

MANUAL DE MICROSCOPIA

Por Bruno P. Kremer, traducido por Joan Farré. Editorial Omega; Barcelona, 2012.

Técnicas ópticas y tintoriales

La importancia de la metodología

Cuando me llegó el libro que lleva por título *Manual de microscopia*, lo abrí con gran atención. Una obra nueva siempre despierta interés, motivación, pero en este caso la curiosidad es superior a la habitual por dos cuestiones: primera, ¿qué puede aportar de nuevo esta obra? Disponemos de un número muy aceptable de manuales de microscopía óptica; muchos de ellos, de la mitad del siglo xx, ya se han convertido en clásicos. Algunos son guías-formulario que permiten preparar diversidad de reactivos específicos para visualizar y poder estudiar células y tejidos animales y vegetales. Han sido y continúan siendo textos de referencia, dado que múltiples métodos tintoriales que figuran en ellos son totalmente válidos en la actualidad. Entre otros textos citaremos el Romeis (1928), el Langeron (1949), el Gabe (1968), el Martoja-Martoja (1970), muchos de ellos publicados por la prestigiosa editorial francesa Masson.

Cabe señalar que la fecha de publicación de dichas obras es de entrada un obstáculo, por varias razones: hay quien considera que lo que contiene un texto de mediados del siglo pasado es obsoleto e inservible; además, algunas de estas obras son difíciles de encontrar, hay que saber buscarlas en los santuarios de las grandes obras.

Efectivamente, hay obras que fueron de referencia en su momento y que han quedado olvidadas a pesar de que su principal interés reside en su carácter casi enciclopédico. Ofrecen recetas y fórmulas para la preparación de muestras muy diversas; en general, materiales que están

a nuestro alcance: pelos, plumas, sangre, granos de almidón y de polen de diversas especies, distintos tipos de madera, microorganismos acuáticos y terrestres, formas adultas y larvianas de especies terrestres y acuáticas, etcétera. Son como un «cajón de sastre», una fuente generosa de informaciones heterogéneas. En este sentido quiero recordar los dos volúmenes de E. Séguéy, *Le microscope: Emploi et applications* (Paul Lechevalier, París 1951), y la *Microscopia analítica* de T. E. Wallis (Acribia de Zaragoza, 1967). Con el mismo enfoque de este texto, la editorial Omega publicó la traducción del alemán del magnífico libro de W. Nachtigall *Microscopia* (1997).

En la línea de este último se ha publicado la obra que aquí reseño, un *Manual de microscopia* de Bruno P. Kremer, también traducido del alemán por la misma editorial Omega. Se trata de una invitación tan sugerente que difícilmente puede uno resistirse a aplicar los métodos descritos para conseguir ver al microscopio lo que podemos contemplar en la abundante y magnífica iconografía que ilustra este texto. Imágenes en campo claro, contraste de fases, contraste interferencial, luz polarizada, realmente un despliegue técnico que pone de manifiesto que la microscopía óptica nunca será obsoleta. A la vez que demuestra la riqueza de recursos gráficos que se obtienen al aplicar las distintas técnicas tanto ópticas como tintoriales.

Material inorgánico diverso, magníficas cristalizaciones inorgánicas y orgánicas, cristales de hielo con sus múltiples formas dejan maravillado al lector. Aspectos

microscópicos de diversos tipos de fibras naturales y artificiales que van desde el algodón al velero. Materiales que tienen en común que no requieren ser cortados para visualizarse, como son los granos de polen o los granos de almidón, se alternan con secciones finas obtenidas con los diversos tipos de micrótomos. Cortes vegetales magníficamente ilustrados con microfotografías y que en ocasiones van acompañadas por esquemas explicativos de alta calidad. Secciones longitudinales y transversales de los distintos órganos vegetativos y reproductores de fanerógamas diversas.

La segunda cuestión que alimenta mi curiosidad es la siguiente: ¿quién podrá ser el posible lector de dicha obra? No creo que el especialista en los nucleosomas, en los priones o en la telomerasa, el estudioso del genoma ni el biólogo celular sientan curiosidad por descubrir lo que encierra esta obra magníficamente presentada. Los profesores de disciplinas en las que el uso del microscopio es obligado, tanto en ciencias experimentales como en medicina o veterinaria, seguro que lo abrirán; algunos se prenderán de la obra, la hojearán con interés y, en muchos casos, se sentirán desgraciados por no poder llevar a la práctica muchas de las sugerencias que nos ofrece Kremer, no por ser complicadas, que no lo son, sino por falta de tiempo. Los actuales planes de estudio que siguen más o menos el de Bolonia han experimentado unos recortes considerables; asimismo, han disminuido las horas de clases magistrales y, más grave todavía, también las sesiones prácticas. Esta misma problemática se presenta en los niveles inferiores de enseñanza de nuestro país.

Lo que propone este *Manual de microscopia* debe llevarse a cabo en el laboratorio: preparar los reactivos (no todo son *kits* comercializados), aplicarlos sobre el material en estudio previamente condicionado para ello (fijación o no, microtomía por un sistema u otro) y, finalmente, observarlos al microscopio, escogiendo la más idónea de un abanico de posibilidades de observación. (El experimentador optará inicialmente por la recomendación del autor, pero a la vez se dejará guiar por su curiosidad y seguramente probará otras técnicas para verificar que la aconsejada es realmente la mejor.)

No resisto la tentación de escoger un párrafo de la memoria leída por Santiago Ramón y Cajal, con motivo de su ingreso a la Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales de Madrid en 1897:

«Reglas y consejos sobre investigación científica», en que hace referencia a la metodología:

La maestría de los métodos, particularmente en las ciencias biológicas, es tan trascendental, que, sin temor de equivocación, se puede afirmar que los grandes descubrimientos corren a cargo de los técnicos más primorosos: de aquellos sabios que han profundizado, a favor de perseverantes ensayos, todos los secretos de uno o varios recursos analíticos.

Me encanta Kremer, cuando en el último capítulo, titulado *Metodología y técnicas*, se atreve a afirmar «hoy en día el dibujo y la fotografía se complementan». Pocos son los profesores que insisten en ello y muchos los alumnos que, con el pretexto de no saber dibujar, se limitan a hacer, en el mejor de los casos, cuatro garabatos sin proporcionalidad (aunque ello no debe hacernos olvidar que todavía existen estudiantes selectos que se muestran atentos a lo que escuchan y ven, que son minuciosos en sus trabajos prácticos

y capaces de elaborar memorias de prácticas que merecerían ser publicadas). Las cámaras digitales son difíciles de combatir; sin embargo, hay que intentarlo. La observación requiere tiempo, requiere tratar adecuadamente el microscopio, requiere paciencia.

En un último capítulo se ofrecen las fórmulas para preparar muchos de los reactivos mencionados en el texto. El nombre de algunos colorantes no tiene la traducción correcta al castellano, hecho que se habría podido subsanar si el traductor hubiese consultado algunos de los manuales anteriormente citados o a expertos en la materia.

Incluye también un apartado dedicado a las distintas modalidades de microscopía óptica existentes, acompañadas de imágenes realmente espectaculares. Algunas técnicas de cultivo de bacterias y mohos, muy ilustrativas y sencillas de llevar a cabo, dan paso a una excelente selección bibliográfica.

Por último, un detalle de gran utilidad que en un opúsculo que tuve ocasión de publicar hace ya muchos años incluí: una relación de casas comerciales don-

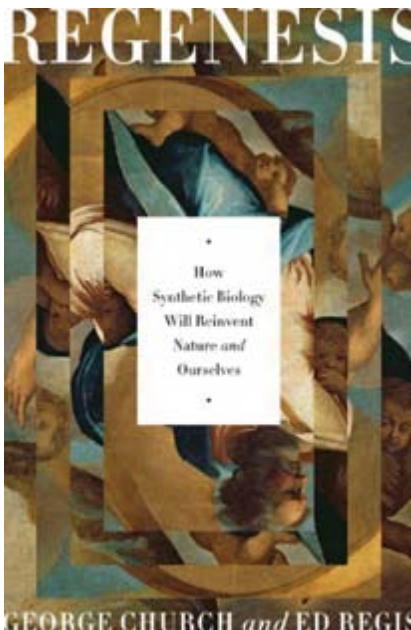
de se pueden adquirir los materiales y reactivos que han sido seleccionados en esta obra.

Deseo que esta valiosa joya editorial tenga la divulgación que se merece y abra el apetito y la curiosidad a cuantos lo hayan leído y visualizado, de la misma manera que me ha incitado a mí a seguir ciertas recomendaciones que desconocía, con un resultado sorprendentemente excelente.

Sin duda Kremer nos despertará el interés por todo lo que nos rodea y que, dado su tamaño, solo es posible apreciar mediante un buen uso del microscopio y, en muchas ocasiones, con una adecuada preparación de la muestra.

Una vez más, hay que dar la razón a Ramón y Cajal cuando afirma en su discurso anteriormente mencionado: «Lo más curioso es que el trabajo me causaba placer. Era una embriaguez deliciosa, un encanto irresistible». Visualizar por uno mismo las imágenes que nos ofrece el microscopio constituye realmente un espectáculo único.

—Mercè Durfort
Universitat de Barcelona



REGENESIS. HOW SYNTHETIC BIOLOGY WILL REINVENT NATURE AND OURSELVES

Por George Church y Ed Regis.
Basic Books; Nueva York, 2012.

Biología sintética

Nueva frontera de la investigación genómica

Imaginemos un futuro en el que el hombre haya adquirido inmunidad contra todos los virus, en el que las bacterias produzcan bienes de consumo, generen electricidad y suministren biocombustibles que nos permitan acabar con la

dependencia del petróleo. Cuando construir una casa no suponga más esfuerzo que sembrar una semilla en el campo. ¿Fantasía? No así para la biología sintética, cuyos cultivadores se multiplican por días. A imagen de los computadores, ca-

paces de simular, con una programación adecuada, la actividad de cualquier otro ingenio, los organismos podrían devenir constructores universales, en el sentido de que, debidamente programados en su genoma, podrían producir cualquier bien imaginable. Cierto es que los microorganismos no pueden convertir plomo en oro. Pero de momento sí pueden transformar residuos en electricidad.

La biología sintética trasciende la mera manipulación microbiana y pone en cuestión conceptos centrales de la evolución. Capaz de escoger trayectorias diferentes de las que originalmente tomó la naturaleza, la disciplina ha recorrido tres fases. La primera fue la era de la ingeniería genética o la biotecnología. Comenzó en los años setenta con la modificación del genoma de microorganismos. Se alteró el de *Escherichia coli* para que produjera insulina, eritropoyetina y anticuerpos monoclonales, entre otros. La segunda fase se aplicó a la elaboración y desarrollo de una genómica sintética asociada a la fabricación de nuevos fármacos y producción de biocombustibles y alimentos genéticamente modificados. En la tercera fase, la actual, se pretende la síntesis completa de genomas, la

creación incluso de especies enteramente nuevas.

Conocemos ya plásticos de origen vegetal. Por su estructura química, el Mirel es un polihidroxitirato (PHB), que se venía extrayendo de hidrocarburos fósiles. El PHB de extracción microbiana presenta ventajas ambientales evidentes sobre la versión derivada del petróleo: libera nuestra dependencia de los combustibles fósiles; su fuente principal, el maíz, era un recurso renovable y sostenible, y, por fin, las resinas Mirel son los únicos bioplásticos sin almidón acreditados por organismos de certificación en cuanto a biodegradabilidad en suelos naturales y el mar. De compuestos petroquímicos se obtenía también el 1,3-propanediol (PDO), principal componente de la fibra Sorona para alfombras. Se creó una cepa industrial de *Escherichia coli*, con 26 cambios genéticos, que convertía directamente la glucosa del maíz en PDO en un tanque de fermentación, igual que la cerveza o el Mirel. Organismos genéticamente manipulados producen diésel, gasolina y combustible para aviones. Y se manipulan microorganismos para detectar la presencia de arsénico en el agua potable a unas concentraciones sumamente bajas (cinco partes por mil millones).

En el laboratorio del autor principal del libro, George Church, en la Universidad Harvard, se trabaja en una nueva técnica que, en línea de principio, podría devolver la vida a especies extinguidas cuyo genoma se conozca o pueda reconstruirse a partir de restos fósiles (como el mamut lanudo). Uno de los graves obstáculos para semejante proeza reside en la carencia de núcleos celulares intactos, lo que significa que no existe núcleo disponible para una clonación por transferencia nuclear. Aunque se haya reconstruido la secuencia genómica del mamut y esté registrada en bases de datos, no se sabe cómo convertir una secuencia abstracta de letras en hebras de nucleótidos que conformen el genoma. Confían, no obstante, en el refinamiento de la técnica MAGe (ingeniería del genoma múltiple automatizado), una suerte de versión acelerada y a escala industrial de la ingeniería genética. Sería también el golpe de gracia contra el vitalismo, sostiene Church.

Lo que nos lleva hasta Jöns Jacob Berzelius, autor de la primera separación tajante entre compuestos orgánicos, los derivados de la materia viva, e inorgánicos, el resto. (Introdujo también los términos

de catálisis, polímero e isómero, entre otros.) La separación en cuestión facilitó la explicación de la vida. En esa distinción se apoyó el vitalismo, teoría según la cual la vida y sus procesos no son reducibles a las leyes de la física y la química. El vitalismo sufrió su primer embate en 1828, cuando Friedrich Wöhler declaró que podía, a partir de fuentes inorgánicas, sintetizar urea, un producto típico de los organismos vivos. Wöhler sintetizó urea a partir de cianato de amonio. El cianato se obtenía del cianuro, que en aquel tiempo se lograba a partir del ferrocianuro, extraído a su vez de los desechos de las fábricas de curtidos. En 1845, Hermann Kolbe mostró que el ácido acético, un producto final común en los organismos vivos, podía constituirse a partir de la síntesis de sus elementos. Pero el vitalismo recibió un sólido respaldo con el experimento de Pasteur, en 1859, que arruinaba la idea de generación espontánea. *Omne vivum ex vivo*, la irreductibilidad de la materia viva a algo no vivo, fue una de las convicciones más firmemente mantenidas por Pasteur. Sostiene Church que, contra la tesis vitalista, laboran los resultados obtenidos en cuatro áreas de investigación: síntesis de la urea, moléculas especulares, polímeros (proteínas, ADN y ARN, que presentan quiralidad) y autorreproducción molecular.

En 1969, K. W. Jeon, I. J. Lorch y J. F. Danielli, de la Universidad de Nueva York, decidieron crear un organismo sintético. Tras participar en un simposio sobre la síntesis experimental de células vivas, pensaron que poseían los medios para ensamblar *Amoeba proteus* a partir de sus componentes principales, vale decir, núcleo, citoplasma y membrana celular. Tomaron el núcleo de una ameba, el citoplasma de otra y los introdujeron en el interior evacuado de una membrana celular. Aunque el organismo sobrevivió el 85 por ciento del tiempo, no se trataba de una célula sintética, pues todos sus componentes eran naturales.

La ingeniería genética comenzó en 1972, cuando coincidieron Stanley Cohen y Herbert Boyer en Honolulu, en una conferencia sobre plásmidos, fragmentos circulares de ADN que pueden replicarse independientemente de los cromosomas celulares. En la conferencia, Cohen hizo público que podía insertar plásmidos en *E. coli*, para que la bacteria los propagara y clonara. Boyer habló de su trabajo con EcoRI, enzima que corta el ADN en puntos específicos. Ambos se percataron

de que, si combinaban sus dos hallazgos, podrían ensartar fragmentos de dos plásmidos diferentes y producir ADN recombinante, dejando que la bacteria produjera cantidades ingentes del plásmido así creado.

El primer genoma sintético fue construido por Blight, Rice y otros en el año 2000. Sintetizaron el virus de la hepatitis C, que afecta a 170 millones de personas. Su genoma consta de unas 9600 bases. En 2002, Cello, Paul y Wimmer sintetizaron un segundo genoma, el del virus de la polio. Un año después, Hamilton Smith y su grupo sintetizaron un tercer genoma, el del virus phiX174, con el fin de mejorar la velocidad de ensamblaje del genoma a partir de oligonucleótidos. Recibió más atención, pese a que era un genoma menor (5386 bases) y no tenía impacto alguno sobre la salud. En 2008, se reconstruyó el agente causante del SARS (síndrome respiratorio agudo severo), un coronavirus. Pero las versiones sintéticas del SARS no funcionaron porque había errores; cuando se corrigieron estos, el genoma vírico sintético terminó por infectar a células en cultivo y a ratones.

Con todo, la caja de resonancia de la biología sintética fue la serie de experimentos realizados por Craig Venter en el Instituto J. Craig Venter, y otros, entre ellos Hamilton Smith. Ilustran hasta qué punto podemos modificar el genoma de determinados organismos. No solo modificarlo, sino mejorarlo y ensamblarlo. En 2005, se propusieron identificar los genes esenciales de una bacteria mínima. Advirtieron que, para su funcionamiento, la bacteria podría prescindir de numerosos genes; los había que incluso frenaban su desarrollo. Las bacterias más pequeñas, miembros del género *Mycoplasma*, no llegan a la micra de longitud. El volumen físico adquirido por una *Mycoplasma* es evidentemente la menor cantidad de espacio en el que pueden acomodarse todos los mecanismos moleculares necesarios para la vida.

En el laboratorio de Venter se trabajó con *Mycoplasma genitalium*, bacteria con un exiguo genoma de solo 582.970 pares de bases y 482 genes codificadores de proteínas. (El microorganismo debe su nombre a que constituye un patógeno del tracto urogenital humano.) Comenzaron por inactivar varios genes codificadores, uno por uno, y anotar el efecto ejercido. Observaron que un centenar de los genes codificadores de proteínas, en torno a un 20 por ciento del total, era «pres-

cindible». Apreciaron también que la interrupción de algunos genes aceleraba la tasa de desarrollo del microorganismo. Los restantes 382 genes codificadores de proteínas, tres genes transportadores de fosfato y 43 genes codificadores de ARN, constituyen presumiblemente el conjunto imprescindible para el desarrollo de esa célula mínima.

En 2007, el equipo de Venter sintetizó el genoma de *M. genitalium*. Lo denominaron *Mycoplasma genitalium* JCVI-1.0. La síntesis constituyó todo un hito técnico. Avanzando un paso más, en un nuevo experimento, cambiaron una especie bacteriana en otra. Tomaron el genoma de una especie y lo transfirieron a otra, para luego pasar de esta a la primera. Se sirvieron de un genoma natural (no sintético). Las especies en cuestión eran dos tipos de *Mycoplasma*: *M. mycoides* y *M. capricolum*, organismos experimentales más adecuados que *M. genitalium* debido a su mayor rapidez de crecimiento. Pese a su complicación técnica, desde el punto de vista conceptual se trataba de un procedimiento sencillo. Los investigadores transfirieron el genoma de *M. mycoides* a una cepa silvestre de *M. capricolum*. Durante un breve tiempo hubo dos genomas en una misma célula; mas no tardó el

nuevo ADN en ser reconocido y asumido por la célula receptora, convirtiéndose así en una bacteria *M. mycoides*. «El cambio de *software* eliminaba por completo el viejo organismo y creaba uno nuevo», explicó Venter. El genoma invasor actuó como un virus, tomando el mando de la célula y transformándola.

Tras ello, vino el experimento culminante. Consistió en diseñar, digitalizar y luego ensamblar químicamente el genoma de *M. mycoides*, de 1,08 millones de pares de bases, e introducirlo en una célula. A ese genoma lo denominaron *M. mycoides* JCVI-syn 1.0. Repitieron lo realizado con el genoma natural de *M. mycoides* del primer experimento: transplantarlo a una célula receptora de *M. capricolum*. Se obtuvieron idénticos resultados: el nuevo genoma, sintético, tomó el control de *M. capricolum* y la convirtió en *M. mycoides*.

Paralelamente, en 2006, Anthony Forster y Church se aprestaron a crear una célula mínima que fuera, además, un organismo vivo sustancialmente sintético. Su idea: fabricar, a partir de moléculas, un sistema químico capaz de replicación y evolución. En oposición a la biología reduccionista de Venter, procederían de abajo arriba, vale decir, montar un ser

vivo a partir de sus componentes; primero, las moléculas se ensamblarían en sub-sistemas, que, a su vez, formarían unidades mayores, etcétera. Pergeñaron el genoma fijándose en los genes homólogos de genomas de diversos grupos de organismos. Parece racional pensar que los genes compartidos por especies diferentes son urgentes, necesarios. Esa idea, sumada a otros métodos tomados de la genética y la bioquímica, sugería un genoma que constaba solo de 151 genes y 113.000 pares de bases de largo.

Sintetizaron el genoma, en una esfera ceñida por una membrana de bicapa lipídica y rellena de enzimas macromoleculares codificadas por 151 genes y un inventario mínimo de pequeñas moléculas necesarias para la vida. Todo el sistema podría emerger a la vida mediante la adición de ribosomas sintéticos, factores de traducción y otras estructuras inspiradas en las células de *E. coli*. Con el tiempo, ese planteamiento habría de producir una célula mínima sintética, autorreplicante y autosuficiente. Para evitar que la célula se replique fuera de las paredes del laboratorio, introducen en su interior una dependencia de nutrientes que no se encuentran en ningún otro ámbito.

—Luis Alonso

INVESTIGACIÓN Y CIENCIA

OFERTA DE SUSCRIPCIÓN

Reciba puntual y cómodamente los ejemplares en su domicilio

Suscríbase a *Investigación y Ciencia*...

- ▶ por **1 año** y consiga un **17% de descuento** sobre el precio de portada (**65 €** en lugar de 78 €)
- ▶ por **2 años** y obtenga un **23% de descuento** sobre el precio de portada (**120 €** en lugar de 156 €)
- ▶ **REGALO** de 2 ejemplares de la colección TEMAS a elegir.*

Y además podrá acceder de forma gratuita a la versión digital de los números correspondientes a su período de suscripción.



Puede suscribirse mediante:

www.investigacionyciencia.es ◀

Teléfono: 934 143 344 ◀

* Consulte el catálogo. Precios para España.