

35 años de microscopía electrónica en Costa Rica

Fecha de recepción: 15/03/2010

Fecha de aceptación: 27/09/2010

Francisco Hernández Chavarría¹

Palabras clave

Microscopía electrónica, ultraestructura, virus, parásitos.

Resumen

En el 2009 se cumplió el XXXV aniversario de la microscopía electrónica en Costa Rica; su historia se inició con la donación de un microscopio, por parte de Japón, la cual se ha consolidado en el Centro de Investigación en Estructuras Microscópicas, de la Universidad de Costa Rica (UCR), entidad que realiza investigación propia y brinda apoyo a diferentes dependencias de la Universidad, universidades estatales y del sector privado. Estos equipos permiten observar el mundo infinitamente pequeño y maravilloso que nos rodea.

Key words

Electron microscopy, ultrastructure, virus, parasites.

Abstract

In 2009 was the XXXV anniversary of the electron microscopy in Costa Rica; its history began with the donation of a microscope by Japan and the establishment of an Unite of electron microscopy, which has been consolidated in the Centre of Research in microscopic structures of the University of Costa Rica (UCR). This center realizes its own research and collaborates with different dependencies of the University and the private sector. The electron microscopes of the UCR allow to observe of the infinitely small and wonderful world around us.

1. Facultad de Microbiología, Centro de Investigación en Estructuras Microscópicas (CIEMic) y Escuela de Artes Plásticas. Universidad de Costa Rica. Correo electrónico: franciscohernandezch@gmail.com

Introducción

La historia de la microscopía electrónica en Costa Rica se inicia en 1970, con el ofrecimiento de compra de un microscopio, por parte del entonces presidente de la República, don José Figueres, a los médicos Rodolfo Céspedes y Pedro Morera. Esas tres personas habían coincidido en la conferencia inaugural de un Congreso Médico Centroamericano, donde se presentaban los hechos más relevantes de *Angiostrongylus costarricensis*, un verme intestinal recién descubierto en aquel momento por los doctores Morera y Céspedes (1971); en la conferencia se mencionaba parte del ciclo de vida del parásito, en el cual las larvas infectantes son dejadas por las babosas en su rastro de baba.

El presidente Figueres, invitado a la inauguración del congreso, hizo alusión a sus antecedentes de agricultor, se mostró muy entusiasta con el descubrimiento de dicho parásito y ofreció ayuda del gobierno para continuar la investigación; los médicos, por su lado, indicaron que necesitaban un microscopio electrónico.

El Dr. Aguilar Bonilla, primer vicepresidente de la República en esa administración, canalizó la solicitud y finalmente se consolidó con la donación que hizo el gobierno de Japón, mediante lo que hoy es la Agencia Japonesa de Cooperación Internacional (JAICA, por sus siglas en inglés); esa colaboración se extendió por muchos años, donando equipos y entrenando a científicos nacionales en Japón y en Costa Rica, mediante la visita de expertos entre los que destacan los médicos Hiroshi Akahori y Yoshimichi Kazuka (Hernández-Chavarría, 1988).

Con el primer microscopio donado en 1974 (figura 1) se fundó la Unidad de Microscopía Electrónica (UME), que estuvo ubicada detrás de la Facultad de Medicina hasta 1995, cuando pasó a ocupar un nuevo edificio en la Ciudad de la Investigación, donde actualmente se ubica. Posteriormente, en el 2001 se consolidó como el Centro de Investigación en Estructuras Microscópicas (CIEMic). En la actualidad cuenta con dos



Figura 1.

microscopios electrónicos de transmisión (MET) y dos de rastreo (MER), además de equipo de microscopia óptica, incluyendo un microscopio confocal láser.

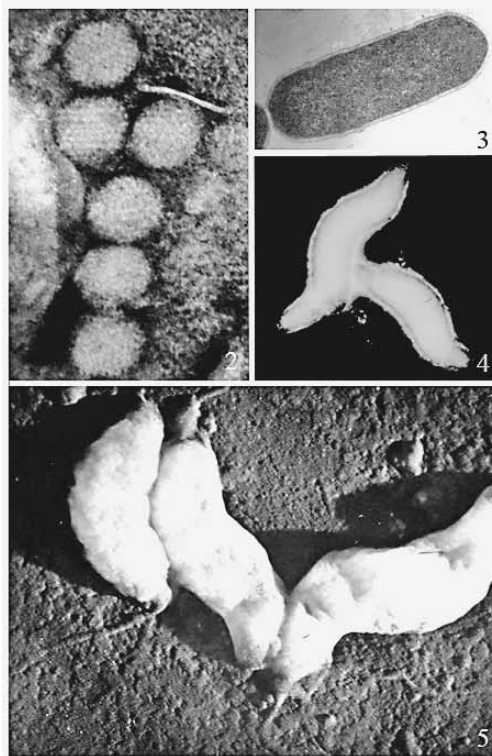
¿Qué es microscopía electrónica?

El término electrónico que califica a este microscopio se debe a que la imagen es obtenida por un haz de electrones que es arrancado de un filamento de tungsteno (W, Wolframio) al calentarse mediante un voltaje de aceleración, que en el MET usualmente es de 100 Kilovoltios (Kv) y en el MER es de unos 15 Kv. En la mayoría de los microscopios, el fenómeno físico por el cual se arrancan esos voltios, corresponde al denominado efecto termiónico, que consiste en calentar el material hasta superar la energía de trabajo (Ew, por sus siglas en inglés), que es la energía que mantiene los electrones de un determinado elemento en sus orbitales. Para el tungsteno, la Ew es de 4.2 electrón voltio, que se alcanza a 2700°K. Esos electrones son convertidos en un haz y enfocados mediante electroimanes, de una manera análoga a como un lente de vidrio enfoca un haz de luz; de hecho, las mismas leyes de óptica son válidas para los lentes de vidrio y los electromagnéticos (Meek, 1976).

La clave para el gran aumento alcanzado con los microscopios electrónicos radica en la pequeñez de la longitud de onda de los electrones, lo cual permite una resolución de 1.4 Å en MET y de 50 a 70 nm en los MER, como los que tiene el CIEMic.

Los dos tipos fundamentales de microscopios electrónicos a los que se ha hecho referencia (MET y MER) generan imágenes diferentes. Si bien el primero tiene tal resolución que permite analizar virus, usualmente sus imágenes son planas; no obstante, con algunas

técnicas especiales se pueden obtener imágenes tridimensionales. En tanto, en el MER este es el tipo de imagen normal, aunque con menor resolución.



Las figuras 2 a 5 corresponden a imágenes de MET: la primera es una tinción negativa de una muestra de heces de un niño con diarrea asociada a adenovirus entéricos; la figura 3 corresponde a un corte de la bacteria *Clostridium tetani*, y las otras dos corresponden a la bacteria *Campylobacter jejuni*; la figura 4 es una tinción negativa y la 5 es una preparación realizada mediante la técnica de sombreado, que consiste en bombardear la preparación con partículas de platino evaporado en un evaporador de metales, lo cual brinda una imagen de carácter tridimensional. Por otra parte, las figuras 6 a 9 corresponden a MER: la 6 es una *Giardia intestinalis*, protozoo parásito; en la 7 se muestran unas escamas del ala de la mariposa *Urania fulgens*; la 8 es una de las garras de la pata de un Geko, se observa

Figura 2, 3, 4, 5.

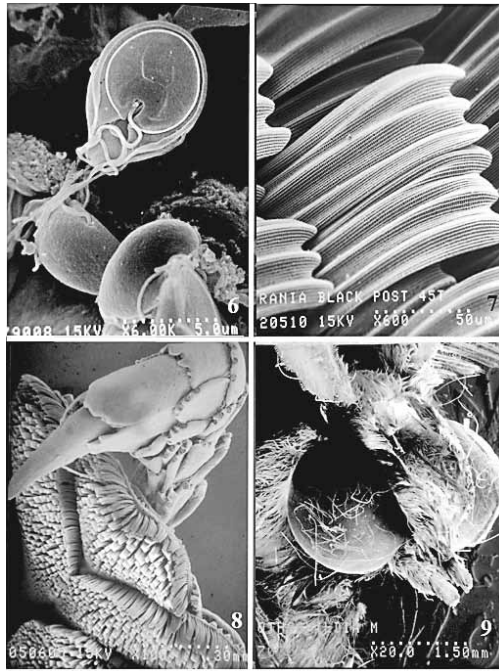


Figura 6, 7, 8, 9.

los cojines de fibrillas que le permiten adherirse a las superficies lisas; finalmente, la figura 9 corresponde a la cabeza de la mariposa nocturna *Roschildia lebeau*.

Obviamente, la preparación de los especímenes es diferente para cada tipo de microscopio; por ejemplo, un fragmento de tejido animal debe fijarse y deshidratarse hasta etanol de 100% y, a partir de este paso, se diferencia para cada microscopio. Para el MET, se embebe en resina y luego se secciona, sacando cortes de solo unos 90 nm de grosor. Para el MER, se seca mediante un método que preserve la estructura, evitando el colapso o las deformaciones, lo cual se logra secando en punto crítico con CO₂ o embebiéndolo en ter-butano y sublimándolo a presión reducida. Estos procesos son un tanto lentos, pero pueden acelerarse empleando un horno de microondas, con lo cual los periodos de fijación de una o dos horas se reducen a dos minutos, lo mismo que los

pasos de deshidratación, que normalmente son de diez minutos. En total, desde la fijación hasta etanol de 100%, con el método estándar se necesitan de 8 a 10 horas, mientras que usando microondas, ese proceso se reduce a unas dos horas (Hernández-Chavarría y Guillén, 2000; Hernández-Chavarría, Vargas-Montero, 2001; Hernández-Chavarría, 2004).

¿Cómo se forma la imagen?

En el MET, la imagen es generada por los electrones que atraviesan la muestra, y al interactuar con sus átomos modifican su energía y trayectoria, que al final impactan en una pantalla fotosensible, donde se convierten en destellos, cuya intensidad depende de su energía y forman la imagen, o bien, impactan una placa fotográfica que la registra.

En el MER, los electrones son enfocados sobre una pequeña zona de la muestra en la cual interactúan con los átomos de esta, generando una serie de señales, entre ellas, las más empleadas son los electrones secundarios y los rayos X característicos. En ambos casos, un electrón proveniente del haz generado en el filamento choca contra un electrón de la muestra y le cede parte de su energía al grado de liberarlo de su átomo y salir expelido de la muestra; este se denomina electrón secundario y lleva información de la topografía del espécimen de donde partió. Es capturado por un dispositivo llamado fotomultiplicador, que aumenta su señal y finalmente lo conduce a un tubo de rayos catódicos, como el tubo de un televisor en blanco y negro, que genera la imagen.

Los rayos X se generan cuando un electrón del mismo átomo que perdió el electrón secundario, pero de un orbital más externo, salta a ocupar la vacante y la energía sobrante es emitida como un fotón de rayos X. Debido a que esa energía es característica para cada elemento dependiendo del orbital involucrado, es posible medirla y determinar el elemento que la produjo, con lo cual se puede hacer un análisis químico elemental de la muestra.

Impacto de la microscopía electrónica en Costa Rica

Durante estos 35 años, los principales aportes de la microscopía electrónica en Costa Rica han sido en el área biomédica, tanto en el diagnóstico histopatológico de enfermedades como en la identificación de los agentes microbianos causantes de cuadros poco comunes, especialmente aquellos de etiología viral; como ejemplo, está el caso de una niña recién nacida, que murió por una hepatitis viral y cuyos hallazgos ultraestructurales permitieron asociar el cuadro clínico a virus herpes, lo cual se corroboró indirectamente con la historia clínica de la madre, que presentó lesiones herpéticas en genitales (Rivera et ál., 1996).

Dentro de los logros más importantes están los estudios de etiología y epidemiología de diarreas infantiles, que condujeron a los primeros diagnósticos en el país sobre virus relacionados con esta enfermedad; para esa época solo se diagnosticaba etiológicamente un 20% de las diarreas, quedando el resto como de etiología inespecífica, aunque en 1973 se había descrito una etiología viral que involucraba a un nuevo virus, denominado rotavirus, como causante de una gran proporción de las diarreas inespecíficas y que incluso era responsable de brotes epidémicos (Bishop et ál. 1973; Flewett et ál. 1973).

En 1977, solo cuatro años después del descubrimiento de ese virus, se describió la primera epidemia por ese agente en Costa Rica (Hernández et ál. 1977), empleando el MET como herramienta diagnóstica; posteriormente, la gama de virus asociados con diarreas incluyó a coronavirus, adenovirus entéricos y astrovirus, entre otros, y el perfil epidemiológico descrito en 1977 sigue vigente con brotes de diarrea a finales y principios de año, como se confirmó nuevamente en 1997 (González et ál. 1997). También han sido relevantes los aportes de la microscopía electrónica en otros campos, como salud animal y vegetal, biología y en áreas no biológicas, como física, química, geología, arqueología y otros campos del saber. Actualmente, el grupo de investigadores que estudian los problemas fitopatológicos es de los más activos en microscopía electrónica.

Para la celebración del 35 aniversario de la *Revista de Biología Tropical*, se hizo una reseña de las investigaciones más importantes publicadas, en las cuales la microscopía electrónica había sido pieza clave (Hernández Chavarría, 2002). Esta publicación puede consultarse en la dirección electrónica http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-77442002000300013&lng=es&nrm=iso

Conclusión

En el trigésimo quinto aniversario de la microscopía electrónica en Costa Rica, se hace reseña de su evolución, desde los primeros pasos dados con el primer microscopio y la creación de la UME, hasta su consolidación como el CIEMic; durante este periodo, ha sido un laboratorio de referencia de microscopía electrónica para Centroamérica, y por mucho tiempo fue un centro de entrenamiento en esta disciplina, para países de Suramérica, Centroamérica y el Caribe. Actualmente, el CIEMic es uno de los centros de investigación de la UCR, con una producción científica importante, y sigue las políticas de colaboración con las distintas dependencias que requieren sus servicios, tanto en la Universidad de Costa Rica como del sector privado, al cual se le venden servicios.

Es importante conocer la existencia de estos equipos en el país y que se pueda admirar el mundo infinitesimal al cual es posible asomarse empleando tales equipos, que representan un verdadero logro y orgullo para la Universidad de Costa Rica.

Bibliografía

- Bishop, RF; Davison, DP; Holmes IH & Ruck BJ. (1977). *Virus particles in epithelial cells of duodenal mucosa from children with acute non-bacterial gastroenteritis*. Lancet 2:1281, 1977.
- Flewett, TH; Bryden, AD & Davies, H. (1977) *Virus particles in gastroenteritis*. Lancet 2: 1497.
- González, P; Sánchez, A; Rivera, P; Jiménez, C; Hernández, F. *Rotavirus and Coronavirus outbreak: etiology of annual diarrhea in Costa Rican children*. Rev Biol Trop. 45: 989-991, 1997.
- Hernández, F; Mata, L; Lizano, C. & Mohs, E. (1977). *Prevalencia de rotavirus y descripción de una epidemia de diarrea por este agente en Costa Rica*. Acta Méd Costarric 20: 297-304.
- Hernández Chavarría, F. *Historia de la Microscopia Electrónica: II La microscopia electrónica en Costa Rica*. Rev Costarric Cienc Med. 1988; 9: 9597.
- Hernández Chavarría, F. & Guillén, R. (2000). *Microwave processing for scanning electron microscopy*. Europ. J. Morphol. 38: 109-111.
- Hernández Chavarría, F. & Vargas-Montero, M. (2001). *Rapid contrasting of ultrathin sections using microwave irradiation with heat dissipation*. J Microsc. 203: 227-230.
- Hernández Chavarría, F. (2002). *Una visión de la biología tropical a través del microscopio electrónico*. Rev Biol Trop. 50: 927-940.
- Hernández Chavarría, F. (2004). *Microwave irradiation for bacterial analysis at scanning electron microscope*. Rev Latinoamer Microbiol. 46: 80-84.
- Meek, G. A. (1976). *The development of the Electron Microscope*. En: Practical electron microscopy for biologists 2nd Ed. John Wiley & Sons, London, 43-75.
- Morera P; & Céspedes, R. (1971). *Angiostrongylus costaricensis n. sp. Nematoda:Metastrongylidae) a new lung-worm occurring in man in Costa Rica*. Rev. Biol. Trop. 18: 173-185.
- Rivera, P; Hernández Chavarría, F & Santamaría, S. (1996). *Hepatitis herpética infantil: Descripción de un caso y revisión de la literatura*. Rev. Cost. Cienc. Méd. 17: 69-73.