

Sección: ¿Cómo funciona?

El mundo a través de una hoja de luz: La microscopía lightsheet

The world through a sheet of light: Lightsheet microscopy

Gonzalo González-Domínguez^{1*}

Javier Rodrigo Prado-Baeza²

¹Posgrado de ciencias bioquímicas de la UNAM.

²Posgrado de ciencias biológicas de la UNAM.

*Autor para la correspondencia: gonzalo030793@gmail.com

RESUMEN

La curiosidad humana siempre nos ha impulsado a querer saber más del mundo que nos rodea, particularmente sobre aquello que escapa a nuestra visión, ver el mundo microscópico siempre ha sido algo de gran interés para nosotros. Esto nos llevó a la creación de una herramienta maravillosa, conocida como microscopio, el cual a lo largo del tiempo se ha evolucionado, adquiriendo una sin fin de aplicaciones, y quizá, entre los microscopios más avanzados hoy día, encontramos al microscopio lightsheet, una herramienta sumamente útil en el campo de la biomedicina y del cual se hablará más a fondo en este trabajo.

Palabras clave: Microscopía, lightsheet, biomedicina.

SUMMARY

Human curiosity has always driven us to learn more about the world around us, particularly about what lies beyond our vision. Observing the microscopic world has always been of great interest to us. This led to the creation of a remarkable tool known as the microscope, which over time has evolved, acquiring countless applications. Among the most advanced microscopes today is the light-sheet microscope, an invaluable tool in the field of biomedicine, which will be discussed in greater detail in this work.

Keywords: Microscopy, lightsheet, biomedicine.

Introducción

Los humanos somos curiosos por naturaleza, siempre estamos tratando de saber más de todo lo que nos rodea, tocamos, probamos, escuchamos, pero sobre todo observamos. Nuestros ojos son nuestra mayor fuente de información. Gracias a ellos, logramos apreciar todo nuestro entorno, desde un pequeño grano de sal hasta la gran luna que nos cuida por la noche. Sin embargo, tienen un límite, y con el fin de superarlo, hemos desarrollado herramientas fantásticas que nos permiten “ver más allá de lo evidente”.

Los planetas, estrellas y galaxias; todo eso que está fuera de nuestro planeta, muy lejos en el cosmos, lo observamos gracias a algo llamado telescopio. Sin embargo, ¿qué hay acerca de todo ese universo tan pequeño que escapa a nuestra visión? El mundo microscópico se abrió ante nosotros con la llegada del microscopio, un aparato que utilizaba un sistema de lentes simple y las propiedades básicas de la luz, para permitirnos ver cosas tan pequeñas como una bacteria.

Desde su invención, cerca del siglo XVI, y su perfeccionamiento por Antonie Van Leeuwenhoek, en el siglo XVII, el microscopio ha cambiado drásticamente, innovándose, utilizando nuevas tecnologías e integrándose en su desarrollo para ampliar su capacidad de aplicaciones. Esta innovación constante ha dado como resultado el surgimiento de diferentes tipos de microscopios que sirven para alcanzar múltiples objetivos. Esto permitió el desarrollo de diferentes técnicas de microscopía útiles en diferentes campos del conocimiento, por ejemplo: de campo claro, electrónica, de fluorescencia, confocal y de superresolución.

Dentro de las técnicas de microscopía más versátiles actualmente, destaca la microscopia conocida como microscopía de iluminación por plano selectivo o de hoja de luz, a la que nos referiremos como microscopia lightsheet,

la cual tiene aplicaciones en geología, diferentes ramas de la biología, como biología celular y biología del desarrollo, y diferentes ramas de la biomedicina, como búsqueda de biomoléculas de importancia diagnóstica, determinación de poblaciones celulares en una muestra, visualización de estructuras internas de tumores y muchas más. Esta variedad de aplicaciones que tiene la microscopía lightsheet la hace una herramienta sumamente valiosa actualmente, pero ¿cómo funciona? ¿Qué es la microscopía lightsheet? ¿Por qué llama tanto la atención? Acompañennos a averiguarlo.

El poder de la luz en la palma de nuestras manos

El microscopio es un instrumento que nos permite observar cosas diminutas o aquellas que no podemos observar a simple vista. El microscopio más sencillo actualmente es el microscopio óptico compuesto (figura 1), denominado así por usar 3 sistemas de lentes y una fuente de luz artificial (llámese también lámpara) para realizar la amplificación de la imagen, dando como resultado un mayor aumento. Estos tres sistemas son: el condensador, el cual concentra y regula los rayos de luz de la lámpara; los objetivos, un conjunto de lentes que se encargan de captar la luz una vez que esta incide en la muestra y generan la imagen; finalmente, los oculares, los cuales se encargan de formar una segunda imagen, y a través de los cuales podemos observar la imagen amplificada.

El funcionamiento básico es el siguiente: la muestra se coloca en la platina y es iluminada por un haz de luz blanca generado por la lámpara y concentrado gracias al condensador. La luz pasa por la muestra y es captada por los objetivos que generan una primera imagen aumentada. La luz sigue su camino y llega a los oculares donde es nuevamente captada y se genera una segunda imagen amplificada.



Figura 1. Componentes generales de un microscopio óptico compuesto.

Es en este punto en donde nosotros podemos ver la imagen. Algo importante es que la luz, a pesar de ser concentrada por el condensador, ilumina toda la muestra y no puede ser dirigida sólo a una parte de esta.

El desarrollo del microscopio óptico compuesto fue un gran avance científico y nos ha permitido desarrollar otro tipo de microscopías que aprovechan otras propiedades de la luz, como, por ejemplo, la fluorescencia. La fluorescencia es el proceso en el que una sustancia tiene la propiedad de absorber y liberar (emitir) luz casi inmediatamente. Esta luz liberada puede ser captada y detectada por diferentes instrumentos, y gracias a esta propiedad, hemos aprendido a usarla para nuestro beneficio en la microscopía de fluorescencia para poder observar estructuras o moléculas específicas de nuestro interés con mayor facilidad.

Los microscopios de fluorescencia se consideran microscopios ópticos modificados. La fuente de luz no es una lámpara de luz blanca, sino una luz LED, lámpara de mercurio, lámpara de xenón o láser, capaz de producir luz que permita que las moléculas fluorescan. Esta luz pasa por un filtro que hace que solo cierta parte de esta se dirija hacia la muestra,

a través del sistema de objetivos. Este sistema concentra la luz sobre la muestra y a la vez capta la fluorescencia emitida por la muestra para generar la imagen. La luz emitida es filtrada por un segundo filtro, el cual permite pasar solo la luz liberada por la muestra hacia los oculares, para finalmente observar la señal fluorescente en la muestra.

La microscopía de fluorescencia convencional es conocida como microscopía de epifluorescencia, donde la luz incide en una gran parte de la muestra, aun en las zonas que no entran dentro del campo de visión de los oculares, dañándose y comprometiendo la calidad de la imagen total. La iluminación de toda la muestra le genera diversos daños. El primero es conocido como fototoxicidad, un daño a la muestra producido por la luz, causado por la generación espontánea de moléculas conocidas como radicales libres, las cuales son capaces de degradar diferentes componentes celulares. Otro de los daños es el fotoblanqueo, que consiste en la degradación irreversible de moléculas capaces de emitir fluorescencia (fluoróforos), debido a una exposición prolongada de estas moléculas a la luz, causando que los fluoróforos pierdan su capacidad de

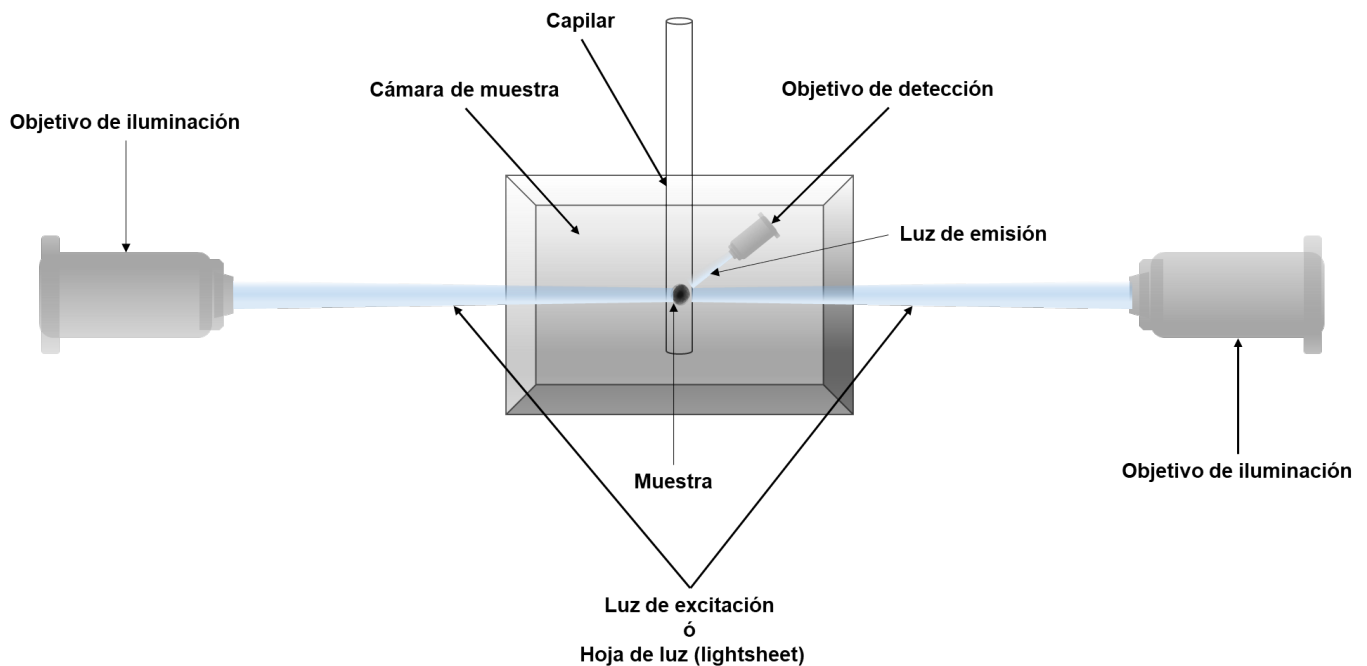


Figura 2. Esquema general del sistema de objetivos de un microscopio lightsheet. Se muestran los diferentes componentes básicos para la observación de una muestra. Un microscopio de hoja de luz puede tener uno o más objetivos de iluminación, los cuales son los encargados de generar el haz de luz. Estos objetivos están posicionados uno frente al otro, de tal manera que iluminan planos opuestos de la muestra a observar. El capilar es un dispositivo utilizado para contener la muestra de interés, está hecho de un gel especial que fija a la muestra sin dañarla, y se ubica dentro de la cámara de la muestra, una pequeña cámara metálica diseñada para que en ella embonen los diferentes objetivos, esta cámara se llena con un líquido (agua o alguna solución) que en conjunto con el capilar tienen un índice de refracción igual, evitando que el haz de luz se distorsione y afecte la captura de la imagen. El objetivo de detección se encuentra en un ángulo de 90° con respecto al o a los objetivos de iluminación y capta la luz emitida por la muestra contenida en el capilar.

emitir la luz en una diferente longitud de onda.

Para remediar este problema surgieron adaptaciones en los microscopios, dando lugar a otras tecnologías como lo es la microscopía confocal y más actualmente la microscopía lightsheet. que tratan de evitar la iluminación completa. La microscopía confocal, cuya aplicación es la visualización de muestras fluorescentes, ha optado por utilizar un sistema de iluminación por láser y la integración de un sistema que permite controlar el paso del haz de luz, estas adecuaciones reducen el área de la muestra expuesta a la luz, y se reduce la fototoxicidad y el fotoblanqueo, logrando obtener imágenes nítidas, aumentando la resolución. Es importante resaltar que este tipo de microscopía permite reconstruir una imagen de la muestra en 3 dimensiones, debido a un método de captura de imágenes en el cual se hace un escaneo de la muestra generando

“rebanadas ópticas”, que después serán utilizadas para una reconstrucción de la muestra generando la imagen.

Microscopía Lightsheet, más allá de la luz

Este es uno de los tipos de microscopía que más popularidad ha tenido en los últimos años debido a su gran poder de resolución y a sus aplicaciones en diversos campos de estudio, no sólo en el área biológica o biomédica. Similar a la microscopía confocal en ciertos aspectos, la microscopía lightsheet ha revolucionado la manera en que visualizamos muestras de interés biológico, permitiéndonos obtener mucha mayor información de ellas.

El sistema de iluminación utilizado en la

Tabla 1. Microscopía lightsheet versus microscopía confocal.

Características	Lightsheet	Confocal
Velocidad de captura	Rápida, por la disposición ortogonal de los objetivos.	Lenta, pues el seccionamiento y reconstrucción de la imagen se hace punto por punto.
Fototoxicidad	Mínima, solo en la zona expuesta a la luz.	Mayor, por la iluminación total del eje Z
Fotoblanqueo	Mínimo, sólo en la zona expuesta a la luz.	Mayor, por la iluminación total del eje z
Tipo de iluminación	Plano selectivo por la hoja de luz.	Campo amplio, se genera un cono de luz

microscopía lightsheet (figura 2) difiere de la microscopía convencional. Se basa en un sistema de objetivos con funciones distintas. Por un lado, uno de estos es el encargado de generar el haz de luz, este haz, es sumamente delgado, y tiene la particularidad de que sólo incide en una parte específica de la muestra que es iluminada, de ahí viene su nombre: microscopía de hoja de luz o de iluminación de plano selectivo. Al ser tan delgada la hoja de luz, debe moverse hacia arriba y hacia abajo de la muestra (eje Z) para poder hacer un escaneo y lograr visualizar toda la muestra de interés, por tal, esta iluminación selectiva implica un seccionamiento óptico generando “rebana-das” para una posterior reconstrucción 3D de la imagen.

El segundo objetivo tiene como finalidad capturar la luz emitida por la muestra posterior a ser iluminada. Está posicionado perpendicularmente con respecto al objetivo que es emisor de luz, exactamente a 90°. Este ángulo formado minimiza que la luz quede fuera de foco, garantizando una mayor resolución y nitidez de la imagen. Además de esto, esta microscopía es utilizada para visualizar muestras fluorescentes, gracias a la implementación de un sistema de filtros que se puede montar y desmontar con facilidad, haciendo de estos microscopios de lightsheet, equipos de gran utilidad.

Las ventajas de una hoja de luz

Es probable que aún con lo anterior, las

ventajas de la microscopía lightsheet sigan sin quedar totalmente claras, sobre todo, cuando la comparamos con la microscopía confocal. La microscopía lightsheet tiene un mayor poder de resolución en el eje Z que la microscopía confocal; sin embargo, en cuanto a los ejes X e Y, la microscopía confocal es mejor; esto último debido a la manera en que la imagen es reconstruida en ambos sistemas. Además de esto, quizá la mayor ventaja de la microscopía lightsheet es la fototoxicidad y fotoblanqueo reducidos gracias a su sistema de iluminación selectiva, haciendo que las muestras puedan ser manipuladas por más tiempo, permitiendo que se lleven a cabo ensayos por largos periodos de tiempo. Otras de las ventajas de la iluminación selectiva se enlistan adelante, no sin antes recordar, que cada tipo de microscopía tiene su aplicación y su uso, de ahí que existan tantas, y sigan siendo utilizadas.

Esferoides

En el campo de la investigación para tratamientos contra el cáncer, una de las etapas realizadas en el laboratorio es experimentar con células derivadas de diferentes tipos de cáncer, las cuales denominamos líneas celulares. Estas células pueden proliferar prácticamente de forma ilimitada, y son usadas con múltiples propósitos. Algunas tienen la capacidad de formar estructuras tridimensionales pequeñas parecidas a una esfera, denominadas esferoides. Estos esferoides son parecidos en su organización estructural y metabolismo a los tumores sólidos, lo que los hace

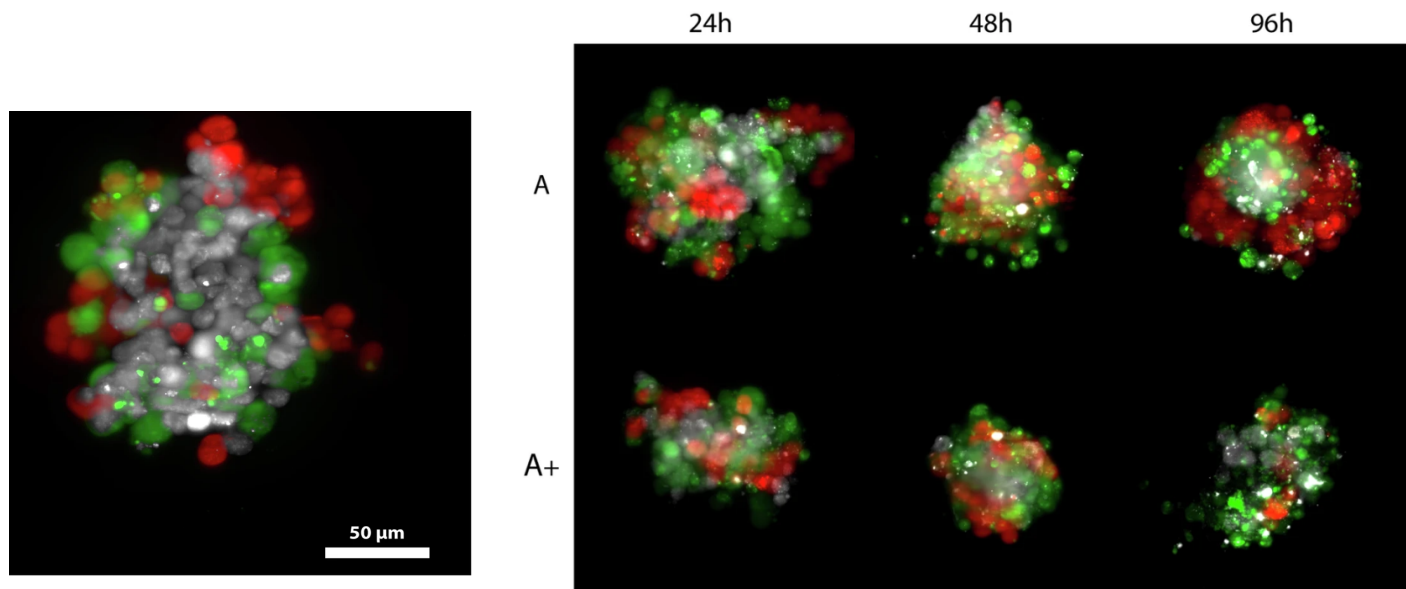


Figura 3. Visualización de esferoides a través de la microscopía de hoja de luz. Efecto del fármaco (A) en la estructura del esferoide a lo largo del tiempo. En rojo se muestran las células tumorales, mientras que en verde y gris se muestran otro tipo de células que forman parte del esferoide. Tomado y modificado de Diosdi et al., *Nature*, 2025.

muy útiles para estudiar y desarrollar nuevos fármacos para el tratamiento del cáncer, previo a usar modelos animales. No obstante, estudiarlos no es tan sencillo, y esto es debido a la limitante que presentan algunas herramientas o equipos para analizar estructuras en tres dimensiones, aun cuando su tamaño no sea mayor a algunos milímetros. Ahí es donde entra la microscopía de hoja de luz, la cual nos ha permitido superar numerosas limitaciones, como aumentar la penetración de la luz en la muestra, captar imágenes con mayor velocidad y provocar menos fototoxicidad, e iluminar la muestra desde diferentes ángulos.

Un ejemplo de cómo estos esferoides y la microscopía de hoja de luz se utilizan en la investigación es el siguiente. En un estudio publicado en 2025, a las y los investigadores les interesaba entender cómo los diferentes tipos de células que forman un tumor interactúan entre ellas, y a su vez, cómo las células del tumor interactúan con las células no tumorales. Con esta idea en mente, usaron varias líneas celulares de diferentes tipos de cáncer, así

como, otros tipos de células no tumorales que participan en el desarrollo tumoral. Tiñeron las células con moléculas fluorescentes que liberaron luz captada en diferentes rangos del espectro visible, y analizaron la composición del esferoide a nivel celular con la microscopía de hoja de luz. Tal y como se muestra en la figura, este tipo de microscopio permitió determinar a nivel celular la composición del esferoide, determinada por colores para cada tipo de célula: tumorales (rojo) y no tumorales (gris y verde), y luego permitió hacer una reconstrucción tridimensional de la muestra (A), mostrando cómo se alteraba la formación de la estructura cuando añadieron algún fármaco anticancerígeno (A+) conforme pasaban los días.

De estructuras multicelulares sencillas a órganos y tumores completos

La microscopía de hoja de luz no solo se limita a poder adquirir imágenes de alta resolución de estructuras celulares complejas como los esferoides. Como segunda instancia, tiene la bon-

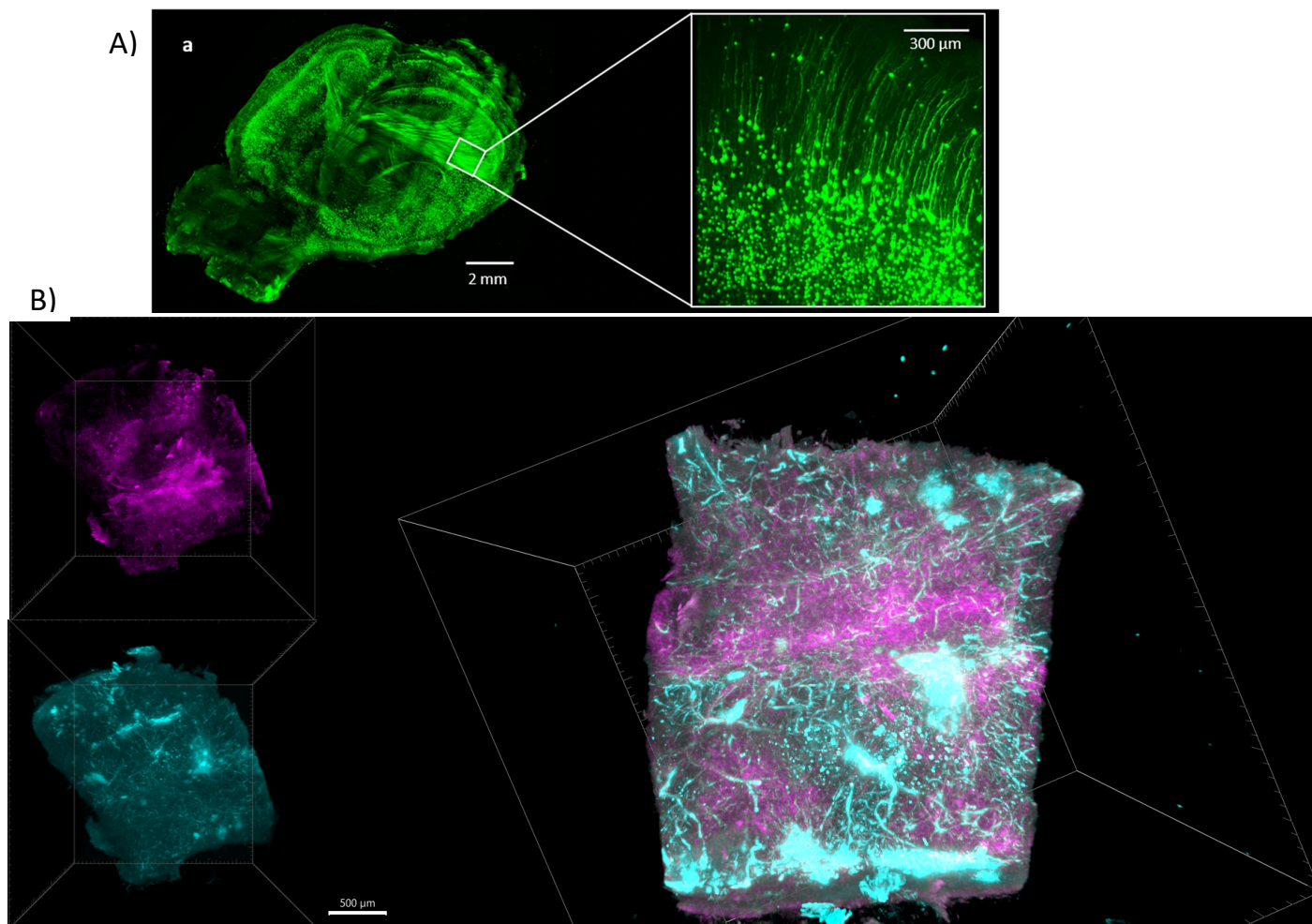


Figura 4. Muestras de cerebro de ratón y tumor escaneados por microscopía de hoja de luz. A) Cerebro completo de ratón que expresa una proteína verde fluorescente. B) Tumor compuesto por células fluorescentes (cian) obtenido de un ratón infiltrado con células humanas (morado). Tomado y modificado de Di Giovanna et al., *Nature*, 2019.

dad de capturar imágenes de órganos pequeños completos, así como muestras de tumores generados en algunos modelos animales, como ratones. De manera tradicional, las muestras de tejidos y tumores son cortadas en rebanadas muy delgadas, de un rango de grosor aproximado de 5 micrómetros, hasta aproximadamente 0.5 milímetros. Estas rebanadas evitan que podamos estudiar el tumor completo, haciendo que solo se pueda estudiar una porción limitada de una muestra de tumor. No obstante, la microscopía de hoja de luz permite observar el tumor completo, sin necesidad de cortarlo, siempre y cuando su tamaño no sea mayor a unos cuantos milímetros, de esta manera, podemos obtener detalles a nivel celular del tumor completo, o de algún ce-

rebro obtenido de un ratón, por ejemplo.

En el laboratorio, realizamos un proyecto donde inyectamos células del sistema inmune humano a ratones, con el objetivo de que estas acabaran con un tumor que se indujo de forma artificial. Como parte de los resultados, evaluamos la capacidad de que las células humanas llegaran al tumor. En la figura pueden observar cómo hay zonas del tumor (cian) repletas de estas células (magenta).

De lo sencillo a lo complejo, escaneando peces y ratones completos

Por si escanear órganos pequeños com-

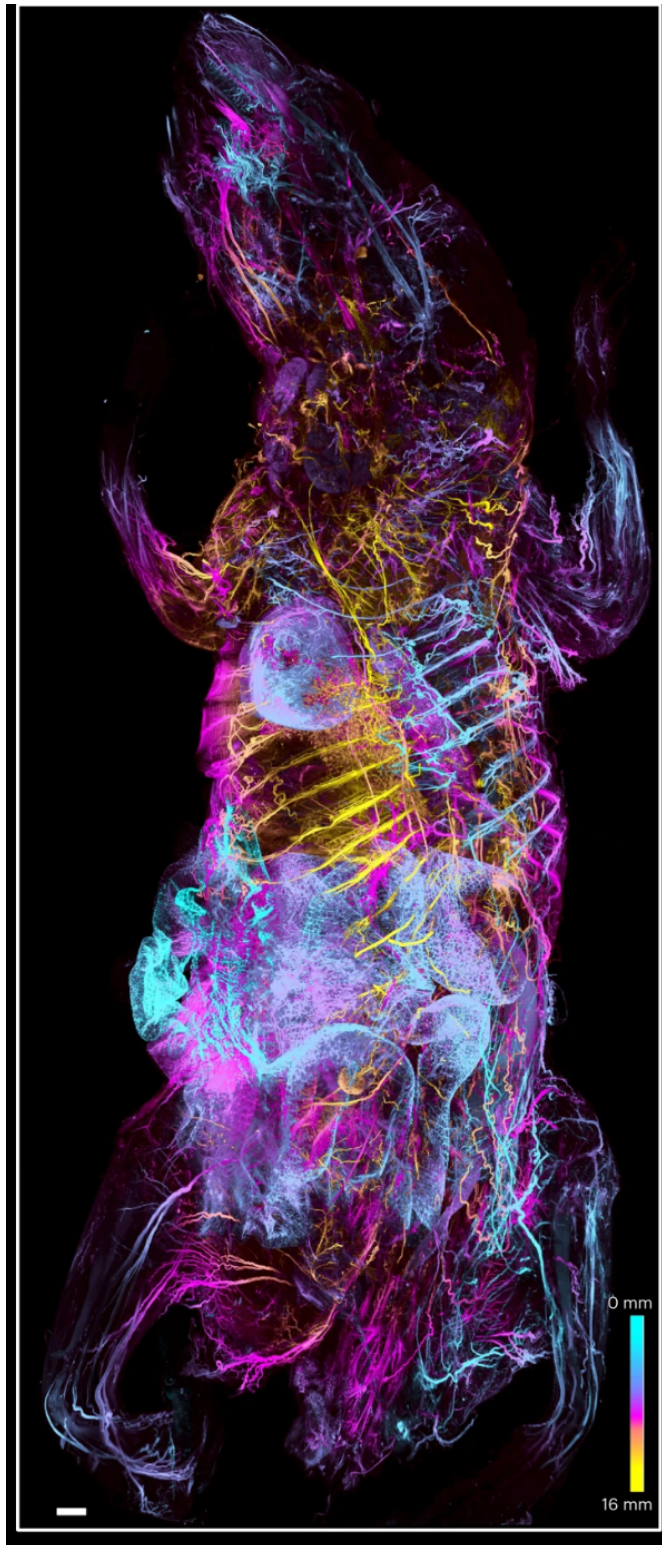


Figura 5. Escaneo completo de un cuerpo de ratón a través de microscopía de hoja de luz. Distribución de una proteína implicada en el sistema nervioso central a través de todo el cuerpo de un ratón. Tomado y modificado de Mai et al., *Nature*, 2023.

pletos o tumores les pareciera poco, las nuevas metodologías empleadas han permitido usar la microscopía de hoja de luz para poder obtener imágenes de organismos completos. Dentro de los modelos de estudio más utilizados en la ciencia se encuentran el pez cebra y, por supuesto, los ratones. Inicialmente, debido a su morfología y tamaño, los peces cebra eran los organismos por excelencia para estudiar con esta técnica. Sin embargo, en los últimos años se han desarrollado protocolos que permiten escanear ratones completos sin necesidad de separar o disectar órganos, no obstante, el trabajo con estas muestras requiere un paso adicional, que es la aclaración del tejido, para que haya una completa iluminación. En la figura se muestra un gradiente de colores que en su conjunto indica la presencia de una proteína implicada en el sistema nervioso del ratón.

Como podrán ver, la microscopía de hoja de luz nos permite seguir explorando un mundo microscópico a gran resolución que existe dentro del mundo macroscópico. Desde analizar muestras diminutas, como los esferoides, hasta poder escanear especímenes completos del tamaño de un ratón. Consideramos que es una herramienta sumamente poderosa con potencial de aplicación en diferentes ámbitos, como la biomedicina, permitiendo ir más allá de los límites y barreras a los que se enfrentan otras técnicas.

Referencias

- [1] Diosdi A. et al. Single-cell light-sheet fluorescence 3D images of tumour-stroma spheroid multicultures. *Sci Data*. 2025 Mar 24;12(1):492.
- [2] Di Giovanna A. et al. Whole-Brain Vasculature Reconstruction at the Single Capillary Level. *Sci Rep*. 2018 Aug 22;8(1):12573.
- [3] Mai H. et al. Whole-body cellular mapping in mouse using standard IgG antibodies. *Nat Biotechnol*. 2024 Apr;42(4):617-627.