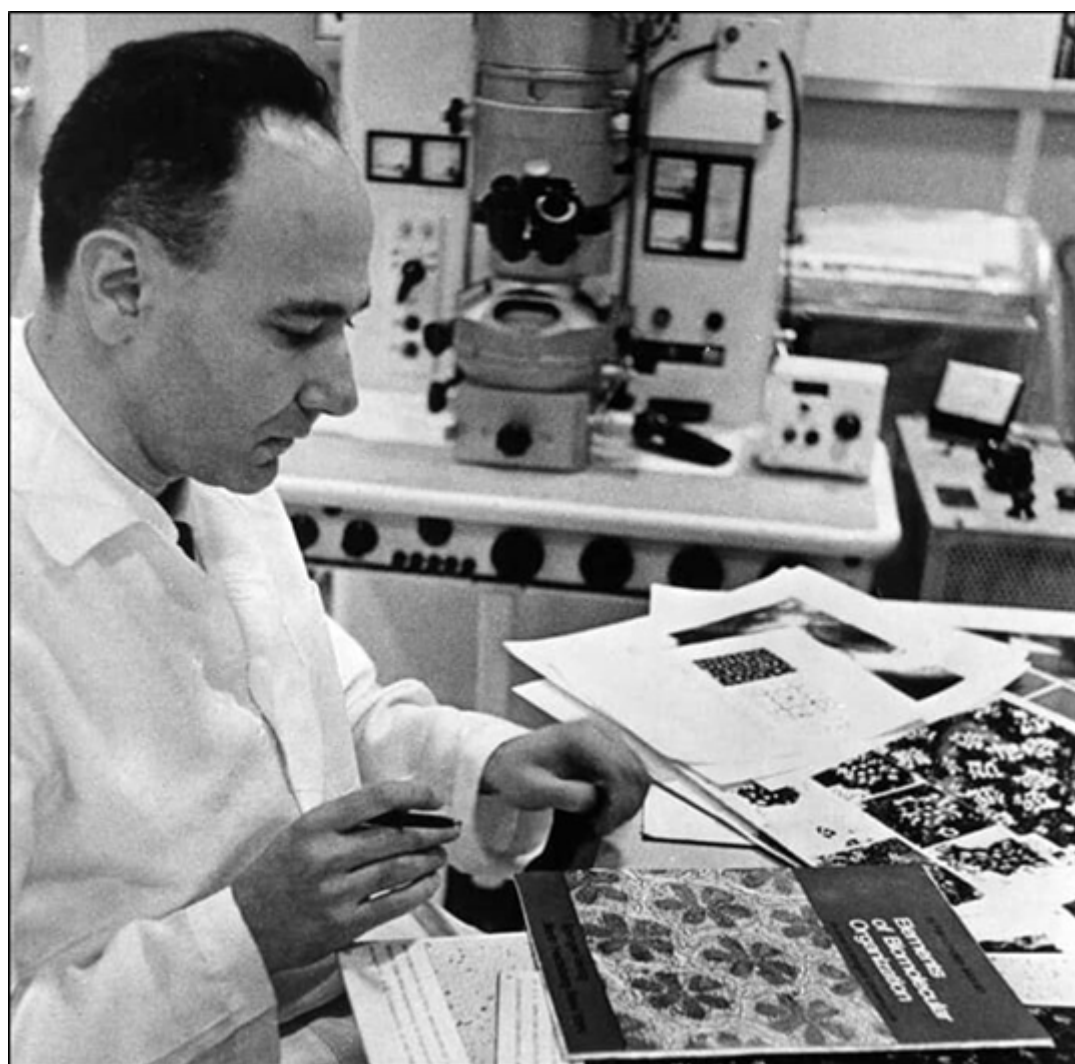


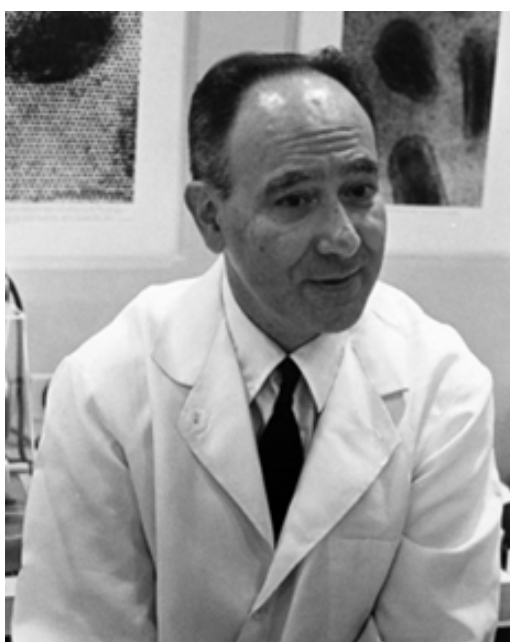
Homenaje a Humberto Fernández- Morán



“¿Qué es vivir?, una pregunta simple con una respuesta compleja, en el mundo científico puede ser descubrir lo inesperado, ver lo invisible, desarrollar la imaginación y llevar lo imaginado a algo tangible.”

Alexandra Puruncaja

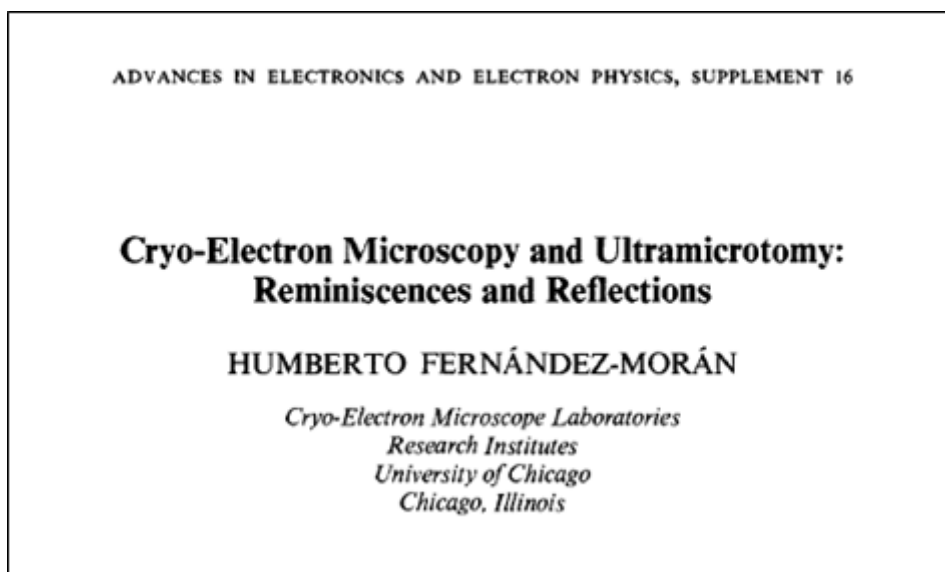
La revista *Acta Microscopica*, en su aniversario número 30, rinde homenaje a un gran científico latinoamericano: Humberto Fernández-Morán (1924-1999), conmemorando los 100 años de su nacimiento. El Dr. Fernández-Morán marcó un antes y un después en el campo de la Microscopía Electrónica debido a sus contribuciones a la investigación científica y al desarrollo de herramientas y técnicas tales como la cuchilla de diamante y la Crío-Microscopía Electrónica. Fernández-Morán dejó una huella muy profunda en el área científica debido a su sed de conocimiento desde muy joven, a su continua labor, a su legado investigativo y a la creación del Instituto Venezolano de Neurología e Investigaciones Cerebrales, antecesor del actual Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC). Con gran orgullo nuestra Revista publica la traducción al español de su artículo “Cryo-Electron Microscopy and Ultramicrotomy: Reminiscences and Reflections”, realizada por el Dr. Carlos Rojas, en el que se resume su contribución al desarrollo de la Microscopía Electrónica.



Dr. Humberto Fernández-Morán

"Cryo-Electron Microscopy and Ultramicrotomy: Reminiscences and Reflections"

En el libro "The Beginnings of Electron Microscopy", publicado en 1985 como parte de la serie "Advances in Electronics and Electron Physics", se recoge el testimonio personal de diferentes investigadores que lideraron el desarrollo de la Microscopía Electrónica, tras haber transcurrido cincuenta años del uso generalizado de esta técnica. Dada la importancia de tales testimonios para la historia de la ciencia, en el año 2021 fueron publicados nuevamente por la casa editorial Elsevier, ahora en la serie "Advances in Imaging and Electron Physics", Vol. 220 y 221. Gracias al apoyo del Dr. Peter Hawkes, editor de "The Beginning of Electron Microscopy", y en ocasión del centenario del nacimiento de Humberto Fernández-Morán, Elsevier nos autorizó a publicar la traducción al español de su artículo testimonial, con el objeto de contribuir a su difusión dentro del público de habla hispana.



Artículo original, "Cryo-Electron Microscopy and Ultramicrotomy: Reminiscences and Reflections",
Advances in Electronics and Electron Physics, Elsevier, Supplement 16

Traducción del artículo “Cryo-Electron Microscopy and Ultramicrotomy: Reminiscences and Reflections”

El Prof. Carlos Rojas es un físico graduado de la Universidad Central de Venezuela, con Ph.D. de la Universidad de Londres. Es Profesor Titular de la Universidad Central de Venezuela, con más de 50 años desarrollando actividades de docencia e investigación en Física Experimental en las áreas de Superficies, Nanosistemas, Microscopía y Microanálisis. Es miembro del Consejo Directivo del Centro Latino-Americano de Física (CLAF), de la Comisión para la Organización, Inventario y Difusión del Fondo Documental “Dr. Humberto Fernández-Morán” y ejercerá la presidencia de la Sociedad Venezolana de Microscopía y Microanálisis (SVMM) durante el período 2025-2027.



Dr. Carlos Rojas

Centro de Microscopía Electrónica de la Facultad de Ciencias
Universidad Central de Venezuela

Introducción Humberto Fernández-Morán



Sociedad Venezolana de Microscopía y Microanálisis, en el centro Humberto Fernández-Morán durante la ceremonia de apertura del 1er Congreso Atlántico de Microscopía Electrónica, 1992, Mérida, Venezuela.

Introducción

Los investigadores en Biología y Medicina siempre han tratado de relacionar las estructuras observadas mediante el microscopio con las funciones biológicas del objeto estudiado, estableciendo así una relación estructura/función. El Microscopio Electrónico surgió en Alemania a principios de los 1930s, lográndose con él superar los límites en resolución impuestos por la longitud de onda usada en los tradicionales microscopios de luz. Desde un principio hubo interés en utilizarlo para la caracterización de especímenes biológicos, aunque para ello debieron vencerse dificultades en lo que respecta a la adecuada preparación de muestras para evitar dañarlas con el haz de electrones y para lograr imágenes con un contraste interpretable. Con el Microscopio Electrónico se enfatizó aún más el establecimiento de la relación estructura/función, introduciéndose el término “ultraestructura” para dar cuenta de los mayores detalles que podían ahora visualizarse mediante este instrumento.

A principios de los 1980s, transcurridos ya 50 años del inicio del uso extendido de la Microscopía Electrónica, el Dr. Peter Hawkes, del Laboratorio de Óptica de Electrones del CNRS, Francia, destacado científico, comunicador y educador que logró avances fundamentales e innovadores en el mundo de la óptica electrónica, las aberraciones y las imágenes digitales, gran conocedor y divulgador de la historia de la Microscopía Electrónica y posteriormente fundador-presidente de la Sociedad Europea de Microscopía, quiso editar una colección de los recuentos personales dados por aquellos científicos que participaron activamente en el desarrollo de esta técnica. Para ello invitó a la mayoría de los connotados especialistas que aún vivían. En 1985 aparece publicada esta colección testimonial con el título “The Beginnings of Electron Microscopy” (Los Comienzos de la Microscopía Electrónica), en el Suplemento 16 de la Serie “Advances in Electronics and Electron Physics” (ISBN 0-12-014578-2), prologada por Ernst Ruska, quien al año siguiente recibiera el premio Nobel de Física por el diseño del primer Microscopio Electrónico. En ella podemos hallar el recuento personal dado por 21 investigadores, 14 europeos, 3 norteamericanos, 2 japoneses, 1 australiano y 1 latinoamericano. No deja de llamar la atención la presencia de un latinoamericano junto a este grupo de investigadores de países con un alto nivel de desarrollo científico. Se trata del venezolano Humberto Fernández-Morán (1924-1999), formado como médico y biólogo, pero que además tuvo acceso al conocimiento generado en importantes laboratorios de Física. En el año 2001, conocí en Toulouse al Dr. Hawkes, quien me manifestó su complacencia porque sabía que la Sociedad Venezolana de Microscopía y Microanálisis mantenía una firme continuidad en los Congresos que organizaba y me habló de la importancia de los aportes de Fernández-Morán a la Microscopía Electrónica, a quien conoció personalmente en su laboratorio de la Universidad de Chicago.

Recién aparecido el libro, pude en él leer, en la biblioteca del “Instituto de Tecnología Venezolana para el Petróleo” (Intevep), la contribución de Fernández-Morán,

titulada “Cryo-Electron Microscopy and Ultramicrotomy: Reminiscences and Reflections”. En ella nos relata el trabajo que desarrolló durante casi cuatro décadas (1946-1982), destacando

- 1) la influencia que tuvo en su formación su estadía en el Instituto Nobel de Física, Suecia, en particular su relación con el Prof. Manne Siegbahn, premio Nobel de Física 1924;
- 2) la invención de la “Cuchilla de Diamante”;
- 3) la creación y desarrollo del Instituto Venezolano de Neurología e Investigaciones Cerebrales (IVNIC), actual Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC), y
- 4) sus aportes a la Crió-Microscopía Electrónica, técnica que años después, en el 2017, justificaría la adjudicación de un Premio Nobel.

Dada la importancia del recuento histórico suministrado por estos pioneros de la Microscopía Electrónica, “The Beginnings of Electron Microscopy” fue publicado nuevamente en el año 2021 en los volúmenes 220 (ISBN 978-0323915076) y 221 (ISBN 978-0323989190) de la serie “Advances in Imaging and Electron Physics”, de la casa editorial Elsevier. Sin embargo, en mi experiencia de varias décadas de docencia en Microscopía Electrónica, he podido notar que la contribución de Fernández-Morán a la Microscopía Electrónica no era bien conocida en mi país, por lo que en el 2024, en ocasión del centenario de su nacimiento, quisimos ofrecer a los lectores de habla hispana una traducción de sus “reminiscencias”.

La conmemoración del centenario del nacimiento de Humberto Fernández-Morán ha traído consigo diferentes actividades en Venezuela, importantes para el desarrollo científico y para la motivación de nuevas generaciones hacia los estudios de ciencias, entre las cuales se destaca la inauguración en el año 2024 de la Universidad Nacional de las Ciencias “Dr. Humberto Fernández-Morán”. Desde el 17 de marzo del presente año sus restos mortales reposan en el Panteón Nacional, en Caracas, Venezuela.

Gracias al decidido apoyo del Dr. Peter Hawkes, editor de “The Beginnings of Electron Microscopy”, Elsevier nos autorizó a publicar en “Acta Microscopica” una traducción al español de la contribución de Fernández-Morán titulada “Cryo-Electron Microscopy and Ultramicrotomy: Reminiscences and Reflections”.

Además de hacer público nuestro agradecimiento, queremos también dedicar este texto divulgativo a la memoria del Dr. Peter Hawkes, cronista de la ciencia, trabajador infatigable y gentil colaborador, quien falleciera a finales del pasado año 2024.

Prof. Carlos Rojas

***“Cryo-Electron
Microscopy and
Ultramicrotomy:
Reminiscences
and Reflections”***

Humberto Fernández-Morán

Traducción al español

Published: 27-03-2025

AVANCES EN ELECTRÓNICA Y FÍSICA DE ELECTRONES, SUPLEMENTO 16

**Crío-Microscopía Electrónica y Ultramicrotomía:
Reminiscencias y Reflexiones**

HUMBERTO FERNÁNDEZ-MORÁN

*Laboratorios de Crío-Microscopía Electrónica
Institutos de Investigación
Universidad de Chicago
Chicago, Illinois*

I. Introducción	1
II. El Instituto Nobel de Física	2
A. El Profesor Manne Siegbahn	2
B. El Microscopio Electrónico de Siegbahn	4
C. Microscopía Electrónica de Células del Lóbulo Anterior de la Hipófisis de Rata	9
III. La Cuchilla de Diamante	10
A. Desarrollo de la Cuchilla de Diamante	10
B. La Cuchilla de Diamante y el Ultramicrotomo	15
C. Aplicaciones de la Cuchilla de Diamante	17
IV. El Instituto Venezolano de Neurología e Investigaciones Cerebrales	21
A. Fundación y Actividades de Investigación	21
B. Simposio Internacional sobre Ultraestructura y Función del Nervio	23
V. Microscopía Electrónica de Baja Temperatura y Ultramicrotomía	34
A. Organización Submicroscópica de las Fibras Nerviosas de Vertebrados	34
B. Microscopía Electrónica de Alta Resolución y Difracción de Electrones de Baja Dosis	35
VI. Crío-Microscopía Electrónica	37
A. Estudio de Sistemas Biológicos a Temperaturas de Helio Líquido	37
B. Desarrollo de Crío-Microscopios Electrónicos con Lentes Superconductores	41
C. Refrigerador de Ciclo Cerrado de Collins de Helio Superfluido	46
D. El Crío-Microscopio con Lentes Superconductores en Munich	47
E. Determinación de la Estructura de un Complejo Orgánico con un Microscopio Electrónico Superconductor	48
VII. Reflexiones y Perspectivas	49
Agradecimientos	51
Referencias	54

HUMBERTO FERNÁNDEZ-MORÁN

I. INTRODUCCIÓN

En sus primeros 50 años de existencia el microscopio electrónico ha sobrepasado en tres órdenes de magnitud la resolución del microscopio de luz (3,17), lo que hace posible ver directamente estructuras de dimensiones moleculares y atómicas. A pesar de la pesimista perspectiva inicial de que “bajo el haz de electrones la materia viviente se quemaría hasta convertirse en cenizas”, los primeros pioneros, Max Knoll, Ernst Ruska (3,4), y L. Marton (5,15), continuaron con su trabajo en esta área. Desde entonces, los sucesivos avances en las técnicas de preparación de muestras han revelado dominios completamente nuevos de insospechados detalles estructurales, la mayoría de los cuales se pueden correlacionar con los resultados de la difracción de rayos-X y con los métodos bioquímicos. Considerado como uno de los más exitosos inventos de nuestros tiempos (16), el microscopio electrónico y sus aportes a la biología y a la medicina han marcado el comienzo de un renacimiento, desde las primeras imágenes de un virus bacteriano (24) para desentrañar la organización submicroscópica de células y tejidos hasta visualizar objetos biológicos aún más pequeños, como las macromoléculas autorreplicantes de ADN. Históricamente, es interesante notar que el biofísico berlinés, Helmholtz (2), y Ernst Abbe mostraron en 1873, de forma independiente, que el poder de resolución del microscopio óptico está limitado por la longitud de onda de la luz. No obstante, el descubrimiento de la birrefringencia de nervios realizado por Ehrenberg (1) en 1849 marca el comienzo de una investigación por microscopía de luz de la ultraestructura de un sistema biológico nativo. Los subsiguientes estudios mediante luz polarizada y difracción de rayos-X de la cubierta de mielina del nervio (19,20) proporcionaron detalles cuantitativos de esta estructura paracrística, consistente de capas lípido-proteicas de aproximadamente 180 Å de espesor, y por lo tanto de dimensiones submicroscópicas. De hecho, las capas postuladas y su disposición concéntrica altamente ordenada en la cubierta de mielina fueron observadas directamente en el microscopio electrónico (42,44). Las investigaciones biofísicas y bioquímicas correlacionadas de este tipo han contribuido de manera significativa a validar los resultados de la microscopía electrónica. La experiencia habida ha demostrado el valor único de este enfoque que implica la aplicación combinada de disciplinas complementarias y la interacción de numerosos expertos que trabajan conjuntamente en imaginativos experimentos. También podemos anticipar el desarrollo de una nueva generación de “crío-microscopios electrónicos” diseñados para reducir, a temperaturas de helio líquido (128), tanto el daño causado a las muestras por la radiación como las vibraciones térmicas.

En última instancia, las reminiscencias son resurrecciones de imágenes significativas y de conceptos fructíferos. Por lo tanto, dentro del sucinto alcance de este artículo, el autor ha seleccionado una serie de micrografías representativas para ilustrar los resultados de estudios correlacionados que utilizan técnicas de preparación mejoradas, complementadas por métodos bioquímicos y biofísicos paralelos. Habiendo compartido el privilegio de participar en este trabajo exploratorio con varios distinguidos colegas durante casi cuatro décadas, se escogieron como casos de interés aspectos

CRÍO-MICROSCOPIA ELECTRÓNICA Y ULTRAMICROTOMÍA

destacados de la crío-microscopía electrónica y de la ultramicrotomía. Presentados como una muestra de profundo agradecimiento, estos casos cubren los aspectos más destacados de una búsqueda internacional que, de muchas maneras, se produjeron en los momentos y lugares adecuados (1946-1982).

Formado como biólogo y médico, mientras trabajaba en su disertación doctoral (29), el autor conoció bien las técnicas clásicas de microscopía de luz bajo la guía de expertos en el área (Profesor A. Dabelow y Profesor B. Romeis).

Las primeras publicaciones sobre microscopía electrónica, que aparecieron en Alemania durante 1939-1940, en particular los artículos de E. Ruska (4) y de H. Ruska (7), así como el inspirador libro de M. von Ardenne (8), fueron estudiados con vivo interés. Posteriormente los artículos clásicos de Luria y Anderson (24) y de Hall, Jakus y Schmitt (25), así como los libros de Burton y Kohl (14) y de Zworykin, Morton, Ramberg, Hillier y Vance (33), le abrieron un nuevo mundo. Es difícil transmitir el impacto que se siente al ver por primera vez las micrografías electrónicas de bacteriófagos, o la fascinante belleza de las estructuras periódicas reveladas por tinción o sombreado en tricoquistes, fibrillas de paramiosina o en tejido conectivo (colágeno).

Sin embargo, el trabajo de postgrado en neurología y neurocirugía absorbió todas las energías del autor. En 1946 Fernández-Morán se trasladó a Estocolmo, Suecia, para continuar su residencia médica y trabajó como investigador extranjero en el grupo del famoso neurocirujano Herbert Olivecrona, en el Serafimerlasarettet. El profesor Olivecrona no sólo fue un gran médico, sino también un magnífico organizador, dotado de una prodigiosa energía y de esa rara medida de autocontrol típica de ciertos suecos destacados (37). Conmovido por las muertes causadas por tumores malignos, a pesar del ejemplar tratamiento quirúrgico, Fernández-Morán, animado por el profesor Olivecrona, se orientó hacia la investigación básica para aprender más sobre la organización de las células tumorales.

En 1946 visitó al profesor Manne Siegbahn, director del Instituto Nobel de Física, y después de una breve discusión fue invitado a trabajar en los laboratorios de microscopía electrónica. Gracias a la generosa hospitalidad y a la asistencia garantizada durante un período de 8 años (1946-1954), Fernández-Morán siguió un aprendizaje especializado en microscopía electrónica tanto allí como en el Instituto Karolinska.

II. EL INSTITUTO NOBEL DE FÍSICA

A. El Profesor Manne Siegbahn

En 1937, la Real Academia de Ciencias Sueca creó un Instituto Nobel de Física, ubicado en Frescati en los suburbios del norte de Estocolmo, con el profesor Manne Siegbahn como su director; aunque en un sentido más profundo él era el alma de ese instituto, tanto como un gran científico como un ser humano único (ver Figura 1). Karl Manne George Siegbahn fue galardonado con el Premio Nobel en Física en 1924 "por sus descubrimientos e investigaciones en el campo de la espectroscopía de los rayos-X".

HUMBERTO FERNÁNDEZ-MORÁN

Desarrolló técnicas especiales de investigación para la espectroscopia de rayos-X, y determinó con extraordinaria precisión la longitud de onda de los rayos-X característicos. Su "Espectroscopía de Rayos Röntgen" (1924) se convirtió en la referencia estándar sobre este tema. Además de sus aportes fundamentales, él diseñó máquinas de rayado especiales para la fabricación de redes de difracción e inventó (en 1939) un microscopio



Fig. 1. Profesor Manne Siegbahn y sus colegas en el Instituto Nobel de Física de la Academia de Ciencias Sueca en Estocolomo, 1947 (de izquierda a derecha): Profesores Kai Siegbahn, Nils Svartholm, Manne Siegbahn, H. Fernández-Morán, and H. Slätis.

electrónico de inusual diseño y de alta resolución, equipado con una bomba rotatoria molecular de alto vacío, de su invención, entre muchas otras contribuciones. Gracias a sus sobresalientes cualidades como organizador, el instituto, dedicado a investigaciones en física nuclear, fue uno de los mejor equipados y dotados de personal en Europa. Cuando llegué en 1946, el instituto era un paraíso de excelencia y un importante centro internacional de investigación y formación, visitado por los más eminentes físicos, incluidos los premios Nobel de Física, quienes cada año dictaban sus Conferencias Nobel.

CRÍO-MICROSCOPIA ELECTRÓNICA Y ULTRAMICROTOMÍA

Sin embargo, la personalidad del profesor Siegbahn permanece como la impresión más duradera: un gran hombre, amable, dotado de excepcionales cualidades de mente y carácter. Personalmente, tengo con él una profunda deuda de gratitud. Más allá de su asistencia en microscopía electrónica, la cuchilla de diamante fue desarrollado en ese entorno único donde sus famosas máquinas de rayado producían redes de difracción de calidad insuperable, trazadas con puntas de diamante.

B. El Microscopio Electrónico de Siegbahn

Un microscopio electrónico magnético de diseño inusual fue construido por el Profesor Manne Siegbahn en 1939 (10) y fue instalado en laboratorios especiales del Instituto Nobel de Física (ver Fig. 2). La columna consiste en un estrecho tubo dispuesto horizontalmente. Las piezas polares fabricadas con precisión están dentro del tubo y hacen contacto magnético con las bobinas de la lente, montadas externamente. La imagen se ve a través de una delgada pantalla fluorescente unida a un portaplacas que acepta hasta ocho placas fotográficas. La alineación de la columna horizontal es crítica, pero se puede llevar a cabo de manera reproducible. Para generar el vacío

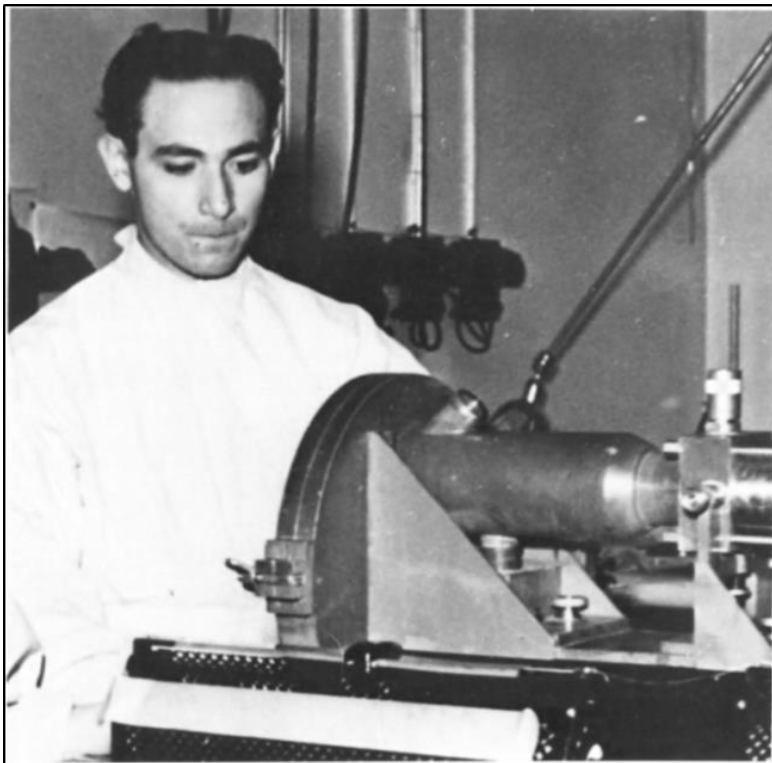


Fig. 2. El autor examinando especímenes biológicos (fotografiado el 9 de febrero de 1947) con el microscopio electrónico diseñado por el Profesor Manne Siegbahn (1939) e instalado en laboratorios de investigación especiales del Instituto Nobel de Física en Frescati, Estocolmo. Este instrumento alcanzó consistentemente resoluciones de 20-50 Å cuando se operaba en óptimas condiciones con las adecuadas técnicas de preparación de muestras.

HUMBERTO FERNÁNDEZ-MORÁN

alto requerido se utiliza una bomba rotatoria molecular diseñada por el mismo Siegbahn. A pesar de que esta bomba no tiene una velocidad de bombeo muy alta, en ausencia de fugas está relativamente libre de contaminación, ya que no contiene vapores de aceite. Con un cuidadoso montaje y balanceo de la bomba se eliminan las vibraciones molestas. Los circuitos eléctricos son de diseño convencional, con una adecuada estabilidad y controles de precisión para el enfoque. El modelo de laboratorio opera a un alto voltaje regulado de 35-55 kV.

Los portamuestras consisten en bloques metálicos rectangulares (2 cm x 2,5 mm x 2 mm) con dos aberturas longitudinales que están cubiertas por una fina malla de cobre (soldada por punto a los portamuestras) con aberturas de 100 μm de diámetro. Cada abertura longitudinal contiene hasta 500 agujeros de la malla. Así, un gran número de especímenes puede ser observado sin romper el vacío. Una mejora importante se logró usando como soportes películas muy delgadas de berilio o de aluminio (10-50 Å de espesor), preparadas de acuerdo al método desarrollado por el profesor Nils Hast (30).

El microscopio electrónico de Siegbahn alcanzó consistentemente resoluciones de 20-50 Å con un aumento útil de 100.000X cuando se opera bajo condiciones óptimas y con técnicas adecuadas de preparación de muestras. Durante 7 años de constante operación, demostró ser notablemente confiable. Además, dado que tiene muchas características en común con un banco electro-óptico, era un instrumento ideal para la experimentación electro-óptica y para evaluar los efectos de estabilidad de los lentes, variaciones del alto voltaje y alineación (Figura 6).

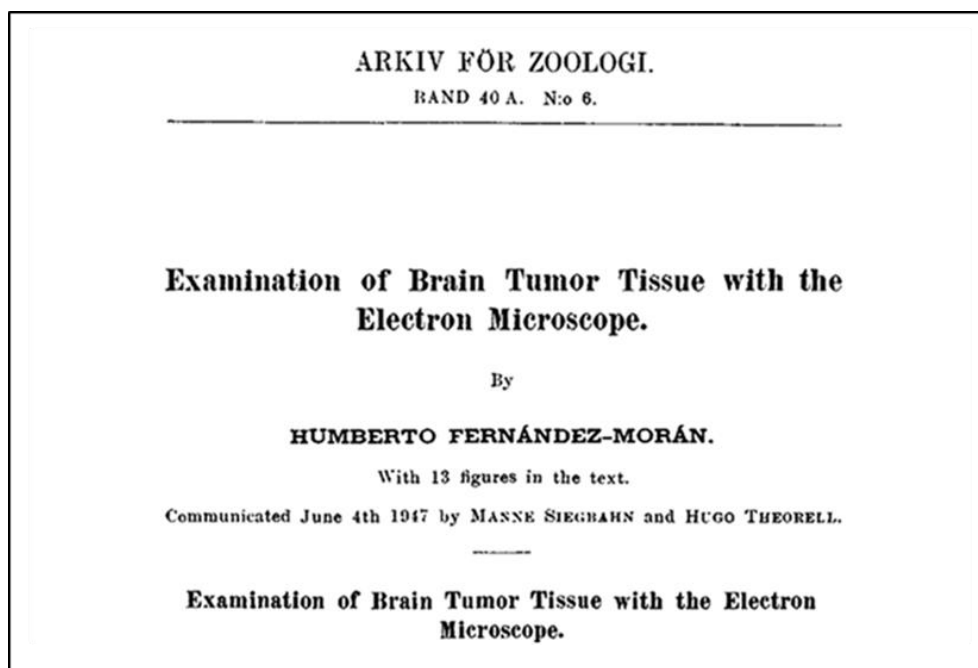


Fig. 3. Informe sobre los resultados preliminares obtenidos en el examen de tejido cerebral con el microscopio electrónico de Siegbahn utilizando nuevas técnicas de preparación. Comunicado a la Academia Sueca de Ciencias el 4 de junio de 1947. [Tomado de *Ark. Zool.* **40A**, No. 6 (1948).]

CRÍO-MICROSCOPIA ELECTRÓNICA Y ULTRAMICROTOMÍA

Elvers (11) realizó estudios sistemáticos de la ultraestructura de células vegetales y desarrolló ingeniosas "micro-rejillas" o "micro-mallas" fabricadas a partir de secciones transversales de madera de pino o abedul, con aberturas tan pequeñas como 10 μm .

Con este microscopio Kai Siegbahn y B. Ingelman (12) realizaron el primer estudio de moléculas de Dextrano usando microscopía electrónica. La investigación más extensiva sobre la estructura fina de la arcilla y el desarrollo de mejores sustratos de películas metálicas ultradelgadas fue llevada a cabo por el profesor Nils Hast (30).

Nuestros estudios preliminares de tejidos frescos de tumores cerebrales provistos por la clínica neuroquirúrgica del profesor Herbert Olivecrona (31) (Figs. 3 y 4) revelaron varios componentes nuevos, incluyendo fibrillas gliales submicroscópicas (Fig. 5) y cuerpos de inclusión citoplasmáticos, y además proporcionaron indicaciones de que los tipos de células gliales patológicas, que son específicas para cada tumor, difieren de las células gliales normales.

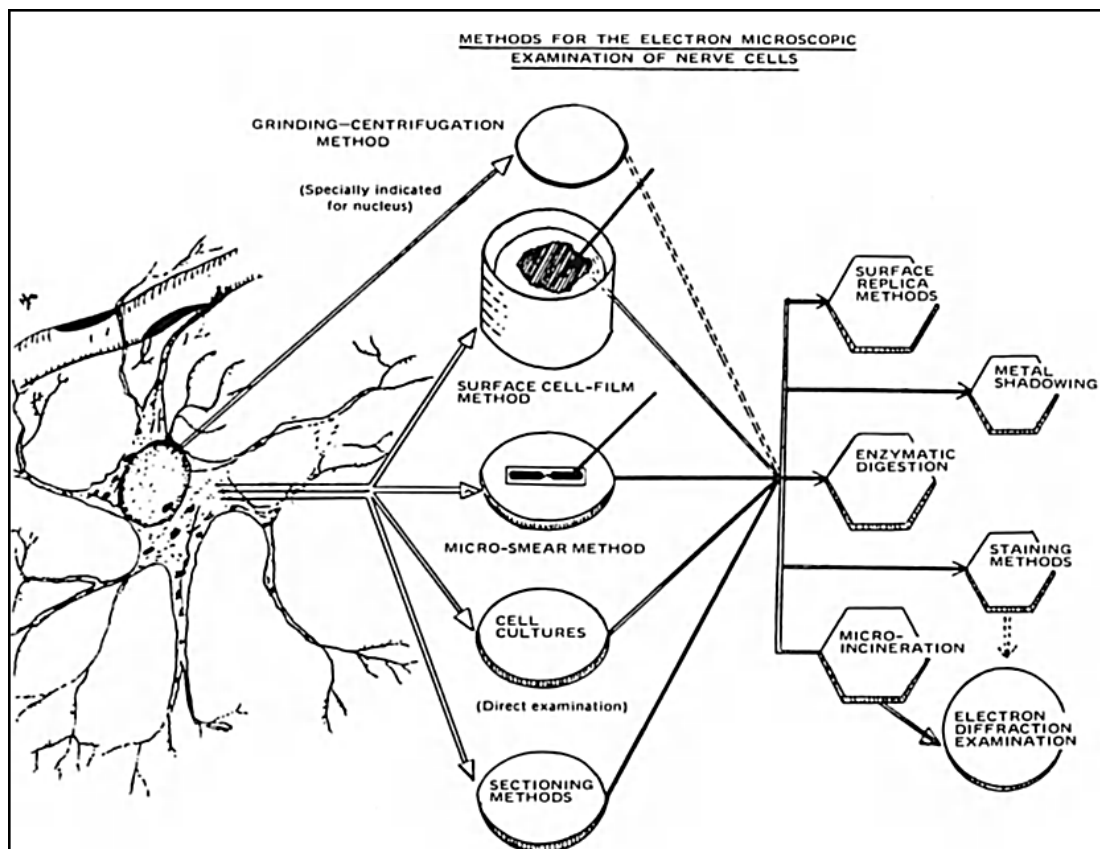


Fig. 4. Diagrama esquemático de las técnicas de preparación para el examen de células nerviosas mediante microscopía electrónica. Varios métodos fueron propuestos e iniciados por el autor en esta temprana etapa (1947), incluidas las técnicas de corte fino y la de esparcir componentes celulares en una monocapa de proteína. Estos métodos demostraron ser útiles y luego fueron desarrollados y aplicados con éxito por numerosos investigadores en estudios correlativos que revelaron nuevos dominios de la ultraestructura celular y de la biología molecular.

HUMBERTO FERNÁNDEZ-MORÁN

La principal ventaja que se derivó de estos estudios preliminares fue la evaluación de las técnicas de preparación adecuadas. Como se muestra en el esquema de la Fig. 4, el autor propuso e inició varios métodos nuevos en esta temprana etapa (1947), incluyendo el de esparcir componentes celulares en una monocapa de proteína. Estos métodos probaron ser útiles, y fueron más tarde desarrollados de manera independiente y aplicados con éxito en estudios correlativos de ADN liberado por bacteriófagos (80) y por cloroplastos (81).

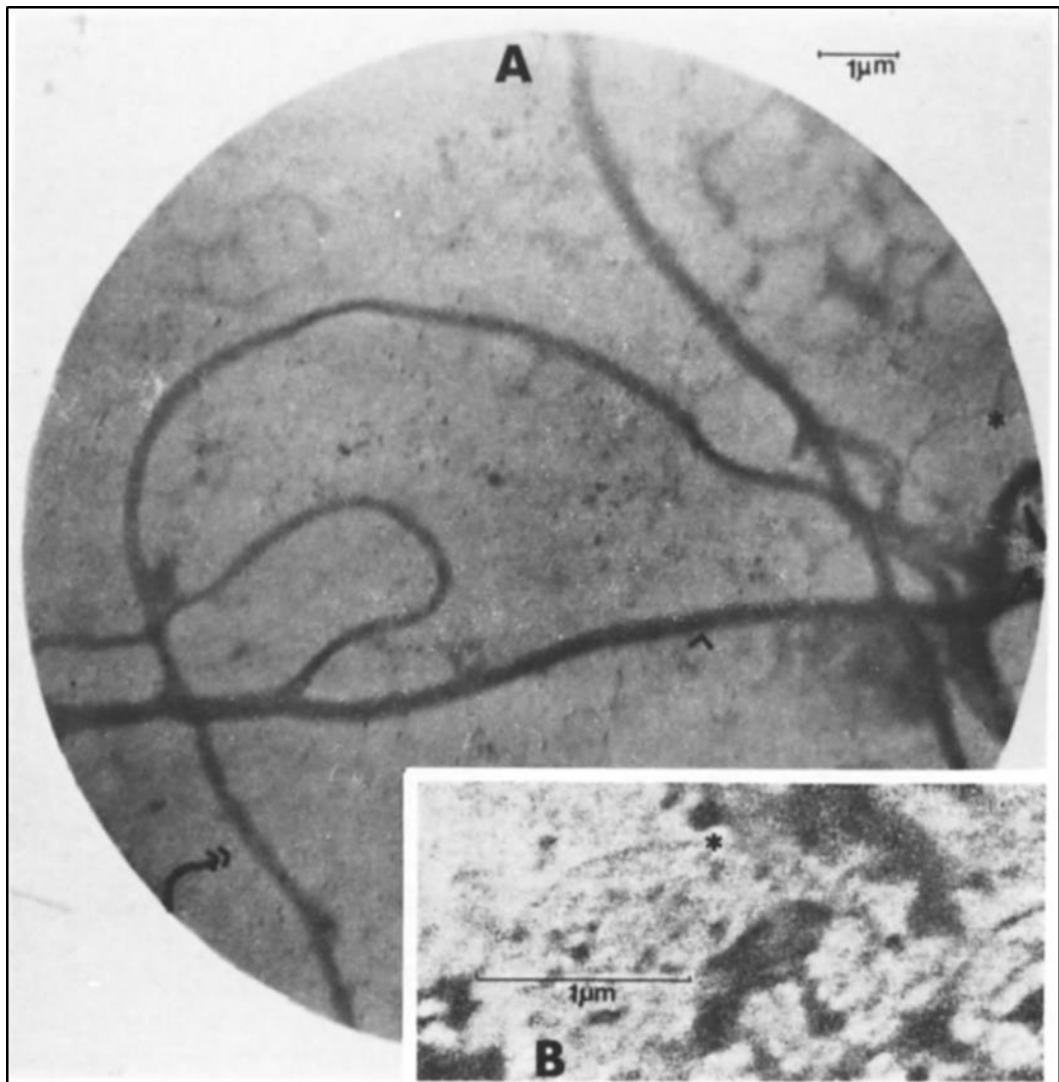


Fig. 5. (A) Fibrillas gliales en una preparación fresca de astrocitoma depositada sobre una película de aluminio de 30-Å y lavada con éter-álcohol. (B) Fibrillas gliales submicroscópicas [desde 1000 hasta 200 Å (*) de diámetro] en una preparación fresca de astrocitoma, sin fijar y sin teñir, depositada sobre una película ultrafina (20-Å) de berilio. Imagen adquirida con el microscopio electrónico de Siegbahn a 35 kV. [Tomado de H. Fernández-Morán, *Ark. Zool.* **40A**, No. 6 (1948).]

CRÍO-MICROSCOPIA ELECTRÓNICA Y ULTRAMICROTOMÍA

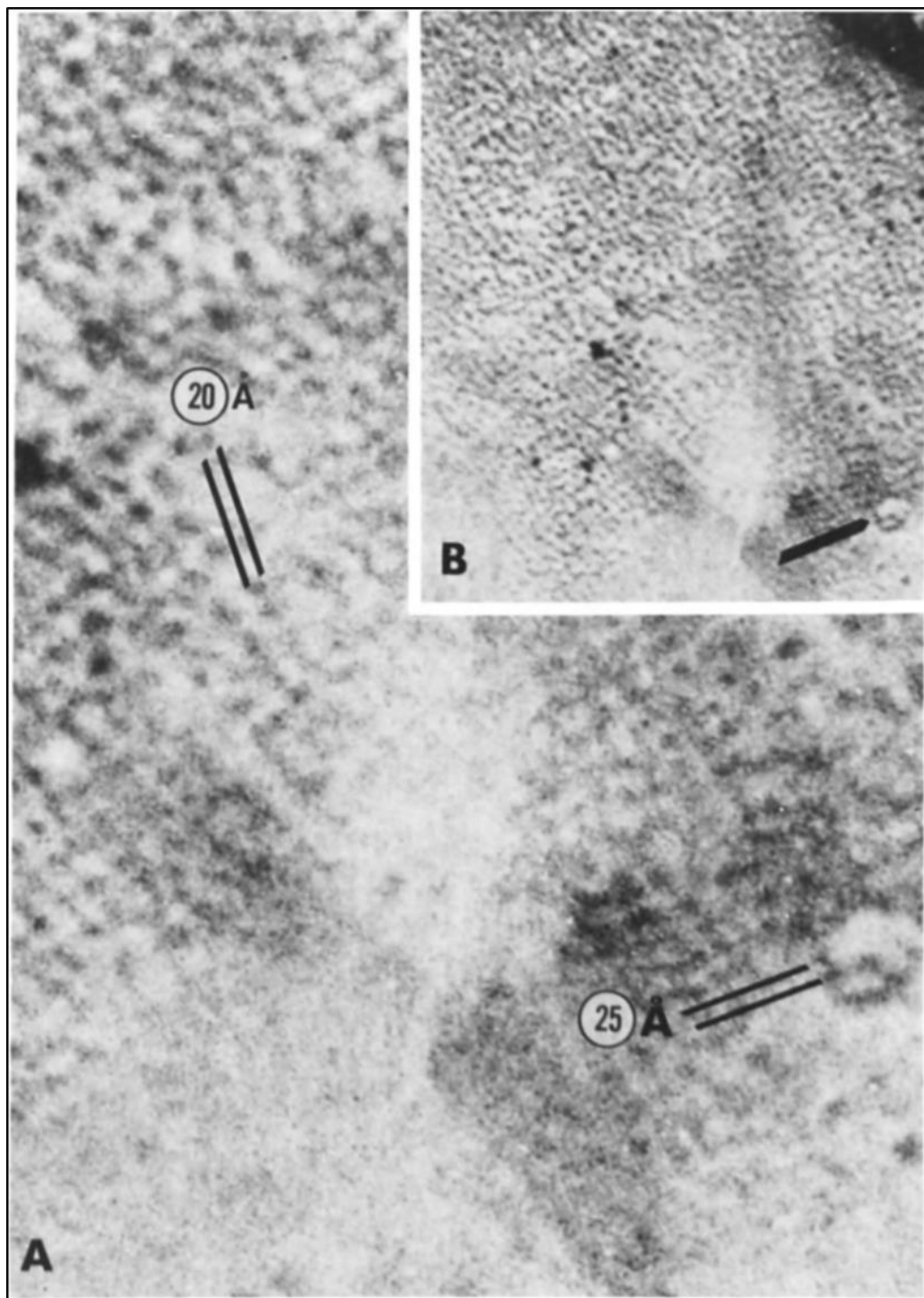


Fig. 6. (A) Micrografía electrónica del recuadro (B) de oro evaporado sobre una película delgada de berilio (20-Å), que muestra una resolución puntual de 20 a 40 Å. Imagen adquirida con el microscopio electrónico de Siegbahn a 55 kV. (H. Fernández-Morán, 1949.)

HUMBERTO FERNÁNDEZ-MORÁN

C. Microscopía Electrónica de Células del Lóbulo Anterior de la Hipófisis de Rata

En colaboración con el Dr. Rolf Luft se realizó un interesante estudio sobre "Gránulos Citoplasmáticos Submicroscópicos en las Células del Lóbulo Anterior de la Hipófisis de Rata Revelados por Microscopía Electrónica" (32). Este estudio fue llevado a cabo con el Microscopio Electrónico de Siegbahn utilizando principalmente el método de réplica-adhesión (26) aplicado a frotis de células del lóbulo glandular de la hipófisis de rata. Se demostró que el citoplasma de todas las células del lóbulo glandular examinadas consisten predominantemente de cuerpos esféricos claramente delineados, de 30-300 nm de diámetro, que por lo tanto están más allá del poder de resolución del microscopio de luz. Estas "citoesferas" (Figs. 7 y 8) contienen gránulos esféricos más pequeños y están embebidas en una sustancia base de partículas submicroscópicas. No se pudieron observar diferencias fundamentales entre los tres tipos básicos de células.

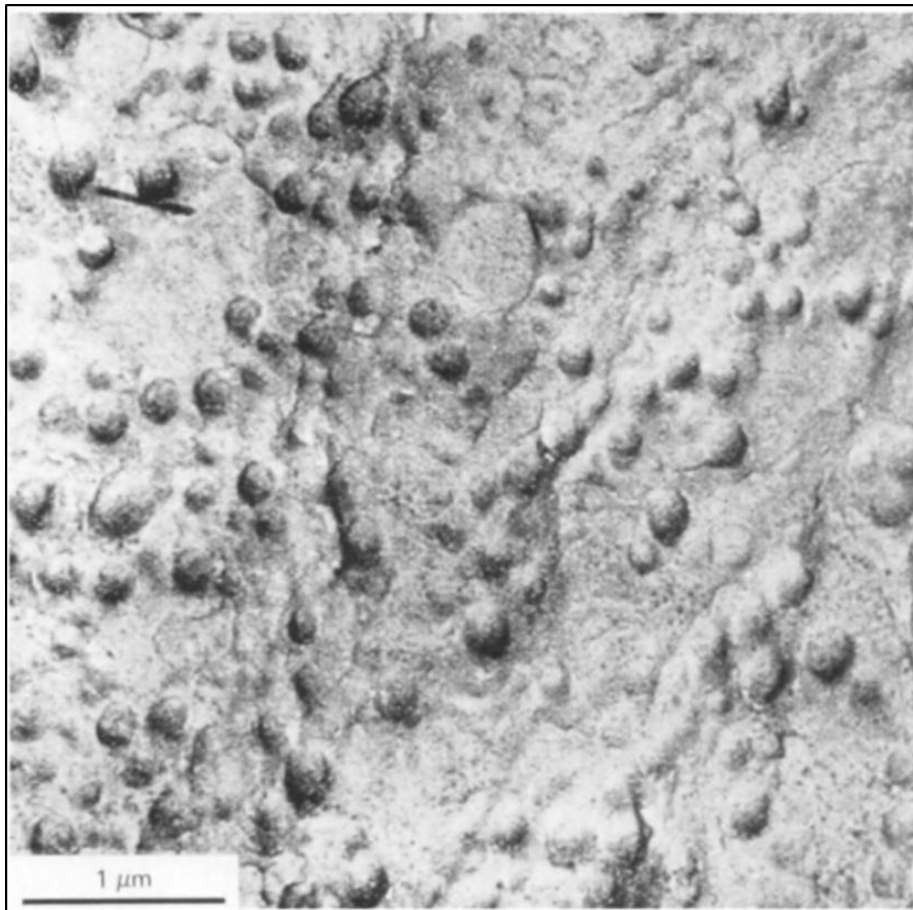


Fig. 7. Micrografía electrónica que muestra gránulos citoplasmáticos submicroscópicos de una célula basófila de la hipófisis de rata tal como lo revelan las técnicas de réplica de superficie utilizando películas muy delgadas de berilio (alrededor de 10-50 Å de espesor). Imagen adquirida con el microscopio electrónico de Siegbahn a 35 kV. [Tomado de H. Fernández-Morán y R. Luft, *Acta Endocrinol. (Copenhague)* 2, 199 (1949).]

CRÍO-MICROSCOPIA ELECTRÓNICA Y ULTRAMICROTOMÍA

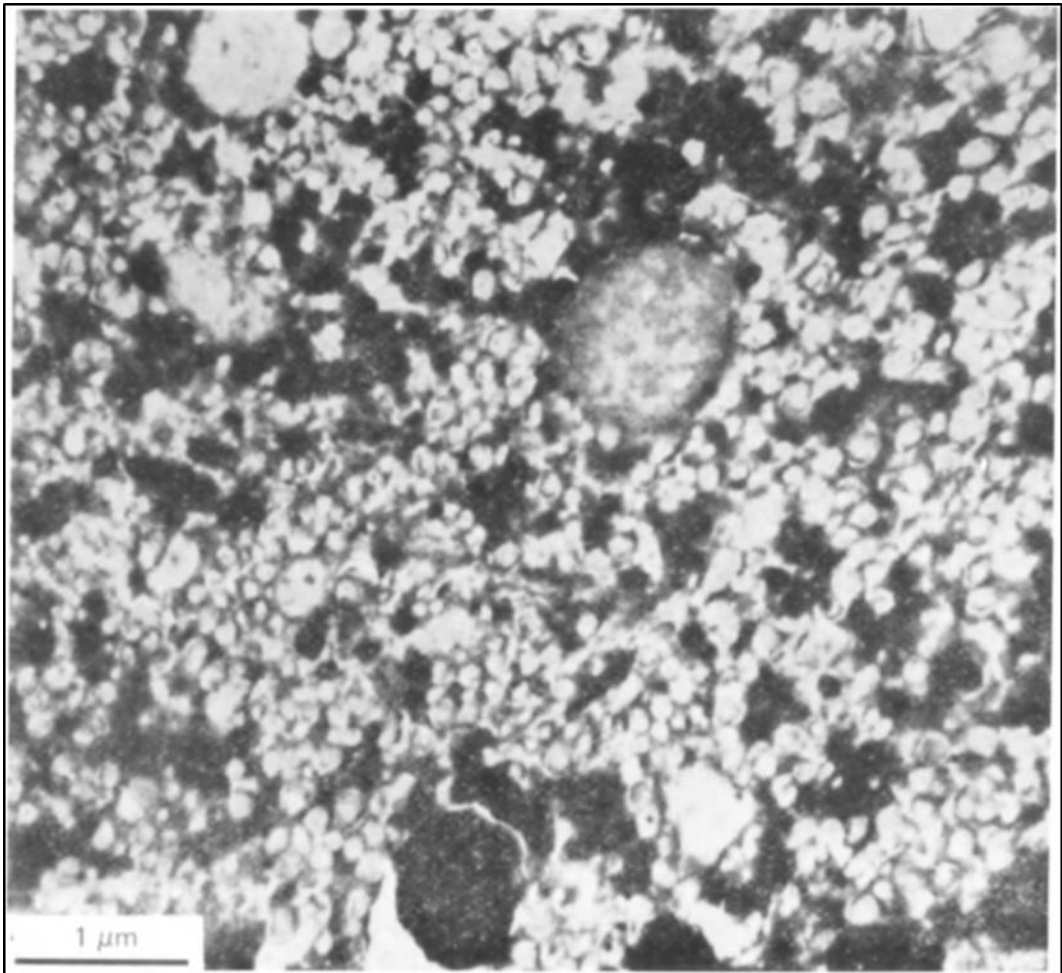


Fig. 8. Segmento de citoplasma en una célula eosinófila del lóbulo anterior de la hipófisis de rata. Dos gránulos específicos están embebidos entre las partículas citoplasmáticas estrechamente empaquetadas, que miden sólo 30-300 nm y, por lo tanto, están más allá del poder de resolución del microscopio de luz. Método de adhesión de réplica metálica; imagen adquirida con el microscopio electrónico de Siegbahn a 55 kV. [Tomado de H. Fernández-Morán y R. Luft, *Acta Endocrinol. (Copenhague)* 2, 206 (1949).]

III. La Cuchilla de Diamante

A. Desarrollo de la Cuchilla de Diamante

La preparación de secciones ultrafinas que tuviesen espesores de varios órdenes de magnitud menores al límite inferior de la microtomía convencional fue uno de los más serios problemas que tenían que ser resueltos antes de que la ultraestructura de células y tejidos pudiese ser estudiada mediante microscopía electrónica.

HUMBERTO FERNÁNDEZ-MORÁN

Un aporte importante fue el desarrollo de ultramicrotomos especiales (35,48,51,79,84), pero la preparación de secciones finas satisfactorias en el rango de 0,01 μm , requería de cuchillas de características excepcionales. Las navajas de afeitar especialmente afiladas no fueron satisfactorias debido a su vida útil relativamente corta, a la corrosión y a otras limitaciones.

La cuchilla de vidrio introducida por Hartmann y Latta (36) constituyó una gran mejora y en realidad ha demostrado ser el borde de corte más popular cuando se trata de especímenes incluidos en plástico, a pesar de su vida útil relativamente corta y a sus limitaciones básicas cuando se trata de seccionar materiales duros.

Se han hecho esfuerzos sistemáticos para elaborar cuchillas de zafiro monocristalino, rubí y otros cristales duros, pero sin éxito. Pronto se hizo evidente que sería ideal un cristal duro con una estructura fina en capas, ya que las capas individuales representan filos de cuchilla "preformadas". Así, los cristales de carburo de silicio pudiesen ser clivados y pulidos cuidadosamente para producir cuchillas afiladas, pero eran demasiado quebradizos.

El diamante ejercía una fascinación especial, ya que las puntas de diamante usadas para fabricar redes de difracción con exquisita precisión en las máquinas de rayado de Siegbahn exhibían una extraordinaria longevidad y resiliencia. Sin embargo, se trataba de puntos naturales y no de bordes. Además, la consulta con expertos en molienda de diamantes resultó de lo más desalentadora.

Fue en esta coyuntura que el profesor Siegbahn, durante una de sus visitas al laboratorio a altas horas de la noche, mientras esperábamos que el microscopio fuese bombeado, me sugirió que me fijara en la amplia variedad de diamantes existentes, particularmente los fragmentos brasileños, los cuales exhiben una distintiva estructura en capas paralelas a las caras de los octaedros (ver Fig. 9).

Así comenzó un esfuerzo sistemático para determinar las dimensiones y la orientación de las estructuras en capas mediante la aplicación combinada de técnicas de réplica cubriendo caras seleccionadas del diamante intacto para examinar mediante microscopía electrónica la estructura laminar de estas superficies. Esto fue seguido por la trituración del diamante en fragmentos lo suficientemente delgados para su caracterización mediante microscopía electrónica y difracción de electrones. Como se muestra en la Fig. 10, todos los fragmentos exhibieron la típica estructura cristalina en capas del diamante, apilada en láminas hasta las "capas unitarias" más delgadas, de unos 10 Å de espesor. Esto también concordaba con las réplicas de superficie de las caras del diamante intacto. Sin el poder de resolución del microscopio electrónico nunca se habría detectado esta estructura laminar submicroscópica. A su vez, la existencia de estos bordes "preformados", que podrían ser diseccionados después del clivaje a lo largo de ciertos planos, seguido de una abrasión y de un pulido cuidadoso para producir bordes extremadamente afilados, proporcionó la justificación racional para producir una cuchilla de diamante. Las propiedades físicas y químicas únicas del diamante favorecían la producción de un borde de corte ultra-afilado, pero a la vez estable. El diamante es el material más duro y resistente al desgaste que se conoce; tiene una resistencia a la

CRÍO-MICROSCOPIA ELECTRÓNICA Y ULTRAMICROTOMÍA

compresión muy alta; su módulo de elasticidad de Young no es aproximado por el de ninguna otra sustancia; su resistencia relativa a la ruptura es muy alta; es uno de los materiales dimensionalmente más estables, con un coeficiente de expansión térmica muy bajo; tiene una estabilidad térmica muy alta; y conduce el calor más rápida y confiablemente que cualquier otra sustancia. Finalmente, en la práctica el diamante es químicamente inerte, excepto bajo condiciones inusuales (ver Fig. 11).

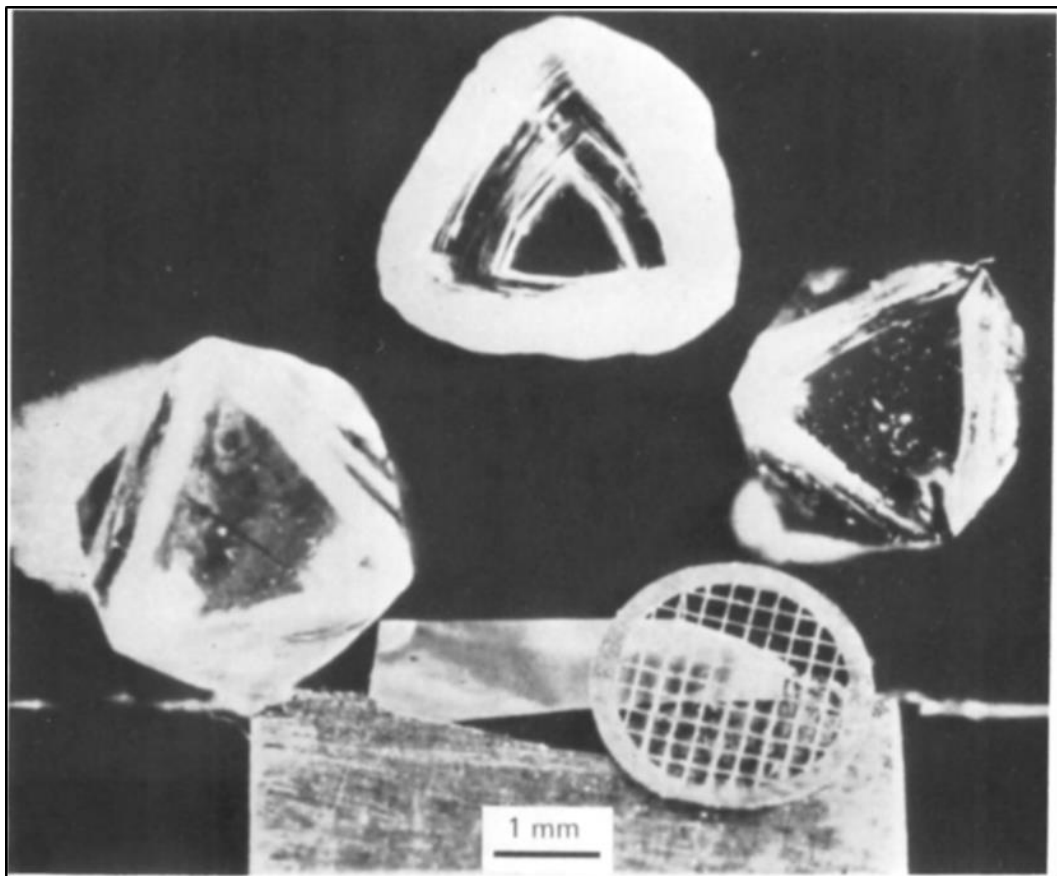


Fig. 9. Cuchilla de diamante para seccionamiento ultrafino preparado a partir de diamantes industriales venezolanos o brasileños mediante técnicas especiales de clivaje y afilado desarrolladas por el autor [*Exp. Cell Res.* 5,25 5 (1953)]. Durante las últimas tres décadas, la cuchilla de diamante con su propiedades únicas ha encontrado aplicación en todo el mundo en ultramicrotomía y ha abierto nuevos campos en mecanizado de precisión y en microcirugía.

A partir de este momento se hizo firme la convicción de que estábamos en la pista correcta. No obstante nos tomó varios años y una inversión bastante sustancial en diferentes tipos de diamantes antes de haber resuelto los problemas de montar el diamante, encontrar la orientación óptima para el clivaje, desarrollar máquinas especiales de alta velocidad de esmerilado y pulido, y preparar el polvo de diamante ultrafino por ultracentrifugación, que era esencial para la operación del pulido final.

HUMBERTO FERNÁNDEZ-MORÁN

Todos los costos fueron sufragados por un fondo especial de investigación proporcionado por mi padre, Luis Fernández-Morán. El infalible aliento y el apoyo de Manne Siegbahn también fueron esenciales. En todo momento, el microscopio electrónico resultó indispensable, junto con la microscopía de luz de contraste de fases. La figura 12 muestra la micrografía electrónica de una réplica de carbono de un filo de cuchilla de diamante que exhibe la característica estructura en capas derivada de las láminas orientadas de diamante cristalino. Sin embargo, cuando finalmente comenzamos a probar las primeras cuchillas de diamante, muchos de las secciones ultrafinas mostraban marcas dejadas por la cuchilla y en algunos casos en realidad estaban muy dañadas. La selección de los diamantes fue un factor crítico, ya que algunas de las cuchillas a menudo se rompían al probarlas o en las fases finales del pulido.

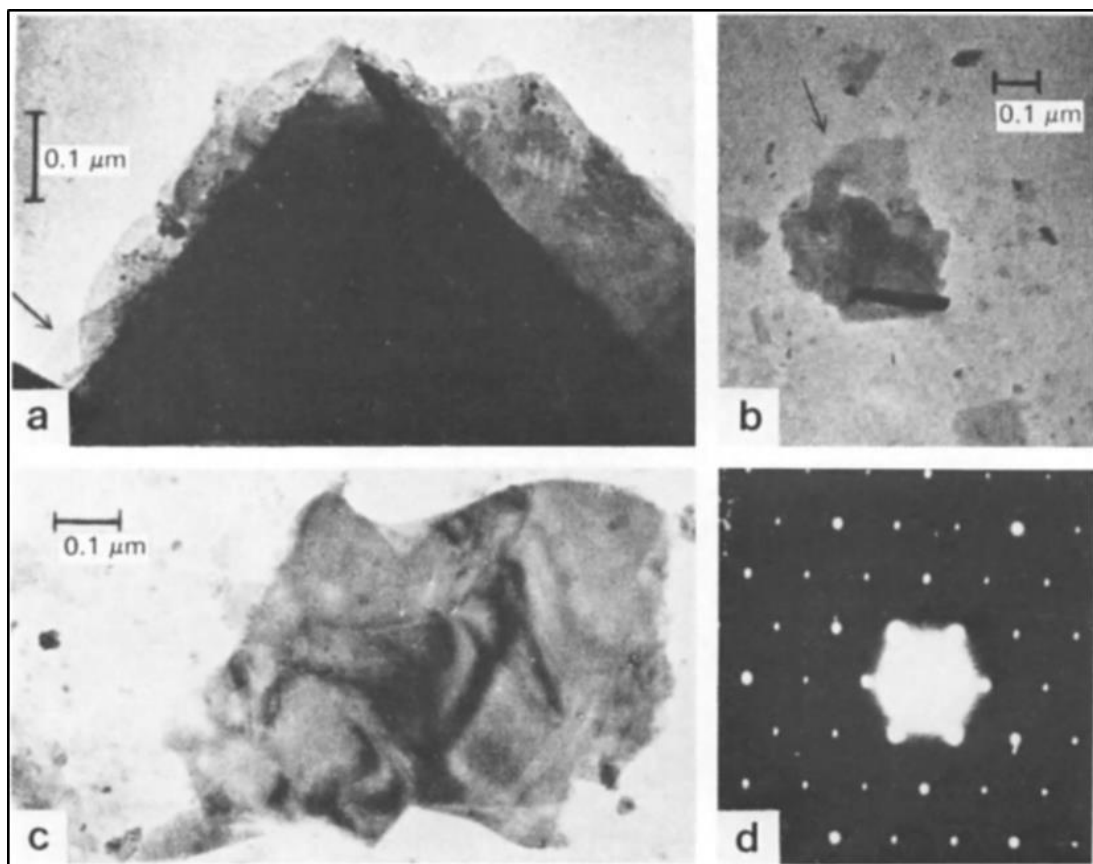


Fig. 10. Los estudios correlacionados de microscopía electrónica y difracción de electrones (d) de la estructura cristalina en capas del diamante (a y c) mostrando capas unitarias de $\sim 10 \text{ \AA}$ (b) proporcionaron la base para producir un borde de corte extremadamente afilado y uniforme de dimensiones moleculares, que es químicamente inerte y muy duradero. (H. Fernández-Morán, 1953-1958.)

Aún así, las mejores cuchillas de diamante eran de tan alta calidad que se aproximaban a la cuchilla ideal con las siguientes características: (1) bordes extremadamente afilados y

CRÍO-MICROSCOPIA ELECTRÓNICA Y ULTRAMICROTOMÍA

uniformes de varios milímetros, con un radio de curvatura de 20 a 50 Å, capaces de producir secciones ultrafinas de 100 Å o menos, con un mínimo de compresión, y formar cintas de secciones seriadas de longitud prácticamente indefinida; (2) todo tipo de especímenes podrían ser seccionados, incluyendo metales, cristales, vidrio, y, particularmente, secciones congeladas; (3) el borde del diamante era extremadamente duradero, resiliente y estable, con un rendimiento reproducible durante su uso constante durante períodos de meses y años cuando se tratan con cuidado y se usan correctamente; (4) la cuchilla de diamante era químicamente inerte y no contaminaba las muestras. La producción de la cuchilla de diamante fue un ejercicio edificante de persistencia y de trabajo en equipo. También demostró el papel indispensable de la microscopía electrónica para "ver y hacer" a nivel submicroscópico, y marcó su valor práctico en el campo de la tecnología de precisión de diamantes y en el mecanizado de ultraprecisión.

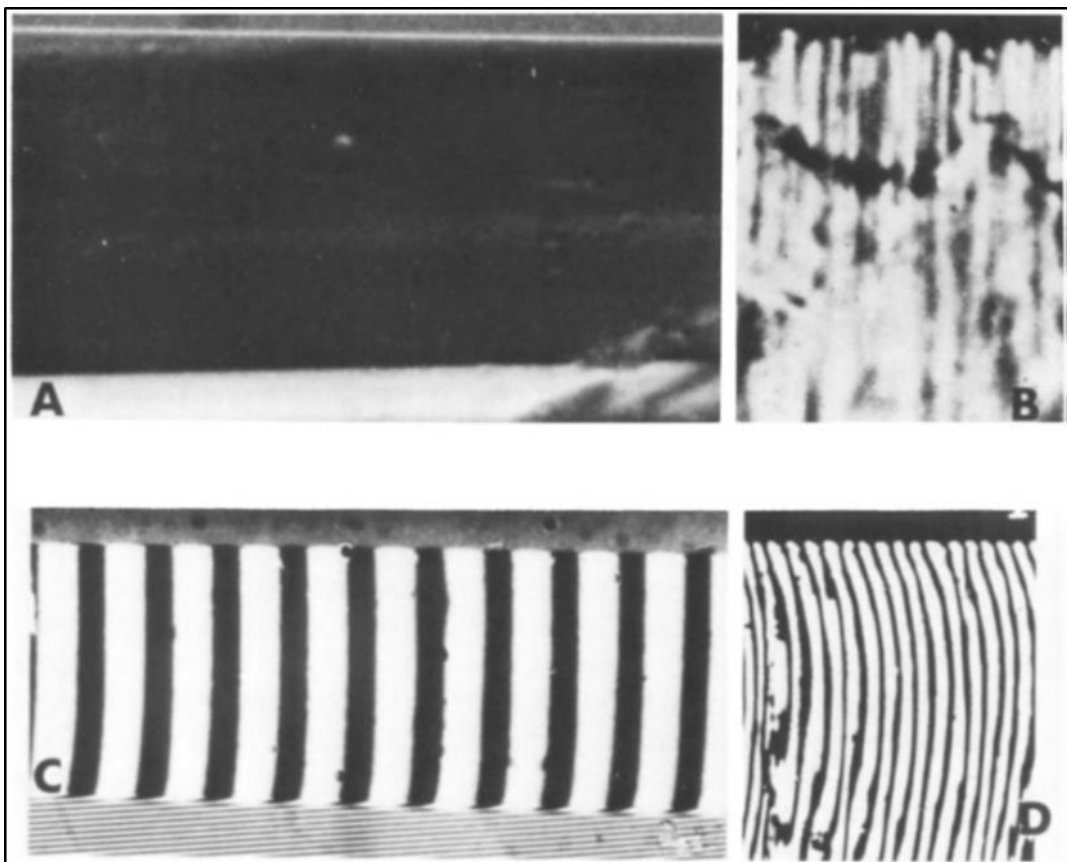


Fig. 11. (A) Borde de corte de una cuchilla de diamante mostrando como una línea brillante muy uniforme en una micrografía de campo oscuro. X1000. (B) Cuchilla de acero inoxidable mostrando el típico borde de corte dentado y faceta con surcos en una micrografía de campo claro. X1000. (C) Cuchilla de diamante mostrando un espaciamiento periódico de franjas uniformes que indican un acabado de calidad óptica inferior a 0,2 μm . Micrografía de interferencia. X600. (D) Filo pulido de navaja de afeitar del tipo que se usaba para ultramicrotomía, mostrando franjas irregulares y distorsionadas en marcado contraste con el acabado de calidad óptica de la cuchilla de diamante. Micrografía de interferencia. X1000.

HUMBERTO FERNÁNDEZ-MORÁN

En este período, 1953, Fernández-Morán publica el primer trabajo sobre la cuchilla de diamante y sus aplicaciones en ultramicrotomía (47). Habíamos logrado los objetivos que nos habíamos fijado para un instrumento de laboratorio.

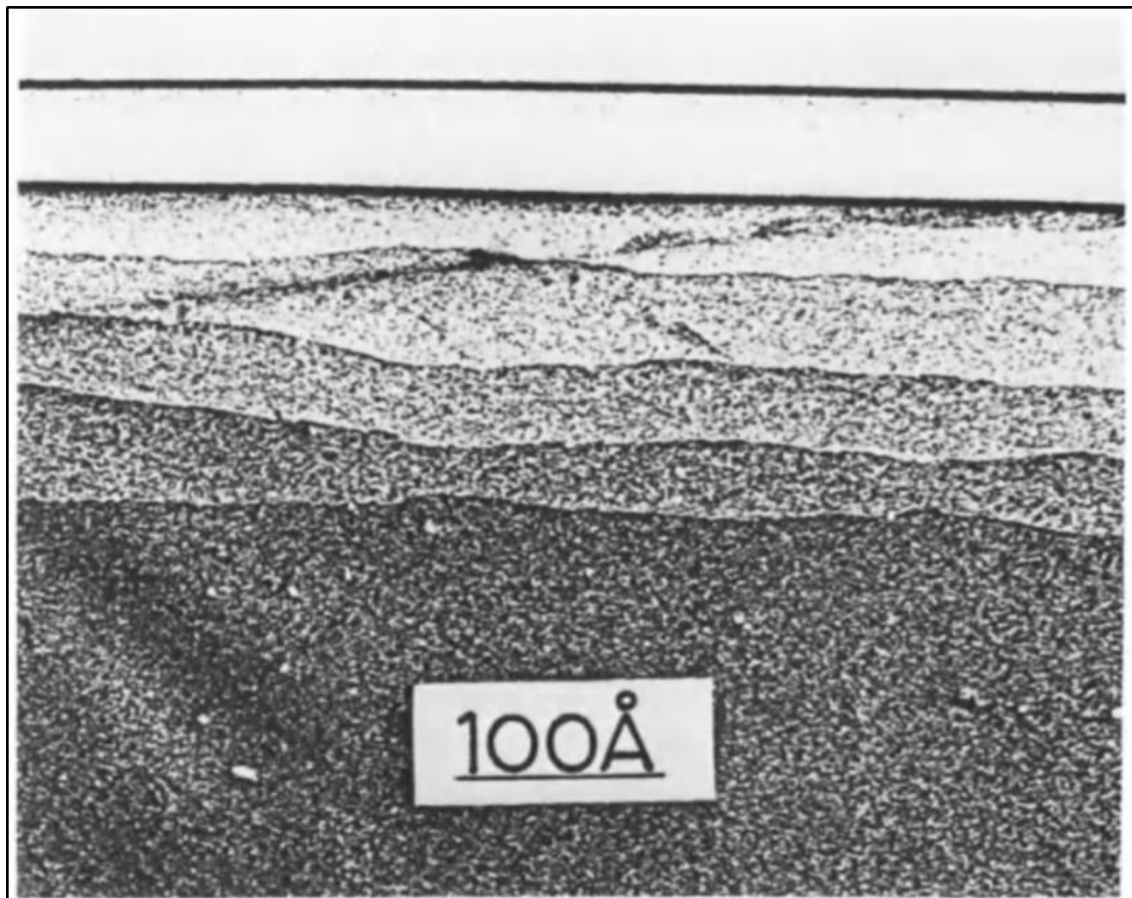


Fig. 12. Micrografía electrónica de una réplica de carbón del filo de una cuchilla de diamante y una faceta que muestra la característica estructura en capas derivada de las láminas de diamante cristalino orientado. Es esta combinación de estructuras en capas en el diamante con sus propiedades únicas la que hace posible "disecionar" mediante el clivaje adecuado y la abrasión de las capas unitarias preformadas, y así obtener los deseados filos de corte estables y ultraafilados de dimensiones moleculares (10-15 Å).

B. La Cuchilla de Diamante y el Ultramicrotomo

Ahora los métodos tenían que ser refinados, se requería un suministro confiable para la selección de diamantes adecuados y se necesitaban recursos suficientes para lograr un nivel satisfactorio de producción de cuchillas de alta calidad. Un abundante suministro de cuchillas de diamante probadas haría posible su amplia distribución. Habiendo fabricado y aplicado un borde de corte superior para ultramicrotomía, la

CRÍO-MICROSCOPIA ELECTRÓNICA Y ULTRAMICROTOMÍA

cuchilla de diamante debería estar fácilmente disponible para otros microscopistas electrónicos con el fin de establecer su desempeño y permitir compartir la experiencia de su uso en diferentes especímenes (53).

Complementando este proyecto, se desarrolló especialmente un ultramicrotomo para aprovechar al máximo las características de la cuchilla de diamante, en particular su capacidad para el corte ultrafino tanto de muestras blandas como de muestras duras. El diseño presentaba una estabilidad mecánica excepcional, una disposición compacta con relativamente pocos componentes de alta precisión y la capacidad de operar sin lubricación en vacío alto o en un ambiente criogénico. El ultramicrotomo de Fernández-Morán (51) (Fig. 13) consta de un rotor cilíndrico de acero especialmente endurecido,

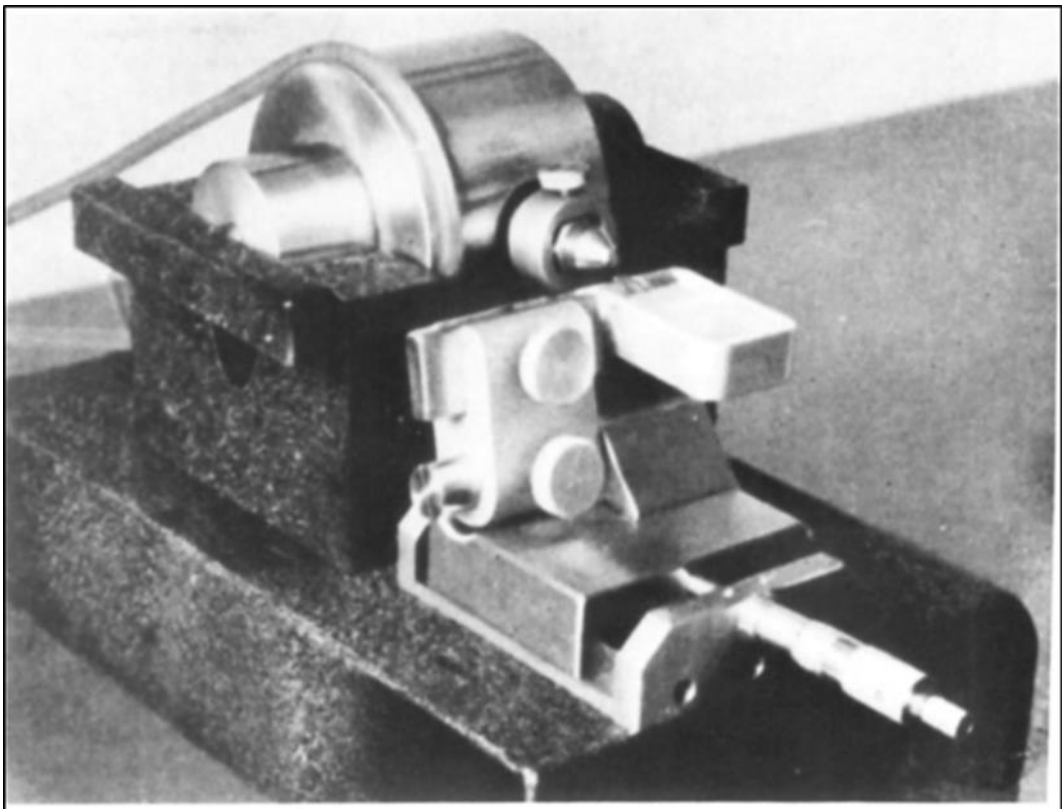


Fig. 13. Ultramicrotomo para producir secciones seriadas ultrafinas (20 a 100 Å) de especímenes biológicos incluidos en plástico o congelados, cristales, metales y otros materiales duros, desarrollado y probado por el autor en 1953-1954 (51). La cuchilla de diamante se mantiene estacionaria mientras el espécimen se hace avanzar hacia él a una velocidad cuidadosamente controlada, operando bajo el principio de expansión térmica de la varilla que sostiene la muestra. Se construyó una versión comercial de este instrumento la cual está disponible a través de la casa Leitz-Wetzlar (143).

mecanizado y pulido con una precisión de micropulgadas, que descansa sobre dos cojinetes en forma de V (formados con varillas de zafiro pulido precisamente alineadas para un rendimiento óptimo). Unos cojinetes puntuales en ambos lados del rotor evitan la

HUMBERTO FERNÁNDEZ-MORÁN

excursión lateral. Por lo tanto, estaba garantizado un movimiento circular de estabilidad y reproducibilidad excepcionales, sin ninguna lubricación y con un desgaste insignificante. La varilla portamuestras de Invar atraviesa el rotor a través de un orificio radial, está firmemente conectada en un extremo y contiene un elemento calefactor para controlar su expansión térmica. La cuchilla de diamante se mantiene estacionaria, firmemente unido a un canal grande que está rígidamente sujeto a un componente especial. La cuchilla de diamante se mueve hacia adelante hasta que hace contacto con la muestra y corta la primera sección. A partir de entonces el espécimen se hace avanzar hacia el filo de la cuchilla a una velocidad cuidadosamente controlada, determinada por la expansión térmica de la varilla portamuestra, cortando una sección ultrafina cada vez que la muestra que gira con precisión hace un solo paso a través de la cuchilla. Los componentes de este prototipo fueron construidos en los talleres centrales del Instituto Nobel de Física y del Instituto de Investigación Celular del Instituto Karolinska, gracias a la experta ayuda del Ingeniero R. Säfström. El montaje y las pruebas del ultramicrotomo fueron llevados a cabo con éxito por el Sr. Josef Weibel, quien supervisó este proyecto a lo largo de los años. El profesor Gunter Bahr (82) compartió amablemente su vasta experiencia en microscopía electrónica cuantitativa, e hizo varias sugerencias constructivas en las primeras etapas de este trabajo. Una versión comercial de este ultramicrotomo, incorporando varias mejoras importantes, fue construido y puesto comercialmente a la disposición por la casa Ernst Leitz GmbH en Wetzlar (1956-1958) (143).

El excelente rendimiento de la ultramicrotomía con cuchilla de diamante usando este instrumento durante un período de tres décadas está bien documentado en las publicaciones correspondientes (140). Como se muestra en las ilustraciones, resultó ser de valor particular en la preparación de secciones ultrafinas del virus del mosaico del tabaco (Fig. 18), del ojo compuesto de insecto con sus resistentes componentes de quitina (Fig. 22), y de las inclusiones de virus cristalinos de insectos (Fig. 23). Las características del diseño básico del crío-ultramicrotomo (Fig. 35) se derivaron de este instrumento.

C. Aplicaciones de la Cuchilla de Diamante

Basado en los métodos desarrollados por Fernández-Morán en el Instituto Nobel de Estocolmo, se implementó un programa sistemático para producir cuchillas de diamante de alta calidad en cantidad suficiente para hacer posible su extensa distribución. En el recién creado Instituto Venezolano de Neurología e Investigaciones Cerebrales (IVNIC) en Caracas, estaba disponible una abundante oferta de diamantes aluviales venezolanos (Fig. 14) y recursos de investigación adecuados para producir y probar cuchillas de diamante, muchas de ellas de excepcional calidad. Durante 1955-1958 varios cientos de cuchillas de diamante probadas se suministraron, de manera gratuita, a microscopistas individuales y a las principales instituciones científicas de todo el mundo (Fig. 15) sobre la base de un intercambio de información (53). La respuesta fue muy gratificante y recibimos a cambio una gran cantidad de información sobre el rendimiento y la gama de aplicaciones de la cuchilla de diamante. El Profesor J. Francis Hartmann, quien junto con H. Latta (36) había introducido la cuchilla de vidrio, escribió una de las

CRÍO-MICROSCOPIA ELECTRÓNICA Y ULTRAMICROTOMÍA

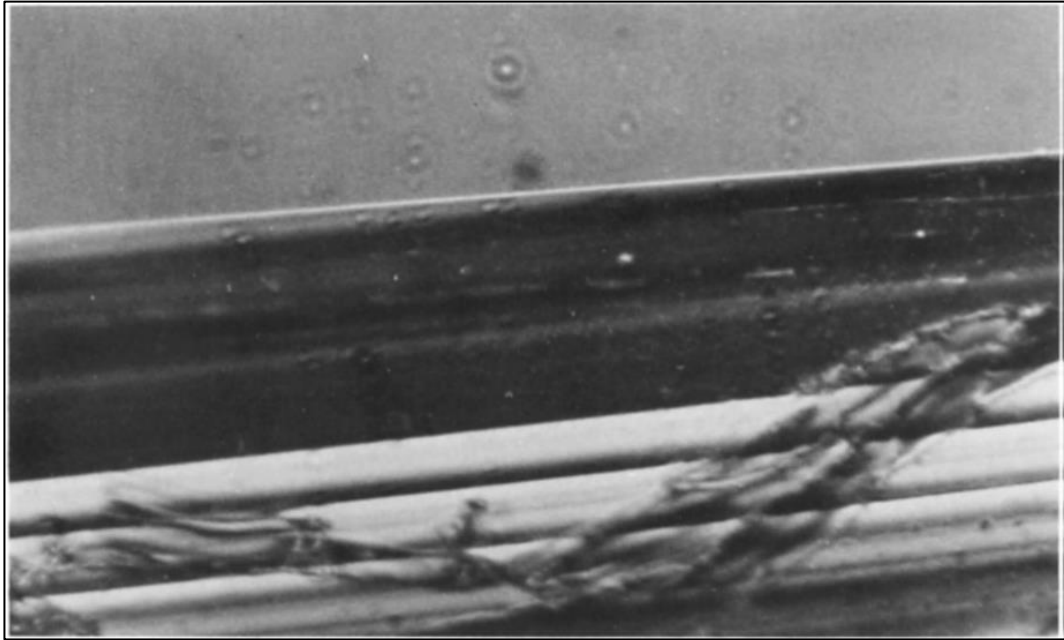


Fig. 14. Micrografía de contraste de fases del borde de corte de un diamante preparado a partir de diamantes aluviales venezolanos cuidadosamente seleccionados, que proporcionaron algunas de las cuchillas de diamante más afiladas y duraderas. Muchos de estos diamantes naturales que se encuentran en ciertas regiones de Venezuela exhiben estrías superficiales características que son similares a las estrías descritas por R. C. DeVries (1973) en los fragmentos de diamante tipo framesita. DeVries considera que estas bandas orientadas de deformación corresponden a endurecimiento por deformación plástica y tienen una mayor resistencia a la abrasión que aún las superficies (111) del diamante. En vista de los resultados experimentales obtenidos por DeVries, F. Bundy y R. Wentorf (1980) en el endurecimiento por deformación del diamante, se están realizando más estudios para seleccionar diamantes para la fabricación de cuchillas mejoradas.

más valiosas comunicaciones, en la que discutió en detalle las ventajas de la cuchilla de diamante y expresó generosamente "Yo lo considero una contribución invaluable al campo de la microscopía electrónica". El Dr. Keith Porter del Instituto Rockefeller también proporcionó una evaluación crítica y constructiva. Después de 1958, una importante contribución fue hecha por T. G. Lewis y sus asociados de la compañía du Pont, quienes desarrollaron un equipo especial y utilizaron las cuchillas de diamante como una herramienta mecánica ultraprecisa para hacer cortes con acabados de calidad óptica de hasta 0,2 μ pulgadas y mantener precisiones cercanas a 1 μ pulgada en aleaciones dúctiles sin necesidad de pulirlas (138). Durante las últimas dos décadas el autor ha colaborado con la División de Instrumentos de la casa du Pont en la evaluación de sus cuchillas de diamante para cortar secciones ultrafinas, y desea reconocer con aprecio el enfoque sistemático apoyado por Daniel Friel, las mejoras realizadas por Robert Sebastian y sus asociados, y las contribuciones significativas realizadas recientemente por el Dr. Frederick Keidel. Una prometedora nueva aplicación fue ideada por el Dr. Davis G. Durham, quien en 1966 introdujo un nuevo instrumento para

HUMBERTO FERNÁNDEZ-MORÁN

incisiones de cataratas mediante el uso de un bisturí de diamante (Fig. 16) fabricado por la División de Productos de Instrumentos de E. I. du Pont de Nemours & Co., Inc., Wilmington, Delaware. Las 60 operaciones de cataratas realizadas con éxito por el Dr. Durham representan el primer uso conocido de las cuchillas de diamante en la cirugía de humanos.

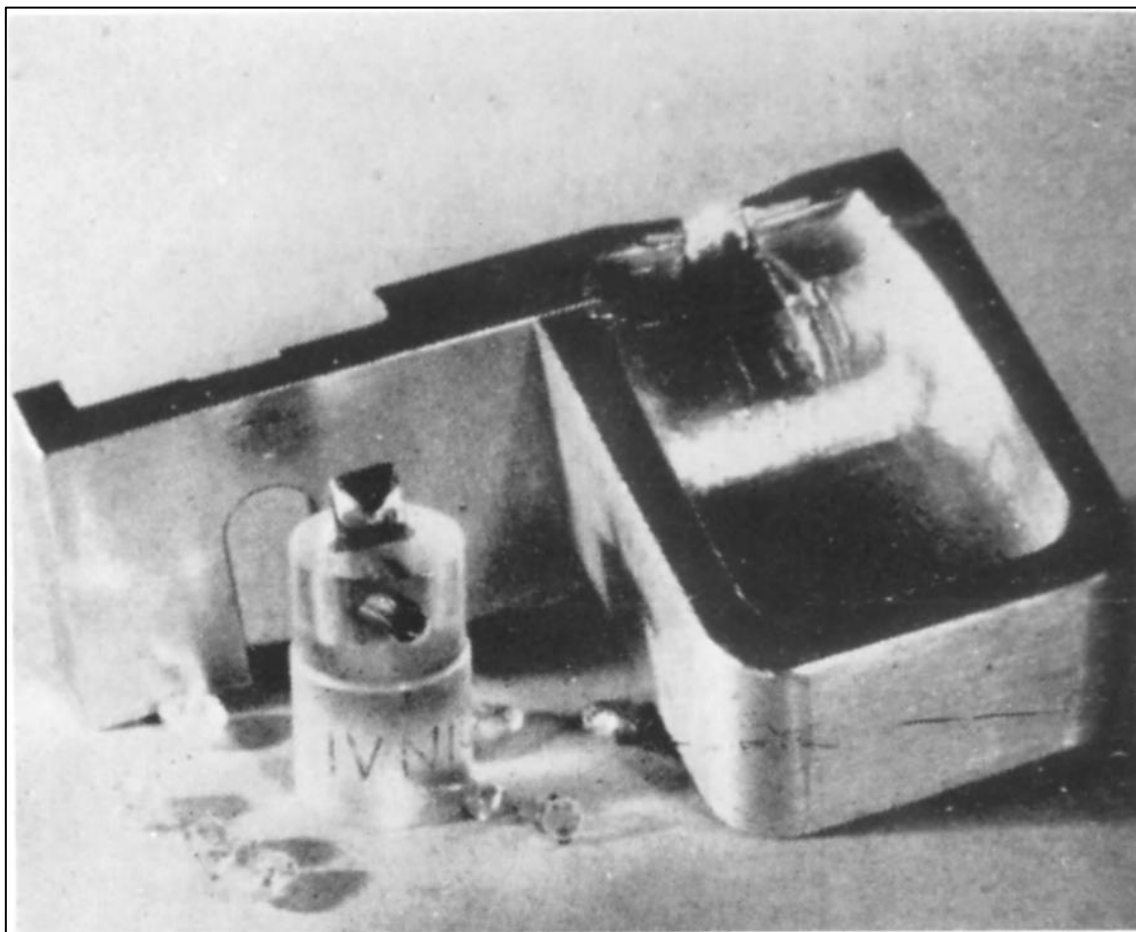


Fig. 15. Siguiendo los métodos desarrollados por el autor en Suecia, la producción de la cuchilla de diamante en cantidades importantes se realizó en el Instituto Venezolano de Neurología e Investigaciones Cerebrales (IVNIC) en Caracas durante los años 1955-1958. Varios cientos de cuchillas de diamante probadas se pusieron a la disposición de las principales instituciones científicas de forma gratuita en todo el mundo, como una contribución de IVNIC a los campos de ultramicrotomía, investigación de ultraestructura y microscopía electrónica.

La historia de la cuchilla de diamante y de sus aplicaciones ha sido relatada aquí con tanto detalle debido a que ha evolucionado de una manera interesante e inesperada. Desarrollado hace 30 años, simplemente como un dispositivo para microscopía electrónica, ha recibido desde entonces la aceptación mundial como una herramienta de

CRÍO-MICROSCOPIA ELECTRÓNICA Y ULTRAMICROTOMÍA

corte insuperable para el mecanizado de precisión, para la producción de componentes ópticos complejos, para delicadas operaciones quirúrgicas, y ha abierto nuevos e importantes campos (138-142).

En 1967 le fue otorgado al autor el Premio John Scott de la ciudad de Filadelfia por la invención de la cuchilla de diamante. Este estimado honor fue inesperado, ya que el placer de haber iniciado un campo y seguido su desarrollo, el cual parece tener vida propia, constituye ya una amplia recompensa.

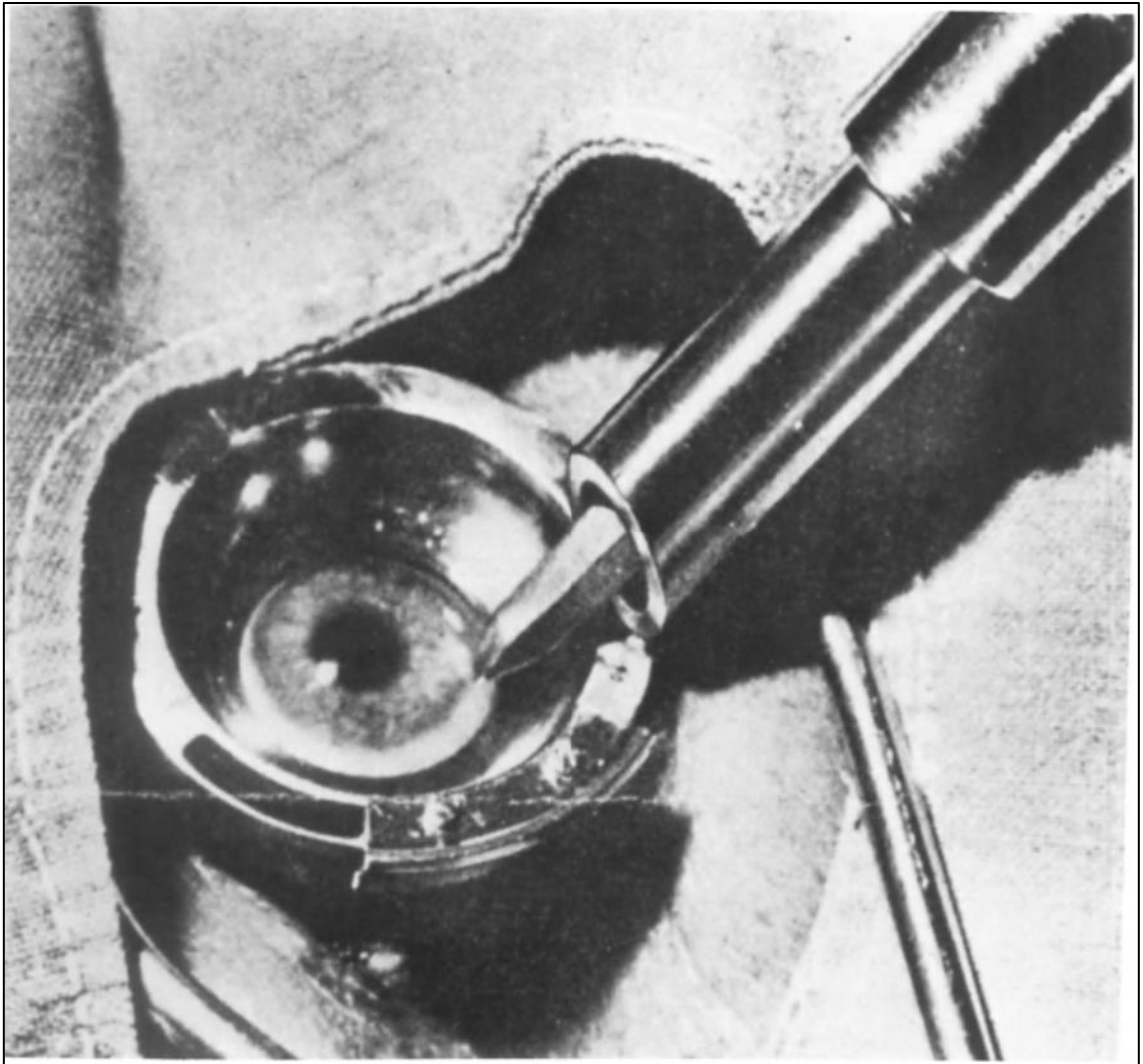


Fig. 16. Dispositivo de fijación por vacío desarrollado por Davis G. Durham, M.D., aplicado al ojo, mostrando el bisturí de diamante du Pont en posición para cortar. Más de 60 operaciones de cataratas se han realizado con éxito con el bisturí de diamante. Este es el primer uso conocido de cuchillas de diamante en cirugía humana. [Cortesía del Dr. Davis G. Durham, *Del. Med. J.* **38**.202 (1966) (139).]

IV. El Instituto Venezolano de Neurología e Investigaciones Cerebrales

A. Fundación y Actividades de Investigación

En 1954 Fernández-Morán regresó a Venezuela, su país natal, invitado por el Ministro de Salud, el distinguido médico Dr. P. A. Gutiérrez Alfaro, asignándosele la misión de desarrollar un centro regional de investigación y entrenamiento en las áreas de neurología y cerebro. El Instituto Venezolano de Neurología e Investigaciones Cerebrales (IVNIC) fue fundado en abril de 1954, por decreto del Presidente de Venezuela, como un organismo gubernamental autónomo, adscrito al Ministerio de Salud, de rango similar al de los Institutos Nacionales de Salud. Con una dotación inicial de 7 millones de dólares, y contando con todo el apoyo del gobierno y de la Academia de Ciencias, se entendió claramente que Fernández-Morán como director de una eficiente junta ejecutiva se concentraría en seleccionar un sitio adecuado y empezar a construir lo antes posible los primeros laboratorios de investigación. Esto le permitiría continuar con su propio trabajo, al mismo tiempo que atraería personal de investigación con el incentivo de equipar sus propios laboratorios con las más modernas instalaciones. Con la ayuda de expertos se seleccionó un sitio ubicado en una hermosa zona montañosa, 12 Km al suroeste de Caracas, a 1500 m de altura, con un excelente clima y con un suministro adecuado de agua (Fig. 17). En los primeros 7 meses, la carretera principal y las instalaciones básicas ya se habían construido, y casi un año después, entre el 26 de noviembre y el 2 de diciembre de 1955, fueron inaugurados los Laboratorios de Ultraestructura Nerviosa (con instalaciones de microscopía electrónica instaladas y en funcionamiento), la Unidad de Neurofisiología, el Taller Central (incluyendo la Unidad de Cuchilla de Diamante), la Biblioteca y las Residencias para el personal de planta y los visitantes (50).

Los trabajos de investigación comenzaron antes de la Navidad de 1955, y el primer artículo, sobre la estructura fina de la retícula de insectos, fue publicado en Nature en 1956 (52). El trabajo de producción, aplicaciones y distribución de cuchillas de diamante (51,53-55) prosiguió con paso firme. Gracias a los dedicados esfuerzos del personal administrativo y de ingeniería, los trabajos de construcción del importante proyecto del instituto (que finalmente costaría más de 50 millones de dólares) continuaron de manera independiente, de acuerdo al calendario programado. Todavía se pueden evocar los impactantes recuerdos de observar en el laboratorio las secciones ultrafinas seriadas (de apenas 100 átomos de espesor) preparadas por ultramicrotomía con cuchilla de diamante, y luego salir para ver afuera a un equipo de tractores rasurando el tope de una montaña, reflexionando sobre cuándo se tiene la oportunidad de ser testigos de tales contrastes de manipulación controlada a través de tantos niveles dimensionales. Pronto nuestro trabajo en microscopía de alta resolución, y el trabajo pionero de Gunnar Svaetichin en el registro de la respuesta espectral de un solo cono retiniano, comenzó a atraer a científicos visitantes. Los Profesores Harold Urey y George Gamow estuvieron entre los distinguidos visitantes transitorios. Los Profesores Arne Engström, Gerhard Schramm, Helmut Ruska, Severo Ochoa, Bryan Finean y el inolvidable Profesor Erwin

CRÍO-MICROSCOPIA ELECTRÓNICA Y ULTRAMICROTOMÍA

W. Müller, para mencionar a sólo unos pocos, se quedaron durante más tiempo y contribuyeron mucho a la actividad del instituto.

Aquí me referiré brevemente a un proyecto de investigación conjunto con el ya fallecido Profesor Gerhard Schramm del Instituto Max-Planck para la Investigación de Virus, el cual arrojó interesantes resultados sobre la estructura de las partículas del virus del mosaico del tabaco (61) y nos puso indirectamente en contacto epistolar con Rosalind E. Franklin. El profesor Schramm sugirió que aplicáramos las técnicas de tinción, inclusión y seccionamiento ultrafino a un estudio de la estructura fina de las partículas del virus del mosaico del tabaco mediante microscopía electrónica de alta resolución. Él señaló que ya existía disponible bastante información sobre la estructura del virus del mosaico del tabaco basada en estudios de difracción de rayos-X de preparaciones



Fig. 17. El Instituto Venezolano de Neurología e Investigaciones Cerebrales (IVNIC), ubicado en las montañas a 12 km al sur de Caracas. Fundado en abril de 1954, pronto se convirtió en un centro de investigación para estudios de ultraestructura nerviosa por microscopía electrónica, difracción de rayos-X, y técnicas afines (1955-1958). Sirviendo como un núcleo, desde entonces se ha expandido (IVIC) y ha jugado un papel importante en el desarrollo científico y cultural de Venezuela durante las pasadas décadas. [Cortesía del Profesor Geoffrey H. Bourne, *Nature* 176, 1049-1051 (1955) (50).]

HUMBERTO FERNÁNDEZ-MORÁN

orientadas, que podrían correlacionarse con los resultados de estudios bioquímicos. Una preparación concentrada de virus del mosaico del tabaco proporcionada por Schramm fue orientada succionándola dentro de capilares delgados de plástico, luego teñida con acetato de uranilo, acetato de lantano, ácido fosfotúngstico, ácido fosfomolibdico y vanadato de amonio. Las preparaciones teñidas fueron incluidas para luego preparar secciones ultrafinas mediante ultramicrotomía con cuchilla de diamante. Las secciones ultrafinas de partículas orientadas de TMV obtenidas a partir de preparaciones teñidas con acetato de uranilo al 1% muestran una área central clara con un diámetro de 25-30 Å (Fig. 18 A). Este hueco central está rodeado por un anillo concéntrico de gránulos densos de ~20 Å de diámetro, con indicaciones de un arreglo regular en un patrón tipo roseta (Fig. 18B). En secciones longitudinales podía verse el canal central con un diámetro de 30-40 Å, correspondiente a las estructuras descritas por primera vez por H. Huxley en Partículas de TMV secadas en la película del espécimen y teñidas con acetato de uranilo al 1 %. (Fig. 18C). Aunque los resultados obtenidos fueron preliminares, la imagen general de una partícula cilíndrica con un núcleo axial hueco, rodeado por una característica densa zona anular parece estar de acuerdo con el modelo postulado por R. E. Franklin, A. Klug y K. C. Holmes (Fig. 18D) (del Simposio de la Fundación CIBA, 1956, Boston, Little, Brown, 1957, pág. 39).

Estos estudios demostraron las ventajas de los métodos de corte fino: (1) se puede obtener información complementaria sobre la estructura interna de las partículas de TMV, que se encuentran relativamente bien conservadas, (2) las secciones ultrafinas permiten observar la textura fina de las partículas del virus en cualquier plano deseado, mientras muestran los detalles repetitivos de la estructura interna que están presentes en arreglos regulares paracrystalinos (61). Durante nuestras largas discusiones con el profesor Schramm me interesé en la personalidad y extraordinario talento de Rosalind Franklin. En 1958, cuando ella planeaba visitar los Estados Unidos, el IVNIC le escribió una carta, invitándola a honrarnos visitando el IVNIC como científico distinguido. Parte de esa carta se reproduce en la página 187 del brillante y conmovedor libro de Anne Sayre sobre Rosalind Franklin y el ADN (62). Su prematura muerte fue una gran pérdida para todos los que la conocían, y para la ciencia. Su prevista visita a América del Sur y a Venezuela, y al IVNIC en particular, hubiese sido un evento memorable.

B. Simposio Internacional sobre Ultraestructura y Función del Nervio

El simposio internacional sobre "La Organización Submicroscópica y Función de las Células Nerviosas" realizado en el Instituto Venezolano de Neurología e Investigaciones Cerebrales, del 15 al 22 de Marzo de 1957, bajo los auspicios de la Sociedad Internacional de Investigaciones Celulares, marca el apogeo de IVNIC. El recuento del Profesor G. H. Bourne en *Nature* (60) y la publicación de las actas del simposio como suplemento de *Experimental Cell Research* (58) transmiten el espíritu de cordial comprensión, estimulante interacción y el intercambio de nuevos datos que prevalecieron durante el encuentro.

CRÍO-MICROSCOPIA ELECTRÓNICA Y ULTRAMICROTOMÍA

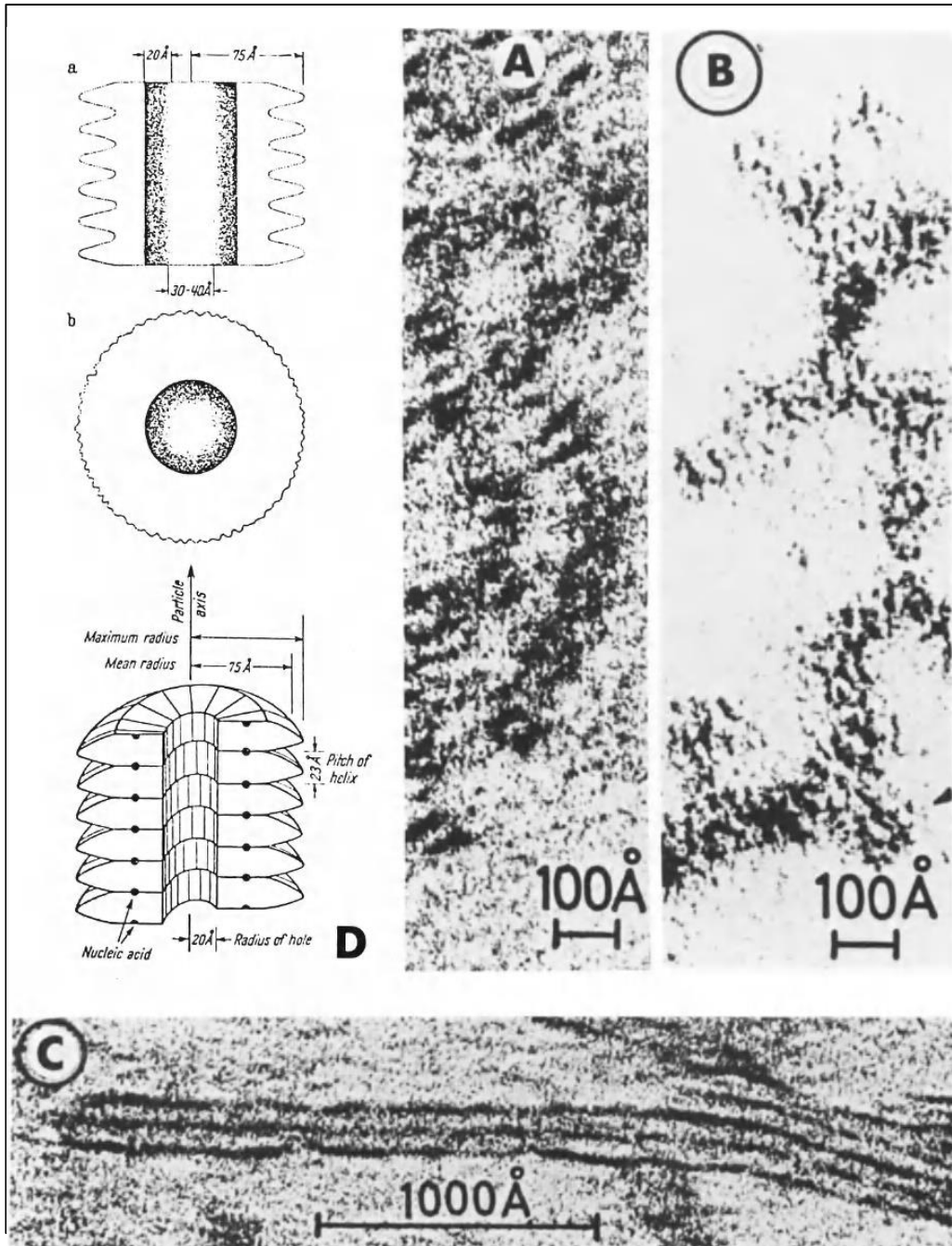


Fig. 18. (A) Sección transversal ultrafina de partículas de virus TMV de una preparación orientada teñida con acetato de uranilo que muestra un área central clara rodeada por una estructura anular densa con un patrón tipo roseta (B). (C) Partícula de TMV secada en la película del espécimen y teñida que muestra el canal central. (D) Diagrama esquemático de la estructura de una partícula del virus del mosaico del tabaco tal como se revela en secciones delgadas por microscopía electrónica, en comparación con el modelo (a y b) postulado por Franklin, Klug y Holmes (1956) basado en estudios de difracción de rayos-X. [Tomado de H. Fernández-Morán y G. Schramm, 1958 (61).]

HUMBERTO FERNÁNDEZ-MORÁN

Un grupo internacional de 46 distinguidos científicos pasaron una semana disfrutando de la hospitalidad de Caracas y subían todas las mañanas en automóvil hasta el instituto donde pasaban el resto del día, asistiendo a las sesiones y visitando los laboratorios. La inspección que realizaron del instituto durante el simposio "mostró que era el sitio mejor equipado del mundo para la aplicación de técnicas físicas al estudio de problemas biológicos. Probablemente la técnica novedosa más intrigante que allí se mostró fue la de resonancia magnética nuclear y su aplicación a la medición de cambios rápidos en el contenido de agua del nervio intacto no tratado" (60). Conforme a su título, el simposio se centró alrededor de los campos de la microscopía electrónica y la ultraestructura, electrofisiología, bioquímica, histoquímica y espectroscopía del nervio. Las ponencias del simposio se dividieron en cinco grupos que trataban de las fibras nerviosas, la membrana de la célula nerviosa, las neuronas, la sinapsis y los receptores. La ultraestructura nerviosa, de acuerdo a lo revelado por la microscopía electrónica y por la difracción de rayos-X de ángulo bajo, fue una contribución importante, particularmente dado que la mayor parte del material presentado era nuevo y todavía, más de dos décadas después, se considera significativo. Casi un tercio de los participantes eran microscopistas electrónicos, incluidos Hans Engström, Keith Porter, S. L. Palay, H. Ruska, E. De Robertis y otros distinguidos pioneros. Los clásicos artículos sobre fibras nerviosas del Dr. H. S. Gasser del Instituto Rockefeller, del Dr. F. O. Schmitt del Instituto de Tecnología de Massachusetts, y del Dr. A. von Muralt de The Hallerianum, Berna, fueron complementados con las contribuciones originales del Dr. J. B. Finean, quien presentó los resultados de estudios por difracción de rayos-X de la vaina o envoltura de mielina del nervio, correlacionados con las investigaciones por microscopía electrónica realizadas en conjunto con Fernández-Morán en el Departamento de Ultraestructura Nerviosa del IVNIC (56,58). Cada trabajo contribuyó con nuevos e interesantes datos sobre los diversos tópicos, y a menudo dio lugar a animados debates. Algunas veces estábamos siendo testigos de la primera correlación de ciertos detalles ultraestructurales con datos funcionales hasta entonces desconocidos, por ejemplo, los registros electrofisiológicos de neuronas individuales, o el elegante análisis de los potenciales de receptor de conos retinianos individuales utilizando ultramicroelectrodos y las técnicas desarrolladas y aplicadas por el Dr. G. Svaetichin en el Departamento de Neurofisiología del IVNIC. (Véanse las figuras 19 a 23).

Lo oportuno y la importancia del simposio se hicieron cada vez más evidentes a medida que se discutían los datos acumulados y los participantes se hacían cada vez más familiarizados con la integración de estructura y función. Además, ahora nos damos cuenta del privilegio de haber recibido un invaluable fondo de conocimiento y sabiduría, basado en la experiencia de toda una vida, que fue aportada como legado por maestros como Herbert Gasser, John Runnström y Yngve Zotterman, quienes ya no están entre nosotros, pero que siempre estarán presentes en nuestros pensamientos. El Dr. G. H. Bourne describió los resultados de sus recientes estudios histoquímicos, señalando la alta actividad de la fosfatasa a lo largo de las membranas de las dendritas de la célula piramidal, y particularmente en las células basales del epitelio olfatorio. El Dr. J. H. Luft describió la estructura fina del tejido eléctrico de los peces, presentando un sistema

CRÍO-MICROSCOPIA ELECTRÓNICA Y ULTRAMICROTOMÍA

característico de túbulos y vesículas que se extienden desde la membrana plasmática hasta dentro del citoplasma de la electroplaca. Según su hipótesis, este sistema puede explicar el transporte de iones en el tejido eléctrico.

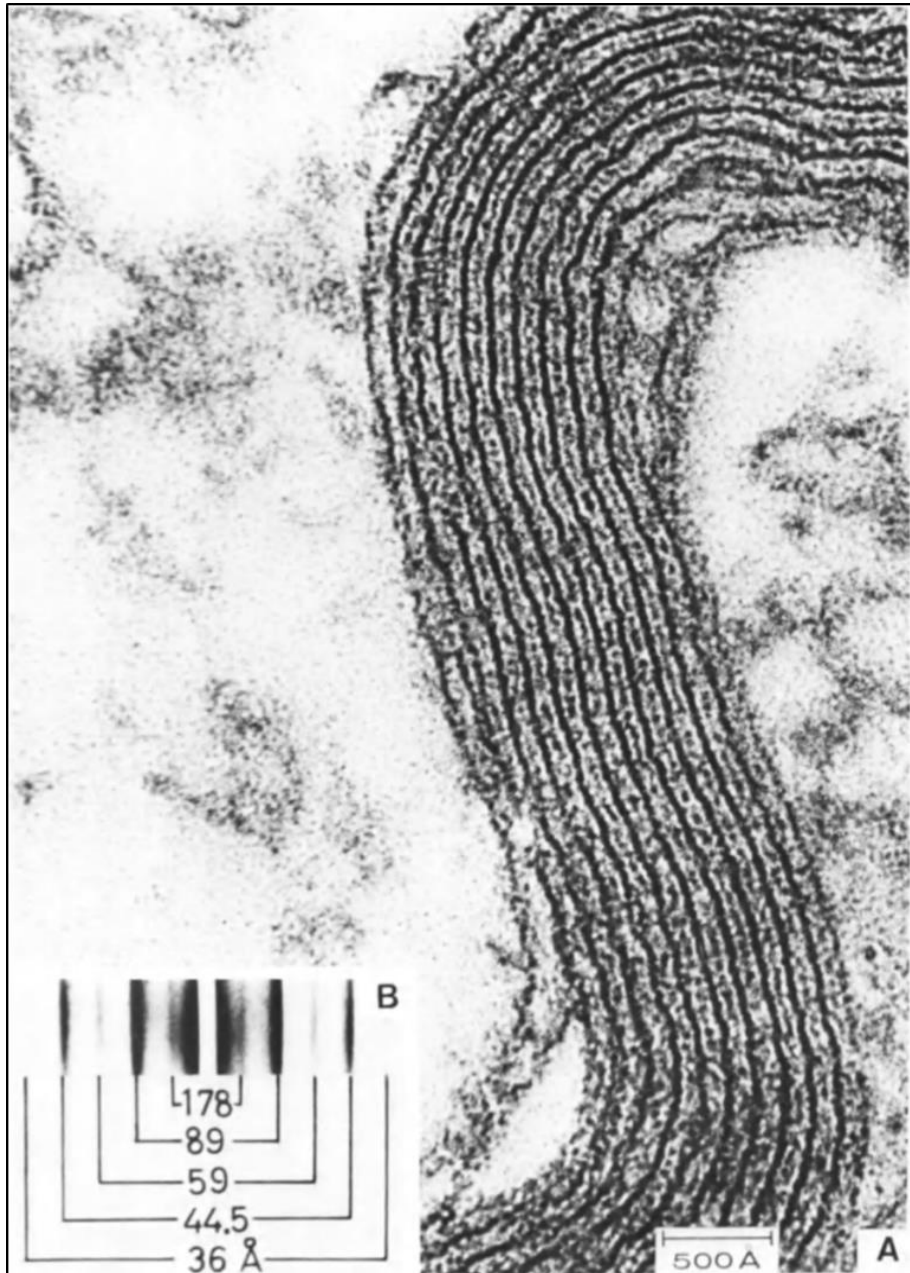


Fig. 19. Micrografía electrónica de alta resolución de un segmento de la envoltura de mielina de una sección delgada del nervio ciático de rana que muestra una matriz concéntrica de capas intermedias y densas en una preparación por crío-fijación. (B) Patrón de difracción de rayos-X de ángulo bajo de un nervio ciático fresco donde se aprecia un período fundamental de 178 Å con la alternancia típica de las intensidades de los órdenes pares e impares. [Tomado de H. Fernández-Morán (63,65,72).]

HUMBERTO FERNÁNDEZ-MORÁN

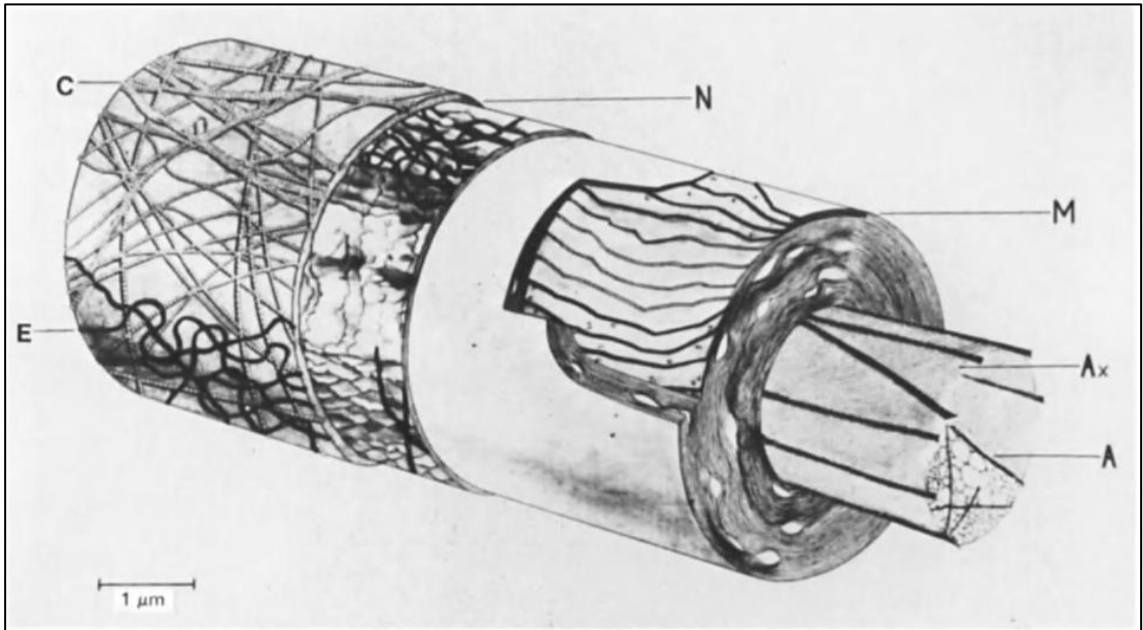


Fig. 20. Diagrama esquemático de la porción internodal de una fibra nerviosa medulada basada en microscopía electrónica de secciones ultrafinas congeladas del nervio ciático de rata fijado con osmio, correlacionado con los resultados de los estudios de difracción de rayos-X y luz polarizada. Se muestran la membrana del neurilema (N), la estructura laminar concéntrica de la envoltura de mielina (M) y la estructura filamentosa del axón (A). Ax, axolema; C, colágeno; E, fibrillas suaves. [Tomado de H. Fernández-Morán, *Exp. Cell Res.* **1**, 309 (1950) (43).]

Los Drs. H. Hydén, S. O. Brattgård y J. E. Edström de la Universidad de Göteborg, Suecia, hicieron un recuento impresionante de la aplicación de sus pioneros métodos ultramicroquímicos y citoquímicos cuantitativos para la determinación de ácidos ribonucleicos (ARNs) y de las fracciones proteicas y lipídicas por célula nerviosa a estudios sobre la regeneración nerviosa. Los datos obtenidos, que permitieron el análisis cuantitativo de neuronas individuales a la citoescala, se correlacionaron con el crecimiento periférico del axón. Durante el período de maduración una de las más impactantes características es el aumento del ARN y del volumen en un 100%. El Dr. George Wald, de los Laboratorios Biológicos de la Universidad de Harvard, hizo una magistral presentación sobre los "Aspectos Fotoquímicos de la Excitación Visual". Su disertación describía interesantes correlaciones de la bioquímica de los sistemas visuales con la base molecular de la excitación visual, e introdujo numerosas sugerencias relacionadas con la relaciones estructurales entre un bastón retiniano y una célula nerviosa periférica, y entre el epitelio pigmentario y la envoltura de Schwann. El Dr. Fernández-Morán describió la estructura fina de los receptores de luz en los ojos compuestos de los insectos, lo cual es de particular interés en vista de sus notables capacidades funcionales, incluida la capacidad de los insectos de orientarse mediante luz polarizada. Ese trabajo (58,59) y la exhibición de micrografías electrónicas sirvieron también para ilustrar las condiciones singularmente favorables prevalecientes en el

CRÍO-MICROSCOPIA ELECTRÓNICA Y ULTRAMICROTOMÍA

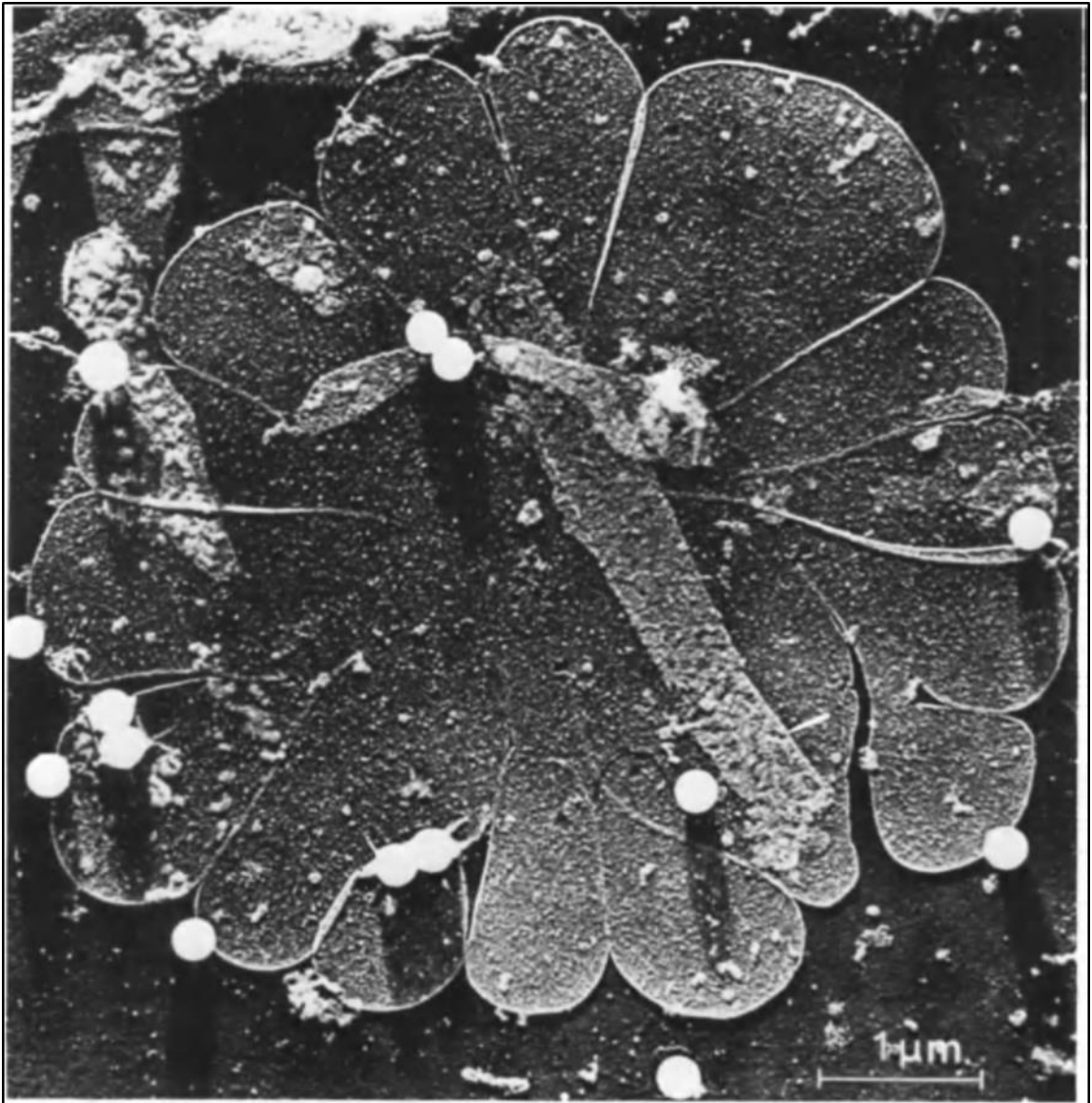


Fig. 21. Disco de una sola unidad aislada del segmento externo de la varilla retiniana (bastón) de rana que muestra la estructura superficial granular y el cordón marginal. Las partículas de látex (2800 Å de diámetro) fueron agregadas para la calibración en esta preparación sombreada (48).

IVNIC para estudiar la riqueza de formas de insectos tropicales con las técnicas apropiadas, incluida la del seccionamiento ultrafino de la delicada pero resistente quitina de los insectos mediante ultramicrotomía con cuchilla de diamante. Fueron examinados especímenes representativos de ojos compuestos con diferentes tipos de formación de imágenes, incluyendo los grandes ojos compuestos de la polilla tropical gigante *Erebus odora*. Fueron confirmados y extendidos los recientes estudios por microscopía electrónica de los elementos diferenciados de las células de retina llamados rabdómeros

HUMBERTO FERNÁNDEZ-MORÁN

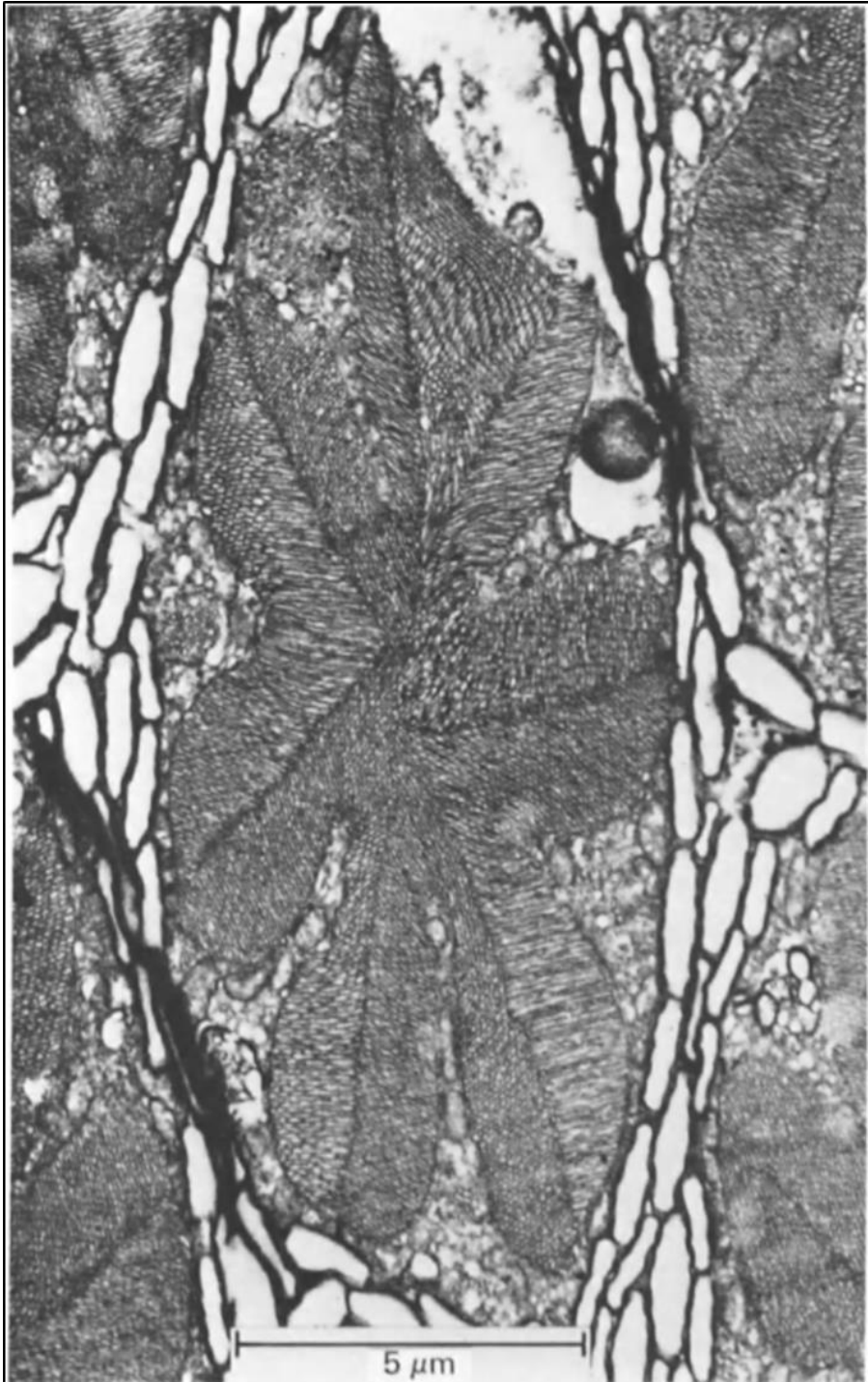


Fig. 22. Sección transversal oblicua a través de fotorreceptores del ojo compuesto de la polilla tropical *Erebus odora* donde se muestra la estructura fina ordenada de sus componentes. La ultramicrotomía con cuchilla de diamante fue esencial en el examen del ojo del insecto con su resistente marco de quitina (59).

CRÍO-MICROSCOPIA ELECTRÓNICA Y ULTRAMICROTOMÍA

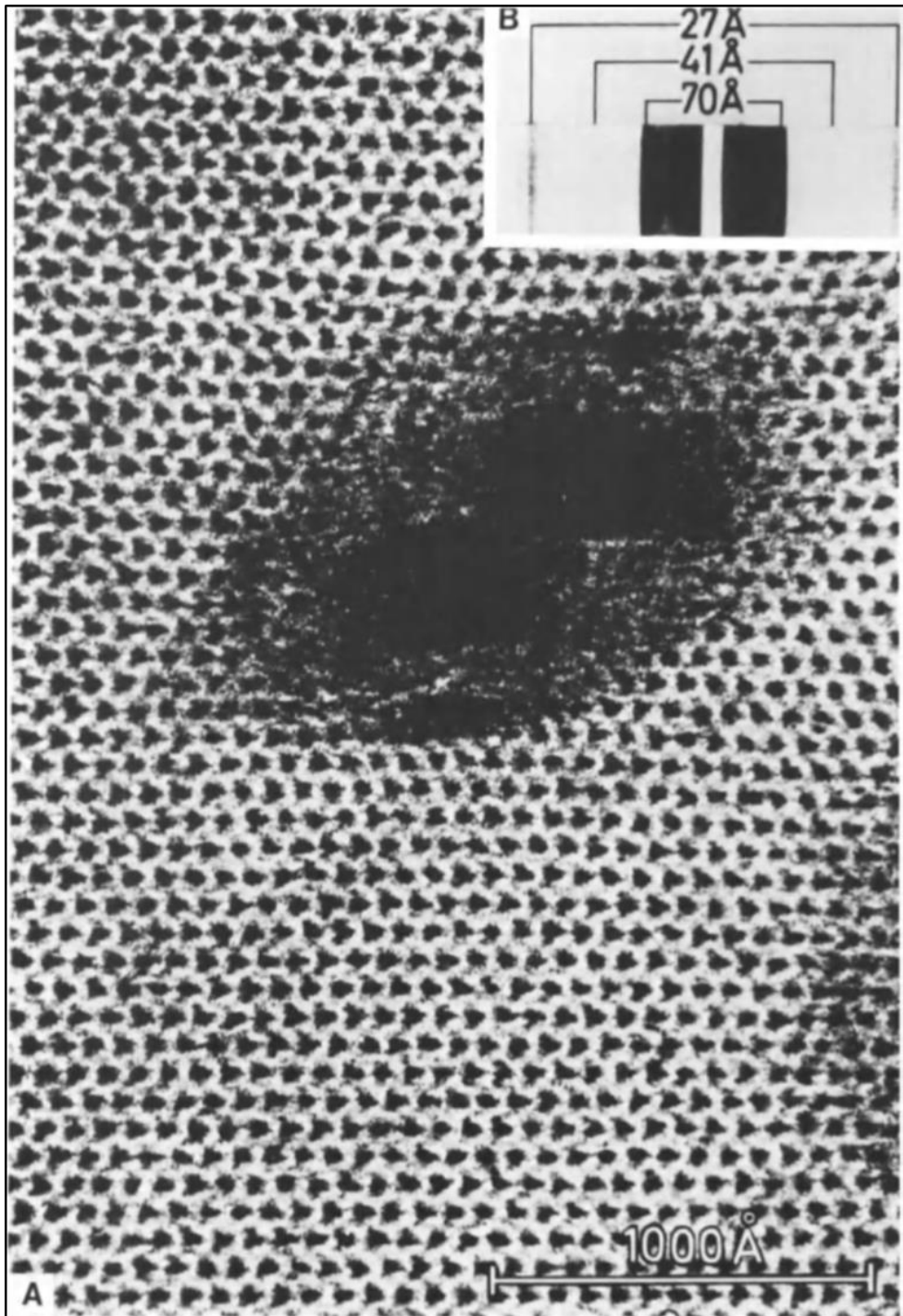


Fig. 23. (A) Micrografía electrónica de alta resolución de una sección ultrafina preparada por ultramicrotomía con cuchilla de diamante a partir de una inclusión de un virus cristalino de insecto que muestra una organización molecular altamente ordenada de la matriz proteica que rodea al virus. La correlación con el patrón de difracción de rayos-X de bajo ángulo (B) proporcionó información adicional [IVNIC, 1957 (86)].

HUMBERTO FERNÁNDEZ-MORÁN

llevados a cabo por T. H. Goldsmith y D. E. Philpott, por J. J. Wolken, J. Capenos y A. Turano, y por W. H. Miller [*J. Biophys. Biochem. Cytol* **3**, **429**, **441**, **421** (1957)]. Los rabdómeros constituyentes en todos los tipos de rabdomos examinados están formados por numerosas unidades en forma de varilla estrechamente empaquetadas o tubulares que varían de 400 a 1200 Å de diámetro. Dentro de cada rabdomo los rabdómeros están dispuestos radialmente en un patrón simétrico formado por pares emparejados de rabdómeros, que exhiben una orientación similar de su estructura interna y por lo general se ubican uno frente al otro (52,58). Los datos disponibles respaldaron la suposición de que los rabdomos individuales, que están compuestos de pares de rabdómeros dispuestos radialmente con capas moleculares del pigmento visual dicroico, orientadas de manera similar en su estructura de compartimientos periódicos, pueden corresponder a las unidades funcionales del analizador de luz polarizada que se postula para el funcionamiento del ojo compuesto. La notable habilidad del insecto para reconocer los patrones regionales de polarización de la luz del cielo como base para la orientación con brújula de luz implicaría una actividad coordinada de estas unidades funcionales a nivel de los grupos omatidiales (58). Este estudio preliminar, publicado hace 25 años, sirvió como base para la sistemática investigación de la organización submicroscópica de los ojos compuestos y de las vías neurales asociadas dentro de los lóbulos ópticos.

Todos los participantes coincidieron en que el simposio tuvo un éxito considerable: "No hay duda de que el Instituto Venezolano de Neurología e Investigaciones Cerebrales ha sido lanzado científicamente. . ." (60).

Después del simposio, 1957 fue un año de intenso trabajo e inocente felicidad. Las publicaciones de ese período dan fe de la amplia gama de actividades. Fue publicado un artículo completo sobre "Estudios de la Capa de Mielina del Nervio Óptico mediante Microscopía Electrónica y Difracción de Rayos-X de Bajo Ángulo" (56), en el que se reporta la estrecha correlación entre los estudios por microscopía electrónica de alta resolución y por difracción de rayos-X de bajo ángulo de la capa de mielina después de modificaciones experimentales controladas, llevadas a cabo en colaboración con el Dr. J. B. Finean, quien hizo significativas contribuciones.

Uno de los proyectos más interesantes y gratificantes fue iniciado por el ya fallecido Profesor Erwin W. Müller, del Laboratorio de Emisión por Campo de la Universidad del Estado de Pensilvania, quien en 1957 aceptó amablemente nuestra invitación. El Dr. Müller compartía nuestro interés en la posible aplicación de esta poderosa técnica a ciertos problemas biológicos. Trajo consigo uno de sus microscopios de iones en campo operado a baja temperatura, y procedió poco después de su llegada a instalar dicho instrumento, utilizando el Criostato de Collins para producir helio líquido instalado en nuestro Departamento de Temperaturas Bajas para proporcionar un dedo frío lleno con Helio líquido, en lugar del Hidrógeno líquido habitual para nuestros experimentos. Sus extraordinarias habilidades experimentales y su virtuosismo al elaborar los filamentos puntiagudos eran inspiradores y dignos de admirar, siendo así como el autor aprendió cómo fabricar filamentos puntiagudos de tungsteno, los cuales jugarían un rol importante en microscopía electrónica de alta resolución. La Figura 24 muestra la imagen de una punta de tungsteno enfriada con un dedo frío lleno de Helio

CRÍO-MICROSCOPIA ELECTRÓNICA Y ULTRAMICROTOMÍA

líquido, adquirida mediante microscopía de iones de helio en campo, por el Profesor Erwin Müller en el IVNIC en 1957. Aunque estos experimentos eran preliminares, Müller abrió un nuevo mundo, descrito en sus artículos clásicos (67), y siempre atesoraremos los recuerdos de su estadía con nosotros en el IVNIC.

El Año Nuevo de 1958 fue inaugurado por uno de esos cambios de fase drásticos, conocidos como revoluciones, no poco comunes en América del Sur. Nosotros continuábamos con nuestro trabajo en el instituto, sin percatarnos de su magnitud. Poco antes del viaje que había planeado para asistir a una reunión de biofísica en Washington, fui llamado el 13 de enero de 1958 por mi buen amigo, el difunto Dr. P. A. Gutiérrez Alfaro, Ministro de Salud, a quien agradezco profundamente su apoyo al IVNIC, y me pidieron que aceptara el cargo de Ministro de Educación de manera temporal. Hasta el día de hoy, considero un privilegio haber servido en su lado, aunque mi mandato como Ministro de Educación iba a durar sólo 10 días. Sin embargo, durante ese tiempo experimenté lo equivalente a un curso de posgrado intensivo en comportamiento humano colectivo, tratando de hacerle frente a aspectos irracionales de la naturaleza humana. Por breve que fuese, este otro tipo de aprendizaje, tanto complejo como arduo, tomado a la edad de 34 años, dejó en mí una impresión duradera, y me confirió una dimensión añadida de comprensión y tolerancia para proyectos futuros.

El 14 de febrero de 1958, el autor entregó el IVNIC a un director y a una administración recientemente designados. En espíritu de objetiva cooperación fue legado el núcleo de un instituto de investigación en funcionamiento, ubicado en un sitio ideal de 2000 hectáreas, a sólo 12 km al suroeste de Caracas, constituyendo la base para una comunidad científica autónoma, con sus propias carreteras, fuentes de agua (diseñado para atender a 30.000 personas), planta de energía eléctrica y una subestación de 10.000 kW (137). Además, había suficientes fondos disponibles o firmemente comprometidos para garantizar la continuidad del proyecto. Más importante, el IVNIC, durante la fase inicial de menos de 4 años desde su fundación en 1954, había abierto nuevos caminos y fue la primera demostración exitosa en Venezuela de un instituto capaz de realizar investigación básica en forma organizada y a largo plazo. Científicamente y literalmente el IVNIC había puesto a Venezuela en "el mapa" del mundo científico internacional, habiendo generado investigación original en el campo de la investigación fundamental del cerebro y las neurociencias, como claramente se demostró durante el Simposio Internacional celebrado en 1957.

Desde entonces, el instituto se ha expandido y, bajo el nombre de IVIC (Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas), ha proporcionado durante los últimos 25 años una nueva generación de científicos venezolanos con todos los recursos necesarios para llevar a cabo investigación básica y entrenamiento. El IVIC ha jugado un papel importante en el desarrollo científico y cultural de Venezuela y de los países vecinos. Dos semanas después, a fines de Febrero de 1958, el autor y su familia partieron de Venezuela, habiendo sido cordialmente invitados por el Profesor Francis O. Schmitt a visitar Boston. Gracias a la amable hospitalidad y al apoyo incondicional recibido del Profesor Schmitt y del Dr. William H. Sweet, Fernández-Morán se unió al personal del Servicio de Neurocirugía del Hospital General de Massachusetts, donde organizó los

HUMBERTO FERNÁNDEZ-MORÁN

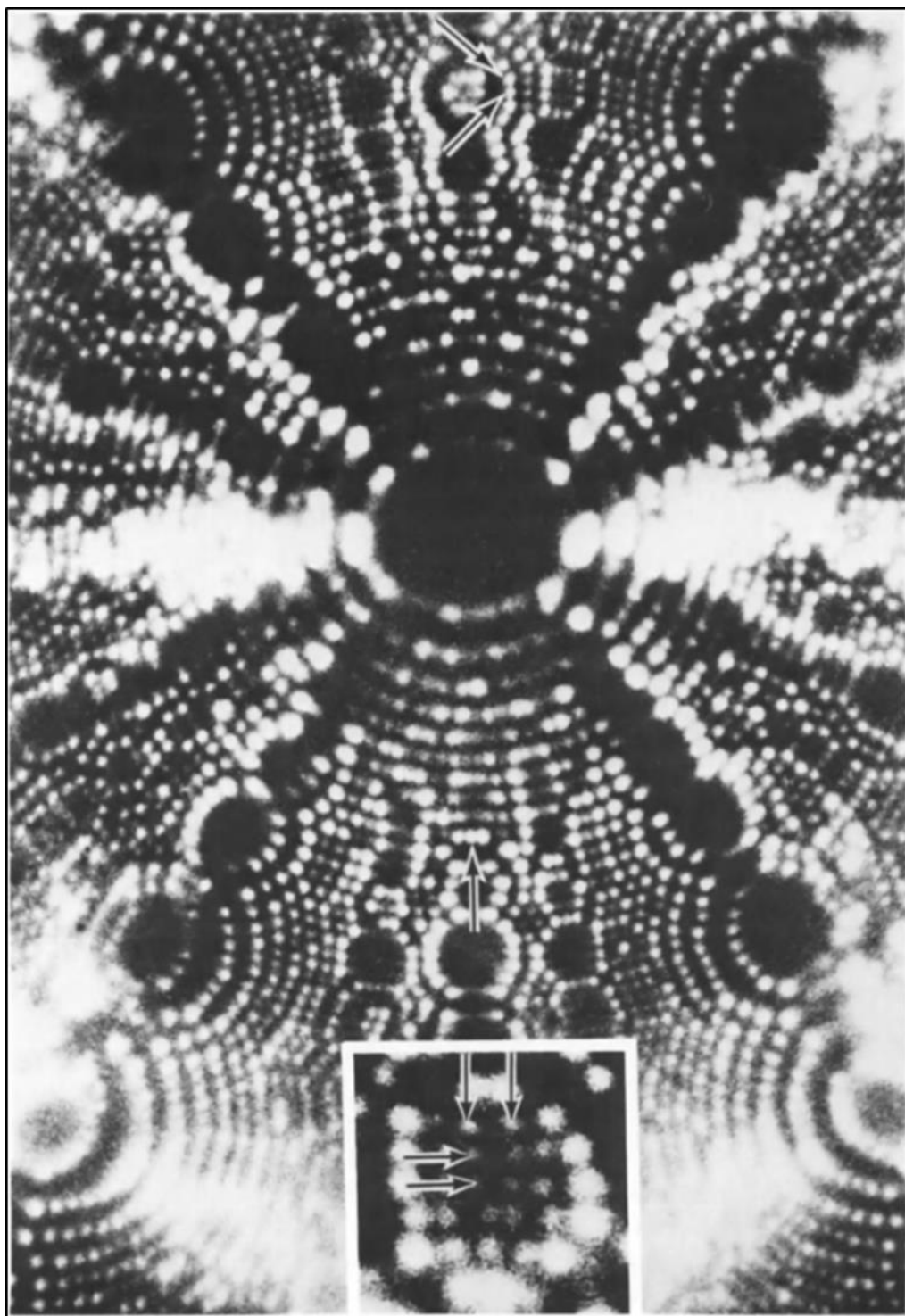


Fig. 24. Imagen de iones de Helio de una punta de tungsteno ($\sim 600 \text{ \AA}$ de radio) enfriada un dedo frío lleno con helio líquido ($\sim 10 \text{ K}$) adquirida con un microscopio de iones en campo (67) por el Profesor Erwin Müller en el IVNIC en 1957. La resolución en el plano (111) (recuadro) es de $2,74 \text{ \AA}$.

CRÍO-MICROSCOPIA ELECTRÓNICA Y ULTRAMICROTOMÍA

Laboratorios Mixter para Microscopía Electrónica. También estuvo asociado con el Departamento de Biología del Instituto de Tecnología de Massachusetts, donde continuó su trabajo en estrecha cooperación con el Profesor Schmitt, y también con el Profesor Samuel C. Collins (85,125) en el Laboratorio de Ingeniería Criogénica. El trabajo en microscopía electrónica de alta resolución y baja temperatura de sistemas biológicos descrito aquí se llevó a cabo en este entorno ideal a partir de 1958 y hasta 1962.

V. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BAJA TEMPERATURA Y ULTRAMICROTOMÍA

A. Organización Submicroscópica de las Fibras Nerviosas de Vertebrados

Las características generales de la ultraestructura de la envoltura de mielina (18) se pudieron deducir basándose en el análisis de luz polarizada y en patrones de difracción de rayos-X de amplio espaciamiento, dando los primeros cuatro órdenes de un espaciamiento fundamental de 171 Å en nervios de anfibios y de 184 Å en nervios de mamíferos, de acuerdo a lo registrado por Schmitt, Bear, y Clark (19) a partir de nervios completos y no dañados. Schmitt llegó a la siguiente concepción: "Esencialmente la envoltura consta de capas de proteínas lipídicas de aproximadamente 180 Å de espesor envueltas concéntricamente alrededor del axón" (20). Este parecía ser un sistema ideal para estudios correlacionados con el microscopio electrónico.

Gracias a la generosa hospitalidad otorgada por el profesor T. Caspersson, director del Instituto de Investigación Celular y Genética del Instituto Karolinska, el autor pudo aplicar el nuevo microscopio electrónico RCA EMU (34) y otras instalaciones para realizar estudios de alta resolución en fibras nerviosas. Comenzando en 1949, se llevaron a cabo una serie de estudios sistemáticos, generando los siguientes resultados publicados durante un período de 3 años (42-44,48).

Para evitar la extracción severa de lípidos y otros artefactos producidos usualmente en los métodos que requieren que el espécimen sea incluido en resina, se desarrolló una técnica que hace posible *preparar series de secciones ultrafinas congeladas de nervios frescos o de nervios fijados pero no incluidos* (42-46). En esta modificación del método de Newman, Borysko y Swerdlow (35), el enfriamiento con dióxido de carbono se utiliza al mismo tiempo para operar el mecanismo de avance por expansión térmica y para congelar el espécimen húmedo y no incluido. Combinado con métodos complementarios de seccionamiento ultrafino, se describieron las siguientes estructuras en la porción internodal de las fibras nerviosas de rata y de rana (43,44):

1. (a) En las secciones finas, tanto transversales como longitudinales, la envoltura de mielina exhibe una estructura fina en láminas concéntricas, en las que las capas individuales tienen un espesor de aproximadamente 80 Å. Laminillas unitarias de dimensiones similares se pueden aislar de la envoltura fragmentada. Basándose en estas observaciones, para la envoltura de mielina se asume una estructura general de láminas

HUMBERTO FERNÁNDEZ-MORÁN

concéntricas (Fig. 20), lo que está en buen acuerdo con los resultados de estudios con luz polarizada y con difracción de rayos-X. Sin embargo, el espesor promedio de 80 Å determinado para las capas individuales por microscopía electrónica correspondería a sólo la mitad del valor de 158 Å del espaciado deducido por rayos-X demostrado en nervios secos mielinizados de mamíferos (b) La envoltura está cubierta con una membrana granular compacta de ~ 200 Å de espesor, correspondiente a neurilema (N) con colágeno asociado y fibrillas suaves, dispuestas principalmente en manojos longitudinales.

2. El axón de secciones de fibras nerviosas frescas y bien preservadas contiene filamentos (100-200 Å de diámetro) de longitud indefinida, con discontinuidades axiales regularmente espaciadas y una disposición predominantemente longitudinal (44).

3. (a) En el funículo lateral de rata y en la médula espinal de rana se encontraron nuevos tipos de fibras nerviosas submicroscópicas (0,1-1 μm de diámetro). Las fibras más delgadas consisten de un solo filamento de 100 Å dentro de una membrana tubular, (b) Las fibras nerviosas sin mielina están constituidas por haces compactos de filamentos delgados de 100 a 200 Å revestidos con una sola membrana de ~ 100 Å.

4. Estos hallazgos indican que los elementos estructurales de todos los tipos de fibras nerviosas son fundamentalmente similares y apuntan a un patrón común de organización en fibras mielinizadas de todos los tamaños y en las llamadas fibras nerviosas no mielinizadas (44,47,49).

Técnicas similares para la preparación de cortes ultrafinos congelados mediante "crio-ultramicrotomía" se aplicaron con éxito en estudios de bacterias, espermatozoides (45), polen (46) y otras estructuras lábiles.

*B. Microscopía Electrónica de Alta Resolución y
Difracción de Electrones de Baja Dosis*

1. Microscopía Electrónica de Baja Temperatura con Iluminación por Microhaz

Un microscopio Siemens Elmiskop I operando a 40-100 kV, equipado con múltiples aperturas del lente objetivo (64), se modificó instalándole filamentos puntiagudos mejorados de tungsteno monocristalino orientado (Fig. 25) (68) (ver también Fig. 28) y fue usado con el sistema de doble condensador para proporcionar una intensa iluminación por un microhaz de alta coherencia. Con este arreglo se aumentó el contraste y se mejoró la resolución (8-10 Å) en secciones finas adecuadas o en preparaciones incluidas con tinción negativa (Fig. 26) (71,72). El daño de la muestra por irradiación puede ser reducido considerablemente mediante una combinación adecuada de una óptica de electrones de baja intensidad y el uso de dispositivos mejorados para el enfriamiento de muestras. Con los nuevos filamentos puntiagudos y el sistema de doble condensador equipado con aperturas de 50-10 μm también es posible obtener microhaces de 0,5-0,1 μm de diámetro y con una intensidad extremadamente baja.

CRÍO-MICROSCOPIA ELECTRÓNICA Y ULTRAMICROTOMÍA

Enfocando el haz en áreas adyacentes y luego desplazando el microhaz de baja intensidad (59,64,71) hacia la zona de interés se pudieron obtener micrografías útiles usando emulsiones de alta velocidad [es decir, Tri-X sensibilizado con soluciones de tiocianato de oro] a partir de componentes extremadamente lábiles (Fig. 27). Se usó una etapa de nitrógeno líquido Leisegang para enfriar el portamuestras térmicamente aislado ($\sim 130^{\circ}\text{C}$), el cual tenía un dispositivo de apantallamiento para evitar la contaminación del espécimen (Fig. 26) (76). Varias de estas técnicas fueron utilizadas en el estudio de complejos multienzimáticos [por ejemplo, el complejo piruvato deshidrogenasa, estudiado en colaboración con el Dr. L. Reed *et al.* (77)]. La iluminación con el microhaz de baja dosis también fue esencial en el estudio de las membranas mitocondriales en colaboración con el Dr. David Green *et al.* (78).

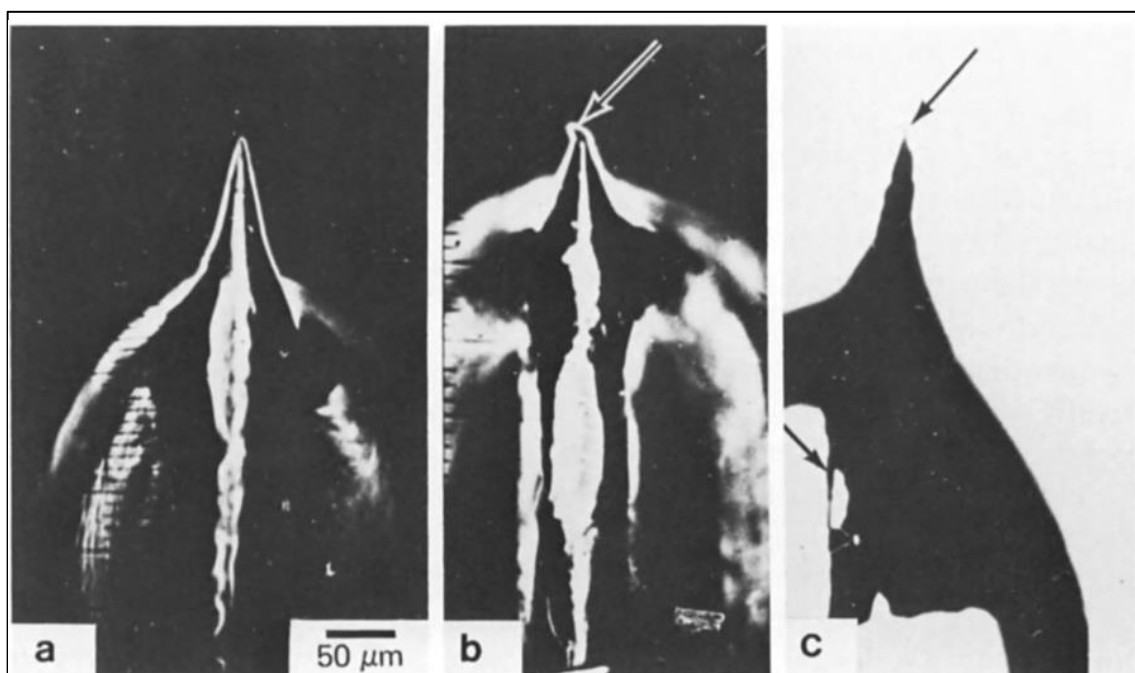


Fig. 25. Filamentos puntiagudos con puntas monocristalinas de tungsteno orientadas y atacadas químicamente que muestran la preservación del perfil crítico del cátodo: (a) punta recocida antes de su uso, (b) filamento después de 40 horas, y (c) después de 100 horas de operación en el Siemens Elmiskop I a 40-100 kV. [H. Fernández-Morán, 1960 (68).]

2. Difracción de Electrones a Baja Temperatura y a Baja Dosis

Las técnicas descritas demostraron ser particularmente útiles para estudios de difracción de electrones de cristales orgánicos. Patrones de difracción de electrones útiles, con una red recíproca bidimensional completa fueron obtenidos con una resolución límite de $1,8 \text{ \AA}$ (71).

HUMBERTO FERNÁNDEZ-MORÁN

VI. CRÍO-MICROSCOPIA ELECTRÓNICA

A. Estudio de Sistemas Biológicos a Temperaturas de Helio Líquido

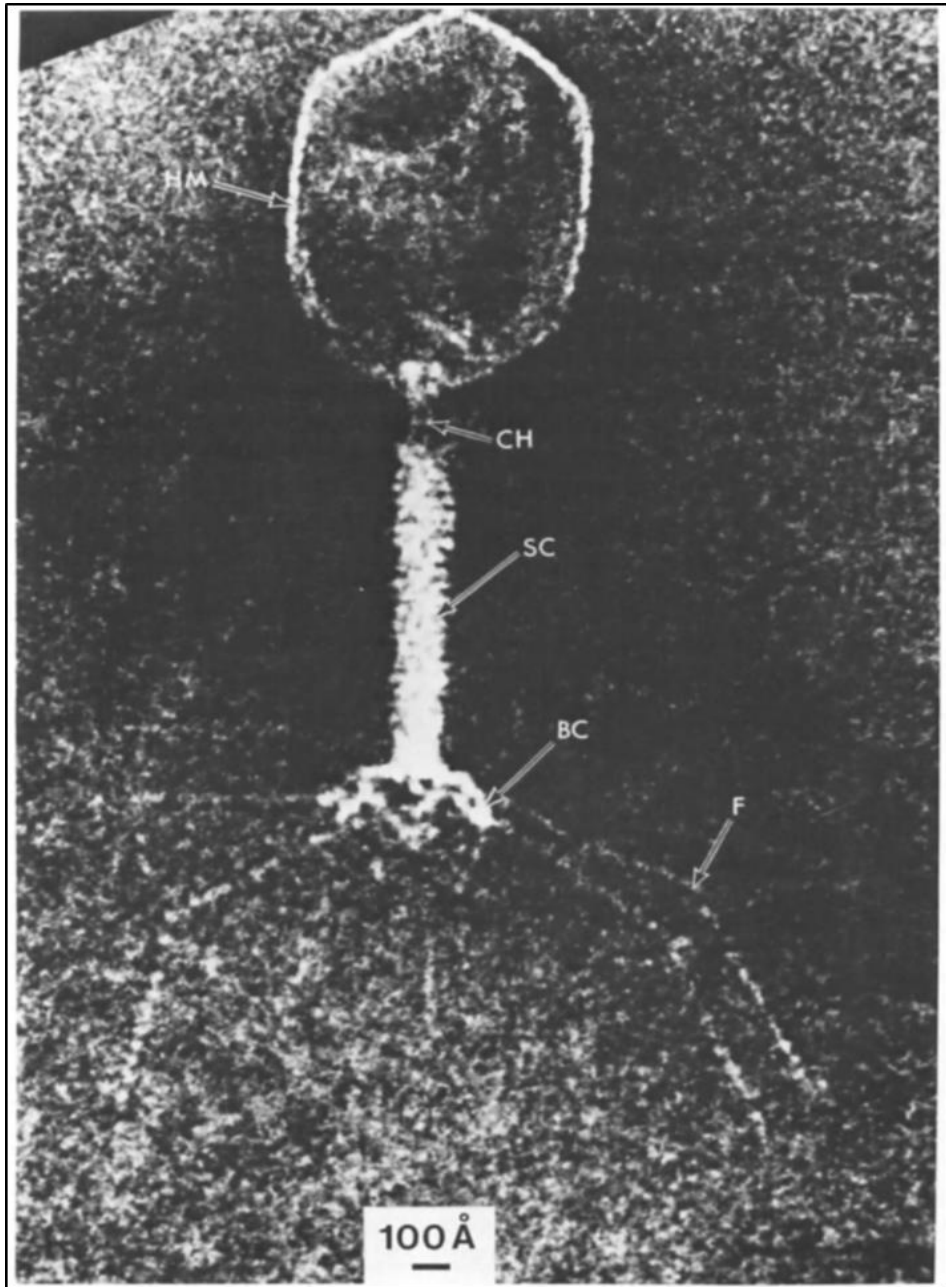


Fig. 26. Virus bacteriano, un bacteriófago T2, que muestra una organización compleja de los componentes de la cabeza (HM) y fibra de la cola (F), tal como se revela en esta preparación teñida negativamente y estudiada por microscopía electrónica de baja dosis con iluminación de microhaz utilizando un filamento puntiagudo (76). CH, Cuello; SC, envoltura; BC, placa base.

CRÍO-MICROSCOPIA ELECTRÓNICA Y ULTRAMICROTOMÍA

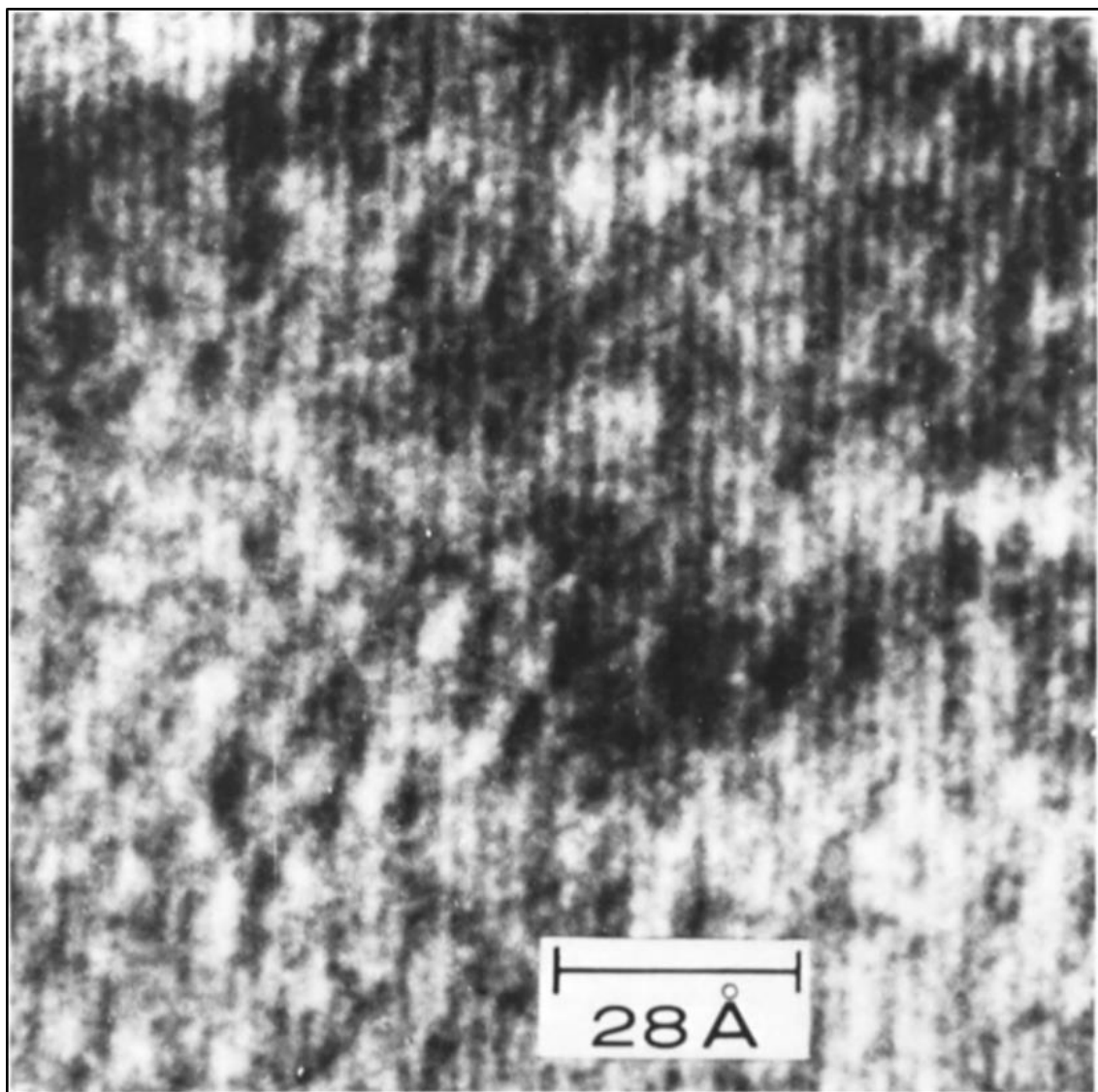


Fig. 27. Micrografía electrónica de alta resolución de un cristal delgado de NaCl que muestra el espaciado de red de los planos (200). El espaciado resuelto es 2,815 Å mediante el método de iluminación directa (axial) de dosis baja utilizando filamentos puntiagudos especiales de Tántalo del tipo Fernández-Morán (68,71).

Las técnicas de preparación de muestras a bajas temperaturas proporcionan uno de los enfoques más prometedores en microscopía electrónica de especímenes biológicos ya que la congelación rápida suspende toda actividad fisiológica, inmovilizando y preservando constituyentes tisulares lábiles. El Helio líquido II, su forma de baja temperatura, parece representar un refrigerante ideal para la congelación rápida o ultrarrápida de sistemas biológicos bajo ciertas condiciones porque exhibe las singulares

HUMBERTO FERNÁNDEZ-MORÁN

propiedades de superconductividad de calor y superfluidez a temperaturas 100 °C inferiores a las obtenidas con el refrigerante estándar de mezclas de nitrógeno líquido

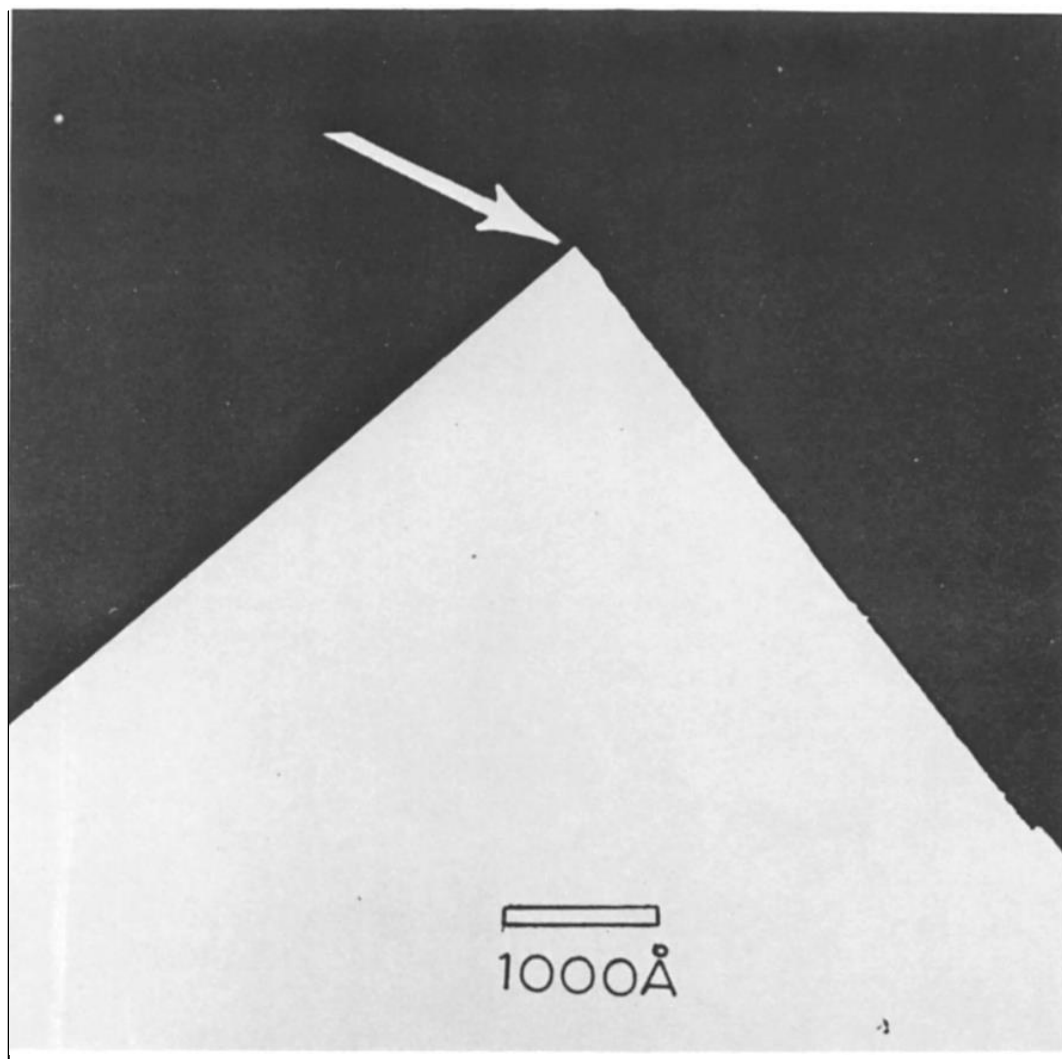


Fig. 28. Cátodo monocristalino de punta de diamante desarrollado por Fernández-Morán (93,102, 113) con un radio de punta de aproximadamente 100-500 Å, después de haber sido recubierto con tungsteno, renio o circonio. Estos cátodos puntuales prácticamente "permanentes" se pueden "recubrir" periódicamente para proporcionar una iluminación de microhaz coherente y estable en condiciones óptimas (93,113).

(85). El isótopo estable más abundante ($^4\text{He}_2$) de este gas noble se condensa a 4,2 K en un líquido incoloro de baja densidad, Helio líquido I, que hierve y se evapora rápidamente debido a su extremadamente pequeño calor de vaporización. A temperaturas inferiores a 2,19 K, temperatura denominada punto lambda, sufre una transformación de

CRÍO-MICROSCOPIA ELECTRÓNICA Y ULTRAMICROTOMÍA

segundo orden, y la fase líquida de baja temperatura, designada como Helio líquido II, exhibe las propiedades únicas de la superconductividad térmica, superfluidez, formación de una película delgada y otros fenómenos físicos con extrañas propiedades.

La naturaleza espectacular de esta transformación se puede ver cada vez que se prepara Helio líquido II. Cuando el Helio líquido I, contenido en un Dewar apantallado, se evapora a presión reducida, hierve violentamente. Cuando la temperatura cae por debajo del punto lambda, el burbujeo cesa repentinamente y una columna límpida y tranquila de Helio líquido II llena el recipiente interior del Dewar (Fig. 29). Este líquido conducirá el calor unas 10.000 veces mejor que el cobre. Además, el Helio líquido II fluye tan rápidamente a través de los más finos canales capilares que parece tener una viscosidad casi nula.

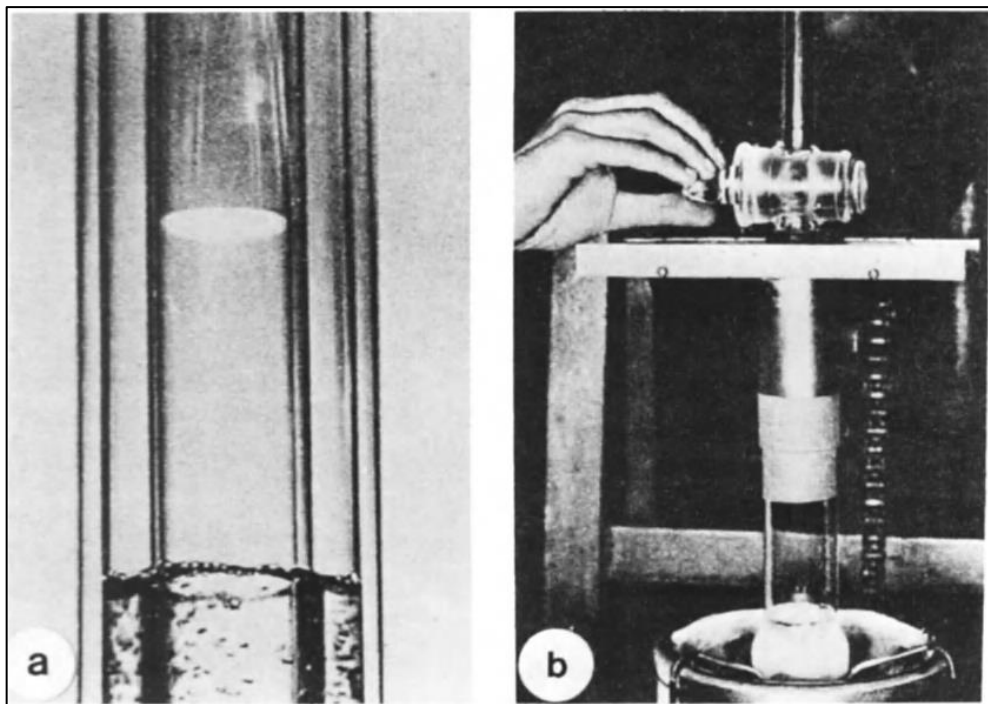


Fig. 29. (a) Helio líquido II en un Dewar apantallado a 1 K que muestra la característica apariencia tranquila del helio superfluido que llena el vaso interno del Dewar, (b) Etapa del espécimen para la introducción de muestras biológicas diminutas en helio líquido II. [H. Fernández-Morán, 1960 (65,85).]

Gracias a la generosa hospitalidad y orientación brindada por el Profesor Samuel C. Collins y sus asociados en el Laboratorio de Ingeniería Criogénica del Instituto Tecnológico de Massachusetts, el autor pudo desarrollar técnicas especiales de preparación y familiarizarse con los procedimientos experimentales de la criogenia. También se llevaron a cabo estudios preliminares del proceso de inmersión de microgotas de componentes celulares mediante fotografía de alta velocidad en colaboración con el profesor Harold E. Edgerton del Departamento de Ingeniería

HUMBERTO FERNÁNDEZ-MORÁN

Eléctrica (Fig. 30), los cuales indicaron que se lograron velocidades de enfriamiento muy rápidas. Durante un período de 4 años (1958-1962), fueron ideadas y aplicadas técnicas de preparación mejoradas de baja temperatura para microscopía electrónica de tejidos biológicos que dan una mejor preservación morfológica e histoquímica de mielina (Fig. 19), sistemas laminares y otros componentes celulares. Estas técnicas de "crío-fijación" (71,72,76,85,86) se basan en la congelación rápida de tejidos frescos o glicerizados con Helio líquido II a 1-2° por encima del cero absoluto, seguida de sustitución por congelación e inclusión en plásticos en condiciones que minimizan la formación de cristales de hielo, gradientes osmóticos artificiales y artefactos de extracción. Desde entonces ha sido bien establecida la supervivencia de organismos vivos, incluidos bacterias, espermatozoides, células sensitivas y tejidos, que primero se tratan de forma protectora con glicerol y luego se congelan con nitrógeno líquido o helio líquido. Mediante el enfriamiento ultrarrápido con Helio líquido II puede ser posible preservar la organización celular nativa, los transitorios intermedios con espines electrónicos desapareados que participan en transferencia electrónica metabólica y otros radicales libres.

B. Desarrollo de Crío-Microscopios Electrónicos con Lentes Superconductores

Siguiendo nuestro trabajo acerca de técnicas de preparación de muestras a temperaturas de Helio líquido (65,85), los importantes desarrollos obtenidos en la producción de electroimanes superconductores para generar altos campos magnéticos con solenoides de aleaciones de Niobio-Estaño o de Nionio-Zirconio (92,100) nos sugirieron el diseño de nuevos tipos de microscopios electrónicos. Estos "crío-microscopios electrónicos" (Fig. 31) (86,88,89) que funcionan a temperaturas de Helio líquido incorporarían las siguientes ventajas significativas: (1) lentes superconductores de alto campo con una estabilidad temporal sin precedentes cuando se operan en el modo de "corriente persistente"; (2) operación a temperaturas de Helio líquido, lo que resulta en las decisivas características del vacío ultra alto criogénico, minimización de la contaminación de muestras, reducción del daño de muestras por radiación y por ruido térmico; (3) condiciones óptimas para microscopía electrónica tanto de bajo voltaje como de alto voltaje; (4) visualización de imágenes con alta eficiencia, intensificadores de imágenes electrónicos y dispositivos de registro harían posible el uso de cinematografía de alta velocidad y registro estroboscópico (obtenidos, por ejemplo, a través de emisión pulsada T-F usando filamentos puntiagudos) para la obtención de alta resolución temporal, combinada con alta resolución espacial (88). Los experimentos preliminares llevados a cabo con los primeros crío-microscopios electrónicos utilizando lentes de alto campo con bobinas superconductoras de Neobio-Zirconio mostraron una excepcional estabilidad temporal de las imágenes cuando se opera en el modo de corriente persistente a 32,2 kG (88,89,91).

CRÍO-MICROSCOPIA ELECTRÓNICA Y ULTRAMICROTOMÍA

Las primeras micrografías electrónicas de especímenes biológicos fueron registradas por Fernández-Morán a temperaturas de Helio líquido (4,2 K) con un lente objetivo superconductor especialmente diseñado (89,91,93). Este tipo de lente superconductor, que se puede adaptar para reemplazar el lente objetivo en microscopios de alta resolución modificados (89,91,99,100), incluye bobinas de Niobio-Zirconio equipadas con un circuito ferromagnético frío, utilizadas sin o preferiblemente con piezas

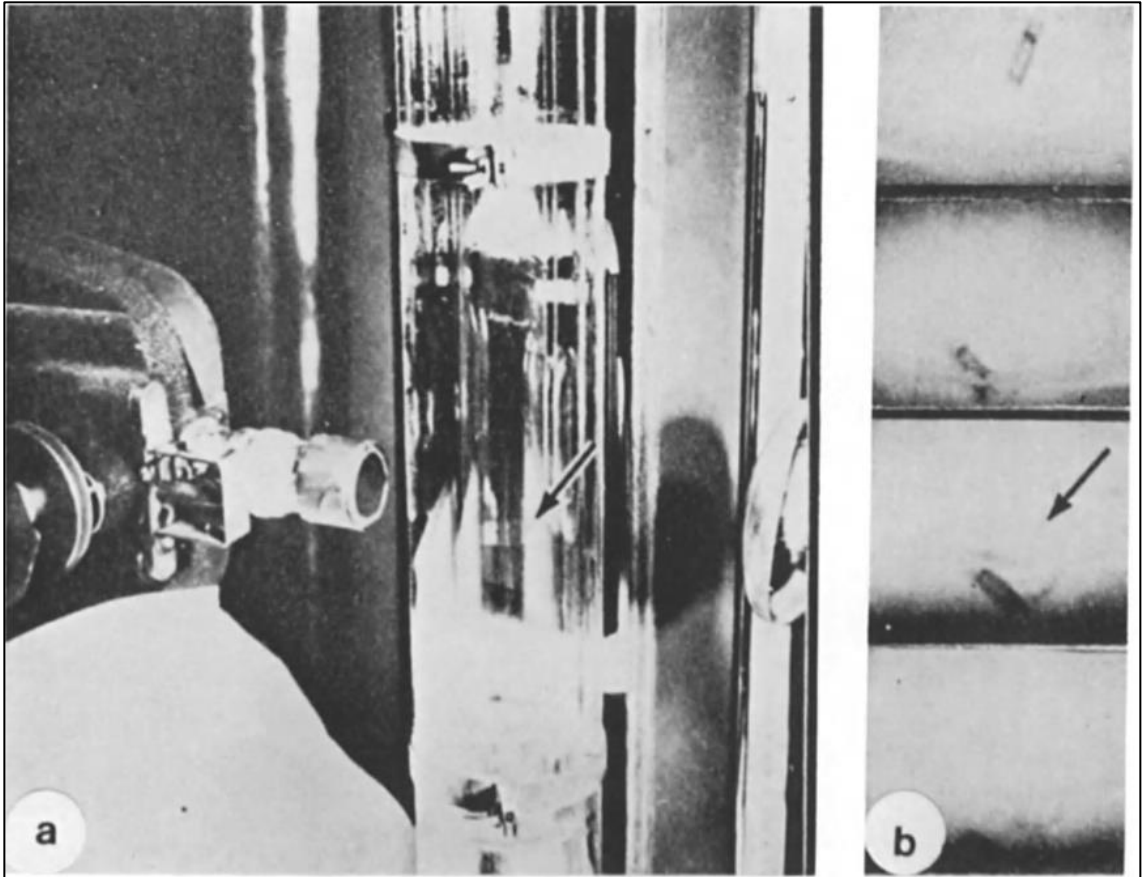


Fig. 30. (a) Helio líquido II (flecha) en Dewar apantallado con dispositivos fotográficos incorporados. La característica apariencia tranquila se debe a la extremadamente alta conductividad calórica del Helio líquido II: no se puede producir una diferencia de temperatura entre el tope y el fondo de la columna líquida lo suficientemente alta como para permitir la formación de burbujas de vapor. (b) Serie de fotografías de alta velocidad que muestran la inmersión de una muestra diminuta en Helio líquido II sin producir ebullición (65,85). (Cortesía del Profesor Harold E. Edgerton, Departamento de Ingeniería Eléctrica, MIT, 1959-1960.)

polares, e incluyendo una etapa criogénica de excepcional estabilidad para la muestra. Todo el conjunto del lente está sumergido en Helio líquido y está totalmente aislado de las partes más cálidas del microscopio por varios dispositivos criogénicos concéntricos. El lente completo con su circuito de control superconductor estaba contenido en un

HUMBERTO FERNÁNDEZ-MORÁN

Dewar plano (89,91,100) que sirvió como prototipo para subsiguientes trabajos con lentes superconductoras (ver Fig. 32). Una característica importante de la circuitería de regulación superconductora, incluidos los estigmatadores y las bobinas de corrección, es que permite ajustes extremadamente finos de la intensidad del campo (unas pocas partes en 10^7 - 10^9) sin dejar de usar el modo de corriente persistente. Esto es esencial para lograr "enfoques superfinos" reproducibles, que es mucho mejor que los sistemas convencionales de regulación de corriente en los lentes (89,91,102,113,128). La alta estabilidad eléctrica y mecánica permitió largos tiempos de exposición con iluminación

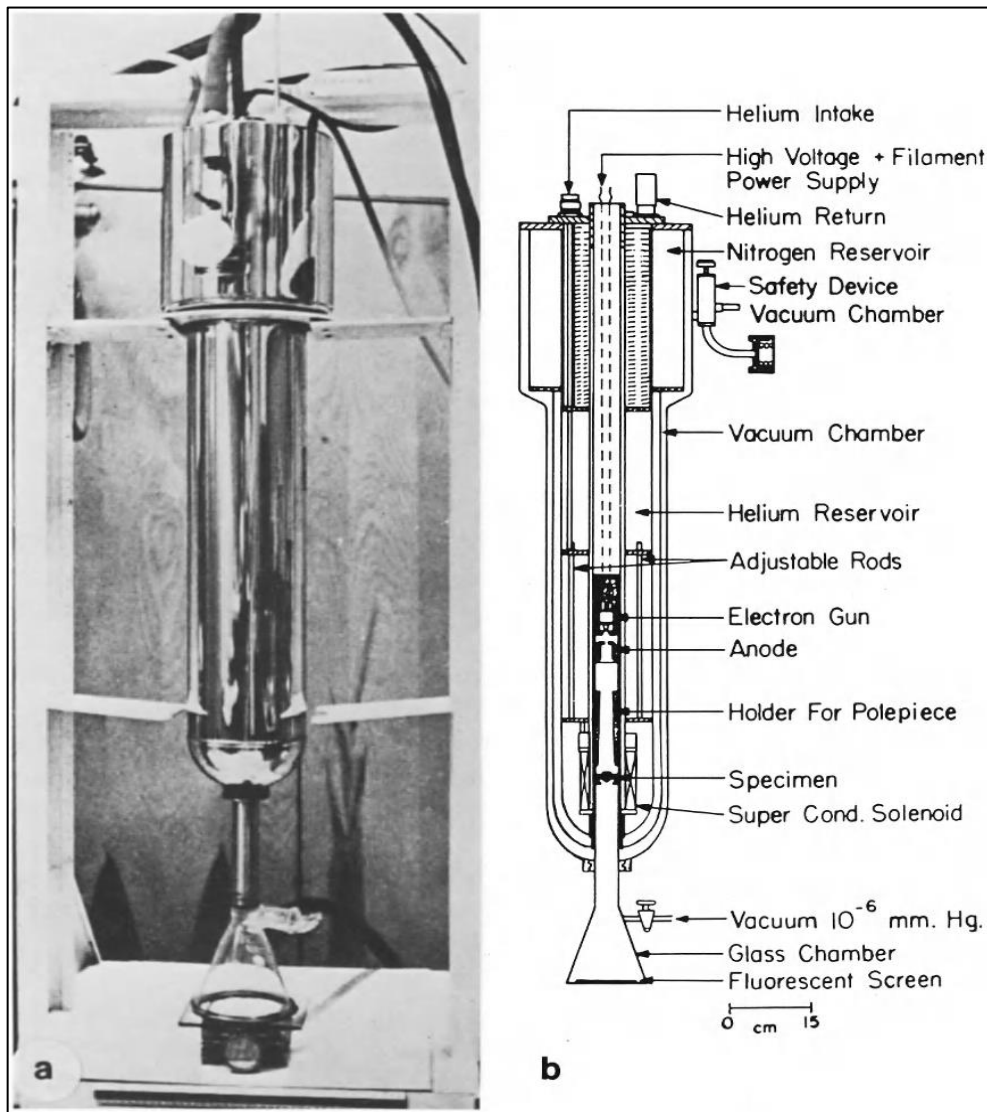


Fig. 31. (a) Fotografía y (b) diagrama del equipo básico para microscopía electrónica con lente superconductor de alto campo, el cual comprende un Dewar de helio líquido con núcleo de aire con un superconductor solenoide (operando a 32,200 G en el modo de corriente persistente), y el microscopio electrónico experimental insertado. [H. Fernández-Morán, 1965 (88).]

CRÍO-MICROSCOPIA ELECTRÓNICA Y ULTRAMICROTOMÍA

de microhaz de baja intensidad, lo que reduce el daño por radiación con resoluciones reproducibles de 8 nm en cristales de catalasa y 1-2 nm en asbesto (ver Figura 33) (89,91,93,98,102,113,131).

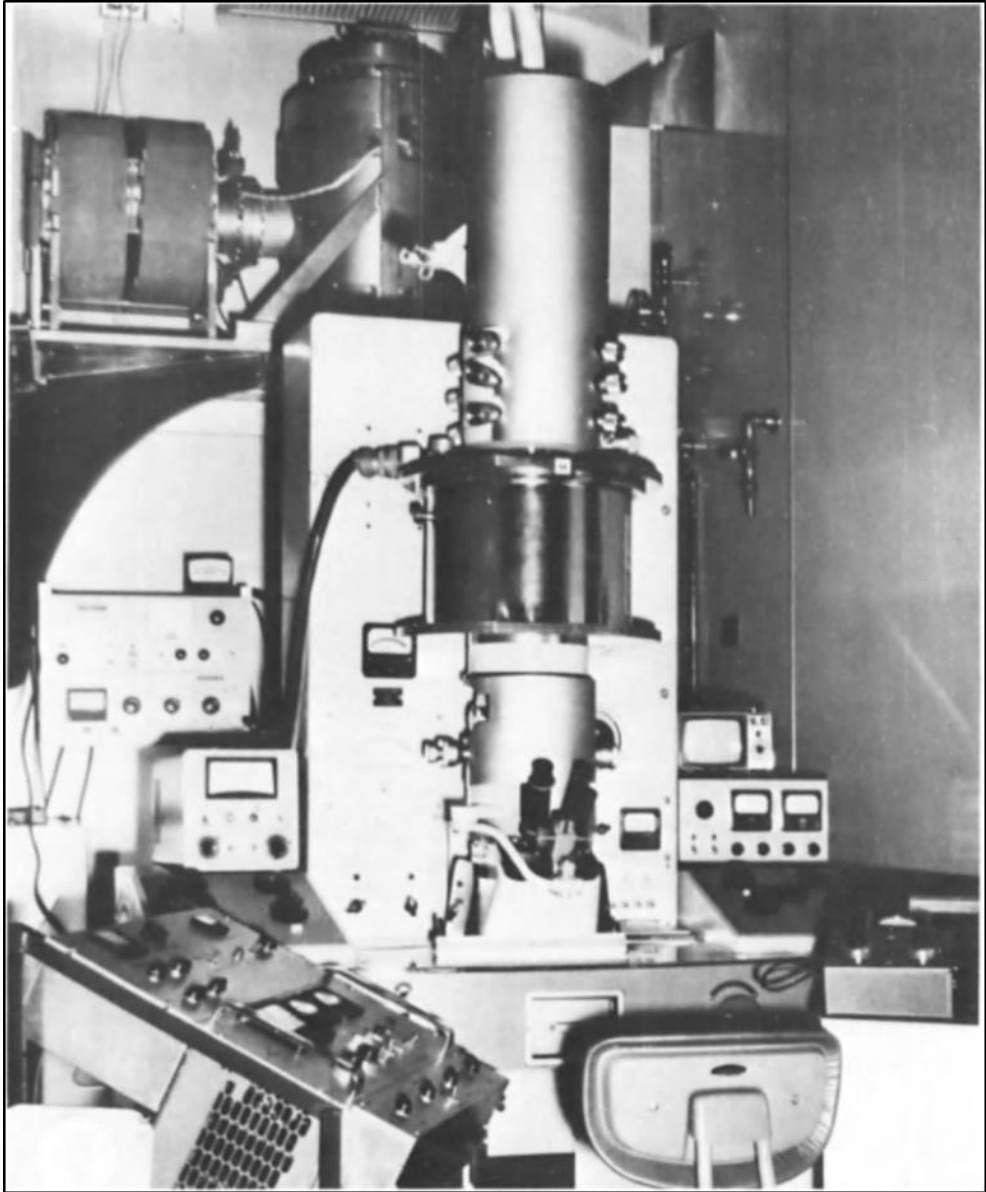


Fig. 32. Crío-microscopio electrónico experimental de alta resolución con un arreglo especial de lente objetivo superconductor en un criostato plano, fuente de alimentación con interruptores de corriente persistente y dispositivos de control de corriente mejorados, sistema vacío ultra alto con bomba iónica, blindaje magnético, intensificador de imagen y base para el aislamiento de vibraciones. [H. Fernández-Morán, 1966-1970 (89,91,92,98,100).]

HUMBERTO FERNÁNDEZ-MORÁN

Durante las últimas dos décadas los esfuerzos sistemáticos de varios grupos de investigación internacionales que trabajan de forma independiente han contribuido al desarrollo de la crío-microscopía electrónica (87,90,94-97,103,104,107-117). El desarrollo y aplicación por Dietrich y colaboradores del lente apantallante durante los últimos 16 años merece una mención especial por su destacado rendimiento (131-133).

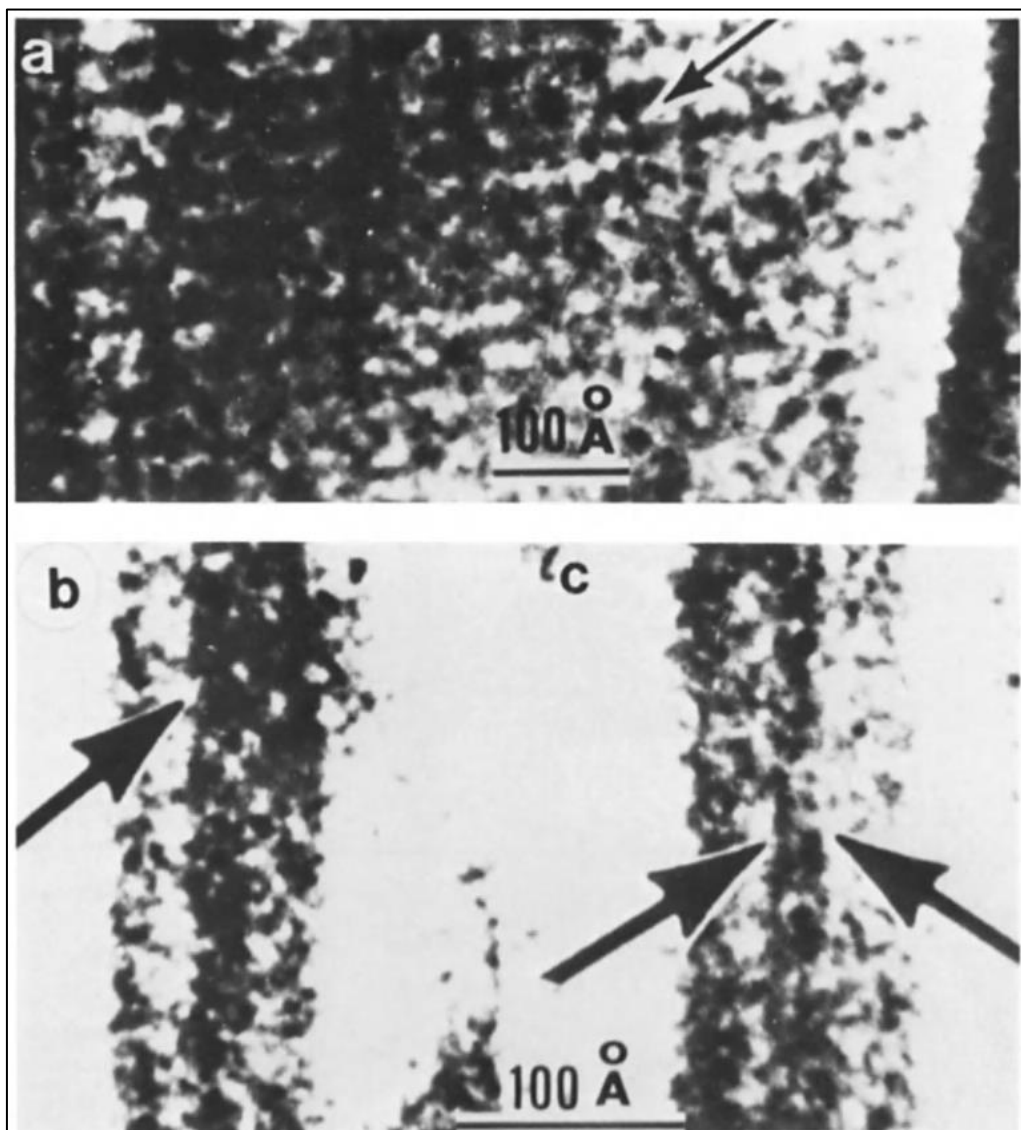


Fig. 33. Primeras "crío-micrografías electrónicas" de alta resolución de muestras biológicas: a) cristales de catalasa, y (b y c) muestras de asbesto registradas a temperatura de Helio líquido (4,2 K) con un crío- microscopio electrónico utilizando un lente objetivo superconductor en el modo de corriente persistente y con iluminación de microhaz de baja dosis. [H. Fernández-Morán, 1966-1967 (89,91,93).]

CRÍO-MICROSCOPIA ELECTRÓNICA Y ULTRAMICROTOMÍA

C. Refrigerador de Ciclo Cerrado de Collins de Helio Superfluido

Las condiciones operativas del sistema criogénico deben optimizarse para obtener un rendimiento reproducible a un costo razonable. Así, para poder reducir las vibraciones introducidas por la ebullición del Helio a 4,2 K pronto encontramos necesario usar Helio superfluido a 1,8 K (98,99,102,113). Las propiedades únicas de flujo no viscoso del Helio superfluido y su conductividad térmica singularmente alta producen claras ventajas para el funcionamiento del lente superconductor, mejora del rendimiento de la etapa del espécimen a una temperatura más baja (1,8 K), y reducción considerable de vibraciones en el criostato.

El Profesor Samuel C. Collins y sus asociados (98,102,113) han fabricado grandes cantidades de Helio superfluido, disponibles gracias a un especial refrigerador de Helio II de ciclo cerrado con un novedoso intercambiador de calor desarrollado y probado por ellos. Con la ayuda del Profesor Collins y M. Streeter, el refrigerador de gran escala de circuito cerrado de Helio superfluido (Fig. 34) fue instalado en nuestro laboratorio y completamente integrado con el crío-microscopio electrónico modificado de 200 kV. Después de eliminar unas superfugas, la unidad ubicada centralmente con sus largas líneas de transferencia demostró por primera vez la viabilidad del suministro rutinario de Helio superfluido a 1,8-1,9 K con una capacidad de refrigeración de 20 W a una tasa de producción de 5-8 litros/hora. Gracias al extraordinario apoyo a largo plazo del Dr. Orr Reynolds y el Dr. George Jacobs de la División de Ciencias de la Vida de la NASA todo este proyecto fue financiado y llevado a cabo durante el período crítico de 10 años de 1964-1974.

Con el pre-enfriamiento con nitrógeno líquido, la tasa de licuefacción se aproxima a 216 litros de Helio II por día. Durante varios años de funcionamiento impecable se realizaron más de 190 experimentos exitosos, lo que permitió el examen prolongado, libre de vibraciones, de diferentes tipos de especímenes orgánicos y biológicos bajo condiciones que reducían significativamente el daño por radiación y ruido térmico (98,102,113,128). El refrigerador de ciclo cerrado puede funcionar continua o intermitentemente, ya que se observó una permanencia prolongada de las temperaturas de Helio líquido en la etapa criogénica del microscopio conectada con el sistema de Helio superfluido por períodos de hasta 29 min después de haber apagado todo el equipo de refrigeración. De hecho, la capacidad de este refrigerador es tan alta que Dewars muy grandes, con superaislamiento, podrían llenarse con varios cientos de litros de Helio II, lo cual sería adecuado para alimentar de una vez crío-microscopios electrónicos individuales durante semanas. Este modo de operación, que aún conservaría las ventajas distintivas de un sistema de ciclo cerrado, puede considerarse para una instalación que contenga varios instrumentos. Se han obtenido consistentemente resoluciones de 0,8-1,6 nm, principalmente a 1,8 K, en el estudio de muestras biológicas, incluidas células sobreenfriadas en hielo vítreo dentro de "cámaras húmedas" especiales o dentro de "celdas de crío-inclusión" al vacío provistas de ventanas delgadas de grafito monocristalino (68,102,113). También se han examinado

nuevas clases de complejos de intercalación en capas de dicalcogenuros de metales de transición con propiedades 48

HUMBERTO FERNÁNDEZ-MORÁN

superconductoras únicas, mediante estudios correlacionados de crío-microscopía electrónica y difracción (102,113).

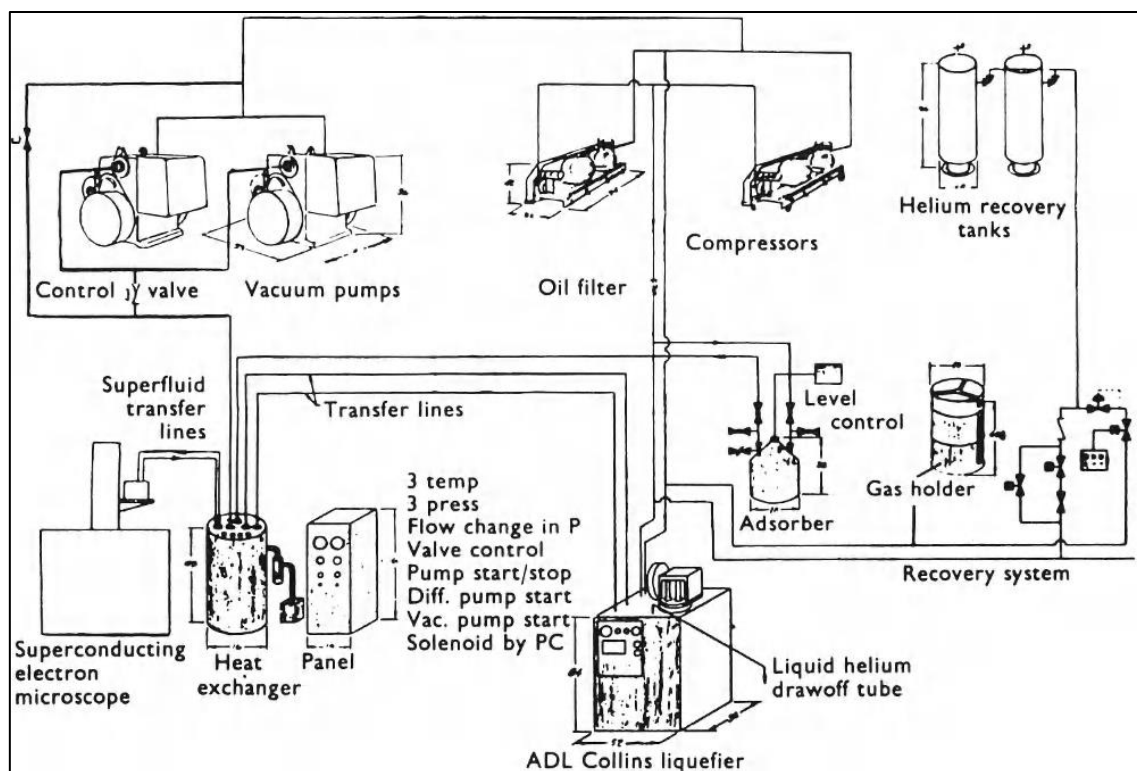


Fig. 34. Diagrama esquemático del sistema refrigerador especial de Helio superfluido de circuito cerrado de Collins (capacidad de 20-W) que alimenta a través de largas líneas de transferencia un crío-microscopio electrónico con un flujo continuo de He II (1,85 K) a una tasa de 8 litros/hora [H. Fernández-Morán, 1969-1978 (98,99,102,103).]

D. El Crío-Microscopio con Lentes Superconductores en Munich

Durante la década pasada se han hecho grandes avances en imágenes de alta resolución. de especímenes orgánicos y biológicos con una reducción considerable del daño por radiación utilizando un crío-microscopio electrónico con lentes superconductores desarrollados y aplicados por Dietrich, Weyl, Knappek y colaboradores en los Laboratorios de Investigación de Siemens AG en Munich (94,97,103,104,108-117) en colaboración con Dubochet y Knappek (114,116). Los aspectos más destacados de este trabajo ejemplar se resumen aquí para ilustrar el gran potencial de este campo.

El crío-microscopio de Munich es un microscopio electrónico de haz fijo de 220 kV equipado con un sistema de lentes superconductores, que incluye un lente objetivo

CRÍO-MICROSCOPIA ELECTRÓNICA Y ULTRAMICROTOMÍA

del tipo apantallado desarrollado por Dietrich et al (94,101,108), contenido en un criostato enfriado por Helio líquido a 4 K. Este instrumento tiene una estabilidad mecánica y eléctrica excepcional, así como una ausencia de contaminación, dando una resolución puntual de 0,15 nm, un valor que se aproxima al poder de resolución teórico del sistema de óptica de electrones. Esta resolución es mejor que la de los lentes convencionales y permite obtener imágenes de campo claro de átomos pesados individuales en un compuesto organometálico (112). Dado que la muestra se enfría efectivamente a 4 K, se ha observado una reducción considerable del daño por radiación en una amplia variedad de especímenes. Aunque la ganancia en protección a la radiación (119,120) todavía está en discusión, la evidencia disponible es consistente con la suposición de que enfriar el espécimen a 4 K reduce el daño del haz en especímenes orgánicos en más de un orden de magnitud, siempre que la muestra no sea calentada por el haz de electrones (116,129,130,132,133).

E. Determinación de la Estructura de un Complejo Orgánico con un Microscopio Electrónico Superconductor

Recientemente, Dietrich, Formanek, von Gentzkow y Knappek (130) han demostrado que la estructura estérica de un complejo de cobre orgánico sensible a la radiación se puede determinar con un microscopio electrónico superconductor cuando la muestra, que consta de cristales muy pequeños, se mantiene a una temperatura de 4 K, por lo que el daño por radiación se reduce drásticamente. Debido a esta efectiva crío-protección y al rendimiento excepcional de los microscopios electrónicos superconductores (resolución punto a punto de 0,15 nm, y deriva del espécimen por debajo de 0,03 nm/min), se pueden adquirir imágenes directas de alta resolución en el que son visibles las líneas reticulares de 1,1 y 0,9 nm. Se demostró un modelo estructural derivado del patrón de difracción de electrones de un monocristal, de las imágenes directas y de los resultados de experimentos químicos. La N,N'-Bis-saliciloil-hidracina (BSH) es uno de los mejores desactivadores del Cobre, y dado que estos quelatos orgánicos desactivan el metal, lo que reduce drásticamente la vida útil de los cables de baja tensión, era esencial investigar la estructura estérica del BSH - complejo de Cobre. Un análisis estructural completo de los microcristales obtenidos de este complejo no es posible con métodos de rayos-X. En principio, el microscopio electrónico es una herramienta muy eficiente para este propósito, siempre que el daño por radiación pueda reducirse drásticamente. La importancia de este trabajo para la determinación de la estructura de complejos biológicos, que sólo pueden obtenerse como microcristales no aptos para análisis de rayos-X, es evidente, ya que abriría todo un nuevo campo de análisis de ultraestructuras biológicas, que proporcionarían nuevos datos de considerable importancia en biología molecular y disciplinas afines (133,136).

HUMBERTO FERNÁNDEZ-MORÁN

VII. REFLEXIONES Y PERSPECTIVAS

Habiendo cubierto un campo tan amplio en estas reminiscencias, puede ser oportuno ofrecer algunas reflexiones que podrían esbozar tendencias futuras. Algunos enfoques específicos que parecen prometedores, particularmente en biología y medicina (128), incluirían los siguientes desarrollos:

1. Instrumentación mejorada en crío-microscopía, abarcando todos tipos de microscopía y haciendo pleno uso de los avances óptica de electrones con superconductores, electrónica, criogenia y química de la radiación (133,135), con especial énfasis en la integración sinérgica con tecnología informática avanzada para el procesamiento de datos, ayudar a la interpretación e inferir y evaluar modelos conceptuales (133-136).

2. Desarrollo sistemático de la siguiente generación de crío-microscopios electrónicos superconductores de alto voltaje, siguiendo la combinación propuesta de un sistema de lentes superconductores con un acelerador lineal superconductor compacto, que proporcionaría condiciones criogénicas óptimas al enfriarse con Helio II (98,106).

3. Perfeccionamiento y aplicación del crío-ultramicrotomo con cuchilla de diamante, diseñado para operar a temperaturas de Helio líquido (102,133) (Fig. 35) y usado principalmente para preparar secciones ultrafinas de material biológico congelado rápidamente, pero incluyendo también secciones más gruesas para histoquímica (144).

4. Aplicación de cuchillas de diamante mejoradas (Fig. 36), que son elaboradas por nuevas técnicas de microirradiación de precisión que resultan en glaseado y recocido para mejorar el rendimiento en crío-microtomía.

Uno podría agregar muchos otros enfoques interesantes, pero tendría que admitir que todas estas sugerencias se refieren a mejoras en técnicas y metodología que quedarían como estériles contribuciones si no se aplican, en estudios correlacionados, a la solución de problemas importantes en las ciencias de la vida.

Sin embargo, con mucho, la lección más importante que se deriva de la experiencia pasada es que la microscopía electrónica, por interesantes y novedosas que sean sus revelaciones, es solo una herramienta, una que amplía enormemente la visualización del hombre pero permanece restringida a la morfología hasta que se vincule a la función y se correlacione con sistemas vivos. La microscopía electrónica siempre ha demostrado ser más fructífera cuando se ha llevado a cabo en un ambiente de esfuerzo académico, uniendo las habilidades y la experiencia de expertos en fisiología, bioquímica, microscopía de luz polarizada, difracción de rayos-X y muchas otras disciplinas, todos dedicados, en un ambiente intelectual estimulante, a la investigación de un problema específico.

Por lo tanto, ahora existe una necesidad urgente de establecer centros internacionales donde la microscopía electrónica en su sentido más amplio y científicos de diferentes países, cada uno experto en una disciplina importante, puedan trabajar juntos y "pensar" juntos, manteniendo continuamente una interacción intelectual intensa pero espontánea y durante un período de tiempo prolongado (126).

CRÍO-MICROSCOPIA ELECTRÓNICA Y ULTRAMICROTOMÍA

En tal ambiente, la microscopía electrónica, correlacionada con estudios bioquímicos, con difracción de rayos-X, y con otras disciplinas, puede contribuir más eficazmente a la biología molecular y a la genética molecular, a la biotecnología y a la presente revolución en biología aplicada. También proporcionará una vital función de entrenamiento mediante la atracción de imaginativos y creativos científicos, ingenieros y tecnólogos jóvenes. Evocando gratos recuerdos de un aniversario único, todavía puedo afirmar “Así, en un sentido más profundo nos damos cuenta de que la microscopía electrónica representa la última extensión directa del ojo y la mano. Por este medio al hombre se le garantizan extrañas nuevas libertades y capacidades para 'ver y hacer' en aquellos dominios microcósmicos fundamentales de la vida que aún están más allá del alcance de la mente” (93).

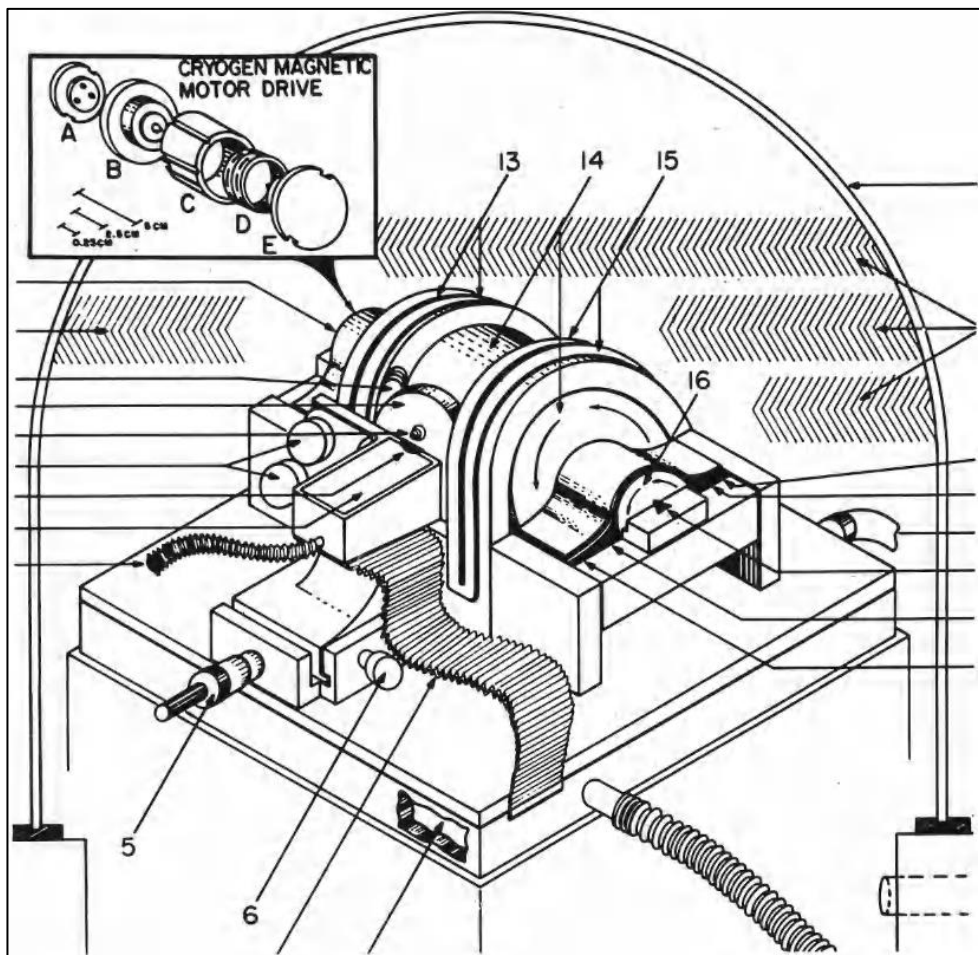


Fig. 35. Dibujo esquemático de crío-ultramicrotomo con cuchilla de diamante diseñado para operar principalmente a temperaturas de helio líquido (1,8-4,2 K) dentro de un criostato especialmente apantallado que usa un motor superconductor. Para un examen directo mediante crío-microscopía electrónica y crío-difracción de electrones se pueden preparar secciones ultrafinas seriadas de muestras biológicas rápidamente congeladas. [H. Fernández-Morán, 1968-1982 (102,113,122,128).]

HUMBERTO FERNÁNDEZ-MORÁN

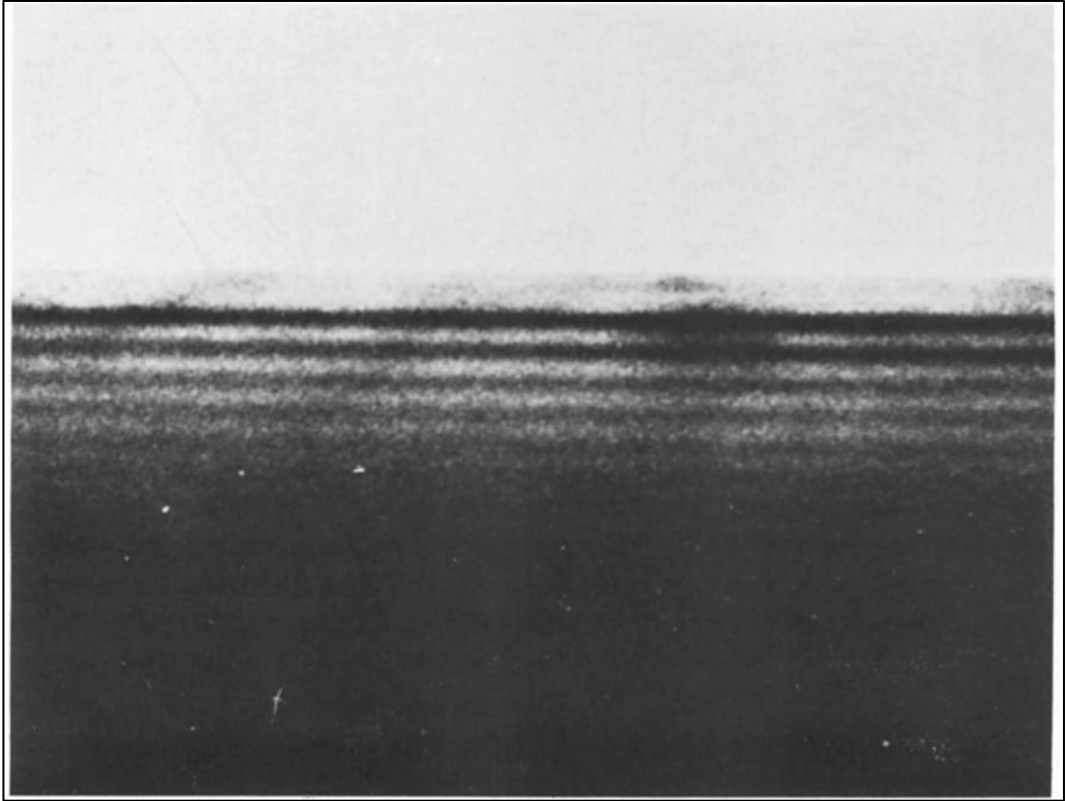


Fig. 36. Micrografía electrónica de transmisión de una cuchilla de diamante mejorada que muestra un borde de corte uniforme y extremadamente afilado, y una estructura periódica característica de la faceta cristalina del diamante. Estas cuchillas de diamante ultra afiladas y resilientes son producidas por nuevas técnicas de microirradiación de precisión, especialmente desarrolladas para crío-microtomía de especímenes biológicos congelados [H. Fernández-Morán, 1980-1982 (128).]

AGRADECIMIENTOS

El trabajo realizado en Suecia (1946-1954) fue apoyado principalmente por el Fondo Luis Fernández-Morán. En su última parte el apoyo económico fue también otorgado por el Fondo Nobel a través del Instituto Karolinska, y de subvenciones a la investigación de la Fundación Wallenberg, la Fundación Therese y Johan Anderson, y el Ministerio de Educación del Gobierno de Venezuela. El trabajo de investigación en crío-microscopía electrónica ha sido apoyado por las subvenciones de la NASA NSG-441-63, NGL 14-001-012, NGR 14-001-166 y NSG 7303; por las subvenciones del NIH B-2460 y NB-04267; por el Fondo L. Block de la Universidad de Chicago, por el fondo Pritzker y por la Fundación de Investigación de Parálisis Espástica. Durante los últimos años subvenciones de investigación especiales fueron amablemente puestas a la disposición por los Fondos Luis Fernández-Morán y C. Jiménez-Macías de Venezuela.

CRÍO-MICROSCOPIA ELECTRÓNICA Y ULTRAMICROTOMÍA

El trabajo aquí reportado abarca aspectos sobresalientes de un esfuerzo continuo de 38 años en el desarrollo y aplicación de la microscopía electrónica, particularmente la crío-microscopía electrónica, la ultramicrotomía con cuchilla de diamante y las técnicas de preparación mejoradas para el estudio de la ultraestructura del nervio y la organización submicroscópica de sistemas biológicos. En su alcance este esfuerzo es internacional, y se llevó a cabo gracias a la asistencia otorgada por distinguidos compañeros y mentores. Muchos de los conceptos y enfoques experimentales se derivan del período de aprendizaje en microscopía electrónica que el autor pasó en el Instituto Nobel de Física en Estocolmo, Suecia. Deseo reiterar mi profundo agradecimiento al difunto Profesor Manne Siegbahn por su generosa hospitalidad, amable apoyo y aliento en todo momento. Es un placer agradecer al Profesor Torbjörn Caspersson, ex director del Instituto de Investigaciones Celulares del Instituto Karolinska, por su valiosa ayuda y asesoramiento.

El autor está especialmente en deuda con el Profesor Samuel C. Collins, ex director del Laboratorio de Ingeniería Criogénica del Instituto Tecnológico de Massachusetts, por su orientación y apoyo poniendo a su disposición las instalaciones del Laboratorio, y otorgándole los beneficios de su valiosa experiencia a lo largo de todas las etapas de los experimentos con Helio superfluido durante un período de dos décadas.

El autor ha tenido el privilegio y el agradecimiento de trabajar con el Profesor Francis O. Schmitt del Instituto Tecnológico de Massachusetts y con el Profesor William H. Sweet del Hospital General de la Universidad de Massachusetts y de la Escuela de Medicina de Harvard. La asistencia ingeniosa del Dr. Frederick B. Merk durante ese tiempo es sinceramente apreciada.

La amable ayuda del Profesor H. Stanley Bennett, del difunto Profesor William Bloom y del Profesor Raymond Zirkle fue fundamental durante las etapas iniciales del trabajo en crío-microscopía electrónica en la Universidad de Chicago. También deseo agradecer al Dr. Charles Laverick del Laboratorio Nacional de Argonne; a Milton Streeter y a R. Osburn de Cryogenic Technology Inc.; y a F. Lins, A. Peuron, D. Kasun y Dr. S. Autler de la División Criogénica de Westinghouse. El autor desea expresar su profundo agradecimiento al Dr. Orr Reynolds, Director del Programa Biosciences, y al Dr. George J. Jacobs, Jefe de Biología Física de la NASA, por su infalible apoyo y aliento durante todo el desarrollo de los crío-microscopios electrónicos y del sistema de Helio superfluido. El autor también está en deuda con los Dres. F. R. Gamble y T. Geballe de la Universidad de Stanford y con F. J. DiSalvo y J. A. Wilson de los Laboratorios Bell por las discusiones y sugerencias relacionadas con los compuestos intercalados en el curso de los programas de investigación cooperativa. Son reconocidas con gratitud las estimulantes discusiones con el Profesor Gaston Dupouy del Laboratoire d'Optique Electronique, Toulouse, Francia; con la Dra. Isolde Dietrich de los Laboratorios de Investigación de Siemens AG en Munich, República Federal de Alemania; con el Profesor Elmar Zeitler, director del Departamento de Microscopía Electrónica del Instituto Fritz-Haber, Max-Planck-Gesellschaft en Berlín; y con el Dr. Gunter F. Bahr, del Departamento de Patología Celular del Instituto de Patología de las Fuerzas Armadas en Washington, D.C. A lo largo de las últimas décadas, el generoso aliento y las valiosas sugerencias del Dr. W. O. Milligan, ex Director de Investigación de la Fundación Robert A. Welch en Houston, Texas, fueron profundamente apreciados. La mayor parte de la investigación y desarrollo en crío-microscopía electrónica ha sido llevada a cabo en un sistemático esfuerzo en equipo por los miembros de un grupo interdisciplinario, particularmente por Helmut Krebs, Charles Hough, el difunto G. Arcuri, G. Bowie y C. Weber. Todo el equipamiento especial fue fabricado y ensamblado por expertos colaboradores del Taller de Desarrollo de Ciencias Físicas.

HUMBERTO FERNÁNDEZ-MORÁN

Estamos en deuda con D. Meddoff, V. Manrique, A. Hibino, M. Ohtsuki y A. Gustafson por su hábil asistencia técnica en la preparación de muestras y en microscopía electrónica.

El autor desea agradecer a todos los colegas y colaboradores que contribuyeron decisivamente a la fundación y a la investigación llevada a cabo en el Instituto Venezolano de Neurología e Investigaciones Cerebrales, IVNIC, cerca de Caracas, Venezuela, durante los años 1954-1958. Sobre todo desea expresar su profundo agradecimiento al fallecido Dr. Pedro A. Gutiérrez Alfaro, ex Ministro de Salud Pública, quien ayudó a fundar y apoyar a IVNIC a lo largo de su existencia. Entre los muchos que participaron en este proyecto pionero, Don Pedro Arvelo Crespo, Don Andrés Parra Pulido, el Dr. Arturo Kan, el ingeniero Josef Weibel y el Profesor Pierre Denis merecen un reconocimiento especial; estamos todos muy en deuda con ellos. También es un placer agradecer al Profesor Geoffrey H. Bourne por su apoyo estimulante durante todas las fases de este proyecto.

Se reconoce con gratitud el generoso apoyo durante la última década del Dr. Luis V. Amador, del Sr. George Scharringhausen, Jr. y de sus colegas de la Fundación para la Investigación de la Parálisis Espástica.

Deseo expresar mi profunda gratitud al difunto profesor Hans Selye y al difunto profesor David E. Green por compartir la sabiduría de su experiencia y por el legado de su inspirador sentido de compromiso.

El autor agradece el apoyo alentador del Dr. Cipriano Jiménez-Macías, del Dr. Alberto Olivares, del difunto Dr. Francisco J. Duarte, del Dr. Marcel Granier D., y del difunto Dr. Miguel Parra León, Presidente Emérito de la Academia Venezolana de Ciencias en Caracas, Venezuela.

CRÍO-MICROSCOPÍA ELECTRÓNICA Y ULTRAMICROTOMÍA

REFERENCIAS

1. C. G. Ehrenberg, *Monatsber. Preuss. Akad. Wiss.* 64, 73 (1849).
2. H. von Helmholtz, *Monatsber. Dtsch. Akad. Wiss. Berlin*, p. 625 (1873).
3. M. Knoll and E. Ruska, *Z. Phys.* 78, 318 (1932).
4. E. Ruska, *Z. Phys.* 89, 90 (1934).
5. L. Marton, *Phys. Rev.*, 527 (1934).
6. A. Frey-Wyssling, "Submicroscopic Morphology of Protoplasm and its Derivatives." New York, 1948.
7. H. Ruska, *Arch. Exp. Zeilforsch.* 22, 673 (1939).
8. M. von Ardenne, "Elektronen Übermikroskopie." Springer-Verlag, Berlin and New York, 1940.
9. A. Prebus and J. Hillier, *Can. J. Res., Sect. A* 17, 49 (1939).
10. M. Siegbahn, *K. Sven Vetenskapsakad. Årsb.* 37, 147 (1939).
11. I. Elvers, *Acta Horti Bergiani* 13 (5) (1943); *Bot. Tidskr.* 37, 331 (1943).
12. K. Siegbahn and B. Ingelman, *Ark. Kemi, Mineral. Geol.* **18B**, No. 1 (1944).
13. B. von Borries and E. Ruska, *Ergeb. Exakten Naturwiss.* 19, 237 (1941).
14. E. F. Burton and W. H. Kohl, "The Electron Microscope." Reinhold, New York, 1942.
15. L. Marton, "Early History of the Electron Microscope." San Francisco Press, San Francisco, California, 1968.
16. D. Gabor, *Canberra*, 1974 Vol. 1, p. 6 (1975).
17. E. Ruska, "The Early Development of Electron Lenses and Electron Microscopy" (transl. by T. Mulvey). Hirzel Verlag, Stuttgart, 1980.
18. W. J. Schmidt, "Die Doppelbrechung von Karyoplasma, Zytoplasma und Metaplasma." Berlin, 1937.
19. F. O. Schmitt, R. S. Bear, and G. L. Clark, *Radiology*, 25, 131 (1935).
20. F. O. Schmitt, *Biochim. Biophys. Acta* 4, 68 (1950).
21. V. Runnström *Protoplasma* 4, 388 (1928).
22. T. Caspersson, *Protoplasma* 27, 463 (1937).
23. T. Caspersson, "Cell Growth and Cell Function." Norton, New York, 1950.
24. S. E. Luria and T. F. Anderson, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 28, 127 (1942).
25. C. E. Hall, M. Jakus, and F. O. Schmitt, *J. Appl. Phys.* **16**, 459 (1945).
26. R. C. Williams and R. W. G. Wyckoff, *J. Appl. Phys.* **15**, 712 (1944).
27. K. R. Porter, A. Claude, and E. F. Fullam, *J. Exp. Med.* 81, 233 (1945).
28. G. E. Palade, *J. Exp. Med.* **95**, 285 (1952).
29. H. Fernández-Morán, *Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat.* **33**, 225 (1944).
30. N. Hast, *Nature (London)* **159**, 370 (1947).
31. H. Fernández-Morán, *Ark. Zool.* 40A, No. 6 (1948).
32. H. Fernández-Morán and R. Luft, *Acta Endocrinol. (Copenhagen)* 2, 199 (1949).
33. V. K. Zworykin, G. A. Morton, E. G. Ramberg, J. Hillier, and A. W. Vance, "Electron Optics and the Electron Microscope." New York, 1945.

34. J. Hillier and E. G. Ramberg, *J. Appl. Phys.* **18**, 48 (1947).

56

HUMBERTO FERNÁNDEZ-MORÁN

35. S. B. Newman, E. Borysko, and M. J. Swerdlow, *Science* **110**, 66 (1949).

36. H. Latta and J. F. Hartmann, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **74**, 436 (1950).

37. H. Olivecrona, *Sven. Laekartidn.* **19** (1946); H. Fernández-Morán, "Apuntes Biográficos sobre el Profesor Herbert Olivecrona." Kugelbergs Boktryckeri, Stockholm, 1947.

38. F. S. Sjöstrand, *J. Cell. Comp. Physiol.* **33**, 383 (1949).

39. V. E. Cosslett, "Practical Electron Microscopy." Butterworth, London, 1951.

40. E.W. Müller, *Z. Phys.* **106**, 541 (1937).

41. K. Lonsdale, *Proc. Phys. Soc, London* **54**, 314 (1942).

42. H. Fernández-Morán, *Exp. Cell Res.* **1**, 143 (1950).

43. H. Fernández-Morán, *Exp. Cell Res.* **1**, 309 (1950).

44. H. Fernández-Morán, *Exp. Cell Res.* **3**, 282 (1952).

45. H. Fernández-Morán, *Ark. Fys.* **4**, 471 (1952).

46. H. Fernández-Morán and A. O. Dahl, *Science* **116**, 465 (1952).

47. H. Fernández-Morán, *Exp. Cell Res.* **5**, 255 (1953).

48. H. Fernández-Morán, *Bol. Acad. Cienc. Fis. Mat. Nat. (Caracas)* **51**, 1 -162 (1953).

49. H. Fernández-Morán, *Prog. Biophys.* **4**, 112 (1954).

50. G. H. Bourne, *Nature (London)* **176**, 1049 (1955).

57. H. Fernández-Morán, *Ind. Diamond Rev.* **16**, 128 (1956).

52. H. Fernández-Morán, *Nature (London)* **111**, 742 (1956).

53. H. Fernández-Morán, */, Biophys. Biochem. Cytol.* **4**, Suppl. 2, 29 (1956).

54. H. Fernández-Morán and A. Engström, *Nature (London)* **173**, 494 (1956).

55. H. Fernández-Morán and A. Engström, *Biochim. Biophys. Acta* **23**, 260 (1956).

56. H. Fernández-Morán and J. P. Finean, *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **3**, 725 (1957).

57. H. Fernández-Morán, *Proc. Int. Neurochem. Symp., 2nd*, 1956 (1957).

58. H. Fernández-Morán and R. Brown, eds. "The Submicroscopic Organization and Function of Nerve Cells" *Exp. Cell Res., Suppl. 5*. Academic Press, New York, 1958.

59. H. Fernández-Morán, *Exp. Cell Res., Suppl. 5*, 586 (1958).

60. G. H. Bourne, *Nature (London)* **179**, 1296 (1957).

61. H. Fernández-Morán and G. Schramm, *Z Naturforsch.* **13B**, 68 (1958).

62. A. Sayre, "Rosalind Franklin and DNA," p. 187. Norton, New York, 1975.

63. H. Fernández-Morán, *Rev. Mod. Phys.* **31**, 319 (1959).

64. H. Fernández-Morán, *J. Appl. Phys.* **30**, 2038 (1959).

65. H. Fernández-Morán, in "Macromolecular Complexes" (M. V. Edds, ed.), p. 113. Ronald Press, New York, 1961.

66. H. Fernández-Morán, in "Fast Fundamental Transfer Processes in Aqueous Biomolecular Systems" (F. O. Schmitt, ed.), pp. 26, 33. M.I.T. Press, Cambridge, Massachusetts, 1960.

67. E. W. Müller, *Adv. Electron. Electron Phys.* **13**, 83 (1960).

68. H. Fernández-Morán, */, Appl. Phys.* **31**, 1840 (1960).

69. C. E. Hall, */, Biophys. Biochem. Cytol.* **1**, 1 (1955).

70. C. E. Hall, */, Biophys. Biochem. Cytol.* **2**, 625 (1956).

71. H. Fernández-Morán, in "The Structure of the Eye" (G. K. Smelser, ed.), p. 521.

Academic Press, New York, 1961.

CRÍO-MICROSCOPIA ELECTRÓNICA Y ULTRAMICROTOMÍA

57

72. H.Fernández-Morán, in "Ultrastructure and Metabolism of the Nervous System" (S. Korey, ed.), A.R.N.M.D. Ser. 40, p. 338. Williams & Wilkins, Baltimore, Maryland, 1962.
73. A. J. Hodge and F. O. Schmitt, *Proc. Natl. Acad. Sei. U.S.A.* 46, 186 (1960).
74. E. H. Leduc and W. Bernhard, in "The Interpretation of Ultrastructure" (R. J. C. Harris, ed.), p. 21. Academic Press, New York, 1962.
75. R. C. Valentine and R. W. Home, in "The Interpretation of Ultrastructure" (R. J. C. Harris, ed.), p. 263. Academic Press, New York, 1962.
76. H.Fernández-Morán, in "The Interpretation of Ultrastructure" (R. J. C. Harris, ed.), Vol. 1, p. 411. Academic Press, New York, 1962.
77. H.Fernández-Morán, L. J. Reed, M. Koike, and R. R. Willms, *Science* **145**,930 (1964).
78. H.Fernández-Morán, T. Oda, P. V. Blair, and D. E. Green, *Cell Biol.* **22**, 63 (1964).
79. C. E. Hall, "Introduction to Electron Microscopy." McGraw-Hill, New York, 1953; 2nd Ed., 1966.
80. A. K. Kleinschmidt and R. K. Zahn, *Z. Naturforsch.* **14B**, 770 (1959).
81. C. L. F. Woodcock and H.Fernández-Morán, *J. Mol. Biol.* 31, 627 (1968).
82. G.F. Bahr and E. H. Zeitler, eds. "Quantitative Electron Microscopy." Williams & Wilkins, Baltimore, Maryland, 1965.
83. G. Dupouy and F. Perrier, *Microsc. (Paris)* 3, 233 (1964).
84. S. Wischnitzer, "Introduction to Electron Microscopy." Pergamon, Oxford, 1970.
85. H.Fernández-Morán, *Ann. NY. Acad. Sei.* 85, 689 (1960).
86. H.Fernández-Morán, *R. Microsc. Soc.* 83, 183 (1964).
87. A. Laberrigue and P. Levinson, *C. R. Hebd. Seances Acad. Sei.* **259**, 530 (1964).
88. H.Fernández-Morán, *Proc. Natl. Acad. Sei. U.S.A.* 53, 445 (1965).
89. H.Fernández-Morán, *Proc. Natl. Acad. Sei. U.S.A.* 56, 801 (1966).
90. H. Boersch, O. Bostanjoglo, and B. Lischke, *Optik*, **24**, 460 (1966).
91. H.Fernández-Morán, *Kyoto, 1966* Vol. 1, p. 147 (1966).
92. C. Laverick, Argonne Natl. Lab. [Rep.] ANL-72-75, 38 (1966).
93. H.Fernández-Morán, *Proc.—Annu. Meet., Electron Microsc. Soc. Am.* 25, 10 (1967).
94. I. Dietrich, R. Weyl, and H. Zerbst, *Cryogenics* 7, 178 (1967).
95. P. Bonjour and A. Septier, *Rome, 1968* Vol. 1, p. 189 (1968).
96. J. Trinquier and J. L. Balladore, *Rome, 1968* Vol. 1, p. 191 (1968).
97. I. Dietrich, H. Pfisterer, and R. Weyl, *Z. Angew. Phys.* 28, 35 (1969).
98. H.Fernández-Morán, *Grenoble, 1970* Vol. 2, p. 91 (1971).
99. H.Fernández-Morán, *Exp. Cell Res.* 62, 90 (1970).
100. J. K. Hulm, D. J. Kasun, and E. Mullan, *Phys. Today* **24**, 48 (1971).
101. R. Weyl, I. Dietrich, and H. Zerbst, *Optik* 35, 280 (1972).
102. H.Fernández-Morán, *Appl. Cryog. Technol.* 5, 153 (1973).
103. I. Dietrich, G. Lefranc, R. Weyl, and H. Zerbst, *Optik* 38, 449 (1973).
104. I. Dietrich, F. Fox, E. Knappek, G. Lefranc, R. Weyl, and H. Zerbst, *Canberra, 1974*

Vol. 1, p. 146(1975).

58

HUMBERTO FERNÁNDEZ-MORÁN

105. J. Dubochet, *J. Ultrastruct. Res.* **52**, 276 (1975).
106. I. Dietrich, K. H. Herrmann, and C. Passow, *Optik* **42**, 439 (1975).
107. I. Dietrich, "Superconducting Electron Optic Devices." Plenum, New York, 1976.
108. I. Dietrich, F. Fox, E. Knappek, G. Lefranc, K. Nachtrieb, R. Weyl, and H. Zerbst, *Ultramicroscopy* **2**, 241 (1977).
109. I. Dietrich, *Toronto, 1978* Vol. 3, p. 173 (1978).
110. F. Fox, E. Knappek, and R. Weyl, *Toronto, 1978* Vol. 2, p. 342 (1978).
111. I. Dietrich, F. Formanek, F. Fox, E. Knappek, and R. Weyl, *Nature (London)* **277**, 380 (1979).
112. H. Formanek and E. Knappek, *Ultramicroscopy* **4**, 77 (1979).
113. H.Fernández-Morán, *Proc. Robert A. Welch Found. Conf. Chem. Res.* **23**, 315 (1980).
114. E. Knappek and J. Dubochet, *J. Mol. Biol.* **141**, 147 (1980).
115. I. Dietrich, H. Formanek, W. von Gentzkow, and E. Knappek, *The Hague, 1980* Vol. 1, p. 116(1980).
116. J. Dubochet, E. Knappek, and I. Dietrich, *Ultramicroscopy* **6**, 77 (1981).
117. I. Dietrich, F. Fox, H. G. Heide, E. Knappek, and R. Weyl, *Ultramicroscopy* **3**, 185 (1978).
118. H. C. Box, "Radiation Effects: ESR and ENDOR Analysis." Academic Press, New York, (1977).
119. V. E. Cosslett, *J. Microsc. (Oxford)* **113**, 113 (1978).
120. K. A. Taylor and R. M. Glaeser, *J. Ultrastruct. Res.* **55**, 448 (1976).
121. H.Fernández-Morán, *Ann. NY. Acad. Sei.* **125**, 739 (1965).
122. H.Fernández-Morán, in "Science Year Book," p. 216. Field Enterprises, Chicago, 1968.
123. H.Fernández-Morán, *Ann. NY. Acad. Sei.* **195**, 376 (1972).
124. E. Ruska, *Adv. Opt. Electron Microsc.* **1**, 115 (1966).
125. S. C. Collins, private communications (1960-1982).
126. R. R. Wilson, *Sei. Am.* **242**, 42 (1980).
127. J. Dubochet, F. P. Booy, R. Freeman, A. V. Jones, and C. A. Walter, *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.* **10**, 133(1981).
128. H.Fernández-Morán, *Hamburg, 1982* Vol. 1, p. 751 (1982).
129. E. Knappek, H. Formanek, G. Lefranc, and I. Dietrich, *Proc.-Annu. Meet. Electron Microsc. Soc. Am.* **39**, 22 (1981).
130. I. Dietrich, H. Formanek, W. von Gentzkow, and I. Knappek, *Ultramicroscopy* **9**, 75 (1982).
131. G. Lefranc, E. Knappek, and I. Dietrich, *Ultramicroscopy* **10**, 111 (1982).
132. E. Knappek, *Ultramicroscopy* **10**, 71 (1982).
133. E. Zeitler, in "Cryomicroscopy and Radiation Damage" (E. Zeitler, ed.), p. 1, 155. North-Holland Publ, Amsterdam, 1982.
134. H.G. Heide, *Ultramicroscopy* **10**, 125 (1982).
135. J. Hüttermann, *Ultramicroscopy* **10**, 7 (1982).
136. O. Scherzer, in "Advances in Structure Research by Diffraction Methods" (W.

Hoppe and R. Mason, eds.), Vol. 7, p. 101. Vieweg, Braunschweig, 1979.

CRIO ELECTR XXXXX PUBLICADO ORIGINALMENTE EN L REVIIXXX
FECAH AGONO. Traducido al espenol por el Prof Carlos Rojas CRÍO-MICROSCOPÍA
ELECTRÓNICA Y ULTRAMICROTOMÍA 59

Humberto Moran -Fernandez in the P

137. H.Fernández-Morán, W. H. Zinn, B. C. Cerutti, and C. Lang, in "First Interamerican Symposium on Nuclear Energy," p. 1. Brookhaven National Laboratory, 1957.
138. T. G. Lewis, *Tool Manufact. Eng.* **49**, 65 (1962).
139. D. G. Durham, *Del. Med. J.* 38, 202 (1966).
140. V. A. P hillips, *Prakt. Metallog.* 4, 637 (1967).
141. E. P. Gargiulo, *Proc. Int. Indust. Diamond Conf.* 1969, p. 145 (1969).
142. F. E. Johnson, M. E. Curcio, D. C. Smith, and L. E. Lockett, *Laser Focus Mag.* p. 36 (1981).
143. F. Walter, *Z. Instrumentenkunde* 66, 246 (1958).
144. H. Sitte, *Hamburg*, 1982 Vol. 1, p. 9 (1982).

***“Cryo-Electron
Microscopy and
Ultramicrotomy:
Reminiscences
and Reflections”***

*Original article reprinted with
permission of Elsevier*

Cryo-Electron Microscopy and Ultramicrotomy: Reminiscences and Reflections

HUMBERTO FERNÁNDEZ-MORÁN

*Cryo-Electron Microscope Laboratories
Research Institutes
University of Chicago
Chicago, Illinois*

I. Introduction.....	167
II. The Nobel Institute for Physics	169
A. Professor Manne Siegbahn	169
B. The Siegbahn Electron Microscope	171
C. Electron Microscopy of Anterior Lobe Cells of the Rat Hypophysis.....	177
III. The Diamond Knife.....	178
A. Development of the Diamond Knife	178
B. The Diamond Knife and Ultramicrotome	182
C. Applications of the Diamond Knife.....	184
IV. The Venezuelan Institute for Neurology and Brain Research.....	187
A. Foundation and Research Activities.....	187
B. International Symposium on Nerve Ultrastructure and Function.....	191
V. Low-Temperature Electron Microscopy and Ultramicrotomy	201
A. The Submicroscopic Organization of Vertebrate Nerve Fibers.....	201
B. High-Resolution Electron Microscopy and Low-Dose Electron Diffraction ...	203
VI. Cryo-Electron Microscopy	206
A. Study of Biological Systems at Liquid-Helium Temperatures	206
B. Development of Cryo-Electron Microscopes with Superconducting Lenses ...	209
C. The Collins Closed-Cycle Superfluid-Helium Refrigerator	213
D. The Cryomicroscope with Superconducting Lenses at Munich	214
E. Structure Determination of an Organic Complex with a Superconducting Electron Microscope	215
VII. Reflections and Outlook	216
References	220

I. INTRODUCTION

In its first 50 years the electron microscope has surpassed the resolution of the light microscope by three orders of magnitude (3,17), making it possible to see directly structures of molecular and atomic dimensions. Despite

the initial pessimistic outlook “that living matter would burn to a cinder under the electron beam,” the first pioneers, Max Knoll, Ernst Ruska (3,4), and L. Marton (5,15), continued their work. Successive advances in preparation techniques have since revealed whole new domains of unsuspected structural detail, most of which can be correlated with the results of X-ray diffraction and biochemical methods. Considered one of the most successful inventions of our times (16), the electron microscope and its contributions to biology and medicine have ushered in a renaissance, from the first imaging of a bacterial virus (24) to unraveling the submicroscopic organization of cells and tissues down to the self-replicating DNA macromolecules. Historically, it is interesting to note that the Berlin biophysicist, Helmholtz (2), and Ernst Abbe independently showed in 1873 that the resolving power of the light microscope is limited by the wavelength of light. Yet, the discovery of birefringence of nerves by Ehrenberg (1) in 1849 marks the beginning of an investigation by light microscopy of the ultrastructure of a native biological system. Subsequent polarized-light and X-ray diffraction studies of the nerve myelin sheath (19,20) furnished quantitative details of this paracrystalline structure, consisting of lipid–protein layers about 180 Å thick, and thus of submicroscopic dimensions. In fact, the postulated layers and their highly ordered concentric arrangement in the myelin sheath were observed directly in the electron microscope (42,44). Correlated biophysical and biochemical investigations of this kind have contributed significantly to validate the results of electron microscopy. Past experience has shown the unique value of this approach involving the combined application of complementary disciplines and the interaction of numerous experts working together in imaginative experiments. We may also anticipate the development of a new generation of “cryo-electron microscopes” designed to reduce specimen radiation damage and thermal vibrations at liquid-helium temperatures (128).

Reminiscing is ultimately the resurrection of meaningful imagery and of fruitful concepts. Within the succinct scope of this article the author has therefore selected a series of representative micrographs to illustrate the results of correlated studies using improved preparation techniques supplemented by parallel biochemical and biophysical methods. Having shared the privilege of participating in this exploratory work with a number of distinguished colleagues during nearly four decades, salient aspects of cryo-electron microscopy and ultramicrotomy were chosen as case histories. Presented as a token of deep appreciation, they cover highlights of an international quest which, in many ways, occurred at the right time and in the right places (1946–1982).

Trained as a biologist and a physician, the author became well acquainted with the classical techniques of light microscopy under expert

guidance (Professor A. Dabelow and Professor B. Romeis) while working on his dissertation (29).

The first publications on electron microscopy, which appeared in Germany during 1939–1940, notably the papers by E. Ruska (4) and by H. Ruska (7) and the inspiring book by M. von Ardenne (8), were studied with keen interest. Later on the classical papers by Luria and Anderson (24) and by Hall, Jakus, and Schmitt (25), and the books by Burton and Kohl (14) and by Zworykin, Morton, Ramberg, Hillier, and Vance (33), opened up a new world. It is difficult to convey the impact of seeing for the first time the electron micrographs of bacteriophages, or the fascinating beauty of the periodic structures revealed by staining or shadowcasting in trichocysts, paramyosin fibrils, or connective tissue (collagen).

However, postgraduate work in neurology and neurosurgery absorbed all the energies of the author. In 1946 Fernández-Morán transferred to Stockholm, Sweden, to continue his residency and work as a foreign research fellow under the famous neurosurgeon Herbert Olivecrona, at the Serafimerlasarettet. Professor Olivecrona was not only a great physician, but also a superb organizer endowed with prodigious energy and that rare measure of self-control typical of certain outstanding Swedes (37). Moved by the deaths caused by malignant tumors in spite of exemplary surgical treatment, Fernández-Morán, encouraged by Professor Olivecrona, turned to basic research to learn more about the organization of tumor cells.

In 1946 he visited Professor Manne Siegbahn, director of the Nobel Institute for Physics, and after a brief discussion he was invited to work in the electron microscope laboratories. Thanks to the generous hospitality and assistance granted during an 8-year period (1946–1954), Fernández-Morán served a unique apprenticeship in electron microscopy both here and at the Karolinska Institute.

II. THE NOBEL INSTITUTE FOR PHYSICS

A. Professor Manne Siegbahn

In 1937 the Royal Swedish Academy of Science created a Nobel Institute of Physics, located at Frescati in the northern suburbs of Stockholm, with Professor Manne Siegbahn as director; but in a deeper sense he was the soul of that institute, both as a great scientist and as a unique human being (see Fig. 1). Karl Manne George Siegbahn was awarded the Nobel Prize in physics in 1924 “for his discoveries and research in the field of X-ray spectroscopy.” He developed special research techniques for X-ray spectroscopy, and determined with extraordinary accuracy the wavelength of X



FIG. 1. Professor Manne Siegbahn and co-workers at the Nobel Institute for Physics of the Swedish Academy of Science in Stockholm, 1947 (left to right): Professors Kai Siegbahn, Nils Svartholm, Manne Siegbahn, H. Fernández-Morán, and H. Slätis.

rays. His “Spectroscopy of Röntgen Rays” (1924) became the standard work on this subject. In addition to his fundamental contributions, he designed special ruling engines and invented (in 1939) an electron microscope of unusual design and high resolution, equipped with a Siegbahn high-vacuum rotary molecular pump, among many other contributions. Thanks to his outstanding qualities as an organizer, the institute, devoted to researches in nuclear physics, was one of the best equipped and staffed in Europe. When I arrived in 1946 the institute was a haven of excellence and a major international center of research and training, visited by the most eminent physicists, including the Nobel Laureates in physics delivering their Nobel lecture each year. However, the personality of Professor Siegbahn remains as the lasting impression: a gentle, great man endowed with exceptional qualities of mind and character. Personally, I owe him a profound debt of gratitude. Beyond his assistance in electron microscopy, the dia-

mond knife was developed in that unique environment where his famous ruling engines produced diamond-ruled gratings of unsurpassed quality.

B. The Siegbahn Electron Microscope

A magnetic electron microscope of unusual design was made by Professor Manne Siegbahn in 1939 (10) and was installed in special laboratories at the Nobel Institute for Physics (see Fig. 2). The column consists of a horizontally arranged narrow tube. The precision-machined polepieces within the tube make magnetic contact with the lens coils mounted externally. The image is viewed through a thin fluorescent screen attached to a plate holder which takes up to eight photographic plates. Alignment of the horizontal

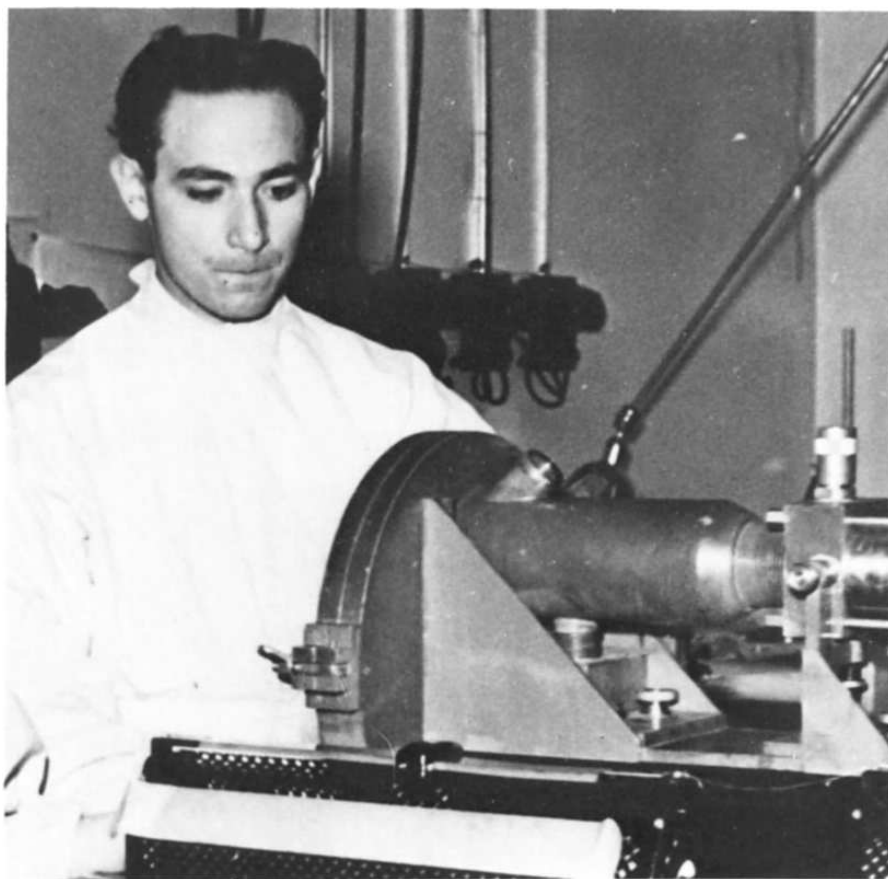


FIG. 2. The author examining biological specimens (photographed February 9, 1947) with the electron microscope designed by Professor Manne Siegbahn (1939) and installed in special research laboratories of the Nobel Institute for Physics at Frescati, Stockholm. This instrument consistently attained resolutions of 20–50 Å when operating under optimum conditions with adequate specimen preparation techniques.

column is critical but can be carried out reproducibly. A rotary molecular pump designed by Siegbahn is used to produce a high vacuum. Although it does not have a very high rate of pumping, it is relatively contamination free in the absence of vacuum leaks, since there are no oil vapors. Careful mounting and balancing of the pump eliminates disturbing vibrations. The electrical circuits are of conventional design, with adequate stability and precision focusing controls. The laboratory model operates at a regulated high voltage of 35–55 kV.

The object holders consist of rectangular metal blocks (2 cm × 2.5 mm × 2 mm) with two longitudinal openings which are covered by a fine copper net (spot welded to the holders) with openings of 100 μ m in diameter. Each opening contains up to 500 screen holes. Thus, a large number of specimens can be viewed without breaking the vacuum. A major improvement was made by using very thin beryllium or aluminum (10–

ARKIV FÖR ZOOLOGI.

BAND 40 A. N:o 6.

Examination of Brain Tumor Tissue with the Electron Microscope.

By

HUMBERTO FERNÁNDEZ-MORÁN.

With 13 figures in the text.

Communicated June 4th 1947 by MANNE SIEGBAHN and HUGO THEORELL.

Examination of Brain Tumor Tissue with the Electron Microscope.

FIG. 3. Report on the preliminary results obtained in the examination of brain tissue with the Siegbahn electron microscope using new preparation techniques. Communicated to the Swedish Academy of Science June 4, 1947. [From *Ark. Zool.* **40A**, No. 6 (1948).]

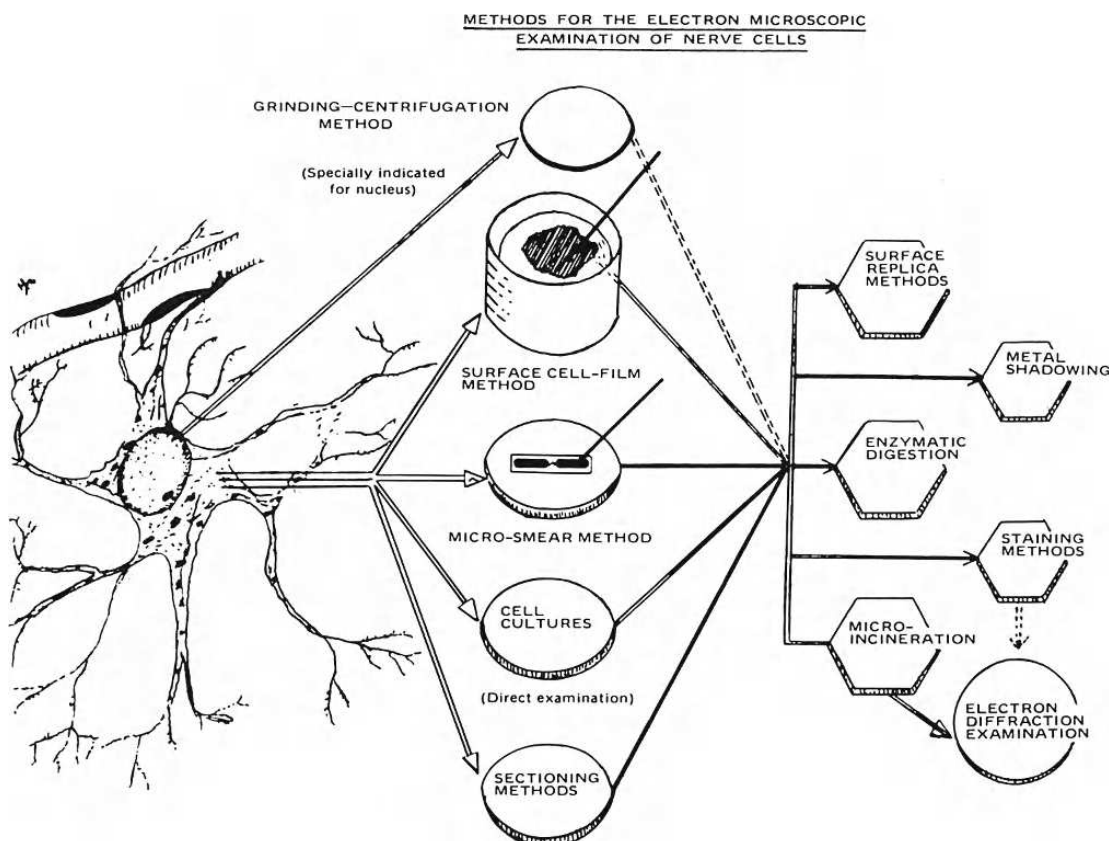


FIG. 4. Schematic outline of the preparation techniques for examination of nerve cells by electron microscopy. Several methods were proposed and initiated by the author at this early stage (1947), including thin-sectioning techniques and spreading of cell components in a protein monolayer. These proved to be useful, and were later successfully developed and applied by numerous investigators in correlative studies which revealed new domains of cell ultrastructure and molecular biology.

50 Å in thickness) supporting films, prepared according to the method developed by Professor Nils Hast (30).

The Siegbahn electron microscope consistently attained resolutions of 20–50 Å with a useful magnification of 100,000× when operating under optimum conditions with adequate specimen preparation techniques. Over 7 years of constant operation it proved to be remarkably reliable. Moreover, since it has many features in common with an electron-optical bench, it was an ideal instrument for electron-optical experimentation and evaluating the effects of lens stability, variation of high voltage, and alignment (Fig. 6).

Elvers (11) carried out systematic studies of plant cell ultrastructure and

developed ingenious “microgrids” or “micronets” made from transverse sections of pinewood or birch, with openings down to $10\ \mu\text{m}$.

Kai Siegbahn and B. Ingelman (12) carried out the first electron microscopic study of Dextran molecules with this instrument. The most extensive investigation on the fine structure of clay and the development of improved ultrathin metal film substrates was carried out by Professor Nils Hast (30).

Our preliminary studies of fresh brain tumor tissue obtained from the neurosurgical clinic of Professor Herbert Olivecrona (31) (Figs. 3 and 4)

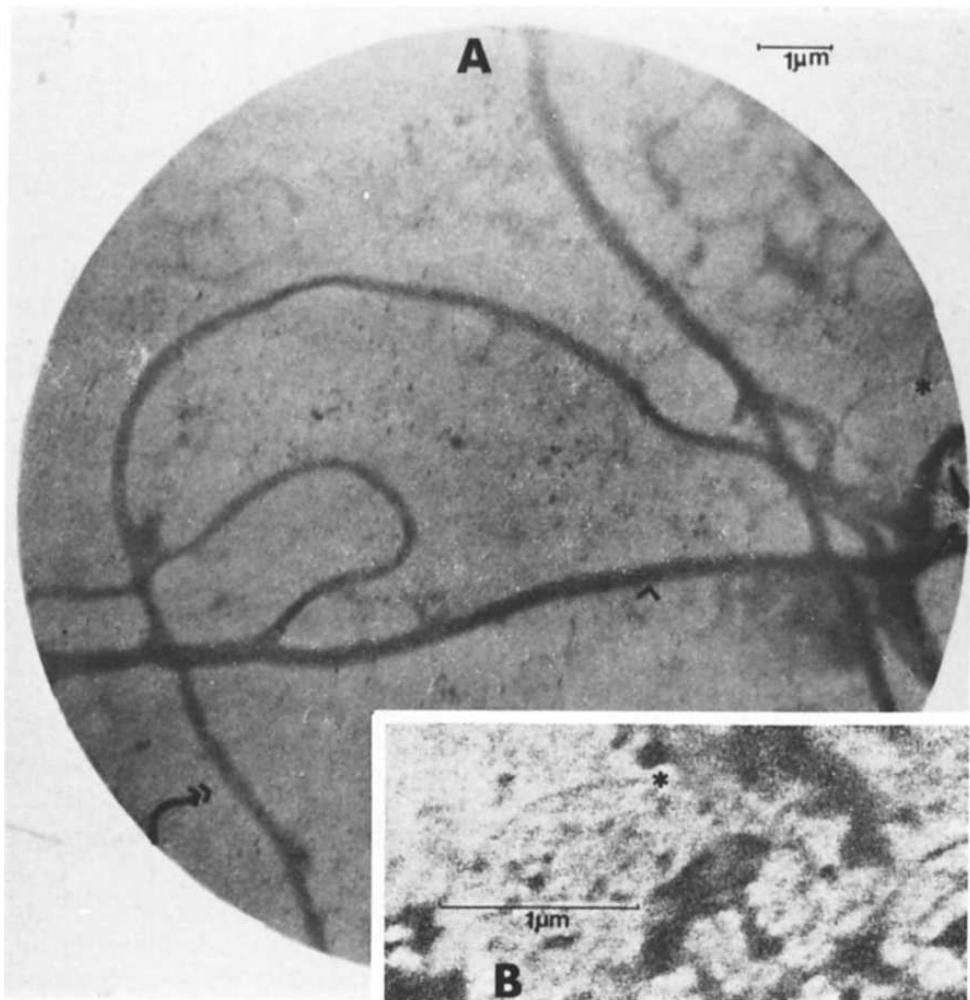


FIG. 5. (A) Glia fibrils in a fresh microsmear preparation of astrocytoma deposited on 30-Å aluminum film and washed with ether-alcohol. (B) Submicroscopic glia fibrils [from 1000 down to 200 Å (*) in diameter] in fresh, unfixed, and unstained astrocytoma preparation on ultrathin (20-Å) beryllium film. Recorded with Siegbahn electron microscope at 35 kV. [From H. Fernández-Morán, *Ark. Zool.* 40A, No. 6 (1948).]

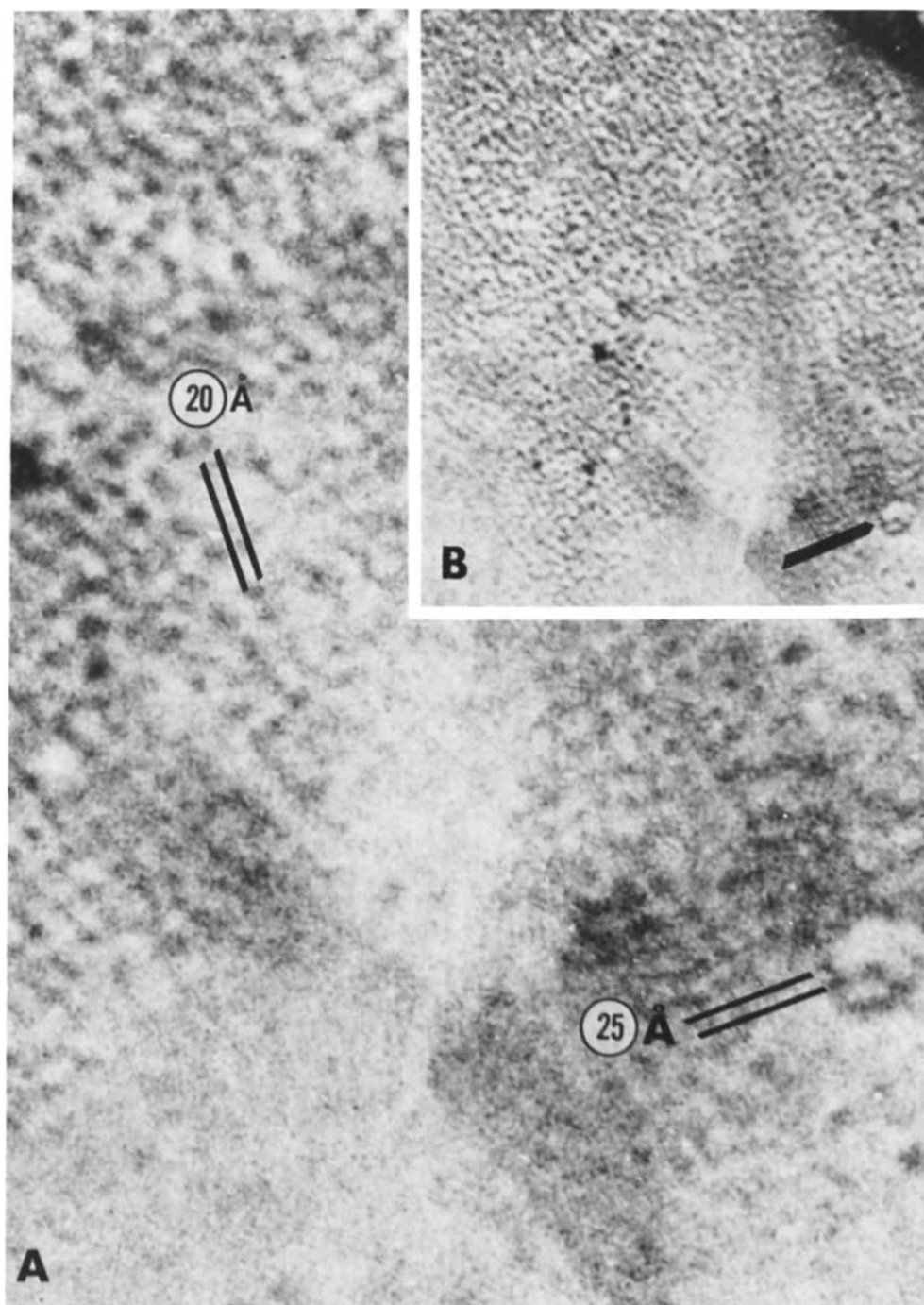


FIG. 6. (A) Electron micrograph of inset (B) of gold evaporated on thin (20-Å) beryllium film, showing 20- to 40-Å point resolution. Recorded with Siegbahn electron microscope at 55 kV. (H. Fernández-Morán, 1949.)

revealed several new components, including submicroscopic glia fibrils (Fig. 5) and cytoplasmic inclusion bodies, and furnished indications that the pathological glia cell types which are specific for each tumor differ from the normal glia cells

The main advantage derived from these preliminary studies was an evaluation of suitable preparation techniques. As depicted in the schematic outline in Fig. 4, several new methods were proposed and initiated by the author at this early stage (1947), including spreading of cell components in a protein monolayer. These proved to be useful, and were later independently developed and successfully applied in correlative studies of DNA released from bacteriophages (80) and from chloroplasts (81).

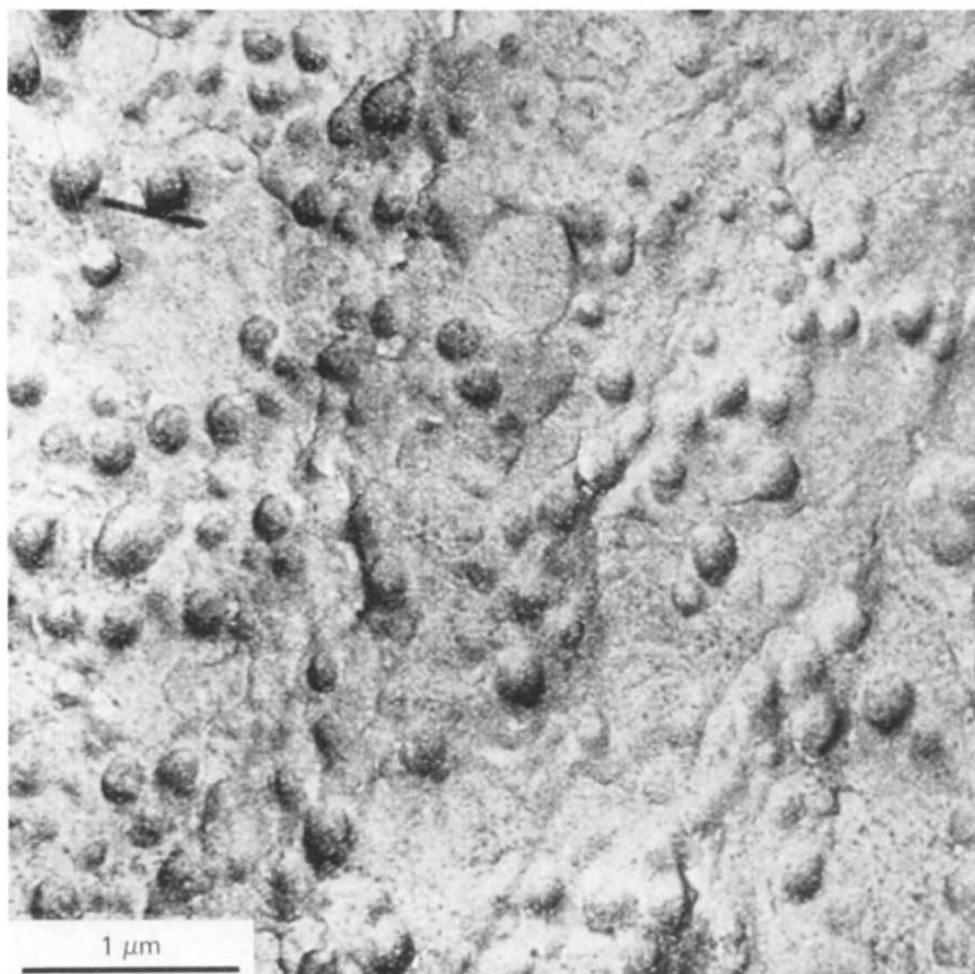


FIG. 7. Electron micrograph showing submicroscopic cytoplasmic granules of a basophil cell from the rat hypophysis as revealed by surface replica techniques using very thin films of beryllium (about 10–50 Å thick). Recorded with the Siegbahn electron microscope at 35 kV. [From H. Fernández-Morán and R. Luft, *Acta Endocrinol. (Copenhagen)* 2, 199 (1949).]

C. Electron Microscopy of Anterior Lobe Cells of the Rat Hypophysis

An interesting study was carried out in collaboration with Dr. Rolf Luft on "Submicroscopic Cytoplasmic Granules in the Anterior Lobe Cells of the Rat Hypophysis as Revealed by Electron Microscopy" (32). This study was carried out with the Siegbahn Electron Microscope using mainly the replica-adhesion method (26) applied to cell smears of the glandular lobe cells of the rat hypophysis. It was shown that the cytoplasm of all glandular lobe cells examined consists predominantly of distinctly outlined spherical bodies of 30–300 nm in diameter, which are thus beyond the resolving power of the light microscope. These "cytospheres" (Figs. 7 and 8) contain

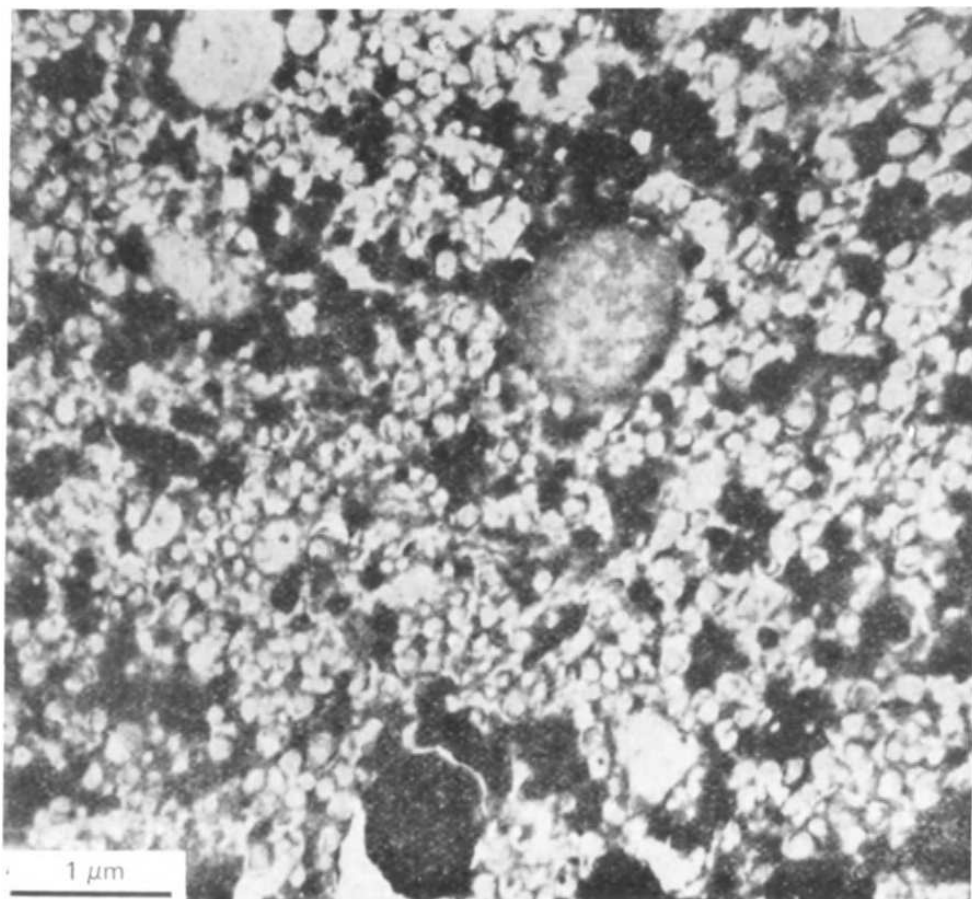


FIG. 8. Cytoplasm segment in an eosinophil cell of the anterior lobe of the rat hypophysis. Two specific granules are embedded among the closely packed cytoplasmic particles, which measure only 30–300 nm and are thus beyond the resolving power of the light microscope. Metal replica-adhesion method; recorded with the Siegbahn electron microscope at 55 kV. [From H. Fernández-Morán and R. Luft, *Acta Endocrinol. (Copenhagen)* 2, 206 (1949).]

smaller spherical granules and are embedded in a particulate submicroscopic ground substance. No fundamental differences in the three basic cell types could be observed.

III. THE DIAMOND KNIFE

A. Development of the Diamond Knife

The preparation of ultrathin sections which were orders of magnitude beyond the lower limit of conventional microtomy was one of the most serious problems that had to be solved before cell and tissue ultrastructure could be studied by electron microscopy. The development of special ultramicrotomes (35,48,51,79,84) was an important contribution, but the preparation of satisfactory sections in the range of $0.01\ \mu\text{m}$ required knives of exceptional characteristics. Specially sharpened razor blades were unsatisfactory because of their relatively short life, corrosion, and other limitations.

The glass knife introduced by Hartmann and Latta (36) was a major improvement and has actually proved to be the most popular cutting edge when dealing with plastic-embedded specimens, despite their relatively short useful life and the basic limitations when hard materials have to be sectioned.

Systematic efforts were made to prepare knives from single-crystal sapphire, ruby, and other hard crystals, without success. It soon became evident that a hard crystal with a layered fine structure would be ideal, since the individual layers represent "preformed" knife edges. Thus, silicon carbide crystals could be cleaved and carefully abraded to produce sharp knives, but they were too brittle.

Diamond held a special fascination, since the diamond points used to rule with exquisite precision the diffraction gratings in Siegbahn's ruling engines exhibited such extraordinary longevity and resilience. However, these were natural points and not edges. Moreover, consultation with expert diamond grinders was most discouraging.

It was at this juncture that Professor Siegbahn, during one of his visits to the laboratory late at night, while we were waiting for the microscope to pump down, quietly suggested that I look into the wide variety of diamonds, particularly Brazilian boarts which exhibit a distinct layered structure parallel to the octahedron faces (see Fig. 9).

Thus began a systematic effort to determine the dimensions and orientation of the layered structures by combined application of replica techniques covering selected faces of the intact diamond to examine the lamellar surface structure by electron microscopy. This was followed by crushing the diamond into fragments thin enough for electron microscopy and diffraction.

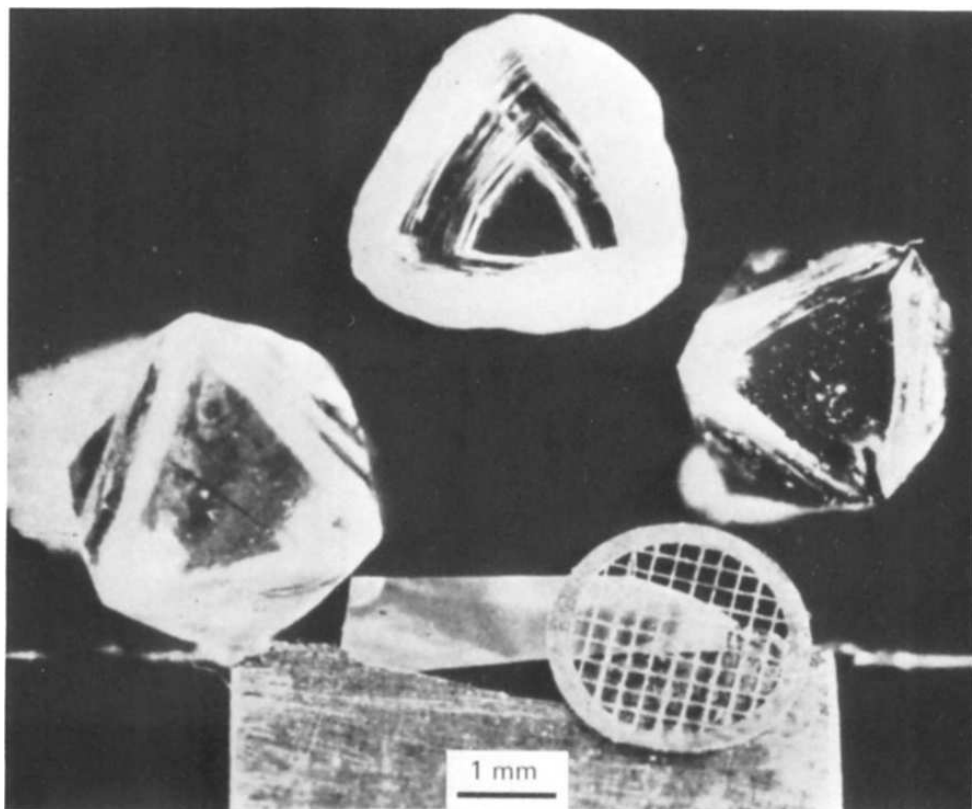


FIG. 9. Diamond knife for ultrathin sectioning prepared from selected Venezuelan or Brazilian industrial diamonds by special cleavage and sharpening techniques developed by the author [*Exp. Cell Res.* **5**, 255 (1953)]. During the past three decades the diamond knife with its unique properties has found worldwide application in ultramicrotomy and opened up new fields in precision machining and microsurgery.

As shown in Fig. 10 all fragments exhibited a typical layered crystalline structure of diamond, stacked up in piles down to the thinnest "unit layers" about 10 Å thick. This was also in agreement with the surface replicas of the intact diamond faces. Without the resolving power of the electron microscope this submicroscopic lamellar structure would never have been detected. In turn, the existence of these "preformed" edges, which could be dissected out after cleavage along certain planes, followed by careful abrading and polishing to produce extremely sharp edges, furnished the rationale for producing a diamond knife. The unique physical and chemical properties of diamond favored such an ultrasharp, yet stable, cutting edge. Diamond is the hardest and most wear-resistant material known; it has a very high compressive strength; the Young's modulus of elasticity is unapproached by any other substance; its relative rupture strength is very high; it is one of the most dimensionally stable materials, with a very low thermal

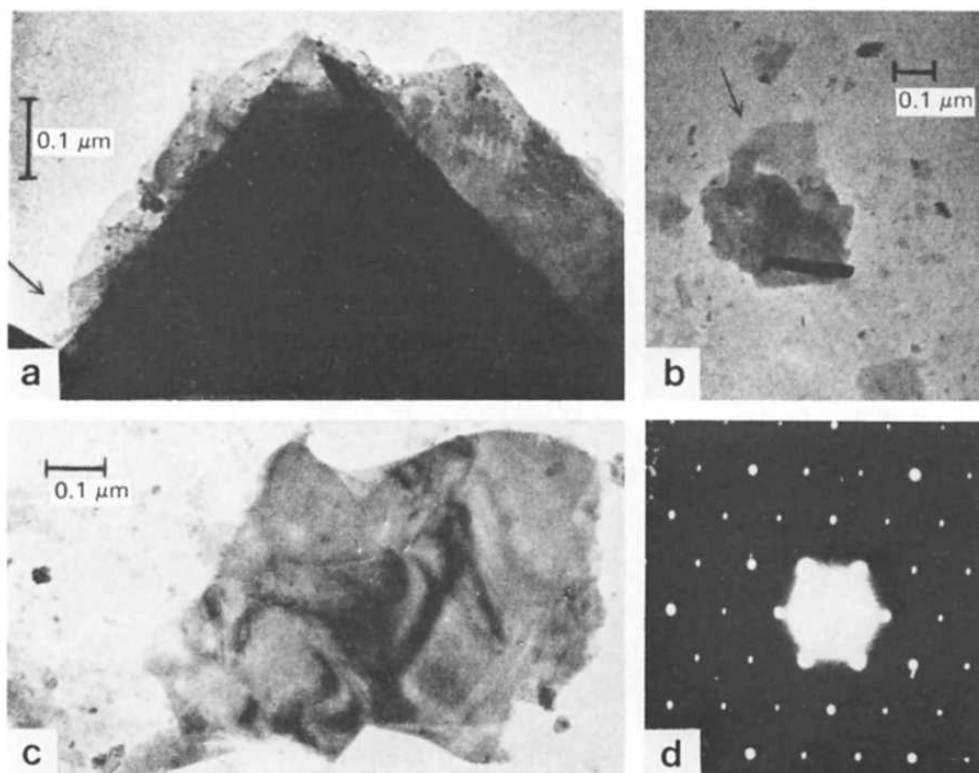


FIG. 10. Correlated electron microscopy and electron diffraction (d) studies of the layered crystalline structure of diamond (a and c) featuring unit layers of ~ 10 Å (b) provided the basis for producing an extremely sharp and uniform cutting edge of molecular dimensions, which is chemically inert and very durable. (H. Fernández-Morán, 1953–1958.)

expansion; it has very high thermal stability; and it conducts heat faster and more reliably than any other substance. Finally, diamond is practically chemically inert except under unusual conditions (see Fig. 11).

From this point on the conviction was firm that we were on the right track. Nevertheless, it took several years and a rather substantial investment in different types of diamond before we had solved the problems of mounting the diamond, finding the optimum orientation for cleavage, developing special high-speed grinding and polishing machines, and preparing the ultrafine diamond powder by ultracentrifugation, which was essential for the final polishing operation. All the costs were defrayed by a special research fund provided by my father, Luis Fernández-Morán. The unfailing encouragement and support of Manne Siegbahn were likewise essential. Throughout, the electron microscope proved indispensable together with phase-contrast light microscopy. Figure 12 shows an electron micrograph of a carbon replica of a diamond-knife edge exhibiting the characteristic layered structure derived from the oriented crystalline diamond lamellae.

Nevertheless, when we finally started testing the first diamond knives, many of the ultrathin sections showed knife tracks, and in some cases were actually shredded. Selection of the diamond was a critical factor, since some of the knives would often shatter upon testing or in the final phases of polishing. Still, the best diamond knives were of such high quality that they approached the ideal with the following characteristics: (1) extremely sharp and uniform edge over several millimeters, with a radius of curvature of 20 to 50 Å, yielding ultrathin sections of 100 Å or less, with a minimum of compression, and forming ribbons of serial sections of practically indefinite length; (2) all types of specimens could be sectioned, including metals, crystals, glass, and, particularly, frozen sections; (3) the diamond edge was extremely durable, resilient, and stable, performing reproducibly during constant use over pe-

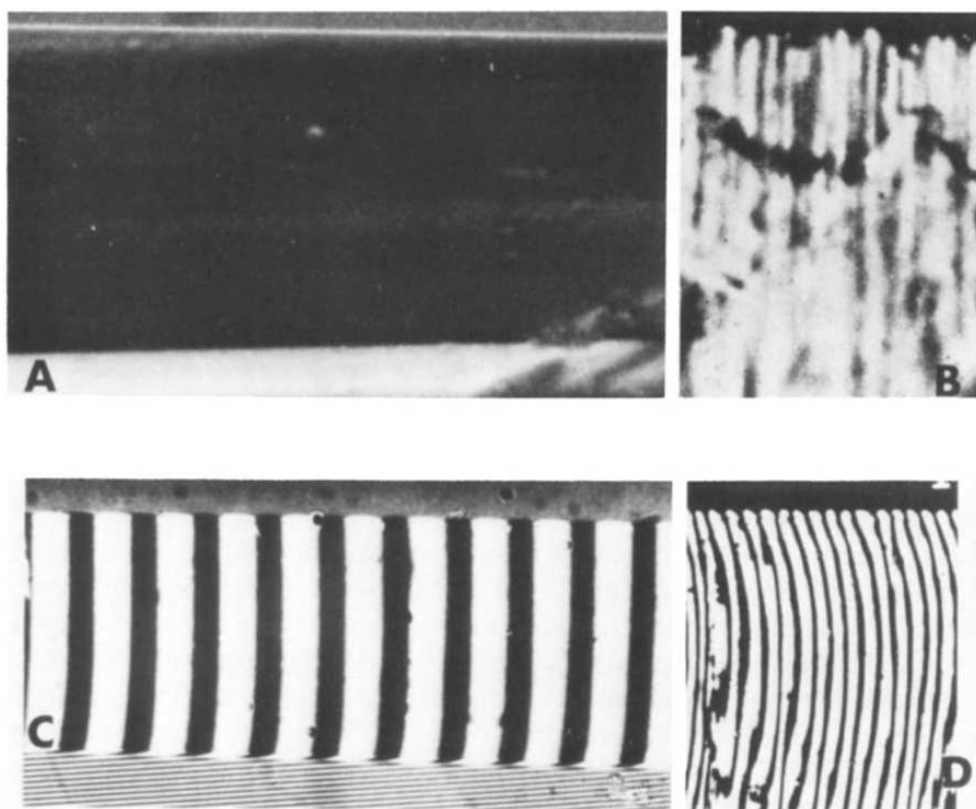


FIG. 11. (A) Diamond-knife cutting edge shown as very uniform bright line in dark-field micrograph. $\times 1000$. (B) Stainless-steel knife showing typical jagged cutting edge and furrowed facet in bright-field micrograph. $\times 1000$. (C) Diamond knife showing periodic spacing of uniform fringes indicating optical quality finish below $0.2 \mu\text{m}$. Interference micrograph. $\times 600$. (D) Polished razor blade cutting edge of type which was used for ultramicrotomy, showing irregular, distorted fringes in marked contrast to optical quality finish of diamond knife. Interference micrograph. $\times 1000$.

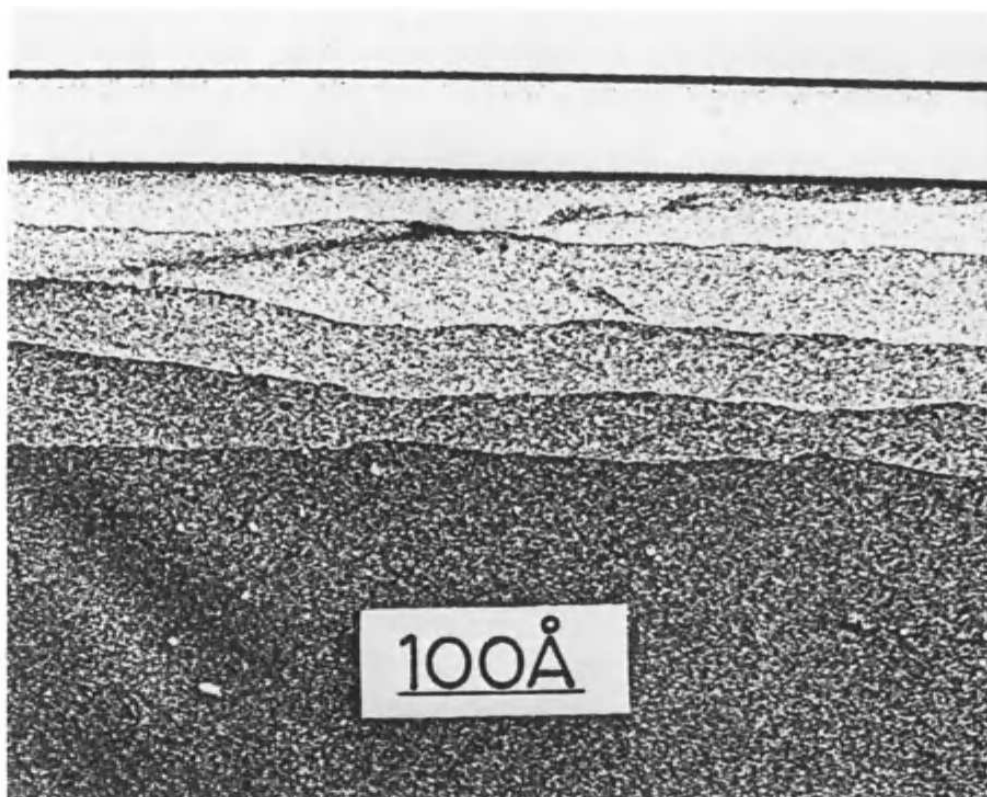


FIG. 12. Electron micrograph of carbon replica of diamond-knife edge and facet showing characteristic layered structure derived from the oriented crystalline diamond lamellae. It is this combination of layered structures in diamond with its unique properties which makes it possible to "dissect out" by adequate cleavage and abrading the preformed unit layers, and thus obtain the desired ultrasharp, stable cutting edges of molecular dimensions (10–15 Å).

riods of months and years when treated with care and properly used; (4) the diamond knife was chemically inert and did not contaminate the specimens. Production of the diamond knife was an edifying exercise in persistence and teamwork. It also demonstrated the indispensable role of electron microscopy in "seeing and doing" at the submicroscopic level, and marked its practical value in the field of precision diamond technology and ultraprecision machining.

At this stage, 1953, Fernández-Morán published the first paper on the diamond knife and its applications in ultramicrotomy (47). We had reached the goals set for a laboratory instrument.

B. The Diamond Knife and Ultramicrotome

Now the methods had to be refined, a reliable supply for selection of suitable diamonds was required, and adequate resources were needed to

achieve a satisfactory level of production of high-quality knives. An abundant supply of tested diamond knives would make extensive distribution possible. Having made and applied a superior cutting edge for ultramicrotomy, the diamond knife should be readily available to fellow electron microscopists in order to establish its performance and to enable sharing the experience of its use on different specimens (53).

Supplementing this project, an ultramicrotome was specially developed to fully utilize the characteristics of the diamond knife, particularly its capability for ultrathin sectioning of both soft and hard specimens. The design featured exceptional mechanical stability, compact arrangement of relatively few high-precision components, and the capability to operate without lubrication in a high vacuum or in a cryogenic environment. The Fernández-Morán Ultramicrotome (51) (Fig. 13) consists of a cylindrical rotor of specially hardened steel, machined and polished with microinch precision, which rests on two V-shaped bearings (provided with precisely aligned pol-

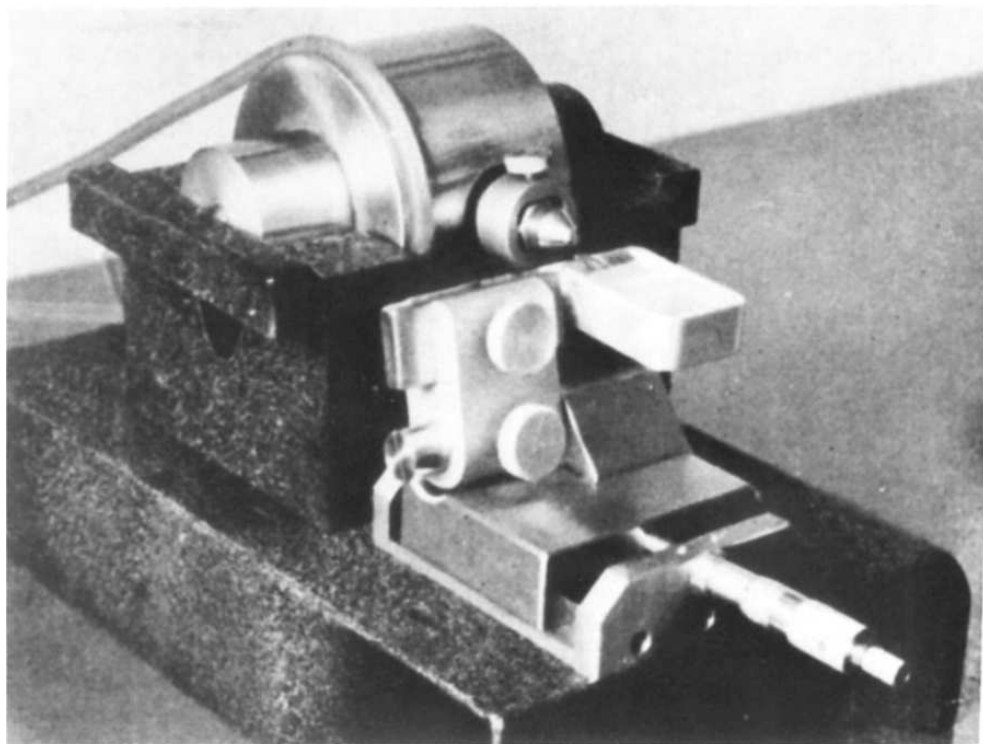


FIG. 13. Ultramicrotome for producing serial ultrathin (20- to 100-Å) sections of plastic-embedded or frozen biological specimens, crystals, metals, and other hard materials, developed and tested by the author in 1953–1954 (51). The diamond knife is held stationary while the specimen is advanced upon it at a carefully controlled rate, operating on the principle of thermal expansion of the specimen rod. A commercial version of this instrument was built and made available by Leitz–Wetzlar (143).

ished sapphire rods for optimum performance). Point bearings on both sides of the rotor prevent lateral excursion. Thus, exceptional stability and reproducibility of circular movement is guaranteed, without any lubrication and with negligible wear. The Invar specimen rod traverses the rotor through a radial hole, is firmly attached at one end, and contains an electrical heating element to control thermal expansion. The diamond knife is held stationary, firmly attached to a large trough which is rigidly clamped to a special stage. The diamond knife is moved forward until it contacts the specimen and slices off the first section. From then on the specimen is advanced toward the knife edge at a carefully controlled rate determined by the thermal expansion of the specimen rod, cutting an ultrathin section every time the precisely rotating specimen makes a single pass across the knife. The components of this prototype were built in the central workshops of the Nobel Institute for Physics, and of the Institute for Cell Research of the Karolinska Institutet, thanks to the expert help of Engineer R. Säfström. Assembly and testing of the ultramicrotome was carried out successfully by Mr. Josef Weibel, who supervised this project over the years. Professor Gunter Bahr (82) kindly shared his vast experience in quantitative electron microscopy, and made several constructive suggestions in the early stages of this work. A commercial version of this ultramicrotome, embodying several important improvements, was built and made available by Ernst Leitz GmbH in Wetzlar (1956–1958) (143).

The excellent performance of diamond knife ultramicrotomy with this instrument over a period of three decades is well documented in the corresponding publications (140). As shown in the illustrations, it proved to be of particular value in preparing ultrathin sections of tobacco mosaic virus (Fig. 18), of the insect compound eye with its tough chitin components (Fig. 22), and of the crystalline insect virus inclusions (Fig. 23). The basic design features of the cryoultramicrotome (Fig. 35) were derived from this instrument.

C. Applications of the Diamond Knife

Based on the methods developed by Fernández-Morán at the Nobel Institute in Stockholm, a systematic program was implemented to produce diamond knives of high quality in sufficient quantity to make extensive distribution possible. At the recently created Venezuelan Institute for Neurology and Brain Research (IVNIC) in Caracas, an abundant supply of Venezuelan alluvial diamonds (Fig. 14) and adequate research resources were available to produce and test diamond knives, many of exceptional quality. During 1955–1958 several hundred tested diamond knives were supplied, free of charge, to individual microscopists and to major scientific institutions throughout the world (Fig. 15) on the basis of an exchange of information (53). The response was most gratifying, and we received in

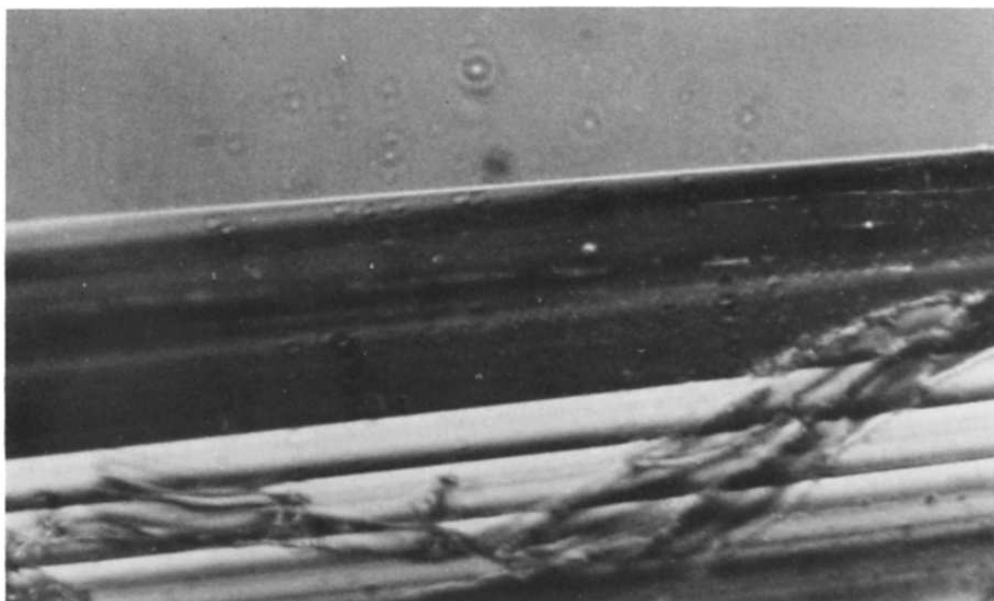


FIG. 14. Phase-contrast micrograph of diamond cutting edge prepared from carefully selected Venezuelan alluvial diamonds, which furnished some of the sharpest and most durable diamond knives. Many of these naturally occurring diamonds in certain regions of Venezuela exhibit characteristic surface striations which are similar to the striations described by R. C. DeVries (1973) in framesite bort-type diamond. He considers that these oriented deformation bands are strain-hardened, as a result of plastic deformation, and have a higher abrasion resistance than even the most abrasion-resistant (111) surfaces of diamond. In view of the experimental results obtained by DeVries, F. Bundy, and R. Wentorf (1980) in work-hardening of diamond, further studies are in progress to select diamonds for improved knives.

return a wealth of information on the performance and range of applications of the diamond knife. Professor J. Francis Hartmann, who together with H. Latta (36) had introduced the glass knife, wrote one of the most valuable letters, in which he discussed in detail the advantages of the diamond knife and generously stated "I consider it an invaluable contribution to the field of electron microscopy." Dr. Keith Porter of the Rockefeller Institute also provided critical and constructive evaluation. After 1958, an important contribution was made by T. G. Lewis and associates of the du Pont company, who developed special equipment and used diamond knives as an ultraprecise machine tool to cut optical-quality finishes up to $0.2\ \mu\text{in.}$ and to maintain accuracies approaching $1\ \mu\text{in.}$ on ductile alloys without polishing (138). The author has collaborated with the Instrument Division of du Pont in the evaluation of their diamond knife for cutting ultrathin sections during the past two decades, and wishes to acknowledge with appreciation the systematic approach supported by Daniel Friel, the improvements made by Robert Sebastian and his associates, and the significant contributions made recently by Dr. Frederick Keidel. A promising new application was pio-

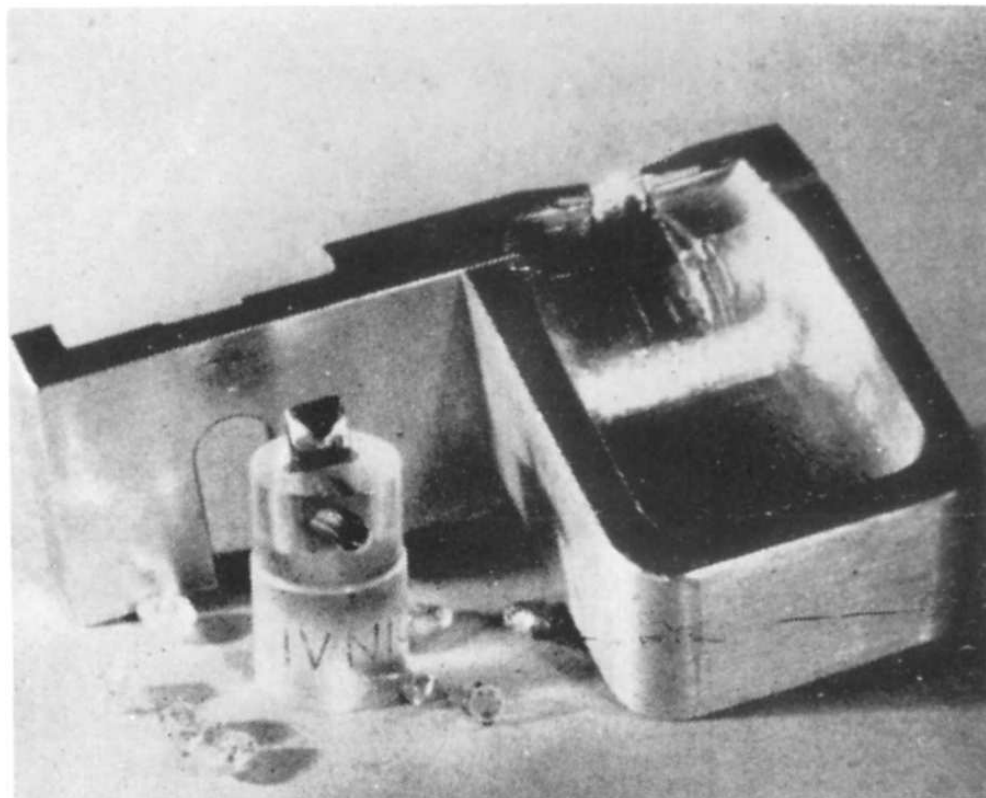


FIG. 15. Following the methods developed by the author in Sweden, production of the diamond knives in quantity was carried out at the Venezuelan Institute for Neurology and Brain Research (IVNIC) in Caracas during the years 1955–1958. Several hundred tested diamond knives were made available free of charge to major scientific institutions throughout the world, as a contribution of IVNIC to the fields of ultramicrotomy, ultrastructure research, and electron microscopy.

neered by Dr. Davis G. Durham, who in 1966 introduced a new instrument for cataract incisions by use of a diamond knife (Fig. 16) manufactured by the Instrument Products Division of E. I. du Pont de Nemours & Co., Inc., Wilmington, Delaware. The 60 cataract operations successfully performed by Dr. Durham represent the first known use of diamond knives in human surgery.

The story of the diamond knife and its applications has been related in such detail because it has evolved in such an interesting and unexpected way. Developed 30 years ago merely as a device for electron microscopy, it has since received worldwide acceptance as an unsurpassed cutting tool for precision machining, for production of complex optical components, and for delicate surgical operations, and has opened up important new fields (138–142).

The John Scott Award from the city of Philadelphia was bestowed upon

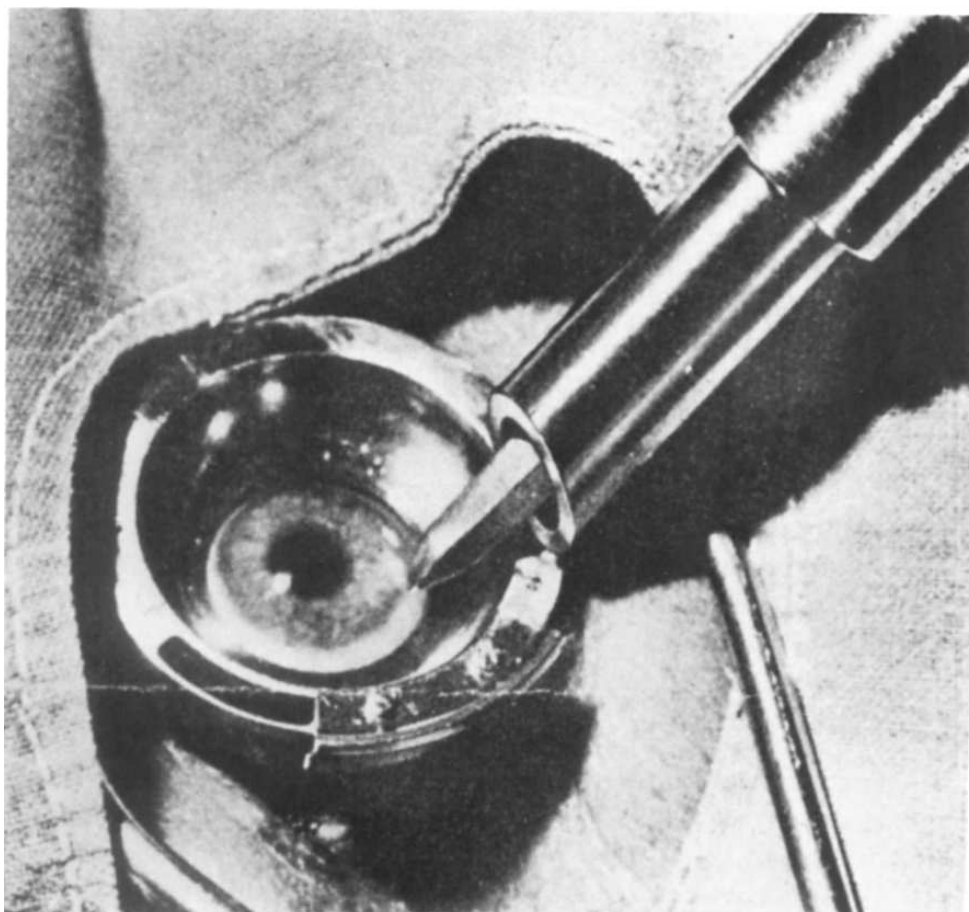


FIG. 16. Vacuum fixation device developed by Davis G. Durham, M.D., applied to the eye, showing the du Pont diamond knife in position for cutting. Over 60 cataract operations have been successfully performed with the diamond knife. This is the first known use of diamond knives in human surgery. [Courtesy of Dr. Davis G. Durham, *Del. Med. J.* 38, 202 (1966) (139).]

the author in 1967 for the invention of the diamond knife. This esteemed honor was unexpected, since the pleasure of having initiated a field and following its development, which seems to have a life of its own, is ample reward.

IV. THE VENEZUELAN INSTITUTE FOR NEUROLOGY AND BRAIN RESEARCH

A. Foundation and Research Activities

Fernández-Morán returned to his native country of Venezuela in 1954, invited by the Minister of Health, the distinguished physician Dr. P. A.

Gutiérrez Alfaro, and was assigned the mission of developing a regional center for research and training in neurology and brain research. The Venezuelan Institute for Neurology and Brain Research was founded in April, 1954, by decree of the President of Venezuela, as an autonomous government agency ascribed to the Ministry of Health, similar in status to the National Institutes of Health. With an initial endowment of 7 million dollars, and counting on the full support of the government and the Academy of Sciences, it was clearly understood that Fernández-Morán as chairman of an efficient executive board would concentrate on selecting a suitable site and start building the first research laboratories at the earliest opportunity. This would enable him to continue his own work, while attracting staff with the incentive of equipping their own laboratories with the most modern facilities. A site was selected with expert assistance, located in a beautiful mountain area 9 miles southwest of Caracas, 5000 feet high, with excellent climate and adequate water supply (Fig. 17). Within 7 months, the main roads and basic facilities had been built, and nearly 1 year later, between November 26 and December 2, 1955, the Laboratories of Nerve Ultrastructure (with electron microscope facilities installed and functioning), the Neurophysiology Unit, the Central Workshop (including the Diamond Knife Unit), the Library, and the Residences for staff and visitors were inaugurated (50).

Research work began before Christmas, 1955, and the first paper, on the fine structure of the insect retinula, was published in *Nature* in 1956 (52). The work on production, applications, and distribution of diamond knives (51, 53–55) proceeded steadily. Thanks to the devoted efforts of the administrative and engineering staff, construction work on the major institute project (which would ultimately cost more than 50 million dollars) continued independently, on schedule. One can still evoke the haunting memories of watching the ultrathin serial sections (barely 100 atoms in thickness) prepared by diamond-knife ultramicrotomy in the laboratory, and then stepping outside to see a team of tractors shaving off a barren mountain top—reflecting on when we would ever witness such contrasts in controlled manipulation across so many dimensional levels. Soon our work in high-resolution microscopy, and Gunnar Svaetichin's pioneering work in recording the spectral response curve from a single cone, began to attract visiting scientists. Professor Harold Urey and George Gamow were among the distinguished transient visitors. Professors Arne Engström, Gerhard Schramm, Helmut Ruska, Severo Ochoa, Bryan Finean, and the unforgettable Professor Erwin W. Müller, to name only a few, stayed longer and contributed much.

Here I can only refer briefly to a joint research project with the late Professor Gerhard Schramm of the Max-Planck-Institute for Virus Research



FIG. 17. The Venezuelan Institute for Neurology and Brain Research (IVNIC), located in the mountains 12 km south of Caracas. Founded in April, 1954, it soon became an international research center for nerve ultrastructure studies by electron microscopy, X-ray diffraction, and related techniques (1955–1958). Serving as a nucleus, it has since expanded (IVIC) and has played a major role in the scientific and cultural development of Venezuela during the past decades. [Courtesy of Professor Geoffrey H. Bourne, *Nature* **176**, 1049–1051 (1955) (50).]

which yielded interesting results on the structure of tobacco mosaic virus particles (61) and brought us indirectly in epistolary contact with the late Rosalind E. Franklin. Professor Schramm suggested that we apply the techniques of staining, embedding, and ultrathin sectioning to a study of the fine structure of tobacco mosaic virus particles by high-resolution electron microscopy. He pointed out that considerable information was already available on the structure of the tobacco mosaic virus based on X-ray diffraction studies of oriented preparations, which could be correlated with the results of biochemical studies. A concentrated preparation of tobacco mosaic virus furnished by Schramm was oriented by sucking it into thin plastic

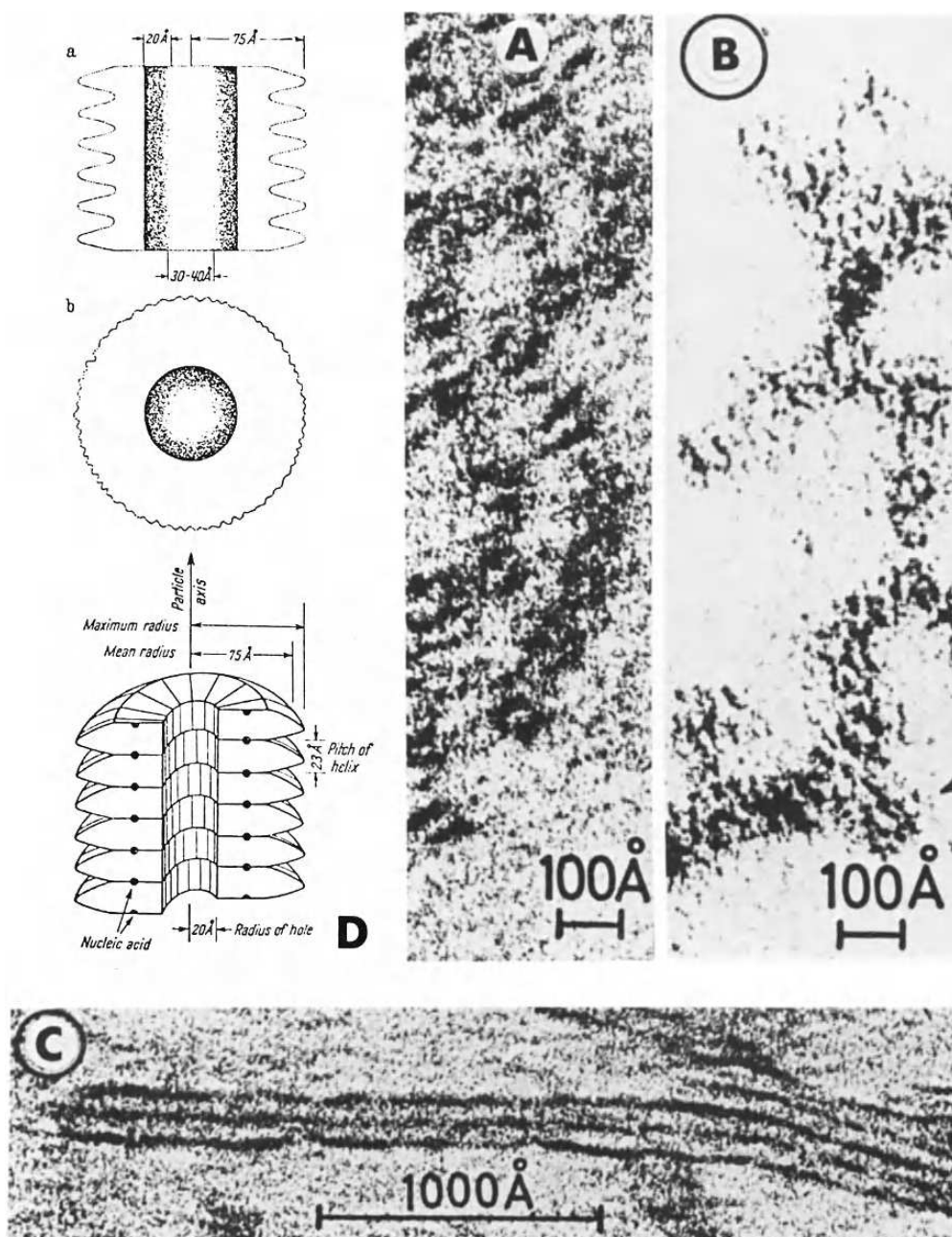


FIG. 18. (A) Transverse ultrathin section of TMV virus particles from oriented preparation stained with uranyl acetate showing light central area surrounded by dense annular structure with rosette-type (B) pattern. (C) TMV particle dried on specimen film and stained showing central channel. (D) Schematic diagram of the structure of a tobacco mosaic virus particle as revealed in thin sections by electron microscopy, compared with the model (a and b) postulated by Franklin, Klug, and Holmes (1956) based on X-ray diffraction studies. [From H. Fernández-Morán and G. Schramm, 1958 (61).]

capillaries, then stained with uranyl acetate, lanthanum acetate, phosphotungstic acid, phosphomolybdic acid, and ammonium vanadate. The stained preparations were embedded and ultrathin sections prepared by diamond-knife ultramicrotomy. Transverse ultrathin sections of TMV particles from oriented preparations stained with 1% uranyl acetate show a light central area with a diameter of 25–30 Å (Fig. 18A). This central hole is surrounded by a concentric ring of dense granules ~ 20 Å in diameter, with indications of a regular arrangement in a rosette-type of pattern (Fig. 18B). In longitudinal sections the central channel with a diameter of 30–40 Å could be seen, corresponding to the structures first described by H. Huxley in TMV particles dried on the specimen film and stained with 1% uranyl acetate (Fig. 18C). Although the results obtained were preliminary, the general picture of a cylindrical particle with a hollow axial core surrounded by a characteristic dense annular zone appears to be in agreement with the model postulated by R. E. Franklin, A. Klug, and K. C. Holmes (Fig. 18D) (from CIBA Foundation Symposium, 1956, Boston, Little, Brown, 1957, p. 39).

These studies demonstrated the advantages of thin-sectioning methods: (1) supplementary information on the internal structure of the TMV particles, which are relatively well preserved, can be obtained; (2) ultrathin sections make it possible to observe the fine texture of the virus particles in any desired plane, while displaying the repetitive features of internal structure which are present in regular paracrystalline arrays (61). During our long discussions with Professor Schramm I became interested in the personality and extraordinary talent of Rosalind Franklin. In 1958, when she planned to visit the United States, IVNIC wrote her a letter, inviting her to honor us by visiting IVNIC as a distinguished scientist. Part of that letter is reproduced on page 187 in Anne Sayre's brilliant and moving book on Rosalind Franklin and DNA (62). Her premature death was a great loss to all who knew her, and to science. Her planned visit to South America and to Venezuela and IVNIC in particular would have been a memorable event.

B. International Symposium on Nerve Ultrastructure and Function

The international symposium on "The Submicroscopic Organization and Function of Nerve Cells" held at the Venezuelan Institute for Neurology and Brain Research, March 15–22, 1957, under the auspices of the International Society for Cell Research, marks the acme of IVNIC. Professor G. H. Bourne's account in *Nature* (60) and the publication of the proceedings as a supplement to *Experimental Cell Research* (58) convey the spirit of cordial understanding, stimulating interaction, and exchange of new data which

prevailed during the meeting. An international group of 46 distinguished scientists spent a week enjoying the hospitality of Caracas, and drove up to the institute every morning where they spent the rest of the day, attending the sessions and visiting the laboratories. Inspection of the institute during the symposium "showed it to be the best equipped in the world for the application of physical techniques to the study of biological problems. Probably the most intriguing new technique demonstrated was that of nuclear magnetic resonance and its application to the measurement of rapid changes in the water content of untreated intact nerve" (60). Conforming to its title, the symposium centered around the fields of electron microscopy and nerve ultrastructure, electrophysiology, biochemistry, histochemistry, and spectroscopy. The papers at the symposium fell into five groups dealing with the nerve fibers, the nerve cell membrane, the neurons, the synapses, and the receptors. Nerve ultrastructure, as revealed by electron microscopy and low-angle X-ray diffraction, was an important contribution, particularly since most of the material presented was new and is still considered significant, more than two decades later. Nearly one-third of the participants were electron microscopists, including Hans Engström, Keith Porter, S. L. Palay, H. Ruska, E. De Robertis, and other distinguished pioneers. The classic papers on nerve fibers by Dr. H. S. Gasser of the Rockefeller Institute, by Dr. F. O. Schmitt of the Massachusetts Institute of Technology, and by Dr. A. von Muralt of The Hallerianum, Bern, were supplemented by the original contributions of Dr. J. B. Finean, who presented the results of X-ray diffraction studies of the nerve myelin sheath correlated with electron microscopy investigations carried out jointly with Fernández-Morán in the Department of Nerve Ultrastructure at IVNIC (56,58). Each paper contributed interesting new data on the various topics, and often led to lively discussions. Sometimes we would be witnessing the first correlation of hitherto unknown ultrastructural detail with functional data, e.g., electrophysiological recording from single neurons, or the elegant analysis of the receptor potentials from single cones using ultramicroelectrodes and techniques developed and applied by Dr. G. Svaetichin at the Neurophysiology Department of IVNIC. (See Figs. 19–23.)

The timeliness and significance of the symposium became increasingly evident as the accumulated data were discussed and the participants grew more familiar with the integration of structure and function. Moreover, we now realize the privilege of receiving the invaluable fund of knowledge and wisdom, based on a lifetime of experience, which was contributed as a legacy by such masters as Herbert Gasser, John Runnström, and Yngve Zotterman, who are no longer in our midst, but ever present in our thoughts. Dr. G. H. Bourne described the results of his recent histochemical studies, pointing out the high phosphatase activity along the membranes of the pyramidal cell

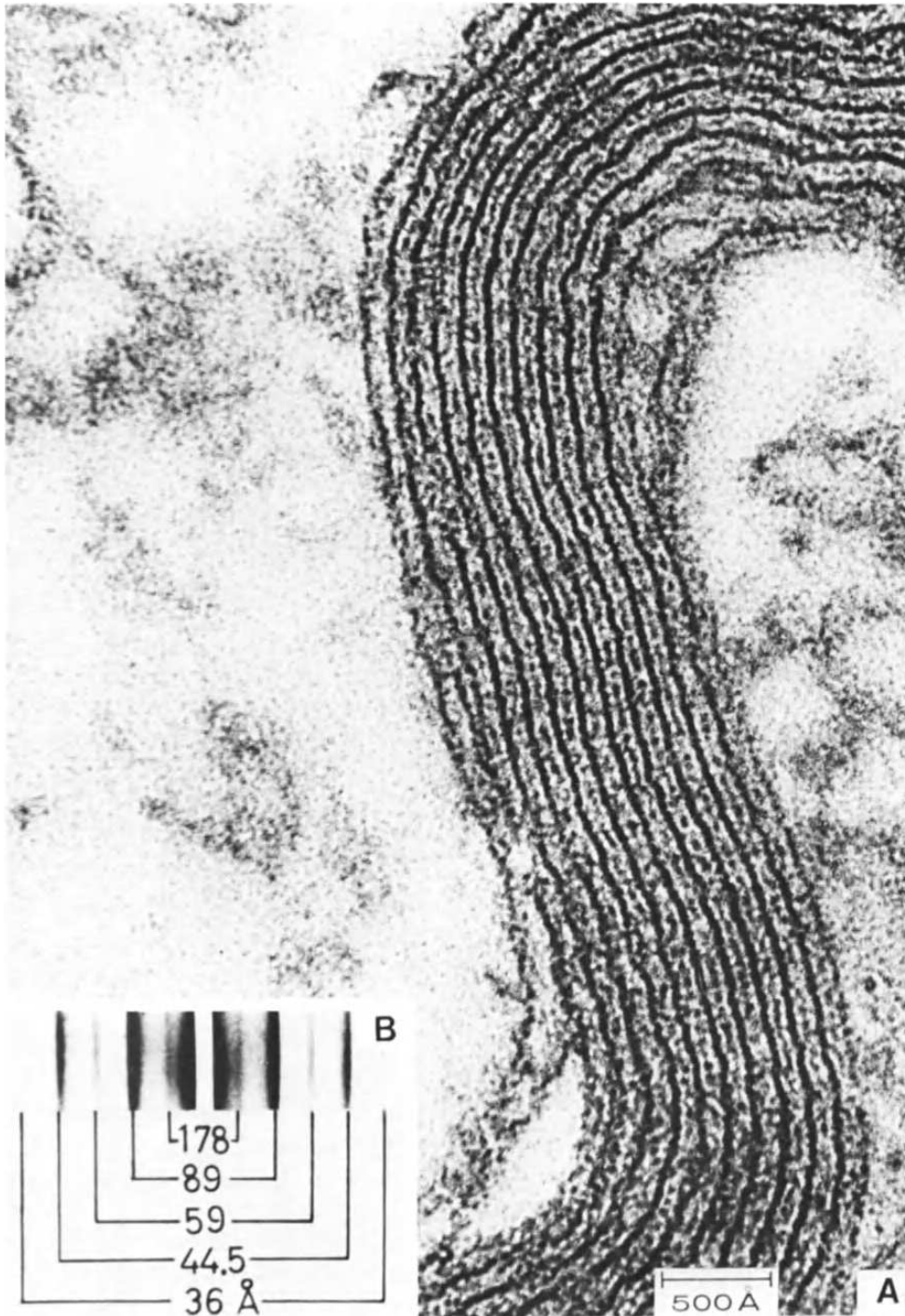


FIG. 19. High-resolution electron micrograph of myelin sheath segment from transverse thin section of frog sciatic nerve showing concentric array of dense and intermediate layers in cryofixation preparation. (B) Low-angle X-ray diffraction pattern of fresh sciatic nerve featuring a fundamental period of 178 Å with typical alternation of the intensities of the even and odd orders. [From H. Fernández-Morán (63,65,72).]

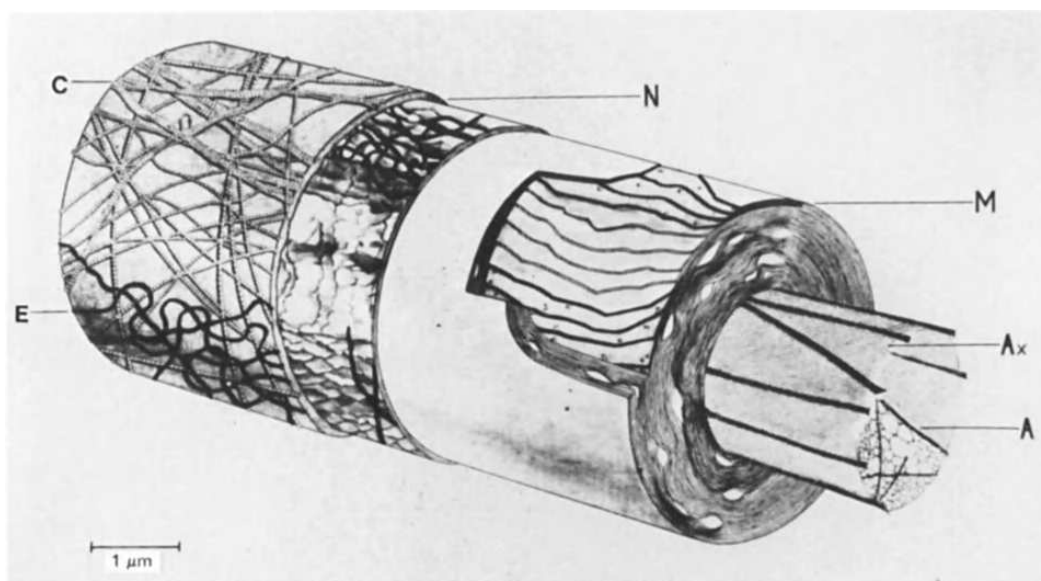


FIG. 20. Schematic diagram of the internode portion of a medullated nerve fiber based on electron microscopy of ultrathin frozen sections of osmium-fixed rat sciatic nerve, correlated with the results of polarized-light and X-ray diffraction studies. The neurilemma membrane (N), the concentric laminated structure of the myelin sheath (M), and the filamentous axon structure (A) are shown. Ax, axolemma; C, collagen; E, smooth fibrils. [From H. Fernández-Morán, *Exp. Cell Res.* **1**, 309 (1950) (43).]

dendrites, and particularly in the basal cells of the olfactory epithelium. Dr. J. H. Luft described the fine structure of electric tissue of fishes, depicting a characteristic system of tubules and vesicles extending from the plasma membrane into the cytoplasm of the electroplate. According to his hypothesis, this system may account for ion transport in electric tissue.

Dr. H. Hydén, S. O. Brattgård, and J. E. Edström of the University of Göteborg, Sweden, gave an impressive account of the application of their pioneering ultramicrochemical and quantitative cytochemical methods for the determination per nerve cell of ribonucleic acids (RNAs) and the protein and lipid fractions to studies of nerve regeneration. The data obtained, which permitted quantitative analysis of individual neurons on the cyto-scale, were correlated to the peripheral growth of the axon. During the maturation period one of the striking features is the 100% RNA increase and the volume increase of 100%. Dr. George Wald, from the Biological Laboratories of Harvard University, gave a masterful presentation on the "Photochemical Aspects of Visual Excitation." This paper described interesting correlations of the biochemistry of visual systems with the molecular basis of visual excitation, and it advanced numerous suggestions bearing on the structural relations between a retinal rod and a peripheral nerve cell, and

between the pigment epithelium and the sheath of Schwann. Dr. Fernández-Morán described the fine structure of the light receptors in the compound eyes of insects, which is of particular interest in view of their remarkable functional capacities, including the ability of insects to orient themselves by polarized light. This paper (58,59) and the exhibit of electron micrographs also served to illustrate the singularly favorable conditions prevalent at IVNIC for studying the wealth of tropical insect forms with appropriate techniques, including ultrathin sectioning of the delicate yet tough insect chitin by diamond-knife ultramicrotomy. Representative specimens of compound eyes with different types of image formation, in-

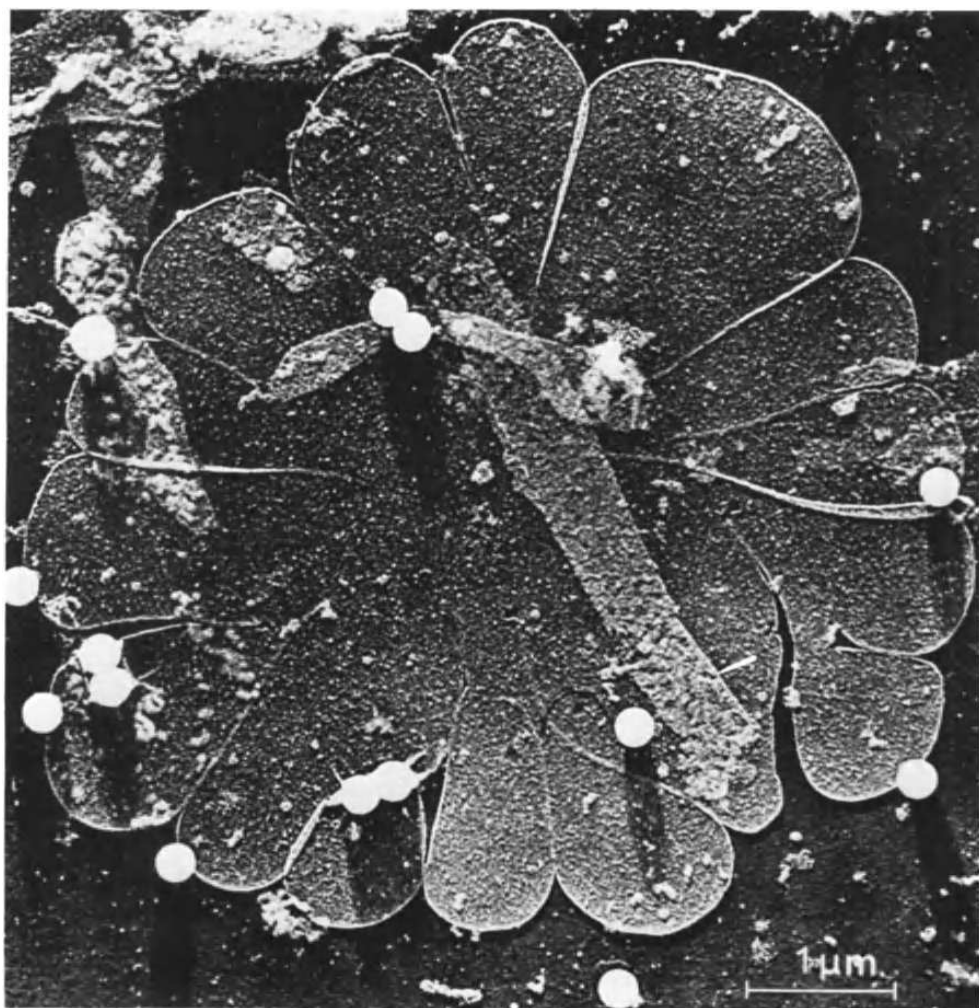


FIG. 21. Single-unit disk isolated from the outer segment of frog retinal rod showing the granular surface structure and the marginal cord. Latex particles (2800 Å in diameter) have been added for calibration in this shadowed preparation (48).

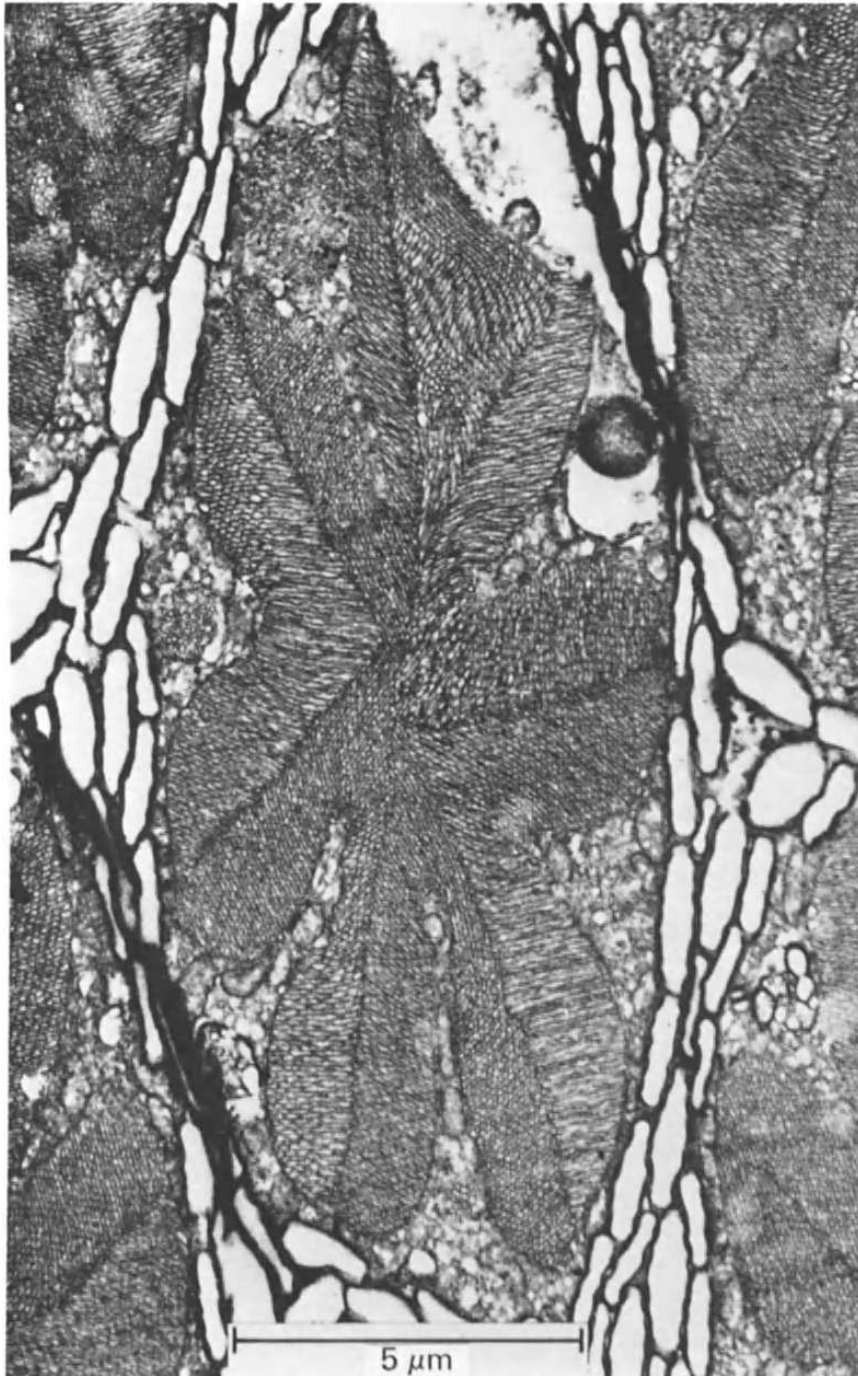


FIG. 22. Oblique cross section through photoreceptors from the compound eye of the tropical moth *Erebus odora* showing the ordered fine structure of its components. Diamond-knife ultramicrotomy was essential in examination of the insect eye with its tough chitin framework (59).

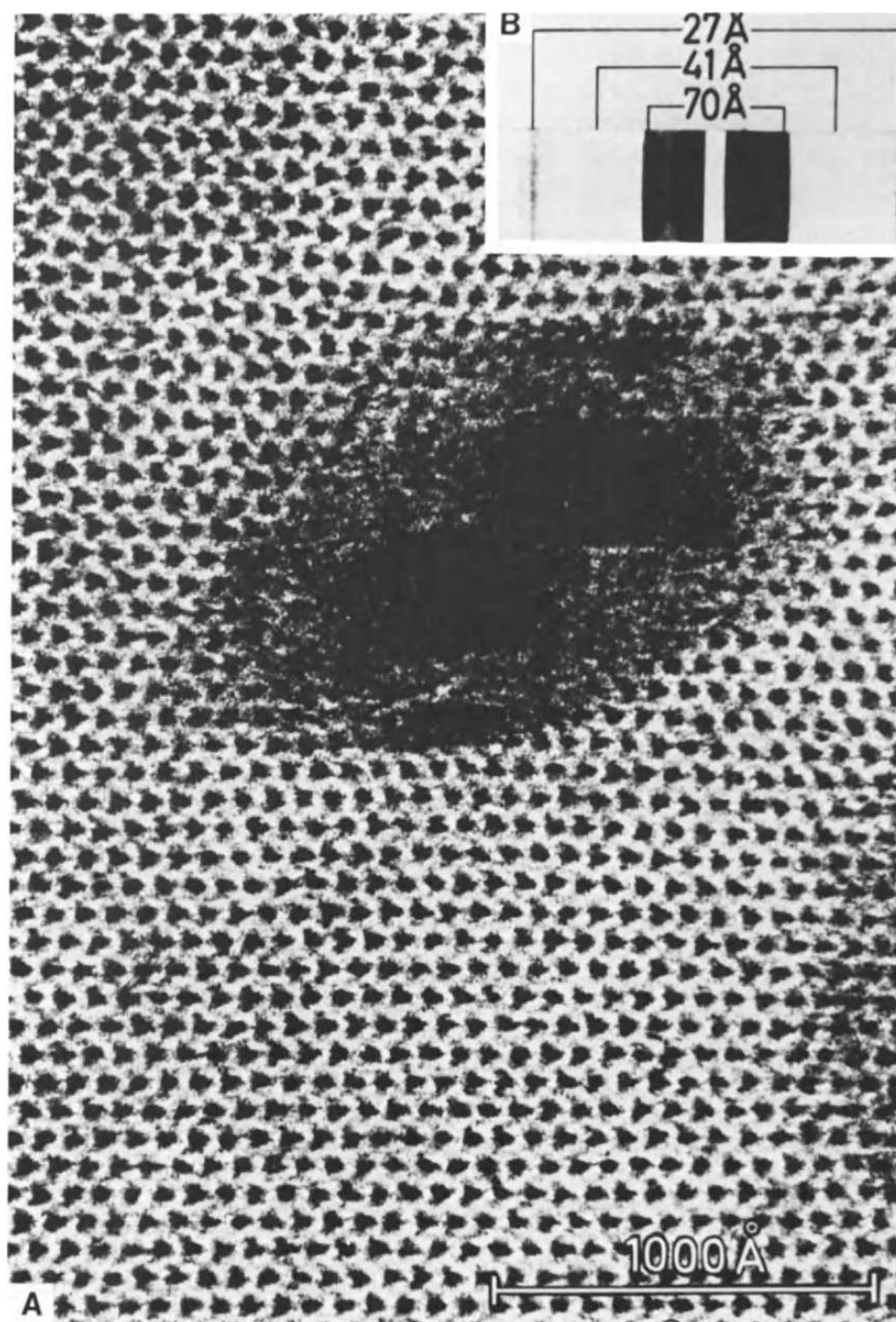


FIG. 23. (A) High-resolution electron micrograph of ultrathin section prepared by diamond-knife ultramicrotomy from a crystalline insect virus inclusion showing highly ordered molecular organization of the protein matrix surrounding the virus. Correlation with the low-angle X-ray diffraction pattern (B) yielded additional information [IVNIC, 1957 (86)].

cluding the large compound eyes of the giant tropical moth *Erebus odora*, were examined. Recent electron microscope studies of the differentiated elements of the retinula cells called rhabdomeres by T. H. Goldsmith and D. E. Philpott, by J. J. Wolken, J. Capenos, and A. Turano, and by W. H. Miller [*J. Biophys. Biochem. Cytol.* 3, 429,441,421 (1957)] were confirmed and extended. The constituent rhabdomeres in all types of rhabdoms examined are built up of numerous closely packed rod-shaped or tubular units which vary from 400 to 1200 Å in diameter. Within each rhabdom the rhabdomeres are radially arranged in a symmetrical pattern formed by matched pairs of rhabdomeres, which exhibit similar orientation of internal structure and are usually located opposite to each other (52,58). The available data supported the assumption that the individual rhabdoms, which are composed of radially arranged rhabdomere pairs with molecular layers of the dichroic visual pigment similarly oriented in their periodic compartment structures, may correspond to the functional units of the analyzer for polarized light postulated in the compound eye. The remarkable ability of the insect to recognize the regional patterns of polarization of the sky as a basis for light-compass orientation would then involve a coordinated activity of these functional units at the level of the ommatidial groups (58). This preliminary survey, published 25 years ago, served as a basis for systematic investigation of the submicroscopic organization of the compound eyes and of the associated neural pathways within the optic lobes.

All taking part agreed that the symposium was a considerable success: "There is no doubt that the Venezuelan Institute for Neurology and Brain Research has been scientifically launched . . ." (60).

Following the symposium, 1957 was a year of intense work and innocent felicity. The publications from that period attest to the wide range of activities. A comprehensive paper on "Electron Microscope and Low-Angle X-Ray Diffraction Studies on the Nerve Myelin Sheath" (56) was published, reporting on a close correlation between high-resolution electron microscopy and low-angle X-ray diffraction studies of the myelin sheath after controlled experimental modifications, carried out in collaboration with Dr. J. B. Finean, who made significant contributions.

One of the most interesting and rewarding projects was initiated by the late Professor Erwin W. Müller, from the Field Emission Laboratory of the Pennsylvania State University, who in 1957 kindly accepted our invitation. Dr. Müller shared our interest in the possible application of this powerful technique to certain biological problems. He brought with him one of his low-temperature field ion microscopes, and proceeded shortly after his arrival to set up the instrument, using the Collins Cryostat for producing liquid helium installed in our Low Temperature Department to provide a liquid-helium-filled cold finger, instead of the usual liquid hydrogen, for our exper-

iments. His extraordinary experimental skills and his virtuosity in making the pointed filaments were inspiring to watch, and the author learned how to make pointed filaments of tungsten, which were to play an important role in high-resolution electron microscopy. Figure 24 shows the helium-ion image of a tungsten tip cooled with a liquid-helium-filled cold finger recorded by Professor Erwin Müller at IVNIC in 1957. Although these experiments were preliminary, he opened up a new world, described in his classic papers (67), and we shall always cherish the memories of his visit with us at IVNIC.

The New Year of 1958 was ushered in by one of those drastic phase changes, known as revolutions, not uncommon in South America. We continued our work at the institute, unaware of its magnitude. Shortly before my planned trip to attend a Biophysics Meeting in Washington, on January 13, 1958, I was called by my good friend, the late Dr. P. A. Gutiérrez Alfaro, Minister of Health, to whom I was deeply indebted for his support of IVNIC, and I was asked to accept the post of Minister of Education on a temporary basis. To this day, I consider it a privilege to have served at his side, although my tenure as Minister of Education was to last only 10 days. However, during this time I experienced the equivalent of an intensive postgraduate course in collective human behavior, trying to cope with irrational aspects of human nature. However brief, this other kind of apprenticeship, both complex and arduous, served at age 34, made a lasting impression, and conferred an added dimension of understanding and tolerance for future endeavors.

On February 14, 1958, the author turned IVNIC over to a recently appointed director and administration. Bequeathed in a spirit of objective cooperation was the nucleus of a functioning research institute, located on an ideal site of 2000 acres, only 12 km southwest of Caracas, constituting the basis for a self-contained scientific community, with its own roads, water supply (designed to serve 30,000 people), electrical power plant, and 10,000-kW substation (137). In addition, sufficient funds were available or firmly committed to guarantee the continuation of the project. Most importantly, IVNIC, during the initial phase of less than 4 years since it was founded in 1954, had broken new ground and was the first successful demonstration in Venezuela of an institute capable of conducting basic research in an organized fashion and on a long-term basis. Scientifically and quite literally IVNIC had put Venezuela on "the map" of the international scientific world, having produced original research in the field of fundamental brain research and the neurosciences, as clearly demonstrated during the International Symposium held in 1957.

The institute has since expanded, and, under the name IVIC (Venezuelan Institute for Scientific Research), during the past 25 years it has provided

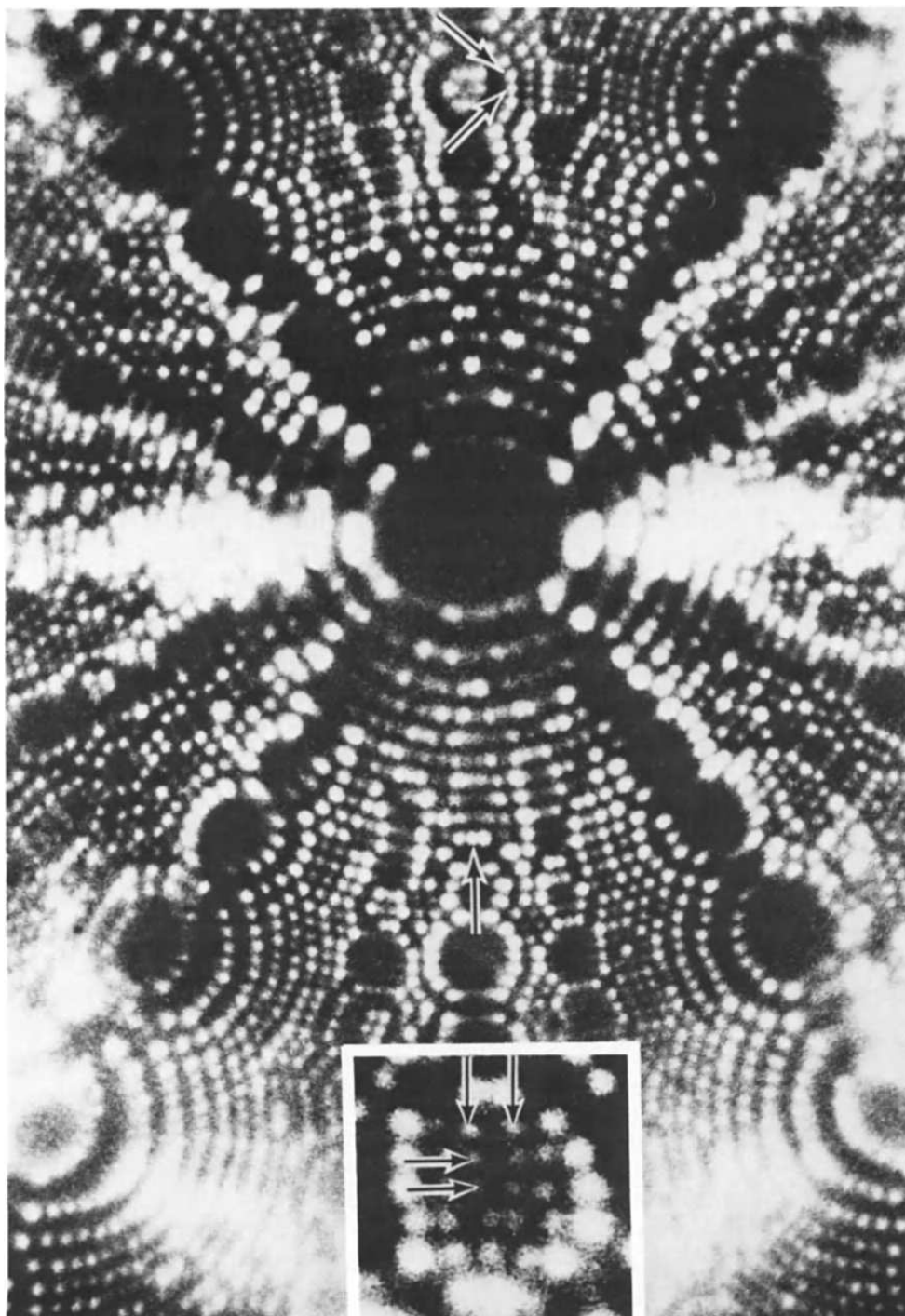


FIG. 24. Helium-ion image of a tungsten tip (~ 600 Å in radius) cooled with liquid-helium-filled cold finger (~ 10 K) recorded with a field ion microscope (67) by Professor Erwin Müller at IVNIC in 1957. Resolution in the (111) plane (inset) is 2.74 Å.

a new generation of Venezuelan scientists with all the resources to carry out basic research and training. It has played a major role in the scientific and cultural development of Venezuela and of neighboring countries.

Two weeks later, in late February of 1958, the author and his family left Venezuela, and were cordially invited by Professor Francis O. Schmitt to visit Boston. Thanks to the gracious hospitality and the wholehearted support received from Professor Schmitt and Dr. William H. Sweet, Fernández-Morán joined the staff of the Neurosurgical Service of the Massachusetts General Hospital, where he organized the Mixter Laboratories for Electron Microscopy. He was also associated with the Biology Department of the Massachusetts Institute of Technology, where he continued his work in close cooperation with Professor Schmitt, and also with Professor Samuel C. Collins (85,125) at the Cryogenic Engineering Laboratory. The work on high-resolution and low-temperature electron microscopy of biological systems described here was carried out in this ideal environment from 1958 to 1962.

V. LOW-TEMPERATURE ELECTRON MICROSCOPY AND ULTRAMICROTOMY

A. *The Submicroscopic Organization of Vertebrate Nerve Fibers*

Based on the polarized-light analysis of the myelin sheath (18) and on long-spacing X-ray diffraction patterns featuring the first four orders of a fundamental spacing of 171 Å in amphibian nerve and 184 Å in mammalian nerve recorded by Schmitt, Bear, and Clark (19) from undamaged whole nerve, the general features of the myelin sheath's ultrastructure could be deduced. Schmitt arrived at the following conception: "Essentially the sheath consists of lipid-protein layers about 180 Å thick wrapped concentrically about the axon" (20). This appeared to be an ideal system for correlated electron microscope studies.

Thanks to the generous hospitality granted by Professor T. Caspersson, director of the Institute for Cell Research and Genetics, Karolinska Institutet, the author was able to apply the new RCA EMU electron microscope (34) and other facilities for high-resolution studies of nerve fibers. Beginning in 1949, a series of systematic studies were carried out and the following results published over a 3-year period (42-44,48).

In order to avoid the severe extraction of lipids and other artifacts of usual methods requiring embedding, a technique was developed which makes it possible to prepare *ultrathin serial frozen sections of unembedded fixed or fresh nerve* (42-46). In this modification of Newman, Borysko, and Swerdlow's method (35), cooling with carbon dioxide is used to operate the thermal

expansion advance mechanism and at the same time to freeze the wet, unembedded specimen. Combined with supplementary methods for ultrathin sectioning, the following structures were described in the internode portion of rat and frog nerve fibers (43,44):

1. (a) The myelin sheath exhibits an extremely regular concentric laminated fine structure in transverse and longitudinal thin sections, and the individual layers are approximately 80 Å thick. Unit lamellae of similar dimensions can be isolated from the fragmented sheath. Based on these observations a general concentric laminated structure of the myelin sheath is assumed (Fig. 20) which is in good agreement with the results of polarized-light and X-ray diffraction studies. However, the average thickness of 80 Å determined for the single layers by electron microscopy would correspond to only half the value of the 158-Å X-ray spacing demonstrated in dried mammalian myelinated nerve. (b) The sheath is covered with a compact granular membrane ~ 200 Å thick corresponding to the neurilemma (N) with associated collagen and smooth fibrils, mainly longitudinally arranged in bundles.

2. The axon of well-preserved fresh nerve fiber sections contains fila-

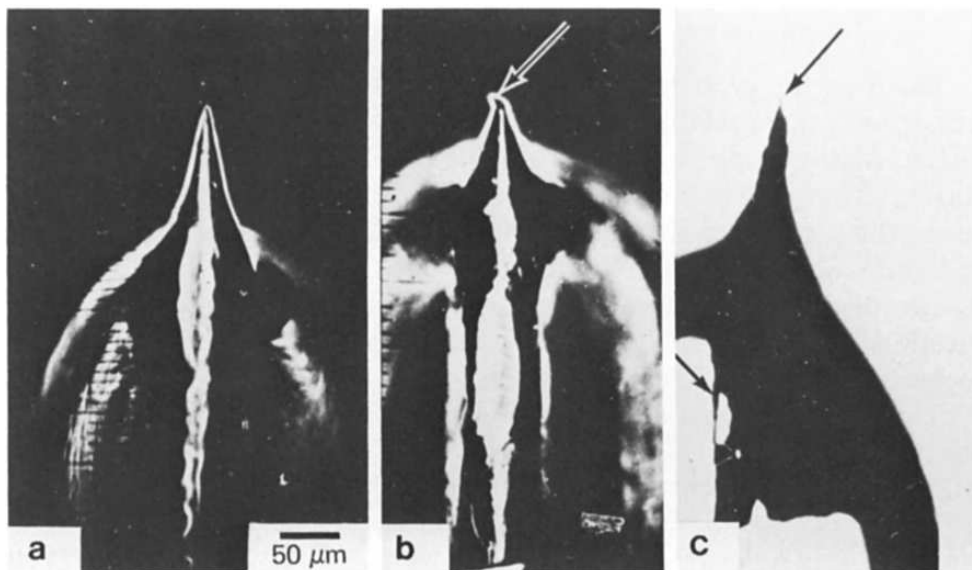


FIG. 25. Pointed filaments with etched, oriented tungsten single-crystal tips showing preservation of critical cathode profile: (a) annealed tip before use, (b) filament after 40 hr, and (c) after 100 hr operation in Siemens Elmiskop I at 40–100 kV. [H. Fernández-Morán, 1960 (68).]

ments (100–200 Å diameter) of indefinite length, with regularly spaced axial discontinuities, and predominantly longitudinal arrangement (44).

3. (a) New types of submicroscopic nerve fibers (0.1–1 μm diameter) were found in the lateral funiculus of rat and frog spinal cord. The finest fibers consist of a single 100-Å filament within a tubular membrane. (b) Unmyelinated nerve fibers are constituted by compact bundles of 100- to 200-Å thin filaments invested with a single membrane of ~ 100 Å.

4. These findings indicate that the structural elements of all types of nerve fibers are fundamentally similar, and point to a common pattern of organization in myelinated fibers of all sizes and in the so-called unmyelinated nerve fibers (44,47,49).

Similar techniques for preparation of ultrathin frozen sections by “cryo-ultramicrotomy” were successfully applied in studies of bacteria, spermatozoa (45), pollen (46), and other labile structures.

B. High-Resolution Electron Microscopy and Low-Dose Electron Diffraction

1. Low-Temperature Electron Microscopy with Microbeam Illumination

A Siemens Elmiskop I operating at 40–100 kV, equipped with multiple objective apertures (64), was provided with improved pointed filaments of oriented single-crystal tungsten (Fig. 25) (68) (see also Fig. 28) and used with the double-condenser system to provide intense microbeam illumination of high coherence. With this arrangement enhanced contrast and improved resolution (~ 8 – 10 Å) were obtained in suitably thin sections or negative-staining embedding preparations (Fig. 26) (71,72). Specimen damage by irradiation can be considerably reduced by suitable combination of low-intensity electron optics and improved specimen cooling devices. With the new pointed filaments and the double-condenser system fitted with apertures of 50– $10\ \mu\text{m}$ it is also possible to obtain microbeams of 0.5– $0.1\ \mu\text{m}$ diameter and of extremely low intensity. By focusing on adjacent areas and then shifting the low-intensity microbeam (59,64,71), useful micrographs were recorded on high-speed emulsions [i.e., Tri-X sensitized with gold thiocyanate solutions] from extremely labile components (Fig. 27). A Leisegang liquid-nitrogen stage was used to cool the thermally insulated specimen support ($\sim 130^\circ\text{C}$) provided with special shielding devices to prevent specimen contamination (Fig. 26) (76). Several of these techniques were used in the study of multienzyme complexes [e.g., pyruvate dehydrogenase

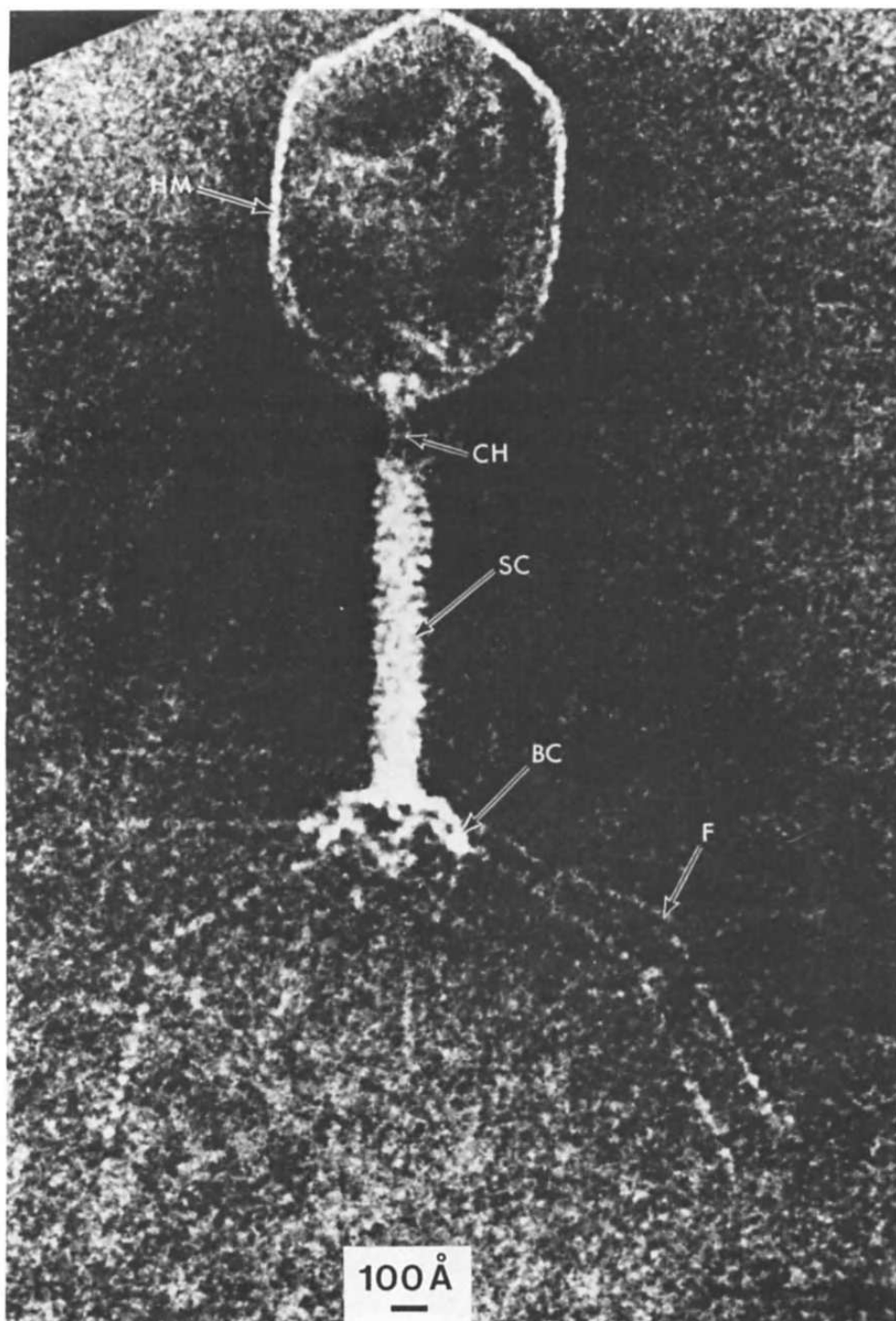


FIG. 26. Bacterial virus, a T2 bacteriophage, showing complex organization of the head (HM) and tail fiber (F) components as revealed in this negatively stained preparation by low-dose electron microscopy with microbeam illumination using pointed filament (76). CH, Collar; SC, sheath; BC, base plate.

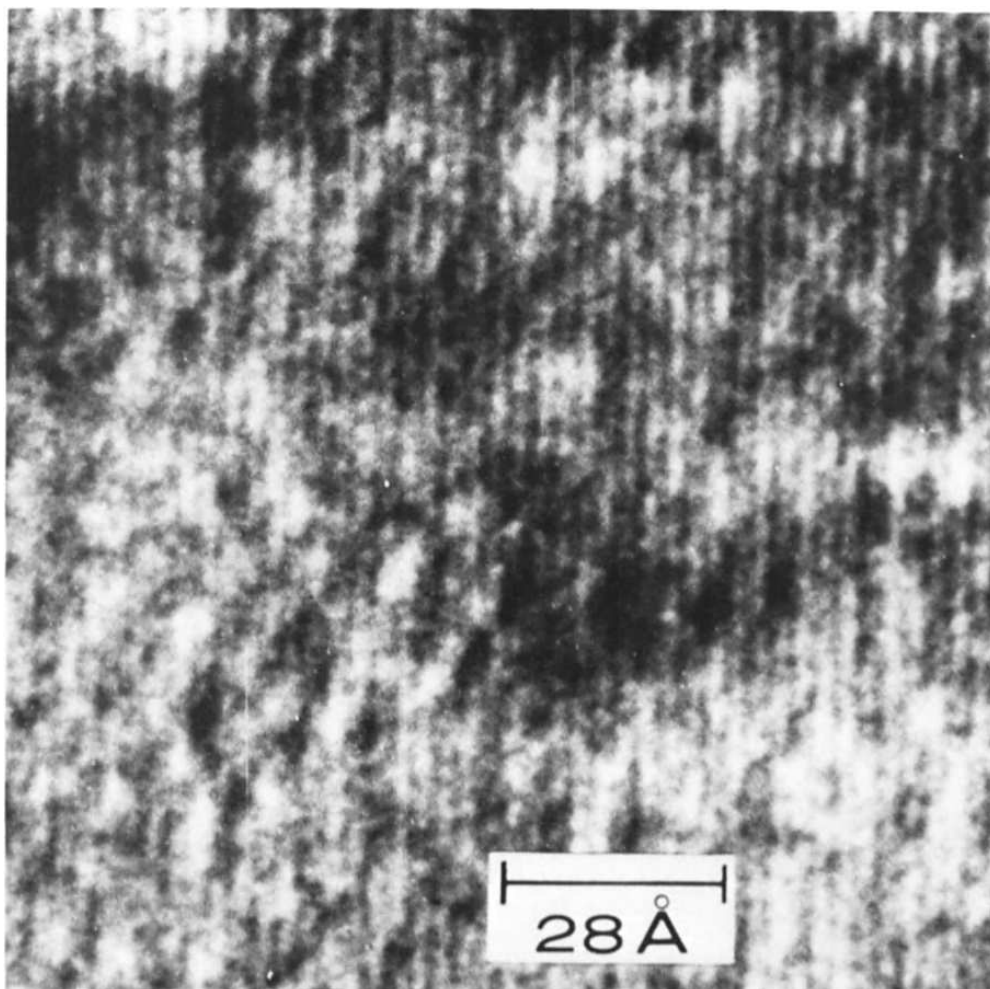


FIG. 27. High-resolution electron micrograph of thin NaCl crystal showing lattice spacing of (200) planes. Spacing resolved is 2.815 Å by direct (axial) low-dose illumination method using special tantalum pointed filaments of the Fernández-Morán type (68,71).

complex, studied in collaboration with Dr. L. Reed *et al.* (77)]. Low-dose microbeam illumination was also essential in the study of mitochondrial membranes in collaboration with Dr. David Green *et al.* (78).

2. Low-Temperature and Low-Dose Electron Diffraction

The described techniques proved to be particularly useful for electron diffraction studies of organic crystals. Useful electron diffraction patterns with a complete two-dimensional reciprocal lattice net have been recorded with a limiting resolution of 1.8 Å (71).

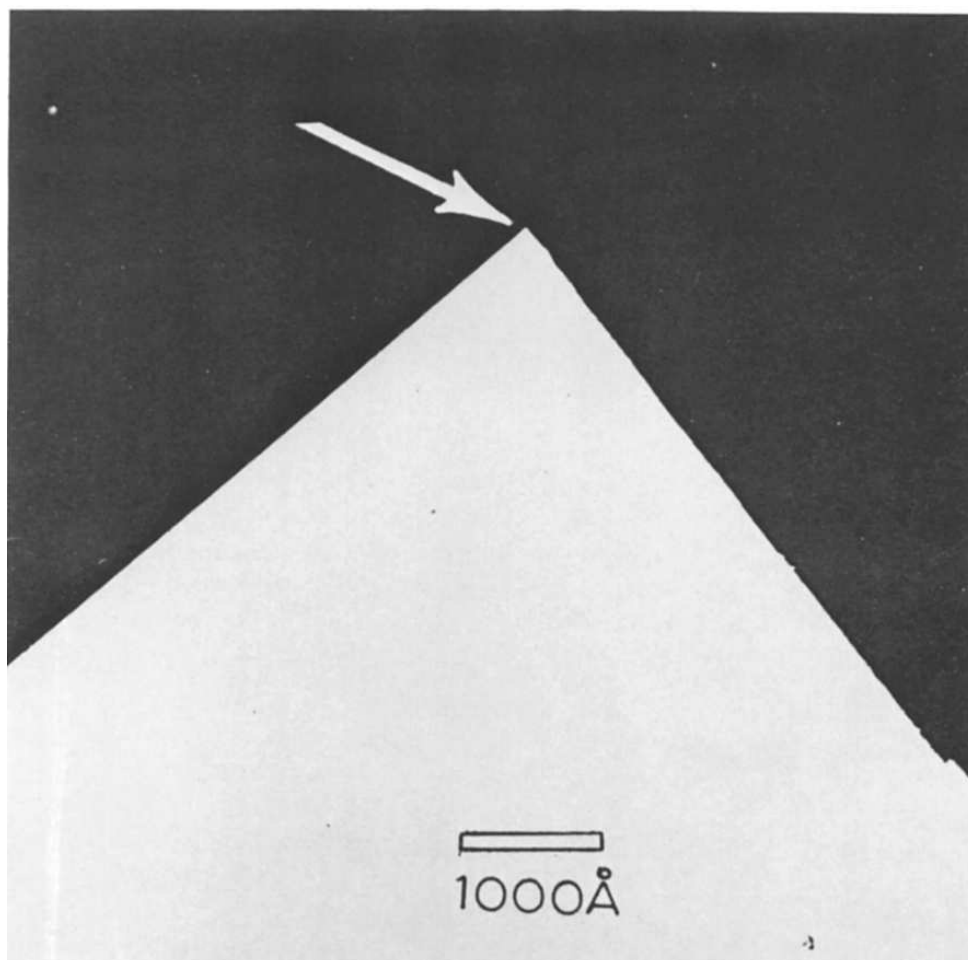


FIG. 28. Single-crystal diamond-point cathode developed by Fernández-Morán (93,102,113) with a tip radius of approximately 100–500 Å after coating with tungsten, rhenium, or zirconium. These practically “permanent” point cathodes can be periodically “re-coated” to provide stable, coherent microbeam illumination under optimum conditions (93,113).

VI. CRYO-ELECTRON MICROSCOPY

A. Study of Biological Systems at Liquid-Helium Temperatures

Low-temperature preparation techniques provide one of the most promising approaches in electron microscopy of biological specimens since rapid freezing suspends all physiological activity, immobilizing and preserving labile tissue constituents. Liquid helium II, the low-temperature form, appears to represent an ideal refrigerant for rapid or ultrarapid freezing of

biological systems under certain conditions because it exhibits the unique properties of heat superconductivity and superfluidity at temperatures 100°C lower than those obtained with the standard liquid-nitrogen coolant mixtures (85). The most abundant stable isotope (^4He) of this noble gas condenses at 4.2 K into a colorless low-density liquid, helium I, which boils and evaporates rapidly because of its extremely small heat of vaporization. At temperatures below 2.19 K, called the lambda point, it undergoes a second-order transformation, and the low-temperature liquid phase, designated liquid helium II, exhibits the unique properties of thermal superconductivity, superfluidity, formation of a thin film, and other strange physical properties.

The spectacular nature of this transformation can be seen every time liquid helium II is prepared. When liquid helium I, contained in a shielded Dewar, is evaporated under reduced pressure, it boils violently. As the temperature falls below the lambda point, bubbling suddenly ceases and a limpid column of quiescent liquid helium II fills the inner Dewar vessel (Fig. 29). This bulk liquid will conduct heat about 10,000 times better than will copper. Moreover, liquid helium II flows so rapidly through the finest capillary channels that it appears to have almost zero viscosity.

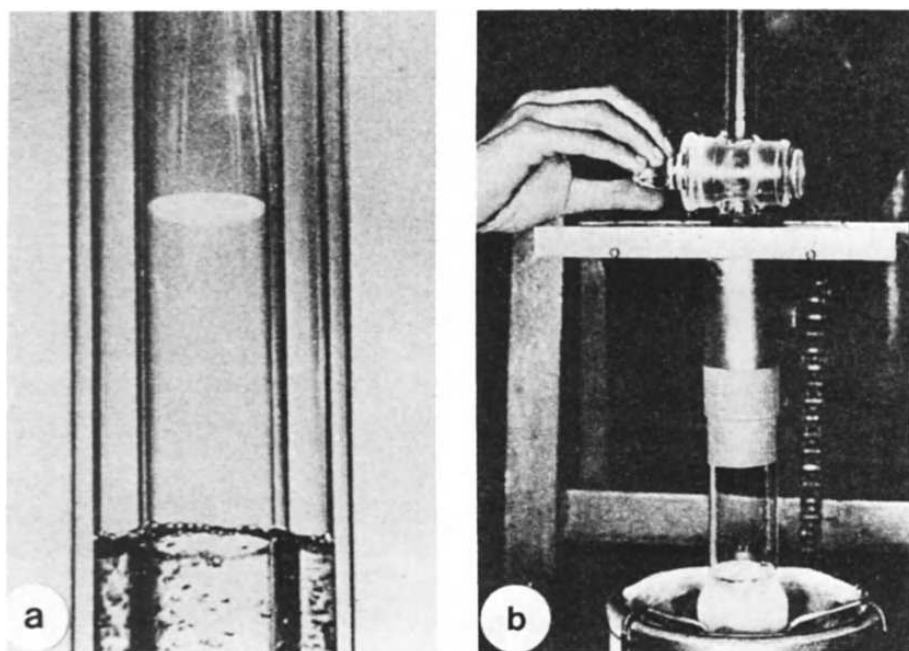


FIG. 29. (a) Liquid helium II in shielded Dewar vessel at 1 K showing characteristic quiescent appearance of the superfluid helium filling the inner Dewar vessel. (b) Specimen stage for introducing minute biological specimens in helium II. [H. Fernández-Morán, 1960 (65,85).]

Thanks to the generous hospitality and guidance provided by Professor Samuel C. Collins and his associates at the Cryogenic Engineering Laboratory of the Massachusetts Institute of Technology, the author was able to develop special preparation techniques and become acquainted with cryogenic experimental procedures. Preliminary studies of the immersion process of microdroplets of cell components were also carried out by means of high-speed photography in collaboration with Professor Harold E. Edgerton of the Department of Electrical Engineering (Fig. 30), indicating very rapid cooling rates. During a 4-year period (1958–1962), improved low-temperature preparation techniques for electron microscopy of biological tissues were devised and applied by Fernández-Morán (64–66), which yield better morphological and histochemical preservation of myelin (Fig. 19), lamellar systems, and other cell components. These “cryofixation” techniques (71,72,76,85,86) are based on rapid freezing of fresh or glycerinated tissues

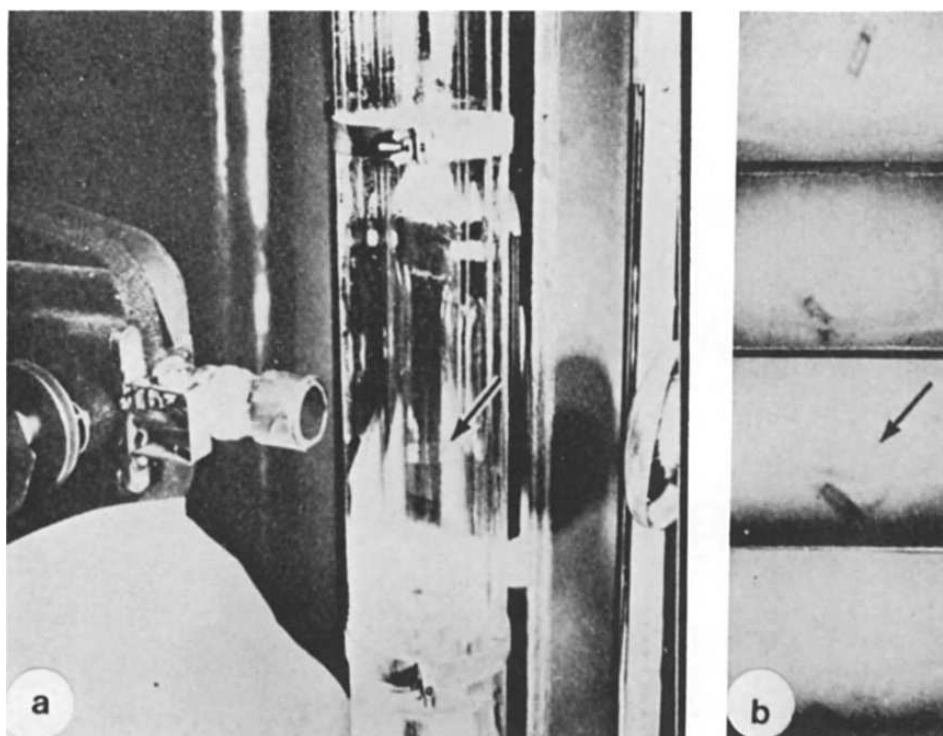


FIG. 30. (a) Liquid helium II (arrow) in shielded Dewar with attached photographic devices. The characteristic quiescent appearance results because of the exceedingly high heat conductivity of helium II: a temperature difference between top and bottom of the liquid column sufficiently great to allow the formation of vapor bubbles cannot be produced. (b) Serial high-speed photographs showing immersion of minute specimen in liquid helium II without producing boiling (65,85). (Courtesy of Professor Harold E. Edgerton, Department of Electrical Engineering, MIT, 1959–1960.)

with liquid helium II at $1-2^{\circ}$ above absolute zero, followed by freeze-substitution and embedding in plastics under conditions which minimize ice crystal formation, artificial osmotic gradients, and extraction artifacts. The survival of living organisms, including bacteria, spermatozoa, sensitive cells, and tissues, which are first treated protectively with glycerol then frozen with liquid nitrogen or liquid helium, has since been well established. By ultra-rapid cooling with liquid helium II it may be possible to preserve the native cellular organization, including the essential water component, the transient intermediates with unpaired electron spin which participate in metabolic electron transfer, and other free radicals.

B. Development of Cryo-Electron Microscopes with Superconducting Lenses

Following our work on specimen preparation techniques at liquid-helium temperatures (65,85), major developments in the generation of high-field superconducting magnets with solenoids of niobium–tin or niobium–zirconium alloys (92,100) suggested the design of new types of electron microscopes. These “cryo-electron microscopes” (Fig. 31) (86,88,89) operating at liquid-helium temperatures would embody the following significant advantages: (1) high-field superconducting lenses with unprecedented time stability when driven in the “persistent-current” mode; (2) operation at liquid-helium temperatures, resulting in the decisive features of ultrahigh cryogenic vacuum, minimized specimen contamination, reduced specimen radiation damage, and thermal noise; (3) optimum conditions for both low-voltage and high-voltage electron microscopy; (4) high-efficiency image viewing, electronic image intensifiers, and recording devices would make it possible to use high-speed cinematography and stroboscopic recording (e.g., obtained through pulsed T–F emission from pointed filaments) for attainment of high temporal resolution combined with high spatial resolution (88). Preliminary experiments with the first cryo-electron microscopes using high-field superconducting niobium–zirconium solenoid lenses demonstrated the exceptional time stability of the images when operating in the persistent-current mode at 32.2 kG (88,89,91).

The first electron micrographs of biological specimens were recorded at liquid-helium temperatures (4.2 K) by Fernández-Morán with a specially designed superconducting objective lens (89,91,93). This superconducting lens type, which can be adapted to replace the objective lens in modified high-resolution microscopes (89,91,99,100), comprises niobium–zirconium coils equipped with a cold ferromagnetic circuit, used without or preferably with polepieces, and including a cryogenic specimen stage of exceptional specimen stability. The entire lens assembly is immersed in

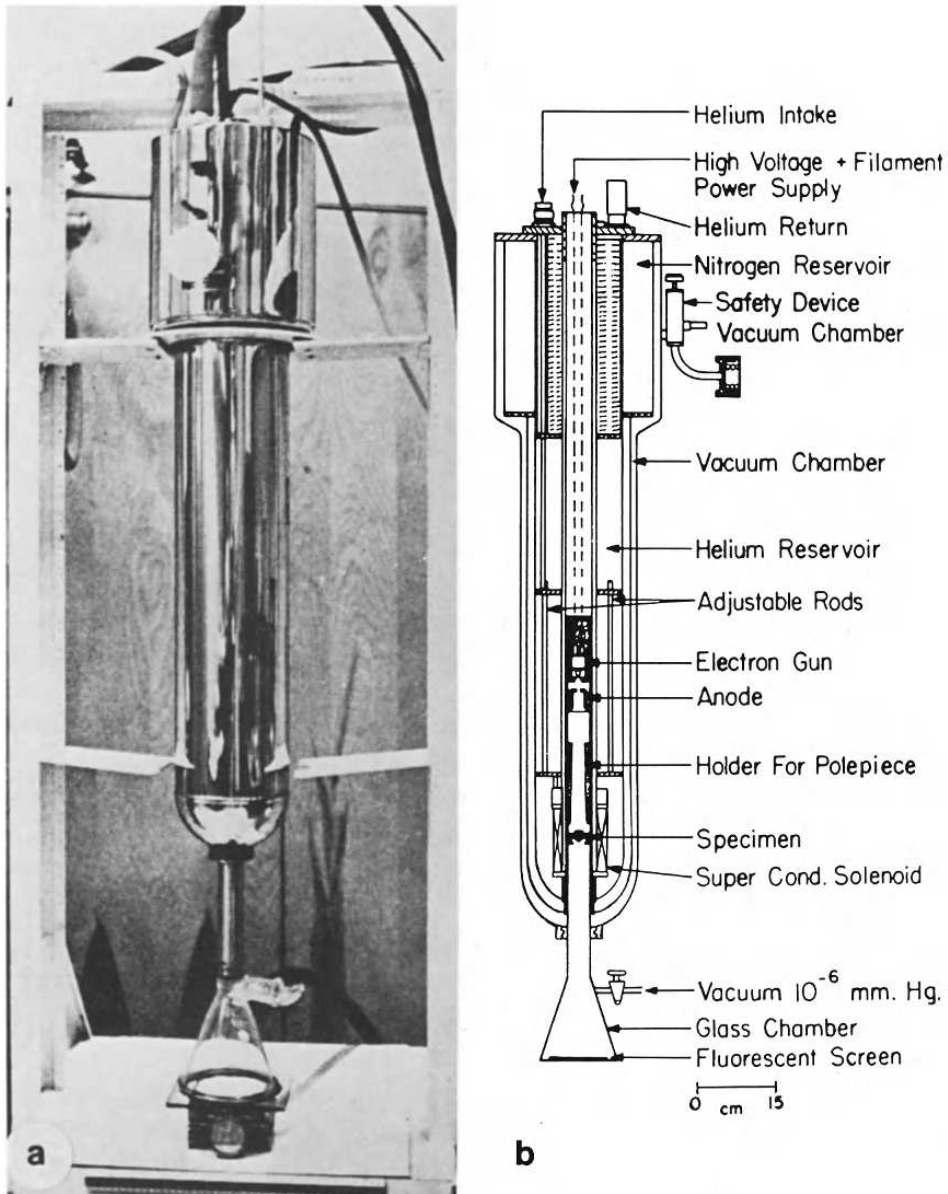


FIG. 31. (a) Photograph and (b) diagram of basic equipment for electron microscopy with high-field superconducting lens, comprising air-core liquid-helium Dewar with superconducting solenoid (operating at 32,200 G in persistent-current mode), and inserted experimental electron microscope. [H. Fernández-Morán, 1965 (88).]

liquid helium and is fully shielded by several concentric cryogenic devices from the warmer parts of the microscope. The complete lens with its superconducting control circuitry was contained in a flat Dewar (89,91,100) which served as a prototype for subsequent work with superconducting

lenses (see Fig. 32). An important feature of the superconducting regulating circuitry, including stigmators and correction coils, is that extremely fine field-strength adjustments (a few parts in 10^7 – 10^9) can be made without leaving the persistent mode. This is essential for achieving reproducible “superfine focusing,” which is orders of magnitude better than conventional lens current regulation systems (89,91,102,113,128). The high electrical and mechanical stability permitted long exposure times with low-intensity mi-

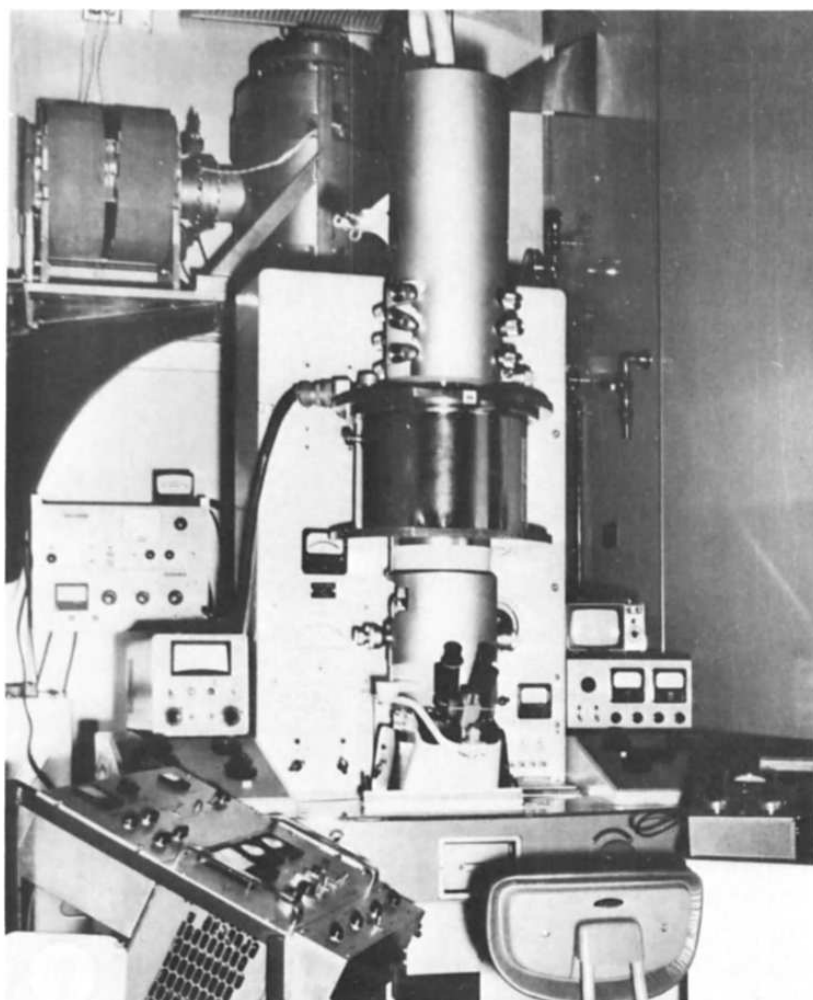


FIG. 32. Experimental high-resolution cryo-electron microscope with special superconducting objective lens assembly in flat cryostat, power supply with persistent-current switches and improved current-control devices, ultrahigh-vacuum ion pump system, magnetic shielding, image intensifier, and vibration-isolated base [H. Fernández-Morán, 1966–1970 (89,91,92,98,100).]

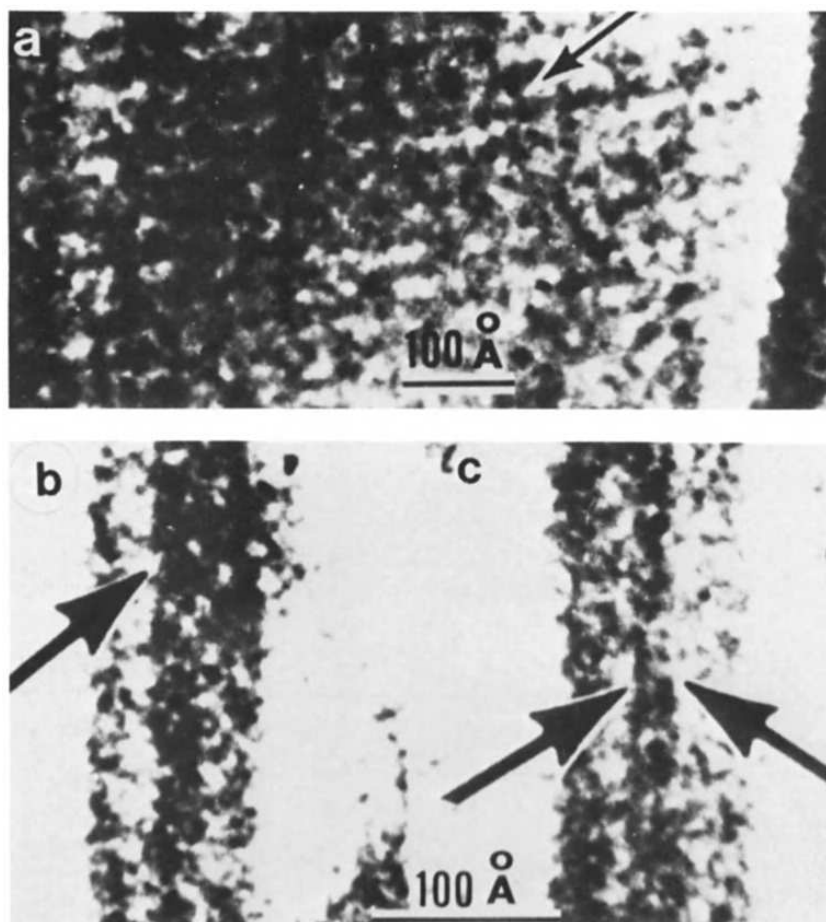


FIG. 33. First high-resolution “cryo-electron micrographs” of biological specimens: (a) catalase crystals, and (b and c) asbestos specimens recorded at liquid-helium temperature (4.2 K) with cryo-electron microscope using superconducting objective lens in persistent-current mode and low-dose, microbeam illumination. [H. Fernández-Morán, 1966–1967 (89,91,93).]

crobeam illumination, thus yielding reduced radiation damage with reproducible resolutions of 8 nm in catalase crystals and 1–2 nm in asbestos (see Fig. 33) (89,91,93,98,102,113,131).

Systematic efforts by several international research groups working independently during the past two decades have contributed to the development of cryo-electron microscopy (87,90,94–97,103,104,107–117). The development and application of the shielding lens by Dietrich and co-workers during the past 16 years deserves special mention because of its outstanding performance (131–133).

C. The Collins Closed-Cycle Superfluid-Helium Refrigerator

The operational conditions of the cryogenic system must be optimized to obtain reproducible performance at a reasonable cost. Thus, in order to reduce the vibrations introduced by boiling helium at 4.2 K we soon found it necessary to use superfluid helium at 1.8 K (98,99,102,113). The unique nonviscous flow properties of superfluid helium and its singularly high thermal conductivity yield distinct advantages for operation of the superconducting lenses, improvement of the performance of the specimen stage at a lower temperature (1.8 K), and considerable reduction of vibrations in the cryostat.

Professor Samuel C. Collins and his associates (98,102,113) have made large quantities of superfluid helium available thanks to a special closed-cycle helium II refrigerator featuring a novel heat exchanger developed and tested by them. With the assistance of Professor Collins and M. Streeter the large-scale, closed-cycle superfluid-helium refrigerator (Fig. 34) was installed and fully integrated with the modified 200-kV cryo-electron microscope in our laboratory. After elimination of superleaks the centrally located unit with its long transfer lines demonstrated for the first time the feasibility of routinely supplying superfluid helium at 1.8–1.9 K with a 20-W refrigeration capacity at a rate of 5–8 liters/hr. Thanks to the extraordinary long-term support of Dr. Orr Reynolds and Dr. George Jacobs of NASA's Life Sciences Division this entire project was funded and brought to fruition during the critical 10-year period of 1964–1974.

With liquid-nitrogen precooling, the rate of liquification approaches 216 liters of helium II per day. During several years of flawless operation more than 190 successful experiments were performed, permitting prolonged vibration-free examination of different types of organic and biological specimens under conditions of significantly reduced radiation damage and thermal noise (98,102,113,128). The closed-cycle refrigerator can be run continuously or intermittently, since a prolonged maintenance of liquid-helium temperatures has been observed in the cryogenic stage of the microscope connected with the superfluid-helium system for periods of up to 29 min after all of the refrigeration equipment had been turned off. In fact, the capacity of this refrigerator is so vast that very large Dewars with improved superinsulation could be filled with several hundred liters of helium II, adequate to provide individual cryo-electron microscopes for weeks at a time. This mode of operation, which would still retain the distinctive advantages of a closed-cycle system, may be considered for a facility containing several instruments. Resolutions of 0.8–1.6 nm have been consistently achieved, mainly at 1.8 K, in the study of biological specimens, including

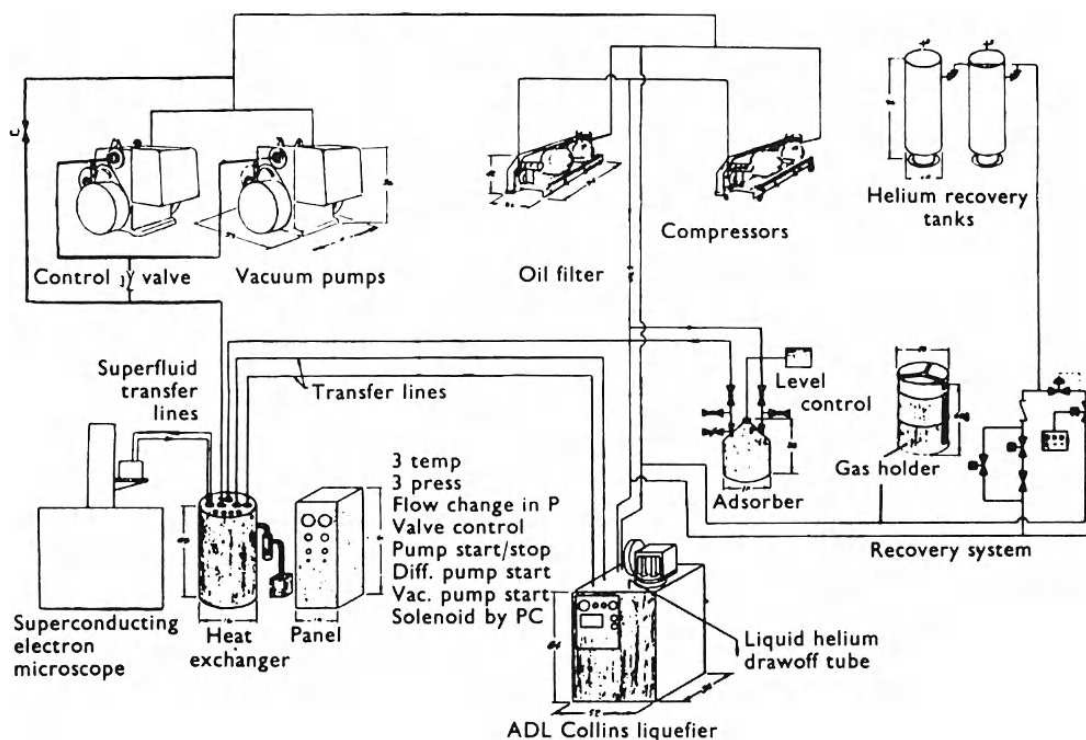


FIG. 34. Schematic diagram of special Collins closed-cycle superfluid-helium refrigerator system (20-W capacity) supplying through long transfer lines an integrated superconducting cryo-electron microscope with a continuous flow of He II (1.85 K) at a rate of 8 liters/hr. [H. Fernández-Morán, 1969–1978 (98,99,102,113).]

supercooled cells in vitreous ice within special “wet chambers” or vacuum-tight “cryo-embedding cells,” provided with thin, single-crystal graphite windows (68,102,113). New classes of layered transition-metal dichalcogenide intercalation complexes with unique superconducting properties have also been examined in correlated cryo-electron microscopy and diffraction studies (102,113).

D. The Cryomicroscope with Superconducting Lenses at Munich

During the past decade major advances have been made in high-resolution imaging of organic and biological specimens with considerable reduction of radiation damage using a cryo-electron microscope with superconducting lenses developed and applied by Dietrich, Weyl, Knappek, and co-workers at the Research Laboratories of Siemens AG in Munich (94,97,103,104,108–117) in collaboration with Dubochet and Knappek (114,116). Salient aspects of this exemplary work are summarized here to illustrate the great potential of this field.

The cryomicroscope at Munich is a fixed-beam 220-kV electron microscope equipped with a superconducting lens system, including an objective lens of the shielding type developed by Dietrich *et al.* (94,101,108), contained in a cryostat cooled by liquid helium at 4 K. This instrument has exceptional mechanical and electrical stability and absence of contamination, yielding a point resolution of 0.15 nm, a value which approaches the theoretical resolving power of the electron-optical system. This resolution is better than that of conventional lenses, and it permits bright-field imaging of single heavy atoms in an organometallic compound (112). Since the specimen is effectively cooled to 4 K, considerable reduction of radiation damage has been observed in a wide variety of specimens. Although the gain in radiation protection (119,120) is still under discussion, the available evidence is consistent with the assumption that cooling the specimen to 4 K reduces the beam damage in organic specimens by more than an order of magnitude, provided that the specimen is not heated by the electron beam (116,129,130,132,133).

E. Structure Determination of an Organic Complex with a Superconducting Electron Microscope

Recently, Dietrich, Formanek, von Gentzkow, and Knappek (130) have demonstrated that the steric structure of a radiation-sensitive organic copper complex can be determined with a superconducting electron microscope when the specimen, consisting of very small crystals, is kept at a temperature of 4 K, so that radiation damage is drastically reduced. Due to this effective cryoprotection, and the exceptional performance of the superconducting electron microscope (point-to-point resolution of 0.15 nm, and specimen drift below 0.03 nm/min), direct high-resolution images could be recorded in which the 1.1- and 0.9-nm lattice lines are visible. A structure model as derived from the single-crystal electron diffraction pattern, the direct images, and the results of chemical experiments is demonstrated. *N,N'*-Bis-salicyloyl-hydrazine (BSH) is one of the best copper deactivators, and since these organic chelates deactivate the metal, which drastically reduces the service life of low-voltage cables, it was essential to investigate the steric structure of the BSH-copper complex. A complete structure analysis of the microcrystals obtained from this complex is not possible with X-ray methods. In principle, the electron microscope is a very efficient tool for this purpose, provided that the radiation damage can be drastically reduced. The importance of this work for structure determination of biological complexes, which can only be obtained as microcrystals unsuitable for X-ray analysis, is evident, since it would open up a whole new field of

biological ultrastructure analysis, yielding new data of considerable significance in molecular biology and related disciplines (*133,136*).

VII. REFLECTIONS AND OUTLOOK

Having covered such a broad field in these reminiscences it may be opportune to offer some reflections which could adumbrate future trends. Some specific approaches which appear promising, particularly in biology and medicine (*128*), would include the following developments:

1. Improved instrumentation in cryomicroscopy, encompassing all types of microscopy and making full use of advances in superconducting electron optics, cryogenics, and radiation chemistry (*133,135*), with especial emphasis on synergistic integration with advanced computer technology for processing data, to assist interpretation, and to infer and evaluate conceptual models (*133–136*).

2. Systematic development of the next generation of high-voltage superconducting cryo-electron microscopes, following the proposed combination of a superconducting lens system with a compact superconducting linear accelerator, providing optimum cryogenic conditions by cooling with helium II (*98,106*).

3. Improvement and application of the cryoultramicrotome with diamond knife designed to operate at liquid-helium temperatures (*102,133*) (Fig. 35) and used primarily to prepare ultrathin sections of rapidly frozen biological specimens for direct examination by cryomicroscopy, but including also thicker sections for histochemistry (*144*).

4. Application of improved diamond knives (Fig. 36), which are prepared by new precision microirradiation techniques resulting in glazing and annealing for enhanced performance in cryomicrotomy.

One could add many other interesting approaches, but would have to admit that all of these suggestions refer to improvements in techniques and methodology which would remain sterile contributions if they are not applied, in correlated studies, to the solution of important problems in the life sciences.

Yet, by far the most important lesson to be derived from past experience is that electron microscopy, however interesting and novel its revelations, is only a tool, one which vastly extends man's visualization but remains restricted to morphology until it is linked to function and correlated with living systems. Electron microscopy has invariably proved most fruitful when it has been conducted in an environment of scholarly endeavor, bringing together the skills and experience of experts in physiology, biochemistry,

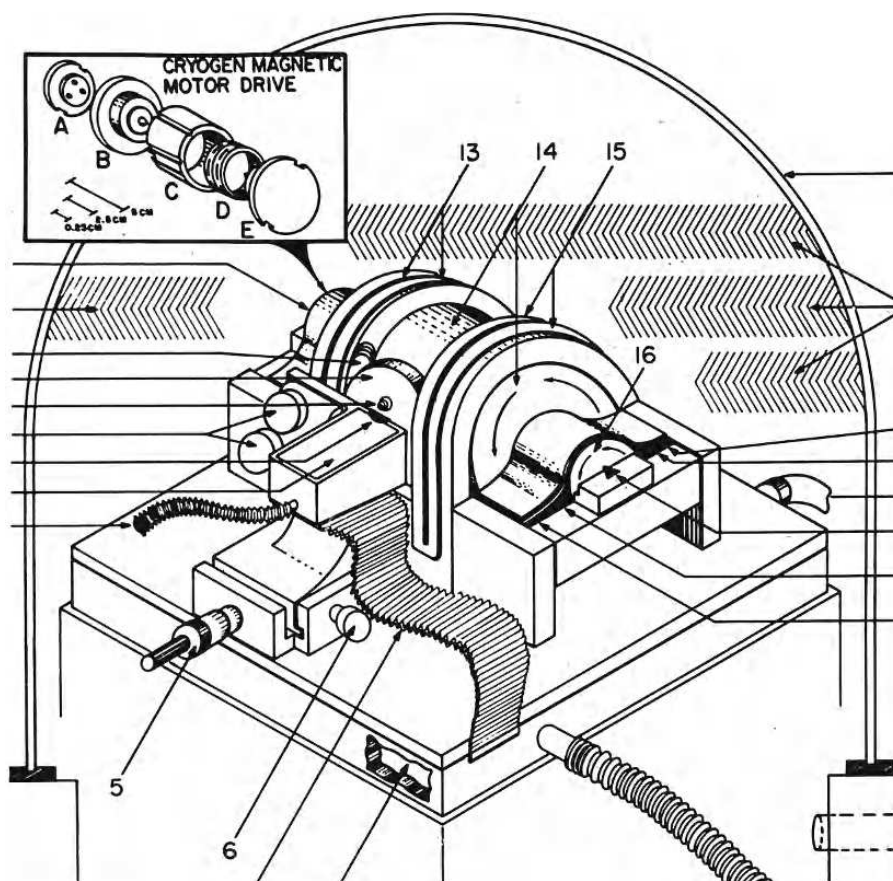


FIG. 35. Schematic drawing of cryoultramicrotome with diamond knife designed to operate mainly at liquid-helium temperatures (1.8–4.2 K) within a specially shielded cryostat using superconducting motor drive. Ultrathin serial sections of rapidly frozen biological specimens can be prepared for direct examination by cryo-electron microscopy and cryo-electron diffraction. [H. Fernández-Morán, 1968–1982 (102,113,122,128).]

polarized-light microscopy, X-ray diffraction, and many other disciplines, all devoted in a stimulating intellectual environment to the investigation of a specific problem.

Therefore, there is now an urgent need to establish international centers where electron microscopy in its broadest sense and scientists from different countries, each an expert in an important discipline, can work together and “think” together, sustaining an intense but spontaneous intellectual interaction continuously, and over a prolonged period of time (126). In such an environment electron microscopy, correlated with biochemical studies, with X-ray diffraction, and with other disciplines, can contribute most effectively to molecular biology and molecular genetics, to biotechnology and the present revolution in applied biology. It will also serve a vital training

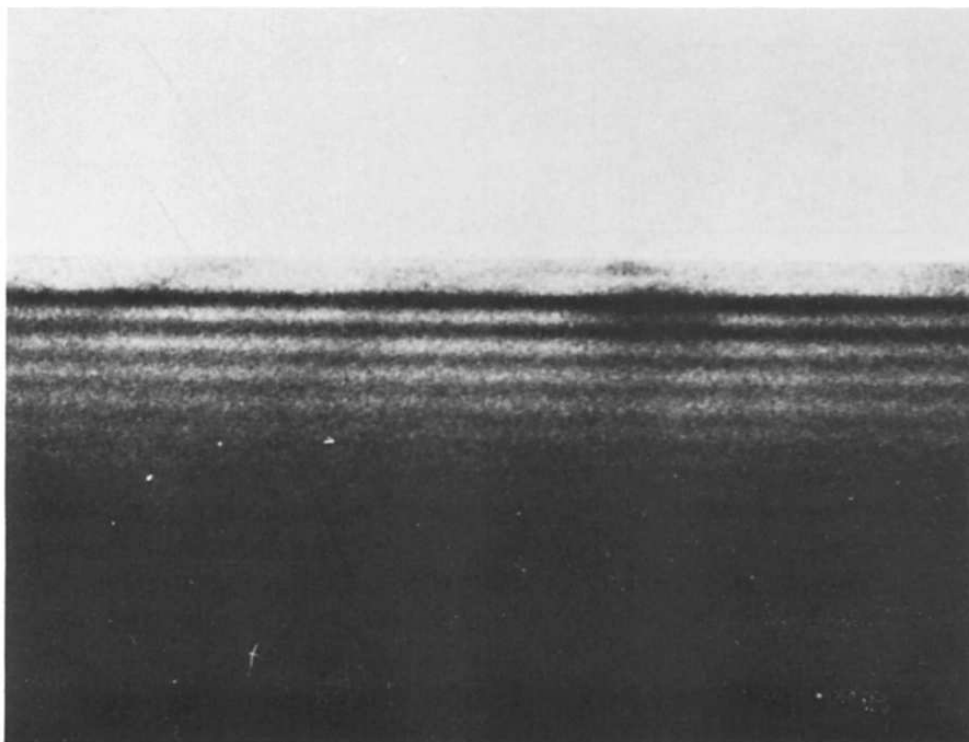


FIG. 36. Transmission electron micrograph of improved diamond knife showing very uniform and extremely sharp cutting edge, and a characteristic periodic structure of the crystalline diamond facet. These ultrasharp and resilient diamond knives are produced by new precision microirradiation techniques, especially developed for cryomicrotomy of frozen biological specimens. [H. Fernández-Morán, 1980–1982 (128).]

function by attracting imaginative and creative young scientists, engineers, and technologists. Evoking fond memories of a unique anniversary I can still state “Thus, in a deeper sense we realize that electron microscopy represents the ultimate direct extension of eye and hand. Man may hereby be granted strange new freedoms and capabilities of ‘seeing and doing’ in those pivotal microcosmic domains of life which are still beyond mind’s grasp” (93).

ACKNOWLEDGMENTS

The work carried out in Sweden (1946–1954) was mainly supported by the Luis Fernández-Morán Fund. Economic support in the latter part was also granted by the Nobel Fund through the Karolinska Institutet, and from research grants by the Wallenberg Foundation, the Therese and Johan Anderson Foundation, and the Ministry of Education of the Venezuelan Government. The research work in cryo-electron microscopy has been supported by NASA Grants NSG-441-63, NGL 14-001-012, NGR 14-001-166, and NSG 7303; by NIH Grant

B-2460, NB-04267; and by the L. Block Fund of the University of Chicago, the Pritzker Fund, and the Spastic Paralysis Research Foundation. During the last few years special research grants were kindly made available by the Luis Fernández-Morán and the C. Jiménez-Macías Funds of Venezuela.

The work reported here encompasses salient aspects of a continuous 38-year effort in the development and application of electron microscopy, particularly cryo-electron microscopy, diamond-knife ultramicrotomy, and improved preparation techniques for the study of nerve ultrastructure and the submicroscopic organization of biological systems. This effort is international in scope, and it was carried out thanks to the assistance granted by distinguished colleagues and mentors. Many of the concepts and experimental approaches stem from the period of apprenticeship in electron microscopy which the author spent at the Nobel Institute for Physics in Stockholm, Sweden. I wish to reiterate my profound gratitude to the late Professor Manne Siegbahn for his generous hospitality, kind support, and encouragement at all times. It is a pleasure to thank Professor Torbjörn Caspersson, former director of the Institute for Cell Research, Karolinska Institutet, for his thoughtful help and advice.

The author is especially indebted to Professor Samuel C. Collins, former director of the Cryogenic Engineering Laboratory at the Massachusetts Institute of Technology, for his guidance and support by placing the facilities of the Laboratory at his disposal, and granting him the benefits of his valuable experience throughout all stages of the superfluid-helium experiments over a period of two decades.

The author has been privileged and grateful to work with Professor Francis O. Schmitt of the Massachusetts Institute of Technology and Professor William H. Sweet of the Massachusetts General Hospital and the Harvard Medical School. The resourceful assistance of Dr. Frederick B. Merk during that time is sincerely appreciated.

The kind help of Professor H. Stanley Bennett, of the late Professor William Bloom, and of Professor Raymond Zirkle was essential during the initial stages of the cryo-electron microscopy work at the University of Chicago. I also wish to thank Dr. Charles Laverick of Argonne National Laboratory; Milton Streeter and R. Osburn of Cryogenic Technology Inc.; and F. Lins, A. Peuron, D. Kasun, and Dr. S. Autler of Westinghouse Cryogenics Division. The author wishes to express his deep appreciation to Dr. Orr Reynolds, Director of the Biosciences Program, and to Dr. George J. Jacobs, Chief, Physical Biology of NASA, for their unflinching support and encouragement during the entire development of the cryo-electron microscopes and superfluid-helium system. The author is also indebted to Drs. F. R. Gamble and T. Geballe of Stanford University and F. J. DiSalvo and J. A. Wilson of Bell Laboratories for discussions and suggestions relating to intercalated compounds in the course of cooperative research programs. The stimulating discussions with Professor Gaston Dupouy of the Laboratoire d'Optique Electronique, Toulouse, France; with Dr. Isolde Dietrich of the Research Laboratories of Siemens AG in München, Federal Republic of Germany; with Professor Elmar Zeitler, director of the Electron Microscope Department of the Fritz-Haber Institute, Max-Planck-Gesellschaft in Berlin; and with Dr. Gunter F. Bahr, Department of Cellular Pathology of the Armed Forces Institute of Pathology in Washington, D.C. are all gratefully acknowledged. Throughout the past decades the generous encouragement and valuable suggestions of Dr. W. O. Milligan, former Director of Research of the Robert A. Welch Foundation in Houston, Texas, were deeply appreciated. The major part of the cryo-electron microscopy development and research has been carried out in a systematic team effort by the members of an interdisciplinary group, particularly by Helmut Krebs, Charles Hough, the late G. Arcuri, G. Bowie, and C. Weber. All of the special equipment was made and assembled by expert co-workers of the Physical Sciences Development Workshop.

We are much indebted to D. Meddoff, V. Manrique, A. Hibino, M. Ohtsuki, and A. Gustafson for their skillful technical assistance in specimen preparation and electron microscopy.

The author wishes to thank all the colleagues and co-workers who contributed decisively to the foundation and research at The Venezuelan Institute for Neurology and Brain Research, IVNIC, near Caracas, Venezuela, during the years 1954–1958. Foremost is his profound debt of gratitude to the late Dr. Pedro A. Gutiérrez Alfaro, former Minister of Public Health, who helped found and support IVNIC throughout its existence. Among the many who participated in this pioneering project, Don Pedro Arvelo Crespo, Don Andrés Parra Pulido, Dr. Arturo Kan, Engineer Josef Weibel, and Professor Pierre Denis deserve special recognition, and we are all greatly indebted to them. It is also a pleasure to thank Professor Geoffrey H. Bourne for his stimulating encouragement during all phases of this project.

The generous support of Dr. Luis V. Amador, Mr. George Scharringhausen, Jr., and their colleagues of the Spastic Paralysis Research Foundation during the past decade is gratefully acknowledged.

I wish to express my deep gratitude to the late Professor Hans Selye and to the late Professor David E. Green for sharing the wisdom of their experience, and for the bequest of their inspiring sense of commitment.

The author thankfully acknowledges the encouraging support of Dr. Cipriano Jiménez-Macias, of Dr. Alberto Olivares, of the late Dr. Francisco J. Duarte, of Dr. Marcel Granier D., and of the late Dr. Miguel Parra Leon, President Emeritus of the Venezuelan Academy of Sciences in Caracas, Venezuela.

REFERENCES

1. C. G. Ehrenberg, *Monatsber. Preuss. Akad. Wiss.* **64**, 73 (1849).
2. H. von Helmholtz, *Monatsber. Dtsch. Akad. Wiss. Berlin*, p. 625 (1873).
3. M. Knoll and E. Ruska, *Z. Phys.* **78**, 318 (1932).
4. E. Ruska, *Z. Phys.* **89**, 90 (1934).
5. L. Marton, *Phys. Rev.*, 527 (1934).
6. A. Frey-Wyssling, "Submicroscopic Morphology of Protoplasm and its Derivatives." New York, 1948.
7. H. Ruska, *Arch. Exp. Zellforsch.* **22**, 673 (1939).
8. M. von Ardenne, "Elektronen Übermikroskopie." Springer-Verlag, Berlin and New York, 1940.
9. A. Prebus and J. Hillier, *Can. J. Res., Sect. A* **17**, 49 (1939).
10. M. Siegbahn, *K. Sven Vetenskapsakad. Årsb.* **37**, 147 (1939).
11. I. Elvers, *Acta Horti Bergiani* **13** (5) (1943); *Bot. Tidskr.* **37**, 331 (1943).
12. K. Siegbahn and B. Ingelman, *Ark. Kemi, Mineral. Geol.* **18B**, No. 1 (1944).
13. B. von Borries and E. Ruska, *Ergeb. Exakten Naturwiss.* **19**, 237 (1941).
14. E. F. Burton and W. H. Kohl, "The Electron Microscope." Reinhold, New York, 1942.
15. L. Marton, "Early History of the Electron Microscope." San Francisco Press, San Francisco, California, 1968.
16. D. Gabor, *Canberra*, 1974 Vol. 1, p. 6 (1975).
17. E. Ruska, "The Early Development of Electron Lenses and Electron Microscopy" (transl. by T. Mulvey). Hirzel Verlag, Stuttgart, 1980.
18. W. J. Schmidt, "Die Doppelbrechung von Karyoplasma, Zytoplasma und Metaplasma." Berlin, 1937.
19. F. O. Schmitt, R. S. Bear, and G. L. Clark, *Radiology*, **25**, 131 (1935).
20. F. O. Schmitt, *Biochim. Biophys. Acta* **4**, 68 (1950).

21. V. Runnström *Protoplasma* **4**, 388 (1928).
22. T. Caspersson, *Protoplasma* **27**, 463 (1937).
23. T. Caspersson, "Cell Growth and Cell Function." Norton, New York, 1950.
24. S. E. Luria and T. F. Anderson, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **28**, 127 (1942).
25. C. E. Hall, M. Jakus, and F. O. Schmitt, *J. Appl. Phys.* **16**, 459 (1945).
26. R. C. Williams and R. W. G. Wyckoff, *J. Appl. Phys.* **15**, 712 (1944).
27. K. R. Porter, A. Claude, and E. F. Fullam, *J. Exp. Med.* **81**, 233 (1945).
28. G. E. Palade, *J. Exp. Med.* **95**, 285 (1952).
29. H. Fernández-Morán, *Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat.* **33**, 225 (1944).
30. N. Hast, *Nature (London)* **159**, 370 (1947).
31. H. Fernández-Morán, *Ark. Zool.* **40A**, No. 6 (1948).
32. H. Fernández-Morán and R. Luft, *Acta Endocrinol. (Copenhagen)* **2**, 199 (1949).
33. V. K. Zworykin, G. A. Morton, E. G. Ramberg, J. Hillier, and A. W. Vance, "Electron Optics and the Electron Microscope." New York, 1945.
34. J. Hillier and E. G. Ramberg, *J. Appl. Phys.* **18**, 48 (1947).
35. S. B. Newman, E. Borysko, and M. J. Swerdlow, *Science* **110**, 66 (1949).
36. H. Latta and J. F. Hartmann, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **74**, 436 (1950).
37. H. Olivecrona, *Sven. Laekartidn.* **19** (1946); H. Fernández-Morán, "Apuntes Biográficos sobre el Profesor Herbert Olivecrona." Kugelbergs Boktryckeri, Stockholm, 1947.
38. F. S. Sjöstrand, *J. Cell. Comp. Physiol.* **33**, 383 (1949).
39. V. E. Cosslett, "Practical Electron Microscopy." Butterworth, London, 1951.
40. E. W. Müller, *Z. Phys.* **106**, 541 (1937).
41. K. Lonsdale, *Proc. Phys. Soc., London* **54**, 314 (1942).
42. H. Fernández-Morán, *Exp. Cell Res.* **1**, 143 (1950).
43. H. Fernández-Morán, *Exp. Cell Res.* **1**, 309 (1950).
44. H. Fernández-Morán, *Exp. Cell Res.* **3**, 282 (1952).
45. H. Fernández-Morán, *Ark. Fys.* **4**, 471 (1952).
46. H. Fernández-Morán and A. O. Dahl, *Science* **116**, 465 (1952).
47. H. Fernández-Morán, *Exp. Cell Res.* **5**, 255 (1953).
48. H. Fernández-Morán, *Bol. Acad. Cienc. Fis. Mat. Nat. (Caracas)* **51**, 1–162 (1953).
49. H. Fernández-Morán, *Prog. Biophys.* **4**, 112 (1954).
50. G. H. Bourne, *Nature (London)* **176**, 1049 (1955).
51. H. Fernández-Morán, *Ind. Diamond Rev.* **16**, 128 (1956).
52. H. Fernández-Morán, *Nature (London)* **177**, 742 (1956).
53. H. Fernández-Morán, *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **4**, Suppl. 2, 29 (1956).
54. H. Fernández-Morán and A. Engström, *Nature (London)* **173**, 494 (1956).
55. H. Fernández-Morán and A. Engström, *Biochim. Biophys. Acta* **23**, 260 (1956).
56. H. Fernández-Morán and J. P. Finean, *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **3**, 725 (1957).
57. H. Fernández-Morán, *Proc. Int. Neurochem. Symp., 2nd*, 1956 (1957).
58. H. Fernández-Morán and R. Brown, eds. "The Submicroscopic Organization and Function of Nerve Cells" *Exp. Cell Res., Suppl. 5*. Academic Press, New York, 1958.
59. H. Fernández-Morán, *Exp. Cell Res., Suppl. 5*, 586 (1958).
60. G. H. Bourne, *Nature (London)* **179**, 1296 (1957).
61. H. Fernández-Morán and G. Schramm, *Z. Naturforsch.* **13B**, 68 (1958).
62. A. Sayre, "Rosalind Franklin and DNA," p. 187. Norton, New York, 1975.
63. H. Fernández-Morán, *Rev. Mod. Phys.* **31**, 319 (1959).
64. H. Fernández-Morán, *J. Appl. Phys.* **30**, 2038 (1959).
65. H. Fernández-Morán, in "Macromolecular Complexes" (M. V. Edds, ed.), p. 113. Ronald Press, New York, 1961.
66. H. Fernández-Morán, in "Fast Fundamental Transfer Processes in Aqueous Biomolecu-

- lar Systems" (F. O. Schmitt, ed.), pp. 26, 33. M.I.T. Press, Cambridge, Massachusetts, 1960.
67. E. W. Müller, *Adv. Electron. Electron Phys.* **13**, 83 (1960).
68. H. Fernández-Morán, *J. Appl. Phys.* **31**, 1840 (1960).
69. C. E. Hall, *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **1**, 1 (1955).
70. C. E. Hall, *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **2**, 625 (1956).
71. H. Fernández-Morán, in "The Structure of the Eye" (G. K. Smelser, ed.), p. 521. Academic Press, New York, 1961.
72. H. Fernández-Morán, in "Ultrastructure and Metabolism of the Nervous System" (S. Korey, ed.), A.R.N.M.D. Ser. 40, p. 338. Williams & Wilkins, Baltimore, Maryland, 1962.
73. A. J. Hodge and F. O. Schmitt, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **46**, 186 (1960).
74. E. H. Leduc and W. Bernhard, in "The Interpretation of Ultrastructure" (R. J. C. Harris, ed.), p. 21. Academic Press, New York, 1962.
75. R. C. Valentine and R. W. Horne, in "The Interpretation of Ultrastructure" (R. J. C. Harris, ed.), p. 263. Academic Press, New York, 1962.
76. H. Fernández-Morán, in "The Interpretation of Ultrastructure" (R. J. C. Harris, ed.), Vol. 1, p. 411. Academic Press, New York, 1962.
77. H. Fernández-Morán, L. J. Reed, M. Koike, and R. R. Willms, *Science* **145**, 930 (1964).
78. H. Fernández-Morán, T. Oda, P. V. Blair, and D. E. Green, *J. Cell Biol.* **22**, 63 (1964).
79. C. E. Hall, "Introduction to Electron Microscopy." McGraw-Hill, New York, 1953; 2nd Ed., 1966.
80. A. K. Kleinschmidt and R. K. Zahn, *Z. Naturforsch.* **14B**, 770 (1959).
81. C. L. F. Woodcock and H. Fernández-Morán, *J. Mol. Biol.* **31**, 627 (1968).
82. G.F. Bahr and E. H. Zeitler, eds. "Quantitative Electron Microscopy." Williams & Wilkins, Baltimore, Maryland, 1965.
83. G. Dupouy and F. Perrier, *J. Microsc. (Paris)* **3**, 233 (1964).
84. S. Wischnitzer, "Introduction to Electron Microscopy." Pergamon, Oxford, 1970.
85. H. Fernández-Morán, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **85**, 689 (1960).
86. H. Fernández-Morán, *J. R. Microsc. Soc.* **83**, 183 (1964).
87. A. Laberrigue and P. Levinson, *C. R. Hebd. Seances Acad. Sci.* **259**, 530 (1964).
88. H. Fernández-Morán, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **53**, 445 (1965).
89. H. Fernández-Morán, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **56**, 801 (1966).
90. H. Boersch, O. Bostanjoglo, and B. Lischke, *Optik*, **24**, 460 (1966).
91. H. Fernández-Morán, *Kyoto, 1966* Vol. 1, p. 147 (1966).
92. C. Laverick, Argonne Natl. Lab. [Rep.] ANL-72-75, 38 (1966).
93. H. Fernández-Morán, *Proc.—Annu. Meet., Electron Microsc. Soc. Am.* **25**, 10 (1967).
94. I. Dietrich, R. Weyl, and H. Zerbst, *Cryogenics* **7**, 178 (1967).
95. P. Bonjour and A. Septier, *Rome, 1968* Vol. 1, p. 189 (1968).
96. J. Trinquier and J. L. Balladore, *Rome, 1968* Vol. 1, p. 191 (1968).
97. I. Dietrich, H. Pfisterer, and R. Weyl, *Z. Angew. Phys.* **28**, 35 (1969).
98. H. Fernández-Morán, *Grenoble, 1970* Vol. 2, p. 91 (1971).
99. H. Fernández-Morán, *Exp. Cell Res.* **62**, 90 (1970).
100. J. K. Hulm, D. J. Kasun, and E. Mullan, *Phys. Today* **24**, 48 (1971).
101. R. Weyl, I. Dietrich, and H. Zerbst, *Optik* **35**, 280 (1972).
102. H. Fernández-Morán, *Appl. Cryog. Technol.* **5**, 153 (1973).
103. I. Dietrich, G. Lefranc, R. Weyl, and H. Zerbst, *Optik* **38**, 449 (1973).
104. I. Dietrich, F. Fox, E. Knapke, G. Lefranc, R. Weyl, and H. Zerbst, *Canberra, 1974* Vol. 1, p. 146 (1975).
105. J. Dubochet, *J. Ultrastruct. Res.* **52**, 276 (1975).

106. I. Dietrich, K. H. Herrmann, and C. Passow, *Optik* **42**, 439 (1975).
107. I. Dietrich, "Superconducting Electron Optic Devices." Plenum, New York, 1976.
108. I. Dietrich, F. Fox, E. Knappek, G. Lefranc, K. Nachtrieb, R. Weyl, and H. Zerbst, *Ultramicroscopy* **2**, 241 (1977).
109. I. Dietrich, *Toronto, 1978* Vol. 3, p. 173 (1978).
110. F. Fox, E. Knappek, and R. Weyl, *Toronto, 1978* Vol. 2, p. 342 (1978).
111. I. Dietrich, F. Formanek, F. Fox, E. Knappek, and R. Weyl, *Nature (London)* **277**, 380 (1979).
112. H. Formanek and E. Knappek, *Ultramicroscopy* **4**, 77 (1979).
113. H. Fernández-Morán, *Proc. Robert A. Welch Found. Conf. Chem. Res.* **23**, 315 (1980).
114. E. Knappek and J. Dubochet, *J. Mol. Biol.* **141**, 147 (1980).
115. I. Dietrich, H. Formanek, W. von Gentzkow, and E. Knappek, *The Hague, 1980* Vol. 1, p. 116 (1980).
116. J. Dubochet, E. Knappek, and I. Dietrich, *Ultramicroscopy* **6**, 77 (1981).
117. I. Dietrich, F. Fox, H. G. Heide, E. Knappek, and R. Weyl, *Ultramicroscopy* **3**, 185 (1978).
118. H. C. Box, "Radiation Effects: ESR and ENDOR Analysis." Academic Press, New York, (1977).
119. V. E. Cosslett, *J. Microsc. (Oxford)* **113**, 113 (1978).
120. K. A. Taylor and R. M. Glaeser, *J. Ultrastruct. Res.* **55**, 448 (1976).
121. H. Fernández-Morán, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **125**, 739 (1965).
122. H. Fernández-Morán, in "Science Year Book," p. 216. Field Enterprises, Chicago, 1968.
123. H. Fernández-Morán, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **195**, 376 (1972).
124. E. Ruska, *Adv. Opt. Electron Microsc.* **1**, 115 (1966).
125. S. C. Collins, private communications (1960–1982).
126. R. R. Wilson, *Sci. Am.* **242**, 42 (1980).
127. J. Dubochet, F. P. Booy, R. Freeman, A. V. Jones, and C. A. Walter, *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.* **10**, 133 (1981).
128. H. Fernández-Morán, *Hamburg, 1982* Vol. 1, p. 751 (1982).
129. E. Knappek, H. Formanek, G. Lefranc, and I. Dietrich, *Proc.—Annu. Meet. Electron Microsc. Soc. Am.* **39**, 22 (1981).
130. I. Dietrich, H. Formanek, W. von Gentzkow, and I. Knappek, *Ultramicroscopy* **9**, 75 (1982).
131. G. Lefranc, E. Knappek, and I. Dietrich, *Ultramicroscopy* **10**, 111 (1982).
132. E. Knappek, *Ultramicroscopy* **10**, 71 (1982).
133. E. Zeitler, in "Cryomicroscopy and Radiation Damage" (E. Zeitler, ed.), p. 1, 155. North-Holland Publ., Amsterdam, 1982.
134. H.G. Heide, *Ultramicroscopy* **10**, 125 (1982).
135. J. Hüttermann, *Ultramicroscopy* **10**, 7 (1982).
136. O. Scherzer, in "Advances in Structure Research by Diffraction Methods" (W. Hoppe and R. Mason, eds.), Vol. 7, p. 101. Vieweg, Braunschweig, 1979.
137. H. Fernández-Morán, W. H. Zinn, B. C. Cerutti, and C. Lang, in "First Interamerican Symposium on Nuclear Energy," p. 1. Brookhaven National Laboratory, 1957.
138. T. G. Lewis, *Tool Manufact. Eng.* **49**, 65 (1962).
139. D. G. Durham, *Del. Med. J.* **38**, 202 (1966).
140. V. A. Phillips, *Prakt. Metallog.* **4**, 637 (1967).
141. E. P. Gargiulo, *Proc. Int. Indust. Diamond Conf.* 1969, p. 145 (1969).
142. F. E. Johnson, M. E. Curcio, D. C. Smith, and L. E. Lockett, *Laser Focus Mag.* p. 36 (1981).
143. F. Walter, *Z. Instrumentenkunde* **66**, 246 (1958).
144. H. Sitte, *Hamburg, 1982* Vol. 1, p. 9 (1982).