

Histoquímica

A. Ulises Acuña, José Elguero

Resumen: La química de colorantes contribuyó al avance de áreas científicas muy diversas, entre ellas la histología. El histólogo utiliza una larga serie de colorantes para obtener imágenes de la morfología de tejidos biológicos y anatomía celular, mediante microscopía óptica. El estudio microscópico de los componentes y reacciones químicas que caracterizan los tejidos biológicos constituye la histoquímica, y se basa, asimismo, en la utilización de colorantes muy específicos. En España, Santiago Ramón y Cajal destacó no solamente por sus investigaciones sobre el sistema nervioso, sino también como un gran innovador de la neurohistología, ciencia que encontró brillantes continuadores en nuestro país en el siglo pasado.

Palabras clave: Histología, histoquímica, colorantes, Ramón y Cajal, microscopía.

Abstract: Dye chemistry facilitated important advances in several scientific areas, as is the case of histology. In this field dyes are used to record images of biological tissues and cell anatomy under the light microscope. Besides that, the related science of Histochemistry addresses the understanding of the chemical composition and reaction mechanisms taking place in biological tissues. In Spain Santiago Ramón y Cajal, well known by his crucial contributions to the current knowledge of the nervous system, was also a leading innovator of staining methods for neurohistology, inaugurating a tradition of noted Spanish histochemists.

Keywords: Histology, histochemistry, dyes, Ramón y Cajal, microscopy.

Introducción

Todos los químicos conocen la importancia que tuvieron los colorantes en el desarrollo de su disciplina,^{1,2} aunque también saben que actualmente es un área de la química relativamente poco frecuentada.

Hay, sin embargo, una parte de la ciencia de los colorantes que ha jugado un papel histórico en otra especialidad: la histología. El histólogo estudia, en primer lugar, la estructura microscópica de tejidos, células y orgánulos celulares para describir su morfología y posible función. Además, le interesa llevar esta descripción a nivel molecular, y llegar a conocer con resolución espacial la composición y reactividad químicas (histoquímica) del sistema biológico. Para obtener imágenes de composición química o de actividad metabólica *in situ*, manteniendo célula y tejido intactos, utiliza fundamentalmente la microscopía óptica. El microscopio óptico de transmisión se perfeccionó considera-

blemente en Alemania a finales del siglo XIX, gracias al trabajo conjunto de Carl Zeiss, de su responsable de investigación Ernst Abbe y de Otto Schott, que consiguió desarrollar los nuevos tipos de vidrio que requerían los objetivos calculados por Abbe. En este tipo de microscopía, las muestras de tejidos o las células individuales tienen espesores pequeños (0,02-10 μm), por lo que los cambios de intensidad debidos a la absorción de luz por las diferentes partes de su estructura no alcanzan el 10-20% necesario para que el ojo humano pueda identificar imágenes correctamente.³ Para aumentar el contraste se recurrió muy pronto a aprovechar la extraordinaria sensibilidad del ojo a diferentes longitudes de onda (colores), mediante técnicas de tinción de células y de orgánulos celulares. Así, por ejemplo, se utilizó la mauveína en preparaciones histológicas poco tiempo después de su descubrimiento por Perkin.² En la mayoría de los casos se buscaba que la tinción fuera muy específica⁴ y, por supuesto, que no alterase la delicada estructura del sistema biológico.^{5,6} En la historia de la ciencia, pero aún más en la historia de la ciencia española, la figura de Santiago Ramón y Cajal está indisolublemente unida a los métodos de tinción de tejidos, a la histología y a lo que hoy se conoce como histoquímica.



A. Ulises Acuña¹



J. Elguero²

¹ Instituto Química-Física “Rocasolano”, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, 28006 Madrid.

C-e: roculises@iqfr.csic.es

² Instituto de Química Médica, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, 28006 Madrid.

C-e: iqmbe17@iqm.csic.es

Recibido: 20/06/2011. Aceptado: 03/09/2011.

Colorantes histológicos y química médica

Paul Ehrlich (1854-1915, Premio Nobel de Medicina en 1908) realizó su investigación de doctorado sobre la teoría y práctica de la tinción histológica (“*Beiträge zur Theorie und Praxis der histologischen Färbung*”, Facultad de Medicina de Leipzig, 1878). A él se debe la demostración de la existencia de la barrera hematoencefálica al colorear con anilina la sangre de un ratón y observar que el cerebro del animal no se teñía. Una de sus mayores innovaciones consistió en el uso de diferentes colorantes (azules de metileno y de indofenol) para la tinción selectiva de diferentes tipos de células. Erlich clasificaba como *basófilas*, *acidófilas* y *neutrófilas* aquellas células que se coloreaban específicamente con colorantes básicos,

ácidos o neutros, respectivamente, explicando dicha especificidad mediante la presencia de los correspondientes grupos ionizables. También fueron importantes sus aportaciones al campo de la quimioterapia, que incluyen el descubrimiento del 606 (por ser fruto de 606 experimentos), en 1901, de la “bala mágica” o Salvarsán (arsfenamina), una preparación de arsénico orgánico empleada en el tratamiento de la sífilis y de la fiebre recurrente, y del Neosalvarsán (neoarsfenamina). El neosalvarsán fue conocido durante mucho tiempo como (Ehrlich 914) por tratarse del compuesto nº 914 preparado por Ehrlich y su ayudante para combatir dichas enfermedades.

Gerhard Domagk (1895-1964, Premio Nobel de Medicina 1939), trabajó en los laboratorios de microbiología de IG Farben en el uso de los colorantes como antibióticos, siguiendo las pautas marcadas por Ehrlich. Encontró que la sulfonamida prontosil (un colorante rojo, “prontosil rubrum”, en realidad un profármaco) era efectiva contra las infecciones causadas por estreptococos. Experimentó el producto en su propia hija, afectada de una grave septicemia que había contraído al pincharse con una aguja, logrando una curación espectacular. Domagk obtuvo el premio Nobel por el descubrimiento del prontosil, primer fármaco efectivo contra las infecciones bacterianas. Fue forzado por el régimen nacionalsocialista a rehusar el premio, que recibió finalmente en 1947.

Ehrlich descubrió en 1891 que el azul de metileno constituía un tratamiento efectivo contra la malaria,^{7,8} pero era ligeramente tóxico, coloreaba la orina en verde y el blanco de los ojos en azul. Durante la Segunda Guerra Mundial aquellos países que luchaban en el Pacífico, como EE UU y Francia (Indochina), buscaron disminuir su toxicidad y sus propiedades colorantes reduciéndolo de fenotiácino a fenotiácina (Figura 1). En los laboratorios Rhône-Poulenc se descubrió que las fenotiácinas no poseían actividad contra la malaria, pero eran potentes antihistamínicos. Sucesivas modificaciones (Figura 1) llevaron a la prometazina (Fenergan®) y de ésta, con la colaboración de los médicos Laborit, Delay y Deniker, a la clorpromazina (Largactil®, Torazina®), el mayor avance jamás realizado para el tratamiento de las enfermedades mentales.⁹ Simone Courvoisier, la responsable de farmacología en los laboratorios Rhône-Poulenc, jugó un papel crucial diseñando originales experimentos con animales de laboratorio para identificar los efectos de la clorpromazina sobre el sistema nervioso central.

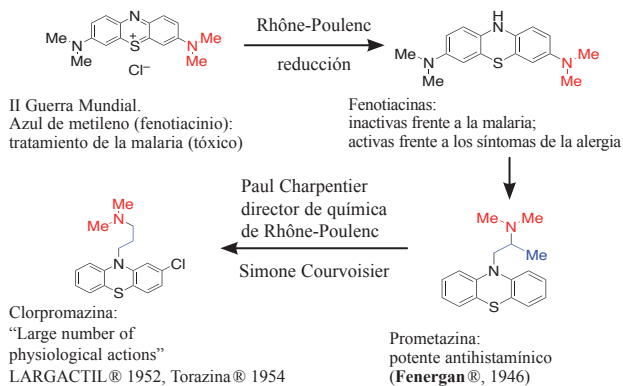


Figura 1. Desarrollo de fármacos a partir del azul de metileno.

Cajal y las técnicas tintoriales en neurohistología

La tinción de tejido nervioso era un problema difícil, debido, entre otras razones, a la elevada concentración de lípidos que impedía el uso de los colorantes polares habituales. Cajal desarrolló varios métodos originales de tinción específica^{10,11} y modificó, mejorándolos, algunos de los ya existentes, como el de Golgi. En 1903 descubrió el método del nitrato de plata reducido,¹⁰ que le permitió estudiar la estructura de las neuronas en fases de su desarrollo en las que el método de Golgi no era útil. Son dos métodos complementarios,¹² el de Golgi impregna la superficie celular, salvo en la modificación para teñir el aparato de Golgi, y permite estudiar células enteras y sus conexiones, mientras que el del nitrato reducido se usa para estudiar la estructura del citoplasma y núcleo celular (neurofibrillas, cuerpo de Cajal, etc.).

Probablemente Cajal no hubiese tenido tanto éxito si no hubiesen concurrido dos circunstancias: era un gran dibujante y un excelente fotógrafo (Figura 2); veía más allá que los otros histólogos de su tiempo, y donde éstos pretendían ver una red inextricable, un continuo (el reticularismo), influidos por consagrados criterios “de escuela”, Cajal comprobó la existencia de neuronas individuales¹¹ (el neuronismo). La ciencia no es descripción neutra, es interpretación de lo observado. Sin sus dotes artísticas, sus colorantes y su independencia de criterio posiblemente Cajal no hubiera alcanzado una comprensión revolucionaria del sistema nervioso.

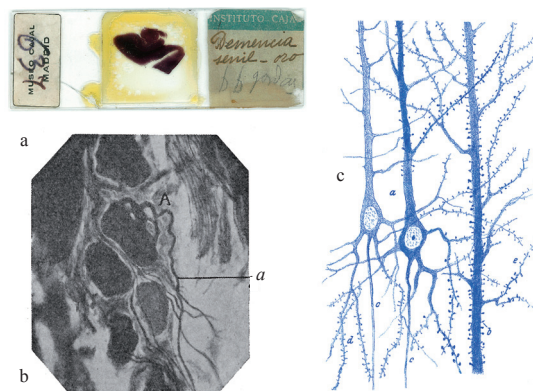


Figura 2. (a) Preparación histológica de Cajal del cerebro de un enfermo con demencia senil en la que utiliza su método del oro-sublimado.¹³ (b) Microfotografía combinada del ganglio plexiforme de un perro en la que Cajal, utilizando su método del nitrato de plata reducido, consigue mostrar el recorrido del axón (a) combinando tres microfotografías de otros tantos planos focales. (c) Dibujo de una célula piramidal de conejo, realizado por Cajal a partir de una preparación en la que utilizó su modificación del método del azul de metileno (reproducción autorizada por los herederos de S. Ramón y Cajal).

Partiendo inicialmente de los hallazgos de Camillo Golgi y de Luis Simarro,¹⁴ Cajal mostró una paciencia, una constancia y una obstinación ejemplares. En una aproximación desprovista de todo fundamento racional, que recuerda a las de Ehrlich y Domagk, probó todo lo que le habían dicho, todo lo que otros descubrieron, incluidas las técnicas de Freud (Figura 3) para el sistema nervioso central,¹⁵ todo lo que pudo imaginar, para mejorar las imágenes de sus cortes neurohistológicos. Así, hasta los últimos días de su vida.¹⁶

A NEW HISTOLOGICAL METHOD FOR THE STUDY OF NERVE-TRACTS IN THE BRAIN AND SPINAL CHORD.

BY DR. SIGM. FREUD,

Assistant Physician to the Vienna General Hospital.

In the course of my studies on the structure and development of the medulla oblongata I succeeded in working out the following method, which will be found a powerful aid in tracing the course of fibres in the central nervous system of the adult and the embryo.

Pieces of the organ are hardened in bichromate of potash, or in *Ehrlich's* fluid (2½ parts of bichromate of potash and ¼ of sulphate of copper to 100 parts of water), and the process of hardening is finished by placing the specimen in alcohol; thin sections are cut by means of a microtome and washed in distilled water. The washed sections are brought into an aqueous solution of chloride of gold (1 to 100) to which is added half or an equal volume of strong alcohol. This mixture is to be preferred to the simple aqueous solution of chloride of gold, which has been hitherto used in staining preparations; the sections are to remain in it from 3 to 5 hours. With the aid of a wooden rod (metal to be avoided) they are taken out of this solution, washed in distilled water and placed in a concentrated solution of caustic soda (1 to 5 or 6 of water); which very soon renders them transparent and slippery. After 2 or 3 minutes the preparations are taken out of the soda with the same wooden rod (toothpick or match), and the superfluous soda is allowed to drop off. The sections are then, with the soda they still contain, put into a 10 per cent. solution of iodide of potash where they almost immediately receive a tender rose-colouring, which changes into darker hues of red during the next 5 to 15

Figura 3. Método de tinción de tejido nervioso desarrollado por Sigmund Freud.

El conocido interés de Cajal por la fotografía y el avanzado carácter de sus trabajos en este campo¹⁷ nos llevan a preguntarnos si su uso de la plata en fotografía precedió o siguió a su uso en histología. Históricamente, el interés de Cajal por la fotografía fue anterior (1868, 1879) a sus trabajos histológicos (1881), pero luego ambos campos se entrecruzan y fertilizan mutuamente, avanzando en paralelo (su libro *La fotografía en colores* es de 1912). Así por ejemplo, para su técnica favorita de tinción histológica mediante nitrato de plata, Cajal recomienda la utilización de un reductor fotográfico, el pirogalol.

La histoquímica en el Instituto Cajal

El interés por la investigación histoquímica renació en la segunda mitad del siglo XX en el Instituto Cajal (CSIC) de la mano del Dr. Ricardo Martínez Rodríguez, Jefe del Departamento de Neurohistoquímica y Neurobioquímica. El Dr. Martínez (Ribadavia, Orense, 1925), médico de la Armada, se especializó en Histología bajo la tutela del Dr. A. Carrato, catedrático de histología y anatomía patológica (Univ. Complutense de Madrid) y Director del Instituto Cajal (1963-1981). Asimismo, Martínez trabajó con Raymond J. Wegmann, Director del *Institute de Histochemie* de las Universidades de París y omnipresente impulsor de la histoquímica y biología molecular y celular en Europa y Sudamérica (Figura 4).

Martínez puso a punto, en los laboratorios del Instituto Cajal, numerosas técnicas histoquímicas y desarrolló métodos originales para detectar actividades enzimáticas *in situ*, como parte de su investigación sobre neurotransmisores que fue reconocida con el Premio Ramón y Cajal del CSIC (1967). Para sistematizar y difundir este extenso conocimiento escribió, a finales de la década de los 70, un tratado de histoquímica de más de 1000 páginas, del cual se distribuyeron copias producidas de manera artesanal.¹⁸ A partir de esta obra, Martínez y Gragera editaron recientemente un enciclopédico compendio de la teoría y práctica de la Histoquímica,^{5d} al que contribuyeron, además, Joaquín Plumet, Ricardo Martínez-Murillo y Javier Capilla.



Figura 4. De izquierda a derecha A. Carrato, R. J. Wegmann y R. Martínez, en una de las visitas del histólogo francés a España (1979).

El lector encontrará aquí métodos histoquímicos específicos para la determinación *in situ* de diferentes grupos funcionales orgánicos (aldehídos, cetonas, alcoholes,...), de aminoácidos, proteínas, lípidos, hidratos de carbono, ácidos nucleicos, etc., así como de una larga serie de enzimas y de procesos metabólicos. En cada capítulo se discute el fundamento químico de la reacción de tinción, cuando se conoce, y, a continuación, se detalla el correspondiente protocolo de trabajo. Para un químico es curioso comprobar que, en la mayoría de los casos, el mecanismo de la reacción responsable de la selectividad del método histológico se conoce sólo fragmentariamente.

La histoquímica hoy: microscopía de fluorescencia y nanoscopía

El microscopio óptico de transmisión alcanzó, hacia 1900, el límite físico de resolución lateral ($\sim 0,2 \mu\text{m}$), que viene dado por la condición de difracción de Abbe.¹⁹ Los nuevos instrumentos, como el microscopio confocal de transmisión,²⁰ que mejoró la resolución a lo largo del eje perpendicular al plano de la muestra, o el de contraste de fases interferencial, que no requiere la tinción previa del sistema biológico, no pueden escapar al límite de Abbe. La ruptura de la barrera de difracción tendría que esperar al desarrollo de la microscopía de fluorescencia, una técnica que se inició tempranamente en Alemania.²¹ En un microscopio de fluorescencia se incorpora a la muestra un colorante fluorescente (floróforo) y se observa desde el mismo lado del que se excita (epi-iluminación), como cuando se observa un objeto opaco; idealmente este instrumento podría proporcionar imágenes con un contraste infinito (luz/oscuridad). La utilidad de esta técnica depende de la habilidad del químico para obtener fluoróforos con las propiedades de selectividad que requiere el biólogo y que, además, emitan eficientemente y sean fotoestables una vez incorporados al sistema biológico. Para resolver este arduo problema hoy se recurre a ingeniosos diseños moleculares,²² anticuerpos, cristales semiconductores o proteínas fluorescentes. La disponibilidad de marcadores fluorescentes, unida a la de nuevos láseres, cámaras digitales y técnicas de análisis de imágenes, ha dado como resultado el moderno microscopio confocal de fluorescencia, que permite obtener imágenes de especímenes vivos y tejidos de una excelente calidad (Figura 5), con una resolución lateral muy próxima al límite de difracción.

Las técnicas de imagen basadas en la fluorescencia han conducido, además, a la aparición de la microscopía óptica con resolución de nanómetros, es decir, la *nanoscopia*.²³ Entre los varios métodos que actualmente se están desarrollando destacamos aquellos que se basan en la utilización de fluoróforos “biestables”, es decir, que pueden bascular entre un estado apagado (no fluorescente) y encendido (fluorescente). En estos métodos (por ejemplo PALM y STORM, por sus siglas en inglés), se marca densamente el objeto con moléculas del fluoróforo que se encuentran inicialmente en el estado “apagado”. Mediante un pulso láser de muy baja intensidad se hace pasar al estado “encendido” a unas pocas moléculas distribuidas al azar por la superficie del objeto. La tecnología electroóptica actual permite determinar la posición de estas moléculas únicas, ahora fluorescentes, con una exactitud mejor de 1 nm, por lo que, repitiendo el proceso un número elevado de veces, se puede reconstruir la imagen del objeto con resolución lateral nanométrica.²⁴ Desgraciadamente, hoy se conocen muy pocas sustancias fluorescentes con esta propiedad. El gran reto del (histo)químico del siglo XXI es el diseño de los nuevos tipos de moléculas fluorescentes que necesita la nanoscopia, con la bioespecificidad que reclama el biólogo.²⁵

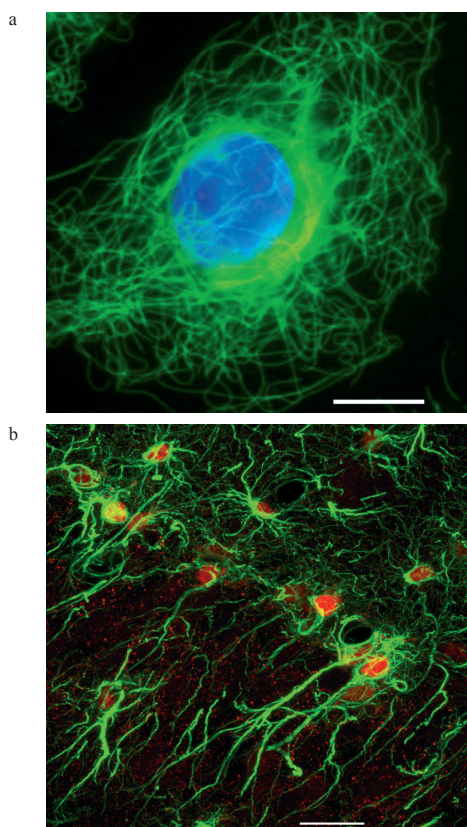


Figura 5. Imágenes de microscopía confocal de fluorescencia: a) Célula de carcinoma de pulmón humano. El sistema de microtúbulos (verde, diám. ~ 25 nm) se marcó con un análogo fluorescente del fármaco antitumoral paclitaxel²⁶ y el núcleo se tiñó con el colorante Hoechst 33342.²⁷ Barra 10 μm (imagen cedida por la Dra. I. Barasoain); b) Astrocytos de cerebro de ratón. El citoplasma (verde) y el núcleo (rojo) se marcaron mediante anticuerpos fluorescentes específicos de proteínas que aparecen únicamente en dichas localizaciones. Barra 20 μm (imagen cedida por el Dr. R. Martínez Murillo).

Agradecimientos

Agradecemos al Dr. Miguel A. Freire la Figura 2, así como su inestimable ayuda y comentarios durante la elaboración de este trabajo; y a los Drs. R. Martínez Murillo, A. Toledano, F. Amat y P. García Madrazo su valiosa colaboración. Los autores agradecen a los herederos de Santiago Ramón y Cajal el permiso para la reproducción de la Figura 2. Trabajo financiado por el Proyecto CTQ2010/16457 del Ministerio de Ciencia e Innovación, España.

Bibliografía

- (a) H. Zollinger, *Color Chemistry. Synthesis, Properties, and Applications of Organic Dyes and Pigments*, Third edition, Wiley-VCH, Verlag Helvetica Chimica Acta, Zürich, **2003**. (b) K. Nassau, *The physics and Chemistry of Color*, Wiley-Interscience, New York, **1983**.
- S. Garfield, *Mauve: How One Man Invented a Color That Changed the World*, Faber & Faber Ltd., London, **2001**.
- Para aumentar el contraste se han desarrollado varios métodos ópticos muy ingeniosos, que transforman diferencias de índice de refracción (fase), polarización, etc. en diferencias de intensidad de luz.
- El tinte en microscopía óptica no sólo se utiliza para aumentar el contraste en un tejido, sino para determinar la localización espacial de un tipo específico de compuestos (lípidos, p. ej.) o de una actividad enzimática.
- Existen numerosos manuales sobre las técnicas de tinción y los colorantes más utilizados en histología, p. ej. (a) J. Kiernan, *Histological and Histochemical Methods: Theory and Practice*, Pergamon Press, Elmsford, **1981**. (b) E. B. Prophet, B. Mills, J. B. Arrington, L. H. Sobin, Eds. *Laboratory Methods in Histochemistry*, American Registry of Pathology, Washington, D. C., **1992**. (c) Uno de los más célebres es R. W. Horobin, J. A. Kierman, Eds. *CONN'S Biological Stains*, 10th Edition, Biological Stain Commission, Oxford, **2002**. (d) R. Martínez Rodríguez, R. R. Gragera Martínez Eds. *Fundamentos teóricos y prácticos de la Histoquímica*. Publicaciones del CSIC, **2008**.
- Hay varias revistas cuyo título incluye la palabra Histoquímica, p. ej.: *Biotechnic and Histochemistry*, *Histochemistry and Cell Biology* y *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. Otras, aunque no la incluyen, publican esencialmente artículos de tipo histoquímico.
- En 1876, Heinrich Caro (el científico responsable de la “reacción de Caro” y el “ácido de Caro”), trabajando en la BASF, preparó un nuevo colorante, el azul de metileno, a partir de *p*-amino-dimetilanilina. Auguste Bernthsen, un químico de Heidelberg, determinó su estructura, a petición de Caro, y denominó *fenotiazina* al anillo. Siguiendo la teoría de la *bala mágica* de Ehrlich, Koch usó azul de metileno para caracterizar la micobacteria de la tuberculosis. Ehrlich encontró que el azul de metileno también coloreaba el parásito de la malaria, lo que le llevó a ensayarlo como antipalúdico. También descubrió que coloreaba las células nerviosas, lo que condujo a Pietro Bodoni en 1899 a usarlo para tratar desórdenes psicóticos (sin éxito). Sin el azul de metileno no hubiera habido antihistamínicos (dos Premios Nobel, Daniel Bovet y James Black) y sin antihistamínicos no hubiera habido antipsicóticos ni antidepressivos tricíclicos.
- Martínez y Gragera^{5d} mencionan con detalle varias de sus aplicaciones histológicas, incluida la determinación de residuos básicos (*basofilia*) en tejidos (p. 375). En 5c se describe el cambio de color en metanol desde el azul, $\lambda_{\text{abs}} = 656 \text{ nm}$, a incoloro, $\lambda_{\text{abs}} = 330 \text{ nm}$, por reducción a azul de leucometileno, una fenotiacina (p. 93), así como sus propiedades como colorante de tinción celular (pp. 299 y 423).

9. (a) J. E. Kristiansen, *Dan. Med. Bull.* **1989**, *36*, 178–185. (b) W. Sneader, *Drug News & Perspectives* **2002**, *15*, 466–471.
10. J. De Felipe, E. G. Jones, *Trends in Neurosciences* **1992**, *15*, 237–245.
11. T. R. Heinz, *Biotechnic & Histochemistry* **2005**, *80*, 211–222.
12. Se pueden encontrar excelentes reproducciones de los dibujos y preparaciones histológicas de Ramón y Cajal en las publicaciones de Miguel Freire y colaboradores: (a) A. Martínez, V. G. Marín, S. Ramón y Cajal Junquera, R. Martínez-Murillo, M. Freire, *Nature Rev. Cancer* **2005**, *5*, 904–909. (b) V. García-Marín, P. García-López, M. Freire, Cajal's contributions to glia research, *Trends Neurosci.* **2007**, *30*, 479–487. (c) V. García-Marín, P. García-López, M. Freire, *J. History Neurosci.* **2009**, *18*, 197–210. (d) P. García-López, V. García-Marín, M. Freire, *Front. Neuroanatomy* 4:9. doi 10.3389/neuro.05.009.2010.
13. En este método se utiliza para la tinción una mezcla de cloruros aúrico y mercurio, conocido éste en el siglo XIX como "sublimado corrosivo".
14. N. Fernández, C. Breathnach, *J. Hist. Neurosci* **2001**, *10*, 19–26.
15. K. Mayer, Chlorure d'or: À propos des études chimiques et histoquímiques de Sigmund Freud, **1996**, *312*, 406–408. S. Freud, **1884**, *7*, 86–88.
16. J. Elguero, *Metodología de la investigación: los ejemplos de Freud y de Cajal*, Anexo III (Métodos de tinción), Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, Madrid, **2004**.
17. M. B. Márquez, Santiago Ramón y Cajal: *Ámbitos* **2004**, 139–153.
18. R. Martínez Rodríguez, con la colaboración de A. Toledano Gasca, R. Martínez Murillo, L. M. García-Segura, *Histoquímica* **1979**.
19. E. Abbe, *Arch. Mikroskop. Anat.* **1873**, *9*, 413–418.
20. El microscopio confocal de barrido es uno de los grandes avances de la microscopía óptica. Fue inventado en 1956 en la Universidad de Harvard (EE UU) por el joven matemático M. L. Minsky (Nueva York, 1927), el cual estaba interesado en mejorar las técnicas de observación, precisamente, de las sinapsis neuronales. Para explotar las grandes posibilidades de este tipo de microscopio hubo que esperar a los nuevos láseres, detectores y microprocesadores de la década de los 90. Minsky se trasladó en 1958 al Massachusetts Institute of Technology, en donde creó una nueva especialidad científica, la inteligencia artificial, por la cual es mundialmente conocido.
21. O. Heimstadt, *Z. Wissens. Mikrosk.* **1911**, *28*, 330.
22. Hay una gran variedad de marcadores fluorescentes disponibles comercialmente, ver p. ej. *Molecular Probes Handbook*, 11th Edit. 2010, Invitrogen Corp. (Carlsbad, EEUU) o *Fluorescent Labels and Dyes Catalog*, ATTO-TEC (Siegen, Alemania).
23. S. W. Hell, *Science* **2007**, *316*, 1153–1158.
24. G. Patterson, M. Davidson, S. Manley, J. Lippincot-Schwartz, *Ann. Rev. Phys. Chem.* **2010**, *61*, 345–367.
25. S. W. Hell, *Nature Methods* **2009**, *6*, 24–32.
26. (a) A. A. Souto, A. U. Acuña, J. M. Andreu, I. Barasoain, M. Abal, F. Amat-Guerri, *Angew. Chem. Intl. Ed.* **1996**, *34*, 2710–2712; (b) M. Abal, A. A. Souto, F. Amat-Guerri, A. U. Acuña, J. M. Andreu, I. Barasoain, *Cell Motil. Cytoskel.* **2001**, *49*, 1–15.
27. El colorante Hoechst 33342 es una bisbenzimidazina cuyo rendimiento cuántico de fluorescencia aumenta considerablemente al intercalarse en la doble hélice del ADN.

X Premios Investigación Lilly para alumnos de doctorado

3 premios de 1.500 € para los alumnos de doctorado de las Áreas de Química Orgánica, Farmacéutica y Analítica



13 de julio de 2012

Finaliza el plazo para la recepción de candidaturas.

28 de septiembre de 2012

Entrega de premios en las instalaciones de Lilly en Alcobendas (Madrid), con las conferencias de la Dra. Cristina Nevado (Chemistry University of Zurich) y del Dr. Phil S. Baran (Scripps Research Institute)

Bases de los premios y otros datos en www.lilly.es/investigacion-y-desarrollo

Eli Lilly es una compañía farmacéutica global con centros de investigación en EEUU y Europa, líder en el descubrimiento, desarrollo y comercialización de nuevos medicamentos. El centro de I+D en Alcobendas, dedicado a Química Médica, Orgánica y Analítica, a través del Comité Europeo para Relaciones Académicas (EUACC), se complace en convocar en España los X Premios de Investigación para alumnos de doctorado.

Eli Lilly en Europa:

España: Alcobendas, www.lilly.es Reino Unido: Windlesham, www.lilly.co.uk Irlanda: Kinsale, www.lilly.ie

