BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE CIENCIAS FÍSICOMATEMÁTICAS

CARACTERÍSTICAS Y FUNCIONAMIENTO DEL MICROSCOPIO DE FLUORESCENCIA CONFOCAL

Tesis presentada al

Colegio de Física

como requisito parcial para la obtención del grado de

Licenciado en Física

PRESENTA

MARÍA DEL RAYO ANGELES APARICIO FERNÁNDEZ

DIRECTOR DE TESIS

DR. CARLOS IGNACIO ROBLEDO SÁNCHEZ

OCTUBRE 2020

A mis padres y hermanos, por el gran amor y apoyo incondicional que me brindan en todo momento.

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi sincero agradecimiento a las siguientes personas:
A la Dra. Cristina E. Solano Sosa, por el apoyo que me brindó durante mi estancia en el Centro de Investigaciones en Óptica A. C., unidad León, durante la cual pude concluir este trabajo.

A la Dra. Dra Valeria Piazza por su valiosa asesoría para dar forma y concluir los dos últimos capítulos de esta tesis.

Al Dr. Carlor I. Robledo Sánchez por haber aceptado ser el director de este trabajo.

No puedo dejar de mencionar al Dr. Sergio Calixto, por las valiosas opiniones que me externó durante las pláticas que tuvimos relativas al tema de esta tesis, ni a los Dres. Geminiano Martínez Ponce y Zacarías Malacara Hernández, siempre dispuestos a escuchar y aclarar dudas para que este trabajo avanzara.

ÍNDICE

DEDICATORIA …… ii
AGRADECIMIENTOS …….. iii
ÍNDICE ……... iv
OBJETIVOS ……..… vi
INTRODUCCIÓN ……..…….…… vii

Capítulo 1. LENTES ESFÉRICAS Y FORMACIÓN DE IMÁGENES ……....1
INTRODUCCIÓN ..…….…... 2
1.1 Características de las lentes esféricas ……. 2
1.2 Ecuación de las lentes delgadas ……... 5
1.3 Formación de imágenes hecha por lentes delgadas ……..… 10
1.4 Imágenes reales e imágenes virtuales ……..……. 12
1.5 Amplificación angular y amplificación lateral ……. 14
1.6 Aberraciones ……... 16
Referencias …..…… 24

Capítulo 2. ELEMENTOS Y FUNCIONAMIENTO DEL MICROSCOPIO ÓPTICO COMPUESTO ……. 25
INTRODUCCIÓN ……... 26
2.1 Sistema mecánico ……... 26
2.2 Sistema óptico ……..……... 28
2.3 Sistema de iluminación ……... 30
2.4 Funcionamiento del microscopio óptico compuesto ……. 32
2.5 Apertura numérica ……... 36
2.6 Resolución del microscopio ……... 37
Referencias…...…… 42

Capítulo 3. EL MICROSCOPIO ÓPTICO Y ALGUNOS DE SUS DESCENDIENTES ……. 43
INTRODUCCIÓN ……. 44
3.1 Microscopio estereoscópico ……. 45
3.2 Microscopio invertido ……. 47
3.3 Microscopio de contraste de fase ……. 48
3.4 Microscopio de epi-fluorescencia ……. 57
3.5 Microscopio confocal ……. 62
Referencias ……. 64

Capítulo 4. MICROSCOPIO DE FLUORESCENCIA CONFOCAL …… 65
INTRODUCCIÓN …… 66
4.1 Estructura del microscopio confocal …… 67
4.2 Sistema óptico del microscopio confocal …… 69
4.3 Sistema de escaneo del microscopio confocal …… 74
4.4 El despliegue de las imágenes …… 77
Referencias …… 81

Capítulo 5. ESTUDIO DE MUESTRA BIOLÓGICA MEDIANTE MICROSCOPÍA DE FLUORESCENCIA CONFOCAL …… 82
INTRODUCCIÓN …… 83
5.1 Fluorocromos y fluoróforos…… 84
5.2 Conceptos básicos sobre la estructura de la célula …… 87
5.3 Preparación de la muestra para tinción …… 89
5.4 Interpretación de imágenes …… 96
Referencias …… 100

CONCLUSIONES …… 101

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Describir los cambios que ha experimentado el microscopio óptico compuesto a través del tiempo, por medio de una recopilación de información técnica sobre su funcionamiento, para demostrar que el diseño del microscopio confocal incorpora los resultados de esa evolución.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Construir un texto sobre los principios del diseño y funcionamiento del microscopio confocal, que sirva de base para tener una aproximación al mismo.

- Mostrar que el manejo y aplicaciones del microscopio de fluorescencia confocal, responde a una lógica de trabajo multidisciplinario.

INTRODUCCIÓN

Desde la invención del microscopio simple por Anton van Leeuwenhoek, en 1675, el microscopio no ha dejado de evolucionar. El microscopio simple debe su nombre al hecho de que sólo contaba con una lente convergente de distancia focal corta, para la amplificación de la imagen. Leeuwenhoek construyó a lo largo de su vida más de 250 microscopios (entre simples y compuestos); también tuvo el ingenio para mejorar lo que hoy conocemos como microscopio óptico compuesto, instrumento cuya invención se atribuye a Zacharias Janssen y su padre, Hans Janssen, en 1595 (Asimov 2014).

Hoy en día, el uso de microscopios de todos tipos es generalizado en el ámbito científico y tecnológico, sin embargo el conocimiento sobre su sistema óptico, su funcionamiento y evolución histórica muchas veces es desconocido, tanto por estudiantes como por técnicos de laboratorio e incluso por los mismos investigadores que los utilizan; esto se debe, quizás, a que la información sobre estos instrumentos se encuentra contenida en libros, muchos de ellos especializados en el tema, en los cuales se profundiza en aspectos como la explicación matemática de la formación de las imágenes, pero resultan ser libros poco prácticos para el usuario experimental y con poca información sobre la evolución de este instrumento. Por las razones anteriores, en este trabajo se describen las características, funcionamiento y usos de diferentes tipos de microscopios de una manera práctica, con la intención principal de que esta información sirva para que el lector, al llegar al capítulo correspondiente, entienda el funcionamiento del microscopio confocal de manera casi automática.

El microscopio óptico compuesto se encuentra en constante transformación, su estructura básica ha sufrido modificaciones y con ellas han surgido nuevas versiones de microscopios ópticos utilizados para análisis y procedimientos específicos (Mouroulis, 1997). Se tienen microscopios monoculares, binoculares, estereoscópicos, invertidos, de contraste de fase y de epi-fluorescencia, entre otros. Estos microscopios son, en esencia, microscopios ópticos compuestos a los que se

han adaptados dispositivos que van desde los más sencillos (como filtros de color) hasta otros muy sofisticados como fuentes de luz láser.

Los microscopios compuestos se caracterizan por formar la imagen amplificada del objeto observado utilizando no una, sino dos juegos de lentes convergentes (de ahí el nombre de “compuesto”), que reciben el nombre de ocular y objetivo.

Por otra parte, el microscopio confocal conjunta el diseño óptico de un microscopio de epi-fluorescencia, con una captura de datos de forma electrónica y sistemas de procesamiento de datos e imágenes por computadora, para formar la imagen de las muestras en observación; su sistema óptico toma información de secciones pequeñísimas (punto por punto) de una determinada zona de la muestra y mediante un barrido (o escaneo) de toda la zona, obtiene los datos que después se integra para formar la imagen.

Un microscopio confocal no forma la imagen completa de la zona en observación recolectando simultáneamente la información de todos los puntos de la zona, sus imágenes son datos numéricos en la memoria de una computadora (Conn 1999), por esta razón, para algunos académicos el microscopio confocal no es un microscopio óptico compuesto, en el sentido estricto de la definición, ya que en los microscopios ópticos el ocular y el objetivo trabajan en conjunto para formar la imagen completa, mientras que en los microscopios no ópticos (como es el caso del microscopio electrónico de barrido o el microscopio de fuerza atómica) la imagen es un conjunto de puntos de distintas intensidades que se muestran en una pantalla, que son el resultado de variaciones en valores de corriente eléctrica, o voltaje, que de alguna forma el instrumento detecta en el proceso de “observación” del objeto.

El microscopio confocal no tiene un sistema, ortodoxo, de captura de información para la formación de la imagen, eso lo hace especialmente distinto de los microscopios ópticos convencionales.

En este trabajo se presenta la información relativa a los elementos ópticos que componen el microscopio óptico compuesto (en general) y el sistema de captura de información para la formación de la imagen en el microscopio confocal (en particular). Se describe el funcionamiento de los microscopios mencionados anteriormente con la intención de mostrar la evolución que ha tenido este

instrumento y para hacer notar que el microscopio confocal es, en cierta forma, el resultado de esa evolución; también se detalla el funcionamiento de este microscopio y cómo, utilizando el fenómeno de fluorescencia, se optimiza el rescate de información para la obtención de imágenes.

Cabe aclarar, que durante la exposición del tema, en el texto, frecuentemente se hace referencia a aplicaciones del microscopio a la biología y ciencias biomédicas y no a otro tipo de aplicaciones, esto se debe a la enorme dependencia que estás disciplinas tienen del instrumento en cuestión, por lo cual el material para ejemplificar las aplicaciones es abundante.

El contenido de esta tesis se divide en cinco capítulos. En el capítulo 1 se aborda la teoría de la formación de imágenes hecha por lentes esféricas, las aberraciones que se presentan en este proceso y se describen características importantes de un sistema óptico como lo son la amplificación angular y la amplificación transversal; todo esto con la finalidad de explicar el funcionamiento del microscopio compuesto en el segundo capítulo.

En el capítulo 2 se describen los sistemas que forman al microscopio óptico compuesto (sistema mecánico, sistema óptico y sistema de iluminación), dando énfasis a la explicación del funcionamiento del sistema óptico y cómo la calidad de la imagen depende de la apertura numérica y la resolución del microscopio.

El tema de la clasificación de los microscopios ópticos es tratado en el capítulo 3. Ahí se expone de forma general cuáles son las características de los microscopios estereoscópicos e invertidos, y se profundiza más en la teoría para la explicación del microscopio de contraste de fase y el de epi-fluorescencia. El microscopio confocal es introducido en este capítulo, pero la explicación detallada de los elementos que lo conforman se deja para el siguiente.

El capítulo 4 está dedicado principalmente a la descripción del sistema óptico del microscopio confocal y su funcionamiento.

Finalmente, en el capítulo 5 se explica la teoría básica sobre los fluorocromos, la preparación específica de una muestra y la interpretación de las imágenes de esa muestra, obtenidas con el microscopio confocal.

Referencias

Asimov I. (2014). *Historia y cronología de la ciencia y los descubrimientos*. España: Ariel.

Conn P. (1999). *Methods in Enzymology*. U.S.A.: Academic Press, p. 29

Mouroulis P. & Mcdonald J. (1997). *Geometrical optics and optical desing*. USA: Oxford University Press.

1

CAPÍTULO 1. LENTES ESFÉRICAS Y FORMACIÓN DE IMÁGENES

Introducción

Una lente esférica es un trozo de material transparente limitado por dos superficies que tienen forma esférica. Incluso, cuando una lente esférica tiene una superficie plana se considera que esa superficie es esférica porque su radio de curvatura es infinito.

Sin importar de qué material estén hechas las lentes (vidrio, acrílico, agua, etc.), todas tienen las mismas características y funcionan siguiendo las leyes de la reflexión y la refracción de la luz

Cuando una lente está formada por un solo elemento, es decir, sólo tiene dos superficies refractoras se le llama *lente simple*. Si hay más de un elemento simple la lente se llama *compuesta* (Hecht 1977).

Al observar un objeto a través de una lente esférica se ve su imagen formada por la lente. La luz que proviene del objeto sigue las leyes de refracción de la luz al atravesar la lente y esta forma una imagen que puede ser erecta (tener la misma orientación vertical que el objeto) o invertida (tener una orientación vertical en sentido opuesto a la del objeto), amplificada o disminuida en tamaño; la imagen puede ser real o virtual, todo esto depende de la forma y el índice de refracción de la lente, así como de la posición del objeto respecto de la misma.

En este capítulo se explica cómo las lentes esféricas forman las imágenes de los objetos que son observados a través de ellas, basándose en la teoría de la óptica geométrica; tener conocimiento de esto último es indispensable para el entendimiento del funcionamiento del microscopio compuesto.

1.1 Características de las lentes esféricas

Como se mencionó en la introducción, todas las lentes esféricas tienen las mismas características y funcionan de la misma forma (siguiendo las leyes de la reflexión y refracción de la luz).

Una de las características de una lente esférica es su eje óptico. El eje óptico es una línea recta imaginaria que cruza la lente por su centro, es perpendicular a sus superficies en los puntos de cruce, y es eje de simetría rotacional de la misma.

Las lentes esféricas se clasifican en lentes convergentes y lentes divergentes, por razones que serán explicadas un poco más adelante. Las lentes convergentes también son llamadas lentes convexas o positivas. Las lentes divergentes se conocen también como cóncavas o negativas. La figura 1.1 muestra los perfiles de las lentes esféricas.

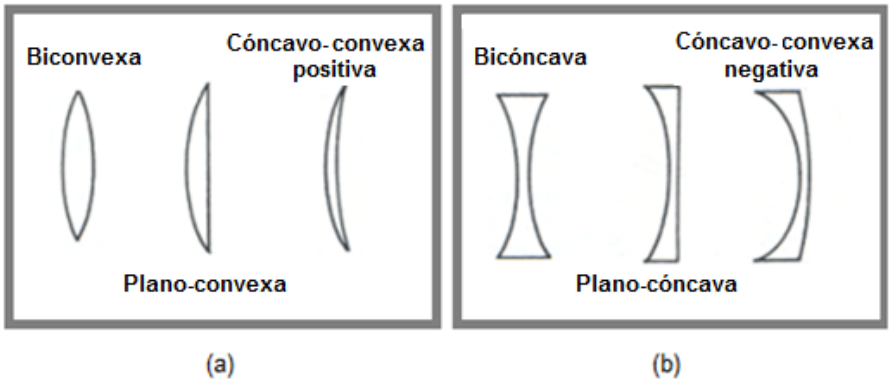


Figura 1.1 a) Lentes esféricas convergente, b) lentes esféricas divergentes

Si suponemos que el índice de refracción de la lente es mayor que el índice del medio que la rodea, un haz de rayos paralelos al eje óptico se comportará como se muestra en las figuras 1.2a y 1.2b, al atravesar una lente convergente y una lente divergente, respectivamente. En este trabajo se asume la convención que supone que la luz viaja de izquierda a derecha cuando se describe el funcionamiento de cualquier elemento o sistema óptico, por lo tanto, la primera superficie de la lente a la que llega la luz se le llama superficie 1 o superficie anterior y a la otra se llama superficie 2 o superficie posterior.

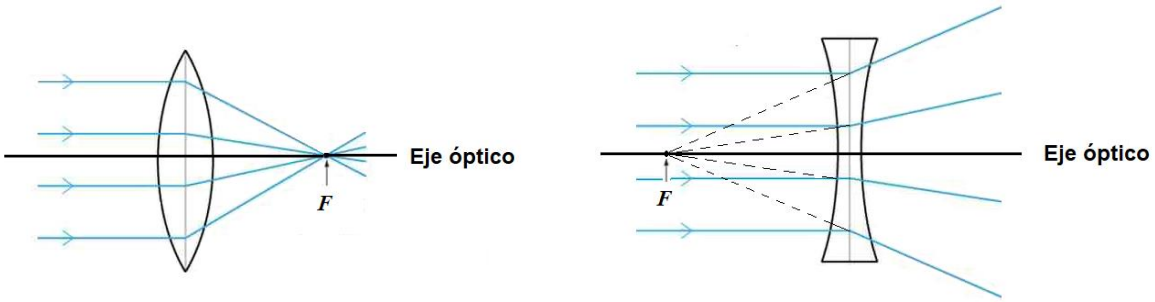


Imagen modificada: https://es.wikipedia.org/wiki/Archivo:Lentes_convergentes_y_divergentes.jpg

Figura 1.2 a) Lente esféricas convergente, b) lente esférica divergente

Una lente esférica convergente hace convergir un haz de rayos paralelos a su eje óptico a un punto llamado foco (F); en general, un punto hacia el cual converge la luz o desde el cual diverge recibe el nombre de ***foco***. Una lente esférica divergente hace divergir el mismo haz como si los rayos provinieran de un punto; de ahí el nombre de lentes convergentes y divergentes. La distancia del foco a la lente se llama distancia focal (f).

En concordancia con la convención sobre sentido en el que viaja la luz, el foco de la figura 1.2a se llama foco posterior de la lente y el foco de la figura 1.2b foco anterior. Si en las mismas figuras 1.2a y 1.2b la luz viajara de derecha a izquierda, paralela el eje de la lente, convergería o divergiría definiendo el foco anterior y posterior de las lentes de la figura, respectivamente. Así, una lente tiene dos focos llamados anterior y posterior.

Otro detalle que es importante mencionar es que un foco hacia el cual realmente converge (o desde el cual realmente diverge) un haz de rayos de luz se llama foco real, mientras que un foco desde el cual parece que diverge un haz de rayos (o al cual parece que converge) se llama foco virtual. El foco de la lente de la figura 1.2a es un foco real, mientras que el foco de la figura 1.2b es un foco virtual.

Como el tipo de lentes en cuestión están limitadas por superficies esféricas (ver figura 1.3), estas superficies tienen radios de curvatura (R_1, R_2) y centros de curvatura (C_1, C_2), estos últimos ubicados sobre el eje óptico; los subíndices 1 y 2 utilizados en la notación, corresponden a la superficie anterior y posterior, de la lente, respectivamente.

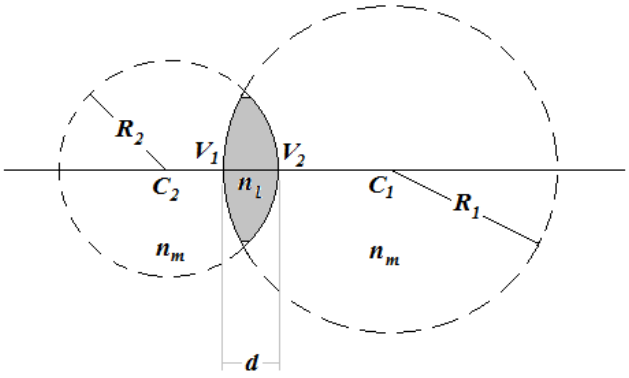


Figura 1.3 Características de una lente esférica. El índice del medio se denota con n_m.

Los puntos de intersección del eje óptico con las superficies de la lente se les llama vértices (V_1,V_2).

Otras características son los focos de la lente (F_1, F_2), sus distancias focales (f_1, f_2), el índice de refracción del material del que está hecha la lente (n_l), el espesor medido en el centro de la lente (d), y el diámetro (D) de la misma.

Finalmente, existe un criterio sencillo y práctico para diferenciar entre lentes convergentes y divergentes: una lente convergente siempre es más gruesa en su centro que en su periferia, mientras que una lente divergente siempre es más delgada en el centro que en su periferia.

1.2 Ecuación de las lentes delgadas

Anteriormente ya se han mencionado dos clasificaciones de lentes (convergentes o divergentes, simples o compuestas), pero cabe mencionar que las lentes también pueden clasificarse en lentes delgadas o gruesas, dependiendo de si su espesor es despreciable ($d \rightarrow 0$) o no. A continuación se presenta el análisis de la refracción que sufre cierto tipo de rayos cuando llegan a una interfase esférica y mediante el cual es posible obtener una ecuación clave en la formación de imágenes hecha por lentes esféricas delgadas, la ecuación en cuestión es llamada ***ecuación de lentes delgadas*****.**

La figura 1.4 muestra uno de los rayos emitidos por una fuente puntual S que llega al punto A, en una interfase esférica de radio R centrada en C. El medio donde el rayo se desplaza inicialmente tiene índice n_1 y el índice del material en el cual se refracta el rayo tiene índice n_2 ($n_2 > n_1$). La distancia de la fuente S al vértice V se denota con s_0 y la distancia del vértice al punto de cruce del rayo refractado y el eje óptico se denota con s_i (Hecht 1977).

El rayo $\overline{SA}$, al igual que todos rayos incidentes sobre la interfase con el mismo ángulo θ_i, se refracta hacia la normal y por consiguiente hacia el eje óptico, hasta cruzarlo en un punto P. No hay que olvidar que la figura 1.4 muestra lo que sucede con un solo rayo, pero en la realidad se tienen una gran cantidad de rayos que se están refractando en forma análoga (todos llegando al punto P), debido a una situación de geometría rotacional alrededor del eje óptico.

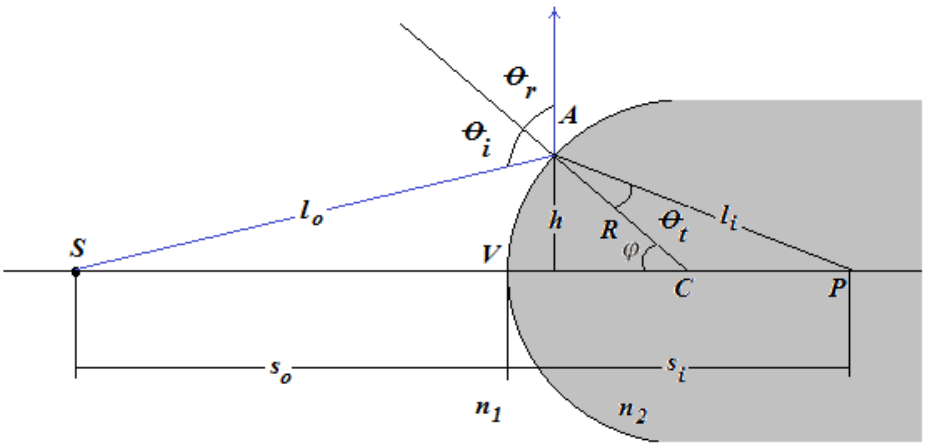


Imagen reproducida del libro: Óptica, Hecht-Zajac

Figura 1.4 Refracción en una interfase esférica de un rayo proveniente de S.

Aplicando la ley de Cosenos a los triángulos SAC y ACP, y el hecho de que $\cos\varphi = -\cos(180° - \varphi)$, se tiene

$$l_0 = [R^2 + (S_0 + R)^2 - 2R(S_0 + R)cos\varphi]^{\frac{1}{2}}$$

y

$$l_i = [R^2 + (S_i - R)^2 - 2R(S_i - R)cos\varphi]^{\frac{1}{2}}$$

Así la longitud de camino óptico (L.C.O.) se puede escribir como

$$\text{L.C.O.} = n_1 l_0 + n_2 l_i$$

$$\text{L.C.O.} = n_1[R^2 + (S_0 + R)^2 - 2R(S_0 + R)cos\varphi]^{\frac{1}{2}} + n_2[R^2 + (S_i - R)^2 - 2R(S_i - R)cos\varphi]^{\frac{1}{2}}$$

Todas las cantidades de la figura 1.4, es decir $s_i,\ s_0,\ R$, etc., son números positivos y forman la base de una convención de signos que se usará de vez en cuando (ver tabla 1.1).

s_0, f_o	+ izquierda de V
x_0	+ izquierda de F_o
s_i, f_i	+ derecha de V
x_i	+ derecha de F_i
R	+ C a la derecha de V
y_0, y_i	+ arriba del eje óptico

Tabla 1.1 Convención de signos para superficies refractoras y lentes delgadas.

El principio de Fermat sostiene que la longitud de camino óptico es estacionaria, es decir, su derivada respecto a la variable de posición es cero. Entonces, cuando el punto A se mueve sobre la superficie esférica, R es constante y φ es la variable de posición. Como d (L.C.O.)/$d\,\varphi$ = 0, debido al principio de Fermat, tenemos

$$\frac{n_1 R(S_0 + R)sen\varphi}{2l_0} - \frac{n_2 R(s_i - R)sen\varphi}{2l_i} = 0$$

de lo cual se deduce que

$$\frac{n_1}{l_0} + \frac{n_2}{l_i} = \frac{1}{R}\left(\frac{n_2 s_i}{l_i} - \frac{n_1 s_0}{l_0}\right) \qquad (1.1)$$

Las aproximaciones que se usan para representar l_0 y l_i, son cruciales en el desarrollo de la teoría que se presenta a continuación.

Si se hace una expansión en series de Taylor de $cos\varphi$ y $sen\varphi$ se tiene

$$cos\varphi = 1 - \frac{\varphi^2}{2!} + \frac{\varphi^4}{4!} - \frac{\varphi^6}{6!} + \cdots$$

$$sen\varphi = \varphi - \frac{\varphi^3}{3!} + \frac{\varphi^5}{5!} - \frac{\varphi^7}{7!} + \cdots$$

Así, para valores pequeños de φ, es decir A cercano al vértice, $cos\varphi \approx 1$. Consecuentemente para l_0 y l_i se cumple que $l_0 \approx s_0$, $l_i \approx s_i$ y con esa aproximación la ecuación (1.1) se reduce a la ecuación (1.2)

$$\frac{n_1}{s_0} + \frac{n_2}{s_i} = \frac{n_2 - n_1}{R} \qquad (1.2)$$

Esta aproximación describe el dominio de lo que se llama *teoría de primer orden*. Los rayos que llegan con ángulos pequeños con respecto al eje óptico (tales que φ y *h* son pequeños) se conocen como *rayos paraxiales*. El segmento de frente de onda que corresponde a estos rayos paraxiales formará una imagen "perfecta" de S en el punto P colocado en s_i.

La región de la interfase alrededor del eje óptico en donde la ecuación (1.2) es válida, e independiente de la posición del punto A, se le llama la *región paraxial*. En 1841, Gauss fue el primero en hacer una exposición sistemática de la formación de imágenes con la aproximación paraxial y a esta se le conoce como *óptica de primer orden*, *paraxial* o *gaussiana*. Las desviaciones de los resultados del análisis paraxial proveerán una medida conveniente de la calidad del sistema óptico (Hecht 1977,112).

Si se da forma esférica a una segunda superficie en la figura 1.4, y se pule, se tendrá una lente esférica como la de la figura 1.5.

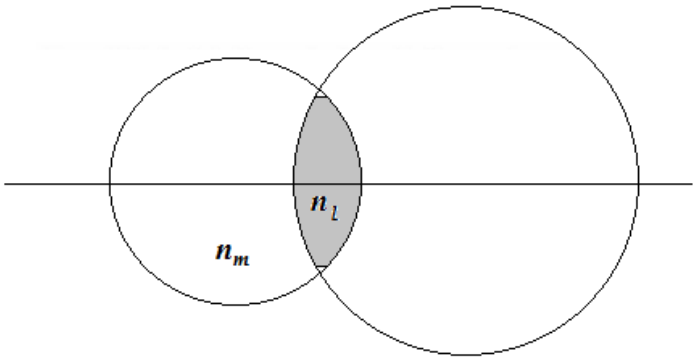


Imagen reproducida del libro: Óptica, Hecht-Zajac

Figura 1.5 Lente esférica.

Al hacer incidir un par de rayos emitidos por la fuente puntual S sobre la lente de la figura 1.5 estos se comportarán como se muestra en la figura 1.6. Entonces, a la segunda superficie "le parece" que los rayo provienen de $P´$ y que se desplazan en un medio de índice n_l .

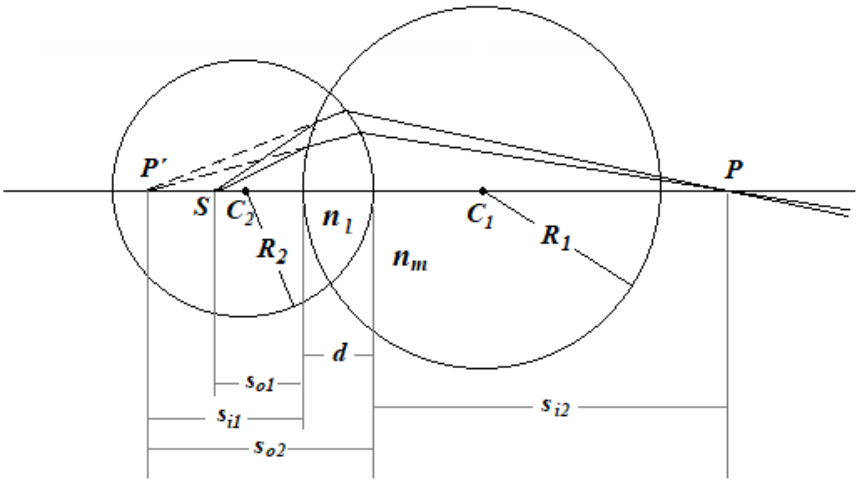


Imagen reproducida del libro: Óptica, Hecht-Zajac

Figura 1.6 Comportamiento de un par de rayos emitidos por S, al cruzar una lente esférica.

Tomando en cuenta estas consideraciones y aplicando la ecuación1.2 a la segunda superficie se tiene

$$\frac{n_m}{s_{01}} + \frac{n_m}{s_{i2}} = (n_l - n_m)\left(\frac{1}{R_1} - \frac{1}{R_2}\right) + \frac{n_1 d}{(s_{i1} - d)s_{i1}} \qquad (1.3)$$

donde n_m es el índice de refracción del medio y n_l es el índice de refracción de la lente.

Si la lente es lo suficientemente delgada ($d \rightarrow 0$) y está rodeada por aire, es decir $n_m \approx 1$, la expresión 1.3 se reduce a la ecuación conocida como *ecuación de las lentes delgadas* o la *fórmula del fabricante de lentes* que está dada por

$$\frac{1}{s_0} + \frac{1}{s_i} = (n_l - 1)\left(\frac{1}{R_1} - \frac{1}{R_2}\right) \qquad (1.4)$$

donde s_0 y s_i son las posiciones del objeto y la imagen y R_1 y R_2 son los radios de curvatura de la lente (Hecht 1977, 115).

En una lente delgada $f_0 = f_i$ y consecuentemente se pueden eliminar todos los subíndices. Entonces

$$\frac{1}{f} = (n_l - 1)\left(\frac{1}{R_1} - \frac{1}{R_2}\right) \qquad (1.5)$$

$$\frac{1}{s_0} + \frac{1}{s_i} = \frac{1}{f} \qquad (1.6)$$

Con la ecuación 1.5 es posible calcular la distancia focal de la lente en función del índice de refracción y los radios de curvatura de la misma. La ecuación 1.6 es la *fórmula gaussiana para las lentes*; esta una relación entre las posiciones del objeto, la imagen y la distancia focal.

1.3 Formación de imágenes hecha por lentes delgadas

Todos los objetos en la naturaleza pueden clasificarse como luminosos o iluminados. Los objetos luminosos tienen luz propia, mientras que los iluminados sólo reflejan la luz que reciben. Independientemente de esta clasificación todos los objetos pueden considerarse como formados por un conjunto de fuentes puntuales que “emiten rayos de luz” en todas direcciones posibles (Hecht 1977), esto es lo que nos permite verlos desde diferentes direcciones; así, cualquier objeto puedo considerarse como formado por multitud de fuentes puntuales (S).

Para entender el principio de la formación imágenes hecha por lentes esféricas es suficiente con utilizar la teoría de la óptica geométrica. La ubicación, tamaño, y orientación de una imagen, producida por una lente delgada, se puede determinar de forma analítica, usando la ecuación de lentes delgadas, o en forma gráfica, utilizando diagramas de rayos (Hecht 1977). A continuación se explica en qué consiste el utilizar un diagrama de rayos, usando una lente convergente como ejemplo. En un diagrama de rayos se utilizan tres rayos específicos que parten del extremo superior del objeto (O) y se observa cómo se comportan al cruzar la lente.

El primer rayo llamado rayo principal (rayo 1 en la figura 1.7), llega hasta el centro de la lente y prácticamente no se desvía de su trayectoria rectilínea. El segundo rayo es paralelo al eje óptico de la lente (rayo 2) y por ello converge al foco posterior de la misma después de atravesarla; finalmente el tercer rayo es un rayo que pasa por el foco anterior de la lente (rayo 3), se refracta al cruzarla y emerge de ella paralelo al eje óptico.

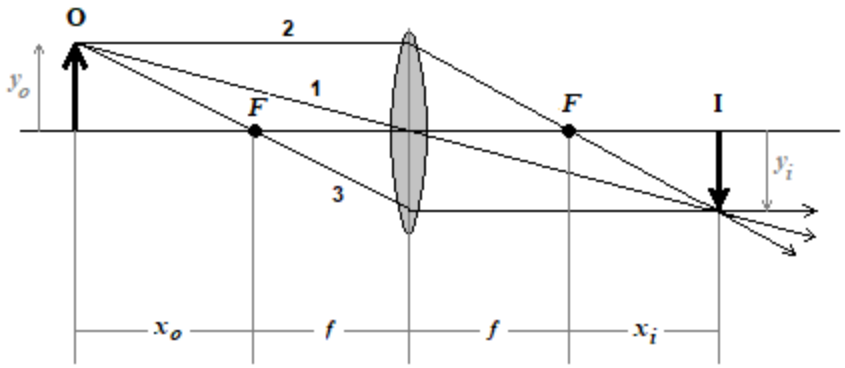


Figura 1.7 Diagrama de rayos en una lente convergente.

Este trazo de rayos se repite para cada punto del objeto, independientemente de su altura y posición transversal, de esta manera se formará un punto imagen correspondiente a cada punto objeto, suponiendo que la lente es ideal y no se presenta aberraciones en la imagen (de este tema se hablará al final de este capítulo). Así es como se forma la imagen completa (I) del objeto en cuestión.

En el caso de una lente convergente de la figura 1.7, los rayos 1, 2 y 3 convergen en un punto después de atravesar la lente y en el punto de convergencia se forma la imagen del punto de donde partieron.

Para las lentes divergentes la formación de imágenes también puede explicarse utilizando un trazo de rayos.

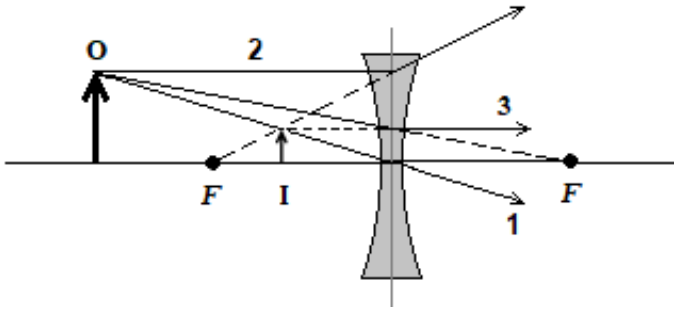


Figura 1.8 Diagrama de rayos en una lente divergente.

En la figura 1.8 los rayos 1, 2 y 3 parten del extremo superior del objeto (O). El rayo 1 llega al centro de la lente y prácticamente no se desvía de su trayectoria rectilínea, el rayo 2 es paralelo al eje óptico por lo cual, al cruzar la lente, diverge como si hubiera partido del foco anterior de la misma. El rayo 3, que originalmente se dirigía al foco posterior, emerge paralelo al eje óptico. En el punto donde coinciden el rayo 1 y las prolongaciones (líneas punteadas) de los rayo 2 y 3, se forma la imagen del extremo superior del objeto, lo cual determina la posición y altura de la imagen (I) del mismo. El trazo de rayos también se repite para cada punto del objeto, y así se formará su imagen completa.

1.4 Imágenes reales e imágenes virtuales

Las imágenes formadas por una lente pueden clasificarse en imágenes reales o imágenes virtuales. Una imagen real se forma por la convergencia de rayos de luz en un espacio físico. En la figura 1.9a se muestra la imagen de una flecha (el objeto), que se encuentra alejada del foco anterior, formada por una lente delgada positiva. Al observar la flecha a través de la lente, un observador (a la derecha) verá la imagen real e invertida de la misma. Si este coloca una pantalla en la posición donde se forma la imagen del objeto en cuestión, se podrá observar sobre de ella la imagen del mismo.

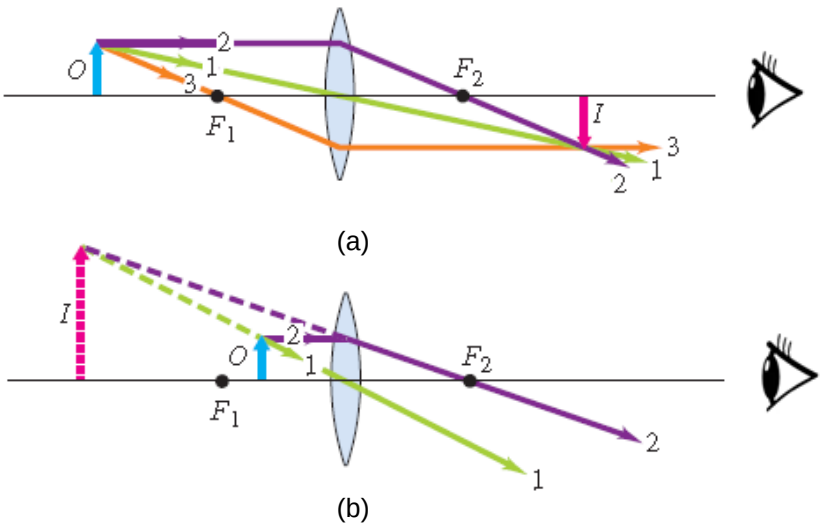


Imagen recuperada de: https://www.escolares.net/fisica/lentes-convergentes-y-divergentes/

Figura 1.9 a) Imagen real formada por una lente delgada positiva,
b) imagen virtual formada por la misma lente delgada.

Por otra parte, en la figura 1.9b el objeto está colocado en un punto entre el foco anterior y la lente. El trazo de rayos muestra que la imagen formada por la lente delgada, en este caso es virtual. Al observar el objeto a través de la lente el observador verá una imagen virtual, esto es, la luz parece provenir de ella pero realmente no es así. Si se coloca una pantalla en la posición donde se forma la imagen virtual no habrá luz sobre ella y por tanto tampoco imagen alguna.

Las lentes convergentes pueden formar imágenes reales o virtuales del objeto observado a través de ellas, dependiendo de la posición que tenga el mismo respecto de la lente.

Por otra parte, una lente divergente siempre forma imágenes virtuales, independientemente de la posición del objeto respecto de la lente.

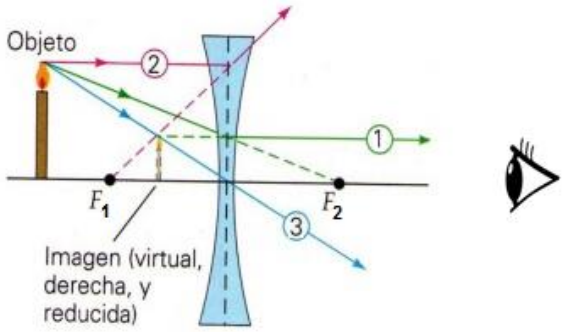


Imagen recuperada de: https://www.escolares.net/fisica/lentes-convergentes-y-divergentes/

Figura 1.10 Imagen virtual formada por una lente delgada negativa.

Es posible resumir los resultados anteriores de la siguiente forma: en el caso de las lentes convergentes, si el objeto se encuentra en una posición entre el foco y la lente, la imagen que esta formará será erecta, amplificada y virtual, mientras que, si el objeto está colocado en una posición antes del foco su imagen será invertida, disminuida y real.

Una lente divergente siempre formará imágenes erectas, disminuidas y virtuales.

1.5 Amplificación angular y amplificación lateral

La amplificación de una lente es de suma importancia a la hora de diseñar un instrumento que hará uso de la misma.

Una lente amplificadora simple es esencialmente una lente convergente de distancia focal corta; la figura 1.11 ilustra el principio de funcionamiento de este tipo de lentes. Cuando un pequeño objeto de altura h es examinado a simple vista, se asume que se coloca a la distancia mínima de visión de un ojo normal, esto es 25 cm alejado del ojo, posición (b) en la figura 1.11, en ese punto el objeto subtiende un ángulo α_o respecto del ojo (Pedrotti 1993, 131).

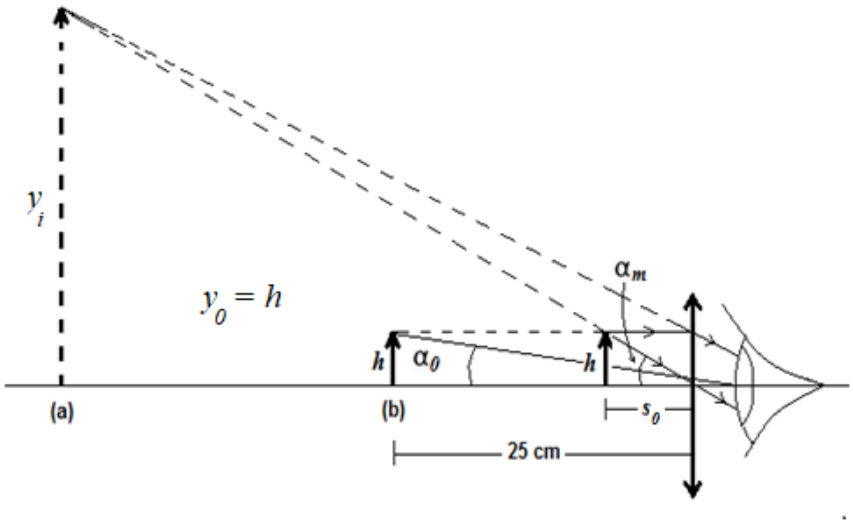


Imagen reproducida del libro: Introduction to optics, Pedrotti

Figura 1.11 Funcionamiento de una lente amplificadora simple

Para proyectar una imagen más grande sobre la retina, se introduce una lente amplificadora simple y el objeto se acerca a una distancia s_0 de la lente, sobre el foco o entre el foco y la lente. En este punto la lente forma una imagen virtual del objeto (en la posición (a)) que subtiende un ángulo mayor que α_0, este ángulo es llamado α_m .

La amplificación angular de una lente convergente simple se define como el cociente $M = \frac{\alpha_m}{\alpha_0}$. En la aproximación paraxial, los ángulos pueden ser representados por sus tangentes, dando como resultado

$$\frac{\alpha_m}{\alpha_0} = \frac{h/s_0}{h/25} = \frac{25}{s_0} \qquad (1.7)$$

donde s_0 es la distancia del objeto a la lente.

Si la imagen es vista al infinito $s_0 = f$ y

$$M = \frac{25}{f} \qquad (1.8)$$

En el otro extremo, si la imagen virtual se ve en el punto de visión más cercano del ojo, entonces s_i = - 25 cm, y de la ecuación de lentes delgadas (ec. 1.4)

$$s_0 = \frac{25\,f}{25+f} \qquad (1.9)$$

Así la amplificación de imagen en el punto de visión más cercano está dada por

$$M = \frac{25}{f} + 1 \qquad (1.10)$$

La amplificación angular real depende entonces del observador en particular, el cual moverá la lente amplificadora hasta que la imagen virtual se observe con comodidad. Para distancias focales pequeñas las ecuaciones 1.7 y 1.9 no difieren grandemente, y la ec.1.7 se usa con más frecuencia.

La amplificación lateral o transversal (M_T) se define como la razón entre el tamaño de la imagen y el tamaño del objeto (Malacara, 1988), esto es

$$M_T = \frac{y_i}{y_0} \qquad (1.11)$$

donde y_i = tamaño de la imagen

y_o = tamaño del objeto

Las lentes amplificadoras se etiquetan generalmente de acuerdo a su amplificación angular M_A.

$$M_A = \frac{25}{f}$$

Por ejemplo, si la distancia mínima de visión de un ojo normal es 250 mm y se tiene una lente de distancia focal de 25 mm entonces

M_A = 250 mm / f

M_A = 250 mm / 25 mm

M_A = 10

Amplificación que se representará como 10 X.

Las lentes objetivos más comunes de los microscopios ópticos compuestos de la actualidad son lentes de 40X, 60 X o 100X, a ellas corresponde distancias focales de 6.25 mm, 4.26 mm (aprox.) y 2.5 mm respectivamente.

1.6 Aberraciones

En la sección 1.2 de este capítulo se definió la teoría de primer orden, que describe la formación de imágenes utilizando únicamente rayos paraxiales, para esto se hizo una aproximación que consistió en tomar únicamente el primer término de la expansión en series de Taylor del $cos\varphi$ y el $sen\varphi$; ahora, si se reemplaza el valor del $sen\varphi$ por los dos primeros términos de la serie se obtiene la llamada *teoría de tercer orden*, con la que se pueden obtener efectos secundarios que no prevé la teoría de primer orden (Malacara 2004), hacer esto significa utilizar rayos que forman ángulos φ mayores.

Los efectos ópticos, que hacen que la calidad de las imágenes formadas por las lentes no sea tan buena como es deseable, se llaman aberraciones.

Cuando la luz que ilumina el objeto es blanca la teoría de primer orden predice que un sistema óptico formado por lentes, tiene distintas distancias focales para distintos colores, ya que el índice de refracción del sistema depende del color de la luz. Al haber distintas distancias focales, la posición y el tamaño de la imagen son diferentes para cada color. El cambio en la posición de la imagen es lo que se conoce como *aberración cromática axial* y el cambio en el tamaño de la imagen como *aberración cromática lateral*. La aberración cromática es la única aberración que puede predecir la teoría de primer orden (Malacara 2004).

La aberración cromática en la imagen de un objeto extendido se aprecia como halos de color azul o rojizo en la periferia del objeto (ver figura 1.12).

Imagen modificada de: http://3dproductiontipsandtricks.blogspot.com/2013/10/chromatic-aberration-in-after-effects.html

Figura 1.12 Aberración cromática**.**

Aún, si la luz que ilumina el objeto es monocromática se presentan aberraciones que no pueden ser predichas por la teoría de primer orden; estas son las llamadas *aberraciones monocromáticas* o *aberraciones de Seidel*. Estas aberraciones también se presentan con luz blanca y se pueden calcular aproximadamente con la teoría de tercer orden. Si se requiere mayor exactitud se deben utilizar aproximaciones de orden superior, lo que significa tomar más términos de la serie del $sen\varphi$.

Si el objeto es puntual la imagen no necesariamente lo es, debido a la presencia de las aberraciones monocromáticas (Malacara 2004).

Las aberraciones de Seidel son cinco: esfericidad, coma, astigmatismo, distorsión y curvatura de campo; a continuación se describen estas, suponiendo en cada caso que la aberración de la que se habla es la única aberración presente en la imagen.

Aberración de esfericidad. Se produce aún en superficies perfectamente esféricas.

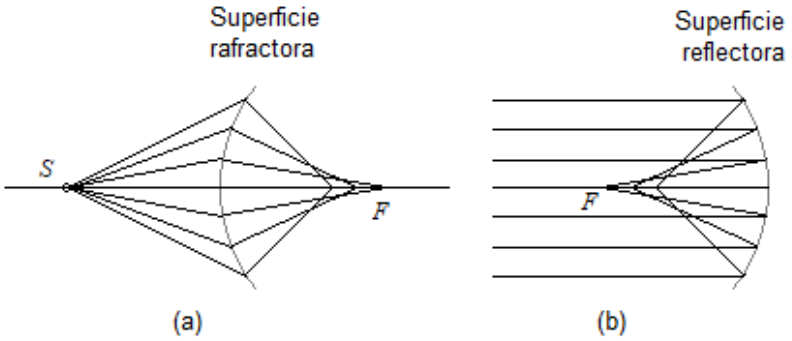


Imagen reproducida del libro: Óptica básica, Malacara.

Figura 1.13 Aberración esférica

En la figura 1.13 se muestra aberración esférica en superficies refractoras y en superficies reflectoras. En ambos casos puede observarse como la posición del foco depende de la altura a la que incide el rayo sobre la superficie. La envolvente tanto de los rayos refractados como reflejados forma una curva llamada *cáustica.*

La aberración de coma. Es un defecto de la imagen que se presenta para objetos puntuales fuera del eje óptico, incluso cuando la distancia al mismo es pequeña.

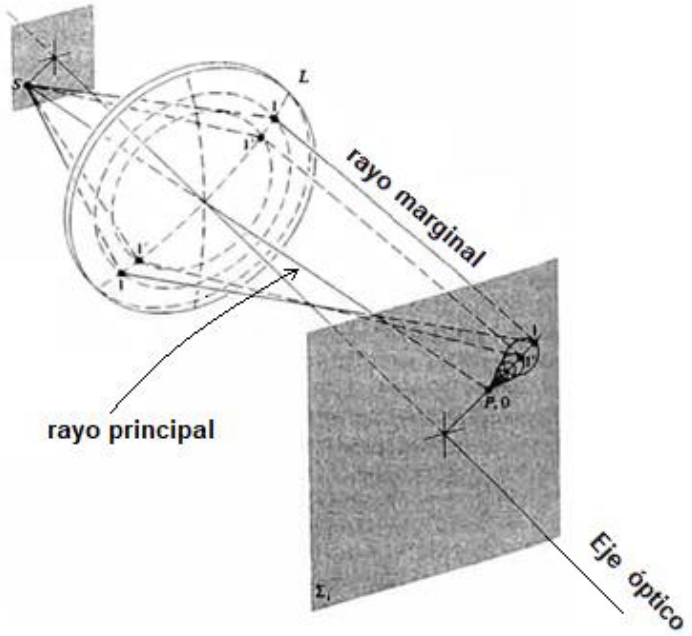


Imagen modificada del libro: Óptica, Hecht-Zajac

Figura 1.14 Aberración comática

La coma se debe a que la distancia focal y la amplificación transversal varían, dependiendo de la distancia al eje del punto de incidencia del rayo sobre la lente.

En la figura 1.14 se observa un objeto puntual S colocado fuera del eje óptico de la lente L; ahí se ve la dependencia de la amplificación transversal (M_T) con la distancia al eje. Los rayos meridionales, que cruzan la orilla de la lente (marginales), llegan al plano imagen Σ_i más alejados del eje que los rayos cercanos al rayo principal.

En este caso, la mayor amplificación se da para los rayos marginales, los cuales formarán una imagen más grande que las imágenes formadas por los rayos más cercanos al rayo principal. Cuando esto sucede se dice que es una coma positiva (los rayos marginales están en foco a una distancia más alejada del eje), en el caso contrario, cuando la amplificación más pequeña está asociada con los rayos marginales y la imagen se encuentra más cerca del eje, entonces se dice que la coma es negativa.

La coma depende de la forma de la lente; si se tiene el objeto al infinito y una lente cóncava-convexa fuertemente positiva (con la cara cóncava hacia el objeto), se tendrá una coma negativa muy grande, esta puede pasar de negativa a cero si se cambia la forma de la lente a plano convexa (con la cara convexa hacia el objeto).

Esta situación tiene cierta analogía con lo que sucede para la aberración esférica, es decir, la aberración esférica se minimiza cuando se usa una lente plano convexa con la superficie convexa hacia el objeto (Hecht 1977).

El astigmatismo. En una imagen el astigmatismo se presenta cuando el objeto está situado a una distancia apreciable fuera del eje óptico, por lo cual el cono de rayos incidentes sobre la lente es asimétrico.

Para explicar en qué consiste el astigmatismo es necesario definir dos planos: el plano meridional (o tangencial) y el plano sagital. El plano meridional contiene al rayo principal y al eje óptico, este plano no cambia, es el mismo desde el objeto hasta la imagen sin importar cuantos elementos tenga el sistema formador de imagen (ver figura 1.15). El plano sagital se define como aquel que es perpendicular al plano meridional y también contiene al rayo principal; este plano cambia su pendiente conforme el rayo principal es desviado por los diferentes elementos ópticos del sistema.

En el caso de un objeto puntual axial, el cono de rayos es simétrico, todas las distancias focales para los diferentes rayos son las mismas y por lo tanto todos los rayos llegarán a un punto común. Sin embargo, la situación para un haz oblicuo será diferente, en los planos sagital y meridional, como resultado las distancias focales en esos planos también serán diferentes (Hecht 1977).

Como existen dos distancias focales diferentes, el cono de rayos sufre una deformación después de refractarse. Inicialmente la sección transversal del cono es circular, pero conforme los rayos avanzan la sección circular se vuelve elíptica, con su eje mayor en el plano sagital, hasta que la elipse degenera en una línea en el foco tangencial F_T, conocida como *imagen primaria* (ver figura 1.17). Al continuar su camino la sección transversal del haz vuelve a ser circular para convertirse nuevamente en una línea, llamada *imagen secundaria*, esta vez sobre el plano meridional, en la posición del foco sagital F_S.

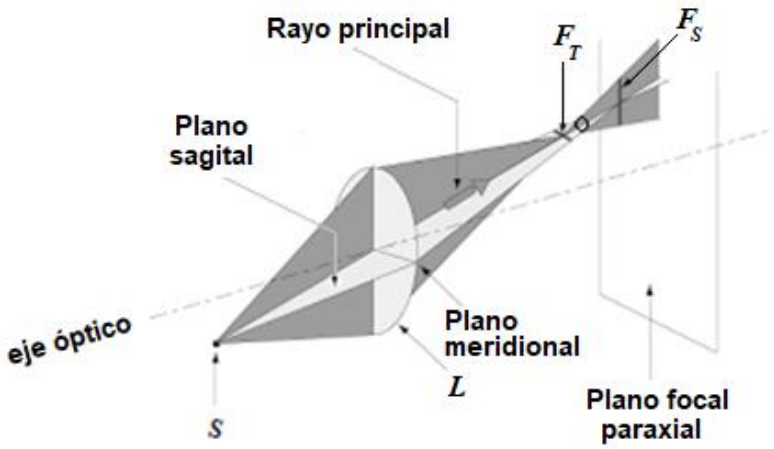
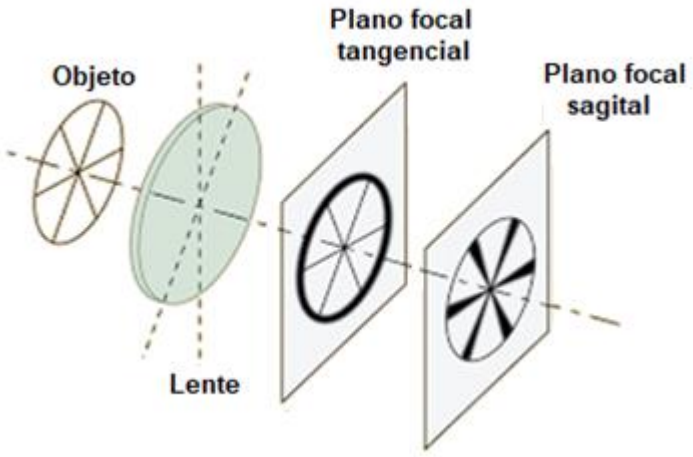


Imagen modificada de: https://www.fing.edu.uy/

Figura 1.15 Planos meridionales y sagitales.

La sección circular del haz de rayos, entre F_T y F_S, se conoce como *círculo de mínima confusión*; este círculo aumenta en diámetro conforme el objeto se aleja del eje óptico, lo que se traduce en el deterioro de la imagen perdiendo definición a lo largo de los bordes.



Modificado de: http://hyperphysics.phy-astr.gsu.edu/

Figura 1.16 Imágenes en los planos focales, tangencial y sagital.

Con el cambio de posición del objeto la línea imagen secundaria y la línea imagen primaria cambiarán de orientación, pero siempre se mantendrán perpendiculares entre sí, esto causa el efecto que se muestra en la figura 1.16; en ella el objeto consiste de líneas radiales y una línea tangencial a las mismas.

Distorsión. Esta aberración se manifiesta como una deformación de toda la imagen, aunque cada punto está nítidamente enfocado (Hecht 1977). La distorsión tiene su origen en el hecho de que la M_T puede ser una función de la distancia y_i, entonces esa distancia puede diferir de la que predice la óptica paraxial en la cual M_T es constante.

En la figura 1.17 se ejemplifica cómo se deforma la imagen de un objeto extendido cuando se presenta la aberración de distorsión. Un objeto cuadrado (figura 1.17a) que sufre distorsión positiva se deforma como lo muestra la figura 1.17b, cada punto de la imagen se desplaza radialmente alejándose del centro, con los puntos más distantes moviéndose una distancia mayor, es decir M_T aumenta con y_i.

Análogamente, la distorsión negativa (figura 1.17c) consiste en una situación donde M_T disminuye con la distancia y_i, esto es, cada punto de la imagen se mueve radialmente hacia el centro.

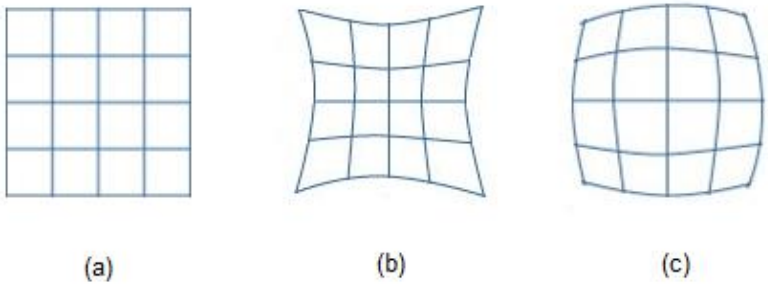


Imagen modificada de: https://www.fisicalab.com/apartado/aberraciones-opticas

Figura 1.17 a) Objeto, b) imagen con distorsión positiva o de corsé, c) imagen con distorsión negativa o de barril.

Es común observar distorsión cuando se ven “de reojo” objetos verticales largos (como uno de los lados del marco de una puerta o un poste) a través de lentes oftálmicas de dimensiones relativamente grandes.

Curvatura de campo. Un objeto plano perpendicular al eje óptico, tendrá una imagen plana únicamente en la región paraxial, pero en general la imagen de ese objeto tendrá una curvatura que es conocida como aberración de *curvatura de campo o de Petzval*. En la figura 1.18 se observa que un objeto en forma de segmento esférico σ_o, tiene como imagen, producida por la lente, un segmento esférico σ_i (ambos segmentos centrados en O).

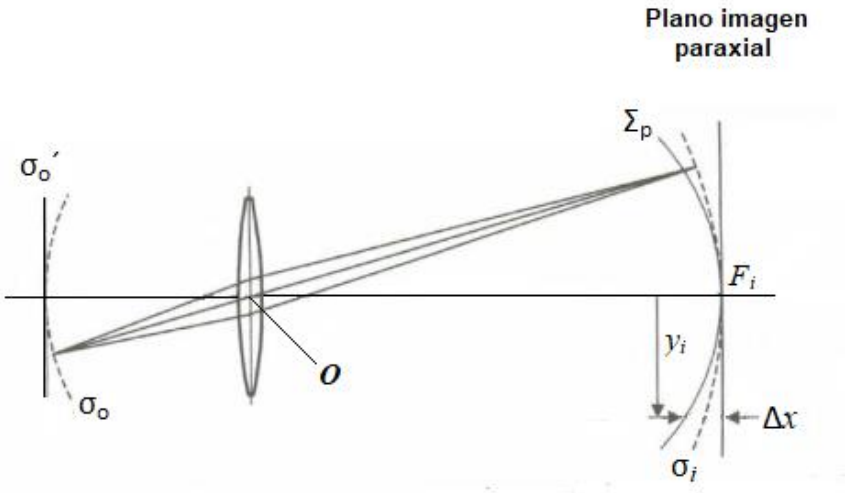


Figura 1.18 Curvatura de campo o de Petzval.

Si se aplana σ_o en el plano σ_o' la imagen se transformará en una superficie parabólica llamada superficie de Petzval.

Para una lente positiva (como es el caso del ejemplo anterior) la superficie de Petzval se curva hacia la lente, hacia el objeto plano. En el caso de una lente negativa la superficie se curvará en contra del plano objeto, es decir, alejándose de la lente (Hecht 1977).

En el caso de los sistemas de proyección, si se tiene presente esta aberración la imagen del objeto se apreciará nítida sobre una pantalla que tenga la forma de la curva de Petzval; en una pantalla plana la periferia de la imagen se observará fuera de foco.

El estudio de las aberraciones de Seidel y de la aberración cromática es un campo amplio de la óptica. En este trabajo únicamente se pretende introducir estas aberraciones a un nivel prácticamente descriptivo.

Referencias

Hecht E. & Zajac A. (1977). Óptica. E.U.A.: *Fondo Educativo Interamericano* S.A., pp.106 – 205.

Malacara D. (1988). *Geometrical and instrumental optics*, *Methods of experimental physics.* USA: Academic Press Inc.

Malacara D. (2004). *Óptica Básica*. México: Fondo de Cultura Económica, pp. 93 - 118.

Pedrotti F. & Pedrotti L. (1993*). Introduction to optics*. USA: Prentice Hall.

2

CAPÍTULO 2. ELEMENTOS Y FUNCIONAMIENTO DEL MICROSCOPIO ÓPTICO COMPUESTO

Introducción

Los microscopios se pueden clasificar en microscopios ópticos y no ópticos. Los microscopios ópticos son aquellos que utilizan lentes y luz visible para formar la imagen amplificada del objeto en observación. En los microscopios no ópticos (como el microscopio electrónico o el microscopio de fuerza atómica) la imagen del objeto examinado no se obtiene mediante el trabajo conjunto de un juego de lentes, en esos instrumentos la imagen es un arreglo de puntos de distintas intensidades que se muestran en una pantalla (o se obtienen impresos), que son el resultado de variaciones en valores de corriente eléctrica, o voltaje, que de alguna forma el instrumento detecta, mediante escaneo, en el proceso de "observación" del objeto.

En la actualidad existe una gran diversidad de microscopios ópticos compuestos, algunos se utilizan especialmente para examinar objetos transparentes, o cortados en láminas tan finas que se transparentan, estos microscopios utilizan la luz transmitida a través de la muestra para formar la imagen de la misma, por eso se les llama microscopios de transmisión. Por otra parte, también existen microscopios ópticos que forman la imagen de la muestra utilizando la luz reflejada por la misma, a estos se les conoce como microscopios de reflexión.

En el capítulo 3 se describirán algunos microscopios que usan luz transmitida y otros luz reflejada por la muestra. En este capítulo se describen brevemente los sistemas que conforman a un microscopio compuesto (sistema mecánico, sistema óptico, y sistema de iluminación) y se explica el principio de funcionamiento de cualquier microscopio óptico compuesto.

2.1 Sistema mecánico

El sistema mecánico del microscopio óptico compuesto lo forman todos los elementos que soportan las componentes ópticas, permiten el movimiento de las mismas para lograr el enfoque, así como el movimiento de la muestra para su observación. Este sistema es el soporte de todos los elementos y accesorios del instrumento, y facilita su traslado.

Los elementos básicos del sistema mecánico, que pueden ser metálicos o estar hechos de materiales plásticos, son: tubo porta ocular, revolver porta objetivos, columna o brazo, cremallera, tornillo macrométrico, tornillo micrométrico, platina, pinzas y el pie o base.

La figura 2.1 muestra el sistema mecánico de un microscopio óptico vertical monocular. El tubo del microscopio sostiene en su parte superior la lente ocular y en su extremo inferior se encuentra el revolver, con un juego de lentes objetivos atornilladas a él. El revolver tiene un mecanismo que le permite girar para cambiar la lente objetivo y con ello la amplificación del instrumento.

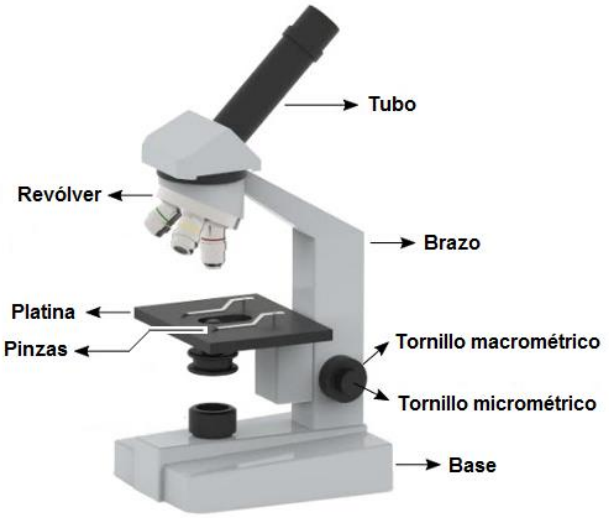


Imagen modificada de: https://www.mundomicroscopio.com/partes-del-microscopio/

Figura 2.1 Sistema mecánico del microscopio óptico compuesto.

El brazo o columna sirve para sostener al conjunto tubo-revolver, tiene una cremallera y dos tonillos, llamados tornillo macrométrico y tornillo micrométrico, que al girarlos mueven al tubo para llevar a cabo el enfoque con un desplazamiento rápido o fino, respectivamente. También existen modelos (como el de la figura 2.1) en los cuales los tornillos, en vez de mover el tubo, mueven la platina para acercar o alejar la muestra a observar y así realizar el enfoque.

La platina es un placa horizontal con una perforación en su centro (puede ser circular u ovalada) sobre la que se coloca la muestra, que puede estar depositada en un portaobjetos o una caja de Petri. En los microscopios convencionales la

perforación de la platina tiene la función de permitir el paso de la luz que ilumina la muestra.

Las pinzas sostienen la muestra cuando está colocada sobre un portaobjetos. En algunos microscopios la platina, en lugar de tener pinzas, tiene un sistema que permite sostener el portaobjetos y darle un desplazamiento horizontal (X-Y) para mover la muestra y con ello cambiar el campo de observación.

El brazo sirve para cargar o trasladar al instrumento.

La base o pie le da estabilidad al instrumento y sobre de ella descansa todo el aparato.

2.2 Sistema óptico

Como se mencionó anteriormente, los microscopios compuestos forman la imagen amplificada del objeto observado utilizando no una, sino dos juegos de lentes convergentes (de ahí el nombre de "compuesto") que reciben el nombre de ocular y objetivo. La figura 2.2 muestra el sistema óptico básico de un microscopio compuesto. La función del objetivo es formar una imagen real del objeto observado, esta imagen será amplificada por el ocular para ser presentada al ojo del observador.

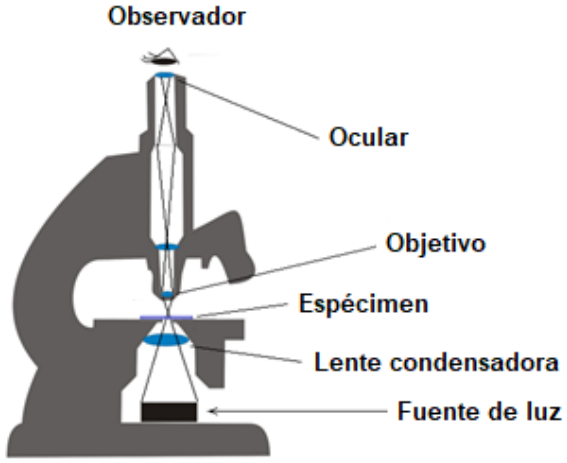


Figura 2.2 Elementos ópticos de un microscopio óptico compuesto.

Hoy en día los oculares y objetivos de microscopio son lentes compuestas, construidos con juegos de lentes para minimizar aberraciones, sin embargo, por

cuestiones didácticas, en los textos de óptica estos elementos ópticos se representan como lentes simples (ver figura 2.3), de esa forma se facilitan los diagramas para las explicaciones.

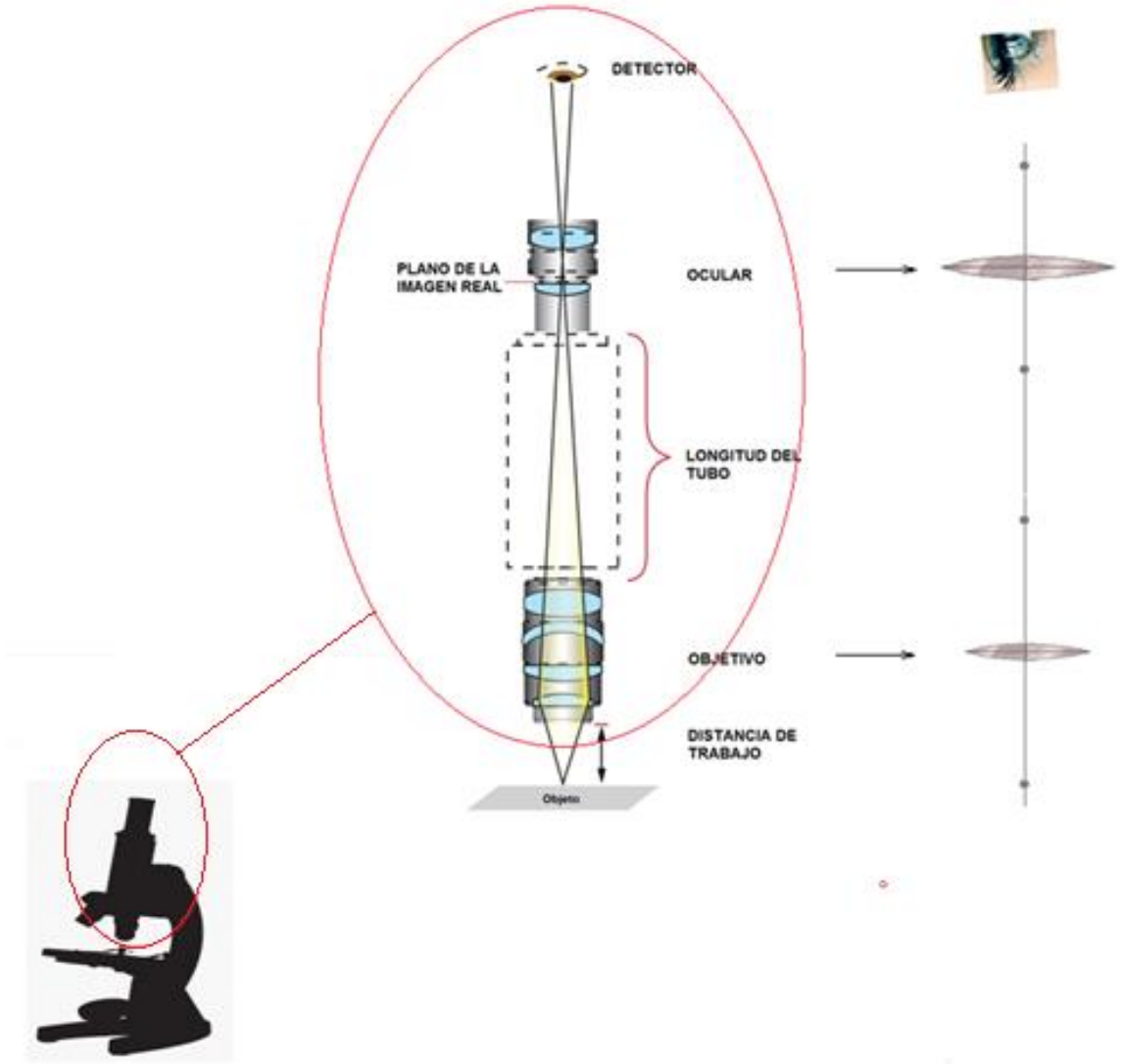


Figura 2.3 Simplificación didáctica del ocular y el objetivo.

En microscopios más equipados el sistema óptico puede incluir sistemas de prismas para que la visión sea binocular (figura 2.4a) e incluso existen microscopios trinoculares, lo que significa que el instrumento cuenta con una salida para cámara fotográfica o cámara de video (figura 2.4b).

(a) (b)

Figura 2.4 Microscopio a) binocular, b) trinocular.

Como se verá más adelante el principio de funcionamiento del microscopio óptico compuesto es único, pero la integración de diferentes accesorios, para nuevas aplicaciones, lo van haciendo más y más sofisticado.

2.3 Sistema de iluminación

El sistema de iluminación de un microscopio tiene como objetivo hacer llegar luz a la muestra, así como controlar su intensidad (figura 2.5). El sistema de iluminación básico del microscopio óptico está formado por una lámpara, una lente condensadora y un diafragma.

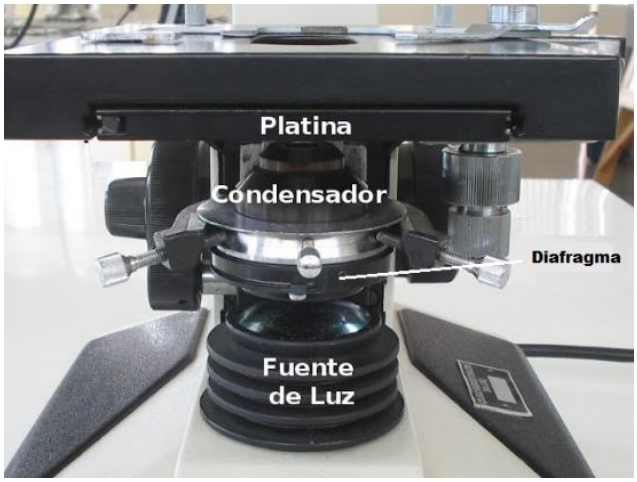


Figura 2.5 Sistema básico de iluminación de un microscopio.

El diafragma sirve para regular la intensidad de la luz que llega a la muestra. Algunos microscopios cuentan con un control eléctrico para regular la intensidad de la luz, pero aún así el diafragma sigue teniendo una función importante.

Hay quienes se preguntan por qué el sistema de iluminación no se considera como parte del sistema óptico, si este sistema incluye la fuente de luz y tiene una lente, la lente condensadora. Aunque el sistema de iluminación tiene un papel determinante en un microscopio (sin luz no hay imagen), se considera como un sistema independiente del sistema óptico ya que su lente condensadora no contribuyen a la formación de la imagen del objeto en observación; la función de la lente condensadora es hacer convergir el haz de la lámpara sobre la muestra para que esta tenga suficiente luz.

En la antigüedad, cuando no existía la energía eléctrica, los sistemas de iluminación de los microscopios compuestos consistían en un espejo móvil (y algunas veces una lente condensadora) que reflejaba la luz natural, o la luz de una vela, de forma que esa luz iluminara la muestra (figura 2.6).

Figura 2.6 Microscopio fabricado por Magny en 1751.
Museo de artes y oficios de Paris.

Existen microscopios (como los estereoscópicos) que cuentan con más de una lámpara, o microscopios (como el de epi-fluorescencia) que tienen fuentes especiales de luz, como la luz laser.

En este trabajo se describen los elementos del microscopio óptico compuesto y cómo funciona, ya que teniendo esto como conocimiento previo es posible comprender rápidamente cómo trabajan muchos otros microscopios ópticos más sofisticados.

2.4 Funcionamiento del microscopio óptico

En su forma más simple un microscopio compuesto consiste de dos lentes positivas: una lente objetivo de distancia focal corta, colocada frente al espécimen u objeto en observación, y una lente ocular que funciona como amplificadora (Pedrotti 1993). La lente objetivo forma una imagen real y amplificada del espécimen, a una distancia específica del objetivo, en esta posición se encuentra lo que llamamos *plano imagen intermedio* (ver figura 2.7). Todos los objetivos están diseñados para que el objeto en observación se encuentre a una distancia definida, medida desde la lente frontal del mismo, esa distancia se le llama la *distancia de trabajo*. A la imagen formada por el objetivo (ubicada en el plano imagen) se le llama *imagen intermedia* (Greenfield 2007).

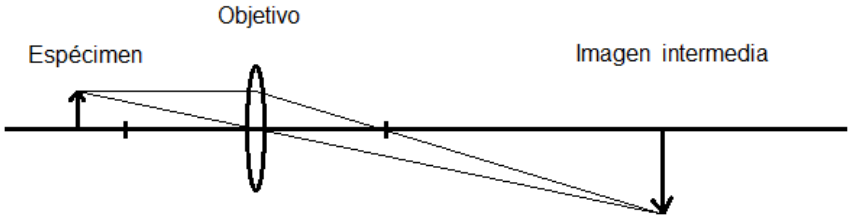


Figura 2.7 Objetivo formando una imagen real, invertida y amplificada del espécimen.

La distancia de trabajo varía con el objetivo y es básicamente mayor para objetivos de baja potencia, pero la ubicación de la imagen intermedia está definida por el diseño.

La imagen intermedia se localiza en el plano focal anterior del ocular, de forma que su imagen es proyectada hacia el infinito (ver figura 2.8); el ojo humano forma una imagen real sobre la retina.

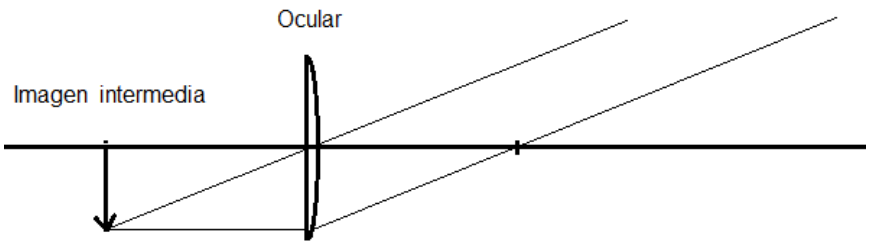


Figura 2.8 Ocular proyectando al infinito la imagen de la imagen intermedia.

En la práctica esto significa que uno puede observar el objeto como si este estuviera en el infinito y así el ojo estaría relajado. Si uno cometiera el error de tratar de observar acomodando el ojo para enfocar, este se estresaría y sería posible sufrir de dolor de cabeza.

En la figura 2.9 se combinan las funciones del objetivo y el ocular, formando el diseño básico del microscopio.

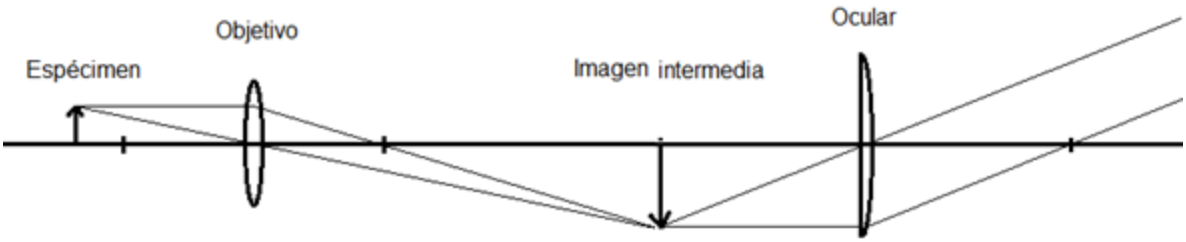


Figura 2.9 Formación de imagen en un microscopio compuesto. El ocular "observa" la imagen real intermedia formada por el objetivo.

Los objetivos de microscopio pueden clasificarse en objetivos corregidos al infinito y objetivos de conjugado finito (finite conjugate objetives).

Los objetivos de conjugado finito generalmente se usan en microscopios convencionales, y enfocan la imagen en una posición finita específica (ver figura 2.10a). En este tipo de objetivos la distancia focal no coincide con la distancia al objeto, están diseñados de esa forma con la finalidad de proyectar la imagen con una amplificación determinada.

Por otra parte, los objetivos corregidos al infinito dirigen la luz en rayos paralelos que están enfocados al infinito; están diseñados de tal forma que la distancia focal

sí coincide con la distancia al objeto (figura 2.10b) y para producir la imagen intermedia utilizan una lente llamada *lente de tubo*, colocada dentro del tubo del microscopio, entre el objetivo y el ocular. El espacio entre el objetivo y la lente de tubo recibe el nombre de *camino de rayos paralelos*.

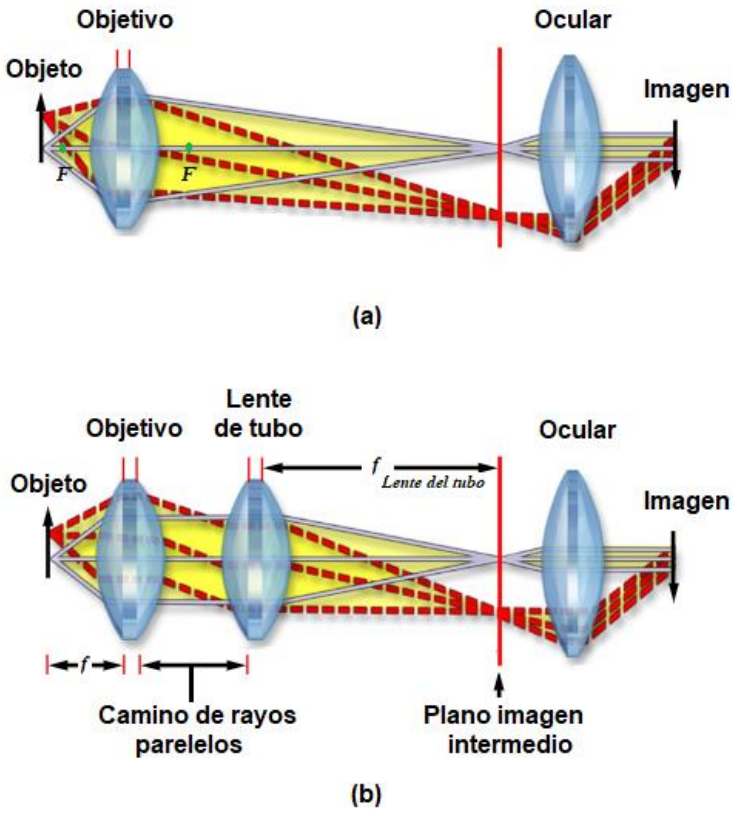


Imagen modificada de: https://www.microscopyu.com/microscopy-basics/infinity-optical-systems

Figura 2.10 a) Objetivo de conjugado finito. b) Objetivo corregido al infinito.

La fortaleza del uso de objetivos corregidos al infinito consiste en la posibilidad de insertar, en el camino de rayos paralelos, componentes ópticas adicionales como divisores de haz, filtros o polarizadores, por mencionar algunos.

En los microscopios más viejos, que usan objetivos de conjugado finito, se tienen una distancia específica entre el segundo punto focal del objetivo y el primer punto focal del ocular (Mouroulis 1997), esta distancia es llamada *la longitud del tubo* (MTL por sus siglas en inglés, Mechanical Tube Length). El diseño asume que cuando se

enfoca el espécimen, se encuentra unas cuantas micras alejado del plano focal frontal del objetivo.

La MTL fue estandarizada a 160 mm, por la Real Sociedad de Microscopía (RMS, por sus siglas en inglés) en el siglo XIX y se aceptó por más de cien años. Al agregar algún accesorio óptico en el camino de rayos paralelos se incrementaba la longitud efectiva del tubo a un valor mayor que 160 mm. Durante el periodo de estandarización los constructores de microscopios fueron forzados a colocar elementos ópticos adicionales a los accesorios ópticos para reestablecer la distancia de 160 mm, el precio de esto era un incremento en la amplificación y una reducción en la intensidad de la imagen.

El fabricante alemán de microscopios Reichert, en un intento por eliminar los elementos ópticos adicionales, fue pionero en el desarrollo de los sistemas ópticos con corrección infinita en la década de 1930, más tarde le siguieron las compañías Leica y Zeiss, pero estos sistemas no se convirtieron en equipos estándar para la mayoría de los fabricantes hasta la década de 1980.

La longitud del tubo en microscopios con corrección infinita se conoce como la *distancia focal de referencia* y varía entre 160 y 200 mm, dependiendo del fabricante.

Obviamente los objetivos diseñados para microscopios con corrección al infinito no son intercambiables con los objetivos de microscopios de tubo con longitud fija y viceversa. Los objetivos diseñados para ser usados en microscopios con longitud fija del tubo tienen inscrito el valor 160mm en la carcasa.

El poder de amplificación de un microscopio es el producto de la amplificación lineal transversal del objetivo, M_{To}, y el aumento angular del ocular, M_{Ae} (Hecht 1977), es decir

$$P.A. = M_{To}\, M_{Ae}.$$

Otra característica importante que debe mencionarse es la brillantez de la imagen que depende, en parte, de la cantidad de luz que colecta el objetivo; la apertura numérica es un parámetro útil para describir esta cantidad.

2.5 Apertura numérica

Para recolectar más luz y producir imágenes más brillantes los conos de rayos que llegan a la lente objetivo, provenientes del objeto observado, deben ser tan amplios como sea posible (Pedrotti 1993).

La amplificación angular de una lente está dada por $M_A = 25 / f$ (ec. 1.12), de esta expresión se observa que la amplificación se incrementa si la distancia focal de la lente disminuye. Las lentes de distancias focales cortas son lentes de curvaturas grandes y por lo tanto diámetros pequeños; ese hecho permite la convergencia de la luz a distancias más cortas respecto de la cara posterior de la lente, dando como resultado distancias focales pequeñas. Al disminuir el diámetro de la lente, el ángulo sólido de rayos útiles provenientes del objeto también disminuye.

En la figura 2.11 (a la derecha del eje óptico de la lente *L*) se muestra cómo los rayos provenientes de un punto O del objeto pasan a través del cubre objetos y de una capa de aire antes de llegar al primer elemento de la lente objetivo *L,* haciendo un ángulo α_a respecto al eje óptico.

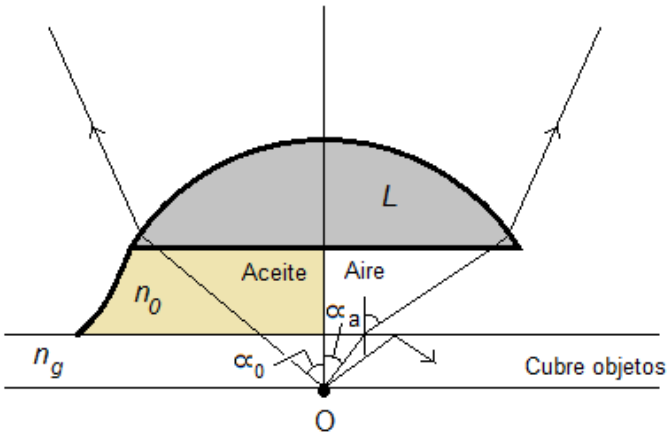


Imagen reproducida de libro: Introduction to optics, Pedrotti.

Figura 2.11 Trayectoria de los rayos que parten de una fuente puntual O y llegan a la lente objetivo

Debido a la refracción en la interfase vidrio-aire, existen rayos con ángulos mayores que α_a que no alcanzarán la lente, por lo cual hay una pérdida de luz. Esta limitación es subsanada usando un fluido transparente acoplador de índice de refracción tan

cercano como sea posible al índice del cubre objetos. En la figura 2.11, a la izquierda del eje óptico, se muestra lo que sucede cuando se usa una capa de aceite; con ello es posible obtener un ángulo α_0 mayor que α_a.

Normalmente el índice de refracción de un cubre objetos es 1.522 y el del aceite es 1.516, lo que permite un excelente acoplamiento. De esta forma se incremente la capacidad de recolección de luz de la lente objetivo, incrementando el índice de refracción en el espacio objeto. Una medida de esta capacidad de recolección de luz está dada por la expresión

$$\text{N.A.} = n \operatorname{sen} \alpha$$

llamada la *apertura numérica*, donde n es el índice de refracción del medio en contacto con el objetivo y α es la mitad del ángulo del cono máximo de luz captado por esa lente.

La figura 2.12 muestra las especificaciones más comunes de un objetivo de microscopio impresas sobre su carcasa.

Figura 2.12 Objetivo de microscopio con sus especificaciones.

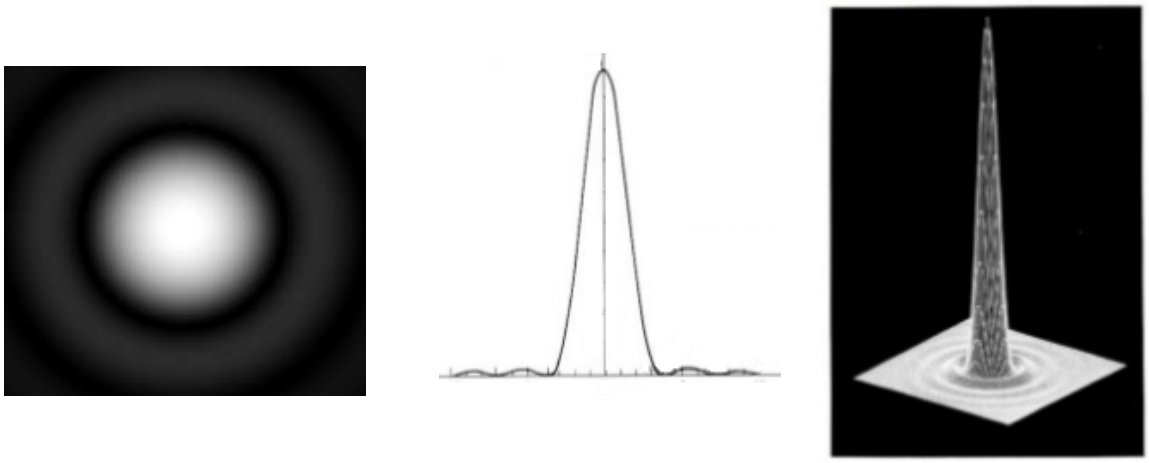
2.6 Resolución del microscopio

Para hablar de la resolución de un instrumento óptico, y en particular del microscopio, se requiere conocer algunos conceptos que no pueden ser explicados por la óptica geométrica, tales conceptos son: el límite de difracción de Abbe, el disco de Airy y el criterio de Rayleigh. Es la óptica física la encargada de explicar estos conceptos.

La resolución de un microscopio está intrínsecamente ligada a la apertura numérica de las componentes ópticas del instrumento, así como a la longitud de onda usada para examinar al espécimen. La resolución es la mínima distancia (d) a la cual dos puntos distintos de un espécimen pueden ser vistos por el observador como entidades distintas (Hecht 1977), en otras palabras, la resolución de un microscopio es la habilidad que tiene el instrumento para distinguir detalles.

Desde el punto de vista de la óptica geométrica, un sistema convergente de lentes (como el objetivo) debería enfocar una fuente puntual de luz en un punto en el plano imagen, sin embargo la experiencia muestra que la imagen de esa fuente puntual es una distribución de intensidades llamada el *patrón de difracción de Airy* (ver figura 2.13a).

Un patrón de Airy es una distribución de intensidades de luz resultado de la difracción de la luz que pasa por una abertura circular pequeña.



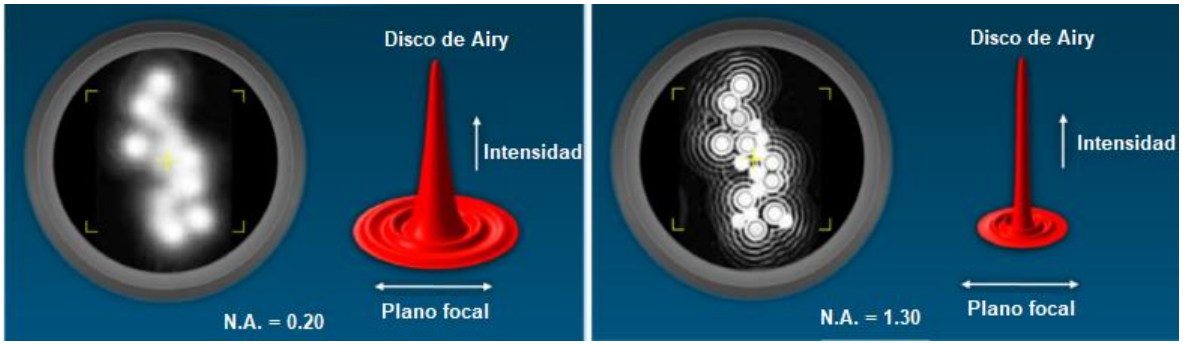
(a) (b)

Figura 2.13. a) Patrón de difracción de Airy, b) distribución de intensidad del patrón de Airy.

La zona central del patrón de Airy es llamado *Disco de Airy* y, en el caso de sistemas de lentes, está determinado por la abertura circular del sistema perfectamente alineado, limitado por difracción. En la figura 2.13b se muestran las intensidades de las diferentes zonas del patrón de Airy, su centro es una zona circular brillante alrededor de la cual hay anillos concéntricos.

La representación tri-dimensional de la distribución de intensidades del patrón de Airy es conocida como la función de esparcimiento de un punto (PSF por sus siglas en inglés “Point spread function”).

Cuando se tiene un objeto puntual la difracción de la luz, que determina el límite de resolución del microscopio, difumina la imagen del objeto hasta un cierto tamaño y forma mínimos llamados PSF (figura 2.14).



(a) (b)

Imagen modificada de: https://www.zeiss.com/microscopy/int/solutions/reference/basic-microscopy/the-point-spread-function.html

Figura 2.14 a) Imagen para una apertura numérica dada, b) la resolución se incrementa si la apertura numérica aumenta.

Un microscopio es esencialmente un sistema de lentes que forma la imagen de un objeto extendido, este objeto puede considerarse como compuesto por un conjunto de fuentes puntuales de luz incoherentes, en este caso el sistema de lentes formará una imagen del objeto que consiste en una distribución de patrones de Airy parcialmente superpuestos (ver figura 2.14b). En lentes donde las aberraciones son despreciables, la extensión de cada punto imagen debido a la difracción representa el límite máximo en la calidad de la imagen (Hecht 1977).

La expresión para calcular la resolución lateral en un microscopio está dada por

$$d = \frac{\lambda}{2\,\mathrm{NA}}$$

donde λ es la longitud de onda de la luz con la que se observa el espécimen y NA es la apertura numérica del objetivo. Esta expresión es llamada fórmula de

difracción de Abbe para la resolución lateral. Entre más pequeña es d mayor resolución presenta la imagen.

Por otra parte, la fórmula de *difracción de Abbe para la resolución axial* es

$$d_{axial} = \frac{2\lambda}{\mathrm{NA}^2}$$

Para incrementar la resolución en un microscopio, el espécimen debe ser observado en alguna de las siguientes condiciones: con una longitud de onda corta, a través de un medio con un índice de refracción relativamente alto, a través de componentes ópticas que tengan alto índice, o una combinación de todos estos factores. Sin embargo, aun teniendo en consideración todas estas condiciones, los límites en un microscopio real están determinados por la complejidad del sistema completo, características de transmisión del vidrio a longitudes menores de 400 nm y de una NA alta en el microscopio completo.

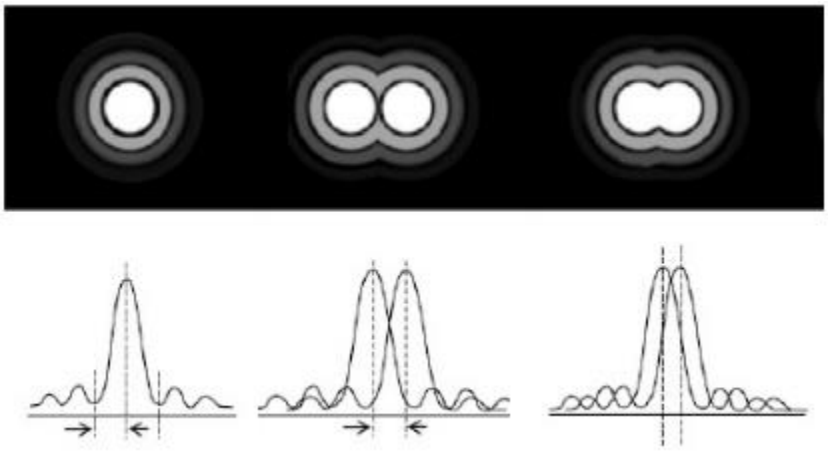
La resolución lateral en un microscopio ideal, con iluminación de una longitud de onda de aproximadamente 400 nm, es alrededor de 150 nm, mientras que la resolución axial es alrededor de 400 nm, cuando se usa un objetivo de NA igual a 1.40.

Para lograr la máxima resolución (teórica) en un microscopio, cada una de las componentes ópticas debe tener la máxima NA disponible, además se debe usar la longitud de onda más corta posible y, el sistema completo del microscopio debe estar correctamente alineado.

Debido a la importancia de la interrelación entre el índice de refracción del medio y la apertura angular del objetivo, Abbe introdujo el concepto de apertura numérica en el curso de la explicación de la resolución del microscopio.

Como la resolución depende de la longitud de onda (longitudes de onda más cortas proporcionan resoluciones mayores y viceversa), para calcular la resolución, los microscopistas fijan la apertura numérica y usan luz blanca de una lámpara de tungsteno para iluminar el espécimen. El espectro visible de la emisión de esta lámpara está centrado alrededor de los 550 nm, luz verde, nuestros ojos son más sensibles a luz verde.

Finalmente, usando la teoría de los discos de Airy (figura 2.15a), el físico inglés John William Rayleigh enunció, en 1896, el criterio que actualmente lleva su nombre, el cual define el límite de resolución en un sistema limitado por difracción. Este criterio establece que dos puntos son distinguibles uno de otro, cuando el centro de uno de los discos de Airy de uno de los puntos, se superpone con el primer mínimo del patrón de difracción del otro punto (figura 2.15b), en este caso se puede considerar que los puntos están resueltos (se distinguen uno de otro); si los discos de Airy están más cercanos que lo marca el criterio anterior los puntos no se distinguen uno de otro (no se resuelven, figura 2.15.c) y por tanto no se ven como detalles separados en la imagen del espécimen.



(a) (b) (c)

Figura 2.15. a) Patrón de Airy, b) puntos resueltos, c) puntos no resueltos.

El criterio Rayleigh es un criterio sencillo y arbitrario, pero suficientemente preciso para definir lo que es la resolución (Hecht 1977).

Referencias

Hecht E. & Zajac A. (1977). Óptica. E.U.A.: *Fondo Educativo Interamericano* S.A.

Malacara D. (2004). *Óptica Básica*. México: Fondo de Cultura Económica.

Mouroulis P. & Mcdonald J.. (1997). *Geometrical optics and optical desing*. USA: Oxford University Press

Pedrotti F. & Pedrotti L. (1993*). Introduction to optics*. USA: Prentice Hall.

Sluder G. & Wolf D.. (2007). *Digital Microscopy*. USA: Academic Press.

https://www.leica-microsystems.com/

https://www.microscopyu.com/microscopy-basics/infinity-optical-systems

http://zeiss-campus.magnet.fsu.edu/articles/basics/resolution.html

3

CAPÍTULO 3. EL MICROSCOPIO ÓPTICO Y ALGUNOS DE SUS DESCENDIENTES

INTRODUCCIÓN

Los microscopios ópticos de hoy en día distan mucho del microscopio simple usado por Leeuwenhoek en el siglo XVII. Como se mencionó anteriormente, el microscopio simple surgió posteriormente al microscopio óptico compuesto; sin embargo la estructura básica de este último sufrió modificaciones y con ellas surgieron nuevas versiones de microscopios ópticos utilizados para análisis y procedimientos específicos (Mouroulis, 1997). El microscopio óptico compuesto se encuentra en constante evolución, debido a las necesidades generadas por las diferentes aplicaciones que requieren el uso de este instrumento.

Existen microscopios monoculares (con un solo ocular), binoculares (dos oculares), estereoscópicos, invertidos, de contraste de fase, de epi-fluorescencia y microscopios confocales, entre otros. Estos microscopios son, en esencia, microscopios ópticos a los que se han adaptados dispositivos que van desde los más sencillos (como filtros de color) hasta otros muy sofisticados, como fuentes de luz láser y equipo de cómputo (como en el caso del microscopio confocal), para llevar a cabo la reconstrucción de la imagen de los especímenes observados (Hibbs 2004).

Algunos de los microscopios que se describirán en este capítulo son microscopios verticales convencionales, es decir, la iluminación de la muestra se hace desde la parte inferior del instrumento, de esta forma la luz llega a la platina sobre la cual se coloca la muestra (esto los convierte en microscopios de transmisión) y finalmente al objetivo y el ocular, que se encuentran en la parte superior del instrumento. Esta es una configuración vertical, la más conocida pero no es la única que existe, como se verá más adelante.

En este capítulo se presentan algunas de las transformaciones que ha sufrido el microscopio compuesto, mencionar todas las existentes llevaría mucho tiempo y no es el objetivo de este trabajo, pero, independientemente del tipo de microscopio que se trate el principio de su funcionamiento, descrito en el capítulo anterior, es el mismo para todos. De toda la gama de microscopios ópticos existentes, aquí se explican sólo algunas configuraciones muy representativas de la evolución que ha tenido este instrumento a lo largo de los cuatro siglos de su existencia.

3.1 Microscopio estereoscópico

Los microscopios estereoscópicos, como su nombre lo indica, ofrecen una imagen estereoscópica (3D) del objeto en observación; en general son microscopios de baja amplificación, entre 10X y 80X y funcionan con luz reflejada por la muestra y no con luz transmitida (ver figura 3.1), como lo hacen la mayoría de los microscopios convencionales; de este modo se pueden observar muestras sin necesidad de laminarlas.

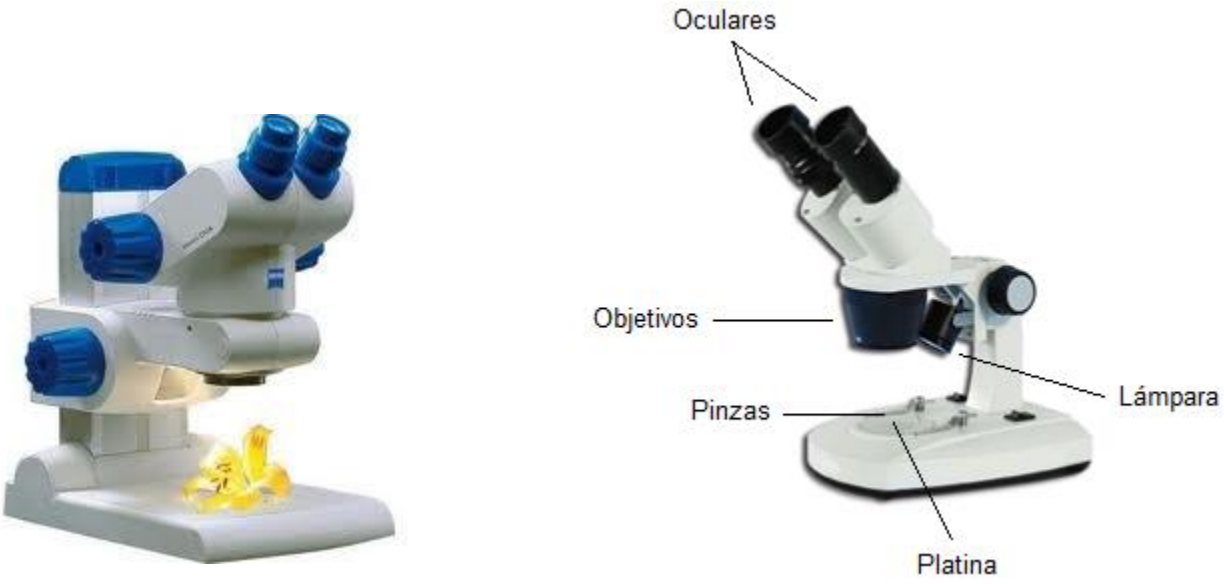


Figura 3.1 Microscopio estereoscópico.

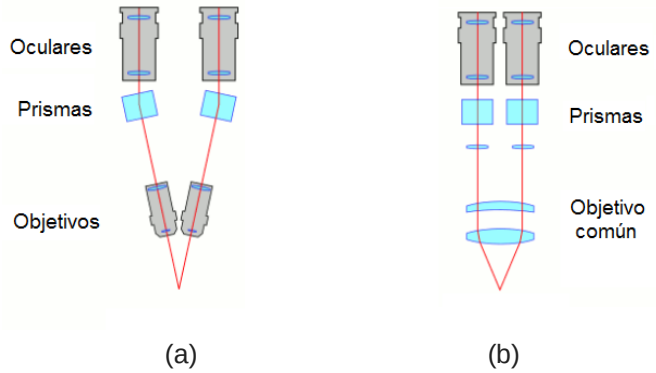
El microscopio estereoscópico es un microscopio binocular, pero no todos los microscopios binoculares son estereoscópicos. Como ocurre en la visión binocular convencional, en un microscopio estereoscópico es necesario que los dos ojos observen el objeto con ángulos ligeramente distintos.

En los microscopios binoculares convencionales la muestra es observada a través de un solo objetivo, por tanto la imagen que observan los dos ojos es exactamente la misma y por ello no puede generarse una visión tridimensional, la imagen se observa en 2D. En contraparte, los microscopios estereoscópicos captan la luz que refleja la muestra desde dos ángulos distintos y por tanto la imagen que observa

cada ojo es ligeramente distinta una de la otra; la combinación de estas dos imágenes produce el efecto tridimensional.

En la práctica existen dos tipos de microscopios estereoscópicos: el de Greenough o convergente y el de Galileo o de objetivo común.

En el modelo llamado de Greenough, se usan dos microscopios idénticos (con la misma amplificación) con un ángulo entre 10 y 12 grados entre ellos, de tal forma que enfocan mismo punto (ver figura 3.2a). Este diseño tiene limitaciones en cuanto a modularidad, o sea, su capacidad de modificar el sistema para introducirle accesorios es limitada, aunque es económico y en él las aberraciones resultan fáciles de corregir, presenta el inconveniente de que la observación durante tiempos largos resulta fatigosa.



(a) (b)

Imagen modificada de: https://www.mundomicroscopio.com/microscopio-estereoscopico/

Figura 3.2 a) Microscopio estereoscópico Greenough y b) microscopio estereoscópico de Galileo.

En el diseño de Galileo (figura 3.2b) la luz que proviene del mismo punto, es refractada por una lente objetivo común de gran tamaño y viaja por dos rutas ópticas paralelas (una para cada ojo); las imágenes formadas por los dos oculares son ligeramente distintas y así se genera el efecto tridimensional. El diseño del microscopio de objetivo común es más sofisticado que el convergente, con mejor modularidad y no genera fatiga en tiempos de observación largos, sin embargo es más costoso de fabricar y las aberraciones, al generarse la imagen a través de la periferia del objetivo común y en un ángulo que no coincide con el eje óptico del mismo, son más difíciles de corregir.

El diseño de los microscopios estereoscópicos es tal que pueden existir distancias entre el objetivo y la muestra que van desde un par de centímetros hasta decenas de ellos. Estos instrumentos tienen aplicación en biología, mineralogía, la industria (microelectrónica, por ejemplo), medicina (microscopios quirúrgicos), investigación y en toda observación que requiera manipular el objeto observado y que la visión estereoscópica sea fundamental.

3.2 Microscopio invertido

Los microscopios invertidos (como su nombre lo indica) tienen su sistema óptico invertido en comparación con los microscopios verticales convencionales. Como se mencionó en la introducción de este capítulo, en un microscopio vertical la muestra se ilumina desde la base del instrumento y la luz viaja hacia arriba cruzando el objetivo y ocular hasta llegar al ojo del observador, o a un detector (ver figura 3.3a). En un microscopio invertido la muestra, colocada sobre la platina, es iluminada desde arriba y la luz viaja hacia el objetivo que se encuentra debajo de la platina (ver figura 3.3b). Gracias a un sistema óptico que guía la luz hacia el ocular, el observador puede ver la imagen amplificada de la muestra en una posición ergonómica, como si se tratara de un microscopio vertical convencional.

(a) (b)

Imágenes recuperadas de: https://www.fisicalab.com/apartado/microscopio#contenidos

Figura 3.3 a) Microscopio óptico vertical, b) Microscopio óptico invertido

Al iluminar la muestra desde arriba de la platina se tiene espacio sobre la misma para la manipulación o, por ejemplo, simplemente para el monitoreo de actividades en los cultivos celulares vivos, como son el crecimiento y el comportamiento de los mismos, que a veces pueden durar varios días.

El principio de funcionamiento y formación de la imagen en un microscopio invertido es el mismo que en el microscopio vertical.

El microscopio invertido fue inventado en 1850 por J. Lawrence Smith, un miembro de la facultad de la Universidad de Tulane, entonces llamado Colegio Médico de Louisiana (Smith 1852).

Los microscopios invertidos son microscopios que funcionan por transmisión de luz y su uso es muy común para el examen de especímenes gruesos y especímenes que se asientan en la base de las cajas de Petri.

Algunas de las técnicas de observación como el contraste de fase y la fluorescencia son usadas con microscopios invertidos en las ciencias biológicas para el estudio de las células vivas y cultivos de tejidos.

En la industria, al microscopio invertido también se le conoce como microscopio de platina invertida. Su uso es muy común en el área de ciencias de los materiales, en donde se requiere análisis tridimensional de materiales semiconductores y de metales, para lo cual las muestras son, generalmente, un metal pulido en el que se estudia la estructura y defectos superficiales.

3.3 Microscopio de contraste de fase

En el año de 1934 el físico holandés Fritz Zernike aplicó la teoría del contraste de fase al área de la microscopía e inventó el microscopio de contraste de fase, por lo cual recibió el Premio Nobel en 1953 (Hecht 1977).

Para entender el concepto de *contraste de fase* no es suficiente con trabajar en el rango de la óptica geométrica, se requiere adentrarse a la óptica física (el comportamiento de la luz como onda) y conocer las características de las ondas entre las cuales está la *fase de la onda* (ver figura 3.4).

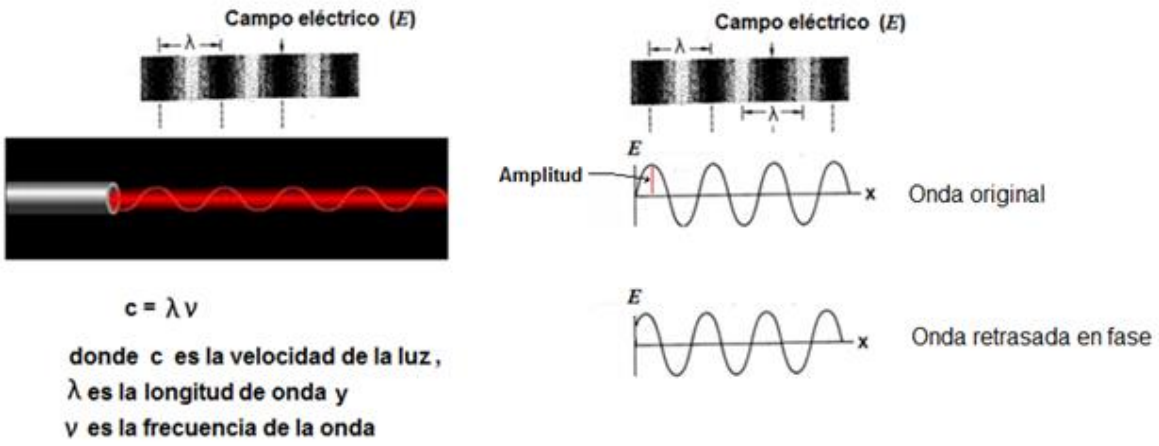


Figura 3.4 Característica de una onda.

La microscopía de contraste de fase se basa fundamentalmente en el retraso que se produce en las ondas de luz al atravesar objetos de cierto índice de refracción o un espesor dado (ver figura 3.5).

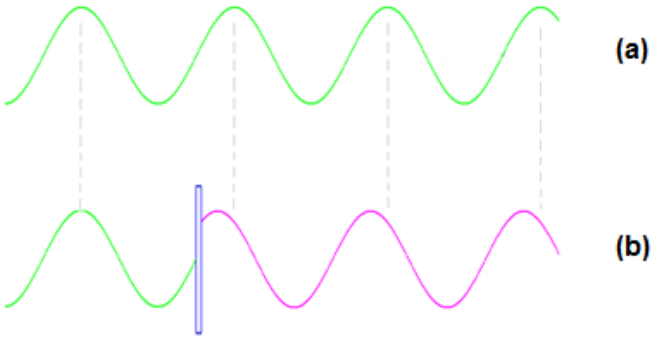


Figura 3.5 a) Onda de luz propagándose, b) onda retrasada en fase al atravesar un medio de diferente índice al medio de propagación original.

En aplicaciones biológicas el microscopio de contraste de fase aprovecha las pequeñas diferencias en el índice de refracción en las distintas partes de una célula y en distintas partes de una muestra de tejido.

En la teoría de la óptica física la luz puede representarse con una función escalar $E(\mathbf{r}, t)$ que es solución de la ecuación de onda (Hecht 1977).

Cuando la perturbación se propaga en dirección positiva del eje x la función $E(\mathbf{r}, t)$ puede escribirse como

$$E(\mathbf{x}, t) = E_0 \, sen(wt - (kx + \varepsilon)) \qquad (3.1)$$

donde E_0 en la amplitud de la perturbación, y el argumento de la función seno, $wt - (kx + \varepsilon)$, es llamado la *fase* de la onda, w es la frecuencia angular, k es el número de onda y ε es la fase inicial de la onda.

Cuando las ondas de luz coinciden en la misma región del espacio se superponen y se dice que interfieren; la perturbación óptica final depende de las circunstancias en que se encontraban las ondas en el momento de la superposición.

La figura 3.6 muestra la superposición de dos ondas de la misma amplitud cuando están defasadas π/2 radianes.

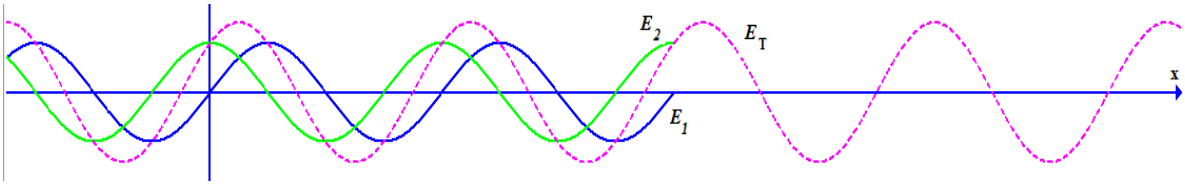


Figura 3.6 Suma de ondas ($E_T = E_1 + E_2$) que difieren en π/2

Si existe una diferencia de fase de 2π rad entre dos ondas que se superponen, se dice que las ondas están en fase (ver figura 3.7a); la superposición de las mismas da como resultado un fenómeno llamado interferencia total constructiva. La superposición de dos ondas fuera de fase, es decir, la diferencia de fase entre ellas es de π rad, da como resultado una interferencia llamada interferencia total destructiva (ver figura 3.7b).

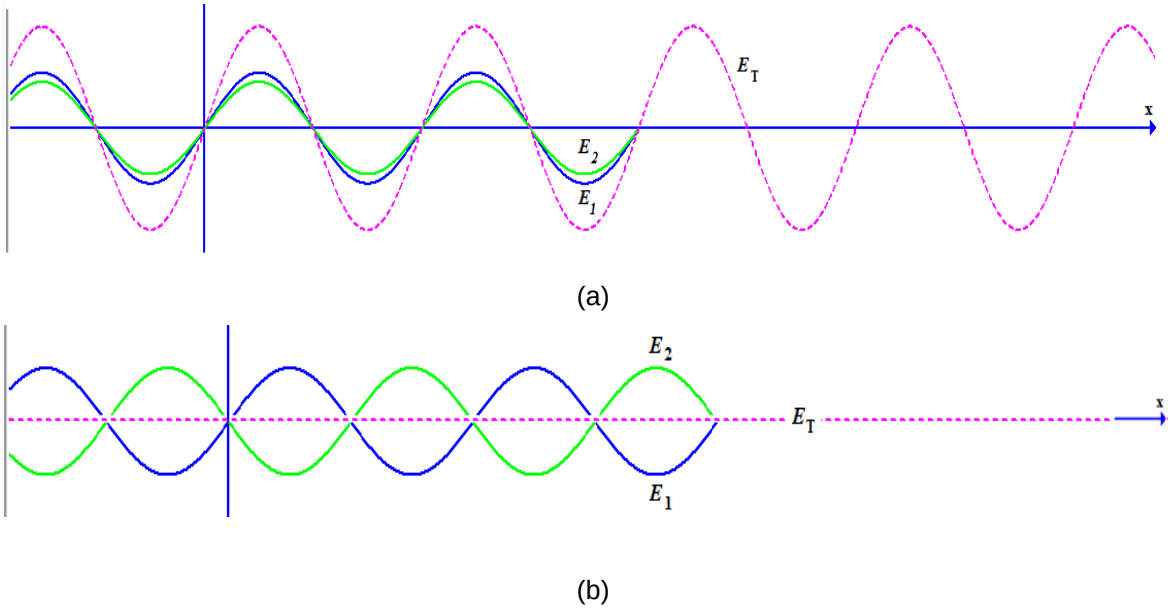


Figura 3.7 Suma de ondas que difieren en a) 2π, interferencia constructiva, b) π, interferencia destructiva

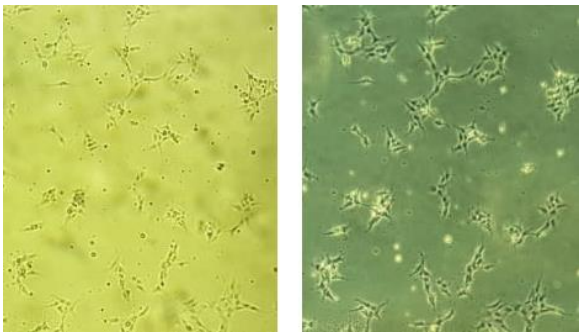
Funcionamiento físico del microscopio de contraste de fase.

Cuando uno observa un objeto opaco este se puede ver porque contrasta con el fondo que lo rodea, este contraste se debe a las variaciones ocasionadas en la amplitud de la onda de luz que refleja; a este tipo de estructura se le conoce como *objeto de amplitud*.

Los objetos que son transparentes y que prácticamente no hacen contraste con su alrededor son llamados *objetos de fase* y alteran solamente la fase de la onda de luz que transmiten. El **espesor óptico** de tales objetos varia generalmente de punto a punto conforme el espesor físico o el índice de refracción (o ambos) varían, esta es la causa de las variaciones en la fase de la luz transmitida por el objeto. El ojo humano no puede detectar variaciones de fase y por lo tanto esos objetos son invisibles. En el caso de la microscopía, esta situación ha llevado a los biólogos a teñir sus muestras transparentes (objetos de fase) para convertirlos en objetos de amplitud, pero este procedimiento muchas veces mata los especímenes cuyos procesos vitales son el objeto de estudio (Hecht 1977). El microscopio de contraste de fase vino a solucionar este problema, ya que con su uso se obtienen imágenes

con un gran contraste en la intensidad, que hace resaltar detalles de la muestra que no pueden verse con un microscopio convencional (ver figura 3.8).

La técnica de contraste de fase **transforma las diferencias de fase de la luz que ilumina la muestra, en diferencias de amplitud en la imagen**; así el objeto se hace visible sin necesidad de teñirlo.



(a) (b)

Figura 3.8 Células epiteliales de riñón humano. a) Imagen en campo brillante, b) imagen de contraste de fase (cortesía de Laboratorio de biofotónica del CIO)

Para explicar qué es el contraste de fase se utilizará el modelo simplificado que se muestra en la figura 3.9. En ese arreglo óptico la muestra (objeto de fase) es una placa transparente con una diferencia de espesor en su centro y la luz que la ilumina se representa con un frente de onda plano. La onda plana pasa a través de la muestra, por lo cual se aprecia el retardo en la fase de una pequeña región del frente de onda plano.

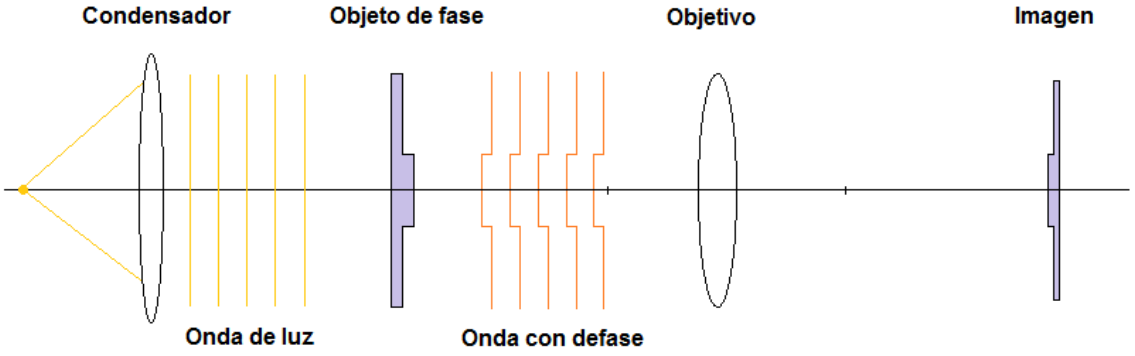


Figura 3.9 Montaje óptico para explicación del contraste de fase.

La onda emergente ya no es perfectamente plana sino que contiene un pequeño defase que corresponde al área del frente de onda retrasada por la zona de mayor espesor, se dice entonces que la onda está modulada en fase.

Si el retraso en fase es muy pequeño (puede considerarse del orden de $\frac{\lambda}{4}$, donde λ es la longitud de onda de la luz) la perturbación en la amplitud de la onda será localizada y muy pequeña.

A la perturbación inicial se le llama onda directa u orden cero, mientras que a la perturbación localizada se le llama onda difractada. La primera produce un campo uniformemente iluminado que no es afectado por el objeto, mientras que la última lleva toda la información acerca de la estructura óptica de la zona de mayor espesor. Después de divergir del objeto este frente de onda se hace convergir en el plano imagen. Las ondas directas y difractadas se recombinan fuera de fase en π/2 (como en la figura 3.6) para formar de nuevo una onda modulada en fase. La amplitud de la onda reconstituida es la misma en todas partes sobre el plano imagen; aunque la fase varia de punto a punto la densidad de flujo es uniforme y la imagen no es perceptible.

Si fuera posible recorrer la fase relativa entre los haces difractado y directo en un π/2 adicional antes de su recombinación, podrían interferir constructivamente o destructivamente (como en la figura 3.7) en cada punto de la imagen, esto significaría que el frente de onda reconstruido sobre la región de la imagen estaría entonces modulado en amplitud y la imagen sería visible.

Para lograr recorrer la fase relativa entre los haces difractado y directo en un π/2 adicional antes de su recombinación, Zernike insertó un filtro espacial (diafragma anular) antes del condensador y una placa de fase, entre el objetivo y el plano imagen, consistente en un surco anular de profundidad *d* grabado en una placa de vidrio transparente de índice n_g (ver figura 3.10). Idealmente sólo el haz directo pasaría a través de este anillo (ver figura 3.11) y al hacerlo así obtendría un adelanto de fase de λ/4 respecto de la onda difractada.

Figura 3.10 Filtro espacial y placa de fase del microscopio de contraste de fase.

La figura 3.11 muestra la trayectoria del haz de luz después de atravesar el diafragma anular. Cabe señalar que si se giran todos los elementos ópticos de esta figura, alrededor del eje óptico, se tendrá una imagen en 3D de la trayectoria real del haz de luz.

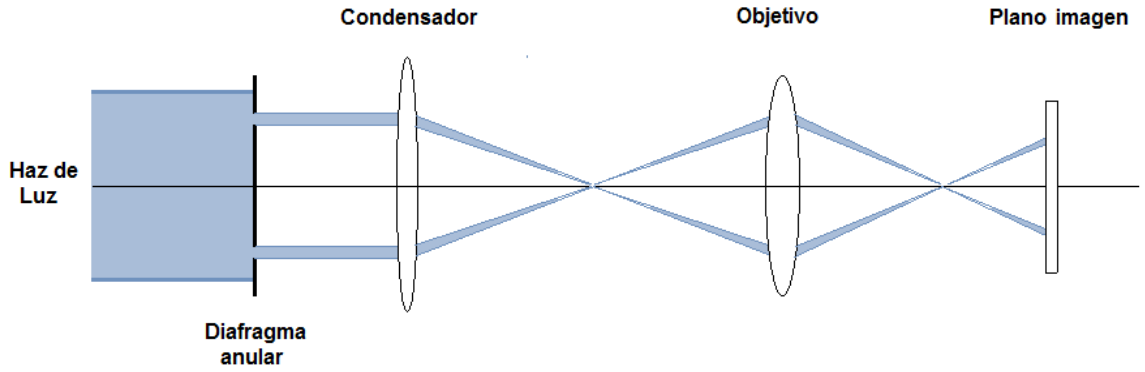


Figura 3.11 Trayectoria de la luz, con simetría rotacional alrededor del eje óptico

En la figura 3.12 se ha colocado la muestra y se observa la luz difractada por la misma.

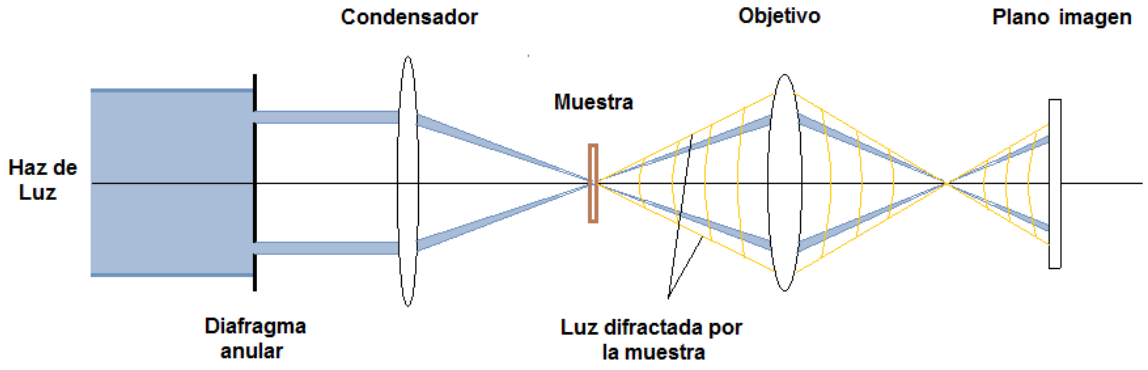
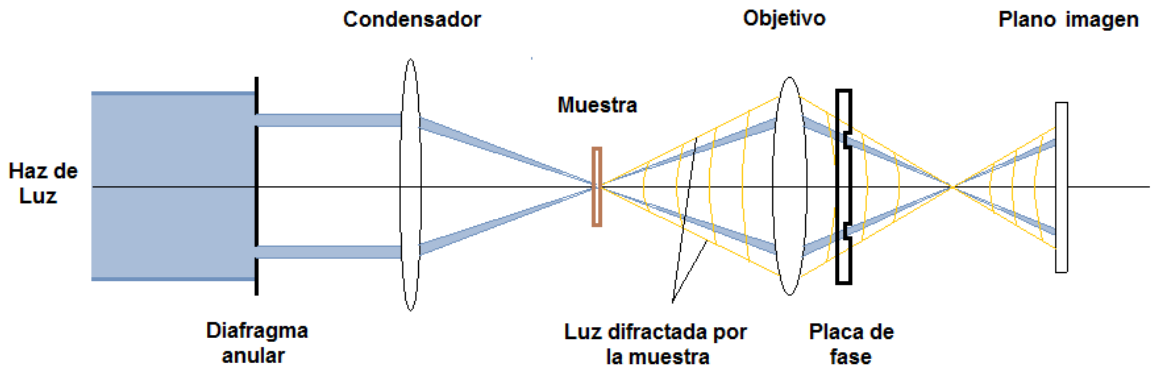
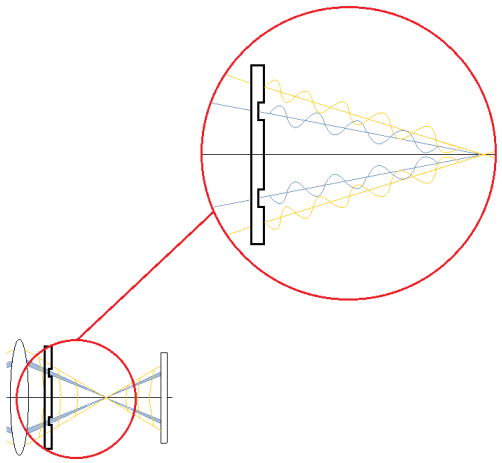


Figura 3.12 Orden cero y luz difractada por la muestra.

En la figura 3.13a se ha insertado la placa de fase delante del objetivo y en la figura 3.13b se muestra un diagrama de la superposición de ondas de luz directa y difractada.



(a)



(b)

Figura 3.13 Microscopio de contraste de fase

En la figura 3.14 se han eliminado varios elementos del sistema óptico como son el objetivo y el diafragma anular. Dependiendo del espesor del espécimen se tendrán diferencias de fase, entre el orden cero y la onda difractada, que variarán entre π y 2π, esto representará zonas completamente obscuras (para defase π), zonas muy brillantes (defase 2π) e intensidades intermedias (para variaciones entre π y 2π) en la imagen.

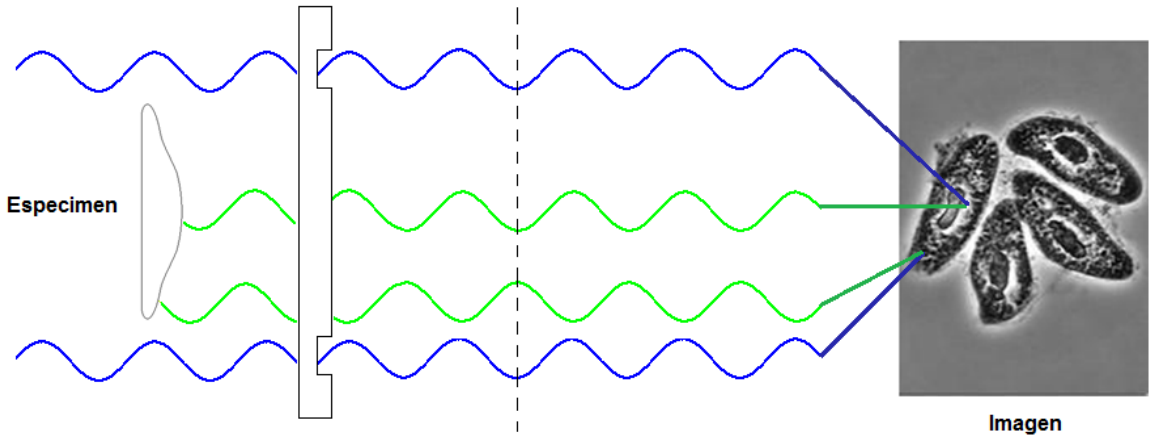


Imagen modificada de: https://www.quora.com/What-is-the-principle-of-phase-contrast-microscopy

Figura 3.14 Diferencias en la intensidad de la imagen dependientes del de fase ente el orden cero y la onda difractada.

En el microscopio de contraste de fase de la vida real se tiene una fuente extendida de luz junto con un condensador bajo la platina. El diafragma anular tiene la finalidad de atenuar el orden cero, ya que con el orden cero atenuado el contraste en la imagen aumenta. Otro detalle importante es el siguiente: los microscopios de contraste de fase cuentan con un accesorio (disco) en el cual están montados tres o cuatro diafragmas, cada uno con un anillo de un diámetro particular y por otra parte, cada objetivo en el revolver tiene una placa de fase con un diámetro de surco particular (cabe mencionar que el filtro de fase está integrado a la montura del objetivo). Existe una relación entre el tamaño de anillo del diafragma y el diámetro del surco de la placa de fase, no funcionará cualquier combinación de estos elementos.

La figura 3.15 muestra los elementos del microscopio de contraste de fase y las posiciones del diafragma anular y el filtro de fase (el diafragma anular está alineado con la placa de fase).

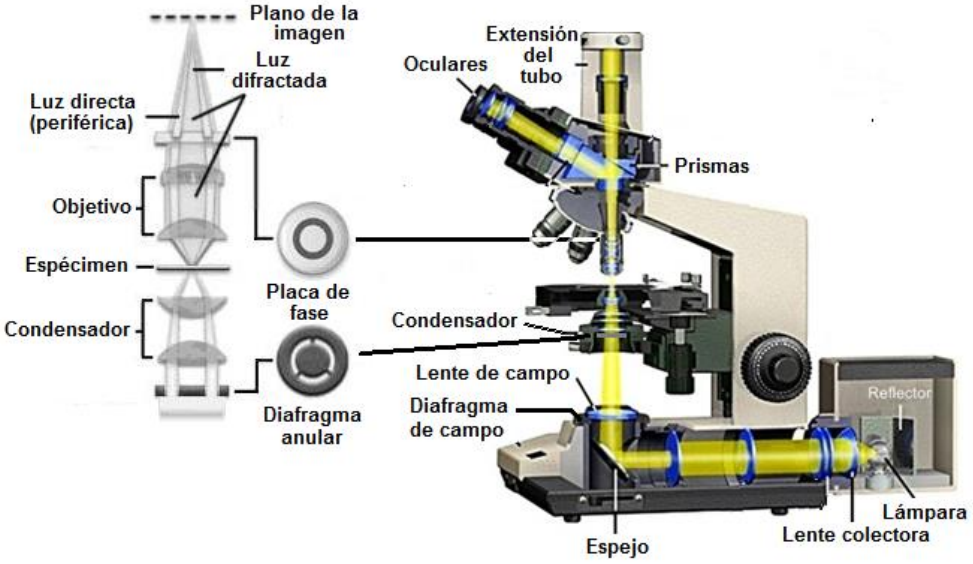


Imagen modificada de: http://morfoudec.blogspot.com/2008/07/microscopa-de-contraste-de-fase.html

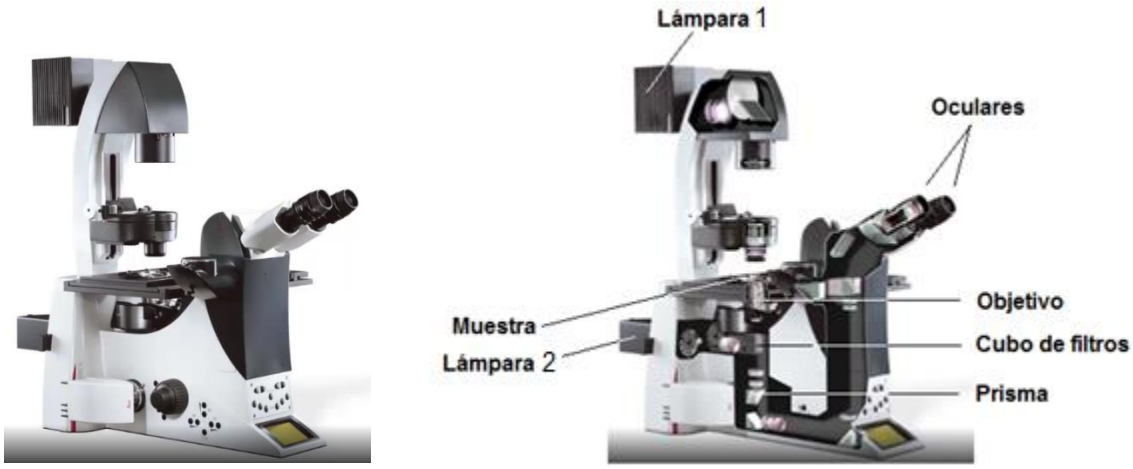
Figura 3.15 Microscopio de contraste de fase.

3.4 Microscopio de epi-fluorescencia

El microscopio de epi-fluorescencia es un microscopio óptico compuesto ampliamente usado en biología y ciencias biomédicas. Este microscopio utiliza el fenómeno de fluorescencia para resaltar estructuras en muestras biológicas fijas o vivas, en lugar de utilizar efectos de absorción, fase o interferencia; por esta razón, es muy común que a este instrumento se le llame microscopio de fluorescencia, pero, como la iluminación de la muestra no se hace con luz transmitida, sino con luz incidente, que en un microscopio vertical provendría de “arriba”, lo más correcto es llamarlo microscopio de epi-fluorescencia (*epi* del griego, significa *arriba*). Aquí cabe aclarar que la frase “iluminación desde arriba” hace la diferencia respecto a los microscopios convencionales, en los cuales la muestra se ilumina “desde abajo”. En los modelos de microscopios invertidos, utilizados como microscopios de fluorescencia, con frecuencia la luz que ilumina la muestra proviene de la parte inferior del instrumento sin embargo es epi-iluminación.

La diferencia más significativa entre los microscopios de epi-fluorescencia y los microscopios de convencionales consiste en el sistema de iluminación. En un microscopio óptico convencional la luz atraviesa la muestra, mientras que un microscopio de epi-fluorescencia funciona con luz reflejada por la muestra y la misma lente que ilumina recibe la luz emitida por ella.

La figura 3.16a muestra la vista exterior de un modelo de microscopio invertido de epi-fluorescencia que también funciona en el modo de campo brillante. Cuando se utiliza la lámpara 1 el microscopio funciona en el modo de campo brillante, como un microscopio convencional, al utilizar la lámpara 2 el instrumento funciona con epi-iluminación.



(a) (b)

Imagen modificada de: https://www.leica-microsystems.com/science-lab/step-by-step-guide-to-fluorescence-microscopy/

Figura 3.16 Microscopio invertido de epifluorescencia, a) Vista externa, b) algunos elementos ópticos internos.

La fluorescencia en la muestra se presenta por el uso de colorantes orgánicos, proteinas, perlas sintéticas o estructuras autofluorescentes. Para hacer la observación con el microscopio de epi-fluorescencia se usan reactivos especiales llamados fluorocromos, estos son sustancias que fluorescen a una determinada longitud de onda, cuando son excitadas por luz de otra longitud de onda característica. Las partes responsables de la emisión de luz en las moléculas de

los fluorocromos son llamadas fluoróforos. Algo que debe tomarse en cuenta es que los flourocromos no son de uso genérico, es decir, distintos organelos de una célula requieren de flourocromos específicos. En el capítulo 5 se dedica una sección al uso de los fluorocromos.

Hoy en día, muchas técnicas de microscopia dependen completamente de la fluorescencia. La microscopía de fluorescencia se usa regularmente en investigación de ciencias de la vida, ya que ofrece la posibilidad de tinción multicolor, el etiquetado de estructuras en células vivas e incluso la medición del estado fisiológico de una célula.

Como el microscopio de epi-fluorescencia funciona con luz reflejada por la muestra, su uso difiere de las técnicas de luz transmitida.

En la figura 3.17 se muestran los elementos de un microscopio de epi-fluorescencia; a diferencia de un microscopio óptico compuesto convencional, este instrumento se caracteriza por usar un divisor de haz dicroico (o espejo dicroico) y dos filtros, un filtro llamado de excitación y otro llamado de emisión. La función del filtro de excitación es seleccionar y transmitir las longitudes de onda que excitan al fluoróforo que se está usando en la muestra. El espejo dicroico refleja, hacia la muestra, la luz en la banda de excitación y transmite la luz emitida por los fluoróforos, en la banda de emisión. Por su parte, el filtro de emisión sólo permite el paso de las longitudes de onda específicas emitidas por el fluoróforo.

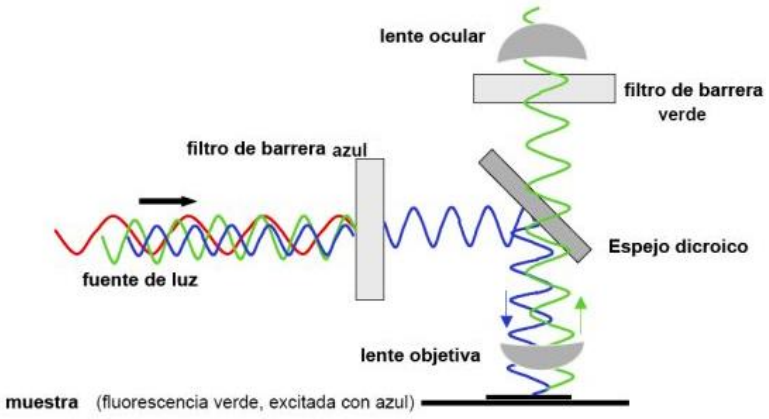


Imagen modificada de:

https://iie.fing.edu.uy/investigacion/grupos/gti/timag/trabajos/2007/proteus/epifluorescencia.html

Figura 3.17 Funcionamiento del microscopio de epi-fluorescencia

En la figura 3.18 se muestra un modelo de microscopio de epi-fluorescencia que usa un soporte para los filtros y el espejo dicroico llamado *sistema de cubo de filtros*. En la figura 3.18a se ve el microscopio funcionando en modo convencional; en ese caso utiliza una lámpara ordinaria (de luz blanca, con un espectro amplio) para iluminar la muestra. La figura 3.18b muestra el mismo microscopio funcionado en modo de epi-fluorescencia. En ese caso utiliza una fuente de iluminación específica cuya longitud de onda está en el rango del azul ($\lambda \approx 400\, nm$) ya que esta longitud de onda excita los fluorocromos usados en ese caso particular, los cuales emiten luz fluorescente en el rango del verde ($\lambda \approx 600\, nm$); con esa longitud de onda se forman imágenes de estructuras celulares específicas (ver figura 3.19) que pueden ser observadas a través de un ocular o mediante una cámara.

(a) (b)

Imagen recuperada de: https://www.leica-microsystems.com/science-lab/step-by-step-guide-to-fluorescence-microscopy/

Figura 3.18 Microscopio a) funcionando en modo convencional, b) funcionando con epifluorescencia.

Nota: En la figura 3.18b la iluminación de la muestra se considera epi-iluminación debido a que el microscopio es invertido.

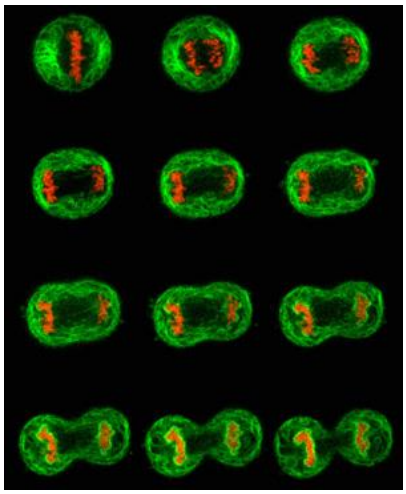


Imagen recuperada de: https://amayabio.wordpress.com/2016/02/15/u-d-3-division-celular-mitosis-y-meiosis/

Figura 3.19 Mitosis celular. Microscopía de epifluorescencia.

La figura 3.20 muestra en detalle el dispositivo (cubo de filtros) que soporta los filtros de excitación y emisión, y el espejo dicroico, en el microscopio de la figura 3.18.

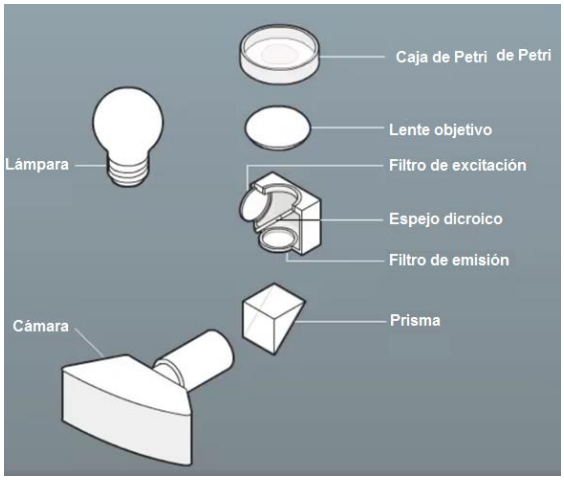


Imagen recuperada de: https://www.leica-microsystems.com/science-lab/step-by-step-guide-to-fluorescence-microscopy/

Figura 3.20 Detalle del cubo de filtros

El espectro de emisión de un flourocromo está corrido hacia una longitud de onda mayor en relación con el espectro de excitación, a esto se le denomina “corrimiento de Stokes”.

3.5 Microscopio confocal

Cuando se trabaja con un microscopio convencional el espécimen está sobre saturado de luz debido a la fuente de iluminación. Con la epi-iluminación se producen reflexiones de luz tanto en el plano de enfoque como en todo el espesor de la muestra; gran parte de la luz recogida por las lentes del objetivo para formar la imagen, procederá de esas regiones y esto reducirá el contraste y definición en la misma.

La luz de planos distintos al plano de enfoque puede ser eliminada mediante el uso de una pantalla que sólo permita la iluminación de una zona muy pequeña del plano enfocado; esta idea fue desarrollada por Marvin Lee Minsky, un joven del posdoctorado en la Universidad de Harvard en el año de 1957, quien solicitó una patente para un microscopio que usaba un sistema óptico confocal de escaneo por etapas (Pawler 2006).

En el arreglo de Minsky del microscopio confocal (ver figura 3.21) el condensador del microscopio convencional era reemplazado por una lente objetivo; en este tipo de microscopios el objetivo guía la luz que ilumina la muestra y también recolecta al luz reflejada por la misma.

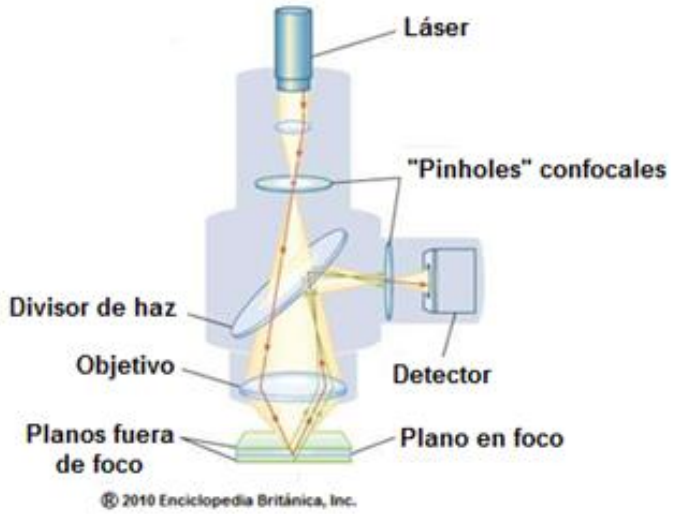


Imagen modificada de: https://www.alamy.es/imagenes/microscopia-confocal.html

Figura 3.21 Elementos ópticos del Microscopio confocal

El campo de iluminación era limitado por un “pinhole” colocado en el eje del microscopio. Una imagen de este “pinhole” era proyectada sobre el espécimen, por la lente “condensadora”, que a la vez jugaba el papel de lente objetivo. El campo de visión estaba restringido por un segundo “pinhole” (“pinhole” de salida) en el plano de la imagen, colocado confocalmente al punto de iluminación con el primer “pinhole” (Conn 1999).

Con este sistema se mejoraba la calidad de la imagen del espécimen observado debido a que, sólo una pequeña zona del mismo era iluminada con luz de un láser, que pasaba por el primer “pinhole”; la información proveniente de las zonas no enfocadas (planos localizados arriba y abajo del plano focal) pero iluminadas por luz dispersa, era eliminada por una pantalla, que contenía al segundo “pinhole”, de esta forma, sólo la información de la zona enfocada llegaba al detector.

Los “pinhole” del arreglo óptico descrito anteriormente son confocales, es decir la imagen de uno se forma sobre la abertura del otro, esto sucede para ambos “pinholes”, de ahí el nombre de ese microscopio.

Actualmente, el microscopio confocal cuenta con un sistema electrónico, que hace posible que la luz de un láser escanee al espécimen, y un software se encarga de la integración de la información para lograr la reconstrucción tridimensional de la imagen, utilizando la información de imágenes individuales tomadas plano a plano.

Aunque Minsky diseñó el microscopio confocal en 1955 en esa época no existía la tecnología para hacer realidad este instrumento, tal y como se le conoce hoy en día (el láser aún no se había inventado y los sistemas de cómputo no estaban disponibles). Minsky usaba una lámpara de arco en lugar de láser y el escaneo se llevaba a cabo moviendo la muestra.

Fue hasta 1983 cuando Cox y Sheppard publicaron un artículo titulado “Scanning optical microscope incorporating a digital framestor and microcomputer” e hicieron que la computadora se integrara al equipo del microscopio confocal (Pawler, 2006).

En el siguiente capítulo se describe en detalle la configuración del microscopio confocal y su funcionamiento, por el momento sólo se presenta una descripción general del mismo.

Referencias

Conn P. (1999). *Methods in Enzymology*. U.S.A.: Academic Press, pp. 3-10.

Hecht E. & Zajac A. (1977). Óptica. E.U.A.: *Fondo Educativo Interamericano* S.A., pp. 503 - 508.

Mouroulis P. & Mcdonald J. (1997). *Geometrical optics and optical design*. USA: Oxford University Press.

Pawley J. (2006). Handbook of biological confocal microscopy. Wisconsin: Springer.

Smith JL. (1852). The inverted microscope- a new form of microscope*. Am J Sci Arts*, 14, pp. 233-241.

Wilson T. (1990). Confocal microscopy. San Diego, California: Academic Press.

https://www. morfoudec.blogspot.com

https://www.leica-microsystems.com/science-lab/step-by-step-guide-to-fluorescence-microscopy/

https://iie.fing.edu.uy/investigacion/grupos/gti/timag/trabajos/2007/proteus/epifluorescencia.html

https://www.leica-microsystems.com/es/aplicaciones/ciencias-biologicas/fluorescencia/

https://www.google.com/search?biw=1280&bih=640&tbm=isch&sa=1&ei=GxloXaXUGIW6tgW_w7vYDw&q=PHASE+PLATE+MICROSCOPE&oq=PHASE+PLATE+MICROSCOPE&gs_l=img.12...98778.109011..111273...0.0..3.234.3897.16j16j2....2..0....1..gws-wiz-img.....0..35i39j0j0i67j0i10j0i30j0i19j0i5i30i19j0i30i19.1a7EwmyOpA0&ved=0ahUKEwjIzenI2qjkAhUFna0KHb_hDvsQ4dUDCAY#imgrc=dcFAJBGkt0ySDM:

https://www.olympus-lifescience.com/en/microscope-resource/primer/techniques/phasecontrast/phase/

https://www.mundomicroscopio.com/

4

CAPÍTULO 4. MICROSCOPIO DE FLUORESCENCIA CONFOCAL

Introducción

Hoy en día el microscopio confocal es un instrumento de vanguardia usado principalmente en las áreas biológica y médica. Este instrumento cae en la clasificación de los microscopios de *escaneo* (al igual que el microscopio electrónico de barrido y el microscopio de fuerza atómica), esto significa que el sistema óptico del microscopio confocal toma información de secciones pequeñísimas de una determinada zona de la muestra y mediante un barrido (o escaneo) de toda la zona, obtiene los datos que después integra, utilizando sistemas de procesamiento de datos e imágenes por computadora, para formar la imagen. Este instrumento ofrece, entre otras cosas, la posibilidad de obtener imágenes en 3D de la zona escaneada, esto gracias a su operación en el modo confocal.

La microscopía confocal moderna explota el fenómeno de fluorescencia para observar estructuras, de muestras biológicas, con alta sensibilidad y contraste, utilizando láseres como fuentes de iluminación (Wilson 1990), para esto, la muestra es teñida con fluorocromos; cuando se trabaja en el modo de fluorescencia, el microscopio confocal modifica ligeramente su nombre a “microscopio de fluorescencia confocal”.

El primer microscopio confocal fue diseñado para funcionar con una lámpara de arco en lugar de luz láser, en esa época este aún no se había inventado.

Marvin Lee Minsky, inventor del microscopio confocal en el año de 1954, es más reconocido en el ámbito del desarrollo de la inteligencia artificial que en el área de la óptica, sin embargo, es innegable que hizo una enorme contribución a la microscopia con su invención, cuya concepción no sólo fue clarividente, sino que su percepción sobre las potenciales aplicaciones y su trascendencia fue nada menos que notable (Pawley 2006).

En este capítulo se describen de forma general, los distintos sistemas que conforman un microscopio confocal: sistema óptico, sistema de escaneo y sistema para el despliegue de las imágenes.

4.1 Estructura del Microscopio Confocal

Los microscopios confocales modernos están equipados con varias fuentes de iluminación laser, una unidad (o módulo) de escaneo, un monitor para la visualización de imágenes, una computadora y el software asociado para el control de adquisición de señales, el procesamiento y análisis de las mismas (figura 4.1).

Imagen recuperada de: https://www.zeiss.com/microscopy/int/cmp/lsc/2019/confocal/lsm-9-family.html

Figura 4.1 Microscopio confocal ZEISS LSM 980

En la figura 4.2 se observa la fotografía del microscopio confocal Carl Zeiss, modelo LSM 710 NLO, ubicado en el Laboratorio de Microscopía Óptica (LMO) del Centro de Investigaciones en Óptica A. C. En este instrumento fue posible observar, en funcionamiento, los sistemas que componen al microscopio confocal, además, con él se tomaron las imágenes que se muestran en el siguiente capítulo, específicamente la sección 5.4.

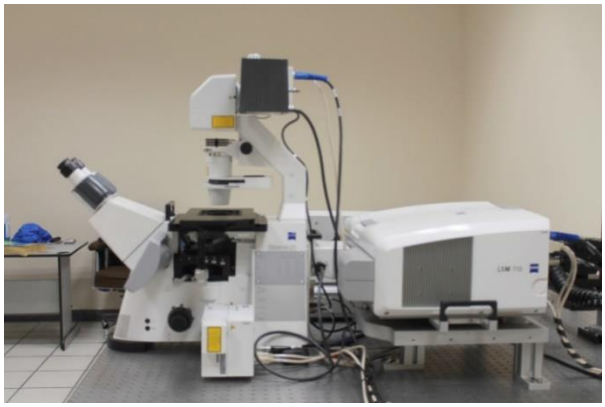


Figura 4.2 Microscopio confocal ZEISS LSM 710 NLO.
Fotografía cortesía del CIO, unidad León.

La mayoría de los microscopios confocales están basados en el diseño del microscopio de epi-iluminación convencional, con un sistema de visión binocular para ubicar la región de interés en la muestra.

Los sistemas ópticos combinados, de un microscopio confocal y un microscopio de epi-iluminación convencional se muestran esquemáticamente en la figura 4.3.

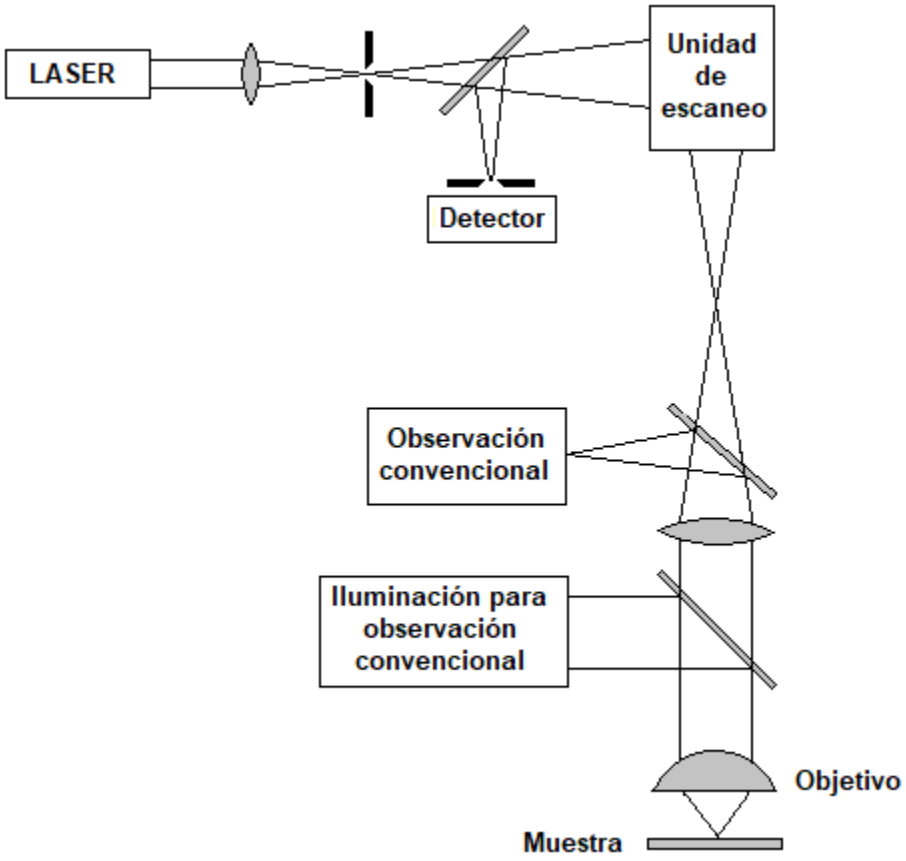


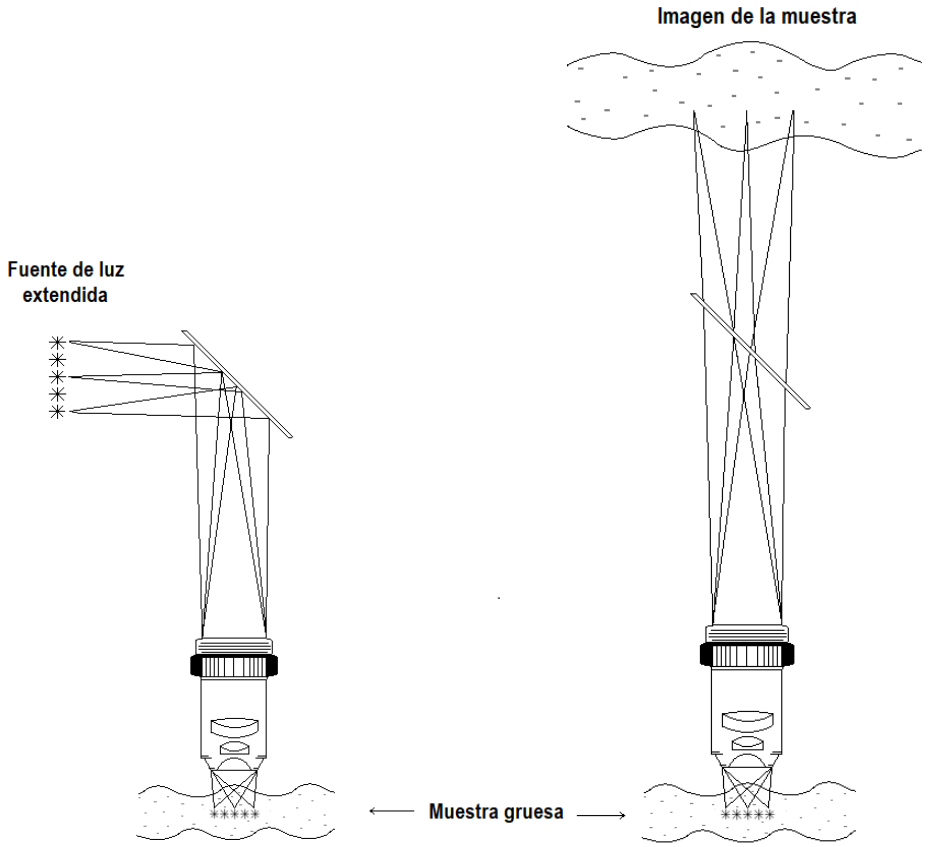
Imagen modificada del libro: Confocal Microscopy, T. Wilson.

Figura 4.3 Sistemas combinados, confocal y microscopio convencional.

Como ya se mencionó anteriormente, en los sistemas que funcionan con epi-iluminación la lente objetivo es lente condensadora y recolectora de luz a la vez.

4.2 Sistema óptico del microscopio confocal

En un microscopio de epi-fluorescencia convencional de campo claro, se utiliza una fuente de luz extendida para iluminar una zona de una muestra gruesa (figura 4.4a), debido a esto el espécimen está sobre saturado de luz, ya que a pesar de que la luz se enfoca en un plano, los puntos alrededor del plano también son iluminados, lo que da como resultado que el objetivo forme la imagen completa de la muestra en el plano imagen (figura 4.4b). Ahí se tiene la imagen en foco de un plano de la muestra pero también se encuentran imágenes fuera de foco de otros planos (Conn 1999), lo que reduce el contraste y definición en la imagen.



(a) (b)

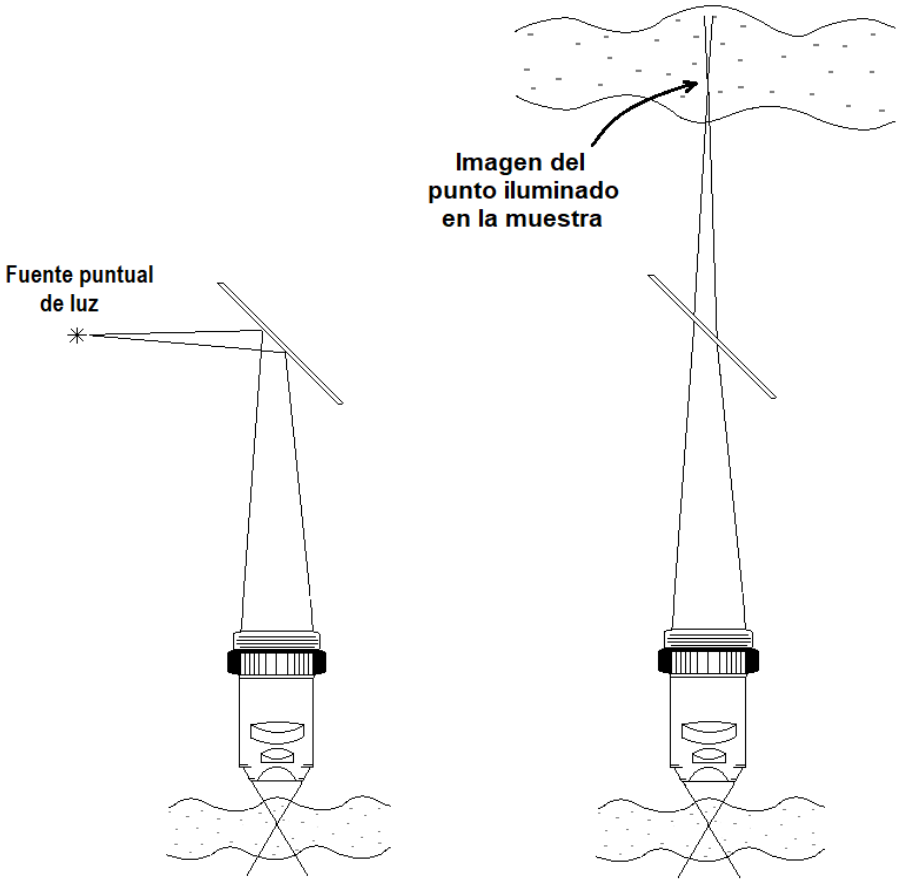
Imagen reproducida del libro: Methods in Enzimology, Michael Conn.

Figura 4.4 a) Luz iluminando una muestra, b) luz recolectada por el objetivo.

Cuando se utiliza una fuente puntual, en lugar de una fuente extendida (figura 4.5a), la luz enfocada por el objetivo ilumina intensamente un punto dentro de la muestra,

pero esa luz también ilumina una zona cercana al punto en cuestión, aunque de manera más tenue.

En la figura 4.5b se observa que la imagen de la muestra es muy brillante donde esta se iluminó de manera intensa y más difuminada donde se iluminó con luz tenue.



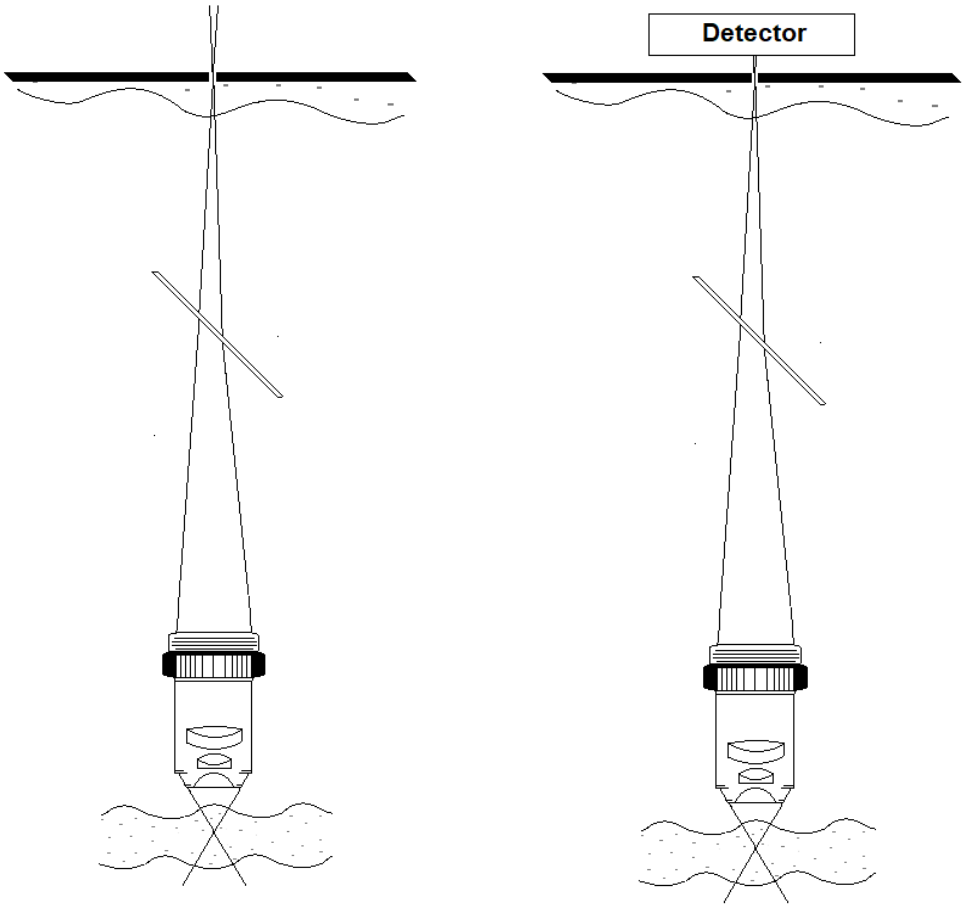
(a) (b)

Imagen reproducida del libro: Methods in Enzimology, Michael Conn.

Figura 4.5 a) Luz enfocada por el objetivo en un punto, b) imagen del punto enfocado.

Para observar únicamente un punto dentro de la muestra se coloca un “pinhole” en el plano imagen como se observa en la figura 4.6a, este sólo permitirá el paso de la luz que forma la imagen del punto enfocado; si detrás del “pinhole” se coloca un detector este registrará esa parte de la imagen de la muestra e ignorará el resto, eliminando de esta forma las imágenes fuera de foco de otros planos (figura 4.6b).

Como puede observarse, se tiene una fuente puntual de luz, un punto de luz enfocado dentro de la muestra y un detector puntual, los tres confocales entre sí. Esto es el principio del funcionamiento de un microscopio confocal (Conn 1999).



(a) (b)

Imagen reproducida del libro: Methods in Enzimology, Michael Conn.

Figura 4.6 a) Un pinhole elimina la luz proveniente de los alrededores del punto iluminado y enfocado a la vez. b) La información del punto enfocado se capta con un detector.

Hasta este momento el detector capta la imagen de un punto dentro de la muestra, el siguiente paso es mapear la muestra completa, punto por punto, recolectar la señal y almacenarla para posteriormente formar la imagen de toda la zona muestreada.

Hay dos formas de hacer el mapeo de la muestra: la primera es moviendo la muestra y dejando fijo el haz de luz (esta es la técnica llamada “stage scanning”), en la segunda, la muestra puede quedar fija mientras la luz enfocada se mueve sobre ella (técnica llamada “beam scanning”). Más adelante se abordarán con más detalle este último procedimiento.

Marvin Minsky solicitó la patente para un microscopio confocal con sistema “stage-scanning”. Los microscopios confocales actuales tienen sistemas de escaneo que dan movimiento al haz de luz en vez de mover el espécimen.

Las figuras 4.7 y 4.8 son reproducción de las imágenes usadas en la solicitud de patente para el microscopio confocal, que hizo Minsky en 1957.

En la figura 4.7 se presenta un diagrama del microscopio confocal, basado en un microscopio de luz trasmitida; en él puede observarse que el condensador de un microscopio convencional fue reemplazado por una lente idéntica a la lente objetivo. Nótese que el principio del funcionamiento de este microscopio es el mismo que se describió anteriormente.

En este y el siguiente diagrama se etiquetaron los elementos del microscopio de la siguiente forma:

A - Pinhole de entrada
B - Pinhole salida
C - Lente condensadora
O - Lente objetivo
S - Muestra
D - Imagen de pinole de entrada
P- Detector

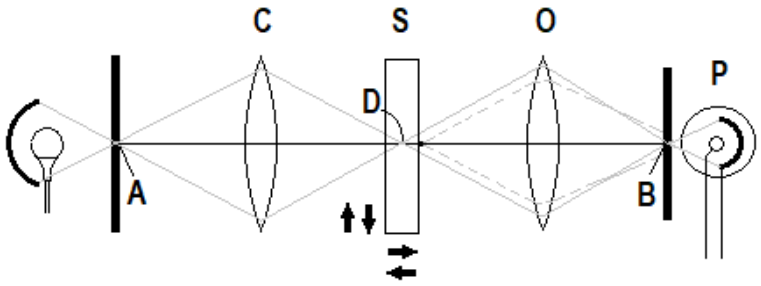


Imagen reproducida del libro: Handbook of biological confocal microscopy, Pawley.

Figura 4.7 Microscopio confocal basado en un microcopio con iluminación por transmisión.

En el microscopio confocal por transmisión de luz, el campo de iluminación estaba limitado por un “pinhole” posicionado en el eje del microscopio y una imagen de ese

“pinhole” se proyectaba por la lente condensadora sobre el espécimen. El campo de visión también estaba restringido por un segundo “pinhole”, ubicado en el plano imagen. Este segundo “pinhole”, llamado “pinhole” de salida, estaba colocado confocalmente al punto iluminado en el espécimen y al primer “pinhole” (Pawley 2006).

Por otra parte, en vez de trans-iluminar el espécimen con un condensador independiente del objetivo, el microscopio confocal también podía utilizarse en el modo de epi-iluminación, esto es, usando una sola lente que sirvía a la vez de condensador y objetivo (ver figura 4.8).

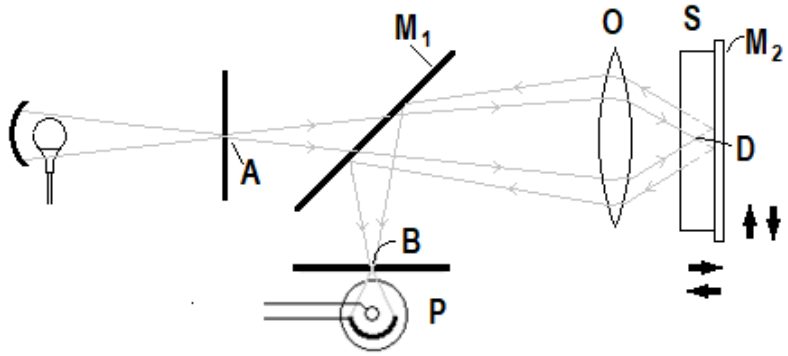


Imagen reproducida del libro: Handbook of biological confocal microscopy, Pawley.

Figura 4.8 Microscopio confocal basado en un microcopio de epi-iluminación.

M_1 y M_2 - son divisor de haz y espejo respectivamente.

Independientemente del tipo de iluminación que se usara, luz transmitida o epi-iluminación, el espécimen se escaneaba con un punto de luz, en ambos casos, la variación en la intensidad de la luz modulada por el espécimen, que pasaba por el segundo pinhole, era capturada por una celda fotoeléctrica; a continuación se iniciaba el procesamiento electrónico de la señal. La corriente fotoeléctrica era amplificada y esta modulaba la intensidad del haz de un tubo de rayos catódicos, como resultado de esto se formaba la imagen del espécimen sobre la pantalla del tubo (Pawley 2006).

4.3 Sistema de escaneo del microscopio confocal

En los microscopios confocales con sistema de escaneo de luz (“beam scanning”), el haz de un laser enfocado, cuyo diámetro es menor a 1µm, barre secuencialmente cada punto de una zona de la muestra; el barrido se lleva a cabo en un patrón similar al que se empleaba hace años, para crear la imagen en una pantalla de televisión. Si la muestra se ubica sobre un plano XY, el mecanismo requiere un escaneo rápido en dirección X (escaneo de líneas) junto con un escaneo en dirección Y más lento (escaneo de cuadros), que desplaza la línea de escaneo a posiciones secuenciales, en la dirección Y, para cubrir toda la zona de interés.

Un mecanismo típico de escaneo utiliza dos espejos resonantes de alta velocidad, que giran en un movimiento vibratorio (giro y regreso) sobre ejes mutuamente perpendiculares, controlados por motores galvanométricos (figura 4.9). Estos sistemas son capaces de reunir imágenes a 30 cuadros por segundo.

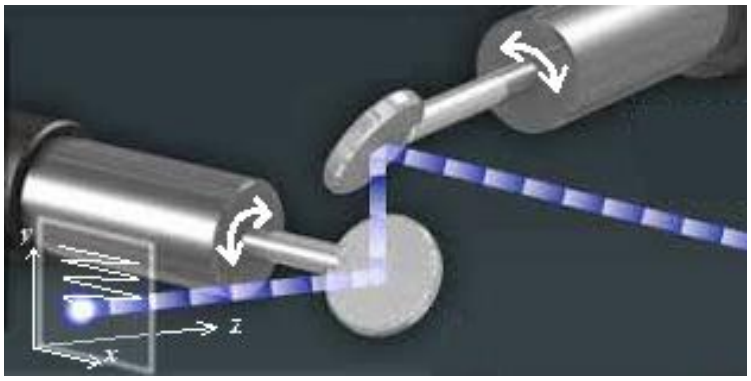


Imagen modificada de: https://www.microscopyu.com/tutorials/resonant-scanning-in-laser-confocal-microscopy

Figura 4.9 Sistema de escaneo de los espejos

Después de cada recorrido del haz a lo largo del eje X, este regresa rápidamente al punto de partida y se desplaza a lo largo del eje Y para comenzar un nuevo barrido, durante el regreso del haz el sistema no toma información de la muestra.

La velocidad de exploración de los espejos es insignificante comparada con la velocidad de la luz, por lo cual la fluorescencia emitida por la muestra puede ser recogida por el objetivo y devuelta a lo largo de la ruta de iluminación original y así

llegar hasta el detector. El retorno de la emisión de fluorescencia a través del sistema de espejos resonantes se conoce como *descanning*.

La figura 4.10 presenta esquemáticamente, la unidad de escaneo como parte del sistema completo del microscopio confocal. Los módulos (o unidades) de escaneo de estos instrumentos son sistemas mucho más complejos que como se representa en la figura, son los responsables de llevar a cabo los escaneos con la luz de excitación así como de recolectar la luz de emisión proveniente de la muestra, para ensamblar la imagen final. Estas unidades incluyen una o más entradas de fuentes láser externas, espejos dicroicos, filtros de fluorescencia, el mecanismo de espejos para escaneo, aberturas de "pinhole" variables y detectores que generalmente son tubos fotomultiplicadores (PMT, Photomultiplier Tube), usados para la detección de diferentes longitudes de onda de fluorescencia.

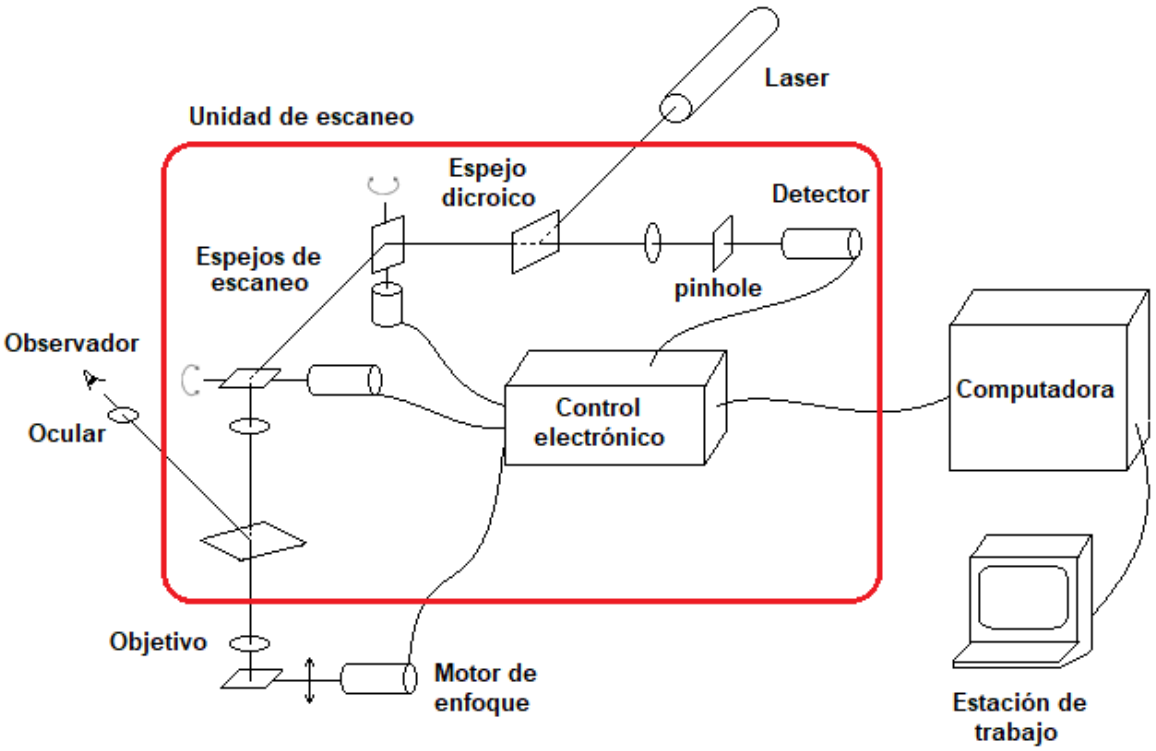


Imagen modificada de: Handbook of Biological Confocal Microscopy, Pawley.

Figura 4.10 Esquema de unidad de escaneo del microscopio confocal.

La figura 4.11 muestra una unidad de escaneo típica, con varios de los elementos mencionados en el párrafo anterior.

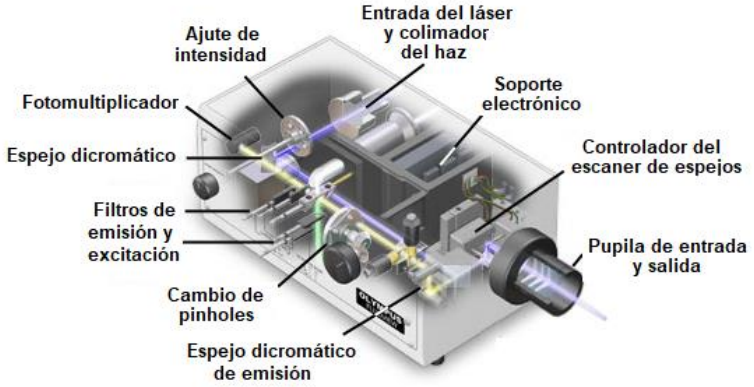


Imagen modificada de: https://www.olympus-lifescience.com/en/microscope-resource/primer/techniques/confocal/confocalscanningsystems/

Figura 4.11 Unidad de escaneo Olimpus Fluo 300.

Por otra parte, se requiere el escaneo en dirección Z (dirección del eje óptico del objetivo) para adquirir la imagen de una serie de secciones ópticas con las cuales se logran las imágenes tridimensionales e imágenes bidimensionales en planos paralelos a los planos XZ o YZ; para esto se cambia la distancia objetivo-muestra trasladando el objetivo o moviendo la platina. Este movimiento se realiza con precisión con un controlador piezoeléctrico o un dispositivo galvanométrico, aunque esto limita el rango de movimiento. Con más frecuencia se utiliza un motor de micropasos para controlar el enfoque fino del microscopio; en los instrumentos actuales estos motores son capaces de enfocar posicionamientos del orden de nanómetros. Para aplicaciones de fluorescencia biológica el posicionamiento en dirección Z con esta precisión es más que suficiente.

La digitalización de los datos de imágenes analógicas recopilados por los fotomultiplicadores facilita los algoritmos de procesamiento de imágenes por computadora; al transformar la señal de voltaje en incrementos digitales discretos, que corresponden a variaciones en la intensidad de la luz, esto incrementa la velocidad en el procesamiento de datos digitales.

La luz proveniente de la muestra que llega hasta un fotomultiplicador se convierte en una señal eléctrica analógica que tiene un voltaje que varía continuamente, correspondiente a la intensidad de la luz. La señal analógica se muestrea

periódicamente y se convierte en una señal digital mediante un convertidor analógico-digital que puede encontrarse en la unidad de escaneo. La información se almacena temporalmente en la computadora, y se muestra en el monitor. La imagen se reconstruye punto por punto, a partir de las señales de emisión de fotones que llegan al fotomultiplicador, pero nunca existe como una imagen que se pueda observar a través de los oculares del microscopio.

4.4 El despliegue de las imágenes

El software instalado en la computadora del microscopio confocal controla prácticamente todos las funciones del instrumento: permite al usuario seleccionar entre las longitudes de onda de excitación de los láseres, ejecuta la selección del objetivo hecha por el usuario (el revolver no se gira manualmente), realiza el cambio en el diámetro de pinholes (la apertura o cierre del mismo en algunos modelos de microscopio o cambio de pinholes en otros), provee diversas funciones para la adquisición de señales con diferentes resoluciones de imágenes en 2D y 3D, controla la unidad de escaneo, el proceso general de adquisición de señales, el despliegue de imágenes y el resguardo de los datos adquiridos.

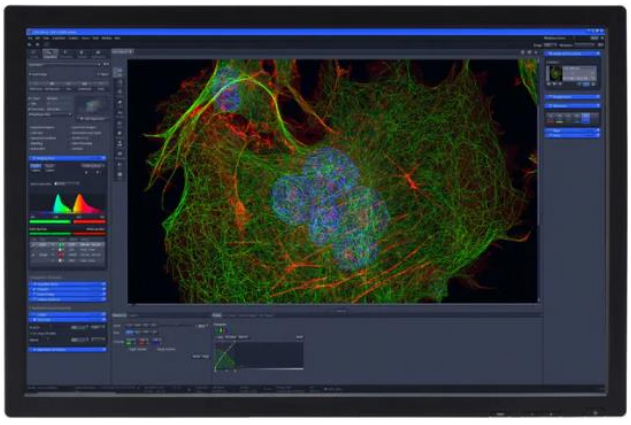


Imagen recuperada de: https://www.zeiss.com/microscopy/int/cmp/lsc/2019/confocal/lsm-9-family.html

Figura 4.12 Pantalla del monitor mostrando una imagen desplegada y ventanas con diferentes opciones para el manejo del microscopio confocal.

El manejo del microscopio confocal se lleva a cabo gracias a una interfase; el usuario (usando el ratón de la computadora) selecciona, en ventanas mostradas en el monitor, las diferentes instrucciones que desea dar al instrumento (figura 4.12).
La reconstrucción de imágenes en 3D es un procedimiento de “apilado de imágenes” tomadas en diferentes planos focales (secciones ópticas).

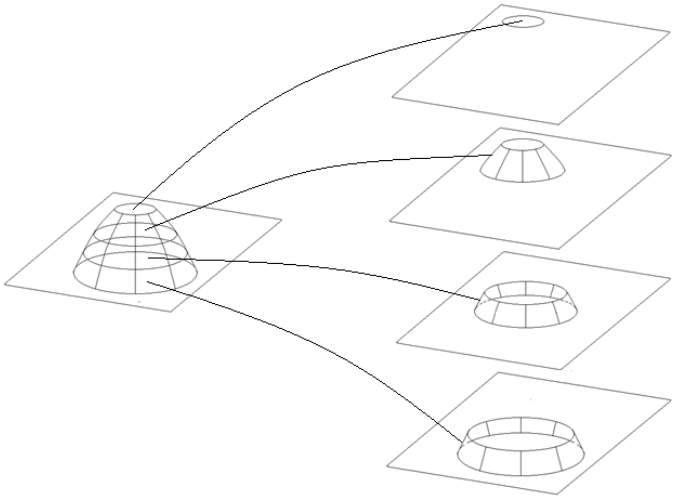


Imagen reproducida del libro: Confocal Microscopy, Wilson
Figura 4.13 Seccionamiento de la muestra que se utiliza, para la reconstrucción del volumen de la misma, en alta resolución.

El número de secciones ópticas que contendrá el apilado de imágenes, los límites (en dirección Z) de la imagen reconstruida, el despliegue de las secciones, la resolución de la imagen, etc., todo se controla a través de las opciones mostradas en las ventanas, descritas claramente en el manual particular de uso, del instrumento. La figura 4.13 es un esquema de la reconstrucción de la imagen en 3D.
En la práctica, las secciones ópticas no son infinitamente delgadas, sin embargo el microscopio confocal brinda imágenes de alta resolución con una profundidad de foco suficientemente pequeña para que todo el detalle en la imagen aparezca en foco (Willson, 1990).
La mayoría de los paquetes de software instalados en las computadoras de los microscopios confocales comerciales, generan imágenes compuestas de datos tomados de las diferentes secciones ópticas. Estos paquetes también pueden crear

una secuencia de video, compilada a partir de diferentes vistas del volumen de la muestra, estas secuencias a menudo imitan el efecto de la rotación del espécimen, lo que ayuda en la apreciación del carácter tridimensional del mismo.

Además, muchos paquetes de software permiten realizar mediciones de longitud, volumen y profundidad, y variar parámetros específicos de las imágenes (como la opacidad) que se pueden alterar de forma interactiva para revelar estructuras internas de interés en diferentes niveles dentro de la muestra.

Los fabricantes de microscopios confocales desarrollan continuamente mejoras, no sólo en los sistemas de escaneo sino, en todos los sistemas de sus instrumentos; las descripciones que aquí se presentan son generalidades. En el manual de cada modelo de microscopio confocal se explica en detalle cómo sacar el mejor provecho de las múltiples funciones del aparato.

A continuación se presentan varias características del Microscopio Confocal ZEISS LSM 710 NLO, para dar algunos ejemplos concretos de los parámetros de estos instrumentos.

- Las fuentes de luz láser de este microscopio emiten en un rango de longitudes de onda tanto en el visible (405, 458, 488, 514, 543 y 633 nm) como en el infrarojo (680-1080), aunque estas últimas sólo se usan para fenómenos no lineales y no para obtención de imágenes confocales.
- El pinhole es modulable, es decir, es posible variar su tamaño de forma prácticamente continua, porque su funcionamiento es como el de un diafragma de iris. En algunos modelos de microscopios menos recientes, se utilizan varios pinholes con diámetros fìjos y un sistema para hacer el cambio de los mismos.
- El microscopio en cuestión cuenta con cinco objetivos cuyas amplificaciones y aperturas numéricas (entre paréntesis) son las siguientes: 10x (0.25), 20x, 25x (0.8), 50x (0.55), 63x (1.46). El objetivo de 25x es de inmersión y puede ser usado con agua, glicerol o aceite. El objetivo de 63x es de inmersión en aceite.
- En cuanto a la resolución del microscopio. Esta depende del objetivo y de la longitud de onda de la luz con los que se trabaje. Como en la construcción

de este instrumento se utiliza tecnología de punta, se puede decir que está limitado únicamente por difracción, al igual que otros microscopios modernos.

Este microscopio también cuenta con características específicas que lo diferencian de los demás, entre ellas pueden mencionarse las siguientes:

- Un arreglo de fotomultiplicadores para hacer análisis espectral, que permite una resolución espectral de 5 nm.
- Una de sus fuentes de luz (mencionada anteriormente) permite seleccionar, de forma continua, longitudes de onda entre 680 y 1080 nm para trabajar en el IR con fenómenos no lineales.
- Detectores NDS (descanning detectors) para la detección de señales muy débiles (especialmente para los fenómenos no lineales) con camino óptico reducido y elevada sensibilidad (PMT Hamamtsu), con posibilidad de detección simultanea de dos emisiones en el rango visible.
- Un sistema de control de temperatura para mantener a la muestra en un determinado medio ambiente (control de platina, objetivo y área del espacio objeto), así como un control de gases para el caso de especímenes vivos.
- El software hace posible seleccionar el rango de adquisición de la luz de emisión, de forma que esta selección no está basada en filtros de emisión físicos, como en los microscopios de epi-fluorescencia.

Como puede apreciarse, de lo descrito anteriormente, la incorporación de la electrónica y la informática a la óptica del microscopio, ha dado como resultado aparatos sumamente sofisticados, como lo son los microscopios confocales, lo que representa un paso gigantesco en la evolución de estos instrumentos.

Referencias

Conn M.. (1999). *Methods in Enzymology* Vol 307. California: Academic Press. pp. 3-26

Pawley J. (2006). *Handbook of biological confocal microscopy*. Wisconsin: Springer.

Wilson T. (1990). *Confocal microscopy*. Great Britain: Academic Press. pp. 1-64

https://www.olympus-lifescience.com/en/microscope-resource/primer/techniques/confocal/confocalscanningsystems/

https://www.sciencedirect.com/topics/immunology-and-microbiology/confocal-laser-scanning-microscope

https://www.sciencedirect.com/topics/immunology-and-microbiology/confocal-laser-scanning-microscope

https://www.olympus-lifescience.com/en/microscope-resource/primer/techniques/confocal/confocalintro/

https://www.biomedicas.unam.mx/wp-content/pdf/unidad-de-microscopia/guia-basica-de-uso-del-microscopio-confocal-lsm-5-de-zeiss.pdf?x56559

5

CAPÍTULO 5. ESTUDIO DE MUESTRA BIOLÓGICA MEDIANTE MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA CONFOCAL.

INTRODUCCIÓN

La fluorescencia es probablemente la forma más importante de lectura óptica en microscopía confocal biológica, porque es mucho más sensible y específica que la absorbancia o reflectancia y porque funciona bien con epi-iluminación (Pawley 2006, 338).

Como se mencionó en el capítulo anterior, el microscopio confocal puede operar en el modo de campo brillante o en el modo de fluorescencia, para esto último la muestra es teñida con fluorocromos y la iluminación se hace con luz monocromática (laser).

El fenómeno de fluorescencia en microscopía confocal aplicada a la biología, permite la visualización de las partes de las células (membrana plasmática, núcleo, vacuolas, retículo endoplásmico, etc.), así como la localización de moléculas específicas (proteínas, lípidos, etc.). También es posible observar procesos celulares como la división celular, cambios en el potencial de acción de la membrana, muerte celular, endocitosis (proceso por el cual las células incorporan dentro de ellas moléculas, grandes o pequeñas, que son recubiertas por una vesícula de membrana) y exocitosis (proceso en el cual una célula dirige el contenido de sus vesículas secretoras hacia su exterior), incluso es posible estudiar la interacción entre moléculas *in vitro*. Los experimentos deben organizare a priori, con protocolos y, a veces también, con arreglos ópticos completamente diferentes.

Hablar de fluorescencia nos introduce, en cierta forma, en la teoría de la óptica cuántica, ya que para explicar este fenómeno se utiliza el modelo en donde la luz tiene una naturaleza dual: se comporta como partículas, paquetes de energía llamados fotones o cuantos de energía, a la vez que conserva características de onda, como su frecuencia y longitud de onda.

En este capítulo se describe el funcionamiento de los fluorocromos, se explica un proceso específico de tinción de muestras usando determinados fluoróforos y se presentan algunas imágenes obtenidas con el microscopio de fluorescencia confocal, y su interpretación.

El material de las secciones 5.3 y 5.4 fue recopilado a través de la observación del trabajo del grupo de neurociencias de la Dra. Valeria Piazza, quien es investigadora

del Centro de Investigaciones en Óptica A. C. (CIO), en León, Gto., especialista en biología molecular, y fundadora del laboratorio de biofotónica de la misma institución.

El CIO cuenta con un microscopio confocal Carl Zeiss, modelo LSM 710 NLO; la Dra. Piazza y su grupo de trabajo son usuarios permanentes de este instrumento. Los avances que los estudiantes de maestría y doctorado obtienen mediante el análisis de las imágenes de microscopio confocal se presentan y discuten en el seminario de neurociencia que ella dirige.

5.1 Fluorocromos y fluoróforos

Como se mencionó en el capítulo tres los fluorocromos son sustancias que fluorescen a una determinada longitud de onda, las partes responsables de la emisión de luz en las moléculas de los fluorocromos son llamadas fluoróforos.

La fluorescencia es un proceso en el que una sustancia emite luz de cierta longitud de onda al ser iluminada con luz de una longitud de onda más corta (y por tanto más energética). La luz que ilumina es conocida como radiación de excitación y a la luz emitida se le llama radiación de emisión.

La fluorescencia ocurre debido a que la sustancia en cuestión absorbe luz en forma de fotones; la energía de un fotón (E) está dada por la expresión

$$E = h\nu$$

donde ν es la frecuencia de la luz y h= 6.62 X 10^{-34} J·s es la constante de Plank.

La absorción de fotones lleva a los electrones de la sustancia a un nivel más alto de energía, pero esta situación de permanencia en nivel alto de energía es inestable, por lo cual los electrones tienden a regresar a su estado base (Acosta 1999). Durante este proceso los electrones liberan energía en forma de fotones, lo que macroscópicamente se observa como un resplandor de la sustancia.

Los diagramas de Jablonski (ver figura 5.1) son ampliamente usados para ilustrar los estados excitados de una molécula y las transiciones radiativas y no radiativas que ocurren entre ellos. Con líneas curvas se representan las transiciones no radiativas y con líneas rectas las transiciones radiativas.

Las transiciones entre los estados se dibujan con líneas verticales; las líneas horizontales denotan los niveles vibracionales.

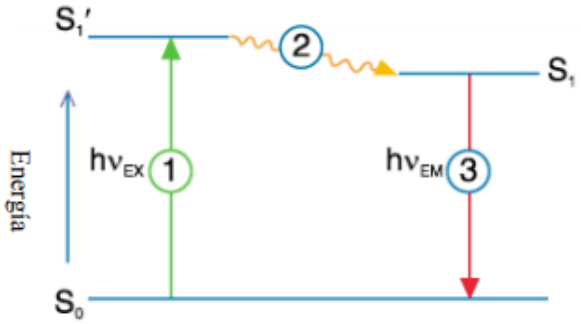


Imagen modificada de: https://www.leica-microsystems.com/science-lab/basic-principles-of-luminescence/

Figura 5.1 Diagrama de Jablonski. S_0 representa el estado base, S_1´ y S_1 los estados excitados.

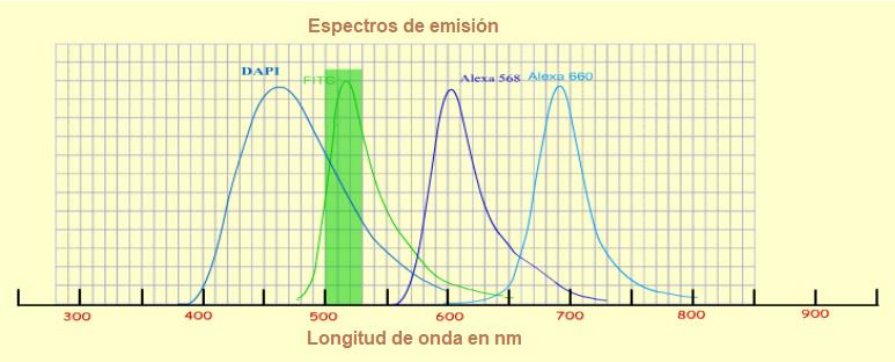
Cuando se presenta la fluorescencia, el cambio de la energía del electrón (o sea la emisión) es muy rápida, es del orden de nanosegundos. La fosforescencia es un fenómeno de emisión de luz similar a la fluorescencia, en el cual el material fosforescente también es excitado con luz, pero a diferencia de la fluorescencia la fosforescencia es más lenta; la sustancia fosforescente puede estar emitiendo durante minutos o hasta horas, después de que termina la excitación.

La mayoría de las sustancias fluorescentes presentes en la naturaleza tienen un espectro amplio de excitación y emisión, pero las sustancias con máximos de excitación y emisión claramente definidos son más útiles para la microscopía de fluorescencia.

La figura 5.2 muestra los espectros de excitación y emisión de cuatro fluoróforos ampliamente usados en ciencias biológicas para hacer microscopía de fluorescencia, estos fluoróforos son: el 4,6 Diamidino2-phenylindole, simplemente llamado DAPI, Isotiocianato de Fluoresceína (FICT por sus siglas en inglés), Alexa 568 y Alexa 660.

Por otra parte, en la tabla 5.1 se presentan algunos fluoróforos con sus longitudes de onda de excitación y emisión.

(a)



(b)

Imagen modificada de:

http://www.iib.unsam.edu.ar/archivos/docencia/licenciatura/biotecnologia/2017/BioCel/1504634347.pdf

Figura 5.2 Espectros del DAPI, FICT, Alexa 568 y Alexa 660, a) excitación y b) emisión.

Fluoróforo	Excitación [nm]	Emisión [nm]
5-Hydroxytryptamina (HAT)	370-415	520-540
Alexa Fluor 488	494	519
Alexa Fluor 532	530	555
Alexa Fluor 546	554	570
DAPI	345	458
DPH	354	430
Bromuro de Etidio	510	595
FITC	494	518
Fluoresceína	495	517
FURA-2	340/380	500/530
GFP	395/489	509
Hoechst 33258	365	480
Hoechst 33342	355	465

Recuperado de: http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/met/espectrofluorimetria.pdf

Tabla 5.1 Fluoróforos utilizados para tinción de muestras biológicas.

Los fluoróforos tienden a disminuir su emisión cuando se exponen de forma prolongada a la luz de excitación; este proceso es llamado “bleaching” (o blanqueamiento) y generalmente se piensa que es un proceso proporcional a la dosis de luz que reciben, aunque hay casos de no linealidad. Cada fluoróforo tiene una cierta cantidad de ciclos de excitación y emisión antes de que se presente el “bleaching”, este es permanente, al igual que el fotodaño a las estructuras bilógicas (Conn M., 1999).

Existe otro proceso llamado “quenching” (desactivación) en el cual también hay una disminución en la emisión del fluoróforo pero, a diferencia del bleaching, el quenching es reversible.

5.2 Conceptos básicos sobre la estructura de la célula

Para entender la información contenida en una imagen biológica obtenida con el microscopio confocal, es necesario tener conocimiento de cómo está constituida la estructura de los tejidos vivos, conocer el contexto en el cual se desarrolla el estudio de la muestra y qué se pretende encontrar en ella. Por estas razones, en esta sección, se han incorporado algunos conceptos teóricos sobre la estructura de la célula, con la intención de facilitar el entendimiento de las secciones restantes.

En el año de 1665 el filósofo natural Robert Hook descubrió la célula al observar láminas delgadas de corcho, utilizando un microscopio óptico compuesto (Freeman 2009), sin embargo lo que Robert Hook en realidad observó fueron las paredes celulares de células vegetales muertas, sin indicios del núcleo u otros organelos presentes en la mayoría de las células vivas. A pesar de esto, este evento marcó el inicio del estudio científico de la célula, conocido hoy en día como *biología celular*.

A partir de entonces los descubrimientos de los diferentes organelos que componen la célula (y sus funciones) se fueron dando, a la par de la evolución del microscopio y de los métodos de tinción:

- 1831 el botánico escocés Robert Brown descubrió el núcleo de las células.
- 1838 el término *protoplasma* es utilizado por primera vez por el fisiólogo checo Jan Evangelista Purkinje.

- 1878 Walter Fleming, biólogo alemán, descubre los cromosomas y la mitosis.
- 1898 Carl Benda, biólogo alemán, descubre las mitocondrias y en el mismo año Camillo Golgi, científico italiano, descubre el complejo que lleva su nombre: aparato de Golgi.
- 1980 Keith Porter, biólogo molecular canadiense, descubre el citoesqueleto.

El citoesqueleto, en las células eucariotas (células que tienen un núcleo bien definido, en cuyo interior se encuentra el material genético) está formado por tres tipos de proteínas: microtúbulos, microfilamentos y filamentos intermedios (ver figura 5.3).

Los filamentos de actina son parte de la red tridimensional de proteínas que dan soporte interno a las células.

El citoesqueleto soporta la tensión y las fuerzas de compresión manteniendo la forma de la célula, interviene en la movilidad celular a través de estructuras como los cilios o flajelos, facilita el transporte intracelular de las vesículas y organelos, y desempeña un papel importante en la división celular (Freeman 2009).

.

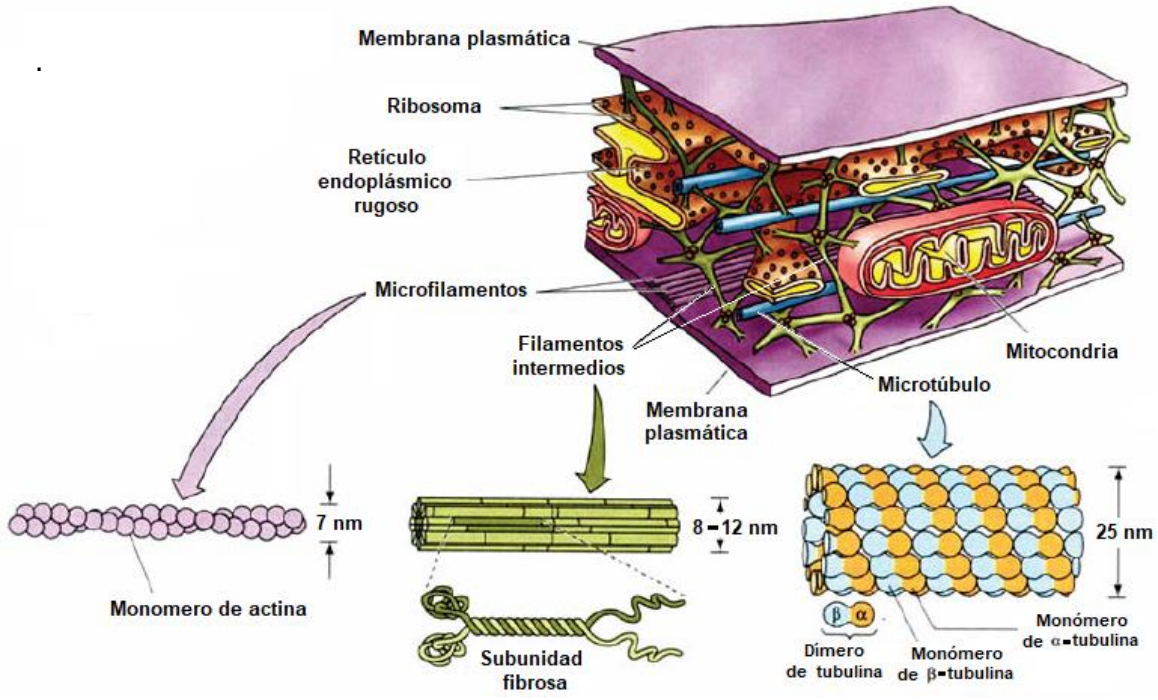


Imagen modificada de: https://www.blogdebiologia.com/citoesqueleto.html

Figura 5.3 Componentes del citoesqueleto.

Desde el año de 1846 se utilizó el término protoplasma para designar la materia gelatinosa que existe en toda célula, actualmente este término está en desuso, sin embargo el término citoplasma (material celular contenido entre la membrana plasmática y la membrana nuclear) sigue en boga.

La preparación de la muestra que se describe en la siguiente sección tiene como objetivo observar los filamentos de actina, microtúbulos y el núcleo de ciertas células en formación.

5.3 Preparación de la muestra para tinción

En esta sección es necesario aclarar que los protocolos para tinción de especímenes, al igual que los fluoróforos utilizados, son muy específicos, dependen de las estructuras que quieran observarse y de la finalidad del experimento. Los fluoróforos se utilizan para resaltar las características de interés en la muestra.

Aquí, es pertinente explicar cómo funcionan y por qué se usan anticuerpos en los protocolos de tinción de muestras. El uso de anticuerpos para protocolos de tinción es ampliamente utilizado, este proceso recibe el nombre de Inmunofluorescencia (IF).

Un anticuerpo es una inmunoglobulina (proteína presente en el suero sanguíneo) producida por el sistema inmunológico, en respuesta una sustancia extraña que se introduce en el organismo; a esa sustancia extraña se le llama antígeno. Cada anticuerpo es único y específico para un tipo particular de antígeno; los anticuerpos se encuentran en los fluidos corporales, como el plasma sanguíneo, de hecho, representan aproximadamente el 20% de la proteína en el plasma.

Los anticuerpos son moléculas en forma de Y, con tres porciones de aproximadamente el mismo tamaño; su estructura específica les permite unirse a múltiples células al mismo tiempo. Las partes separadas de la molécula del anticuerpo, o región V, pueden unirse a una amplia gama de antígenos y también a algunas moléculas efectoras (células que realizan una función específica en respuesta a un estímulo). En contraste, el tallo de la estructura Y puede unirse a un número limitado de células efectoras y moléculas.

Los laboratorios comerciales con frecuencia generan anticuerpos para su uso en investigación; estos se clasifican en anticuerpos primarios y secundarios, en función de su capacidad y usos vinculantes.

Un anticuerpo que puede unirse a una proteína específica o una biomolécula objeto de investigación, se llama **anticuerpo primario**. Los anticuerpos primarios se producen utilizando especies animales como la rata, el ratón, la cabra y el conejo como huéspedes.

Un **anticuerpo secundario** se une con un anticuerpo primario que se ha unido directamente a la biomolécula de interés. Después de que la región V del anticuerpo primario se ha unido a la biomolécula o a un antígeno, un anticuerpo secundario marcado une su región V al tallo del anticuerpo primario (figura 5.4).

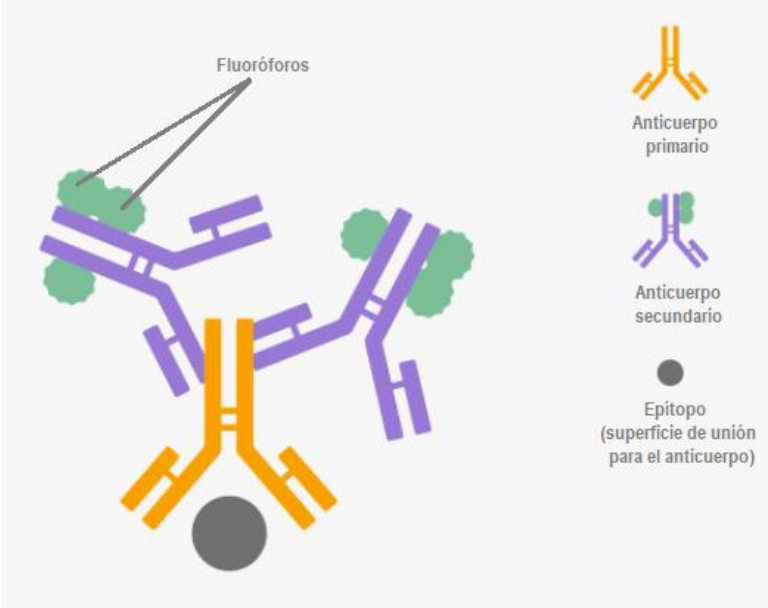


Imagen modificada de: Molecular probes, school of fluorescence.

Figura 5.4 La IF indirecta usa dos anticuerpos, el anticuerpo primario no está unido a ningún fluoróforo y el anticuerpo secundario se une al primario y está conjugado (unido) a un fluorocromo para usarse como detección.

Ejemplos de anticuerpos secundarios comúnmente usados son IgG anti-conejo, IgG anti-ratón, IgG anti-pollo o IgG anti-cabra. El anticuerpo secundario seleccionado siempre debe ser capaz de reconocer porciones del anticuerpo primario

conservadas en la especie huésped en la que se produjo el anticuerpo primario, por ejemplo, para detectar un anticuerpo primario producido a partir de un ratón, se usa un anticuerpo secundario anti-ratón.

A continuación se presenta un protocolo para tinción llamado de “tinción a gota” (ver figura 5.5), debido a que se utiliza la menor cantidad de sustancias posible.

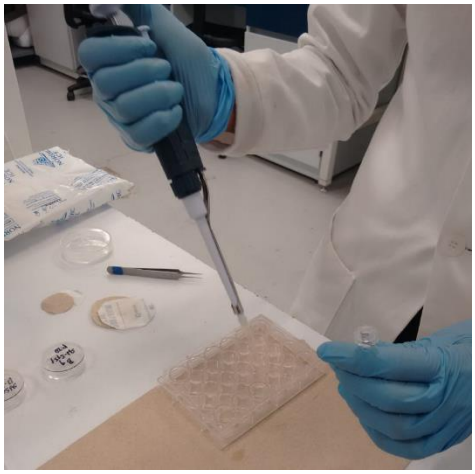


Figura 5.5 Tinción a gota. Durante el procedimiento la mayoría de las incubaciones se realizan con una gota de solución, en lugar de sumergir la muestra en cantidades más grandes de la misma.

Este protocolo se aplicó a la preparación de células de la línea SH-SY5Y, que es una línea celular derivada de neuroblastoma humano (tipo de tumor canceroso que se desarrolla a partir de tejido nervioso). En ellas se pretende observar el núcleo, microfilamentos de actina y tubulina.

El procedimiento se realiza en dos días. En general se tienen que procesar en paralelo, las muestras con todos sus controles.

En el **primer día** las células se colocan sobre cubreobjetos; aunque estos son soportes relativamente frágiles, su tamaño los hace ideales para el tratamiento (tinción a gota) que se les dará a las células. En general, los cultivos celulares se manejan en cubreobjetos para simplificar la manipulación de las muestras biológicas y la última parte de la preparación, que es el montaje en los portaobjetos.

El primer paso es fijar las células, para lo cual se sumergen en una solución salina tamponada con fosfato o PBS, por sus siglas en inglés (Phosphate Buffered Saline),

con formaldeido al 4% durante 20 minutos, para después enjuagarlas nuevamente con PBS. El formaldeido es una sustancia que conserva las estructuras de las células, de otra forma estas, al morir, colapsan y las estructuras se deforman.

El PBS es una solución isotónica que mantiene el pH y la presión osmótica lo más semejante al ambiente fisiológico natural de las células.

A continuación es necesario permeabilizar las células, es decir, abrir poros en la membrana celular para que el anticuerpo que se agregará más adelante, penetre en ellas. El anticuerpo se usa para que reconozca y se pegue a las estructuras que se desea marcar (las palabras “teñir” y “marcar” se usan como sinónimos).

Para permeabilizar se utiliza GSDB en este caso. El GSDB es una solución iso-osmótica, contiene el detergente Triton-X-100 al 0.1% (para permeabilizar) y una solución bloqueadora que evitará que el anticuerpo se adhiera a cualquier estructura. Se sumerge cada muestra en 300 µL de GDBS, y este se cambia tres veces, cada 10 minutos. Mientras tanto se preparan las cámaras de incubación.

Preparación de las cámaras de incubación

Las cámaras de incubación se pueden preparar en cualquier caja de superficie amplia con tapa, que pueda cerrarse bien, en este caso se usan dos cajas de Petri. Se recortan discos de toalla de papel para manos y de parafilm con la medida del diámetro interno, para cada una de las cajas de Petri. Los discos de papel se depositan sobre el fondo de la caja correspondiente, humedecidos con agua sin que haya un exceso de la misma (ver figura 5.6). El parafilm se coloca sobre la toalla

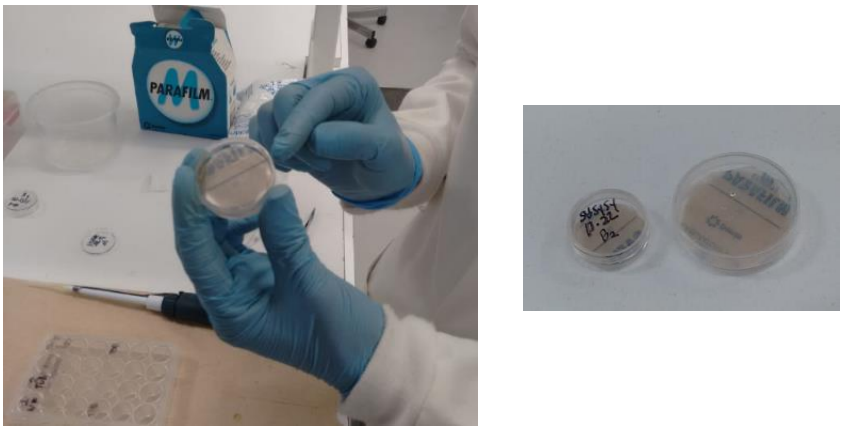


Figura 5.6 Preparación de las cámaras de incubación

húmeda, sin quitarle el papel encerado que protege una de sus caras; este debe quedar en contacto con la toalla de papel.

El parfilm es un material flexible, semitransparente y resistente al agua cuya presentación en láminas es muy utilizada para proteger instrumentos contra la humedad en los laboratorios de industrias como la médica, farmacéutica y hospitalaria; aquí se utiliza para que el cubreobjetos que contiene a las células no esté en contacto directo con el papel húmedo.

Cuando las células están permeabilizadas y bloqueadas se colocan los cubreobjetos (con las células hacia abajo) en las cámaras de incubación, sobre una gota de solución GSDB que contiene al anticuerpo primario Rabbit (conejo).

Las cámaras de incubación se tapan y sellan con parafilm, para evitar la evaporación del líquido y que no se deshidraten las células. La incubación con este anticuerpo primario se realiza en el refrigerador, a - 4ºC, durante toda la noche.

El **segundo día** se sacan las cámaras de incubación del refrigerador, se retiran los cubreobjetos de ellas y se colocan en un multipozos (figura 5.7), con las células hacia arriba, para enjuagarlas con PBS, tres veces durante cinco minutos; mientras tanto se limpian las cajas de Petri para preparar nuevas cámaras de incubación.

Después del enjuague se colocan los cubreobjetos (con las células hacia abajo), en las cámaras de incubación, sobre gotas de solución que contienen el anticuerpo secundario llamado anti-conejo, para dejarlas incubando en refrigeración, durante hora y media.

Figura 5.7 Colocación de las células en el multipozos para el enjuague con PBS.

Como se mencionó anteriormente, la función del anticuerpo secundario, conjugado con algún fluoróforo, es pegarse al anticuerpo primario y así marcar indirectamente la posición de la molécula de interés, reconocida por el anticuerpo primario. La palabra “conjugado” es un término que significa que físicamente están pegados.

Se utilizó el fluoróforo Alexa Fluor 488 conjugado al anticuerpo secundario anti-conejo para marcar tubulina, DAPI para marcar los núcleos de las células y faloidina conjugada al fluoróforo Alexa Fluor 568 para teñir los microfilamentos de actina (ver tabla 5.2). La faloidina no es un fluoróforo, es una micotoxina producida por el hongo *Amanita phalloides*, tiene la capacidad de unirse a la actina impidiendo su depolimerización, en células vivas y en células fijadas. Debido a su elevada afinidad con la actina la faloidina se puede unir eficazmente y específicamente a filamentos de actina, funcionando así como el sistema de laboratorio más eficiente para marcar estos filamentos.

Fluoróforo	Excitación [nm]	Emisión [nm]
5-Hydroxytryptamina (HAT)	370-415	520-540
Alexa Fluor 488	494	519
Alexa Fluor 532	530	555
Alexa Fluor 546	554	570
DAPI	345	458
DPH	354	430
Bromuro de Etidio	510	595
FITC	494	518
Fluoresceína	495	517
FURA-2	340/380	500/530
GFP	395/489	509
Hoechst 33258	365	480
Hoechst 33342	355	465

Tabla 5.2 Algunos fluoróforos y sus longitudes de onda de excitación y emisión.

Se prepara una mezcla de GSDB con DAPI y faloidina para obtener 120 µL de solución en total (se utilizarán 40 µL de solución para cada muestra).

Cuando ha transcurrido el tiempo requerido por la tinción cada cubreobjetos debe enjuagarse con PBS. Después de esto las muestras se encuentran listas para colocarlas (montarlas) sobre un portaobjetos, para lo cual se utiliza un medio de montaje; este es una solución que al secar endurece, aísla la muestra del exterior y hace el montaje permanente. Los medios de montaje no presentan reactividad con

la muestra, su índice de refracción es cercano al del vidrio, no cristalizan ni se oscurecen con el tiempo.

En este caso el medio de montaje utilizado es ProLong Diamond Invitrogen, se vierte una gota, por muestra, en un portaobjetos y sobre la gota se coloca el cubreobjetos, con las células hacia el medio de montaje. Este procedimiento se lleva a cabo con iluminación tenue e indirecta, ya que la colocación de los cubreobjetos sobre el portaobjetos puede llevar algunos minutos y durante ese tiempo los fluoróforos expuestos a la luz podrían sufrir blanqueamiento.

En la figura 5.8 se visualizan los tres cubreobjetos colocados sobre un portaobjetos; en cada una de sus aristas se colocó una gota de esmalte de color con la finalidad de fijarlos mientras el medio de montaje seca. Al final se sellan todos los bordes del cubreobjetos con esmalte, para aislar la muestra del aire.

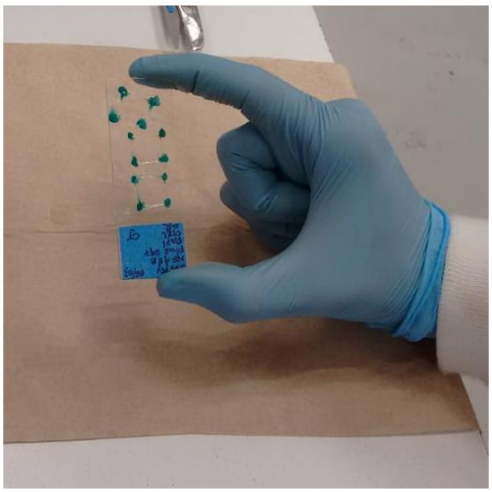


Figura 5.8 Muestras listas para su observación en el microscopio confocal.

El protocolo para la preparación de las muestras incluye muchos más detalles, como el etiquetado para no confundir el grupo control con el grupo de estudio o el manejo de las sustancias para evitar contaminaciones; estos no se mencionan para tener un texto lo más conciso posible.

Una vez que las muestras están listas se guardan en el refrigerador para su estudio posterior.

5.4 Interpretación de imágenes

A continuación se presentan las imágenes de las células de la línea SH-SY5Y de neuroblastoma obtenidas con el microscopio confocal (figura 5.9), cuya preparación se describió en la sección anterior.

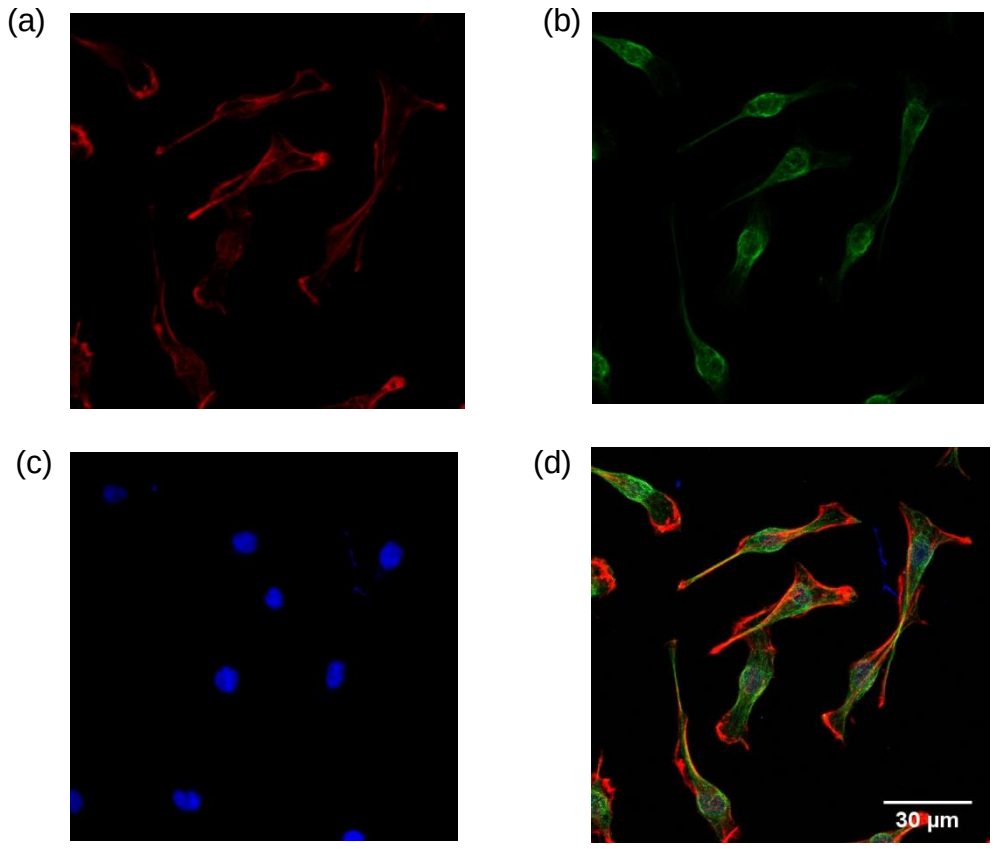


Figura 5.9 Células de la línea SH-SY5Y de neuroblastoma. Cortesía de la Dra. Valeria Piazza.

En la figura 5.9a se observan, en rojo, los microfilamentos de actina. Para realizar el marcaje se utilizó faloidina conjugada con el fluoróforo Alexa Fluor 568.

La figura 5.9b muestra, en verde, la tubulina. El anticuerpo secundario utilizado fue anti-conejo, conjugado con Alexa Fluor 488.

Los núcleos de las células se distinguen en azul (figura 5.9c), para ellos se usó DAPI.

Finalmente, la figura 5.9d muestra el empalme (Merge) de las tres imágenes anteriores.

Como era de esperarse las tres tinciones tienen localizaciones celulares diferentes: el DAPI está restringido a la cavidad nuclear, la red de microtúbulos rodea y define la cavidad nuclear, pero sin penetrarla, mientras que la red de filamentos de actina se hace más densa en los extremos distales de las células, definidos como pseudo-dentritas.

La falta de coincidencia espacial, técnicamente definida como la falta de localización, se aprecia por la ausencia de colores intermedios, como podría ser el amarillo si las estructuras rojas (actina) y verde (tublina) fueran captadas por los mismos pixeles. La única colocalización observable es la de la actina y tubulina en la sección más larga de estas células (pseudo-axón).

Las siguientes imágenes se tomaron con el objetivo de observar la morfología del sistema nervioso central de la rata.

La figura 5.10 muestra una micrografía confocal de un corte parasagital de cerebelo de rata, de 125 µm de grosor. En la imagen se aprecia la organización de la parte superficial de una folia cerebellar (pliegues del cerebelo); las células de Purkinje separan la capa granular, abajo, de la capa molecular (fibras alongadas en verde).

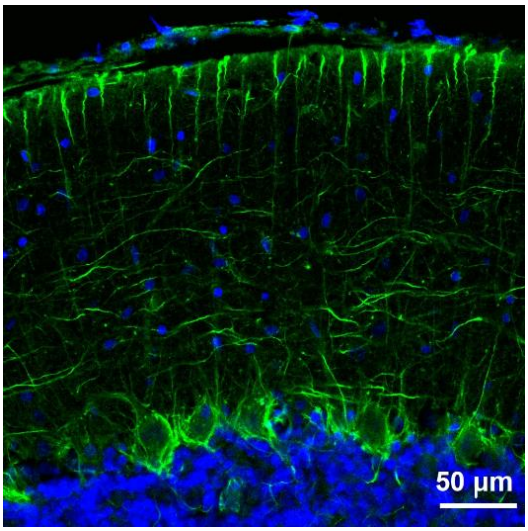
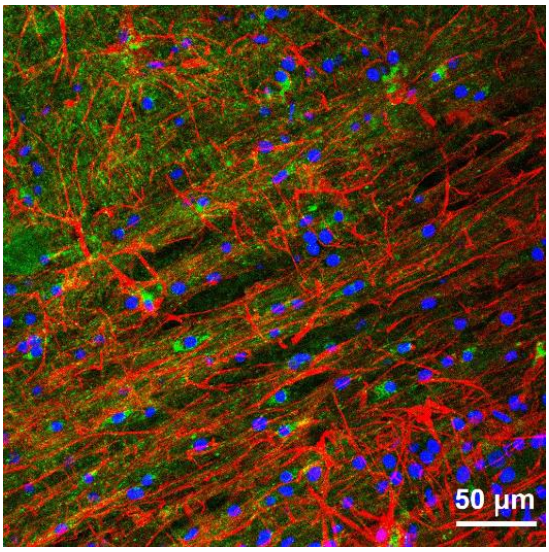


Figura 5.10 Micrografía de un corte parasagital de cerebelo de rata. Verde: NF, azul: DAPI. Cortesía del Dr. Víctor H. Hernández, la Dr. Valeria Piazza y la M. en C. Ángeles Garduño

Los anticuerpos utilizados para marcar neurofilamentos (NF) fueron: Anti-Neurofilament 200, que es un anticuerpo primario producido en conejo, y el anticuerpo secundario anti-conejo producido en cabra, conjugado con Alexafluor 488. Los neurofilamentos son estructuras exclusivas de las neuronas, por lo cual, lo que se observa en verde son neuronas.

Para teñir los núcleos se usó DAPI, en la imagen aparecen en azul.

Por otra parte, en la figura 5.11 se observa una micrografía confocal de un corte longitudinal de médula espinal de rata, de 125 µm de grosor. En esta imagen, que es un ejemplo de marcaje triple, se puede observar la distribución espacial de tubulina, neurofilamentos y núcleos.



. **Figura 5.11** Micrografía de un corte longitudinal de médula espinal de rata.
Verde: tubulina, rojo: NF y azul: DAPI.
Cortesía del Dr. Víctor H. Hernández, la Dr. Valeria Piazza y la M. en C. Ángeles Garduño

Para marcar tubulina se usaron: anticuerpo primario Anti-tubulina, producido en oveja y el anticuerpo secundario anti-oveja generado en burro, conjugado con Alexa Fluor 488. La señal de tubulina, de acuerdo al espectro del fluoróforo utilizado, se representó en verde.

Para teñir los neurofilamentos se usaron: el anticuerpo primario Anti-Neurofilamentos producido en conejo y el anticuerpo secundario anti-conejo generado en cabra, conjugado con Alexafluor 568. Los neurofilamentos se observan en rojo. Para teñir los núcleos se usó DAPI, se observan en azul.

El análisis de células simples y secciones de tejidos es una importante técnica que apoya el estudio de la estructura celular así como el funcionamiento de las células vivas y sus constituyentes, todo esto es posible gracias a las imágenes de microcopía confocal.

Referencias

Acosta V., Cowan C. & Graham B. (1999). *Curso de física moderna*. México: Harla

Conn P. (1999). *Methods in Enzymology*. U.S.A.: Academic Press

Freeman S. (2009). *Biología*. Madrid: Pearson Educación S.A.

Pawley J. (2006). Handbook of biological confocal microscopy. Wisconsin: Springer.

Wilson T. (1990). *Confocal microscopy*. San Diego, California: Academic Press.

https://www.news-medical.net/life-sciences/Primary-and-Secondary-Antibodies-Whats-the-Difference.aspx

http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/met/espectrofluorimetria.pdf

https://www.cio.mx/talleres/tmcmf/archivos/CW_Fluoroforos.pdf

http://www.tecnicaenlaboratorios.com/Nikon/Info_fluoroforos.htm

https://www.medigraphic.com/pdfs/revedubio/reb-2016/reb164c.pdf

https://www.leica-microsystems.com/science-lab/basic-principles-of-luminescence/

http://www.iib.unsam.edu.ar/archivos/docencia/licenciatura/biotecnologia/2017/BioCel/1504634347.pdf

https://www.news-medical.net/life-sciences/Primary-and-Secondary-Antibodies-Whats-the-Difference.aspx

http://museovirtual.csic.es/salas/vida/vida6.htm

https://www.significados.com/citoesqueleto/

CONCLUSIONES

- Los microscopios confocales son instrumentos de vanguardia sumamente sofisticados, fabricados con tecnología de última generación. El manejo y aprovechamiento de estos instrumentos requiere, que los equipos de trabajo que los usan tengan una preparación multidisciplinaria, ya que para la obtención de resultados no es suficiente con tener conocimientos de biología o medicina, se requiere saber física, en general, y óptica, en particular.

- El diseño del microscopio confocal se fundamenta en el funcionamiento de los microscopios de epi-fluorescencia. La electrónica y el sistema de cómputo asociados a ellos han logrado que estos instrumentos alcancen resoluciones limitadas únicamente por difracción.

- El microscopio confocal toma el nombre de microscopio de fluorescencia confocal al aplicarse a las áreas biomédicas, en donde se aprovecha el fenómeno de la fluorescencia de sustancias con las cuales se tiñen las muestras biológicas analizadas.

- El avance de la biología celular, sin duda está marcado por la aparición del microscopio confocal, que también es el resultado de la evolución del microscopio óptico compuesto, el desarrollo de la tecnología de los láseres y la investigación sobre el uso de fluorocromos para realizar la tinción de las muestras biológicas.

- Los microscopios de fluorescencia confocales proporcionan imágenes únicas de muestras biológicas, debido a la selectividad de los anticuerpos utilizados en el proceso de tinción de las mismas, lo que permite diferenciar perfectamente los distintos componentes de células y tejidos.