

## Técnicas de microscopía óptica

*F. Javier Díez Guerra*

---

Arbor CLXXVII, 698 (Febrero 2004), 225-258 pp.

### Introducción

Durante los últimos años, las técnicas de microscopía óptica y sus aplicaciones han experimentado un auge sin precedentes. Más concretamente, la difusión de sistemas de microscopía confocal durante los 90 ha empujado con fuerza el desarrollo de la microscopía de fluorescencia y abierto nuevos horizontes de investigación. Este fenómeno ha venido propiciado por varios motivos. Por una parte, los progresos en la tecnología de detectores fotosensibles, tanto chips CCD (charge-coupled devices) como fotomultiplicadores (PMT), cada vez de mayor resolución y sensibilidad. En segundo lugar, la amplia variedad de fluorocromos disponibles en todo el espectro visible, incluidas las proteínas fluorescentes de medusas (*Aequorea Victoria*, *Renilla*, etc) y, más recientemente, de corales. Finalmente, la evolución imparable de los sistemas de iluminación, ahora basados en láseres, así como de los elementos ópticos (filtros de interferencia, prismas, rejillas de difracción, etc) cada vez más eficaces.

Los recientes progresos de la microelectrónica e informática tampoco han quedado desapercibidos en el campo de la microscopía. El control automatizado de los sistemas de iluminación (barrido por láser, obturadores y diafragmas, ruedas de filtros, etc), de los sistemas de enfoque y posicionamiento, o de los tiempos de exposición y ganancia de los fotodetectores son aspectos que se ejecutan automáticamente desde la consola del ordenador. También es relevante la aportación de la informática en el análisis y procesado de imágenes. La utilización conjunta de la instrumentación más sofisticada junto con avanzados algoritmos de análisis y procesamiento de imágenes permite organizar y dar significado a la información que fluye por el interior del microscopio.

Todos estos avances han resultado determinantes en la evolución del microscopio, que ha pasado de ser un instrumento dedicado en exclusiva a la inspección ocular directa, a constituir un elemento más dentro de un sistema complejo que sirve tanto para la observación directa de muestras, como para realizar estudios cuantitativos y comparativos de aspectos más concretos. Entre ellos, podemos destacar la determinación de la localización y concentración de múltiples constituyentes celulares, su trasiego entre distintos compartimentos, su vida media o su interacción con otros componentes.

Una de las tendencias más recientes es la observación y análisis de preparaciones biológicas «in vivo», es decir, en una situación similar a su estado natural. La posibilidad de generar microentornos compatibles con el mantenimiento normal de la vida (control de temperatura, nutrientes, concentraciones salinas, pH, presión de gases como O<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub>, etc) permite analizar procesos fisiológicos en distintas escalas temporales. La medida en tiempo real de las variaciones de calcio intracelular en células musculares o el seguimiento de linajes celulares durante el desarrollo de *Caenorabditis Elegans* son experimentos perfectamente asequibles a día de hoy. En el presente capítulo, mi objetivo es realizar un repaso personal de las técnicas de microscopía óptica desarrolladas más recientemente, sus fundamentos y sus posibilidades.

### Una breve perspectiva histórica

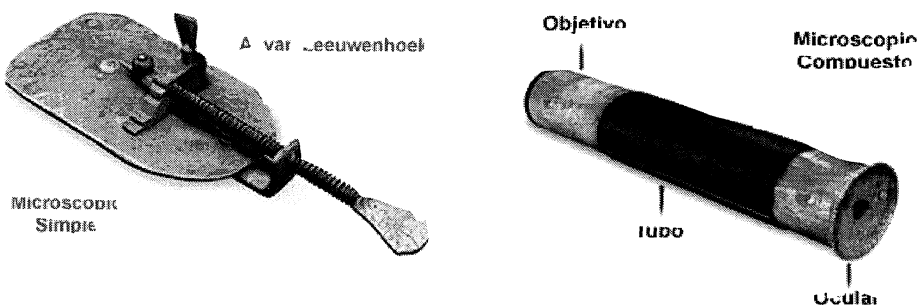
Muy frecuentemente, cuando se recuerda o alude al descubridor del microscopio como instrumento científico se menciona sin dudar a Anthony van Leeuwenhoek (Delft, Holanda). Sin embargo, antes de que Leeuwenhoek naciera, un compatriota suyo —Zacharias Janssen— y el británico Robert Hooke ya habían inventado y construido de forma independiente los primeros microscopios. Estos instrumentos tenían forma de catalejo invertido y estaban formados por dos lentes: el ocular, que cuyo nombre se relaciona con su proximidad al ojo del observador, y el objetivo, lente próxima al objeto o muestra.

Aunque no inventó el microscopio, a Leeuwenhoek se le recuerda en todos los libros de texto por sus enormes contribuciones en el campo de



Anthony van Leeuwenhoek  
(1632-1723)

la Biología. Él fue el primero en observar y describir la existencia de bacterias, paramecios, espermatozoides, glóbulos rojos y una serie interminable de organismos microscópicos (nematodos y rotíferas). Su microscopio, construido con una sola lente (microscopio simple) fue muy superior a los microscopios compuestos de la época, construidos con dos lentes, tanto en poder resolutivo como en magnificación. Leeuwenhoek llegó a conseguir 200 aumentos frente a los 30 de los microscopios compuestos. Las claves de su éxito fueron, además de su habilidad para pulir lentes de alta calidad, su extraordinaria agudeza visual, su inagotable curiosidad y el rigor y realismo de sus descripciones.



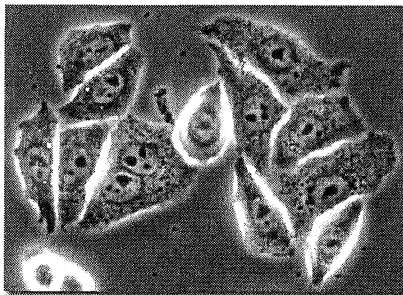
Tras Leeuwenhoek, el concepto y diseño de microscopio compuesto, presente también en instrumentos como prismáticos o telescopios, se fue abriendo paso, aunque su implantación definitiva se produjo con bastante lentitud. Las aberraciones ópticas, especialmente esférica y cromática, muy evidentes en sistemas compuestos, no se corrigen eficazmente hasta bien avanzado el siglo 18, cuando se comienzan a combinar en los objetivos lentes fabricadas con materiales de distinta dispersión óptica.

Durante el siglo 19, el progreso continuó en el diseño y fabricación de microscopios de mayor resolución y corrección. Para finales de siglo, varias compañías dedicadas a su fabricación y comercialización estaban bien establecidas y comenzaban a competir. Entre ellas, destacó la compañía fundada por Carl Zeiss en 1846, que comenzó construyendo microscopios simples, pero rápidamente optó por el desarrollo y construcción de microscopios compuestos. Desde esta compañía, especialmente tras la incorporación de Ernst Abbe, se realizaron aportaciones decisivas para la evolución de la microscopía óptica. En 1872, Ernst Abbe formula su teoría sobre la formación de imagen en microscopios, conocida como la teoría de ondas, y diseña un sistema de iluminación (condensador de Abbe) que proporciona imágenes con una calidad y resolución desconoci-

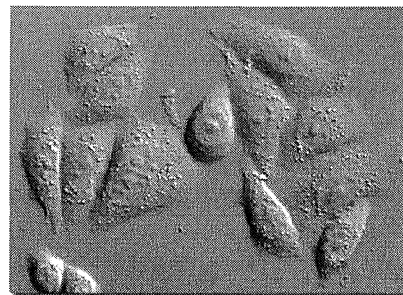
das en la época. Más tarde, August Köhler propuso un método de ajuste (iluminación Köhler) capaz de extraer toda la capacidad resolutive de los objetivos y condensadores diseñados por Ernst Abbe. Este método se sigue utilizando rutinariamente hoy en día.

A pesar de las guerras mundiales, en el siglo 20 se produjeron avances en los procesos de fabricación y pulido de lentes, mejorando su apertura numérica y por tanto su poder resolutive. Pronto se descubrieron las carencias de unos instrumentos desarrollados para la inspección de muestras teñidas, que eran incapaces de revelar detalles de organismos unicelulares vivos, debido a su gran transparencia y bajo contraste. En 1934, el físico holandés Frits Zernicke (premio Nobel de física en 1953) desarrolla la técnica de contraste de fases. Esta técnica permite la observación de objetos prácticamente transparentes como, por ejemplo, células en cultivo, que no absorben ni desvían la luz significativamente, pero introducen un pequeño retardo en su propagación y, por tanto, un cambio de fase. La técnica de contraste de fases permitió, por primera vez, observar cromosomas metafásicos en una célula viva y resultó determinante para establecer las etapas de la mitosis y meiosis durante el ciclo celular.

En la misma época, un físico francés llamado Georges Nomarski, desarrolló un sistema de generación de contraste que hoy se conoce genéricamente como contraste de interferencia diferencial (DIC). Este sistema convierte pequeños gradientes ópticos en diferencias amplificadas de intensidad en el plano de imagen y requiere luz polarizada y unos prismas especiales (prismas de Wollaston). Las imágenes generadas dan la sensación de relieve y gozan de una resolución muy elevada.



Contraste de fases



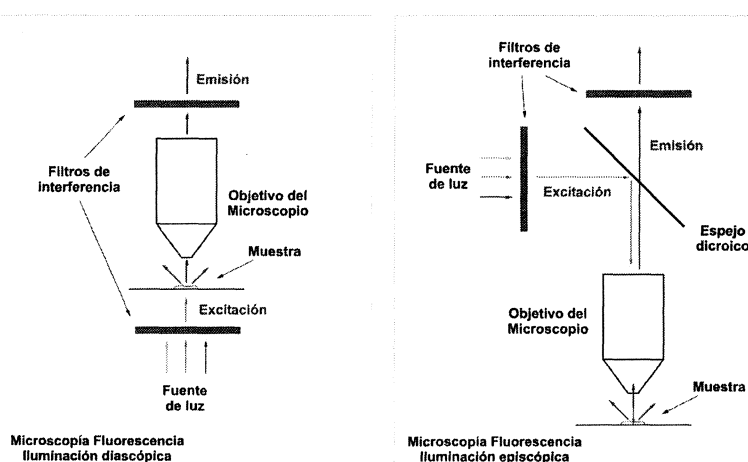
Contraste de interferencia diferencial (DIC)

### **Microscopia de Fluorescencia**

Sin embargo, en el área de la biomedicina y, especialmente, la biología celular, la técnica que mayor influencia está ejerciendo es la mi-

Microscopía de fluorescencia. La fluorescencia es un fenómeno conocido desde la antigüedad, aunque inicialmente descrito de forma científica por Georges Gabriel Stokes en 1852. Este científico británico comprobó que los cristales de fluorita, al ser iluminados con luz ultravioleta, emitían una intensa luz púrpura azulada. Stokes comprobó también que la luz emitida por el cristal presenta siempre una longitud de onda superior a la luz de iluminación. Este fenómeno, conocido como «Stokes shift» es una característica básica de la fluorescencia, formulada en la ley que lleva su nombre. En la actualidad, la fluorescencia se encuadra dentro de un grupo de fenómenos conocidos colectivamente como luminiscencia, que se define como la emisión de luz en respuesta a la absorción previa de energía. Ésta energía puede ser lumínica, como es el caso de la fluorescencia, química, eléctrica o de cualquier otra índole.

Los primeros microscopios de fluorescencia se construyeron en Alemania a principios del siglo 20, entre otros por August Köhler. Estos primeros diseños fueron diascópicos, es decir, el observador se sitúa en línea recta frente a la fuente de iluminación y, entre la muestra y el observador, se coloca un filtro opaco para las longitudes de onda de la luz incidente (UV) y transparente para la radiación fluorescente, de mayor longitud de onda. Este sistema se asemeja mucho a la observación de un gel de DNA en un transiluminador de luz UV. Sin embargo, debido a la limitada efectividad de los filtros, la sensibilidad de estos microscopios era muy escasa. Posteriormente, aprovechando que la fluorescencia es emitida en todas las direcciones del espacio, se modificó el diseño pasando a una configuración de iluminación episcópica, que es el modelo actual, en el que la luz de excitación y la fluorescencia emitida viajan en direcciones opuestas a través



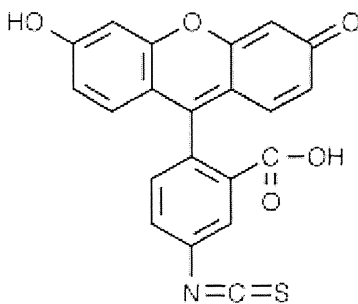
del objetivo. Este sistema presenta unos niveles mínimos de ruido lumínico y permite visualizar muestras con emisión fluorescente débil.

En un microscopio de fluorescencia, a diferencia de uno convencional, se utiliza una fuente de iluminación de intensidad elevada, generalmente basada en una lámpara de arco de mercurio o de xenón que ilumina la muestra a través de un filtro interferencial (excitación) y un espejo dicróico. Ambos seleccionan una banda del espectro óptima para la excitación del fluorocromo, que emite luz (fluorescencia) a una longitud de onda mayor. Esta luz es recogida por el objetivo, pasa el espejo dicróico y un segundo filtro interferencial (emisión) y es enfocada en un plano para formar la imagen ampliada del objeto fluorescente, accesible al observador a través de los oculares o a un dispositivo de captura de imagen (cámara de video, cámara digital CCD, etc) a través de un puerto especial. Así pues el microscopio de fluorescencia forma una imagen ampliada de la muestra, pero utiliza únicamente la luz fluorescente emitida por los fluorocromos presentes en ella.

### **Fluorocromos**

Inicialmente, el microscopio de fluorescencia se utilizó para analizar muestras con fluorescencia endógena como minerales cristalizados y algunas bacterias y proteínas (elastinas, queratinas, etc). La disponibilidad de colorantes fluorescentes (fluorocromos) imprimió un rumbo completamente distinto a la evolución de esta técnica. Inicialmente desarrollados para la industria textil, los fluorocromos mostraron muy pronto sus posibilidades en el campo de la Biología. Su utilización en muestras biológicas permitió observar estructuras y morfologías con un detalle hasta entonces inédito. Fue entonces cuando se fraguaron los principios de la microscopia de fluorescencia indirecta, basada en la utilización de fluorocromos en disolución para teñir selectivamente componentes de la muestra y, de esta forma, revelar su estructura y composición con detalle.

A mediados del siglo 20, comienza el progreso ascendente de la microscopia de fluorescencia en la Biología. Fluorocromos como la fluoresceína o la rodamina, compuestos orgánicos constituidos por anillos aromáticos con gran número de electrones deslocalizados, emiten fluorescencia con una alta eficiencia. La conjugación de anticuerpos secundarios con estos fluorocromos proporcionó una poderosa herramienta para citólogos e histólogos con varias ventajas sobre las técnicas inmunocitoquímicas tradicionales basadas en la peroxidasa de rábano (HRP). En primer lugar, la



Isotiocianato de Fluoresceína

microscopía de fluorescencia tiene mayor capacidad de resolver detalle puesto que la imagen se forma con la luz emitida por el fluorocromo, mientras que la inmunocitoquímica tradicional utiliza un depósito o precipitado opaco, generalmente, de diaminobenzidina. En segundo lugar, hace posible la realización de marcajes múltiples en la misma preparación, pudiendo visualizar varios componentes utilizando distintas bandas del espectro visible (colores). Antes, los estudios de colocalización

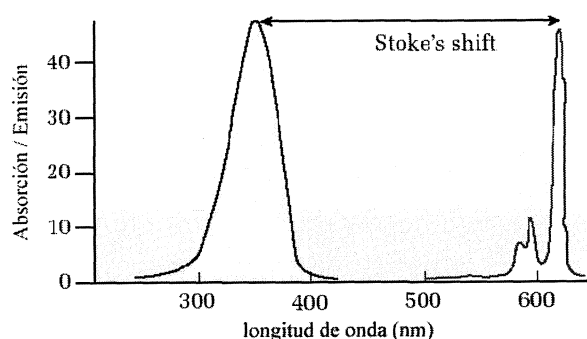
se realizaban utilizando cortes seriados y por tanto resultaban meras extrapolaciones. Finalmente, comparando la sensibilidad de ambas técnicas, la microscopía de fluorescencia ha progresado mucho, siendo ya posible detectar la fluorescencia emitida por una sola molécula. A ello han contribuido no sólo la utilización de fluorocromos optimizados o cascadas de amplificación de señal, también la ampliación de los límites de sensibilidad de los fotodetectores que permiten el análisis de fenómenos muy rápidos (Vg. cambios de potencial de membrana) o de fenómenos que afectan a un número muy limitado de moléculas.

Aunque la utilización de anticuerpos conjugados con fluorocromos se halla muy extendida, existen otras aplicaciones de los fluorocromos no menos importantes. Desde los años 60, se han venido desarrollando métodos para identificar y cuantificar compuestos orgánicos y macromoléculas definidos por su interacción ó reacción química con otros compuestos que, fluorescentes o no, generan un producto fluorescente. En los años 70, el método de visualización de las catecolaminas noradrenalina y dopamina en tejido nervioso se encontraba muy extendido. El tratamiento de cortes de tejido nervioso con vapores de paraformaldehído favorece su condensación con las catecolaminas y la formación de productos (tetrahidroisoquinolonas) que reaccionan con proteínas cercanas y forman fluoróforos (grupos químicos fluorescentes). Esta técnica sirvió para realizar un mapeo exhaustivo de las vías catecolaminérgicas del sistema nervioso de varias especies. En la misma época, se descubrieron compuestos (DAPI, Hoescht) que interaccionan fuertemente con ácidos nucleicos y forman complejos fluorescentes, permitiendo revelar de forma específica su localización en muestras biológicas. Estos compuestos se intercalan entre las bases nitrogenadas de los ácidos nucleicos y muestran distintas preferencias para zonas ricas en pares AT o GC.

Más recientemente, se han introducido varias familias de sondas lipofílicas fluorescentes (DiI, DiO, FM1-43, FM4-64) con la particularidad de que su fluorescencia solamente se produce en ambientes hidrofóbicos. Esta característica las convierte en sondas idóneas para la identificación y seguimiento de membranas biológicas mediante microscopía de fluorescencia. Existen además, sondas para la identificación y localización de proteínas de citoesqueleto, indicadores de la concentración de iones como  $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Na}^{+}$ ,  $\text{Mg}^{+2}$ , etc, indicadores de pH y potencial de membrana; marcadores de viabilidad y proliferación celular, sondas para estudiar el tráfico intracelular de membranas o para identificar orgánulos y compartimentos celulares.

Es por tanto evidente que las aplicaciones actuales de la microscopía de fluorescencia son múltiples y, además, se encuentran en constante evolución. Sin embargo, existen unos límites que hay considerar y que afectan principalmente a los fluorocromos. Un fluorocromo ideal debería presentar espectros de excitación y emisión lo más estrechos posibles, así como un desplazamiento de Stokes elevado. Estas características permitirían la utilización de un mayor número de marcadores en la misma preparación, ya que su discriminación sería más sencilla y precisa. Por otra parte, un fluorocromo ideal debería tener un elevado coeficiente de extinción molar, es decir, alta capacidad de absorción en sus máximas de excitación, y preferiblemente, un valor de eficiencia cuántica ( $Q_e$ ) cercano a la unidad. Este valor nos indica la proporción de energía absorbida por el fluorocromo que es posteriormente emitida en forma de fluorescencia. Cuanto mayor sea el coeficiente de extinción molar y la eficiencia cuántica de un fluorocromo más brillante será su fluorescencia y, por tanto, mayor la capacidad de detectarlo. Un fluorocromo ideal debería ser químicamente lo más estable posible y, en especial, resistente a la fotoxidación (photobleaching). Este fenómeno es habitual y se produce por la mayor reactividad química de los fluoróforos en su estado excitado y por el aumento de agentes oxidantes (radicales libres) producidos como consecuencia de iluminar a intensidades medias y altas en presencia de oxígeno molecular. La fotoxidación no debe confundirse con el apantallamiento o «quenching» que se puede producir por cambios de pH, de concentraciones de iones o por la proximidad del fluoróforo a otros grupos aromáticos. En ambos casos se produce una pérdida de fluorescencia; sin embargo, en el caso del «quenching» la pérdida es reversible, mientras que en el caso de la fotoxidación, no. La fotoxidación implica una transformación química del grupo fluoróforo, en la que intervienen radicales libres, que lo inhabilita irreversiblemente para emitir fluorescencia.

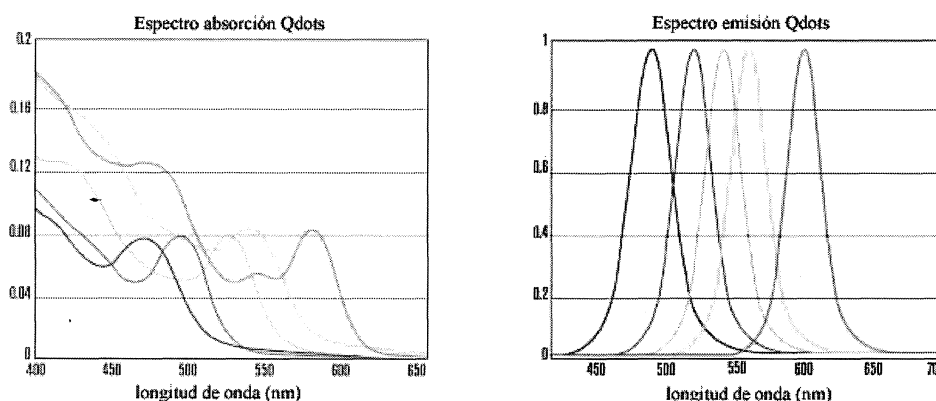




Espectros de Absorción y Emisión del Europio

Los fluorocromos que más se aproximan al ideal están constituidos por elementos denominados tierras raras o lantánidos. El Europio es bien conocido por su gran desplazamiento de Stokes (300nm), máximo de excitación alrededor de los 330 nm y máximo de emisión por encima de los 610 nm, su larga vida media de fluorescencia (1msec). A pesar de su baja eficiencia cuántica, su fluorescencia no es susceptible de «photobleaching», como es el caso de los fluorocromos orgánicos. Más recientemente, una generación nueva de fluoróforos con aplicaciones más directas para la microscopía está emergiendo. Se trata de los denominados «quantum dots» (Qdots) constituidos por nanocristales de seleniuro de cadmio (CdSe) de diámetro inferior a 10 nm, recubiertos por una capa externa de sulfuro de zinc (SZn). Para aumentar su solubilidad, estos complejos se tratan con polímeros orgánicos (grupos carboxilo) que favorecen su hidratación y aportan grupos funcionales para su conjugación con anticuerpos, estreptavidina, etc. El tamaño final de las nanopartículas se encuentra en el entorno de 10-15 nm, similar al tamaño de muchas proteínas celulares. El funcionamiento de los Qdots es el mismo que el de los pigmentos coloidales utilizados en las vidrieras coloreadas de las antiguas iglesias y catedrales. Absorben luz en amplias franjas del espectro y emiten fluorescencia por las transiciones energéticas de un número de electrones compartidos y confinados en el interior del nanocristal. Presentan un espectro de emisión más estrecho que los fluoróforos orgánicos, cuyas características dependen del tamaño y composición del nanocristal. Son excitados mejor a longitudes de onda situadas en el entorno de los 420 nm, aunque su espectro de absorción es muy amplio. Son extremadamente fotoestables y no experimentan «photobleaching», lo que les hace apropiados para experimentos «in vivo» con capturas frecuentes de imagen o periodos largos de seguimiento. Los Qdots presentan una efi-

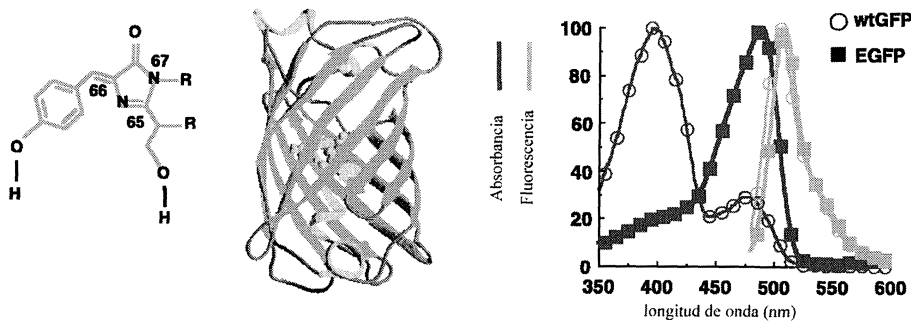
ciencia cuántica elevada y una fluorescencia brillante, que supone un aumento significativo de la relación señal-ruido en la imagen. Finalmente, otra ventaja importante es que su espectro de emisión puede diseñarse a la carta, a diferencia de los fluorocromos orgánicos, introduciendo variaciones en la composición y, especialmente, el tamaño de los nanocristales.



### Proteínas Fluorescentes

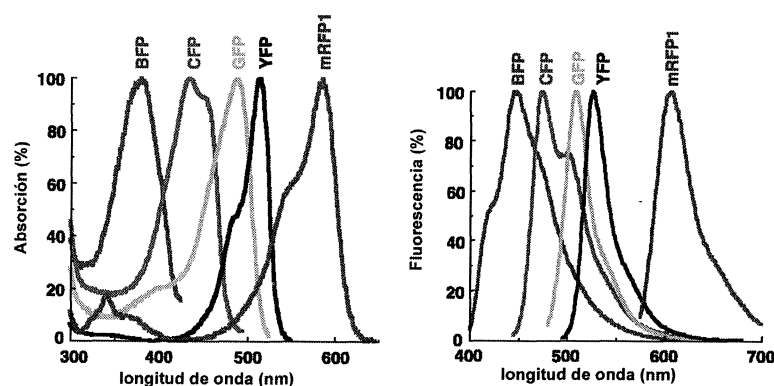
Ahora bien, la verdadera revolución de los últimos años ha venido de la mano del descubrimiento y aplicaciones de las proteínas fluorescentes y ha incidido especialmente en el campo de la biología celular. La proteína verde fluorescente (GFP) fue descubierta en 1962 por Shimomura, en la medusa *Aequorea Victoria* presente en el Pacífico Norte. Esta medusa es prácticamente transparente y presenta la peculiaridad de emitir luz verde cuando se estimula de forma mecánica (contacto). En realidad, la bioluminiscencia natural que se produce en esta medusa necesita otra proteína, la aequorina, cuyo grupo prostético se oxida en presencia de calcio y emite luz a 470 nm (azul). Esta luz es capturada por la GFP que, a su vez, emite a 508 nm (verde). Es decir, la GFP actúa como transductor de la aequorina y su significado sería emitir luz muy brillante para desconcertar a posibles depredadores que entren en contacto con la medusa. Lo más sobresaliente de esta proteína es que no necesita ningún grupo prostético para emitir fluorescencia. Su fluoróforo se encuentra codificado en su secuencia y se genera durante la síntesis al plegarse formando una estructura característica en forma de lata de refresco jalonado por láminas beta (estructura  $\beta$ -can). La propia cadena polipeptídica,

sin necesidad de proteínas auxiliares, se pliega y cataliza una reacción de oxidación y ciclación que resulta en la formación del elemento fluorescente en el que intervienen los residuos Ser65-Tyr66-Gly67 y se sitúa horizontalmente en el interior de la «lata beta». Estas características han atraído fuertemente la atención y servido de base para múltiples aplicaciones, especialmente a partir de 1992 cuando Prasher clona GFP por primera vez y demuestra con claridad que su fluorescencia depende exclusivamente de su secuencia, ya que el gen expresado en otras especies, incluso en bacterias, genera proteína con exactamente las mismas características.



GFP es una proteína muy estable y de pequeño tamaño (238 aa). Durante los últimos años el esfuerzo dedicado a mejorar y/o modificar sus características ha sido increíble. Se han introducido mutaciones para «humanizar» sus codones y aumentar su nivel de expresión, mejorar su plegamiento a 37°C (Phe64Leu), evitar su dimerización a altas concentraciones (Ala206Lys, Leu221Lys, Phe223Arg) o acelerar la formación del fluoróforo y convertir los distintos picos de absorbancia en un sólo a 489 nm (Ser65Thr). Todas estas mutaciones se han combinado para producir una GFP mejorada (enhanced GFP, EGFP), en la que la estabilidad y, sobre todo, la brillantez de la fluorescencia son superiores a las de la proteína nativa (wtGFP). Desarrollos posteriores han permitido desarrollar formas mutantes de EGFP con distintos espectros de absorción y emisión. La proteína fluorescente azul (BFP) se genera por la mutación Tyr66His. Esta variante no es muy utilizada debido a que su fluorescencia es débil y su fotoxidación rápida. La variante de color azul claro (cyanFP, CFP) es más brillante y estable que BFP y lleva la mutación Tyr66Trp. Recientemente se ha introducido una nueva versión de ECFP, mCerulean, que presenta dos veces más fluorescencia. La variante ama-

rilla (EYFP) presenta múltiples mutaciones y es aún más brillante que EGFP. Sin embargo, su maduración en Golgi es más lenta y su fluorescencia es sensible a bajo pH y a concentraciones iónicas. Recientemente, se han desarrollado dos versiones de EYFP (Venus y Citrina) igualmente brillantes, pero sin los inconvenientes de EYFP. Los esfuerzos para generar variantes rojas a partir de GFP de *A. Victoria* no han tenido éxito. Sin embargo, la investigación en otros organismos marinos como los corales *Discosoma* y *Heteractis Crispa* han dado como resultado el desarrollo de dos proteínas, DsRed y HcRed respectivamente, con espectros de emisión en el rojo. Los avances realizados con las proteínas fluorescentes rojas son muy recientes. La mutación Lys83Met desplaza el pico de emisión de DsRed de 583 nm a 602 nm, mejorando su separación con otras proteínas fluorescentes. Sus mayores inconvenientes, hasta ahora, venían motivados por su lenta maduración y fuerte tendencia a oligomerizar en forma de tetrámeros. La introducción de 33 mutaciones en DsRed, la mayor parte de ellas argininas, ha dado como resultado la generación de mRFP1, una proteína roja fluorescente monomérica, de maduración rápida aunque con menor brillantez y fotoestabilidad que la DsRed nativa.



Las aplicaciones surgidas a raíz de la disponibilidad de las proteínas fluorescentes (FPs) son numerosas y no se limitan a un campo concreto de la Biología. La diferencia fundamental crucial entre las FPs y otros fluoróforos es su utilización en organismos o preparaciones vivas. Las FPs se utilizan como reporteros para identificar, localizar y cuantificar la actividad de promotores *in vivo*, para realizar seguimientos de linaje celular durante el desarrollo y diferenciación celular o, más frecuentemente, para marcar o etiquetar con fluorescencia otras proteínas cuya vida

media, localización subcelular, translocación entre compartimentos, interacción con otras moléculas o proteínas se quiera analizar. El abordaje utilizado en estos casos es generar construcciones para la expresión de proteínas de fusión que incluyan alguna de la FPs.

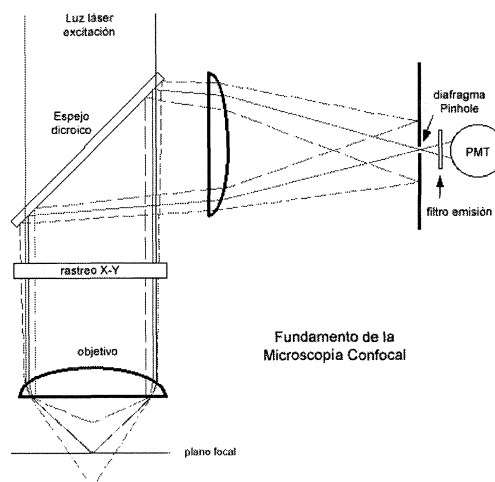
Las proteínas fluorescentes de desarrollo más reciente presentan fluorescencia variable y son idóneas para analizar patrones temporales de expresión y vida media de proteínas. Una de ellas es «*timer*», una variante de la proteína fluorescente roja drFP583 que tras su síntesis es verde y en el transcurso de varias horas se transforma en una proteína fluorescente roja. Analizando la relación entre fluorescencia verde y roja se puede extrapolar la vida media de la proteína de fusión correspondiente. Otras son proteínas fluorescentes fotoactivables que presentan inicialmente una fluorescencia muy baja o nula, y aumentan su fluorescencia tras ser irradiadas con una longitud de onda diferente a su pico de excitación. PA-GFP (GFP fotoactivable), generada por la mutación Thr203His, es capaz de incrementar hasta 100 veces su fluorescencia por excitación a 488 nm, tras ser iluminada con luz a 413 nm. Kaede es una proteína fluorescente identificada en el coral *Trachyphyllia geoffroyi*. Tras ser irradiada a 400 nm, Kaede pasa de 508/518 nm a 572/582 nm en sus picos de excitación/emisión, lo que quiere decir que se transforma de proteína fluorescente verde a roja, presentando ratios de fluorescencia roja/verde 2000 veces mayores tras su fotoactivación. Kaede, sin embargo, aún presenta problemas de oligomerización, lo que limita sus posibilidades y aplicaciones en la actualidad.

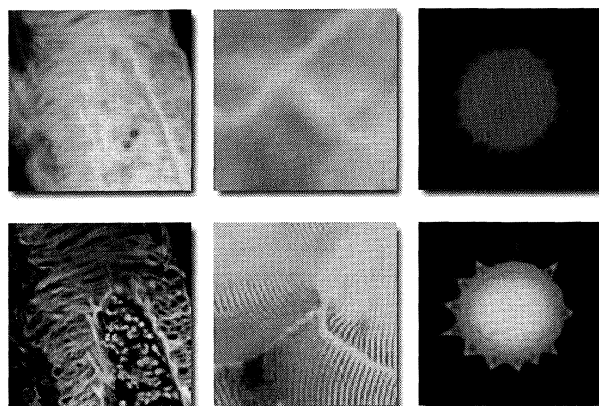
### Microscopia Confocal

Uno de los avances que más ha impactado en la microscopía reciente ha sido el microscopio confocal. Aunque la idea original se atribuye a Nipkow, fue realmente Marvin Minsky en 1957 quién diseñó, construyó y patentó un instrumento en el que se aplicaban los principios básicos de la microscopía confocal. Treinta años más tarde, Brad Amos and John White (Cambridge, UK) construyen el primer microscopio confocal diseñado para muestras biológicas, movidos por la necesidad de visualizar y reconstruir en el espacio los planos de división celular durante el desarrollo de *C. Elegans*, utilizando anticuerpos anti-tubulina e inmunofluorescencia. La microscopía confocal parte de los principios de la microscopía de fluorescencia y los mejora con un diseño capaz de eliminar la fluorescencia fuera de foco, es decir, procedente de planos superiores e inferiores al plano focal. El microscopio confocal por tanto captura exclusi-

vamente la fluorescencia que se genera en el plano focal, y consigue mejor contraste y resolución. Los elementos necesarios para conseguirlo son varios. En primer lugar, un sistema de iluminación secuencial de la muestra que puede estar basado en un barrido láser XY mediado por espejos galvanométricos o en un disco de Nipkow (barrido secuencial en distintos puntos simultáneamente). En segundo lugar, es necesario ubicar un diafragma (pinhole) de apertura variable en un unto del camino óptico (punto focal de la lente de tubo) para impedir el progreso hacia el fotodetector de la fluorescencia emitida desde planos superiores e inferiores al plano focal. Existe una relación estrecha entre la apertura del diafragma y el grosor de la sección confocal, es decir, a mayor apertura, mayor es el grosor de la sección óptica analizada.

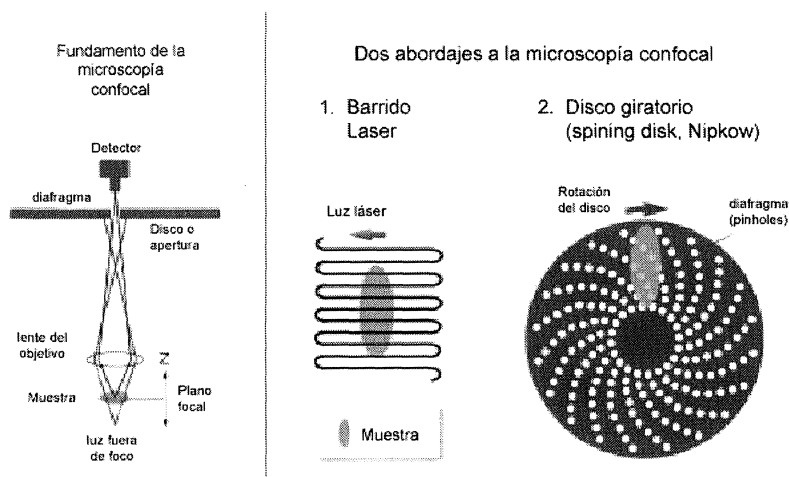
En los sistemas que utilizan barrido láser XY, el detector es un fotomultiplicador constituido por un único fotoelemento que acumula la energía de los fotones incidentes y la amplifica y transforma en una señal eléctrica a una frecuencia determinada. La coordinación entre el sistema de barrido y la frecuencia del fotomultiplicador, define la posición e intensidad de cada señal (píxel) en el plano de imagen. En el sistema basado en el disco de Nipkow el funcionamiento es el mismo, con la salvedad de que esta operación se realiza en varios puntos simultáneamente. La luz incidente se proyecta sobre un disco en rotación que contiene múltiples líneas de pequeños diafragmas colocados en espiral. La fluorescencia emitida desde cada punto vuelve a través de los mismos diafragmas y es proyectada sobre una matriz bidimensional de fotodetectores (CCD).





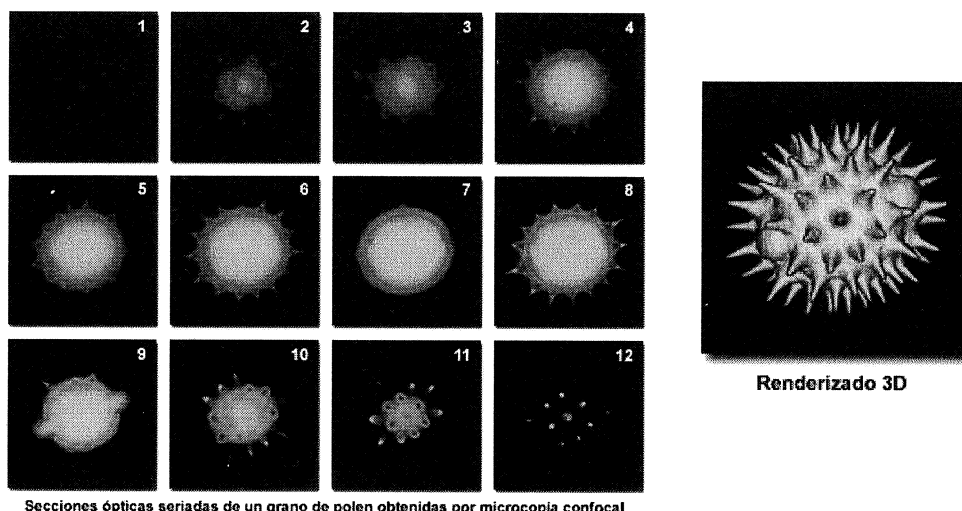
Comparativa entre microscopía de fluorescencia y confocal

Ambos sistemas, el barrido XY y el disco giratorio, generan resultados equivalentes, es decir, secciones ópticas a distintas alturas que sirven para reconstruir en 3 dimensiones un objeto fluorescente. De esta forma, la microscopía confocal introduce la tercera dimensión (eje z) en la microscopía, que nos permite comprender e interpretar relaciones estructurales en el espacio. Otra consecuencia del rechazo de la fluorescencia fuera de foco es el aumento de la resolución de la imagen, considerada ésta como la capacidad de discriminar dos puntos fluorescentes muy próximos entre si. Este aspecto, por sí sólo, ya justifica la adopción de este sistema de microscopía ya que permite realizar estudios de localización múltiple de fluoróforos (colocalización) con una precisión antes desconocida.



La elección entre el sistema de barrido o disco giratorio, depende en gran medida de las aplicaciones a desarrollar. El sistema de barrido permite controlar el tamaño del diafragma (pinhole) para cada canal de fluorescencia de forma independiente y, por tanto, consigue mejor resolución en el eje z. Este sistema se utiliza mucho para visualizar y analizar muestras fijadas y procesadas por inmunofluorescencia. El sistema de disco giratorio es más apropiado para estudios *in vivo* que requieran confocalidad, ya que produce menos fototoxicidad y, gracias al barrido múltiple que realiza, consigue mayor velocidad de adquisición (del orden de 10-30 fps, dependiendo de la fluorescencia). Además, este sistema permite observar directamente la imagen confocal en los oculares, opción que no es posible en ningún otro sistema.

La difusión masiva de la microscopía confocal en la década de los 90 supone un cambio radical en la forma de analizar muestras biológicas al microscopio. Antes, el estudio de la localización espacial requería seccionar la muestra con un microtomo y obtener cortes seriados que tras su procesamiento individual servían para reconstruir la muestra en tres dimensiones. El rechazo de la luz procedente de planos fuera de foco, característica del microscopio confocal, permitió por primera vez analizar estructuras y componentes celulares en preparaciones intactas. Un ejemplo muy claro es la localización intranuclear. Antes del confocal era imposible precisar sin margen de error la localización intranuclear de marcadores, a no ser que se realizara un estudio de microscopía electrónica en cortes ultrafinos. Actualmente, la microscopía confocal permite obviar ese estudio y asegurar la presencia intranuclear con gran fiabilidad.





En los últimos años se han introducido gran cantidad de mejoras y adelantos en los sistemas de microscopía confocal. Actualmente, la variedad de fuentes de luz láser disponible es mucho mayor que hace escasamente 5-6 años. La tendencia actual es ir sustituyendo los láseres basados en gases nobles (argón, helium-neón, kriptón, etc) por láseres basados en diodos, más estables y duraderos. La calidad de la iluminación es cada vez mayor. Los láseres actuales emiten luz coherente (en fase), colimada (haz paralelo) y polarizada con unas tolerancias muy reducidas. Constantemente aparecen nuevos láseres de mayor vida útil, que van poblando los huecos que quedan en el espectro visible. La tecnología ha evolucionado en la regulación de la intensidad del láser, cuya potencia de bombeo es siempre constante (máxima). Antes, la intensidad se atenuaba mediante filtros neutros de distinta densidad colocados después del láser. En la actualidad, se utilizan filtros optoacústicos (AOTFs) basados en cristales de óxido de telurio que, orientados adecuadamente, son capaces de atenuar la luz que transmiten en función de la frecuencia e intensidad de los ultrasonidos aplicados. Además, los AOTFs se usan para rechazar la transmisión de la luz en bandas concretas del espectro, con gran precisión de corte de banda (de 0 a 100% transmitancia, en 1 nm) y la posibilidad de conmutarlos a gran velocidad (transición cerrado/abierto = 1 seg).

Otro avance implementado recientemente en los sistemas de última generación es el análisis espectral, que se basa en la utilización de un elemento de dispersión de luz, bien sea un prisma o una red de difracción (grating), para descomponer y proyectar el espectro de la fluorescencia sobre los fotodetectores. Existen dos abordajes distintos: uno es acotar franjas (slits) de paso utilizando espejos móviles frente a los fotodetectores y el otro es proyectar toda la línea espectral sobre un array de fotodetectores múltiples, de manera que cada uno captura una banda fija del espectro. Estos sistemas permiten analizar los patrones espectrales de emisión de fluoróforos o del ruido de fondo (background), archivarlos y utilizarlos después para separar mezclas (spectral unmixing) mediante algoritmos apropiados. Esta técnica facilita mucho el análisis en tejidos que típicamente presentan autofluorescencia como el cerebro, tejidos vegetales, etc. Tras analizar y archivar su patrón espectral, éste es sustraído automáticamente durante la captura para generar una imagen limpia del fluoróforo utilizado. Los sistemas con análisis espectral permiten del mismo modo separar fluoróforos con perfiles de fluorescencia cercanos y, por tanto, posibilitan el acomodo de mayor número de marcadores en la misma muestra.

No todo son ventajas en la microscopia confocal. Una de sus desventajas es su alta fototoxicidad. Como se apuntó anteriormente, en el microscopio confocal, sólo una parte de la fluorescencia alcanza el fotodetector, la mayor parte es rechazada por el diafragma (pinhole) a fin de obtener secciones ópticas confocales. Esto no puede ser de otra manera si se pretende conseguir confocalidad. Por tanto, para obtener relaciones señal/ruido suficientes e imágenes con cierta calidad, es necesario incrementar la intensidad de la excitación. Por este mismo motivo se utilizan láseres en los sistemas confocales, ya que permiten obtener intensidades puntuales de iluminación muy elevadas. Así, un microscopio confocal necesita una fuente de iluminación con una intensidad varias veces superior a la de uno convencional para obtener una imagen con un nivel de saturación comparable. A mayor intensidad, mayor fototoxicidad y por tanto mayor fotoxidación y pérdida de fluorescencia. Este aspecto debe ser considerado cuidadosamente, especialmente cuando se trabaja con muestras difíciles de replicar, porque su mera inspección para realizar los ajustes necesarios de potencia, ganancia o «averaging» puede arruinarla completamente.

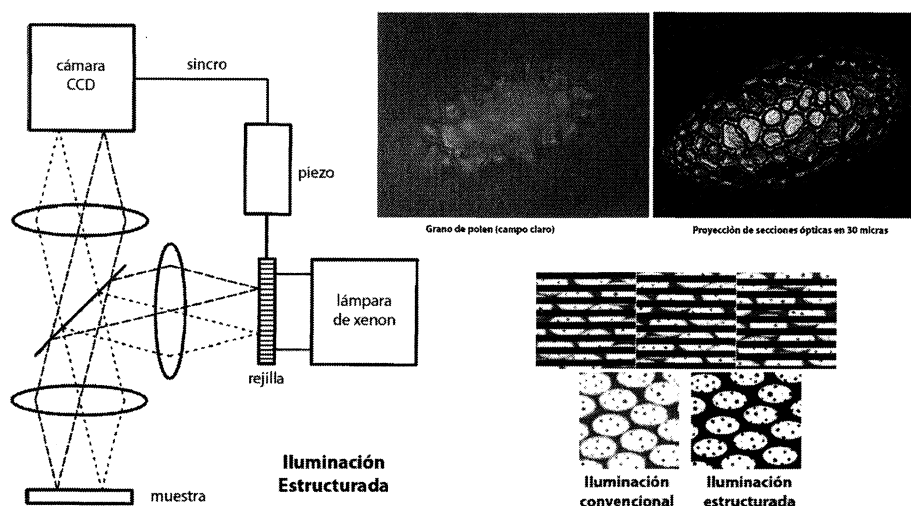
Este problema se agrava en gran medida cuando se pretende hacer seguimiento de muestras «in vivo» (células en cultivo, desarrollo embrionario, etc). En estos experimentos, la intensa iluminación de la muestra necesaria para la captura de imagen se debe repetir una y otra vez, afectando no sólo la fotoxidación sino también otros factores que afectan la viabilidad. Entre ellos, hay que destacar la generación de fotoproductos derivados de la riboflavina (vitamina B2), triptófano, tirosina y otros, que aumenta con la intensidad de la luz, su longitud de onda (más nociva por debajo de 540 nm) y la concentración de oxígeno. En casi todos los casos, la producción de radicales libres seguida de la generación de peróxidos, como el agua oxigenada (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), es el causante de la citotoxicidad. La prevención de estos efectos requiere un estudio cuidadoso de la composición del medio de cultivo, la inclusión de compuestos antioxidantes como el ácido ascórbico (vitamina C) o la vitamina E junto con mezclas apropiadas de enzimas (catalasa, superóxido dismutasa), la utilización de longitudes de onda de excitación en el rojo o infrarrojo y, sobre todo, dosificar la exposición a la luz todo lo posible.

Desde el punto de vista instrumental, la utilización de sistemas confocales basados en el disco giratorio de Nipkow contribuye a reducir los niveles de fototoxicidad y mejorar la viabilidad en experimentos «in vivo». Este sistema resulta menos dañino esencialmente por su mayor rapidez de adquisición de imagen, propiciada por el barrido múltiple y la detección mediante CCDs. En general, cuanto más eficiente y sensible

sea el sistema de captura, menor fototoxicidad, ya que podremos trabajar con intensidades de excitación inferiores. Las dos tecnologías disponibles de fotodetección, CCDs y PMTs, están evolucionando de forma convergente. Por un lado, los PMTs están incrementado sensiblemente su eficiencia ( $Q_e$ ) utilizando nuevos materiales (arseniuro de galio) y sistemas de reflexión interna por prismas ópticos, que incrementan el porcentaje de fotones que inciden con éxito en el fotodetector. Por otro lado, los CCDs, tradicionalmente más eficientes que los PMTs pero de ganancia limitada, están evolucionando hacia los denominados ECCDs (enhanced CCDs). En los ECCDs, la carga acumulada por el impacto de fotones en cada fotoelemento es amplificada en el mismo chip con un nivel mínimo de ruido para alcanzar ganancias que exceden los 3 órdenes de magnitud. Si a estos niveles de amplificación añadimos eficiencias de más del 90%, típicas de los «back-illuminated thin» CCDs, los niveles de sensibilidad son suficientes para detectar la fluorescencia procedente de una sola molécula. Para reducir el ruido generado por efecto térmico («dark current») estos chips necesitan ser refrigerados a  $-40^\circ\text{C}$  o menos. Actualmente, estos detectores se utilizan en cámaras de video ultrarrápidas, capaces de generar secuencias de video a razón de más de 1000 imágenes por segundo en condiciones normales de iluminación. La implementación de estos chips en sistemas basados en el disco de Nipkow está permitiendo utilizar fuentes de iluminación basadas en lámparas de xenón, sin necesidad de recurrir al láser. Esto supone, no sólo un menor costo, sino también una mayor flexibilidad para escoger longitudes de onda de excitación, que pueden seleccionarse utilizando filtros pasabanda o, mejor aun, un monocromador de apertura variable; sin necesidad de utilizar láseres con longitudes de onda fija, mucho más costosos y menos flexibles.

Además de los sistemas de barrido, existen formas alternativas de generar imágenes confocales. Un sistema que se está imponiendo cada vez más, debido a su sencillez y bajo coste, se fundamenta en utilizar iluminación estructurada. Según abandonamos el concepto clásico del microscopio, en el que debe haber un plano de muestra y un plano de imagen (amplificada) con toda la información, las posibilidades se multiplican. Este es el caso de la iluminación estructurada, que utiliza una rejilla para proyectar un fino patrón de bandas sobre la muestra. La rejilla es desplazada verticalmente por un dispositivo mecánico piezoeléctrico de gran precisión. Para conseguir una imagen confocal es necesario capturar 3 imágenes en tres posiciones, cada una de ellas desplazada un tercio del periodo de la rejilla respecto de la siguiente. De cada captura se descarta la luz procedente de planos fuera de foco, presente en

el patrón opaco de la rejilla. Tras combinar las tres imágenes parciales se obtiene una imagen en la que un porcentaje alto de luz fuera de foco ha sido eliminado. Este sistema reúne gran simplicidad, elevada eficiencia lumínica y baja fototoxicidad. No requiere iluminación láser ni tampoco diafragmas (pinoles). Se puede instalar en cualquier microscopio y permite obtener imágenes confocales en técnicas de fluorescencia y reflexión. Ahora bien, como sucede en los sistemas de barrido, la imagen no puede observarse en los oculares. Es necesario disponer de un sistema de captura digital y un software que procese las imágenes parciales. Con los algoritmos actuales y la potencia de los ordenadores actuales es posible observar la imagen confocal en el monitor prácticamente a tiempo real.

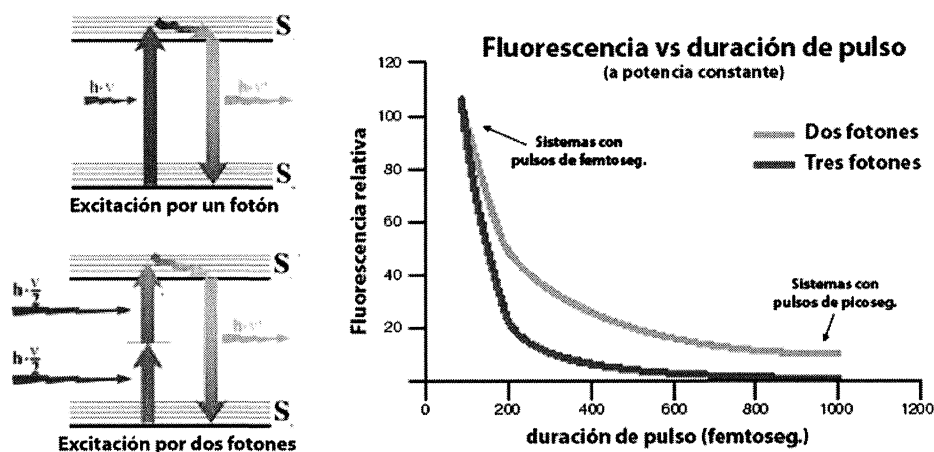


### Microscopía multifotón

La microscopía multifotón es un desarrollo reciente dentro de la microscopía de fluorescencia cuyo desarrollo presenta un enorme potencial. El fenómeno de la emisión de fluorescencia por absorción de dos o más fotones fue descrito por Maria Goppert Mayer, premio Nobel de física en 1963, en su tesis doctoral (1931). Treinta años después, la disponibilidad de los primeros láseres pulsados de rubí permite demostrar experimentalmente la propuesta de Goppert Mayer, lográndose excitar por dos fotones una sal de Europio ( $\text{CaF}_2:\text{Eu}$ ). Años después, ya en los 70, se consigue la excitación por 3 fotones de fluorocromos orgánicos. La idea del microscopio confocal multifotón es propuesta por el grupo liderado por Colin Sheppard y Tony Wilson en Oxford (UK) en los años 80, y desarro-

llada por Winfried Denk, James Strickler y Watt Webb en la Universidad de Cornell (Ithaca, NY), que patentan la tecnología en 1991.

Un fluoróforo puede conseguir la energía necesaria para emitir fluorescencia de varias maneras. Una de ellas, es la absorción de un fotón con una energía o longitud de onda ( $\lambda$ ) determinada. Este fenómeno está bien estudiado y define a cada fluoróforo por su espectro de excitación (monofotón) característico. Otra alternativa, menos probable, es la absorción secuencial de varios fotones de menor energía (mayor  $\lambda$ ) de manera que, entre todos, logren alcanzar el estado de excitación necesario para la emisión de un fotón fluorescente. Para que se produzca esta acumulación de energía es necesario que la absorción de los fotones se produzca en un intervalo muy corto de tiempo, del orden de 10 attosegundos. Este intervalo se corresponde con la vida media de relajación de los estados energéticos provocados por la absorción de cada fotón individual. Por tanto, si 2 o más fotones son absorbidos en este lapso de tiempo su energía se acumulará y se podrá emitir fluorescencia. De otro modo, el fluoróforo liberará la energía absorbida en forma de calor o cambios en la velocidad de rotación molecular (spin).

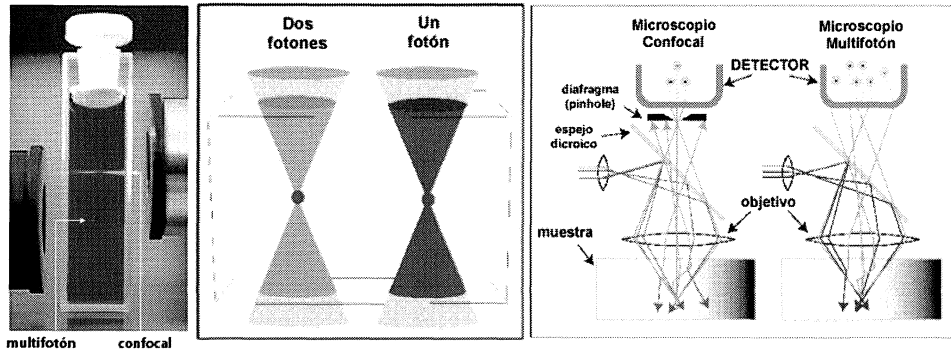


La fluorescencia por excitación multifotón no se produce de forma natural porque la probabilidad de que dos fotones sean absorbidos por la misma molécula en un lapso inferior a 0.1 femtosegundo es bajísima. Para que este fenómeno se produzca es necesario aumentar la densidad de fotones (intensidad de iluminación) varios órdenes de magnitud. La probabilidad de excitación por dos fotones depende linealmente del cuadrado de la intensidad de la iluminación. Se calcula que la densidad de

fotones necesaria para excitar la fluorescencia en un sistema multifotón es de 6 órdenes de magnitud superior que la excitación por un fotón. Solamente los láseres pulsados de estado sólido son capaces de alcanzar las intensidades necesarias para producir excitación multifotón. Los láseres más habitualmente usados son los de titanio:zafiro (Vg SP Tsunami) capaces de entregar más de 100 miliwatios en pulsos de 50 femtosegundos, cada 10 nanosegundos en un rango de longitudes de onda variable entre 690 a 1060 nm. En la actualidad, existe gran interés y también competencia para desarrollar láseres cuyos pulsos sean lo más cortos posible, ya que la densidad de fotones varía de manera inversa con la duración del pulso.

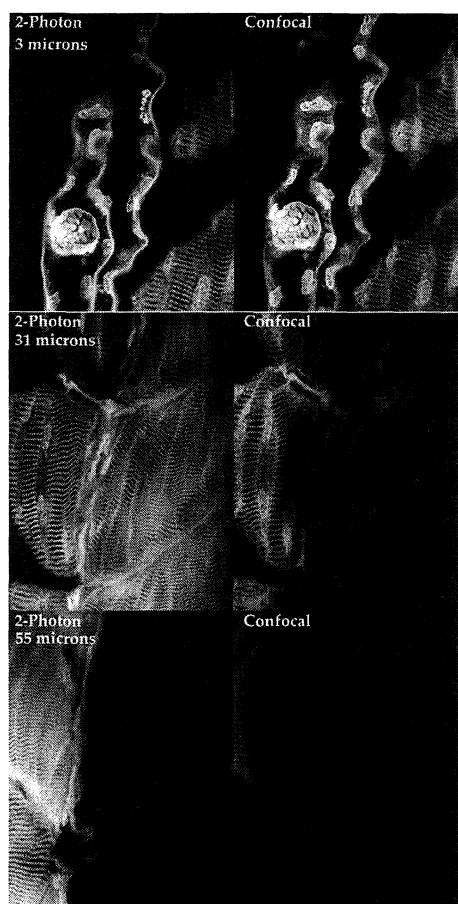
¿Cuáles son las ventajas que añade la microscopía multifotón? La principal característica del multifotón es que la excitación se limita al punto donde el objetivo concentra la mayor densidad de fotones. Por debajo de una densidad fotónica determinada no se produce excitación y, por tanto, tampoco fluorescencia. Esta peculiaridad limita drásticamente la fototoxicidad derivada de la iluminación, puesto que los fluoróforos situados en planos superiores e inferiores no son excitados. En el microscopio confocal convencional el haz de luz produce excitación en todo su recorrido y, por tanto, mucha mayor fototoxicidad. Cuanto mayor sea la magnificación y apertura del objetivo, menor será el volumen del punto de excitación en el microscopio multifotón. Por regla general, la excitación por dos fotones requiere longitudes de onda algo inferiores a dos veces sus máximos de excitación por un fotón. Por ejemplo, si la fluoresceína presenta un máximo de excitación por un fotón a 488 nm, el pico de excitación por dos fotones debería situarse en torno a los 850-900 nm. Si la excitación fuera por tres fotones, entonces la longitud de onda óptima de excitación se movería en torno a los 1200 nm, es decir, menos del triple de su máximo a 488 nm. Por lo general, los espectros de excitación por dos o tres fotones no presentan picos abruptos como los de excitación por un fotón, sino picos mucho más suaves que permiten un amplio margen de posibilidades de excitación. La excitación por longitudes de onda ubicadas en el espectro infrarrojo presenta varias ventajas. En primer lugar, la radiación infrarroja penetra con mayor facilidad en el interior de la muestra ya que su grado de absorción y desviación (scattering) es muy reducido (comparado con la radiación visible). En segundo lugar, debido a su baja absorción, la radiación infrarroja no produce prácticamente fototoxicidad, y se adecua mejor a estudios de muestras «in vivo».

Otra característica destacable del microscopio multifotón es la ausencia de diafragmas (pinoles) para rechazar la fluorescencia procedente de planos fuera de foco. La confocalidad en el microscopio multifotón viene



dada porque la excitación se limita a los fluoróforos situados en un mismo plano focal. Por tanto, no dispone ni necesita elementos para restringir el paso de fluorescencia al fotodetector. A resultas de ello, la colección de fotones es mucho más eficiente. En la microscopía multifotón, el grosor de la sección óptica depende de las características del objetivo (aumentos y apertura) y de la potencia de láser que se aplique en cada pulso. Cuanto mayor sea la potencia aplicada mayor será el grosor del plano barrido por el láser. Además de ser más eficiente en capturar la fluorescencia emitida, la microscopía confocal se caracteriza por su mayor capacidad de penetración en el interior de muestras con un cierto grosor como pueden ser cortes de tejido, embriones completos, etc. La razón de esta mayor capacidad de penetración reside en la longitud de onda utilizada. Como se apuntó anteriormente la radiación infrarroja presenta menor absorción y desviación a su paso por la muestra. En el microscopio confocal convencional la luz de excitación es fuertemente absorbida por la muestra, de manera que según se penetra en su interior la intensidad decae rápidamente. Dependiendo de la muestra y la longitud de onda de excitación el confocal convencional experimenta una disminución notable de eficiencia a partir de los  $30\ \mu\text{m}$  de profundidad. Sin embargo, en similares condiciones, el microscopio multifotón comienza a experimentar pérdidas de brillantez a partir de los  $80\ \mu\text{m}$  de profundidad. Con el sistema multifotón, se han llegado a conseguir imágenes de células marcadas en el interior de la corteza cerebral de un organismo vivo a una profundidad de hasta  $500\ \mu\text{m}$ . Idealmente, la excitación por tres fotones puede conseguir una mayor penetración y resolución. Sin embargo, también la potencia de láser necesaria es mucho mayor. En la actualidad, sólo es posible excitar con tres fotones fluoróforos cuyos máximos de absorción (monofotón) se encuentran en el ultravioleta (DAPI, Hoescht, NADPH, etc). Por otra parte, la excitación con tres fotones sería aún me-

nos nociva para muestras «in vivo», ya que cuanto mayor sea la longitud de onda de excitación, menor absorción presentará la muestra y por tanto, menor fototoxicidad.



¿Qué desventajas presenta el microscopio multifotón? Evidentemente la primera de ellas es su elevado coste de adquisición y mantenimiento. El coste del láser pulsado supone en la mayoría de las ocasiones más de la mitad del costo del equipo. Por lo demás, el principal cuidado que hay que tener es evitar el sobrecalentamiento de las muestras. Este se produce cuando las muestras poseen algún compuesto que absorbe en las longitudes de onda que normalmente se utilizan (infrarrojo).

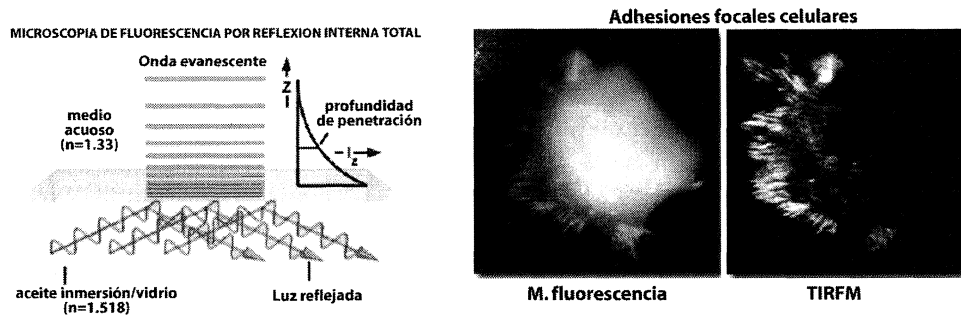
Otra ventaja del multifotón es la posibilidad de trabajar en confocal con fluoróforos que absorben en el UV, sin necesidad de excitarlos con luz UV que presenta muy baja penetración en el tejido, baja transmisión en las lentes normalmente empleadas en los objetivos y una fototoxicidad elevadísima en experimentos «in vivo». La utilización de longitudes de onda en el infrarrojo es capaz de producir excitación de estos fluoróforos obviando todos los problemas.

### Microscopía de fluorescencia por reflexión interna total (TIRFM)

No solamente la la microscopía confocal ha experimentado progresos en los últimos años. La aparición y desarrollo de nuevas técnicas es una constante en el campo de la microscopía de fluorescencia. Un ejemplo de ello es una técnica, relativamente novedosa, pero de implantación muy reciente que se está imponiendo para el estudio de fenómenos que acon-



tecen en la membrana plasmática celular o sus cercanías. La microscopía de fluorescencia por reflexión interna total (TIRFM), se basa en el principio de la reflexión total y generación de una onda evanescente. Muy brevemente, al proyectar un haz de luz sobre una superficie pulida constituida de un material transparente con distinto índice de refracción, es posible encontrar un ángulo de incidencia tal que la totalidad de la luz proyectada es reflejada. Este ángulo se denomina ángulo crítico y en el punto donde se produce la reflexión total se genera una onda electromagnética (la onda evanescente), de igual frecuencia que la luz incidente, que progresa perpendicularmente hacia el lado de opuesto y decae exponencialmente con la distancia de avance. La onda evanescente es capaz de excitar aquellos fluoróforos que se encuentren a una distancia no superior a 200 nm de la superficie de reflexión.



Hace unos años, instalar un sistema TIRFM era una tarea complicada y costosa. Entonces, el sistema de iluminación estaba basado obligatoriamente en un láser y necesitaba añadir condensadores especiales para lograr ángulos de incidencia compatibles con la reflexión total. En la actualidad, gracias a la disponibilidad de objetivos de alta apertura (NA de hasta 1.45 en aceite de inmersión) el mismo objetivo puede actuar como condensador y como colector de fluorescencia. Además, el grado de sensibilidad que alcanzan actualmente los fotodetectores permite utilizar lámparas de mercurio o xenón en lugar de láseres. Las aplicaciones de esta técnica se asocian con mucha frecuencia a estudios de muestras «in vivo». Sus ventajas derivan de la capacidad de excitar, de forma exclusiva, una franja de aproximadamente 100-200 nm en contacto con la superficie de reflexión, la baja fototoxicidad que presenta, su alta relación señal/ruido en la captura de imagen y la posibilidad de visualizar la imagen directamente en los oculares. El resto de la muestra, situado por encima de la franja de excitación, simplemente no se visualiza porque no

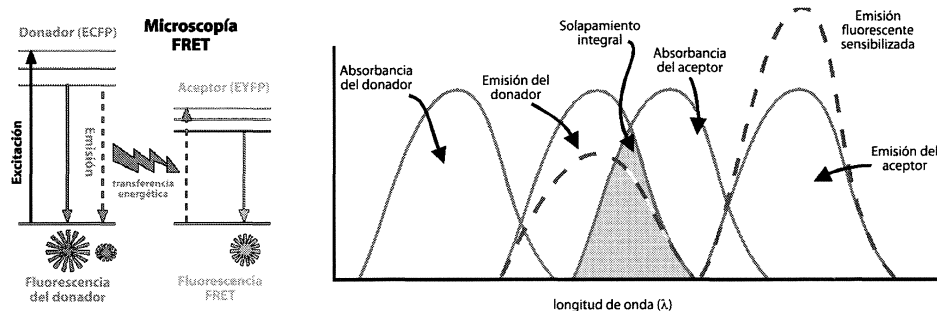
es excitada. En este sentido, la microscopía TIRF funciona como si de un confocal se tratara pero con una capacidad de resolución axial superior aunque, eso sí, limitado a la superficies de contacto

TIRFM se utiliza en estudios de seguimiento de endocitosis y exocitosis, formación de adhesiones focales y otros complejos de adhesión celular y en la localización y dinámica de proteínas de membrana, como receptores, etc. La preparación más adecuada para esta técnica son células cultivadas sobre cubreobjetos de vidrio. Su principal limitación reside en su incapacidad de visualizar más allá de la zona afectada por la onda evanescente. Sin embargo, los microscopios de fluorescencia actuales permiten conmutar sin dificultad y con rapidez entre técnicas de TRIFM y microscopía de fluorescencia convencional. Las desventajas que presenta TIRFM están relacionadas con la interpretación de los resultados. La intensidad de la onda evanescente disminuye exponencialmente con la distancia que recorre. Por tanto, la variación de fluorescencia en un punto determinado puede ser interpretada tanto como un movimiento lateral de difusión o concentración de fluoróforo, como por un desplazamiento vertical entrando y saliendo de la franja útil de excitación. Cada caso debe ser estudiado con cuidado a fin de obtener las conclusiones correctas.

### **Transferencia de energía por resonancia fluorescente (FRET)**

La microscopía de fluorescencia puede utilizarse también para estudiar y cuantificar interacciones entre componentes celulares a nivel molecular. FRET es la transferencia de energía no-radiante que se produce entre dos fluoróforos (donador y aceptor) con espectros de emisión (donador) y excitación (aceptor) solapantes, tras la excitación del donador. La eficiencia del FRET decae con la sexta potencia de la distancia entre fluoróforos (radio de Forster). A distancias superiores a 10 nm, no se produce transferencia significativa. Por otra parte, la transferencia es más eficaz cuanto mayor solapamiento se produzca entre los espectros de excitación-emisión de donador y aceptor y cuanto más favorable sea la orientación espacial relativa de los (dipolos) fluoróforos.

Cuando se produce FRET, el donador disminuye su intensidad de emisión, puesto que una parte de la energía absorbida es cedida al aceptor. Al mismo tiempo, se detecta un aumento de emisión en el aceptor que, a las longitudes de onda típicas de excitación del donador, emite de forma muy escasa o nula. El seguimiento del FRET en el microscopio de fluorescencia o confocal se puede hacer de varias maneras distintas. La



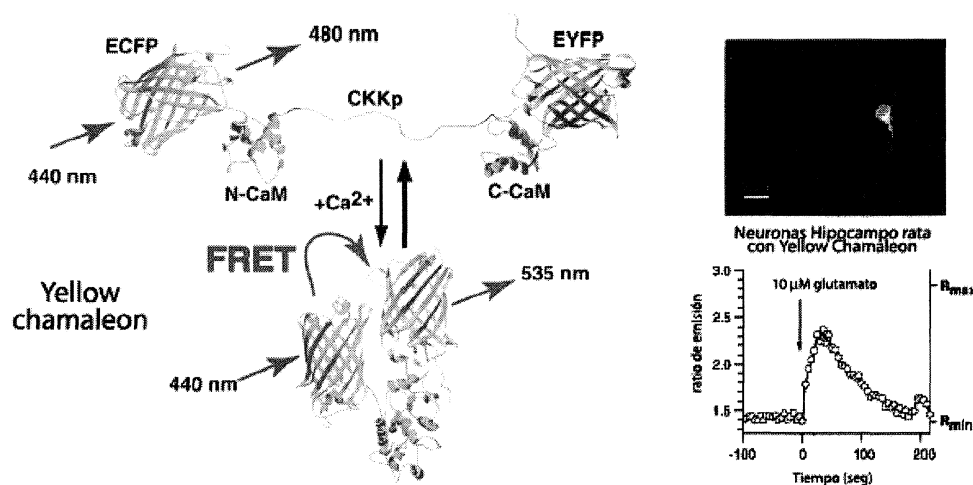
forma más fiable y también más costosa es medir la vida media de la fluorescencia del donador. Cada fluoróforo posee un patrón temporal característico de decaimiento de emisión que determina un valor de vida media, es decir, el tiempo que tarda en decaer hasta emitir la mitad de la fluorescencia inicial (máxima). Los valores de vida media de los fluoróforos orgánicos, incluidas las proteínas fluorescentes, se encuentran en el entorno de unos pocos nanosegundos. Cuando se produce FRET entre fluoróforos, la vida media de fluorescencia del donador disminuye, siendo este valor indicativo de la eficiencia de FRET. Ahora bien, antes de utilizar este método es necesario descartar otras posibles causas, ya que la vida media también puede verse afectada por las concentraciones de oxígeno, iones, pH o interacciones con otros compuestos no fluorescentes. Una vez descartados posibles artefactos, este método es extraordinariamente sensible y fiable, con la ventaja añadida de no depender de la concentración de fluoróforo ni de la intensidad de la emisión. El segundo método es el método de los «ratios». Consiste en capturar imágenes independientes con la emisión del donador y del aceptor tras excitar selectiva y únicamente al donador. Cuando se está produciendo FRET, la emisión del donador disminuye mientras que la emisión del aceptor aumenta. Si dividimos la señal del aceptor por la del donador en cada píxel o en un área determinada, obtendremos un valor numérico indicativo de la eficiencia de FRET al que se denomina «ratio». Cuanto mayor sea ese número, mayor será la eficiencia de FRET y viceversa. El método de los «ratios» es el más utilizado debido a su sencillez y facilidad de implementación. Sin embargo, para obtener resultados fiables, es necesario realizar una serie de pruebas previas encaminadas a asegurar una intensidad de emisión similar para cada fluoróforo y una relación molar lo más parecida posible. El tercer método para determinar FRET consiste en capturar imágenes de la emisión del donador antes y después de eliminar la fluorescencia del aceptor mediante «photo-

bleaching». En caso de producirse FRET, tras eliminar la absorción del aceptor, la emisión del donador debería ser más intensa. Esta prueba sólo puede realizarse una vez ya que, tras «quemar» el aceptor, es imposible capturar de nuevo la imagen inicial. La determinación de FRET mediante «photobleaching» se utiliza muy a menudo como prueba irrefutable de su existencia, ya que no se ve afectado por factores que sugieren su presencia artefactual.

La microscopía FRET se utiliza para estudiar y confirmar interacciones proteína-proteína, proteína-DNA, etc. La estrecha relación inter o intramolecular necesaria para que se produzca FRET, junto con su fuerte dependencia de la distancia entre donador y aceptor, determina su exquisita sensibilidad a mínimos cambios de conformación. La pareja donador:aceptor más utilizada para medir FRET es la constituida por las proteínas fluorescentes ECFP y EYFP. Estas proteínas presentan espectros de absorción y emisión con suficiente solapamiento (aunque no óptimo). Entre estas dos proteínas los valores máximos de FRET se hallan limitados por el hecho de que los fluoróforos se encuentran en el interior de la estructura tridimensional característica de las proteínas fluorescentes derivadas de *A. Victoria* ( $\beta$ -can), de manera que la mayor aproximación posible se sitúa en torno a los 5 nm. Continuamente se están desarrollando nuevas parejas donador/aceptor FRET con supuestos mejoras de brillantez en los fluoróforos, solapamiento de sus espectros, distancias de aproximación y eficiencia de transferencia en general.

Una manera de estudiar interacción entre proteínas «in vivo» es construir quimeras independientes con ECFP y EYFP para establecer parejas donador/aceptor FRET. Sin embargo, aunque las construcciones son sencillas de realizar, en muchas ocasiones no es posible demostrar FRET por mucho que la interacción entre ambas proteínas esté suficientemente demostrada por otros métodos. Los motivos más habituales de esta falta de eficiencia tienen que ver con la ubicación de las proteínas fluorescentes en la estructura de las proteínas de fusión, muchas veces incompatible con la proximidad necesaria para el FRET. También es habitual topar con dificultades para determinar los niveles de FRET debido a que la expresión e intensidad de fluorescencia de donador y aceptor son muy heterogéneas. En estos casos, se suele variar la cantidad relativa de cada vector de expresión en las transfecciones. Puesto que, en muchas ocasiones, el FRET es una cuestión de ensayo y error, un abordaje utilizado con frecuencia es la construcción de los denominados «sensores o sondas FRET». Estos están constituidos por una cadena polipeptídica que incluye ECFP e EYFP y además incorpora entre ellas secuencias o dominios relevantes, que pueden ser secuencias de corte por proteasas,

de fosforilación por quinasas o dominios de interacción con ligandos como iones, nucleótidos u otras proteínas. Una de las primeras sondas FRET en desarrollarse fue la denominada Yellow-Chamaleon, constituida por una molécula de Calmodulina (CaM), flanqueada por ECFP y EYFP, y en cuyo interior se insertó la secuencia de interacción con  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM de la quinasa de la cadena ligera de miosina (MLCK). La proteína de fusión resultante admite dos conformaciones; una en presencia de calcio, en la que CaM interacciona con la secuencia de MLCK, se produce un acercamiento entre ECFP e EYFP y, por tanto, FRET y, otra, en ausencia de calcio, en la que los fluoróforos están separados y no se produce FRET. En este sensor, las variaciones de FRET se correlacionan directamente con cambios en las concentraciones de calcio intracelular.



### FLIM, FRAP y FLIP

Los acrónimos FLIM (fluorescence lifetime imaging microscopy), FRAP (fluorescence recovery after photobleaching) y FLIP (fluorescence loss in photobleaching) empiezan a escucharse con frecuencia, sobre todo, en el campo de la biología celular. La vida media de fluorescencia de un fluoróforo ( $\tau$ ) es una propiedad física característica y distintiva de cada fluoróforo. FLIM es una técnica de microscopía que mide la vida media de los fluoróforos presentes en una muestra. Su interés fundamental radica en que el valor de  $\tau$  no depende de la concentración de fluoróforo ni de la intensidad de iluminación y, por tanto, se puede utilizar para ana-

lizar la composición de fluoróforos en muestras complejas, especialmente, allí donde otros métodos como el análisis espectral no resultan efectivos. Las primeras medidas de vida media de fluorescencia se realizaron en 1926 utilizando espectrofluorímetros. Su introducción en la microscopía es mucho más reciente y coincidió con la disponibilidad de fotodetectores más rápidos y sensibles (cámaras CCDs intensificadas).

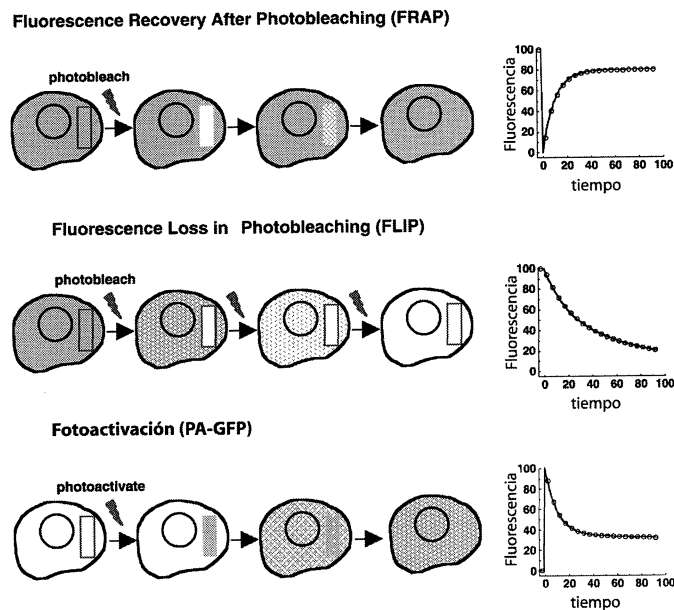
Los valores de vida media pueden verse modificados por varios factores del entorno. Como regla general, la vida media disminuye cuando parte de la energía del fluoróforo excitado es transferida a su entorno en vez de emitirse en forma de fluorescencia. Cuanta más energía se transfiera al entorno, más se reducirá el valor de vida media. Uno de los factores ambientales que más afectan la vida media es la concentración de oxígeno. El oxígeno «apantalla» la emisión de muchos fluoróforos y absorbe buena parte de su energía. Existen sondas fluorescentes especialmente sensibles a «quenching» por oxígeno que permiten determinar indirectamente su concentración a través de la medida de su vida media. El valor de  $\tau$  también se afecta por otros factores entre los que cabe destacar la interacción o conjugación del fluoróforo con otras moléculas (Vg. proteínas), su proximidad a otros fluoróforos con espectros de absorción adecuados (FRET), el pH o la concentración iónica.

En microscopía, la vida media de fluorescencia se puede medir en el «dominio tiempo» o en el «dominio frecuencia». En el primer caso, la muestra se excita con un pulso corto de luz (puede ser por absorción de uno o varios fotones) generalmente producido por un láser pulsado y, a continuación, una cámara ultrarrápida y sensible realiza capturas a varios tiempos para muestrear la caída de la emisión. Este proceso se repite muchas veces hasta conseguir un valor promedio fiable. Estas cámaras están dotadas de un intensificador frente al CCD (que amplifica la señal hasta  $10^5$  veces) y un sistema de compuerta electrónico (gating) que reduce los tiempos de captura hasta 0,1 nanosegundos. El segundo método no requiere disponer de un equipo tan costoso como el primero. Se trata de aplicar un patrón de excitación en forma de ondas con una frecuencia y modulación constantes y registrar los cambios de fase y modulación producidos en la emisión. La comparación de estos parámetros entre excitación y emisión permite obtener los valores de vida media ( $\tau$ ).

La amplia difusión de proteínas fluorescentes así como de herramientas para la manipulación genética ha posibilitado la realización de estudios de localización y comportamiento cinético de proteínas en células vivas. Las técnicas relacionadas con la microscopía en especímenes vivos se agrupan bajo la denominación microscopía 4D, que tras introducir la tercera dimensión con la microscopía confocal, hace alusión a la va-

riable tiempo como la cuarta dimensión. De todas ellas, además de la ya comentada TIRFM, las más utilizadas son la microscopía FRAP y FLIP.

Al observar al microscopio de fluorescencia o confocal células vivas que expresan proteínas fluorescentes, uno se percata rápidamente de que la mera observación o captura secuencial de imágenes no aporta información real sobre los movimientos de una proteína en el interior celular. Debido en buena parte a la sobreexpresión pero también a la imposibili-



dad de distinguir grupos o «pools» dentro de la población total en base a algún criterio, resulta imposible obtener información sobre sus características cinéticas, vida media, etc. Una proteína podría estar anclada en el citoesqueleto, traslocándose continuamente entre compartimentos o libre para difundir en el citoplasma y, en todos los casos, obtendríamos secuencias de imágenes equivalentes. Para discernir entre estas posibilidades es preciso que un pequeño grupo o «pool» de la proteína pueda distinguirse del resto para así poder analizar su comportamiento cinético. La microscopía FRAP persigue este objetivo y consiste en producir «photobleaching» en un área específica y limitada de la célula para, a continuación, realizar un seguimiento del patrón y la rapidez con los que la fluorescencia se restaura en el área irradiada. Tras el «photobleaching», una fracción de la proteína se hace invisible y se altera el estado estacionario de la distribución de fluorescencia pero no el de la distribución de

proteína que continua siendo el mismo. Los estudios cuantitativos de microscopía FRAP con quimeras de proteínas fluorescentes nos permiten estimar sus coeficientes de difusión ( $D_{\text{eff}}$ ) y su fracción móvil ( $M_f$ ). Para analizar la movilidad se calcula un valor  $D_{\text{eff}}$  teórico, inversamente proporcional al tamaño de la proteína, que correspondería al desplazamiento aleatorio de una proteína ideal que no interacciona con su entorno. Valores experimentales de  $D_{\text{eff}}$  por debajo del teórico pueden indicar aumentos de viscosidad en el medio, asociación de la proteína a un complejo o agregado de mayor tamaño o interacción con ligandos anclados en la estructura celular (Vg citoesqueleto). Valores de  $D_{\text{eff}}$  por encima del valor teórico podrían indicar menor viscosidad o transporte mediado por proteínas motoras. Por otra parte, el porcentaje máximo de fluorescencia que difunde al interior de la zona irradiada ( $M_f$ ) también puede revelar información importante. Un descenso en el valor de  $M_f$  puede indicar un anclaje de la proteína, su inclusión en agregados inmóviles o su confinamiento en un compartimento separado. Un aumento del valor de  $M_f$  puede indicar, por otra parte, su liberación de una estructura compleja o su exportación dirigida desde otro compartimento.

La microscopía FLIP consiste en la irradiación repetida de una zona de la célula al tiempo que se continúan recogiendo imágenes de la distribución de la fluorescencia. Al analizar la fluorescencia en las zonas no irradiadas se pueden realizar seguimientos de la movilidad de la quimera fluorescente y de la continuidad entre compartimentos celulares. Así por ejemplo, si sometemos a «photobleaching» continuado la región del aparato de Golgi podemos encontrarnos con un patrón de pérdida progresiva de fluorescencia en toda la célula. Este protocolo nos permitiría acotar «pools» definidos de proteína y realizar seguimientos de su movilidad y cinética en el interior celular.

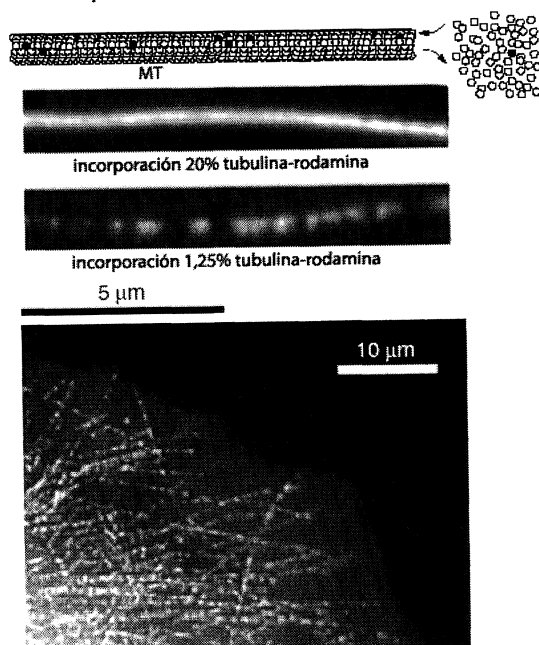
Dentro de la microscopía 4D hay que incluir también otras modalidades de microscopía, como son la utilización de las nuevas variantes de proteínas cuya fluorescencia puede alterarse por efecto de la iluminación en el entorno de 400 nm, como es el caso de las ya descritas PA-GFP y Kaede. Otras técnicas emergentes en este grupo son la microscopía de correlación de fluorescencia (FCM) y la microscopía de fluorescencia de «speckle» (motas) (FSM). La microscopía de correlación de fluorescencia (FCM) registra y analiza en el tiempo las fluctuaciones de fluorescencia en un volumen muy reducido de la muestra (del orden de femtolitros). Si el tamaño del volumen monitorizado es suficientemente pequeño, las fluctuaciones pueden interpretarse como movimientos de entrada y/o salida de fluoróforos individuales en el espacio definido por la excitación. A través del análisis de estas fluctuaciones se puede obtener información



sobre la movilidad de proteínas en una localización o compartimiento determinado, o determinar sus constantes de disociación con otros ligandos. Como la movilidad por difusión depende del tamaño molecular, cuando una proteína marcada con un fluoróforo interacciona con otra, el tamaño del complejo fluorescente aumenta y los cambios de movilidad pueden detectarse mediante FCM. Esta técnica ha evolucionado de la espectroscopia de correlación de fluorescencia (FCS) cuyo tratamiento matemático es esencialmente el mismo. La posibilidad técnica real de llevar a cabo estas mediciones en células vivas mediante microscopía confocal y multifotón está empujando con fuerza la implantación de FCM.

La microscopía de fluorescencia de «speckles» (motas) o FSM es también una técnica de microscopía catalogada como 4D. Se utiliza para estudiar el movimiento, ensamblaje y desensamblaje de estructuras y macromoléculas celulares como, por ejemplo, el citoesqueleto. Esta técnica fue descubierta casi por accidente al observar en imágenes de alta resolución de células microinyectadas con tubulina-rodamina que los microtúbulos (MTs) presentaban variaciones de intensidad de fluorescencia a lo largo de su estructura como si estuvieran «salpicados» (speckled) de fluorescencia. Posteriormente, se comprobó que este patrón de fluorescencia dependía del porcentaje de monómeros fluorescentes (tubulina-rodamina) incorporados en los MTs. Si la incorporación de monómeros fluorescentes es elevada (en torno al 20%), los MTs aparecen marcados con una fluorescencia uniforme. Sin embargo, si la incorporación es baja (en torno al 1%), entonces los MTs aparecen moteados, indicando así que el patrón de motas se debe a la

#### Microscopía de fluorescencia de «motas» (speckles)



proporción de fluoróforos incorporados. A menor incorporación, menor será el número de «motas» visibles a lo largo del MT, pero mayor será el contraste entre ellas. La situación óptima sería que cada mota se debie-

proporción de fluoróforos incorporados. A menor incorporación, menor será el número de «motas» visibles a lo largo del MT, pero mayor será el contraste entre ellas. La situación óptima sería que cada mota se debie-

ra a la emisión de un fluoróforo. Sin embargo, estas condiciones se alcanzarían sólo en porcentajes muy bajos de incorporación de monómeros fluorescentes. La sensibilidad del sistema de detección, los niveles de ruido y la propia dinámica (rapidez) del proceso de ensamblaje y desensamblaje limitan la posibilidad de alcanzar este punto. En la práctica, las motas están generadas por grupos de moléculas fluorescentes que, una vez incorporadas a la estructura (el MT), generan un patrón de distribución que permanece constante hasta que se produzca el desensamblaje de la estructura. Por tanto, los patrones de motas fluorescentes registrados en los MTs actúan como marcas de referencia, que permiten detectar la movilidad de estructuras enteras en el interior celular, su aparición y su desaparición. En la actualidad, la técnica de FSM está impactando con fuerza en el área de la biología celular, especialmente en aquellas líneas dedicadas a entender y explicar la motilidad celular en base a la dinámica del citoesqueleto de actina y tubulina.

### Referencias bibliográficas

- «FRET Imaging». E. A. JARES-ERIJRNAN y T. M. JOVIN. *Nature Biotechnology* 21, 1387-1395 (2003).
- «Quantitative fluorescent speckle microscopy: where it came from and where it is going». G. DANUSER y C. M. WATERMAN-STORER. *Journal of Microscopy* 211, 191-207 (2003).
- «Spectral imaging and its applications in live cell microscopy». T. ZIMMERMANN, J. RIETDORF y R. PEPPERKOK. *FEBS Letters* 546, 87-92 (2003).
- «Light microscopy techniques for live cell imaging». D. J. STEPHENS y V. J. ALLAN. *Science* 300, 82-86 (2003).
- «Fluorescence resonance energy transfer (FRET) microscopy imaging of live cell protein localizations». R. B. SEKAR y A. PERIASARNY. *Journal of Cell Biology* 160, 629-633 (2003).
- «Digital Microscopy». Eds. G. SLUDER y D. E. WOLF. En «Methods in Cell Biology» volumen 72, 2nd Edition (2003).
- «Lighting up, cells: labelling proteins with fluorophores». A. MJYAWAKI, A. SAWANO y T. KOGURE. *Nature Cell Biology* (September) S1-S7 (2003).
- «Development and use of fluorescent protein markers in living cells». J. LIPPINCOTT-SCHWARTZ y G. H. PATTERSON. *Science* 300, 87-91 (2003).
- «Fluorescence imaging of physiological activity in complex systems using GFP-based probes». A. MIYAWAKI. *Current Opinion in Neurobiology* 13, 591-596 (2003).
- «Cell Biological Applications of Confocal Microscopy». Ed. B. MATSUMOTO. En *Methods in Cell Biology* volumen 70 (2002).
- «Total internal reflection fluorescence microscopy for singlemolecule imaging in living cells». Y. SAKO y T. UYEMURA. *Cell Structure and Function* 27, 357-365 (2002).
- «Spinning-disk confocal microscopy: a cutting-edge tool for imaging of membrane traffic». A. NAKANO. *Cell Structure and Function* 27, 349-355 (2002).
- «New developments in multiphoton microscopy». F. HELMCHEN y W. DENK. *Current Opinion in Neurobiology* 12, 593-601 (2002).