

Manipulación láser de células, orgánulos y biomoléculas

J. Ricardo Arias-González

Las relaciones entre la Física y la Biología molecular se han reducido tradicionalmente al transvase de técnicas experimentales que permitieran reconstruir, visualizar y entender estructuras moleculares. Con las recientes técnicas de moléculas individuales –microscopía atómica de fuerzas, pinzas ópticas y magnéticas– la Física ha encontrado en la célula un laboratorio de complejos fenómenos físicos a nivel molecular. Desde este punto de vista, muchas proteínas son verdaderos motores moleculares de dimensiones y precisión que están hoy lejos del alcance de la ingeniería.

Las pinzas ópticas son uno de los instrumentos más útiles en la creciente experimentación en Biofísica. Los estudios con láser de Ashkin a principios de los 70 demostraron que las fuerzas creadas por la presión de radiación tienen capacidad para atrapar y manipular partículas en el rango del nanómetro y micrómetro. La magnitud de estas fuerzas, en el orden del pico-Newton, las hace especialmente convenientes en Biofísica Molecular y Celular, aunque su rango de aplicaciones encuentra igualmente interés en otras ramas de la Nanotecnología.

La fuerza, el torque, la tensión y la deformación o el trabajo son ejemplos de acciones mecánicas y elásticas íntimamente unidas a las reacciones químicas en la célula. Las pinzas ópticas representan una metodología basada en el láser que permite manipular y monitorizar en tiempo real moléculas y orgánulos individuales mientras realizan su función biológica o para medir sus propiedades físicas. En este artículo introducimos el atrapamiento óptico y su aplicación en la construcción de la mencionada técnica experimental. A continuación se describen los principios operacionales y su potencial en el estudio de procesos biológicos, haciendo especial referencia a la importancia de las fluctuaciones en Biología. Por último se ilustran aplicaciones explicando las configuraciones experimentales y recientes progresos en biofísica molecular y celular.

1. Introducción

No pasó mucho tiempo desde la invención del láser hasta que se logró aplicarlo a la investigación física de la vida. No hace mucho tiempo en términos de la evolución de la Física como ciencia aunque sí desde el punto de vista de la Biología, en donde las explicaciones basadas en primeros principios físicos apenas han empezado a emerger [1]. La Física es una ciencia prácticamente presocrática mientras que la Biología molecular explotó a mediados del siglo XX. Casi todas las técnicas avanzadas de estudio de células y macromoléculas en Biología han venido precedidas por una tecnología desarrollada por físicos, investigadores que siendo expertos en un campo fundamental de la Física y demostrando un profundo conocimiento de los procesos biológicos y bioquímicos, han generado instrumentos que les permitiesen curiosear en ese mundo tan específico, desde un punto de vista universal, pero tan importante, desde un punto de vista humano, que es la vida. Buena parte de estas tecnologías, además, vinieron precedidas particularmente del estudio de la Física de ondas. Las más conocidas rinden tributo a la Física de la luz, u óptica, puesto que poder ver con nuestros propios ojos la dinámica o al menos instantáneas de un proceso dinámico siempre ha proporcionado una información no solamente deseable, sino también en muchos casos principal. Hoy somos capaces de ver células con microscopios ópticos mientras están vivas y a

la vez que experimentamos sobre ellas. Hoy podemos resolver virus con microscopía electrónica y estructura de moléculas con rayos X. Habida cuenta de la cantidad de energía que transportan los electrones y las ondas electromagnéticas de longitud de onda por debajo de la del visible no existe todavía técnica experimental que nos permita ver macromoléculas en movimiento, esto es, dinámica de nanomotores biológicos. Podemos ver la estructura del ADN o de una polimerasa, por ejemplo, con resolución atómica mediante rayos X pero de manera estática y en unas condiciones en las que han perdido totalmente su capacidad funcional.

Aunque no nos ha sido posible ver la dinámica molecular –estocástica, por cierto– que hay en el interior de nuestras células sí que es hoy posible medirla *in vitro*, medir una terna de magnitudes independientes, fuerza, desplazamiento y tiempo [2], que nos permite reconstruir la mecánica, la termodinámica y la cinética química de las reacciones mecano-químicas que realizan las proteínas continuamente y fuera de equilibrio en nuestras células para que podamos considerarnos seres vivos. Hoy somos capaces de medir cómo una proteína genera trabajo mecánico consumiendo energía química, típicamente de la hidrólisis de la molécula de ATP, y de las fluctuaciones térmicas del entorno. Hoy somos capaces de medir las propiedades elásticas de polímeros tan determinantes como el ADN, un disco duro en el interior de nuestras células con un diseño nanotecnológico que la evolu-

ción ha desarrollado a lo largo de millones de años. Un disco duro cuyas propiedades elásticas son importantes de conocer si queremos entender, por ejemplo, cómo es el proceso de lectura, copia (replicación), compresión (empaquetamiento) y otros procesos físicos que ocurren en la nanoescala y que son necesarios, de nuevo, para que tengamos realidad como seres vivos. La escala de fuerzas a la que ocurren estos procesos es la del pico-Newton (pN) y los desplazamientos de nanómetros (nm). El rango de tiempos es amplio pero la observación en el milisegundo es una precisión que nos está proporcionando hoy una información muy amplia, como veremos en este artículo.

2. Atrapamiento óptico

Construir un dinamómetro en el pN no fue tarea tecnológicamente sencilla hasta hace unos 25 años, aunque fue sabido con siglos de antelación, desde la temprana historia de la óptica, que la luz posee momento lineal y angular y que, por lo tanto, puede ejercer fuerza sobre los objetos físicos. Sin embargo, se consideraba que no tenía la magnitud suficiente como para afectar a los usos prácticos de aquellos tiempos. Con el advenimiento del láser, Ashkin mostró en 1970 que se puede usar la presión de radiación de haces focalizados para afectar de modo ostensible la dinámica de partículas micro y nano-métricas. Sus experimentos iniciales fueron de aceleración/deceleración, levitación y atrapamiento de partículas.

Las aplicaciones en Física Atómica revolucionaron las técnicas de enfriamiento, consiguiéndose las temperaturas más bajas del universo. En esta línea de trabajo, se obtuvieron avances en la condensación de Bose-Einstein y más recientemente en láseres de átomos. Asimismo, se han realizado avances prácticos en relojes atómicos y en la medida de fuerzas gravitatorias. En Nanotecnología existe un amplio abanico de aplicaciones. En Biología se ha conseguido desde la manipulación de células vivas, hasta la medida de fuerzas mecánicas y propiedades elásticas de células y biomoléculas. En particular, en el estudio de motores moleculares y en el plegamiento de proteínas.

Partiendo de las ecuaciones de Maxwell, que son las que gobiernan la luz, se puede calcular la fuerza generada sobre partículas pequeñas de un modo analítico y sencillo y lo vamos a estudiar en la siguiente sección. Previamente y a modo descriptivo, vamos a pensar en un láser como si se tratase de un cañón de luz que dispara fotones en trayectorias rectilíneas. Estos fotones son como balas que atraviesan los objetos físicos y que al hacerlo provocan una serie de efectos que pretendemos analizar. El efecto total de estos fotones al interaccionar con un objeto es lo que se llama *presión de radiación*, y se puede descomponer, para objetos dieléctricos, en dos efectos principales: *fuerza de scattering*, que es el empuje de los fotones al “chocar” con el objeto, y *fuerza de gradiente*, que es la fuerza responsable del atrapamiento. Para levitar partículas, por ejemplo, sólo hace falta fuerza de scattering; podemos pensar en un láser a la manera de géiser, apuntando en dirección opuesta a la fuerza gravitatoria y levitando a las partículas en contra de su peso por el flujo vertical de fotones.

3. Fuerza sobre una partícula en un haz electromagnético armónico

3.1. Partícula pequeña. Aproximación dipolar

Una partícula es pequeña cuando es mucho menor que la longitud de onda de la radiación que se le aplica. Normalmente, en pinzas ópticas se trabaja con longitudes de onda que van desde el visible hasta el infrarrojo, es decir, desde 300 nm a unos 1100 nm. Una partícula es entonces pequeña (también llamadas partículas tipo *Rayleigh* o en *aproximación dipolar*) cuando tiene un diámetro característico de menos de 50 nm. Las microesferas que se atrapan con pinzas ópticas tienen típicamente un diámetro del orden de 1 μm , lo cual está fuera de esta aproximación. Sin embargo, en esos casos la descripción sigue siendo cualitativamente válida y, sobre todo, permite entender la física del problema.

Sea una partícula pequeña, es decir, con radio $a \ll \lambda$, neutra y polarizable eléctricamente ($\epsilon \neq 1$) pero no magnéticamente ($\mu = 1$). En presencia de un campo electromagnético, la fuerza de Lorentz queda [3]:

$$\vec{f} = (\vec{\mathcal{P}} \cdot \nabla) \vec{\mathcal{E}} + \frac{1}{c} \frac{\partial \vec{\mathcal{P}}}{\partial t} \times \vec{\mathcal{B}} \quad (1)$$

donde $\vec{\mathcal{P}}$ es el momento dipolar inducido y $\vec{\mathcal{E}}, \vec{\mathcal{B}}$ son los vectores eléctrico y magnético, respectivamente (unidades del sistema de Gauss). A frecuencias ópticas, usadas en la mayoría de los experimentos, el promedio temporal de la fuerza es la magnitud observable [4]. Sea el campo electromagnético armónico, es decir, $\vec{\mathcal{E}}(\mathbf{r}, t) = \Re\{E(\mathbf{r}) \exp(-i\omega t)\}$, $\vec{\mathcal{B}}(\mathbf{r}, t) = \Re\{B(\mathbf{r}) \exp(-i\omega t)\}$, $\vec{\mathcal{P}}(\mathbf{r}, t) = \Re\{p(\mathbf{r}) \exp(-i\omega t)\}$; E, B , y p son, en este formalismo, funciones complejas de la posición y el espacio, y $\Re$ denota la parte real. Así, la componente i -ésima de la fuerza de Lorentz promediada en el tiempo en un intervalo $T \gg 2\pi/\omega$ es [3]:

$$\langle f_i(\mathbf{r}, t) \rangle = F_i(\mathbf{r}) = \frac{1}{2} \Re\left\{ \alpha E_j(\mathbf{r}) \frac{\partial E_j^*(\mathbf{r})}{\partial x_i} \right\} \quad (2)$$

La ec. (2) constituye la expresión del promedio temporal de la fuerza $\langle \vec{f}(t) \rangle \equiv \mathbf{F} = (F_1, F_2, F_3)$ sobre una partícula pequeña en un campo electromagnético armónico arbitrario. α es la polarizabilidad de la partícula.

El campo óptico puede expresarse en su forma paraxial, es decir, un haz u onda plana propagante o evanescente con una dirección principal de propagación a lo largo de $\mathbf{k}$. De esta manera, el vector eléctrico se puede describir por $E(\mathbf{r}) = E_0(\mathbf{r}) \exp(i\mathbf{k} \cdot \mathbf{r})$. Sustituyendo en la ec. (2), se obtiene [3]:

$$\mathbf{F} = \frac{1}{4} \Re\{\alpha\} \nabla |E_0|^2 + \frac{1}{2} \Im\{\alpha\} |E_0|^2 \mathbf{k} - \frac{1}{2} \Im\{\alpha\} \Im\{E_0 \cdot \nabla E_0^*\} \quad (3)$$

$\Im m$ denota la parte imaginaria. El primer término es la *fuerza de gradiente* que actúa sobre la partícula, pues como se ve, este término es proporcional al gradiente de la intensidad de la onda, $\nabla |E_0|^2$. El segundo término representa la contribución de la presión de radiación a la *fuerza de scattering*. Este término es proporcional a la intensidad de la onda, $|E_0|^2$, y lleva la dirección de la propagación, $\mathbf{k}$. El último término es solamente cero cuando α o E_0 es real. Este es el caso de una onda plana propagante o evanescente pero no de un haz en general. Este último término puede inducir rotación por transferencia de momento angular sobre la partícula, como se ha clarificado recientemente [5]. Si la partícula presenta respuesta magnética, el análisis es más complejo [6]. La física derivada del análisis del tercer término de la ec. (3) o de la presencia de partículas magneto-dieléctricas no ha sido de momento explotada en la manipulación de biomoléculas por lo que, por brevedad, no la detallaremos aquí.

3.2. Partícula grande. Aproximación de óptica de rayos

Las partículas de dimensión mucho mayor que la longitud de onda pueden tratarse mediante óptica de rayos. Aquí no vamos a usar un tratamiento matemático para describirlo sino que simplemente vamos a emplear argumentos cualitativos para entender la aparición de las componentes de la presión de radiación antes deducidas rigurosamente para partículas dipolares. La figura 1(a) muestra cómo las componentes de scattering y de gradiente de la fuerza provienen ambas de la presión de radiación en una partícula dieléctrica. Considérese un par de rayos “a” y “b” que llegan a la partícula de forma simétrica respecto al centro de la misma. Si ignoramos el efecto de reflexiones secundarias, la mayor parte de los rayos se refractan a través de la partícula, dando lugar a las fuerzas $\vec{F}_a$ y $\vec{F}_b$ en la dirección del cambio de momento. La fuerza $\vec{F}_b$ es mayor que la $\vec{F}_a$ ya que la intensidad del rayo “b” es mayor que la del “a”. Sumando el efecto de todos los pares de rayos simétricos que llegan a la partícula, se ve que la fuerza neta puede ser resuelta en términos de dos componentes, $\vec{F}_{scat}$, llamada *fuerza de scattering*, que apunta en la dirección y sentido de la luz incidente, y $\vec{F}_{grad}$, *fuerza de gradiente*, que proviene del gradiente de la intensidad de luz y lleva la dirección transversal a la dirección de propagación del haz, apuntando hacia las zonas de mayor intensidad de campo. Para una partícula en el eje del haz gaussiano TEM_{00} , $\vec{F}_a = \vec{F}_b$ en la dirección transversal, y no hay componente neta de gradiente. Como resultado de las fuerzas que actúan sobre la partícula, ésta quedaría centrada en el eje del haz y moviéndose en la dirección de propagación. De esta manera, hemos conseguido atrapar la partícula en la dirección transversal a la propagación del haz. Estas ideas son generalizables para partículas dieléctricas en un haz genérico: la fuerza de scattering empuja a las partículas en la dirección de propagación del haz, y la fuerza de gradiente las hace tender hacia las posiciones de máxima intensidad de luz (en otras palabras, las partículas dieléctricas tienden a “escalar” el gradiente de energía electromagnética).

Si queremos producir un atrapamiento en las tres direcciones del espacio, hemos de jugar con la fuerza de gradiente. Para

ello, podemos hacer converger los rayos hacia un centro común usando una lente, según la figura 1(b). En estas condiciones, el foco de la lente se convierte en el máximo de intensidad. Si el gradiente es lo suficientemente “empinado”, lo cual se puede conseguir con una apertura numérica alta, la fuerza de gradiente será lo suficientemente grande como para vencer el empuje radiativo que produce la fuerza de scattering, y la partícula quedará finalmente atrapada también en la dirección de propagación.

Es importante notar que los argumentos empleados en esta sección son válidos para partículas dieléctricas (transparentes). Para partículas metálicas el comportamiento es más complejo. Los experimentos realizados hasta la fecha en Biofísica se han realizado con partículas dieléctricas (poliestireno, típicamente). Además, la mayor parte de las células, orgánulos y biomoléculas no presentan absorción ni respuesta magnética por lo que, por brevedad, no vamos a extender los argumentos de arriba a partículas más complejas. Por otro lado conviene señalar que jugando con el perfil geométrico de la onda se pueden diseñar trampas más sofisticadas a las de la figura 1(b) que incluso puedan hacer orbitar y rotar a la partícula atrapada. Por ejemplo, el modo TEM_{11} se usa para atrapar partículas metálicas que por sus propiedades ópticas escapan de las trampas ópticas convencionales como la de la figura 1(b).

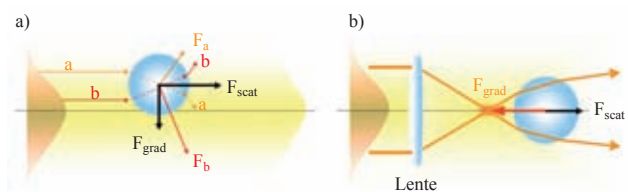


Fig.1. Fuerzas ópticas sobre una esfera dieléctrica. (a) Origen de las componentes de scattering, $\vec{F}_{scat}$, y de gradiente, $\vec{F}_{grad}$, para una partícula dieléctrica y de índice de refracción mayor que el del medio que le rodea, bajo la acción de un haz láser de perfil gaussiano (modo TEM_{00}). (b) Fuerza de gradiente en la dirección de propagación del mismo haz tras focalizarlo. El equilibrio entre la fuerza de scattering y la de gradiente en el eje genera ahora estabilidad también en esta dirección. Este esquema representa la forma más sencilla de generar un atrapamiento 3D enteramente óptico y dio nombre a la técnica “pinzas ópticas” en el año 1986 [7].

3.3. Partícula general. Tensor de tensiones de Maxwell

La dispersión de luz por partículas generales incluye scattering múltiple en la superficie y en el interior de la partícula. Estos efectos a su vez perturban la distribución del campo incidente de manera que el análisis es complejo. La resolución de las ecuaciones de Maxwell se realizó hace ya bastante tiempo de manera analítica para geometrías sencillas (esfera y cilindro) en forma de serie (*Serie de Mie* [8]), pero también se puede realizar para cualquier geometría mediante cálculo numérico [3]. Existen efectos físicos interesantes que no pueden ser descritos por las aproximaciones de las secciones anteriores como son la aparición de resonancias electromagnéticas del tipo cono-

cido como “modos de galería susurrante” y plasmones de diferentes órdenes. Estos efectos ocurren para longitudes de onda críticas y tienen una consecuencia no trivial sobre la fuerza [3]. Para haces de luz y geometrías y materiales de partícula bastante comunes, sin embargo, la fuerza puede seguir discutiéndose cualitativamente en términos de gradiente y scattering. Independientemente de cuál sea el método elegido para calcular el campo electromagnético dispersado por una partícula, la fuerza siempre puede calcularse a partir de la siguiente expresión para campos armónicos en promedio temporal:

$$\mathbf{F} = \frac{1}{8\pi} \Re \left\{ \int_{\Sigma} d^2r \left[(\epsilon \mathbf{E}(\mathbf{r}, \omega) \cdot \mathbf{n}) \mathbf{E}^*(\mathbf{r}, \omega) + (\epsilon \mathbf{H}(\mathbf{r}, \omega) \cdot \mathbf{n}) \mathbf{H}^*(\mathbf{r}, \omega) \right] - \frac{1}{2} (\epsilon |\mathbf{E}(\mathbf{r}, \omega)|^2 + \mu |\mathbf{H}(\mathbf{r}, \omega)|^2) \mathbf{n} \right\} \quad (4)$$

donde Σ es una superficie cualquiera que contiene a la partícula y $\mathbf{n}$ es el vector unitario normal a dicha superficie que apunta hacia el exterior de la misma. Hemos empleado $\mathbf{B}(\mathbf{r}) = \mu \mathbf{H}(\mathbf{r})$, $\vec{\mathcal{H}}(\mathbf{r}, t) = \Re \{ \mathbf{H}(\mathbf{r}) \exp(-i\omega t) \}$, para dar simetría a la expresión y para extender, a través de las permitividades dieléctrica, ϵ , y magnética, μ , el análisis al caso en que el cuerpo se encuentre sumergido en un fluido isótropo y homogéneo. Esta expresión está obtenida a partir de la parte espacial del tensor de energía-momento del campo electromagnético y se conoce como *tensor de tensiones de Maxwell* [3]. Es correcta independientemente del material de la partícula, tamaño o geometría.

Alternativamente se puede expresar la fuerza en función de las secciones eficaces:

$$\mathbf{F} = \frac{I_0}{c} C_{pr} \frac{\mathbf{k}_0}{k_0} \quad (5)$$

donde I_0 es la intensidad incidente y $C_{pr} = C_{ext} - \overline{\cos \theta \cdot C_{sca}}$, siendo C_{ext} y C_{sca} las secciones eficaces de extinción y scattering, respectivamente, y $\overline{\cos \theta \cdot C_{sca}}$ el promedio del ángulo de scattering [8]. Esta expresión puede ser obtenida de modo riguroso integrando la ec. (4) sobre una superficie esférica que contenga a la partícula. La ec. (5) pone en conexión la presión de radiación con las secciones eficaces de extinción y scattering por lo que hace más visible la Física de la presión de radiación. Aplicarla, sin embargo, es complicado si el campo incidente no es una onda plana o evanescente y la partícula no es esférica o cilíndrica.

Conviene justificar que sólo nos interesan los promedios temporales de las fuerzas electromagnéticas sobre un objeto puesto que a frecuencias ópticas los campos varían tan rápidamente en el tiempo, que el objeto no tiene tiempo de reaccionar a sus cambios instantáneos. Esto es especialmente verdad cuando el objeto se encuentra en un fluido (los experimentos en Biología se realizan en un tampón acuoso) de manera que la fricción impide al objeto seguir la frecuencia del láser o sus fluctuaciones rápidas en intensidad.

4. Pinzas ópticas: montaje experimental

Las pinzas ópticas son un transductor de fuerza y un manipulador. Un transductor porque permiten medir fuerzas y un manipulador porque permiten mover en el espacio una muestra y aplicarle fuerza. El microscopio atómico de fuerzas (AFM) puede realizar estas operaciones pero el rango de fuerzas en el que mide o actúa es mucho más alto (mil veces, típicamente, en el nN), por lo que es poco sensible a los experimentos con biomoléculas. Las técnicas basadas en manipulación con campos magnetostáticos o “pinzas magnéticas”, por el contrario, generan fuerzas demasiado pequeñas (típicamente por debajo de los 10 pN) y efectos residuales (no es posible generar un atrapamiento estable 3D con campos magnetostáticos a no ser que se empleen partículas diamagnéticas) por lo que tienen menor rango de aplicaciones que las técnicas basadas en el atrapamiento óptico.

La forma más sencilla de montar un instrumento de pinzas ópticas de un haz para aplicaciones en Biología es hacerlo dentro de un microscopio convencional. Para ello se necesitan una serie de elementos básicos, a saber, un objetivo de alta focalización o apertura numérica, una cámara de fluidos para las muestras, una lente condensadora y un sistema de detección de luz. El desplazamiento de la microesfera atrapada es lineal a lo largo de un amplio rango de fuerzas y, por lo tanto, la trampa óptica se puede caracterizar por una constante de recuperación, como un análogo óptico de una micropalanca mecánica. Después, a través del análisis de la distribución de luz dispersada por la microesfera, se pueden medir tanto la fuerza como el movimiento de la microesfera. Un sistema de doble haz, el cual básicamente consiste en dos haces iguales contrapropagantes y con el mismo foco, permite una reducción significativa del daño por radiación, al tiempo que mantiene un rango de fuerzas similar al de la trampa de un solo haz. En este tipo de diseño la medida de la fuerza suele implementarse a partir del principio de conservación del momento, lo cual es posible esencialmente recogiendo toda la luz saliente de la trampa [9]. Respecto a la iluminación del láser, es preferible una longitud de onda

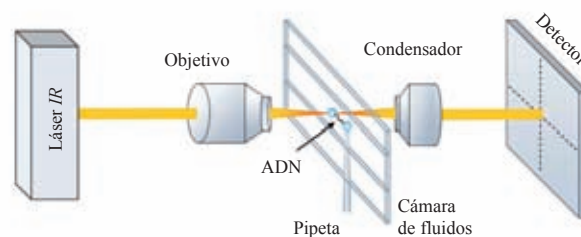


Fig.2. Elementos básicos de un instrumento de pinzas ópticas. La luz del láser (típicamente infrarroja) es focalizada por un objetivo de microscopio y recogida por una lente condensadora. La trampa óptica se genera en el interior de una cámara de fluidos que contiene las microesferas (o células) en solución. Una micropipeta insertada en la cámara se puede usar para mantener por succión una segunda microesfera. El haz dispersado a la salida es recogido y registrado en un fotodetector sensible a la posición. La figura muestra un experimento de molécula individual en el que se estira una molécula de ADN entre dos microesferas.

próxima al infrarrojo para aplicaciones biológicas, porque el agua y los especímenes biológicos exhiben una adecuada transparencia entre 780 y 1100 nm. Una potencia de salida de unos ~ 200 mW es suficiente normalmente para generar fuerzas de un centenar de pN. La luz dispersada por la muestra en la trampa es dirigida a fotodetectores sensibles a la posición, como se muestra en la figura 2, para después obtener la medida de la fuerza y la posición de la partícula atrapada. La “cámara de fluidos” (ver figura 2) desempeña aquí el papel de tubo de ensayo en Bioquímica. Por técnicas de microfluídica que no detallamos aquí se pueden construir canales por los que circular los diferentes reactivos y tampones con diferentes condiciones hasta su destino final en el foco del objetivo, donde por medio del láser se genera la reacción molécula a molécula.

5. Biofísica molecular

Las macromoléculas que componen la maquinaria de las células funcionan en un medio muy diferente al de las soluciones regulares y homogéneas del laboratorio. Por un lado, el citoplasma es un medio enormemente condensado en donde las estructuras moleculares como las proteínas motoras, cromosomas, ribosomas, poros nucleares, canales de membrana, huso acromático y centrómero, anillo contráctil, etc., deben funcionar como si de una orquesta se tratasen. Por otro lado, muchas de estas estructuras están presentes en números notablemente pequeños, cada una trabajando individualmente y sujetas a grandes fluctuaciones que son, en muchos casos, una parte integral de su función.

Las moléculas biológicas han sido estudiadas tradicionalmente con métodos bioquímicos *de volumen*, donde un gran número de ellas son analizadas simultáneamente. Estos experimentos macroscópicos proporcionan promedios poblacionales y temporales de las características individuales de cada molécula. El conjunto de propiedades deterministas y de variación lenta así obtenidas dan lugar a una imagen idealizada, esto es, moléculas con dinámicas lentas y bien definidas. Pero al nivel de molécula individual [2], la imagen es bien diferente: se las puede encontrar en estados lejos del comportamiento promedio de la población, y sus dinámicas instantáneas son rápidas y altamente aleatorias. A este nivel de detalle, la imagen macroscópica falla y la descripción mesoscópica se hace necesaria.

Una forma pictórica de entender la mayor parte de las proteínas de la célula es asumir que están organizadas en grupos correlacionados de pequeños motores (nanomotores) que son capaces de funcionar individualmente y de consumir ATP como moneda de cambio. Esta representación motora está, sin embargo, lejos de la imagen clásica que tenemos de los motores macroscópicos para los que el entorno varía lentamente. En realidad, el ambiente celular es estocástico; las proteínas tienen realidad en un ambiente de fluctuaciones térmicas aleatorias que afectan su dinámica. Lejos de ser un problema, las fluctuaciones experimentadas por estas moléculas en la célula representan una parte integral de su mecanismo. Los proteínas motoras

usan esta superficie de energía libre como combustible, bien rectificando grandes desplazamientos difusivos (como un *ratchet browniano*), bien redirigiendo pequeños pasos difusivos (como en un *motor de explosión*). La eficiencia de estas máquinas moleculares, en términos de energía consumida frente al trabajo desarrollado, es mucho mayor que la eficiencia de las máquinas macroscópicas que podemos construir hoy.

La energía promedio de una fluctuación térmica es $k_B T$, donde k_B es la constante de Boltzmann y T es la temperatura. A 25°C , esta energía tiene un valor aproximado de 4.1×10^{-21} J, que es un valor significativo si consideramos que la energía libre liberada en la hidrólisis de una molécula de ATP en condiciones fisiológicas es de aproximadamente $24 k_B T$.

6. Aplicaciones

Las aplicaciones son tan amplias como fenómenos se puedan encontrar en un libro de Biología Molecular y Celular cuando se analizan como procesos que ocurren sujetos a las leyes de la Física. Es por ello que aunque se han realizado un buen número de investigaciones, se puede decir que apenas hemos empezado el análisis físico de la maquinaria molecular y celular. A continuación expondremos como ejemplo una breve descripción de tres líneas de investigación de nuestro laboratorio que puede ser completada en las referencias citadas. Una información más exhaustiva de la investigación realizada hasta la fecha en Biofísica con pinzas ópticas puede encontrarse en la revisión [10].

Transiciones estructurales de biomoléculas

Las proteínas y los ácidos nucleicos sufren transiciones estructurales en respuesta a cambios del medio en el que se encuentran. Las proteínas pueden desplegarse o saltar entre dos estados estructurales diferentes, y el conjunto de los diferentes estados está relacionado con la función biológica de la proteína. Los ácidos nucleicos experimentan cambios aleatorios de origen entrópico y también transiciones entre configuraciones estables. Es por tanto interesante entender la estabilidad mecánica de las diferentes formas de los ácidos nucleicos de doble hebra. Las transiciones estructurales de grandes macromoléculas individuales son los análogos en sistemas finitos de las transiciones de fase en los sistemas compuestos por un número indefinidamente grande de moléculas, con la diferencia de que en los primeros los efectos de frontera del sistema son mucho más importantes que en los segundos. Para estudiar la estabilidad mecánica y las transiciones entre las formas de moléculas de ácidos nucleicos se pueden aplicar fuerzas externas molécula a molécula como se muestra en la figura 3, en donde una molécula de ADN se etiqueta químicamente por sus dos extremos y se pega a dos microesferas, una ópticamente atrapada y la otra fija por succión a una micropipeta. El desplazamiento de la microesfera de la trampa óptica respecto a su posición de equilibrio por la presencia de una fuerza externa aplicada desde la micropipeta se deduce del

patrón de scattering medido por los fotodetectores, como se ha explicado anteriormente (ver también [9]). La figura 3(a) muestra resultados experimentales con una molécula única de ADN y la figura 3(b) muestra cómo se sigue el experimento por videomicroscopía.

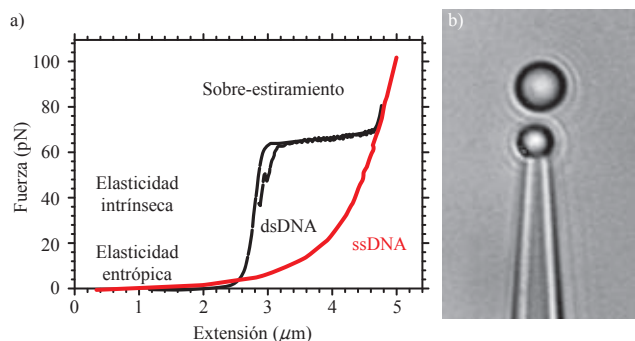


Fig.3. Estirando moléculas individuales de ADN. (a) Curvas de fuerza-extensión características del ADN. La curva negra muestra un ciclo completo de estiramiento y relajación de una molécula de ADN bicatenario (dsDNA) procedente del plásmido pBACgus11 (~8000 pares de bases) en 80 mM NaCl, 10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 7.5. Las flechas indican los distintos regímenes de elasticidad del ADN bicatenario (régimen de escisión no mostrado). La curva roja muestra un ciclo completo de estiramiento y relajación de una molécula de ADN monocatenario (ssDNA) procedente del mismo plásmido en una mezcla de tampón Tris y 20% etanol (el etanol facilita la separación del ADN en dos hebras). (b) Imagen de videomicroscopía óptica del experimento. Las microesferas, de 3 y 2 μm , pueden verse pero el ADN que está enganchado entre ambas no puesto que su grosor, 2 nm, queda por debajo del límite de resolución óptico. Experimentos control permiten verificar que se hace el experimento con sólo una molécula (de [9]).

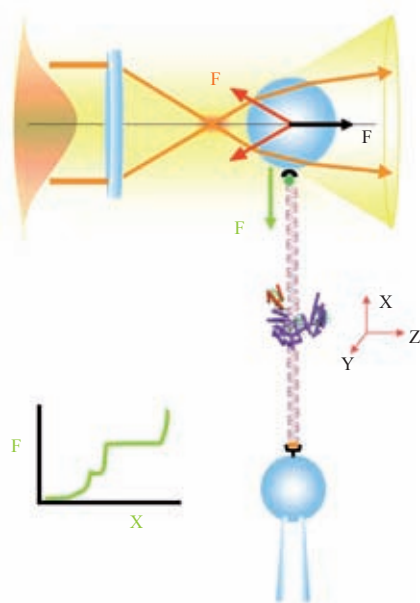


Fig.4. Esquema del estudio de un motor molecular que opera sobre ADN, como puede ser una ADN-polimerasa. Los motores moleculares son nanomáquinas biológicas que realizan un trabajo mecánico consumiendo, típicamente, energía química y de las fluctuaciones térmicas. En el experimento representado, el ADN se engancha entre dos microesferas. La microesfera superior está sostenida por pinzas ópticas, que permiten medir en tiempo real las fuerzas ultrapequeñas que desarrollan estos motores así como los subsecuentes desplazamientos nanométricos.

Biomáquinas moleculares

La eficiente replicación, transcripción, empaquetamiento o modificación de ácidos nucleicos se lleva a cabo por proteínas que explotan las propiedades físicas de estas cadenas de polinucleótidos. La tensión y el torque ejercidos por las proteínas que interactúan con el ADN pueden inducir cambios estructurales (como los discutidos anteriormente), así como la apertura o desenrollamiento de las dos hebras de la doble hélice. En la figura 4 se esquematiza gráficamente un ejemplo del planteamiento de molécula individual que se sigue para el estudio de ADN-polimerasas y helicasas [11]. En el experimento, tanto la proteína como el ADN son invisibles puesto que se utiliza videomicroscopía óptica y ésta sólo permite seguir la posición de las microesferas (ver también la micrografía de la figura 3(b)). La técnica permite medir las fuerzas y los desplazamientos de la polimerasa, por ejemplo, en tiempo real de manera indirecta a través de la diferente elasticidad que muestra el ADN conforme pasa de cadena sencilla a cadena doble al ser replicado por la polimerasa.

Biofísica de orgánulo individual

La manipulación de orgánulos individuales puede revelar las propiedades físicas de estos ensamblados moleculares tan extremadamente grandes ($\sim 1 \mu\text{m}$). Un buen ejemplo de esto es el centrosoma, un orgánulo complejo de las células eucariotas superiores que suele situarse cerca del centro de la célula y en proximidad con el núcleo. Su estructura es altamente heterogénea por la diversidad de tipos celulares y organismos, pero normalmente está compuesto por un par de centriolos rodeados por el llamado *material pericentriolar*. El medio celular, que está altamente condensado, da lugar a una dinámica compleja basada en multitud de procesos locales que están, al mismo tiempo, globalmente integrados. En este escenario las grandes estructuras tales como el centrosoma, los microtúbulos, las membranas o el citoesqueleto están implicadas en la organización y movimiento de las macromoléculas. La manipulación *in vitro* de estos orgánulos permite “interrogarlos” uno a uno en configuraciones experimentales como la mostrada en la figura 5, que representa cómo se realiza un análisis electrofisiológico de un orgánulo aislado [12].

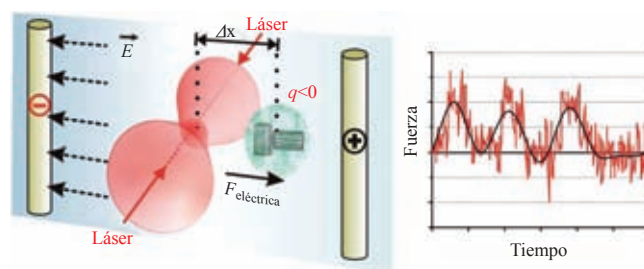


Fig.5. Propiedades eléctricas de orgánulos celulares analizados por medio de la medida de fuerzas con pinzas láser. El esquema muestra una configuración experimental en la que un centrosoma aislado en la trampa óptica es desplazado respecto del centro de la región focal del láser de atrapamiento por la acción de un campo eléctrico.

7. Futuro de la manipulación óptica

La primera barrera que se piensa en romper cuando se habla de manipulación en Biología es la de manipular procesos *in vivo*. Las técnicas ópticas presentan la ventaja de que la radiación en el visible e infrarrojo es *no invasiva*, la luz puede penetrar en el interior celular sin necesidad de romper la membrana o alterar su funcionalidad y puede hacerse focalizar sobre el orgánulo en cuestión. Existen ya experimentos en los que, por ejemplo, se han manipulado mitocondrias y cromosomas dentro de células vivas sin perturbarlas [10]. La desventaja desde un punto de vista biológico es que la luz carece de especificidad en el interior celular puesto que, como se ha apuntado anteriormente, la célula y sus componentes son dieléctricos. Esto implica que sería imposible saber si tras atrapar una mitocondria en el interior celular, por ejemplo, la trampa estaría atrayendo hacia sí también otras biomoléculas. Este tipo de efectos podría alterar el ritmo celular o destruir la célula por lo que todavía se está lejos de poder investigar con esta tecnología problemas verdaderamente biológicos. Este tipo de barrera parece teóricamente más fácil de solucionar con campos magnéticos que guíen nanopartículas químicamente pegadas al orgánulo sobre el que se pretende actuar. Esto es así puesto que, como se ha dicho también anteriormente, la mayor parte de las células no presenta respuesta magnética y entonces la manipulación sí sería específica.

En otro orden de ideas, las técnicas basadas en trampas ópticas están evolucionando hacia el diseño de múltiples trampas generadas a través de hologramas dinámicos y que pueden ser controlados por ordenador. Este tipo de sistemas ópticos permite modelar configuraciones experimentales más sofisticadas que las mostradas en las figuras anteriores para identificar y medir movimientos más complejos de biomoléculas *in vitro*.

Por último, la luz en la nanoescala puede considerarse una fuente de energía para alimentar nanomáquinas artificiales. La tecnología basada en el láser y el avance que poseemos hoy en el control de estas fuentes de radiación nos permite dirigir este combustible con bastante precisión. Sería muy interesante no sólo poder fabricar motores nanométricos totalmente sintéticos alimentados de esta manera sino también poder hacer motores híbridos en esta escala a partir de biomoléculas que tengan respuesta a la luz como, por ejemplo, las que tienen cambios en geometrías *cis-trans*. Este tipo de manipulación en la que se induce una dinámica a través de luz generará motores con una dinámica diferente de la macroscópica debido a la fuerte influencia de las fluctuaciones térmicas, como se ha argumentado anteriormente. Estos motores deberán diseñarse para aprovechar la física de dichas fluctuaciones en beneficio de la eficiencia, una vez bien entendida la termodinámica de estos sistemas fuera de equilibrio.

El futuro es tan prometedor en la nanoescala a través de la investigación mediante manipulación láser que el esfuerzo combinado entre la Física y la Biología no sólo está beneficiando estas áreas de la ciencia, también está cambiando la forma que tenemos de considerar su contexto biofísico. En este sentido, la medicina es un objetivo de fondo siempre presente en la investigación en este campo interdisciplinar, y aunque ya se está aprovechando de técnicas ópticas modernas, tales como “tijeras láser”, microcirugía láser y pinzas ópticas, se espera que experimente una revolución como resultado de la interfaz que la bioingeniería le proporcionará en el futuro.

Referencias

- [1] VALPUESTA, J.M., *A la búsqueda del secreto de la vida. Una Breve Historia de la Biología Molecular*, editorial Hélice (2008).
- [2] BUSTAMANTE, C., MACOSKO, J.C. AND WUITE, J.L., *Grabbing the cat by the tail: manipulating molecules one by one*, Nat. Rev. Mol. Cell. Biol. **1**, 130-136 (2000).
- [3] ARIAS-GONZALEZ, J.R., *Resonancias electromagnéticas en el scattering de luz por superficies y objetos. Detección y caracterización de objetos ocultos, campo cercano y fuerzas ópticas*. Tesis doctoral, Universidad Complutense de Madrid (2002).
- [4] BORN, M., AND WOLF, E., *Principles of Optics*, (por ejemplo, 7ª ed.). Cambridge University Press, Cambridge (1999).
- [5] ALBALADEJO, S., MARQUÉS, M.I., LAROCHE, M., AND SÁENZ, J.J., *Scattering Forces from the Curl of the Spin Angular Momentum*, Phys. Rev. Lett. **102**, 113602 (3009).
- [6] NIETO-VESPERINAS, M., SÁENZ, J.J., GÓMEZ-MEDINA, R., AND CHANTADA, L., *Optical forces on small magnetodielectric particles*, Opt. Express **18**, 11428-11443 (2010).
- [7] ASHKIN, A., DZIEDZIC, J.M., BJORKHOLM, J.E. AND CHU, S., *Observation of a single-beam gradient force optical trap for dielectric particles*, Opt. Lett. **11**, 288-290 (1986).
- [8] VAN DE HULST, H.C., *Light Scattering by Small Particles*. Dover, New York (1981).
- [9] HORMEÑO, S., *Biofísica de Centrosomas y ADN mediante Manipulación Óptica*. Tesis doctoral, Universidad Autónoma de Madrid (2010).
- [10] HORMEÑO, S., AND ARIAS-GONZALEZ, J.R., *Exploring mechanochemical processes in the cell with optical tweezers*, Biol. Cell **98**, 679-695 (2006).
- [11] IBARRA, B., CHEMLA, Y.R., PLYASUNOV, S., SMITH, S.B., LÁZARO, J.M., SALAS, M., BUSTAMANTE, C., *Proofreading dynamics of a processive DNA polymerase*, EMBO J. **28**, 2794-2802 (2009).
- [12] HORMEÑO, S., IBARRA, B., CHICHÓN, F.J., HABERMANN, K., LANGE, B.M.H., VALPUESTA, J.M., CARRASCOSA, J.L. AND ARIAS-GONZALEZ, J.R., *Single centrosome manipulation reveals its electric charge and associated dynamic structure*, Biophys. J. **97**, 1022-1030 (2009).

J. Ricardo Arias-González

Laboratorio de Nanomanipulación Óptica
Instituto Madrileño de Estudios Avanzados en Nanociencia
(IMDEA Nanociencia) y Centro Nacional de Biotecnología
(CSIC). Cantoblanco, 28049 Madrid
ricardo.arias@imdea.org