Alumna: Alba Milà
Tutora: Iris Gual

Brillant en la foscor

Presentació
Aquest treball consisteix a esbrinar les diferents aplicacions de la luminescència en el camp del desenvolupament, la investigació i la recerca. També se'n vol portar a terme algunes en laboratoris especialitzats que utilitzen aquestes aplicacions en la seva línia de recerca. Un altre objectiu és comprovar la fluorescència d'alguns materials comuns.

Metodologia
Per començar es fa una recerca bibliogràfica sobre la llum, la luminescència, les propietats d'aquesta i quines poden ser les seves utilitats.
Tot seguit es classifiquen de manera ordenada les aplicacions de la luminescència depenent de la seva utilitat. Es trien les aplicacions que estan en l'àmbit de la recerca i el desenvolupament i s'expliquen amb més detall cada una d'elles.
Un cop ja s'han identificat totes les aplicacions de la luminescència trobades a la bibliografia, se n'escullen dues per dur-les a terme al laboratori.
Les pràctiques sobre luminescència no es poden fer al laboratori escolar i s'han de dur a terme en laboratoris especialitzats. Per fer-ho possible es busquen labo-

ratoris amb línies d'investigació que utilitzin diverses aplicacions de la luminescència en la seva recerca.
La primera pràctica consistirà en una transfecció per tal que es pugui visualitzar en un microscopi amb font ultraviolada, alguns orgànuls cel·lulars o la cèl·lula en si. Aquest experiment es duu a terme gràcies a un grup de recerca encapçalat per la Dra. Gemma Marfany, del Departament de Genètica de la Facultat de Biologia de la Universitat de Barcelona. En definitiva, consisteix a introduir material genètic dins de la cèl·lula mitjançant plasmidis. Aquests plasmidis contenen material genètic que, quan la cèl·lula transcrigui i posteriorment quan el tradueixi, s'expressarà en forma d'una proteïna fluorescent (Green Flourescent Protein) capaç de marcar la nostra cèl·lula. Per tant quan el cultiu estigui exposat a la llum ultraviolada es podrà veure en el microscopi en llum verda.
La transfecció és un mètode que s'utilitza freqüentment per marcar cèl·lules, orgànuls cel·lulars i proteïnes, entre d'altres. Aquesta és molt útil per a l'observació de les característiques que va desenvolupant certa proteïna o la cèl·lula sencera.
La següent pràctica es basa en la immunofluorescència que consisteix en la visualització d'orgànuls cel·lulars o parts específiques de la cèl·lula mitjançant anticossos. S'ha pogut dur a terme aquesta pràctica gràcies al Dr. Jens Lüders, líder del grup de recerca sobre l'organització dels microtúbuls del Departament de Cèl·lules i Desenvolupament Biològic de l'Institut de Recerca Biomèdica de Barcelona.
Per acabar es fan una sèrie de comprovacions de la fluorescència d'objectes o éssers vius comuns a la vida quotidiana. Objectes utilitzats sotmesos a llum ultraviolada: tònica, clorofil·la, bata de polièster, bitllets d'euro i alguns minerals com la fluorita.

Cos del treball

Aplicacions de la luminescència

Primerament s'exposen les diferents aplicacions de la luminescència en alguns àmbits: recerca i investigació, aplicacions optoelectròniques i il·luminació.
Del primer àmbit se'n troben deu aplicacions. La primera aplicació tracta de la microscopia de fluorescència de superresolució (superresolution fluorescence microscopy) STOM. La microscopia de superresolució supera el límit de difracció de la llum i per tant ajuda a estudiar les estructures subcel·lulars amb major detall que un microscopi confocal. Es poden aconseguir resolucions de fins a uns 20 nm.
Una altra aplicació seria seguir el trajecte de gens en bacteris que es podria fer amb el FRET o el BRET. El FRET (Förster resonance energy transfer) és un mecanisme de transferència d'energia entre cromòfors. Un cromòfor és la part d'una molècula responsable del color. En cas que els cromòfors siguin fluorescents s'anomenen fluorocroms. Quan es vagi transmetent l'energia d'un fluorocrom a l'altre, s'absorbi-

rà l'energia d'una longitud d'ona específica i la tornarà a emetre a una determinada longitud d'ona major. En canvi, el BRET (Bioluminescence resonance energy transfer), involucra l'energia d'un donant bioluminescent a un acceptador fluorescent. El donant dóna fotons i per tant la fluorescència no és necessària com en el FRET.
La següent aplicació, que s'ha fet com bé ja s'ha dit abans a la IRBB, és la detecció de proteïnes o altres estructures cel·lulars mitjançant anticossos conjugats a alguna molècula fluorescent (anticòs recombinant).
La immunofluorescència és una tècnica de marcació on es combina l'ús dels anticossos, normalment un de primari i un de secundari.
L'anticòs primari detecta una proteïna que se situa en un orgànul determinat de la cèl·lula. Seguidament l'anticòs secundari s'acobla a l'anticòs primari. Això és possible ja que els dos anticossos són d'espècies diferents, ja que si fossin de la mateixa espècie no es detectarien, és a dir, no s'efectuaria una resposta immunològica a l'anticòs primari. Com que l'anticòs secundari té un fluoròfor o fluorocrom, que és una molècula que un cop excitada dona una resposta en forma de fluorescència, d'aquesta manera si s'excita el fluoròfor amb la longitud d'ona correcta es pot veure a partir d'un microscopi de fluorescència on està situada la proteïna inicial.
També tindríem la detecció d'ADN amb bromur d'etidi. Gràcies a la fluorescència del bromur d'etidi que canvia i augmenta considerablement quan s'uneix a l'ADN ens és molt útil per visualitzar la localització de fragments d'ADN.
Seguidament hi hauria la visualització de cèl·lules específiques dins d'un teixit, estructures dins d'un òrgan o tumor mitjançant la fluorescència. Hi ha una proteïna anomenada GFP (Green Flourescent Proteïn) que quan és irradiada amb llum ultraviolada respon emetent llum verda. La fluorescència de la GFP es produeix i es manté en cèl·lules vives que incloguin el gen que la codifica. És més, es pot fusionar amb altres proteïnes, proporcionant a aquestes una propietat fluorescent que permet seguir-les en directe.
La GFP no és l'única proteïna capaç d'emetre llum, n'hi d'altres com la YFP (yellow flourescent protein) o la TagBFP (Blue Flourescent Protein, mcherry (vermell)).
Tot seguit, hi hauria l'expressió de proteïnes recombinant-se en teixits o cèl·lules eucariotes.
S'ha dut a terme una pràctica sobre la visualització d'estructures de cèl·lules a la Facultat de Biologia de la Universitat de Barcelona on s'utilitza el procés següent, encara que en aquest cas no s'ha utilitzat un Microscopi Làser Confocal.
Aquest seguiment s'aconsegueix gràcies a la introducció d'uns plasmidis que porten la proteïna d'interès amb una de fluorescent (normalment la GFP, ja que és una proteïna biofluorescent). Per tant, permet analitzar-la in vivo a través del MLC (Microscopi Làser Confocal).

Després hi ha la microscopia de fluorescència. La microscopia de fluorescència de teixits, cèl·lules o estructures subcel·lulars s'aconsegueix marcant l'anticòs amb un fluorocrom (són uns components d'una molècula que fan que aquesta sigui fluorescent) i permetent que aquest trobi el seu antigen corresponent a la mostra. En marcar amb diferents fluorocroms es pot aconseguir la visualització de múltiples objectius en una mateixa imatge. Molts components cel·lulars tenen components fluorescents, fenomen conegut com fluorescència intrínseca. Tot i així, un component cel·lular pot estar marcat amb una tinta fluorescent. Quan se li aplica una emissió fluorescent a una freqüència específica sense necessitat d'excitació, pot ser vista amb un microscopi.
A continuació, la detecció d'empremtes dactilars. Les empremtes dactilars es poden visualitzar amb compostos fluorescents com la ninhidrid.
Per altra banda, en la seqüenciació de l'ADN hi ha el mètode de terminació de la cadena. Cada un dels quatre nucleòtids terminals de l'ADN es troba marcat amb un fluorocrom específic de tal manera que es generen cadenes de diferents longituds que en estar sotmeses a una font de llum ultravioleta es pot determinar la base nitrogenada terminal de cada cadena gràcies a la longitud d'ona emesa de cada fluorocrom. La seqüenciació de l'ADN és determinar la seqüència dels nucleòtids de l'ADN (A,C,G i T).
Per acabar també trobem aplicacions en els minerals. Alguns minerals poden tenir una fluorescència sota la llum ultraviolada o sota els raigs X. Alguns exemples són l'ambre i la calcita, que presenten fluorescència sota llum UV; en canvi, els diamants ho fan sota els raigs X.
En segon lloc hi hauria les aplicacions optoelectròniques, que consistirien en sensors luminescents. Aquests detecten marques que no poden ser visibles per a l'ull humà ja que són capaços de veure substàncies fluorescents. Aquests sensors detecten les marques la luminescència de les quals sigui superior a la del seu fons.
Per acabar hi hauria les aplicacions en la il·luminació, que consistirien en els fluorescents i els LEDS.
Els fluorescents consten d'un tub revestit per fòsfor. Aquest material absorbeix la llum ultraviolada i la torna a emetre en un espectre visible. El LED (light-emitting díode) és un component optoelectrònic que emet llum. Es tracta d'un cos semiconductor de gran resistència que en rebre un corrent elèctric de baixa intensitat emet llum eficientment.

Resultats de la transfecció

En la pràctica de la transfecció utilitzem dues proteïnes fluorescents diferents, la GFP i la YFP. En total s'utilitzen tres pous comptant el pou de control.
Tal i com es pot observar en la figura 1 es veu que certes cèl·lules presenten un color groguenc quan s'il·luminen amb llum blanca. Quan es canvia la llum a ultraviolada es pot veure clarament com la cèl·lula sembla tintada d'un color verdós groguenc més intens. Això ens verifica que el material genètic introduït a les cèl·lules ha po-

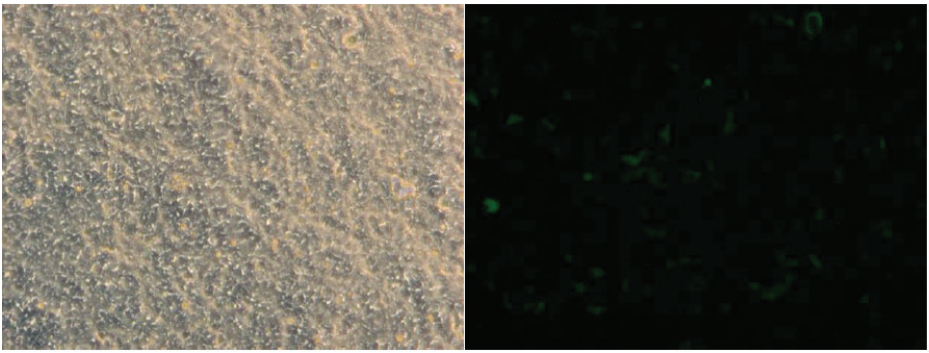

Figura 1: A la dreta hi ha la fotografia de les cèl·lules del segon pou enfocades amb llum blanca. A l'esquerra hi ha un grup de cèl·lules ampliades del segon pou amb llum ultraviolada. Font pròpia.

gut entrar al nucli i que s'ha traduït la proteïna YFP a partir del fragment transcrit. En aquesta figura 2 es pot veure clarament com s'ha transfectat correctament ja que es veu com la GFP s'ha expressat bé en la segona part de la imatge. Solament s'expressa en el nucli ja que la GFP està fusionada amb una proteïna característica del nucli de la cèl·lula.

Resultats dels cultius cel·lulars i visualització d'orgànuls
Gràcies a la immunofluorescència es pot observar una mitosi, és a dir, el comportament d'una cèl·lula, en aquest cas, la divisió cel·lular. Particularment s'ha emprat la immunofluorescència en unes determinades proteïnes però es pot arribar a utilitzar aquest mètode per a altres proteïnes que no necessàriament hagin d'estar situades al centríol i als microtúbuls.

Conclusions
Quant al primer objectiu del treball, que consistia a fer una àmplia recerca de les aplicacions de la luminescència, s'han trobat les següents aplicacions distribuïdes en els següents àmbits.

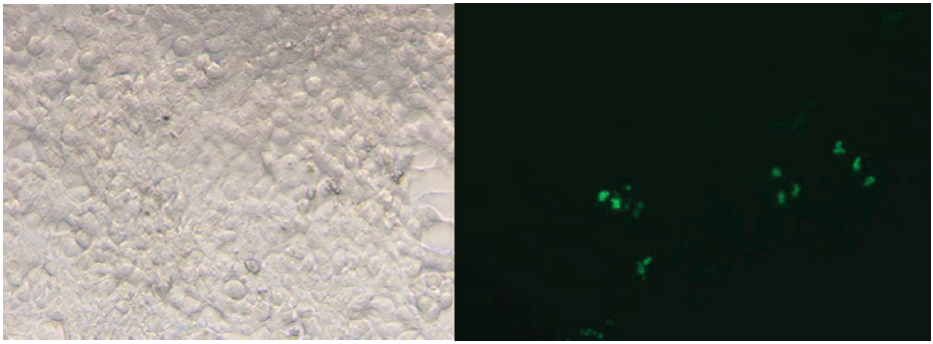

Figura 2: Conjunt de dues imatges. La primera és una imatge de cèl·lules il·luminades amb llum blanca i l'altra, les mateixes cèl·lules amb una il·luminació amb llum ultraviolada. Font pròpia.

El primer àmbit és el de desenvolupament i recerca. Com bé s'ha vist anteriorment aquest apartat dona pas a un gran ventall de possibilitats que van des del microscopi de fluorescència fins a la detecció d'empremtes o l'expressió de proteïnes fluorescents com la GFP. En el segon àmbit tenim les aplicacions optoelectròniques que són bàsicament els sensors fluorescents capaços de detectar marques de luminescència. Per acabar tenim l'àmbit de la il·luminació que abasta tot el que són fluorescents o LEDS. Quant al segon objectiu, que proposava fer alguna experiència en la part pràctica, s'ha pogut observar l'efecte d'algunes proteïnes fluorescents en cèl·lules vives gràcies a la transfecció. Hem comprovat que la YFP s'expressa arreu de la cèl·lula. També hem comprovat l'expressió de la GFP combinada amb la proteïna NrE3 que, com que aquesta última només s'expressa el nucli, en irradiar la mostra amb llum ultraviolada es pot observar que la fluorescència solament es manifesta a l'interior del nucli de la cèl·lula. També s'ha fet una pràctica d'immunofluorescència on s'ha pogut veure una altra forma de fer visibles parts de les cèl·lules amb l'ajuda dels anticossos.
Gràcies a tècniques d'immunofluorescència es poden visualitzar estructures cel·lulars tal com són els filaments d'actina i els cromosomes d'una cèl·lula en el procés de divisió cel·lular. Té moltes utilitats, ja que es pot estudiar el comportament de les cèl·lules cancerígenes quan aquestes es dupliquen o la importància dels microtúbuls en les neurones.

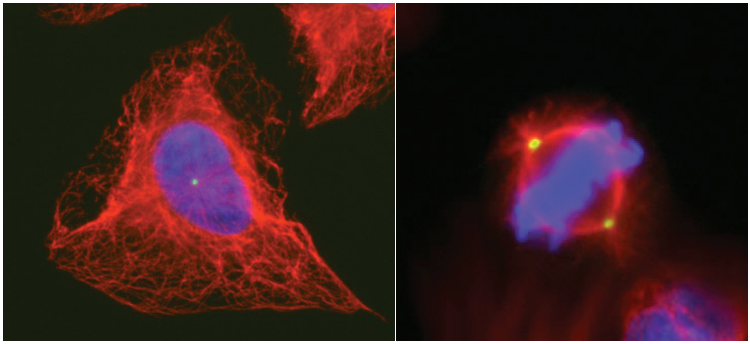

Figura 3: Conjunt d'imatges. Imatge de la dreta obtinguda amb un microscopi de fluorescència on es pot veure una cèl·lula en mitosi. En blau es veuen els cromosomes, en vermell el fus mitòtic i en groc els centríols. Imatge de l'esquerra una cèl·lula obtinguda amb el mateix mètode. Font pròpia.

Per altra banda s'han fet una sèrie de demostracions de fluorescència a l'escola amb objectes d'ús quotidià. S'ha pogut observar en la tònica, que conté quinina, que és una substancia fluorescent igual que la clorofil·la dels vegetals o alguns minerals com la fluorita, que quan aquests s'irradien amb llum ultraviolada emeten una radiació en forma de llum.
La fluorescència també té usos essencials avui en dia com és en el cas del sistema de seguretat contra falsificacions en la fabricació i l'ús de moneda de la Unió Europea en forma de bitllet. Com s'ha pogut observar anteriorment, els bitllets irradiats amb la llum ultraviolada presenten una sèrie de marcadors que s'il·luminen més gràcies a la llum que se'ls ha aplicat.
Per tant, la fluorescència no és una manifestació inusual en la nostra vida, sinó que està present en el nostre entorn en forma de substàncies com la tònica a fins i tot en minerals com la fluorita.

Bibliografia

Pàgines web
—Societat Catalana de Biologia <http://www.iec.cat/SCB/QueCalSaber/QCS149.pdf>

—Clickmica. <http://clickmica.fundaciondescubre.es/recursos/unidades-didacticas/33-unidades-didacticas/255-reacciones-luminiscentes>
—Bioinformàtica. <http://bioinformatica.uab.cat/biocomputacio/treballs2006-07/Montamat%20Catalan/BACTERIOCINES/1que_son_caracteristiques.htm>
—Calamar Bobtail. <https://www.vistaalmar.es/recursos/fotografia-video/3511-brillantes-fotos-calamar-bobtail.html>
—Química. <https://departamentofisicaequimica.wordpress.com/2015/01/06/francisco-chapela/>
—Cuca de llum. <http://proyectoluciernagas.blogspot.com.es/2015/03/luciernaga.html>
—Divulgació científica. <http://cluster-divulgacioncientifica.blogspot.com.es/2008/12/fluorescencia-y-fosforescencia.html>
—Llum negra. <https://ca.wikipedia.org/wiki/Llum_negra>
—Microscòpia. <http://www.medic.ula.ve/histologia/anexos/microscopweb/MONOWEB/capitulo6_7.htm>
—Green Fluorescent Protein. <https://www.thermofisher.com/es/es/home/life-science/cell-analysis/fluorophores/green-fluorescent-protein.html>
—Aequorea Victoria. <http://www.bioexpedition.com/aequorea-victoria/>