

# El siglo XXI: el siglo de la imagen

José María Valpuesta

Centro Nacional de Biotecnología (CNB-CSIC)

Las técnicas de imagen han sido fundamentales para el desarrollo de la ciencia, pues al cabo una imagen es la plasmación más directa posible de la observación de cualquier fenómeno y la biología no es una excepción. Las primeras técnicas de imagen en biología aparecieron con el desarrollo de lentes que, usando la luz visible, permitieron la amplificación de los objetos para ser observados en detalle. El nacimiento del microscopio óptico a finales del siglo XVI permitió las primeras observaciones de muestras biológicas invisibles al ojo humano. El paso del tiempo fue mejorando su calidad hasta que en el siglo XIX, fundamentalmente en Alemania y de la mano de científicos como Ernst Abbe y Carl Zeiss, los microscopios alcanzaron lo que parecía ser su límite teórico. Estos avances, junto con desarrollos en tinturas que permitieron el marcaje de orgánulos específicos, ayudaron a describir la estructura general de la célula y los cambios morfológicos que sufre durante el ciclo celular.

Para adentrarse en mayores detalles, la biología requería de nuevos desarrollos que vinieron con la revolución física que tuvo lugar durante las primeras décadas del siglo XX. El descubrimiento de la dualidad onda/partícula de los electrones por Louis de Broglie sentó las bases para “adaptar” el uso de haces de electrones como fuente de iluminación en microscopios. Así, a principios de la década de los treinta los alemanes Max Knoll y Ernst Ruska (Premio Nobel de Física en 1986), utilizaron lentes electromagnéticas capaces de conducir y enfocar electrones para construir los primeros microscopios electrónicos. La gran ventaja de los electrones usados como fuentes de iluminación es que, energizados gracias a un alto voltaje, poseen longitudes de onda muy pequeñas lo que permite en teoría obtener resoluciones subatómicas. El estudio de la estructura atómica de los compuestos, bien fueran inorgánicos o biológicos, parecía pues al alcance de esta técnica, como para entonces ya estaba firmemente establecido con la difracción de rayos X. Para el caso de los compuestos inorgánicos, la posibilidad de resolver distancias atómicas se convirtió en realidad en pocos años, en cuanto se desarrollaron mejores microscopios electrónicos. Sin embargo no fue así para las muestras biológicas en las que otros factores, como la sensibilidad de los compuestos orgánicos a la radiación electrónica o la inestabilidad de las muestras en las condiciones de vacío del microscopio, impidieron alcanzar resolución atómica en un principio.

Ya durante la segunda mitad del siglo XX se desarrollaron técnicas que sirvieran para fijar químicamente y a la vez

mantener la estructura de la muestra biológica de la manera más fidedigna posible, bien sea en células completas, orgánulos celulares o en moléculas biológicas aisladas como proteínas o ácidos nucleicos. A esta época corresponde la caracterización en más detalle de la estructura tisular y celular y las primeras determinaciones de la estructura de complejos proteicos a baja resolución, esto último a la par que los avances en la teoría de la formación de imagen y los métodos de reconstrucción tridimensional, propiciados en Inglaterra por Aaron Klug (Premio Nobel de Química en 1982). Quedaba clara, sin embargo, la limitación de estos métodos para alcanzar alta resolución, pues las muestras biológicas a estudiar estaban deshidratadas y por consiguiente no mantenían íntegra su estructura nativa. El golpe de ingenio surgió del grupo de Jacques Dubochet (Premio Nobel de Química en 2017), con el desarrollo en la década de los 80 de la técnica de vitrificación, que no es sino la congelación de la muestra a tan alta velocidad que el agua no cristaliza sino que forma un cuerpo vítreo que protege a aquella del vacío de la columna del microscopio y (en parte) de la radiación electrónica. La muestra debe a partir de entonces mantenerse y observarse a esa baja temperatura (entre  $-170$  y  $-180$  °C), y con esta y otras técnicas análogas nació la criomicroscopía electrónica, que dio lugar de la mano de científicos como Richard Henderson (Premio Nobel de Química 2017) la primera determinación estructural a nivel casi atómico de una proteína cristalina: la bacteriorrodopsina (1990), o los desarrollos en los procedimientos de reconstrucción tridimensional utilizando moléculas individuales liderados por Joachim Frank (Premio Nobel de Química 2017), que permitieron las primeras reconstrucciones a resoluciones cercanas a la atómica de grandes estructuras como virus icosaédricos o ribosomas. El campo requería sin embargo mejoras tecnológicas para poder hacer de la criomicroscopía electrónica una técnica estándar como lo son la difracción de rayos X o la resonancia magnética nuclear (RMN). Estas mejoras se han producido a lo largo de esta última década y han dado lugar a una auténtica revolución en el campo de la biología estructural, que se ha dado en llamar “la revolución de la resolución”. Estos desarrollos y una descripción del verdadero potencial de la técnica están tratados en el artículo de **Jaime Martín-Benito** y **Rocío Arranz** (“Determinación estructural mediante criomicroscopía electrónica de partículas individuales y procesamiento de imágenes”).

Los avances en la preparación de las muestras y en la adquisición y procesamiento de datos no sólo han permitido

la determinación estructural de moléculas biológicas (la biología estructural molecular) sino también el estudio de estructuras y subestructuras celulares (la biología estructural celular). Modificaciones de las técnicas antes descritas permiten en la actualidad la determinación estructural de regiones celulares a resolución incluso subnanométricas, utilizando la técnica de tomografía electrónica. Esta técnica, descrita en un artículo de **José Jesús Fernández** (*“Criotomografía electrónica”*), abre un campo enorme en lo que se ha denominado la “sociología celular”, el estudio de las relaciones entre los distintos componentes celulares en su entorno nativo, una relación muy alejada del azar.

La mayor limitación de la tomografía electrónica radica en el espesor de la muestra que es capaz de reconstruir, entre 0,5 y 1  $\mu\text{m}$ , muy alejado de las dimensiones de la mayor parte de las células. Esta carencia puede ser paliada por una nueva técnica microscópica, surgida a finales del siglo pasado pero desarrollada fundamentalmente en éste, que permite la reconstrucción tridimensional de células (hasta 15  $\mu\text{m}$ ) a resoluciones espaciales de 30-50 nm, es decir a nivel de orgánulos celulares. Es la microscopía de transmisión de rayos X blandos, que utiliza fundamentalmente radiación sincrotrón para obtener la estructura tridimensional de células completas criopreservadas. España es uno de los líderes en este campo de la microscopía y una descripción básica de esta técnica está incluida en el artículo de **José Javier Conesa y Francisco Javier Chichón** (*“Criomicroscopía correlativa tridimensional de tomografía de rayos X blandos”*). Este artículo también describe a grandes rasgos otro de los grandes campos que se abre a las técnicas de microscopía, su uso coordinado. El sueño de muchos científicos del pasado siglo de detectar un cierto evento biológico en una célula (marcado por ejemplo por una sonda fluorescente) mediante microscopía óptica y seguirlo a mucha mayor resolución en un microscopio de rayos X o electrónico, es ahora una realidad gracias al uso de técnicas correlativas que pueden ser usadas a bajas temperaturas (criomicroscopía correlativa), lo que permite una mejor conservación de las estructuras celulares que se estudian.

Finalmente hay que señalar que los grandes avances no solo se han limitado a la microscopía electrónica. A finales de los años 50 la microscopía óptica recibió un fuerte empujón

con el desarrollo teórico por parte de Marvin Minsky de la microscopía confocal, que permite obtener información de alta definición de estructuras de gran grosor (células enteras, por ejemplo) mediante el registro puntual de esa información a distintos planos, utilizando para ello un colimador que recoge sólo la del plano focal. De este concepto general se desarrollaron en los años 80 varios tipos de microscopios confocales que permitieron el estudio de estructuras vivas de gran espesor. Sin embargo, la verdadera revolución en la microscopía óptica ocurrió en 1993, cuando Eric Betzig pudo detectar molecular individuales fluorescentes a temperatura ambiente. Este gran logro sirvió de base para otras técnicas que se desarrollaron a finales del siglo XX y que permitieron traspasar el límite de resolución espacial de la microscopía óptica que está asociado al de la difracción de la luz ( $\sim 300$  nm). Estas técnicas, cuyo desarrollo se ha personificado en los recientes Premios Nobel de Química 2014 Eric Betzig, William E. Moerner y Stefan Hell, han “explorado” en nuestro siglo para alcanzar en algunos casos resoluciones nanométricas, y serán descritas en un artículo escrito por **María Sanz-Paz y María F. García-Parajo** (*“Nuevas técnicas de superresolución óptica permiten la visualización de interacciones biomoleculares a escala nanométrica”*).

Todas las técnicas descritas hasta ahora han tenido, pero sobre todo van a tener en los próximos años, un enorme impacto en la ciencia básica, pero hay otras técnicas de imagen que pueden hacer lo propio en la investigación biomédica, incluso a nivel clínico. Una de las más poderosas es sin duda la imagen molecular por resonancia magnética. En esta técnica no se utilizan fotones ni electrones para generar imágenes de las muestras, sino la interacción de los momentos magnéticos que poseen los núcleos de ciertos átomos (a efectos prácticos,  $^1\text{H}$  y  $^{31}\text{P}$ ) con campos magnéticos externos.

La Resonancia Magnética Nuclear (RMN), desarrollada a lo largo de la segunda mitad del pasado siglo, y que ha permitido entre otras cosas la resolución de estructuras biológicas incluso a nivel atómico, puede ser también utilizada para la visualización de grandes estructuras (p.ej. órganos) y ha evolucionado en este campo de tal manera que se ha convertido a lo largo de este siglo, tal como se describe en el artículo de **María Luisa García-Martín** (*“Imagen Molecular por Resonancia Magnética”*), en la técnica líder del diagnóstico por imagen.