Biblioteca Digital
F C E N - U B A

BIBLIOTECA CENTRAL LUIS F LELOIR
BIBLIOTECA CENTRAL LELOIR
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES UBA

Tesis Doctoral

Mediciones con resolución nanométrica mediante depleción por emisión estimulada

Bordenave, Martín Diego

2016-11-14

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:
Bordenave, Martín Diego. (2016-11-14). Mediciones con resolución nanométrica mediante depleción por emisión estimulada. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:
Bordenave, Martín Diego. "Mediciones con resolución nanométrica mediante depleción por emisión estimulada". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2016-11-14.

EXACTAS UBA
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

UBA
Universidad de Buenos Aires

Dirección: Biblioteca Central Dr. Luis F. Leloir, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Intendente Güiraldes 2160 - C1428EGA - Tel. (++54 +11) 4789-9293

Contacto: digital@bl.fcen.uba.ar

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Física

Mediciones con resolución nanométrica mediante depleción por emisión estimulada

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Univeridad de Buenos Aires en el área de Ciencias Físicas

Martín Diego Bordenave

Director de tesis: Fernando D. Stefani

Consejera de estudios: Andrea V. Bragas

Lugar de trabajo: Centro de Investigaciones en Bionanociencias, Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, Polo Científico y Tecnológico

Buenos Aires, 2016

Resumen

Desde los estudios de Ernst Abbe, a finales del siglo XIX, se dio por aceptado que la microscopía óptica de campo lejano tenía un límite en su poder de resolución espacial: objetos que se encontraran más cercanos entre sí que media longitud de onda de la luz utilizada no podrían distinguirse. Sin embargo, en las últimas dos décadas se han desarrollado un número de técnicas basadas en fluorescencia que mantienen las ventajas de la microscopía óptica de campo lejano, y proporcionan una resolución espacial limitada únicamente por el tamaño del marcador fluorescente. Estas técnicas se denominan microscopías de superresolución o nanoscopías de fluorescencia e involucran la transición entre estados moleculares de los fluoróforos que permitan o no la emisión de fluorescencia. En particular, en la nanoscopía STED (Stimulated Emission Depletion), se produce esta transición mediante depleción por emisión estimulada, con el fin de desactivar fluoróforos en regiones controladas del espacio y de esta forma reducir el volumen efectivo de observación.

En el marco de esta tesis, y gracias a una colaboración formal y activa con Stefan W. Hell (Department of NanoBiophotonics, Max Planck Institute for Biophysical Chemistry, Göttingen, Germany), galardonado en 2014 con el premio Nobel de Química por su trabajo pionero en las nanoscopías de fluorescencia, se construyó el primer nanoscopio STED de Argentina (Grupo de Nanofísica Aplicada, Centro de Investigaciones en Bionanociencias (CIBION), Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Buenos Aires (BA), Argentina).

El nanoscopio STED se aplicó para indagar y dilucidar problemas biofísicos con resolución nanométrica. En colaboraciones interdisciplinarias se estudió: (a) la organización de proteínas en la membrana del *Trypanosoma cruzi*, en colaboración con el Grupo de Inmunología Molecular, Instituto de Investigaciones Biotecnológicas (IIB), Universidad Nacional de San Martín (UNSAM), CONICET, BA, Argentina; (b) procesos de reestructuración del citoesqueleto de los conos de crecimiento durante la polarización neuronal, en colaboración con el Laboratorio de Neurobiología, Instituto de Investigación Médica de Córdoba (INIMEC), CONICET, Córdoba, Argentina; y (c) la formación y estabilidad de estructuras periódicas de actina en procesos de degeneración axonal, en colaboración con el Laboratorio de Neurobiología, INIMEC, CONICET, Córdoba, Argentina y el Grupo de Neurobiología Molecular, Instituto de Investigación en Biomedicina de Buenos Aires (IBIOBA), CONICET, BA, Argentina.

Asimismo, se desarrolló un nuevo esquema de implementación de la nanoscopía STED que expande considerablemente su campo de aplicación. Generalmente, luz de longitud de onda situada en la zona roja lejana del espectro de emisión del fluoróforo es utilizada para

inducir el fenómeno de emisión estimulada. En esta tesis, se demuestra que STED continuo (CW) también es posible utilizando longitudes de onda de STED ubicadas en el máximo de emisión, donde la sección eficaz de emisión estimulada puede ser hasta 10 veces mayor. Como resultado, es posible obtener imágenes de STED utilizando potencias proporcionalmente menores. Además, fluoróforos que se consideraban inadecuados para ciertas configuraciones espectrales de nanoscopía STED, pueden ser utilizables.

Palabras claves: Microscopía, Nanoscopía, STED, Resolución, Superresolución.

Measurements with nanometric resolution by stimulated emission depletion

Abstract

Since the studies made by Ernst Abbe, by the end of the XIXth century, it was accepted that far field optical microscopy had a limit in its spatial resolution: objects found closer together than half the wavelength of the light used would not be distinguished apart. However, in the last two decades, a number of techniques based on fluorescence have been developed, that keep all the advantages of far-field optical microscopy and provide spatial resolution only limited by the size of the fluorescent marker. These techniques are called super-resolution fluorescence microscopies or fluorescence nanoscopies and they involve the transition between molecular states of the fluorophores that allow or not fluorescence emission. Particularly, in STED (Stimulated Emission Depletion) nanoscopy, this transition is produced by stimulated emission depletion, in order to disable fluorophores in controlled regions of space and thereby reduce the effective volume of observation.

In the framework of this thesis, and supported by a formal and active collaboration with Stefan W. Hell (Department of NanoBiophotonics, Max Planck Institute for Biophysical Chemistry, Göttingen, Germany), awarded in 2014 with the Nobel Prize in Chemistry for his pioneering work in fluorescence nanoscopies, the first STED nanoscope of Argentina was built (Grupo de Nanofísica Aplicada, Centro de Investigaciones en Bionanociencias (CIBION), Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Buenos Aires (BA), Argentina).

The STED nanoscope was applied to investigate and elucidate biophysical questions with nanometric resolution. In interdisciplinary collaborations it was studied: (a) the organization of proteins in the membrane of *Trypanosoma cruzi*, in collaboration with the Group of Molecular Immunology, Instituto de Investigaciones Biotecnológicas (IIB), Universidad Nacional de San Martín (UNSAM), CONICET, BA, Argentina; (b) processes of cytoskeleton restructuring in growth cones during neuronal polarization, in collaboration with the Laboratory of Neurobiology, Instituto de Investigación Médica de Córdoba (INIMEC), CONICET, Córdoba, Argentina; and (c) the formation and stability of periodic structures of actin in the process of axonal degeneration, in collaboration with the Laboratory of Neurobiology, INIMEC, CONICET, Córdoba, Argentina and the Group of Molecular Neurobiology, Instituto de Investigación en Biomedicina de Buenos Aires (IBIOBA), CONICET, BA, Argentina.

Also, a new implementation scheme of STED nanoscopy was developed, which expands considerably its field of application. Generally, light of a wavelength located in the far-red

zone of the emission spectrum of the fluorophore is used to induce stimulated emission. In this thesis, it is shown that continuous wave STED (CW), is also feasible using STED wavelengths located at the maximum of emission, where the stimulated emission cross section can be up to 10 times higher. As a result, super-resolved STED images are obtained using proportionally less power. Also, fluorophores considered unsuitable for certain spectral configurations of STED nanoscopy, may become usable with this scheme.

Keywords: Microscopy, Nanoscopy, STED, Resolution, Super-resolution.

Índice general

1. Introducción **9**

1.1. Microscopía óptica de campo lejano 11

1.1.1. Formación de imagen - Límite de resolución 11

1.1.2. Fluorescencia 13

1.1.3. Microscopía de fluorescencia 14

1.1.4. Mejoras en la resolución 16

1.2. Nanoscopía de fluorescencia de campo lejano 18

1.2.1. Técnicas estocásticas 19

1.2.2. Técnicas dirigidas 21

1.3. Motivación y organización de la tesis 24

2. Nanoscopía mediante depleción por emisión estimulada **27**

2.1. Conceptos fundamentales 28

2.1.1. Cinética de población 28

2.1.2. Resolución 30

2.1.3. Sección eficaz de emisión estimulada 32

2.1.4. El nanoscopio 33

2.2. Ingeniería del foco: Imágenes en 2D y 3D 34

2.3. Láseres para STED: Pulsados y continuos 35

2.4. Fotodegradación 37

2.5. Estado del arte 38

3. Nanoscopio STED **43**

3.1. Disposición experimental 44

3.1.1. Sincronización de láseres 47

3.1.2. Configuración espectral 47

3.2. Alineación 48

3.3. Desempeño 51
3.4. Preparación de muestras biológicas 54

4. Organización de proteínas en la membrana del *Trypanosoma cruzi* 55
4.1. Mecanismos moleculares de supervivencia del *T. cruzi* 57
4.2. Preparación de muestras 58
4.3. Resultados y discusiones 59
4.4. Conclusiones y perspectivas 62

5. Arquitectura del citoesqueleto neuronal modulada por RhoA 65
5.1. Preparación de muestras 68
5.2. Resultados y discusiones 69
5.3. Conclusiones y perspectivas 74

6. Estructuras periódicas de actina en procesos de degeneración axonal 75
6.1. Preparación de muestras 78
6.2. Resultados y discusiones 78
6.3. Conclusiones y perspectivas 85

7. Nanoscopía STED con longitudes de onda en el máximo de emisión 87
7.1. Materiales y métodos 88
7.1.1. Preparación de muestras 88
7.1.2. Propiedades espectrales del Nile Red 89
7.1.3. Longitudes de onda de excitación (pulsada) y STED (CW) 91
7.1.4. Nanoscopio CW-STED 91
7.1.5. Imágenes de STED 92
7.2. Resultados y discusiones 93
7.3. Conclusiones y perspectivas 98

8. Conclusiones generales y perspectivas 101

1

Introducción

LAS propiedades de las lentes cóncavas y convexas fueron descriptas alrededor del siglo XI, pero no fue hasta finales del siglo XVI, que se desarrollaron los primeros instrumentos que permitieron la visualización de estructuras imposibles de ver con el ojo desnudo, los cuales recibieron el nombre de microscopios. Hans Jansen y su hijo Zacharias inventaron el primer microscopio compuesto, el cual estaba formado por un tubo que poseía dos lentes, cuya distancia relativa permitía modificar la magnificación. A mitad del siglo XVII Robert Hooke publicó *Micrographia*, el primer libro sobre microscopía. Su microscopio combinado es el precursor de los microscopios modernos; contaba con una platina sobre la cual se posicionaba la muestra, una fuente de iluminación y tres lentes diferentes para cambiar la magnificación [Hooke, 1665]. Hasta mitad del siglo XIX las lentes que se utilizaban en los microscopios se producían mediante prueba y error sin conocimientos fundamentales de los principios de funcionamientos. A finales del siglo XIX Ernst Abbe, en colaboración con Carl Zeiss y Otto Schott, desarrolló las bases matemáticas de la teoría de formación de imágenes y aberraciones de las lentes, lo cual permitió el correcto diseño de los microscopios y demostró que la resolución espacial de cualquier sistema óptico de imágenes, se encuentra limitada por el fenómeno de difracción de la luz a valores de alrededor de media longitud de onda [Abbe, 1873]. Estos descubrimientos fueron acompañados por una serie de hallazgos científicos sin precedentes en el campo de la biología y medicina.

La microscopía óptica se desarrolló de manera continua, incorporando nuevos métodos de contraste. El método de tinción mediante cromato de plata descubierto por Camillo Golgi a finales del siglo XIX y hecho famoso por Santiago Ramón y Cajal revolucionó el estudio de tejidos nerviosos [Ramón y Cajal, 1899]. La tinción provee contraste finito al cambiar las propiedades de absorción de diferentes estructuras celulares. En 1902 Richard Adolf Zsigmondy inventó la microscopia de campo oscuro que utiliza luz dispersada para poder observar nanopartículas coloidales cuyo diámetro es mucho menor que la longitud de onda de iluminación [Siedentopf and Zsigmondy, 1902]. A comienzos de la década de 1930 Frits Zernike desarrolló la microscopía por contraste de fase, que convierte variaciones de fase en la luz, al atravesar un espécimen transparente, en cambios de intensidad en la imagen [Zernike, 1935]. La microscopía por polarización, ideada en 1939, explota la anisotropía óptica de muestras transparentes para revelar detalles de su estructura interna [Schmidt, 1939]. En 1955 Georges Nomarski inventó la microscopía de contraste por interferencia diferencial que, basándose en el principio de interferencia, obtiene información de la longitud del camino óptico de la muestra [Nomarski, 1955]. En 1852 George Stokes describió una extensa colección de substancias fluorescentes, las cuales absorben luz, para luego emitir luz de igual o menor energía [Stokes, 1852]. La marcación con moléculas fluorescentes, es la técnica de contraste preferida en las ciencias de la vida, puesto que provee gran especificidad y contraste infinito. Además, no solamente proporciona información sobre la estructura marcada, sino que en condiciones adecuadas permite conocer el entorno en el que se encuentra, la orientación de las estructuras, la interacción con otros componentes de la muestra, dinámica, etc.

Sin embargo, la resolución espacial de todos estos métodos de contraste mejorados sigue limitada por difracción y resulta insuficiente para dilucidar problemas biológicos a nivel molecular. Los científicos, conscientes de esta limitación comenzaron a idear técnicas que permitieran visualizar dominios en la escala nanométrica. A finales de la década de 1920, Ernst Ruska, como estudiante en la Universidad Técnica de Berlín, desarrolló lentes que servían para controlar haces de electrones. Esto constituyó el primer paso en el desarrollo de la microscopia electrónica, que gracias a la longitud de onda de De Broglie, su resolución puede ser del orden de angstroms [Knoll and Ruska, 1932]. Si bien brinda una gran resolución espacial, la microscopía electrónica, no es compatible con mediciones en células vivas. Las altas energías de los electrones son inherentemente destructivas para las muestras biológicas. Además, el microscopio electrónico opera en vacío, lo cual dificulta la preparación de muestras que incluso deben ser enriquecidas con metales para mejorar el contraste. En 1981 Gerd Binnig y Heinrich Rohrer diseñaron el primer microscopio de barrido superficial con contraste por tuneleo cuántico de electrones (*Scanning Tunneling Microscope*, STM) [Binnig et al.,

1982]. Años más tarde aparecieron variantes que medían la fuerza ejercida entre una punta y la muestra (*Atomic Force Microscope*, AFM) [Binnig et al., 1986] o la interacción de luz que se generaba entre una punta y la muestra (*Near-field Scanning Optical Microscope*, NSOM) [Pohl et al., 1984]. Todas estas técnicas de microscopías de escaneo usando sondas brindan resoluciones espaciales a nivel atómico, pero se encuentran limitadas a obtener imágenes simplemente de la superficie de la muestra.

La necesidad de una técnica puramente óptica para analizar especímenes biológicos en vivo, capaz de aprovechar las ventajas de marcación que ofrece la microscopía de fluorescencia, y que pueda investigar fenómenos a nivel molecular motivó el desarrollo de los métodos que hoy se conocen como *nanoscopías de fluorescencia de campo lejano* o *microscopías de superresolución*, las cuales, sobrepasan el límite de difracción usando las propiedades fotofísicas o fotoquímicas de los marcadores fluorescentes.

En este capítulo se comenzarán describiendo las bases de la microcopia óptica de campo lejano. Se explicará qué es la resolución espacial y qué la limita. Se presentará la microscopía de fluorescencia. Se describirán los microscopios de campo amplio y confocal; cuáles son sus componentes y qué diferencia hay entre ellos. Se analizarán los primeros intentos en mejorar la resolución de un microscopio. Luego se explicará cómo se puede sobrepasar la barrera que impone la difracción sobre la resolución de un microscopio. Se describirán las dos grandes familias de nanoscopías ópticas de campo lejano; las técnicas estocásticas y las técnicas dirigidas. Finalmente se explicará la motivación y organización de esta tesis.

1.1. Microscopía óptica de campo lejano

1.1.1. Formación de imagen - Límite de resolución

Los microscopios de campo lejano utilizan lentes para generar una imagen de la muestra. Si bien es posible utilizar una única lente, los microscopios modernos emplean un sistema compuesto por múltiples lentes. En la Fig. (1.1) se puede observar el principio básico de formación de imágenes en un microscopio de campo amplio con una lente objetivo corregida a infinito (O). La muestra se posiciona en el plano focal de la lente objetivo (f_O). Puede ser iluminada de cualquier forma. La señal es colectada y colimada por el objetivo, luego enfocada en el plano imagen (PI) mediante la lente de proyección (LP). La magnificación m del microscopio está dada por el cociente entre la distancia focal del objetivo y la de la lente

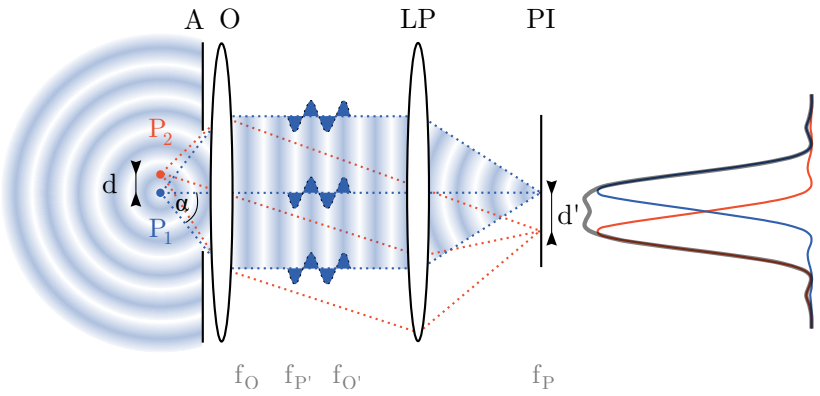


Figura (1.1): Principio de formación de imágenes en un microscopio de campo amplio con un objetivo de microscopio corregido a infinito (O). A es la abertura del objetivo. α es el ángulo de colección. Los puntos de la muestra P_1 y P_2 en el plano focal del objetivo (f_O) forman una imagen a través de la lente de proyección (LP). Debido a la naturaleza ondulatoria de la luz, cada punto de la muestra aparece como una distribución de intensidad de Airy en el plano imagen (PI). Se esquematizan las ondas electromagnéticas de P_1.

de proyección (f_{LP}).

$$m = \frac{f_{LP}}{f_O} \tag{1.1}$$

La Fig. (1.1) muestra esquemáticamente lo que ocurre al hacer imagen de un punto (P_1). La lente objetivo colecta una fracción de la luz proveniente de P_1 y la lente de proyección enfoca esta luz en el plano imagen. Debido a la naturaleza ondulatoria de la luz, las ondas electromagnéticas interfieren en el plano imagen generando un patrón de intensidad con un máximo en el punto focal, denominado *patrón de Airy* [Born and Wolf, 2000]. En 1873 Ernst Abbe descubrió que la resolución de un microscopio se encontraba limitada por ese fenómeno, dos objetos puntuales en la muestra se observarán como dos patrones de Airy en el plano imagen. Cuanto más se superpongan las imágenes, más difícil será separarlas como puntos independientes. El *límite de resolución* establece que dos objetos muy pequeños (comparados con la longitud de onda de iluminación), separados por una distancia d en la dirección lateral, no podrán ser distinguidos individualmente por un microscopio iluminando con luz de longitud de onda λ, donde n sea el índice de refracción del medio y α la mitad del ángulo de colección del objetivo [Abbe, 1873].

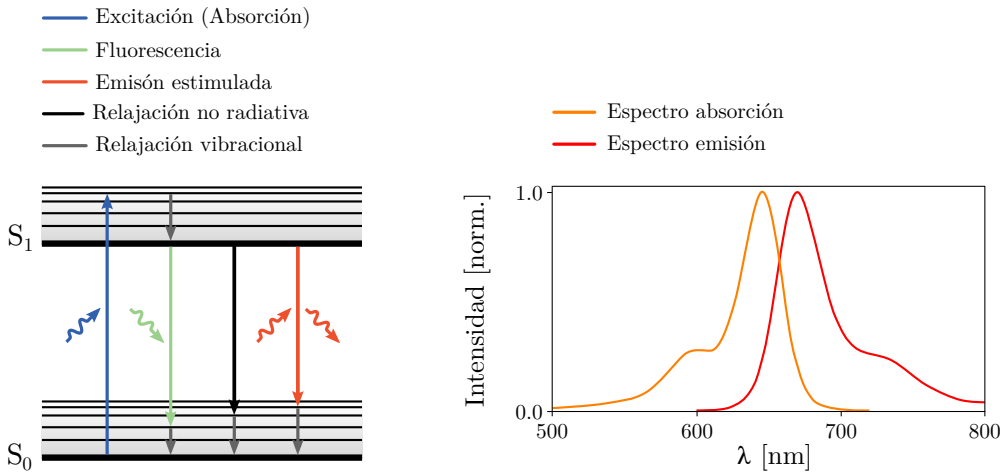
$$d = \frac{\lambda}{2n \sin \alpha} \tag{1.2}$$

Considerando un microscopio que utiliza un objetivo de inmersión en aceite cuya apertura numérica NA$= n \sin \alpha$ sea de 1,4 y que ilumina las muestras con luz en el rango visible del

espectro electromagnético $(490-650)$ nm, la Ec. (1.2) impone un límite de entre $(175-230)$ nm para la resolución lateral alcanzable con dicho microscopio.

El modelo derivado por Abbe se basa en lentes ideales, sin embargo, los microscopios modernos utilizan una combinación compleja de lentes y diferentes materiales ópticos, que pueden generar aberraciones ópticas. Uno de los parámetros más importantes que caracteriza el desempeño de un microscopio y brinda información directa sobre la resolución del mismo es lo que se conoce como la función de dispersión de un punto (*Point Spread Function*, PSF). La PSF es la imagen de un punto ideal de la muestra e incluye toda la información inherente al desempeño del sistema óptico.

1.1.2. Fluorescencia



(a) **(b)**

Figura (1.2): Fluorescencia. **(a)** Diagrama de Jablonski para un sistema de dos niveles (fundamental, S_0 y excitado, S_1). Las líneas ondeadas representan fotones y las líneas rectas transiciones electrónicas o moleculares. En color azul se muestra la excitación o absorción ($\sim fs$), en color verde la fluorescencia ($\sim ns$), en color gris la relajación vibracional ($\sim ps$), en color rojo la emisión estimulada y en color negro la relajación no radiativa ($\sim ps/ms$). **(b)** Espectros de absorción y emisión de una molécula fluorescente.

La fluorescencia es un fenómeno en el cual una substancia absorbe luz y emite luz mediante transiciones electrónicas. Como se muestra en la Fig. (1.2.a), a nivel molecular, un electrón en el estado fundamental puede ser excitado a cualquier nivel vibracional de un orbital de mayor energía, siempre y cuando la diferencia energética entre los niveles sea igual a la energía del fotón incidente. Luego de ser excitada, la molécula relajará al mínimo estado vibracional en unos pocos picosegundos, llegando a un equilibrio con su entorno. El elec-

trón excitado puede decaer al estado fundamental (i) emitiendo un fotón de fluorescencia, (ii) mediante un proceso no radiativo (calor) o (iii) a través de la emisión estimulada. La probabilidad de que se genere un decaimiento radiativo es lo que se conoce como *eficiencia cuántica*, ϕ. El tiempo de vida del estado electrónico excitado, τ_{fl}, es de unos pocos nanosegundos. Como se pierde energía a través de la relajación vibracional en el estado excitado, los fotones emitidos suelen tener menor energía que los fotones de excitación (*corrimiento Stokes*), lo cual puede apreciarse en los espectros de ejemplo de la Fig. (1.2.b). Esta propiedad es empleada en la microscopía de fluorescencia para separar la luz de excitación de la de emisión y obtener gran contraste en las imágenes.

1.1.3. Microscopía de fluorescencia

En esta sección [1.1.3] se detallarán los dos pilares fundamentales en los cuales se sustenta la microscopía de fluorescencia: (i) un instrumento capaz de realizar imágenes, el cual puede ser de campo amplio o confocal y (ii) una muestra marcada específicamente con moléculas fluorescentes.

Instrumentación - Campo amplio y confocal

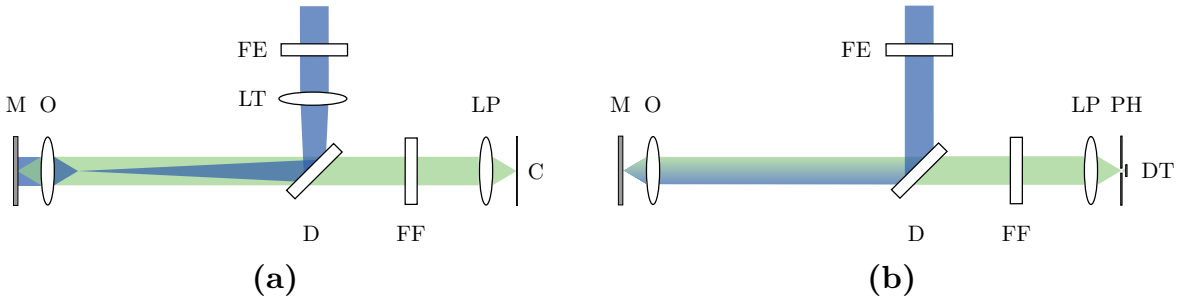


Figura (1.3): Diagrama de un microscopio de fluorescencia (a) de campo amplio y (b) confocal. FE: filtro de excitación, LT: lente de tubo, D: espejo dicroico, O: objetivo corregido a infinito, M: muestra, FF: filtro de fluorescencia, LP: lente de proyección, C: cámara, PH: Pinhole y DT: detector.

En un microscopio de fluorescencia, se separa la luz de excitación de la de detección mediante un espejo dicroico (D). Existen dos formas de implementación: la microscopia de campo amplio y la confocal.

En la Fig. (1.3.a) se observa el diagrama de un microscopio de fluorescencia de campo amplio. Como fuente de luz de excitación se utiliza una lámpara, un láser o un diodo emisor de luz (*Light Emitting Diode*, LED). Si se utiliza una lámpara, se define el ancho espectral

mediante un filtro de excitación (FE). Una lente de tubo (LT), ubicada a su distancia focal del plano focal conjugado del objetivo (O), enfoca la luz, la cual ilumina una amplia región de la muestra (M). La señal de fluorescencia es colectada mediante el objetivo y atraviesa un espejo dicroico. Un filtro de fluorescencia (FF) selecciona la región espectral de observación y la lente de proyección (LP) enfoca cada punto de la muestra en la cámara, formando así una imagen.

En la Fig. (1.3.b) se observa el diagrama de un microscopio confocal. Generalmente se utiliza un láser como fuente de iluminación. La luz de excitación entra colimada al objetivo, y es enfocada sobre la muestra, dando lugar a un volumen de iluminación muy reducido. La fluorescencia es colectada por el objetivo, atraviesa el espejo dicroico, el filtro de fluorescencia y mediante una lente de proyección es enfocada en una abertura (*Pinhole*, PH) justo delante de un detector (DT). Dicha abertura se elige de tal forma que su imagen sobre la muestra sea del mismo tamaño que el volumen de excitación ($\mathrm{PSF}_{\mathrm{exc}}$). De esta manera, el volumen efectivo de detección ($\mathrm{PSF}_{\mathrm{det}}$) queda reducido, principalmente en la dirección axial, rechazando luz que proviene de otros planos y brindando gran seccionamiento óptico al microscopio. La PSF resultante surge de la multiplicación entre el volumen de excitación y el de detección, considerando que son similares, el volumen focal se reduce aproximadamente $\sqrt{2}$ veces. Luego, se realiza un barrido del foco sobre cada punto de la muestra, lo cual puede llevarse a cabo montando la muestra en una platina motorizada o mediante un sistema de escaneo con espejos galvanométricos que muevan el haz. En ambos casos, se mapea la intensidad de fluorescencia con la posición.

Marcación

Existen numerosas estrategias para marcar fluorescentemente una muestra [Valeur and Berberan-Santos, 2012]. En el caso de muestras biológicas, se requieren protocolos que unan un marcador fluorescente a componentes específicos, como, por ejemplo, proteínas, lípidos, ácidos nucleicos, etc. El primer enfoque que se desarrolló fue la técnica de anticuerpos fluorescentes en la década de 1940 [Coons et al., 1941]. Los anticuerpos se unen muy específicamente a proteínas y pueden ser decorados con moléculas fluorescentes. La inmunomarcación es una técnica muy usual en la biología, aunque no es compatible con el trabajo en células vivas. En 1994 se desarrolló un método que ha revolucionado la biología celular y tuvo su origen con el descubrimiento y posterior clonación de la proteína fluorescente verde (*Green Fluorescent Protein*, GFP) expresada en la medusa *Aequorea Victoria*. A partir de este punto, fue posible fusionar proteínas fluorescentes con casi cualquier otra proteína, permitiendo que permaneciera inalterada su función original. La información de GFP puede ser incluso incor-

porada en el genoma de líneas celulares o de animales, logrando que estas células expresen la proteína quimera [Chalfie, 1994]. En las últimas dos décadas se han desarrollado proteínas fluorescentes con múltiples propiedades espectroscópicas y sensibilidad química [Matz et al., 1999, Patterson and Lippincott-Schwartz, 2002, Ando et al., 2002, Shaner et al., 2004].

1.1.4. Mejoras en la resolución

En esta sección [1.1.4] se presentan un conjunto de técnicas, que junto con la microscopía confocal (sección [1.1.3]), constituyen los primeros intentos por mejorar la resolución de la microscopía óptica de campo lejano.

Microscopia multi-fotónica

La microscopía multi-fotónica se basa en la excitación de moléculas fluorescentes por medio de la absorción simultánea de dos (o más) fotones. Esto solamente puede ocurrir si la suma de las energías de los dos (o más) fotones es igual que la diferencia de energía entre los niveles electrónicos fundamental y excitado de la molécula [Huang et al., 2009]. La probabilidad de absorción de dos fotones de una molécula fluorescente depende cuadráticamente con la radiación de excitación (tres fotones: cúbicamente, etc.). Como consecuencia, la resolución en la direccional axial disminuye considerablemente, eliminando contribuciones de fluorescencia del fondo fuera de foco, lo cual permite realizar seccionamiento de imágenes para su posterior reconstrucción en 3 dimensiones. Debido a que la excitación de fluorescencia generalmente se realiza con longitudes de onda en el rango infra-rojo del espectro electromagnético, la resolución lateral (Ec. (1.2)) es menor a la que se obtiene al utilizar luz en el rango visible. Sin embargo, las altas longitudes de onda utilizadas dañan mucho menos y penetran mucho más los tejidos que aquellas utilizadas en microscopía de fluorescencia por excitación de un fotón.

Microscopía 4Pi

De la Ec. (1.2) es evidente que la forma natural de aumentar la resolución de un microscopio es aumentando la apertura numérica del sistema. Una manera de realizar esto es utilizando dos objetivos, opuestos y perfectamente alineados de forma tal que ambos se encuentren enfocados en la misma zona geométrica de la muestra. El ángulo sólido de iluminación y detección se duplica. De esta forma, las moléculas que se encuentren en la región focal común a los dos objetivos podrán ser iluminadas coherentemente de ambos lados y la fluorescencia emitida podrá ser detectada coherentemente logrando resoluciones axiales del

orden de 100 nm. La implementación de esta idea mediante microscopía confocal se conoce como 4Pi y mediante microscopia de campo amplio como I^{5}M [Bewersdorf et al., 2006].

Microscopía mediante iluminación estructurada

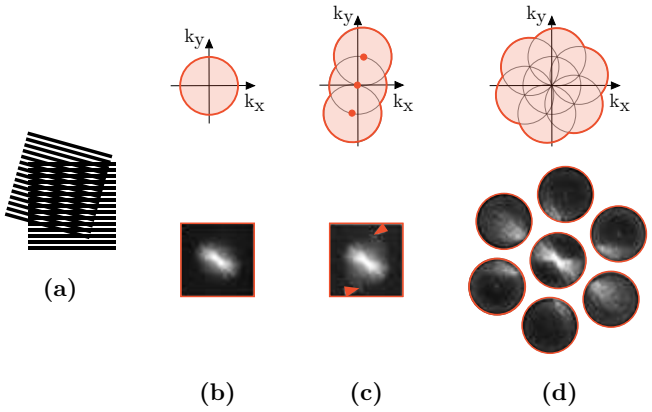


Figura (1.4): Microscopía mediante iluminación estructurada. (a) Si dos patrones son superpuestos, su multiplicación tendrá patrones de Moiré (franjas verticales). **(b)** Región de observación en el espacio recíproco de un microscopio limitado por difracción y transformada de Fourier de una imagen obtenida con un microscopio mediante iluminación homogénea. **(c)** Si la muestra es iluminada con un patrón sinusoidal de luz, en la región de observación en el espacio recíproco aparecen dos nuevas componentes. La transformada de Fourier de una imagen mediante iluminación estructurada contiene, además de información dentro de la región de observación, información desplazada de otras regiones superpuestas con la información normal (flechas). **(d)** De una secuencia de dichas imágenes con diferente orientación y fase del patrón, es posible reconstruir información de un área del doble de tamaño que la región normal de observación, lo cual implica el doble de resolución.

El concepto detrás de la microscopía por iluminación estructurada (*Structured Illumination Microscopy*, SIM) [Gustafsson, 2000] puede ser entendido en términos del conocido efecto de Moiré, por medio del cual, si dos patrones de líneas paralelas son superpuestos multiplicativamente, se formará un batido conocido como patrón de Moiré, tal como se observa en la Fig. (1.4.a). En este ejemplo, uno de los patrones corresponde a la muestra que se quiere analizar en el microscopio y el segundo patrón corresponde a la excitación de luz estructurada. Como puede verse en la Fig. (1.4.a), el patrón de Moiré puede ser mucho más grueso que cualquiera de los dos patrones originales y, consecuentemente, podría ser observable a través del microscopio, aún si uno de los patrones fuera demasiado fino como para ser resuelto. El patrón de Moiré contiene información sobre la estructura de la muestra que no se conoce y como el patrón de iluminación es conocido, se puede reconstruir información de la muestra con mayor resolución.

Una forma alternativa de expresar el límite de resolución (d) consiste en utilizar el espacio recíproco a través de la transformada de Fourier. El objetivo del microscopio cumple la función de un filtro pasa-bajos que elimina todas las altas frecuencias que contienen información de alta resolución y la región de observación a través de dicho objetivo se representa mediante un círculo de radio $^1/_d$, como se observa en la Fig. (1.4.b).

Si en vez de iluminar la muestra con un patrón de intensidad homogénea, se utiliza un patrón de intensidad sinusoidal, en el espacio recíproco se definen 3 componentes cuya posición se encuentra limitada por el circulo que define la región de observación. Uno de dichos puntos estará centrado en el origen y los otros dos estarán desfasados del origen en una dirección definida por el patrón de iluminación y una distancia proporcional a la inversa del espaciamiento entre franjas. Cuando la muestra es iluminada con este patrón estructurado, la imagen que se observa a través del microscopio, contiene además de la imagen normal, patrones de Moiré correspondientes a la información que se origina en esas dos regiones desfasadas en el espacio recíproco, como se muestra en la Fig. (1.4.c) . El área de dichos círculos que reside fuera de la región normal de observación representa nueva información que no es accesible mediante microscopía convencional.

La imagen observada es la suma de esas tres contribuciones y no es posible de separar utilizando una sola imagen. Sin embargo, los coeficientes mediante las cuales se suman dependen de la fase del patrón de iluminación. Al realizar tres imágenes de la muestra con tres fases diferentes, las componentes se pueden separar computacionalmente y recombinar en su posición adecuada, para luego transformarlas al espacio real. Como se observa en la Fig. (1.4.d), de una secuencia de dichas imágenes con el patrón de iluminación en diferentes orientaciones es posible reconstruir la información de un área del espacio recíproco cuyo tamaño sea el doble de la región normal de observación, lo cual se traduce en el doble de resolución ~ 100 nm en la dirección lateral.

1.2. Nanoscopía de fluorescencia de campo lejano

Las técnicas puramente ópticas presentadas en la sección [1.1.4] constituyen una leve mejora en la resolución, pero sin embargo, se encuentran fundamentalmente limitadas por la difracción de la luz. Las nanoscopías de fluorescencia de campo lejano, en cambio, no lo están. El concepto fundamental detrás de estas técnicas reside en la conmutación transitoria entre (al menos) dos estados distinguibles, típicamente un estado emisor (fluorescencia "*on*") y un estado no emisor (fluorescencia "*off*"). Fluorescencia "*off*" se puede referir al estado de un fluoróforo que efectivamente no puede emitir fotones de fluorescencia, o a un estado que emite

en una región espectral no detectada en el experimento. Esta conmutación entre estados ("*on-off*") permite distinguir fluoróforos, incluso cuando se encuentran más próximos entre sí que la distancia que establece el límite de difracción. Dependiendo la forma de implementación, existen dos grandes familias de técnicas de nanoscopías de fluorescencia de campo lejano: ténicas estocásticas [1.2.1] y técnicas dirigidas [1.2.2].

1.2.1. Técnicas estocásticas

Una imagen de microscopía fluorescente puede ser definida mediante las coordenadas espaciales de los fluoróforos que marcan la estructura que se desee analizar. Las técnicas de nanoscopías ópticas estocásticas se basan en la determinación con gran precisión de la posición de cada molécula fluorescente presente en la muestra (Fig. (1.5)). Si bien la imagen de una molécula individual producida por un microscopio de campo amplio tiene una forma y tamaño definida por la PSF del sistema óptico (d_{CA}), la precisión con la cual se puede determinar su posición es mucho mayor que el límite establecido por la difracción de la luz. Si se registran N fotones emitidos por una molécula, la precisión de su localización, d_{TE}, se encuentra definida como expresa la Ec. (1.3) [Ober et al., 2004, Rieger and Stallinga, 2014, Smith et al., 2010].

$$d_{\mathrm{TE}} \approx \frac{d_{\mathrm{CA}}}{\sqrt{N}} \tag{1.3}$$

Una estructura biológica marcada fluorescentemente posee miles o millones de fluoróforos densamente distribuidos, lo cual imposibilita su localización individual debido a que las imágenes de dichas moléculas se superponen espacialmente, como se muestra en la Fig. (1.5.b). Utilizando sondas fluorescentes que puedan ciclar entre un estado emisor (fluorescencia "*on*") y un estado no emisor (fluorescencia "*off*") esta limitación puede ser sorteada al separar temporalmente las imágenes. Las moléculas dentro de una región limitada por difracción pueden ser activadas en diferentes tiempos, detectadas de forma individual y localizadas (Fig. (1.5.c,d y e). De esta forma, es posible reconstruir una imagen con resolución nanométrica (Fig. (1.5.f)).

Existen diferentes mecanismos de transición entre estados "*on-off*" que dan lugar a diferentes técnicas estocásticas. PALM se basa la fotoactivación de proteínas fluorescentes [Betzig et al., 2006], PAINT en la unión a través de la cinética de hibridización de ADN [Jungmann et al., 2010, Sharonov and Hochstrasser, 2006] y STORM en la transferencia de los fluoróforos a un estado oscuro estable y reversible cuyo tiempo de vida oscile entre cientos de milisegundos y varios segundos [Rust et al., 2006, van de Linde et al., 2011].

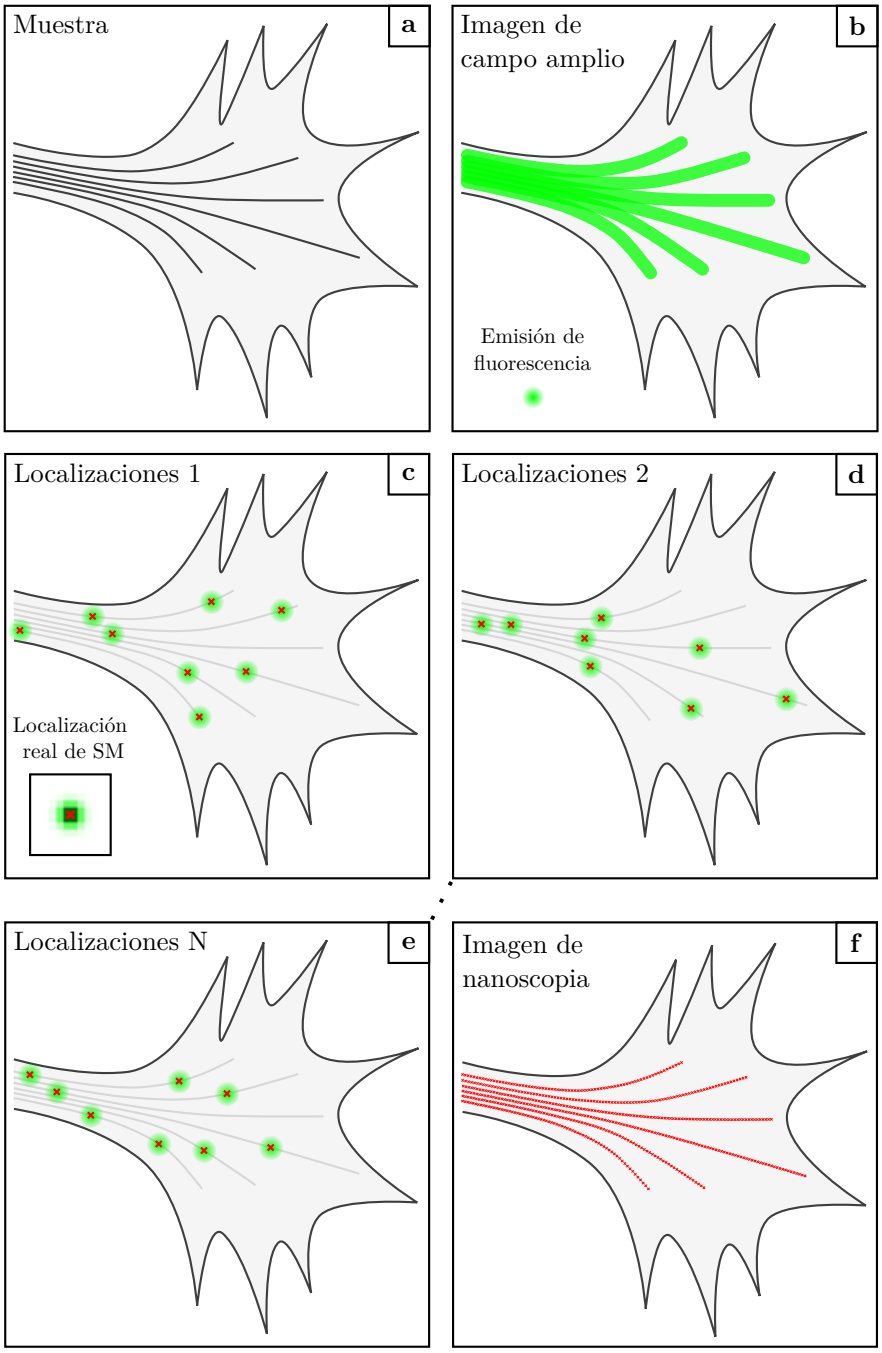


Figura (1.5): Técnicas estocásticas. Sondas fluorescentes marcando la estructura de la muestra son activadas a diferente tiempo. Esto permite obtener una imagen de solamente un subgrupo de fluoróforos que no se superponen espacialmente y que pueden ser localizados con gran precisión. Iterando el proceso de activación e imagen y se logra obtener la posición de una gran cantidad de fluoróforos y la posterior reconstrucción de una imagen con resolución nanométrica. **(a)** Muestra. **(b)** Imagen de campio amplio. **(c)**, **(d)** y **(e)** Localizaciones sucesivas. **(f)** Imagen de nanoscopia.

1.2.2. Técnicas dirigidas

Las técnicas dirigidas requieren que la transición "*on-off*" sea impulsada por luz mediante un patrón de luz que determina precisamente las coordenadas de la muestra en la cual los fluoróforos podrán emitir fluorescencia. Para ello, se superponen (al menos) dos haces. Uno de ellos, de la misma forma que en la microscopia confocal, transfiere los fluoróforos que se encuentran en una región limitada por difracción a un estado electrónico excitado ("*on*") del cual pueden decaer emitiendo fotones de fluorescencia. El otro haz, llamado de *depleción*, transfiere los fluoróforos a un estado desde el cual no pueden emitir fluorescencia detectable ("*off*"). El frente de onda del haz de depleción se manipula espacialmente (utilizando retardadores de fase o moduladores espaciales), de forma tal que cuando es enfocado, presenta interferencia destructiva (cero intensidad) en el centro, como se observa en la Fig. (1.6.a). Sin embargo, dicho patrón también se encuentra limitado por la difracción de la luz, por lo tanto, su efecto no alcanza para obtener imágenes con resoluciones por debajo del límite de difracción. La clave, reside en la dependencia no lineal de la población depletada con la intensidad del haz de depleción. Si dicha intensidad supera cierto umbral (I_s), esencialmente toda la emisión de fluorescencia espontánea se suprime. Al incrementar la intensidad de depleción, la región de depleción saturada se expande sin afectar la emisión de la fluorescencia del centro del foco (ver Fig. 1.6.a). Consecuentemente, se reduce el volumen efectivo de emisión de fluorescencia a una zona alrededor del centro del foco.

La resolución en las técnicas de nanoscopías dirigidas d_{TD} se expresa como se muestra en la Ec. (1.4).

$$d_{\mathrm{TD}} \approx \frac{d_{\mathrm{c}}}{\sqrt{1+\frac{I}{I_s}}} \tag{1.4}$$

donde d_{c} es la resolución limitada por difracción del microscopio confocal, I es la intensidad del haz de depleción e I_s es la intensidad de saturación de la transición "*on-off*" (la cual depende inversamente con el tiempo de vida del estado "*on*" y de la sección eficaz del fenómeno de depleción involucrado) [Hell, 2003]. Imágenes con super-resolución se obtienen cuando el nivel de saturación I/I_s es mayor que uno.

Las técnicas de nanoscopías dirigidas son altamente atractivas debido a su gran velocidad de adquisición en comparación con las técnicas estocásticas, lo cual facilita, realizar mediciones *en vivo* o analizar procesos dinámicos. Además, la información obtenida no requiere ninguna clase de post-procesamiento computacional o matemático.

Existen una variedad de procesos moleculares que brindan transiciones fotoquímicas o fotofísicas útiles para nanoscopía dirigida; STED, GSD y RESOLFT.

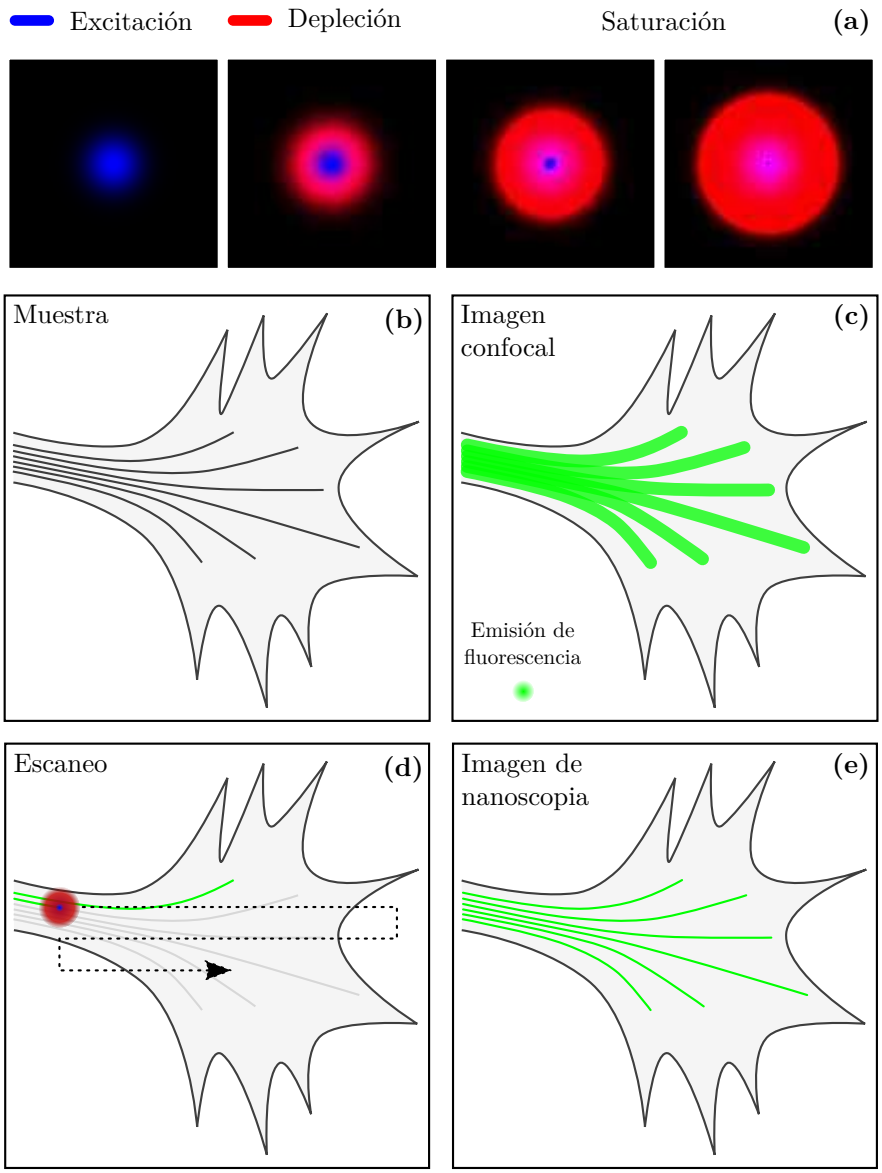


Figura (1.6): Técnicas dirigidas. **(a)** En azul se muestra el haz de excitación con un perfil de intensidad Gaussiano y en rojo el haz de depleción con un perfil de intensidad tal que en el centro hay un mínimo. A medida que se incrementa la intensidad del haz de depleción, disminuye la región central desde la cual las moléculas podrán emitir fotones fluorescentes. **(b)** Muestra. **(c)** Imagen confocal. **(d)** Escaneo de la muestra con la superposición del haz de excitación y depleción. **(e)** Imagen de nanoscopía.

Depleción por emisión estimulada, STED

Como se muestra en la Fig. (1.7.a), utiliza la emisión estimulada (más detalle en la sección [2]) para ciclar entre el primer estado electrónico excitado "*on*" de un fluoróforo y el estado fundamental "*off*". Se requieren intensidades del orden de $^{MW}/_{cm^2}$ del haz de depleción para obtener resoluciones nanométricas.

Depleción del estado fundamental, GSD

En la Fig. (1.7.b) se muestra un diagrama energético que esquematiza las transiciones electrónicas y moleculares que se aprovechan en esta variante. El haz de depleción satura fuertemente la excitación del estado fundamental (S_0) al excitado (S_1) de forma tal que los fluoróforos son atrapados en el estado triplete (T_1) mediante un entrecruzamiento no radiativo [Hell and Kroug, 1995]. Esto se debe al largo tiempo de vida media de T_1 ($\tau_T \approx \mu s - ms$). Luego, se apaga el haz de depleción y los fluoróforos que se encontraban en el centro del mismo, son leídos mediante un haz Gaussiano co-alineado ($\tau_{fl} \approx 4ns$). Finalmente, luego de τ_T todos los fluoróforos retornan al estado fundamental [Rittweger et al., 2009b]. Una limitación intrínseca de esta técnica es que el tiempo de medición en cada pixel no puede ser menor al tiempo de relajación del fluoróforo desde el estado triplete. Antes de que el haz cambie de posición, se debe esperar a que todas las moléculas estén de vuelta en el estado fundamental para que puedan ser detectadas [Bretschneider et al., 2007]. Se requieren intensidades del orden de $^{kW}/_{cm^2}$ del haz de depleción para obtener super-resolución [Hell and Kroug, 1995, Hell, 2007, Bretschneider et al., 2007, Fölling et al., 2008, Rittweger et al., 2009b].

Transición de fluorescencia óptica saturable y reversible, RESOLFT

La transición "*on-off*" se debe a una foto-isomerización cis-trans [Hell, 2003, Hell, 2009, Hell et al., 2004, Hofmann et al., 2005]. Como se muestra en la Fig. (1.7.c), la implementación más exitosa de esta técnica se llevó a cabo utilizando la proteína fluorescente Dronpa-M159T [Testa et al., 2012, Testa et al., 2014]. Se prepara el estado "*on*" utilizando un haz de 405 nm con un perfil de intensidad gaussiana (40 μs). Las moléculas en la periferia son llevadas al estado "*off*" mediante un haz de 491 nm con forma de dona (40 ms). Las moléculas que permanecieron en el estado "*on*" son llevadas a fluorescer mediante un haz de 491 nm con un perfil de intensidad gaussiano (40 μs). Se requieren intensidades del orden de $^{W}/_{cm^2}$ del haz de depleción para obtener resoluciones nanométricas. Estas bajas intensidades, la convierten en una técnica especialmente atractiva para realizar imágenes en vivo (menor

fototoxicidad) y para paralelizar (utilizar múltiples focos simultáneamente y de esta forma reducir los tiempos de adquisición) [Chmyrov et al., 2013].

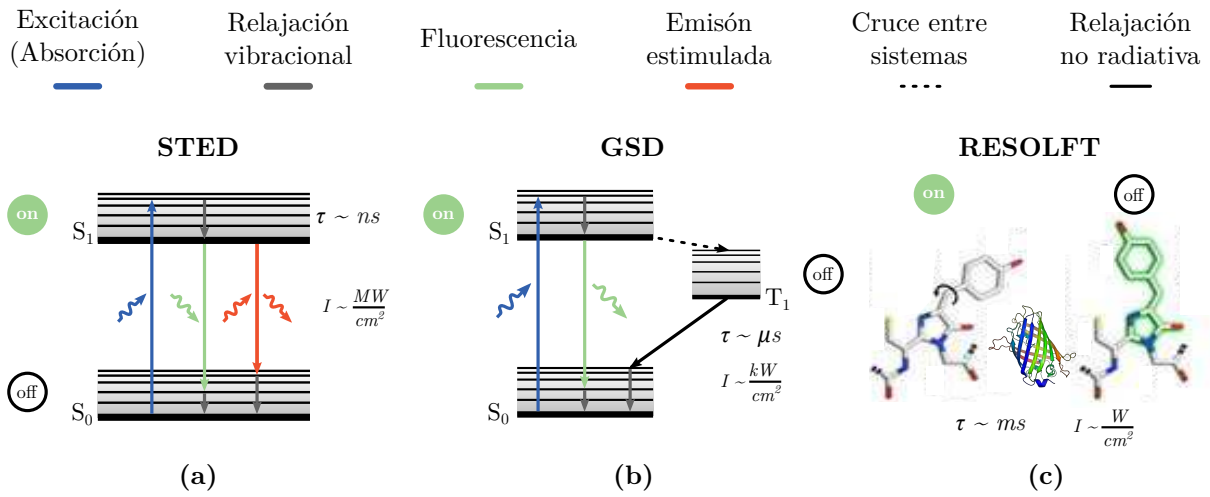


Figura (1.7): Técnicas dirigidas. Diagramas de Jablonski y configuración conformacional de diferentes mecanismos que dan lugar a técnicas de nanoscopías dirigidas. **(a)** STED. **(b)** GSD. **(c)** RESOLFT.

1.3. Motivación y organización de la tesis

Las microscopías de superresolución son metodologías recientes, en continuo proceso de investigación y desarrollo, que encuentran cada vez más aplicaciones en las ciencias de la vida. Sin embargo, a pesar de su enorme potencial de aplicación, la nanoscopía mediante depleción por emisión estimulada (STED) no estaba disponible en Argentina. En esta tesis, se ha encarado este desafío.

Se comienza formulando los conceptos fundamentales [2.1] sobre los que se sustenta la técnica, se describe cómo realizar imágenes en dos y en tres dimensiones [2.2], se exponen las diferentes tecnologías de láseres [2.3] y cómo su elección afecta en la resolución del nanoscopio, se explica porque la fotodegradación [2.4] de los fluoróforos puede comprometer la calidad de las imágenes y finalmente se muestra el estado del arte [2.5] de la técnica.

Se describe el nanoscopio STED implementado en el Centro de Investigaciones en Bionanociencias (CIBION). Se detalla la disposición experimental [3.1], la metodología de alineación [3.2], se demuestra su desempeño [3.3], y finalmente se explica cómo preparar muestras biológicas [3.4].

El nanoscopio STED diseñado en el CIBION se aplica para indagar problemas biofísicos con resolución nanométrica a través de colaboraciones interdisciplinarias. En particular, se

estudió [4] la organización de proteínas en la membrana del *Trypasosoma cruzi*, [5] la arquitectura del citoesqueleto neuronal modulada por RhoA y [6] estructuras periódicas de Actina en procesos de degeneración axonal.

A través de una colaboración con el departamento de nanobiofotónica del Instituto Max-Planck de Biofisicoquímica, Gotinga, Alemania, se desarrolló un nuevo esquema de implementación de la nanoscopía STED [7] que expande considerablemente su campo de aplicación al demostrar que es posible obtener súper-resolución utilizando longitudes de onda de depleción en el máximo de emisión del fluoróforo.

Finalmente se detallan las conclusiones y perspectivas generales [8].

2

Nanoscopía mediante depleción por emisión estimulada

LA nanoscopía STED fue propuesta en 1994 por Stefan Hell y Jan Wichmann [Hell and Wichmann, 1994] e implementada por Thomas Klar y Stefan Hell en 1999 [Klar and Hell, 1999]. Se basa en el fenómeno de emisión estimulada mediante el cual un fotón con una determinada energía interactúa con un electrón que se encuentra en un estado molecular excitado, forzando a que decaiga a un nivel energético menor. Dicha liberación de energía genera un fotón con igual longitud de onda, dirección, fase y polarización que el fotón incidente.

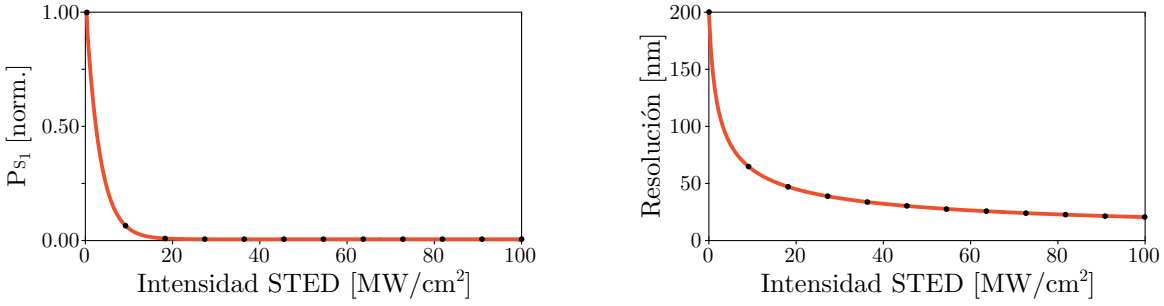
En la Fig. (1.7.a) se muestra un diagrama energético que esquematiza el concepto de la emisión estimulada. El fluoróforo es excitado desde el estado fundamental S_0 a un estado vibracional del primer estado electrónico excitado S_1. Luego de algunos picosegundos el electrón decae al estado vibracional de menor energía, desde el cual la molécula emite un fotón de fluorescencia luego de algunos nanosegundos. Esta emisión espontánea puede ser suprimida a través de la emisión estimulada, que permite depletar el estado S_1, forzando ópticamente la molécula al estado S_0 luego de su excitación. Al incrementar la intensidad del haz de desexcitación, el estado excitado S_1 se depletará mucho más probablemente, es decir,

la molécula residirá menos tiempo en dicho estado. Por lo tanto, el fluoróforo se encontrará básicamente confinado al estado S_0, lo que es equivalente a apagar la habilidad de la molécula de fluorescer.

En este capítulo [2] se definirán, en primer lugar, los conceptos fundamentales sobre los cuales se basa la nanoscopía STED [2.1]. Luego se describirá cómo modificar espacialmente el foco, de forma tal de obtener imágenes en dos dimensiones (2D) y en tres dimensiones (3D) [2.2]. Se discutirán las modalidades de STED pulsadas y continuas. Se explicará cómo la fototoxicidad del fluoróforo [2.4] puede afectar la calidad de las imágenes y finalmente se expondrá el estado del arte de la técnica [2.5], haciendo referencia a los avances más importantes que se produjeron en la última década.

2.1. Conceptos fundamentales

Se derivarán los fundamentos sobre los que se sustenta la nanoscopía STED. Se comienza deduciendo la expresión para la cinética de población de los estados electrónicos moleculares [2.1.1] y para la resolución del nanoscopio [2.1.2]. En ambos casos se considerará un sistema de STED pulsado. Luego se presentará la formulación de la sección eficaz de emisión estimulada en función de la longitud de onda [2.1.3] y finalmente se describirá la configuración esquemática y espectral del nanoscopio STED [2.1.4].



(a) **(b)**

Figura (2.1): Conceptos fundamentales de la nanoscopía STED. **(a)** Probabilidad de población del estado excitado en función de la intensidad del haz de STED. **(b)** Resolución en función de la intensidad del haz de STED.

2.1.1. Cinética de población

Se deriva la expresión que gobierna la inhibición de señal de fluorescencia detectada en presencia del haz de STED a través del análisis de la fotofísica de un fluoróforo [Klar et al.,

2000, Dyba and Hell, 2002, Dyba et al., 2005, Leutenegger et al., 2010, Vicidomini et al., 2011].

La emisión de fluorescencia es proporcional a la población del primer estado excitado. Se supone que: (i) el marcador fluorescente puede ser descrito mediante un modelo energético de dos niveles, como se muestra en la Fig. (1.7.a); fundamental S_0 y excitado S_1. Los estados oscuros (tripletes) son despreciables. (ii) la probabilidad de excitar un marcador fluorescente con el haz de STED es despreciable. El par de ecuaciones diferenciales que gobierna la cinética de población de los estados fundamental y excitado se puede expresar como

$$\begin{aligned} \frac{\mathrm{dP_{S_0}}}{\mathrm{dt}} &= -k_{\mathrm{exc}}\mathrm{P_{S_0}} + k_{\mathrm{fl}}\mathrm{P_{S_1}} + k_{\mathrm{STED}}\mathrm{P_{S_1}} + k_{\mathrm{NR}}\mathrm{P_{S_1}} \\ \frac{\mathrm{dP_{S_1}}}{\mathrm{dt}} &= +k_{\mathrm{exc}}\mathrm{P_{S_0}} - k_{\mathrm{fl}}\mathrm{P_{S_1}} - k_{\mathrm{STED}}\mathrm{P_{S_1}} - k_{\mathrm{NR}}\mathrm{P_{S_1}} \end{aligned} \tag{2.1}$$

donde $\mathrm{P_{S_0}}$ y $\mathrm{P_{S_1}}$ son las probabilidades de encontrar al fluoróforo en el estado $\mathrm{S_0}$ y $\mathrm{S_1}$ respectivamente. $k_{fl} = {}^1\!/_{\tau_{fl}}$ es la constante de velocidad de emisión espontánea dada por el tiempo de vida de fluorescencia del estado excitado τ_{fl} en ausencia del haz de STED y de procesos no radiativos (NR). $k_{\mathrm{STED}} = \sigma_{se} I_{\mathrm{STED}}$ es la pseduo constante de velocidad de emisión estimulada dada por la sección eficaz de emisión estimulada σ_{se} y la intensidad del haz de STED I_{STED}. $k_{\mathrm{exc}} = \sigma_{\mathrm{abs}} I_{\mathrm{exc}} \, ({}^{Tr}\!/_{Tp})$ es la tasa de excitación (asumiendo pulsos rectangulares con intensidad constante durante su duración) dada por la sección eficaz de absorción σ_{abs}, la intensidad de excitación I_{exc}, el tiempo entre 2 pulsos consecutivos T_r y el ancho temporal de los pulsos T_p. k_{NR} es la tasa de emisión mediante procesos no radiativos. Las intensidades están en unidades de fotones por unidad de área y por unidad de tiempo. En presencia del haz de STED y de procesos no radiativos, el tiempo de vida del estado excitado $\tau = {}^1\!/_{(k_{fl} + k_{\mathrm{STED}} + k_{\mathrm{NR}})}$ disminuye al aumentar la I_{STED}.

Para resolver la Ec. (2.1) se asume que: (i) La frecuencia de repetición del láser ($f = {}^1\!/_{T_r}$) es tal que los fluoróforos excitados pueden relajar al estado fundamental antes de que otro pulso de excitación llegue. En este caso, las condiciones iniciales son las mismas al comienzo de cada ciclo de excitación, consecuentemente el estudio de un solo período es suficiente. A tiempo $t = 0$; $\mathrm{P_{S_0}}(0) = 0$ y $\mathrm{P_{S_1}}(0) = 1$. (ii) La intensidad de excitación es suficientemente baja, de manera de evitar la saturación de la transición $\mathrm{S_0} \rightarrow \mathrm{S_1}$. (iii) La fluorescencia emitida durante los cortos tiempos (decenas, centenas de picosegundos) entre el pulso de excitación y el de STED puede ser despreciada. Se deriva que la probabilidad de encontrar al fluoróforo en el estado excitado luego de la incidencia de un pulso de STED con un ancho temporal de

τ_{STED} es proporcional a

$$\mathrm{P}_{\mathrm{S}_1} \propto e^{-\tau_{\mathrm{STED}}\sigma_{se}I_{\mathrm{STED}}} \tag{2.2}$$

En la Fig. (2.1.a) se puede observar el gráfico de la dependencia de la probabilidad de población del estado excitado en función de la intensidad del haz de STED. La relación no lineal que se presenta en la Ec. (2.2) entre la probabilidad de población del estado excitado y la intensidad del haz de STED es fundamental para obtener resoluciones por debajo de lo que establece el límite de difracción.

2.1.2. Resolución

Se deriva la expresión que describe los datos experimentales de resolución de un nanoscopio STED [Westphal and Hell, 2005, Harke et al., 2008a, Vicidomini et al., 2011].

El factor de supresión $\eta(r)$ se define como la fracción de señal de fluorescencia detectada en la posición r en presencia de la luz de inhibición $I_{\mathrm{STED}}(r)$

$$\eta(r) \cong e^{-\ln(2)\left(\frac{I_{\mathrm{STED}}(r)}{I_S}\right)} \tag{2.3}$$

donde $I_S = {}^1/_{(\sigma_{se}\tau_{fl})}$ es la intensidad de saturación, definida como la intensidad a la cual la probabilidad de emisión de fluorescencia se reduce a la mitad. Es evidente que el factor de supresión depende de la forma del patrón focal de inhibición. La distribución de intensidades de un haz con forma de dona puede expresarse como

$$I_{\mathrm{STED}}(r) = \frac{I^m_{\mathrm{STED}}}{0{,}184}\frac{r^2}{{d_{\mathrm{STED}}}^2}2\ln(2)e^{-4\ln(2)\frac{r^2}{{d_{\mathrm{STED}}}^2}} \tag{2.4}$$

con

$$I^m_{\mathrm{STED}} = \frac{4}{\pi}2\ln(2)\frac{P}{{d_{\mathrm{STED}}}^2}0{,}184 \tag{2.5}$$

definida de forma tal que al integrar $I_{\mathrm{STED}}(r)$ sobre todo el espacio, se obtiene la potencia, P. Si se desarrolla a segundo orden en serie de Taylor la Ec. (2.4), se obtiene

$$I_{\mathrm{STED}}(r) = \frac{I^m_{\mathrm{STED}}}{0{,}184}\frac{r^2}{{d_{\mathrm{STED}}}^2}2\ln(2) \tag{2.6}$$

agrupando $\beta = \frac{\ln(2)}{0{,}368{d_{\mathrm{STED}}}^2}$ se puede reescribir la Ec. (2.6) como la ecuación de una parábola donde el parámetro β controla la forma de la misma.

$$I_{\mathrm{STED}}(r) = 4\beta I^m_{\mathrm{STED}}r^2 \tag{2.7}$$

Una forma intuitiva de estimar el rendimiento de un nanoscopio STED, es a través del aumento en resolución en comparación con un microscopio confocal. La PSF efectiva del nanoscopio STED ($\mathrm{PSF_{ef}}$) es directamente proporcional a la PSF del microscopio confocal ($\mathrm{PSF_c}$) y al factor de supresión.

$$\mathrm{PSF_{ef}}(r) = \mathrm{PSF_c}(r)\eta(r) \tag{2.8}$$

La $\mathrm{PSF_c}$ alrededor del foco puede ser descrita mediante una función Gaussiana del estilo $I_G(r) = I_G^m e^{-4\ln(2)\frac{r^2}{{d_c}^2}}$ con $I_G^m = \frac{2}{\pi}2\ln(2)\frac{P}{{d_c}^2}$ donde d_c es la resolución del microscopio confocal y definida de forma tal que al integrar $I_G(r)$ sobre todo el espacio se obtienen la potencia P.

Luego,

$$\begin{aligned}\mathrm{PSF_{ef}}(r) &= e^{-4\ln(2)\frac{r^2}{{d_c}^2}} e^{-\ln(2)\frac{I_{\mathrm{STED}}(r)}{I_S}} \\ \mathrm{PSF_{ef}}(r) &= e^{-4\ln(2)\frac{r^2}{{d_c}^2}} e^{-4\ln(2)\frac{I^m_{\mathrm{STED}}}{I_S} r^2\beta}\end{aligned} \tag{2.9}$$

definiendo $\zeta = \frac{I^m_{\mathrm{STED}}}{I_S}$ como el factor de saturación y d como la resolución del nanoscopio STED.

$$e^{-4\ln(2)\frac{r^2}{d^2}} = e^{-4\ln(2)r^2\left(\frac{1}{{d_c}^2}+\zeta\beta\right)} \tag{2.10}$$

$$\frac{1}{d^2} = \frac{1}{{d_c}^2} + \zeta\beta \tag{2.11}$$

Reordenando, la resolución para el nanoscopio STED se puede expresar como

$$d = \frac{d_c}{\sqrt{1 + {d_c}^2\zeta\beta}} \tag{2.12}$$

En la Fig. (2.1.b.) se puede observar el gráfico de la dependencia de la resolución del nanoscopio en función de la intensidad del haz del STED. Analizando la Ec. (2.12), en el límite cuando $\zeta \to 0$ se recupera la resolución del microscopio confocal, $d \cong d_c$. Mientras que para grandes niveles de saturación, la resolución efectiva del nanoscopio STED se encuentra gobernada por $d \cong \frac{1}{\sqrt{\beta\zeta}}$.

2.1.3. Sección eficaz de emisión estimulada

Se calcula la expresión para la sección eficaz de emisión estimulada σ_{se} en función de la longitud de onda [Deshpande et al., 1990]. El conocimiento de $\sigma_{se}(\lambda)$ permite establecer la eficiencia del proceso de emisión estimulada para cada longitud de onda [Rittweger et al., 2007].

La tasa de emisión espontánea está dada por el coeficiente $A = {}^{1}/_{\tau_{rad}}$ de Einstein, donde τ_{rad} es el tiempo de vida radiativo y se encuentra relacionada con el coeficiente B de Einstein a través de la Ec. (2.13)

$$A = \frac{8\pi h\nu^3}{c^3}B \tag{2.13}$$

donde $c = {}^{c_0}/_{n}$ es la velocidad de la luz, c_0 es la velocidad de la luz en el vacío, n es el índice de refracción, h es la constante de Planck y ν es la frecuencia. Luego,

$$B = \frac{c_0^3}{\tau_{rad} 8\pi h\nu^3 n^3} \quad \left[\frac{m^3}{Js^2}\right] \tag{2.14}$$

La ganancia en la densidad de fotones por emisión estimulada por unidad de tiempo $\frac{dn_{ph}(\nu)}{dt}$ $\left[\frac{1}{m^3 s}\right]$ es directamente proporcional al coeficiente de Einstein B, a la densidad de energía del campo de radiación incidente $u(\nu) = n_{ph}(\nu)h\nu$ $\left[\frac{J}{m^3}\right]$ donde $n_{ph}(\nu)$ $\left[\frac{1}{m^3}\right]$ es la densidad de fotones, a la densidad de electrones en el estado excitado N $\left[\frac{1}{m^3}\right]$, y a la probabilidad de emitir un fotón E a la frecuencia ν tal que $\int E(\nu)\mathrm{d}\nu = 1$.

$$\frac{\mathrm{d}n_{ph}(\nu)}{\mathrm{d}t} = Bu(\nu)NE(\nu) \tag{2.15}$$

La densidad de fotones por emisión estimulada $I(\nu) = u(\nu)c$ $\left[\frac{J}{m^2 s}\right]$

$$\frac{\mathrm{d}I(\nu)}{\mathrm{d}t} = \frac{h\nu c_0}{n}Bu(\nu)NE(\nu) \tag{2.16}$$

$$\frac{\mathrm{d}I(\nu)}{\mathrm{d}t} = h\nu BE(\nu)I(\nu)N \tag{2.17}$$

El cambio espacial de la intensidad de fotones por emisión estimulada es

$$\frac{\mathrm{d}I(\nu)}{\mathrm{d}z} = \frac{1}{c}\frac{\mathrm{d}I(\nu)}{\mathrm{d}t} \tag{2.18}$$

$$\frac{\mathrm{d}I(\nu)}{\mathrm{d}z} = \frac{nh\nu}{c_0}BE(\nu)I(\nu)N \tag{2.19}$$

donde se puede definir la sección eficaz de emisión estimulada $\sigma_{se}(\nu) = \frac{nh\nu}{c_0} BE(\nu)$

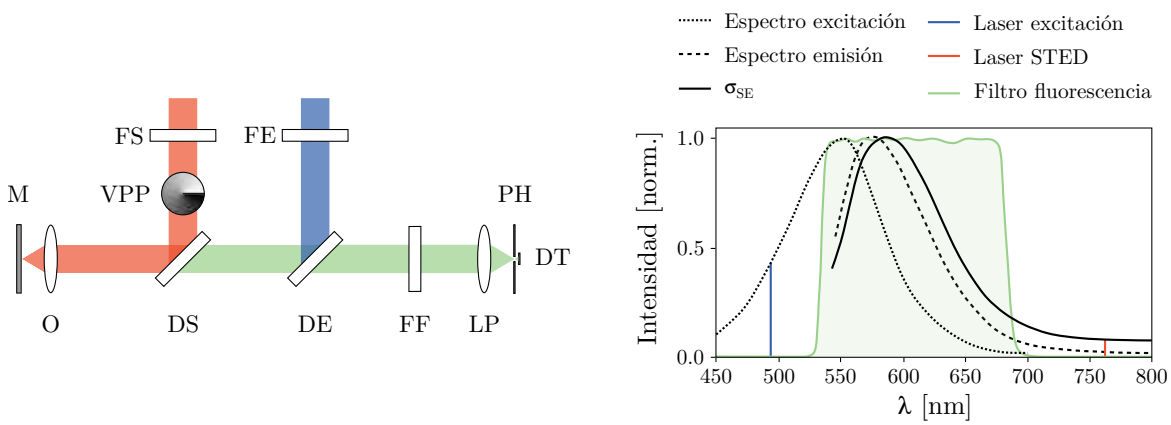
$$\frac{\mathrm{d}I(\nu)}{\mathrm{d}z} = \sigma_{se}(\nu) I(\nu) N \tag{2.20}$$

Teniendo en cuenta que $\nu = {}^{c_0}/_{\lambda}$, que $E(\nu) = E(\lambda)\,({}^{\lambda^2}/_{c_0})$ y que $\tau_{rad} = {}^{\tau_{fl}}/_{\phi}$ donde ϕ es la eficiencia cuántica

$$\sigma_{se}(\lambda) = \frac{\phi \lambda^4}{8\pi n^2 c_0 \tau_{fl}} E(\lambda) \quad \left[m^2\right] \tag{2.21}$$

En la Fig. (2.2.b) se observa el gráfico de sección eficaz de emisión estimulada en función de la longitud de onda para una molécula determinada. A grandes rasgos, tiene una forma funcional muy similar a la del espectro de emisión $E(\lambda)$ pero desfasado algunos nanómetros debido a la dependencia con λ^4.

2.1.4. El nanoscopio



(a) **(b)**

Figura (2.2): El nanoscopio. **(a)** Esquema de un nanoscopio STED. A un microscopio confocal se le agrega una sección de STED con su frente de onda modificado mediante un desfasaje helicoidal de 0 a 2π, *VPP*. **(b)** Configuración espectral normalizada. Para una determinada molécula fluorescente, se observa, en línea punteada de color negro el espectro de excitación, en línea rayada de color negro el espectro de emisión, en línea continua de color negro la sección eficaz de emisión estimulada, en línea continua de color azul el láser de excitación, en línea continua de color rojo el láser de STED y en color verde la región de detección.

Para inducir la emisión estimulada, generalmente se elige una longitud de onda que se encuentra en la zona roja lejana del espectro de emisión del fluoróforo. Esto se debe a que se intenta: (i) que la longitud de onda de STED no excite el fluoróforo, por lo tanto, se la separa del espectro de excitación y (ii) separar espectralmente la excitación de la depleción y

conseguir una amplia zona de colección de fluorescencia. Teniendo en cuenta la dependencia espectral derivada en la sección [2.1.3], se deben emplear altas intensidades del haz de STED para compensar las bajas secciones eficaces de emisión estimulada.

La nanoscopía STED se basa en la microscopía confocal y utiliza un esquema muy similar. Como se muestra en la Fig. (2.2.a), a grandes rasgos, a un microscopio confocal se le debe agregar: (i) un láser de STED (esquematizado rojo), (ii) un dispositivo retardador de fase (VPP) para generar un patrón de intensidad determinado en el plano focal y (iii) un espejo dicroico (DS) para separar la longitud de onda de STED de la de excitación y fluorescencia. En la Fig. (2.2.b) se observa un diagrama espectral característico de la nanoscopía STED. El espectro de excitación de la molécula se muestra en línea punteada, la cual será excitada mediante el láser esquematizado en color azul. En línea rayada se muestra el espectro de emisión de la molécula, la cual será depletada mediante el láser esquematizado en color rojo ubicado en la zona roja lejana del espectro de emisión. Entre el láser de excitación y el de STED se define la zona de detección (esquematizada en color verde).

2.2. Ingeniería del foco: Imágenes en 2D y 3D

La resolución del nanoscopio STED no posee ningún límite fundamental. Sin embargo, la calidad de la distribución espacial y magnitud de la intensidad focal del haz de STED impacta fuertemente en el máximo valor alcanzable.

En la Fig. (2.3.a) se muestra la distribución de intensidad en el plano focal de un haz Gaussiano cuando no se aplica ningún desfasaje estructurado al frente de ondas, como por ejemplo, el caso del haz de excitación de un nanoscopio STED.

Para obtener un incremento uniforme de la resolución en el plano (x, y), se utiliza una distribución focal con forma de dona, como se muestra en la Fig. (2.3.b). Dicha distribución se logra aplicando un retraso de fase helicoidal en conjunto con polarización circular derecha al frente de onda del campo eléctrico del haz de STED. Para generar el retraso de fase se utiliza una placa de polímero cuyo máximo de espesor corresponde a un desfasaje de 2π para la longitud de onda de STED utilizada. También se han utilizado moduladores espaciales de luz, pero resultan más costosos, el diseño es menos compacto y hay que tener especial cuidado en el máximo de intensidades que se les puede aplicar [Harke et al., 2008a].

Algunas aplicaciones también requieren imágenes con resolución por debajo del límite de difracción en la dirección axial (z). Si se aplica un retraso de fase de π en el área central circular al frente de onda del campo eléctrico del haz de STED, en conjunto con polarización circular, se revierte el signo de la mitad de la amplitud y se produce interferencia destructiva

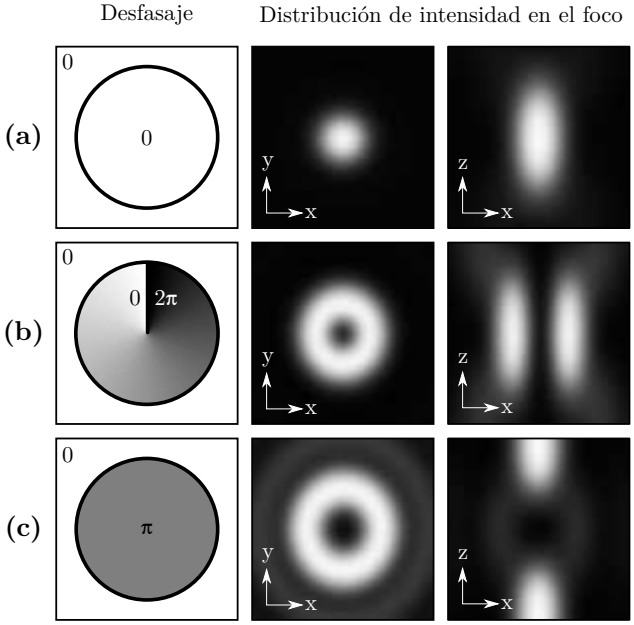


Figura (2.3): Ingeniería del foco. En la columna **izquierda** se observan tres posibles desfasajes para el frente de onda. **(a)** Sin desfasaje. **(b)** Desfasaje helicoidal de 0 a 2π. **(c)** Desfasaje binario $0 - \pi$. Con estos desfasajes se obtienen distribuciones de intensidad del foco que permiten obtener imágenes con resolución: limitada por difracción, nanométrica en la dirección lateral y nanométrica en la dirección axial respectivamente. Figura adaptada de [Hao et al., 2010].

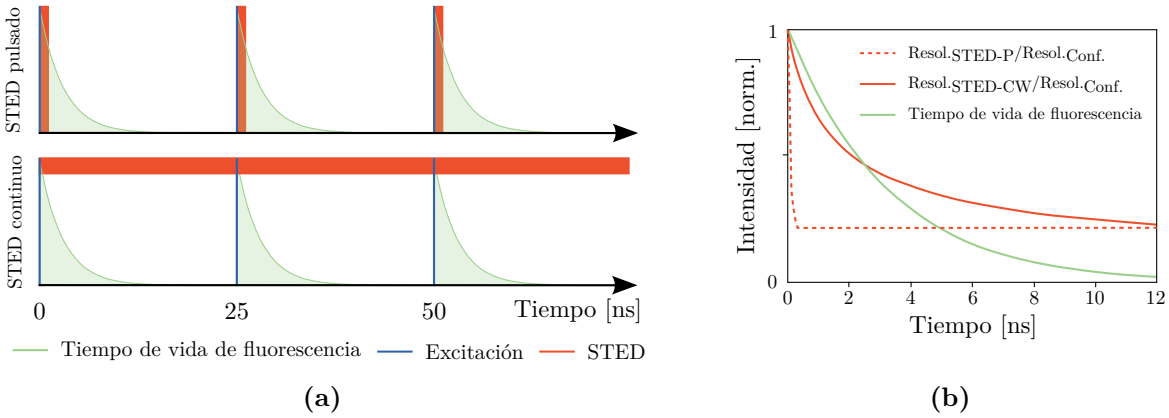
en el foco, lo cual origina un mínimo de intensidad, como se muestra en la Fig. (2.3.c). Este patrón de intensidades genera principalmente, un confinamiento óptico en la dirección axial (z), aunque en el plano (x, y) también genera una débil, pero no despreciable, distribución espacial con forma de dona [Klar et al., 2000, Osseforth et al., 2014, Wildanger et al., 2009, Harke et al., 2008b].

La implementación de óptica adaptativa ha permitido realizar imágenes en 3D en especímenes mucho más complejos, como tejidos [Gould et al., 2012]. Nanoscopios técnicamente más sofisticados que combinan dos objetivos opuestos de gran apertura numérica que permiten obtener altas resoluciones axiales (ver Sección (1.1.4)) también fueron diseñados [Schmidt et al., 2008, Dyba and Hell, 2002, Dyba et al., 2003, Hell et al., 2009, Schmidt et al., 2009].

2.3. Láseres para STED: Pulsados y continuos

A lo largo de los últimos 20 años se desarrollaron diferentes modalidades de STED. Las simplificaciones que se fueron dando con el paso del tiempo se deben, principalmente, al avance tecnológico en el diseño de láseres.

En los primeros nanoscopios STED se utilizaban láseres de Titanio-Zafiro (Ti:Za) cuyos



(a) **(b)**

Figura (2.4): Nanoscopía STED utilizando láseres pulsados y continuos. **(a)** Diagrama temporal. Se observa, en línea de color azul el pulso de excitación a una repetición de 40 MHz con un ancho temporal de 250 ps, en color verde el histograma de emisión de fotones para un fluoróforo con un tiempo de vida de 3 ns y en color rojo el láser de STED (superior: pulsado con un ancho temporal de 1 ns, inferior: continuo). **(b)** Comparación de la resolución de STED con respecto a la microscopía confocal en función del tiempo. En línea rayada de color rojo para nanoscopía STED utilizando un láser pulsado y en línea continua de color rojo para nanoscopía STED utilizando un láser continuo. Figura adaptada de [Vicidomini et al., 2013].

pulsos poseían un ancho temporal de centenas de femtosegundos a una repetición de 80 MHz. Los láseres de excitación se comandaban opto-electrónicamente. Además de la perfecta sincronización de los pulsos de ambos láseres, se requería del ensanchamiento temporal de los pulsos del Ti:Za hasta llegar a unos $(100 - 300)$ ps de manera tal de optimizar la eficiencia de STED [Dyba and Hell, 2003].

Con el desarrollo de láseres de luz blanca (súpercontinuos) estables y de gran potencia (≈ 4 W) se consiguió gran flexibilidad permitiendo acceso a un amplio rango de longitudes de onda de excitación y STED inherentemente sincronizadas [Wildanger et al., 2008, Wildanger et al., 2009].

En un intento de reducir la complejidad y el costo del nanoscopio STED se sacrificó la capacidad de sintonización de longitud de onda. Gracias al uso de láseres monocromáticos en el rango de entre $(760 - 780)$ nm con pulsos cuyo ancho temporal oscila entre centenas de picosegundos y algunos nanosegundos. Estos láseres alcanzan potencias medias de aproximadamente 500 mW en la pupila del objetivo y gracias a ello, se alcanzaron resoluciones espaciales menores a 15 nm. Además, estos láseres permitieron, por primera vez, sincronizar externamente o internamente la frecuencia de repetición de los pulsos [Göttfert et al., 2013].

La mayor simplificación introducida fue gracias al uso de láseres de STED continuos (CW-STED), a través de los cuales resulta innecesaria la sincronización y adaptación de pulsos. Las primeras versiones se realizaron con láseres de argón-kriptón o Ti:Za operados

en el modo continuo [Willig et al., 2007, Harke, 2008]. En la actualidad ya se ha logrado CW-STED utilizando láseres compactos de fibra [Moneron and Hell, 2009, Moneron et al., 2010] o láseres de estado sólido bombeados por diodos [Honigmann et al., 2012, Mueller et al., 2012, Honigmann et al., 2013]. En la Fig. (2.4.a) se puede observar la comparación temporal entre las modalidades P-STED (STED pulsado) y CW-STED. El rendimiento de la nanoscopía CW-STED se encuentra rezagado con respecto al de P-STED debido a la menor probabilidad instantánea de desexcitación de la modalidad continua. En P-STED la sincronización entre los pulsos de excitación y STED optimiza eficientemente la conmutación entre estados *on-off* de fluorescencia, debido a que el pulso de STED arriba al plano focal unos pocos picosegundos luego del pulso de excitación e inhibe la emisión de fluorescencia instantáneamente. En cambio, para lograr el mismo efecto, se deben utilizar potencias medias entre tres y cinco veces mayores en CW-STED. Además, en CW-STED una población no despreciable de moléculas emiten fluorescencia antes de haber sido expuestas a la intensidad necesaria del haz de STED para conmutar al estado *off*, dicha fluorescencia residual resulta en un detrimento de la resolución. Una forma de solucionar esta limitación consiste en combinar el láser CW-STED con un láser pulsado de excitación para luego realizar un filtrado temporal de fotones [Moffitt et al., 2011, Vicidomini et al., 2011, Vicidomini et al., 2013, Vicidomini et al., 2014]. En la Fig. (2.4.b) se puede ver la relación entre la resolución de STED (pulsado y continuo) en comparación con la resolución limitada por difracción en función del tiempo. En la modalidad CW-STED a medida que avanza el tiempo, los fotones tienen información con mayor resolución espacial, mientras que en P-STED la resolución es constante en el tiempo (con excepción del instante inicial de duración del pulso de P-STED). Se han logrado utilizar potencias medias de entre (60-120) mW de STED en la modalidad CW-STED con filtrado temporal de fotones obteniendo resoluciones por debajo de 60 nm [Bordenave et al., 2016].

2.4. Fotodegradación

Para lograr que el efecto de STED sea eficiente, se deben utilizar intensidades de luz del orden de decenas de $^{MW}/_{cm^2}$, lo cual representa entre 1000 y 10000 veces más de la intensidad necesaria para excitar un fluoróforo individual [Tinnefeld et al., 2015, Wäldchen et al., 2015]. Una vez que los fotones son absorbidos, la molécula es excitada a niveles energéticos superiores y el fluoróforo puede utilizar la energía extra para cruzar barreras de potencial realizando alguna transformación química. Se denomina fotoblanqueo al proceso estocástico mediante el cual un fluoróforo sufre una alteración fotoquímica que lo deja inactivo en términos de fluorescencia. Una molécula fotoblanqueada ya no absorbe o no emite luz, lo cual

limita el número de ciclos de excitación-relajación que puede realizar y en consecuencia el número de fotones de fluorescencia que puede entregar. [Pellegrotti, 2015].

Teóricamente la luz de STED no es absorbida por la molécula fluorescente y debería reducir el fotoblanqueo porque disminuye el tiempo que la molécula fluorescente reside en el estado excitado. Pero, ocasionalmente, la luz de STED es absorbida por la molécula fluorescente, convirtiéndose en la razón principal del fotoblanqueo. Múltiples enfoques se pueden llevar a cabo para minimizar sus efectos: (i) Escaneo rápido de los láseres a través de la muestra [Donnert et al., 2006, Donnert et al., 2007, Donnert et al., 2009, Moneron et al., 2010]. (ii) Selección adecuada de la longitud de onda de STED [Hotta et al., 2010, Rankin et al., 2011]. (iii) Implementación de RESCue STED (*REduction of State transition Cycles*), lo cual consiste en apagar el haz de STED en aquellas zonas donde no haya señal para detectar y de esta forma reducir la dosis de intensidad innecesaria que recibe la muestra [Staudt et al., 2011].

2.5. Estado del arte

En esta sección [2.5] se presentan algunos de los avances más relevantes obtenidos mediante la nanoscopía STED durante la última década.

Imágenes en células vivas

La capacidad de realizar imágenes en células vivas es uno de los enfoques más importantes en el estudio de la biología y medicina. Sin embargo, la resolución que brinda la microscopía óptica muchas veces es insuficiente, forzando a los investigadores a complementar sus estudios mediante microscopía electrónica. En [Nägerl et al., 2008] se presenta el primer caso de una nanoscopía óptica de campo lejano en donde se adquieren imágenes en células vivas, de forma no invasiva, para estudiar la morfología de espinas dendríticas. Como se observa en la Fig. (2.5.a), la nanoscopía STED revela importantes detalles estructurales de espinas dendríticas de neuronas hipocampales que expresan la proteína fluorescente YFP, que no eran visibles mediante la microscopía confocal. De esta forma, se logra mejorar la cuantificación de parámetros morfológicos, como ser el ancho del cuello o la curvatura de la cabeza de la espina, los cuales, se presume tienen un rol fundamental en las conexiones sinápticas.

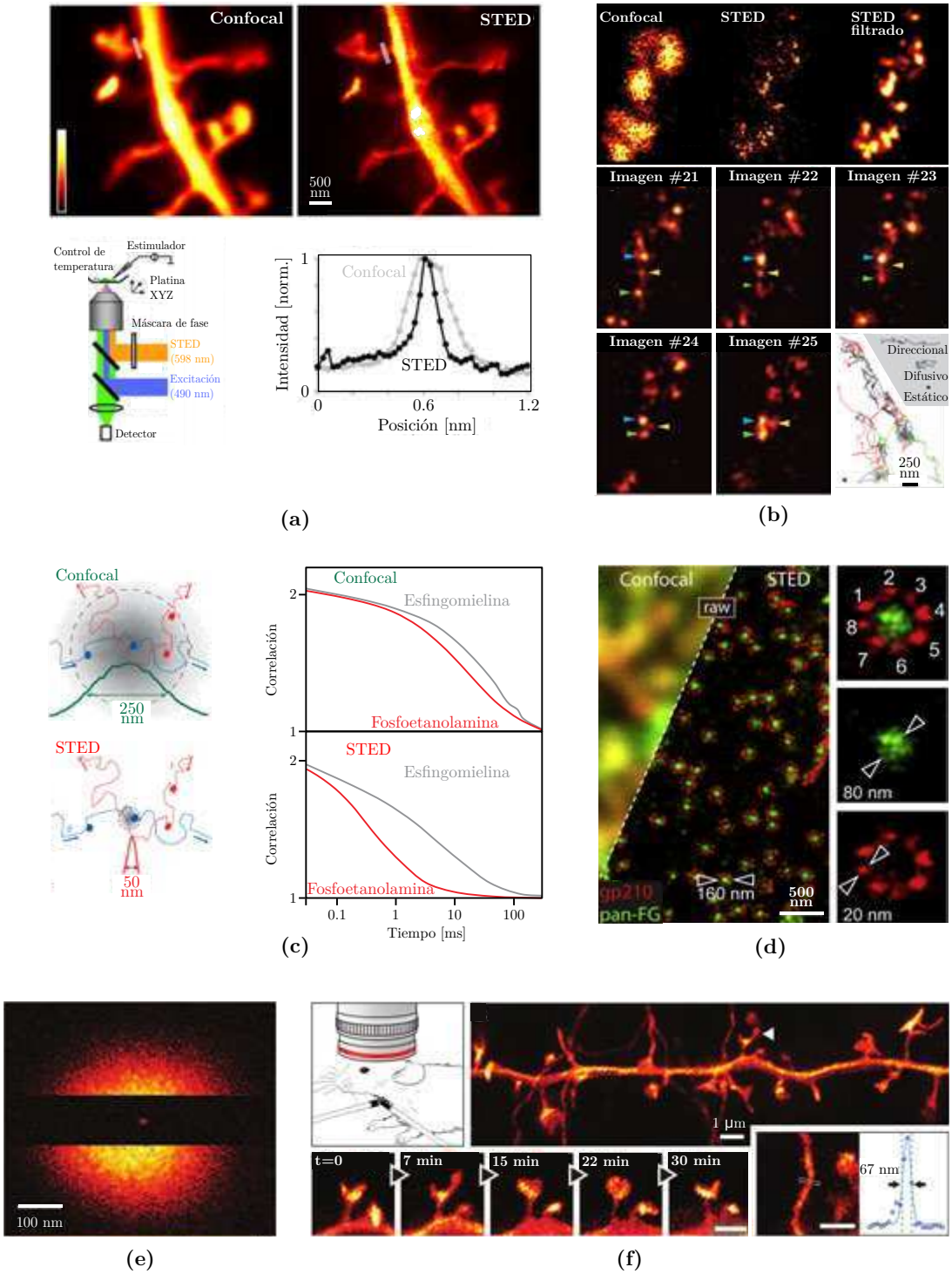


Figura (2.5): Estado del arte de la nanoscopía STED. **(a)** Imágenes en células vivas. **(b)** Videos. **(c)** Espectroscopía de correlación de fluorescencia. **(d)** Poder de visualización. **(e)** Resolución espacial sin límites y **(f)** Imágenes en el cerebro de un ratón vivo. Todas las imágenes fueron adaptadas de sus respectivas publicaciones.

Video

En [Westphal et al., 2008] se presenta la capacidad de hacer videos (28 imágenes por segundo) con 62 nanómetros de resolución en células vivas. Vesículas sinápticas dentro del axón de neuronas marcadas fluorescentemente fueron grabadas mediante nanoscopía STED en un campo de visión de $(2{,}5 \times 1{,}8)$ μm. Al reducir la sección trasversal del área del foco casi 20 veces por debajo del límite de difracción, STED permitió describir la movilidad de las vesículas dentro de los botones sinápticos. En la Fig. (2.5.b) se observa la comparación entre las imágenes confocal y STED, así como también una secuencia de imágenes de STED donde se encuentran marcadas algunas vesículas a las cuales se les calculó su trayectoria y se puede distinguir entre comportamientos direccionales, difusivos o estáticos. Este estudio demuestra la habilidad emergente de las nanoscopías ópticas de investigar procesos fisiológicos intracelulares en tiempo real.

Espectroscopía de correlación de fluorescencia

La espectroscopia de correlación de fluorescencia (*Fluorescence Correlation Spectroscopy* , FCS) es una técnica no invasiva, muy sensible, que permite el estudio de procesos dinámicos muy complejos. A través de las fluctuaciones de intensidad dentro del volumen de iluminación es posible obtener la concentración y tiempos de difusión de estructuras marcadas con moléculas fluorescentes. FCS generalmente se aplica en combinación con la microscopía confocal, el volumen de iluminación es del orden de los femtolitros, lo cual limita la concentración máxima de moléculas fluorescentes detectables a órdenes nM. Aprovechando la gran resolución espacial de STED, se puede disminuir el volumen de iluminación tres órdenes de magnitud, permitiendo estudiar concentraciones de fluoróforos mucho mayores (μM). En [Eggeling et al., 2009] aprovechan estas características de la técnica FCS-STED para analizar la difusión de lípidos individuales o proteínas en la membrana plasmática de células vivas (ver Fig. (2.5.c)).

Poder de visualización

La utilidad de las técnicas de nanoscopías ópticas de campo lejano surge de la necesidad de visualizar estructuras complejas en sistemas biológicos que no son accesibles mediante la microscopía óptica convencional. [Göttfert et al., 2013] representa uno de los ejemplos más impactantes del poder de visualización de la nanoscopía STED. Los complejos de poros nucleares (*Nuclear Pore Complex*, NPC) son estructuras de proteínas que permiten el transporte de moléculas a través de la envoltura nuclear, incluyendo el de ADN, ARN y

proteínas ribosomales entre otros. En la Fig. (2.5.d) se puede comparar la imagen confocal y de STED de los NPC. La nanoscopía STED revela la simetría característica de la proteína transmembrana gp120, compuesta por ocho subunidades de aproximadamente 20 nm de diámetro, junto con otro conjunto de proteínas ubicadas en el centro de los poros.

Resolución espacial sin límites

La estructura cristalina del diamante está formada por una red de átomos de carbono. Existe un defecto cristalino conocido como centro nitrógeno-vacante [Gruber et al., 1997], el cual se produce si la red, en lugar de contener dos átomos de carbono contiene un único átomo de nitrógeno, quedando otra posición vacante. Son estructuras fluorescentes que tienen potenciales aplicaciones en la criptografía [Kurtsiefer et al., 2000] y computación cuántica [Dutt et al., 2007], así como también en la marcación biológica [Fu et al., 2007, Chao et al., 2007] puesto que sus estados de espines se pueden polarizar y detectar ópticamente. Como se observa en la Fig. (2.5.e), [Rittweger et al., 2009a] demuestra que la nanoscopía STED es capaz de realizar imágenes de los centros nitrógeno-vacante con precisión de unos pocos angstroms. Estos defectos demuestran su gran potencial como marcadores para nanoscopías ópticas de campo lejano, debido a su alta resistencia al fotoblanqueo. Se obtuvo una resolución de 5,8 nm, demostrando que la nanoscopía STED no posee un límite fundamental en la resolución que puede alcanzar.

Imágenes en el cerebro de un ratón vivo

Las células, unidades funcionales de la vida, son mejor estudiadas en vivo. Esto es particularmente cierto en neuronas, que realizan su tarea básica de procesar información al conectarse con sus vecinos. Por lo tanto, entender el funcionamiento interno del cerebro requiere la visualización de neuronas en animales vivos. En [Berning et al., 2012], como se muestra en la Fig. (2.5.f), se utilizó la nanoscopía STED para estudiar la dinámica neuronal y analizar los cambios morfológicos de las espinas dendríticas en la corteza cerebral de un ratón vivo.

3

Nanoscopio STED

LAS nanoscopías de fluorescencia de campo lejano son técnicas recientes, en constante desarrollo, motivo por el cual, aun, no existe un diseño específico de implementación. Llamativamente, a pesar de su enorme potencial de aplicación en la fuerte comunidad biomédica, las técnicas de nanoscopías dirigidas no se encontraban disponibles en Argentina al comenzar esta tesis. Parte de este trabajo consistió en el diseño, implementación y utilización del primer nanoscopio STED del país. Para diseñarlo, se dio especial importancia a dos aspectos. (i) La necesidad de la nanoscopía multicolor, para poder estudiar la interacción entre diferentes estructuras simultáneamente. (ii) La resolución máxima alcanzable. Por lo tanto, se decidió que el nanoscopio cuente con dos canales de iluminación y detección y opere en la modalidad pulsada.

En este capítulo se describirá el nanoscopio STED implementado en el CIBION. Se expondrá la configuración espectral seleccionada y consecuente disposición experimental diseñada [3.1]. Se explicará el protocolo de alineación [3.2] y finalmente se demostrará el desempeño [3.3].

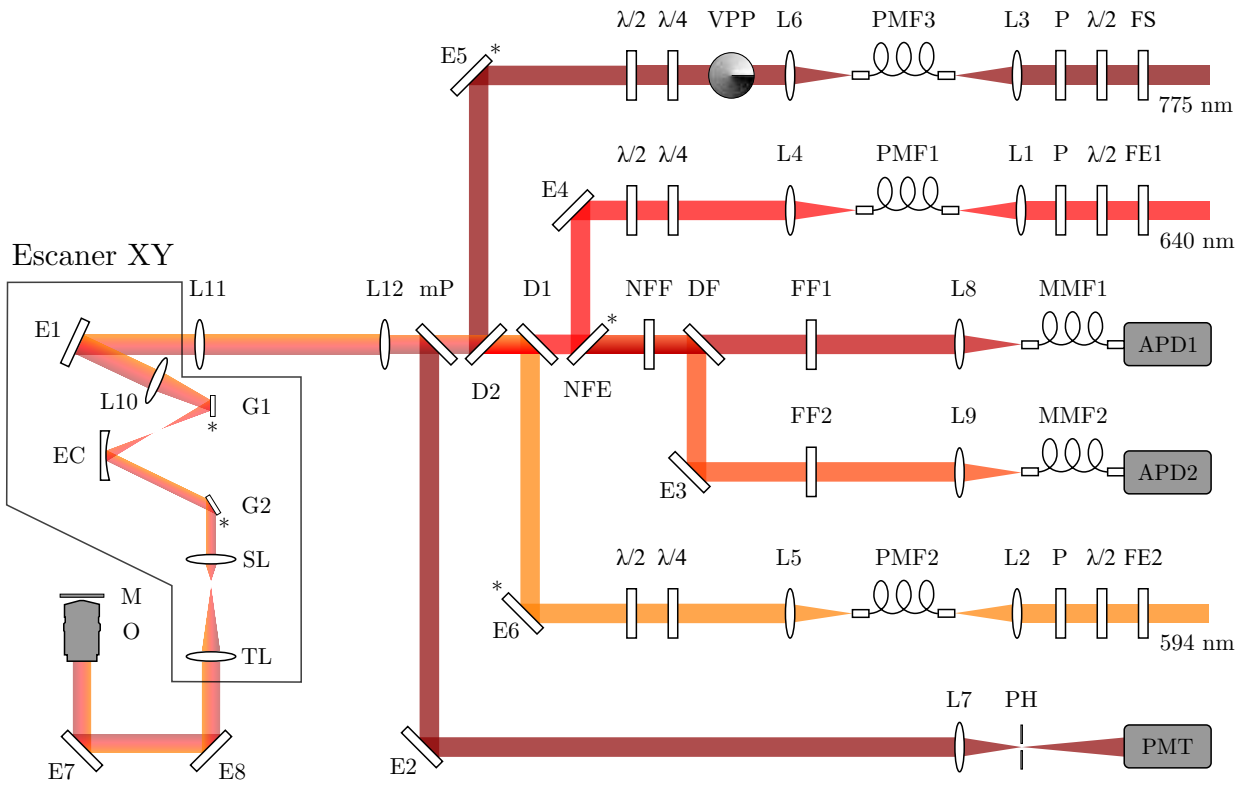


Figura (3.1): Disposición experimental. Representación esquemática del nanoscopio STED de dos colores. FS: filtro de STED, FE: filtro de excitación, P: polarizador, L: lente, PMF: fibra monomodo que mantiene la polarización, VPP: retardador de fase helicoidal de $0-2\pi$, $\lambda/4$: retardador de fase de $\lambda/4$, $\lambda/2$: retardador de fase de $\lambda/2$, NFE: filtro de corte de excitación, D: espejo dicroico, mP: película micrométrica que divide el haz montada magnéticamente, E: espejo, SL: lente de escaneo, TL: lente de tubo, O: objetivo, M: muestra, NFF: filtro de corte de detección, DF: espejo dicroico de fluorescencia, FF: filtro de fluorescencia, PH: pinhole, MMF: fibra multi-modo, APD: fotodiodo de avalancha, PMT: fotomultiplicador, EC: espejo cóncavo y G: espejo galvanométrico.

3.1. Disposición experimental

Iluminación

Una representación esquemática del nanoscopio STED se muestra en la Fig. (3.1). Para excitar, se utilizaron dos colores: (i) Luz de 594 nm fue seleccionada utilizando un filtro de interferencia (*FE2*; Chroma ZET594/10X) de un láser supercontinuo de 4 W de potencia media (Fianium FemtoPower1060), pulsado (430 ps) y operado a una repetición de 40 MHz. Fue linealmente polarizado mediante un divisor de haz por polarización. (ii) Un láser linealmente polarizado, pulsado (200 ps), de 640 nm (PicoQuant LDH-P-C-640B), filtrado espectralmente mediante un filtro de interferencia (*FE1*; Semrock LD01-640/8-25), operado a una repetición de 20 MHz, cuya potencia media es de 50 mW. Cada color fue acoplado a

una fibra mono-modo que mantiene la polarización (*PMF1* and *PMF2*; Thorlabs P3-488PM-FC-5) utilizando un colimador de fibra (*L1* y *L2*; Schäffer und Kirchoff 60FC-4-A7.5-01). La luz que sale de las fibras fue colimada (*L4* y *L5*; f = 30 mm) de manera de obtener el modo TE00 de excitación. La polarización circular fue ajustada para cada longitud de onda utilizando una lámina de cuarto de onda ($\lambda/4$; Thorlabs AQWP05M-600) de amplio ancho de banda $(400 - 800)$ nm y una lámina de media onda ($\lambda/2$; Thorlabs AHWP05M-600) de amplio ancho de banda $(400 - 800)$ nm.

Para STED, se utilizó un láser linealmente polarizado, pulsado (1 ns), de 775 nm, filtrado espectralmente mediante un filtro de interferencia (*FS*; Semrock FF01-780/12-25), cuya potencia media es de 3 W (Onefive Katana HP). La luz fue acoplada a una fibra mono-modo que mantiene la polarización (*PMF3*; Thorlabs P3-630PM-FC-5) mediante un colimador de fibra (*L3*; Schäffer und Kirchoff 60FC-4-A11-02). La luz de STED que sale de la fibra fue colimada (*L6*; f = 30 mm) y enviada a través de un retardador de fase helicoidal de $0 - 2\pi$ (*VPP*; RPC Photonics VPP-1a). Se ajustó la polarización circular utilizando una lámina de cuarto de onda ($\lambda/4$; Thorlabs AQWP05M-980) de amplio ancho de banda $(690 - 1200)$ nm y una lámina de media onda ($\lambda/2$; Thorlabs AHWP05M-980) de amplio ancho de banda $(690 - 1200)$ nm.

Para controlar la potencia de cada una de las tres longitudes de onda, antes de ser acopladas a sus respectivas fibras mono-modo que mantienen la polarización, se implementó, independientemente, un sistema compuesto por una lámina de media onda y un polarizador (*P*; Thorlabs GTH10M-A/B). La lámina de media onda es montada en una platina de rotación controlada mediante un servomotor (Thorlabs PRM1-Z8EM), el cual permite modificar la dirección de la polarización lineal (θ). Al atravesar el polarizador con su eje principal fijo, la intensidad de luz incidente (I_0) es atenuada siguiendo la ley de Malus y la intensidad transmitida (I_T) resulta $I_T = I_0 \cos^2(\theta)$. El sistema es controlado mediante un programa desarrollado en el lenguaje de programación visual LabView.

Los láseres de excitación y de STED se combinaron utilizando un espejo dicroico pasa-altos (*D1*; Chroma ZT594RDC), un filtro de corte posicionado a 22 grados respecto de su eje principal (*NFE*; Semrock NF03-658-25) y un espejo dicroico pasa-bajos de 5 mm de espesor (*D2*; Chroma Z780SPRDC) que reflejaban los láseres de 594 nm, 640 nm y 775 nm respectivamente.

Escaneo

Muchos nanoscopios STED utilizan una platina piezoeléctrica que permite mover la muestra a través de la región focal [Harke et al., 2008a, Donnert et al., 2006, Rittweger et al.,

2009a, Wildanger et al., 2008]. Si bien es una idea de simple implementación, tiene múltiples desventajas: (i) la velocidad de adquisición y aceleración de la muestra se encuentran limitada, lo cual imposibilita su aplicación en procesos dinámicos, (ii) el campo de visión de la mayoría de las platinas piezoeléctricas es de solamente 30-40 μm [Staudt, 2009], lo cual restringe las estructuras que se pueden visualizar. Estos inconvenientes se pueden evitar, escaneando el haz sobre la muestra, mediante un sistema compuesto por dos espejos galvanométricos (*G1* y *G2*, Cambridge Technology), como se muestra en el recuadro de la Fig. (3.1). Para garantizar que el escaneo de produzca de forma simétrica en todo el campo de visión, el haz no se debe desplazar sobre el plano focal posterior del objetivo, sino, que debe pivotear sobre el mismo. Para ello, se deben posicionar cada uno de los espejos galvanométricos sobre una imagen del plano focal posterior del objetivo (esquematizado con un asterisco), lo cual se logra mediante un telescopio formado por una lente de escaneo (*SL*; Leica) y una lente de tubo (*TL*; Leica) y mediante un espejo curvo de dos pulgadas de diámetro (*EC*, f = 50 mm). Finalmente, se utiliza una lente (*L10*; f = 100 mm) para a colimar el haz.

El mismo concepto, de mover el haz de forma simétrica sobre el campo de visión, resulta útil para alinear el nanoscopio (y que no se deformen los focos al mover los haces), por lo tanto, se agregó un telescopio (*L11* y *L12*; f = 300 mm) que permite trasladar una imagen del plano focal posterior del objetivo hasta un elemento de alineación de cada uno de los haces de 775 nm (*E5*), 594 nm (*E6*) y 640 nm (*NFE*).

Para un control adicional de la posición y enfoque fino, la muestra fue montada en una platina piezoeléctrica XYZ (Thorlabs NanoMax MAX311D/M). La luz fue enfocada al límite de difracción mediante un objetivo de 1.4 de apertura numérica (*O*; Leica HCX PL APO 100x/1.40-0.70 Oil CS).

Detección

Una película micrométrica divisora de haz montada magnéticamente (*mP*; Thorlabs BP145B1), se encarga de desviar la luz de *scattering* hacia un foto-multiplicador (*PMT*; Thorlabs PMM02) de amplio ancho de banda $(280-850)$ nm. La luz de STED fue eliminada del camino de la detección mediante un filtro de corte (*NFF*; Semrock NF03-785-25). La fluorescencia fue dividida en dos canales utilizando un espejo dicroico pasa-altos (*DF*; Chroma ZT647RDC) y el rango espectral correspondiente para cada canal fue seleccionado utilizando filtros de fluorescencia (*FF1*; Semrock FF01-623/24-25 y *FF2*; Semrock FF01-676/37-25). La fluorescencia fue acoplada (*L8* y *L9*; f = 50 mm) en los detectores confocales (*APD1* y *APD2*; MPD PD-050-CTC-FC) mediante una fibra multi-modo de 25 μm de diámetro. Estos detectores son diodos de avalancha con la capacidad de detectar fotones individuales, poseen

una resolución temporal menor a 50 ps y una eficiencia de detección que alcanza el 49 % (a 532 nm). Se cuenta con un dispositivo de conteo de fotones individuales correlacionados en el tiempo (Pico Harp 300, PicoQuant) que permite obtener histogramas de tiempo de arribo de fotones. Los sistemas de escaneo, adquisición de fluorescencia y *scattering* fueron controlados a través de una placa AD/DA (National Instruments PCIe-6353) utilizando el software Imspector [Schönle, 2012].

3.1.1. Sincronización de láseres

Luego de ser filtrado espacialmente, transmitirse y reflejarse en todos los componentes ópticos del sistema, el láser de STED alcanza una potencia media (P_M) de 300 mW en la pupila del objetivo. La frecuencia de repetición del láser es sintonizable entre (20 y 80) MHz y la energía por pulso $E_P = {}^{P_M}/_{\text{Frecuencia}}$ depende inversamente de la misma. Si se comanda el láser a una frecuencia de repetición de 20 MHz, se obtiene, en la pupila del objetivo, una energía máxima de 15 nJ/p, mientras que, si la frecuencia de repetición es de 40 MHz, la energía máxima disminuye a la mitad, 7.5 nJ/p. Cuanto mayor sea la energía por pulso, mayor será la resolución alcanzable. Considerando los valores de potencia medio obtenidos y según resultados previamente publicados [Göttfert et al., 2013] se decidió comandar el láser de STED a una frecuencia de repetición de 20 MHz.

En la Fig. (3.2.a) se muestra el esquema de la sincronización de los pulsos de los tres láseres utilizados (594, 640 y 775) nm. Debido a que el láser que entrega la excitación en 594 nm solamente opera a una frecuencia de repetición de 40 MHz, se lo definió como el láser *maestro*, es decir, entregará la señal de referencia para disparar al resto de los láseres. El láser de 640 nm posee un oscilador que permite controlar la frecuencia del mismo, por lo tanto, recibirá una señal de entrada de 40 MHz proveniente del láser de 594 nm e internamente dividirá la frecuencia, de forma tal de obtener una señal de referencia de 20 MHz que se utilizará para comandar no solamente la salida de excitación en 640 nm, sino también al láser STED.

3.1.2. Configuración espectral

En la Fig. (3.2.b) se observa la configuración espectral del nanoscopio. Se utiliza el mismo haz de STED en 775 nm (color bordó) para depletar dos fluoróforos diferentes, Atto 594 (color negro) y Atto 647N (color gris). En línea continua se muestra el espectro de absorción y en línea punteada el espectro de emisión de cada fluoróforo. El láser de 594 nm (color naranja) excitará el fluoróforo Atto 594 y se colectará señal de fluorescencia entre (612-636)

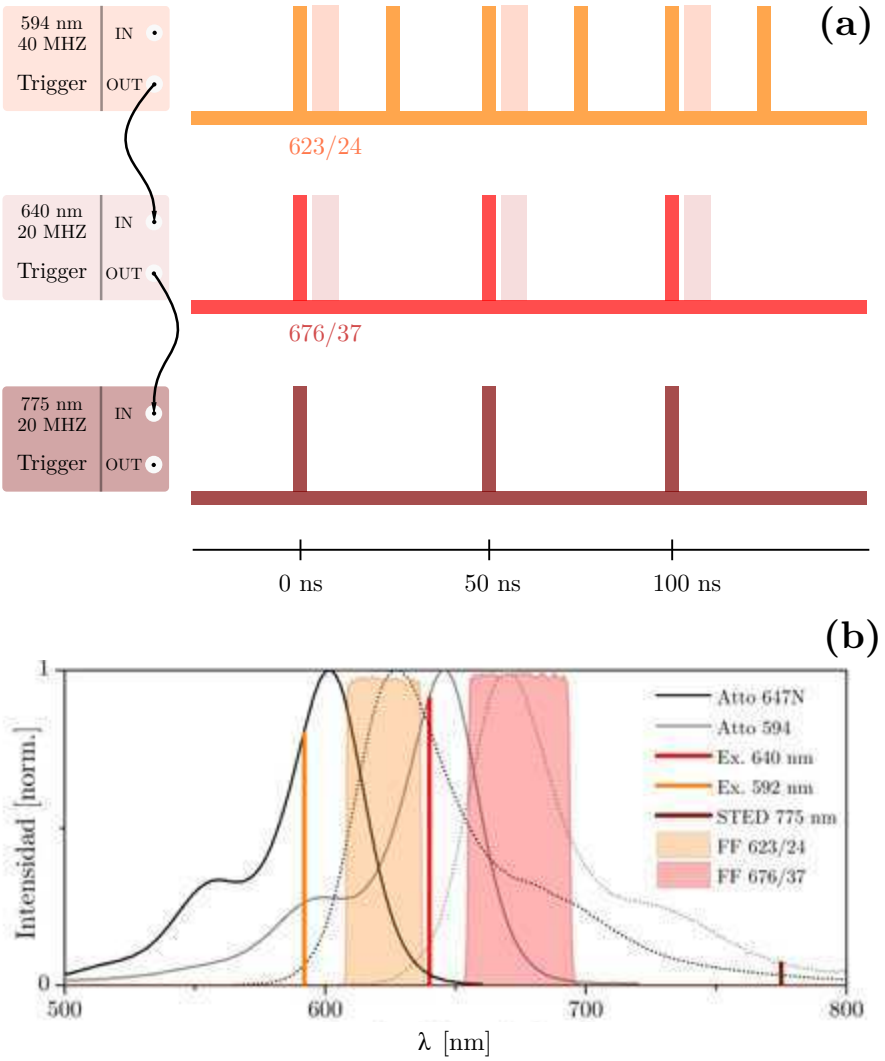


Figura (3.2): Configuración del nanoscopio. (a) Secuencia de disparo de los láseres. **(b)** Configuración espectral.

nm. El láser de 640 nm (color rojo) excitará el fluoróforo Atto 647N y se colectará señal de fluorescencia entre (658-695) nm.

3.2. Alineación

La alineación del nanoscopio STED se divide en tres etapas: (i) alineación espacial de los focos, (ii) alineación temporal de los pulsos, y (iii) filtrado temporal de fotones.

Para llevar a cabo la alineación espacial del nanoscopio se realizan imágenes de *scattering* de nanopartículas de oro de 60 nm de diámetro. En primer instancia, se superponen los focos en las tres dimensiones (x,y,z) hasta que las excitaciones coincidan entre sí y donde

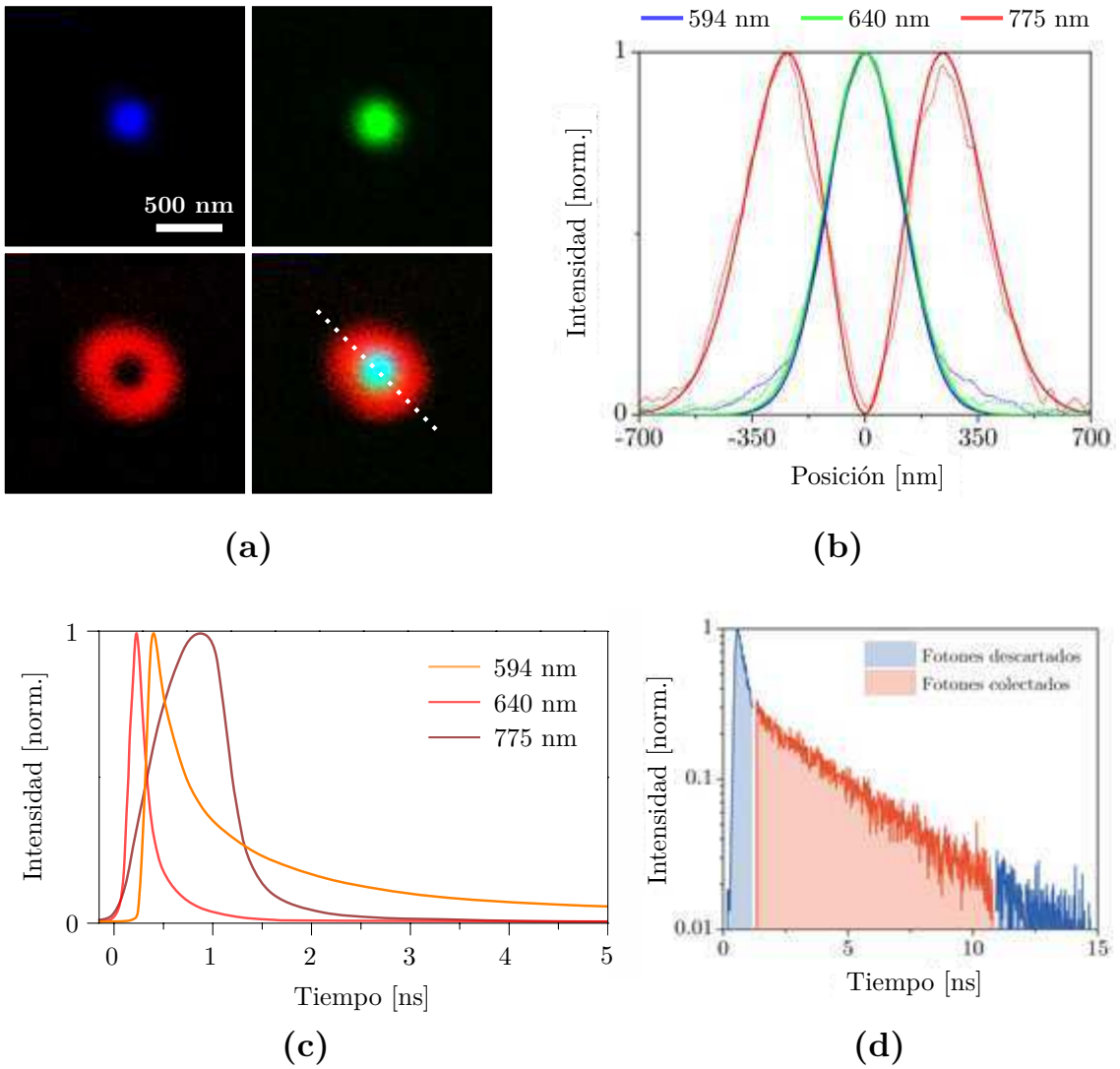


Figura (3.3): Alineación del nanoscopio STED. **(a)** Imágenes del foco de cada uno de los láseres de excitación y de STED. **(b)** Perfil de intensidades de un eje de la superposición de focos. En línea punteada se muestran los datos originales y en línea continua su correspondiente ajuste. **(c)** Sincronización temporal de los pulsos de los láseres. **(d)** Filtrado temporal de fotones.

ellas presenten un máximo de intensidad, el haz de STED, con forma de dona, presente un mínimo. Para ello se utiliza *E5* para 775 nm, *E6* para 594 nm y *NFE* para 640 nm, puesto que permiten pivotear sobre el plano focal posterior del objetivo. Luego se alinea cada foco individualmente hasta que incidan de forma perpendicular a la muestra, a través de la iteración de los grados de libertad que ofrecen en conjunto *D2-E5* para 775 nm, *D1-E6* para 594 nm y *NFE-E4* para 640 nm. En la Fig. (3.3.a) se observa el resultado final de la alineación de los focos. En color azul se muestra la excitación de 594 nm, en color verde la excitación de 640 nm y en color rojo el láser de STED de 775 nm. En la Fig. (3.3.b) se

muestra el perfil de intensidades superpuestas.

Los pulsos de cada uno de los láseres tienen diferente perfil temporal. La alineación temporal del nanoscopio consiste en encontrar la posición relativa entre cada pulso de excitación y el de STED, de forma tal de maximizar la depleción. Para ello, una vez que el nanoscopio se encuentra alineado espacialmente, se mide la $I_{STED}/I_{Confocal}$ a medida que la distancia temporal entre el pulso de excitación y el de STED varía. Para modificar la posición relativa entre los pulsos, se altera la distancia del camino eléctrico en la sincronización de los láseres (1 ns $\approx$ 20 cm de cable). Se prepara una solución 10 uM de Atto 647N, se superpone el haz de excitación en 640 nm y el haz de STED con forma Gaussiana (es decir, sin el *VPP*) y se realiza una medición de fluorescencia. Primero excitando solamente el fluoróforo con el haz de 640 nm y seguidamente con el haz de excitación y el de STED incidiendo sobre la muestra simultáneamente. Luego, se calcula el valor medio de intensidad de fluorescencia en cada caso y se realiza el cociente. Cuando dicho cociente sea mínimo significa que la depleción por emisión estimulada se produce de la forma más eficiente posible, y por lo tanto es la posición temporal ideal entre el pulso de excitación y de STED. De forma análoga se lleva a cabo la medición para el fluoróforo Atto 594, excitando con el láser de 594 nm. En la Fig. (3.3.c) se muestra la forma característica y posición optima de cada uno de los pulsos, para obtenerlas, se utilizó un dispositivo de conteo de fotones individuales correlacionados en el tiempo.

Como se mencionó en la sección [2.3], en la modalidad P-STED, los fotones que arriban al detector en las primeras centenas de pico segundos poseen información de bajas frecuencias espaciales, lo cual produce un detrimento en la resolución del nanoscopio. Para evitar este inconveniente, se realiza una selección temporal de los fotones de fluorescencia con los cuales se reconstruye la imagen. Se utilizó una placa electrónica fabricada en el Instituto Max Planck de biofísica química, que permite definir la posición y ancho temporal de una ventana de detección. Utiliza como entrada la señal proveniente de todos los fotones que inciden sobre el fotodiodo de avalancha y una señal de sincronismo de los láseres. La salida corresponde solamente a los fotones que se encuentran dentro de la ventana temporal definida. Para poder visualizar el proceso de selección temporal, se utiliza un dispositivo de conteo de fotones individuales correlacionados en el tiempo. En la Fig. (3.3.d) se observa el histograma de arribo de fotones que da lugar al tiempo de vida del fluoróforo Atto 647N (la intensidad se muestra en escala logarítmica). Es conveniente descartar los fotones que arriban al detector durante la duración del pulso del haz de STED, puesto que no fueron depletados eficientemente y también los fotones que arriban al detector luego de un tiempo mucho mayor que el tiempo de vida del fluoróforo (típicamente 3-4 ns), puesto que son contribuciones, principalmente,

de fondo. En la Fig. (3.3.d) se muestran, en color azul, los fotones descartados y en color rojo los colectados para el fluoróforo Atto 647N.

3.3. Desempeño

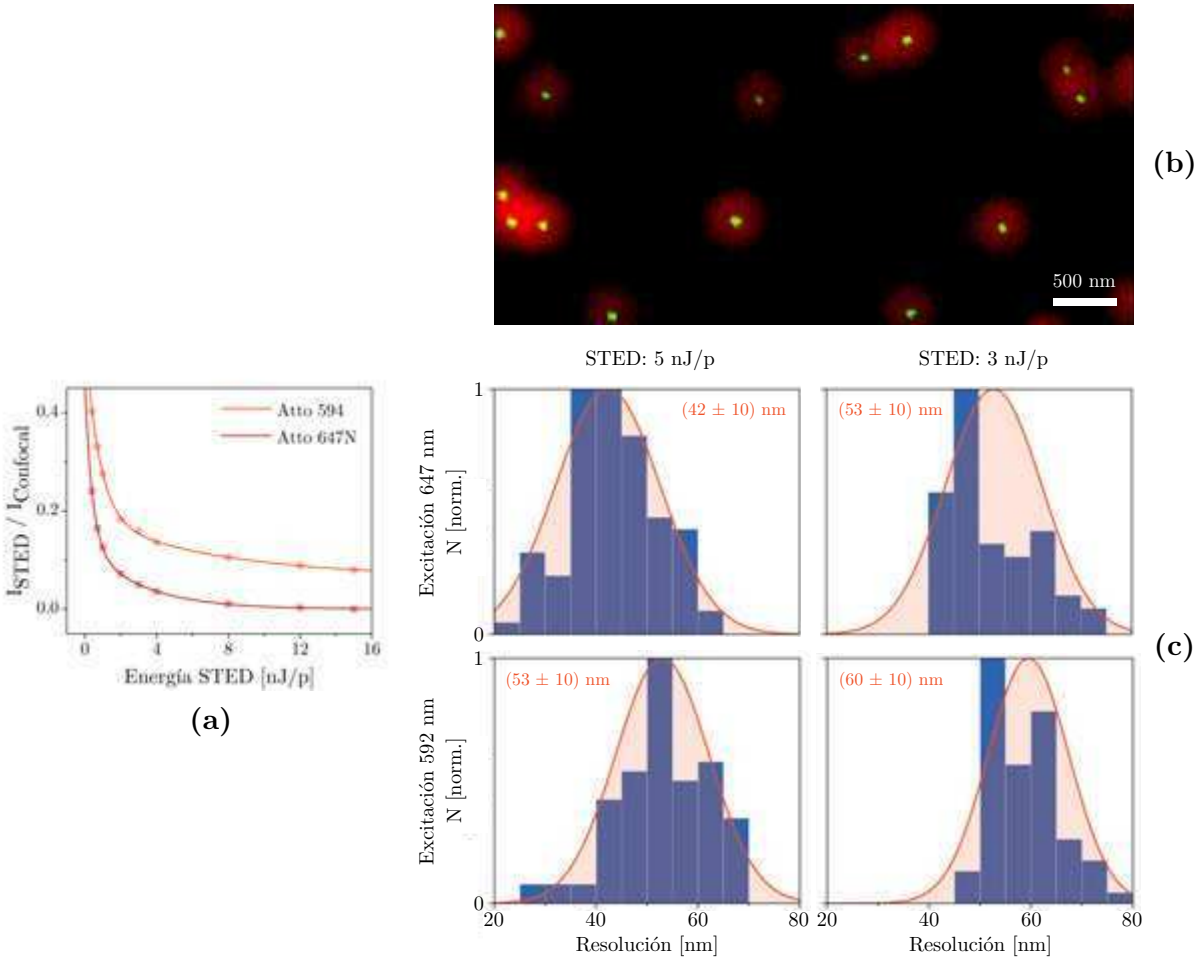


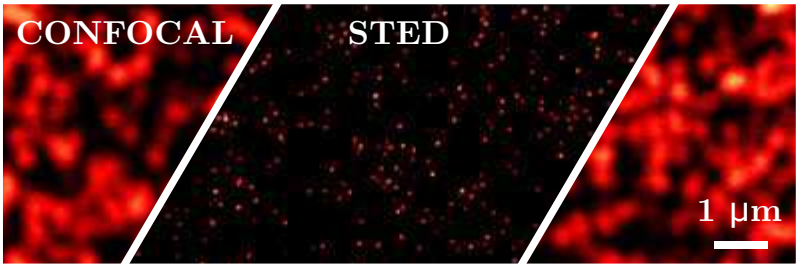
Figura (3.4): Desempeño del nanoscopio STED. (a) Supresión de fluorescencia. **(b)** Nanopartículas fluorescentes de Atto 647N. En color rojo se muestra la imagen confocal y en color verde la imagen de STED. **(c)** Resolución.

Como se puede ver en la Fig. (3.2.b), el espectro de emisión, y por lo tanto la sección eficaz de emisión estimulada para la longitud de onda del haz de STED es diferente para cada fluoróforo. Es esperable, entonces, que para una determinada potencia de STED la resolución sea diferente en cada canal. Para caracterizar la eficiencia de depleción, se midió la $I_{STED}/I_{Confocal}$ en función de la energía del pulso de STED de forma análaga a la explicada en la sección [3.2] para la alineación temporal de los pulsos. En la Fig. (3.4.a) se observan las

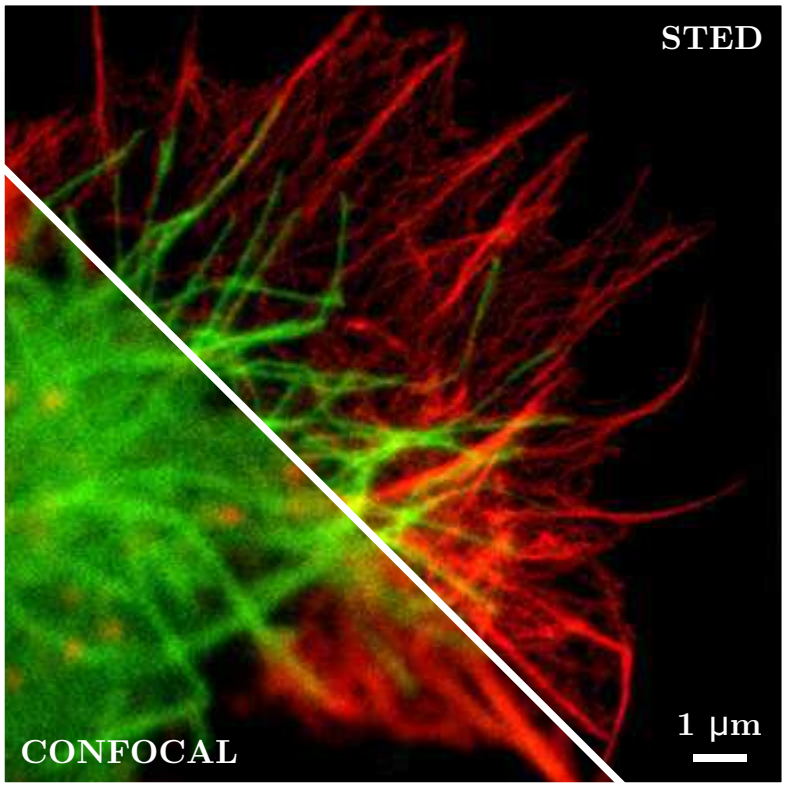
curvas características de supresión de fluorescencia para cada fluoróforo. Se puede notar que al utilizar una energía de 15 nJ/p el fluoróforo Atto 647N se logra depletar completamente, mientras que el fluoróforo Atto 594 satura en un valor 10 % mayor.

El parámetro que define el desempeño de un nanoscopio es la resolución. Para caracterizarla, se depositaron nanopartículas fluorescentes (anticuerpos secundarios contra ratón marcados con entre 2 y 9 moléculas fluorescentes, Sigma Aldrich) sobre un cubreobjetos (#1.5, con cámara Nunc, Lab-Tek II) en una concentración de una nanopartícula cada 4 μm^2. En la Fig. (3.4.b) se observa un ejemplo, donde, en color rojo se muestra la imagen confocal, y en color verde la imagen de STED. Se adquirieron multiples imágenes de 5×5 μm, utilizando 500×500 pixels, para dos energías del pulso de STED. Se analizaron aproximadamente 100 partículas para cada condición y se ajustó el ancho a mitad de altura de cada una de ellas. En la Fig. (3.4.c) se observan los histogramas de la resolución obtenidos. Al excitar el fluoróforo Atto 647N y depletar utilizando una energía de 5 $^{\mathrm{nJ}}/_{\mathrm{p}}$, se obtuvo una resolución de (42 ± 10) nm y al reducir la energía a 3 $^{\mathrm{nJ}}/_{\mathrm{p}}$ se obtuvo una resolución de (53 ± 10) nm. Como era de esperarse, la resolución obtenida para el fluoróforo Atto 594 para una determinada potencia de STED fue levemente inferior, obteniendo (53 ± 10) nm al utilizar una energía de 5 $^{\mathrm{nJ}}/_{\mathrm{p}}$ y de (60 ± 10) nm al utilizar una energía de 3 $^{\mathrm{nJ}}/_{\mathrm{p}}$. El ancho de las distribuciones se debe a la incerteza en el proceso de ajuste del ancho a mitad de altura de cada nanopartícula y a posibles aglomeraciones de anticuerpos secundarios.

En la Fig. (3.5) se exponen, a modo de ejemplo, dos imágenes confocal-STED donde a través de una inspección visual, se puede observar el aumento en la resolución que produce la nanoscopía STED en comparación con la microscopia confocal. En la Fig. (3.5.a) se muestra la imagen de nanopartículas fluorescentes de 40 nm de diámetro (Dark red, Invitrogen). La imagen fue adquirida utilizando 15×5 μm, 1500×500 pixels (10 nm/pixels), 100 μs de tiempo de integración, 10 μW de potencia de excitación para el haz de 640 nm, una energía de 5 $^{\mathrm{nJ}}/_{\mathrm{p}}$ para el haz de STED en la entrada de la pupila del objetivo y se aplicó un filtro Gaussiano de 40 nm. En la Fig. (3.5.b) se muestra la imagen de una neurona hipocampal de ratón adquirida en colaboración con el grupo de Neurobiología Molecular, IBIOBA, CONICET, BA, Argentina. En color verde se muestra tubulina tirosina marcada con el fluoróforo Atto 594 y en color rojo se muestra actina marcada con el fluoróforo Atto 647N. En el capítulo [5] se explicará con gran detalle la estructura del citoesqueleto neuronal. La imagen fue adquirida utilizando 15×15 μm, 750×750 pixels (20 nm/pixels), 100 μs de tiempo de integración, 8 μW de potencia de excitación para el haz de 592 nm y 640 nm, una energía de 3 $^{\mathrm{nJ}}/_{\mathrm{p}}$ para el haz de STED en la entrada de la pupila del objetivo y se aplicó un filtro Gaussiano de 40 nm.



(a)



(b)

Figura (3.5): Imágenes de STED. (a) Nanopartículas fluorescentes de 40 nm de diámetro. **(b)** Neurona hipocampal de ratón. En color verde se muestra tubulina tirosina marcada con el fluoróforo Atto 594 y en color rojo se muestra actina marcada con el fluoróforo Atto 647N.

3.4. Preparación de muestras biológicas

La obtención de imágenes con gran resolución espacial mediante nanoscopía STED requiere de un proceso de optimización específico para cada sistema que se desee analizar. En esta sección se presentan recomendaciones que facilitan la preparación de muestras biológicas, tales como la elección de muestras, el espesor de los cubre objetos, la selección de fluoróforos, la densidad de marcación y el medio de montaje adecuado, entre otros.

STED permite visualizar una gran variedad de muestras, tales como células [D'Este et al., 2015], tejidos [Urban et al., 2011, Ilgen et al., 2014] e incluso animales vivos [Berning et al., 2012]. La estructura que se desee observar se debe encontrar lo más cercana posible al cubre objetos, puesto que el objetivo del nanoscopio (Leica, HCX PL APO 100x/1.40-0.70 Oil CS) posee una distancia de trabajo de 90 μm. Además, se encuentra diseñado para trabajar con cubre objetos de 170 μm de espesor, por lo tanto, las muestras deben ser montadas en los cubre objetos denominados número 1.5 (160-190 μm) o número 1.5H (170-180 μm).

Multiples fluoróforos han sido probados exitosamente para la configuración espectral que se presenta en esta tesis. Por ejemplo; Atto 590 [Göttfert et al., 2013, Kolmakov et al., 2014], Atto 594 [Göttfert et al., 2013, Kolmakov et al., 2014], Alexa Fluor 594 [Kolmakov et al., 2014], mCherry [Hein, 2009], Atto 647N [Willig et al., 2007], Abberior STAR 635 [Göttfert et al., 2013, Wurm et al., 2012], Abberior STAR 635P [Göttfert et al., 2013, Kolmakov et al., 2014, Wurm et al., 2012] o TagRFP657 [Morozova et al., 2010].

La densidad de marcación es de gran importancia, puesto que, si desean obtener resoluciones de unas pocas decenas de nanómetros, es indispensable que haya fluoróforos marcando la estructura para que ello sea posible. Típicamente las concentraciones de los anticuerpos primarios y secundarios resultan entre 5 y 10 veces mayores que las que se utilizan para microscopía confocal.

El índice de refracción del medio de montaje debe coincidir con el del aceite de inmersión utilizado en el objetivo para permitir la máxima penetración de la luz con el mínimo de aberraciones. Es indispensable que no genere fluorescencia al ser irradiado con las altas densidades de potencia a 775 nm. Se han obtenido muy buenos resultados utilizando *Mowiol*, un medio de montaje basado en glicerol y alcohol polivinílico [Osborn and Weber, 1982, Vogelsang et al., 2008].

4

Organización de proteínas en la membrana del *Trypanosoma cruzi*

Trypanosoma cruzi (T. cruzi) es el parásito protozoario flagelado causante de la enfermedad de Chagas. Como se observa en la Fig. (4.1), su ciclo de vida es complejo y alterna entre un insecto hematófago vector, de la familia Reduviidae (vinchucas), y un hospedador mamífero.

Un insecto vector se infecta con el *T. cruzi* al alimentarse de sangre de una persona o animal previamente infectado. En el intestino del insecto se diferencia a epimastigote (estadio replicativo). El epimastigote se multiplica por fisión binaria. En la zona terminal del intestino el epimastigote se diferencia a tripomastigote metacíclico (estadio infectivo). Durante el día, la vinchuca se esconde en las paredes o techos de las casas y durante la noche emergen para alimentarse. Luego de picar, defecan en la persona y trasmiten parásitos en las heces cerca de la herida de la picadura. Al rascarse la picadura, los tripomastigotes entran al hospedador a través de la herida, o a través de la mucosa ocular. La enfermedad también se propaga a través de transfusiones de sangre, trasplantes de órgano, ingesta de comida contaminada con parásitos, o transmisión congénita [Remme et al., 2006]. Una vez dentro del huésped, los tripomastigotes invaden las células, donde se diferencian en amastigotes

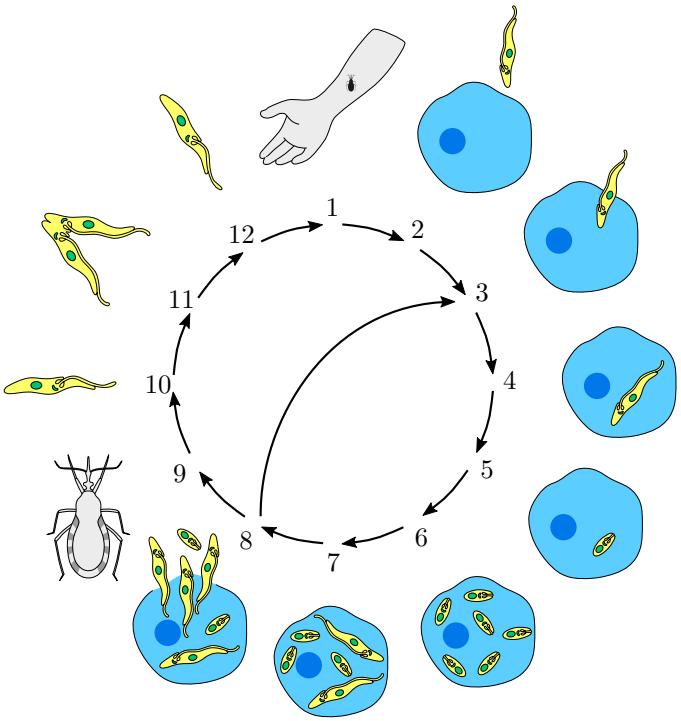


Figura (4.1): Ciclo replicativo del *T. cruzi*. A la **izquierda** se muestra el desarrollo en el insecto vector y a la **derecha** se muestra la evolución en una persona.

(estadio esférico y replicativo). Los amastigotes se multiplican mediante fisión binaria y luego se diferencian al estadio tripomastigote sanguíneo. La acumulación de parásitos intracelulares provoca eventualmente el estallido de la célula y la liberación al torrente sanguíneo de los tripomastigotes [Martins et al., 2012].

La enfermedad, en los humanos, ocurre en dos etapas. Una etapa aguda, justo después de la infección inicial, y una etapa crónica que se desarrolla muchos años después [Dias, 1984]. La fase aguda generalmente no presenta síntomas o son muy leves (fiebre, dolor de cabeza, fatiga, dolor muscular, diarrea, náuseas, vómitos, etc.). Si es detectada, puede ser tratada con benznidazol o nifurtimox [Pinto et al., 2009]. La etapa crónica afecta principalmente al corazón y al sistema digestivo. Si una infección no es tratada en la etapa aguda, el individuo permanecerá infectado de por vida. El diagnóstico se logra encontrando al parásito en muestras de sangre utilizando un microscopio, o a través de la presencia de anticuerpos específicos para *T. cruzi* en la sangre. Todavía no se ha desarrollado una vacuna. Los métodos de prevención consisten básicamente en la eliminación de vinchucas y en el análisis de sangre utilizada en transfusiones. La enfermedad de Chagas representa un problema de salud pública en los países de América Latina. Se estima que aproximadamente 8 millones de personas se encuentran infectadas, y de ellas, 12500 mueren al año [Remme et al., 2006]. Los

mecanismos presentes en la patogénesis, así como también las manifestaciones clínicas de la enfermedad de Chagas no se han dilucidado completamente. El estudio de la biología del *T. cruzi* es de primordial importancia para el desarrollo de nuevos métodos de diagnóstico y cura.

4.1. Mecanismos moleculares de supervivencia del *T. cruzi*

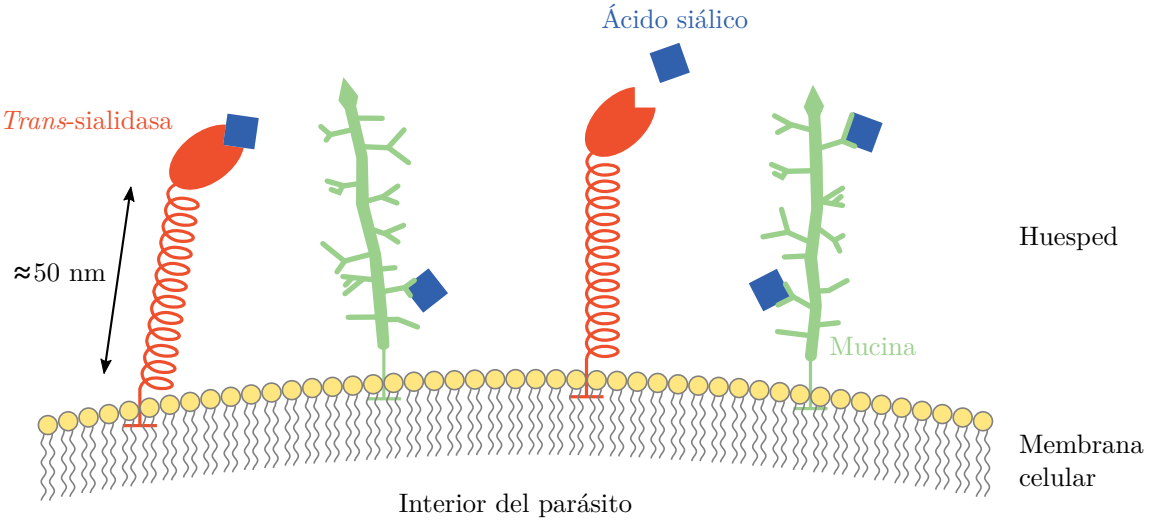


Figura (4.2): Representación esquemática de la membrana del *T. cruzi* en la nanoescala.

La membrana del *T. cruzi* está equipada para sobrevivir en la sangre del huésped e invadir células donde proliferarse. El parásito es incapaz de sintetizar ácido siálico, un monosacárido involucrado en la respuesta inmune del huésped [Schauer, 2000]. Como se observa en la Fig. (4.2), las *trans*-sialidasas y mucinas son enzimas y substratos, respectivamente, del sistema que recoge ácido siálico del huésped y lo transfiere a la superficie del parásito en una interacción fundamental para la supervivencia del mismo [Buscaglia et al., 2006].

Tanto las *trans*-sialidasas como las mucinas, están formadas por tres dominios. Las *trans*-sialidasas poseen un dominio catalítico, seguido de un dominio repetitivo de 12 aminoácidos, denominado SAPA (Shed Acute Phase Antigen), que aleja al dominio catalítico unos 50 nm de la superficie celular, y una región terminal que se une de forma covalente a un ancla glicosilfosfatidilinositol (GPI) para lograr la unión a la membrana celular. Las mucinas están compuestas por un extremo con un grupo amino libre, una región central con múltiples sitios

para la glicosilación (añadido del ácido siálico) y, al igual que las *trans*-sialidasas, una región terminal que permite la unión a la membrana celular mediante un ancla GPI [Giorgi and de Lederkremer, 2011]. Las *trans*-sialidasas y las mucinas son sintetizadas dentro de la célula, se trasladan hacia la superficie, donde se ubican en la membrana, y luego son secretadas al entorno extracelular.

Debido a la escasez de ensayos en la membrana del *T. cruzi*, la glicobiología y la dinámica de la membrana de los tripomastigotes del *T. cruzi* son desconocidas. Es de gran interés entender completamente el proceso de adquisición de ácido siálico en conjunto con la distribución de moléculas aceptoras en la superficie del parásito. Las dimensiones de los dominios de las mucinas y *trans*-sialidasas, no permiten resolver este problema mediante microscopias de fluorescencia convencionales. En este trabajo se estudia, en colaboración con el Grupo de Inmunología Molecular, IIB, UNSAM, CONICET, BA, Argentina, la membrana del tripomastigote del *T. cruzi* desde la perspectiva glicobiológica mediante la descripción de la localización de las *trans*-sialidasas y las mucinas con una resolución espacial sin precedentes [Lantos et al., 2016, Lantos, 2016].

4.2. Preparación de muestras

La preparación de muestras se llevó a cabo en el IIB. Se utilizaron tripomastigotes de la cepa CL Brener derivados de células de cultivo Vero (ATCC). Las células fueron cultivadas en medio esencial mínimo (Gibco) con 4 % de suero fetal bovino (Gibco) a 37 °C y 5 % de dióxido de carbono y fueron infectadas al segundo día de cultivo. Los tripomastigotes se cosecharon a partir sexto día luego de la infección. Para obtener cultivos exclusivamente de tripomastigotes, se eliminaron los amastigotes por natación, es decir, se centrifugaron los medios de cultivo a 2500 rpm durante 5 minutos, se retiró el sobrenadante y se incubó en condiciones de cultivo por al menos 2 horas.

Para realizar la inmunomarcación, se recubrieron cubreobjetos de 12 mm de diámetro (no. 1.5, Marienfeld) con 0,2 $^{mg}/_{ml}$ de poli-L-lisina (Sigma Aldrich). Se enjuagaron con buffer TRIS (150 mM NaCl, 50 mM Tris, pH: 7.6) y se depositaron sobre ellos un millón de tripomastigotes previamente fijados con p-formaldehido al 4 % (Electron Microscopy Sciencies) durante 1 hora. Los cubreobjetos fueron bloqueados con 2 % de albúmina de suero bovino (BSA, Amresco) en buffer fosfato salino (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na_2HPO_4, 2 mM KH_2PO_4, pH: 7.4) filtrado por una membrana de 0,22 μm. Para marcar el ácido siálico, se llevó a cabo una reacción química bio-ortogonal a través del uso de conjugados sintéticos azido-sialidados que permitieron la incorporación de un epítope denominado Flag. Se

incubaron durante 1 hora anticuerpos primarios contra Flag (rata) y contra SAPA (conejo), diluidos mil veces en 2 % BSA. Luego, se incubaron durante 1 hora anticuerpos secundarios contra rata marcados con Atto 594 (Sigma Aldrich) y contra conejo marcados con Atto 647N (Sigma Aldrich) a una concentración de 2 $^{\mu g}/_{ml}$. Los cubre objetos se montaron sobre una gota de 5 μl de Mowiol.

4.3. Resultados y discusiones

Se realizaron más de treinta imágenes de STED de tripomastigotes del *T. cruzi*. Las mucinas se marcaron con el fluoróforo Atto 594 y las *trans*-sialidasas con el fluoróforo Atto 647N. Las imágenes se adquirieron utilizando 20 μW de potencia de excitación y una energía de 3 $^{\text{nJ}}/_{\text{p}}$ para el haz de STED en la entrada de la pupila del objetivo. El tiempo de integración fue de 100 μs y el tamaño del pixel de 20 nm. En las imágenes características que se muestran en las Figs. (4.3) y (4.4), además, se aplicó un filtro Gaussiano de 30 nm.

Si bien las imágenes confocales permiten observar que tanto las *trans*-sialidasas como las mucinas no están distribuidas uniformemente en la membrana del parásito y sugieren la presencia de dominios que no colocalizan entre sí, las imágenes de STED permiten analizar el tamaño, la separación y colocalización entre ellos. Para estudiar en detalle estas observaciones, se realizó un análisis estadístico de la distribución y morfología de las mucinas y *trans*-sialidasas. Se implementó un algoritmo que a partir de una binarización de la imagen, permite reconocer dominios, determinar sus dimensiones, calcular la distancia hacia los más cercanos (primer vecino) y calcular el grado de colocalización entre vecinos de diferente identidad, lo cual se esquematiza en la Fig. (4.5.a)

Se analizaron más de 800 dominios. Se calculó el diámetro medio, como el diámetro de una circunferencia de igual área que la estructura irregular analizada. Las mucinas presentaron un diámetro medio de (130 ± 35) nm y las *trans*-sialidasas presentaron un diámetro medio de (105 ± 30) nm. En las Figs. (4.5.b) y (4.5.c) se pueden observar los histogramas respectivos. Además, se calculó la distancia a los primeros vecinos de la misma identidad. Las mucinas presentaron un valor medio de (260 ± 115) nm y las *trans*-sialidasas presentaron una distancia media de (220 ± 100) nm. En las Figs. (4.5.d) y (4.5.e) se pueden observar los histogramas respectivos. A partir de estos resultados, podemos afirmar que tanto las mucinas como las *trans*-sialidasas constituyen una población heterogénea en forma y distribución sobre la membrana del parásito.

Se estudió el grado de colocalización entre los dominios de las *trans*-sialidasas y las mucinas. El mismo, se calculó como la distancia entre centros de *trans*-sialidasas y mucinas

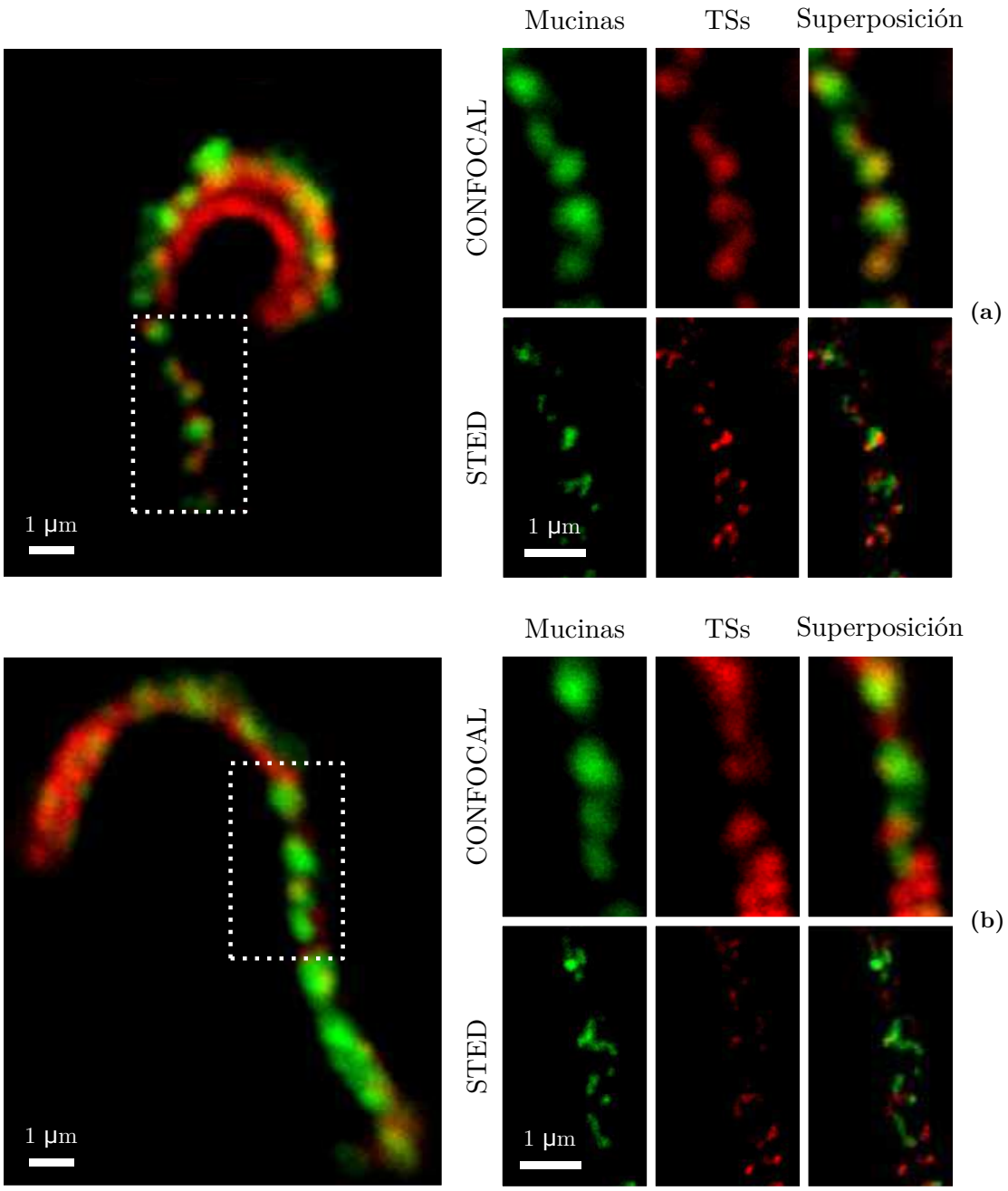


Figura (4.3): Imágenes características del *Trypanosoma cruzi.*

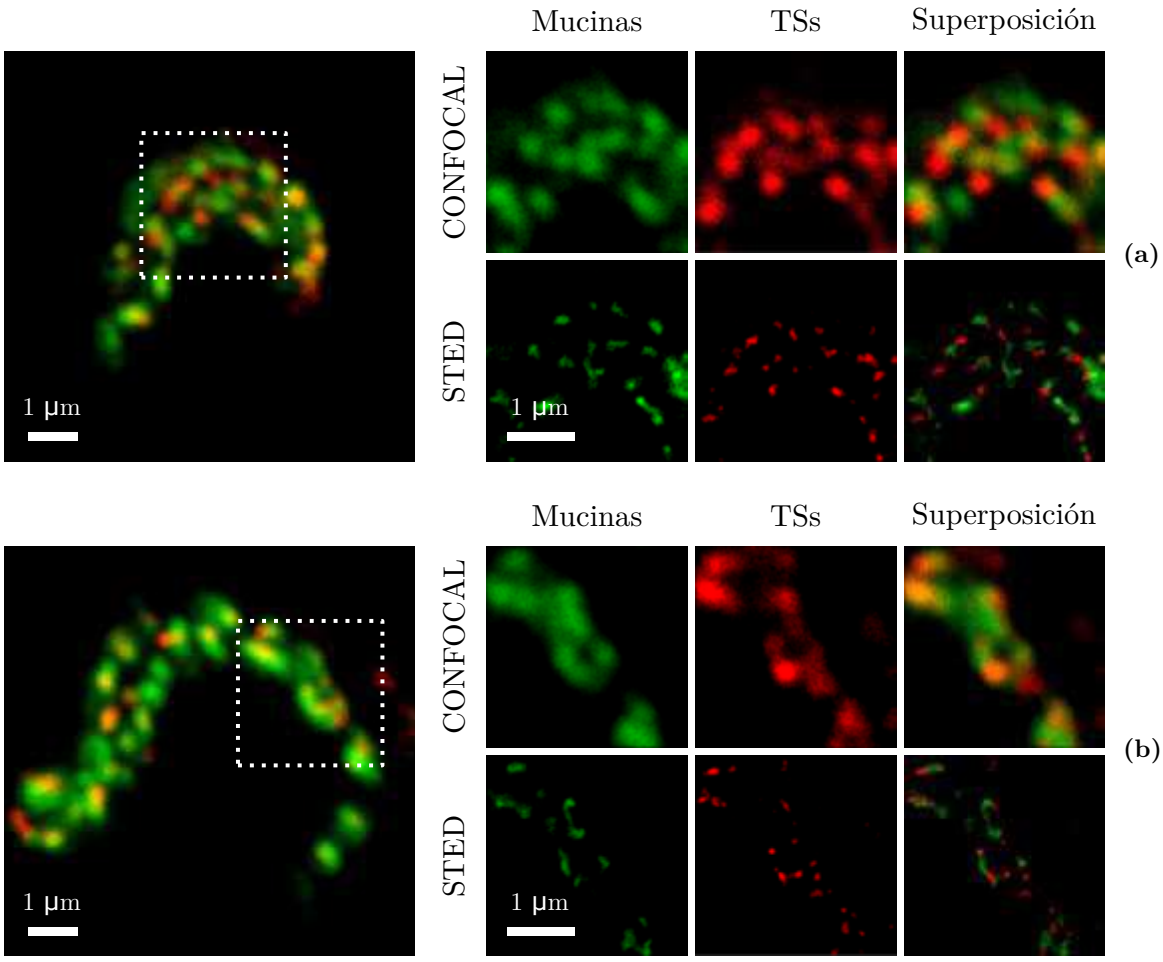


Figura (4.4): Imágenes características del *Trypanosoma cruzi.*

vecinas menos los radios efectivos de cada una de ellas. Como se muestra en la Fig. (4.5.f), un valor mayor que cero indica segregación, un valor igual que cero indica adyacencia estricta y un valor menor que cero indica solapamiento entre los dominios. En la Fig. (4.5.g), se puede observar el histograma de colocalización, el cual presenta un valor medio cercano a cero y una moda de 25 nm. Además, se calculó la razón entre el área de colocalización con respecto al área total ocupada por las mucinas y se obtuvo un valor del 16 % y la razón entre el área de colocalización con respecto al área total ocupada por las *trans*-sialidasas y se obtuvo un valor de 20 %. Basándonos en estos resultados, podemos afirmar que las *trans*-sialidasas y mucinas no colocalizan.

4.4. Conclusiones y perspectivas

Era esperable que las *trans*-sialidasas se ubicaran suficientemente cerca de las mucinas, de forma tal de favorecer el proceso de sialidación. Sin, embargo, no hubo colocalización. Las *trans*-sialidasas y mucinas presentan una distribución segregada, tanto en el cuerpo celular como en el flagelo de la superficie del parásito. Teniendo en cuenta que las *trans*-sialidasas y las mucinas no solamente son enzima y substrato, sino también proteínas unidas a la membrana celular mediante un ancla GPI, su distribución segregada es desconcertante y evidencia la complejidad de los mecanismos de infección del tripanosoma y del tráfico de proteínas en la membrana.

Estos resultados desafían el paradigma clásico en el que las mucinas ancladas a la membrana celular son sialidadas por una molécula de *trans*-sialidasa vecina y no podrían haber sido obtenidos mediante técnicas de microscopía convencional, puesto que las dimensiones de interacción de los dominios se encuentran por debajo del límite de difracción de la luz.

A partir de este descubrimiento, especulamos que las mucinas podrían sialidarse por medio de *trans*-sialidasas secretadas en el medio extracelular. Para comprobar esta hipótesis se realizó un experimento donde se mezclaron parásitos fijados con paraformaldehído, con vivos. Los parásitos fijados son aceptores de ácido siálico pero incapaces de producir *trans*-sialidasas. Por lo tanto si estos parásitos adquieren ácido siálico la única posibilidad es que sea por medio de la *trans*-sialidasa liberada por los parásitos viables. Lo que se observó, es que a tiempos muy cortos (1 min) los parásitos vivos lograban sialidar a los parásitos fijados, lo cual permite ganar confianza en nuestra hipótesis [Lantos et al., 2016, Lantos, 2016].

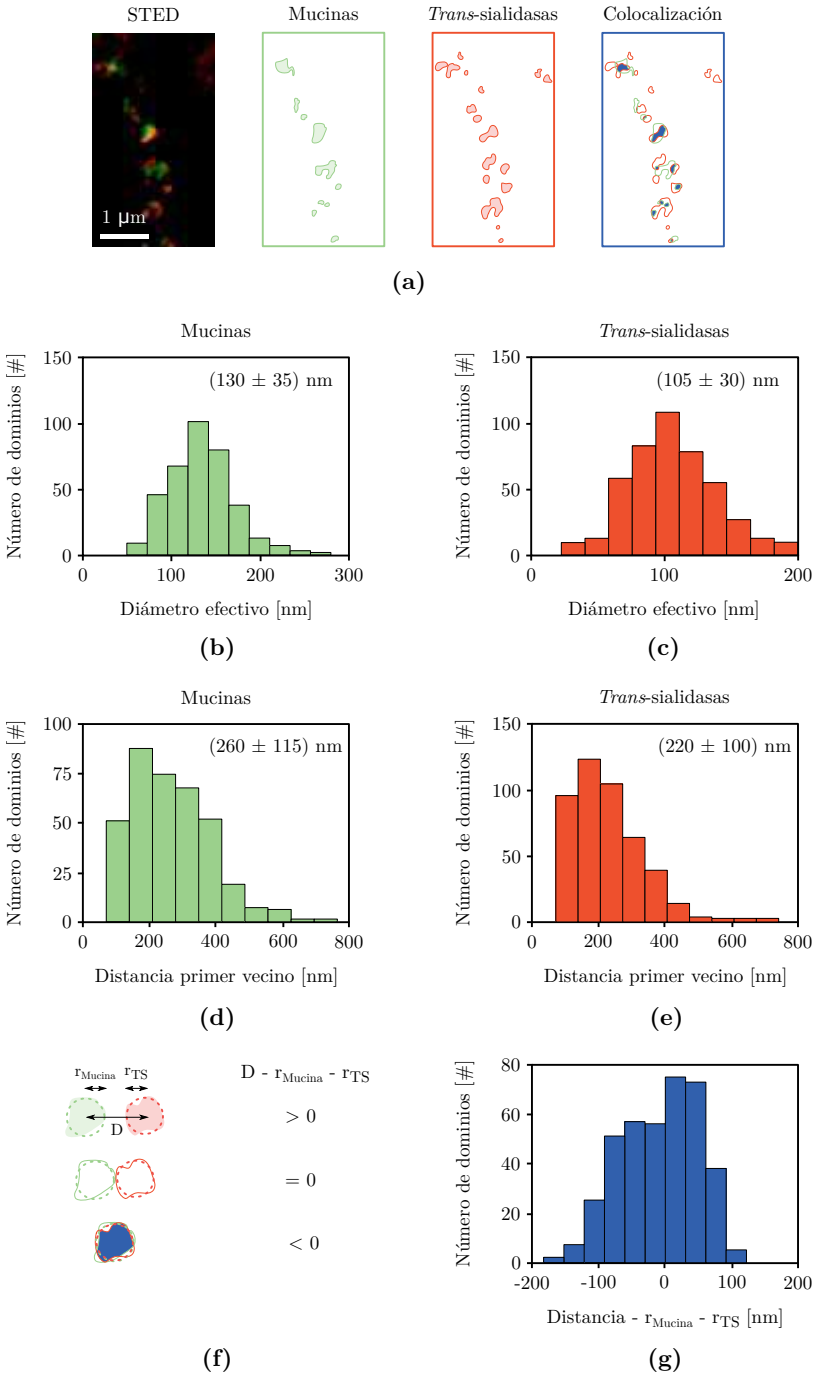


Figura (4.5): Análisis de datos. **(a)** Esquema representatito del algoritmo de selección de dominios. **(b)** y **(c)** Histogramas del diámetro efectivo para las mucinas y *trans*-sialidasas respectivamente. **(d)** y **(e)** Histogramas de la distancia al primer vecino para las mucinas y *trans*-sialidasas respectivamente. **(f)** Esquema del cálculo de colocalización. **(g)** Histograma de colocalización.

5

Arquitectura del citoesqueleto neuronal modulada por RhoA

LAS neuronas son células altamente polarizadas. Como se puede ver en la Fig. (5.1.a), las neuronas hipocampales en cultivo presentan, inicialmente, un arreglo simétrico formando un lamelipodio (estadio 1) y poco tiempo después comienzan a crecer proyecciones menores con un cono de crecimiento en su extremo distal, denominadas neuritas (estadio 2). Estas neuritas se expanden y retraen sin elongación neta. Al día siguiente, una de ellas, con un cono de crecimiento más extendido, se prolonga rápidamente y se convierte en el axón (estadio 3). Varios días después, las neuritas restantes continúan creciendo y ramificándose hasta formar las dendritas (estadio 4), y en la etapa final de maduración se desarrollan protrusiones, denominadas espinas dendríticas (estadio 5) [Govek et al., 2005]. El axón se encarga de trasmitir información y las dendritas de recibirla. La habilidad de una neurona de polarizarse es crucial en el proceso de transmisión de señales y, en consecuencia, para el funcionamiento del sistema nervioso adulto. El conocimiento de los mecanismos que gobiernan la polaridad morfológica es fundamental para entender el desarrollo neuronal, la plasticidad y enfermedades neurodegenerativas [Caceres et al., 1986, Dotti and Banker, 1986, Cáceres et al., 2012].

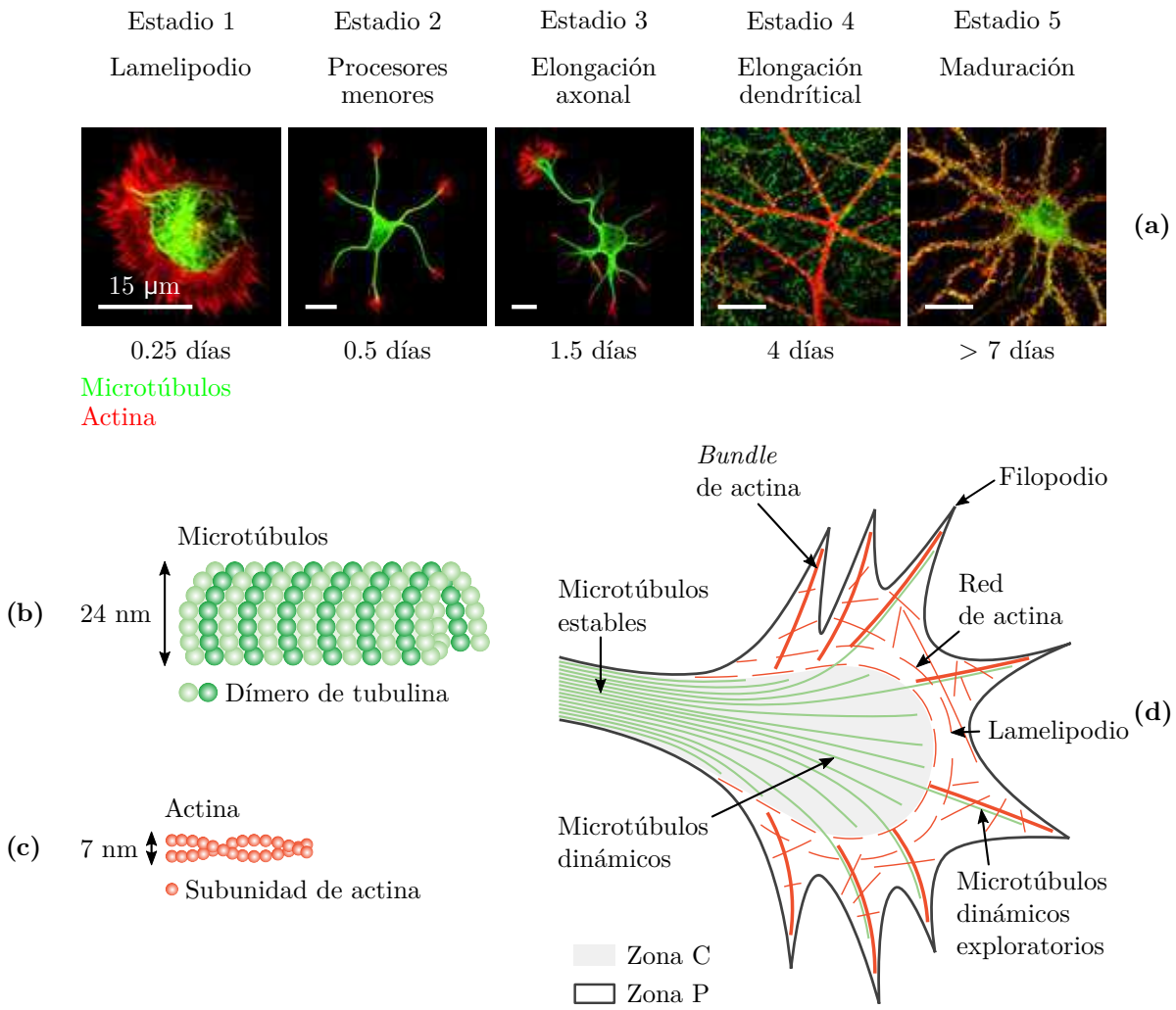


Figura (5.1): Morfología neuronal. **(a)** Secuencia de cambios estructurales de una neurona hipocampal en cultivo en función del tiempo. En color verde está marcados los microtúbulos y en color rojo la actina. La barra de escala es de 15 μm en todas las imágenes. Imagen adaptada de [Cáceres, 2016]. **(b)** y **(c)** Esquema de los microtúbulos y de la actina respectivamente. **(d)** Distribución de microtúbulos y actina en un cono de crecimiento axonal.

El citoesqueleto tiene un rol central en la polaridad neuronal porque no solamente da soporte estructural a la célula, sino que permite el tráfico de vesículas y organiza el interior celular. Está formado fundamentalmente por microtúbulos, filamentos de actina y proteínas que regulan su dinámica. Los microtúbulos son polímeros no covalentes en forma cilíndrica, hueca, de 24 nm de diámetro, formados por heterodímeros de α y β tubulina, como se puede observar en la Fig. (5.1.b). Inicialmente, se sintetizan con un residuo tirosina en su extremo carboxilo terminal. Existen en un estado dinámico de polimerización (crecimiento) y depolimerización (encogimiento) que les permite reorganizarse rápidamente, diferenciarse

espacial y temporalmente de acuerdo al contexto celular, y, explorar el ambiente celular. La tubulina tirosinada, puede sufrir modificaciones post-traduccionales, algunas de ellas, por ejemplo, dan lugar a la (i) tubulina detirosinada (también conocida como glu tubulina), en la que una enzima remueve el residuo tirosina del extremo carboxilo terminal y deja expuesto un residuo (aminoácido) de ácido glutámico y a la (ii) tubulina acetilada, en la que una enzima le agrega un grupo acetilo. Ambas modificaciones solamente ocurren cuando la tubulina está incorporada a los microtúbulos, tienen un tiempo de vida mayor y son mucho más estables ante efectos desestabilizantes que la tubulina tirosinada [Conde and Cáceres, 2009]. La actina es una proteína monomérica que tiene la capacidad de polimerizar formando un filamento helicoidal con 13 unidades por giro. Como se puede observar en la Fig. (5.1.c), tiene la apariencia de una doble hélice.

Un aspecto determinante en el proceso de la polarización neuronal lo constituye la dinámica del citoesqueleto en los conos de crecimientos, los cuales son estructuras sensoriales muy dinámicas que se encuentran en los extremos de los procesos neuronales en desarrollo. Son el lugar activo de crecimiento de axones y tienen la capacidad de detectar señales químicas del entorno que los rodea guiando el crecimiento axonal hacia zonas específicas [Conde and Cáceres, 2009]. Están formados por una estructura extremadamente plana, denominada lamela, de la que emergen finas extensiones cilíndricas llamadas filopodios. En los filopodios, la actina forma haces muy densos de filamentos paralelos (*bundles*), mientras que en la zona periférica (P) del cono de crecimiento forma una compleja red. Los microtúbulos forman haces paralelos muy densos a lo largo del axón, y, cuando entran a la región central (C) del cono de crecimiento, que es la zona más voluminosa, se separan unos de otros [Lowery and Van Vactor, 2009].

El ensamblado y la estabilización local de microtúbulos en el cono de crecimiento de una neurita particular constituye una señal fisiológica que determina la polarización, convirtiendo a dicha neurita en axón. Modificar la dinámica de microtúbulos es suficiente para alterar la diferenciación y el desarrollo de axones y dendritas, como así también su habilidad para regenerarse [Witte et al., 2008]. Entre las proteínas que regulan la dinámica del citoesqueleto, se encuentran las Rho-GTPasas, pequeñas proteínas de señalización intracelular. En particular, RhoA ha sido implicada en la polaridad neuronal y posterior elongación axonal mediante un rol complejo [Gonzalez-Billault et al., 2012, Wojnacki et al., 2014]. En la actualidad, hay muy poca evidencia sobre su activación espacio temporal y sobre su participación en diferentes etapas de la formación del axón, debido a que la visualización y análisis cuantitativo de los diversos componentes celulares implicados (microtúbulos y filamentos de actina) no se pueden resolver mediante técnicas de microscopías de fluorescencia convencionales. En el

presente trabajo, en colaboración con el Laboratorio de Neurobiología, INIMEC, CONICET, Córdoba, Argentina, hemos abordado esta problemática, a través del estudio del citoesqueleto de los conos de crecimiento de neuronas hipocampales de estadio 3 mediante la nanoscopía STED.

5.1. Preparación de muestras

La preparación de muestras se llevó a cabo en el INIMEC. Se realizaron cultivos primarios de neuronas hipocampales utilizando embriones de *Rattus norvegicus* (Sprague Dawley) de 18 días de gestación. Las ratas madres fueron anesteciadas en una cámara de CO_2 y sacrificadas mediante dislocación cervical. Los embriones fueron removidos de la cavidad abdominal y decapitados. Las cabezas de los embriones fueron colocadas en una cápsula de Petri estéril en solución salina equilibrada (Invitrogen). Los hipocampos fueron disecados e incubados durante 15 minutos en una solución de tripsina 0,25 % (Gibco) en solución salina equilibrada a 37 °C. El tejido nervioso se precipitó mediante centrifugación y fue resuspendido en medio de siembra (MEM, suero de caballo 10 % $^{v}/_{v}$, piruvato, glutamax y penicilina; Gibco). El tejido fue disociado mecánicamente mediante el pasaje sucesivo por 3 pipetas Pasteur de diámetro decreciente. Finalmente, las neuronas fueron sembradas a una densidad aproximada de 10000 unidades por cm^2 en cubreobjetos de 12 mm de diámetro (no. 1.5, Marienfeld) previamente tratados con poli-L-lisina (Sigma Aldrich). Luego de 2 horas se cambió el medio de siembra por medio de mantenimiento (neurobasasl y B27; Invitrogen). Desde la siembra hasta el momento de fijación los cultivos fueron mantenidos en un incubador húmedo a 37 °C y CO_2 5 % [Wojnacki, 2012].

Para evaluar el efecto que la actividad de RhoA tiene sobre la dinámica de los conos de crecimiento de procesos axonales, neuronas que hayan alcanzado el estadio 3 de desarrollo fueron tratadas con el potente activador de RhoA, conocido como ácido lisofosfatídico (LPA) [Fritz et al., 2013].

Para fijar las células, se incubó mediante agitación, un cubreobjeto con 1 ml de solución de fijación (40 ml solución PHEM, 10 ml paraformaldehido 20 %, 500 μl glutaraldehido 25 %, 1,85 g de sacarosa y 50 μL de triton, PHEM: 60 mM PIPES, 25 mM HEPES, 5 mM EGTA, 1 mM MgCL, pH: 6.9) a 37 °C, durante 20 minutos y se lavó 3 veces con tampón fosfato salino (PBS). Se incubaron las células con una solución de 50 mM de cloruro de amonio en PBS a pH: 7.6 y se lavó 3 veces con PBS. Luego, se realizó la permeabilización de las células mediante una solución con detergente no iónico Tritón 0,01 % $^{v}/_{v}$ en PBS durante 5 minutos. Para bloquear la inmunomarcación inespecífica se trataron los vidrios con una

solución de albúmina sérica bovina (BSA) 5 % $^{p}/_{v}$ en PBS-Triton 0,01 % durante 60 minutos a temperatura ambiente y se lavó 3 veces con PBS-Triton 0,01 %.

La inmunomarcación se llevó a cabo en dos etapas. En primer lugar se realizó la marcación de actina incubando 1 hora a temperatura ambiente las células con faloidina con Atto 594 (Sigma Aldrich) en una concentración de 10 $^{\mu l}/_{ml}$ y se lavó 3 veces con PBS-Triton 0,01 %. En segundo lugar, se realizó la marcación de tubulina. Para ello, se incubaron las células durante 10 minutos a temperatura ambiente con la solución de fijación y se lavó 3 veces con PBS-Triton 0,01 %. Se realizó la marcación con el anticuerpo primario anti tubulina tirosinada de ratón (Sigma Aldrich) utilizando una concentración 1 : 200 en BSA 5 % PBS-Triton 0,01 % durante 1 hora a temperatura ambiente y se lavó 3 veces con PBS-Triton 0,01 % (de forma análoga se realizó para la tubulina detirosinada y acetilada). Luego, se agregó el anticuerpo secundario contra ratón marcado con el fluoróforo Atto 647N (Sigma Aldrich) utilizando una concentración 1 : 200 en BSA 5 % PBS-Triton 0,01 % durante 1 hora a temperatura ambiente y se lavó 3 veces con PBS-Triton 0,01 %. Finalmente, se montaron los vidrios en un portaobjetos, usando 5 μl de Mowiol como medio de montaje.

5.2. Resultados y discusiones

En primer lugar, se estudió el efecto de la activación de RhoA sobre la estructura del citoesqueleto de los conos de crecimiento axonales a través de la distribución de tubulina detirosinada y actina. Para ello, se incubaron neuronas hipocampales de estadio 3 durante 0, 15 y 30 minutos con LPA a una concentración 10 μM.

En las Figs. (5.2.a, 5.2.b y 5.2.c) se pueden observar imágenes confocales características para diferentes tiempos de incubación con LPA [Cáceres, 2016]. En color verde se muestra la tubulina detirosinada y en color rojo se muestra la actina. Las escalas de dimensiones e intensidad de fluorescencia son las mismas en todos los casos. A través de una inspección visual, es posible notar, que al incubar las neuronas con el activador de RhoA durante una mayor cantidad de tiempo; (i) la cantidad de tubulina detirosinada incrementa y (ii) la tubulina detirosinada penetra más en los conos de crecimiento. Se estudiaron en detalle estas observaciones, a través del análisis estadístico de más de 15 conos de crecimiento.

En las Figs. (5.2.d y 5.2.e) se pueden observar, respectivamente, los resultados de área y perímetro, de los conos de crecimiento, para distintos tiempos de incubación con LPA. Dentro del error experimental, ninguna de las dos magnitudes cambió, es decir, el tamaño de los conos de crecimiento, se mantuvo igual. En cambio, al observar el gráfico del valor medio de la intensidad de fluorescencia de tubulina detirosinada dentro del cono de crecimiento,

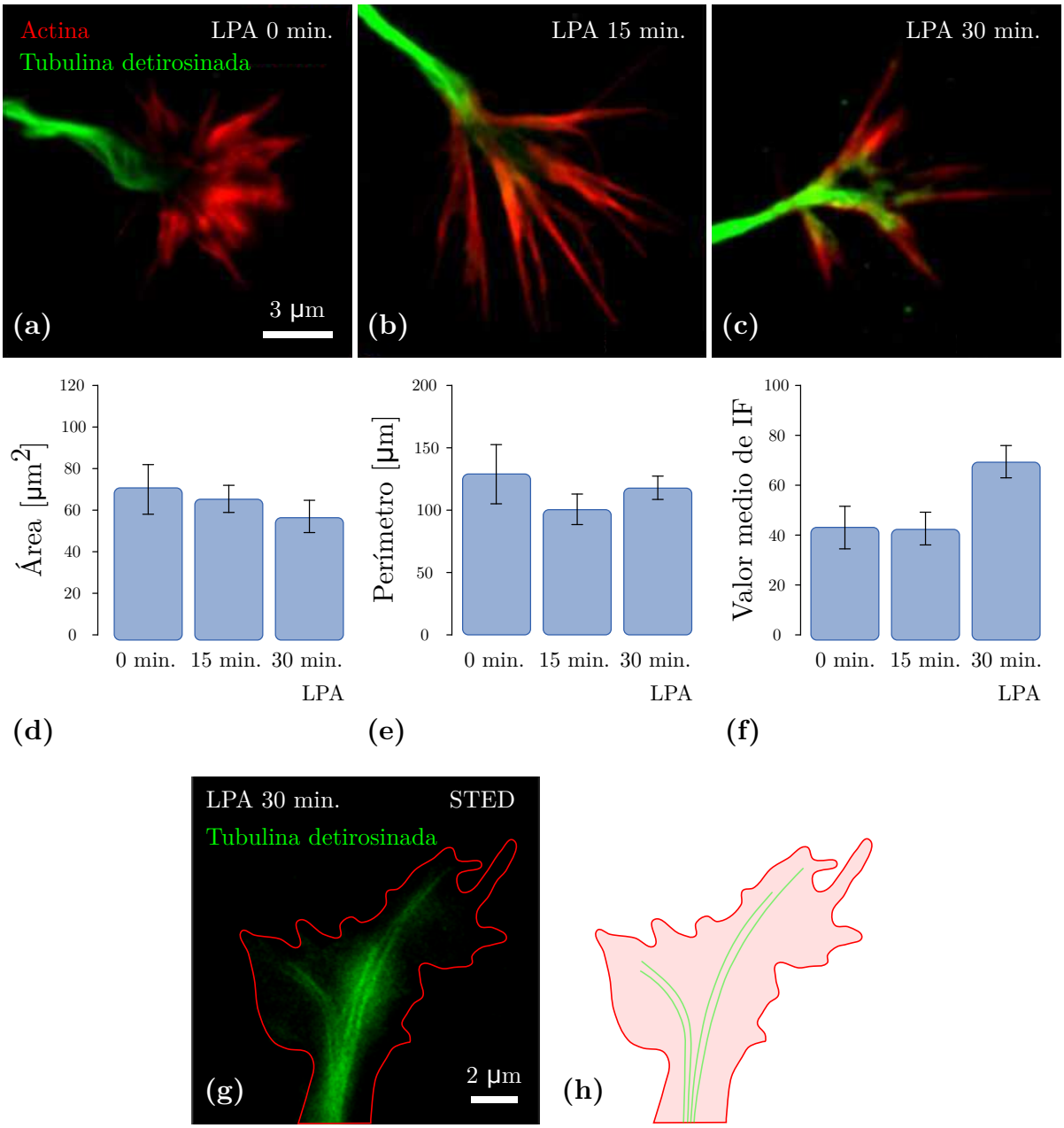


Figura (5.2): Tubulina detirosinada. **(a)**, **(b)** y **(c)** Imágenes de conos de crecimiento axonales en función del tiempo de incubación con LPA. En color verde se muestra tubulina detirosinada y en color rojo actina [Cáceres, 2016]. Estudio del **(d)** área del cono de crecimiento, del **(e)** perímetro del cono de crecimiento y del **(f)** valor medio de la intensidad de fluorescencia, en función del tiempo de incubación con LPA. **(g)** Imagen de STED de un cono de crecimiento axonal luego de incubar la neurona durante 30 minutos con LPA. **(h)** Esquema estructural del cono de crecimiento axonal de la imagen de STED.

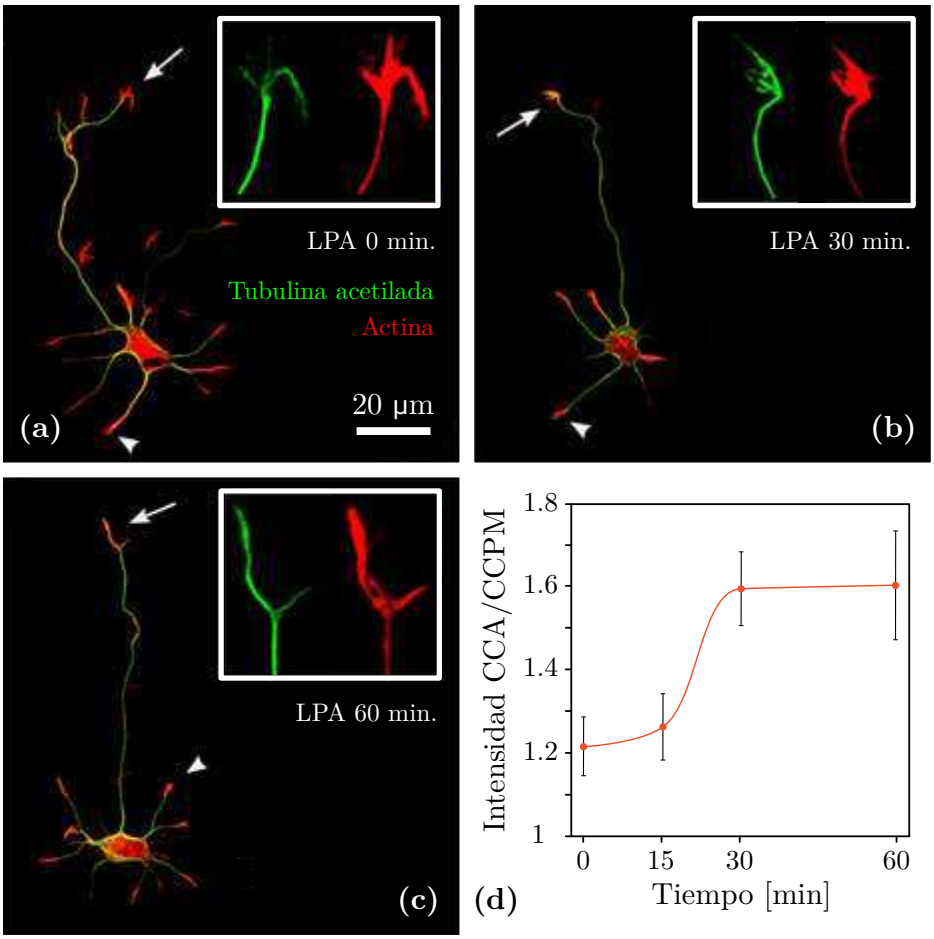


Figura (5.3): Tubulina acetilada. (a), **(b)** y **(c)** Imágenes de neuronas hipocampales de estadio 3 en función del tiempo de incubación con LPA. En cada imagen se muestra un recuadro con el cono de crecimiento axonal. En color verde se muestra tubulina acetilada y en color rojo actina. **(d)** Grafico de intensidad de los conos de crecimiento axonal normalizada sobre la intensidad de los conos de crecimientos de procesos menores en función del tiempo de incubación con LPA. Imagen adaptada de [Wojnacki, 2012].

que se muestra en la Fig. (5.2.f), se puede notar que la cantidad de tubulina detirosinada, al incubar las neuronas durante 30 minutos con el activador de RhoA aumentó en un 40 % con respecto a la situación control. Se realizaron imágenes de STED bajo estas condiciones. En la Fig. (5.2.g) se muestra una imagen característica y en la Fig. (5.2.h) se muestra un esquema de la distribución de tubulina detirosinada dentro del contorno de actina. Si bien los microtúbulos detirosinados son estables y deberían permanecer en la región central del cono de crecimiento, luego de activar RhoA, se puede ver, cómo estos microtúbulos penetran totalmente en el cono de crecimiento, hasta casi tocar el extremo.

En segundo lugar, se estudió el efecto de la activación de RhoA sobre la estructura del

citoesqueleto de los conos de crecimiento axonales a través de la distribución de tubulina acetilada, tirosinada y actina. Para ello, se incubaron neuronas hipocampales de estadio 3 durante 0, 15, 30 y 60 minutos con LPA a una concentración 2,5 μM.

En las Figs. (5.3.a), (5.3.b) y (5.3.c) se observan imágenes confocales de neuronas bajo diferentes tiempos de incubación con el activador de RhoA. En color verde se muestra tubulina acetilada y en color rojo, actina. En cada imagen se muestra un recuadro con el cono de crecimiento axonal. Se calculó la relación entre la intensidad de fluorescencia del cono de crecimiento axonal (flecha) y un cono de crecimiento de un proceso menor (punta de flecha) para más de 15 neuronas. En la Fig. (5.3.d) se observan los resultados. Luego de incubar las neuronas durante 60 minutos con el activador de RhoA, la relación aumenta en un 25 %, haciendo evidente el incremento de tubulina acetilada [Wojnacki, 2012].

Además, a través de una inspección visual de las Figs. (5.3.a), (5.3.b) y (5.3.c), se pueden observar cambios en la penetración de la tubulina acetilada dentro del cono de crecimiento al activar RhoA durante diferente cantidad de tiempo. Para analizar más en detalle esta observación, se realizaron más de 40 imágenes de STED de conos de crecimiento axonal marcadas contra tubulina acetilada y actina o tubulina tirosinada y actina para condiciones control e incubadas mediante el activador de RhoA durante 60 minutos. Las imágenes de STED se adquirieron utilizando 20 μW de potencia de excitación y una energía de 3 $^{\mathrm{nJ}}/_{\mathrm{p}}$ para el haz de STED en el canal de tubulina y de 2 $^{\mathrm{nJ}}/_{\mathrm{p}}$ en el canal de actina. El tiempo de integración fue de 100 μs y el tamaño del pixel de 20 nm. En las imágenes características que se muestran en la Fig. (5.4), además, se aplicó un filtro Gaussiano de 30 nm. En las Figs. (5.4.a) y (5.4.d) se muestran imágenes de STED características del caso control e incubada con LPA durante 60 minutos respectivamente. En color verde se muestra tubulina acetilada y en color rojo, actina. Se realizó un análisis estadístico de la cantidad de microtúbulos presentes y la penetración de los mismos dentro de cada cono de crecimiento. En las Figs. (5.4.c) y (5.4.f) se pueden observar los resultados. A través de la cuantificación de las imágenes de STED de tubulina tirosinada se puede concluir que al activar RhoA mediante LPA, se incrementa la cantidad de microtúbulos, lo cual se debe a que pequeñas estabilizaciones de microtúbulos promueven el ensamblado de nuevos microtúbulos que finalmente son los que promueven el crecimiento neurítico [Witte et al., 2008]. Por otro lado, al analizar la cuantificación de las imágenes de STED de tubulina acetilada, se observa que al activar RhoA; (i) la cantidad de microtúbulos estables aumenta y (ii) los microtúbulos estables penetran hasta la zona periférica del cono de crecimiento.

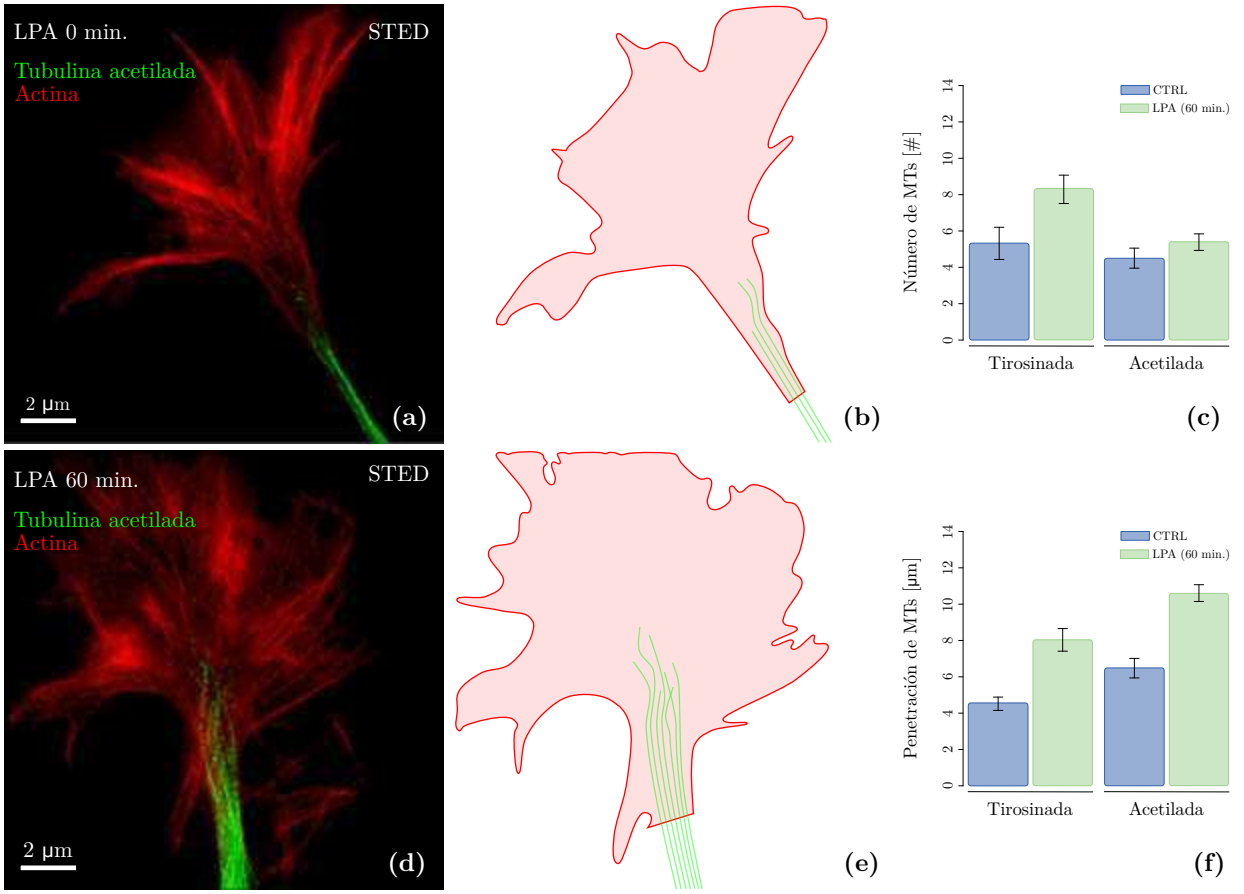


Figura (5.4): Nanoscopía STED de tubulina acetilada y tirosinada. Imágenes de STED de conos de crecimiento axonal en condiciones control **(a)** y luego de incubar las neuronas durante 60 minutos con LPA **(d)**. En color verde se muestra tubulina acetilada y en color rojo actina. **(b)** y **(e)** Esquemas estructurales de los conos de crecimiento axonal de las respectivas imágenes de STED. **(c)** Estudio del número de microtúbulos dentro de los conos de crecimiento para tubulina tirosinada y acetilada en condiciones control y luego de incubar las neuronas durante 60 minutos con LPA. **(j)** Estudio de la penetración de los microtúbulos dentro de los conos de crecimiento para tubulina tirosinada y acetilada en condiciones control y luego de incubar las neuronas durante 60 minutos con LPA.

5.3. Conclusiones y perspectivas

Teniendo en cuenta los resultados de los análisis obtenidos luego de analizar las estructuras de los microtúbulos tirosinados, detirosinados y acetilados con respecto a la actina, en este capítulo hemos demostrado que RhoA, activada a través de LPA, estimula el crecimiento neurítico y favorece el crecimiento axonal en neuronas de estadio 3. Los microtúbulos estables (detirosinados y acetilados) penetran hasta el dominio periférico del cono de crecimiento y aumentan sus niveles. Además, los microtúbulos se estabilizan más rápido, lo cual promueve la polimerización de nuevos microtúbulos.

Para explicar los múltiples roles que RhoA cumple durante el proceso de polarización neuronal, se complementará este estudio, con una descripción del citoesqueleto de los conos de crecimiento de neuronas hipocampales de estadio 2.

6

Estructuras periódicas de actina en procesos de degeneración axonal

LA regulación de la sobrevida y muerte celular es un aspecto fundamental en el establecimiento de circuitos neuronales funcionales [Schoenmann et al., 2010]. Las neuronas sensoriales del sistema nervioso de los vertebrados son producidas en exceso y sólo aquellas que logran el contacto exitoso con tejidos periféricos forman las conexiones apropiadas para sobrevivir, mientras que las restantes son eliminadas mediante una muerte celular programada (apoptosis) [Unsain et al., 2013]. Los tejidos periféricos producen una cantidad limitada de neurotrofinas, las cuales son proteínas que favorecen la supervivencia de las neuronas, como, por ejemplo, el factor de crecimiento nervioso (NGF). Solamente las neuronas que compiten exitosamente por dicha cantidad limitada de neurotrofinas sobrevivirán el fenómeno de degeneración axonal que culmina con la apoptosis [Ceni et al., 2014]. En la Fig. (6.1.a) se puede observar un esquema del desarrollo axonal de neuronas sensoriales para un embrión de ratón, en función de los días desde la gestación del embrión. La degeneración axonal es un proceso activo y estrictamente controlado de autodestrucción de segmentos axonales. Involucra la depolimerización de microtúbulos, el ensanchamiento del axón y finalmente la fragmentación del mismo [Saxena and Caroni, 2007]. Para estudiar la biología axonal, generalmente se utilizan ganglios de la raíz dorsal (DRG), formados por entre 8000

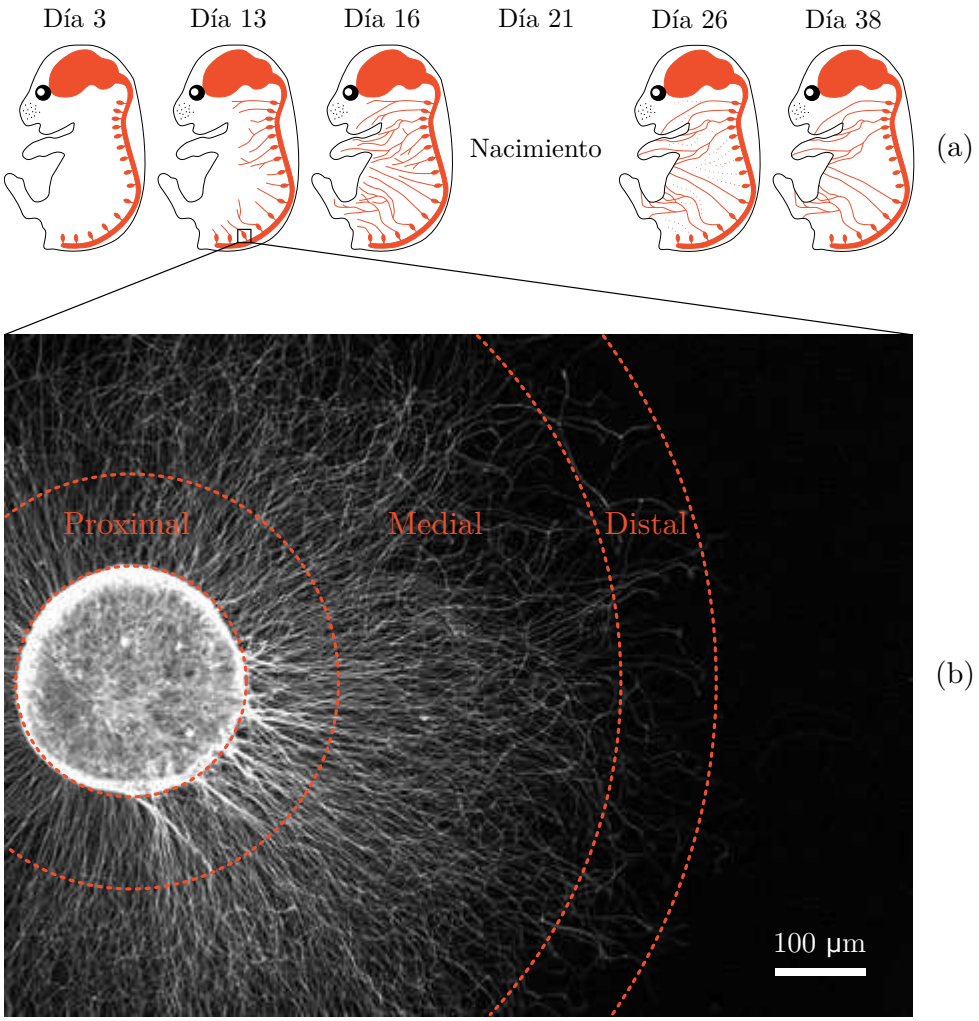


Figura (6.1): Degeneración axonal. **(a)** Las neuronas compiten por cantidades limitadas de neurotrofinas en zonas específicas, lo cual lleva a la supervivencia selectiva de las mismas. **(b)** Ganglio de la raíz dorsal [Cáceres, 2016]. Se esquematizan tres zonas: proximal, medial y distal.

y 12000 neuronas sensoriales, debido a que no poseen dendritas, sino que todas sus neuritas son axones. Además, estos axones, experimentan un rápido y robusto crecimiento cuando son mantenidos en presencia de NGF, y una degeneración muy rápida cuando son privados del mismo [Unsain et al., 2014]. En la Fig. (6.1.b) se puede observar un ganglio de la raíz dorsal característico [Cáceres, 2016], donde se distinguen tres zonas: proximal; hasta 100 μm del soma, distal; hasta 100 μm del extremo de los axones y medial; entre la proximal y la distal. Esclarecer los mecanismos y eventos regulatorios que afectan la degeneración axonal permitirá entender los principios del ensamblado de circuitos neuronales, descubrir mecanismos de progresión de enfermedades e identificar formas de proteger las sinapsis y los axones en desordenes neurodegenerativos.

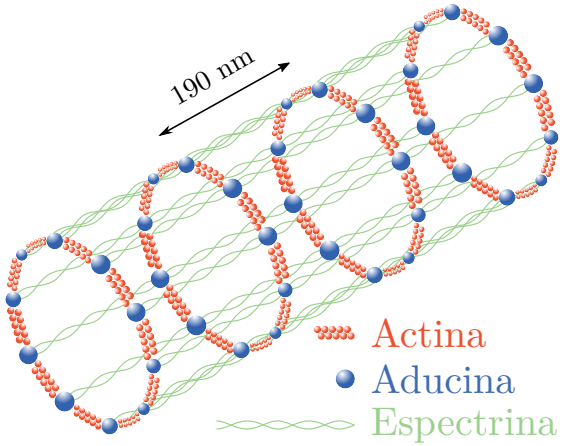


Figura (6.2): Modelo del citoesqueleto de axones. Filamentos cortos de actina (color rojo), con un tope de aducina en uno de sus extremos (color azul) forman estructuras en forma de anillos que envuelven la circunferencia del axón. Los tetrámeros de espectrina conectan los anillos adyacentes a lo largo del axón, creando un red con una periodicidad de aproximadamente 190 nm.

La actina, es una de las proteínas más abundantes en las neuronas. Su rol en el citoesqueleto ha sido estudiado extensivamente en compartimientos enriquecidos, como los conos de crecimiento, que favorecen la elongación axonal o como las espinas dendríticas, que se encargan de la recepción de estímulos. Sin embargo, a principios del año 2013, a través de técnicas de microscopía de súper-resolución, se observó una novedosa organización periódica de anillos de actina con una distribución de aproximadamente 190 nm en el axón de neuronas hipocampales [Xu et al., 2013]. Los estudios realizados desde dicho momento, hasta el presente, sugieren que los filamentos de actina están entramados en forma cilíndrica, son estabilizados mediante un *capuchón* de aducina en uno de sus extremos, y se conectan mediante tetrámeros de espectrina que actúan como espaciadores, tal como puede observarse en la Fig. (6.2) [Leite and Sousa, 2016]. Si bien su función no está establecida, la arquitectura y ubicación sugiere que son el andamiaje que soporta la membrana plasmática. Como los axones pueden crecer a grandes longitudes, y están bajo un increíble estrés mecánico, es razonable que hayan desarrollado estas estructuras para sostenerse [Roy, 2016]. Ya fueron descubiertas tanto en axones como en dendritas [D'Este et al., 2015] y son una característica fundamental de las células del sistema nervioso [D'Este et al., 2016]. Además, emergen muy temprano en el desarrollo axonal y se propagan de la zona proximal a la zonal distal [Zhong et al., 2014].

En el presente trabajo, en colaboración con el Laboratorio de Neurobiología, INIMEC, CONICET, Córdoba, Argentina, hemos abordado el análisis de la relación entre la degeneración axonal y la posible ruptura, o al menos adaptación, de los anillos de actina, a través del

estudio de ganglios de la raíz dorsal en presencia o privados de NGF, mediante la nanoscopía STED.

6.1. Preparación de muestras

La preparación de muestras se llevó a cabo en el INIMEC. Los DRG fueron preparados de embriones de ratón de 13.5 días desde la gestación. Crecieron en cubreobjetos de 18 mm de diámetro (no. 1.5, Marienfeld) que habían sido recubiertos secuencialmente con poli-D-lisina (1 $^{mg}/_{ml}$; Sigma Aldrich), laminina (10 $^{\mu g}/_{ml}$; Sigma Aldrich) y colágeno (0,1 $^{mg}/_{ml}$, PureCol; Advance BioMatrix). El medio de cultivo consistía en Neurobasal (Invitrogen) suplementado con 2 % B-27 (Invitrogen), 1 % L-glutamina (Wisent), 1 % penicilina/estreptomicina (Wisent) y 20 μM 5-fluoro-2-desoxiuridina (Sigma Aldrich). Durante los primeros 3 días de crecimiento axonal, el medio de cultivo fue suplementado con 12,5 $^{ng}/_{ml}$ de NGF (Alomone). La privación de NGF se logró al cambiar el medio de cultivo por uno sin NGF suplementado con anticuerpos contra NGF conocido como Rab1 (1 $^{\mu g}/_{ml}$) [Unsain et al., 2013, Unsain et al., 2014].

Los cultivos de DRG fueron fijados durante 15 minutos a temperatura ambiente utilizando una solución de PHEM-PFS (PHEM: 120 mM PIPES, 50 mM HEPES, 10 mM EGTA y 1 mM MgCl. PFS: 0,8 g PFA, 9 ml de Agua Mili-Ro, 0,8 g de sacarosa y filtrado en papel Whatman) y fueron lavados dos veces con PBS. Luego, se trabajó sobre una placa hidrofóbica, dentro de una cámara húmeda. Los DRG fijados fueron incubados durante: (i) 10 minutos con 60 μl de glicina 0,1 M y el líquido fue descartado, (ii) 15 minutos con 60 μl de Tritón 0,1 % en BSA 5 % y el líquido fue descartado, (iii) 1 hora con 60 μl de faloidina marcada con Atto 647N (Sigma Aldrich) utilizando una concentración 1 : 100 en PBS y fueron lavados 2 veces. Finalmente, los cubreobjetos fueron montados con Mowiol.

6.2. Resultados y discusiones

En este trabajo, se describen cambios tempranos (luego de 3hs), en el comportamiento de la actina de axones de 3 días de crecimiento frente al fenómeno de degeneración axonal, en presencia y ausencia de NGF.

En primer lugar, se realizó un estudio microscópico. En las Figs. (6.3.a) y (6.3.b) se puede observar la distribución de microtúbulos y actina, respectivamente, en axones sanos, y en las Figs. (6.3.c) y (6.3.d), en axones privados de NGF [Cáceres, 2016]. Las escalas de dimensiones e intensidades son iguales, para poder comparar cualitativamente las imágenes.

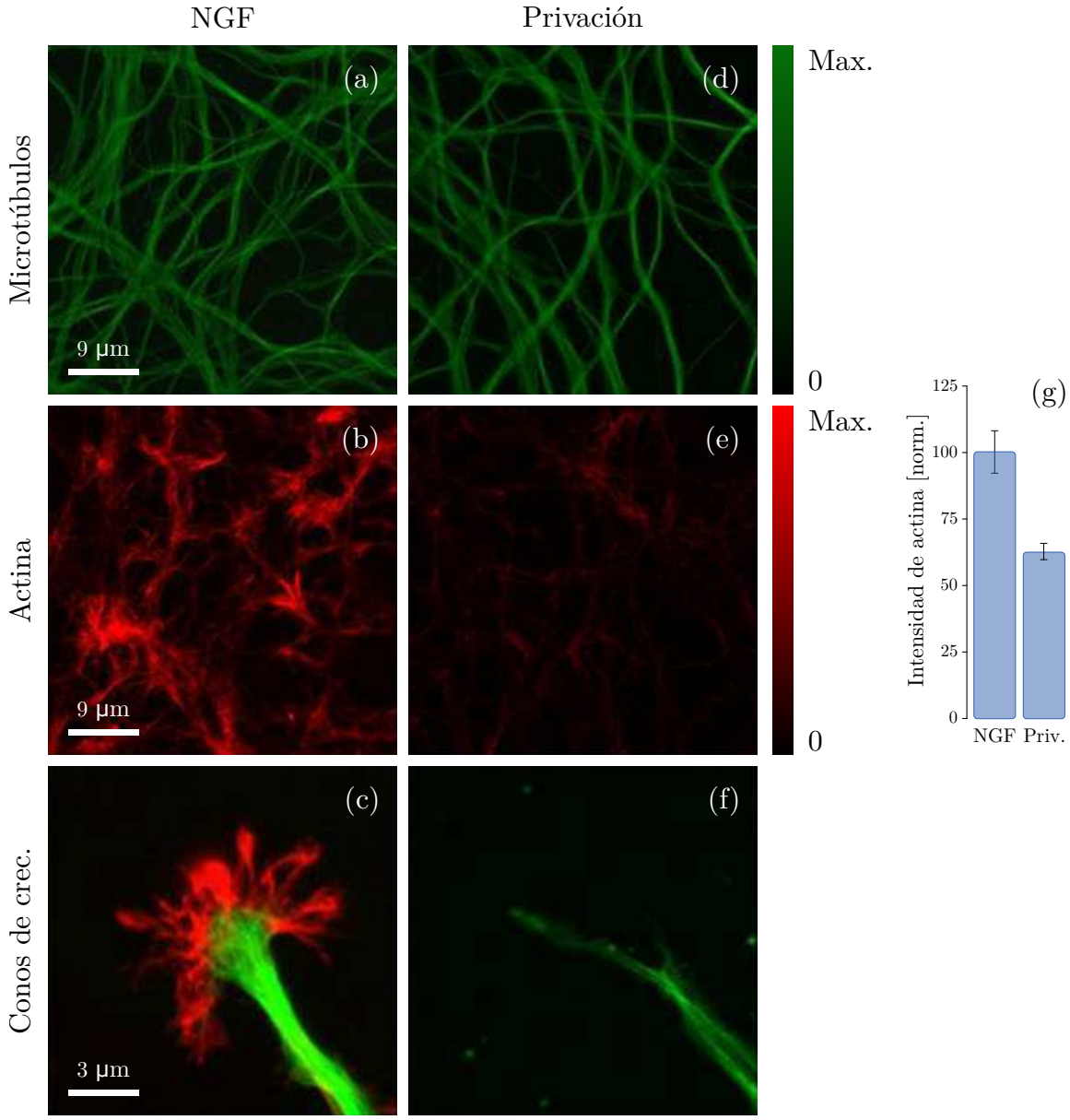


Figura (6.3): Estudio microscópico de actina en degeneración axonal. **(a)**, **(b)** y **(c)** Imágenes de microtúbulos (color verde), actina (color rojo) y conos de crecimiento, respectivamente, en axones en presencia de NGF. **(d)**, **(e)** y **(f)** Imágenes de microtúbulos, actina y conos de crecimiento, respectivamente, en axones en ausencia de NGF. **(g)** Estudio de intensidad de actina en función de la presencia o ausencia de NGF. Imagen adaptada de [Cáceres, 2016].

A través de una inspección visual, se puede notar que la tubulina no sufre modificaciones, pero la cantidad de actina decae considerablemente. Se analizó en detalle esta observación, a través del análisis cuantitativo de más de 20 imágenes de diferentes ganglios, y de múltiples cultivos celulares. En la Fig. (6.3.g) se muestran los resultados de intensidad de actina en función de la presencia o ausencia de NGF, en los cuales se puede notar una caída del 40 % en la intensidad de actina al privar los axones de NGF con respecto al caso control. Además, se analizó la morfología de los conos de crecimiento. En las Figs. (6.3.c) y (6.3.f) se observan dos imágenes características. En rojo se muestra la actina y en verde la tubulina. Al privar a los axones de NGF se produce una retracción total de la actina en los conos de crecimiento.

A través de estos experimentos, se descubrió que la actina en los axones sufre modificaciones microscópicas luego de cortos períodos de tiempo de privación de NGF. A partir de estos resultados, se realizó un estudio nanoscópico. En la Fig. (6.4.a) se puede observar una imagen confocal de $(100 \times 100)\ \mu m$ de la zona medial de un ganglio de la raíz dorsal. De ella, se selecciona una región, en la cual, primero se realiza una imagen confocal (ver Fig. (6.4.b)) y luego una imagen de STED (ver Fig. (6.4.c)). Las imágenes de STED se adquirieron utilizando 10 μW de potencia de excitación y una energía de 3 $^{\mathrm{nJ}}/_{\mathrm{p}}$ para el haz de STED en la entrada de la pupila del objetivo. El tiempo de integración fue de 100 μs y el tamaño del pixel de 20 nm. En las imágenes características que se muestran en las Figs. (6.4), (6.5) y (6.6), además, se aplicó un filtro Gaussiano de 30 nm. A través de una inspección visual de la imagen de STED, es posible notar que aparecen estructuras con una periodicidad por debajo del límite de difracción que no podían ser resueltas mediante la microscopía confocal. Para realizar un análisis cuantitativo de las imágenes se consideraron los siguientes parámetros: (i) abundancia de estructuras periódicas por área, (ii) abundancia de filamentos por área, (iii) cantidad de axones con estructuras periódicas, (iv) cantidad de axones con filamentos y (v) periodicidad de las estructuras. Como se puede observar en la Fig. (6.4.d), para cuantificar (i) y (ii), se dividió la imagen de STED de $(10 \times 10)\ \mu m$ en 100 sub imágenes de $(1 \times 1)\ \mu m$. En cada sub imagen se decidió si (a) presentaba estructuras periódicas, (b) presentaba filamentos, (c) presentaba estructuras periódicas y filamentos o (d) si no había ninguna estructura definida. Para cuantificar (iii) y (iv), se decidió si cada axón presentaba (a) estructuras periódicas, (b) filamentos o (c) estructuras periódicas y filamentos. Cada una de dichas magnitudes fue normalizada con respecto a la situación control en presencia de NGF. En las Figs. (6.4.e) y (6.4.f) se observan dos sub imágenes donde hay filamentos y estructuras periódicas, respectivamente. Para analizar la periodicidad de las estructuras (v), como puede observarse en las Figs. (6.4.f) y (6.4.g), se realizaron perfiles de intensidad de múltiples zonas axonales. A través de ellos se determinaron las posiciones de los máximos y

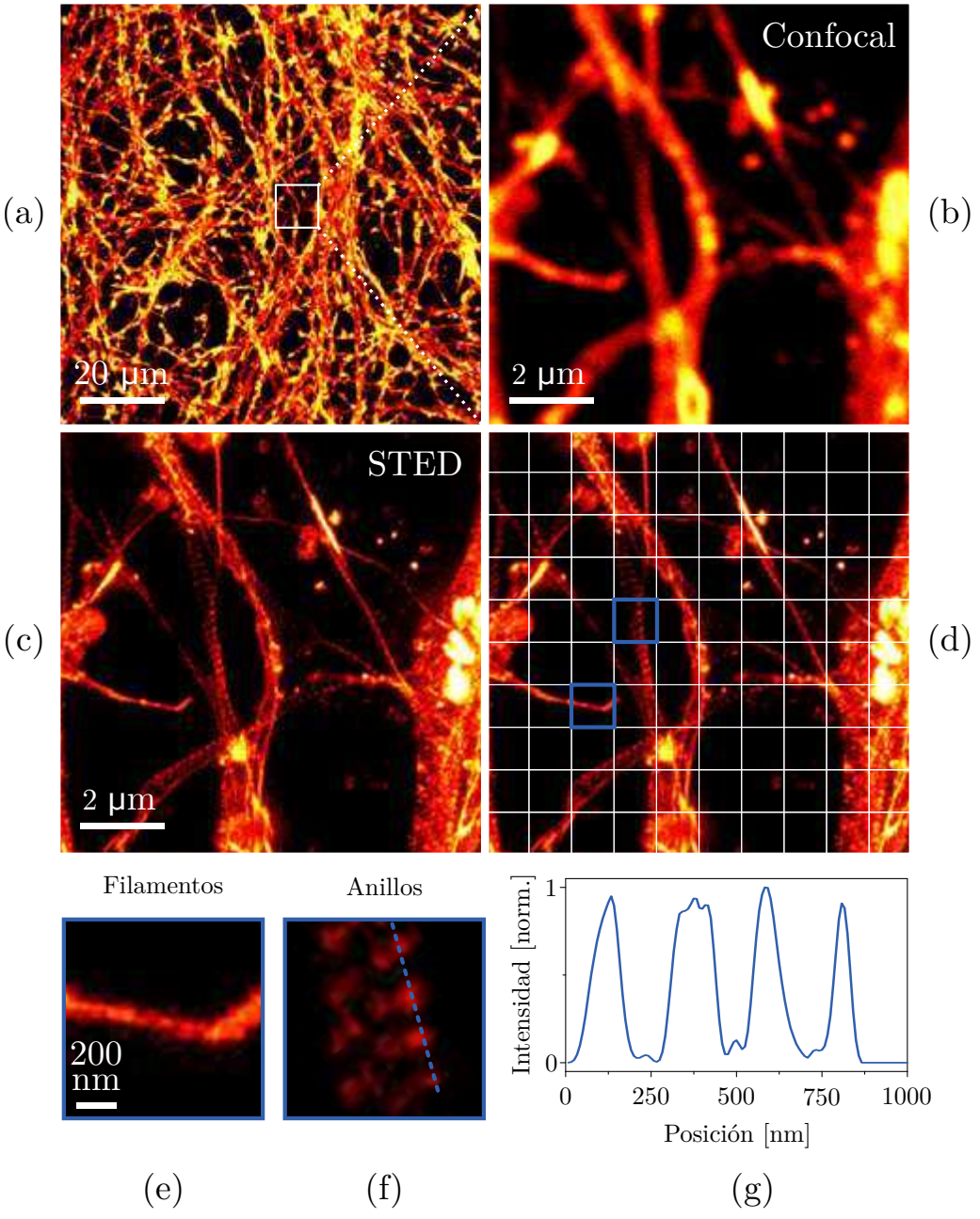


Figura (6.4): Cuantificación de estructuras periódicas. **(a)** Imagen confocal de (100×100) μm de la zona medial de un ganglio de la raíz dorsal. **(b)** y **(c)** Imágenes confocal y de STED de una región de la imagen de la Fig. (a). **(d)** División de la imagen de STED en 100 sub imágenes para su cuantificación. **(e)** y **(f)** Sub imágenes que presentan, filamentos y estructuras periódicas, respectivamente. **(g)** Perfil de intensidad de la Fig. (f).

se calculó la periodicidad de las estructuras.

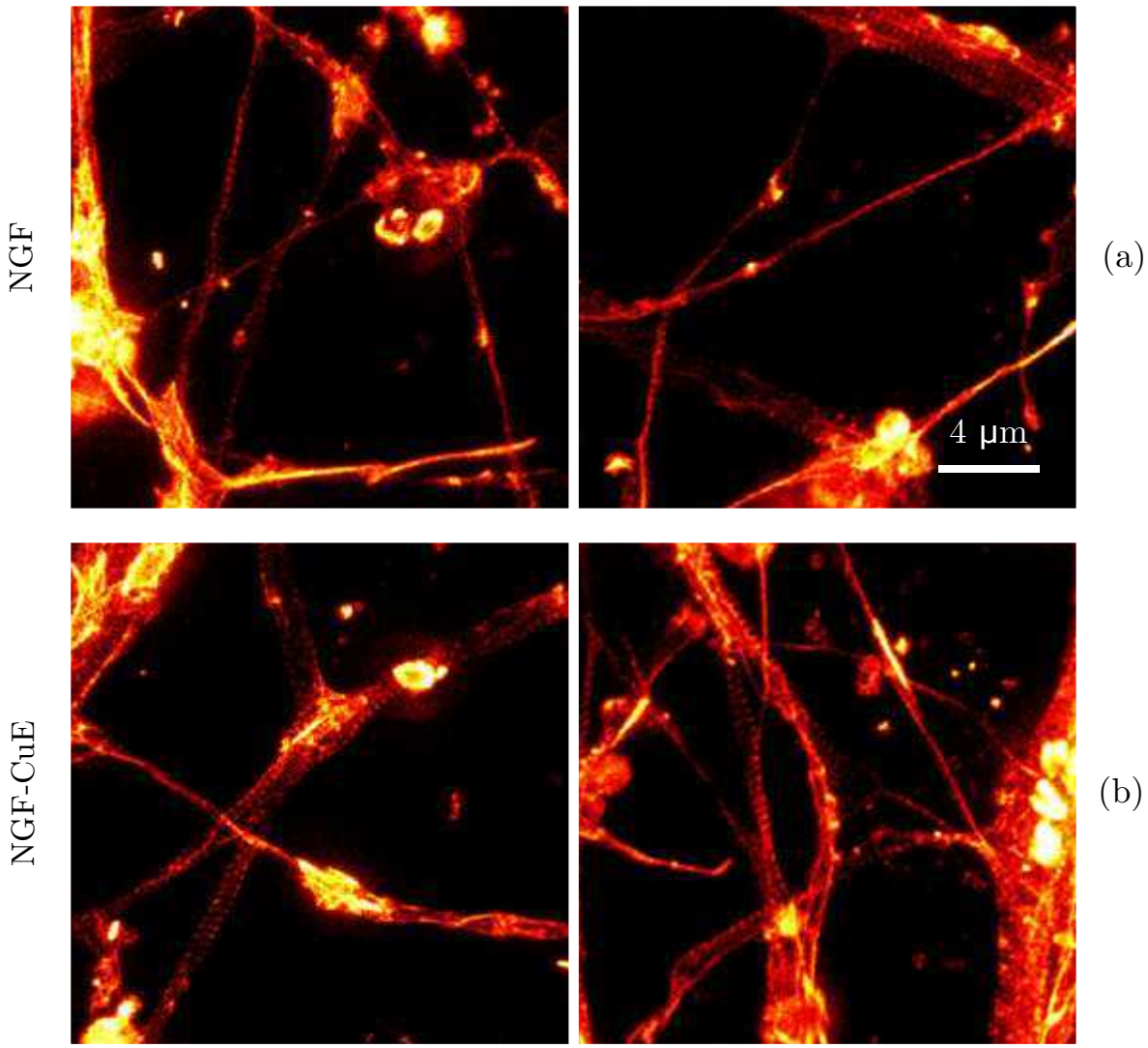


Figura (6.5): Imágenes de STED de axones en presencia de NGF. Axones **(a)** en presencia de NGF y **(b)** en presencia de NGF y cucurbitacina E.

Para cada condición, se realizaron más de 30 imágenes de STED de diferentes ganglios, y de múltiples cultivos celulares. En las Figs. (6.5.a) y (6.6.a) se pueden observar imágenes de STED características en presencia y ausencia de NGF, respectivamente. Además, se estudió el efecto de estabilizar la activa a través de la cucurbitacina E (5 nM), un producto natural derivado de plantas, que previene la depolimerización de filamentos [Sörensen et al., 2012]. En las Figs. (6.5.b) y (6.6.b) se pueden observar imágenes de STED características en presencia y ausencia de NGF, respectivamente. Los resultados de la cuantificación estadística de las estructuras periódicas se muestran en las Figs. (6.7.a) y (6.7.b). En primer lugar, es posible

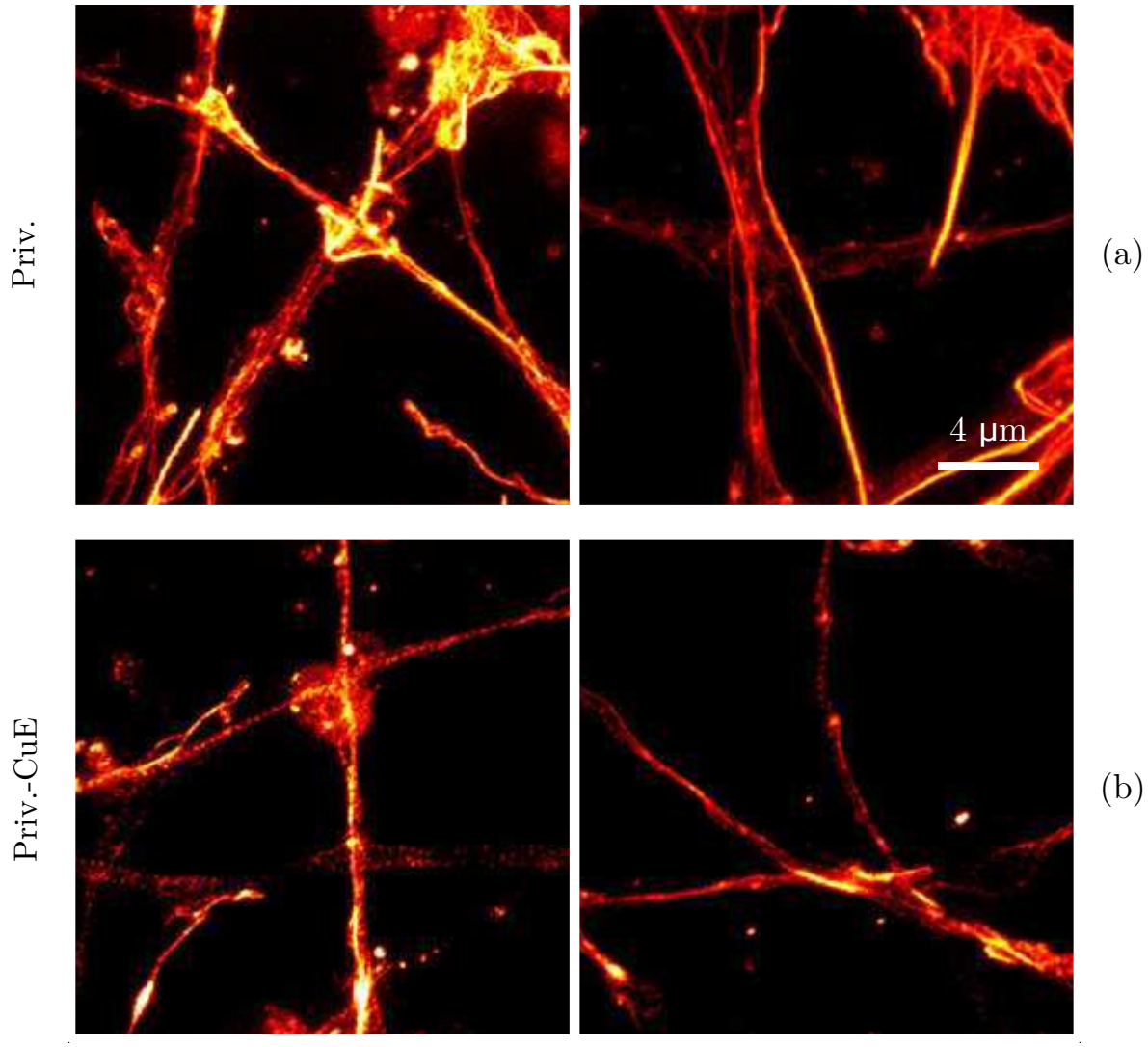


Figura (6.6): Imágenes de STED de axones privados de NGF. Axones **(a)** privados de NGF y **(b)** privados de NGF con cucurbitacina E.

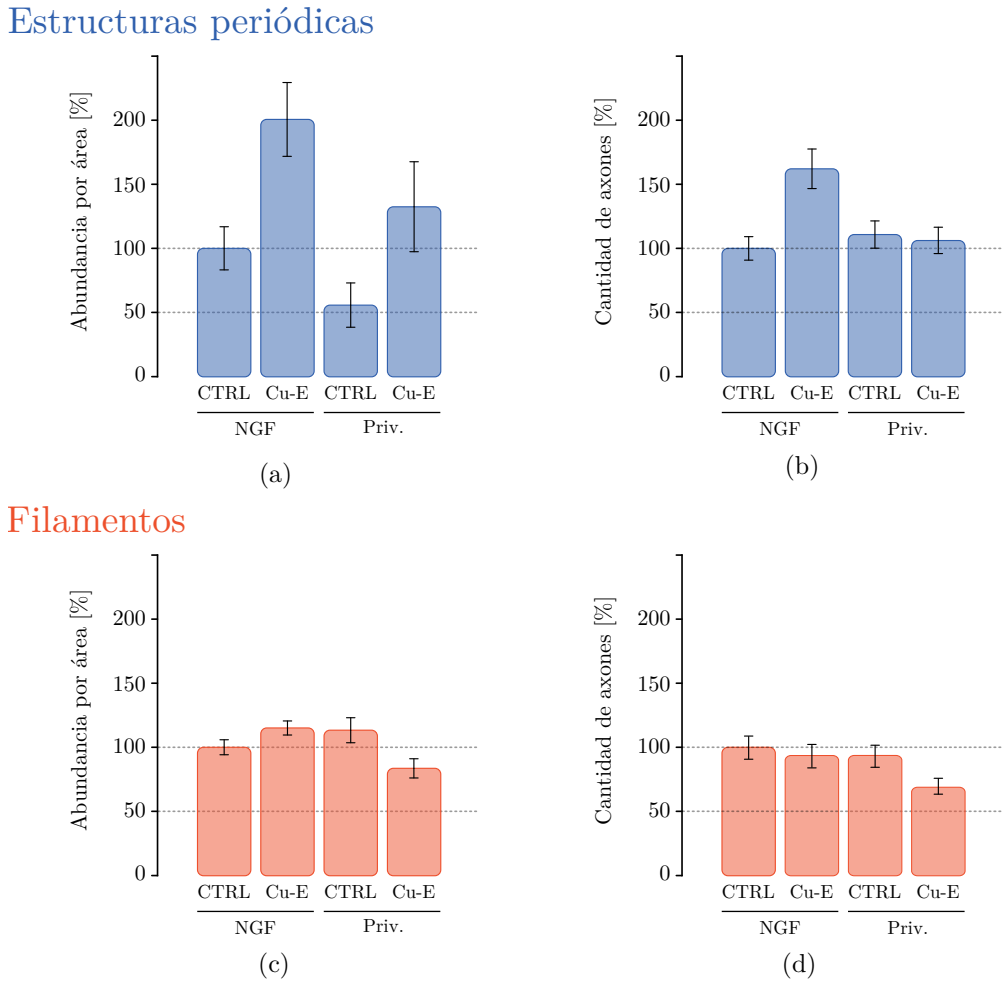


Figura (6.7): Estudio nanoscópico de actina en degeneración axonal. Estudio de **(a)** abundancia por área, y **(b)** cantidad de axones de estructuras periódicas en presencia y privadas de NGF. Estudio de **(c)** abundancia por área, y **(d)** cantidad de axones de filamentos en presencia y privados de NGF.

notar, que la abundancia por área disminuye en un 50 % luego de ser privadas de NGF con respecto a la situación control. En cambio, la cantidad de axones, casi no se ve modificada, lo cual sugiere que, en degeneración, todos los axones que poseían estructuras periódicas, las siguen teniendo, pero de forma menos abundante. Distinto es el caso de la estabilización de la actina mediante la cucurbitacina E, por medio de la cual se logró incrementar la cantidad de axones con estructuras periódicas. Se realizó un análisis de más de 235 estructuras periódicas y se comprobó que la periodicidad en presencia de NGF es de (194 ± 29) nm y al ser privadas de NGF es de (194 ± 35) nm, es decir, se mantiene constante. En las Figs. (6.7.c) y (6.7.d) se muestran los resultados de la cuantificación estadística de filamentos. Tanto la abundancia de filamentos por área como la cantidad de axones con filamentos prácticamente no se modifica al ser privadas de NGF, con respecto a la situación control.

6.3. Conclusiones y perspectivas

Se describieron modificaciones microscópicas y nanoscópicas de la actina en los axones frente al fenómeno de degeneración axonal luego de cortos períodos de tiempo (3 horas) de privación de NGF. Se distinguieron dos organizaciones de actina; estructuras periódicas y filamentos. Se realizó un análisis estadístico y cuantitativo de las imágenes de STED, determinando que la abundancia por área de las estructuras periódicas disminuye en un 50 % al ser privadas de NGF, con respecto a la situación control, pero la cantidad de axones con estructuras periódicas no varía. La abundancia de filamentos por área y la cantidad de axones con filamentos no se modifica. Además, estabilizando la actina mediante la cucurbitacina E, se logró incrementar la cantidad de axones con estructuras periódicas, pero no modificar la de los filamentos.

Se realizará un estudio análogo observando la estructura de espectrina. Se complementará el estudio de privación de NGF con el fenómeno de degeneración Walleriana (al cortar los axones). Y, se diseñará un algoritmo capaz de distinguir la presencia de estructuras periódicas en los axones de manera automática.

7

Nanoscopía STED con longitudes de onda en el máximo de emisión

USUALMENTE, la longitud de onda del haz de STED se elige cuidadosamente en la zona roja lejana del espectro de emisión del fluoróforo utilizado, evitando, de esta forma, excitación anti-Stokes producida por las altas potencias de STED y dejando una ventana espectral suficientemente amplia como para la detección de fluorescencia entre las longitudes de onda de excitación y de STED. Sin embargo, esta configuración hace que STED sea muy ineficiente en términos de potencia debido a que la sección eficaz de emisión estimulada σ_{se}, como se dedujo en la sección [2.1.3], sigue prácticamente la misma dependencia espectral que la emisión:

$$\sigma_{se}(\lambda) = \frac{\lambda^4 E(\lambda)\phi}{8\pi c n^2 \tau_{\text{fl}}} \tag{7.1}$$

Con el fin de compensar los pequeños valores de σ_{se}, se necesitan altas densidades de potencia para obtener resoluiones por deajo del límite de difracción, típicamente varias decenas de $\frac{MW}{cm^2}$, es decir, $1000 - 10000$ veces más de lo que es necesario para excitar a un fluoróforo. Estos niveles tan altos de irradiación han generado preocupaciones por la fototoxicidad [2.4] y han motivado el desarrollo de nanoscopías dirigidas utilizando marcadores fluorescentes

fotoconvertibles que requieren muy bajas intensidades de luz [1.2.2]. Sin embargo, la nanoscopía STED sigue siendo muy atractiva, debido a que la emisión estimulada es un mecanismo "*on-off*" universal, aplicable, en principio a cualquier fluoróforo, y de hecho ha sido aplicado exitosamente en mediciones con células vivas [2.5] e incluso en vivo [2.5].

Por consiguiente, el uso de longitudes de onda de STED más cercanas al máximo de emisión, pero todavía en la zona roja lejana del espectro de emisión del fluoróforo ha sido investigado y se han obtenido imágenes de STED con resolución por debajo del límite de difracción utilizando menores intensidades de STED [Vicidomini et al., 2012, Ronzitti et al., 2013].

En este capítulo, extendemos esta idea e investigamos si es posible realizar nanoscopía STED utilizando longitudes de onda a través de todo el espectro de emisión de un fluoróforo, en particular, en el máximo de emisión (ver Fig. (7.1)). Los experimentos se realizaron en el Instituto Max-Planck de Biofisicoquímica, Gotinga, Alemania, en una estadía realizada en el marco de un proyecto de grupo asociado con el departamento de nanobiofotónica, dirigido por Stefan W. Hell.

Se diseñó un nanoscopio STED de onda continua, multicolor, basado en selección acusto-óptica de longitudes de onda, tanto para la excitación como para la detección, lo cual permite la comparación adecuada de imágenes con resolución nanométrica para diferentes longitudes de onda de STED a través del espectro de emisión del fluoróforo. Para una dada densidad de potencia, cambiar la longitud de onda del CW STED hacia el máximo de emisión conduce a mayores resoluciones, en concordancia con el aumento esperado en la sección eficaz de emisión estimulada. También hemos encontrado, que, para una dada densidad de potencia, seleccionar la longitud de onda a través del espectro de emisión implica un compromiso entre resolución y señal total de fluorescencia.

7.1. Materiales y métodos

7.1.1. Preparación de muestras

Los experimentos se realizaron en muestras de partículas de poliestireno, esféricas, de 20 nm, marcadas con el fluoróforo Nile Red (Nile Red Fluospheres Invitrogen), dispersadas en un sustrato de vidrio en una densidad de una partícula cada 4 μm^2. Los sustratos de vidrio (no. 1,5 Marienfeld) se limpiaron mediante los siguientes pasos: i) sonicando 10 min en 0,2 % v/v Hellmanex II en agua Milli-Q y luego enjuagando con agua Milli-Q; ii) sonicando 10 min en etanol; iii) sonicando 10 min en acetona; iv) secando con nitrógeno (N_2) y finalmente

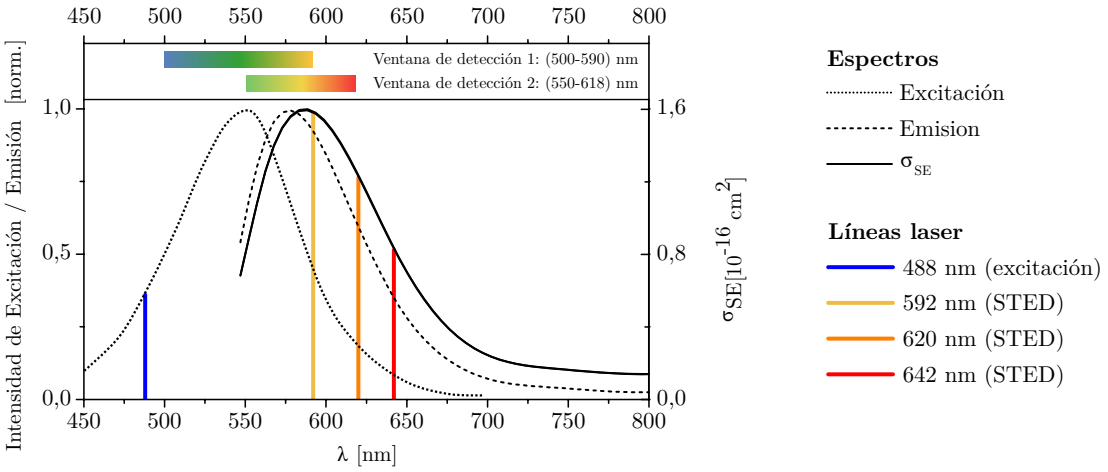


Figura (7.1): Espectro de emisión (excitado a 488 nm) y de excitación (detectado a (710±10) nm) de Nile Red en un film de polimetilmetacrilato, junto con la sección eficaz de emisión estimulada calculada utilizando la Ec. (7.1) con $\phi = 0{,}7$ y $\tau_{fl} = (3 \pm 0{,}1)$ ns. Las líneas verticales indican las longitudes de onda utilizadas en este trabajo para excitación de fluorescencia (488 nm) y para STED (592 nm, 620 nm y 642 nm).

utilizando plasma. Luego, una fina capa de poli-L-lisina (Sigma-Aldrich) fue depositada en el sustrato de vidrio: i) sumergiendo el sustrato limpio en una solución de poli-L-Lisina 0,1 % p/v en agua por 2 min; ii) enjuagando con abundante agua Milli-Q y iii) secando con N_2. Las nanopartículas fluorescentes fueron diluidas en agua Milli-Q en 4 pasos consecutivos hasta obtener una concentración de 1 : 230000 de la suspensión original. La suspensión diluida fue sonicada por 30 min y centrifugada a 12000 rpm por 2 min. Una gota del sobrenadante fue depositada durante 30 s en el sustrato de vidrio ya tratado y luego fue lavada con abundante agua Milli-Q. La muestra fue secada con N_2 y montada en un porta objeto de microscopio con 5 μl de Mowiol como medio de montaje.

7.1.2. Propiedades espectrales del Nile Red

En la Fig. (7.1) se muestran los siguientes espectros de Nile Red: i) emisión normalizado, obtenido utilizando una longitud de onda de excitación de 488 nm; ii) excitación normalizado, obtenido a una longitud de onda de (710 ± 10) nm; iii) sección eficaz de emisión estimulada, calculada de acuerdo a la Ec. (7.1), considerando el tiempo de vida medido del estado excitado de $(3 \pm 0{,}1)$ ns y el máximo valor de eficiencia cuántica reportado para Nile Red ($\phi = 0{,}7$; en dioxano puro [Sackett and Wolff, 1987]).

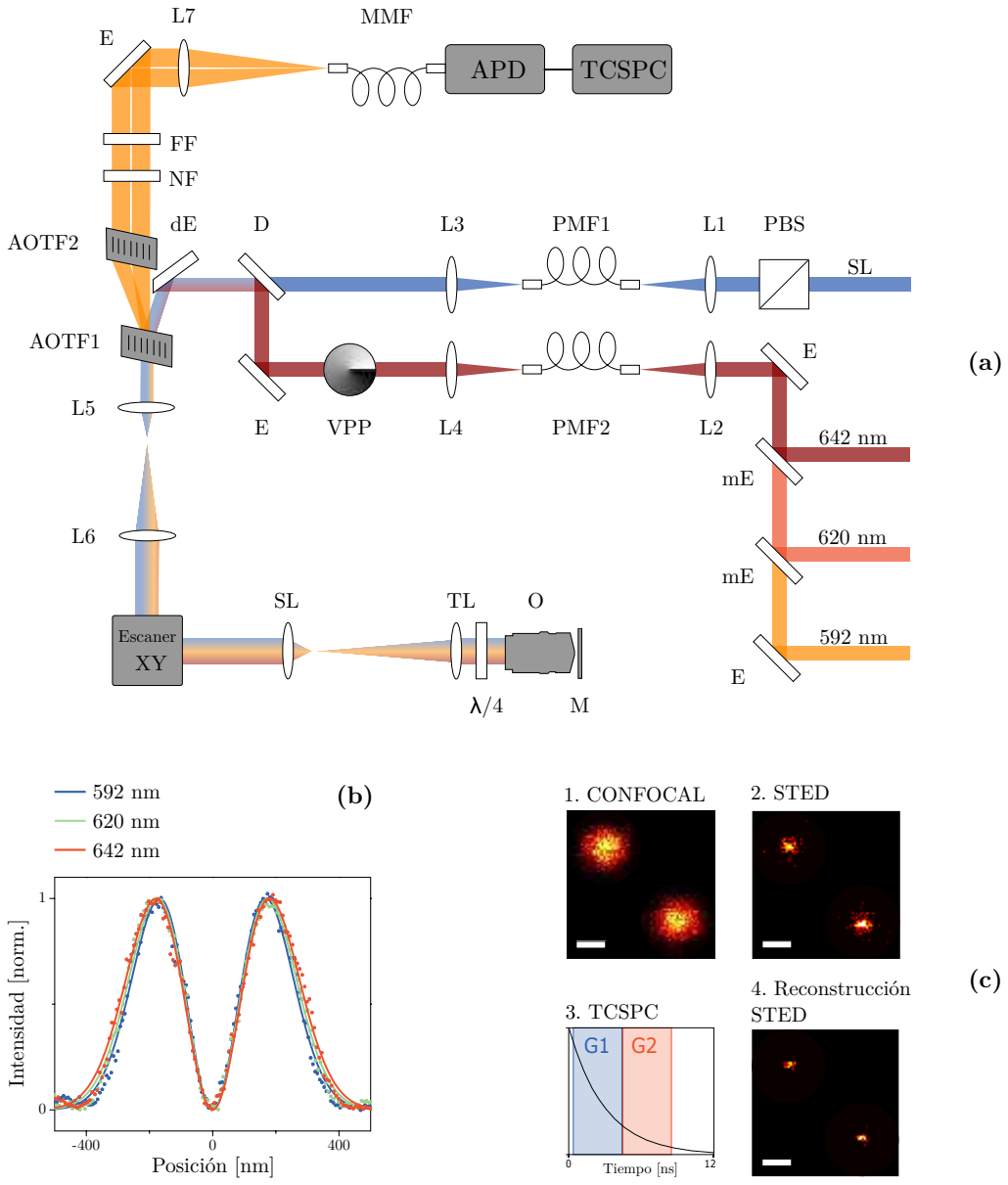


Figura (7.2): (a) Representación esquemática del nanoscopio multicolor CW STED. SL: láser súper-continuo, PBS: divisor de haz por polarización, E: espejo, L: lente, PMF: fibra mono-modo que mantiene la polarización, mE: espejo montado magnéticamente, VPP: retardador de fase helicoidal de $0-2\pi$, D: espejo dicroico, dE: espejo en forma de *D*, AOTF: filtro sintonizable acusto-óptico, SL: lente de escaneo, TL: lente de tubo, $\lambda/4$: retardador de $\lambda/4$, O: objetivo, M: muestra, NF: filtro de corte, FF: filtro de fluorescencia, MMF: fibra multi-modo, APD: fotodiodo de avalancha, TCSPC: dispositivo de conteo de fotones individuales correlacionados en el tiempo. **(b)** Perfiles de la señal (puntos) y ajustes (líneas) correspondientes a cada uno de los focos con forma de dona del haz de STED. **(c)** Secuencia de la adquisición con imágenes de ejemplo: (1) imagen confocal, (2) imagen de STED original, (3) tiempo de decaimiento espontáneo del Nile Red y ventanas temporales utilizadas para sustraer el fondo de fluorescencia excitado por el haz de STED e (4) imagen de STED con el fondo restado. Barra de escala de 200 nm.

7.1.3. Longitudes de onda de excitación (pulsada) y STED (CW)

En la Fig. (7.1) también se muestran las líneas de láseres utilizadas para excitación (488 nm) y STED (592, 620 y 642) nm. Las secciones eficaces de emisión estimulada calculadas para las tres longitudes de onda de STED son σ_{se}(592 nm)= 1,4 $\times$ 10^{-16} cm^2, σ_{se}(620 nm)= 1,1 $\times$ 10^{-16} cm^2 y σ_{se}(642 nm)= 0,7 $\times$ 10^{-16} cm^2. La eficiencia cuántica de Nile Red depende de la polaridad del entorno, por lo tanto, es razonable esperar valores más pequeños de σ_{se}, pero como la eficiencia cuántica es una constante multiplicativa en la Ec. (7.1), la relación σ_{se}(592 nm): σ_{se}(620 nm): σ_{se}(642 nm)= 1 : 0,8 : 0,5 se debe mantener. En comparación a una configuración usual con el láser de CW-STED situado en la zona de longitudes de onda roja lejana del espectro de emisión del fluoróforo (660 nm [Schrof et al., 2011], 676 nm [Moneron and Hell, 2009] y 765 nm [Hell et al., 2006, Klar et al., 2000]), las longitudes de onda utilizadas en este trabajo corresponden a secciones eficaces de emisión estimulada hasta 10 veces mayores.

7.1.4. Nanoscopio CW-STED

Un esquema del nanoscopio CW-STED con filtrado temporal de fotones se muestra en la Fig. (7.2.a). Para excitar, luz de 488 nm fue seleccionada mediante un filtro de interferencia (Chroma ZET488/10X) de un láser supercontinuo pulsado (*SL*; Koheras SuperK Extreme) operado a una repetición de 80 MHz. Luego de pasar por un divisor de haz por polarización (*PBS*; Thorlabs) fue acoplado en una fibra mono-modo que mantenía la polarización (*PMF1*; Thorlabs P3-488-PM-FC-2) usando un colimador de fibra (*L1*; Schäfter und Kirchhoff 60FC-4-A7.5-01). Finalmente, la luz que salía de la fibra fue colimada (*L3*; f = 15 mm) de manera de obtener el modo TE00 de excitación. Para STED, se utilizaron tres láseres continuos linealmente polarizados de 592 nm, 620 nm y 642 nm (MPB Communications 2RU-VFL-P-1500-592/620/642). Los tres láseres fueron acopladas a la misma fibra mono-modo que mantenía la polarización (*PMF2*; Schäfter und Kirchhoff PMC-630-4.2-NA012-3-APC/EC-500-P) utilizando un colimador de fibra (*L2*; Schäfter und Kirchhoff 60FC-4-A7.5-02). La luz de STED que salía de la fibra fue colimada (*L4*; f = 15 mm) y enviada a través de un retardador de fase helicoidal de $0-2\pi$ (*VPP*; RPC Photonics VPP-1a). El ajuste fino de la polarización, fase y alineación fue realizado independientemente para cada longitud de onda de STED. Los haces de excitación y STED fueron combinados utilizando un espejo dicroico (*DM*; Chroma Z590sprdc).

Para separar los haces de excitación y STED de la luz de fluorescencia, se construyó un divisor de haz acusto-óptico (*AOBS*) compuesto por dos filtros sintonizables acusto-ópticos

(*AOTF*; AA Opto-electronic AA-AOTFnC). El AOTF 1 difracta tanto la longitud de onda de excitación como la de STED y las dirige hacia la muestra, en donde son enfocadas al límite de difracción utilizando un objetivo de 1.4 de apertura numérica (*O*; Leica HCX PL APO 100x/1.40-0.70 Oil CS). La luz de fluorescencia es colectada por el mismo objetivo y pasa por el AOTF 1 sin difractar (orden cero) pero divergiendo y con una dispersión cromática considerable. Estas aberraciones son corregidas por medio de un segundo cristal (*AOTF 2*) con las mismas características, pero utilizado de forma invertida. El AOBS tiene dos ventajas principales en comparación con un divisor de haz convencional interferométrico: (i) no sufre inestabilidades mecánicas asociadas con las ruedas de filtros, que producen desplazamientos en la imagen; y (ii) se pueden modificar los ajustes de longitud de onda del microscopio en aproximadamente 15 μs. La trasmisión promedio para longitudes de onda entre $(400 - 700)$ nm es de 90 %. Adicionalmente, filtros adecuados pasa banda y de corte necesarios (Chroma, Semrock) fueron utilizados antes de acoplar la luz de fluorescencia en la fibra multi-modo (*MMF*; Thorlabs M31L02) del detector confocal (*APD*; Perkin Elmer SPCM-AQRH-13-FC).

Un telescopio con magnificación $2{,}4X$ (*L5 : L6*) se utilizó para cambiar el tamaño de la cintura de los haces de manera de sobre llenar la pupila del objetivo. El escaneo lateral de la muestra fue realizado utilizando un escaner galvanométrico (Till Photonics Yanus IV), una lente de escaneo (*SL*; Leica) y una lente de tubo (*TL*; Leica). Para obtener polarización circular, una lámina de cuarto de onda de amplio ancho espectral (B. Halle) fue utilizada. Para posicionamiento adicional y control fino del foco, la muestra fue montada en una platina piezoeléctrica XYZ con resolución nanométrica (Thorlabs NanoMax MAX311D/M). El tiempo de arribo de los fotones fluorescentes fue detectado con un dispositivo de conteo de fotones individuales correlacionados en el tiempo (Pico Harp 300, PicoQuant). El sistema de escaneo, adquisición de la fluorescencia y los dispositivos acusto-ópticos fueron controlados a través de una placa AD/DA (National Instruments PCIe-6353).

7.1.5. Imágenes de STED

Para cada una de las longitudes de onda de STED se optimizó la polarización circular y se implementó un desfasaje helicoidal $0 - 2\pi$ adecuado. La calidad del haz de STED, así como también la co-alineación con el haz de excitación se ajustó al escanear nanopartículas esféricas de oro de 40 nm de diámetro, midiendo la señal de *scattering*. Los fotones colectados fueron filtrados espectral y temporalmente. Para el filtrado espectral, filtros pasa-banda y filtros de corte fueron utilizados en la detección: para STED a 642 nm: (585 ± 35) nm y corte (densidad óptica $(OD) \geq 6$; $642 \pm 2)$ nm; para STED a 620 nm: (585 ± 35) nm y corte $(OD \geq 6$; $620 \pm 2)$ nm; y para STED a 592 nm: (550 ± 44) nm y corte $(OD \geq$

6; 592 ± 2) nm. El filtrado temporal se realizó con una estrategia similar a la reportada en [Vicidomini et al., 2012]. Se generaron dos imágenes en diferentes ventanas temporales dentro de los 12.5 ns entre los sucesivos pulsos de excitación (Fig. (7.2.b)). La *Imagen 1* fue producida con los fotones detectados en una ventana temporal entre 0,5 ns $< t <$ 4,5 ns luego del pulso de excitación y está compuesta de fotones correspondientes a la imagen de súper-resolución más fotones correspondientes a las moléculas excitadas por el haz de STED. La *Imagen 2* fue producida con los fotones detectados en una ventana temporal entre 4,5 ns $< t <$ 8,5 ns luego del pulso de excitación. Como Nile Red tiene un tiempo de vida del estado excitado de (3 ± 0,1) ns, esta ventana temporal evita la mayoría de fotones de fluorescencia generados por la excitación pulsada, y por lo tanto está compuesta principalmente por fotones fluorescentes excitados por el haz de STED. La imagen de súper-resolución se obtiene simplemente de restar *Imagen 1 − Imagen 2*. Para cada longitud de onda de STED y potencia, series de imágenes (Confocal + STED) fueron adquiridas en diferentes zonas de la muestra, donde nanopartículas fluorescentes individuales pudieran ser encontradas. Parámetros de las imágenes: 10 × 10 μm, 700 × 700 pixels (14.3 nm/pixels), tiempo de integración de 100 μs, potencia de excitación de 10 μW en la entrada de la pupila del objetivo.

7.2. Resultados y discusiones

Evaluamos el desempeño de STED para cada una de las tres longitudes de onda analizando imágenes obtenidas con diferentes potencias de STED. En la Fig. (7.3.a) se observan imágenes típicas de STED obtenidas para diferentes potencias y cada una de las longitudes de onda, de manera tal de poder comparar visualmente los resultados. Extraordinariamente, obtuvimos imágenes con super-resolución para todas las longitudes de onda de STED, incluso para 592 nm, que prácticamente coincide con el máximo de emisión del Nile Red (Fig. (7.1)). Como una medida de la resolución espacial alcanzada utilizamos el ancho a mitad de altura (FWHM) obtenido de ajustar la señal de las partículas individuales mediante una función Gaussiana. Perfiles representativos se muestran en la Fig. (7.3.b). Para una dada potencia de STED, a medida que la longitud de onda se acerca al máximo de emisión, dos efectos se evidencian: (i) la resolución mejora, como es de esperarse debido al incremento en la sección eficaz de emisión estimulada, y (ii) la señal total disminuye. Luego, analizamos estos dos efectos con mayor detalle y discutimos sus implicaciones para la nanoscopía STED.

Se realizó un análisis cuantitativo de la resolución, calculando el valor medio del FWHM de al menos 50 imágenes de STED de nanopartículas individuales para cada combinación

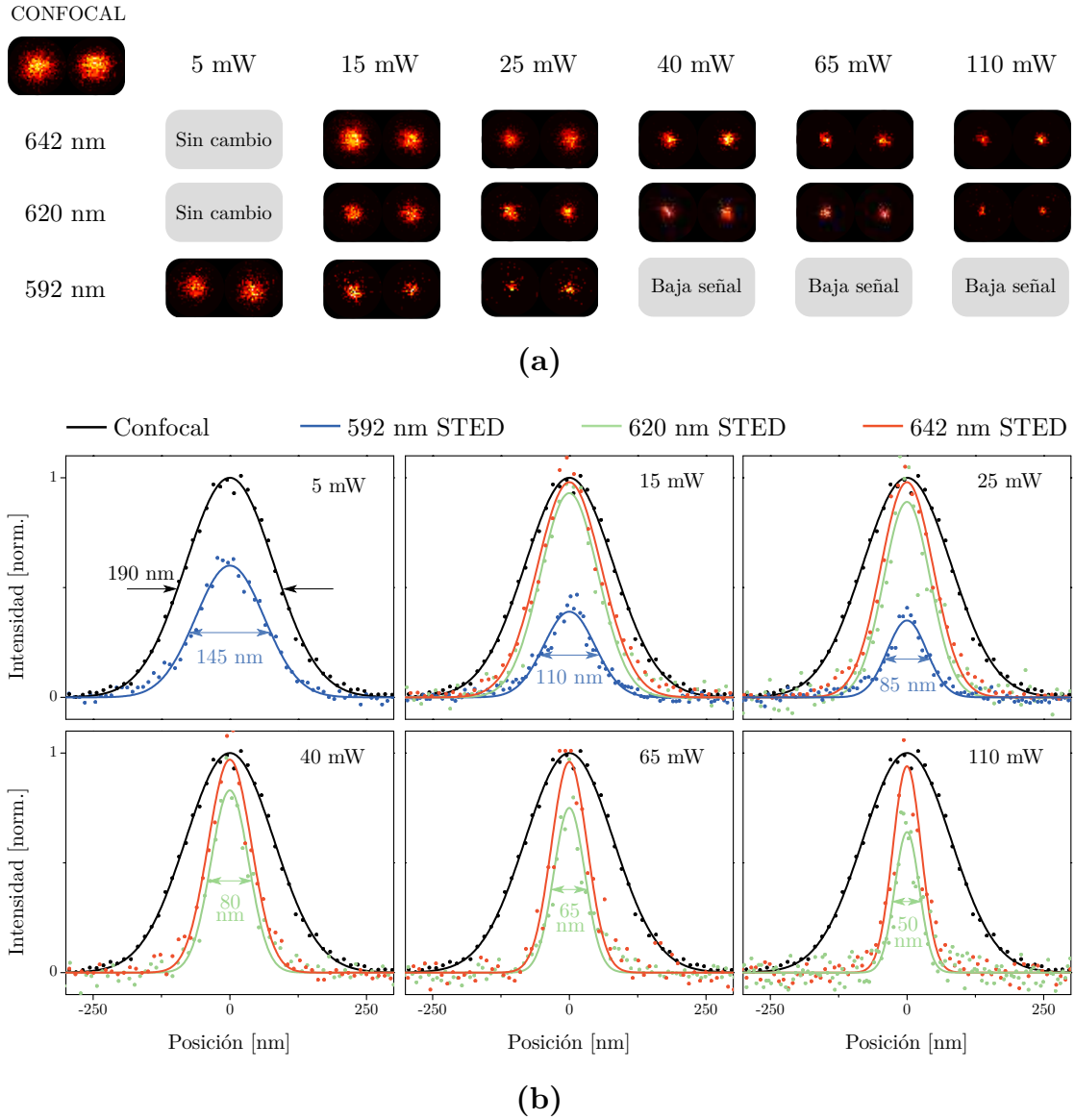


Figura (7.3): (a) Imágenes representativas de nanopartículas individuales marcadas con el fluoróforo Nile Red obtenidas con las longitudes de onda de STED de 592, 620 y 642 nm para seis potencias diferentes (P_{STED}). Cada imagen corresponde a un área diferente de la muestra de $(0{,}5 \times 1)$ μm. Las condiciones marcadas como *sin cambio* indican que la resolución espacial fue igual a la confocal. Las condiciones marcadas como *baja señal* indican que la relación entre la señal de STED y la confocal fue menor al 15 %. Como referencia, también se muestra una imagen confocal. **(b)** Perfiles representativos de la señal y ajustes para cada condición. El FWHM ilustra la resolución espacial obtenida en cada caso.

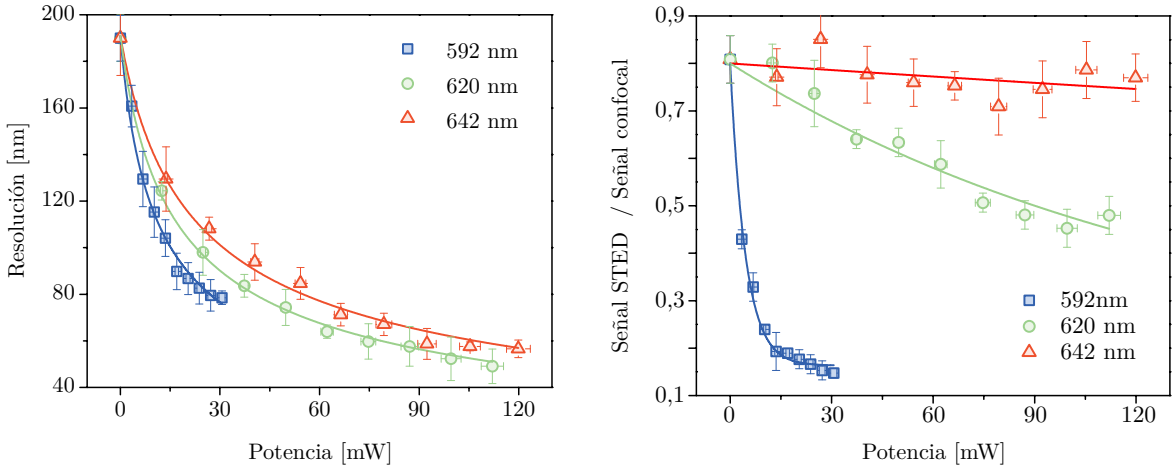


Figura (7.4): (a) Resolución (FWHM promedio de al menos 50 nanopartículas para cada punto) en función de la potencia de STED para cada una de las tres longitudes de onda. Las líneas son ajustes utilizando la Ec. (7.2). **(b)** Señal STED/Señal confocal en función de la potencia de STED para cada una de las tres longitudes de onda. Las líneas son ajustes exponenciales que ayudan a visualizar la tendencia.

de potencia y longitud de onda de STED. Los resultados se muestran en la Fig. (7.4.a). La resolución del nanoscopio CW-STED con filtrado temporal de fotones puede ser expresada como

$$d = \frac{d_c}{\sqrt{1 + d_c^2 \zeta \left(1 + \frac{\gamma}{ln(2)}\right) \beta}} \tag{7.2}$$

donde d_c es la resolución (FWHM) del microscopio confocal. ζ, γ y β son factores que tienen en cuenta la saturación de la emisión estimulada, el efecto del filtrado temporal de fotones y la distribución de potencia en la proximidad del centro del foco de una dona, respectivamente.

Recordando que ζ se define como $\zeta = \frac{I^m_{STED}}{I_s}$, donde $I_s = \frac{1}{\sigma_{se}\tau}$ e $I^m_{STED} = \frac{P_{STED}}{A_{STED}} \frac{\lambda}{hc}$. Para estimar el área del foco de STED A_{STED}, comparamos las intensidades de un haz Gaussiano y del haz de STED con forma de dona [2.1.2] y resulta que la relación entre las áreas es de aproximadamente 0,3 y se puede estimar que $A_{STED} \approx \frac{\pi}{0{,}3} \frac{d_{\mathrm{STED}}}{2}^2$.

γ se define como $\gamma = \frac{T_g}{\tau}$, con T_g el desfasaje temporal que hay entre el pulso de excitación y el comienzo de la ventana temporal donde se colecta fluorescencia. Se asume que la ventana de colección es mayor que el tiempo espontáneo de decaimiento τ_{fl}. El factor β se obtiene de ajustar el perfil de intensidades del haz de STED en la proximidad del mínimo central

Parámetro / Longitud de onda	**592 nm**	**620 nm**	**642 nm**
β $[m^{-2}]$	$2{,}4 \times 10^{13}$	$2{,}2 \times 10^{13}$	$2{,}1 \times 10^{13}$
d_{STED} [nm]	280 ± 10	290 ± 10	300 ± 10
σ_{se} $[cm^2]$ de la Ec. (7.2)	$3{,}7 \times 10^{-17}$	$2{,}8 \times 10^{-17}$	$2{,}2 \times 10^{-17}$
σ_{se} $[norm.]$ de la Ec. (7.2)	1	0,75	0,59
σ_{se} $[cm^2]$ de la Ec. (7.1)	$1{,}4 \times 10^{-16}$	$1{,}1 \times 10^{-16}$	$0{,}7 \times 10^{-16}$
σ_{se} $[norm.]$ de la Ec.(7.1)	1	0,8	0,5

Tabla (7.1): Valores determinados experimentalmente de β y d_{STED} para cada una de las tres longitudes de onda de STED. Valores de σ_{se} obtenidos de (i) los ajustes de la resolución en función de la potencia (Fig. (7.4.a), Ec. (7.2)) y (ii) del espectro de emisión, valor reportado de eficiencia cuántica $\phi = 0{,}7$ y tiempo de vida $(3 \pm 0{,}1)$ ns (Fig. (7.1), Ec. (7.1)).

mediante la ecuación de una parábola $I_{STED}(r) = 4\beta I_{STED}^{m} r^2$. Esta ecuación asume que la intensidad cerca del mínimo es cero, lo cual, como se muestra en la Fig. (7.2.b) es una aproximación razonable puesto que en nuestras mediciones, era menor que el 1 % del máximo de intensidad.

De estos numerosos parámetros, la única incógnita es σ_{se}. El tiempo de vida del estado excitado para el Nile Red en nuestros experimentos se determinó como $\tau_{\mathrm{fl}} = (3 \pm 0{,}1)$ ns. P_{STED} fue medida en la pupila de entrada del objetivo, con un sensor calibrado y se consideró la transmisión del objetivo para cada longitud de onda de STED. La ventana de detección del filtrado temporal de fotones se llevó a cabo con $T_g = (0{,}5 \pm 0{,}1)$ ns. La resolución del microscopio confocal fue obtenida de más de 150 nanopartículas de poliestireno marcadas con Nile Red $d_c = (190 \pm 10)$ nm. El valor de d_{STED}, así como también el valor de la distribución de $I_{STED}(r)$ se determinaron de mediciones de luz *scattereada* al escanear una nanopartícula esférica de oro de 40 nm sobre el correspondiente foco. En la Fig. (7.2.b) se observan los perfiles de señales representativas y sus correspondientes ajustes. Los valores obtenidos de FWHM y β para cada una de las longitudes de onda de STED se muestran en la Tabla (7.1).

Es posible ajustar la resolución en función de la potencia del haz de STED por medio de la Ec. (7.2), siendo σ_{se} el único parámetro libre (Fig. (7.4.a)). La descripción mediante la Ec. (7.2) provee un ajuste satisfactorio de los resultados experimentales, conduciendo a los valores de σ_{se} que se muestran en la Tabla (7.1) para cada longitud de onda de STED. También, en la Tabla (7.1) se muestran los valores de σ_{se} previstos por la Ec. (7.1), el espectro de emisión, el valor reportado de la eficiencia cuántica $\phi = 0{,}7$ y el tiempo de vida del estado excitado $\tau_{\mathrm{fl}} = (3 \pm 0{,}1)$ ns. Los valores de σ_{se} obtenidos de las mediciones de resolución en función de la potencia son en promedio 3.7 veces menores que los calculados mediante la Ec. (7.1). Sin embargo, la magnitud relativa se mantiene muy bien ($\sigma_{se}(592nm) : \sigma_{se}(620nm)$:

$\sigma_{se}(642nm) = 1 : 0{,}75 : 0{,}59$). Este es un indicativo de que la eficiencia cuántica del Nile Red en nuestras condiciones experimentales es cercano a $\phi = 0{,}2$ en vez de $\phi = 0{,}7$ como fue usado en los cálculos.

Es interesante comparar nuestros resultados con datos previamente reportados para el mismo fluoróforo. Nile Red fue usado con éxito en varias configuraciones de STED con longitudes de onda en la zona roja lejana del espectro de emisión del fluoróforo, como 660 nm [Schrof et al., 2011], 676 nm [Moneron and Hell, 2009] y 765 nm [Hell et al., 2006, Klar et al., 2000], entre otros. La sección eficaz de emisión estimulada para cada una de esas longitudes de onda, calculadas utilizando el espectro de emisión y considerando $\phi = 0{,}2$ son $\sigma_{se}(660nm) = 1{,}4 \times 10^{-17}cm^2$, $\sigma_{se}(6760nm) = 1{,}0 \times 10^{-17}cm^2$ y $\sigma_{se}(765nm) = 0{,}36 \times 10^{-17}cm^2$. Usando longitudes de onda a través del espectro de emisión se incrementa la eficiencia de los fotones de STED hasta 10 veces.

Luego, analizamos la intensidad de la señal de fluorescencia obtenida para cada una de las tres configuraciones de STED. A través de una inspección directa de las imágenes y perfiles (Fig. (7.3)), es evidente que la señal disminuye a medida que la longitud de onda de STED se aproxima al máximo de emisión. Primero, es importante considerar la ventana espectral utilizada para la detección de fluorescencia, que típicamente está ubicada entre la longitud de onda del haz de excitación y del haz de STED (Fig. (7.1)). Por consiguiente, la señal de fluorescencia integrada, puede disminuir considerablemente para longitudes de onda de STED que se acercan al máximo de emisión. En este punto, podemos notar que, en nuestro nanoscopio, en principio, es posible colectar señal de fluorescencia en longitudes de onda mayores que la de STED. Sin embargo, esto no fue posible en nuestro caso, puesto que las altas intensidades de STED excitaban fluorescencia en componentes ópticos del nanoscopio (específicamente en la lente de escaneo y en el cristal del AOTF), que generaban un nivel de señal de fondo inaceptable. En nuestros experimentos, la señal de fluorescencia integrada con la ventana de detección 1 (STED a 592 nm, Fig. (7.1)) corresponde al 36 % de la emisión total, mientras que la ventana de detección 2 (STED a 620 nm y a 642 nm) corresponde al 55 % del total de la emisión. Sin embargo, la reducción en la señal observada es más drástica de lo que se esperaría por las ventanas de detección espectral y depende fuertemente de la potencia y longitud de onda del haz de STED. Se hicieron imágenes confocales luego de hacer imágenes de STED (la secuencia fue confocal $\rightarrow$ STED $\rightarrow$ confocal) y observamos que la reducción en la señal de fluorescencia era irreversible, lo cual es un indicativo del fotoblanqueo inducido por los láseres de STED.

La cuantificación de la reducción de la señal en función de la potencia del haz de STED y de la longitud de onda se muestra en la Fig. (7.4.b). Calculamos la reducción promedio de la

señal de fluorescencia de las nanopartículas de una primera imagen confocal y posterior imagen de STED para las diferentes potencias y longitudes de onda. Una reducción promedio del 20 % de la señal se observó luego de dos imágenes confocales (en ausencia del haz de STED). El láser de STED en 642 nm tiene influencias muy pequeñas en la señal de fluorescencia, se reduce simplemente un 5 % adicional incluso al usar (120 ± 4) mW de potencia de STED. Bajo estas condiciones, se obtuvo una resolución de (57 ± 4) nm. El cambio de longitud de onda de STED a 620 nm conduce a una considerable reducción de la señal, con una dependencia casi lineal con la potencia del haz de STED. Cuando se utilizaron (110 ± 3) mW de potencia a 620 nm, la señal de fluorescencia cayó un 30 % adicional en comparación con la situación sin laser de STED. Igualmente, se obtuvieron imágenes razonables alcanzando una resolución de (49 ± 7) nm. La situación cambia dramáticamente cuando la longitud de onda se sintoniza en 592 nm. En este caso la señal cae al 15 % de su valor original luego de hacer una imagen confocal y posterior de STED usando simplemente (30 ± 1) mW de potencia. Una foto degradación tan fuerte, se encuentra en el límite de lo que es viable para hacer imágenes de CW-STED y por lo tanto limitó la resolución alcanzada a (78 ± 3) nm.

7.3. Conclusiones y perspectivas

La conclusión más importante de este capítulo es que la nanoscopía STED no se encuentra limitada a usar láseres de STED con longitudes de onda en la zona roja lejana del espectro de emisión de los fluoróforos. De hecho, es posible utilizar prácticamente cualquier longitud de onda a través del espectro de emisión. Como la sección eficaz de emisión estimulada sigue prácticamente la misma dependencia espectral que la emisión, utilizar longitudes de onda de STED cercanas al máximo de emisión, permite generar imágenes mucho más eficientemente en términos de la potencia necesaria. Modelamos cuantitativamente la resolución de STED en función de la sección eficaz de emisión estimulada. En comparación con una configuración usual de STED, al usar longitudes de onda de STED cercanas al máximo de emisión, se pueden lograr secciones eficaces de emisión estimuladas hasta 10 veces mayores. Encontramos que para este fluoróforo en particular, la fotodegradación se vuelve crítica a medida que la longitud de onda de STED se acerca a la banda de absorción. Esto es entendible, debido que el fluoróforo se somete a múltiples ciclos (no deseados) de excitación y desexcitación provocados por el haz de STED. Si bien, el ciclado no es perjudicial de por sí, el fluoróforo es más propenso a ser excitado a un estado energético superior y por lo tanto a fotoblanquearse. Utilizar la longitud de onda de STED a la mitad de máximo de emisión (620 nm) resultó ser un buen compromiso entre obtener una gran sección eficaz de emisión estimulada y no

fotoblanquearse demasiado. Concretamente, pudimos hacer uso de secciones eficaces 8 veces mayores que las que se obtienen al utilizar la longitud de onda de STED en la zona roja lejana del espectro de emisión del fluoróforo, con una reducción de la señal del 50 %. Naturalmente estas condiciones variarán para diferentes fluoróforos. Dado el rol crucial de la conmutación entre estados, los fluoróforos son esenciales para obtener imágenes de alta calidad en técnicas de nanoscopías de fluorescencia de campo lejano. Su rendimiento y desempeño han sido estudiados extensivamente para la configuración de longitudes de onda de STED en la zona roja lejana del espectro de emisión. Los resultados de este trabajo motivan el estudio de fluoróforos bajo longitudes de onda de STED cercanas al máximo de emisión. Primero, la nanoscopía STED utilizando densidades de potencia considerablemente menores podrá llegar a ser posible, y segundo, fluoróforos que en el pasado se han reportado como inadecuados bajo configuraciones típicas de STED podrían ser útiles simplemente utilizando longitudes de onda donde su sección eficaz de emisión estimulada sea varias veces mayor.

8

Conclusiones generales y perspectivas

Esta tesis constituye la primera implementación en Argentina de la nanoscopía STED.

En el capítulo [3] se presentó el diseño y las características principales del nanoscopio; un sistema pulsado, compuesto por dos colores de excitación (640 nm y 594 nm) y un único laser de depleción (775 nm). Se detalló la disposición experimental [3.1], la metodología de alineación [3.2] y se demostró su desempeño [3.3]. Al utilizar el haz de depleción con una energía de 5 $^{nJ}/_{p}$ se obtuvo una resolución espacial de (42 ± 10) nm para el fluoróforo Atto 647N y de (53 ± 10) nm para el fluoróforo Atto 594. Además, se explicó cómo preparar muestras biológicas [3.4]. Para mejorar las capacidades del nanoscopio, se (i) cambiará el láser supercontinuo que provee la excitación en 594 nm por un láser monocromático, de la marca PicoQuant, que será compatible con el existente en 640 nm, lo cual permitirá simplificar el proceso de sincronización y alineación temporal de los pulsos, (ii) se agregará un control activo de foco que permitirá realizar mediciones durante varias horas sin que se desenfoque la muestra y (iii) se agregará una cámara de temperatura, humedad y CO_2 que permitirá trabajar con células vivas.

Luego, se describieron las primeras aplicaciones del nanoscopio STED a la investigación de sistemas biofísicos con una resolución espacial sin precedentes. Esto se llevó a cabo a través de colaboraciones interdisciplinarias.

En colaboración con el Grupo de Inmunología Molecular, IIB, UNSAM, CONICET,

BA, Argentina, se estudió la membrana del tripomastigote del *T. cruzi* para entender el proceso de adquisición de ácido siálico, fundamental para que el parásito sobreviva en la sangre del huésped e invada células donde proliferarse. Se realizaron imágenes de STED que permitieron describir la distribución y tamaño de las *trans*-sialidasas y mucinas, descubriendo que constituyen una población heterogénea sobre la membrana del parásito. El paradigma vigente establece que las mucinas ancladas a la membrana celular son sialidadas por una molécula de *trans*-sialidasa vecina, sin embargo, a través del análisis de la colocalización de los dominios, se comprobó que, en realidad, se encuentran demasiado separados como para que ello ocurra y especulamos que las mucinas podrían sialidarse por medio de trans-sialidasas secretadas en el medio extracelular.

En colaboración con el Laboratorio de Neurobiología, INIMEC, CONICET, Córdoba, Argentina, se describió el citoesqueleto de los conos de crecimiento axonales de neuronas hipocampales de estadio 3 para entender como RhoA influye en la dinámica de polimerización y estabilización de microtúbulos y filamentos de actina durante el fenómeno de diferenciación axonal. Se realizaron imágenes de STED de tubulina tirosinada, detirosinada, acetilada y actina y a través de la cuantificación y posterior análisis estadístico, se comprobó que RhoA, activada a través de LPA, estimula el crecimiento neurítico y favorece el crecimiento axonal. Debido a esto, los microtúbulos se estabilizan más rápido, lo cual promueve la polimerización de nuevos microtúbulos y los microtúbulos estables penetran hasta el dominio periférico del cono de crecimiento y aumentan sus niveles. Se complementará este estudio con una descripción del citoesqueleto de los conos de crecimiento en neuronas hipocampales de estadio 2 (cuando todavía no se ha definido el axón) para explicar los diversos roles que RhoA cumple durante la formación axonal.

Se analizó la relación entre el fenómeno de degeneración axonal y la adaptación de estructuras periódicas de actina, a través del estudio de axones de ganglios de la raíz dorsal luego de ser privados del factor de crecimiento nervioso (NGF), en colaboración con el Laboratorio de Neurobiología, INIMEC, CONICET, Córdoba, Argentina. Se descubrió que la actina en los axones sufre modificaciones microscópicas luego de cortos períodos de tiempo (3 horas) de privación de NGF. Se realizaron imágenes de STED que permitieron distinguir dos clases de organizaciones de actina; estructuras periódicas y filamentos. A través de un análisis cuantitativo y estadístico, se determinó que la abundancia de filamentos por área y la cantidad de axones con filamentos no se modifica al ser privadas de NGF, con respecto a la situación control. En cambio, la abundancia por área de las estructuras periódicas disminuye en un 50 %, pero la cantidad de axones con estructuras periódicas, casi no se ve modificada, lo cual, sugiere que los axones que poseían estructuras periódicas, las siguen teniendo, pero

de forma menos abundante. Finalmente, se logró incrementar la cantidad de axones con estructuras periódicas a través de la estabilización de la actina mediante la cucurbitacina E. Para entender con mayor detalle el proceso de degeneración axonal, se estudiará, la estructura periódica de espectrina al privar los axones de NGF. Se estudiará el comportamiento de las estructuras periódicas de actina y espectrina frente al fenómeno de degeneración Walleriana (es decir, al cortar los axones). Y, además, se desarrollará un algoritmo que permitirá determinar automáticamente la presencia de estructuras periódicas, lo cual simplificará el proceso de análisis.

Finalmente, a través de una colaboración con el departamento de nanobiofotónica del Instituto Max-Planck de Biofisicoquímica, Gotinga, Alemania, se desarrolló un nuevo esquema de implementación de la nanoscopía STED [7] que expande considerablemente su campo de aplicación al demostrar que la nanoscopía STED no se encuentra limitada a usar láseres de depleción con longitudes de onda en la zona roja lejana del espectro de emisión de los fluoróforos, sino que de hecho, es posible utilizar prácticamente cualquier longitud de onda a través del espectro de emisión. De esta forma, se logró incrementar la eficiencia de los fotones de STED hasta 10 veces, en comparación a configuraciones usuales. Además, fluoróforos que, en el pasado, se consideraban inadecuados bajo determinadas configuraciones espectrales, pasan a ser utilizables. Se considera probar múltiples fluoróforos y realizar las primeras mediciones en muestras biológicas.

Las nanoscopías de fluorescencia de campo lejano dirigidas son técnicas muy recientes, que encuentran cada vez más aplicaciones en las ciencias de la vida, y se deberá continuar perfeccionándolas y difundiéndolas hasta que se conviertan en técnicas rutinarias de cualquier laboratorio de imágenes.

En las técnicas de microscopías desarrolladas en el siglo XX, el aumento en la resolución se basaba en el perfeccionamiento de las lentes. En las técnicas de microscopías de súper resolución, dicha función la cumplen los marcadores fluorescentes, por lo tanto, su desarrollo acompañará el progreso de las técnicas.

Se comenzarán a implementar técnicas que permitan realizar la transición "*on-off*" de fluoróforos con bajas intensidades de luz, lo cual las convertirá especialmente atractivas para realizar imágenes en vivo y para paralelizar las mediciones (utilizar múltiples focos simultáneamente).

Las técnicas de nanoscopías de campo lejano, se basan en la separación de estados moleculares, será interesante encontrar otros mecanismos de transición, tales como "absorción/no-absorción", "*scattering/no-scattering*", "*spin up/spin down*", que permitan extender el campo de aplicación.

Bibliografía

[Abbe, 1873] Abbe, E. (1873). Beiträge zur theorie des mikroskops und der mikroskopischen wahrnehmung. *Archiv für mikroskopische Anatomie*, 9(1):413–418.

[Ando et al., 2002] Ando, R., Hama, H., Yamamoto-Hino, M., Mizuno, H., and Miyawaki, A. (2002). An optical marker based on the uv-induced green-to-red photoconversion of a fluorescent protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(20):12651–12656.

[Berning et al., 2012] Berning, S., Willig, K. I., Steffens, H., Dibaj, P., and Hell, S. W. (2012). Nanoscopy in a living mouse brain. *Science*, 335(6068):551–551.

[Betzig et al., 2006] Betzig, E., Patterson, G. H., Sougrat, R., Lindwasser, O. W., Olenych, S., Bonifacino, J. S., Davidson, M. W., Lippincott-Schwartz, J., and Hess, H. F. (2006). Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution. *Science*, 313(5793):1642–1645.

[Bewersdorf et al., 2006] Bewersdorf, J., Schmidt, R., and Hell, S. (2006). Comparison of i5m and 4pi-microscopy. *Journal of microscopy*, 222(2):105–117.

[Binnig et al., 1986] Binnig, G., Quate, C. F., and Gerber, C. (1986). Atomic force microscope. *Physical review letters*, 56(9):930.

[Binnig et al., 1982] Binnig, G., Rohrer, H., Gerber, C., and Weibel, E. (1982). Surface studies by scanning tunneling microscopy. *Physical review letters*, 49(1):57.

[Bordenave et al., 2016] Bordenave, M. D., Balzarotti, F., Stefani, F. D., and Hell, S. W. (2016). Sted nanoscopy with wavelengths at the emission maximum. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 49(36):365102.

[Born and Wolf, 2000] Born, M. and Wolf, E. (2000). *Principles of optics: electromagnetic theory of propagation, interference and diffraction of light*. CUP Archive.

[Bretschneider et al., 2007] Bretschneider, S., Eggeling, C., and Hell, S. W. (2007). Breaking the diffraction barrier in fluorescence microscopy by optical shelving. *Physical review letters*, 98(21):218103.

[Buscaglia et al., 2006] Buscaglia, C. A., Campo, V. A., Frasch, A. C., and Di Noia, J. M. (2006). Trypanosoma cruzi surface mucins: host-dependent coat diversity. *Nature Reviews Microbiology*, 4(3):229–236.

[Caceres et al., 1986] Caceres, A., Banker, G., and Binder, L. (1986). Immunocytochemical localization of tubulin and microtubule-associated protein 2 during the development of hippocampal neurons in culture. *The Journal of Neuroscience*, 6(3):714–722.

[Cáceres et al., 2012] Cáceres, A., Ye, B., and Dotti, C. G. (2012). Neuronal polarity: demarcation, growth and commitment. *Current opinion in cell biology*, 24(4):547–553.

[Cáceres, 2016] Cáceres, A. (2016). Imagen provista por el laboratorio de neurobiología. *Instituto de Investigación Médica de Córdoba, Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, Córdoba, Argentina.*

[Ceni et al., 2014] Ceni, C., Unsain, N., Zeinieh, M. P., and Barker, P. A. (2014). Neurotrophins in the regulation of cellular survival and death. In *Neurotrophic Factors*, pages 193–221. Springer.

[Chalfie, 1994] Chalfie, M. (1994). Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Trends in Genetics*, 10(5):151.

[Chao et al., 2007] Chao, J.-I., Perevedentseva, E., Chung, P.-H., Liu, K.-K., Cheng, C.-Y., Chang, C.-C., and Cheng, C.-L. (2007). Nanometer-sized diamond particle as a probe for biolabeling. *Biophysical journal*, 93(6):2199–2208.

[Chmyrov et al., 2013] Chmyrov, A., Keller, J., Grotjohann, T., Ratz, M., D'Este, E., Jakobs, S., Eggeling, C., and Hell, S. W. (2013). Nanoscopy with more than 100,000'doughnuts'. *Nature methods*, 10(8):737–740.

[Conde and Cáceres, 2009] Conde, C. and Cáceres, A. (2009). Microtubule assembly, organization and dynamics in axons and dendrites. *Nature Reviews Neuroscience*, 10(5):319–332.

[Coons et al., 1941] Coons, A. H., Creech, H. J., and Jones, R. N. (1941). Immunological properties of an antibody containing a fluorescent group. *Experimental Biology and Medicine*, 47(2):200–202.

[Deshpande et al., 1990] Deshpande, A., Beidoun, A., Penzkofer, A., and Wagenblast, G. (1990). Absorption and emission spectroscopic investigation of cyanovinyldiethylaniline dye vapors. *Chemical Physics*, 142(1):123–131.

[D'Este et al., 2015] D'Este, E., Kamin, D., Göttfert, F., El-Hady, A., and Hell, S. W. (2015). Sted nanoscopy reveals the ubiquity of subcortical cytoskeleton periodicity in living neurons. *Cell reports*, 10(8):1246–1251.

[D'Este et al., 2016] D'Este, E., Kamin, D., Velte, C., Göttfert, F., Simons, M., and Hell, S. W. (2016). Subcortical cytoskeleton periodicity throughout the nervous system. *Scientific reports*, 6.

[Dias, 1984] Dias, J. C. P. (1984). Acute chagas'disease. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 79:85–91.

[Donnert et al., 2007] Donnert, G., Eggeling, C., and Hell, S. W. (2007). Major signal increase in fluorescence microscopy through dark-state relaxation. *Nature methods*, 4(1):81–86.

[Donnert et al., 2009] Donnert, G., Eggeling, C., and Hell, S. W. (2009). Triplet-relaxation microscopy with bunched pulsed excitation. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 8(4):481–485.

[Donnert et al., 2006] Donnert, G., Keller, J., Medda, R., Andrei, M. A., Rizzoli, S. O., Lührmann, R., Jahn, R., Eggeling, C., and Hell, S. W. (2006). Macromolecular-scale resolution in biological fluorescence microscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(31):11440–11445.

[Dotti and Banker, 1986] Dotti, C. G. and Banker, G. A. (1986). Experimentally induced alteration in the polarity of developing neurons. *Nature*, 330(6145):254–256.

[Dutt et al., 2007] Dutt, M. G., Childress, L., Jiang, L., Togan, E., Maze, J., Jelezko, F., Zibrov, A., Hemmer, P., and Lukin, M. (2007). Quantum register based on individual electronic and nuclear spin qubits in diamond. *Science*, 316(5829):1312–1316.

[Dyba and Hell, 2002] Dyba, M. and Hell, S. W. (2002). Focal spots of size $\lambda/23$ open up far-field florescence microscopy at 33 nm axial resolution. *Physical review letters*, 88(16):163901.

[Dyba and Hell, 2003] Dyba, M. and Hell, S. W. (2003). Photostability of a fluorescent marker under pulsed excited-state depletion through stimulated emission. *Applied optics*, 42(25):5123–5129.

[Dyba et al., 2003] Dyba, M., Jakobs, S., and Hell, S. W. (2003). Immunofluorescence stimulated emission depletion microscopy. *Nature biotechnology*, 21(11):1303–1304.

[Dyba et al., 2005] Dyba, M., Keller, J., and Hell, S. (2005). Phase filter enhanced sted-4pi fluorescence microscopy: theory and experiment. *New Journal of Physics*, 7(1):134.

[Eggeling et al., 2009] Eggeling, C., Ringemann, C., Medda, R., Schwarzmann, G., Sandhoff, K., Polyakova, S., Belov, V. N., Hein, B., von Middendorff, C., Schönle, A., et al. (2009). Direct observation of the nanoscale dynamics of membrane lipids in a living cell. *Nature*, 457(7233):1159–1162.

[Fölling et al., 2008] Fölling, J., Bossi, M., Bock, H., Medda, R., Wurm, C. A., Hein, B., Jakobs, S., Eggeling, C., and Hell, S. W. (2008). Fluorescence nanoscopy by ground-state depletion and single-molecule return. *Nature methods*, 5(11):943–945.

[Fritz et al., 2013] Fritz, R. D., Letzelter, M., Reimann, A., Martin, K., Fusco, L., Ritsma, L., Ponsioen, B., Fluri, E., Schulte-Merker, S., van Rheenen, J., et al. (2013). A versatile toolkit to produce sensitive fret biosensors to visualize signaling in time and space. *Sci. Signal.*, 6(285):rs12–rs12.

[Fu et al., 2007] Fu, C.-C., Lee, H.-Y., Chen, K., Lim, T.-S., Wu, H.-Y., Lin, P.-K., Wei, P.-K., Tsao, P.-H., Chang, H.-C., and Fann, W. (2007). Characterization and application of single fluorescent nanodiamonds as cellular biomarkers. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(3):727–732.

[Giorgi and de Lederkremer, 2011] Giorgi, M. E. and de Lederkremer, R. M. (2011). Trans-sialidase and mucins of trypanosoma cruzi: an important interplay for the parasite. *Carbohydrate research*, 346(12):1389–1393.

[Gonzalez-Billault et al., 2012] Gonzalez-Billault, C., Muñoz-Llancao, P., Henriquez, D. R., Wojnacki, J., Conde, C., and Caceres, A. (2012). The role of small gtpases in neuronal morphogenesis and polarity. *Cytoskeleton*, 69(7):464–485.

[Göttfert et al., 2013] Göttfert, F., Wurm, C. A., Mueller, V., Berning, S., Cordes, V. C., Honigmann, A., and Hell, S. W. (2013). Coaligned dual-channel sted nanoscopy and molecular diffusion analysis at 20 nm resolution. *Biophysical journal*, 105(1):L01–L03.

[Gould et al., 2012] Gould, T. J., Burke, D., Bewersdorf, J., and Booth, M. J. (2012). Adaptive optics enables 3d sted microscopy in aberrating specimens. *Optics express*, 20(19):20998–21009.

[Govek et al., 2005] Govek, E.-E., Newey, S. E., and Van Aelst, L. (2005). The role of the rho gtpases in neuronal development. *Genes & development*, 19(1):1–49.

[Gruber et al., 1997] Gruber, A., Dräbenstedt, A., Tietz, C., Fleury, L., Wrachtrup, J., and Von Borczyskowski, C. (1997). Scanning confocal optical microscopy and magnetic resonance on single defect centers. *Science*, 276(5321):2012–2014.

[Gustafsson, 2000] Gustafsson, M. G. (2000). Surpassing the lateral resolution limit by a factor of two using structured illumination microscopy. *Journal of microscopy*, 198(2):82–87.

[Hao et al., 2010] Hao, X., Kuang, C., Wang, T., and Liu, X. (2010). Effects of polarization on the de-excitation dark focal spot in sted microscopy. *Journal of Optics*, 12(11):115707.

[Harke, 2008] Harke, B. (2008). *3D STED microscopy with pulsed and continuous wave lasers*. PhD thesis, Georg-August-University Goettingen.

[Harke et al., 2008a] Harke, B., Keller, J., Ullal, C. K., Westphal, V., Sch, A., Hell, S. W., et al. (2008a). Resolution scaling in sted microscopy. *Optics express*, 16(6):4154–4162.

[Harke et al., 2008b] Harke, B., Ullal, C. K., Keller, J., and Hell, S. W. (2008b). Three-dimensional nanoscopy of colloidal crystals. *Nano letters*, 8(5):1309–1313.

[Hein, 2009] Hein, B. (2009). *Live Cell STED Microscopy Using Genetically Encoded Markers*. PhD thesis, Georg-August-Universität zu Göttingen.

[Hell, 2003] Hell, S. W. (2003). Toward fluorescence nanoscopy. *Nature biotechnology*, 21(11):1347–1355.

[Hell, 2007] Hell, S. W. (2007). Far-field optical nanoscopy. *science*, 316(5828):1153–1158.

[Hell, 2009] Hell, S. W. (2009). Microscopy and its focal switch. *Nature methods*, 6(1):24–32.

[Hell et al., 2004] Hell, S. W., Dyba, M., and Jakobs, S. (2004). Concepts for nanoscale resolution in fluorescence microscopy. *Current opinion in neurobiology*, 14(5):599–609.

[Hell and Kroug, 1995] Hell, S. W. and Kroug, M. (1995). Ground-state-depletion fluorscence microscopy: A concept for breaking the diffraction resolution limit. *Applied Physics B*, 60(5):495–497.

[Hell et al., 2009] Hell, S. W., Schmidt, R., and Egner, A. (2009). Diffraction-unlimited three-dimensional optical nanoscopy with opposing lenses. *Nature Photonics*, 3(7):381–387.

[Hell and Wichmann, 1994] Hell, S. W. and Wichmann, J. (1994). Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy. *Optics letters*, 19(11):780–782.

[Hell et al., 2006] Hell, S. W., Willig, K. I., Dyba, M., Jakobs, S., Kastrup, L., and Westphal, V. (2006). Nanoscale resolution with focused light: Stimulated emission depletion and other reversible saturable optical fluorescence transitions microscopy concepts. In *Handbook of Biological Confocal Microscopy*, pages 571–579. Springer.

[Hofmann et al., 2005] Hofmann, M., Eggeling, C., Jakobs, S., and Hell, S. W. (2005). Breaking the diffraction barrier in fluorescence microscopy at low light intensities by using reversibly photoswitchable proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(49):17565–17569.

[Honigmann et al., 2012] Honigmann, A., Eggeling, C., Schulze, M., and Lepert, A. (2012). Super-resolution sted microscopy advances with yellow cw opsl. *Laser Focus World*, 48(1):75–79.

[Honigmann et al., 2013] Honigmann, A., Mueller, V., Fernando, U., Eggeling, C., and Sperling, J. (2013). Simplifying sted microscopy of photostable red-emitting labels. *Laser+ Potonik*, 5:40–42.

[Hooke, 1665] Hooke, R. (1665). *Micrographia: Or Some Physiological Descriptions of Minute Bodies Made by Magnifying Glasses.* Jo. Martyn, and Ja. Allestry.

[Hotta et al., 2010] Hotta, J., Fron, E., Dedecker, P., Janssen, K. P., Li, C., Müllen, K., Harke, B., Bückers, J., Hell, S. W., and Hofkens, J. (2010). Spectroscopic rationale for efficient stimulated-emission depletion microscopy fluorophores. *Journal of the American Chemical Society*, 132(14):5021–5023.

[Huang et al., 2009] Huang, B., Bates, M., and Zhuang, X. (2009). Super resolution fluorescence microscopy. *Annual review of biochemistry*, 78:993.

[Ilgen et al., 2014] Ilgen, P., Stoldt, S., Conradi, L.-C., Wurm, C. A., Rüschoff, J., Ghadimi, B. M., Liersch, T., and Jakobs, S. (2014). Sted super-resolution microscopy of clinical paraffin-embedded human rectal cancer tissue. *PloS one*, 9(7):e101563.

[Jungmann et al., 2010] Jungmann, R., Steinhauer, C., Scheible, M., Kuzyk, A., Tinnefeld, P., and Simmel, F. C. (2010). Single-molecule kinetics and super-resolution microscopy by fluorescence imaging of transient binding on dna origami. *Nano letters*, 10(11):4756–4761.

[Klar and Hell, 1999] Klar, T. A. and Hell, S. W. (1999). Subdiffraction resolution in far-field fluorescence microscopy. *Optics letters*, 24(14):954–956.

[Klar et al., 2000] Klar, T. A., Jakobs, S., Dyba, M., Egner, A., and Hell, S. W. (2000). Fluorescence microscopy with diffraction resolution barrier broken by stimulated emission. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(15):8206–8210.

[Knoll and Ruska, 1932] Knoll, M. and Ruska, E. (1932). Das elektronenmikroskop. *Zeitschrift für Physik*, 78(5-6):318–339.

[Kolmakov et al., 2014] Kolmakov, K., Wurm, C. A., Meineke, D. N., Göttfert, F., Boyarskiy, V. P., Belov, V. N., and Hell, S. W. (2014). Polar red-emitting rhodamine dyes with reactive groups: synthesis, photophysical properties, and two-color sted nanoscopy applications. *Chemistry–A European Journal*, 20(1):146–157.

[Kurtsiefer et al., 2000] Kurtsiefer, C., Mayer, S., Zarda, P., and Weinfurter, H. (2000). Stable solid-state source of single photons. *Physical review letters*, 85(2):290.

[Lantos et al., 2016] Lantos, A. B., Carlevaro, G., Araoz, B., Diaz, P. R., de los Milagros Camara, M., Buscaglia, C. A., Bossi, M., Yu, H., Chen, X., Bertozzi, C. R., et al. (2016). Sialic acid glycobiology unveils trypanosoma cruzi trypomastigote membrane physiology. *PLoS Pathog*, 12(4):e1005559.

[Lantos, 2016] Lantos, A. B. G. (2016). *Fisiología de membrana del tripomastigote de Trypanosoma cruzi desde la perspectiva del ácido siálico y la trans-sialidasa*. PhD thesis, Universidad Nacional de San Martín.

[Leite and Sousa, 2016] Leite, S. C. and Sousa, M. M. (2016). The neuronal and actin commitment: Why do neurons need rings? *Cytoskeleton*.

[Leutenegger et al., 2010] Leutenegger, M., Eggeling, C., and Hell, S. W. (2010). Analytical description of sted microscopy performance. *Optics express*, 18(25):26417–26429.

[Lowery and Van Vactor, 2009] Lowery, L. A. and Van Vactor, D. (2009). The trip of the tip: understanding the growth cone machinery. *Nature reviews Molecular cell biology*, 10(5):332–343.

[Martins et al., 2012] Martins, A. V., Gomes, A. P., Gomes de Mendonça, E., Lopes Rangel Fietto, J., Santana, L. A., de Almeida Oliveira, M. G., Geller, M., de Freitas Santos, R., Roger Vitorino, R., and Siqueira-Batista, R. (2012). Biology of trypanosoma cruzi: An update. *Infectio*, 16(1):45–58.

[Matz et al., 1999] Matz, M. V., Fradkov, A. F., Labas, Y. A., Savitsky, A. P., Zaraisky, A. G., Markelov, M. L., and Lukyanov, S. A. (1999). Fluorescent proteins from nonbioluminescent anthozoa species. *Nature biotechnology*, 17(10):969–973.

[Moffitt et al., 2011] Moffitt, J. R., Osseforth, C., and Michaelis, J. (2011). Time-gating improves the spatial resolution of sted microscopy. *Optics express*, 19(5):4242–4254.

[Moneron and Hell, 2009] Moneron, G. and Hell, S. W. (2009). Two-photon excitation sted microscopy. *Optics express*, 17(17):14567–14573.

[Moneron et al., 2010] Moneron, G., Medda, R., Hein, B., Giske, A., Westphal, V., and Hell, S. W. (2010). Fast sted microscopy with continuous wave fiber lasers. *Optics express*, 18(2):1302–1309.

[Morozova et al., 2010] Morozova, K. S., Piatkevich, K. D., Gould, T. J., Zhang, J., Bewersdorf, J., and Verkhusha, V. V. (2010). Far-red fluorescent protein excitable with red lasers for flow cytometry and superresolution sted nanoscopy. *Biophysical journal*, 99(2):L13–L15.

[Mueller et al., 2012] Mueller, V., Eggeling, C., Karlsson, H., and Von Gegerfelt, D. (2012). Cw dpss lasers make sted microscopy more practical. *Biophotonics*, 19(5):30–32.

[Nägerl et al., 2008] Nägerl, U. V., Willig, K. I., Hein, B., Hell, S. W., and Bonhoeffer, T. (2008). Live-cell imaging of dendritic spines by sted microscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(48):18982–18987.

[Nomarski, 1955] Nomarski, M. (1955). Microinterféromètre différentiel à ondes polarisées. *Journal de Physique et le Radium*, 16:S9–S13.

[Ober et al., 2004] Ober, R. J., Ram, S., and Ward, E. S. (2004). Localization accuracy in single-molecule microscopy. *Biophysical journal*, 86(2):1185–1200.

[Osborn and Weber, 1982] Osborn, M. and Weber, K. (1982). Immunofluorescence and immunocytochemical procedures with affinity purified antibodies: tubulin-containing structures. *Methods in cell biology*, 24:97–132.

[Osseforth et al., 2014] Osseforth, C., Moffitt, J. R., Schermelleh, L., and Michaelis, J. (2014). Simultaneous dual-color 3d sted microscopy. *Optics express*, 22(6):7028–7039.

[Patterson and Lippincott-Schwartz, 2002] Patterson, G. H. and Lippincott-Schwartz, J. (2002). A photoactivatable gfp for selective photolabeling of proteins and cells. *Science*, 297(5588):1873–1877.

[Pellegrotti, 2015] Pellegrotti, J. V. (2015). *Manipulacion de Fluorescencia Molecular Mediante Nanoparticulas Metalicas*. PhD thesis, Universidad de Buenos Aires.

[Pinto et al., 2009] Pinto, A. Y. d. N., Ferreira Jr, A. G., Valente, V. d. C., Harada, G. S., and Valente, S. A. d. S. (2009). Urban outbreak of acute chagas disease in amazon region of brazil: four-year follow-up after treatment with benznidazole. *Revista panamericana de salud pública*, 25(1):77–83.

[Pohl et al., 1984] Pohl, D. W., Denk, W., and Lanz, M. (1984). Optical stethoscopy: Image recording with resolution $\lambda/20$. *Applied physics letters*, 44(7):651–653.

[Ramón y Cajal, 1899] Ramón y Cajal, S. (1899). *Comparative study of the sensory areas of the human cortex*.

[Rankin et al., 2011] Rankin, B. R., Moneron, G., Wurm, C. A., Nelson, J. C., Walter, A., Schwarzer, D., Schroeder, J., Colón-Ramos, D. A., and Hell, S. W. (2011). Nanoscopy in a living multicellular organism expressing gfp. *Biophysical journal*, 100(12):L63–L65.

[Remme et al., 2006] Remme, J. H., Feenstra, P., Lever, P., Medici, A. C., Morel, C. M., Noma, M., Ramaiah, K., Richards, F., Seketeli, A., Schmunis, G., et al. (2006). Tropical diseases targeted for elimination: Chagas disease, lymphatic filariasis, onchocerciasis, and leprosy.

[Rieger and Stallinga, 2014] Rieger, B. and Stallinga, S. (2014). The lateral and axial localization uncertainty in super-resolution light microscopy. *Chemphyschem*, 15(4):664–670.

[Rittweger et al., 2009a] Rittweger, E., Han, K. Y., Irvine, S. E., Eggeling, C., and Hell, S. W. (2009a). Sted microscopy reveals crystal colour centres with nanometric resolution. *Nature Photonics*, 3(3):144–147.

[Rittweger et al., 2007] Rittweger, E., Rankin, B., Westphal, V., and Hell, S. (2007). Fluorescence depletion mechanisms in super-resolving sted microscopy. *Chemical physics letters*, 442(4):483–487.

[Rittweger et al., 2009b] Rittweger, E., Wildanger, D., and Hell, S. (2009b). Far-field fluorescence nanoscopy of diamond color centers by ground state depletion. *EPL (Europhysics Letters)*, 86(1):14001.

[Ronzitti et al., 2013] Ronzitti, E., Harke, B., and Diaspro, A. (2013). Frequency dependent detection in a sted microscope using modulated excitation light. *Optics express*, 21(1):210–219.

[Roy, 2016] Roy, S. (2016). Waves, rings, and trails: The scenic landscape of axonal actin. *The Journal of cell biology*, 212(2):131–134.

[Rust et al., 2006] Rust, M. J., Bates, M., and Zhuang, X. (2006). Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (storm). *Nature methods*, 3(10):793–796.

[Sackett and Wolff, 1987] Sackett, D. L. and Wolff, J. (1987). Nile red as a polarity-sensitive fluorescent probe of hydrophobic protein surfaces. *Analytical biochemistry*, 167(2):228–234.

[Saxena and Caroni, 2007] Saxena, S. and Caroni, P. (2007). Mechanisms of axon degeneration: from development to disease. *Progress in neurobiology*, 83(3):174–191.

[Schauer, 2000] Schauer, R. (2000). Achievements and challenges of sialic acid research. *Glycoconjugate journal*, 17(7-9):485–499.

[Schmidt et al., 2008] Schmidt, R., Wurm, C. A., Jakobs, S., Engelhardt, J., Egner, A., and Hell, S. W. (2008). Spherical nanosized focal spot unravels the interior of cells. *Nature methods*, 5(6):539–544.

[Schmidt et al., 2009] Schmidt, R., Wurm, C. A., Punge, A., Egner, A., Jakobs, S., and Hell, S. W. (2009). Mitochondrial cristae revealed with focused light. *Nano letters*, 9(6):2508–2510.

[Schmidt, 1939] Schmidt, W. (1939). Doppelbrechung der kernspindel und zugfasertheorie der chromosomenbewegung. *Zeitschrift für Zellforschung und Mikroskopische Anatomie Abt. B Chromosoma*, 1(1):253–264.

[Schönle, 2012] Schönle, A. (2012). Imspector software package. http://www.max-planck-innovation.com/en/.

[Schoenmann et al., 2010] Schoenmann, Z., Assa-Kunik, E., Tiomny, S., Minis, A., Haklai-Topper, L., Arama, E., and Yaron, A. (2010). Axonal degeneration is regulated by the apoptotic machinery or a nad+-sensitive pathway in insects and mammals. *The Journal of neuroscience*, 30(18):6375–6386.

[Schrof et al., 2011] Schrof, S., Staudt, T., Rittweger, E., Wittenmayer, N., Dresbach, T., Engelhardt, J., and Hell, S. W. (2011). Sted nanoscopy with mass-produced laser diodes. *Optics express*, 19(9):8066–8072.

[Shaner et al., 2004] Shaner, N. C., Campbell, R. E., Steinbach, P. A., Giepmans, B. N., Palmer, A. E., and Tsien, R. Y. (2004). Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from discosoma sp. red fluorescent protein. *Nature biotechnology*, 22(12):1567–1572.

[Sharonov and Hochstrasser, 2006] Sharonov, A. and Hochstrasser, R. M. (2006). Wide-field subdiffraction imaging by accumulated binding of diffusing probes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(50):18911–18916.

[Siedentopf and Zsigmondy, 1902] Siedentopf, H. and Zsigmondy, R. (1902). Uber sichtbarmachung und größenbestimmung ultramikoskopischer teilchen, mit besonderer anwendung auf goldrubingläser. *Annalen der Physik*, 315(1):1–39.

[Smith et al., 2010] Smith, C. S., Joseph, N., Rieger, B., and Lidke, K. A. (2010). Fast, single-molecule localization that achieves theoretically minimum uncertainty. *Nature methods*, 7(5):373–375.

[Sörensen et al., 2012] Sörensen, P. M., Iacob, R. E., Fritzsche, M., Engen, J. R., Brieher, W. M., Charras, G., and Eggert, U. S. (2012). The natural product cucurbitacin e inhibits depolymerization of actin filaments. *ACS chemical biology*, 7(9):1502–1508.

[Staudt, 2009] Staudt, T. (2009). *Strategies to reduce photobleaching, dark state transitions andphototoxicity in subdifraction optical microscopy.* PhD thesis, Rupertus Carola University of Heidelberg.

[Staudt et al., 2011] Staudt, T., Engler, A., Rittweger, E., Harke, B., Engelhardt, J., and Hell, S. W. (2011). Far-field optical nanoscopy with reduced number of state transition cycles. *Optics express*, 19(6):5644–5657.

[Stokes, 1852] Stokes, G. G. (1852). On the change of refrangibility of light. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*, 142:463–562.

[Testa et al., 2014] Testa, I., D'Este, E., Urban, N. T., Balzarotti, F., and Hell, S. W. (2014). Dual channel resolft nanoscopy by using fluorescent state kinetics. *Nano letters*, 15(1):103–106.

[Testa et al., 2012] Testa, I., Urban, N. T., Jakobs, S., Eggeling, C., Willig, K. I., and Hell, S. W. (2012). Nanoscopy of living brain slices with low light levels. *Neuron*, 75(6):992–1000.

[Tinnefeld et al., 2015] Tinnefeld, P., Eggeling, C., and Hell, S. W. (2015). *Far-Field Optical Nanoscopy*, volume 14. Springer.

[Unsain et al., 2014] Unsain, N., Heard, K. N., Higgins, J. M., and Barker, P. A. (2014). Production and isolation of axons from sensory neurons for biochemical analysis using porous filters. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, (89):e51795–e51795.

[Unsain et al., 2013] Unsain, N., Higgins, J. M., Parker, K. N., Johnstone, A. D., and Barker, P. A. (2013). Xiap regulates caspase activity in degenerating axons. *Cell reports*, 4(4):751–763.

[Urban et al., 2011] Urban, N. T., Willig, K. I., Hell, S. W., and Nägerl, U. V. (2011). Sted nanoscopy of actin dynamics in synapses deep inside living brain slices. *Biophysical journal*, 101(5):1277–1284.

[Valeur and Berberan-Santos, 2012] Valeur, B. and Berberan-Santos, M. N. (2012). *Molecular fluorescence: principles and applications*. John Wiley & Sons.

[van de Linde et al., 2011] van de Linde, S., Löschberger, A., Klein, T., Heidbreder, M., Wolter, S., Heilemann, M., and Sauer, M. (2011). Direct stochastic optical reconstruction microscopy with standard fluorescent probes. *Nature protocols*, 6(7):991–1009.

[Vicidomini et al., 2014] Vicidomini, G., Hernández, I. C., dâ€™Amora, M., Zanacchi, F. C., Bianchini, P., and Diaspro, A. (2014). Gated cw-sted microscopy: a versatile tool for biological nanometer scale investigation. *Methods*, 66(2):124–130.

[Vicidomini et al., 2012] Vicidomini, G., Moneron, G., Eggeling, C., Rittweger, E., and Hell, S. W. (2012). Sted with wavelengths closer to the emission maximum. *Optics express*, 20(5):5225–5236.

[Vicidomini et al., 2011] Vicidomini, G., Moneron, G., Han, K. Y., Westphal, V., Ta, H., Reuss, M., Engelhardt, J., Eggeling, C., and Hell, S. W. (2011). Sharper low-power sted nanoscopy by time gating. *Nature methods*, 8(7):571–573.

[Vicidomini et al., 2013] Vicidomini, G., Schönle, A., Ta, H., Han, K. Y., Moneron, G., Eggeling, C., and Hell, S. W. (2013). Sted nanoscopy with time-gated detection: theoretical and experimental aspects. *PLoS One*, 8(1):e54421.

[Vogelsang et al., 2008] Vogelsang, J., Kasper, R., Steinhauer, C., Person, B., Heilemann, M., Sauer, M., and Tinnefeld, P. (2008). A reducing and oxidizing system minimizes photobleaching and blinking of fluorescent dyes. *Angewandte Chemie International Edition*, 47(29):5465–5469.

[Wäldchen et al., 2015] Wäldchen, S., Lehmann, J., Klein, T., van de Linde, S., and Sauer, M. (2015). Light-induced cell damage in live-cell super-resolution microscopy. *Scientific reports*, 5.

[Westphal and Hell, 2005] Westphal, V. and Hell, S. W. (2005). Nanoscale resolution in the focal plane of an optical microscope. *Physical review letters*, 94(14):143903.

[Westphal et al., 2008] Westphal, V., Rizzoli, S. O., Lauterbach, M. A., Kamin, D., Jahn, R., and Hell, S. W. (2008). Video-rate far-field optical nanoscopy dissects synaptic vesicle movement. *Science*, 320(5873):246–249.

[Wildanger et al., 2009] Wildanger, D., Medda, R., Kastrup, L., and Hell, S. (2009). A compact sted microscope providing 3d nanoscale resolution. *Journal of microscopy*, 236(1):35–43.

[Wildanger et al., 2008] Wildanger, D., Rittweger, E., Kastrup, L., and Hell, S. W. (2008). Sted microscopy with a supercontinuum laser source. *Optics express*, 16(13):9614–9621.

[Willig et al., 2007] Willig, K. I., Harke, B., Medda, R., and Hell, S. W. (2007). Sted microscopy with continuous wave beams. *Nature methods*, 4(11):915–918.

[Witte et al., 2008] Witte, H., Neukirchen, D., and Bradke, F. (2008). Microtubule stabilization specifies initial neuronal polarization. *The Journal of cell biology*, 180(3):619–632.

[Wojnacki, 2012] Wojnacki, J. (2012). *Dinámica espacial de la actividad de Rho GTPasas durante el establecimeinto de la polaridad neuronal*. PhD thesis, Universidad Nacional de Córdoba.

[Wojnacki et al., 2014] Wojnacki, J., Quassollo, G., Marzolo, M.-P., and Cáceres, A. (2014). Rho gtpases at the crossroad of signaling networks in mammals: impact of rho-gtpases on microtubule organization and dynamics. *Small GTPases*, 5(1):e28430.

[Wurm et al., 2012] Wurm, C. A., Kolmakov, K., Göttfert, F., Ta, H., Bossi, M., Schill, H., Berning, S., Jakobs, S., Donnert, G., Belov, V. N., et al. (2012). Novel red fluorophores with superior performance in sted microscopy. *Optical Nanoscopy*, 1(1):1.

[Xu et al., 2013] Xu, K., Zhong, G., and Zhuang, X. (2013). Actin, spectrin, and associated proteins form a periodic cytoskeletal structure in axons. *Science*, 339(6118):452–456.

[Zernike, 1935] Zernike, F. (1935). Das phasenkontrastverfahren bei der mikroskopischen beobachtung. *Z. Tech. Phys*, 16:454–457.

[Zhong et al., 2014] Zhong, G., He, J., Zhou, R., Lorenzo, D., Babcock, H. P., Bennett, V., and Zhuang, X. (2014). Developmental mechanism of the periodic membrane skeleton in axons. *Elife*, 3:e04581.

Martín Diego Bordenave
Noviembre de 2016