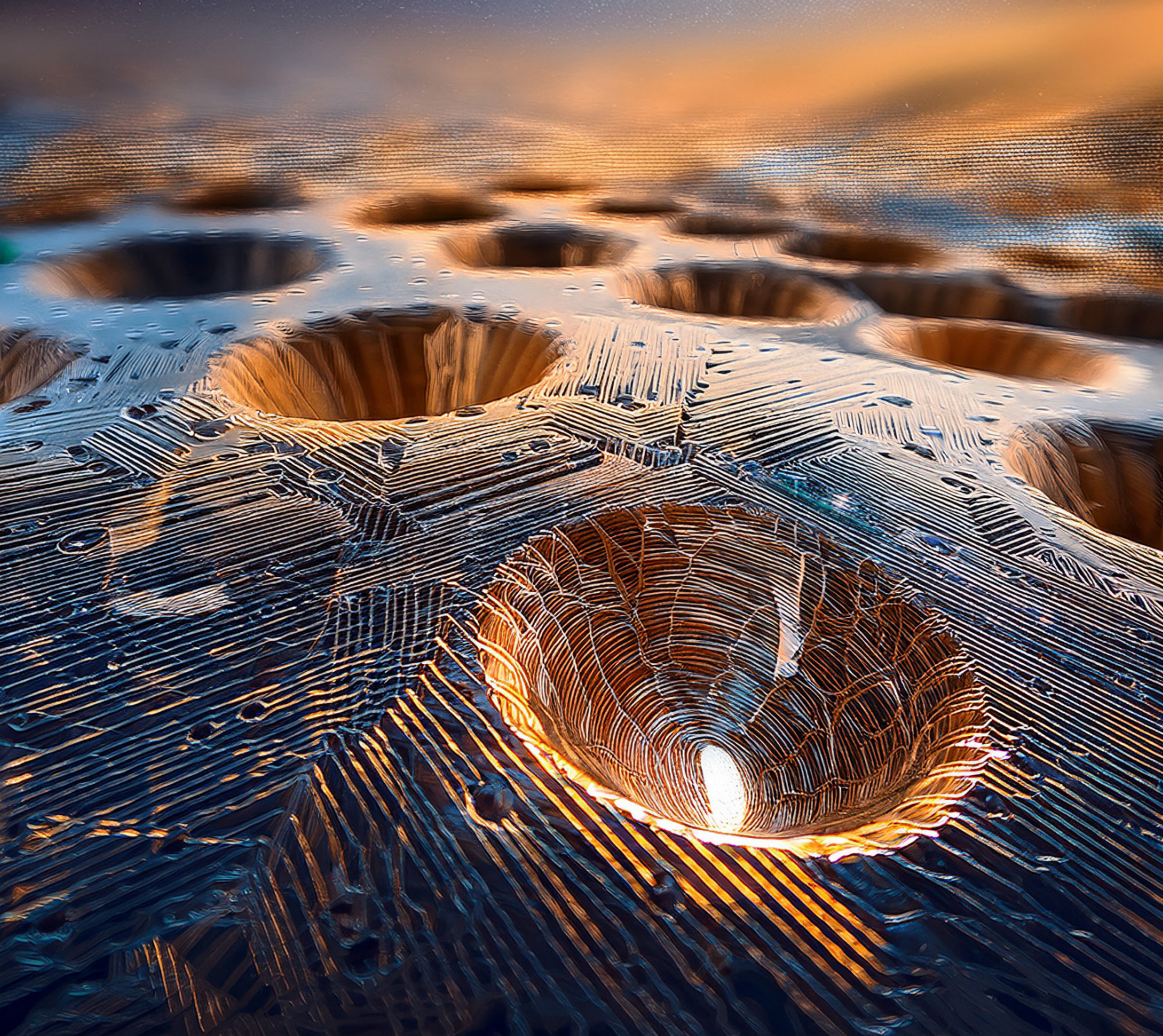


¿Cómo  
funciona?



# Brilla, brilla, estrellita: Técnicas de microscopía de superresolución para iluminar el nanomundo

*Twinkle, twinkle, little star: Superresolution microscopy techniques to illuminate the nanoworld*

Josue David Hernández-Varela  
Susana Dianey Gallegos-Cerda  
José Jorge Chanona-Pérez\*

Laboratorio de superresolución y nanoestructuras,  
Departamento de Ingeniería Bioquímica, Escuela  
Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico  
Nacional, CDMX, México.

\*Autor para la correspondencia:  
jchanona@ipn.mx

## Resumen

Desde su invención en los 90's las técnicas de microscopía de superresolución (MSR) han revolucionado el uso de fluorocromos específicos para observar fenómenos a escalas nanométricas, y ha abierto la puerta para develar eventos fotoquímicos a través de parpadeos brillantes en la nanoescala, similar a como titilan las estrellas en el firmamento. Así en esta contribución se describe de manera general las técnicas de la MSR usadas para observar eventos biológicos en la nanoescala.

*Palabras clave: Nanoscopia, localización, moléculas.*

## Summary

Since their invention in the 1990s, superresolution microscopy (SRM) techniques have revolutionized the use of specific fluorochromes to observe phenomena at nanoscales and have opened the door to revealing photochemical events through bright flickering at the nanoscale, similar to how stars twinkle in the sky. Thus, in this contribution, the SRM techniques used to observe biological events at the nanoscale are described in general terms.

*Keywords: Nanoscopy, localization, molecules.*

## De la microscopía de luz a la microscopía de superresolución

La microscopía de superresolución (MSR) es una excelente técnica para observar eventos a nanoescala en materiales biológicos, tomando como punto de partida los fundamentos de la microscopía de fluorescencia, superando los límites de la resolución de la microscopía óptica [1, 2]. La novedad de la MSR es que resoluciones nanométricas son alcanzadas mediante el uso de fotones para observar las estructuras contenidas en los organismos y materiales biológicos en tiempo real con mínimo daño en la muestra. Esto es una ventaja en comparación las técnicas de microscopía de electrones y de fuerza atómica donde las muestras deben previamente fijarse y no pueden ser observadas bajo condiciones específicas de humedad o temperatura. Desde que Robert Hooke (siglo XVII) observó células de corcho a través de un microscopio, considerables esfuerzos se han realizado para mejorar la resolución de los microscopios ópticos

[2]. Modificaciones posteriores a los sistemas de microscopía permitieron observar bacterias usando luz solar como fuente lumínica. Hacia el siglo XVIII, los primeros lentes acromáticos fueron desarrollados para microscopios monoculares y observar muestras mediante luz transmitida y espejos para reflejar la luz. En siglo XIX, el desarrollo de lentes de mayor calidad óptica permitió tener objetivos de inmersión, paralelamente Ernest Abbe en 1873 estableció su ecuación que establece el límite de resolución de los microscopios ópticos en 200 nm. En la primera mitad del siglo XX la comprensión de las aplicaciones de espectro electromagnético, el avance de la física, la química orgánica y las ciencias de la vida promovieron el desarrollo de microscopía de fluorescencia; una herramienta fundamental para las ciencias biológicas pues permite conocer la distribución de los componentes celulares y algunas de sus funciones. Al término de la Segunda Guerra Mundial, con la aparición de la microelectrónica y la invención de los láseres, se permitió el desarrollo del microscopio confocal de barrido láser (CLSM, por sus siglas en inglés) y de doble fotón o multifotónico; estos sistemas de microscopía fueron herramientas importantes para el avance de las ciencias de la vida en el siglo XX. El establecimiento de la nanotecnología hacia el final del siglo XX e inicios del XXI revolucionó el mundo de la microscopía, y así fueron desarrollados mejores instrumentos para la observación de las estructuras a escalas nanométricas [1-4]. Durante este tiempo, la microscopía de electrones tuvo avances importantes para estudiar las estructuras biológicas en la nanoescala, pero hacía falta una técnica de microscopía que pudiera resolver las estructuras biológicas a escalas nanométricas, en tiempo real, en muestras vivas, sin el uso de vacío, sin daño, ni procedimientos de preparación complejos e invasivos. El reto era superar el límite de resolución espacial de 200 nm impuesto por la ecuación de Abbe para microscopios ópticos, así la necesidad de conocer lo que ocurre dentro de las células vivas en la nanoescala. Esto permitió el desarrollo de las técnicas de MSR, que por definición es toda aquella técnica de microscopía fotónica que permita alcanzar una resolución

menor o igual 100 nm.

La primera técnica de superresolución que se desarrolló fue la microscopía de iluminación estructurada (SIM, por sus siglas en inglés). En el año 2000, Gustafsson [5] reportó un sistema usando un microscopio con iluminación láser y una rejilla para generar un patrón de franjas y un efecto Moiré que es el principio básico de la SIM, alcanzando 100 nm de resolución que es el doble al obtenido con microscopio convencional. En paralelo la microscopía de agotamiento de emisión estimulada (STED, por sus siglas en inglés) fue introducida por Stefan Hell, que permite alcanzar resoluciones de 30 nm. Finalmente, las técnicas de MSR alcanzaron su máximo auge en 2014, cuando Betzig, Moerner y Hell obtuvieron el Premio Nobel de Química por el desarrollo de la microscopía de fluorescencia de superresolución, actualmente conocida como nanoscopía, por el desarrollo de la microscopía STED y la localización de moléculas simples mediante microscopía (SMLM, por sus siglas en inglés).

### ***De la microscopía de luz a la microscopía de superresolución***

Desde la invención del primer microscopio óptico diversos avances se han llevado a cabo en la construcción de objetivos, oculares compuestos, sistemas de iluminación y detección [6]. Por ejemplo, en un microscopio invertido con epi-iluminación, los fotones entran por los objetivos, iluminan la muestra, el haz de luz incide sobre la muestra y la imagen se forma (Figura 1a). La resolución se mejora y estructuras de hasta media micra ( $0.5 \mu\text{m}$ ) se pueden observar usando objetivos de mayor magnificación, pero ciertos efectos de difracción generan una limitante cuando el área de la muestra que es irradiada es mayor que la magnificación usada.

Por otro lado, la microscopía de fluorescencia, en donde los objetos son iluminados por haces de luz en rangos de longitudes de onda específicas que se logra usando filtros específicos, en lugar de iluminar la muestra con un haz de luz blanca que comprende el rango de la luz visible (400-700 nm) del espectro

electromagnético [6, 7]. Debido a la incidencia de los rayos de luz específicos, la forma de un objeto observado se puede definir con mayor precisión analizando la imagen resultante. Esta imagen se produce a partir de la radiación electromagnética emitida por las moléculas dentro del objeto que han absorbido energía de la fuente de excitación primaria. Después de absorber esta energía, las moléculas vuelven a emitir luz en longitudes de onda más largas [6]. Este proceso, conocido como fluorescencia, permite una representación más precisa de la forma del objeto en función de las características específicas de la luz emitida. Sin embargo, para lograr una calidad de imagen óptima, es necesario usar fluorocromos o fluoróforos, que son moléculas capaces de absorber fotones a

una longitud de onda menor y emitir fotones a longitudes de ondas mayores. Por ejemplo, la clorofila, el pigmento más abundante en las plantas, absorbe energía alrededor de 561 nm y puede emitir fluorescencia llegando a los 600-800 nm [7].

Con el desarrollo de láseres, el uso de filtros con longitudes de onda específicos quedó atrás y apareció la microscopía de fluorescencia confocal o microscopía confocal de barrido láser (CLSM, por sus siglas en inglés) que emplea una iluminación puntual, que atraviesa filtros dicróicos y que junto con un orificio (pinhole) ubicado en un plano óptico conjugado frente al detector permite observar el proceso de fluorescencia presente en la muestra (Figura

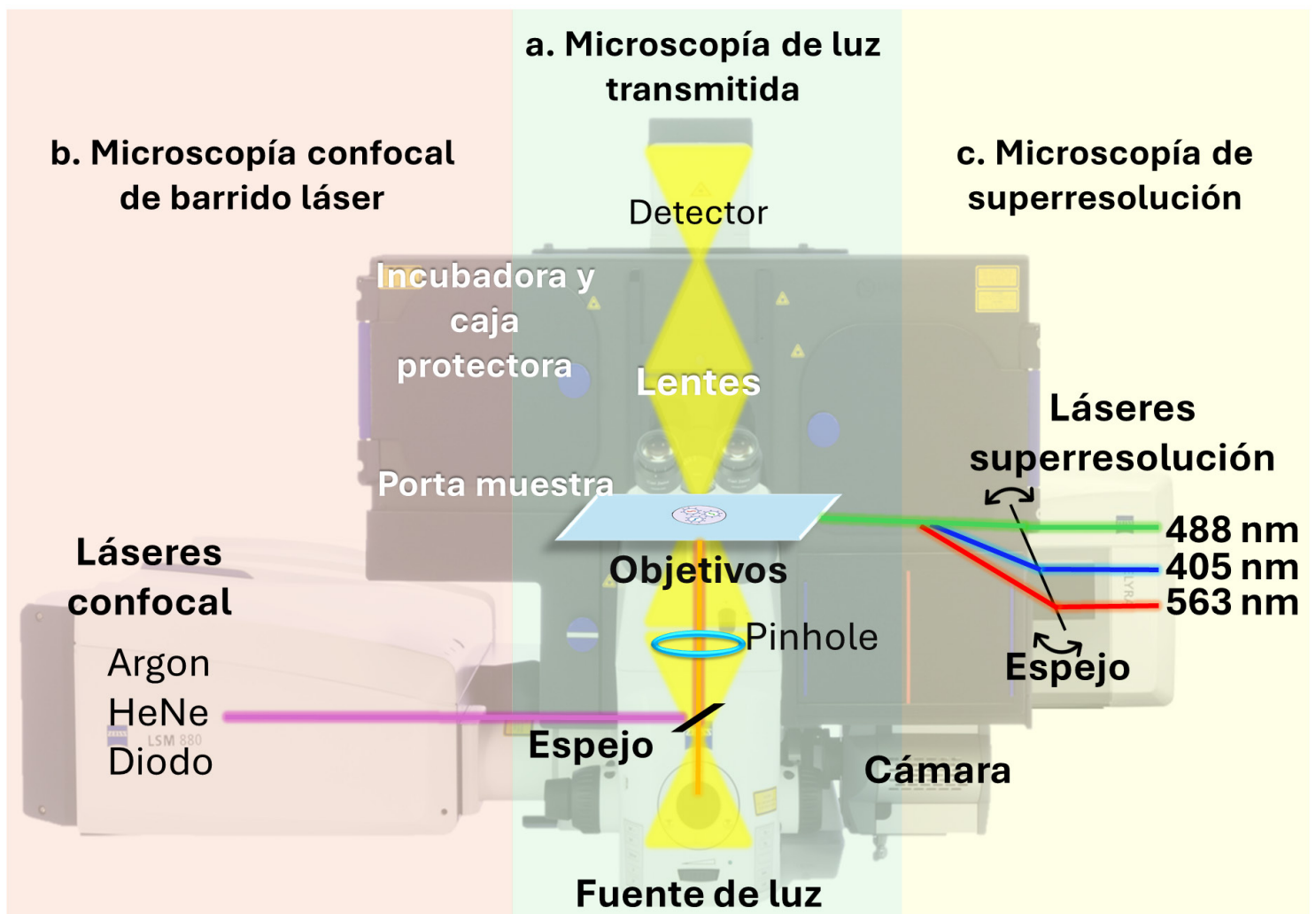


Figura 1. Descripción de los diferentes tipos de microscopía: de luz transmitida (a), confocal láser (b) y de superresolución (c). Se muestra las partes esenciales para el uso de un equipo que posee las tres formas de microscopía, así como algunas de las líneas láser usadas en un microscopio confocal y en un microscopio de superresolución.

1b). Este diseño le permite eliminar cualquier información que provenga de fuera del plano focal [6, 8]. Como resultado, solo se detecta la luz dentro de este plano focal específico, lo que produce una calidad de imagen significativamente mejorada en comparación con los microscopios de fluorescencia o de campo amplio (WF, por sus siglas en inglés) [5, 6]. Si bien en la microscopía de fluorescencia y CLSM, el pinhole y los objetivos favorecen la observación de las moléculas en un plano, también es importante acotar que el haz de luz (láser) es de vital importancia pues permitirá usarse como luz de excitación para las moléculas y también para conocer su emisión con una resolución específica. Otro concepto importante para entender el término resolución es el “disco de Airy” que se puede explicar como la ubicación de moléculas individuales conocidas como emisores en el plano focal, que están diferenciadas o no de otras moléculas fluorescentes. Sin embargo, cuando no están separados, no se ven como puntos de luz, sino como pequeñas manchas [6, 8]. Tomando en consideración el concepto de disco de Airy, se definió el término de resolución óptica como la distancia mínima entre objetos distinguibles en una imagen, que en práctica se describe cuando dos o más moléculas se encuentran juntas y estos discos se superponen. De allí, la resolución de una imagen considerando los discos de Airy ( $r_{airy}$ ) vendría dada por la relación que existe entre la longitud de onda de la luz ( $\lambda$ ) utilizada para la observación entre la apertura numérica (NA, por sus siglas en inglés) del lente objetivo, todo esto multiplicado por una constante específica como se define en la fórmula  $r_{airy} = 0.61(\lambda/NA_{obj})$ . Esto permite conocer el límite del poder de resolución de un microscopio de luz que es aproximadamente de 200 nm y propuesto por Ernst Abbe [4, 6, 8].

Sin embargo, actualmente la MSR (Figura 1c) emplea algunas estrategias que permite romper el límite de resolución impuesto por Abbe y alcanzar valores de hasta 10 nm. Una de estas estrategias es el uso de láseres con mayor potencia, dado que es necesaria la excitación efectiva de los fluoróforos, y el uso de aditamentos físicos como el uso de cámaras de-

tectoras (sCMOS y CCD), rejillas que rotan actuando como un filtro de la fluorescencia excedente, así como el uso de láseres superpuestos que permiten la adquisición de imágenes con resoluciones por debajo del límite permitido. Por otro lado, el uso de fluoróforos que limitan el rango de fluorescencia dependiendo de sus propiedades ópticas (coeficiente de extinción), lo que permite observar el fenómeno de “titilar” a la nanoescala. Para explicar este fenómeno, primero se debe explicar que, aunque los fluoróforos utilizados en CLSM pueden ser fluoróforos orgánicos e inorgánicos convencionales, estos presentan alto nivel de fluorescencia lo que puede generar señales ruidosas y por ende una disminución en la resolución de la imagen. En contraste, las técnicas de MSR utilizan fluoróforos de menor tamaño y de alta especificidad a los sitios de estudio de la muestra, lo que mejora sustancialmente la resolución espacial.

### ***Nanoscopía: técnicas de superresolución con moléculas fluorescentes específicas***

Como se explicó antes, un elemento vital para la observación en microscopía de fluorescencia y confocal es el uso de fluoróforos. Estos compuestos, pueden ser moléculas convencionales orgánicas e inorgánicas, sirven para visualizar muestras, ya que poseen un nivel óptimo de fluorescencia, pero la unión inespecífica del colorante y sus propiedades ópticas, hacen que se detecten señales ruidosas, reduciendo la resolución obtenida [8, 9]. En la microscopía de súperresolución (Figura 1c), se usan fluoróforos con un comportamiento específico bajo un láser adecuado que puede superar la barrera de difracción alcanzando alrededor de 10 nm en función de la localización de moléculas individuales, y una alta especificidad de las moléculas que mejora la resolución espacial [9]. La resolución en la microscopía de súperresolución está directamente relacionada con las moléculas fluorescentes utilizadas. Esta localización de las moléculas individuales se basa en la precisión de la posición del fluoróforo de un punto aislado de otras moléculas fluorescentes y es conocida como microscopía de localización de molécula única (SMLM, por sus siglas

en inglés) [10]. Lo que permite realizar este tipo de microscopía son las propiedades químicas de algunas moléculas fluorescentes que poseen un comportamiento espaciotemporal complejo, es decir, se pueden usar varios fluoróforos cercanos que emitan luz en momentos separados y entonces resolverlos en el tiempo si se toman secuencialmente muchas imágenes [8].

Particularmente, para localizar una molécula individual es necesario activar y desactivar las emisiones de fluorescencia. Esta característica se define como una acción de prendido-apagado, por lo que los fluorocromos actúan de manera similar a una estrella que brilla según la energía que reciba. Así presentará una especie de “titilar” por periodos muy cortos de tiempo. Los fluorocromos usados en MSR pueden clasificarse dependiendo de su forma de “titilar” o de prenderse y apagarse. De esa forma los podemos clasificar como fluoróforos foto-activables, foto-intercambiables y foto-convertibles.

En primera instancia, los fluoróforos fluorescentes foto-activables pueden pasar de un estado no fluorescente (oscuro) a un estado fluorescente (brillante) mediante la irradiación con luz del espectro menor a uno mayor. En este proceso, las moléculas apagadas en su estado basal se excitan y pasan a un estado encendido que puede detectarse por el microscopio. De forma contraria, los fluoróforos foto-convertibles, como su nombre lo indica, tienen la capacidad de cambiar su longitud de onda de emisión una vez que son irradiados con una fuente de energía externa, lo que significa que pueden usarse dos canales de color tras la foto-estimulación. Este proceso puede ser reversible en la mayoría de estas moléculas y por lo tanto favorecen en mucho la adquisición de información en fenómenos que duren muy poco tiempo, por ejemplo, la reacción de una enzima con un particular sustrato marcado con un fluoróforo de este tipo, ya que la interacción puede observarse desde el principio del experimento. Finalmente, los fluoróforos foto-intercambiables son moléculas fluorescentes que pueden cambiar

de un estado no fluorescente a uno fluorescente como en el caso de los foto-activables. Sin embargo, una vez que son irradiadas por un láser de excitación en longitudes de onda muy específicas, este proceso puede ser reversible porque la molécula fluorescente no cambia sus propiedades físicas una vez es foto-estimulada [9, 10]. Así, con la ayuda de pulso de luz de diferentes longitudes de onda, estos fluoróforos fluorescentes pueden activarse y desactivarse cientos de veces sin foto-decoloración. Ahora, conociendo estas propiedades específicas de cada una de las moléculas fluorescentes que se pueden usar en la MSR, es posible asociarlas a ese proceso de “titilar” por periodos muy cortos de tiempo.

Tal y como ocurre con un árbol de navidad (Figura 2a), las técnicas de SMLM confieren un barrido espacial de la muestra y pueden localizar con mayor precisión un emisor de luz, es decir, veremos un árbol de navidad más nítido con todas las luces de colores en específico, mientras que un árbol no resuelto se vería como una mezcla de colores sin definición, como cuando se usa la CLSM. Dentro de las técnicas más utilizadas están la microscopía de localización foto-activada (PALM, por sus siglas en inglés) y la microscopía de reconstrucción óptica estocástica (STORM, por sus siglas en inglés). En ambas técnicas, un proceso de reconstrucción en el tiempo define una molécula mediante una función de dispersión de puntos asociado a una emisión Gaussiana del emisor [8]. Este proceso se repite en cada imagen tomada en el tiempo y luego se agrupan todas las imágenes, con lo que se obtiene una imagen reconstruida con millones de puntos asociados a la localización de una molécula hasta más o menos 10 nm [8, 9, 10]. Este proceso hace similitud a la técnica del puntillismo introducido por el pintor Frances Georges-Pierre Seurat, y que luego hizo popular Vicent van Gogh, como se muestra en las alegorías que se presentan en Figura 2 cuando se usan las técnicas nanoscópicas.

Por otro lado, dada la respuesta no lineal a la excitación que tienen la mayoría de los fluoróforos, se pudiera aprovechar esta caracterís-

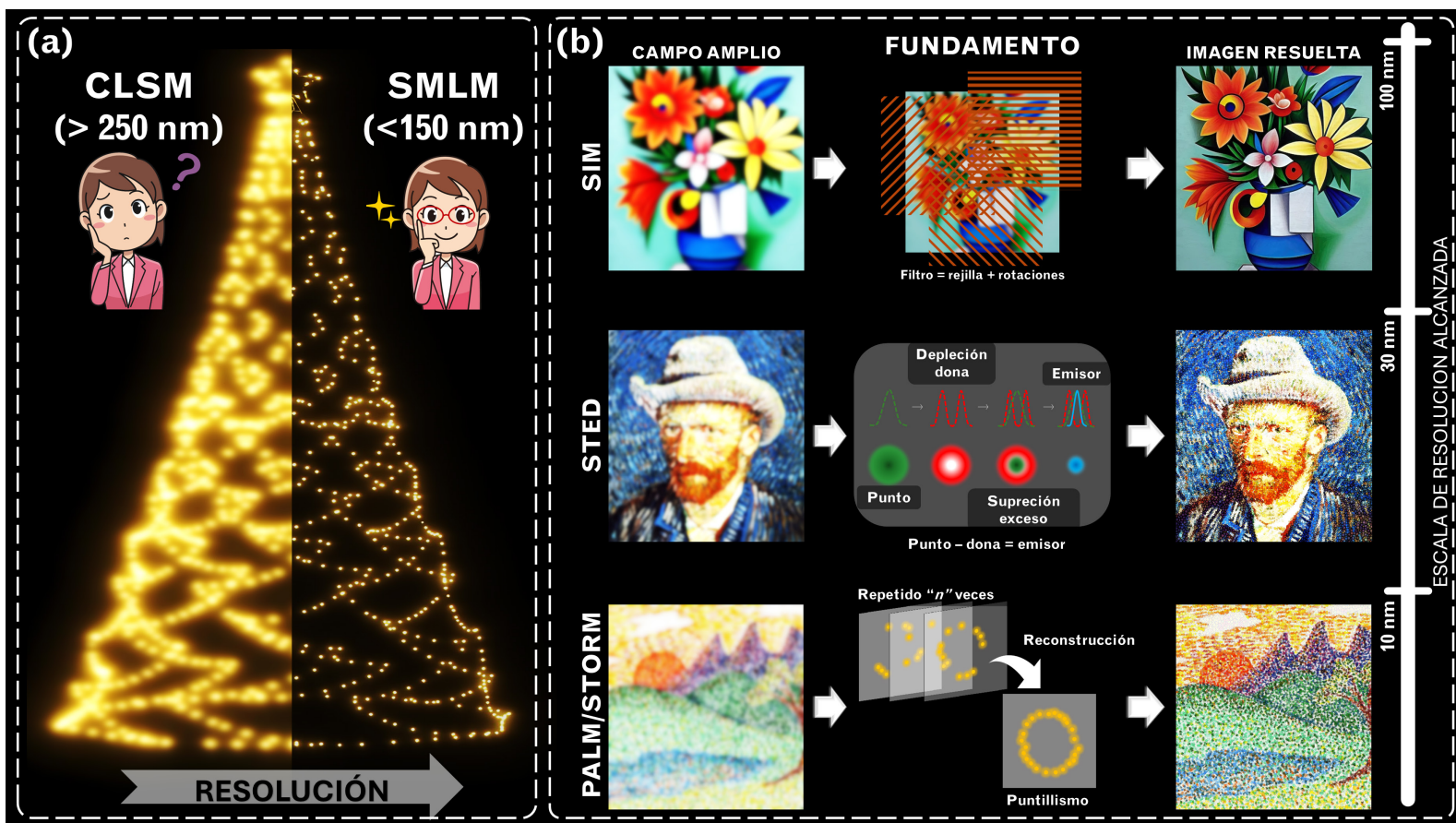


Figura 2. Diversas técnicas nanoscópicas y su comparación con la microscopía confocal de barrido láser (CLSM). (a) La microscopía de localización de molécula única (SMLM) define la máxima resolución alcanzada usando fluoróforos específicos y aditamentos que ayudan a llevar a la nanoescala usando una fuente de luz. (b-d) Ejemplos de pinturas en puntillismo haciendo alegoría a las técnicas de SIM, STED y PALM/STORM con su respectiva escala en comparación con la microscopía de campo amplio (wide-field, por su definición en inglés).

tica para mejorar la resolución. Estos métodos conocidos como microscopía de superresolución determinística incluyen la microscopía de agotamiento de emisión estimulada (STED, por sus siglas en inglés). En esta técnica, lo que se intenta es reducir la fluorescencia en regiones específicas de la muestra, dejando un punto focal central activo para emitir fluorescencia [8]. La forma más simple de explicar la técnica de STED sería usando como ejemplo una rosquilla y un punto fluorescente. El punto se considera el punto de excitación máxima, entonces un punto de desexcitación en forma de rosquilla se sobrepone en el mismo espacio de excitación y se realiza una sustracción de la fluorescencia circundante, lo que refleja un área restante que permite una fluorescencia específica del emisor y que puede alcanzar valores de 30 nm [10].

Finalmente, una técnica bastante útil es la

microscopía de iluminación estructurada (SIM, por sus siglas en inglés) que, con ayuda de algunos implementos físicos como rejillas y rotaciones, puede reducir la gran relación de señal-ruido y obtener imágenes resueltas [9]. En esta técnica se hace uso de un efecto conocido como el efecto de Moiré que se describe como una deconvolución matemática de la señal de interferencia usando una transformada de Fourier que mejora la resolución espacial hasta los 100 nm.

### Aplicaciones y tendencias futuras

Si bien la MSR tiene sus mayores aplicaciones en las ciencias de la vida como la biología celular, virología, inmunología, neurociencias y cancerología, también en otras especialidades como la ciencia de los materiales, catálisis, polímeros, biosensores, y otras áreas han empe-

zado a aplicar la MSR dado su potencial para caracterizar la estructura de materiales sensibles a escalas nanométricas. Así conforme se mejoren las técnicas de MSR y nuevos fluorocromos se desarrollen, la fluorescencia de moléculas individuales y su localización, similar al titilar de las estrellas del firmamento, la MSR continuará fascinando a más y nuevos investigadores interesados en develar los secretos del nanomundo. **iBIO**

a powerful tool to study complex synthetic materials. *Nature Reviews Chemistry*, 3(2), 68–84. <https://doi.org/10.1038/s41570-018-0070-2>

[10] Kabayama, K., & Tero, R. (2018). Super-Resolution Microscopy. In J. Heath & A. Kusserow (Eds.), *Compendium of Surface and Interface Analysis (Essential)*, pp. 651–656. Springer Singapore. [https://doi.org/10.1007/978-981-10-6156-1\\_105](https://doi.org/10.1007/978-981-10-6156-1_105)

## Referencias

[1] Doetsch, R. N. (1961). History of the Microscope. *Science*, 133(3456), 946–947. <https://doi.org/10.1126/science.133.3456.946>

[2] Karlsoon, C. (2009). The beginning. *Nature Cell Biology*, Milestone 1, S6. <https://doi.org/10.1038/ncb1938>

[3] Masters, B. R. (2009). A Brief History of the Microscope and Its Significance in the Advancement of Biology and Medicine. *Confocal Microscopy and Multiphoton Excitation Microscopy*, 3–17. <https://doi.org/10.1117/3.660403.ch1>

[4] Lawson, I. (2016). Crafting The microworld: How Robert Hooke Constructed knowledge about small things. *Notes and Records*, 70(1), 23–44. <https://doi.org/10.1098/rsnr.2015.0057>

[5] Gustafsson, M.G.L. (2000). Surpassing the Lateral Resolution Limit by a Factor of Two Using Structured Illumination Microscopy. *Journal of Microscopy*, 198, 82–87. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2818.2000.00710.x>

[6] Hickey, S. M., Ung, B., Bader, C., Brooks, R., Lazniewska, J., Johnson, I. R. D., ... Brooks, D. A. (2022). Fluorescence microscopy—an outline of hardware, biological handling, and fluorophore considerations. *Cells*, 11(1). <https://doi.org/10.3390/cells11010035>

[7] Donaldson, L. (2020). Autofluorescence in plants. *Molecules*, 25(10). <https://doi.org/10.3390/molecules25102393>

[8] Gallegos-Cerda, S. D., Hernández-Varela, J. D., Chanona-Pérez, J. J., Arredondo Tamayo, B., & Méndez Méndez, J. V. (2023). Super-Resolution Microscopy and Their Applications in Food Materials: Beyond the Resolution Limits of Fluorescence Microscopy. *Food and Bioprocess Technology*, 16(2), 268–288. <https://doi.org/10.1007/s11947-022-02883-4>

[9] Pujals, S., Feiner-Gracia, N., Delcanale, P., Voets, I., & Albertazzi, L. (2019). Super-resolution microscopy as