

## Sesión científica conmemorativa del Premio Nobel 2014 en Fisiología o Medicina y en Química



**Juan Ramón Lacadena Calero**

Coordinador de la sesión.

Sesión celebrada el 27 de noviembre de 2013

e-mail: [jrlgbucm@bio.ucm.es](mailto:jrlgbucm@bio.ucm.es)

---

---

### ORDEN DEL DÍA

#### *Presentación:*

---

**“El Premio Nobel 2014 en Fisiología o Medicina: el GPS cerebral”**

**“El Premio Nobel 2014 en Química: la nanoscopía”**

Excmo. Sr. D. Juan-Ramón Lacadena Calero

Académico de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia

#### *Ponentes:*

---

**“El premio Nobel de Fisiología o Medicina 2014”**

Excmo. Sr. Francisco J. Rubia

Académico de Número de la Real Academia Nacional de Medicina

**“Premio Nobel de Química 2014: observando el nanomundo”**

Excmo. Sr. Jesús Pintor

Académico de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia

## El Premio Nobel 2014 en Fisiología o Medicina: el GPS cerebral

Juan-Ramón Lacadena Calero

---

An. Real Acad. Farm. Vol 80, Nº 4 (2014), pag. 736-737

El 6 de octubre de 2014, la Asamblea Nobel del Instituto Karolinska de Estocolmo otorgó el Premio Nobel 2014 en Fisiología o Medicina “por sus descubrimientos de las células que constituyen un sistema de posicionamiento en el cerebro” conjuntamente y a partes iguales, por un lado, a John O’Keefe, Profesor de Neurociencia Cognitiva y Director del Sainsbury Wellcome Center in Neural Circuits and Behaviour en el University College de Londres y, por otro lado, al matrimonio formado por los Dres. May-Britt y Edvard I. Moser que son, respectivamente, Profesora de Neurociencia y Directora del Centre for Neural Computation en la Universidad Noruega de Ciencia y Tecnología en Trondheim y Profesor y Director del Kavli Institute for Systems Neuroscience en la misma Universidad. Ambos fueron científicos visitantes en el laboratorio del Dr. O’Keefe.

Como señalaba la nota de prensa del Instituto Karolinska, John O’Keefe descubrió en 1971 el primer componente cerebral del sistema de posicionamiento: se trataba de un tipo de células del hipocampo del cerebro de ratas que se activaban cuando el animal estaba en un determinado lugar del espacio de investigación, mientras que otras células nerviosas se activaban cuando el animal estaba en otro lugar (1, 2). La conclusión de O’Keefe fue que estas células de lugar o posicionamiento (*place cells*) formaban en el cerebro un mapa del espacio.

Treinta años más tarde, en la primera década de este siglo, May-Britt y Edvard I. Moser (3, 4, 5) descubrieron otro nuevo componente del sistema de posicionamiento del cerebro, identificando un tipo de células situadas en otro lugar del cerebro (el cortex entorrinal), llamadas células en parrilla o red (*grid cells*), que generan un sistema de coordenadas cerebral que permite a la rata situarse y explorar el terreno con precisión.

En definitiva, usando términos coloquiales, los galardonados han puesto en evidencia la existencia de un sistema interno de GPS cerebral.

Termino este breve comentario poniendo de manifiesto mi particular satisfacción por un doble motivo: en primer lugar, porque haya merecido el premio un matrimonio (es la cuarta vez que esto sucede) que ha sido capaz de colaborar no sólo en su proyecto de vida en común como pareja, sino también en el quehacer científico y, en segundo lugar, porque May-Britt Moser ha aumentado la nómina de mujeres galardonadas con el Premio Nobel en un área científica (Fisiología o Medicina, Química, Física) que, según los datos que proporciona la Institución

Nobel es más bien escasa: solamente 16 mujeres han obtenido el Premio Nobel en Ciencias, aunque alguna por partida doble, como es el caso de Marie Curie.

Para comentar este Premio Nobel 2014 en Fisiología o Medicina contamos hoy con la presencia del Profesor Francisco José Rubia, experto en Fisiología del Sistema Nervioso. Me gustaría poner de manifiesto que en el ciclo de conferencias que ha impartido en el mes de octubre de este año el profesor Rubia en el Colegio Libre de Eméritos sobre “Funciones cerebrales” incluía una conferencia sobre “Cerebro y espacio”, programada proféticamente mucho antes de la concesión del Premio Nobel 2014 en Fisiología o Medicina.

Tiene la palabra el Profesor Rubia.

### **REFERENCIAS**

1. O'Keefe, J.; Dostrovsky, J. The hippocampus as a spatial map. Preliminary evidence from unit activity in the freely-moving rat. *Brain Research* **34**, 171-175. (1971).
2. O'Keefe, J. Place units in the hippocampus of the freely moving rat. *Experimental Neurology*, **51**, 78-109 (1976).
3. Fyhn, M.; Molden, S.; Witter, M.P.; Moser, M.B.; Moser, E.I. Spatial representation in the entorhinal cortex. *Science*, **305**, 1258-1264 (2004).
4. Hafting, T.; Fyhn, M.; Molden, S.; Moser, M.B.; Moser, E.I. Microstructure of spatial map in the entorhinal cortex. *Nature*, **436**, 801-806 (2005).
5. Sargolini, F.; Fyhn, M.; Hafting, T.; McNaughton, B.L.; Witter, M.P.; Moser, M.B.; Moser, E.I. Conjunctive representation of position, direction, and velocity in the entorhinal cortex. *Science*, **312**, 758-762 (2006).

## El premio Nobel de Medicina o Fisiología 2014

### Francisco J. Rubia

Académico de Número de la Real Academia Nacional de Medicina.

---

*An. Real Acad. Farm. Vol 80, Nº 2 (2014), pag. 738-748*



**Figura 1.**

El premio Nobel de Medicina o Fisiología de este año ha sido concedido a tres neurocientíficos: el estadounidense John O'Keefe y la pareja de noruegos May-Britt y Edvard Moser (Figura 2).

Oficialmente el premio se concede por sus investigaciones sobre las células de posicionamiento del cerebro, una especie de "GPS interno" que permite a las personas orientarse en el espacio.

John O'Keefe nació en 1939 en Nueva York y es Profesor en el Instituto de Neurociencia Cognitiva y en el Departamento de Anatomía del University College de Londres. En este mismo año recibió el Premio Kavli de Neurociencia "por el descubrimiento de las redes cerebrales específicas de la memoria y la cognición", junto con Brenda Milner y Marcus Raichle (Figura 3).



**Figura 2.-De izquierda a derecha, John O'Keefe, May Britt y Edvard Moser.**



**Figura 3.-John O'Keefe junto a Brenda Milner y Marcus Raichle.**

Brenda Milner es una neuropsicóloga canadiense, profesora en el Departamento de Neurología y Neurocirugía de la Universidad McGill y Profesora de Psicología del Instituto Neurológico de Montreal. Es muy conocida por haber estudiado durante años al paciente H.M. del que hablaremos más tarde. Marcus Raichle es un neurólogo estadounidense de la Escuela de Medicina de la Universidad Washington en San Luis, Missouri, y es conocido por sus trabajos con técnicas de neuroimagen como la tomografía por emisión de positrones (PET) y la resonancia magnética funcional aplicadas al estudio del cerebro sano y patológico.

La pareja de neurocientíficos noruegos, May-Britt y Edvard Moser nacieron en 1963 y 1962 respetivamente. Edvard Moser es el director del Instituto Kavli para Neurociencia de Sistemas y Centro de Computación Neural de la Universidad noruega de Ciencia y Tecnología en Trondheim. Ambos trabajan en un gran laboratorio con unos 20 a 30 doctorandos y estudiantes de Ph.D.



Pero antes de entrar en detalle sobre estos descubrimientos permítanme remontarme un poco en el tiempo.

Desde el punto de vista del sistema nervioso podría decirse que “en el principio era la acción”. Esto quiere decir que sólo organismos que se mueven poseen un sistema nervioso.

Como ejemplo que corrobora esta afirmación tenemos a las ascidias, un género de tunicados que pertenecen al subfilo Urochordata (Figura 4). Estos animales, en su estado larvario, poseen una notocorda (Figura 5), que induce a la ectodermis a formar el sistema nervioso central. Pero cuando se hacen sésiles, cuando se fijan a las rocas, y por tanto dejan de moverse, las ascidias reabsorben estos rudimentos de sistema nervioso central. Precisamente por ello han sido comparadas con algunos profesores cuando consiguen un puesto fijo.



**Figura 4.-Ascidias, subfilo Urochordata.**

Por tanto, animales que se mueven tienen un sistema nervioso y este sistema nervioso tiene que hacer posible, para que puedan moverse en un entorno, la orientación en ese espacio. Un espacio en el que vivimos, en el que nos movemos, que exploramos y que defendemos.

En los animales de experimentación que solemos utilizar, generalmente mamíferos, dos estructuras permiten la orientación en el espacio: la corteza posterior del lóbulo parietal y el hipocampo.

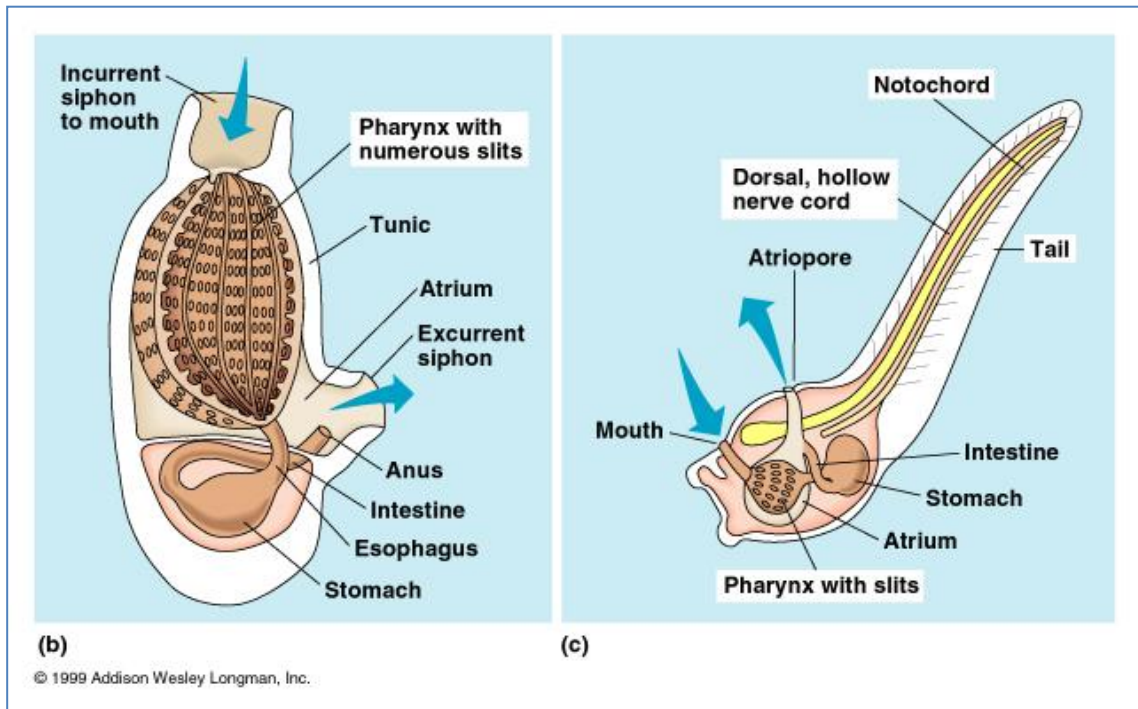


Figura 5.

Que la corteza parietal posterior tiene que ver con el espacio es un conocimiento ya antiguo demostrado sobre todo por los efectos de lesiones o tumores en esa región del cerebro. El síndrome de negligencia, por ejemplo, producido sobre todo por lesiones en la corteza parietal posterior derecha hace que el paciente desatienda el hemiespacio contralateral, es decir, el izquierdo, que comience a leer una página de un libro desde el centro a la derecha, que se afeite sólo la mitad derecha de la cara, o que dibuje solamente la parte derecha de una figura (Figura 6).

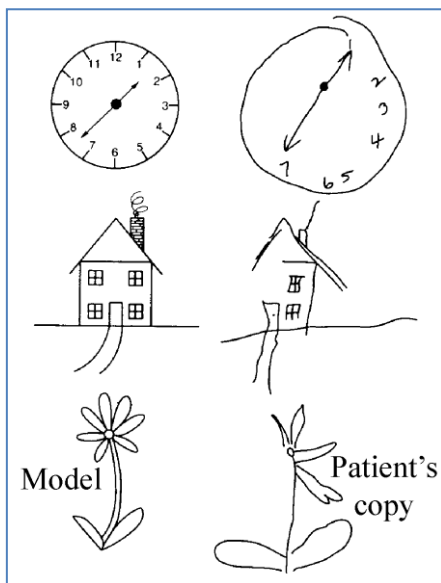


Figura 6.

La orientación en el espacio guiada por la visión, lo que se conoce como visuoespacialidad, es una de las funciones que realiza esta parte de la corteza cerebral, función importante sobre todo para poder movernos en el espacio exterior. De ahí las profundas conexiones de esta región parietal con las funciones ejecutivas, motoras, de la corteza frontal.

Mucho más moderno es el conocimiento de la implicación del hipocampo en tareas espaciales. Bien es verdad que aquí también se adelantó la neurología, ya que a mitad del siglo pasado se conoció el célebre caso del paciente H.M., llamado así para proteger su privacidad,

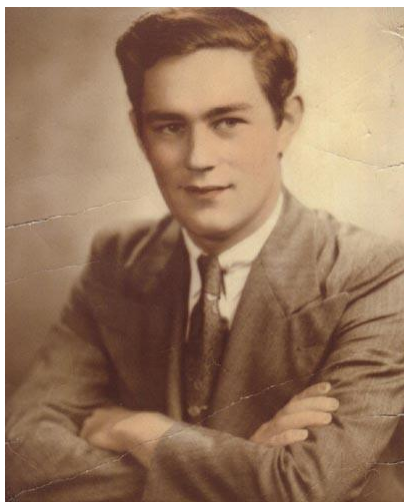


Figura 7.

pero que hoy sabemos que se llamaba Henry Molaison tras su muerte en el año 2008 (Figura 7).

Este paciente sufría de ataques epilépticos en ambos lóbulos temporales, por lo que un neurocirujano le extirpó grandes regiones de ambos lóbulos incluido el hipocampo de los dos lados. Los ataques desaparecieron, pero el paciente sufrió desde entonces una amnesia anterógrada, es decir que olvidaba al cabo de una hora todo lo que experimentaba, conservando en cambio la memoria de lo vivido antes de la operación. La amnesia anterógrada se manifestaba, por ejemplo, en el hecho de que cada día que entraba el médico a visitarle le saludaba como si no lo conociese, como si el día anterior no lo hubiese visto. O en que el paciente lloraba cada vez que se le decía que un tío muy querido por él había fallecido.

Hoy sabemos que la llamada memoria explícita, episódica o autobiográfica depende del hipocampo, pero también la memoria espacial, demostrada recientemente con técnicas modernas de neuroimagen en taxistas londinenses que tenían un hipocampo de mayor tamaño que el ciudadano normal de Londres, ya que los taxistas tienen que orientarse continuamente en la ciudad y pasar previamente un durísimo examen con el aprendizaje de numerosas rutas para poder llegar a conseguir su licencia. El aumento del hipocampo se explica hoy por otro descubrimiento relativamente reciente, a saber que en el hipocampo existe neurogénesis, o sea creación de nuevas células, algo desconocido cuando yo estudiaba medicina.

Evidentemente, el paciente H. M. sufría asimismo de un grave deterioro en la memoria espacial y se manifestaba en la incapacidad para aprender y encontrar el camino en barrios que no conocía.

Pero la importancia del hipocampo para la orientación espacial del animal fue definitivamente confirmada por los descubrimientos de John O'Keefe en 1971. En este año, O'Keefe y su estudiante Jonathan Dostrovsky publicaron en la revista *Brain Research* un trabajo titulado "El hipocampo como un mapa espacial" en el que constataron que las neuronas del hipocampo dorsal disparaban cuando los animales, concretamente ratas, estaban localizadas en una parte determinada de su entorno, pero no en otros lugares. A estas neuronas, los autores las llamaron "place cells" o neuronas de lugar (Figura 8).

Y a las neuronas que no tenían nada que ver con la posición del animal en el espacio las llamaron "displace cells".



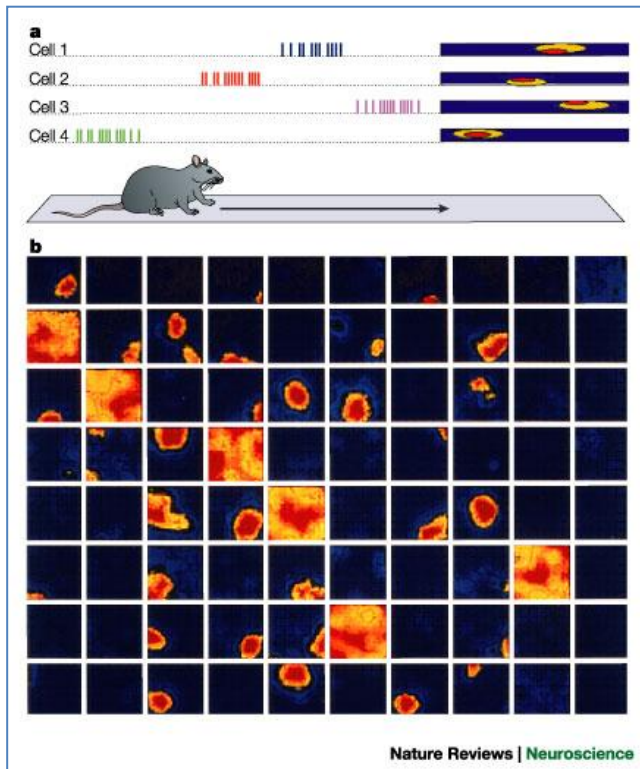


Figura 8.

En esa época estaba yo de catedrático de Fisiología Humana en la Universidad de Munich y recuerdo la controversia que los resultados de O'Keefe despertaron en la comunidad científica. Hasta que, en 1978, John O'Keefe y Lynn Nadel publicaron un libro con el título "The Hippocampus as A Cognitive Map" (El hipocampo como un mapa cognitivo) (Figura 9), que reunía todos los trabajos realizados por estos autores y sus colaboradores hasta ese momento.

La teoría del mapa cognitivo de la función del

hipocampo es sobre todo una teoría sobre la memoria de los diseños espaciales y manera en la que los animales utilizan ese sistema de memoria para su conducta adaptativa al mundo exterior. Los hechos que llevaron a O'Keefe y colaboradores a esta teoría son los siguientes: O'Keefe estaba muy interesado en conocer cómo el cerebro controlaba la conducta, y a finales de los años 60 comenzó sus experimentos con métodos neurofisiológicos. Utilizando ratas de laboratorio, los investigadores registraron la actividad de neuronas piramidales del hipocampo en las regiones CA3 y CA1. Las llamadas células de lugar disparaban cuando el animal entraba en una precisa localización que denominaron "campos de lugar". Cuando el animal entraba en un nuevo entorno en cuestión de minutos se formaban nuevos campos de lugar que permanecían estables durante meses. De manera que si se registraba un cierto número de células de lugar se podía predecir dónde se encontraba el animal en su entorno. De esta manera, el hipocampo constituye un mapa cognitivo del entorno del animal.

Esta idea de "mapa cognitivo" ya fue propuesta anteriormente por el psicólogo estadounidense Edward Tolman en 1948. Tolman planteó que en algún lugar del cerebro tenía que haber una representación del entorno que permitiera al animal orientarse en él.

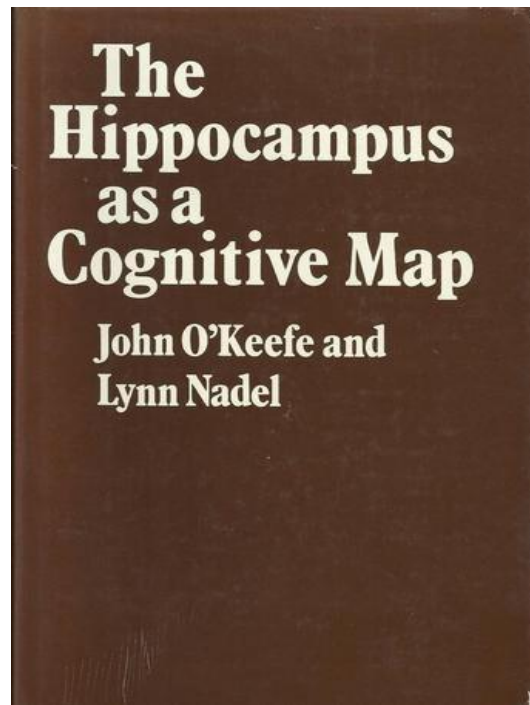


Figura 9.

La cuestión es cómo se forma ese mapa del entorno y qué tipo de información es aportada a las neuronas piramidales del hipocampo que son células de lugar. Esto es precisamente lo que investigaron los científicos noruegos May-Britt y Edvard Moser. Descubrieron que en la corteza entorrinal, localizada en el lóbulo temporal medio y que funciona como una interfaz entre el hipocampo y el neocórtex, sus células proyectan sus axones por la llamada vía perforante al hipocampo (Figura 10).

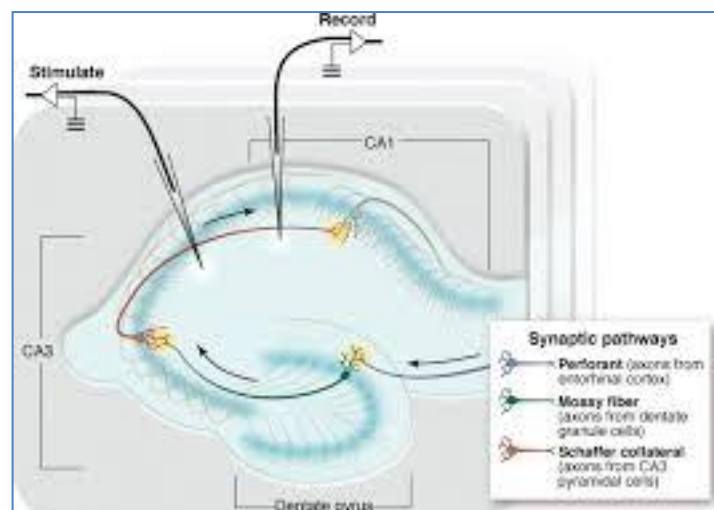


Figura 10.

Estas células forman un mapa de manera diferente a las células de lugar. En vez de disparar cuando el animal se encuentra en un lugar determinado, como las

células de lugar, las neuronas entorrinales, llamadas células de cuadrícula o de red (grid cells), lo hacían siempre que el animal se encontraba en una posición que forma un triángulo (Figura 11). Esta cuadrícula le permite al animal situar su cuerpo en un sistema cartesiano de coordenadas que es independiente del contexto, de puntos de referencia, o de señales específicas y que le permite la navegación espacial. Esta información espacial cartográfica es transformada en el hipocampo en localizaciones espaciales determinadas representadas por las descargas de las células de lugar. En resumen: el hipocampo genera un sistema GPS o sistema de posicionamiento.

La pregunta que se plantea es la siguiente: ¿cómo se mantiene el patrón de descarga de una población de neuronas del hipocampo una vez formado para un determinado entorno? La respuesta es: mediante la potenciación a largo plazo, un fenómeno descubierto en 1966 por Terje Lomo y que consiste en la intensificación duradera en la transmisión de señales entre dos neuronas que resulta de la estimulación sincrónica de ambas (Figura 12).

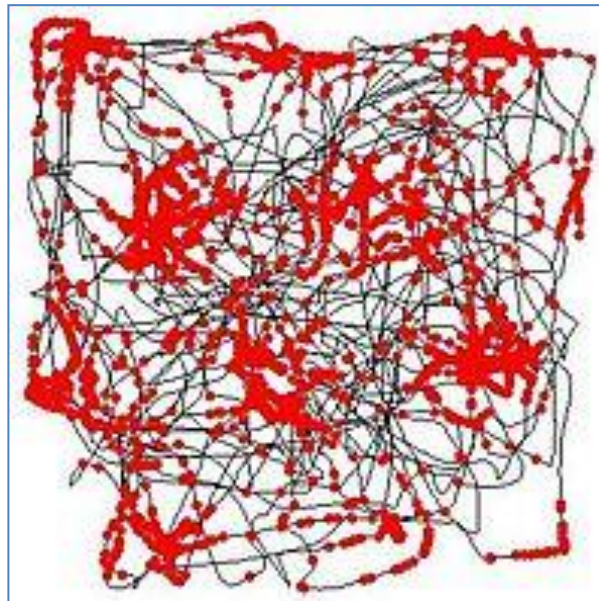


Figura 11.

Este fenómeno subyace a la plasticidad sináptica, esto es la capacidad de las sinapsis de modificar su fuerza o intensidad transmisora. La potenciación a largo plazo se considera que es el mecanismo fundamental para el aprendizaje y la memoria.

De la misma manera que el aprendizaje se fomenta por la atención que se presta al propio proceso, la atención es también imprescindible para la estabilidad a largo plazo de los campos de lugar de las neuronas. Si un animal no presta atención al espacio en el que se mueve, los campos de lugar se forman, pero son

inestables tras 3 o 6 horas. Y estos animales con espacios de lugar inestables no son capaces de aprender una tarea de memoria espacial. Si por el contrario el animal presta atención, entonces los campos de lugar son estables durante varios días.

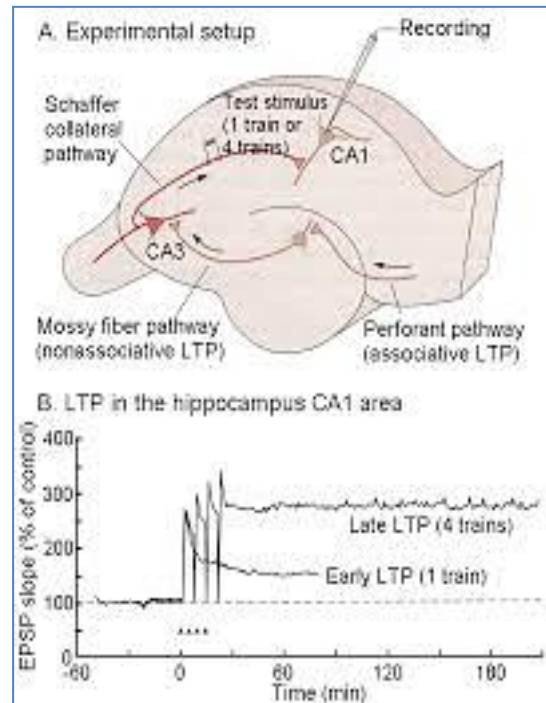


Figura 12.

Los mecanismos de atención dependen de la corteza prefrontal y del sistema modulador dopaminérgico. La memoria a largo plazo de los campos de lugar requiere la atención del animal a su entorno, de la misma manera que también se requiere en humanos para la memoria explícita.

Después de estos hallazgos se entiende por qué las lesiones del hipocampo producen deficiencias de las memorias con contenido espacial, sobre todo la llamada memoria "navegacional". Esta navegación espacial u orientación en el espacio exterior es importante para toda una serie de funciones, como la búsqueda de alimentos, la huida a un lugar seguro, la conducta parental y reproductiva o el regreso al nido o madriguera.

Existen dos tipos de navegación en nuestras experiencias diarias. Una es la ruta que seguimos cuando nos levantamos para ir a beber algo durante la publicidad en la televisión, esto es, siguiendo una ruta muy conocida. La otra es el tipo de navegación que hacemos cuando conducimos un automóvil desde el trabajo a casa y tenemos que sortear, por ejemplo, una nueva construcción o una desviación del tráfico. El primer tipo depende, como habilidad motora bien establecida, de los ganglios basales y del cerebelo, mientras que el segundo implica al hipocampo.

Más recientemente, investigaciones utilizando las modernas técnicas de neuroimagen, así como estudios en pacientes que tenían que someterse a operaciones neuroquirúrgicas, han podido comprobar que las células de lugar y de red o cartográficas también existen en humanos. En pacientes con enfermedad de Alzheimer, tanto el hipocampo como la corteza entorrinal se ven afectados en los primeros estadios de la enfermedad, por lo que estos pacientes pierden con frecuencia la capacidad de orientación espacial, incluso en su propia casa, pero también muestran un deterioro de la memoria episódica, autobiográfica o explícita que depende asimismo del hipocampo.

Las consecuencias de estos resultados son de gran relevancia. En realidad son cuestiones que fueron de gran importancia para el filósofo alemán Immanuel Kant en el siglo XVIII cuando se preguntaba que cuáles serían las facultades mentales con las que nacemos. Kant concluía que el espacio y el tiempo eran formas de la sensibilidad, es decir que no son rasgos que las cosas tengan independientemente de nuestro conocimiento. El espacio es una forma a priori de la sensibilidad externa, o percepción de las cosas físicas, mientras que el tiempo sería una forma a priori de la sensibilidad interna, o percepción de la propia vida psíquica. Así, el sujeto cognoscente estructura las sensaciones proyectando todo lo conocido en una dimensión espacio-temporal. Con otras palabras: que el concepto de espacio era un principio innato de nuestra mente, principio a través del cual se percibía el mundo.

Y ya en el siglo XX, Edward Tolman, mencionado anteriormente, estudiando el comportamiento de ratas de laboratorio en laberintos, pudo comprobar que los animales aprendían a navegar, proponiendo la existencia de un mapa cognitivo cerebral que les permitía encontrar fácilmente su camino en los laberintos. Faltaba solamente saber cómo esos mapas estaban representados en el cerebro.

Por tanto, y volviendo a los descubrimientos de la pareja Moser, sabemos que comenzaron analizando en ratas recién nacidas, justo después de que abrieran sus ojos, si tenían células de lugar o células de cuadrícula o cartográficas. Estas células no estaban maduras en animales tan jóvenes, pero supusieron que a lo largo del desarrollo estas células, como resultado de la experiencia, terminan formándose. Con otras palabras, como ocurre con todas las facultades mentales, aunque tengamos una predisposición genética para ellas, se necesita la influencia del medio ambiente para que esa predisposición se desarrolle normalmente, como ocurre, entre otras cosas, con el lenguaje, que si no encuentra un entorno parlante no se desarrolla normalmente. Y lo mismo puede decirse de la música o la inteligencia y otras facultades mentales.

Habría que añadir que en humanos la lateralización de funciones en ambos hemisferios ha mostrado que el hipocampo del hemisferio no dominante,



generalmente el derecho, está especializado en codificar memorias relacionadas con el entorno y la situación del organismo en él, mientras que el hipocampo del lado izquierdo está más implicado en cuestiones lingüísticas.

En relación con otras estructuras, como la corteza parietal posterior, el hipocampo está implicado en el procesamiento del espacio llamado aloentríco, es decir, un sistema de representación que implica relaciones entre objetos, mientras que la corteza parietal posterior está implicada en un procesamiento del espacio en relación con el sujeto, espacio llamado egocéntrico. De esta manera, ambos sistemas ayudan a la orientación en el espacio, siendo la corteza parietal posterior especialmente importante en representar el espacio para poder guiar visualmente los movimientos en él.

Finalmente unas palabras sobre la relación entre la memoria episódica y la memoria espacial, ambas localizadas y procesadas en la misma estructura, es decir el hipocampo. La memoria episódica trata de sucesos vividos por el sujeto y suele incluir información correspondiente al contenido del propio suceso, así como al contexto externo de ese suceso, como dónde y cuándo ocurrió. Este tipo de memoria es un recuerdo de sucesos espacio-temporales, a diferencia de la memoria semántica que es una memoria de hechos y que se supone está localizada en un lugar distinto del lóbulo temporal.

En resumen: el Comité Nobel ha premiado a tres científicos que han hecho avanzar nuestros conocimientos sobre un tema crucial para nuestra mente: la capacidad de orientarnos en el espacio exterior generando una representación interna de ese espacio para poder guiar y anticipar sin problemas nuestra conducta. De nuevo otro ejemplo de la creciente internalización del mundo exterior en el cerebro a lo largo de la evolución.

Muchas gracias por su atención.

## Presentación. El Premio Nobel 2014 en Química: la nanoscopía

### Juan-Ramón Lacadena Calero

El 8 de octubre de 2014, la Real Academia de Ciencias de Suecia en Estocolmo acordó conceder el Premio Nobel 2014 en Química conjuntamente a Eric Berzig (Janelia Research Campus, Howard Hughes Medical Institute, Ashburn, VA, USA), Stefan W. Hell (University of Heidelberg, Director at the Max Planck Institute for Biophysical Chemistry, Division Head at the German Cancer Research Center, Heidelberg, Germany) y a William E. Moerner (Mosher Professor in Chemistry y Professor of Applied Physics at Standford University, CA, USA) “por el desarrollo de la microscopía de fluorescencia de super-resolución”.

Siempre y nunca son dos palabras que no pueden utilizarse en Ciencia porque, como decía Laín Entralgo, la Ciencia es lo penúltimo, lo último no es Ciencia. Digo esto porque el famoso microscopista Ernst Abbe afirmó en 1873, mediante la denominada “ecuación de Abbe”, que había un límite físico (límite de difracción de Abbe) para la resolución máxima de la microscopía óptica que nunca –repito, nunca– podría llegar a los 0,2 micrómetros (la mitad de la longitud de onda de la luz visible). Como señalaba la nota de prensa de la Real Academia Sueca de Ciencias, ayudados por las moléculas fluorescentes, los tres galardonados lograron salvar con ingenio esa limitación, llevando la microscopía óptica a la nanodimensión; es decir, al nacimiento de la nanoscopía.

El avance científico se basa en dos principios. El primero – la *microscopía STED* (*stimulated emission depletion*) – fue desarrollado por Stefan Hell, (1, 2, 3), utilizando dos rayos laser: uno que estimula a las moléculas fluorescentes para que brillen y el otro que anula la fluorescencia excepto en volúmenes nanométricos. El segundo principio –la *microscopía de moléculas individuales*– que consiste en la posibilidad de encender y apagar (on/off) la fluorescencia de moléculas individuales fue desarrollado por William Moerner (4,5) y Eric Berzig (6,7), aunque trabajando por separado.

En la actualidad los científicos pueden visualizar los movimientos de moléculas individuales dentro de las células vivas. Así, pueden ver cómo las moléculas crean las sinapsis entre células nerviosas en el cerebro o seguir la pista a las proteínas responsables de las enfermedades de Parkinson, de Alzheimer o la corea de Huntington cuando se agregan o seguir la pista a proteínas individuales en el proceso de división del cigoto en la primera división embrionaria, tomando literalmente los ejemplos utilizados en la nota de prensa institucional.

## **REFERENCIAS**

1. Hells, S.W.; Wichman, J. Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: stimulation–emission–depletion–microscopy. *Opt. Lett.* **19**, 780-782 (1994).
2. Hell, S.W.; Krough, M. Ground-state depletion fluorescence microscopy, a concept for breaking the diffraction resolution limit. *Appl. Phys. B.* **60**, 495-497 (1995).
3. Klar, T.A.; Jakobs, S.; Dyba, M.; Egnér, A.; Hell, S.W. Fluorescence microscopy with diffraction resolution barrier broken by stimulated emission. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **97**, 8206-8210 (2000).
4. Moerner, W.E.; Kador, L. Optical detection and spectroscopy of single molecules in a solid. *Phys. Rev. Lett.* **62**, 2535-2538 (1989).
5. Dickson, R.M.; Cubitt, A.B.; Tsien, R.Y.; Moerner, W.E. On/off blinking and switching behaviour of single molecules of green fluorescent protein. *Nature* **388**, 355-358 (1997).
6. Betzig, E. Proposed method for molecular optical imaging. *Opt. Lett.* **20**, 237-239 (1995).
7. Betzig, E.; Patterson, G.H.; Sougrat, R.; Lindwasser, O.W.; Olenych, S.; Bonifacino, J.R.; Davidson, M.W.; Lippincott-Schwarz, J.; Hess, H.F. Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution. *Science* **313**, 1642-1645 (2006).

Para glosar estas investigaciones contamos con el Profesor Jesús Pintor. Sus méritos académicos nos fueron recordados hace pocos días con motivo de su ingreso como Académico de Número en esta Real Academia Nacional de Farmacia. Aquí y ahora, únicamente quiero recoger algunas palabras que dijo la Profesora M<sup>a</sup> Teresa Miras en su laudatio: “Puedo asegurarles que en los congresos internacionales nadie se olvida de asistir a las conferencias de Suso, así le llaman todos, pues van a disfrutar de la buena ciencia, bien envuelta y con comprensión asegurada, ya que es un excelente comunicador. Lo mismo ocurre en sus clases del día a día docente, o en las ilustraciones para sus artículos científicos. La estética es un valor añadido y si acompaña a la buena ciencia la hace más atractiva y se difunde mejor”. Seguro que en su intervención de hoy en esta Real Academia hará gala de tales méritos.

Tiene la palabra el Profesor Pintor.

## Premio Nobel 2014 en Química. Observando el nanomundo

### Jesús Pintor

Académico de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia. Departamento de Bioquímica, Facultad de Óptica y Optometría, Universidad Complutense de Madrid, c/Arcos de Jalón 118, 28037 Madrid, España  
e-mail: jpintor@ucm.es

---

*An. Real Acad. Farm. Vol 80, Nº 4 (2014), pag. 751-762*

### RESUMEN

Con lo que se conoce como “nanoscopía”, los científicos pueden visualizar moléculas individuales dentro de las células vivas. Parecía imposible que los científicos pudiesen, a través de métodos ópticos, ver cierto tipo de detalles en sus preparaciones, sobre todo en observar detalles de las moléculas en el interior de las células. En 1873, el microscopista Ernst Abbe estipuló un límite físico a la máxima resolución de la microscopía óptica tradicional: nunca podría llegar a ser mejor que 0,2 micrómetros. Eric Betzig, Stefan W. Hell y William E. Moerner han sido galardonados con el Premio Nobel de Química 2014 por haber pasado por alto este límite. Debido a sus logros el microscopio óptico puede ahora mirar en el nanomundo. Son básicamente dos principios los que han propiciado la concesión del mencionado galardón. En primer lugar la técnica STED (stimulated emission depletion), desarrollada por Stefan Hell en el año 2000. En esta estrategia dos rayos láser son utilizados; uno estimula las moléculas fluorescentes haciéndolas brillar, otro anula toda fluorescencia a excepción de un volumen de tamaño nanométrico. El barrido de la preparación en observación produce una imagen con una resolución mejor que cualquiera que se hubiera obtenido hasta la actualidad. Eric Betzig y William Moerner, trabajando por separado, sentaron las bases para el segundo método, la microscopía de una sola molécula, definida con el acrónimo PALM (Photoactivated localization microscopy). El método se basa en la posibilidad de excitar la fluorescencia de moléculas individuales encendiéndolas y apagándolas. Los científicos iluminan la misma zona varias veces, dejando que sólo unas pocas moléculas intercaladas brillen cada vez. La superposición de estas imágenes produce una imagen súper densa con una resolución en el nivel nanométrico. Hoy en día, nanoscopía se utiliza en todo el mundo y se con ella se profundiza en el conocimiento de cómo las moléculas participan en las sinapsis entre las células nerviosas en el cerebro, se pueden rastrear proteínas implicadas en la enfermedad de Parkinson, el Alzheimer y la de Huntington, o investigar proteínas individuales en los huevos fertilizados que dan lugar embriones. Sin duda la nanoscopía favorecerá el conocimiento científico en aspectos que redundarán en una mejora de la calidad de vida de los seres humanos.

## **ABSTRAC**

With what is known as "nanoscopy", scientists can display individual molecules within living cells. It seemed impossible that scientists could see, via optical methods, details in certain preparations, especially to observe details of molecules inside cells. In 1873, the microscopist Ernst Abbe stipulated a physical limit to the maximum resolution of traditional light microscopy: resolution could never be better than 0.2 micrometers. Eric Betzig, Stefan W. Hell and William E. Moerner have been awarded with the Nobel Prize in Chemistry 2014 for having surpass this limit. Because of their achievements light microscopy can now look into the nanoworld. There are basically two principles that have been discovered by the awarded scientists. First the STED technique (stimulated emission depletion) developed by Stefan Hell in 2000. In this strategy two laser beams are used, one stimulates fluorescent molecules, the second limits the fluorescent area to a nano-sized volume. This combination produces an image with better resolution than any image taken before. Eric Betzig and William Moerner, working separately, laid the groundwork for the second method, the single-molecule microscopy, with the acronym PALM (photoactivated localization microscopy). The method is based on the possibility of turning on and off the fluorescence of individual molecules. Scientists can illuminate the same area several times, leaving only a few molecules interspersed increasingly shine. The superposition of these images produces a super dense image with a resolution in the nanometer level. Today, nanoscopy is used worldwide and has improved the knowledge of how molecules are involved in the synapses between nerve cells in the brain, and how proteins involved in Parkinson's disease, Alzheimer's and Huntington disease can interact during the pathology. Moreover, it has been possible to investigate how individual proteins in fertilized embryos participate in the animal development. Certainly the nanoscopy helps the scientific knowledge in ways that will result in improved quality of life of human beings.

## **INTRODUCCIÓN**

Como cada año, la Real Academia de las Ciencias de Suecia es la encargada de nombrar al ganador del Premio Nobel de Física, del Premio Nobel de Química y del Premio en Ciencias Económicas en memoria de Alfred Nobel. Este año en el apartado de química, han sido galardonados los científicos Eric Betzig, Stefan W. Hell y William E. Moerner "*por el desarrollo de la microscopía de fluorescencia de alta resolución*" (Figura 1). La institución del Premio Nobel ha referido los siguientes párrafos como justificación de la concesión:





**Figura 1.-** Fotografías de los laureados, de izquierda a derecha Eric Betzig, Stefan Hell y William H. Moerner.

*“Eric Betzig, Stefan W. Hell y William E. Moerner han sido galardonados con el Premio Nobel de Química 2014 por haber superado una limitación científica que indicaba que un microscopio óptico no podía tener una resolución más allá de 0.2 micrómetros”*

*“Con el uso de moléculas fluorescentes, los científicos pueden ahora controlar la interacción entre las moléculas individuales dentro de las células, pueden observar las interacciones de las proteínas a nivel individual en los procesos patológicos y es posible realizar un seguimiento de la división celular a la escala nanométrica”*

Las aportaciones de los insignes científicos son el desarrollo de la técnica denominada STED (inventada por Stefan Hell), y PALM (desarrollada por Moerner y Betzig). Ambas técnicas son capaces de romper la norma definida por Ernst Abbe en 1873 que indicaba que la máxima resolución de la microscopía óptica tradicional nunca sería mejor que 0,2 micrómetros. Para comprender la relevancia de estas técnicas es conveniente revisar algunos conceptos de la microscopía óptica, empezando por el papel de los pioneros en la microscopía.

### ***Notas históricas sobre los inventores del microscopio***

Como suele ocurrir en muchas áreas de la ciencia, los expertos en la historia de la microscopía no se ponen de acuerdo sobre quién fue el primero en desarrollar un instrumento óptico para poder magnificar los objetos pequeños. Sí parece que Holanda fue el país donde se ideó el microscopio, pero no se sabe con certeza quien lo inventó, aunque todos los indicios señalan a Zacharias Janssen como su creador en 1590. Zacharias Janssen trabajaba en la fábrica de lentes de su padre, junto con Hans Lippershey, otro posible candidato a inventor del microscopio. Existen indicios que apuntan a que Hans Lippershey vio jugar a

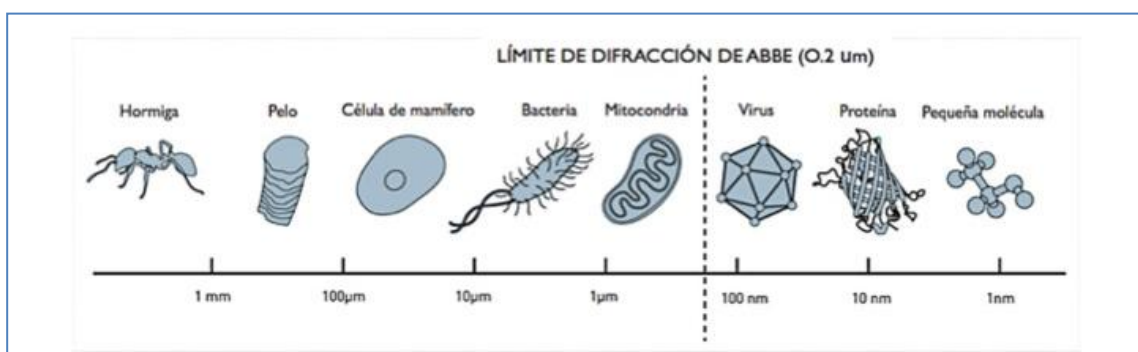
Zacharias cuando era niño con los restos de lentes desechadas, y como combinando esas lentes podía ampliar las imágenes de algunas plantas y animales. Se dice que Hans tomó buena nota de este hecho y haciendo suya la idea desarrolló el primer microscopio que denominó con el nombre de *tubo óptico*. Lamentablemente no se sabe cual de los dos fue el inventor, pero aunque aparentemente Hans Lippershey habría actuado de una manera no muy honrosa, Zacharias Janssen no era tampoco una persona demasiado escrupulosa. Zacharias no tenía muy buena reputación, ya que hizo fortuna a base de falsificar monedas de españolas, primero de cobre y más adelante de oro y plata. Independientemente de quien fuera el inventor, el primer microscopio tenía forma cilíndrica y presentaba una magnificación entre 3 y 9 aumentos.

En el año 1665 Robert Hooke observó con un microscopio, cuya capacidad de magnificación era de 30 a 50 aumentos, una fina sección de corcho en la que pudo visualizar estructuras en forma de celdas a las que llamó células. Este es un hito en la historia de la ciencia.

Posteriormente, un tratante de telas llamado Anton van Leeuwenhoek desarrolló un microscopio simple, es decir con una sola lente, pero de tal calidad, que permitía una magnificación superior a los 200 aumentos. Desarrolló el instrumento para valorar la calidad de los tejidos con los que comerciaba. Leeuwenhoek fue un auténtico pionero describiendo las estructuras de “cosas” invisibles hasta la fecha, y así describió por primera vez protozoos, bacterias, espermatozoides y los glóbulos rojos (1).

Otra persona muy influyente en el desarrollo de la microscopía fue Ernst Abbe. Las mejoras más importantes de la óptica en los microscopios surgieron en 1877, cuando por encargo de Carl Zeiss, mejoró la microscopía de inmersión sustituyendo el agua por aceite de cedro, lo que permitió obtener aumentos de 2000.

Es Ernst Abbe, una persona clave en el Premio Nobel de Química 1905 puesto que en 1873 elaboró la Teoría de los Límites de la Resolución (Figura 2).



**Figura 2.-** Descripción de los tamaños de las estructuras microscópicas y el punto limítrofe descrito por Ernst Abbe del límite de la resolución para la microscopía óptica.

Esta teoría dice que debido a la difracción de la luz al atravesar la óptica de un microscopio, la luz procedente de un objeto puntual crea una imagen anular con un patrón de difracción característico denominado disco de Airy. Este fenómeno se utiliza para conocer la habilidad del ojo humano para distinguir dos fuentes puntuales de luz cuyos discos de Airy se superponen.

Esto quiere decir que la resolución de un microscopio es capaz de distinguir entre dos puntos que estén separados aproximadamente la mitad de la longitud de onda de la luz, con la que queremos observar esos dos puntos. En líneas generales, se puede asumir que la distancia que han de tener esos dos puntos entre sí para ser discernibles tiene que ser superior a 0,2 micrometros.

Gracias a la contribución de los galardonados este limite de 0,2 micrómetros ha podido ser sobrepasado, de manera que ya es posible diferenciar entre moléculas que estén a menor distancia de lo anteriormente indicado.

### ***¿Pero qué se puede hacer para mejorar la resolución de un microscopio óptico?***

Pese a las limitaciones de resolución definidas por Abbe, existen estrategias que se han ido desarrollando a lo largo de los años para poder mejorar la calidad de las imágenes microscopio óptico. Básicamente además de mejorar la calidad de las lentes se ha trabajado intensamente en iluminar las muestras de diversas formas o bien procesar las imágenes usando métodos físicos para ver más allá de lo que permite la observación con la luz transmitida. Son habituales las técnicas de campo oscuro, contraste de fases o contraste interferencial de Normarski, entre otras (2).

En la microscopía óptica normal (luz transmitida) la muestra se tiñe con algún colorante que permita ver los detalles que de otra manera no se pueden ver. En algunos casos los colores naturales de la muestra permiten observar algunos detalles sin la necesidad de la tinción.

El microscopio en campo oscuro utiliza una luz muy intensa en forma de un cono hueco concentrado sobre la muestra. El campo de visión del objetivo se encuentra en la zona hueca del cono de luz y sólo recoge la luz que se refleja en el objeto. Por ello las porciones claras de la muestra aparecen como un fondo oscuro y los objetos minúsculos que se están analizando aparecen como una luz brillante sobre el fondo. Esta forma de iluminación se utiliza para analizar elementos biológicos transparentes y sin manchas, invisibles con iluminación normal.

En la microscopía de contraste de fases se ilumina el espécimen con un cono hueco de luz, como en el microscopio en campo oscuro. Sin embargo dicha luz entra en el campo de visión del objetivo, que contiene un dispositivo en forma de anillo que reduce la intensidad de la luz y provoca un cambio de fase de un cuarto de la longitud de onda. Este tipo de iluminación provoca variaciones minúsculas en el índice de refracción de un espécimen transparente, haciéndolo visible. Esta

técnica se usa principalmente para aumentar el contraste entre las partes claras y oscuras de las células sin la necesidad de teñirlas. Es ideal a la hora de examinar tejidos vivos, por lo que se utiliza con frecuencia en biología y medicina

La microscopía DIC o Nomarski, emplea dos rayos de luz polarizada de manera que las imágenes combinadas aparecen como si la célula estuviera proyectando sombras hacia un lado. Fue diseñado para observar relieves de muestras que son más bien gruesas y en las que se pueden ver relieves. Con esta técnica tampoco es necesario teñir la preparación.

Una innovación muy interesante ha sido la aplicación de la fluorescencia para la observación de preparaciones de interés biológico. En este caso lo que se hace es aprovechar las propiedades naturales fluorescentes de las células o bien se aplica un colorante con esta propiedad (la de ser fluorescente). La preparación se ilumina (excita) con un haz de luz para que emita luz a una longitud de onda mayor de la que se ha empleado para excitar al pigmento fluorescente. El microscopio de fluorescencia necesita de una lámpara para poder excitar el pigmento fluorescente y unos filtros especiales para poder permitir el paso de la luz que emite el pigmento excitado (3).

Mejorando todavía más la técnica fluorescente una de las implementaciones que más han contribuido a relanzar la microscopía óptica como herramienta crucial en la investigación biomédica y científica en general ha sido la aparición de la microscopía confocal.

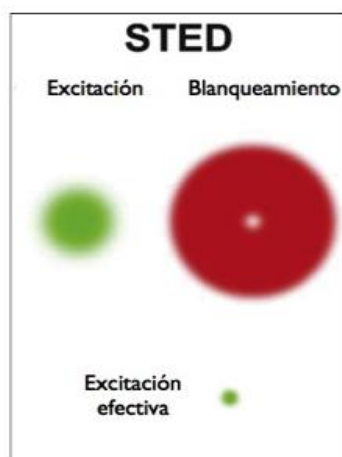
El microscopio confocal es un microscopio de fluorescencia en donde la muestra se ilumina con un láser y en la que se emplean dos diafragmas confocales (uno antes de la muestra y otro después) capaces de enfocar la iluminación en un único punto de la preparación. Como el láser tiene propiedades de coherencia la muestra se puede barrer en toda su superficie, plano a plano. Con todas esas imágenes que son bidimensionales el ordenador las puede integrar generando una imagen tridimensional de la muestra.

Todas estas estrategias han valido para mejorar sustancialmente la resolución de las imágenes, sin embargo, en ningún caso ha sido posible superar el límite de difracción de Abbe, por lo que por mucho que hayan mejorado las cosas, hasta hace poco no se podían diferenciar dos moléculas cuando se encuentran a una distancia inferior a 0.2 micrometros.

### ***Stefan Hell y la técnica agotamiento de la emisión estimulada: STED (Stimulated Emission Depletion)***

Stefan W. Hell (1962) nació en Rumania pero se doctoró en la Universidad de Heidelberg y actualmente está a cargo de la dirección del el Instituto Max Planck de Química Biofísica (Alemania), y del Centro Alemán de Investigación contra el Cáncer de Heidelberg.

Cuando Stefan Hell leyó sobre el concepto de la emisión estimulada, se dio cuenta de que debería ser posible concebir una especie de nano-flash de laser que podría barrer las muestras de nanómetro en nanómetro. Mediante el uso de la emisión estimulada los científicos puede apagar moléculas fluorescentes. Cuando se dirige un rayo láser a dichas moléculas, pierden inmediatamente su energía y se oscurecen. En 1994, Stefan Hell publicó un artículo que resumía sus ideas (4). En el método propuesto, denominado agotamiento de la emisión estimulada (STED), un pulso de luz excita todas las moléculas fluorescentes, mientras otro pulso de luz apaga la fluorescencia de todas las moléculas excepto en un volumen de tamaño nanométrico en el medio. Sólo este volumen es registrado por lo que el área observada es muy pequeña y precisa (Figura 3).

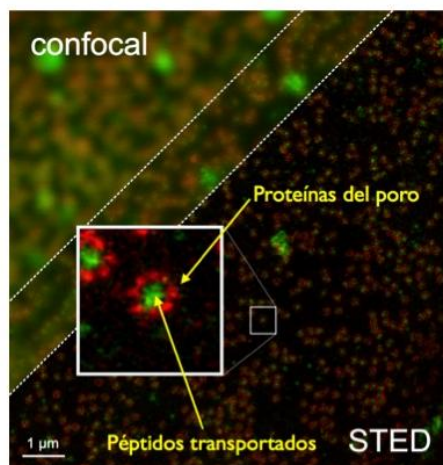


**Figura 3.-** Descripción de la técnica inventada por Stefan Hell, donde la fluorescencia de un punto producido por un rayo láser (en verde), es mejorada por medio de otro láser (en rojo) que apaga parte de dicha fluorescencia. Se ha eliminado gran parte de la difracción del láser verde haciendo que el punto luminoso sea más pequeño y definido.

Haciendo el correspondiente barrido de toda la muestra es posible obtener una imagen completa y más precisa. Cuanto menor sea el volumen al que se le permite emitir fluorescencia en un instante, mayor será la resolución de la imagen final. Por lo tanto, no hay, en principio, límite a la resolución de los microscopios ópticos (Figura 4).

El artículo teórico de Stefan Hell no creó ninguna conmoción inmediata, pero era lo suficientemente interesante como para que le ofrecieran un puesto en el Instituto Max Planck de Química Biofísica en Göttingen. En los años siguientes llevó sus ideas a buen término, desarrolló un microscopio STED. En 2000 él fue capaz de demostrar que sus ideas funcionan realmente en la práctica, mediante, entre otras cosas, imágenes de una bacteria *E. coli* con una resolución nunca antes alcanzado en un microscopio óptico (5).





**Figura 4.-** Imagen comparativa entre la microscopía confocal (parte superior izquierda) y la nueva técnica STED descrita por S. Hell. Nótese la extraordinaria calidad y resolución de la nueva técnica.

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

### ***Moerner, el primero en detectar una molécula fluorescente***

En la mayoría de los métodos químicos, por ejemplo al medir la absorción de luz por una molécula o en medidas de fluorescencia, los científicos estudian millones de moléculas simultáneamente. Los resultados de tales experimentos representan una especie de media de todas ellas. Los científicos han tenido que aceptarlo, sin embargo hay que reconocer que la ciencia soñaba con la medición de moléculas individuales, ya que así sería más fácil y mejor comprender, por ejemplo, como se desarrollan las enfermedades. Así, en 1989, cuando Moerner como el primer científico en el mundo fue capaz de medir la absorción de la luz de una sola molécula, consiguió un logro fundamental (6).

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

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

En 1997 Moerner se incorporó a la Universidad de California en San Diego, donde Roger Tsien, Premio Nobel, estaba tratando de conseguir que la proteína verde fluorescente, GFP, tuviese todos los colores del arco iris. La proteína verde se

aisló de una medusa fluorescente y su interés se encuentra en su capacidad para hacer que las proteínas dentro de las células vivas puedan ser visibles. Usando el gen de la GFP los científicos pueden hacer fluorescentes a otras proteínas. La luz verde posteriormente revela exactamente en que parte de la célula se ubica la proteína marcada.

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

Moerner dispersa estas proteínas excitables en un gel, de manera que la distancia entre cada proteína individual fuera mayor que el límite de difracción de Abbe de 0,2 micrómetros. Con un microscopio óptico se podría discernir el resplandor de las moléculas individuales - eran como pequeñas lámparas con interruptores, que podía encender y apagar. Los resultados fueron publicados en la revista científica *Nature* en 1997 (7).

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

### ***Entra en escena Eric Betzig***

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

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

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

En 1995 Eric Betzig publicó sus ideas teóricas en la revista *Optics Letters*, y posteriormente abandonó la academia y se unió a la compañía de su padre (8).

### ***La atracción por la proteína verde fluorescente (GFP)***

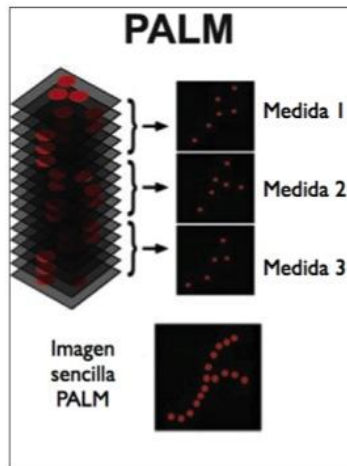
Durante muchos años, Eric Betzig estuvo totalmente desconectado de la comunidad investigadora. Pero un día, un anhelo de la ciencia cobró vida de nuevo y volvió a revisar la literatura científica encontrándose con la proteína fluorescente verde por primera vez. Al darse cuenta de que había una proteína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

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

### ***Sobrepasando el límite de difracción de Abbe: la técnica PALM (photoactivated localization microscopy)***

Apenas un año más tarde, Eric Betzig demostró, en colaboración con científicos que trabajan en proteínas fluorescentes excitables, que su idea funcionaba en la práctica. Entre otras cosas, los científicos acoplaron la proteína brillante a la membrana que envuelve el lisosoma de la célula. Con el uso de un pulso de luz las proteínas se activaban emitiendo fluorescencia, pero ya que el pulso era tan débil sólo una fracción de estas proteínas comenzaban a brillar.

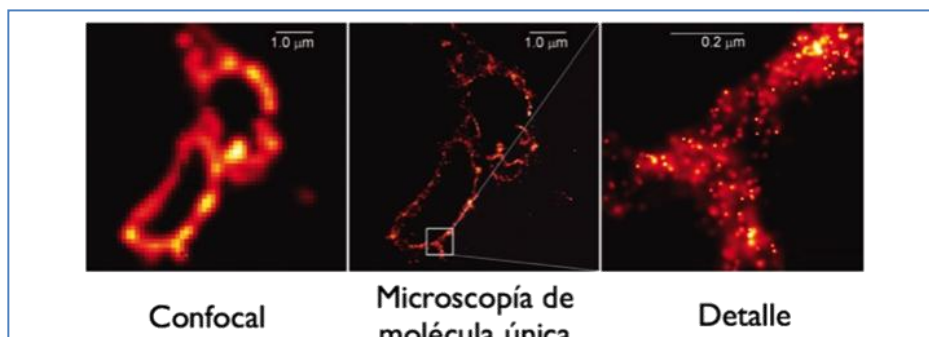
Debido a su pequeño número, casi todos ellos estaban situados a una distancia mayor que el límite de difracción de Abbe de 0,2 micrómetros. Por lo tanto la posición de cada proteína brillante podría ser registrado de forma muy precisa en el microscopio. Después de un tiempo, cuando su fluorescencia se apagaba, los científicos activaban un nuevo subgrupo de proteínas. Una vez más, el pulso era tan débil de modo que sólo una fracción de las proteínas brillaba, después de lo cual otra imagen se tomaba. Este procedimiento se repetía una y otra vez (Figura 5).



**Figura 5.-** Descripción de la técnica inventada por Betzig basada en los descubrimientos de W. E. Moerner. Con esta técnica se hacen fotografías consecutivas de la misma preparación iluminándola varias veces, de modo que en cada foto se iluminan moléculas distintas. Cuando se superponen las fotos las distancias entre dichas moléculas es inferior al límite de Abbe.

Cuando Betzig superpuso las imágenes obtuvo una imagen de alta resolución de la membrana de los lisosomas. A esta técnica se la denominó PALM (photoactivated localization microscopy) que podría traducirse como microscopía de localización fotoactivada o microscopía de una sola molécula.

Su resolución era mucho mejor que el límite de difracción de Abbe (Figura 6).



**Figura 6.-** Comparativa entre una imagen confocal y una imagen por la técnica PALM (microscopía de molécula única) de las proteínas de la membrana lisosomal. Obsérvese la extraordinaria resolución de la imagen de la derecha, donde claramente se aprecia que el límite de Abbe ha sido superado.

Un artículo publicado en la revista Science en 2006, presentó esta nueva aproximación a la comunidad científica (9).

## **CONCLUSIONES**

Los métodos desarrollados por Eric Betzig, Stefan Hell y W.E. Moerner han dado lugar a varias técnicas de la denominada “nanoscopía” que se utilizan en la actualidad en todo el mundo. Los tres laureados son todavía investigadores en activo, formando parte de una comunidad grande y creciente de científicos que lideran la innovación en el campo de la microscopía. Cuando ellos dirigen sus poderosos “nanoscopios” hacia los componentes más pequeños de la vida, realizan descubrimientos que están a la vanguardia de la ciencia. Stefan Hell se ha observado el interior de células nerviosas con el fin de entender mejor las sinapsis de las neuronas cerebrales. W.E. Moerner ha estudiado las proteínas en relación con la enfermedad de Huntington. Eric Betzig ha rastreado la división celular dentro de los embriones. Estos son sólo algunos de los muchos ejemplos pero más tendrán que venir no solo provenientes de los laureados sino también de muchos otros investigadores.

## **REFERENCIAS**

1. Maxfield, F.R. Introduction: optical microscopy in physiological investigations. *FASEB J.* **8**(9), 571-582 (1994).
2. Keller, P.J.; Dodt, H.U. Light sheet microscopy of living or cleared specimens. *Curr Opin Neurobiol.* **22**(1), 138-143 (2012).
3. Renz, M. Fluorescence microscopy-a historical and technical perspective. *Cytometry A.* **83**(9), 767-779 (2013).
4. Hell, S.W.; Wichmann, J. Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy. *Optics Letters* **19**(11), 780-782 (1994)
5. Klar, T.A.; Jakobs, S.; Dyba, M.; Egner, A.; Hell, S.W. Fluorescence microscopy with diffraction resolution barrier broken by stimulated emission. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 8206–8210 (2000).
6. Moerner, W.E.; Kador, L. Optical detection and spectroscopy of single molecules in a solid. *Phys. Rev. Lett.* **62**, 2535–2538 (1989)
7. Dickson, R.M.; Cubitt, A.B.; Tsien, R.Y.; Moerner, W.E. On/off blinking and switching behaviour of single molecules of green fluorescent protein. *Nature* **388**, 355–358 (1997).
8. Betzig, E. Proposed method for molecular optical imaging. *Opt. Lett.* **20**, 237–239 (1995).
9. Betzig, E.; Patterson, G.H.; Sougrat, R.; Lindwasser, O.W.; Olenych, S.; Bonifacino, J.S.; Davidson, M.W.; Lippincott-Schwartz, J.; Hess, H.F. Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution. *Science* **313**, 1642–1645 (2006).