

COLABORACIONES EN BIOLOGÍA

EL LÁSER EN BIOLOGÍA, UN BRILLANTE PRESENTE

INTRODUCCIÓN

El láser es, quizá, una de los dispositivos que más se relacionan con la tecnología y el futuro. Todos recordamos las espadas láser o los rayos láser que se utilizan en los combates espaciales de las películas. Sin embargo, el láser es una herramienta que se utiliza actualmente en multitud de aplicaciones y es de gran utilidad en los avances conseguidos en los laboratorios de investigación.

La palabra *láser* es el acrónimo de light amplification by stimulated emission of radiation, que se puede traducir al castellano como “amplificación de luz mediante emisión inducida de radiación”. Los fundamentos del laser los estableció inicialmente Albert Einstein en 1917, siendo confirmados en 1928 por Rudolf Ladenburg. La propuesta de utilizar emisión inducida para amplificar ondas cortas partió en 1939 de Valentin Fabrikant, siendo Lamb y Retherford los que en 1947 encontraron emisión inducida aparente en el espectro del hidrógeno y realizaron la primera demostración de emisión inducida. Para completar los elementos básicos que se necesitaban para permitir la construcción del primer láser era necesario el desarrollo del bombeo óptico, algo que propuso en 1950 Albert Kastler y que fue capaz de demostrar en 1952 junto con Brossel y Winter. La consecución de todos estos hitos supuso alcanzar las condiciones necesarias para que el 16 de mayo de 1960 Theodore Maiman realizara la demostración del primer láser funcional capaz de producir pulsos cortos en los Laboratorios de Investigación Hughes situados en California¹.

El dispositivo construido por Maiman empleaba un cristal de rubí para producir la luz roja del láser, con una

longitud de onda de 694 nanómetros. La obtención del primer láser continuo no necesitó mucho tiempo ya que en ese mismo año se construyó el primer láser de gas, que empleaba helio y neón. Desde entonces se han desarrollado múltiples dispositivos que han aprovechado los diferentes avances tecnológicos y han permitido conseguir láser con distintas longitudes de onda, con variaciones en la capacidad energética, la eficiencia o la duración del pulso. Todo ello, además, con un descenso del coste económico, lo que ha permitido su empleo en un mayor número de dispositivos que hoy en día se encuentran en nuestra vida diaria.

Actualmente empleamos la palabra “láser” para definir tanto el fenómeno como el aparato que lo produce, pero ¿qué es realmente un láser?² Los átomos y las moléculas que absorben luz almacenan energía y la pueden emitir a su vez en forma de luz. Einstein propuso que un haz de luz con la longitud de onda adecuada que pase próximo a un átomo permite que éste almacene energía y pueda emitirla en forma de luz que se añade a la del haz. Normalmente los átomos y las moléculas emiten luz de forma aleatoria con una dirección y fase aleatorias, si en el momento preciso pasa cerca de él un haz de luz con una longitud de onda adecuada es posible que el átomo emita luz sincrónica a ese haz luminoso, lo que se traduce en una amplificación de la luz de acuerdo con la idea de Einstein. Por lo tanto, para producir un láser lo que necesitamos es una maquina que proporcione las condiciones adecuadas para que esto ocurra.

Un láser es un oscilador óptico sólido, líquido o gaseoso, con espejos en ambos extremos. La incidencia de luz o de electrones en los átomos produce su excitación a orbitales de mayor energía. Algunos átomos vuelven a niveles más bajos de energía de manera espontánea liberando un fotón, que puede estimular a otros átomos excitados a emitir más fotones con la misma energía y la misma longitud de onda que el fotón original. Estas ondas de luz se refuerzan porque se pro-

¹ Ver Efemérides: “1960, nace el primer laser de Rubí en los laboratorios de la Hughes Aircraft Company (California, USA)”, en este mismo número de 100cias@uned.

² Ver Colaboraciones en Física: “Fundamentos físicos del láser”, también en este mismo número de 100cias@uned.

duce una onda estacionaria entre los espejos que limitan la cavidad del oscilador (cómo las ondas sonoras en la caja de una guitarra). El resultado es que la luz emitida desde la fuente tiene la misma frecuencia, fase y polarización, a diferencia de lo que ocurre con las fuentes de luz normales, que emiten haces de luz incoherentes con un fase aleatoria que varía con el tiempo. La luz láser sale del dispositivo a través de uno de los espejos del resonador que es parcialmente transparente. En general, la luz que se produce en un dispositivo láser se suele ceñir a una estrecha longitud de onda del espectro dando lugar a un haz muy monocromático, pero también es posible producir haces con una longitud de onda variable.

APLICACIONES EN BIOLOGÍA

La luz natural es una radiación electromagnética en la que cada onda oscila en un plano determinado, que se llama plano de polarización. En el caso del láser, el plano, de polarización es el mismo para todas las ondas emitidas. Todas viajan en direcciones muy próximas y, por lo tanto, el haz diverge muy poco. Al ser tan paralelo puede ser dirigido a pequeños diámetros donde la concentración de energía llega a ser tan grande que los láseres se pueden utilizar para cortar o taladrar materiales. Además, también permite iluminar y examinar detalles muy pequeños. Son estas propiedades las que hacen del láser una herramienta potente en Biología, usándose por un lado de manera directa como unas pinzas y un escalpelo microscópico y, por otro, junto con el uso de fluoróforos (moléculas que emiten fluorescencia al ser irradiadas con luz) se emplea en todas aquellas técnicas que necesitan de la iluminación en determinadas longitudes de onda o de manera muy precisa.

Desde los inicios de la biología celular, el deseo del investigador ha sido poder manipular las células de manera directa para analizar su comportamiento y entender su funcionamiento. Sin embargo, el diminuto tamaño de la mayor parte de las células y su delicadeza hacen muy difícil trabajar a esos niveles y aunque se han desarrollado micromanipuladores de muy diversa índole, siempre existen limitaciones en su empleo. La irrupción del láser ha permitido dar un paso adelante y llegar a unos niveles que hasta entonces no se habían alcanzado.

Básicamente lo que se ha hecho es acoplar la tecnología láser al microscopio, idea que puso en práctica por primera vez Bessis en 1962. De esta forma se conju-

ga la posibilidad de observar a nivel microscópico con la manipulación a nivel celular y subcelular. Es evidente que los límites de la aproximación vienen impuestos por los avances tecnológicos de tal forma que la mejora de la óptica del microscopio y la versatilidad del láser han proporcionado unos resultados más interesantes.

Actualmente en la micromanipulación con láser se realizan dos métodos que dependen de la naturaleza de la fuente de láser: las “trampas ópticas” y la “ablación” con láser. En las trampas ópticas se acopla a un microscopio un laser infrarrojo continuo. En el punto donde incide el láser se generan fuerzas ópticas que atraen organismos microscópicos y los mantienen en el lugar gracias a las fuerzas de presión de la radiación (Figura 1). La utilidad de estas trampas ópticas es que permiten separar virus, bacterias o células eucariotas a partir de un conjunto complejo. Además, su combinación con la interferometría permite el estudio in vitro de la elasticidad de las células sanguíneas, las fuerzas implicadas en el transporte citoplásmico o la replicación del DNA.

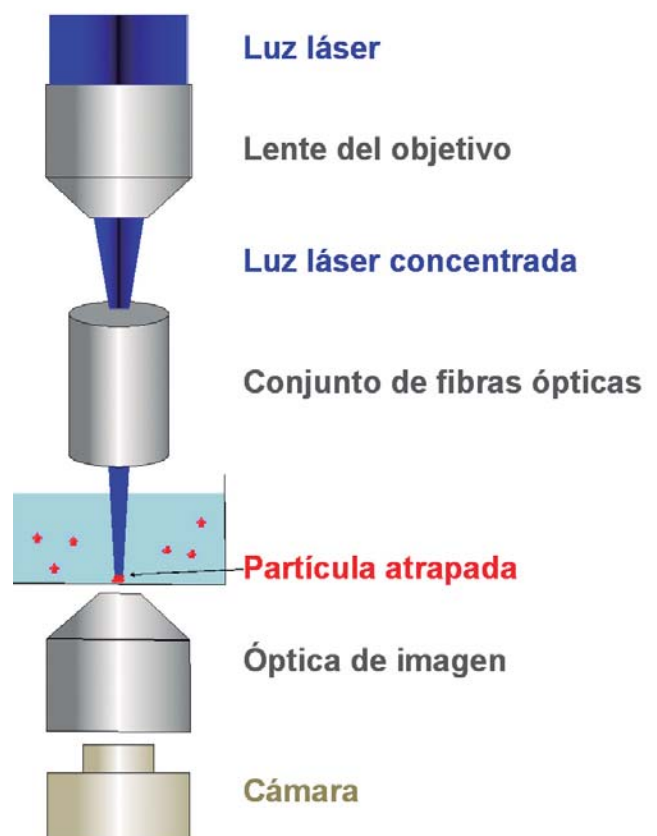


Figura 1. Esquema de pinzas moleculares. El láser se concentra para poder dirigirlo a las partículas o a las células que interesen, de esta forma se pueden manipular y desplazar en la solución.

Por otro lado, la ablación y la microdissección de material con alta resolución espacial se consiguen por medio del acoplamiento de un láser ultravioleta de onda larga pulsado a un microscopio. La fotodescomposición es una reacción química en la que se produce la ruptura de los compuestos químicos por los fotones de la luz y depende de la energía de los fotones que inciden y de los enlaces químicos sobre los que actúan. Dado que la energía del fotón es inversamente proporcional a la longitud de onda, es lógico emplear un láser de luz ultravioleta ya que es una de las longitudes de onda del espectro con mayor energía. De esta manera, a través de la fotodescomposición se produce la eliminación de material en el punto donde incide el láser, por lo que se puede realizar el corte alrededor del material de interés para liberarlo sin dañarlo y poder trabajar con él.

La precisión de estas dos técnicas, seguras en márgenes de nanómetros, permite la micromanipulación de células y la obtención de material a partir de muestras microscópicas. La combinación de ambos métodos abre muchas posibilidades en el estudio de la biología celular o del desarrollo así como en el campo de la biología molecular, ya que es posible la eliminación selectiva de células en un embrión de un animal para estudiar su papel o aislar determinadas células para analizar su perfil de expresión. De esta forma nos podemos acercar prácticamente a la individualización del estudio a niveles insospechados hace años. La potencia del láser en esta aplicación es tal que permite incluso el trabajo con orgánulos celulares en células vivas, como por ejemplo eliminar ciertos orgánulos o microdisseccionar el huso mitótico para mover ciertos cromosomas y alterar su disposición durante la división celular.

Otra aplicación que se ha hecho del láser es en combinación con la citometría de flujo. La citometría de flujo es una técnica para contar y examinar partículas microscópicas, generalmente células o cromosomas. Midiendo la dispersión de luz y la fluorescencia que poseen conforme pasan a través de un rayo de luz se pueden analizar distintos parámetros físicos y químicos de las partículas.

La combinación de la citometría de flujo con moléculas fluorescentes y un láser permite realizar procesos como la separación de un conjunto de células en función de un elemento común. Para ello se utilizan anticuerpos específicos conjugados con una molécula fluorescente que se unen a una molécula propia de la población de interés. La suspensión celular se hace pasar a través del citómetro

en forma de gotas muy pequeñas que se iluminan con un láser. Cuando la gota que pasa contiene una célula con el anticuerpo unido se emite fluorescencia que se detecta por un fotodetector, activando un proceso por el cual se carga la gota con una carga negativa. Posteriormente la gota pasa por un par de placas de metal cargado que permite su retención de tal manera que las gotas sin carga se descartan conservándose las que llevan las células de la población que interesa. De esta manera se puede aislar esa población para posteriormente trabajar con ella. Gracias a que con el láser se puede iluminar con una longitud de onda determinada y conocida, jugando con los distintos fluoróforos que existen y su excitación a distintas longitudes de onda podemos separar poblaciones complejas en subpoblaciones de manera mucho más precisa que si se empleara una fuente de luz normal.

La utilización del láser en combinación con otras tecnologías no se ha quedado aquí, una de las más espectaculares visualmente a nivel biológico es su empleo en la microscopía confocal. La microscopía confocal es una técnica óptica empleada para mejorar la resolución y el contraste de una microfotografía. Esto se consigue gracias a un orificio espacial, un colimador de orificio delimitante, que permite eliminar la luz desenfocada o los destellos de la lente en las muestras que son más gruesas que el plano focal. A partir de las imágenes obtenidas se puede realizar la reconstrucción tridimensional por medio de programas de ordenador.

En un microscopio óptico de fluorescencia convencional se ilumina toda la muestra excitándola completamente al mismo tiempo de tal forma que la fluorescencia resultante llega al fotodetector o la cámara desde todas las partes de la muestra, incluidas las zonas que se encuentran fuera de foco. En un microscopio confocal, sin embargo, la muestra se ilumina de forma localizada y se sitúa el colimador de orificio limitante enfrente del detector, eliminándose así la señal que llega fuera del plano focal. Al detectarse solo la fluorescencia más cercana al plano focal se obtiene una imagen con una mayor resolución óptica que en los microscopios normales, especialmente en cuanto a profundidad de la muestra. Pero no todo son ventajas ya que el colimador impide que mucha de la fluorescencia procedente de la muestra alcance el detector, por lo que el aumento de resolución se obtiene a cambio de una menor intensidad de señal. Para compensar esto se realizan exposiciones más prolongadas.

Al iluminarse solo un punto de la muestra cada vez, la imagen en dos o tres dimensiones precisa de un barrido

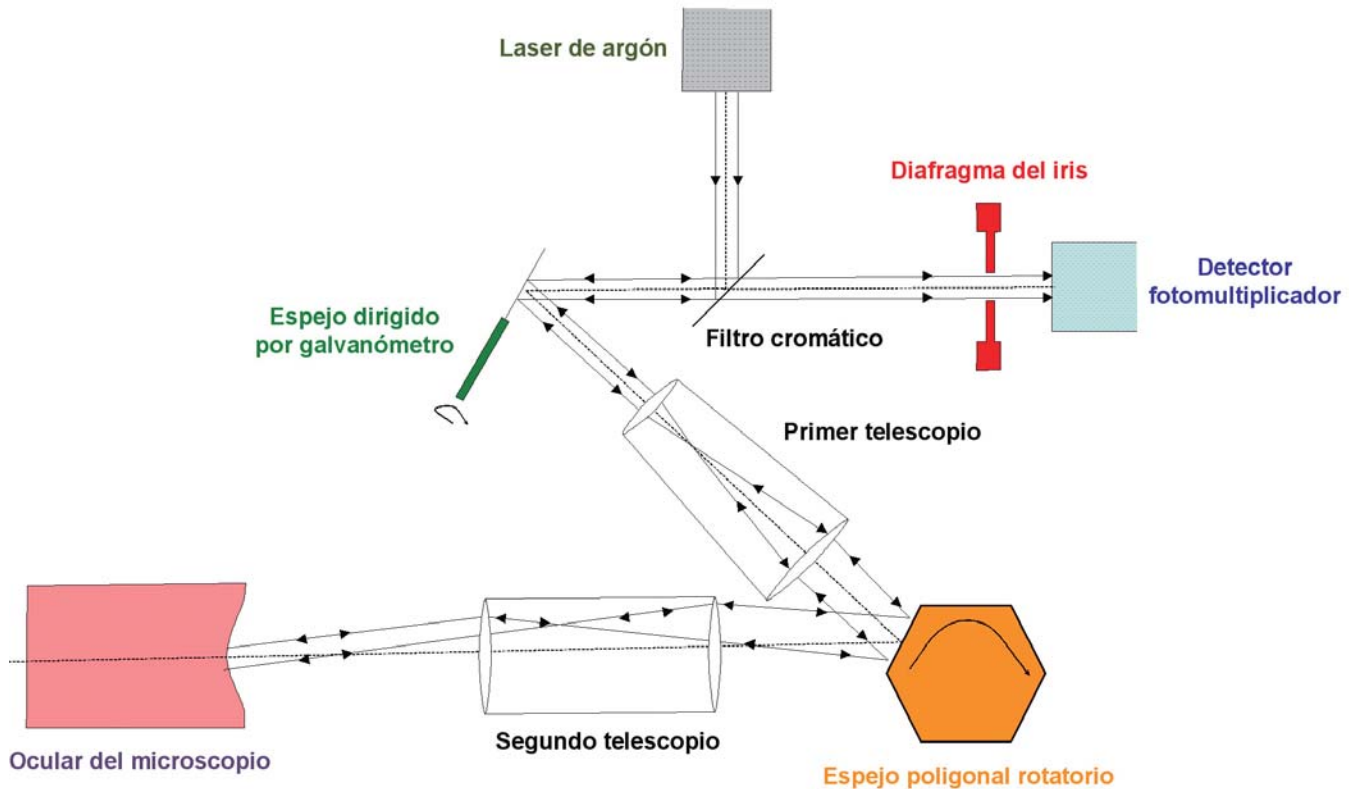


Figura 2. Dibujo esquemático de la estructura de un sistema de iluminación en microscopía confocal de escaneo láser. El láser de argón se emplea para iluminar la muestra tras pasar por unos espejos y lentes que permiten dirigir la luz a las zonas de interés, de esta manera el láser puede excitar la muestra y la luz producida por esta llegar hasta el detector, generalmente una cámara digital.

sobre una trama regular. La microscopía confocal de escaneo láser (laser scanning confocal microscope, LSCM) emplea como fuente de luz un láser (Figura 2). La luz del láser se dirige a través de un espejo dicróico hacia un par de espejos que escanean la luz en las direcciones X e Y. La luz pasa posteriormente por el objetivo del microscopio y excita la muestra. La luz fluorescente producida por la muestra realiza el camino inverso a través del objetivo y los espejos llegando a través del colimador hasta el detector. En cada momento solo se observa un punto de la muestra, por lo que es el ordenador el que reconstruye la imagen. En el caso de las imágenes en tres dimensiones el resultado es producto de la combinación de las imágenes en distintos planos focales.

Actualmente la mayor parte de los microscopios confocales para la LSCM permiten el empleo de muestras vivas y fijadas con un grosor de hasta cien micrómetros. Generalmente presentan entre tres y cinco sistemas de láser controlados por medio de filtros que permiten una regulación precisa de la longitud de onda y la intensidad de la excitación. Los fotomultiplicadores, que tienen una alta eficiencia cuántica en las regiones del espectro ul-

travioleta cercano, visible e infrarrojo próximo, permiten el análisis de fluorescencia entre los 400 y los 750 nanómetros. La inclusión de sistemas de imagen espectral permite además examinar los fluoróforos que tienen espectros superpuestos y la posibilidad de compensar la posible autofluorescencia de la muestra. Todo esto, combinado con la mejora de los fluoróforos, hace de la LSCM una técnica potente para estudiar distintos procesos vivos.

La microscopía confocal tiene actualmente una amplia difusión en los laboratorios de investigación. Permite visualizar la distribución de elementos determinados, como pueden ser orgánulos o moléculas, gracias a distintos colorantes o anticuerpos conjugados con fluoróforos. Esta visualización no solo se realiza sobre tejidos o células fijadas sino que también se puede realizar sobre células vivas, lo que es útil para ver procesos dinámicos que pueden ir desde el análisis del transporte de una molécula en el interior celular a los movimientos de los orgánulos en respuesta a los estímulos que se proporcionan. Quizá la parte más espectacular de la LSCM es la posibilidad de realizar

imágenes en tres dimensiones gracias al empleo de programas informáticos. Los resultados obtenidos alcanzan, en muchos casos, un nivel de fidelidad y de detalle ciertamente espectacular (Figura 3).

A nivel de biología molecular el láser también ha permitido la mejora o el desarrollo de nuevas técnicas. Uno de los mayores avances a nivel de biología molecular fue la posibilidad de secuenciar el DNA, la molécula biológica que contiene la información de un ser vivo, que controla todo su metabolismo y desarrollo. Inicialmente la secuenciación de DNA se ha realizado durante muchos años con métodos que empleaban radiactividad, con todos los peligros que esto supone. Uno de ellos determina la secuencia de bases de un fragmento de DNA por medio de la síntesis de la cadena complementaria utilizando una mezcla de DNA polimerasa, dideoxinucleótidos trifosfato y radioisótopos. El procedimiento se basa en la incorporación al azar de los nucleótidos, teniendo en cuenta que cuando se incorpora un dideoxinucleótido la cadena se para ya que la enzima responsable no puede seguir polimerizando. Se realizan cuatro reacciones en paralelo y en cada una de ellas se incluye la cadena molde a copiar, de la que se desea saber su secuencia, la DNA polimerasa, uno de los cuatro nucleótidos trifosfato marcado radiactivamente y uno de los dideoxinucleótidos. Los productos de síntesis de cada uno de los cuatro tubos se separan en función de su tamaño en una electroforesis en gel, cargando en cada uno de los cuatro carriles paralelos el contenido de cada uno de los cuatro tubos en los que se ha llevado a cabo las reacciones de polimerización. El gel se “lee” de abajo hacia arriba proporcionando la secuencia de la cadena complementaria a la que se usó como molde. El uso de la radiactividad supone la necesidad de disponer material y espacios especiales para poder realizar estos métodos, lo que supone un aumento del coste. Además, los productos de desecho necesitan ser eliminados de manera especial por su carácter radiactivo. Por lo tanto, se hacía necesario desarrollar

una tecnología que permitiera eliminar la radiactividad del proceso, lo que se ha logrado gracias a la combinación del láser con los fluoróforos. El resultado no solo ha sido una técnica más segura, sino que ha permitido la automatización del proceso y, con ello, un aumento de la capacidad de secuenciación, que se ha traducido en el desarrollo de los distintos proyectos genoma cuyo representante más conocido es el Proyecto Genoma Humano.

En la técnica con fluoróforos, el primer paso es la reacción por la que se obtienen los distintos fragmentos marcados, que consiste en una reacción en la que se pone en contacto el DNA a secuenciar con un oligonucleótido que sirve de cebador a la DNA polimerasa, los desoxinucleótidos que sirven para la síntesis de DNA y los nucleótidos marcados que sirven de terminadores de cada cadena (Figura 4). El resultado es una mezcla de múltiples fragmentos de distintos tamaños que terminan en un nucleótido marcado, que será el que se lea.

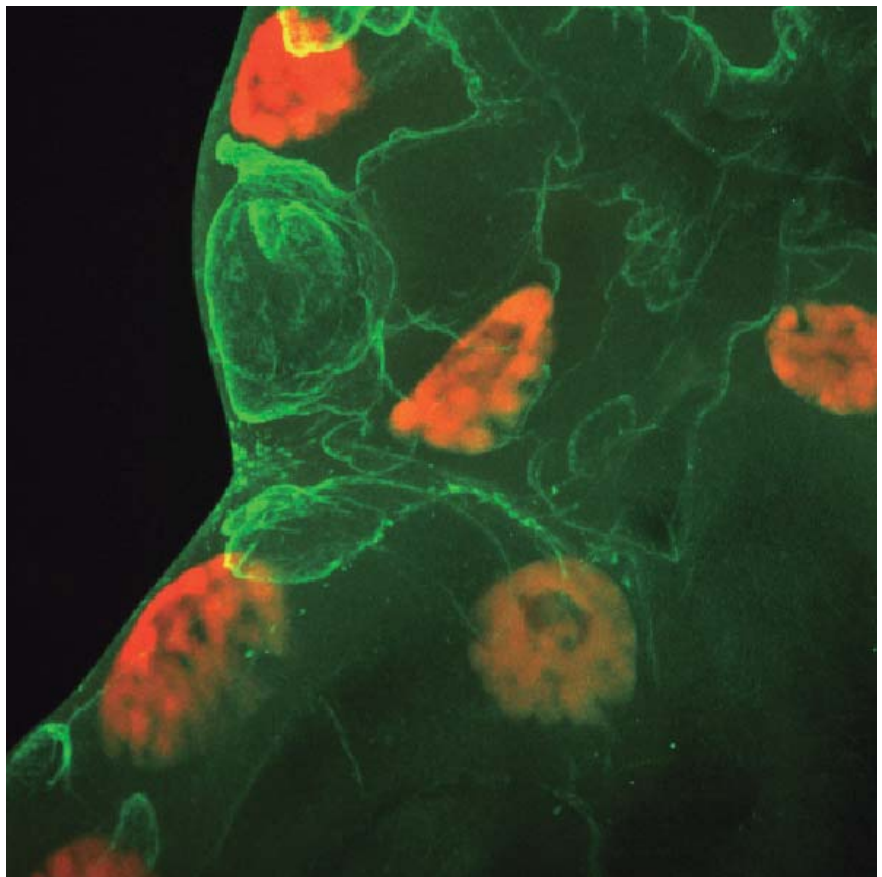


Figura 3. Imagen de microscopia confocal. Detalle de una glándula salivar de larva de *Chironomus riparius*, un mosquito con larva acuática. En naranja puede apreciarse el DNA en la zona nuclear mientras que el resto de la célula y la secreción mucosa aparecen en verde.

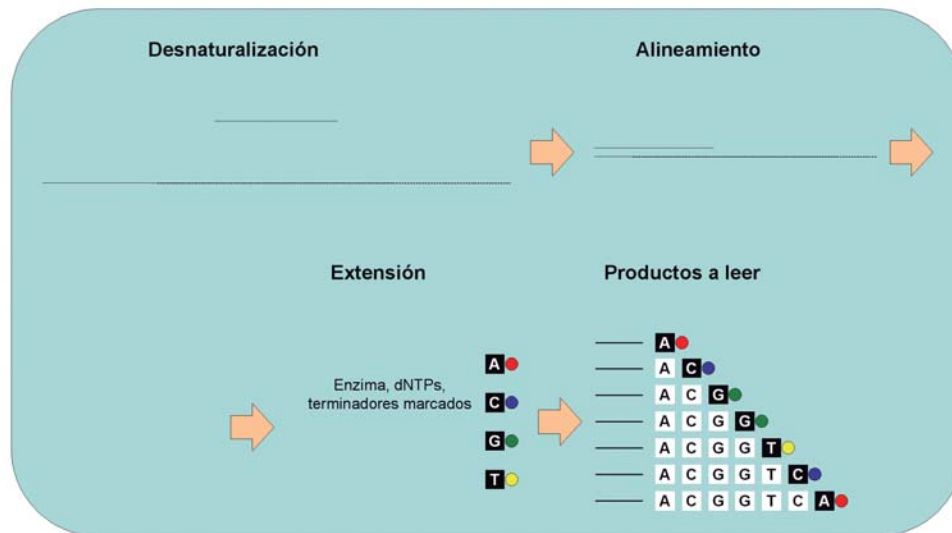


Figura 4. Reacción de marcate de las muestras para la secuenciación automática. Los desoxinucleótidos conjugados con fluoróforos se incorporan a los fragmentos correspondientes. La entrada de un desoxinucleótido marcado detiene la polimerización dando como resultado fragmentos con una base más que el anterior. Cuando pasan por el detector del secuenciador cada uno da una señal diferente según el nucleótido final, indicando así la secuencia.

La secuenciación automática consiste en la automatización de la mayor parte de la técnica que lleva a que se obtenga más secuencia y más fiable. La posibilidad de que cada nucleótido tenga su propio color único al ser marcado con un fluoróforo diferente permite reducir el uso de cuatro reacciones a una sola y, además, desarrollar aparatos capaces de realizar la electroforesis en sistemas capilares a los que se acopla el láser como fuente de iluminación. La mayoría de los secuenciadores actuales se basan en el paso de la mezcla de reacción a través de un capilar en el que se realiza una electroforesis. Este capilar se ilumina en un punto determinado con un láser, el cual excita el fragmento que pase en ese momento. Ese fragmento lleva un dideoxinucleótido marcado que emite fluorescencia y se detecta en un fotorreceptor. Según el color que se detecte se determina el nucleótido. El paso de los distintos fragmentos permite ir leyendo la secuencia que queda almacenada en el ordenador. La mejora de la tecnología no solo ha permitido leer mejor la secuencia sino que también se pueden leer más secuencias al mismo tiempo con lo que actualmente el coste de la secuenciación se ha abaratado, con lo que ello supone.

De esta manera, y junto con la capacidad de los ordenadores para procesar información, se ha podido realizar un avance importante en la tecnología de la secuenciación que, como principal logro, ha proporcionado la posibilidad de secuenciar genomas en poco

tiempo. En el año 2003 se logró el hito más publicitado en este sentido, la obtención del genoma humano que permite su estudio de una manera más eficaz y precisa. Esto no quiere decir que haya sido el único, ya que gracias a los secuenciadores automáticos se ha “democratizado” la posibilidad de secuenciar el genoma de los seres vivos, siendo cada vez mayor el número de organismos en los que se conoce la secuencia del DNA.

Otra aplicación del láser es su empleo en la lectura de microarrays. La expresión génica se produce cuando a partir del DNA se produce el RNA mensajero que, posteriormente, irá a los ribosomas para ser traducido y dar lugar a las proteínas. La célula se ve sometida a cambios metabólicos, bien por efecto de la activación de un proceso interno o por estímulos externos, que llevan a modificaciones en la cantidad y el número de mRNAs que tiene. Para estudiar estos cambios se aprovecha el hecho de que un mRNA puede unirse a la hebra complementaria de DNA que la ha originado. Combinando esto con marcadores fluorescentes es posible cuantificar la cantidad de mRNA que se ha unido a una muestra específica de DNA. Un microarray consiste en colocar y fijar en una superficie de pequeño tamaño, como pueda ser un portaobjetos empleado en microscopía, cientos o miles de fragmentos de DNA que corresponden a distintos genes. Cada fragmento se coloca en forma de pequeño círculo.

El estudio de la muestra de RNA generalmente se hace comparando dos situaciones, una que corresponde a la que se considera normal y otra que es la que se está estudiando. El RNA procedente de cada una de ellas se retrotranscribe para dar un DNA complementario (cDNA) y se marca con un fluoróforo. Posteriormente se añaden al microarray para que hibriden con aquellos fragmentos de DNA fijado que tienen la misma secuencia en el portaobjeto, a los que se unirán. Una vez hecho esto se procede a la lectura del microarray, para lo cual se ilumina cada círculo produciendo la excitación de los fluoróforos. Cada muestra emite una señal propia que se debe a los fluoróforos que, generalmente, son la cianina 3 (Cy3, emite luz verde) y la cianina 5 (Cy5, emite luz roja), dos moléculas que absorben a 550 nm y 549 nm y emiten a 570 nm y 670 nm, respectivamente. De esta manera, la iluminación provoca que ambas emitan luz de forma que si se obtiene un color amarillo ese gen se transcribe en iguales cantidades en ambas muestras mientras que si se obtiene un color rojo significa que la muestra que se haya marcado con Cy5 tiene más copias mientras que si el color es verde, entonces es que la muestra marcada con Cy3 tiene más copias. En caso de que no se observe señal la conclusión es que no hay expresión de ese gen.

A la hora de realizar la iluminación se puede emplear una luz de xenón de amplio espectro o utilizar un sistema de escaneo mediante una iluminación de banda estrecha con láser. La ventaja del escaneo con láser es que emiten más fotones de excitación a la muestra, lo que produce más fotones de emisión y, por tanto, mejor detección por cada píxel en la cámara. Para mejorar el sistema en algunos casos se emplean varios láser de longitud de onda subóptima para la excitación, separando más los espectros de ambos fluoróforos. Una ventaja adicional es que la incidencia de la luz puede ser muy precisa gracias a que el láser puede ceñirse al tamaño deseado.

Gracias a esta técnica es posible realizar el estudio de miles de genes de manera simultánea y aplicarlo a un amplio número de investigaciones, ya que el análisis de los cambios en los patrones de expresión permite desde el desarrollo de perfiles específicos para

determinados procesos biológicos hasta la descripción en detalle de tumores, lo que se traduce en inmensas posibilidades de desarrollar terapias y de conocer los mecanismos moleculares por los que las células responden a distintos fenómenos de su entorno.

El uso del láser en la biología actual se encuentra cada vez más extendido. Se han comentado algunas de las aplicaciones que se hacen hoy en día, las más comunes, pero las inmensas posibilidades que tiene hacen que cada vez se desarrollen nuevas técnicas que se aprovechan de sus propiedades para proporcionarnos un mayor y mejor conocimiento de los seres vivos y de su funcionamiento. Los avances que se realizan, tanto a nivel tecnológico como científico, en el campo del láser auguran que en un futuro próximo se pueda utilizar en nuevas funcionalidades y abrirnos muchas puertas que actualmente se encuentran cerradas.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] *How the Confocal Laser Scanning Microscope entered Biological Research*. W.B. Amos, J.G. White. *Biology of the Cell*, Vol. 95, 335–342 (2003).
- [2] *Laser Scanning Confocal Microscopy*. N.S. Claxton, T.J. Fellers and M.W. Davidson (www.olympusfluoview.com/theory/LSCMIntro.pdf).
- [3] *Laser Microtools in Cell Biology and Molecular Medicine*. S. Thalhammer, G. Lahr, A. Clement-Sengewald, W. M. Heckl, R. Burgemeister and K. Schütze. *Laser Physics*, Vol. 13, 681–691 (2003).
- [4] *Laser Facts*. Nobelprize.org. (2010). (<http://nobelprize.org/educational/physics/laser/facts/index.html>).
- [5] *A History Of The Laser: A Trip Through The Light Fantastic*. M. Rose, *Photonics spectra*, N° 5 (<http://www.photonics.com/Splash.aspx?PID=5>). May (2010).

Rosario Planelló Carro y
José Luís Martínez Guitarte
Grupo de Biología
Dpto. de Física Matemática y de Fluidos