

**«DESARROLLO DE UNA ANIMACIÓN 3D
SOBRE LA MICROSCOPIA DE ONDA
EVANESCENTE Y SU APLICACIÓN EN
VIROLOGÍA: UNA HERRAMIENTA PARA EL
ESTUDIO Y COMPRENSIÓN DE LOS
MECANISMOS DE INFECCIÓN POR
MICROORGANISMOS EN CÉLULA VIVA»**

**CREATION OF A 3D ANIMATION ON
EVANESCENT WAVE MICROSCOPY AND
ITS APPLICATION IN VIROLOGY: A TOOL
FOR THE STUDY AND UNDERSTANDING OF
THE MECHANISMS OF INFECTION BY
MICROORGANISMS IN LIVING CELLS**

Agustín Valenzuela Fernández

avalenzul@ull.edu.es

José David Machado

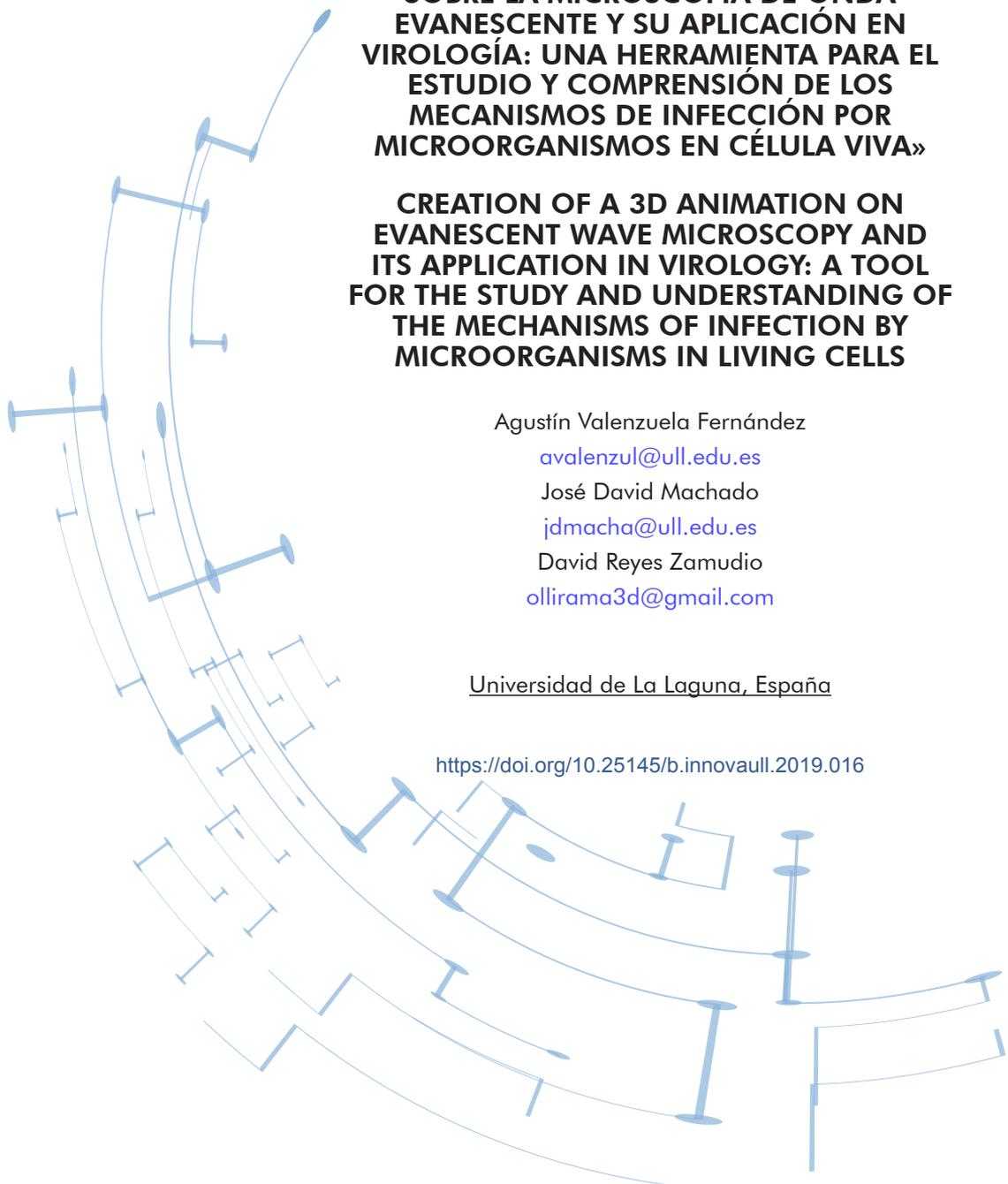
jdmacha@ull.edu.es

David Reyes Zamudio

ollirama3d@gmail.com

Universidad de La Laguna, España

<https://doi.org/10.25145/b.innovauull.2019.016>



RESUMEN

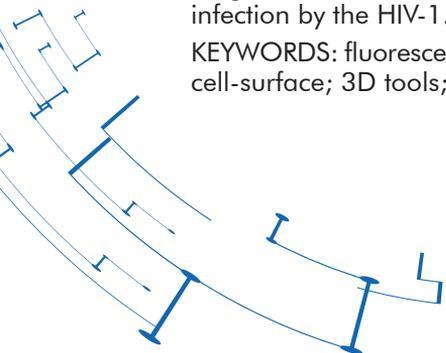
En el estudio de los mecanismos de invasión por patógenos (virus, bacterias, parásitos), es importante abordar, a nivel avanzado y molecular, los procesos que gobiernan la fusión de membrana, como uno de los eventos biológicos clave en la infección por microorganismos y en el contexto de las Enfermedades Infecciosas. En este contexto, es importante entender cómo funcionan las proteínas de los patógenos que regulan la invasión de células y tejidos, mediante el control y promoción del proceso de fusión de membrana entre el patógeno y la célula diana. Donde el empleo de la microscopía de onda evanescente es importante. Las ilustraciones científicas en este tema suelen ser láminas o esquemas 2D fijos, que ilustran la función de las proteínas implicadas y la fusión de membranas entre patógeno y célula diana, con cadenas secuenciales de imágenes no dinámicas, y difícilmente se ilustra el funcionamiento de este microscopio de última generación. En este capítulo se presenta, a modo de resumen, nuestro proyecto de innovación docente ULL, cuyo objetivo ha sido la creación y generación, por vez primera, de material de Animación 3D para ilustrar de forma pedagógica, y con el mayor rigor científico, la aplicación de la tecnología de microscopía fluorescente de onda evanescente (TIRFM) en el estudio de células vivas y del mecanismo de su infección por patógenos, aplicándolo a la comprensión del proceso de fusión de membranas y, en particular, al proceso de infección temprana por el virus VIH-1. **PALABRAS CLAVE:** microscopía fluorescente; onda evanescente; célula viva; virus; infección; superficie celular; herramientas 3D; animación 3D.

ABSTRACT

224

In the study of the mechanisms of invasion by pathogens (viruses, bacteria, parasites), it is important to address, at an advanced and molecular level, the processes that govern membrane fusion, as one of the key biological events in infection by microorganisms and in the context of Infectious Diseases. In this scenario, it is important to understand how the proteins of the pathogens that regulate the invasion of cells and tissues work, by controlling and promoting the process of membrane fusion between the pathogen and the target cell. In this matter, the use of evanescent wave microscopy (TIRFM) is key and very important. The scientific illustrations in this topic are usually fixed sheets or 2D-diagrams that illustrate the function of the proteins involved and the fusion of membranes between pathogen and target cell, with sequential chains of non-dynamic images, where it is difficult to illustrate how this last generation microscope works. In this chapter we briefly present our ULL teaching innovation project, whose objective has been the creation and generation, for the first time, of a 3D Animation material to illustrate in a pedagogical way, and with the greatest scientific rigor, the application of the evanescent wave fluorescence microscopy technology in the study of living cells and the mechanism of their infection by pathogens, applying it to the understanding of the membrane fusion process and, in particular, to the process of early infection by the HIV-1.

KEYWORDS: fluorescence microscopy; evanescent field; living cells; virus; infection; cell-surface; 3D tools; 3D Animation.



INTRODUCCIÓN

En la enseñanza avanzada en **Enfermedades Infecciosas** y, en concreto, en las áreas de **Virología** e **Inmunología**, el alumnado necesita comprender, claramente, conceptos biológicos complejos, objetivos de las unidades didácticas de las Asignaturas asociadas. Generalmente, en la enseñanza de los mecanismos de infección por virus, se emplean herramientas e ilustraciones 2D para vehicular el conocimiento al alumnado. Las interacciones entre el patógeno y el huésped, tanto a nivel macroscópico como a nivel celular y molecular, son difíciles de representar y de enseñar con estas herramientas estáticas. Más difícil aún es su comprensión por parte del alumnado, cuando los procesos a estudiar ocurren de una forma espaciotemporal, contemplan la participación de diferentes y múltiples factores en el microorganismo y en el huésped, e incluyen tecnología compleja, como es el caso de la microscopía de **onda evanescente o microscopía fluorescente de reflexión interna total** (de acrónimo **TIRFM**, en inglés). En este ámbito formativo, las herramientas de representación gráfica 3D son escasas. De hecho, las ilustraciones o animaciones científicas disponibles que aborden la tecnología de onda evanescente y sus aplicaciones en estudios de infección por virus son prácticamente inexistentes, o consisten en láminas o esquemas que no ilustran de forma comprensible la tecnología y sus aplicaciones. Mucho menos aún existen estas herramientas orientadas a la enseñanza de la tecnología de microscopía de onda evanescente, y su aplicación en el estudio de la fusión de membrana durante la infección viral, para estudiantes de Grado y Máster.

225

Por tanto, el empleo y desarrollo de herramientas y animaciones 3D para ilustrar estos procesos biológicos y el uso de la tecnología TIRFM, con el mayor rigor científico, técnico y apoyándose en recursos estéticos y artísticos, son necesarios y muy útiles. Estos recursos ayudan indudablemente a la comprensión del mecanismo de infección de una célula por un virus, y a entender la importancia que tiene para su estudio la microscopía TIRF en célula viva.

Así, por vez primera, en el equipo **SciArt3D** de la ULL ([@SciArt3D](#)) hemos desarrollado material de Animación 3D para ilustrar, de forma pedagógica y con el mayor rigor científico y técnico, el funcionamiento del microscopio de onda evanescente y su aplicación en el estudio de los eventos de fusión de membrana, procesos claves en la infección por muchos patógenos, como el virus VIH, empleado de forma paradigmática en las unidades didácticas de la Asignatura.

El contexto de creación de la Animación 3D como herramienta de innovación educativa ha sido la Asignatura de posgrado, máster «Mecanismos de invasión por patógenos (virus, bacterias, parásitos)». Por tanto, el presente capítulo es fruto del desarrollo de esta herramienta didáctica, proporcionando una breve explicación de la teoría electromagnética y de las propiedades notables del campo evanescente, con aplicación clara en

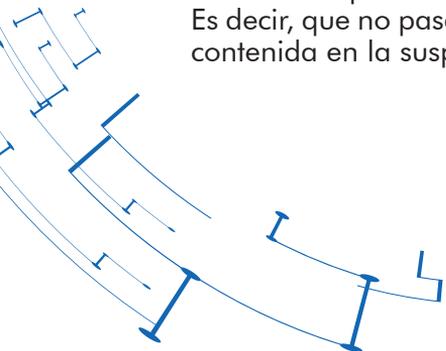
el estudio de las fases tempranas de infección de células vivas por virus, Así, se muestran en este capítulo ilustraciones extraídas de los «frames» de la Animación 3D asociada, herramienta pedagógica empleada en la Asignatura anteriormente indicada.

LA MICROSCOPIA DE ONDA EVANESCENTE EN BIOLOGÍA CELULAR, LOS PRIMEROS PASOS:

El fenómeno de la fluorescencia de reflexión interna total (TIRF) se introdujo, por vez primera, en el contexto de la microscopía óptica en estudios de Biología Celular por el Dr. Daniel Axelrod (Axelrod et al. 1984). La microscopía TIRF o de onda evanescente aprovecha las propiedades del campo electromagnético evanescente para seccionar ópticamente regiones de la muestra, en la proximidad del sustrato (Figura 1), donde se induce el campo evanescente (Figura 1B). Las primeras aplicaciones en Biología Celular se enfocaron en la investigación de fenómenos que ocurren en la superficie celular (membrana plasmática). La aplicación más notable de TIRF son los experimentos de molécula única («single molecule», en inglés), que pueden proporcionar información valiosa sobre la distribución y fluctuación de moléculas en la superficie celular, así como su proximidad, además de mostrarnos eventos inesperados que, hasta el momento, no habían sido descritos. Esta técnica proporciona, por tanto, conocimientos novedosos y sorprendentes sobre los mecanismos que gobiernan las interacciones moleculares a nivel de superficie celular y que sustentan muchos procesos fundamentales en la célula.

¿QUÉ LA ONDA EVANESCENTE?: LA TEORIA DE TIRF

El campo evanescente es una onda electromagnética que se produce por acción de un haz de luz de excitación sobre un sólido (por ejemplo, un cubreobjetos de vidrio o plástico de cultivo de células o tejidos) (Figura 1A), y al incidir en un ángulo alto concreto sobre la superficie sólido/líquido a la que se adhiere la muestra (p.ej: moléculas o células individuales cultivadas sobre un portaobjetos de cristal y que están dispuestas al lado opuesto de la cara donde incide el haz de luz) (Figura 1B). Este ángulo, medido desde la normal, debe ser lo suficientemente grande como para que el haz de luz incidente se refleje internamente y totalmente (TIR), en el mismo objetivo del microscopio, y no se refracte a través de la interfaz. Es decir, que no pase el portaobjetos ni incida directamente en la muestra contenida en la suspensión líquida al otro lado (Figura 1B).



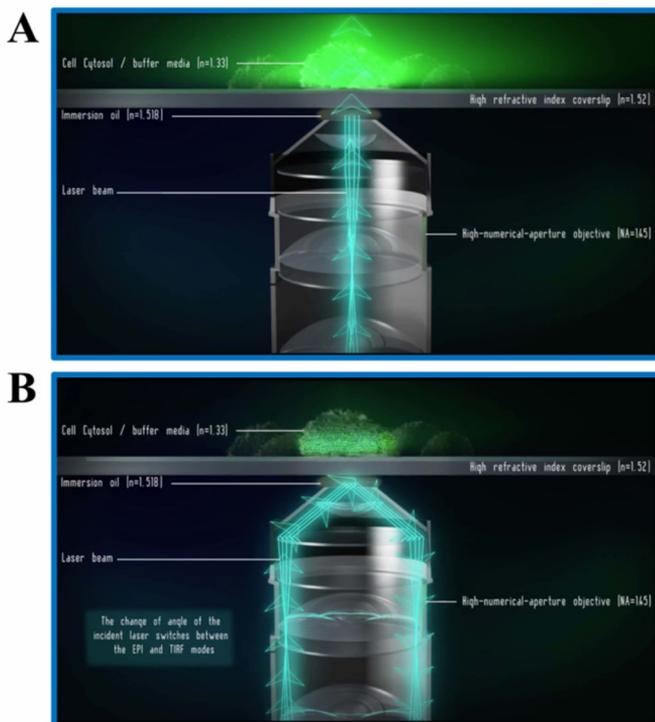


Figura 4. A) Se muestra esquema de objetivo termostatzado de un microscopio TIRF con el haz de luz láser incidiendo de forma perpendicular en la muestra (portaobjetos con células vivas marcadas con un cromóforo que emite luz fluorescente verde, tras ser excitado por el haz de luz láser). La excitación ocurre de forma global en todo el volumen de la célula (fenómeno de epifluorescencia). B) El cambio del ángulo de incidencia del haz de luz láser sobre la muestra, mediante desplazamiento del haz de luz láser dentro del objetivo a un ángulo determinado, provoca que el haz de luz se refleje completamente dentro del objetivo, generándose, a su vez, en la interfaz entre el punto de reflexión interna total del haz y la muestra, un campo evanescente capaz de excitar la muestra, y sin refracción alguna. Ilustraciones procedentes de «frames» de la Animación 3D (<https://vimeo.com/230631827>) desarrollada en inglés para el Proyecto de Innovación Educativa ULLL asociado a esta publicación.

La reflexión interna total es una condición que ocurre por encima del denominado «ángulo crítico» y es propia para cada longitud de onda. TIR genera así un campo electromagnético muy delgado en el líquido (solución en la que se encuentra la muestra sorbe el portaobjetos, justo al otro lado del objetivo donde se produce el TIRF), con la misma frecuencia que la luz incidente, decayendo exponencialmente en intensidad con distancia de la superficie (Figura 2). Este campo es capaz de excitar fluoróforos cerca de la superficie, evitando la excitación de un número posiblemente mucho mayor de fluoróforos más lejanos en el líquido. La delgada capa de iluminación es un «campo evanescente» que decae exponencialmente en intensidad al aumentar la distancia normal a la superficie (Figura 2).

A



Figura 5. La imagen muestra la profundidad del campo evanescente en la muestra, con un alcance de unos 100 nm de profundidad, contados desde la zona de reflexión interna total del haz de luz láser, y sin refracción alguna. Esto permite observar fenómenos que ocurren en la membrana plasmática y su cercanía en célula viva. Ilustración procedente de un «frame» de la Animación 3D (<https://vimeo.com/230631827>) desarrollada en inglés para el Proyecto de Innovación Educativa ULLL asociado a esta publicación.

228

Por tanto, la microscopía de onda evanescente proporciona un medio para excitar selectivamente los fluoróforos en un entorno acuoso y celular, muy cerca de una superficie sólida (en un rango de distancia de unos 100 nm), y sin excitar la fluorescencia de regiones más alejadas de la superficie (Figura 2). La excitación de la fluorescencia por esta delgada zona de energía electromagnética (llamada «campo evanescente») da como resultado imágenes con una fluorescencia de fondo muy baja, prácticamente sin fluorescencia desenfocada y una exposición mínima de las células a la luz en cualquier otro plano en el muestra. La Figura 3 muestra un ejemplo de un experimento TIRF en célula viva, desarrollado en nuestro laboratorio, y en el que se compara una imagen de campo evanescente con una imagen de epi-fluorescencia estándar. En la imagen inferior TIRF se observan sólo las proteínas fluorescentes (marcadas con el cromóforo EGFP que fluoresce en la longitud de onda del verde) que se expresan en la membrana plasmática y su proximidad, mientras que la epi-fluorescencia muestra las proteínas marcadas en todo el volumen celular (Figura 3).

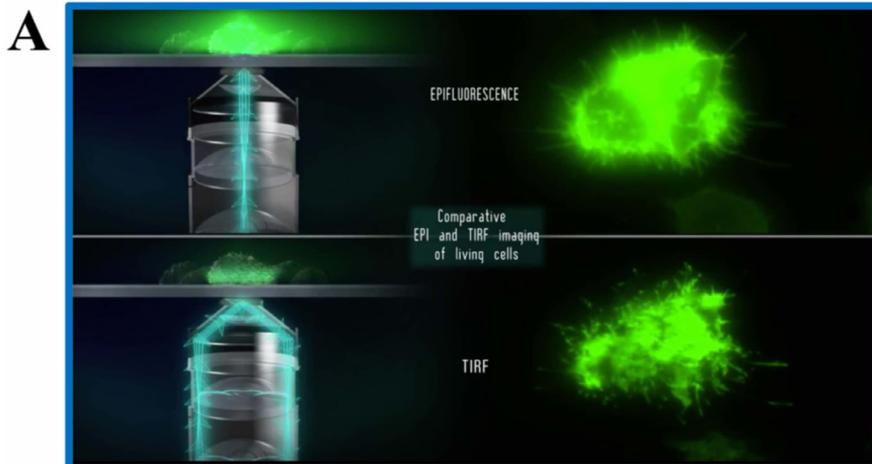


Figura 6. La imagen muestra, a la derecha, células vivas observadas bajo un objetivo de microscopio TIRF (esquemático a la izquierda), y que fluorescen en su todo su volumen cuando son excitadas por el haz de luz láser que incide perpendicularmente a la muestra (imagen superior derecha de epifluorescencia). Mientras que las mismas células fluorescen por la acción de un campo evanescente TIRF que se genera cuando el haz de luz incide en el portaobjetos de la muestra con el ángulo crítico adecuado, para provocar el fenómeno de onda evanescente. En TIRF se excitan las proteínas fluorescentes dispuestas en la membrana plasmática celular y en su proximidad, a no más de 100 nm de profundidad. Ilustración procedente de un «frame» de la Animación 3D (<https://vimeo.com/230631827>) desarrollada en inglés para el Proyecto de Innovación Educativa ULLL asociado a esta publicación.

Las características únicas del fenómeno electromagnético del TIRF permiten numerosas aplicaciones en Biología celular y, como se muestra a continuación, con gran aplicación en el estudio de las etapas tempranas del proceso de infección de una célula por un virus. Para ello, y como en el caso de nuestro equipo de investigación que ha estudiado por TIRF la infección de células por el virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1) (García-Expósito et al. 2011), para ver los eventos de infección en membrana celular con esta tecnología, es necesario, por un lado, modificar las células de estudio, para que expresen un gen de una de las proteínas claves para la infección y que esta fluoreszca bajo el campo evanescente. De este modo, la proteína celular escogida se debe localizar en la membrana plasmática de la célula, y portar en su secuencia, en fase, una proteína fluorescente, que actúa a modo de chivato o trazador para caracterizar su nivel de expresión y localizarla en la célula. Y, por otra parte, hay que generar viriones VIH-1 que sean fluorescentes, portando, por ejemplo, su proteína de matriz viral acoplada en fase a una proteína fluorescente que emita luz fluorescente (distinta a la de la proteína celular) bajo el campo evanescente, para así poder seguir al virión durante la interacción con el receptor marcado celular, y en las etapas siguientes de fusión de mem-

brana y entrada viral en la célula. En la herramienta educativa que hemos generado, Animación 3D, se muestra esquemáticamente al correceptor celular CCR5 para la infección por VIH-1 expresado en la membrana celular y portando, en su región citoplasmática intracelular, la proteína fluorescente verde EGFP («enhanced green fluorescent protein») (Figura 4).

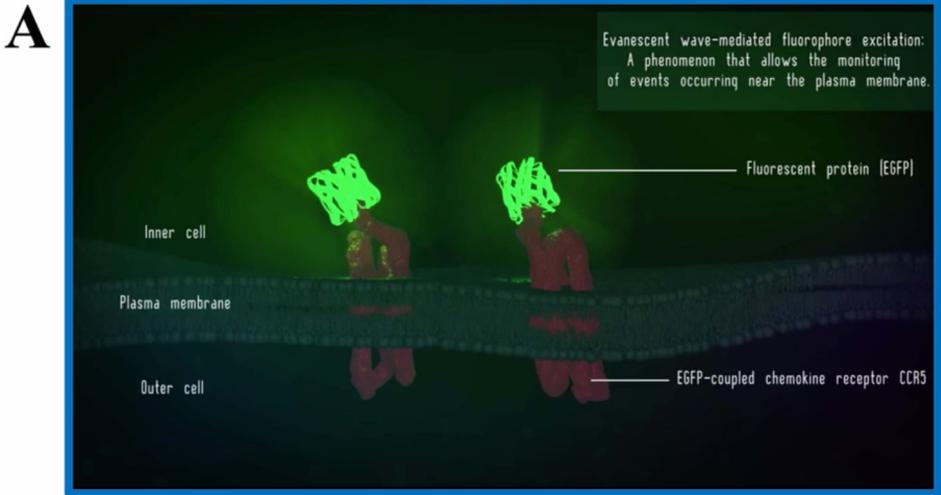
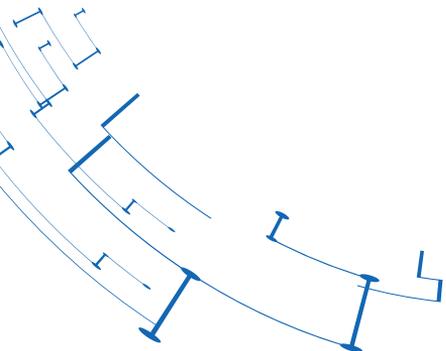


Figura 7. La imagen ilustra la expresión en superficie celular del correceptor de quimiocinas CCR5 que permite la infección por cepas R5 trópicas del virus VIH-1. El receptor CCR5 en su dominio C-terminal lleva en fase la proteína fluorescente verde EGFP. La proteína EGFP está acoplada a CCR5 en la región intracelular del receptor, de forma que no impide la unión del virus VIH-1 al CCR5, que ocurre fuera de la célula y con la región extracelular de CCR5, y permite, a su vez, la trazabilidad dinámica de CCR5 en la superficie celular por microscopía TIRF durante el proceso de infección y junto al virión. Ilustración procedente de un «frame» de la Animación 3D (<https://vimeo.com/230631827>) desarrollada en inglés para el Proyecto de Innovación Educativa ULLL asociado a esta publicación.

Al mismo tiempo, se muestra el virión VIH-1 aproximándose a la superficie celular (Figura 5A) y, posteriormente, la interacción íntima entre las proteínas de la superficie del virión y las de la célula diana (Figura 5B), que median el evento de fusión entre las membranas viral y celular, lo que genera el poro de fusión por donde entra la cápside viral en la célula, portando el material genético del virus e iniciándose así la infección por el VIH-1 (Figura 5C).



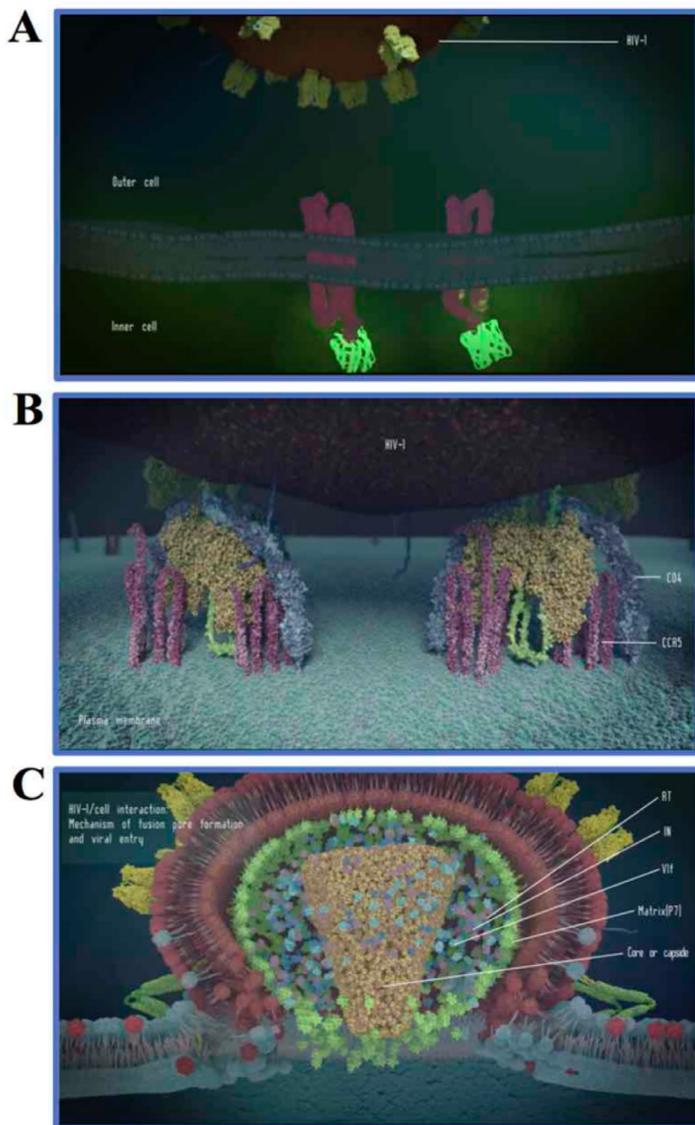


Figura 8. A) Representación de una partícula viral del VIH-1 aproximándose a la superficie de una célula diana, expresando el receptor CCR5 acoplado a la proteína fluorescente EGFP. B) Esquema mostrando las interacciones cooperativas que se establecen entre las proteínas de la envoltura del VIH-1 con el principal receptor celular para la infección por VIH-1, la molécula CD4, y el correceptor de quimiocinas CCR5, necesario para la infección. C) Esquema representativo de la fusión de las membranas viral y celular, que forman el poro de fusión, que permite la entrada de la cápside del virus portando el material genómico en el interior celular, siendo esto el inicio del ciclo de infección del VIH-1. Ilustraciones procedentes de «frames» de la Animación 3D (<https://vimeo.com/230631827>) desarrollada en inglés para el Proyecto de Innovación Educativa ULLL asociado a esta publicación.

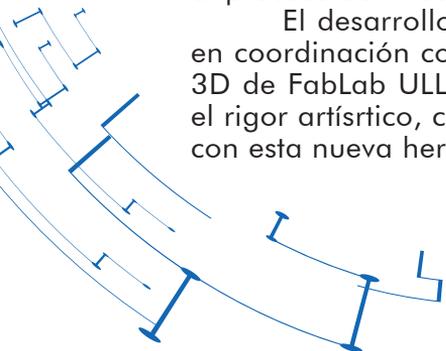
CONCLUSIÓN

La incorporación de las tecnologías gráficas avanzadas, mediante el uso de la animación 3D ad hoc, que integran la docencia magistral y la tutorización, han mejorado la eficacia de la formación global de los estudiantes en el tema que se trata en este capítulo, y en la consecución de los objetivos y adquisición de competencias teóricas en esta área avanzada de conocimiento.

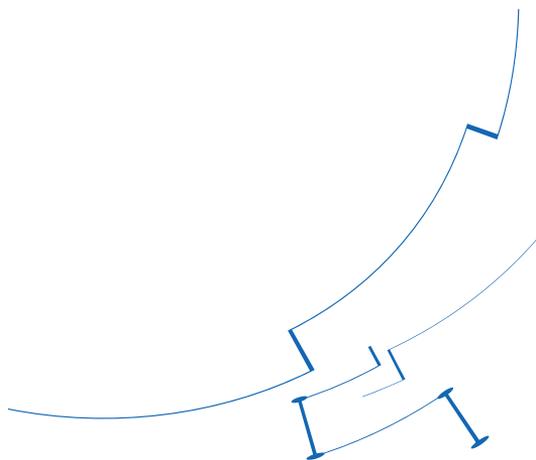
A nivel metodológico, el cambio es cualitativo, al introducir ilustraciones científicas en movimiento que permiten una mayor comprensión del funcionamiento de la microscopía de onda evanescente y su aplicación en el estudio de la infección por patógenos, dentro del Tema «Mecanismos de invasión por patógenos (virus, bacterias, parásitos)». Esto nos ha permitido una mejoría en los procesos de planificación, organización y desarrollo de los objetivos de este Tema y de la práctica docente.

En la Asignatura «Inmunología aplicada a la Investigación y Diagnóstico de Enfermedades Tropicales», que se imparte en el «Máster Universitario en Investigación y Diagnóstico de Enfermedades Tropicales (MIDETROP)» de la ULL, se trata el Tema 3: «Mecanismos de invasión por patógenos (virus, bacterias, parásitos)», donde se desarrolla a nivel avanzado y molecular los procesos de fusión de membrana, como uno de los eventos biológicos clave en la infección por microorganismos y en el contexto de las Enfermedades Tropicales. En este contexto, es importante entender cómo funcionan las proteínas de los patógenos que regulan la invasión de células y tejidos, mediante el control y promoción del proceso de fusión de membrana entre el patógeno y la célula diana. Donde el empleo de la microscopía de onda evanescente es importante. Las ilustraciones científicas en este tema suelen ser láminas o esquemas fijos que ilustran la función de las proteínas implicadas y la fusión de membranas entre patógeno y célula diana, con cadenas secuenciales de imágenes no dinámicas, y difícilmente se ilustra el funcionamiento de este microscopio de última generación. El presente proyecto de innovación docente ha creado y generado, por vez primera, material de animación 3D donde se ha ilustrado de forma pedagógica la aplicación de la tecnología puntera de microscopía de onda evanescente en el estudio de células vivas y del mecanismo de su infección por patógenos, aplicándolo a la comprensión del proceso de fusión de membranas, objeto de enseñanza del Tema 3, y, en particular, al proceso de infección temprana por el virus VIH-1.

El desarrollo de este nuevo material didáctico se ha realizado en coordinación con un modelador y experto en tecnologías gráficas 3D de FabLab ULL (@SciArt3D), y para, de esta manera, garantizar el rigor artístico, científico y pedagógico de los contenidos a impartir con esta nueva herramienta.



Por otra parte, esta herramienta educativa, Animación 3D, ha permitido el aprendizaje razonado al alumnado sobre las potenciales estrategias terapéuticas que intercepten esta etapa temprana del proceso de infección viral y la aplicación de la microscopía de onda evanescente en otros procesos biológicos. A modo de ejemplo, se analizan en estos trabajos de nuestro equipo de investigación donde por tecnología y microscopía TIRF se estudiaron potenciales nuevos antagonistas del receptor CCR5 para la infección por VIH-1 y que, además, inhiben la señalización de ligandos naturales agonistas de CCR5, la internalización del receptor de la superficie celular, y su función quimioattractora de las células (quimiotaxis) (Barroso-González et al. 2009) .



REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AXELROD, D., BURGHARDT, T.P., & THOMPSON, N.L. (1984) Total internal reflection fluorescence. *Annual Review of Biophysics and Bioengineering*, 13, 247-268.
- BARROSO-GONZÁLEZ, J., EL JABER-VAZDEKIS, N., GARCÍA-EXPÓSITO, L., MACHADO, J.D., ZÁRATE, R., RAVELO, A.G., ESTÉVEZ-BRAUN, A., & VALENZUELA-FERNÁNDEZ, A. (2009) The lupane-type triterpene 30-oxo-calenduladiol is a CCR5 antagonist with anti-HIV-1 and anti-chemotactic activities. *Journal of Biological Chemistry*, 12, 284(24), 16609-16620. doi: 10.1074/jbc.M109.005835.
- GARCÍA-EXPÓSITO, L., BARROSO-GONZÁLEZ, J., PUIGDOMÈNECH, I., MACHADO, J.D., BLANCO, J., & VALENZUELA-FERNÁNDEZ, A. (2011) HIV-1 requires Arf6-mediated membrane dynamics to efficiently enter and infect T lymphocytes. *Molecular Biology of the Cell*, 15, 22(8), 1148-1166. doi: 10.1091/mbc.E10-08-0722.

