



Memoria del 46.º Taller de Actualización Bioquímica, Facultad de Medicina; UNAM

Técnicas de microscopía avanzada.

Advanced techniques in microscopy.

López-Saavedra, Alejandro^{1*}; Fabian-Morales, Eunice¹ y Herrera-Montalvo, Luis Alonso.¹

1. Unidad Biomédica de Investigación en Cáncer, Instituto Nacional de Cancerología, Universidad Nacional Autónoma de México.

*Correspondencia. Unidad de Microscopía Avanzada, Unidad Biomédica de Investigación en Cáncer, Instituto Nacional de Cancerología – UNAM. Av. San Fernando 22, Col. Sección XVI, Tlalpan, C.P. 14080, CDMX. Tel +52 (55) 56280400, ext. 20011.
alexlosaav@ciencias.unam.mx

Resumen

Desde sus comienzos la microscopía ha sido una herramienta para visualizar objetos que son invisibles o indistinguibles para el ojo humano. Hoy en día, el avance tecnológico, científico y computacional ha convertido a la microscopía en un instrumento capaz de contestar preguntas científicas complejas, ya que se puede estudiar estructuras subcelulares, la dinámica de organelos y hasta de proteínas específicas. Las técnicas de iluminación en el campo de la microscopía también han avanzado, la primera técnica usada fue iluminación de campo claro por luz transmitida, técnica que a la fecha se sigue usando. En luz transmitida se desarrollaron a su vez técnicas de contraste al grado de poder observar células vivas, aunque estas sean prácticamente translúcidas. Las técnicas más avanzadas de iluminación han permitido usar luz reflejada para ver fluorescencia y fuentes de láser para iluminar de forma más precisa una zona de interés en la muestra y para disminuir la iluminación de fondo o de fuera de foco. En los últimos 300 años la resolución de una imagen en microscopía fotónica se ha visto limitada por la difracción de la luz y aun usando un objetivo con la más amplia apertura angular y un medio de inmersión con el índice de refracción más alto posible, la resolución llega a un máximo de 200 nm. Sin embargo, los avances más recientes han permitido superar esta barrera a través del uso de algoritmos matemáticos y de nuevas formas de iluminar la muestra, de manera que ahora se puede llegar a una resolución de hasta 10 nm. En

Abstract

Since its early days, microscopy has been a useful tool to observe objects invisible or indistinguishable to the naked eye. In addition, the current advances in science, technology, and informatics have turned microscopy in a powerful technique to answer a variety of complex scientific questions since subcellular structures, dynamics of organelles and even of specific proteins can now be observed. Illumination modes have also been developed: brightfield in transmitted light was the first illumination mode to be used, and even today it is still widely used in several applications. Nonetheless, several contrast techniques have been developed in brightfield, so that even alive translucent specimens, such as cultured cell lines, can now be observed. More advanced illumination techniques include reflected light to excite fluorescent molecules, as well as laser power to illuminate more precisely a specific region of interest and to reduce the background or out of focus light. In the last 300 years diffraction of light has limited the resolution in photonic microscopy, and even the highest angular aperture in objective lenses and the medium with the highest refraction index can only provide a resolution of about 200 nm, according to Abbe equation. However, the most recent advances have achieved an unprecedented resolution of about 10 nm, thanks to sophisticated algorithms and illumination modes. In the present review the fundamentals of the most advanced microscopy techniques will be described.

el presente texto se irán revisando características y fundamentos de las más avanzadas técnicas de microscopía.

Palabras clave: microscopía, fotones, lentes, fuentes de láser, límite de difracción

Key words: microscopy, photons, lenses, lasers, diffraction limit

Introducción

Desde aquellos días de Robert Hooke y Antonie Van Leeuwenhoek en el siglo XVII, cuando nació el microscopio como un instrumento científico, el avance en la tecnología, en las ciencias naturales, en

las matemáticas y en la informática, ha sido de tal magnitud que es difícil comparar tanto la arquitectura como las imágenes obtenidas de los equipos construidos en esas épocas con los microscopios modernos (Figura 1).

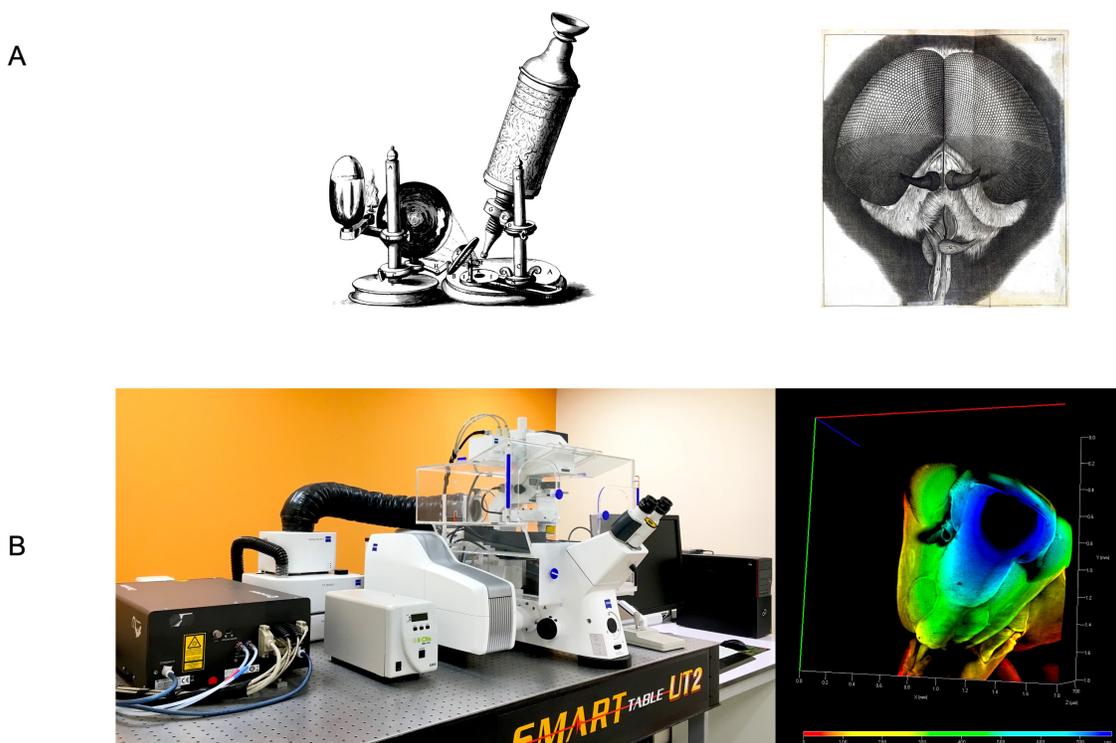


Figura 1. Comparativo entre un microscopio del siglo XVII y uno moderno. (A) En su libro “Micrografía” (Londres, 1665), Robert Hooke ilustra y describe el Microscopio compuesto desarrollado por el y una cabeza de mosca observada con tal microscopio. (B) Un microscopio confocal equipado con incubación para células vivas, láser multifotónico y software de análisis puede generar imágenes tridimensionales como la que se muestra a la derecha.

Algunos de los avances en el campo de la microscopía han ocurrido a distintos niveles: a) el tipo, naturaleza y fuente de iluminación, b) tipos de contraste, c) el material, número, morfología y disposición de las lentes y finalmente d) la integración con la computación. No obstante, la superación del límite de la difracción de la luz y la iluminación selectiva de secciones ópticas son quizás de los avances más recientes que hoy en día tienen mayor difusión y aplicación en las ciencias biológicas. A lo largo de este texto revisaremos el

fundamento y las aplicaciones de diferentes técnicas de microscopía que actualmente se usan en las ciencias naturales.

Técnicas de contraste en microscopía de luz transmitida

En microscopía, el término *luz transmitida* se refiere al paso de la luz desde la fuente de iluminación, -al lado opuesto a la muestra-, hasta las lentes del objetivo, es decir la iluminación se

transmite a través del espécimen. Cuando éste último no tiene una tinción, es muy delgado o se trata de células vivas adherentes, se necesitan técnicas que aumenten el contraste para observarlos, ya que este tipo de especímenes son prácticamente transparentes. Dichas técnicas incluyen: contraste diferencial por interferencia (DIC), uso de luz polarizada, contraste de fases, contraste por modulación de Hoffman y microscopía de campo oscuro, revisaremos algunas de ellas a continuación [1].

Iluminación de campo claro

Esta técnica es quizás la primera en haberse usado desde que se inventó el microscopio hace más de tres siglos y que sigue vigente en la actualidad. Se basa en cambios en la absorción de la luz, en el índice de refracción o en color de alguna tinción en particular (tales como eosina y hematoxilina, o azul de metileno), lo que proporciona el contraste suficiente para poder observar el espécimen. La limitación principal de esta técnica es que no puede usarse en muestras que son prácticamente translúcidas o que carecen de contraste, tales como células vivas adherentes.

Contraste de fases

Esta técnica mereció el premio Nobel de física para Frits Zernike en 1953, quien la describió por vez primera en 1934 y la cual revolucionó la

investigación biomédica básica en células vivas (Figura 2A), las cuales, junto con otros especímenes no teñidos y/o delgados, tenían el problema de que no eran fácilmente detectadas por el ojo humano ya sea en campo claro o en campo oscuro. Durante su paso a través del núcleo, citoplasma, organelos o agua, -es decir objetos o sustancias con índices de refracción ligeramente diferentes dentro de una célula-, las ondas de luz son ligeramente retardadas. Como resultado, las ondas de luz que pasaron a través del núcleo quedan más retrasadas que aquellas que pasaron a través del agua; la diferencia entre ambas ondas se llama cambio de fase. Dado que el ojo humano no puede distinguir estos cambios de fases, sino sólo cambios en la intensidad de luz o en colores, en la técnica de contraste de fases se utilizan dispositivos ópticos para que los cambios de fases se interpreten como cambios en niveles de intensidad o de valores de grises. Dichos dispositivos consisten en un condensador especial (que contiene un bloqueador de luz de forma circular o placa anular), así como en un anillo o placa de fases, presente en la parte posterior de las lentes del objetivo (Figura 2B). Este tipo de objetivos contienen una inscripción (Ph1, Ph2, Ph3) que debe corresponder con el tamaño de la placa anular del condensador (Figura 2C). Una limitante de esta técnica es que no es adecuada para especímenes gruesos, ya que la luz produce halos brillantes en los bordes.

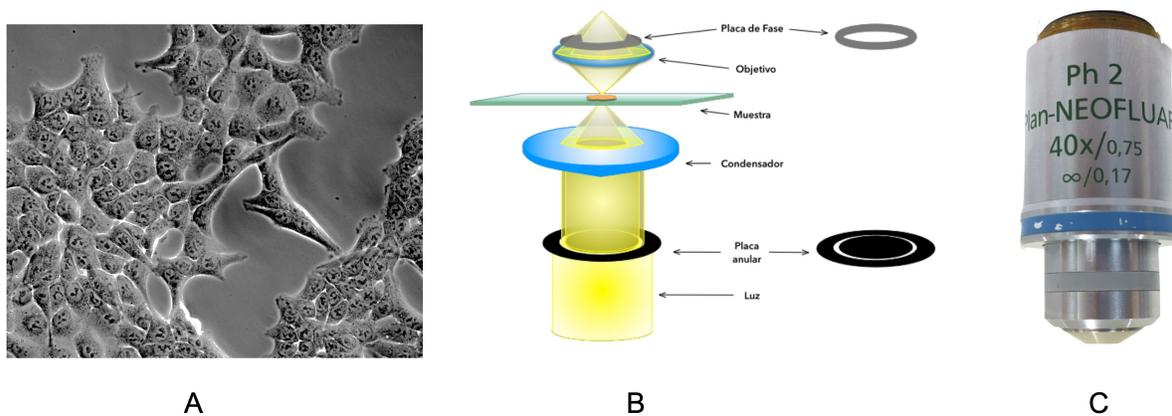


Figura 2. Técnica de contraste de fases. (A) Observación de células vivas. (B) Componentes necesarios para hacer contraste de fases: placa anular en el condensador y anillo de fases en el objetivo. (C) Los objetivos que se requieren para hacer contraste de fases contiene la etiqueta Ph1, 2 o 3, dependiendo de su apertura numérica y dictamina el tamaño de la placa anular que debe usarse. Fotografía de células por cortesía de Unidad de Microscopía INCAN-RAI-UNAM.

Contraste diferencial por interferencia (DIC)

Es una técnica que requiere luz polarizada y dos prismas Nomarski bi-refringentes para que puedan resaltar diferencias mínimas en grosor y en índice de

refracción del espécimen. Por tanto, es una técnica excelente para observar muestras gruesas. El prisma del condensador hace una descomposición vectorial de la luz que proviene del polarizador en dos rayos linealmente polarizados y perpendiculares entre sí.

Estos rayos a su vez, al pasar a través del espécimen, pueden desplazarse lateralmente si se encuentran con regiones de espesor e índice de refracción variables (Figura 3A y 3B). Cuando ambos rayos entran al objetivo, son enfocados en la parte posterior de éste y entran a un segundo prisma DIC donde se combinan nuevamente. No obstante, producto de las diferencias en grosor e índice de refracción, los rayos no están en el mismo plano y eje pues sus trayectorias ópticas cambiaron de longitud en su ruta a través de la

muestra. Por tanto, se requiere de un segundo polarizador (analizador) que reúna los rayos y estos formen una imagen que resulta de cambios en intensidad y color, las cuales además se caracterizan por tener una apariencia pseudo-tridimensional de la muestra (Figura 3B y 3C). Con DIC es posible aprovechar toda la apertura numérica del objetivo y tener también imágenes a color. Otra ventaja es que, a diferencia del contraste de fases, no hay halos en la periferia de la muestra.

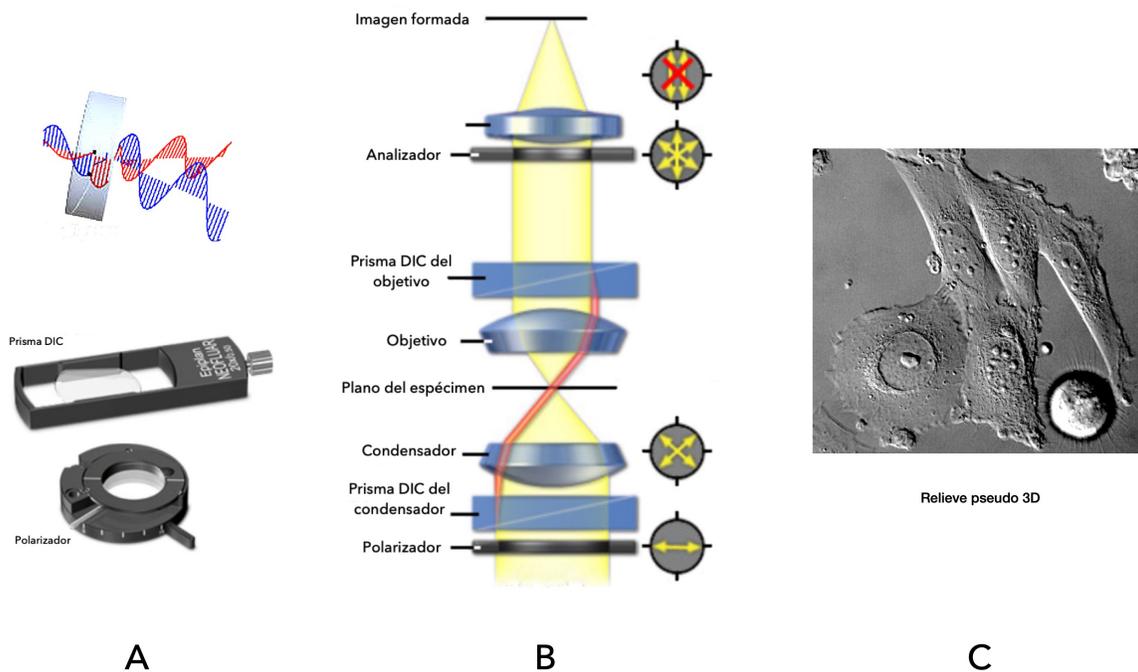


Figura 3. Técnica de contraste diferencial por interferencia (DIC). (A) Polarizador del condensador y prisma DIC del objetivo. El prisma DIC (o Nomarski) del condensador desdoblará la luz polarizada en dos rayos perpendiculares entre sí, los cuales incidirán sobre la muestra. (B) Esquemización de elementos para hacer DIC y de la ruta de la luz. (C) La imagen final tiene una apariencia pseudo-tridimensional producto de las diferentes rutas de los rayos de luz desdoblados por el prisma DIC del condensador. Imagen modificada de: <http://zeiss-campus.magnet.fsu.edu/articles/basics/contrast.html>. Fotografía de células por cortesía de Unidad de Microscopía INCAN-RAI-UNAM.

Campo Oscuro

Técnica que utiliza una iluminación oblicua para aumentar el contraste en el espécimen. En el condensador se coloca una placa anular (similar a la usada en contraste de fases) con la que se genera un cono hueco de luz con ángulos extremadamente oblicuos de modo que los rayos directos no entran a la lente del objetivo, por lo que se genera un fondo oscuro en la imagen (Figura 4A). Sólo la luz que interactúa con el espécimen y que es refractada, reflejada o difractada, es capaz de entrar al objetivo

con lo que se crea una imagen brillante sobre un fondo oscuro (Figura 4B y 4C). Para que solo únicamente entre la luz que interactúe con el espécimen y se excluyan los rayos directos del cono, es necesario usar un objetivo de poca apertura numérica, lo que limita el uso de esta técnica. Otras limitantes consisten en que el polvo o cualquier otro objeto también contribuyen a la imagen; una muestra muy delgada no desvía tanto la luz, por lo que la señal es débil; mientras que una muestra muy gruesa redirige mucha luz hacia el objetivo, por lo que se pierde nitidez en la imagen.

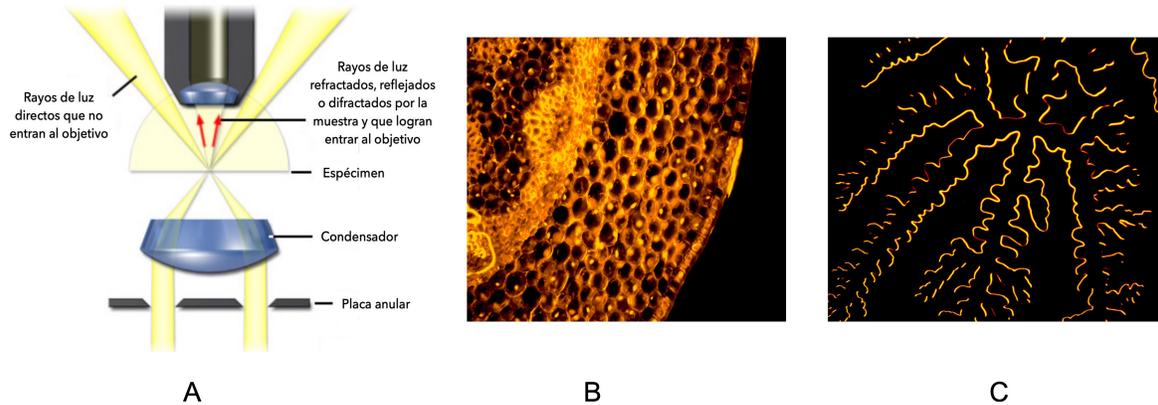


Figura 4. Iluminación por campo oscuro. (A) Elementos ópticos para generar campo oscuro. Los rayos de luz directos del cono invertido generado por la placa anular son tan oblicuos que no logran entrar la objetivo. Solo Únicamente pasan aquellos rayos reflejados, refractados o difractados por la muestra. (B) Corte transversal de una raíz perteneciente al género *Convallaria* y (C) Cristales formados por la desecación de una gota de solución salina sobre un portaobjetos. Imagen modificada de: <http://zeiss-campus.magnet.fsu.edu/articles/basics/contrast.html>. Fotografías por cortesía de Unidad de Microscopía INCan-RAI-UNAM.

Microscopía de fluorescencia

En los campos de biología, medicina o biomedicina (y en otras áreas), la microscopía de fluorescencia ha llegado a ser una herramienta indispensable para contestar muchas preguntas y en general para la realización de un sin número de proyectos. Fue en los años 30's cuando surgió el interés por aplicar esta técnica en las ciencias y en los 50's cuando se potenció su uso con la implementación de la inmunofluorescencia. Posteriormente, con la llegada de las proteínas

fluorescentes, la microscopía de fluorescencia se abrió paso en la investigación de células vivas. Las técnicas de microscopía mas modernas se basan en los principios de la microscopía de fluorescencia. La técnica se basa en la epi-iluminación (razón por la que también se le conoce como epi-fluorescencia), la cual consiste en colocar la iluminación y la detección en un solo lado del microscopio. Esto contrasta con la iluminación por transmisión, donde la muestra es iluminada de un lado, la luz se transmite a través de la muestra y del otro lado la señal es detectada (Figura 5).

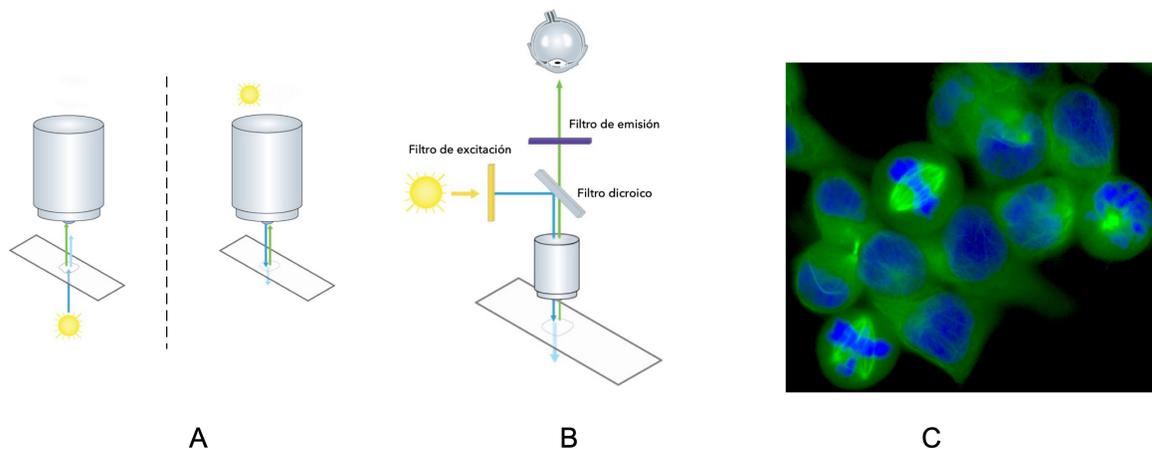


Figura 5. Microscopía de fluorescencia. (A) Mientras que en microscopía de luz transmitida la iluminación ocurre desde un lado de la muestra y la detección ocurre en el lado opuesto, en la microscopía de epifluorescencia, también llamada de luz reflejada, tanto la iluminación como la detección ocurren de un solo lado del microscopio. (B) En epifluorescencia es indispensable el uso de filtros de excitación, de emisión y dicróicos. (C) Inmunofluorescencia en células humanas de cáncer usando un anticuerpo anti-tubulina marcado con Alexa-Fluor 488 y DAPI para teñir el ADN nuclear. Imagen modificada de: <https://www.leica-microsystems.com/science-lab/milestones-incident-light-fluorescence-microscopy/>. Imagen cortesía de Unidad de Microscopía INCan-RAI-UNAM.

En la microscopía de fluorescencia se utilizan filtros de excitación, los cuales seleccionan un rango de longitudes de onda que han de excitar al fluoróforo de interés. El filtro dicróico refleja la luz de excitación hacia la muestra y posteriormente deja pasar sólo un rango de longitudes de onda en donde está incluida la de emisión del fluoróforo. El filtro de emisión deja pasar de forma más selectiva la emisión del fluoróforo hacia los oculares o hacia la cámara de captura de imagen.

Microscopía de células vivas

Una de las limitantes en microscopía de luz transmitida es que ésta requiere de muestras fijadas y teñidas con colorantes para visualizar la estructura celular. Sin embargo, no es posible usar estos colorantes en células vivas porque son tóxicos. La solución a este problema es el uso de técnicas de contraste como DIC y contraste de fases, aunque con éstas no es posible visualizar subestructuras celulares, lo cual también se soluciona con el empleo de moléculas fluorescentes que se introducen en las células vivas en forma de vectores de expresión y las cuales sí pueden marcar subestructuras, organelos o inclusive proteínas muy específicas en una región determinada en la célula. De hecho, en los experimentos con microscopía de células vivas es posible combinar técnicas de iluminación de contraste en campo claro con la epi-iluminación fluorescente (Figura 6). En el campo de la biomedicina hay ejemplos interesantes de la importancia de observar la dinámica celular. En animales vivos este tipo de microscopía ha demostrado una correlación directa entre la migración celular de células tumorales y el proceso de intravasación a torrente sanguíneo. Otros estudios *in vivo* han mostrado una interacción entre las células tumorales y los macrófagos [2].

Microscopía confocal

A altas magnificaciones o con especímenes muy gruesos la luz difusa de otros planos focales contribuye a la formación de la imagen, lo que reduce significativamente el contraste y la resolución (Figuras 7A y 7C). En microscopía confocal por otra parte, la fuente de iluminación es un láser y éste se concentra en un área pequeña de la muestra. La imagen es resultado del paso de la luz de emisión, de un solo plano focal o sección óptica, a través de un diafragma conocido como *pinhole*, el cual excluye la luz de emisión que proviene de otros planos focales. Esto reduce dramáticamente la luz difusa del fondo en la imagen y aumenta la resolución (Figuras 7B y 7D). Cambiando el plano focal se pueden capturar

imágenes de distintas secciones ópticas y reconstruirse una imagen tridimensional del espécimen (Figura 7E).

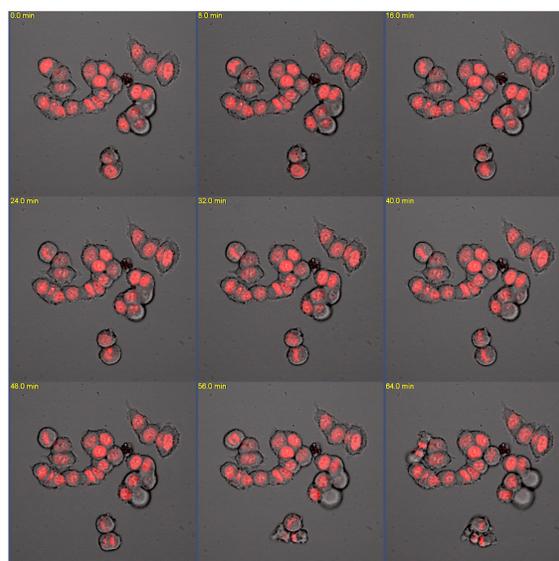


Figura 6. Microscopía de células vivas. Células de cáncer cultivadas *in vitro* y transfectadas con un vector que expresa la variante de histona H2B fusionada a la proteína fluorescente DsRED. El cultivo se deja incubando en el microscopio y se capturan imágenes cada 8 minutos. Imagen cortesía de Unidad de Microscopía INCan-RAI-UNAM.

En microscopía confocal se pueden usar técnicas de iluminación como FRET, FRAP, FLIP, TIRF, etc. La desventaja en la microscopía confocal es que se requieren potentes fuentes de láser debido a que a través del *pinhole* sólo pasa una pequeña cantidad de luz y entre más potencia en un láser, más daño a células vivas, si es que éstas son el espécimen por observar y estudiar [3]

Microscopía multifotónica

Esta técnica está basada también en microscopía de fluorescencia, usando láser como fuente de iluminación, pero en lugar de excitar el fluoróforo con un solo fotón como ocurre en microscopía confocal, dos fotones con la mitad de energía (y el doble de longitud de onda) pueden lograr la misma excitación. La microscopía de dos fotones o multifotónica, usa un láser pulsado, es decir que funciona disparando paquetes de fotones que son enfocados y concentrados en un área y plano focal de la muestra. La intensidad de la iluminación cae rápidamente por abajo y por arriba del plano focal de interés y dado que la probabilidad de absorción de dos fotones incrementa con la intensidad, la probabilidad de absorción de dos fotones también es baja fuera del plano focal. Por tanto, solo los

fluoróforos del plano focal son excitados y la luz de emisión de esa sección óptica es la que forma la imagen. Mientras que en la microscopía confocal los fluoróforos fuera del plano focal también son excitados, pero la emisión de estos es excluida

gracias al uso del *pinhole*, en la microscopía multifotónica la absorción y emisión fotones ocurre sólo en un estrecho volumen (en el plano focal), por tanto, no es necesario el uso de un *pinhole*.

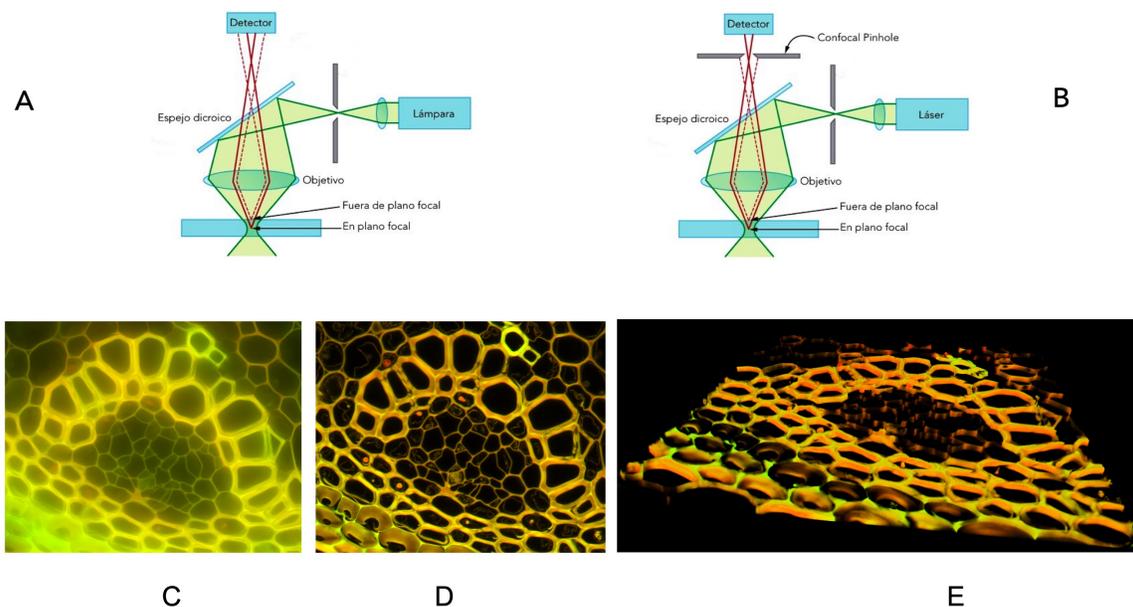


Figura 7. Microscopía confocal. Diferencias en el mecanismo de microscopía de epifluorescencia convencional (A) y de microscopía confocal (B). En este último vemos que un diafragma (*pinhole*) sólo permite el paso de luz del plano focal de interés (línea roja continua). (C) Imagen de epifluorescencia convencional de un corte transversal de una raíz del género *Convallaria*. (D) Imagen de microscopía confocal de la misma raíz. Nótese la diferencia en contraste y resolución en ambas imágenes gracias a la eliminación de esa luz difusa proveniente de otros planos focales, que está presente en (C) mediante el uso de un *pinhole*. (E) Imagen tridimensional de la misma raíz, resultado de capturar imagen de distintas secciones ópticas o planos focales en ese espécimen. Imagen cortesía de Unidad de Microscopía INCAN-RAI-UNAM.

Interesantemente, dado que fuera del plano focal el espécimen es expuesto a una baja intensidad del láser, el fotoblanqueo y fototoxicidad ocurren sólo en el plano focal y entonces la muestra en conjunto se expone a menor radiación potencialmente dañina. Por tanto, la microscopía multifotónica es ideal para microscopía de células vivas (Figura 8A y 8B). Una segunda ventaja de la microscopía multifotónica es que se usa un láser infrarrojo, el cual a diferencia de la luz ultravioleta o de la luz visible, penetra a mayor profundidad en un tejido. Aunque la luz de emisión todavía se dispersa través del tejido (lo cual disminuye si se usan técnicas de clarificación durante la preparación de la muestra), es más plausible penetrar el tejido hasta 200 μm , lo cual contrasta con la microscopía confocal donde la penetración de la luz está alrededor de 100 μm en un tejido [2].

Microscopía de súper resolución

Aun usando lentes con la mayor apertura angular posible en un medio con el mayor índice de refracción posible, la ecuación de Abbe limita la resolución óptica en aproximadamente 200 nm. Este

límite se debe principalmente a una propiedad inherente de la luz, que es la difracción. Por mucho tiempo se pensó que este límite era insuperable pero recientemente se han desarrollado metodologías en microscopía que finalmente lo han logrado, llegando a una resolución de alrededor de 10 a 130 nm, permitiendo a los científicos estudiar una amplia gama de fenómenos con gran detalle, desde subestructuras celulares hasta el movimiento individual de vesículas u otros cuerpos. Ejemplos de estas metodologías son Reducción de la Emisión Estimulada (STED por sus siglas en inglés derivadas de *Stimulated emission depletion*), Microscopía de localización Fotoactivada (PALM, *photoactivated localization microscopy*), Microscopía de Reconstrucción Óptica Estocástica (STORM, *stochastic optical reconstruction microscopy*) y Microscopía de Iluminación Estructurada (SIM, *structured illumination microscopy*) (Tabla 1) [2].

Microscopía de Iluminación Estructurada (SIM)

El procedimiento de obtención de una imagen por microscopía SIM incluye la iluminación de una

muestra con una serie de patrones en rayas sinusoidales de alta frecuencia espacial conocidos como patrón Moiré (Figura 9A). Estos patrones son generados por un láser que pasa a través de una rejilla óptica móvil y que se proyecta a través del objetivo sobre la muestra. El movimiento de esta rejilla disminuye la difracción de la luz y genera

patrones con diferentes orientaciones los cuales son capturados por el microscopio (Figura 9B). La imagen generada es luego procesada usando algoritmos computacionales, los cuales estiman los parámetros para discernir los componentes superpuestos en la imagen, obteniendo de este modo una imagen de alta resolución [4].

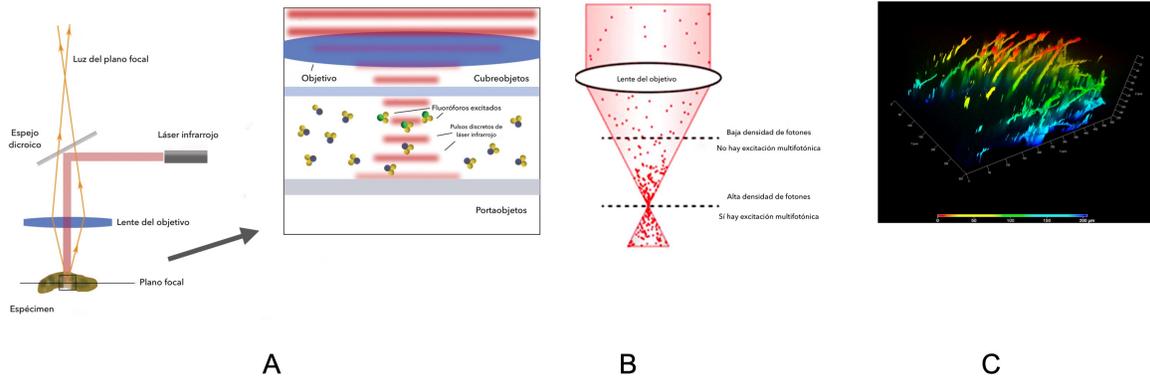


Figura 8. Microscopía multifotónica. (A) y (B) El láser infrarrojo pulsado penetra hasta el plano focal y solo ahí se excitan y emiten los fluoróforos, por lo que la técnica no necesita del *pinhole* y la muestra sufre de menos fototoxicidad y fotoblanqueo. (C) Imagen de una pata de araña. El código de color indica la profundidad, la cual es de 200 μm . Imagen cortesía de Unidad de Microscopía INCan-RAI-UNAM.

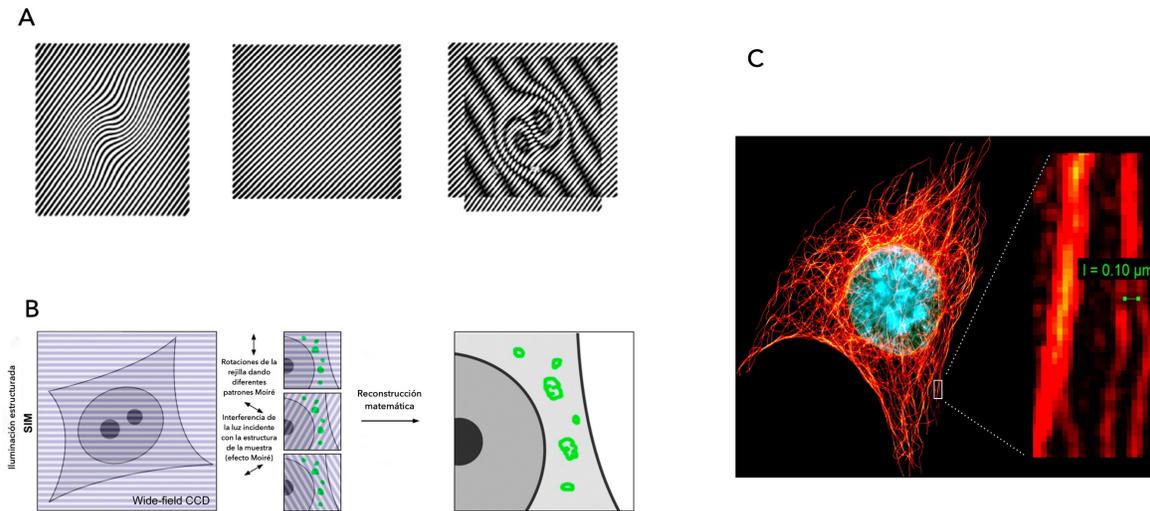


Figura 9. Iluminación estructurada. (A) Usando un patrón de finas líneas como fuente de iluminación se interfiere con los detalles estructurales de la muestra y se genera un nuevo patrón, conocido como de Moiré. (B) Este patrón no necesariamente se asemeja a la muestra, pero colectando una serie de imágenes en donde el patrón de iluminación cambia, se desplaza o rota ligeramente, la estructura subyacente de la muestra puede ser calculada. La interferencia ocurre sólo en el plano focal y conforme el patrón de iluminación varía, la luz proveniente de otros planos focales es invariable y puede substraherse de la imagen final; de esta manera se reduce el efecto de difracción y se obtienen imágenes en una sola sección óptica. Imagen modificada de [1] y [4]. (C) Imagen de una célula humana usando SIM. Nótese la resolución obtenida entre dos filamentos, de hasta 100 nm. Imagen cortesía de Unidad de Microscopía INCan-RAI-UNAM.

Reducción de la Emisión Estimulada (STED)

En esta microscopía se usa una fuente de luz, llamada luz de agotamiento, la cual lleva un

fluoróforo excitado al estado de energía más bajo (es decir, el estado basal) antes de que pueda emitir una señal de fluorescencia. En la práctica, la luz de agotamiento se aplica como un patrón que rodea el

punto focal del láser de excitación. Este haz de agotamiento tiene una forma de rosquilla con una intensidad cero en el centro, generado por el paso a través de una placa apropiada. Esto reduce el tamaño de la región de excitación en las moléculas que emiten fluorescencia, como si el "punto focal" del láser estuviera afilado. Al escanear este punto afilado

a través de una muestra, se puede grabar una imagen de súper resolución (Figura 10), No se requiere de ningún procesamiento posterior a la adquisición [4, 5]. En muestras biológicas, las imágenes STED han alcanzado una resolución de 20 nm cuando se usan colorantes orgánicos y una resolución de 50–70 nm cuando se usan proteínas fluorescentes.

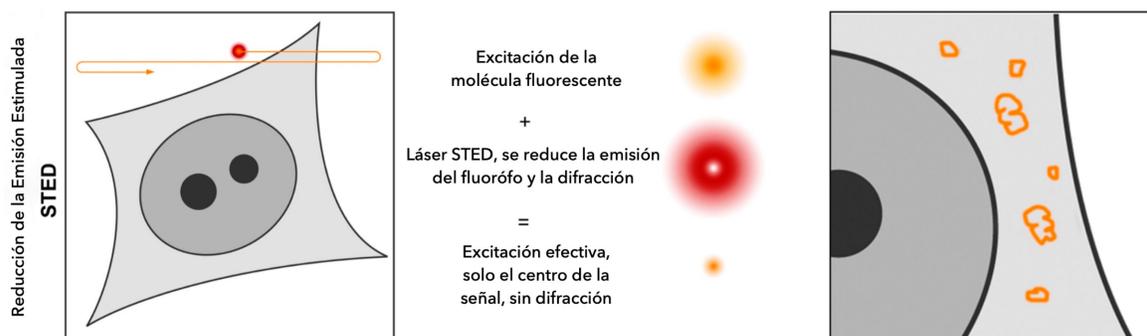


Figura 10. Microscopía STED. En esta microscopía el plano focal se escanea con dos rayos láser superpuestos, que usualmente se pulsan con un mutuo retraso. Mientras que el primer láser excita a los fluoróforos, el segundo láser de longitud de onda más larga hace que los fluoróforos regresen al estado basal mediante el proceso de emisión estimulada. En la trayectoria de la luz del láser de agotamiento, una placa genera una distribución de energía en forma de rosquilla, dejando sólo un pequeño volumen desde el cual se puede emitir la luz que luego se detecta. Por lo tanto, la emisión de la molécula se conforma de un volumen más pequeño que el límite de difracción.

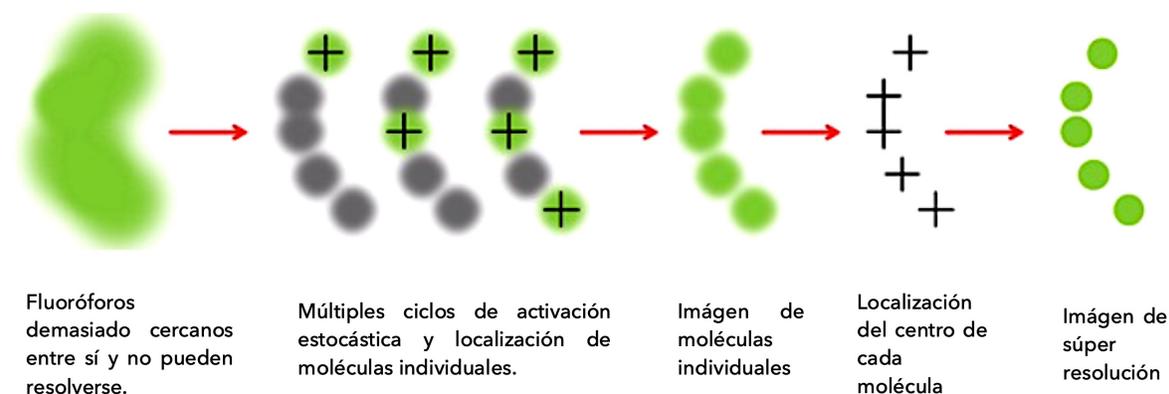


Figura 11. Microscopía de localización de una sola molécula. Esta microscopía se asegura que sólo unos cuantos fluoróforos estén en estado activo o de emisión. Esto se logra a través de la fotoactivación, fotoparapadeo o fotoconversión en donde las moléculas individuales son activadas de forma estocástica y son detectadas por una cámara CCD como puntos limitados por difracción y cuya posición lateral se determina con gran precisión. Posteriormente se usa la posición de cada una de las moléculas individuales, obtenidas de varios cientos de imágenes con distintas poblaciones de moléculas activas en momentos específicos, para crear un mapa de densidad de moléculas y reconstruir la imagen con cada molécula individual

Localización y composición de una sola molécula (PALM/STORM)

La microscopía PALM desarrollada por Betzig y col., en el 2006 [6] y STORM desarrollada por el grupo de Zhuang casi al mismo tiempo [7]. Estos métodos se basan en el intercambio de los fluoróforos entre un estado 'ENCENDIDO' y

'APAGADO'. Este intercambio estocástico ofrece la posibilidad de que sólo un subconjunto aleatorio de fluoróforos activados puedan ser lo suficientemente escasos para ser resueltos ópticamente en un momento determinado. En cada ciclo de formación de imágenes un subconjunto distinto y disperso de fluoróforos es activado y ópticamente resuelto, lo que permite que sus posiciones se determinen con

precisión después del análisis de las imágenes por un algoritmo matemático. En última instancia, las imágenes de súper resolución se reconstruyen mediante la integración de la información de la posición de miles de marcos. La precisión de localización de las técnicas PALM y STORM depende de que se capturen suficientes fotones en cada evento de activación y, por tanto, de la confiabilidad de los fluoróforos utilizados [8]. Aunque trabajan con el mismo principio, las técnicas

PALM y STORM emplean diferentes fluoróforos independientemente fotoactivables. Los fluoróforos que se emplean habitualmente en PALM son proteínas fluorescentes codificadas genéticamente o fluoróforos orgánicos que se someten a algunos ciclos de fotoconversión o fotoactivación antes de ser blanqueados en forma permanente. En el caso de STORM, las sondas fluorescentes son fluoróforos orgánicos con frecuencia fotoactivables de manera reversible [9].

Tabla 1. Técnicas de microscopía de súper resolución

	Microscopía de Iluminación Estructurada (SIM)	Reducción de la Emisión Estimulada (STED)	Microscopía de localización Fotoactivada (PALM) y Microscopía de Reconstrucción Óptica Estocástica (STORM)
Principio	Usan patrones de luz interferida para crear un efecto Moiré a partir del cual la información de alta resolución puede ser extraída.	Reduce el volumen de excitación efectivo con un láser de agotamiento.	Activa estocásticamente un subconjunto de sondas fotoactivables a la vez, y entonces determina la posición del centroide de cada función de dispersión de puntos.
Tipo de microscopía	Iluminación de campo amplio	Confocal de escaneo laser	Iluminación de campo amplio
Resolución xy	100-130 nm	20-70 nm	10-30 nm
Resolución axial	~300 nm	40-70 nm	10 – 75 nm
Sondas	Colorantes orgánicos fotostables comunes y proteínas fluorescentes.	Colorantes orgánicos fotostables particulares y proteínas fluorescentes.	PALM: proteínas fluorescentes fotoactivables STORM: colorantes orgánicos fotoactivables
Resolución temporal	Milisegundos a segundos	Milisegundos a segundos	Segundos a minutos
Fotodaño	Bajo a moderado	Moderado a alto	Moderado
Fotobleaching	Moderado a alto	Moderado a alto	Alto para fluoróforos sencillos, bajo en general.
¿Imágenes de células en vivo?	Si	Si	Si
¿Procesamiento de imágenes post-captura?	Si	No	Si
Número máximo de colores simultaneos	4	3	PALM: 2 STORM: 3
Consideraciones	Preparación de muestras. El algoritmo de reconstrucción puede causar artefactos.	La mejor resolución temporal en la resolución espacial más alta; sin embargo, puede ser a expensas de la resolución axial.	La resolución espacial más alta; sin embargo, es sensible a densidad del marcaje. La interferencia entre fluoróforos puede ser un problema.

Microscopía de iluminación selectiva de planos ópticos: Microscopía *Lightsheet*

Este tipo de microscopía, en donde la muestra es iluminada por una lámina de luz, está siendo cada vez más popular sobre todo en las áreas de biología del desarrollo. La microscopía de fluorescencia *Lightsheet* es la tecnología que conecta la calidad de imagen de la estereomicroscopía de fluorescencia con la imagen de alta resolución de muestras fijadas. Se caracteriza por tener alta penetración, bajo fotoblanqueo, baja fototoxicidad y alta velocidad en la adquisición de imagen, por lo que esta técnica es la idónea para capturar imágenes de embriones vivos u otros organismos vivos en alta resolución, en tres dimensiones y por largos periodos de tiempo, razón por la cual la microscopía *Lightsheet* fue elegida método del año en 2014.

Esta técnica es iluminación por sección óptica, tal como ocurre con una microscopía multifotónica. Utiliza un plano o lámina de luz que sólo ilumina un plano focal o sección óptica, lo que permite alcanzar una mayor profundidad en el espécimen. Dado que la

muestra está expuesta únicamente a un delgado haz de luz, el fotoblanqueo y fototoxicidad son mínimos en comparación con la microscopía de fluorescencia convencional, confocal o inclusive la multifotónica. En añadidura, el uso de una lámina de luz que sólo ilumina el plano focal reduce drásticamente la luz proveniente de otros planos focales y reduce la relación señal sobre ruido (Figura 12A y 12B).

Para la microscopía *Lightsheet* se requieren de muestras tridimensionales, ya sean fijadas o vivas, por lo que se requiere de una preparación particular. Para la introducción al microscopio las muestras no están en portaobjetos o recipientes de cultivo, sino que están en una columna de material cilíndrico para que la muestra pueda rotarse mientras se hace la captura de imagen y para que, si está viva, pueda también estar inmovilizada. El tipo de muestras para esta técnica pueden ser desde levaduras, plantas en crecimiento, cultivos tridimensionales de células humanas, embriones de pez cebra u otro animal, insectos, biopsias de tejidos, y muchos más. (Figura 12C) [10].

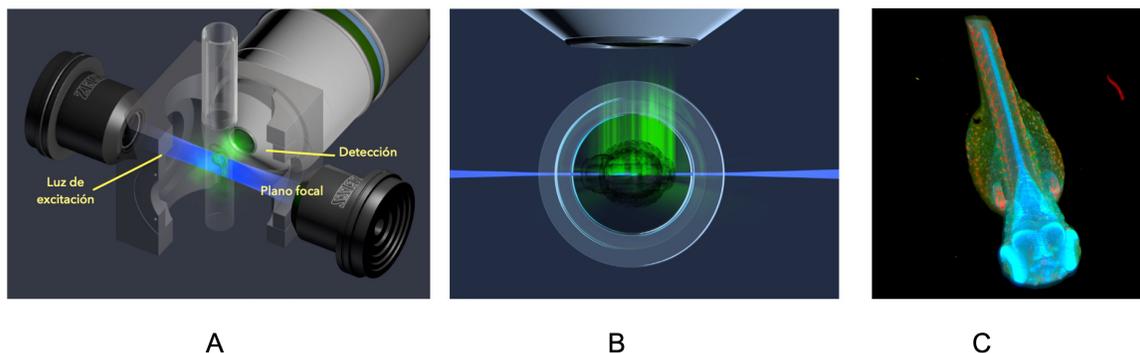


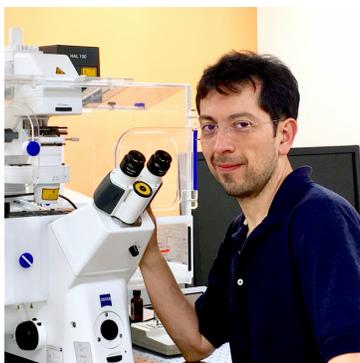
Figura 12. Microscopía *Lightsheet*. (A y B) Un haz de luz en forma de lamina plana ilumina y excita sólo una sección óptica de la muestra, la detección de la emisión se realiza con otro objetivo. Las muestras que se montan al microscopio son tridimensionales y vienen montadas en una columna, que puede ser de aire o de agua matriz o gel para inmovilizar al organismo vivo. Imágenes modificadas de <https://www.zeiss.com/microscopy/int/products/imaging-systems/lightsheet-z-1.html>. (C) Esta técnica de microscopía es idónea para observar el desarrollo de embriones de pez cebra o de otros organismos en 3D y en el tiempo. Imagen cortesía de Unidad de Microscopía INCAN-RAI-UNAM.

Referencias

1. <http://zeisscampus.magnet.fsu.edu/articles/basics/contrast.html>
2. Schmolze, D. B., Standley, C., Fogarty, K. E., and Fischer, A. H. (2011) Advances in microscopy techniques. *Arch Pathol Lab Med.* **135**, 255–63
3. Wollman, A., Nudd, R., Hedlund, E., and Leake, M. (2015) From Animaculum to single molecules: 300 years of the light microscope. *Open Biol.* **5**, 150019–150019
4. Schermelleh, L., Heintzmann, R., and Leonhardt, H. (2010) A guide to super-resolution fluorescence microscopy. *J Cell Biology.* **190**, 165–175
5. Huang, B., Babcock, H., and Zhuang, X. (2010) Breaking the Diffraction Barrier: Super-Resolution Imaging of Cells. *Cell.* **143**, 1047–58
6. Betzig, E., Patterson, G. H., Sougrat, R., Lindwasser, W. O., Olenych, S., Bonifacino, J. S., Davidson, M. W., Lippincott-Schwartz, J., and Hess, H. F. (2006) Imaging Intracellular Fluorescent Proteins at Nanometer Resolution. *Science.* **313**, 1642–1645
7. Rust, M. J., Bates, M., and Zhuang, X. (2006) Subdiffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM). *Nat Methods.* **3**, nmeth929
8. Patterson, G., Davidson, M., Manley, S., and Lippincott-Schwartz, J. (2010) Superresolution Imaging using Single-Molecule Localization. *Annu Rev Phys Chem.* **61**, 345–367

9. Toomre, D., and Bewersdorf, J. (2010) A New Wave of Cellular Imaging. *Annu Rev Cell Dev Bi.* 26, 285–314
10. Luis, G.-H., Flood, P. M., and Reynaud, E. G. Light Sheet Fluorescence Microscopy: beyond the flatlands. *Current*

Microscopy Contributions to Advances in Science and Technology. 838-847, Formatex 2012.



DR. ALEJANDRO LÓPEZ SAAVEDRA

Investigador en ciencias médicas C y responsable de la Unidad de Microscopía Avanzada en la Unidad Biomédica de Investigación en Cáncer del Instituto Nacional de Cancerología (INCan) y de la Red de Apoyo a la Investigación (RAI - UNAM).

Estudió ingeniería bioquímica en el Instituto Tecnológico de Celaya y realizó sus estudios de

posgrado de maestría en ciencias biológicas y doctorado en ciencias biomédicas en la UNAM.

Al frente de la Unidad de Microscopía Avanzada (INCan-RAI-UNAM) ha realizado diversos cursos de especialización en los cuarteles generales de la compañía Carl Zeiss de Alemania y coordina el apoyo técnico y científico para las aplicaciones clínicas del INCan y para proyectos de investigación de distintas instituciones.

Es docente de la Facultad de Ciencias de la UNAM impartiendo cursos en el taller de bases moleculares del cáncer y también ha apoyado en distintos tópicos de posgrado.

Es miembro del Sistema Nacional de Investigadores nivel I, cuenta con 14 publicaciones, 1 capítulo de libro, 2o lugar en el premio del XX Encuentro Nacional de Investigadores de la Secretaría de Salud, 2015 y su línea de investigación estudia la relación entre la inestabilidad cromosómica y la quimiorresistencia en cáncer.