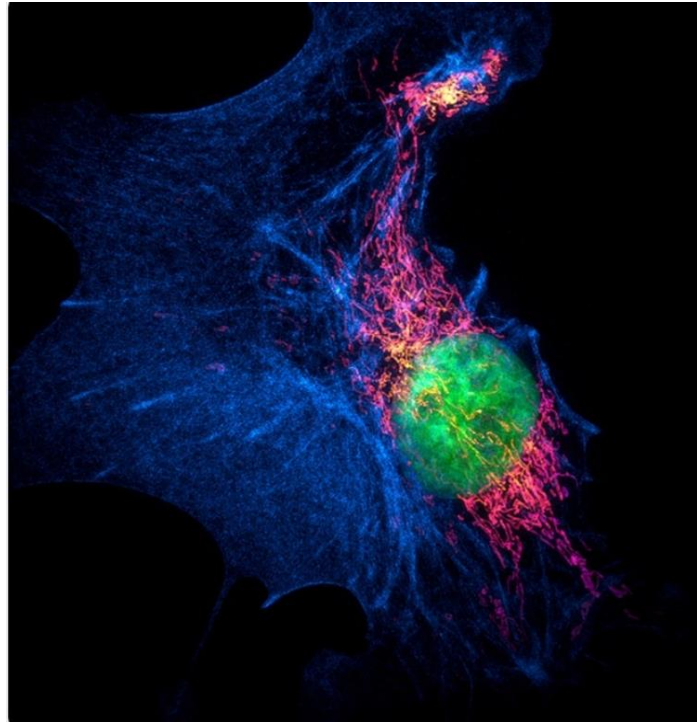




## TRABAJO FIN DE GRADO

### APLICACIONES DE LA MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA DE SÚPER-RESOLUCIÓN



Facultad de Farmacia. Universidad de Sevilla.  
Departamento de Química Física.

Alumno: Ortega Elías, Lucía  
Tutor: Oviedo López, Jaime



# APLICACIONES DE LA MICROSCOPÍA DE FLUORESCENCIA DE SÚPER-RESOLUCIÓN

Trabajo Fin de Grado de carácter bibliográfico.  
Realizado por Lucía Ortega Elías. Grado en Farmacia

Tutor: Jaime Oviedo López  
Departamento de Química Física

Facultad de Farmacia. Universidad de Sevilla.



Sevilla, junio de 2020.

## **RESUMEN**

La microscopía electrónica de súper-resolución nos permite visualizar el interior celular de una forma individual con una resolución que supera hasta 10 veces más la que hasta entonces se había alcanzado con los microscopios convencionales. Existen varias técnicas en las que se van a utilizar unos marcadores llamados fluoróforos. Estos se unen a las moléculas que se quieren observar y al incidir sobre ellas láseres o haces de luz, emitirán una fluorescencia que será analizada, para finalmente dar como resultado unas imágenes con una elevada resolución y un sorprendente resultado con respecto a técnicas anteriores. En la enfermedad del Alzheimer se han podido observar los ovillos neurofibrilares y las placas amiloides con las correspondientes proteínas que intervienen en el proceso de formación. Otro de los estudios en los que se ha aplicado la microscopía de súper-resolución es en la afectación de los carbohidratos en las células cancerígenas. Por último, se ha incluido un estudio de la enfermedad producida por *Plasmodium sp.*, la malaria. Se podrán observar unas imágenes impactantes del parásito en el interior celular y el daño que realiza a la célula.

## **PALABRAS CLAVE**

Súper-resolución; técnicas; fluorescencia; alzhéimer; malaria; cáncer.

## **ABSTRACT**

Super-resolution electron microscopy allows us to visualize the cellular interior individually with a resolution that exceeds up to 10 times more than that previously reached with conventional microscopes. There are several techniques in which markers called fluorophores will be used. These join the molecules that you want to observe and when you influence them lasers or beams of light, they will emit a fluorescence that will be analyzed, to finally result in images with a high resolution and a surprising result with respect to previous techniques. In Alzheimer's disease, neurofibrillary balls and amyloid plaques have been observed with the corresponding proteins involved in the formation process. Another study in which super-resolution microscopy has been applied is in the involvement of carbohydrates in cancer cells. Finally, a study of the disease caused by Plasmodium sp., malaria, has been included. Shocking images of the parasite can be seen inside the cell and the damage it does to the cell.

## **KEY WORDS**

Super-resolution; techniques; Alzheimer's fluorescence; malaria; cancer.

## Índice

<b>1. Introducción .....</b>	<b>4</b>
<b>2. Objetivos de la revisión .....</b>	<b>7</b>
<b>3. Metodología .....</b>	<b>8</b>
<b>4. Técnicas microscópicas de súper-resolución.....</b>	<b>9</b>
Microscopía del agotamiento de la emisión estimulada (STED).....	9
Microscopía de localización de una sola molécula (SMLM) .....	11
Microscopía de iluminación estructurada (SIM) .....	13
<b>5. Aplicaciones del microscopio de fluorescencia de súper-resolución...17</b>	
Estudios en la enfermedad del Alzheimer .....	18
Investigación del cáncer .....	24
Visualización del parásito de la malaria.....	28
<b>6. Conclusiones .....</b>	<b>32</b>
<b>7. Bibliografía .....</b>	<b>33</b>

## 1. Introducción

El interés por amplificar imágenes se remonta a años antes de Cristo. En el siglo I, griegos y romanos, usaban bolas de cristal llenas de agua para poder observar las heridas y los tejidos.

Tras un gran interés científico por el mundo paralelo que se escondía más allá de nuestros ojos, en 1632, Anton Van Leuwenhoek pudo fabricar su propio microscopio tallando unas lentes. Éste se trataba de un microscopio óptico simple, con el que pudo llegar a observar las primeras bacterias.

Esto, hizo posible que, en 1665 Robert Hooke, pudiera fabricar un microscopio compuesto, y por primera vez observar la célula. Poco a poco se han ido mejorando las técnicas ayudando al avance científico.

A partir de ahí, fueron apareciendo distintos tipos de microscopía, utilizando diferentes técnicas y pudiendo observar diferentes organismos con más claridad. Se comenzó a utilizar la microscopía con luz polarizada, esto permitía observar diferentes partes de la célula y algunos microorganismos causantes de infecciones.

Más tarde, apareció el microscopio electrónico de transmisión, en el que no utilizaba la luz, sino haces de electrones; Estos electrones viajan en forma onda mucho más pequeña que la luz visible utilizada en los microscopios ópticos, por lo tanto, se consigue una resolución mucho más pequeña. Este aumento de resolución tiene un gran inconveniente y es que las muestras hay que recubrirlas para poder observarlas y se estropearán. Poco a poco se fueron consiguiendo más aumentos en las imágenes obtenidas.

El científico Ernst Abbe decía que, si la separación entre dos cuerpos es mayor o igual a la mitad de la longitud de onda de la luz que provoca su excitación, los cuerpos se pueden descifrar (Heintzmann R., et al. 2006). Abbe manifestó que la resolución mínima que se podía alcanzar era de 200 nm aproximadamente.

A finales del siglo XIX, Lord Rayleigh definió la resolución máxima de un sistema óptico como la distancia mínima entre dos objetos puntuales que se pueden separar como fuentes individuales (Turkowsky B., et al. 2016). Concepto importante de saber y entender para esta revisión bibliográfica. En la figura 1 se representa el criterio en una imagen para clarificar más el concepto.

$$\sin \theta = 1.22 \frac{\lambda}{D}$$

Esta fórmula es aplicable tanto a la microscopía electrónica como a la microscopía óptica. Dado que en la microscopía electrónica la longitud de onda es menor que en la óptica, se consiguen resoluciones más bajas.

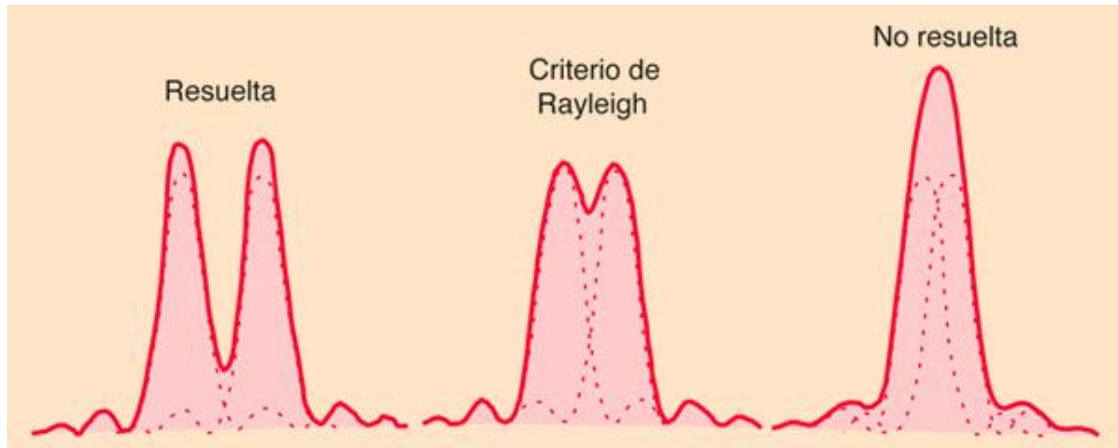


Figura 1: Criterio de Rayleigh.

La longitud de onda de la luz visible siempre ha limitado la microscopía. Al introducir la microscopía electrónica y tener la longitud de onda más pequeña, se mejora la resolución, aunque a costa de introducir algunos problemas técnicos. Además, al aplicar la luz fluorescente descubrieron que las moléculas se podían marcar y así encenderlas y apagarlas e ir construyendo poco a poco la imagen entera.

Tras varios descubrimientos, no es hasta 2014 cuando los científicos Stefan W. Hell, Eric Betzig, y William E. Moerner ganan el premio Nobel de Química con la técnica de súper resolución, con la que conseguían llegar a una resolución mínima de casi 10 nm con la posibilidad de reconstruir células en tres dimensiones. Los métodos de microscopía de súper resolución, como la microscopía de localización de una sola molécula (SMLM), la microscopía STED y la microscopía de iluminación estructurada (SIM), proporcionan un acceso sin precedentes al funcionamiento interno de las células y diversos procesos biológicos. (Wang, H. et al., 2019)

Cada uno de los científicos implicados en el Premio Nobel de 2014, se basaron en una investigación diferente. Stefan Hell descubrió, en 1994, la técnica de agotamiento de emisión estimulada (STED) y en 2006, William Moerner y Eric Betzig et al. asentaron sus investigaciones en la localización de moléculas individuales.

Otro concepto importante que se debe tener claro para entender mejor esta revisión bibliográfica es el proceso de fluorescencia.

Las moléculas están formadas por varios átomos y alrededor de sus núcleos se disponen los electrones que se mueven en orbitales moleculares a diferentes distancias con respecto al núcleo y en diferentes estados de energía, ya que a cada orbital le corresponde una energía diferente.

En la figura 2 podemos ver un diagrama en el que se ven representados los diferentes estados de energía de la molécula. El primero, llamado estado fundamental es el  $S_0$ . El  $S_1$  es el estado en el que se encontrarán cuando estén excitados esos electrones. Existen más niveles de excitación, pero me he querido centrar en esos para hacer una explicación más clara.

Cuando la luz incide sobre la molécula, esta absorbe un fotón, y los electrones pasarán a un estado excitado, por ejemplo,  $S_1$ . Estos electrones tendrán la necesidad de volver a su estado inicial. Cuando eso ocurre, la energía que han absorbido en forma de fotón se emite con una longitud de onda mayor, en forma de fluorescencia.

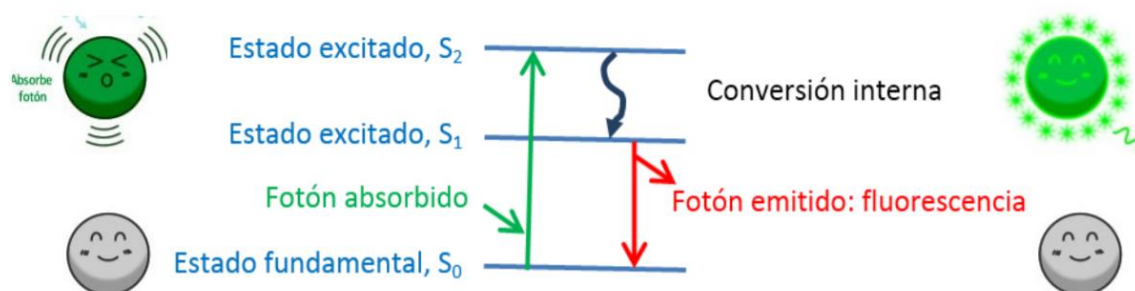
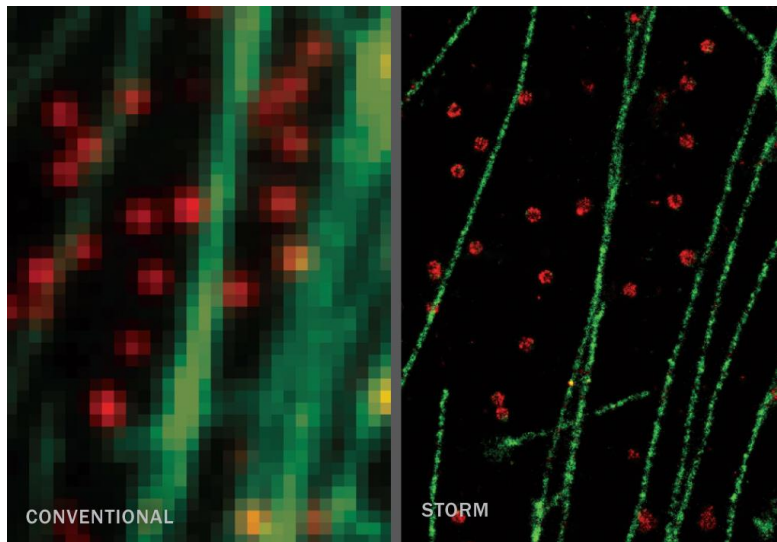


Figura 2: Proceso de fluorescencia.

El proceso de fluorescencia implica un nuevo término que es el “fluoróforo”. Estos son moléculas capaces de emitir fluorescencia. Se unen a las moléculas que queremos observar al microscopio, provocando su excitación y haciendo que al pasar a su estado fundamental emitan la fluorescencia que buscamos. Hay infinidad de fluoróforos y su elección es clave para obtener una imagen de calidad según la técnica que queramos usar.

Cuando empecé con las primeras búsquedas sobre el tema, pude tener claro desde el principio, que la mejor manera de explicar los resultados de este tipo de microscopía era con imágenes.





*Figura 3: Estructura nucleosómica del ADN junto con diversas proteínas sobre las que se enrolla.*

Gracias a esta microscopía se consiguen ver las proteínas, su interacción con la membrana celular, los movimientos en el interior y estructuras celulares de una manera mucho más clara de lo que hasta entonces se había conseguido.

## **2. Objetivos de la revisión**

En esta revisión bibliográfica hay dos objetivos:

1. El primero es poder dar una explicación sobre las diferentes técnicas de microscopía de fluorescencia de súper-resolución, ya que quizás es la parte más complicada de entender sin los conocimientos básicos de la física o la química.
2. Un segundo y principal objetivo para este trabajo es realizar una explicación de aplicaciones para las que se ha usado este tipo de microscopía y que he podido considerar más interesantes, novedosas o actuales.

### **3. Metodología**

Para el desarrollo de esta revisión bibliográfica he realizado una recopilación, evaluación, selección y ordenación de los diferentes artículos científicos necesarios para obtener un buen resultado cumpliendo con los objetivos expuestos en el apartado anterior.

La microscopia de súper resolución actualmente es una técnica muy novedosa para la que se sigue investigando hoy en día, ya que puede darnos unos increíbles resultados.

En primer lugar, he hecho un estudio de cómo ha ido evolucionando la microscopía a lo largo de la historia hasta llegar a nuestros días.

Posteriormente, me he centrado en el microscopio de fluorescencia de súper-resolución. Tras la lectura de muchos artículos, debido a mi dificultad para entender el mundo de la física, he podido asimilar y desarrollar una explicación de las técnicas más importantes que tiene, ya que existen diversidad de adaptaciones.

Para poder seleccionar las tres aplicaciones que he incluido en este trabajo, he realizado una búsqueda muy amplia de las diferentes aplicaciones que tiene este microscopio. Una vez obtenida una visión general he podido seleccionar las tres que he considerado más interesantes.

En cuanto a las bases de datos que han sido necesarias para recopilar esta información y buscar material, cabe destacar: Scopus, Fama.us.es. La búsqueda la he realizado introduciendo las palabras claves en la búsqueda. Con los resultados he ido leyendo y seleccionando los artículos tras la lectura del abstract de cada uno de ellos. Una vez seleccionados los he ido traduciendo y obteniendo una visión general tras una primera lectura, con la segunda pude ir componiendo la revisión bibliográfica.

Como palabras claves se emplearon los siguientes términos principalmente: microscopy, super-resolution, fluorescence, STED, STORM, alzheimer, cancer, malaria; todos ellos fueron combinados para realizar una búsqueda más específica.

En la búsqueda se establecieron varios filtros para reducir la lista de artículos. Me centré principalmente en publicaciones desde 2009 hasta el año actual, para ver el inicio desde antes que los autores de esta microscopía recibieran el Premio Nobel.

De estos mismos artículos he obtenido las imágenes, esenciales en este tema, ya que son realmente las que describen los sorprendentes resultados de esta técnica.

Toda la bibliografía que aparece en este trabajo ha sido redactada siguiendo estrictamente las normas de Vancouver.

Por último, he añadido una tabla de elaboración propia para obtener una visión general de las diferentes técnicas cuyo contenido fue recogido de los diferentes artículos.

#### **4. Técnicas microscópicas de súper-resolución**

En esta revisión bibliográfica, he querido dar más importancia a las aplicaciones que a las diferentes técnicas que existen en este tipo de microscopía. Sin embargo, para entender mejor los avances que se han producido gracias a esta microscopía es bueno entender mínimamente las técnicas que se han usado para cada aplicación.

Como hemos visto en la introducción, las moléculas pueden absorber luz y emitirla en forma de fluorescencia. Así, las propiedades de algunas moléculas individuales de “encender” y “apagar” pueden ser utilizadas para obtener súper resolución y, por lo tanto, superar el límite de difracción óptico. (Hu et al.,2014). Estos fluoróforos han sido las claves para este tipo de microscopía, ya que con la modulación de su fluorescencia se pueden detectar de forma independiente y después elaborar una imagen. Para llevar a cabo la elección de una molécula fluorescente u otra se tiene en cuenta la estabilidad, el brillo y las dimensiones de la imagen. (Schermelele et al., 2010).

Una vez elegido el marcador correcto, se decide que técnicas se pueden utilizar. Las técnicas de imagen que permiten la visualización de estructuras por debajo del límite de difracción son esenciales para el campo de las ciencias de la vida, sin embargo, cada uno de estos enfoques tiene ventajas y limitaciones inherentes. (Masters, B.R.,2020).

La microscopía de iluminación estructurada (SIM) y la de emisión estimulada (STED), se basan en patrones de luz de excitación, en cambio la microscopía SMLM utiliza la localización de moléculas individuales compuesta por las técnicas STORM y PALM.

##### **4.1 Microscopia del agotamiento de la emisión estimulada (STED)**

Stefan Hell fue reconocido por su importante contribución en esta modalidad microscópica en el año 1994.

Esta técnica se basa en la aplicación de dos rayos láser, uno de excitación y otro de agotamiento (STED). En primer lugar, el láser de excitación es el que hace que la molécula pase de su estado fundamental a su estado excitado y emita fluorescencia. Por otro lado, el láser de agotamiento (STED), que presenta una forma anular (forma anillo) con una intensidad nula en el centro, desactiva las moléculas de la parte externa, dejando activas solo las del centro.

En la figura 4, se observa de una forma muy clara el principio de esta técnica. En amarillo se representa el láser de excitación. Con una longitud de onda más alta y de color rojo vemos el láser STED. Esto permite que se puedan observar imágenes con una resolución mucho más alta, ya que el láser STED al apagar las moléculas fluorescentes de la parte externa, reduce el tamaño del punto de excitación alcanzando los 10 nm.

De esta forma se va escaneando la imagen punto por punto y por último, de forma computacional se reconstruye la imagen punto por punto.

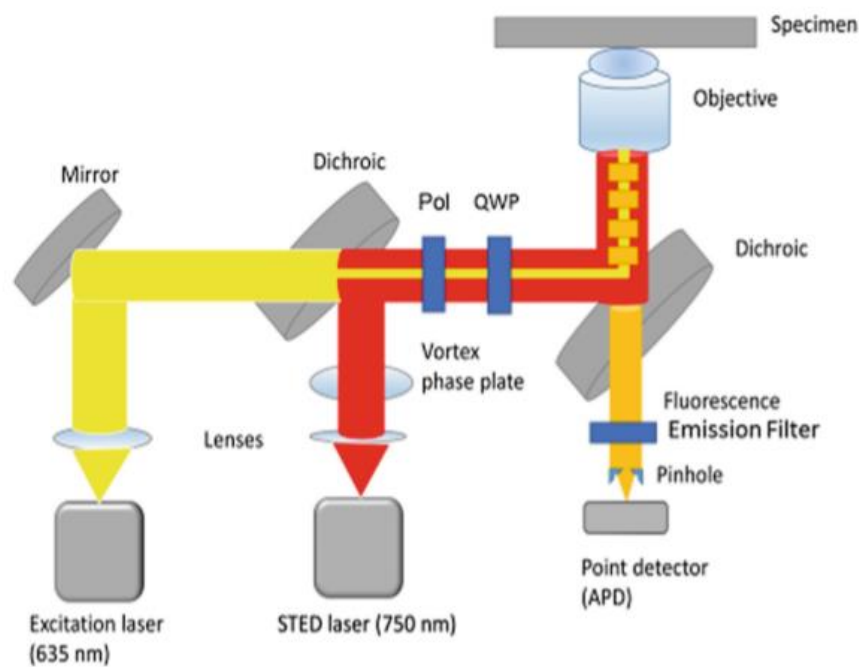
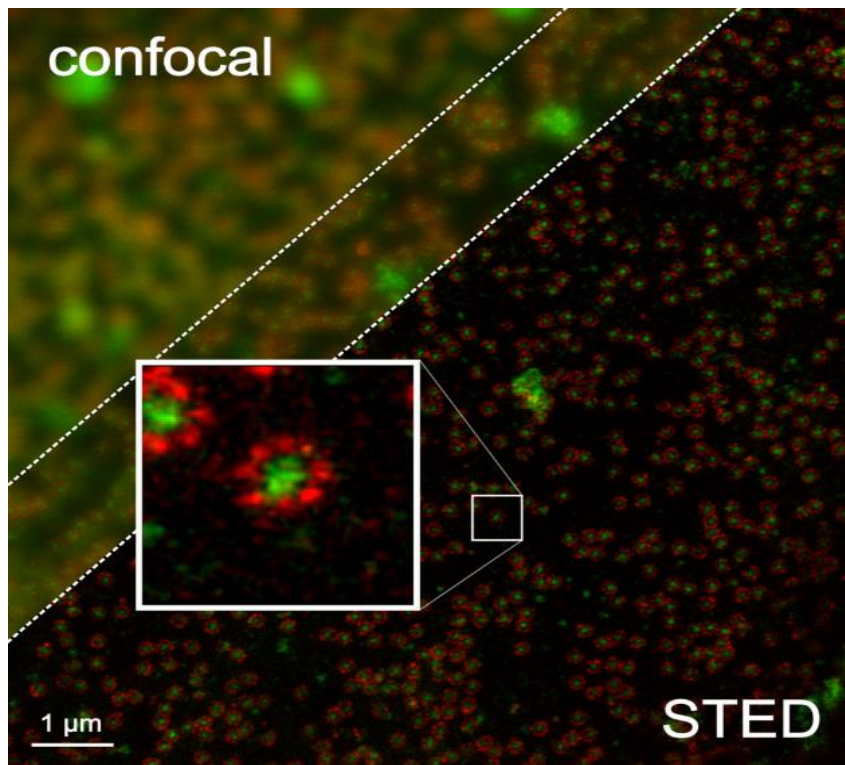


Figura 4: Principio de la microscopía de STED.

Finalmente, en la figura 5, en la que se muestran los resultados de esta técnica.



*Figura 5: Superficie de un núcleo celular visto con un microscopio confocal y con uno STED. En rojo podemos ver unas proteínas que rodean los poros y en verde las proteínas que se encuentran en el centro del poro.*

Los inconvenientes de esta técnica son la alineación de los haces de excitación y STED, la complejidad de su uso y el alto costo. La alineación es bastante crítica, se altera con gran facilidad con la temperatura o con las vibraciones, y evitaría obtener una imagen de calidad. Otro de los inconvenientes que presenta es el fotoblanqueo (destrucción del fluoróforo), ya que al realizar este paso hace que sea más difícil hacer mediciones repetidas a las muestras. Con STED se han podido visualizar el interior de las neuronas, un avance perfecto para el estudio de enfermedades neurodegenerativas.

#### 4.2 Microscopía de localización de una sola molécula (SMLM)

Esta técnica, al igual que la anterior, se realiza controlando el encendido y el apagado de los fluoróforos. Sin embargo, mientras que STORM utiliza un enfoque aleatorio para la asignación de fluoróforos a estados fluorescentes y no fluorescentes, STED utiliza un enfoque dirigido en

el que los fluoróforos se asignan directamente a sus estados apropiados en áreas específicas de la muestra. (Tam, J., 2015).

En este tipo de microscopía podemos encontrar varios tipos de técnicas que también han conseguido superar el límite de difracción. Estas son PALM (microscopía de localización fotoactivada) y STORM (microscopía de reconstrucción óptica estocástica) entre otras variantes.

Estas técnicas son diferentes entre ellas, pero con algo en común. Todas usan fluoróforos que se van activando y desactivando de manera aleatoria, por lo tanto, se irán captando las moléculas aisladas gracias a las técnicas de alta resolución. Este proceso se va repitiendo hasta obtener los suficientes datos.

Para llevar a cabo estas técnicas, se marcan con fluoróforos las moléculas que se vayan a observar. Esos fluoróforos están inactivos y se activarán incidiendo sobre ellos un haz de luz de baja intensidad (ultravioleta), evitando que se activen todos, ya que queremos una activación aleatoria. Una vez activados, se aplica un haz de mayor intensidad sobre los fluoróforos excitándolos. Al estar excitados, emiten energía y esta será recogida para poder localizarlos y hacer el estudio.

Hasta aquí todos los pasos son comunes para ambas técnicas, el siguiente y último paso variará según realicemos STORM o PALM.

Para la técnica PALM, se realiza es el fotoblanqueo (photobleaching), aquí los fluoróforos serán destruidos, y así se evita que puedan influir en la continuación del proceso. Con ello podemos cerrar el primer ciclo. Este volverá a empezar desde el principio y así sucesivamente. Finalmente se superponen todas las imágenes obtenidas para obtener la imagen final.

Sin embargo, en la modalidad de STORM, este último paso del fotoblanqueo no se lleva a cabo. Los fluoróforos no se destruyen ya que se pueden activar y desactivar cuando se crea oportuno. Otra diferencia es que, al principio, la activación de la molécula se hace proporcionando luz de manera irreversible (Photoswitching) mientras que en PALM se hacía proporcionando luz de manera reversible (fotoactivación) (Vangindertael et al., 2018)

STORM tiene una ventaja con respecto a PALM y es el tiempo de adquisición de la imagen, en STORM es mucho menor por lo que se obtienen resultados de una forma más rápida. Sin embargo, aunque en PALM la adquisición sea más lenta, esta permite localizar muchos fluoróforos al mismo tiempo. Otra ventaja de STORM con respecto a PALM es el proceso de fotoblanqueo, que no lo realiza y por lo tanto no se destruyen las muestras.

Con esta técnica, se puede conseguir ver como oligomeriza la hemaglutinina en la membrana de las células (Leung y Choy, 2011). Además, también he añadido más adelante, en la aplicación del cáncer unas imágenes en las que se puede ver claramente los carbohidratos en las membranas celulares. En la figura 6 vemos la imagen que se obtiene al aplicar la técnica sobre una célula de riñón.

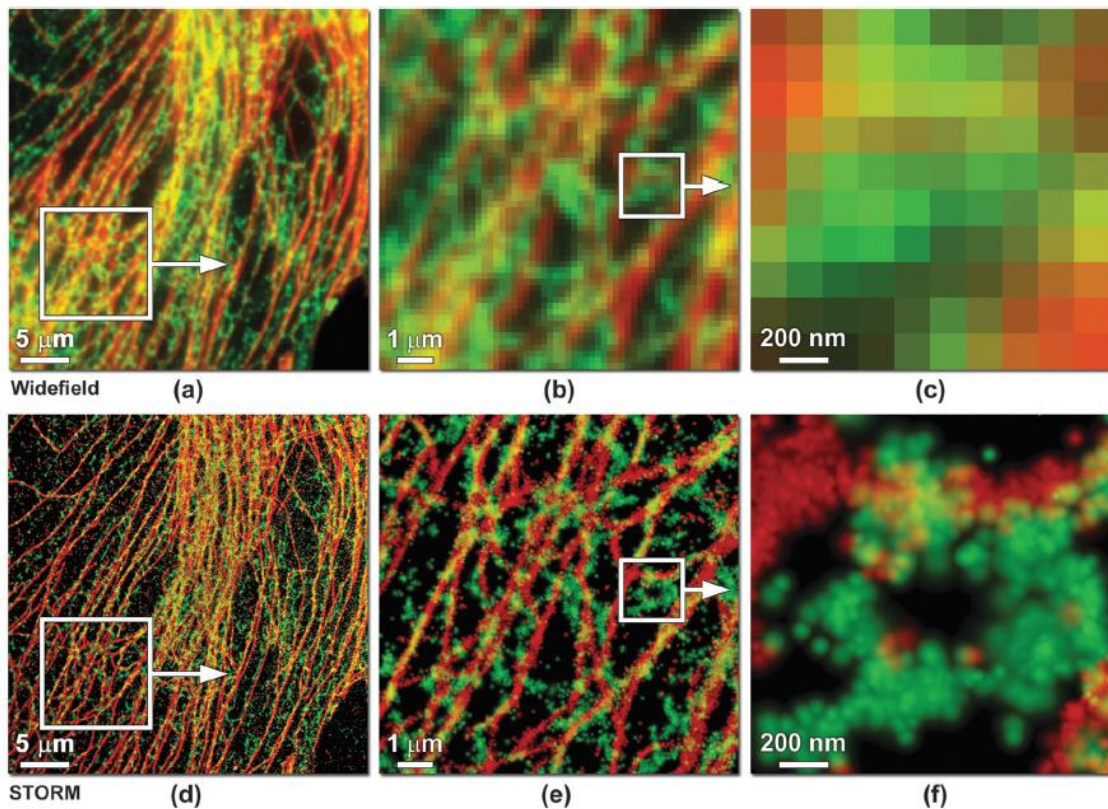


Figura 6: Imagen de una célula de riñón en la que podemos ver de color verde el retículo endoplasmático y de color rojo los microtúbulos observados con la técnica STORM. (Allen, J.R. et al. 2013).

### 4.3 Microscopía de iluminación estructurada (SIM)

Esta técnica es la más diferente a las demás. Utiliza un escáner de luz estructurada, es decir, la luz incide sobre la muestra en diferentes fases con patrones de rayas como se puede ver en la

figura 7. Al interactuar la muestra con los patrones de excitación se producirán imágenes con el efecto Moiré.

La imagen resultante directamente no rompe el límite de resolución, sin embargo, contiene información que puede ser reconstruida computacionalmente mediante funciones matemáticas para generar imágenes que sí se encuentran por encima del límite de resolución (Kim y So, 2017). Para ello se utiliza la teoría de Fourier. Tanto la imagen original como la transformada de Fourier son equivalentes, es decir, no se pierde ninguna información al pasar de una a otra.

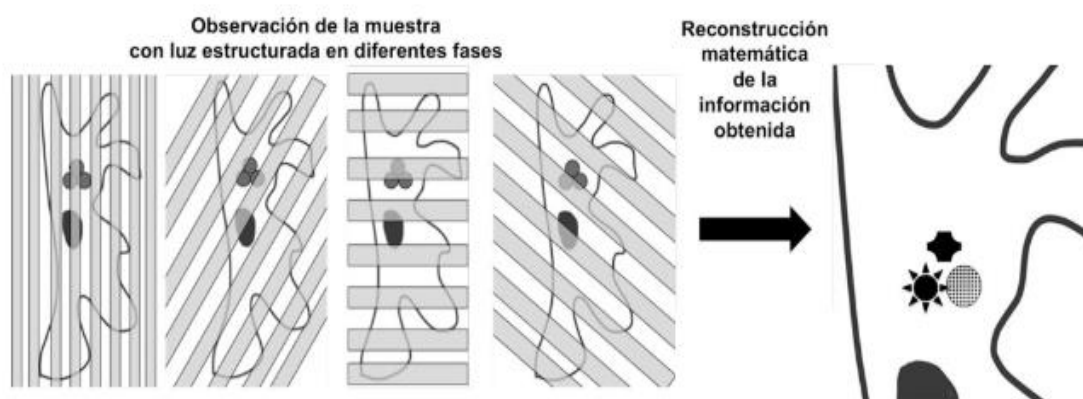
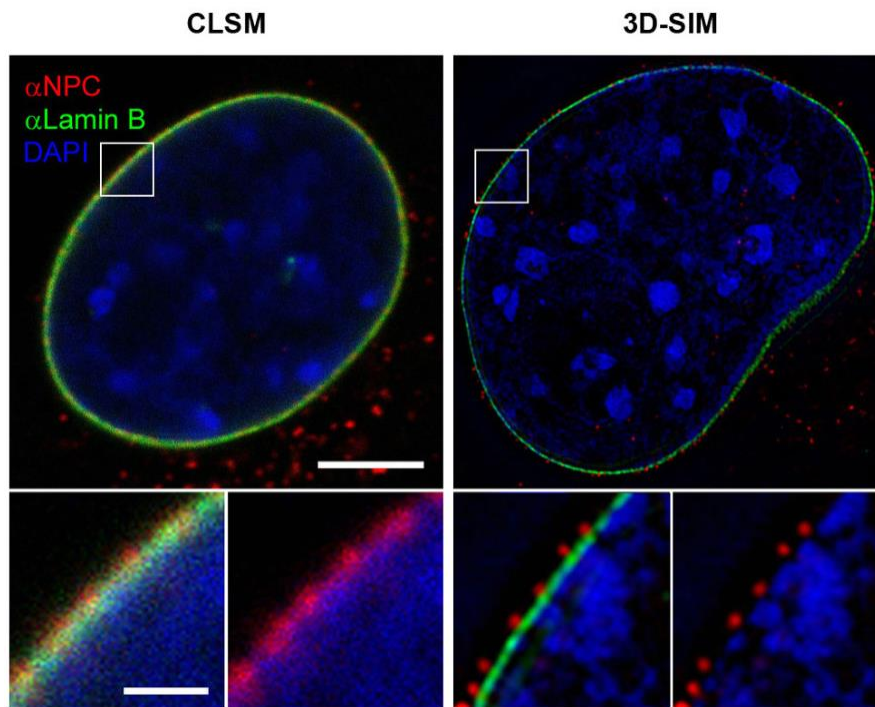


Figura 7: Técnica SIM.

Esta técnica no alcanza la resolución de las anteriores, ya que es técnicamente más simple, no usa láseres, sino haces de luz y es más rápida, lo que la hace menos fototóxica y más susceptible de ser aplicada para grabar células vivas completas (Ball et al., 2015). Además, la luz aplicada en las técnicas SMLM es muy intensa por lo que las muestras se dañan rápidamente. SIM, sin embargo, es diferente, debido a su velocidad y al hecho de que toma mucha menos luz que los otros métodos. (Sanexa et al., 2015).

Las moléculas de interés se marcan con fluoróforos, que para esta técnica son muy especiales. En primer lugar, se utiliza una luz que activa todas estas moléculas, y seguidamente otra que las desactiva. Al pasar esta luz de desactivación, las moléculas que se encuentran en las zonas más oscuras de la onda siguen manteniendo su fluorescencia. Esta imagen se captura. El proceso se repite muchas veces hasta obtener los datos de la imagen final como la que podemos ver en la figura 8.





*Figura 8: Núcleo celular visto con un microscopio confocal (CLSM) y con un microscopio SIM. En rojo se ven los poros nucleares, en verde una proteína de la envoltura nuclear y en azul se puede ver la cromatina.*

Esta técnica no es la más adecuada para células vivas por el tiempo que se necesita hasta obtener la imagen. La mayoría de los estudios que han utilizado esta técnica han sido utilizando muestras fijas. Se han podido analizar las estructuras de la cromatina, de los virus y los glóbulos rojos afectados por *Falciparum Plasmodium* en la malaria (posteriormente veremos en las aplicaciones) entre muchas otras.

TÉCNICA		PRINCIPIO DE LA TÉCNICA	LIMITACIONES/ VENTAJAS	APLICACIONES
STED		Emisión de fluoróforos seguido de un escaneo para obtener la imagen super resuelta	Velocidad muy lenta Difícil alineación de los láseres. Fotoblanqueo Fototoxicidad	Interior de las neuronas para las enfermedades neurodegenerativas
SMLM	PALM	Activación de fluoróforos y Fotoblanqueo	Velocidad lenta	División de una bacteria
	STORM	Usa diferentes fluoróforos y los localiza para formar la imagen	Velocidad mayor que PALM No utiliza fotoblanqueo	Mecanismos de las proteínas asociadas a nucleótidos
SIM		Iluminación usando un patrón para obtener la imagen	Alta demanda computacional No es fototóxica	Diagnóstico de imágenes hematológica Cromatina

Una vez vistas las técnicas más importantes de la súper-resolución, se ha podido comprobar que cada una tiene una utilidad diferente y que según el objetivo y la muestra que tengamos, usaremos una técnica u otra.

Tras la explicación de las técnicas, me centraré en las diferentes aplicaciones, ya que es otro de los objetivos en esta revisión bibliográfica.

## **5. Aplicaciones del microscopio de fluorescencia de súper-resolución**

La microscopía de fluorescencia de súper-resolución se ha convertido en un método muy útil para el estudio celular. Gracias a estas técnicas podemos obtener imágenes con una alta resolución con respecto a los microscopios tradicionales. La microscopía convencional nos ofrece imágenes con una resolución muy baja, por lo tanto, con la microscopía de súper-resolución se logrará superar la resolución, acabando con ese problema y ofreciendo muchas ventajas y avances a la ciencia.

Este modelo de microscopio se ha utilizado en múltiples aplicaciones en el campo de la ciencia, como en enfermedades neurodegenerativas, obteniendo imágenes de agrupación de receptores durante la sinapsis entre muchas otras, estudios del genoma, visualización y posicionamiento de estructuras celulares, investigación del cáncer, trastornos renales, enfermedades de la sangre, formación del colesterol en las membranas biológicas, mecanismo de acción de las proteínas que están asociadas a nucleótidos, etc. Dentro de este amplio abanico, en esta revisión bibliográfica me voy a centrar en las tres aplicaciones que he considerado más importantes.

En primer lugar, me he interesado en el alzhéimer. Este es un problema que nos puede preocupar a todos, ya que existen muchos casos actualmente, todos podemos tener en la familia alguien con esta enfermedad o incluso es algo que nos puede preocupar a nosotros mismos y que algún día podamos llegar a padecerla. Aun así, todavía no se ha conseguido conocer del todo esta enfermedad y hasta ahora no existe un tratamiento que la cure. Por ello me he interesado, es un tema actual y que me ha gustado investigar para poder saber todos los avances que existen ahora mismo en investigación.

La segunda aplicación interesante en la investigación es el cáncer. Hoy en día, en España se alcanzan casi los 280.000 casos de personas que sufren esta enfermedad. Al igual que en el alzhéimer, aún no se ha encontrado una cura. Si existen tratamientos que pueden radicar la enfermedad según su localización, pero aún no se conocen muy bien todos los mecanismos, ni cómo tratar los distintos tipos de cáncer.

Por último, pero no por ello menos importante, la aplicación que voy a tratar en esta revisión bibliográfica es la malaria. Esta enfermedad también afecta a muchas personas en el mundo cada año y gracias al microscopio de súper-resolución, se han podido obtener algunos avances.

### 5.1 Estudios en la enfermedad del Alzheimer

En 1906 Alois Alzheimer anunció el descubrimiento de una nueva enfermedad en la corteza cerebral. Poco a poco comenzaron a descubrirse las primeras características que luego tendrían tanta repercusión como es el Alzheimer en la actualidad.

En el cerebro, las neuronas van deteriorándose como consecuencia de algunas alteraciones en sus estructuras. Estas alteraciones estructurales, se han podido estudiar gracias a la microscopía de súper-resolución.

Tau, es una proteína asociada a microtúbulos (MT) que se expresa preferentemente en células neuronales; dentro de las neuronas, tau se expresa exclusivamente en los axones (Kubo, A. et al., 2019). Esta los mantiene rígidos y bien estructurados, además, permite que las moléculas y los neurotransmisores viajen por la neurona para producir la sinapsis.

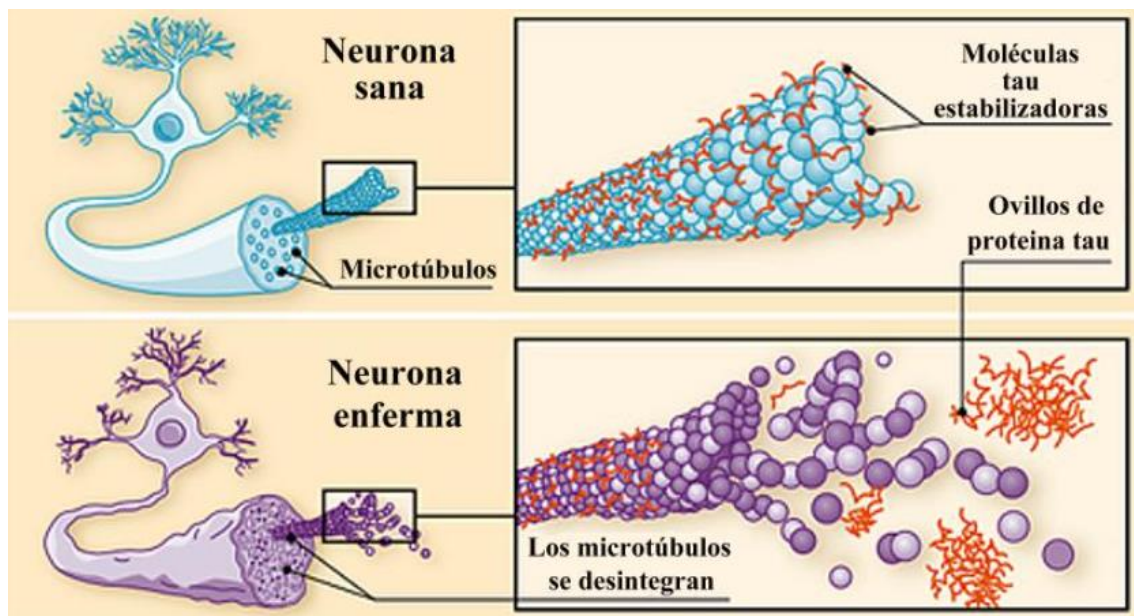
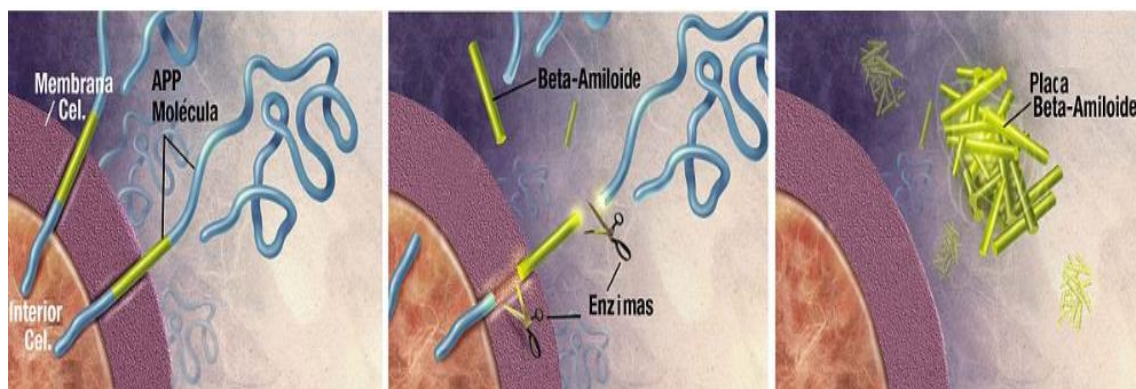


Figura 9: Diferencia de la neurona sana y enferma y la formación de ovillos.

El primer defecto estructural se produce por la fosforilación de Tau (incorporación de un grupo fosfato), provocando su desintegración y haciendo que esta se separe del microtúbulo. Como consecuencia, se unirán las proteínas en una maraña y formarán los ovillos neurofibrilares en el interior de la neurona como podemos observar en la figura 9.

Otro de los defectos se produce en su membrana plasmática. Las neuronas no dejan de ser células y al igual que todas contienen una membrana plasmática. En ellas existen unas proteínas transmembranales llamadas proteínas APP (proteína precursora amiloide).

En una neurona sana, la enzima  $\alpha$ -secretasa corta un fragmento de esta proteína APP y una segunda enzima llamada  $\gamma$ -secretasa, liberará un segundo fragmento. Este se liberará al torrente sanguíneo evitando el daño en el cerebro. Por el contrario, en un paciente con EA, ya sea por estrés oxidativo o por radicales peróxidos, la enzima que realizará el primer corte será la  $\beta$ -secretasa, y el segundo corte lo hará de nuevo la  $\gamma$ -secretasa que liberará un fragmento diferente al de una neurona sana, llamado  $\beta$ -amiloide. En la imagen central de la figura 10 se representan los cortes de estas dos enzimas. Estos fragmentos se acumularán formando las placas amiloides de forma extracelular, aunque existen evidencias de que también se pueden formar en el interior celular. Los fragmentos  $\beta$ -amiloides pueden ser de dos tipos,  $A\beta_{40}$ , formado por una cadena de 40 aminoácidos, o  $A\beta_{42}$ , con 42 aminoácidos.



*Figura 10: Formación de las placas amiloides en la corteza cerebral.*

Un paso importante para comprender los fenómenos de la formación de placas es la capacidad de investigar el lugar de la aparición de la agregación amiloide en modelos experimentales de enfermedad. (Kaminski Schierle, G.S. et al., 2011).

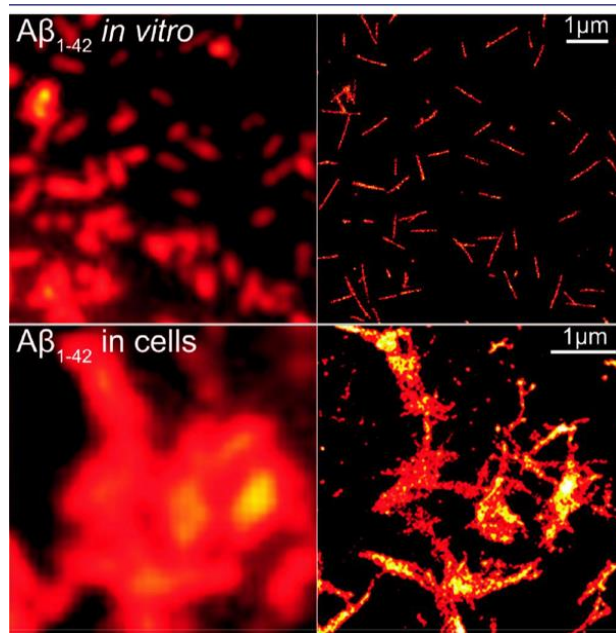
En un principio, para estudiar la agregación de esos fragmentos de proteínas, se utilizaron técnicas microscópicas electrónicas (EM) y de fuerza atómica (AFM). Estas técnicas utilizan un pretratamiento para las muestras que hace que se dañen las estructuras que se quieren observar.

Con la aparición del microscopio de fluorescencia de súper-resolución y las diferentes técnicas se ha podido solucionar ese problema. Los métodos de iluminación estructurada (SIM) no presentan una resolución espacial suficiente para proporcionar información sobre la morfología de las diversas especies de amiloides. (De Rossi, P., 2020). Sin embargo, las técnicas STORM y PALM alcanzan una resolución de 20-30 nm. Estas son capaces de reproducir imágenes muy potentes y mostrar una gran diferencia al igual que también se puede hacer con STED.

Para el avance en las investigaciones del Alzheimer, en uno de sus estudios se utilizó la microscopía de fluorescencia confocal y la técnica SIM de microscopio electrónico de súper-resolución, en la que se pudieron observar las placas  $\beta$ -amiloides que se generan en el exterior de la neurona. También se usó la técnica dSTORM para ver la naturaleza y la composición de esos depósitos amiloides intracelulares.

En estos estudios se pudo demostrar que las placas  $\beta$ -amiloides extracelulares pasaron a ser intracelulares tras una hora de incubación. Esto se vio gracias a las técnicas que usaron y al fluoróforo "HiLyteFluor488" para los péptidos  $\beta$ -amiloides.

Una vez que se supo que las placas pasaban al interior celular, se pudo observar cómo estas se iban acumulando en vesículas celulares o liposomas favoreciendo las reacciones intermoleculares. Había una evidencia previa de que la pérdida de integridad de las membranas endosómicas / lisosómicas representa un evento temprano en la patogénesis  $\beta$ -amiloide, y se ha sugerido que la fuga de vesículas intracelulares puede conducir la muerte celular dependiente de  $\beta$ -amiloide (Kaminski Schierle, G.S. et al., 2011).



*Figura 11: En esta imagen podemos observar claramente la diferencia entre la microscopía convencional (imágenes de la izquierda) y la microscopía electrónica de súper-resolución con la técnica dSTORM (imágenes de la derecha). En las dos de arriba, se ven agregados que se encuentran en una solución madre in vitro. Con la técnica dSTORM también se pueden observar en el interior celular, como podemos ver en las imágenes inferiores.*

La imagen de la figura 11, se obtuvo de un experimento, en el que querían ver el comportamiento de los agregados  $\beta$ -amiloides en el interior y el exterior de la célula. Tras una hora de incubación, vieron que las marañas amiloideas seguían igual en el exterior de la célula, sin embargo, en su interior se hicieron más grandes.

La enfermedad de Alzheimer (EA) y otras enfermedades neurodegenerativas tienen patologías características que se analizan en el cerebro post mortem recolectado en bancos de tejidos clínicos (Benda, A. et al., 2016). Existe un estudio publicado en 2018 en el que cogían muestras humanas y usando la microscopía de emisión estimulada (STED) junto con la tomografía (AT) realizaban estudios neuropatológicos caracterizando las placas  $\beta$ -amiloides en muestras ultrafinas.

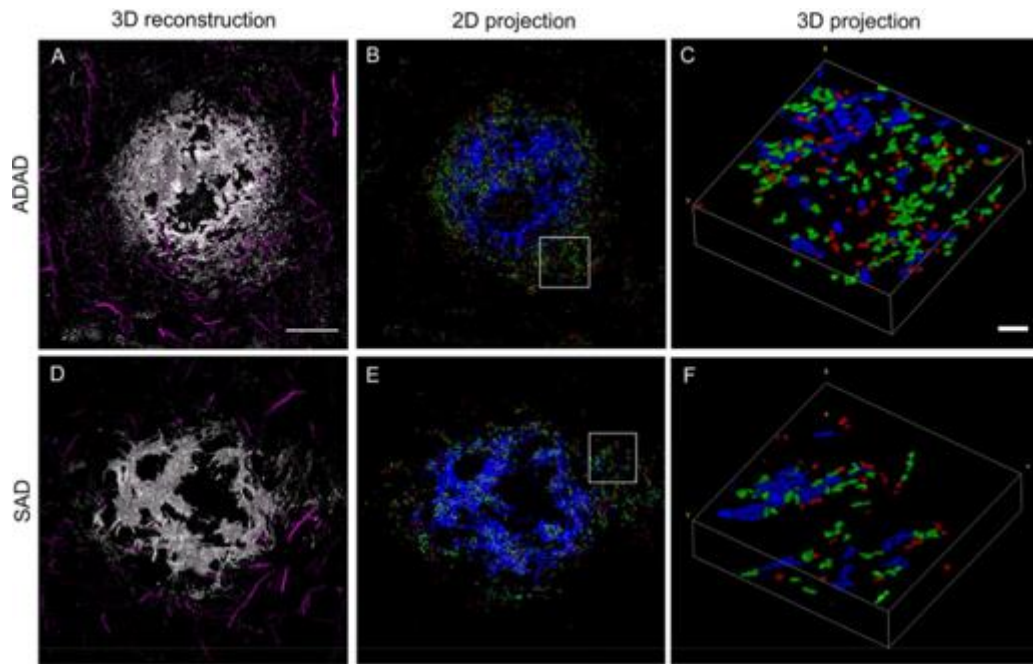
Con el uso de esta técnica pudieron comprobar la potencia en este tipo de aplicación. Vieron que los péptidos  $\beta$ -amiloides pueden formar oligómeros solubles, y van creciendo hasta

hacerse insolubles y acumulándose de manera extracelular como habíamos visto anteriormente. Cada vez hay más pruebas de que las especies A $\beta$  solubles son más tóxicas que la A $\beta$  fibrilar para causar pérdida neuronal y disfunción sináptica (Quercol Villaseca et al., 2019).

La enfermedad del Alzheimer generalmente es una enfermedad que se produce de forma esporádica en pacientes de edad avanzada (SAD), por una descompensación en la formación y eliminación del péptido  $\beta$ -amiloide como consecuencia del envejecimiento, pero han visto que hay veces que la enfermedad aparece también en personas jóvenes (ADAD). En este caso, es causado por mutaciones en unas proteínas. Esas pueden ser las proteínas transmembrana que veíamos al principio, llamada APP, o la presenilina en dos de sus genes como el PSEN1 y PSEN2. Estas mutaciones hacen que se forme A $\beta$ 42 que dará lugar a un depósito  $\beta$ -amiloide soluble provocando la neurodegeneración.

Aprovechando la técnica AT-STED, se investigaron las diferencias que existen entre estos pacientes, los que presentan la enfermedad por mutaciones en las proteínas, o personas en las que el alzhéimer es consecuencia de la edad avanzada (figura 12). Para ello observaron las estructuras  $\beta$ -amieloides en ambos casos y vieron como en muestras de pacientes con alzhéimer precoz por mutaciones en la presenilina, existían más estructuras que en casos de personas de avanzada edad.





*Figura 12: Gracias a la técnica AT-STED podemos ver como las estructuras A $\beta$  no fibrilares son más abundantes en un paciente joven (ADAD) con mutaciones en la presenilina que en un paciente de edad avanzada (SAD). La distribución neuronal se puede observar de color magenta alrededor de las placas y en el centro un núcleo denso de estructuras amiloides. También se puede observar diferencia entre la distribución de las fibrillas.*

Con la técnica AT se pudo alcanzar una resolución de hasta 70nm, pero con la adición de la técnica STED se pudo llegar hasta los 10 nm, una resolución inalcanzable para la microscopía confocal o en ensayos inmunohistoquímicos. Usando ambas técnicas se pudo reconstruir la placa amiloide y así pudieron ver la distribución de las fibrillas en tejido humano como podemos ver en la figura 10, en la que se puede ver que las placas amiloides están formadas por un núcleo central y un halo alrededor.

Estudios anteriores demostraron que una acumulación de  $\beta$ -amiloide provoca la pérdida neuronal y una toxicidad sináptica. Esa acumulación de  $\beta$ -amiloide puede ser una causa del procesamiento anormal de la proteína APP en pacientes con EA precoz.

Se necesitan más estudios para investigar más a fondo la patogénesis de esta enfermedad. La unión de ambas técnicas abre una puerta a la neurociencia para poder caracterizar los agregados como objetivos terapéuticos.

## **5.2 Investigación del cáncer**

La microscopía óptica ha sido la técnica principal para visualizar la morfología celular y las anomalías en tejidos con cáncer. Gracias al avance de la microscopía y la mejora de la resolución, se pueden ver estructuras de tamaños moleculares. Vieron que un paso limitante para poder obtener imágenes de alta calidad era la preparación adecuada de la muestra según la técnica que se fuera a utilizar. Las técnicas más usadas para este tipo de aplicación son las técnicas basadas en moléculas individuales. PALM, requiere la incorporación de proteínas fluorescentes fotoactivables, pero tiene una utilidad clínica limitada en muestras patológicas fijas, mientras que STORM utiliza colorantes orgánicos convencionales que es altamente compatible con el tejido patológico (Liu, Y., 2019).

Un estudio muy interesante que se ha realizado sobre el cáncer es la afectación de los carbohidratos en esta enfermedad.

Uno de los componentes importantes de la membrana celular son los carbohidratos. Estos, sufren un proceso de glicosilación (adición de los carbohidratos a una proteína) y ayudan al mantenimiento celular, realizando algunas de sus funciones. Si en algún momento se produjera un error en este proceso, a cualquier nivel, estos cambios pueden influir en la estructura de la membrana plasmática, en las interacciones celulares, etc., y por lo tanto, pueden producir muchas enfermedades como por ejemplo el cáncer.

En primer lugar, vieron que carbohidratos eran los que se acumulaban en las células cancerosas con más frecuencia que en las células normales, con este avance estos carbohidratos se podrían utilizar como diana para tratamiento quimioterapéutico o como marcadores para el diagnóstico de la enfermedad.

Como ya he dicho, la mayor parte de las proteínas que se encuentran en la membrana celular de los mamíferos sufren un proceso llamado glicosilación. Varios estudios han demostrado que algunos trastornos en la glicosilación pueden acompañarse de formación del tumor o metástasis entre otras enfermedades.

La dificultad está en detectar el trastorno que se produce, ya que existen infinitas posibilidades de glicoconjugados implicados en el cáncer. Sin embargo, los residuos que forman las cadenas de esos carbohidratos son limitados en mamíferos. Los más comunes son N-acetilglucosamina (GlcNAc), N-acetilgalactosamina (GalNAc), fucosa (Fuc), manosa (Man), galactosa (Gal) y ácido siálico (Sia).

Para poder observar la diferencia de carbohidratos en las células con y sin cáncer, se utilizaron células renales humanas. Etiquetaron ambas muestras con la concentración correcta de fluoróforos y se observaron al microscopio de súper resolución con la técnica dSTORM, observando los diferentes carbohidratos. Vieron que todos se agregaban en grupos más grandes y con una distribución distinta en células con cáncer que en las células sanas (figura 13).

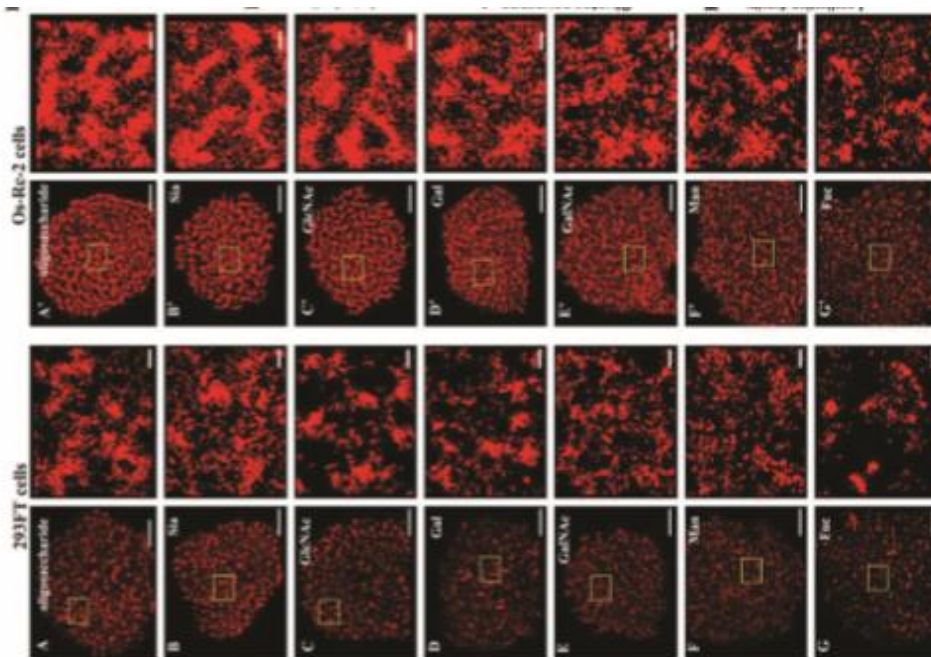


Figura 13: Análisis de los siete tipos de carbohidratos en diferentes células cancerosas (A-G) y la distribución de los principales de carbohidratos de interés en las membranas celulares. (Chen et al., 2016).

Tras este estudio de los carbohidratos más comunes en las células en el año 2016, se ampliaron las investigaciones con otro carbohidrato, ya conocido desde el año 1983 por Hakomori y bastante importante en algunas células cancerosas, llamado globo H.

Este se identificó en el cáncer de mama en muestras humanas. En este tipo de cáncer, el globo H está siendo la próxima línea de investigación para la inmunoterapia.

Para esta investigación usaron también la técnica dSTORM. Un paso muy importante al usar esta técnica es el etiquetado. El Globo H, es una molécula muy difícil de etiquetar ya que es muy compleja. En estudios previos se utilizó un anticuerpo de alto peso molecular específico

para ese glucoesfingolípido, el MBr1. Por suerte, se han introducido recientemente unos ácidos nucleicos, llamados aptámeros. El aptámero para Globo H, es una cadena de ADN que solo tiene un sitio de unión para la molécula, esté localizada o no en la membrana celular. Estos aptámeros lo hicieron más eficientes añadiéndoles un tinte orgánico para poder visualizarlo al microscopio de fluorescencia de súper-resolución.

Gracias a este marcador se pudo estudiar la distribución de Globo H en las membranas. Para investigar la distribución utilizaron la estadística de Hopkins. En este método, los valores de H pueden estar entre 0 y 1. Si están cerca de 1 como resultó ser en este caso, significará que globo H tenía una distribución agrupada.

Una vez que vieron el tipo de distribución, utilizaron un programa llamado SR-Teseller para reconstruir la imagen. Como resultado pudimos observar que globo H es heterogéneo y tiene diferentes formas en la membrana celular (Figura 14).

Una vez aclarado el concepto de que los carbohidratos globo H son específicos de las células cancerosas, realizaron otro estudio usando muestras de diferentes tipos de células cancerígenas. Células de cáncer de mama (MCF-7), de cáncer de colon (HCT116), de cáncer de pulmón (A549) y a su vez, muestras de células no cancerígenas de mama (MCF-10A), colon (NCM460) y pulmón (HFL1).

Se observaron en el microscopio electrónico de súper-resolución con la técnica dSTORM. Obtuvieron imágenes en las que se observaba que globo H se expresaba de manera mucho más significativa en las células cancerosas independientemente del tipo de célula que fuera. Estos resultados sugirieron la posibilidad de utilizar los aptámeros como marcadores potentes para diagnosticar estos tipos de cáncer, incluso para la terapia.

Con la investigación de este carbohidrato, sabiendo que la mayoría de ellos están implicados en las funciones celulares y como consecuencia de las interacciones entre ellos en las membranas celulares, propusieron una hipótesis en la que diferentes tipos de carbohidratos implicados en esta enfermedad podían agregarse a las membranas celulares interaccionando unos con otros y mediar las funciones de las células cancerígenas.

Por ello investigaron más carbohidratos implicados en el cáncer y así se pudo estudiar el ácido siálico, otro típico en este tipo de células.

Usando de nuevo la técnica dSTORM podemos ver claramente las diferencias entre globo H y ácido siálico como podemos ver en la figura 14.

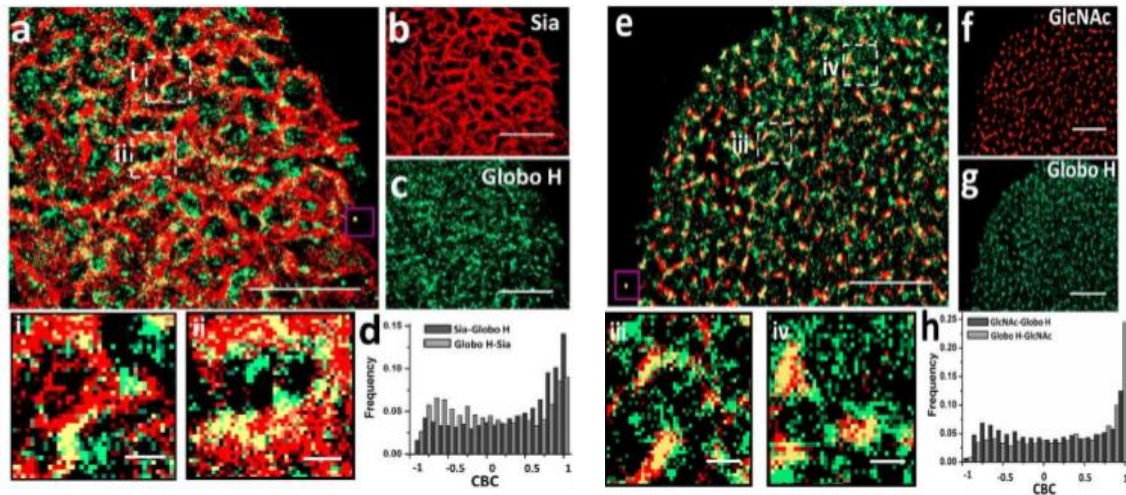


Figura 14: Relación entre globo H y otros carbohidratos asociados al cáncer en la superficie de las células MCF-7. En la imagen a vemos la localización del globo H con el carbohidrato ac.sialico y como se superponen unos con otros. En la imagen "e" se ve la localización de globo H respecto a otro carbohidrato, el GlcNAc

Al observar estas imágenes pudieron ver que el globo H y el ácido siálico estaban asociados uno con otro. Se preguntaron si ese comportamiento lo tendrían muchos de los carbohidratos para poder trabajar de forma cooperativa. Para ello, observaron las localizaciones del globo H y del N-acetilglucosamina (GlcNAc) en las membranas celulares de MCF-7, ya que GlcNAc es el glicano más común en esta estructura celular y su ramificación anormal, un factor clave en el cáncer. Los resultados mostraron que estos carbohidratos también estaban asociados entre ellos (figura 14e).

Para confirmar definitivamente esta hipótesis, hicieron un experimento con diferentes tipos de glicosidasas para intentar desorganizar al ácido siálico y GlcNAc y así poder observar también la distribución de globo H. Como resultado del experimento tras aplicar el tratamiento con glicosidasas pudieron observar una gran disminución tanto de ácido siálico como de GlcNAc. Además, se comprobó que la escisión de ambos grupos provocaba también la disminución del globo H. Con esto se pudo confirmar que los carbohidratos se unían para trabajar de forma cooperativa en las membranas de las células cancerosas.

De este modo, se podría intervenir en este proceso para investigar sobre una vacuna para el cáncer. Aunque todavía queda mucho por dilucidar, los hallazgos sobre las interacciones

basadas en glicanos en los cánceres podrían contribuir a descifrar las funciones fisiológicas de los carbohidratos en los cánceres y desarrollar aún más una vacuna contra el cáncer basada en carbohidratos. (Jing, Y. et al., 2019)

### 5.3 Visualización del parásito de la malaria

La malaria sigue siendo una amenaza mundial, con 216 millones de casos en todo el mundo y más de 400,000 muertes solo en 2016 (Schloetel, J.G., et al, 2019). Es una enfermedad causada por *Plasmodium spp.* Este parásito ha sido investigado durante más de un siglo, pero con la microscopía se han podido dar grandes avances.

Muchos estudios que utilizaron métodos clásicos de microscopía electrónica mostraron la arquitectura general de los esporozoitos y formas similares de parásitos. (De Niz, M. et al., 2017).

La aplicación de esta microscopía para observar las estructuras de los parásitos tiene algunas limitaciones, como ya he dicho anteriormente en la explicación de la técnica SIM, se necesitan unos fluoróforos especiales y, además, algunos métodos no son compatibles con muestras vivas o con los glóbulos rojos.

Para poder entender el avance con la microscopía de súper-resolución en esta enfermedad, hay que entender antes una parte del ciclo del parásito como se muestra en la figura 15.

Los esporozoitos de *Plasmodium spp.* cuando invaden la célula hepática, forman unas estructuras llamadas vacuolas parasitóforas (PVM). Esa vacuola hace posible que el parásito pueda adquirir sus nutrientes y pueda vivir en el interior celular.

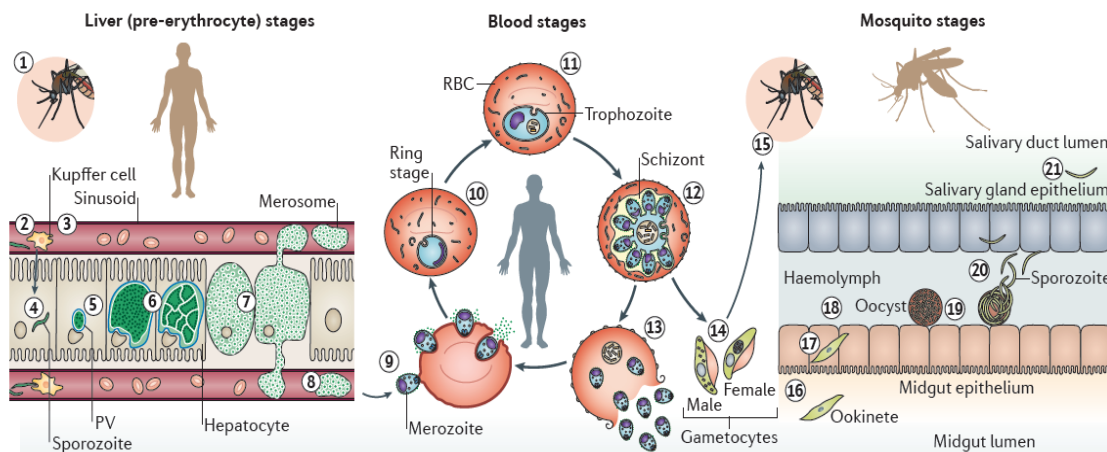


Figura 15: Ciclo de *Plasmodium spp.*

Los esporozoitos entran en la célula hepática y se transforman en merozoitos para pasar a los glóbulos rojos. El mecanismo de unión del merozoito a la membrana de los eritrocitos para su invasión se demostró con la técnica SIM (Baum, J., 2017). Sin embargo, esta técnica, en comparación con otras técnicas de súper-resolución como STED, STORM, PALM, tiene una ganancia de resolución baja sobre la fluorescencia convencional.

Como he dicho anteriormente, la microscopía de súper-resolución tiene unas limitaciones, y entre ellas está la incompatibilidad con las muestras. Una de las limitaciones que crearon estos parásitos a la técnica STED fue por su sensibilidad a la luz. Esta sensibilidad se debe a un material microcristalino oscuro llamado hemozoína. La hemozoína se forma en las vacuolas parasitóforas por la liberación del grupo hemo tras la ingestión de hemoglobina. Interferir con la formación de la hemozoína ha sido un objetivo importante para los medicamentos antipalúdicos. (Schloetel, J.G. et al., 2019). Cuando el grupo hemo liberado se ilumina con un láser de alta potencia, la muestra se desintegra.

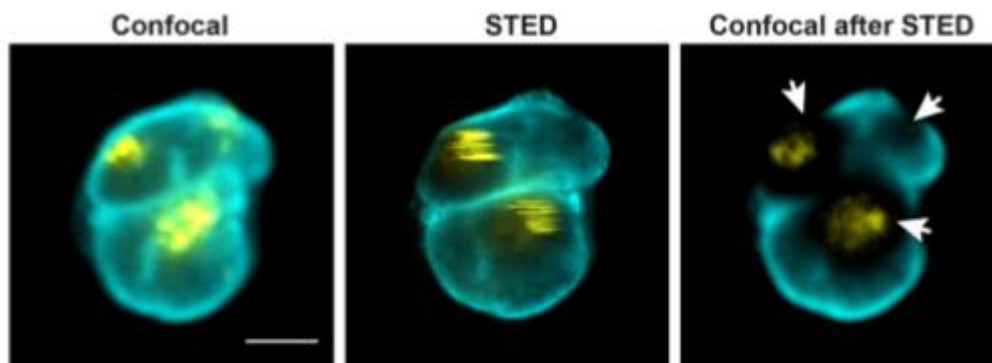


Figura 16: La hemozoína en las muestras de malaria. Imágenes STED confocal y convencional de un glóbulo rojo. La PVM marcada en color cian y la hemozoína que contiene la vacuola aparece amarilla por la luz reflejada por el láser STED. En STED convencional se ve un claro ejemplo del aumento de la resolución, pero provoca un daño a la hemozoína y a cualquier estructura que esté a su alrededor, como podemos comprobar en la imagen confocal después de STED.

La forma de solucionar este problema se hizo creando un nuevo enfoque de la técnica, llamado de iluminación adaptativa (AI). En esta adaptación, cuando el láser incide sobre las partes sensibles a la luz de la muestra, este se desactiva, reduciendo el daño a la muestra. Con esta adaptación también se pueden obtener imágenes de las distintas fases del ciclo de *Plasmodium spp.*

Esta adaptación hace que se reduzca el foto-blanqueo, pero sigue provocando algún daño a la muestra. Como el objetivo era evitar ese daño provocado por la hemozoína, se creó otra adaptación llamada STED guiada.

La nueva técnica de STED guiada no provoca el daño a las estructuras celulares que se encuentre alrededor de la hemozoína, por lo que podemos obtener imágenes de todas esas estructuras, incluida la hemozoína sin alterar la muestra.

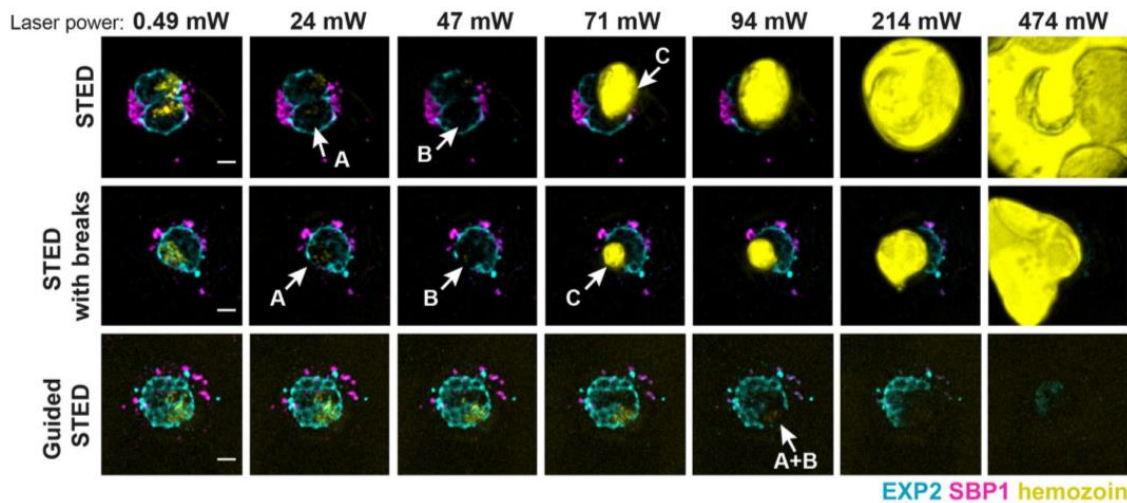


Figura 17: Imágenes obtenidas de glóbulos rojos con las diferentes técnicas STED, aplicando diferentes potencias de manera creciente.

A: se puede observar una alteración de la estructura de la hemozoína.

B: daño en las zonas circundantes a la hemozoína.

C: desintegración total de la hemozoína.

Se ve claramente como la STED guiada permite la obtención de imágenes sin dañar la muestra y sin necesidad de utilizar una baja intensidad en el láser.

En la microscopía STED convencional cuando hacen incidir un láser de menos de 24mW no hay problemas en la célula, pero esto impide la obtención de imágenes de alta calidad, ya que las muestras necesitan la potencia de un láser mayor de 24 mW.



Sin embargo, con la técnica de STED guiada la potencia del láser hasta con 71mW no causó ningún daño en la célula. Ya es con 94 mW cuando empiezan a producirse los primeros daños, pero nunca se vio una desintegración de la hemozoína, esta permaneció intacta en todo momento (figura 17).

Con esta última adaptación de la técnica STED, los científicos aprovecharon para obtener imágenes de algunos orgánulos del parásito, críticos para su crecimiento en el interior de la célula huésped.

Primero se observó el retículo endoplasmático. Cuando el parásito invade la célula huésped, estos exportan unas proteínas que van dirigidas en primer lugar hacia el retículo endoplasmático. Este orgánulo, está muy cerca de la vacuola que contiene la hemozoína. Para evitar problemas y poder observarlo bien, se usaron etiquetas específicas. También se pudieron observar unos orgánulos llamados hendiduras de Maurer, estas facilitan la circulación de las proteínas a la superficie del eritrocito. Para su obtención se usaron marcadores SBP1. Como resultado se pudieron obtener unas imágenes sorprendentes de las estructuras de los parásitos (figura 18).

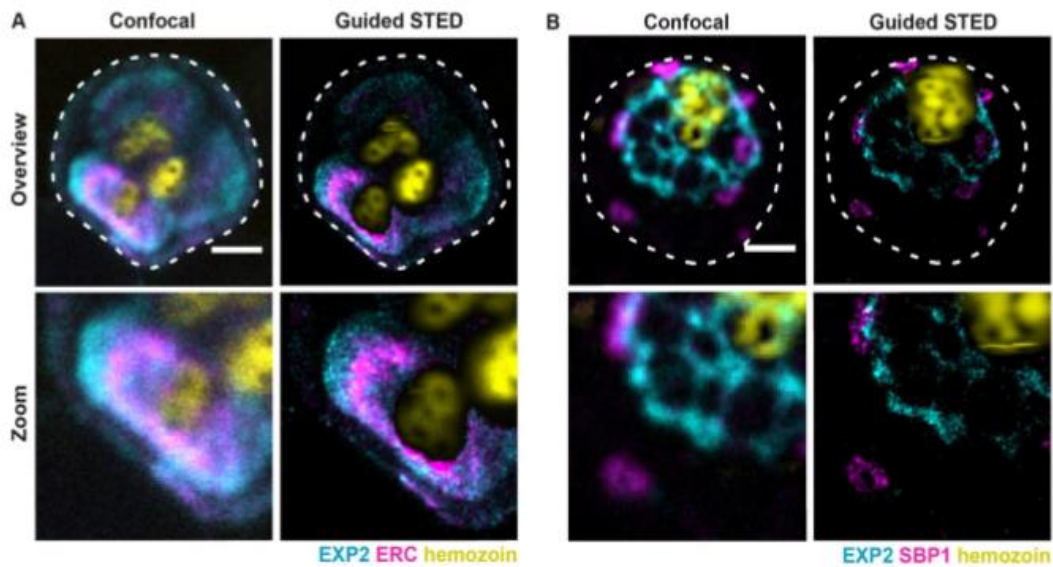


Figura 18: Imagen de los diferentes orgánulos del parásito. En ambas imágenes se puede observar la hemozoína en color amarillo y las proteínas que rodean la vacuola parasitófora en color cian. Por otro lado, en color rosa vemos en la imagen A, el retículo endoplasmático y en la

*imagen B, las hendiduras de Maurer. Las imágenes inferiores son una ampliación de las observadas en la microscopía STED.*

Actualmente se está investigando sobre la forma de interferir en la hemozoína con tratamientos antipalúdicos e intentar erradicar la enfermedad que a tantos países afecta actualmente.

## **6. Conclusiones**

La microscopía de fluorescencia de súper-resolución juega un papel muy importante a nivel sanitario. Esta técnica permite realizar un estudio más completo de las células, obteniendo una resolución muy mejorada con respecto a la microscopía convencional. Pese a los avances en este tipo de microscopía, aún queda mucho trabajo por delante de cara al futuro.

En esta revisión bibliográfica se ha visto la variedad de técnicas que existen dentro de este tipo de microscopía, cada una con sus características específicas, sus ventajas y sus inconvenientes, pero todas ellas en una continua evolución buscando una mejora en la resolución. La resolución máxima que alcanzan estas técnicas ronda en torno a los 20 nm, superando diez veces el límite de difracción de Abbe.

Una limitación que puede tener este tipo de microscopía es el tiempo que se necesita para realizar el barrido, relacionado con el tamaño de volumen que se haya tomado. Cuanto mayor es el volumen de la muestra más complicado es obtener imágenes con una buena resolución y con nitidez.

Como hemos visto en las diferentes aplicaciones mostradas en esta bibliografía, la microscopía de súper-resolución tiene un gran peso científico, sobre todo en el ámbito de la bioquímica, biología celular y biomedicina, ya que, les facilita la observación de procesos biológicos en una dimensión que hasta el año 2014 era algo imposible, pudiendo obtener información del funcionamiento del organismo y así conocer mejor las diferentes enfermedades.

Gracias a STED, se ha avanzado mucho en el estudio de la malaria entre otros. Aquí hemos visto como se ha conseguido obtener imágenes con una alta resolución del parásito causante de la enfermedad y poder conocer un poco más su modo de actuación dentro del organismo.

Otro avance que se ha dado por esta técnica es la obtención de imágenes súper-resueltas de la sinapsis producida en las enfermedades neurodegenerativas como puede ser el Alzheimer, también se han podido ver los filamentos de proteína Tau, que han sido de gran ayuda para avanzar en los estudios.

La técnica SIM también ayudó a obtener imágenes súper-resueltas en la malaria, resolviendo el mecanismo de unión del merozoito a los eritrocitos.

Además, se ha podido comprobar los efectos de la técnica STORM en el cáncer, pudiendo ver cómo afectan los carbohidratos a este tipo de enfermedad y obteniendo imágenes súper-resueltas de su localización en las células.

En conclusión, esta microscopía ha generado muchas más ventajas a nivel científico, pero hay que seguir sacándole el máximo partido posible y para ello seguir trabajando. Mejorar las técnicas, intentar aumentar aún más la resolución, y poder aplicar este gran avance a otros niveles fuera de la ciencia o de la sanidad que puedan ayudar a mejorar la calidad de vida.

## **7. Bibliografía**

1. Allen, J.R., Ross, S.T., and Davidson, M.W. Sample preparation for single molecule localization microscopy. *Physical Chemistry Chemical Physics*. 2013. 15(43), pp. 18771-18783.
2. Ball G., Demmerle J., Kaufmann R., Davis I., Dobbie IM, Schermelleh L. SIMcheck: a toolbox for successful super-resolution structured illumination microscopy. *Sci Resp*. 2015; 5(1):112-143.
3. Baum, J., Richard, D., Riglar, D.T. Malaria parasite invasión: achieving Superb Resolution. *Cell Host and Microbe*. 2017. 21(3), pp.294-296.
4. Benda, A., Aitken, H., Davies, D.S., Whan, R., Goldsbury, C. STED imaging of tau filaments in Alzheimer's disease cortical grey matter. *Journal of Structural Biology*. 2016; 195(3), pp.667-683.

5. Chen, J., Liu T., Gao, J., Gao,L., Zhou,L., Cai,M., et al. Variation in Carbohydrates between Cancer and Normal Cell Membranes Revealed by Super-Resolution Fluorescence Imaging. *Advanced Science*. 2016; 3(12):1600270.
6. De Niz, M., Burda, P.-C., Kaiser, G., Del Portillo, H.A., Spielmann, T., Frischknecht, F., et al. Progress in imaging methods: insights gained into Plasmodium biology. *Nature Reviews Microbiology*. 2017; 15(1): 37-54.
7. De Rossi, P., Nomura, T., Andrew, R.J., Masse, N.Y., Sampathkumar, V., Musial, T.F., et al. *Cell Reports* 30 (10), pp. 3520-3535. e7.
8. Heintzmann R, Ficz G. Breaking the resolution limit in light microscopy. *Brief funct geimic proteomic*. 2006; 5(5):289-301.
9. Heintzmann, R., Huser, T. Super-Resolution Structured Illumination Microcopy. *Chemical Reviews*. 2017. 117(23), pp. 13890-13908.
10. Hu YS, Zimmerley M Li Y, Watters R, Cang H. Single molecule super-resolution light-sheet microscopy. *Chemphyschem*. 2014; 15(4):577-586.
11. Hell, S.W., and Wichmann, J. Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy. *Optics Letters*. 1994.19(11), pp. 780-782.
12. Jing, Y., Chen, J., Zhou, L., Sun, J., Cai, M., Shi, Y. et al. Super-resolution imaging of cancer-associated carbohydrates using aptamer probes. *Nanoscale*.2019; 11(31): 14879-14886.
13. Kaminski Schierle, G.S., Van de Linde, S., Erdelyi, M., Esbjorner, E.K., Klein, T., Rees, E. et al. In situ measurements of the formation and morphology of intracelular  $\beta$ -amyloid fibrils by super-resolution fluorescence imaging. *Journal of the American Chemical Society*. 2011; 133(33): 12902-12905.

14. Kim Y-H, So PTC. Three-dimensional wide-field pump-probe structured illumination microscopy. *Optics Express*. 2017;25(7): 7369-7391.
15. Kubo, A., Misonou, H., Matsuyama, M., Nomori, A., Wada-Kakuda, S., Takashima, A., et al. Distribution of endogenous normal tau in the mouse brain. *Journal of Comparative Neurology*. 2019; 527 (5), pp.985-998.
16. Leung BO, Chou KC. Review of the super-resolution fluorescence microscopy for biology. *Appl Spectrosc*. 2011; 65(9): 967-980.
17. Liu, Y. & Xu, J. High-Resolution Microscopy for Imaging Cancer Pathobiology. *Current Pathobiology Reports*. 2019; 7(3): 85-96.
18. Maryam Mahdi. "Super Resolution Fluorescence Microscopy". *News Medical Life Sciences*. 2018. <https://www.news-medical.net/medical/authors/maryam-mahdi>
19. Masters, B.R. Stimulated Emission Depletion Microscopy and Related Techniques. Springer Series in Opticas Sciences. 2020. 227, pp. 261-305.
20. Nehme, E., Weiss, L.E., Michaeli, T., Shechtman, Y. Deep-STORM: super-resolution single-molecule microscopy by deep learning. *Optica*. 2018. 5(4), pp. 458-464.
21. Oikawa, Y. The principle and the applications of structured illumination super resolution microscopy. *Kobunshi*. 2015. 64(9), pp. 586-587.
22. Querol-Vilaseca, M., Colom-Cadena, M., Pegueroles, J., Nuñez-Llaves, R., Luque-Cabecerans, J., Muñoz-Llahuna, L. et al. Nanoscale structure of amyloid- $\beta$  plaques in Alzheimer's disease. *Scientific Reports*. 2019; 9(1): 5181.
23. Sanexa M, Eluru G, Gorthi SS. Structured illumination microscopy, *Advances in optics and photonics*. Osa publishing. 2015; 7(2): 241-275.

24. Schloetel, J.G., Heine, J., Cowman, A.F. and Pasternak, M. Guided STED nanoscopy enables super-resolution imaging of blood stage malaria parasites. *Scientific Reports*. 2019; 9(1): 4674.
25. Shermelleh L, Heintzmann R, Leonhardt H. A guide to super resolution fluorescence microscopy. *J Cell Biol*. 2010; 190(13): 165-175.
26. Tam J, Merino, D. Stochastic optical reconstruction microscopy STORM in comparison with stimulated emission depletion STED and other imaging methods. *J neurochem*. 2015; 135(4):643-658.
27. Turkowyd, B., Virant, D. and Endesfelder, U. From single molecules to life: microscopy at the nanoscale. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2016. 408(25), pp. 6885-6911.
28. Vangindertael J, Camacho R, Sempels W, Mizuno H, Dedecker P, Janseen KPF. An introduction to optical super-resolution microscopy for the adventurous biologist. *Methods Appl Fluoresc*. 2018; 6(2):48-93.
29. Wang, H., Rivenson, Y., Jin, Y., Wei, Z., Gao, G., Günaydin, H., et al. Deep learning enables cross-modality super-resolution in fluorescence microscopy. *Nature Methods*. 2019. 16(1), pp. 103-110.