

Tópicos de Biofísica Molecular

1er Cuatrimestre de 2018

Docentes: Lía Pietrasanta y Alan Bush

Práctica de laboratorio n° 3: Microscopía de Fluorescencia

OBJETIVOS

Identificar las partes y familiarizarse con el funcionamiento del microscopio de fluorescencia. Observar muestras de nanopartículas (*quantum dots*) y microesferas fluorescentes. Analizar una muestra de células marcada con tres sondas fluorescentes. Discutir la configuración de los cubos (filtro de excitación, espejo dicróico y filtro de emisión) para cada muestra comparando los espectros de los fluoróforos utilizados y de los cubos disponibles en el microscopio. Estudiar cómo afecta la resolución del microscopio en la visualización de los tres tipos de muestras.

INTRODUCCIÓN

1. Microscopía de Fluorescencia

La **fluorescencia** refiere al proceso mediante el cual un espécimen (orgánico o inorgánico, vivo o no) absorbe y subsecuentemente irradia luz, en un intervalo de tiempo (entre la absorción de la luz de excitación y la emisión de la luz fluorescente) que es usualmente de pocos nanosegundos. La Microscopía de Fluorescencia es una herramienta muy valiosa para estudiar materiales que son fluorescentes, ya sea de manera natural (materiales autofluorescentes) o tratados con sondas fluorescentes.

El Microscopio de Fluorescencia fue desarrollado a principios del siglo veinte por August Köhler, Carl Reichert, y Heinrich Lehmann, entre otros. Sin embargo no fue sino hasta décadas después que se descubrió su potencial, siendo hoy una técnica indispensable en biología celular. La principal diferencia del Microscopio de Fluorescencia es que permite irradiar al espécimen con la luz de excitación y **separar** la luz fluorescente emitida, que es mucho más débil, de la luz de excitación. Así, sólo la luz emitida por el espécimen es detectada por el ojo o el detector (usualmente una cámara digital). Como resultado, las partes fluorescentes de la muestra brillan contra un fondo (*background*) oscuro con suficiente contraste como para permitir la detección. Cuanto más oscuro es el fondo, más eficiente será el instrumento. La **Figura 1** presenta un esquema de lo que ocurre cuando un espécimen fluorescente es observado a través de un Microscopio de Fluorescencia.

La microscopía de fluorescencia es una herramienta de inestimable valor ya que permite alcanzar altos niveles de sensibilidad y resolución microscópica, permitiendo una apreciación diferente de la información que se puede obtener de los especímenes y que generalmente pasa desapercibida. El uso de fluoróforos ha permitido identificar células, componentes celulares sub-micrométricos y otras entidades con un alto grado de especificidad. Más aún, esta microscopía permite la detección del material fluorescente con una altísima sensibilidad: puede ser detectada una cantidad muy pequeña de moléculas fluorescentes (unas 50 moléculas por micrón cúbico). En una misma muestra,

diferentes sondas fluorescentes permiten apreciar distintos tipos de moléculas gracias a las técnicas de marcado específico.

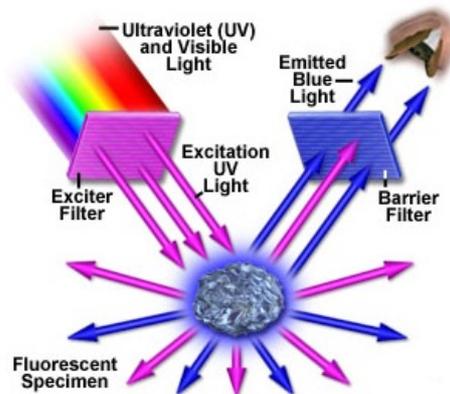


Figura 1. Representación de una muestra en el Microscopio de Fluorescencia. Por medio de un filtro de excitación se seleccionan las longitudes de onda específicas de la luz de una fuente UV-visible. Un filtro de barrera permite el paso de la luz fluorescente emitida bloqueando la luz UV reflejada. La fluorescencia se irradia en todas las direcciones independientemente de la dirección de la luz de excitación. Tomado de Davison M, Abramowitz M, *Introduction to Fluorescence*. Olympus Microscopy Resource Center.

2. Filtros para Fluorescencia

Los filtros juegan un papel muy importante en un Microscopio de Fluorescencia ya que son los que permiten separar la luz emitida de la luz de excitación. Básicamente hay tres categorías de filtros: filtros de excitación, filtros de barrera y espejos dicróicos usualmente combinados para producir un cubo de filtros como el de la **Figura 2a**. La selección de los filtros apropiados es la clave para que esta microscopía funcione.

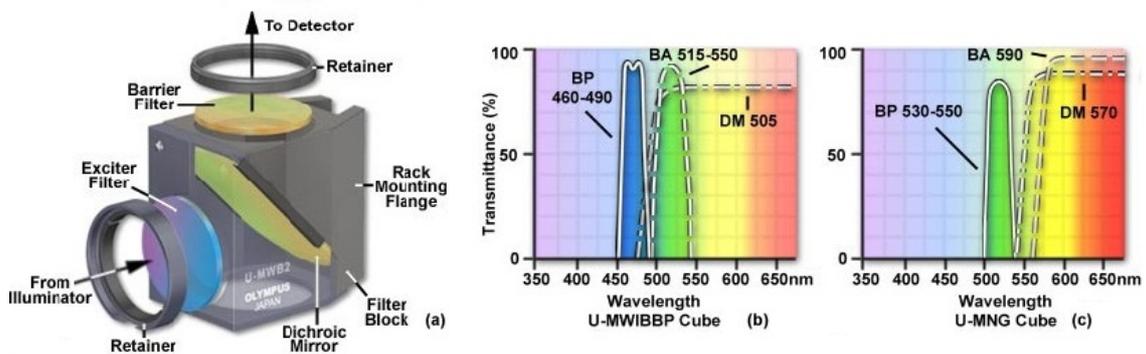


Figura 2. (a) Cubo de filtros de un Microscopio de Fluorescencia. (b) Espectros de los filtros que conforman el cubo U-MWIBBP: excitación BP 460-490, emisión BA 515-550 y dicróico DM 505. (c) Espectros de los filtros del cubo U-MNG: excitación BP 530-550, emisión BA 590 y dicróico DM 570. Modificado de Davison M, Abramowitz M, *Fluorescence Filters*. Olympus Microscopy Resource Center.

Los **filtros de excitación** permiten que sólo las longitudes de onda seleccionadas de la fuente de luz pasen a través del camino de iluminación del espécimen. Los **filtros de barrera** o **filtros de emisión** están diseñados para suprimir o bloquear (absorber) las longitudes de onda de excitación en el paso hacia el detector. Los **espejos dicróicos** son filtros especializados diseñados para reflejar las longitudes de onda de excitación y dejar

pasar las de emisión eficientemente. Los dicroicos se posicionan en el camino óptico después del filtro de excitación pero antes del de emisión, a un ángulo de 45 grados respecto de cada uno de ellos, como se ve en la **Figura 2a**. Las características de cada filtro se pueden ver en su espectro, que muestra el porcentaje de transmisión en función de la longitud de onda. En la **Figura 2b,c** se presentan los espectros de los filtros de excitación y emisión, y filtros dicroicos para dos cubos comerciales de la firma Olympus.

3. Algunos materiales y sondas fluorescentes

La Microscopía de Fluorescencia aprovecha principalmente el alto grado de sensibilidad de la técnica combinado con la habilidad de marcar componentes estructurales y procesos dinámicos en células o tejidos ya sea vivos o fijados químicamente. Muchas sondas fluorescentes son construidas a partir de compuestos aromáticos sintéticos y fueron diseñadas para ligarse a una macromolécula biológica (por ejemplo una proteína o un ácido nucleico) o para localizarse en una región estructural específica como citoesqueleto, mitocondria, retículo endoplasmático o núcleo. Otro tipo de sondas son empleadas para monitorear procesos dinámicos y variables ambientales localizadas incluyendo concentración de iones, pH y potencial de membrana.

Una de las sondas más utilizadas es la Fluoresceína (**Figura 3a**), y su derivado FITC (*fluorescein isothiocyanate*) que se une a aminas primarias permitiendo marcar componentes biológicos. Como otro ejemplo, el fluoróforo DAPI (o 4',6-diamidino-2-phenylindole) se une a regiones del ADN ricas en bases A-T, y puede pasar a través de la membrana celular por lo que se usa para marcar células fijadas o vivas (**Figura 3b**). En cuanto al marcado de organelas, se han desarrollado fluoróforos específicos como los de la serie MitoTracker (**Figura 3c**) y MitoFluor de *Molecular Probes*, que presenta fluoróforos para marcar Mitocondria con diversas propiedades espectrales. El mecanismo de ligadura varía en cada sonda de la serie, desde una unión covalente a la oxidación en membranas de mitocondrias respiratorias.

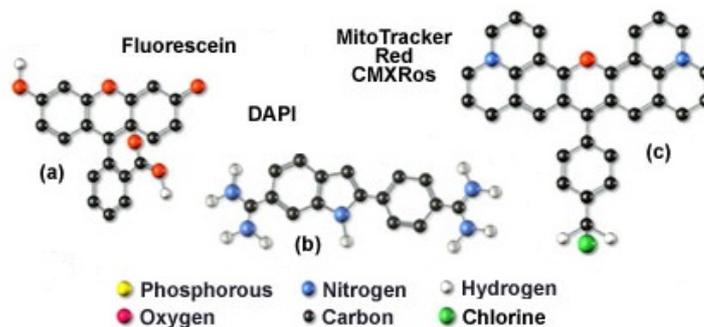


Figura 3. Estructura de los fluoróforos Fluoresceína (a), DAPI (b) y MitoTracker Red (c).

La ingeniería de sondas fluorescentes tuvo un salto tecnológico muy grande con el descubrimiento de la proteína verde fluorescente (GFP) y el desarrollo de sus variantes mutantes espectrales, que abrieron la puerta a las investigaciones multicolor no invasivas en localización de proteínas, interacciones intermoleculares y tráfico en cultivos de células vivas.

Por último, como desarrollo más reciente en sondas fluorescentes podemos mencionar los *quantum dots* (QDs) o nanopartículas semiconductoras fluorescentes, cuyas propiedades espectrales están fuertemente determinadas por su tamaño (**Figura 4**). QDs con tamaños que difieren en decenas de un nanómetro emiten en diferentes longitudes de onda (menores tamaños emiten longitudes de onda más cortas y viceversa). Los materiales más comunes de estas nanopartículas es el Seleniuro de Cadmio (CdSe) o Sulfuro de Cadmio (CdS). Los QDs vienen recubiertos con polímeros hidrofílicos y conjugados a anticuerpos u otros péptidos biológicamente activos y carbohidratos para su aplicación en protocolos de inmunohistoquímica. Sus propiedades fotofísicas presentan ventajas significativas respecto de otros fluoróforos, como fotoestabilidad, altos niveles de fluorescencia y emisión en múltiples colores con una única longitud de onda de excitación.

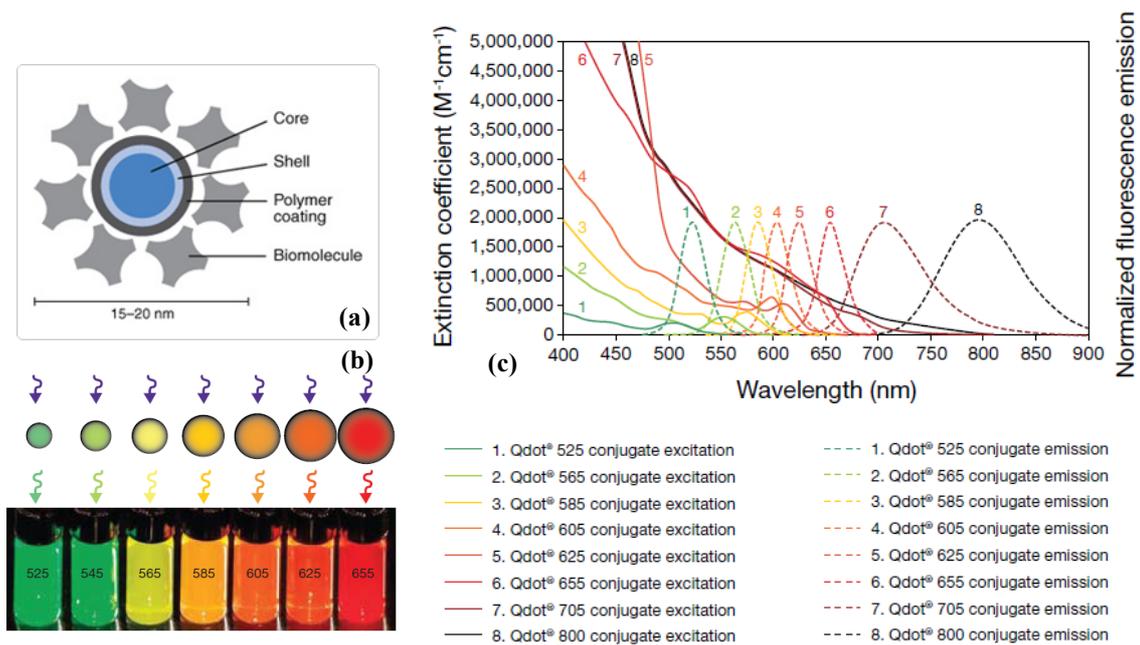


Figura 4. (a), Estructura de un *quantum dot* y su funcionalización con biomoléculas. Las soluciones de QDs fluorescen en distintas longitudes de onda según su tamaño, como puede verse en (b) y en sus características espectrales (c). Tomadas de <http://www.invitrogen.com> (075409_Qdot_brochure.pdf).

DESARROLLO DE LA PRÁCTICA

1. Identificar las partes específicas y familiarizarse con el funcionamiento del Microscopio de Fluorescencia. Analizar los espectros de los cubos de filtros (filtro de excitación, espejo dicróico y filtro de emisión) disponibles en el microscopio.

El microscopio cuenta con cuatro posiciones para cubos de filtros, tres de ellas están dispuestas para fluorescencia:

- (1) 450-490/ FT 510/ LP520 (Zeiss)
- (2) Para transmisión
- (3) LP 590/QD 665 (Zeiss/Chroma)
- (4) BP 365/ FT 395/ LP 397 (Zeiss)

2. Preparar muestras de:

- esferas de látex fluorescentes (fluoróforo: Coumarina).

Observarlas al microscopio (elegir el cubo indicado para cada fluoróforo). Tomar imágenes de ambas muestras. ¿Se puede medir el tamaño de las partículas a partir de las imágenes tomadas?

3. Muestra biológica: componentes del citoesqueleto y núcleo, marcados con distintas sondas fluorescentes, en células endoteliales de arteria pulmonar bovina (**Figura 5**)

Actina: filamentos marcados con faloidina Texas Red®-X

Tubulina: marcado con un anticuerpo primario contra α -tubulina y visualizado con un anticuerpo secundario conjugado a BODIPY® Fluoresceína

Núcleo: marcado con DAPI

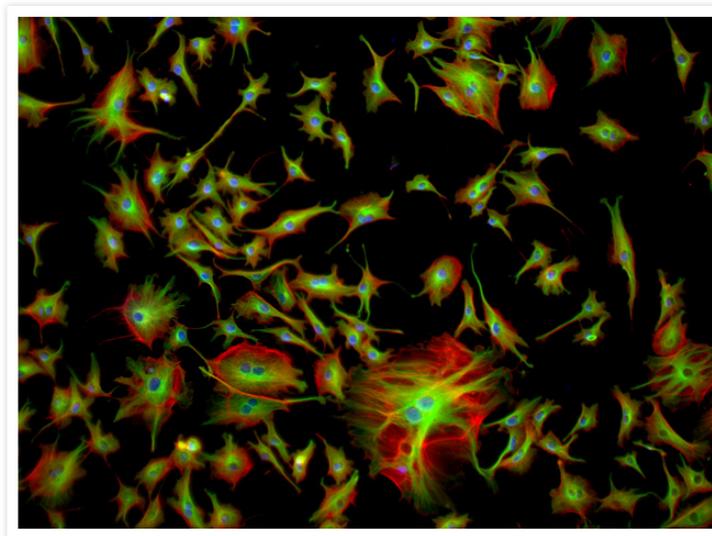


Figura 5. Muestra comercial de células de arteria pulmonar bovina.

Proponer la configuración de los cubos de acuerdo a cada fluoróforo presente en la muestra (**Figura 6**). Comparar la misma con los cubos disponibles en el Microscopio. Observar la muestra en los diferentes canales, identificar los componentes celulares marcados, su localización y distribución. Adquirir una imagen de cada canal.

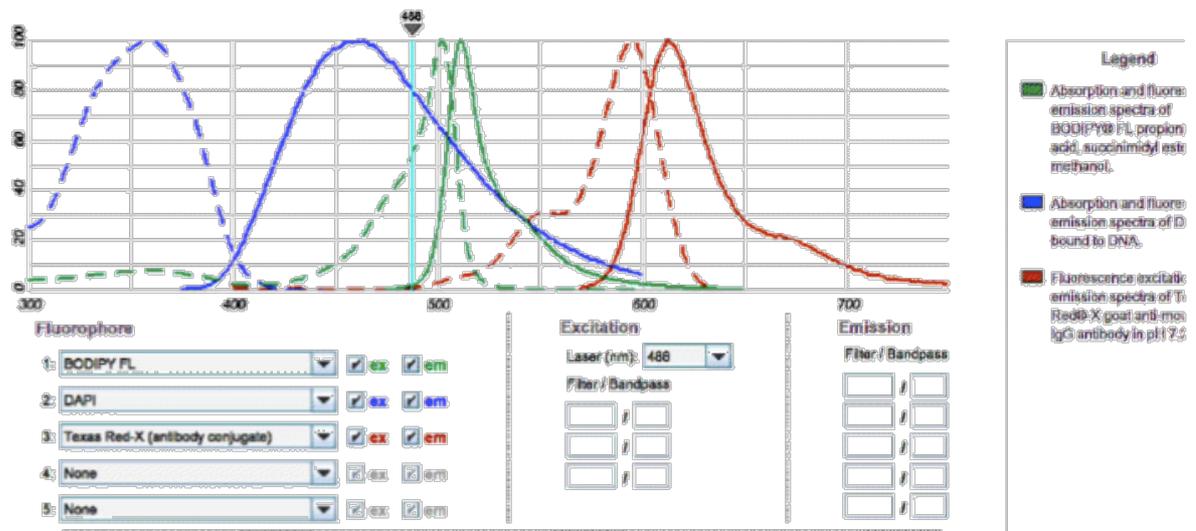


Figura 6. Espectros de excitación (línea de puntos) y emisión (línea llena) de los tres fluoróforos presentes en la muestra: DAPI (azul), BODIPY (verde) y Texas Red (rojo). Tomado de <http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/support/Research-Tools/Fluorescence-SpectraViewer.html>

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>

Tutorials

<http://www.olympusmicro.com/primer/java/index.html>

<http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/support/Tutorials.html>

<http://www.zeiss.com>, ir a Fluorescence Dye and Filter Database

<http://www.leica-microsystems.com/products/light-microscopes/accessories>

Köhler Illumination

<http://www.olympusmicro.com/primer/anatomy/kohler.html>

Fluorescence Microscopy

<http://www.olympusmicro.com/primer/techniques/fluorescence/fluorhome.html>