen tres sistemas de lentes, que son el condensador, el objetivo y el ocular. El ocular aumenta la imagen producida por el objetivo (cuando le atraviesa la luz), pero no puede aumentar la resolución.

Y aquí está la clave. ¿Qué se entiende por resolución? “*La resolución es la capacidad del sistema óptico del microscopio para producir imágenes separadas de objetos que se encuentran muy próximos*”.

En 1873, el microscopista **Ernst Abbe** publicó una ecuación demostrando como la resolución del microscopio óptico está limitada por, entre otras cosas, la longitud de onda de la luz. Determinó un límite físico para la resolución máxima de la microscopía óptica tradicional y estipuló que nunca podría ser inferior a $0,2\mu\text{m}$.

La ecuación es la siguiente:

$$d = \frac{0,61 \lambda}{n \sin \alpha}$$

donde d es la distancia mínima que debe separar dos puntos próximos en la muestra para poderlos observar individualizados; λ es la longitud de onda de la luz (527 nm para la luz blanca) y n es el índice de refracción del medio presente entre la muestra y la lente del objetivo. Alfa (α) es igual a la mitad del ángulo del cono de luz que entra en la lente del objetivo.

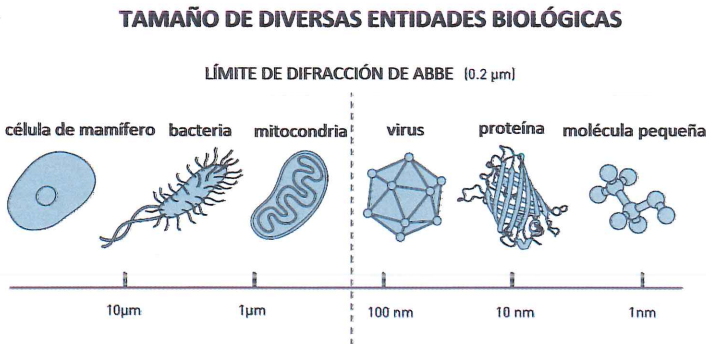


Figura 1. A finales del siglo XIX Ernst Abbe definió el límite de la resolución del microscopio óptico a la mitad de la longitud de onda de la luz $0,2 \text{ micrómetros}$. Esto significaba que se podían distinguir las células y alguno de sus orgánulos, pero no algo tan pequeño como los virus o proteínas individualizadas.

El tamaño de diversas entidades biológicas muestra aquellas que pueden ser descifradas por la microscopía óptica situadas a la izquierda del límite de difracción de Abbe ((de izquierda a derecha) célula de mamífero, bacteria, mitocondria, virus, ribosoma, proteína verde fluorescente (GFP) y timina (Johan Jarnestad 2014, Nobel Price in Chemistry, con modificaciones).

El poder de resolución o también llamado “límite de difracción” no solo depende del sistema óptico sino también de la longitud de onda de la fuente luminosa, el espesor de la muestra, la calidad de la fijación y la intensidad de la coloración. La capacidad del ojo humano para distinguir dos puntos próximos (partículas o líneas) está limitada a 0,2 mm, y la del microscopio óptico a 0,2 μm (figura 1). El micrómetro, micrón o micra (μ) es la unidad de longitud equivalente a una millonésima parte de un metro. Llegados a este momento conviene tener en cuenta cuales son la equivalencias a este respecto en las medidas de longitud:

1.0 milímetro	= 1.000 micrómetros
1.0 micrómetro (μ o μm)	= 1.000 nanómetros
1.0 nanómetro (m μ)	= 10 angstroms
1.0 angstrom	= 0,1 nanómetros (nm)

Hoy día para el estudio e investigación en biología celular y en histología, así como en organografía microscópica, se utilizan distintos microscopios ópticos que han ido apareciendo con el desarrollo de diferentes tecnologías. Los diferentes microscopios, sobre la base estructural común, se diferencian fundamentalmente en las distintas longitudes de onda de las fuentes luminosas utilizadas, la alteración física de la luz que incide o sale de la muestra y los procesos analíticos específicos que se apliquen a la imagen final.

Las muestras para poder ser observadas al microscopio deben ser transparentes o translúcidas. Cuando las muestras proceden de tejidos, se requiere previamente obtener cortes muy finos debidos a la utilización de un aparato de corte llamado *microtomo*. Los microtomos se denominan de congelación o bien de parafina, teniendo en cuenta el material en el que se encastran las piezas. Los cortes así obtenidos, se tiñen bajo la acción de los llamados *colorantes*, tales como la *hematoxilina*, *eosina*, *azul de toluidina*, *verde luz*. Estos compuestos tienen una composición química determinada y se reconocen como colorantes, ácidos, básicos, neutros. Los distintos colorantes se unirán a moléculas biológicas facilitando su visibilidad.

La pieza de la cual se obtendrá el *corte* procedente del microtomo requiere que previamente se la someta a la acción del llamado *fijador* que suele ser una solución química como el formol, el formaldehído, ácido acético, etc.

■ MODELOS DE MICROSCOPIOS ÓPTICOS

Los microscopios ópticos que se utilizan en la investigación son: microscopio de campo claro (el que usan habitualmente los estudiantes), microscopio de contraste fase, microscopio de campo oscuro, microscopio de fluorescencia (del que nos ocuparemos con posterioridad y básico en los estudios de los Premios Nobel), microscopio de barrido confocal, microscopio de luz ultravioleta, microscopio de polarización.

Microscopio de campo claro. Este microscopio es el más utilizado y conocido a nivel de los estudios escolares y universitarios. Puede disponer de un solo ocular (y se le denomina microscopio monocular), pero lo más usual es que conste de dos oculares (microscopio binocular). El ocular es la lente más próxima al ojo observador, mientras que la lente del objetivo es la más próxima a la muestra a observar. Este tipo de microscopio requiere de una fuente luminosa que se sitúa en la parte más inferior, un condensador por encima que permite la proyección de los rayos de luz sobre la muestra y una platina perforada sobre la que se deposita la muestra en un llamado portaobjetos o porta (figura 2).

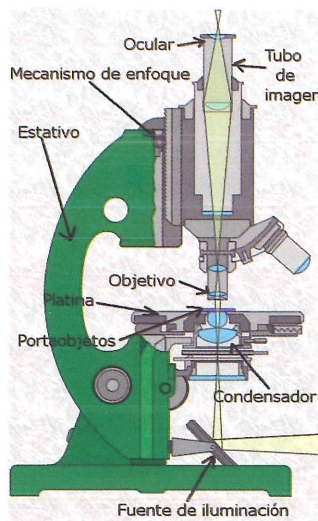


Figura 2. Microscopio óptico ([www/monografias.com](http://www.monografias.com)).

Microscopio de contraste de fase. Es el microscopio habitualmente usado para la observación de células vivas sin teñir, es decir sin la utilización de colorantes. Normalmente se utiliza en el estudio de cultivos celulares y cortes semifinos (de unos 5µm) de tejidos incluidos en material plástico.

Este microscopio tiene en cuenta los diferentes índices de refracción de las diferentes partes de la célula. Las partes más densas producen imágenes más oscuras, mientras que las partes más claras corresponden a zonas menos densas

de la estructura examinada. La luz que atraviesa las zonas de mayor índice de refracción (zonas densas) experimenta una deflexión y queda fuera de fase con respecto a la luz principal de las ondas que atraviesan la muestra.

La muestra a examinar tiene diferentes componentes cada uno de los cuales a su vez tiene distinta composición química por lo que la influencia de la luz les afecta de distinta manera, es decir presentan distintos índices de refracción. Con este modelo de microscopio se pueden observar en las células vivas los diferentes orgánulos que la componen: mitocondrias, complejo de Golgi, vacuolas...y esta observación nos informa de los aspectos dinámicos de los mismos.

Las imágenes obtenidas en ocasiones presentan halos que interfieren y sombras producidas en lugares en los que el índice de refracción experimenta cambios súbitos, se trata entonces del llamado *microscopio de interferencia*. Existen varios tipos de microscopio de interferencia que minimizan los artefactos ópticos. El más conocido y útil es el llamado microscopio de interferencia de Nomarski o DIC (*contraste de interferencia diferencial*) que ofrece unas atractivas imágenes tridimensionales.

Microscopio de campo oscuro. Consta de un condensador especial que ilumina la muestra con luz fuerte indirecta. El objetivo recibe solo la luz dispersa o refractada por las estructura de la muestra. Por tanto, el campo visual se observa con un fondo oscuro (de ahí el nombre) sobre el que aparecen partículas brillantes de la muestra.

Si en una habitación oscura, entra un rayo de luz vemos flotando infinidad de partículas de polvo. Pues bien la luz reflejada por las partículas es la registrada por la retina haciéndolas visibles.

El microscopio de campo oscuro se utiliza para la observación de cristales de ácido úrico o de oxalatos en la orina. Es también muy útil para la detección de microorganismos y para la observación de los gránulos de plata revelados en las autorradiografías. Los gránulos aparecen blancos sobre fondo oscuro.

Microscopio de fluorescencia. Es el microscopio más utilizado para la localización de moléculas en el interior de las células. Las moléculas con capacidad fluorescente emiten una luz de determinada longitud de onda dentro del espectro visible, cuando son expuestas a una fuente de luz ultravioleta (UV). El micros-

copio de fluorescencia se utiliza para la observación de moléculas fluorescentes naturales (autofluorescentes) como ocurre con el caso de la vitamina A y algunos neurotransmisores. Su uso más frecuente es en el caso de inyectar en el interior de la célula colorantes fluorescentes (*fluorocromos*) que se acoplan a determinadas moléculas que en este caso emiten fluorescencia y pueden ser identificadas, como es el caso de los antígenos con los anticuerpos.

Entre la fuente de luz ultravioleta y la muestra se interponen distintos filtros con el fin de lograr una luz monocromática. Entre la muestra y el objetivo se insertan otro conjunto de filtros que solo permiten que la estrecha banda de longitudes de onda de la fluorescencia llegue al objetivo.

Un *fluorocromo* o *fluoróforo* es un componente de una molécula que hace que ésta sea fluorescente. Se trata de un grupo funcional de la molécula que absorberá energía de una longitud de onda específica y la volverá a emitir en otra longitud de onda de mayor longitud y por tanto de menor energía. Estas dos condicionantes dependerán tanto del propio fluorocromo como del ambiente químico en el que se producen.

Un derivado reactivo de la fluoresceína, el llamado *isocianato de fluoresceína* ha sido uno de los fluorocromos que con más frecuencia se han unido químicamente a otras moléculas no fluorescentes con el fin de proporcionar nuevas moléculas fluorescentes. *La rodamina, cumarina y cianina* son fluorocromos que se utilizan habitualmente.

Más adelante nos ocuparemos del microscopio de fluorescencia de alta resolución que ha sido el ideado por los tres Premios Nobel y de sus insospechadas ventajas.

Microscopio de barrido confocal. En este microscopio llama la atención el hecho de que la fuente luminosa es un rayo *láser*. Un sistema de espejos mueve el láser a través de la muestra iluminando un solo punto por vez. Previamente el láser ha pasado por un tubo fotomultiplicador. Los datos de cada punto de la muestra recorrida con el rayo móvil, se guardan en una computadora y posteriormente se pasan a un monitor de vídeo de alta resolución, creando una imagen visual. Las regiones fuera de foco se eliminan de la imagen por medio del programa de la computadora, creándose así una definición máxima de la imagen.

Una de las principales ventajas de este sistema es la posibilidad de obtener imágenes de la muestra en cortes ópticos muy finos (aproximadamente de 1 μm de espesor). Además es posible crear imágenes a diferentes profundidades dentro de la muestra. Es decir se puede estudiar capa por capa de la muestra en todo su espesor. Con una serie de imágenes y gracias a la computadora se pueden lograr reconstrucciones tridimensionales muy nítidas.

Microscopio de luz ultravioleta. Como su nombre indica, este microscopio utiliza como fuente de luz, la luz ultravioleta (UV) y como lentes, lentes de cuarzo. La luz ultravioleta tiene una longitud de onda de unos 200 nm y en consecuencia se puede alcanzar un índice de resolución de 0,1 μm . Hay que tener en cuenta que no se puede observar directamente la muestra por medio del objetivo ya que los rayos UV no son visibles y dañan la retina. Los resultados son registrados en fotografías.

Se utiliza para el estudio y detección de los componentes de los ácidos nucleicos, especialmente las bases púricas y pirimídicas. También se emplea en el estudio de determinadas proteínas que contienen aminoácidos específicos. El funcionamiento del microscopio de luz ultravioleta no es muy diferente del funcionamiento de un espectrofotómetro.

Microscopio de polarización. Entre la fuente de luz y la muestra se dispone un filtro polarizante, conocido como *polarizador*. Entre el objetivo y el observador se encuentra un segundo polarizador que en este caso recibe el nombre de *analizador*. El microscopio de polarización utiliza la propiedad de las moléculas o conjunto de moléculas muy ordenadas, para rotar el ángulo del plano de la luz polarizada.

La capacidad que tiene un cristal o estructura paracristalina de rotar el plano de la luz polarizada se denomina *birrefringencia* (doble refracción). Entre otras muchas estructuras, presentan birrefringencia las células musculares estriadas y algunas inclusiones cristaloides presentes en las células de Leydig o células intersticiales del testículo.

Microscopio de fluorescencia de alta resolución. A finales del pasado siglo XX y en lo que llevamos de siglo XXI, se han llevado a cabo toda una serie de innovaciones en relación con la microscopía de fluorescencia. Se trata de técnicas ópticas complejas (tecnologías de *super resolución*) que permiten a los investigadores

localizar proteínas con marcas fluorescentes en resoluciones de décimas de nanómetros.

Por tanto, la famosa ecuación de Abbe, que preconizaba que nunca se podría alcanzar una resolución mayor que 0,2 micrómetros, ha sido sobrepasada, y hoy es posible un microscopio óptico de nueva dimensión que permite la visualización de moléculas individuales en el interior de las células. Es decir que no hay una estructura demasiado pequeña que no pueda ser estudiada, del microscopio se ha pasado al **nanoscopio**.

Muchas de las técnicas de super resolución se basan en el descubrimiento de que una mutación particular de polipéptido GFP transforma la proteína en una molécula fotoactivable (PA-GFP) y dicha GFP mutante sigue siendo no fluorescente hasta que la activa la luz ultravioleta. Hoy en día se conocen toda una serie de *proteínas fotoconmutables* cuya emisión fluorescente en una determinada longitud de onda puede activarse o desactivarse con pulsos luminosos.

■ La contribución de los premios nobel

La técnica de agotamiento de la emisión estimulada: **STED** (Stimulated Emission Depletion).

Stefan Hell (1962) nació en Rumanía doctorándose en la Universidad de Heidelberg. Actualmente está a cargo de la dirección del Instituto Max Planck de Química Biofísica (Alemania), y del Centro Alemán de Investigación contra el Cáncer de Heidelberg.

Cuando Stefan Hell leyó sobre el concepto de la emisión estimulada, se dio cuenta de que debería ser posible concebir una especie de nano-flash de láser que podría barrer las muestras de nanómetro en nanómetro. Mediante el uso de la emisión estimulada los científicos pueden apagar moléculas fluorescentes. Cuando se dirige un rayo láser a dichas moléculas, pierden inmediatamente su energía y se oscurecen. En 1994, Stefan Hell publicó un artículo que resumía sus ideas (1). En el método propuesto, denominado agotamiento de la emisión estimulada (STED), un pulso de luz excita todas las moléculas fluorescentes, mientras otro pulso de luz apaga la fluorescencia de todas las moléculas excepto en un volumen de tamaño nanométrico en el medio. Solo este volumen es registrado por lo que el

área observada es muy pequeña y precisa (figura 1). Haciendo el correspondiente barrido de toda la muestra es posible obtener una imagen completa y más precisa. Cuanto menor sea el volumen al que se le permite emitir fluorescencia en un instante, mayor será la resolución de la imagen final. Por lo tanto, no hay, en principio, límite a la resolución de los microscopios ópticos (figura 3).

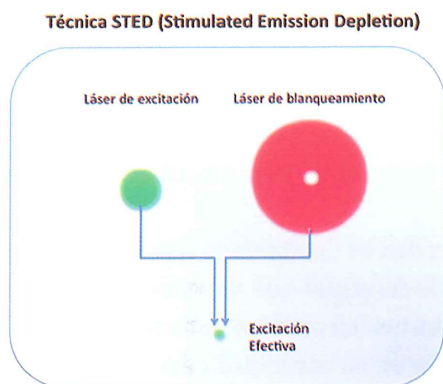


Figura 3. Ejemplo simplificado de la técnica STED. En esta técnica el haz de excitación (verde) se puede hacer más pequeño con otro láser (rojo), que apaga el entorno del primero haciendo que sea más preciso.

El artículo teórico de Stefan Hell no creó ninguna conmoción inmediata, pero era lo suficientemente interesante como para que le ofrecieran un puesto en el Instituto Max Planck de Química Biofísica en Göttingen. En los años siguientes llevó sus ideas a buen término, desarrolló un microscopio STED. En 2000 él fue capaz de demostrar que sus ideas funcionan realmente en la práctica, mediante, entre otras cosas, imágenes de una bacteria *E. coli* con una resolución nunca antes alcanzada en un microscopio óptico.

El microscopio STED recoge la luz de una multitud de pequeños volúmenes para crear una imagen más completa. En contraste, el segundo principio galardonado, la microscopía de una sola molécula, implica la superposición de varias imágenes. Eric Betzig y W.E. Moerner, desarrollaron, independientemente entre sí, los diferentes elementos fundamentales para su desarrollo. El origen de esta segunda técnica ocurrió cuando Moerner logró detectar una sola molécula fluorescente.

■ La primera vez que se detecta una molécula fluorescente

En la mayoría de los métodos químicos, por ejemplo al medir la absorción de luz por una molécula o en medidas de fluorescencia, los científicos estudian millones de moléculas simultáneamente. Los resultados de tales experimentos representan una especie de media de todas ellas. Los científicos han tenido que aceptarlo, sin embargo hay que reconocer que la ciencia soñaba con la medición de moléculas individuales, ya que así sería más fácil y mejor comprender, por

ejemplo, cómo se desarrollan las enfermedades. Así, en 1989, cuando Moerner como el primer científico en el mundo fue capaz de medir la absorción de la luz de una sola molécula, consiguió un logro fundamental.

El experimento abrió la puerta a un nuevo futuro e inspiró muchos químicos a dirigir su atención a las moléculas individuales. Uno de ellos era Eric Betzig, cuyos logros se describen más adelante.

Ocho años más tarde William Moerner dio el siguiente paso hacia la microscopía de una sola molécula, basándose en el descubrimiento anterior de la proteína verde fluorescente (GFP) del Premio Nobel Roger Tsien otorgado en el año 2008.

En 1997 Moerner se incorporó a la Universidad de California en San Diego, donde Roger Tsien, Premio Nobel, estaba tratando de conseguir que la proteína verde fluorescente, GFP, tuviese todos los colores del arco iris. La proteína verde se aisló de una medusa fluorescente y su interés se encuentra en su capacidad para hacer que las proteínas dentro de las células vivas puedan ser visibles. Usando el gen de la GFP los científicos pueden hacer fluorescentes a otras proteínas. La luz verde posteriormente revela exactamente en qué parte de la célula se ubica la proteína marcada.

Moerner descubrió que la fluorescencia de una variante de la proteína GFP se podría encender y apagar a voluntad. Cuando se excita con luz de longitud de onda de 488 nanómetros la proteína comienza a emitir fluorescencia, pero después de un tiempo la fluorescencia se desvanece. Independientemente de la cantidad de luz que dirige a la proteína, la fluorescencia desaparece. Sin embargo, la luz de longitud de onda de 405 nanómetros hace que la proteína vuelva a ser fluorescente al ser de nuevo iluminada con luz de 488 nanómetros.

Moerner dispersa estas proteínas excitables en un gel, de manera que la distancia entre cada proteína individual fuera mayor que el límite de difracción de Abbe de 0,2 micrómetros. Con un microscopio óptico se podría discernir el resplandor de las moléculas individuales –eran como pequeñas lámparas con interruptores, que podía encender y apagar–. Los resultados fueron publicados en la revista científica *Nature* en 1997.

Por este descubrimiento Moerner demostró que es posible controlar ópticamente la fluorescencia de moléculas individuales. Esto resuelve un problema que Eric Betzig había formulado dos años antes (figura 4).

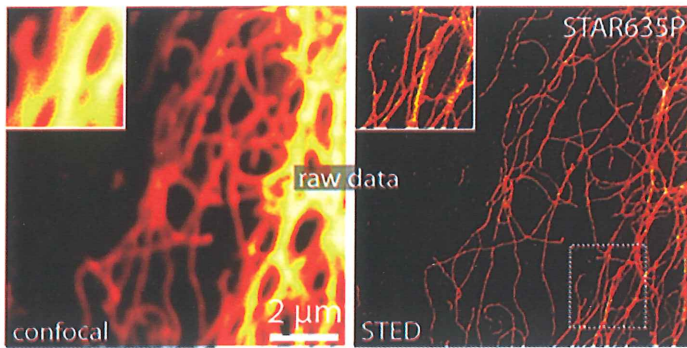


Figura 4. Ejemplo de la técnica STED. Comparación de una muestra de la proteína vimentina observada por microscopía confocal y la técnica STED. Nótese la diferencia en la resolución entre las dos imágenes (imagen libre de derechos obtenida de wikimedia commons).

■ La contribución de Eric Betzig

Al igual que Stefan Hell, Eric Betzig estaba obsesionado por la idea de sobrepasar el límite de difracción de Abbe. A principios de la década de 1990 estaba trabajando en un nuevo tipo de microscopía óptica llamada microscopía de campo cercano en los Laboratorios Bell, en Nueva Jersey. En la microscopía de campo cercano el rayo de luz se emite desde una punta muy delgada que se coloca a solo unos nanómetros de la muestra. Este tipo de microscopía también puede eludir el límite de difracción de Abbe, aunque el método tiene importantes debilidades. Por ejemplo, la luz emitida tiene un corto alcance tal que es difícil de visualizar las estructuras por debajo de la superficie de la célula.

En 1995 Eric Betzig concluyó que la microscopía de campo cercano no podría mejorarse mucho más allá. Además, él no se sentía a gusto en el mundo académico y decidió poner fin a su carrera de investigación; sin saber a dónde iría después, dejando los Laboratorios Bell. Pero el límite de difracción de Abbe se mantuvo en su mente. Durante un paseo un día frío de invierno una nueva idea se le ocurrió. ¿Podría ser posible eludir el límite de difracción utilizando moléculas con diferentes propiedades, moléculas que poseen fluorescencia de diferentes colores?

Inspirado por Moerner, entre otros, Eric Betzig ya había detectado fluorescencia en moléculas individuales utilizando microscopía de campo cercano. Empezó

a preguntarse si un microscopio regular podría producir la misma alta resolución si diferentes moléculas brillaban con diferentes colores, como el rojo, amarillo y verde. La idea era tener el microscopio y registrar una imagen por color. Si se dispersaban moléculas fluorescentes de un color y se encuentran a una distancia mayor a los 0,2 micrómetros estipulados por límite de difracción de Abbe, su posición se podría determinar con gran precisión. Si después hacemos lo mismo con las de otro color, es muy posible que cuando se superpusiesen estas imágenes, la fotografía completa obtendría una resolución entre moléculas mucho mejor que el límite de difracción de Abbe, y así las moléculas de color rojo, amarillo y verde serían distinguibles incluso si su distancia estaba a unos pocos nanómetros. De este modo límite de difracción de Abbe podría eludirse. Sin embargo, hubo algunos problemas prácticos, por ejemplo, una falta de moléculas con una calidad suficiente de propiedades ópticas adecuadas para ser distinguibles.

En 1995 Eric Betzig publicó sus ideas teóricas en la revista *Optics Letters*, y posteriormente abandonó la academia y se unió a la compañía de su padre.

■ La sorprendente proteína verde fluorescente (GFP)

Durante muchos años, Eric Betzig estuvo totalmente desconectado de la comunidad investigadora. Pero un día, un anhelo de la ciencia cobró vida de nuevo y volvió a revisar la literatura científica encontrándose con la proteína fluorescente verde por primera vez. Al darse cuenta de que había una proteína que podría hacer visibles otras proteínas dentro de las células, revivieron los pensamientos de Betzig sobre cómo eludir el límite de difracción de Abbe.

Sin embargo, el verdadero avance se produjo en 2005, cuando encontró que las proteínas fluorescentes que podrían activarse a voluntad, aquellas en las que había trabajado Moerner en 1997. Betzig se dio cuenta de que una proteína como esa era la necesaria para poner en práctica la idea que había tenido diez años antes. Las moléculas fluorescentes no necesitaban ser de diferentes colores sino que valdría con poder encenderlas y apagarlas en diferentes momentos.

La **proteína verde fluorescente** (o **GFP**, *green fluorescent protein*) es una proteína producida por la medusa *Aequorea victoria* que emite bioluminiscencia en la zona verde del espectro visible. Esta proteína se utiliza habitualmente en biología molecular como marcador. En 2008 los profesores Martin Chalfie, Osamu Shinomura y

Roger Tsien fueron galardonados con el Premio Nobel de Química por su descubrimiento y desarrollo de la proteína fluorescente verde, herramienta indispensable para la biología y la medicina modernas.

■ La técnica PALM (photoactivated localization microscopy)

Apenas un año más tarde, Eric Betzig demostró, en colaboración con científicos que trabajan en proteínas fluorescentes excitables, que su idea funcionaba en la práctica. Entre otras cosas, los científicos acoplaron la proteína brillante a la membrana que envuelve el lisosoma de la célula. Con el uso de un pulso de luz las proteínas se activaban emitiendo fluorescencia, pero ya que el pulso era tan débil solo una fracción de estas proteínas comenzaban a brillar. Debido a su pequeño número, casi todos ellos estaban situados a una distancia mayor que el límite de difracción de Abbe de 0,2 micrómetros. Por lo tanto la posición de cada proteína brillante podría ser registrada de forma muy precisa en el microscopio. Después de un tiempo, cuando su fluorescencia se apagaba, los científicos activaban un nuevo subgrupo de proteínas. Una vez más, el pulso era tan débil de modo que solo una fracción de las proteínas brillaba, después de lo cual otra imagen se tomaba. Este procedimiento se repetía una y otra vez (figura 5).

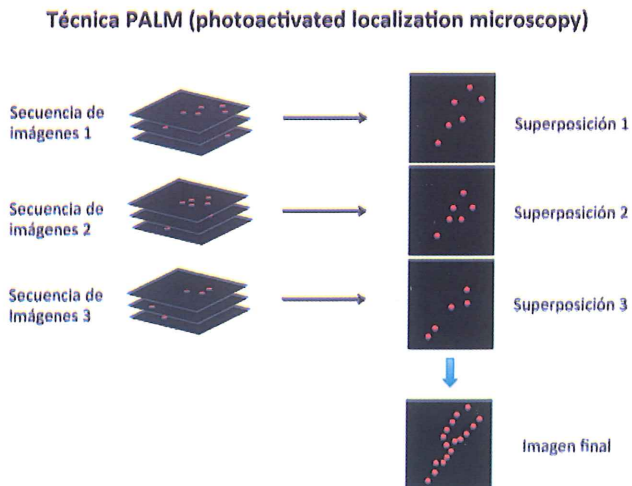


Figura 5. Ejemplo simplificado de la técnica PALM. En la técnica PALM los fluoróforos se van encendiendo y apagando alternativamente, de modo que al combinar muchas fotos del mismo plano y superponerlas, las imágenes obtenidas permiten que la distancia entre fluoróforos sea inferior a 200 nm.

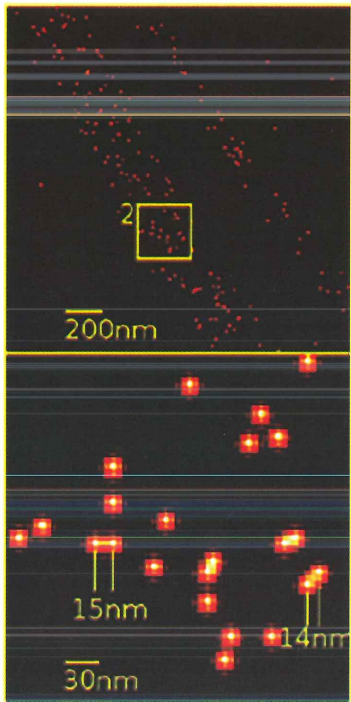


Figura 6. Ejemplo de fluorescencia PALM (photoactivated localization microscopy). Imagen de superresolución de la proteína amarilla YFP, obtenida a partir de modificaciones genéticas de la GFP. En este ejemplo es posible comprobar cómo es posible superar sobradamente el límite impuesto por Ernst Abbe con la técnica PALM (imagen libre de derechos obtenida de la wikipedia).

Cuando Betzig superpuso las imágenes obtenidas consiguió una imagen de alta resolución de la membrana de los lisosomas. A esta técnica se la denominó PALM (photoactivated localization microscopy) que podría traducirse como microscopía de localización fotoactivada o microscopía de una sola molécula. Su resolución era mucho mejor que el límite de difracción de Abbe (figura 6). Un artículo publicado en la revista *Science* en 2006, presentó esta nueva aproximación a la comunidad científica.

■ Conclusiones

En resumen, podemos considerar que el Premio Nobel de Química 2014 ha premiado dos descubrimientos separados. El método de microscopía STED (*stimulates depletion emission*), desarrollado por Stefan Hell en 2000, que utiliza dos rayos laser, uno que estimula moléculas fluorescentes para brillar, y otro que anula toda la fluorescencia excepto para aquella en un volumen de tamaño nanométrico. Con la exploración posterior de la muestra nanómetro a nanómetro, se consigue una imagen con una resolución más elevada del límite estipulado por Abbe.

Eric Betzig y William Moerner, trabajando separadamente encontraron el segundo método, la microscopía de moléculas individuales. El método cuenta con la posibilidad de cambiar a fluorescentes o no fluorescentes moléculas individuales. Repasando la misma área muchas veces, dejando que unas pocas moléculas salpicadas brillen cada momento, la superposición de estas imágenes conduce a una superimagen densa con resolución de nanonivel. En 2006 Eric Betzig utilizó este método por primera vez.

Hoy la nanoscopía se usa en todo el mundo y cada día se producen nuevos conocimientos del mayor beneficio para la humanidad.

Por tanto, la historia de la microscopía de fluorescencia de alta resolución es muy corta. El conjunto microscopía STED y fluoróforos fue aplicado por primera vez en el año 2000 y los métodos basados en fluoróforos individuales, en el año 2006. A pesar de esto, las técnicas en rápido desarrollo de la microscopía de fluorescencia de alta resolución, se aplican a gran escala en los campos más importantes de las ciencias biológicas y de las ciencias biomédicas, como biología, microbiología y neurociencias. En este momento existen muchas razones para predecir que estos descubrimientos ya están produciendo cantidad de nuevos y hasta ahora inalcanzables resultados, producción que se acelerará en las próximas décadas. Estos descubrimientos han de revolucionar la biología y la medicina al permitir descripciones cuantitativas y reales a nanoescala de procesos biológicos moleculares multidimensionales y complejos, que definen el fenotipo de todas las formas de vida.

■ Abreviaturas

DIC, contraste de interferencia diferencial.

GFP, (*green fluorescent protein*) proteína verde fluorescente.

PALM, (*photoactivated localization microscopy*) microscopía de localización fotoactivada o microscopía de una sola molécula.

STED, (*stimulated Emission Depletion*) agotamiento de la emisión estimulada.

UV, ultravioleta.

■ Bibliografía consultada

Abbe, E. (1873). Beiträge zur Theorie der Mikroskops und der mikroskopischen Wahrnehmung. *Archiv für mikroskopische Anatomie* 9, 413-418.

Betzig, E. (1995). Proposed method for molecular optical imaging. *Opt Lett* 20, 237-239.

Betzig, E., Patterson, G.H., Sougrat, R., Lindwasser, O.W., Olenych, S., Bonifacino, J.S., Davidson, M.W., Dickson, R.M., Cubitt, A.B., Tsien, R.Y. y Moerner, W.E. On/off blinking and switching behaviour of single molecules of green fluorescent protein. *Nature*, 388, 355-358.

Cooper, G.M. (2009). Hansman, R. E. *The Cell. A molecular approach*. Boston University Press (5ª edición). 21-28.

Ehrenberg, M. (2014). Super-resolved fluorescent microscopy. The Royal Swedish Academy of Sciences. Nobel Committee for Chemistry Scientific Background of the Nobel Prize in Chemistry pp 1-15.

Ehrember, M. y Lidin, S. (2014). How the optical microscope became a nanoscope. The Royal Swedish Academy of Sciences. Nobel Committee for Chemistry Scientific Background of the Nobel Prize in Chemistry pp 1-7.

Lippincott-Schwartz, J y Hess, H.F. (2006). Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution. *Science* 313, 1642–1645.

Hell, S.W., Wichmann, J. (1994). Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy. *Optics Letters*, 19, 780-782.

Hell, S.W. (2003). Toward fluorescence nanoscopy. *Nat Biotechnol* 21, 1347-1355.

Hooke, R. (1665). *Micrographia or Some Physiological Descriptions of Minute Bodies Made by Magnifying Glasses with Observations and Inquiries Thereupon*. Ed. J. Martyn y J. Allestry.

Klar, T.A., Jakobs, S., Dyba, M., Egnér, A. y Hell, S.W. (2000). Fluorescence microscopy with diffraction resolution barrier broken by stimulated emission. *Proc Natl Acad Sci USA* 97 8206-8210.

Huang, B., Babcock, H. y Zhang, X. (2010). Breaking the diffraction barrier. Super resolution imaging *Cell*, 143, 1047–1058.

Moerner, W.E., y Kador, L. (1989) Optical detection and spectroscopy of single molecules in a solid. *Phys Rev Lett* 62, 2535–2538.

Ross, M.H., Romvold, L.J. y Kaye, G.I. (1997). *Histología (Texto y Atlas en color)*. Editorial Médica Panamericana. 3ª edición; pp 10-16.

Sahl, S.J. y Moerner, W.E. (2013). Super-resolution fluorescence imaging with single molecules. *Current Opinion in Structural Biology* 23, 778-787.

Schleiden, Matthias Jakob: **Beiträge zur Phylogenesis. In: *Archiv für Anatomie, Physiologie und wissenschaftliche Medizin*. 1838, pp. 137-176.**

Schwann, T. (1839). *Mikroskopische Untersuchungen über die Übereinstimmung in der Struktur und dem Wachstum der Thiere und Pflanzen*. Verlag der Sanders'schen Buchhandlung (G.E. Reimer). Berlin.
<http://www.vanleeuwenhoek.com/letters.htm>