

Conferencia Premiación IOCIM 2010

El desarrollo tecnológico de la microscopia en el avance del conocimiento de la esencia misma de la vida

Prof. Jorge Sans Puroja

(Ex Prof. ICBM-Facultad de Medicina, U. de Chile; Prof. Escuela de Tecnología Médica, Facultad de Medicina U. del Desarrollo de Chile, Gerente de Bio-JSP, Chile.)

Resumen

La comprensión de que la célula era la unidad básica y fundamental de la vida, solo fue posible con el advenimiento del microscopio óptico. Este instrumento, en su versión compuesta, con dos componentes ópticos de tipo convergente (objetivo y ocular dispuestos en un mismo eje óptico), fue desarrollado, al rededor del año 1600, por *Zacharias Jansen*. Sus principios y fundamentos se han mantenido en los microscopios más sofisticados del presente. No obstante a ello, los cambios tecnológicos en la microscopia, se han centrado, en gran medida, en: 1) variaciones en la forma de iluminar el espécimen, 2) automatización y/o robotización de su manejo, 3) la incorporación de la computación, 4) la captura de imágenes por medios digitales, y 5) la incorporación de software para el procesamiento y análisis de imágenes, etc.

Dentro de las distintas técnicas microscópicas clásicas: campo claro, campo oscuro, contraste de fases, luz polarizada, interferencia (DIC) y fluorescencia, es esta última, la que ha experimentado el mayor avance tecnológico en los últimos años, especialmente, con el advenimiento y desarrollo de la Microscopia Confocal, cuyos principios fueron propuestos inicialmente por *M. Minsky* en 1957. Su fundamento se orienta a la obtención de cortes ópticos, en especímenes fluorescentes, cada vez más finos en el eje z y sin interferencia de los planos sobre y bajo foco, (efectos inevitables en la fluorescencia convencional en células vivas completas o en cortes gruesos). La incorporación de esta tecnología se ha traducido en un explosivo avance en el conocimiento de la organización estructural y funcional de la célula y por ende, en la profundización en el conocimiento de la esencia misma de la vida.

En la presentación se mostrarán los principios y fundamentos de la microscopía Confocal y sus aplicaciones. De igual manera, se discutirán distintos procedimientos para la obtención de imágenes confocales, como son la microscopía bi o multifotónica, y la microscopía de luz estructurada, entre otras. Estas tecnologías han llevado en la actualidad, a la microscopía óptica a un nivel de resolución prácticamente molecular.

Inicio de la presentación

La difteria es una enfermedad hoy en día prácticamente erradicada. Yo soy un sobreviviente de ese mal. En el año 1958 contraí esta mortal enfermedad, mis padres oportunamente, frente a las altas temperatura 40°-41° C, llamaron, al médico, este diagnóstico una amigdalitis e iniciaron un tratamiento con antibiótico, como con los días seguía igual llamaron a otro médico este era mayor y con un buen ojo clínico, inmediatamente sospecho que se trataba de una difteria, aunque en ese entonces muy poco frecuente en nuestro país. Pidió inmediatamente, un examen microbiológico para constatar su diagnóstico, pero con tan buen tino, inicio, ese mismo día, un tratamiento con suero de equino anti-toxina diftérica. A los pocos días, recobraba mi integridad física para seguir haciendo travesuras típicas, de lo que hoy se conoce o se ha dado en llamar, *Niño Índigo, por no decir, hiperkinético.*

Mi salvación fue posible a una serie de acontecimientos en la historia de la medicina. Primeramente, como fue el hecho que entre los 1590-1608, en la ciudad de Middelburg, Holanda, *Zacharias Jansen*, en conjunto con *Hans Jansen* y *Hans Lippershey*, construyeran el primer microscopio compuesto con dos lentes de tipo convergentes dispuestos en un mismo eje óptico, mediante el cual se podían ver cosas muy pequeñas, imposibles de ver a simple vista. Y que algunos años después, *Antony Van Leeuwenhoek*, (1632-1723), en la ciudad de Delf, Holanda, vendedor de telas y tapices, aficionado a tallar lentes, desarrollo un microscopio extremadamente simple (diapositiva), con un solo lente convergente, pero pulcramente tallada, con el cual realizó las primeras observaciones de organismos vivos, de un tamaño de una milésima de milímetro (1µm), los “*animalículos de Van Leeuwenhoek*”, hoy bacterias o células procarióticas. Se estima que *Van Leeuwenhoek*, entre muchas otras contribuciones, fue el primero que asoció la presencia de estos

animalículos con una enfermedad, presencia de *animalículos* en las encías y caries dentales

Por otro lado, al hecho que en el año mil ochocientos y tanto la difteria hacia estragos en el mundo y *Federl Loeffler* discípulo de *Robert Roux*, determinó que esta enfermedad era producida por un microbio (bacteria), *Emile Roux*, también discípulo del gran *Louis Pasteur*, comprobó que la causa de la muertes no se debía a la presencia del microbio en si, sino que era producto de la toxina que este producía. *Emile Beringer*, discípulo de otro grande, *Robert Koch*, determinó que el suero de animales infectados con la difteria humana, era capaz de bloquear la toxina producida por la bacteria. Y, por último, *Emile Roux*, en el ya Instituto Pasteur en la calle Dutot de Paris, desarrolló un procedimiento para producir en gran cantidad el suero, anti-toxina de la difteria humana, en equinos, el mismo con el cual yo fui curado. A mi juicio, todo esto fue posible gracias a la invención del microscopio.

Desde la construcción del primer microscopio por *Z. Jansen*, hasta mediados del siglo XIX este instrumento se fabricaba empíricamente en forma artesanal, en que la preocupación, se centró en aspectos, más bien estéticos, que en mejoras sustanciales de este instrumento (diapositiva). Un vuelco importante a este respecto, se produjo a partir de la segunda mitad del siglo 19, con *Carl Zeiss, (1816-1888)*, un fabricante de microscopios de la ciudad de Jena, Alemania (cuna de la microscopia moderna), se preocupó, debido en parte, a la creciente demanda de este instrumento y al requerimiento del ambiente científico de la época, por microscopios, con un poder de resolución cada vez mayor y de mejor calidad, en dar un impulso mas científico y sistemático en la producción industrial de este instrumento. Y tuvo la visión de asociarse con destacados científicos de la Universidad de Jena, como el físico, (*Ernest Abbe, 1848- 1905*), un matemático (*Agust Kohler, 1866-1948*). Y la de un experto fabricante de vidrios y cristales (*Otto Schott, 1866- 1935*). En conjunto hicieron posible

la gran transformación en la fabricación de microscopios, al pasar de una era artesanal a una de producción industrial, con fundamentos claros y científicos. Estos que fueron rápidamente asimilados por otros fabricantes de microscopios del resto del mundo. Por ello se les considera a estos personajes, como “*Los cuatro pilares, de lo que se ha dado en llamar, la microscopia moderna*” (diapositiva).

Los principios y fundamentos, desde la creación del microscopio por **Z. Jansen**, se han conservado, hasta el día de hoy, en los microscopios mas sofisticados del presente (diapositiva). No obstante a ello, se han incorporado a este instrumento, numerosa mejoras tecnológicas centradas en: a) la forma como se ilumina el espécimen con fotones, b) el mejoramiento en la calidad los lentes, cada vez mas resolutivos y libres de aberraciones, c) la automatización y/o robotización en su manejo, d) incorporación de un registro de imágenes digitales de gran sensibilidad y su asociación con la incorporación de la informática (diapositiva).

Todo ello ha contribuido en: 1) incrementar sustancialmente su poder resolutivo a un nivel nanométrico, 2) en la posibilidad de estudiar células o especímenes vivos, 3) incrementar sustancialmente la velocidad en la captura de imágenes digitales, 4) su procesamiento y análisis a través de programas computacionales cada vez mas poderosos, (diapositiva). Estos han hecho posible analizar a las células vivas en su organización estructural y funcional, en forma tridimensional o 3D, y sus cambios dinámicos en el tiempo, lo que se conoce como análisis 4D.

Entre los hitos importantes en el desarrollo tecnológico de la microscopía, que han hecho posible analizar a las células en esta nueva perspectiva, hay que destacar las siguientes:

La **microscopía de campo oscuro**, llamada también, **ultra microscopía**, desarrollada muy tempranamente. Esta técnica permite ver solo la luz difractada por las diferentes estructuras del espécimen en

observación, Estos se ven como cuerpos brillantes en un fondo negro, similar a un cielo de una noche estrellada (diapositiva).

La microscopía de contraste de fases, desarrollada por *F. Zernike (1888-1966)*, en la década del treinta del siglo pasado y que le valió recibir el premio Nóbel de matemática en 1953. Esta técnica, permite ver preparados *in vivo*, sin el auxilio de cromógenos o colorantes, incrementando en forma importante el contraste de las diferentes estructuras celulares (diapositiva).

La microscopía de polarización, introducida muy tempranamente en el desarrollo de la microscopía, (alrededor del 1800). Permite visualizar estructuras birrefringentes, que dan información sobre un ordenamiento particular de moléculas. (diapositivas).

La microscopía de interferencia DIC, desarrollada por *G. Nomarski (1919-1997)*, y **la microscopía de Hoffmann**, creada por el homónimo, ambas, permiten ver a las células vivas con un pseudos volumen con muy buena resolución y belleza estética (diapositiva).

Por último **la microscopía de fluorescencia**, que permite visualizar moléculas fluorescentes*, normalmente existentes o introducidas en forma de marcadores, **fluorocromos**, muy usados a partir de los años 50 del siglo pasado (diapositiva).

* En el proceso de fluorescencia existe una interacción luz átomo. En dicho proceso fotones con un determinado nivel energético (longitud de onda) se incorporan a la masa de electrones involucrados en doble enlaces covalentes (electrones Pi), entre átomos de una misma molécula y en el cual exista alternancia de enlaces covalentes doble con sencillos y que por ende, presentan mutarrotación de dichos enlaces. La incorporación del fotón hace que el electrón sufra un salto cuántico a un orbital mas periférico del átomo (mas energético o mas alejado de los núcleos atómicos que participan en el doble enlace). Esto reconvierte en un átomo excitado. Este fenómeno dura tan solo una fracción de tiempo, en el rango de mili segundos. El salto cuántico del electrón, produce una inestabilidad en el átomo excitado,(una vibración fuera de lo normal dentro del átomo). Para recobrar su situación normal, el electrón excitado debe desprenderse de la energía ganada y lo hace desprendiendo un fotón de menor energía, es decir, con una longitud de onda mayor al fotón que se incorporó inicialmente. La emisión de este fotón constituye el fenómeno de **Fluorescencia**. Una determinada molécula presentara fluorescencia mientras esta sea excitado con fotones de una determinada longitud de onda, especifica para cada fluoroforo. Como así, la emisión que el fluoroforo emite. La fluorescencia se produce solo cuando el fluoroforo es excitado Esta cesa cuando la

molécula deja de recibir fotones del nivel energético que la excite, se apaga la fluorescencia.

Esta técnica de microscopía fluorescente es la que ha tenido un desarrollo impresionante en las dos últimas décadas, especialmente, con el advenimiento y desarrollo de la **microscopia confocal**. Esta técnica ha permitido un mejoramiento sustancial en la calidad y resolución de las imágenes fluorescentes (diapositiva).

La **microscopia confocal**, fue propuesta inicialmente por *M. Minsky* en 1957. Su fundamento se centra en la obtención de cortes ópticos de especímenes fluorescentes cada vez más finos en el eje z, incluso, más delgados que la profundidad de foco natural de los diferentes objetivos, y sin interferencia de la fluorescencia que proviene de los planos sobre y bajo foco, (efectos inevitable en la fluorescencia convencional cuando se estudian células vivas enteras o en cortes gruesos). Esto se consigue mediante la utilización de un diafragma (pinhole), dispuesto estratégicamente antes del sistema de captura de la imagen (diapositiva).

A este principio básico de la **microscopía confocal**, se le han agregado varias mejoras sustanciales como: La incorporación de una o más fuente de luz LASER de diferentes longitudes de onda (generalmente dentro del espectro visible 400-700nm. Un dispositivo que permite iluminar puntualmente el espécimen mediante un pequeño, pero intenso, haz de luz excitatoria, que se desplaza haciendo un rápido barrido sobre el espécimen. Con ello, se evita la pérdida de fluorescencia, por la sobre excitación del fluorocromo. También, se les han incorporado un sistema de captura de la imagen fluorescente, mediante fotomultiplicadores o cámaras digitales de alta sensibilidad (CCD enfriado a -20° o -40° C). Por último, un computador para el manejo, almacenaje de imágenes y software que permite integrar la imagen digital y efectuar, entre otras cosas, procesamiento y análisis de imágenes: colocalizaciones de moléculas, reconstrucciones en 3 y 4D*.

En los últimos años, han surgido numerosas alternativas para obtener imágenes confocales con una alta sensibilidad, rapidez y resolución**. Entre ellas, hay que destacar la **Microscopía de luz estructurada y Microscopía bi o multifotónica**, cuyos principios y beneficios comentamos a continuación: Hago aquí la salvedad que existen otras varias alternativas de microscopía confocal, por nombrar una, la microscopía confocal mediante spinning, que no serán tratadas en esta oportunidad.

* La automatización, la robotización y la incorporación de super computadores a procedimientos tecnológicos asociados con la biología celular, han hecho que los descubrimientos en este ámbito de la ciencia, hayan sido tan vertiginoso en las dos últimas décadas. Vale como ejemplo, lo sucedido con el proyecto del genoma humano en que se prevía, en su inicio, que la secuenciación de todo el genoma humano llevaría hasta el año 2015, sin embargo, este se concluyó el año 2000, es decir, quince años antes. Se prevé, que para el año 2015, se habrán secuenciado el genoma completo de una gran cantidad de especies.

**El traslado de moléculas en el interior de la célula mediante difusión por los medios fluidos. En las células eucariontes, esto sólo se explicaría si existiera un proceso de difusión direccional, de otra manera, no se podría explicar la gran eficiencia con que algunas moléculas llegan a lugares tan recónditos de la célula, como es el caso del nucléolo, ubicado en el núcleo celular, entre una gran maraña de cromática. Es así, que en el ciclo celular (25 hrs, de duración), de una célula secretora, se sintetizan alrededor 800.000 ribosomas, 32.000 por hora, 534 por minuto por lo tanto, alrededor de 10 por segundo. El lugar donde se fabrican las dos sub unidades ribosomales, la pequeña 30S y la grande 50S, es el nucleolo. Por cada una de estas dos sub unidades, deben ingresar desde el citoplasma al núcleo y por ende, al nucléolo, 30 y 50 proteínas diferentes por cada una de las respectivas sub unidades Además, todas ellas codificadas por genes diferentes. Estas sub-unidades, a su vez, deben trasladarse al citoplasma, donde participan en la traducción del mensaje genético, es decir, en la síntesis de proteínas, probablemente, en algunos casos, en la síntesis de sus propias proteínas. Este proceso, sugiere que los procesos celulares involucrados con la vida ocurren a una gran velocidad y con una gran precisión. Dilucidar la forma como ocurren estos eventos requieren de tecnologías de captura de imágenes más rápidas y cada vez más resolutivas.

Mi hipótesis al respecto, y al no tratarse de una simple difusión o de difusión facilitada, debe producirse una suerte de corrientes de difusión en el medio acuoso, (similar a las que se producen en las grandes masas acuáticas), que dan la direccionalidad en el destino de las moléculas, talvez, por un cambio en la estructura de la molécula de agua. Respuestas a esta incógnita solo se podrán contestar con técnicas adecuadas de marcaje de estas moléculas y su seguimiento, *in vivo*, mediante microscopia confocal bi o multifotónica.

Creo que en el futuro no muy lejano se descubrirán importantes roles, aun desconocido, de la molécula más abundante de los sistemas vivo, como es el caso del agua, como por ejemplo, su rol en la direccionalidad de la difusión de moléculas en el interior de las células. O su posible papel como la unidad básica (byte de información) en la codificación de la memoria. No olvidemos que el agua es un dipolo y su

organización estructural puede ser modificada, por ello podría funcionar como un sistema binario de codificación de información.

Microscopía de luz estructurada. Esta es una alternativa ligeramente más económica a la microscopia confocal convencional. Su principio se basa en una forma particular de cómo se ilumina el espécimen con la luz excitatoria. En este caso, se introduce un tamiz de líneas paralelas que se desplaza, en forma regular, frente al haz de luz, produciendo una estructuración del cono de luz que proviene de cada punto de la fuente de luz. En algunos sistemas el tamiz se desplaza produciendo tres saltos y en otros hasta cinco. Con cada uno de estos saltos, el espécimen se ilumina con un ángulo levemente diferente. Coordinadamente se captura una imagen por cada desplazamiento del tamiz. Posteriormente, mediante un programa computacional se hace un análisis comparativo (píxel a píxel) de las tres fotografías, Al final, se despliega solo una fotografía, correspondiente a aquellos píxeles coincidentes en las tres fotografías. Los píxeles no concordante, corresponden a las fluorescencias bajo y sobre foco, son eliminados de la imagen final. De esta manera, se obtiene una imagen sin interferencia de la fluorescencia emitida de los planos sobre y bajo foco. Obtienen con este procedimiento, imágenes muy nítidas y de gran resolución, indistinguibles a las obtenidas en un microscopio confocal convencional (Diapositivas).

Microscopía bi o multifotónica, Someramente su fundamento se basa en el hecho descubierto por *Mary Goeppert Mayer (1906-1972)*, que le valió el premio Nóbel de Física en 1963. Este consiste en que se puede obtener excitación de una molécula fluorescente si sobre en mismo electrón inciden simultáneamente dos fotones de la mitad de la energía requerida para excitarlo. Es decir, si un fluorocromo requiere para ser excitado un fotón con una energía de 350nm de longitud de onda, puede ser excitado si sobre el electrón Pi, inciden simultáneamente dos fotones, con una energía de 700 nm de longitud de onda. De esta manera, solo habrá

emisión de fluorescencia en el punto focal o punto de convergencia de dos fotones que inciden simultáneamente sobre el punto focal. Con esta técnica de excitar los fluorocromos, podríamos decir que se obtiene, en forma directa, la confocalidad más perfecta, es decir, más delgada en el eje Z. (diapositivos).

La incorporación de estas tecnologías ha llevado en la actualidad, a la microscopía óptica a un nivel de resolución prácticamente molecular (20nm). Y un nivel de detección temporal de alrededor de los nanosegundos. Hechos que han contribuido sustancialmente con el explosivo avance que se ha producido en los últimos años en el conocimiento de la organización molecular, estructural y dinámica de la célula. En esta perspectiva se puede decir, que en la actualidad, se está analizando *la esencia misma de la vida*.

*El progreso, en este ámbito de las ciencias, en los países en vía de desarrollo, según mi perspectiva, se ha visto limitado por la falta de conciencias en la inversión y renovación de las tecnologías de punta. A consecuencia de esto, frecuentemente se da el caso, que muchas investigaciones deben incorporar en sus trabajos a persona que no son creadoras de las ideas centrales de la investigación, pero, que son poseedoras de la tecnología.

- Dedico esta presentación y la distinción recibida, a mis hijos, Rodrigo, Diego y Milan, que por mi dedicación a la biología celular, tuvieron que soportar mis ausencias en momentos importantes de sus vidas.