

## MOLÉCULAS PEQUEÑAS COMO MATERIALES FLUORESCENTES EN BIOIMAGEN POR MICROSCOPIA DE ABSORCIÓN DE DOS FOTONES

Mariana Flores-Jarillo, Alejandro Álvarez-Hernández

Área Académica de Química, UAEH, Mineral de la Reforma, Hidalgo  
alvarez@uaeh.edu.mx

### RESUMEN

Cuando la luz interactúa con la materia, una molécula puede absorber fotones para generar un estado electrónico excitado que, al desactivarse, emite luz en un proceso llamado fluorescencia. Existen moléculas que mediante la acción de un láser, que concentra la luz en espacio y tiempo, pueden absorber simultáneamente dos fotones de luz infrarroja para acceder a un estado excitado que genera fotones de emisión de mayor energía (luz visible) que la luz empleada en la excitación. Además, el proceso es muy localizado lo cual permite que la bioimagen por microscopía óptica de fluorescencia de dos fotones tenga alta resolución, penetre profundamente en los tejidos y cause menor daño en las células y tejidos de estudio comparada a la fluorescencia por absorción de un solo fotón. La técnica usa microscopios de fluorescencia especializados que cuentan con un láser de luz infrarroja (700-1000 nm) para irradiar la muestra y existen fluoróforos comerciales con los cuales se ha elaborado una amplia variedad de imágenes celulares para observar y detectar organelos celulares, ADN, enzimas, iones metálicos y moléculas reactivas en células [1]. Sin embargo, aún se requieren moléculas de absorción de dos fotones mucho más eficientes que las comerciales y que sean altamente selectivas. Por tanto, es necesario diseñar y obtener moléculas con mayor rendimiento cuántico de fluorescencia, mayor sección cruzada de absorción multifotónica, fotoestabilidad, apreciable solubilidad en agua, alta especificidad hacia el analito objetivo y baja citotoxicidad. El presente trabajo de **divulgación** ilustra los avances y retos en el desarrollo de materiales para microscopía óptica por absorción de dos fotones basados en el análisis de la literatura científica publicada hasta la fecha.

**Palabras Clave:** fluorescencia, absorción multifotón, microscopía, imagen celular, investigación biomédica.

### ABSTRACT

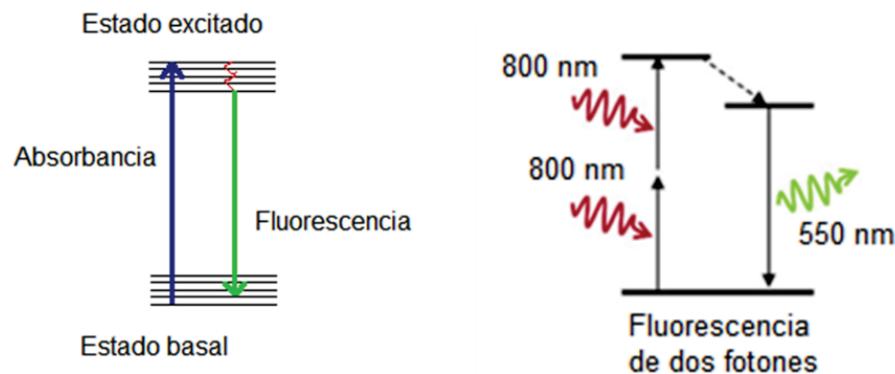
Upon irradiation with light, molecules can absorb photons to reach an electronic excited state, among several paths to go back to their ground state, molecules can emit light in a process called fluorescence. There are molecules that can simultaneously absorb two low energy photons from an infrared laser beam and combine their energies to access an electronic excited state that can emit

photons of higher energy. This process has led to multiphoton fluorescence microscopy which is strongly dependent of the intensity of light and thus can create high resolution images, has deeper penetration and causes less damage to the cells and tissues compared to one-photon fluorescence microscopy. The technique is well established and uses fluorescence microscopes equipped with an infrared laser (700-1000 nm) and specialized commercial fluorophores and has been used to develop a wide variety of cellular imaging of organelles, DNA, enzymes, metal ions and reactive molecules [1]. However, there is still a need to obtain molecules that show higher fluorescence quantum yield, higher multiphoton absorption cross section, photostability, appreciable water solubility, high specificity towards the target analyte and low cytotoxicity. This work aims to show the progress and challenges in the development of materials for two-photon microscopy based on analysis of the scientific literature published to the date.

**Keywords:** fluorescence, multiphoton absorption, microscopy, cell imaging, biomedical research.

## 1. INTRODUCCIÓN

La microscopía óptica se basa en el fenómeno de absorción y emisión de luz para generar contraste y obtener imagen celular y de tejidos. Tradicionalmente, un fluoróforo absorbe luz y excita sus electrones, luego emite fotones de menor energía que la absorbida, debido a la competencia con otros mecanismos de desactivación como la generación de calor. Sin embargo, algunas moléculas expuestas a la intensa luz de un láser pueden absorber simultáneamente más de un fotón en el proceso de excitación electrónica; en este caso los fotones emitidos son de mayor energía que la luz empleada en la excitación.[1] (Figura 1).



**Figura 1.** Comparación gráfica de los procesos de absorción de uno y dos fotones.

Los materiales que absorben multifotones son de gran importancia en la microscopía de fluorescencia de dos fotones. Esta técnica ofrece ventajas respecto a la microscopía de fluorescencia de un fotón que emplea los materiales tradicionales que absorben un solo fotón. (Tabla 1)

**Tabla 1.** Comparación de la microscopía óptica que emplea uno y dos fotones en el proceso de excitación electrónica.

Microscopía de un fotón	Microscopía de dos fotones
Moléculas absorben un fotón de luz UV-Vis (350-550 nm de longitud de onda, $\lambda$ )	Moléculas absorben simultáneamente fotones de luz infrarroja
Se limita a imagen celular. No es útil en imágenes de tejido profundo (< 100 $\mu\text{m}$ )	Imagen celular y de tejidos. Un fotón de IR penetra más profundamente
Menor resolución debido a la fluorescencia de moléculas intrínsecas: dinucleótido flavina-adenina y nicotinamida-adenina	Mayor resolución espacial
El tejido es dañado por la luz UV-Vis	Permite mayor tiempo de observación, menor daño por la luz IR, una excitación más confinada y con luz menos energética.

## 2. OBJETIVO

El presente trabajo tiene como objetivo divulgar el estado del arte en materia de microscopía óptica por absorción de dos fotones mediante una compilación de la literatura reciente.

## 3. DISCUSIÓN

Una molécula con fluorescencia de dos fotones que se use como sonda para obtener imagen de sistemas biológicos requiere poseer varias características: ser muy brillante; apreciable solubilidad en agua para teñir células y tejidos ( $\mu\text{M}$ ); alta especificidad para el analito objetivo y alta fotoestabilidad [1]. Las moléculas que presentan fluorescencia tienen enlaces múltiples, son rígidas y presentan deslocalización de electrones. La brillantez que pueda obtenerse de una sonda depende del rendimiento cuántico de fluorescencia ( $\phi$ ) y la sección cruzada de absorción de dos fotones ( $\delta$ ) que pueda tener la molécula. El rendimiento cuántico indica la eficiencia de la molécula en transformar la energía absorbida en emisión de fluorescencia y por tanto el valor ideal es de 1 (100%). La sección cruzada es la capacidad de la molécula para absorber multifotones, se mide en unidades GM, y solo se presenta si la molécula es capaz de deslocalizar los electrones en un estado excitado altamente polarizado, por tanto la estructura de las moléculas debe contener grupos polarizables.

Las moléculas de absorción de dos fotones utilizadas a la fecha se pueden clasificar de la siguiente manera (Figura 2) [1].

### 1. Moléculas trazadoras.

Una molécula trazadora se forma al unir un fluoróforo a un organelo, proteína o anticuerpo para que estos puedan ser detectados por fluorescencia.

### 2. Sondas Apagado-Encendido

Se componen por fluoróforos específicamente diseñados para ser el receptor de un analito que al unirse provocan el encendido o un cambio evidente de intensidad en la fluorescencia.

3. Sondas de Apagado-Encendido con referencia interna.

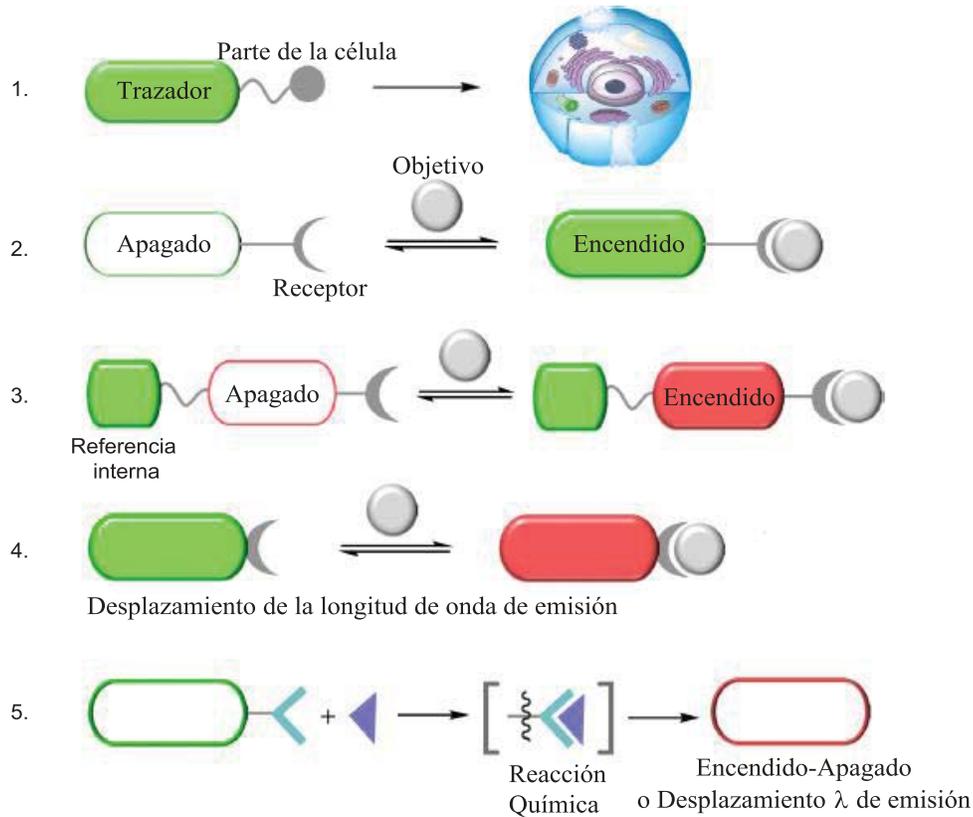
Se compone de una sonda de apagado-encendido como la que se describió anteriormente, a la que se ha unido además una referencia interna que emite a menor longitud de onda que la molécula receptora del analito. La molécula receptora responde a la concentración del analito mientras que la referencia permanece constante, lo que permite que la concentración del ión sea cuantitativamente estimada al calcular el radio: (Emisión de la molécula receptora/ Emisión de la referencia interna).

4. Sondas radiométricas.

Son moléculas que responden con un desplazamiento del espectro de emisión al rojo o al azul durante la unión con un analito.

5. Sondas basadas en reacciones químicas.

Dan alta selectividad, sin embargo, conllevan reacciones irreversibles por lo que pueden usarse sólo de forma cualitativa.



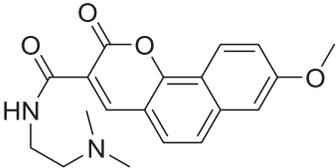
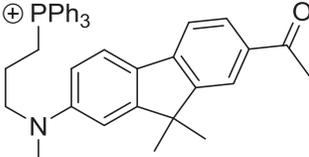
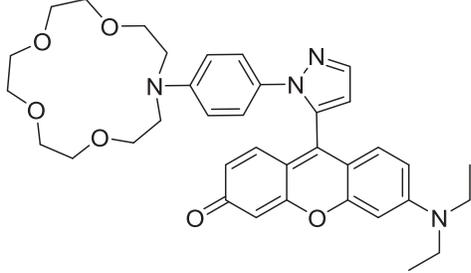
**Figura 2.** Tipos de sondas de absorción de dos fotones. Editado de referencia 1

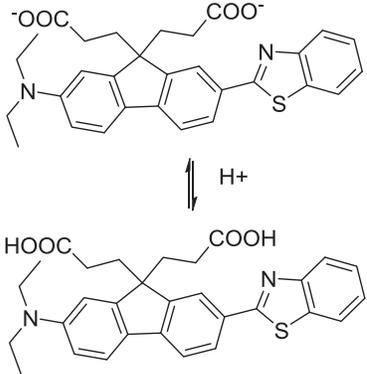
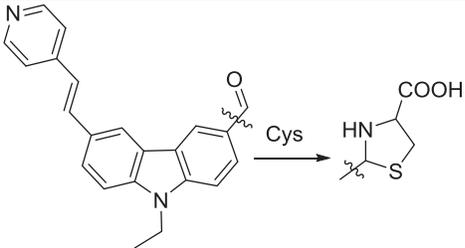
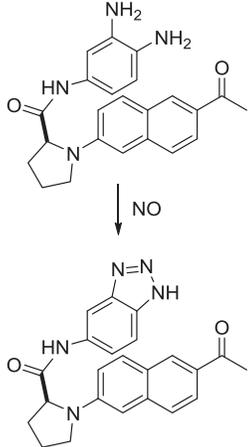
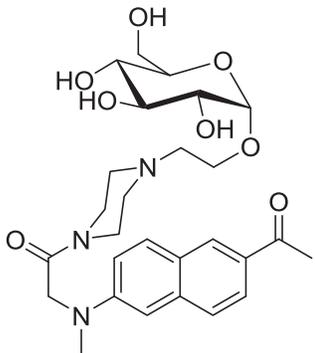
Para que el proceso de absorción de dos fotones sea óptimo para una aplicación en sistemas biológicos se requiere que las moléculas absorban fotones en la región del infrarrojo pues esta irradiación ofrece daños mínimos a las células comparada con la radiación UV y penetra los tejidos

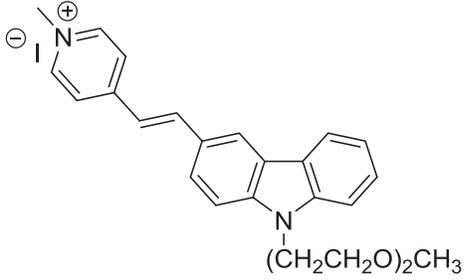
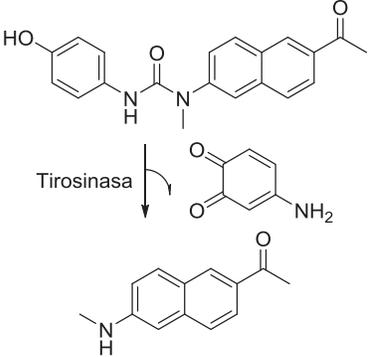
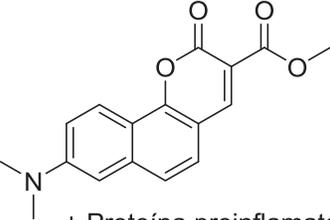
mucho mejor que la luz visible. A la fecha se han empleado en microscopía de absorción de dos fotones las moléculas de absorción de un solo fotón que presenten también la absorción de dos fotones. Sin embargo, estas moléculas tienen secciones cruzadas menores a 50 GM y la brillantez de fluorescencia es baja lo que ha limitado su uso. Aún con esta limitación el número de analitos detectados por esta técnica es muy amplio e interesante (Tabla 2).

Algunas moléculas desarrolladas recientemente tienen valores de sección cruzada cientos de veces mayor a las sondas comerciales y a las moléculas usadas en estudios pioneros. Puede deducirse fácilmente que el desarrollo de nuevas moléculas especialmente diseñadas para absorber dos fotones que presenten alta intensidad de fluorescencia y selectividad celular permitirá expandir la aplicación a imagen biomédica y coadyuvar al entendimiento y resolución de una amplia variedad de problemas biológicos.

**Tabla 2.** Uso de sondas de absorción de dos fotones en la identificación de diversos analitos. Construida según datos tomados de la Referencia [1].

Analito	Función biológica	Estrategia	Ejemplo
Lisosomas	Son organelos ácidos. Activación de funciones enzimáticas. Degradación de proteínas	Usar un grupo amino unido al fluoróforo como sitio de protonación para activar o modificar la fluorescencia	
Mitocondria	Suministra energía a las células. Es sitio primario de consumo de oxígeno y la mayor fuente de especies de oxígeno reactivo.	La mitocondria tiene un potencial de membrana negativo, se han empleado especies catiónicas como iones trifenil fosfonio o piridinio	
Iones Metálicos (sodio, magnesio, calcio, zinc)	Regulan el nivel de electrolitos, Metaloenzimas. Transcripción de genes. Su alteración puede causar desordenes como Alzheimer y Parkinson	Se emplean grupos funcionales capaces de coordinar al metal como éteres corona y grupos amino	

<p>pH</p>	<p>Procesos metabólicos como señalización, endocitosis, apoptosis y proliferación</p>	<p>Grupos susceptibles al cambio de pH como aminas y bencimidazoles</p>	
<p>Tioles</p>	<p>Presentes en aminoácidos y péptidos. Homeostasis redox Mantienen estructuras de orden superior de proteínas</p>	<p>El fluoróforo contiene grupos funcionales capaces de reaccionar con los tioles o H<sub>2</sub>S presentes en el organismo</p>	
<p>Especies reactivas de O y N</p>	<p>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y O<sub>2</sub><sup>-</sup> permiten señalización y defensa en las células El NO interviene en la actividad sináptica y en el sistema inmune</p>	<p>El fluoróforo contiene grupos funcionales capaces de reaccionar con las especies reactivas de O y N</p>	
<p>Glucosa y ATP</p>	<p>Fuente primaria de Energía para el crecimiento y función de las células. El consumo de glucosa es más rápido en células de alto crecimiento (cancerosas) La oxidación de glucosa produce ATP.</p>	<p>Trazadores que incorporan glucosa. Moléculas que coordinan ATP a través de los grupos fosfato presentes en la molécula.</p>	

ADN, ARN	Portan información genética necesaria para la producción de proteínas.	Utilizan la interacción electrostática entre grupos catiónicos en la sonda y grupos electronegativos en el ADN (fosfato)	
Enzimas	Catalizadores de las reacciones bioquímicas	Incorporar un grupo susceptible a la acción de la enzima específica	
Proteínas	Funciones fisiológicas, estructurales, inmunitarias	Unir la proteína a un fluoróforo de forma covalente o no covalente	 <p>+ Proteína proinflamatoria P43</p>

Además, se han generado aplicaciones médicas [1], que han llegado incluso a pruebas clínicas. Algunas de estas aplicaciones y su imagen en microscopía se muestran como ejemplo en las Figura 3 y 4.

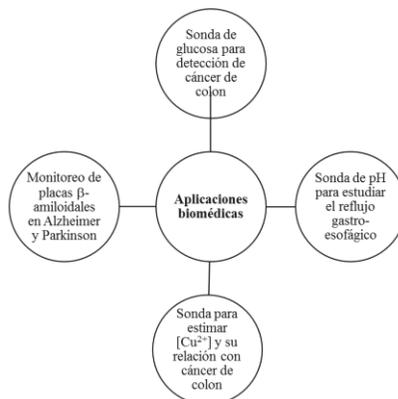
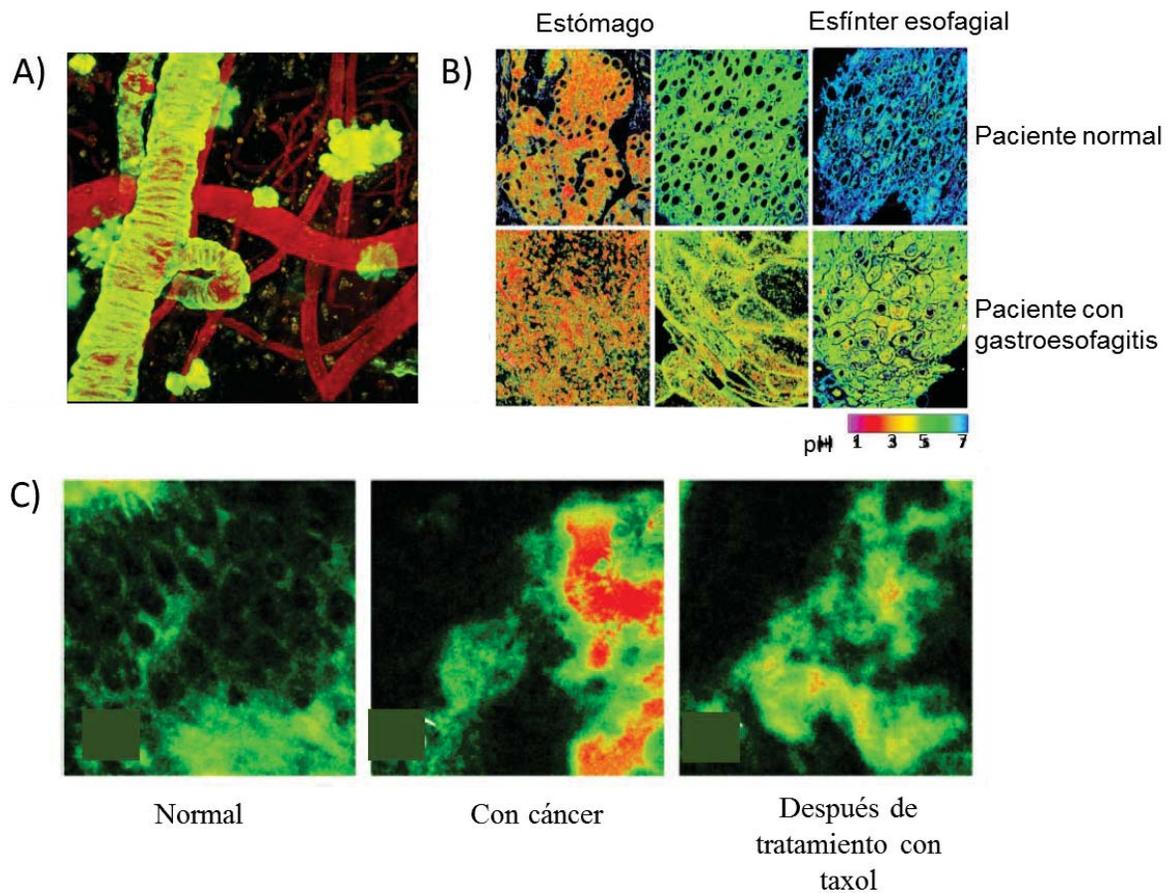


Figura 3. Aplicaciones biomédicas de microscopía con sondas de absorción de dos fotones



**Figura 4.** Aplicaciones médicas de sondas de absorción de dos fotones [1 y 2]

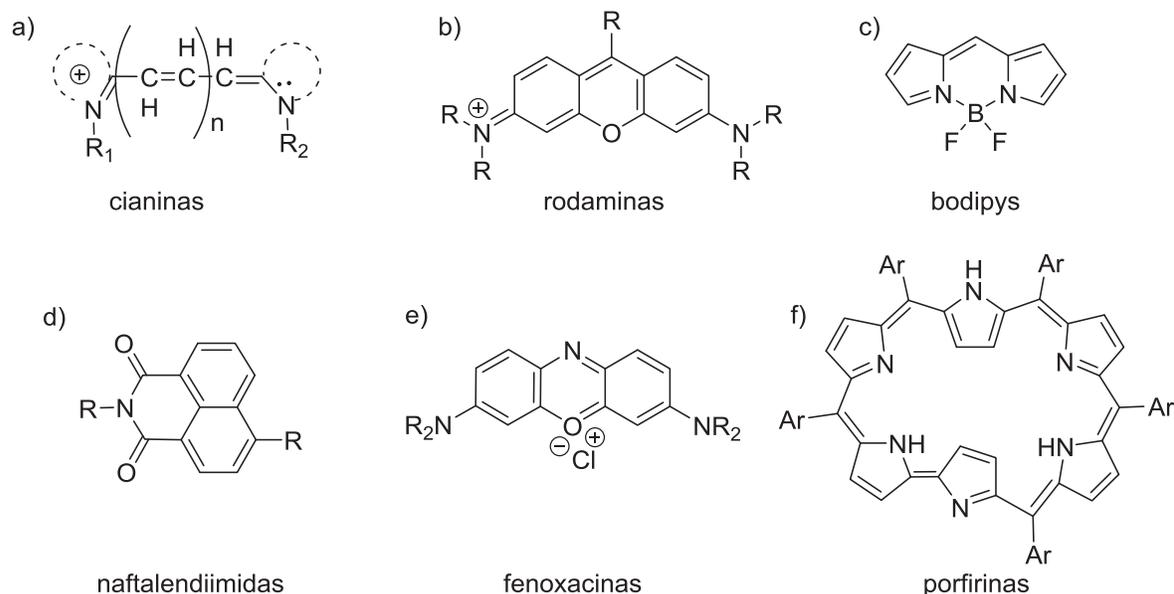
- A) La enfermedad de Alzheimer y la de Parkinson son desórdenes neurodegenerativos. La formación de placas beta-amiloidales ( $A\beta$ ) en el cerebro está directamente implicada a la patogénesis. Se han desarrollado sondas para observar las placas en el cerebro de un ratón vivo.
- B) El reflujo gastroesofágico es un síntoma crónico causado por reflujo del ácido estomacal y que está asociado a los cambios de pH en el esófago. Se ha desarrollado una sonda radiométrica capaz de un marcado cambio del color de emisión con respecto a la variación del pH. La gráfica muestra tejidos y pH iguales en el estómago de individuos sanos y enfermos. Sin embargo, en aquellos con gastro-esofagitis el valor de pH en el esófago fue 3.1 y en el esfínter esofagial fue 5.1 mientras que los valores en individuos sanos fueron 4.7 y 7.2, respectivamente.
- C) La primera sonda evaluada para aplicaciones clínicas es una sonda trazadora de glucosa que se emplea en tejido de colon humano. La absorción de la sonda resultó ser más rápida en células cancerosas con respecto a células normales y decrece dramáticamente después de tratamiento con Taxol®. Es posible diagnosticar tejido canceroso y buscar la droga más eficiente al

D) comparar las velocidades de absorción de la sonda en tejidos cancerosos tratados con varios medicamentos.

Las sondas de dos fotones han sido evaluadas para estimar la concentración de cobre [Cu<sup>2+</sup>] en tejidos de colon humano a 90-160 μm de profundidad, lo que corresponde a las capas de mucosa que tienen importancia clínica durante la formación de pólipos malignos. Los tejidos cancerosos presentan una concentración de Cu<sup>2+</sup> mucho más alta que los tejidos normales. Estos resultados sugieren que la sonda puede ser utilizada como una herramienta clínica para diagnosticar cáncer de colon.

Normal + EDTA	Normal	Pólipos	Cáncer	
0.0	8.2	13.0	22.0	μM [Cu <sup>2+</sup> ]

En la actualidad existen esfuerzos por desarrollar sondas que puedan absorber en la región del infrarrojo del espectro electromagnético. Estas moléculas pueden clasificarse según su estructura en cianinas, análogos de rodamina, bodipys, escuaraínas, naftalendiimidias, fenoxacinas y porfirinas (Figura 5) [3].



**Figura 5.** Familias de moléculas que pueden ser capaces de absorber luz de la longitud de onda del infrarrojo cercano. Tomado de la referencia [3].

#### 4. CONCLUSIONES

La microscopía de fluorescencia de dos fotones se ha desarrollado usando moléculas que fueron originalmente diseñadas para absorber un fotón en el ultravioleta. Aunque estas moléculas han sido muy útiles en la obtención de bioimagen existen grandes oportunidades para desarrollar moléculas orgánicas especialmente diseñadas para la absorción de dos fotones de luz infrarroja que se puedan usar como sondas altamente específicas de procesos biológicos dentro de células vivas para obtener bioimagen en tiempo real que ayude a expandir el entendimiento de la función celular y los procesos patológicos.

#### AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el financiamiento CONACyT 221360 y la beca doctoral de MFJ.

#### BIBLIOGRAFÍA.

1. KIM, H. M. and CHO B. R. Small-Molecule Two-Photon Probes for Bioimaging Applications. *Chem. Rev.* 2015, 115, 5014-5055.
2. <http://sackler.tufts.edu/Faculty-and-Research/Faculty-Research-Pages/Philip-Haydon>. Último acceso 14 agosto 2015.
3. YUAN, L.; LIN, W.; ZHENG, K.; HE, L.; HUANG, W. Far-red to near infrared analyte-responsive fluorescent probes based on organic fluorophore platforms for fluorescence imaging. *Chem. Soc. Rev.* 2013, 42, 622-661.