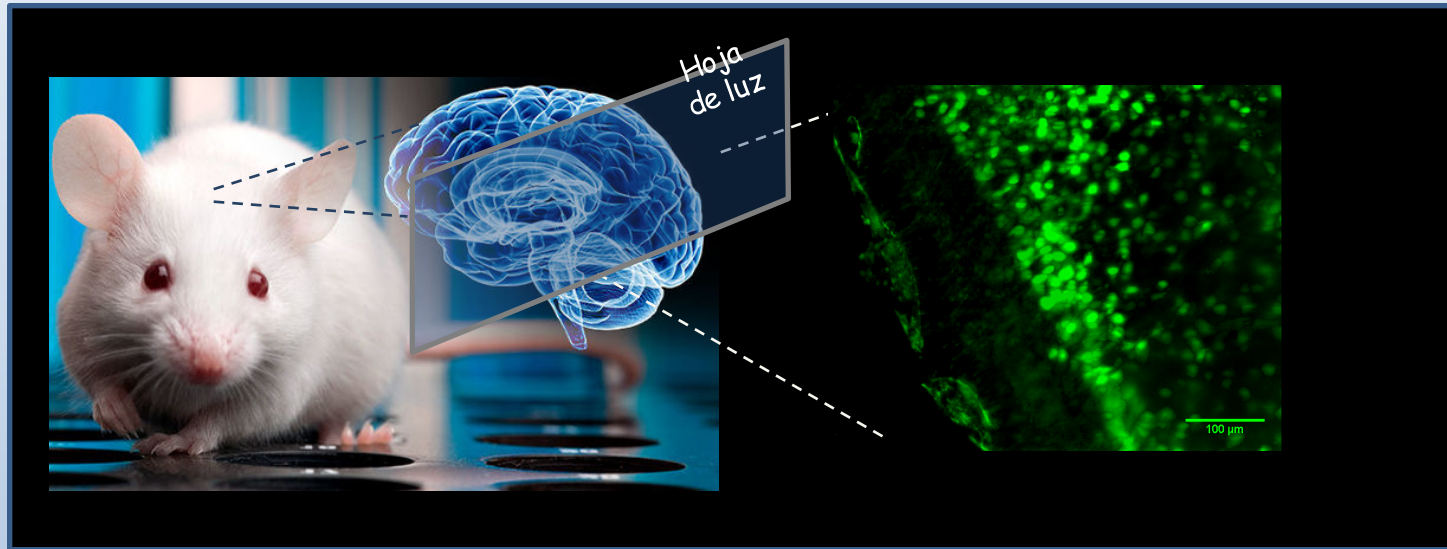


Microscopía de hoja de luz láser: innovación para el análisis 3D en estudios de biología y biomedicina

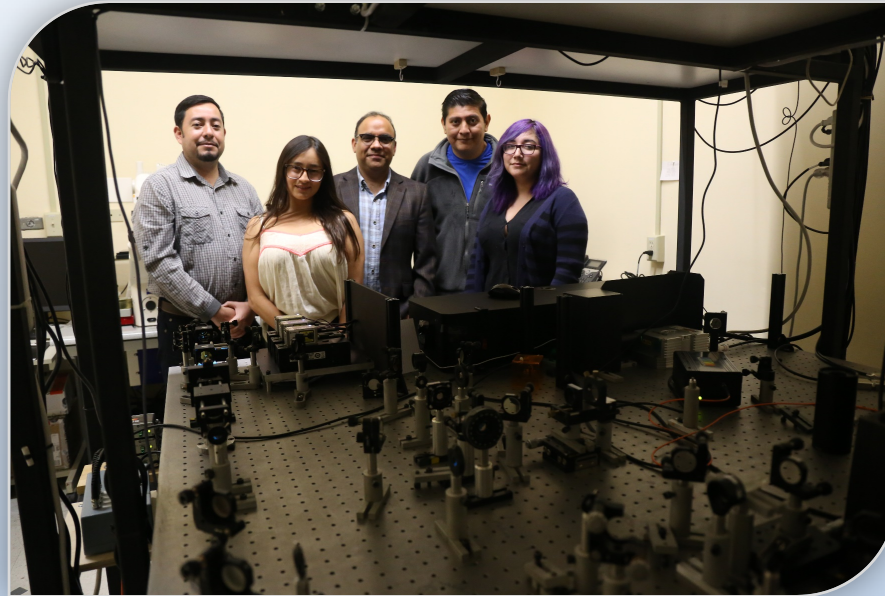


Dr. Israel Rocha Mendoza

X Congreso Nacional de Tecnología
Aplicada a Ciencias de la Salud

15 junio de 2019
Universidad Iberoamericana
Puebla, Pue.

Grupo de Microscopía Avanzada



OBJETIVOS:

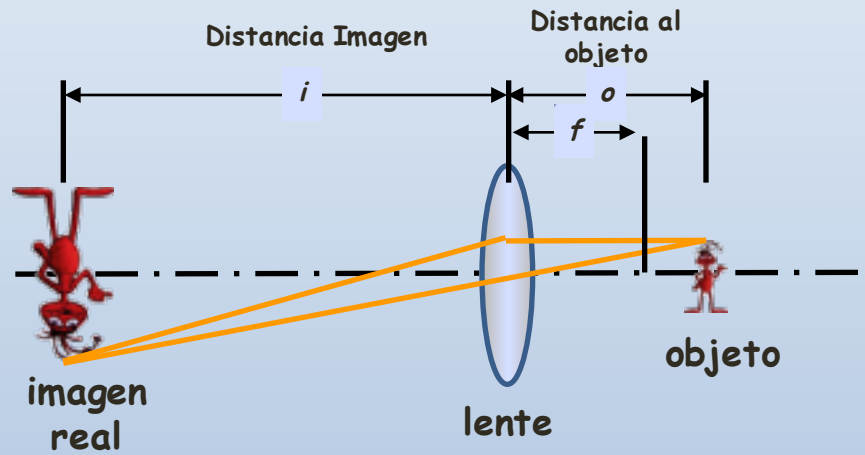
- **Implementar técnicas modernas y avanzadas de microscopía**
 - Lineales (Fluorescencia SPIM/DSLM)
 - No lineal (TPEF, SHG, CARS, etc.)
- **Desarrollar proyectos con potencial aplicación en biología y medicina**
 - Biofotónica

En esta plática ...

1. Del microscopio simple al microscopio de barrido láser
2. ¿Qué es la microscopía con hoja de luz láser?
3. *Innovación realizada en CICESE*
4. Aplicaciones y colaboraciones
5. Conclusiones
6. Acerca del CICESE

Microscopio Óptico

Formación de imágenes



fuelle
de
luz

$$\frac{1}{f} = \frac{1}{o} + \frac{1}{i}$$

1) imagen real amplificada

Microscopio Óptico

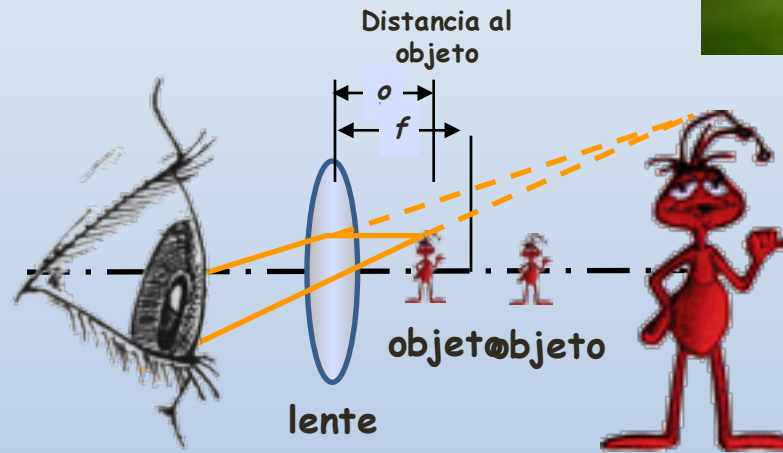
Microscopio Simple (una simple lupa!)

"El Padre de la Microbiología"



Antonie van Leeuwenhoek
(1632-1723)

Dutch tradesman and empirical Biologist



fuelle
de
luz

2) Imagen virtual amplificada



Microscopio Óptico

Microscopio Simple

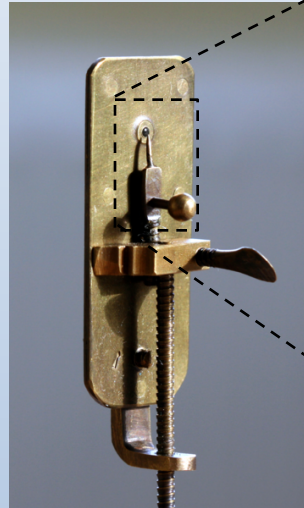
~300X

"El Padre de la Microbiología"



Antonie van Leeuwenhoek
(1632-1723)

Dutch tradesman and empirical Biologist



Describe por primera vez

- ✓ Bacterias llamándolas "animalculos"
- ✓ *Parásitos*
- ✓ *Células de sangre*
- ✓ *entre otros muchos microorganismos*

Observaciones publicadas a partir de 1676 por la "Royal Society of London"

Microscopio Óptico

Microscopio Compuesto

"El otro padre de la microbiología"



Robert Hooke
(1635-1703)

English and Natural Philosopher

Micrographia (1665):

Primer libro con ilustraciones detalladas de observaciones realizadas con microscopios

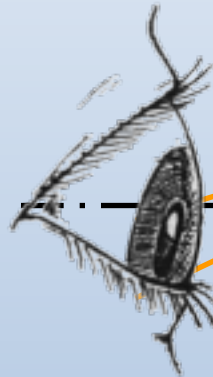
Utiliza la palabra "Cell"

Celdas observadas en corcho

OCULAR

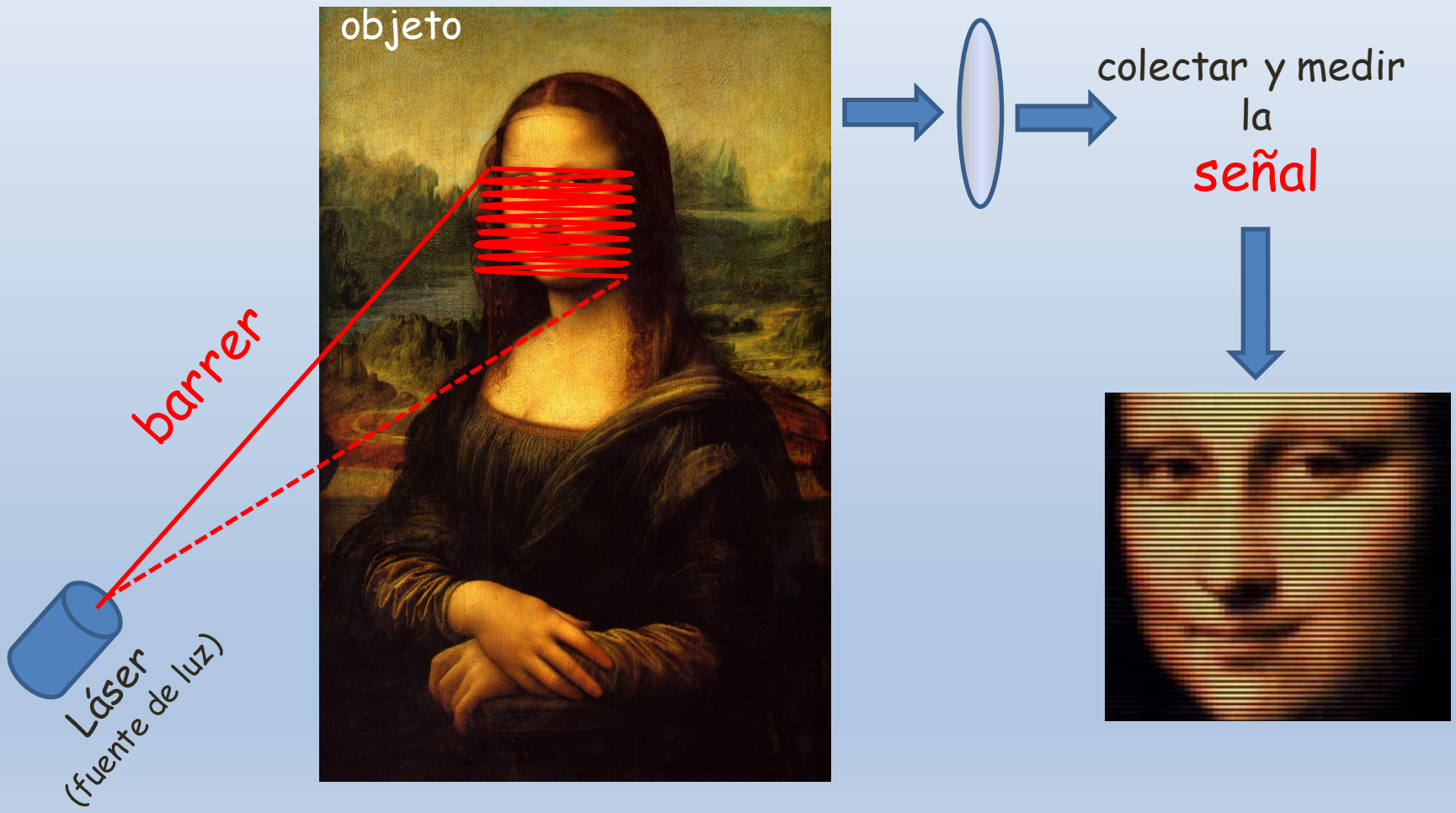


OBJETIVO



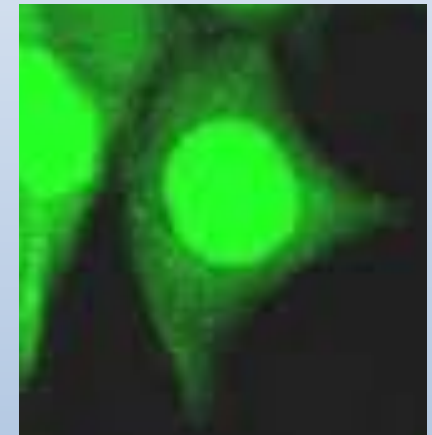
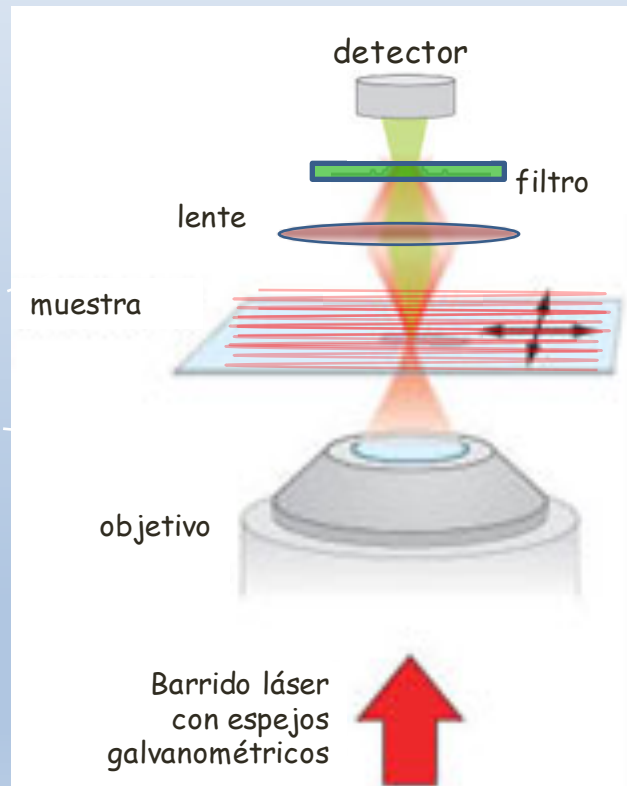
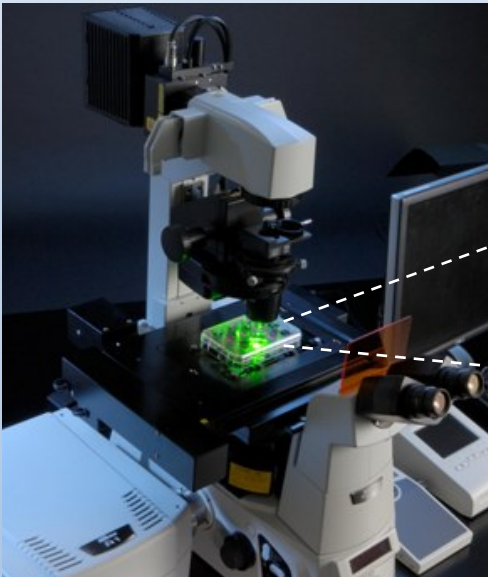
Barrido Láser

¿Cómo formar una imagen?



Barrido Láser

Microscopio de barrido láser

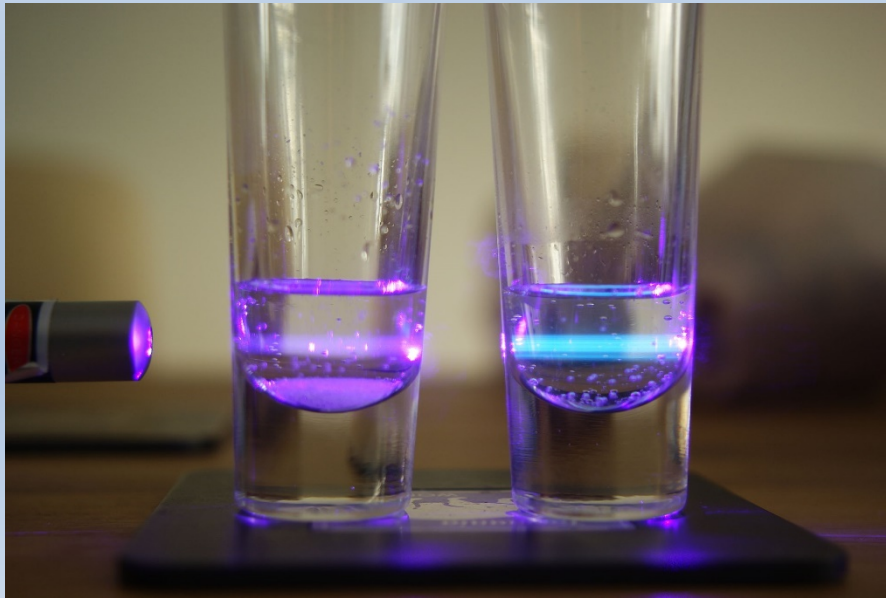


¿qué medir?

Microscopio de barrido láser

- 1) *La transmisión o la reflexión de la luz láser a través del objeto*
- 2) *Efectos inducidos con un láser (de un color) y que generan luz de otro color*

Fluorescencia

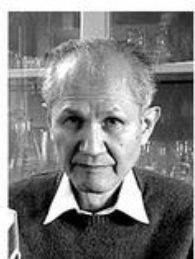


¿qué medir?

Barrido Láser

¿qué medir?

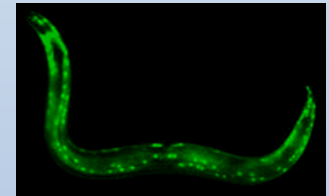
Proteínas Fluorescentes
(Premio nobel de química 2008)



Osamu Shimomura descubre la proteína verde fluorescente (GFP) de la medusa *Aequorea victoria*



Martin Chalfie logra introducir el gen de esta proteína en el ADN de gusano *Caenorhabditis elegans*



Roger Y. Tsien modifica la proteína para generar moléculas que emitieran luz a diferentes longitudes de onda



Barrido Láser

Microscopía de fluorescencia

¿qué medir?

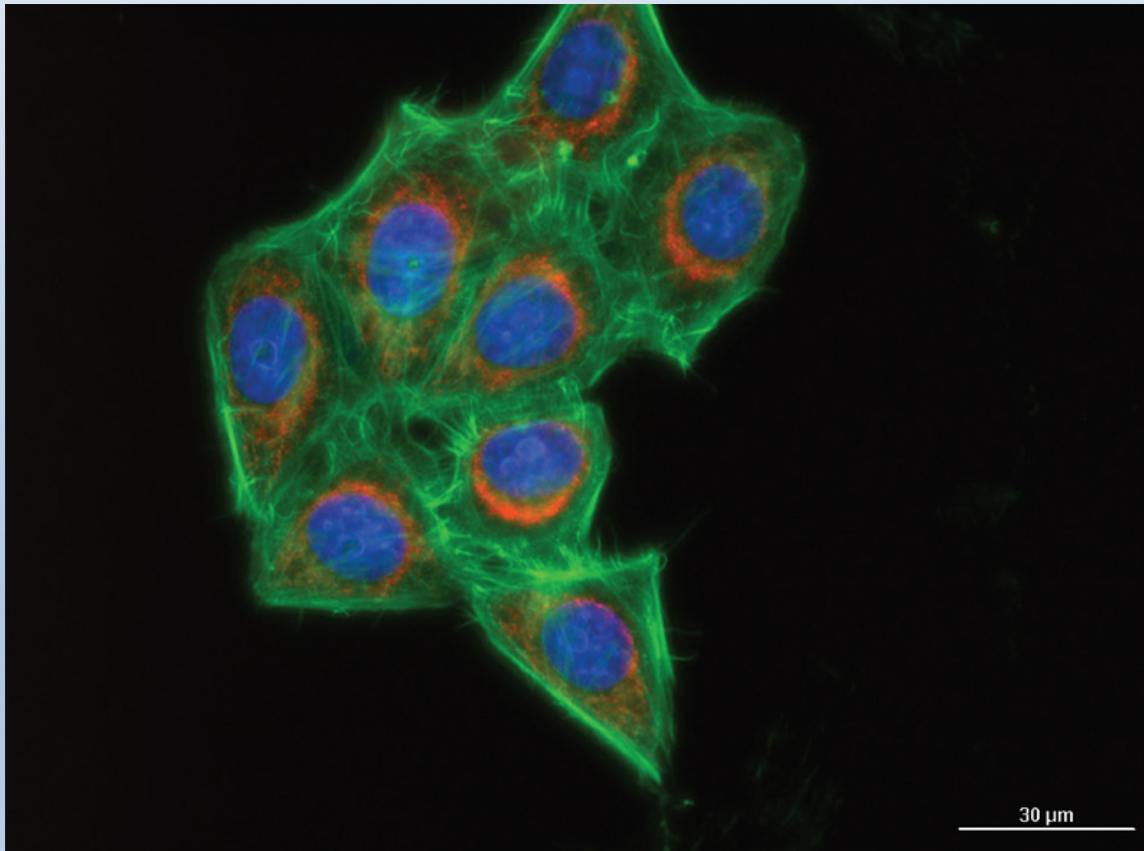


Figure 5. Fixed and three color fixed and stained HeLa cells. Mitochondria identified by a mouse anti-mitofilin primary antibody followed with a Rabbit antimouse IgG monoclonal antibody labeled with Texas Red (Red). Nuclei and actin filaments are identified by DAPI (blue) and AlexaFluor®-488-phalloidin (green) counterstaining respectively. Scale bar indicates 30 μm .

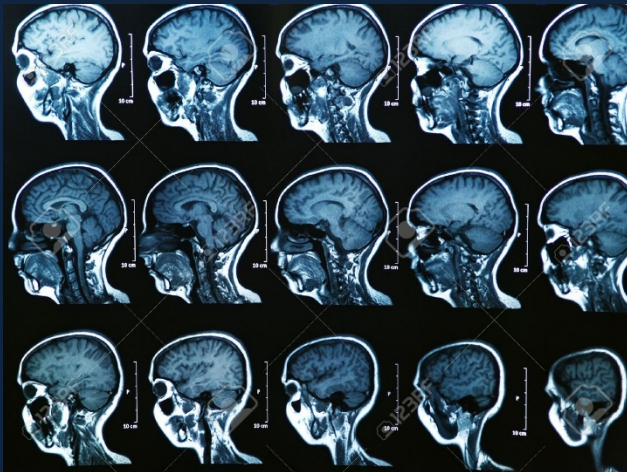
Microscopía con hoja de luz láser

Explicación sencilla ...

Cámara



Imágenes "tomográficas"



Resultado

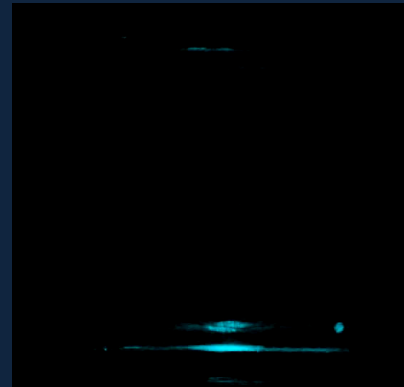


Foto del plano 1
Foto del plano 2



Objeto 3D
transparente

Principio de prueba en objetos milimétricos

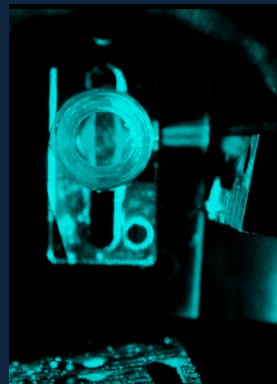


Principio de prueba en objetos milimétricos

10 cm



Vial con agua

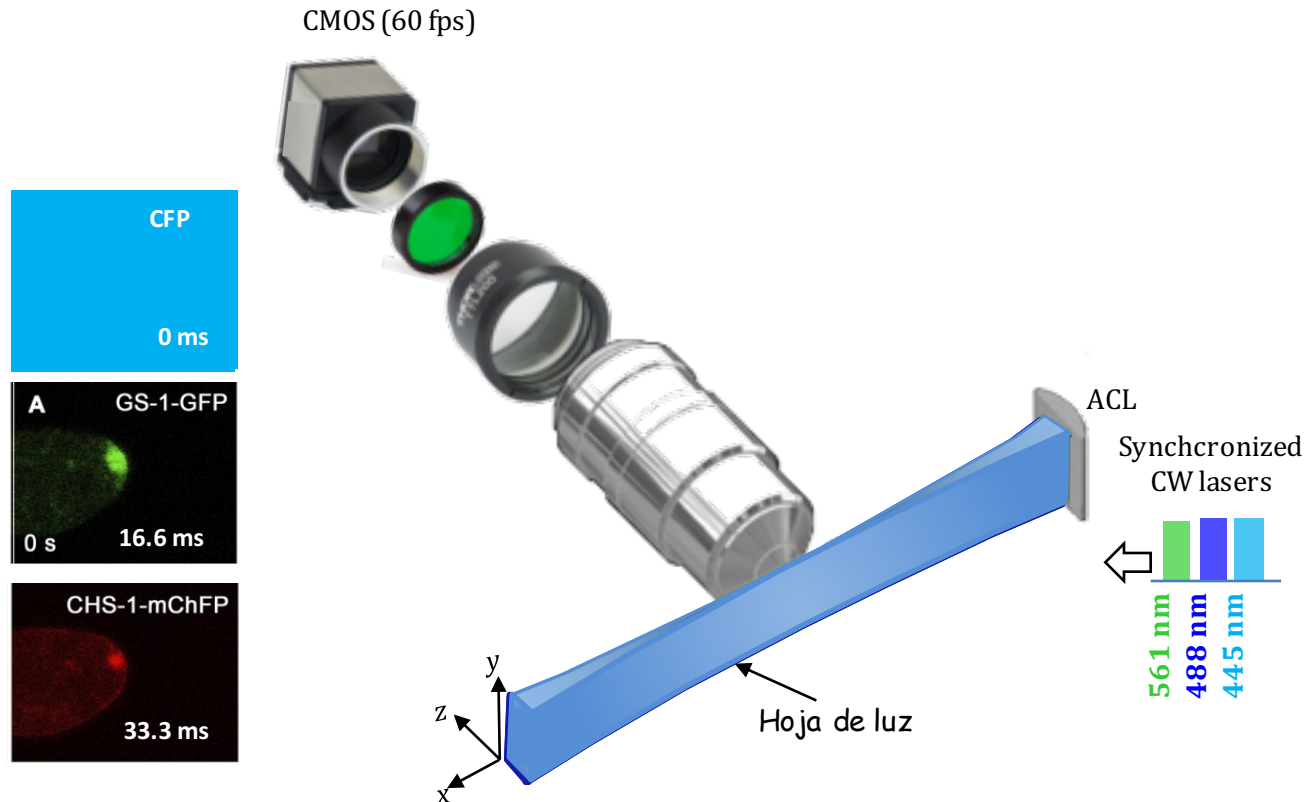


Torre Eiffel



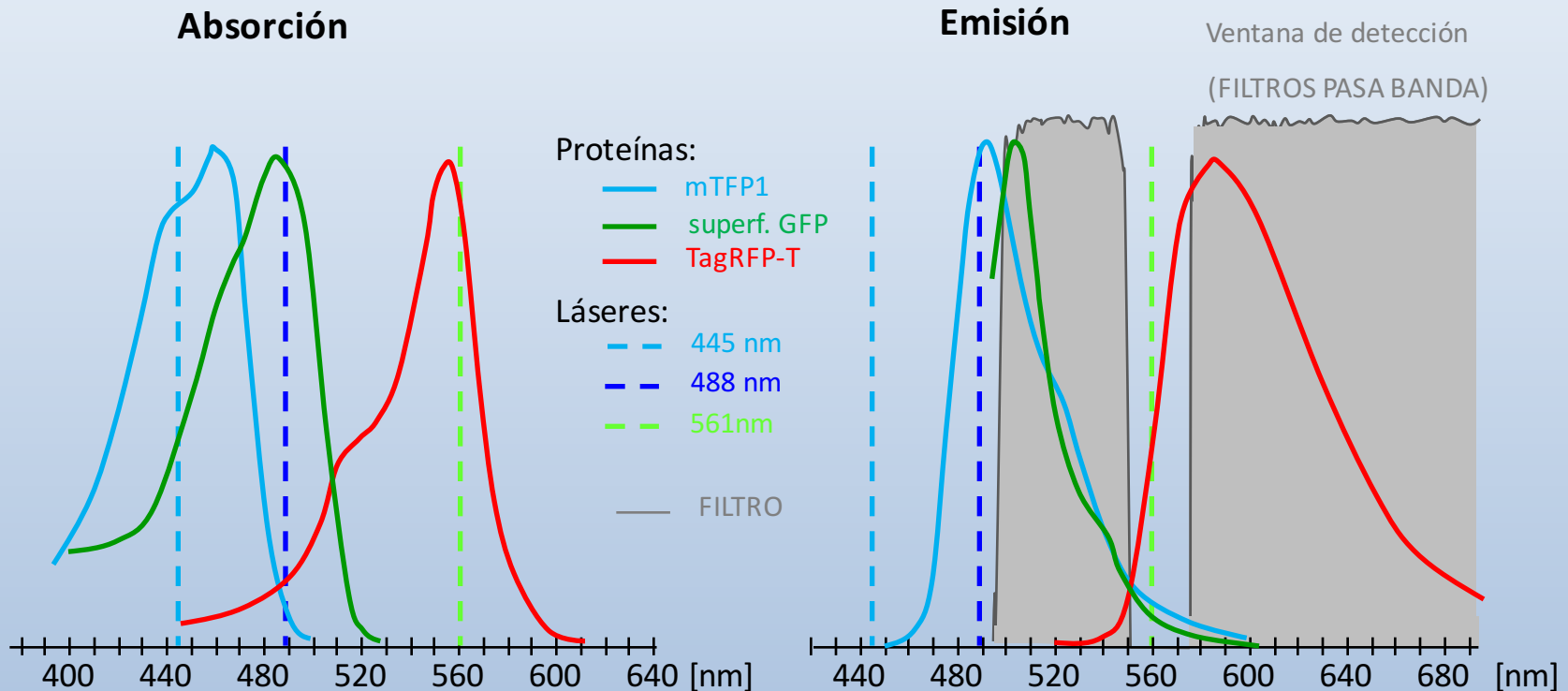
La innovación: Microscopía multi-fluorescente con hojas de luz láser

[Journal of Biomedical Optics](#) 24(01): 2019



La innovación: Microscopía multi-fluorescente con hojas de luz láser

[Journal of Biomedical Optics](#) 24(01): 2019.

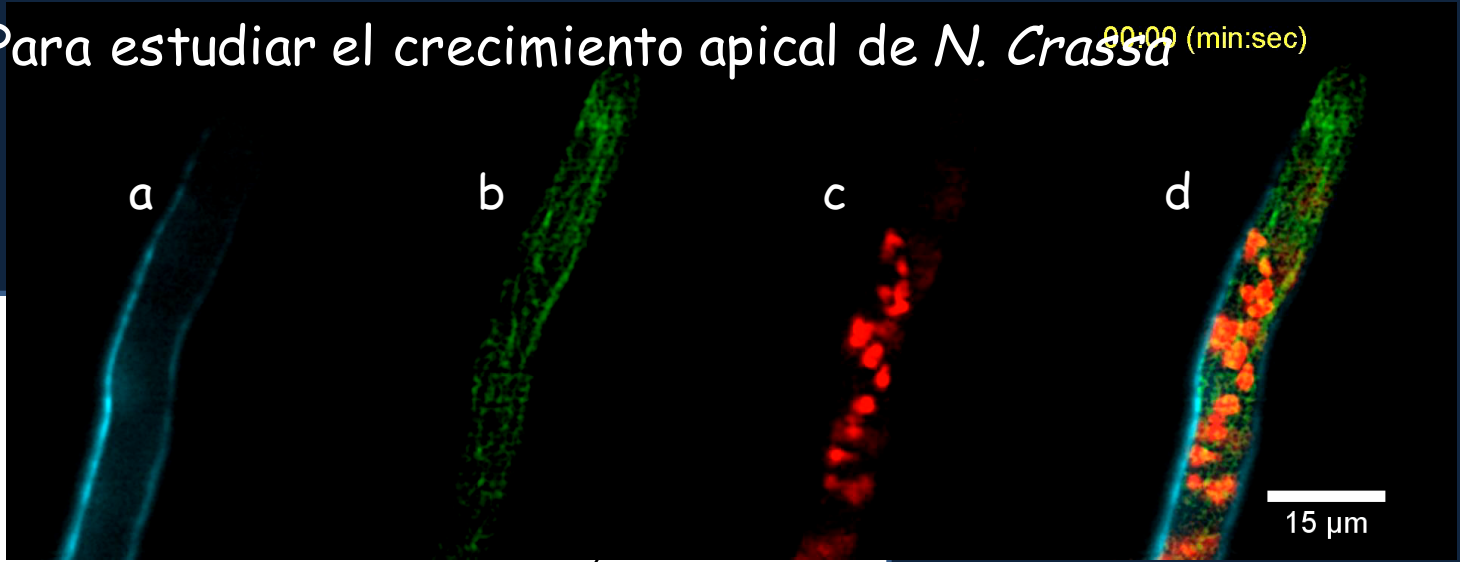


Los láseres y marcadores fluorescentes

Aplicación en microbiología

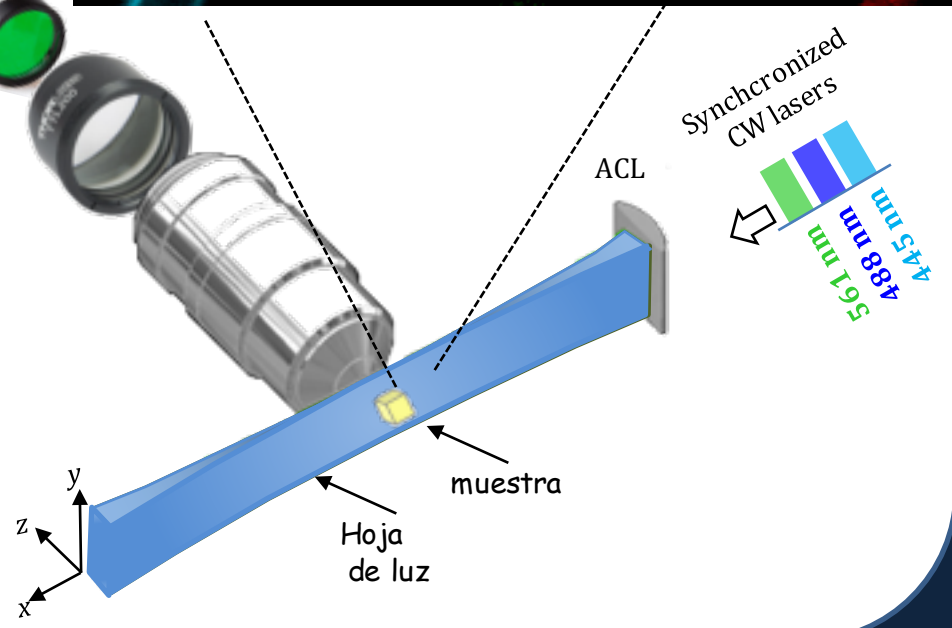
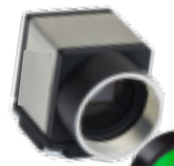
Para estudiar el crecimiento apical de *N. Crassa*

00:00 (min:sec)



15 μm

CMOS (60 fps)



Dynamics of the different structures involved in *N. crassa* hyphal growth

- (a) Cell wall stained with solophenyl flavine 7GFE dye
- (b) Microtubules tagged with GFP
- (c) nuclei tagged with RFP.
- (d) Merged images

• En colaboración con la Dra. Meritxell Riquelme CICESE



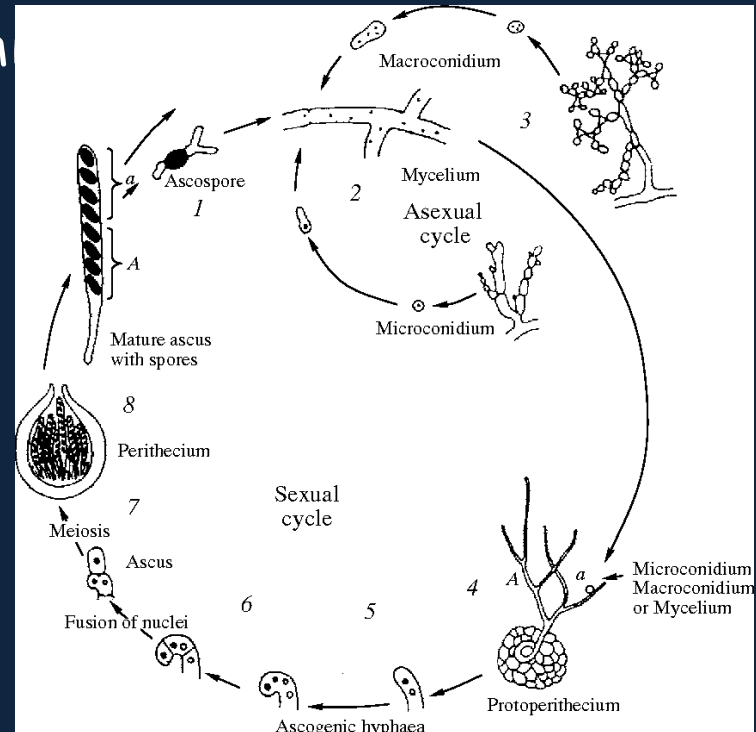
Aplicación en microbiología

Para estudiar el crecim

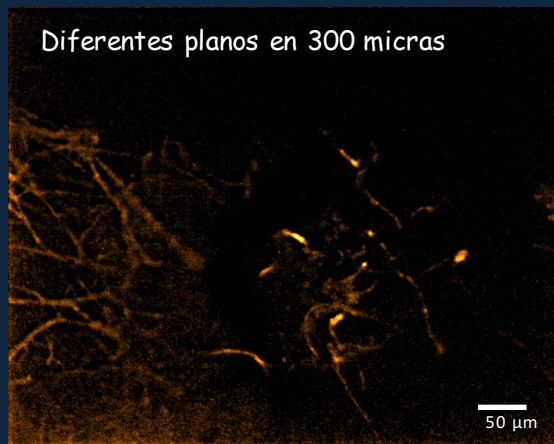
Hifas de *N. crassa*



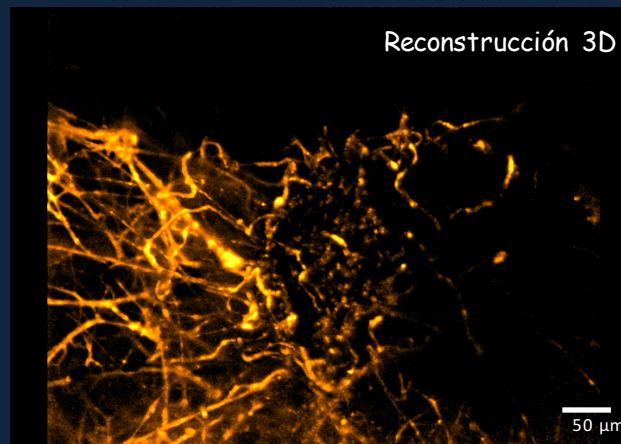
H1-RFP:



Peritecios de *N. crassa**



Diferentes planos en 300 micras



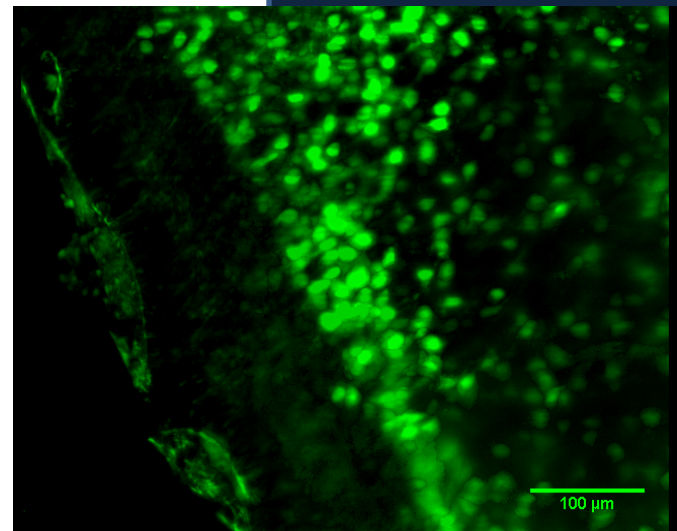
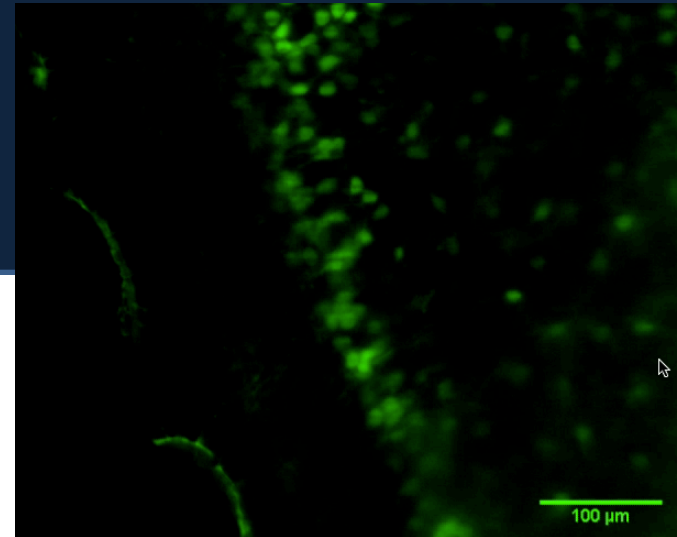
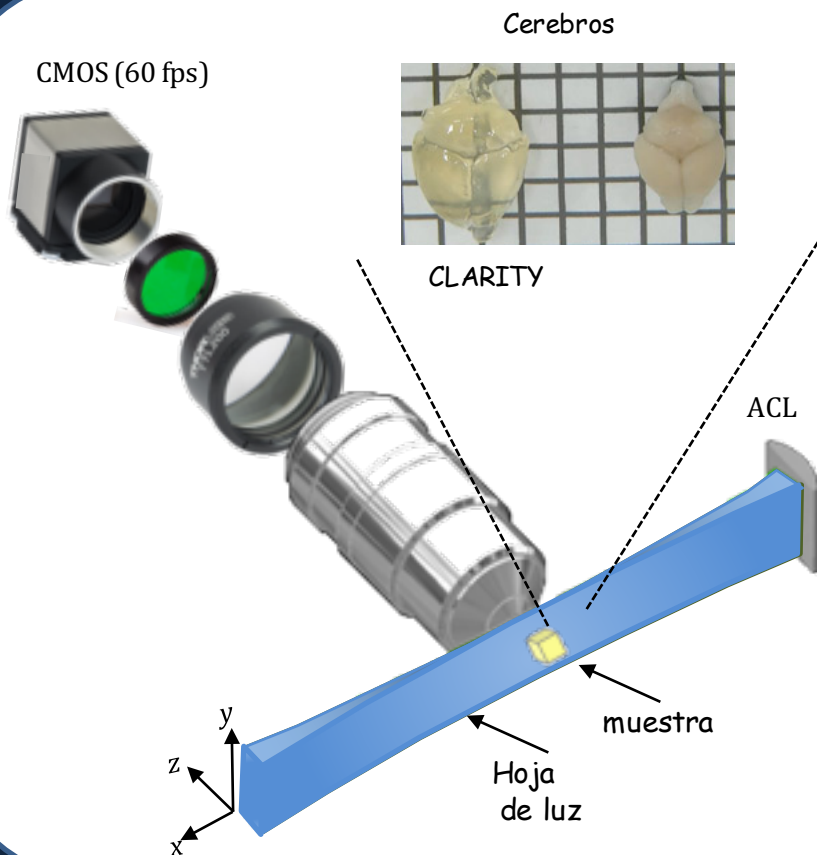
Reconstrucción 3D

• En colaboración con la Dra. Meritxell Riquelme CICESE



Aplicación en neurobiología

Para estudiar las displasias
corticales en cerebros
Clarificados de Ratón



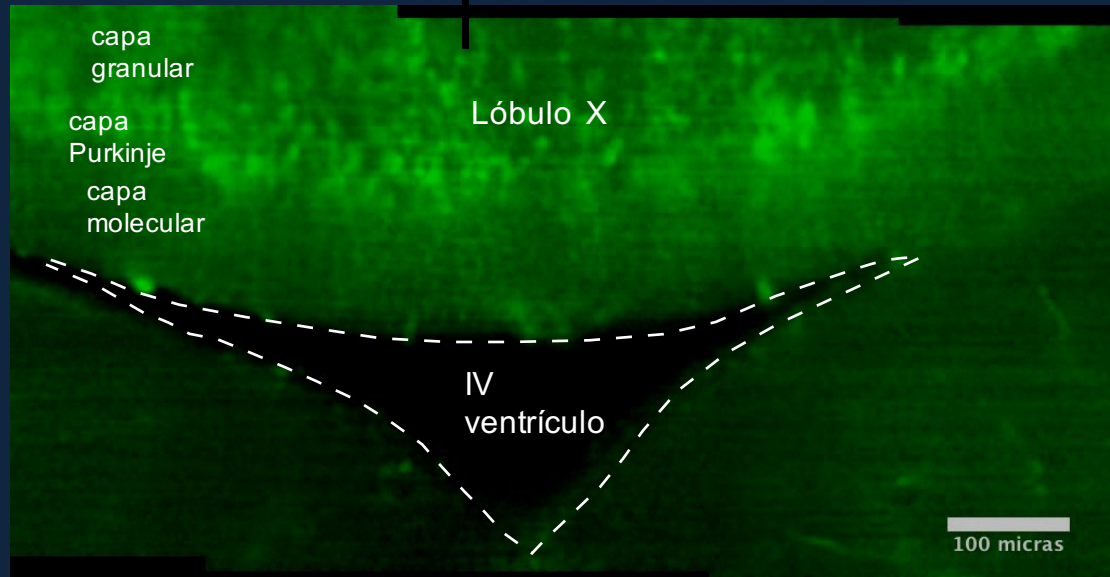
- En colaboración con la Dr. Aaulfo Martínez
- INB UNAM Qro.



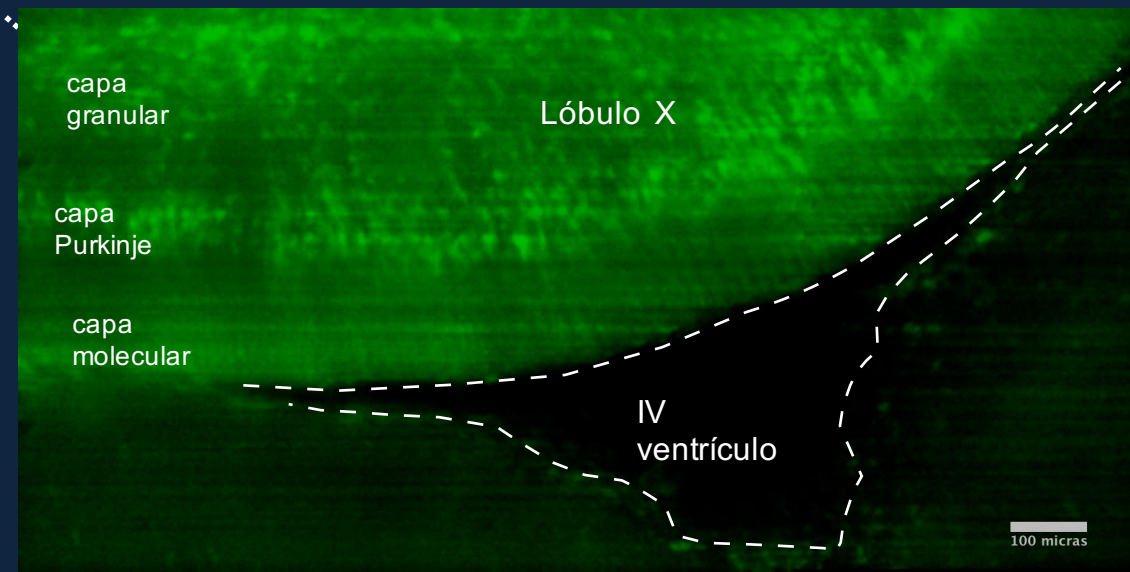
Aplicación en neurobiología

Glía de Bergmann

Muestra Control



Muestra Tratada con Carmustina

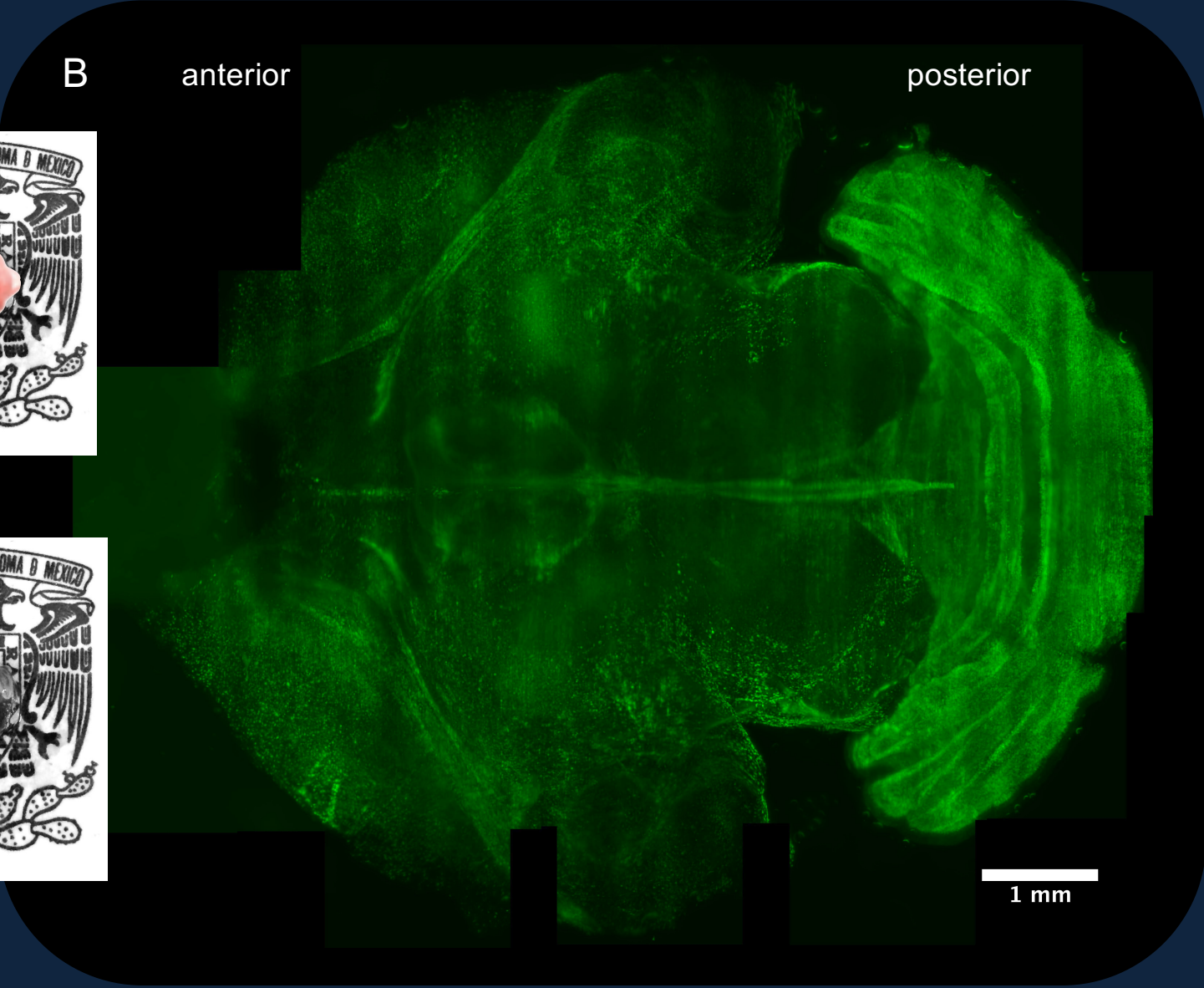


Reconstrucción por microscopía de hoja de luz de cerebro clarificado

B

anterior

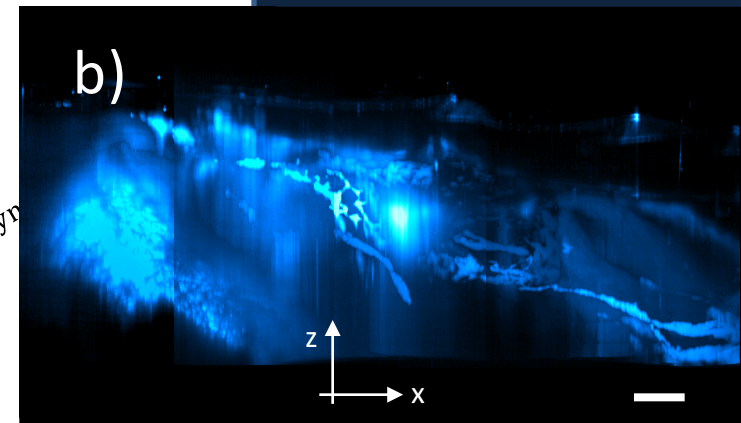
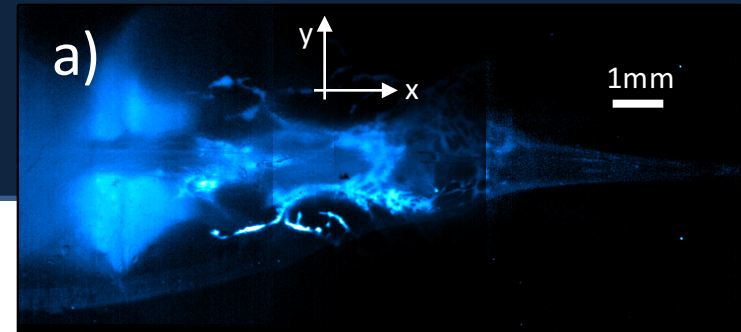
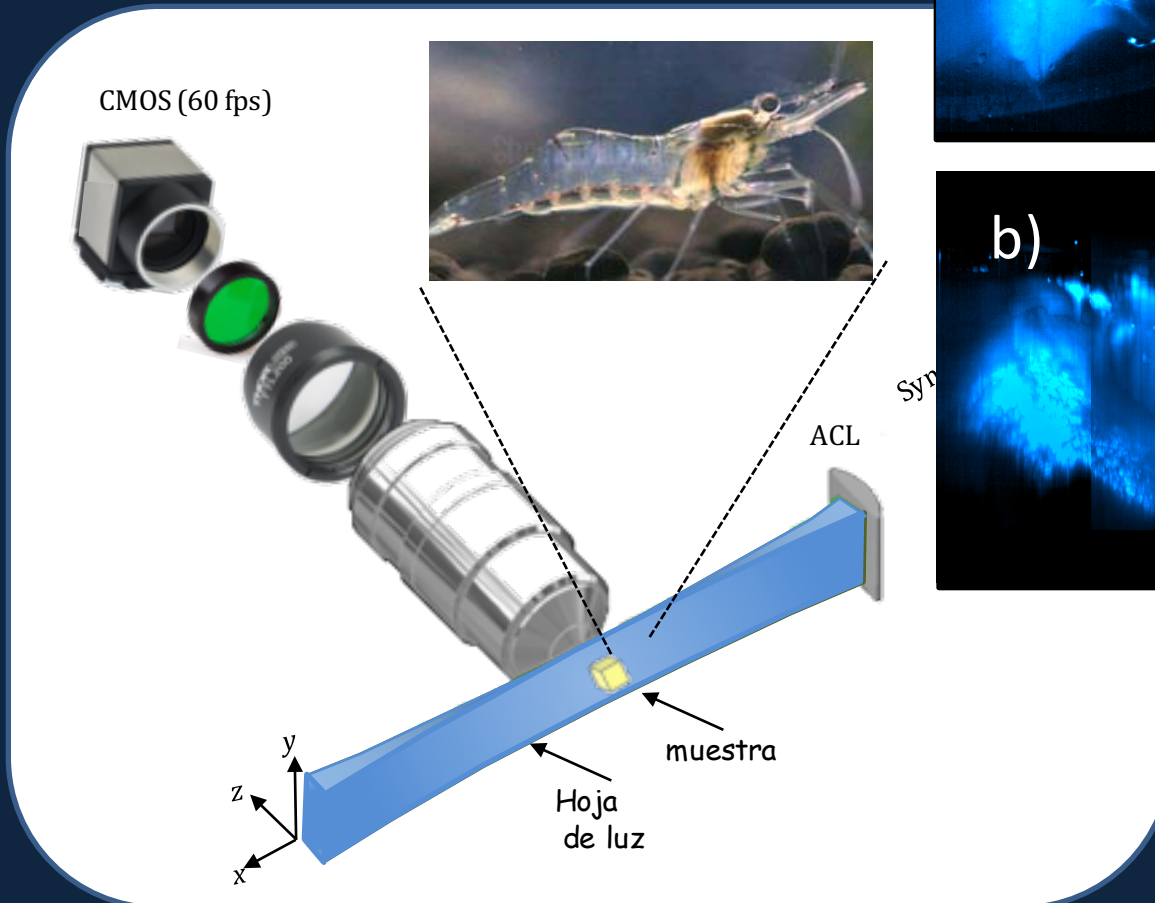
posterior



1 mm

Aplicación en biología

Imágenes de camarón patiblanco (*Litopenaeus vannamei*) para estudiar la distribución de bio-nanopartículas antivirales. Fluoresceína-5-isotiocianato (FITC).

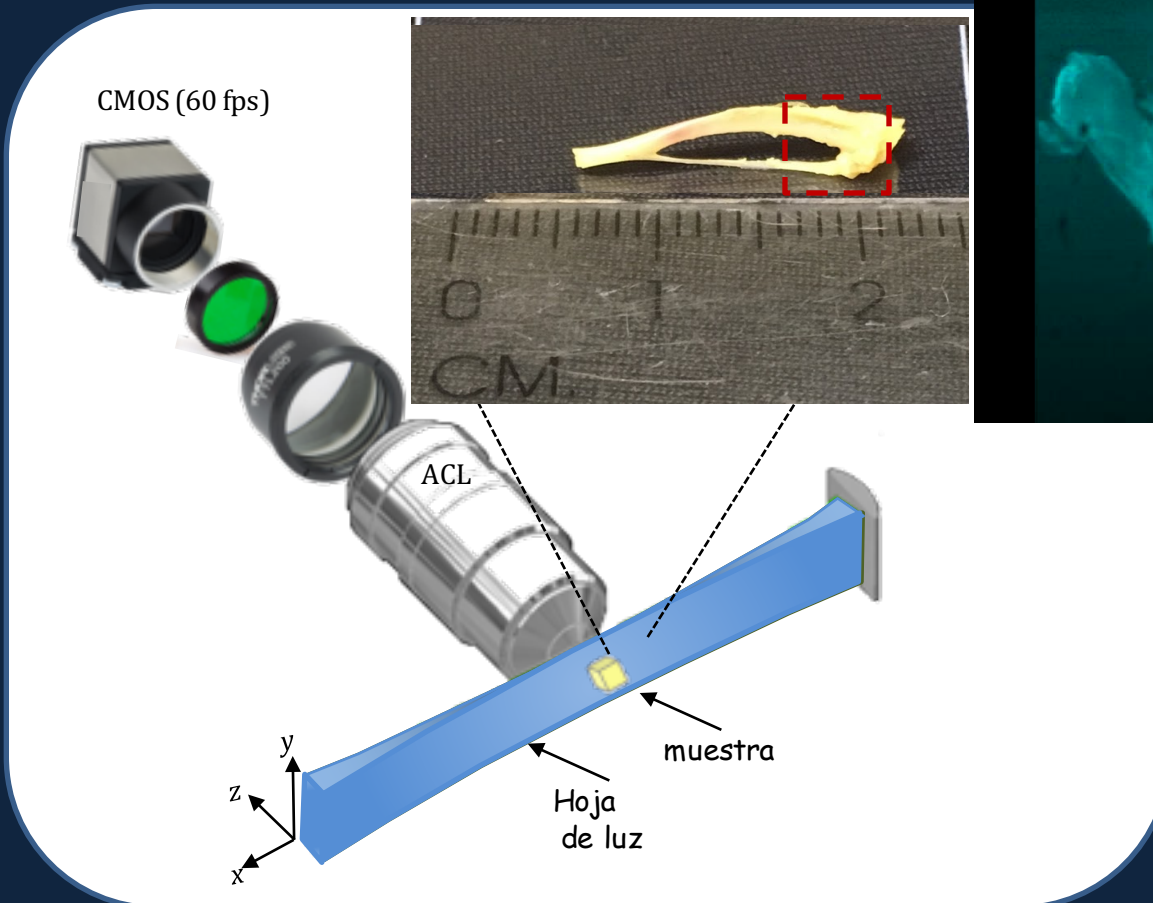
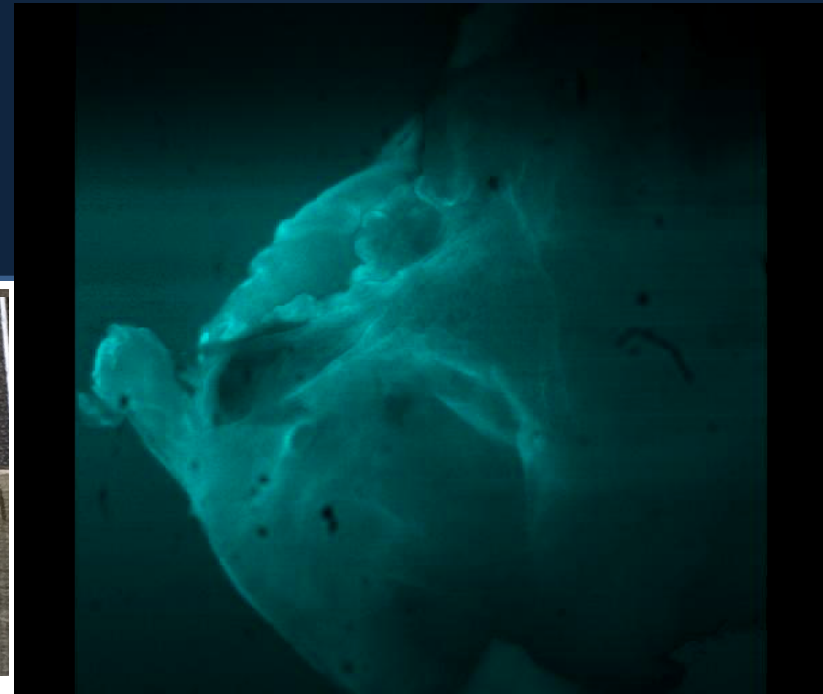


- En colaboración con el Dr. Rubén Cadena Nava
- CNyN Qro.

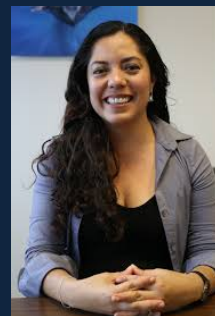


Aplicación en biomedicina

Estudios preliminares en huesos de ratón aplicando la técnica CLARITY para estudiar la remoción ósea



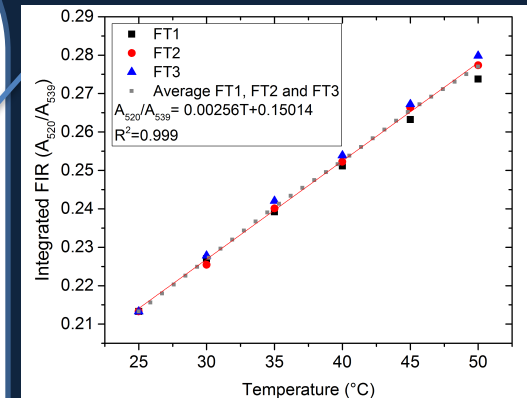
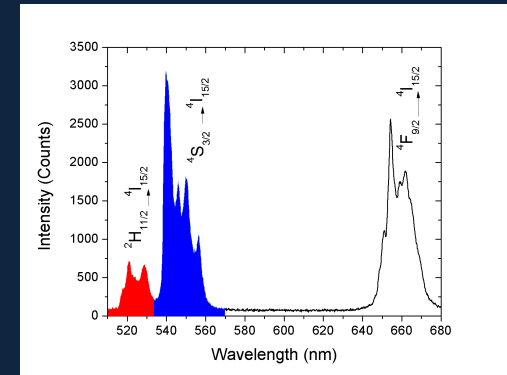
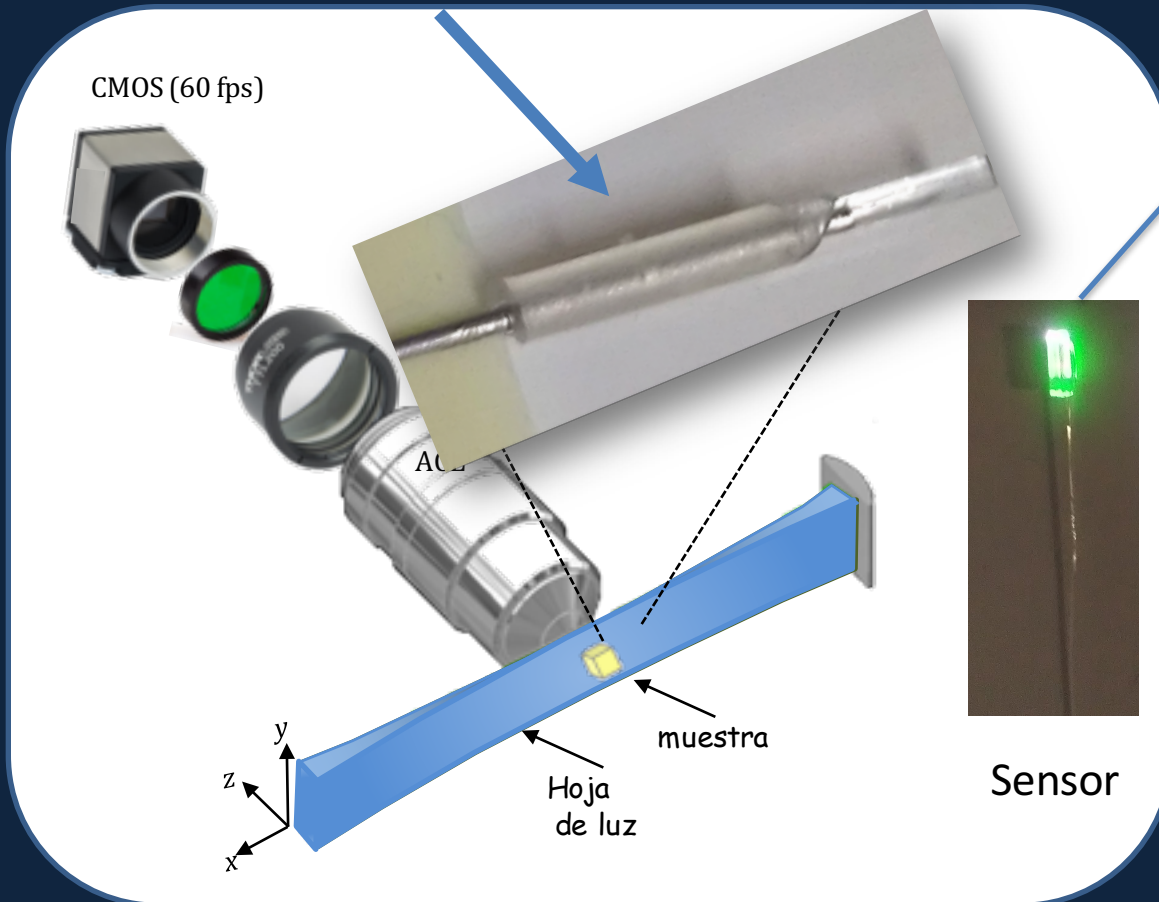
- * En colaboración con la Dra. Patricia Juárez
- DIB, CICESE



En sensores de temperatura

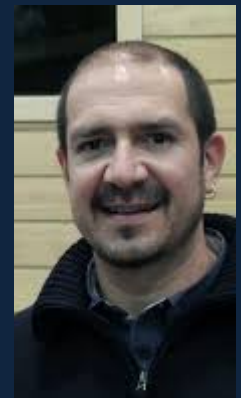
Medición de la temperatura en sensores basados polímeros dopados con tierras raras.

PDMS+NaY0.77Yb0.20Er0.03F4



- * En colaboración con
- Dr. Juan Hernández Cordero

- Instituto de Investigaciones en Materiales
- UNAM



Resultados Células de Cáncer de mama MCF-7 (*)

50X, 0.50 NA, WD 30mm

con nanopartículas de SrAl_2O_4 dopado con $\text{Eu}^{2+}/\text{Dy}^{3+}$

Excitación 422nm

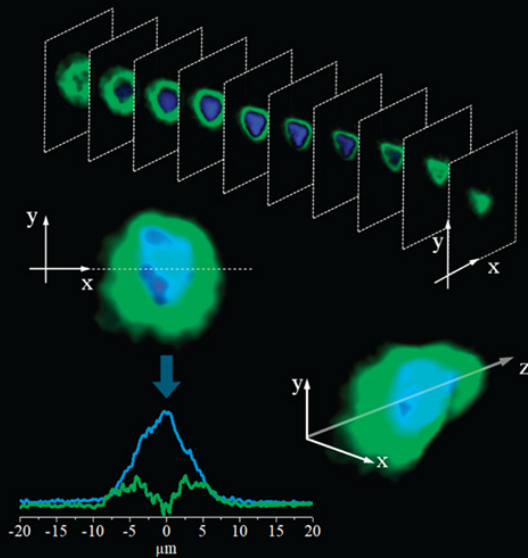
Azul: DAPI; Verde: nanopartículas

Journal of

6/18

BIOPHOTONICS

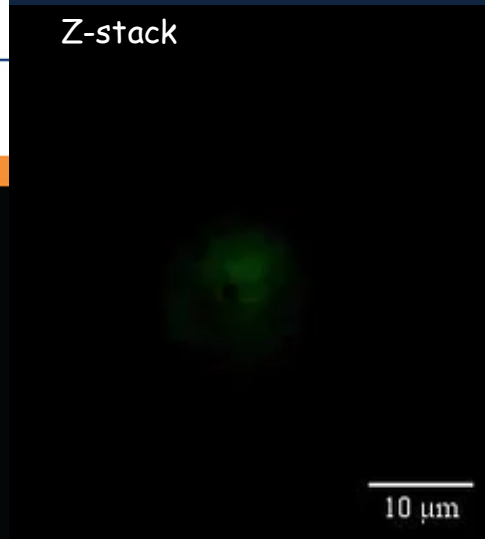
www.biophotonics-journal.org



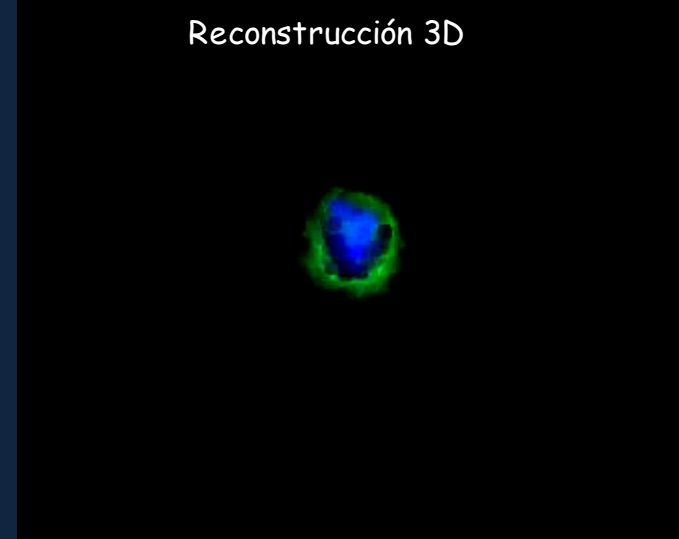
Light sheet microscopy and SrAl_2O_4 nanoparticles doped with $\text{Eu}^{2+}/\text{Dy}^{3+}$ ions for cancer cell tagging
Bonifacio Car-Uc, Juana B. Montes-Frausto, Karla Juárez-Morano,
Jacob Licea-Rodríguez, Israel Rocha-Mendoza, Gustavo A. Hirata

WILEY-VCH

Z-stack



Reconstrucción 3D



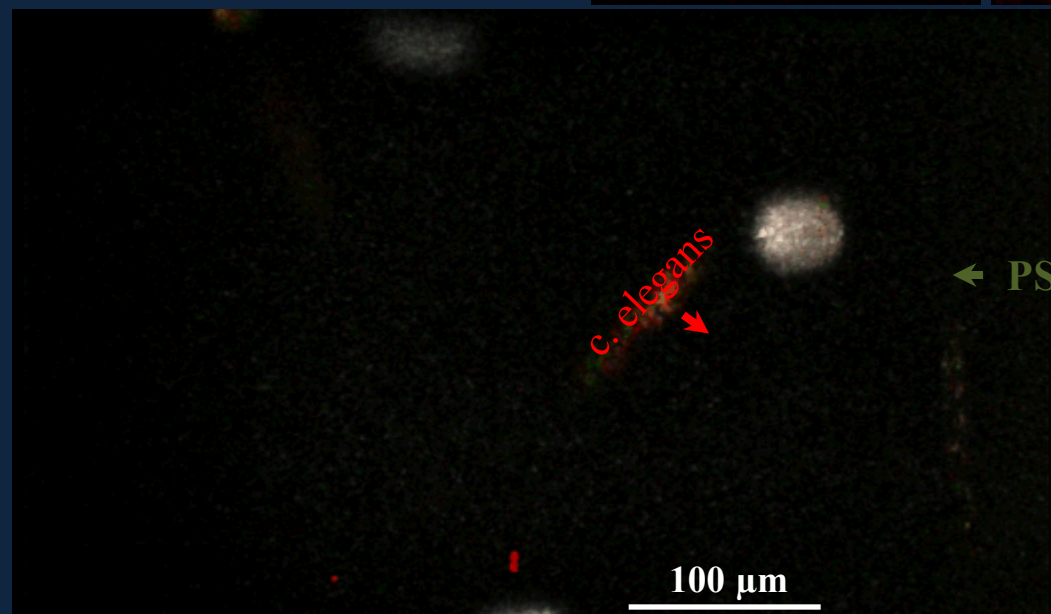
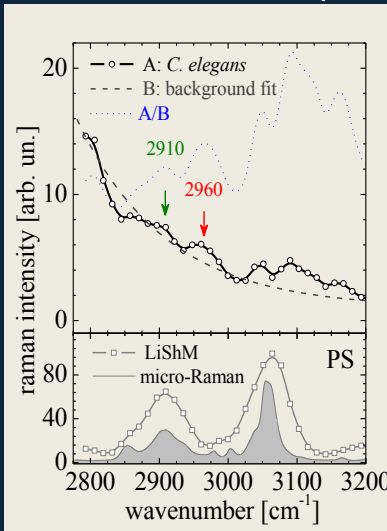
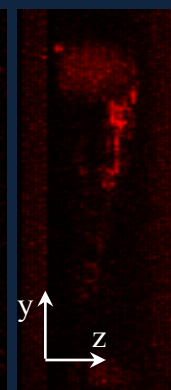
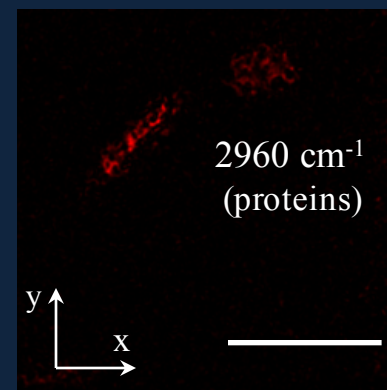
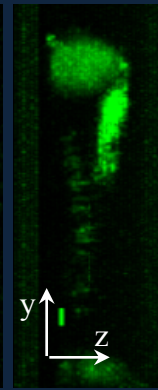
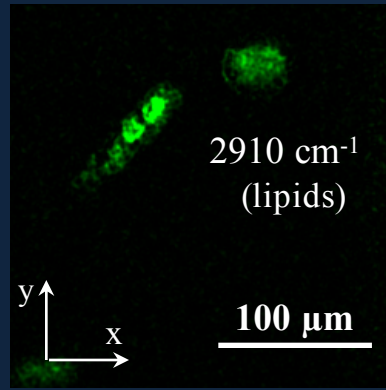
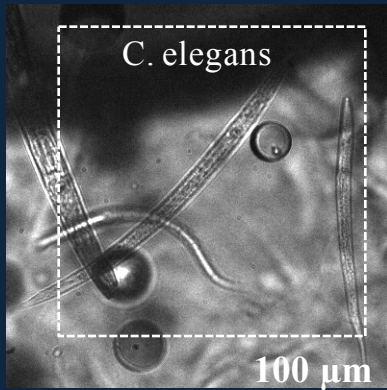
Las MCF-7 presentan una sobre expresión de receptores de ácido fólico

Las capas de las NP's tienen ácido fólico

Método de detección: "Se pegan, hay cáncer. No se pegan, no hay cáncer"

Aplicación en espectroscopía

*I. Rocha et. al., BOE, 6(9): 3449-3461 (2015)**



* ICFO: Pablo Loza, Jacob Licea, Mónica Marro.



Conclusión

La microscopía de hoja de luz es una herramienta poderosa para la adquisición rápida de imágenes 3D en muestras grandes con resoluciones celulares útiles en estudios de biología y biomedicina.

¡Interesados en colaborar son bienvenidos!

¿Dónde está el CICESE?



**¿Qué si te gustaría
Ensenada ?**





Departamento de Óptica



GRACIAS

EVOO 2019

29 de JULIO al 9 de AGOSTO

INICIO

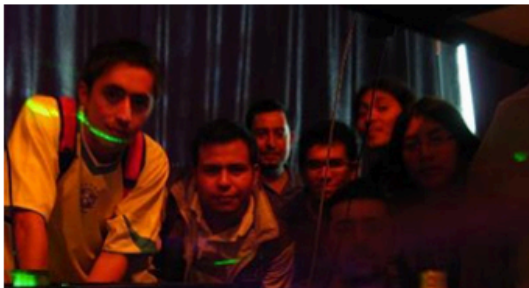
PROMOS

SELECCIÓN

SOLICITUD DE ADMISIÓN

CONTACTO

Selección



El registro de solicitudes deberá hacerse electrónicamente a través de la liga: **Solicitud**, del 29 de marzo al 31 de mayo de 2019.