

Tópicos en Biofísica Molecular

1er Cuatrimestre de 2018

Docentes: Lía Pietrasanta y Alan Bush

Práctica de laboratorio n° 2: Microscopía Óptica

OBJETIVOS

Identificar las partes y familiarizarse con el funcionamiento del microscopio óptico. Ajustar los componentes para lograr una iluminación uniforme (iluminación de Köhler). Calibrar la magnificación del sistema lente objetivo/ocular usando el micrómetro objeto y el retículo ocular del microscopio. Calibrar con el micrómetro objeto el tamaño de cada píxel para imágenes adquiridas con una cámara. Utilizando las calibraciones efectuadas, determinar el diámetro promedio y la desviación estándar para células epiteliales de la mucosa bucal.

INTRODUCCIÓN

1. Iluminación Köhler

El sistema de iluminación está constituido por las partes del microscopio que producen o captan, reflejan y regulan la intensidad de la luz que se utiliza para la observación microscópica. Uno de los aspectos críticos a considerar en la microscopía óptica es la fuente de luz que se emplea para iluminar el espécimen. Si la muestra es iluminada de manera inadecuada, la calidad de la imagen que se obtiene se verá afectada, aún cuando se disponga de un excelente sistema óptico. La iluminación óptima debe ser brillante, sin resplandores y en lo posible debe dispersarse de manera uniforme en el campo de observación. El método de iluminación que optimiza la observación microscópica fue diseñado por el profesor August Köhler el año 1893. Este un método de iluminación permite aprovechar al máximo las capacidades de las lentes (objetivos) iluminando la muestra en estudio con un campo de luz uniforme cuyo diámetro sea igual al del área de captura del objetivo. Los microscopios actuales están diseñados para utilizar la iluminación Köhler.

El condensador se desplaza verticalmente hasta obtener una imagen nítida del diafragma de campo. La iluminación ideal se consigue cuando el condensador se encuentra lo más cerca de la preparación. El diafragma de campo regula el diámetro de la apertura de la iluminación y al cerrarlo se incrementan los contrastes (**Figura 1**).

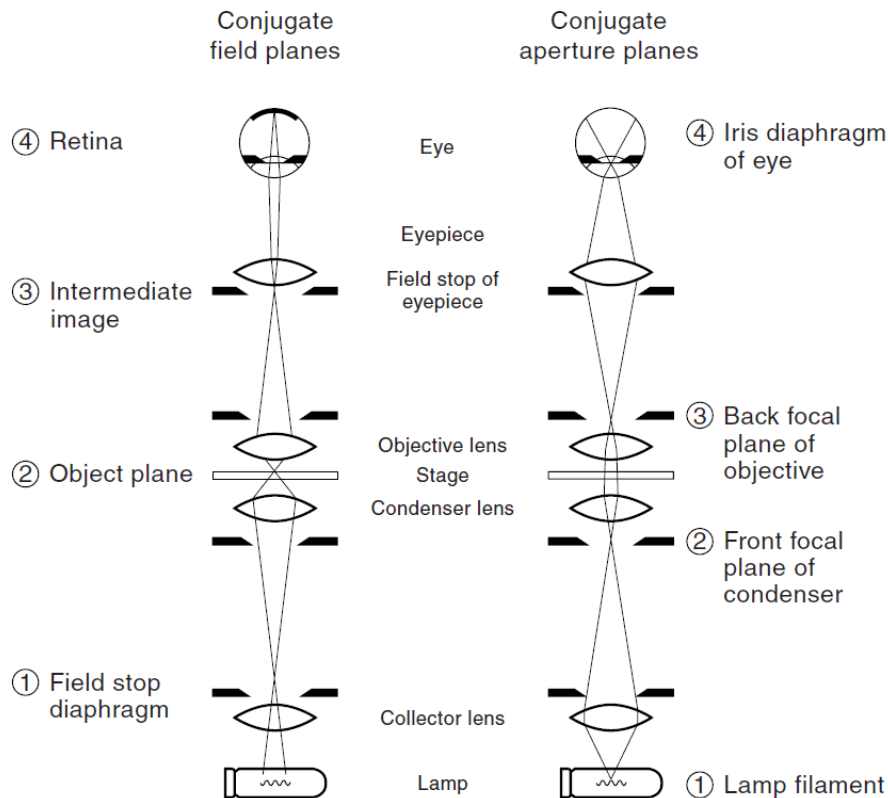


Figura 1. Trayectoria de la luz en la iluminación Köhler. *Modificado de Davison M, Abramowitz M. Optical Microscopy. Olympus Microscopy Resource Center.*

Pasos a seguir para lograr la iluminación Köhler

- 1- Subir el condensador hasta el tope, introduciendo la lente abatible del condensador para lograr la máxima concentración de luz sobre la muestra a observar.
- 2- Enfocar el objeto con un objetivo de poca amplificación, generalmente de 10x
- 3- Cerrar el diafragma de campo de la lámpara colectora, con lo que se verá proyectado éste sobre la muestra.
- 4- Bajar el condensador para enfocar el diafragma, de manera que su imagen se proyecte bien definida sobre la muestra.
- 5- Centrar la imagen del diafragma de campo con los tornillos para centrado del condensador.
- 6- Abrir el diafragma de campo, de manera que la imagen de sus bordes se abra y se ilumine todo el campo visual.
- 7- Ajustar el diafragma de apertura del condensador para lograr mejor contraste, profundidad de campo y poder de resolución.
- 8- A cada cambio de lente objetivo, volver a enfocar la imagen con el tornillo micrométrico y ajustar el diafragma del condensador para mejorar el contraste.

2. Calibración de la magnificación

Una vez familiarizados con la estructura y funcionamiento del microscopio compuesto, queremos **medir y cuantificar**, lo que constituye la micrometría (morfometría) de los especímenes observados al microscopio.

Para cuantificar longitudes, cantidades (número de células, núcleos, partículas), se emplean tradicionalmente oculares de medición con retículos (retículo ocular micrométrico), que deben ser calibrados con una grilla patrón de dimensiones conocidas. En caso de medir con el retículo del ocular, se calibra para cada combinación de lente objetivo utilizando un micrómetro objeto. Para ello, se enfoca la imagen del micrómetro objeto y se superponen el retículo ocular y el micrómetro objeto, haciendo coincidir uno de sus extremos de cada uno (**Figura 2**). Así es posible obtener el cociente longitud/división que determina la calibración del retículo ocular para cada objetivo.

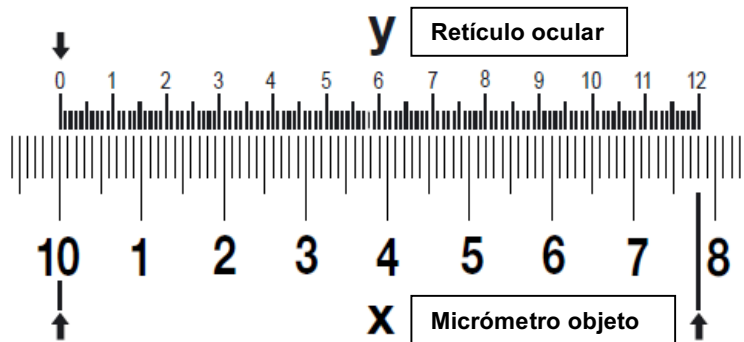


Figura 2. Sobreposición de retículo ocular y micrómetro objeto. La medición debe ser consistente, desde el extremo en que coinciden ambas retículas hasta otra subdivisión coincidente.

Si las mediciones se realizan a partir de imágenes adquiridas con una cámara, la resolución no sólo está dada por el sistema óptico, sino que depende de cómo esté digitalizada la imagen. En este caso, para cuantificar longitudes es necesario calibrar qué tamaño tiene cada píxel de la imagen adquirida. Este valor no depende solamente de sistema óptico, sino que está dado también por la cantidad de píxeles y del zoom utilizados para tomar la imagen. Para calibrar el tamaño del píxel de una imagen, podemos tomar una imagen de la grilla de calibración en las mismas condiciones (cantidad de píxeles, zoom) que la imagen a cuantificar, y, de la misma forma que para el retículo ocular, relacionar ahora una cierta cantidad de píxeles con una longitud conocida.

DESARROLLO DE LA PRÁCTICA

1. Identificar las partes y familiarizarse con el funcionamiento del microscopio.
2. Ajustar los componentes para lograr la iluminación Köhler. Identificar y localizar las posiciones de los cuatro planos de apertura y de los cuatro planos de campo.
¿Por qué es erróneo ajustar el brillo de la imagen usando el diafragma de campo o el de apertura? ¿Cómo debería hacerse?
3. Calibrar la magnificación del sistema lente objetivo/ocular usando el micrómetro objeto y el retículo ocular correspondiente al microscopio empleado. Determinar cuántos micrómetros hay por unidad del retículo a diferentes magnificaciones. Contamos con:
 - Micrómetro objeto (Carl Zeiss *cat. No. 474026*), positive 5 + 100/100 y; D = 0.17 mm
graduación en +y-: 5 mm en 5 intervalos;
graduación en -y-: 1 mm en 100 intervalos = 10 μ m
Precisión \pm 1 μ m
 - Retículo ocular (Carl Zeiss *cat. No. 454060*), 14:140 / d = 26 mm
longitud de la graduación = 14 mm
incrementos = 0.1 mm
tolerancia \leq 0.001 mm
4. Calibrar con el micrómetro objeto el tamaño de cada píxel para imágenes adquiridas con la cámara. Hacerlo para imágenes con distinta resolución. ¿Podemos aumentar la resolución indefinidamente aumentando la cantidad de píxeles de la imagen?
Calcular la resolución teórica del microscopio. ¿Cómo conviene elegir la cantidad de píxeles de la imagen en función de este valor?
5. Preparar una muestra de células epiteliales de mucosa bucal utilizando un hisopo. Para ello frotar suavemente la mucosa bucal con un hisopo y luego transferir la carga del mismo a un portaobjetos. Colocar un cubreobjetos sobre la zona del preparado y sellar con esmalte para uñas.
6. Determinar el diámetro promedio y la desviación estándar para las células epiteliales de la mucosa bucal y para sus núcleos ($n = 10$).
7. Analizar la muestra en los modos *contraste de fases* y *campo oscuro*. ¿Qué diferencias se observan?

NORMAS PARA EL USO CORRECTO DEL MICROSCOPIO ÓPTICO

- 1.** Quitar la funda protectora del microscopio.
- 2.** Enchufar/encender el microscopio.
- 3.** Colocar en primera instancia el objetivo de menor aumento para lograr un enfoque correcto. Este paso es muy importante y se debe realizar siempre, ya que permitirá la observación de una panorámica del preparado y la ubicación de áreas de interés para su análisis posterior.
- 4.** Subir el condensador utilizando el tornillo correspondiente.
- 5.** Colocar el preparado sobre la platina, con el cubre-objetos hacia arriba y sujetándola con las pinzas/guías.
- 6.** Enfocar el preparado mirando a través del ocular y moviendo lentamente el tornillo macrométrico.
- 7.** Recorrer todo el preparado, hacer sus observaciones. Elegir el sitio donde debe seguir observando a mayor aumento.
- 8.** Cambiar al objetivo de mediano aumento (20 X) y para lograr el enfoque seguir moviendo lentamente el tornillo macrométrico. Al cambiar de objetivo, la imagen debe estar ligeramente enfocada gracias a que la mayoría de microscopios son parafocales, es decir, una vez logrado el primer enfoque, al pasar al objetivo de aumento inmediato superior la imagen queda en un foco aproximado y solo se debe realizar un ajuste.
- 9.** Realizar la observación, hacer sus anotaciones. Determinar cuál es la estructura que se va a observar a mayor aumento y colocarla en el centro del campo.
- 10.** Cambiar al objetivo de mayor aumento. Si se realizó el enfoque de manera correcta con el objetivo anterior, al colocar el objetivo de mayor aumento la imagen solo se debe enfocar girando única y lentamente el tornillo micrométrico. *Cuidado:* no se debe utilizar el tornillo macrométrico con los objetivos de mayor aumento, pues al estar éste muy cerca del preparado, se corre el riesgo de partirlo.
- 11.** Al lograr el enfoque con el objetivo de mayor aumento, realizar la observación moviendo constantemente el tornillo micrométrico para variar los planos de enfoque. De igual manera, abrir o cerrar el diafragma para regular la intensidad de la luz y mejorar el contraste.
- 12.** Una vez finalizada la observación, alejar la platina y colocar nuevamente el objetivo de menor aumento.
- 13.** Retirar la muestra.
- 14.** Limpiar la lente objetivo si usó medio de inmersión, apagar la/s lámpara/s.
- 15.** Cubrir el microscopio con la funda protectora, una vez que la lámpara se haya enfriado.

Recomendaciones

NUNCA dañar, rayar, dejar caer las lentes u otros componentes ópticos.

NUNCA forzar los controles de foco.

NUNCA tocar las superficies ópticas. Durante la clase se discutirá cuál es el procedimiento para limpiar las lentes objetivos correctamente.

REFERENCIAS

[1] Douglas B. Murphy, *Fundamentals of light microscopy and electronic imaging*. Editorial Wiley-Liss, Inc., 2001.

[2] Axioskop 2 Routine Microscope, Operating Instructions. Carl Zeiss Mikroskopie.

[3] Medición, Manual de empleo de Leica Microsystems Ltd.

[4] José L. Cabrera T., José A. Salas, Juan A. Guardado, José M. Juárez. Simposio de Metrología 2008, Santiago de Querétaro, México.

[5] ASTM (American Society for Testing and Materials) Standards: E 1951 -02, *Standard Guide for Calibrating Reticles and Light Microscope Magnifications*.

[6] Davison, M., Abramowitz, M. *Optical Microscopy*. Olympus Microscopy Resource Center. <http://www.olympusmicro.com>