

Tópicos en Biofísica Molecular 2do cuat. 2015

Guía 2: Microscopía y Fluorescencia.

Objetivos

Identificar las partes y familiarizarse con el funcionamiento del Microscopio Óptico. Optimizar la iluminación empleando el método de Köhler.

Identificar las partes y familiarizarse con el funcionamiento del Microscopio de Fluorescencia. Observar muestras de microesferas fluorescentes y estudiar la resolución del microscopio. Analizar una muestra de células marcada con tres sondas fluorescentes. Discutir la configuración de los filtros para cada muestra en base a los espectros de los fluoróforos utilizados y de los cubos disponibles en el microscopio. Procesar y analizar las imágenes de fluorescencia. Estudiar cómo afecta la resolución del microscopio en la visualización de las diferentes muestras.

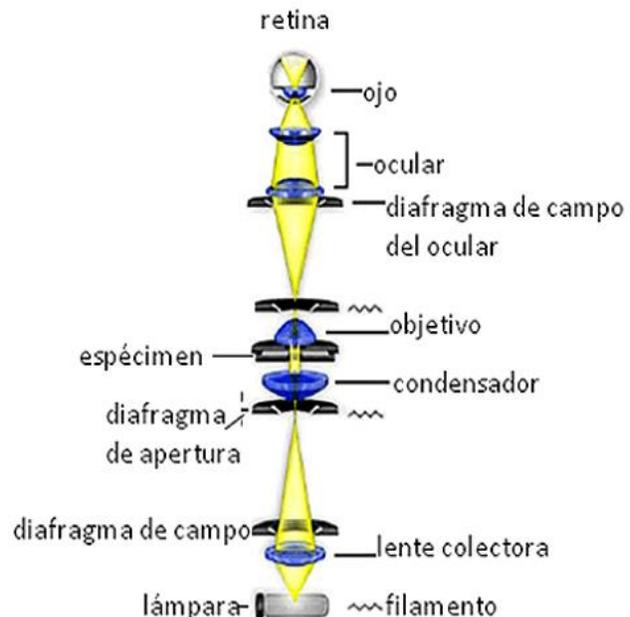
Introducción

Microscopio óptico

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.

En el año 1893, el profesor August Köhler propuso un método de iluminación para optimizar la observación microscópica y la microfotografía, que 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 modernos están diseñados para utilizar la iluminación Köhler. Como parte de esta práctica identificarán los diferentes elementos que constituyen el sistema de iluminación del microscopio e implementarán el método propuesto por Köhler para optimizar la iluminación.

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



Una vez familiarizado con la estructura y funcionamiento del microscopio compuesto, hay que considerar aquellos accesorios que conducen a una excelente práctica microscópica y que facilitan el trabajo, haciéndolo más rápido y efectivo o ampliando las capacidades del instrumento. Una de las capacidades es medir y cuantificar los especímenes observados en el microscopio, lo que constituye la micrometría (morfometría). Para cuantificar longitudes se emplean tradicionalmente oculares de medición con retículos (retículo ocular micrométrico) que deben ser calibrados con una grilla patrón de dimensiones conocidas. También se pueden cuantificar cantidades (número de células, núcleos, partículas, bacterias, etc.) empleando cámaras de conteo.

Microscopía de fluorescencia

La microscopía de fluorescencia es una herramienta de inestimable valor para la investigación científica, 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. La fluorescencia refiere al proceso mediante el cual un espécimen 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 la herramienta que permite estudiar materiales 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 2 presenta un esquema de lo que ocurre cuando un espécimen fluorescente es observado a través de un Microscopio de Fluorescencia.

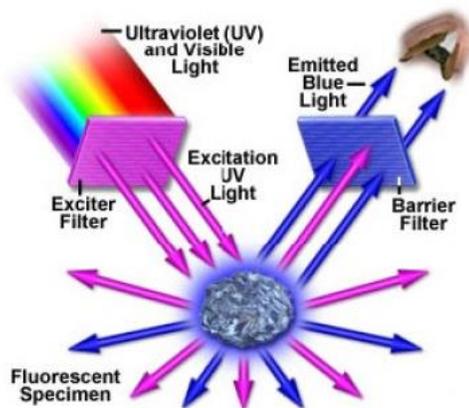


Figura 2. Representación de una muestra en el Microscopio de Fluorescencia. Por medio de un filtro de excitación se seleccionan las longitudes de onda específicas de la luz de una fuente UV-visible. Un filtro de barrera permite el paso de la luz fluorescente emitida bloqueando la luz UV reflejada. La 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.

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 dicroicos usualmente combinados para producir un cubo de filtros como el de la Figura 3a. La selección de los filtros apropiados es la clave para que esta microscopía funcione.

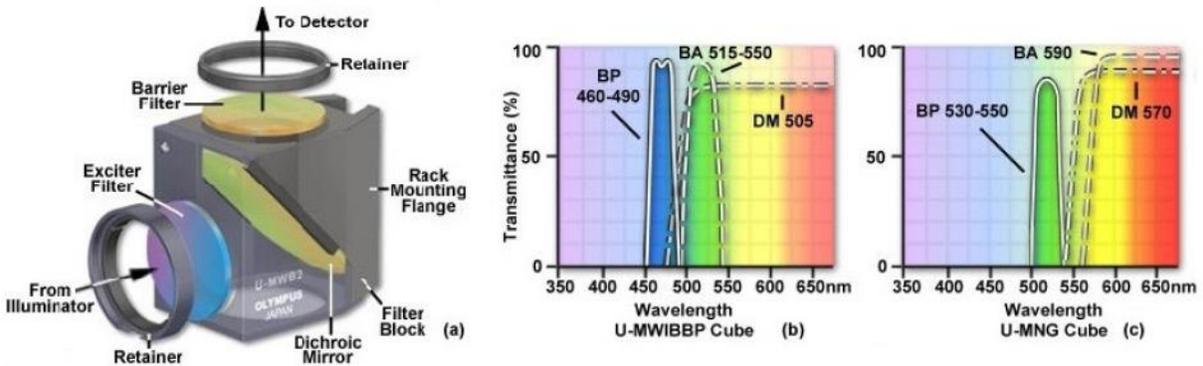


Figura 3. (a) Cubo de filtros de un Microscopio de Fluorescencia. (b) Espectros de los filtros que conforman el cubo U-MWIBBP: excitación BP 460-490, emisión BA 515-550 y dicroico DM 505. (c) Espectros de los filtros del cubo U-MNG: excitación BP 530-550, emisión BA 590 y dicroico DM 570. Modificado 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 dicroicos 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 3a. 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 3b,c se presentan los espectros de los filtros de excitación y emisión y filtros dicroicos para dos cubos comerciales de la firma Olympus.

Sistema de detección y procesamiento de imágenes

Para la adquisición de imágenes, el microscopio de fluorescencia tiene instalado un dispositivo CCD de Astronomical Instruments, modelo ST8. Mediante imágenes de transmisión de una grilla de calibración, se determinará el tamaño del píxel de las imágenes obtenidas a partir de diferentes objetivos del microscopio. También se caracterizará el ruido de oscuridad del detector que luego será descontado de las imágenes adquiridas. El procesamiento y análisis de las imágenes se efectuará en la plataforma abierta y gratuita FIJI (*Fiji Is Just ImageJ*).

En la clase teórica discutimos: las características de las sondas fluorescentes, los tipos y su aplicación; los requerimientos instrumentales como fuente de luz, filtros, lente objetivo; dificultades en la obtención de las imágenes, así también como la naturaleza de la muestra que observaremos. El objetivo del trabajo práctico será identificar las partes y sus funciones para la microscopía de fluorescencia. Discutir la configuración de los filtros para cada muestra en base a 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 las diferentes muestras. Además, adquiriremos imágenes empleando una cámara CCD y luego las procesaremos mediante FIJI.

Actividades

A. Microscopio óptico

ANTES de usar el microscopio leer atentamente las normas para el uso correcto del microscopio óptico (apéndice A).

A.1. Identificar las partes y familiarizarse con el funcionamiento del microscopio compuesto. Preste atención a la fuente de iluminación y los objetivos que tiene a disposición.

A.2. Ajustar los componentes para lograr la iluminación Köhler (ver apéndice B). Identificar y localizar el condensador, el diafragma de apertura y el diafragma de campo.

A.3. ¿Por qué es erróneo ajustar el brillo de la imagen usando el diafragma de campo o el de apertura? ¿Cómo debería hacerse?

Calibración del retículo del ocular para diferentes magnificaciones. Determinación del tamaño de células epiteliales de mucosa bucal

El microscopio cuenta con un ocular que posee un retículo graduado para poder realizar mediciones de los tamaños de los objetos observados.

A.4. Haciendo uso de un micrómetro objeto patrón, calibre el retículo del ocular para diferentes magnificaciones del sistema lente objetivo/ocular. Datos del micrómetro patrón:

Micrómetro objeto (Carl Zeiss cat. No. 474026)
graduación en +y: 5 mm en 5 intervalos;
graduación en -y: 1 mm en 100 intervalos = 10 μm
Precisión $\pm 1 \mu\text{m}$

¿Cómo se observa el retículo ocular empleando diferentes magnificaciones? ¿y el micrómetro patrón?

A.5. Prepare una muestra de células epiteliales de mucosa bucal utilizando un hisopo. Para ello frote suavemente la mucosa bucal con un hisopo y luego transfiera la carga del mismo a un portaobjetos. Coloque un cubreobjetos sobre la zona del preparado y selle con esmalte para uñas.

A.6. Determine el diámetro promedio y la desviación estándar para las células epiteliales de la mucosa bucal y para sus núcleos.

B. Microscopía de Fluorescencia

B.1. Identificar las partes específicas y familiarizarse con el funcionamiento del Microscopio de Fluorescencia. Identifique las fuentes de iluminación y los sistemas de detección. 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) Cubo QD 655 (*Chroma*)
- (4) BP 365/ FT 395/ LP 397 (*Zeiss*)

B.2. Muestra de microesferas de látex fluorescentes de diferentes tamaños. Observarlas al microscopio (elegir el cubo indicado para cada fluoróforo). Adquirir imágenes con la cámara CCD.

Crinsom 40nm
Dragon Green 500nm
Polybeads Blue Dye 3000nm

B.3. Determine el tamaño del píxel en las imágenes adquiridas.

B.4. ¿Se puede medir el tamaño de las partículas a partir de las imágenes tomadas? Calcule la resolución teórica del microscopio.

B.5. Muestra de células endoteliales de arteria pulmonar bovina que tiene marcados con distintas sondas fluorescentes componentes del citoesqueleto y núcleo (Figura 4):

Actina: filamentos detectados con faloïodina Texas Red®-X (rojo)

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

Núcleo: marcado con DAPI (azul)

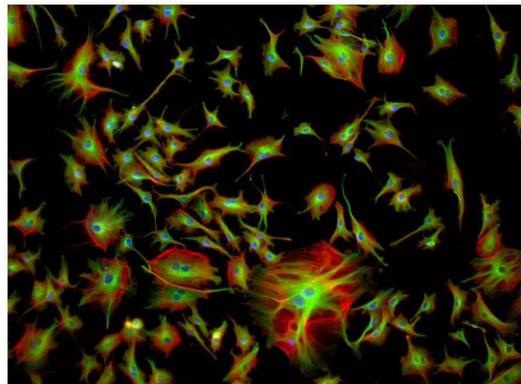


Figura 4. Imagen de fluorescencia de células endoteliales de arteria pulmonar bovina.

B.6. Proponga la configuración de los cubos (filtro de excitación, espejo dicróico y filtro de emisión) de acuerdo a cada fluoróforo presente en la muestra. Compare la misma con los cubos que se utilizará en el TP. Microscopía de Fluorescencia

En la Figura 5 se muestran los espectros de excitación y emisión de los distintos fluoróforos empleados.

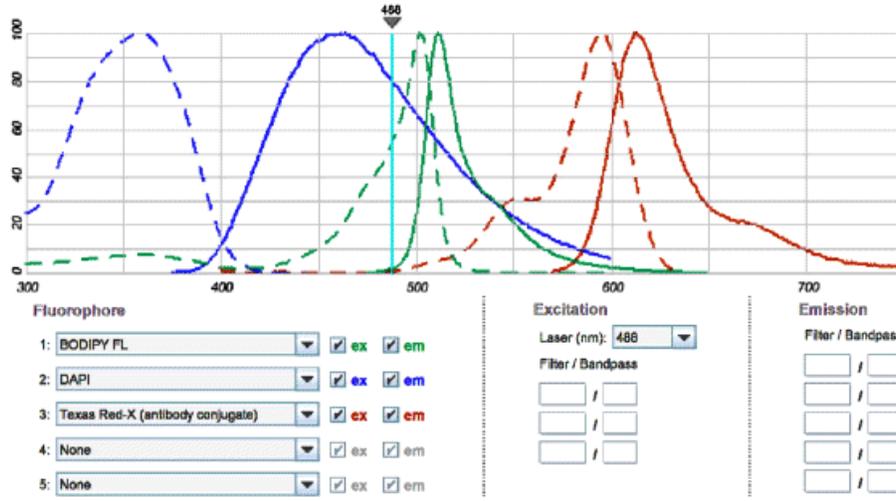


Figura 5. Espectros de excitación (línea de puntos) y emisión (línea llena) de los tres fluoróforos presentes en la muestra: DAPI (azul), BODIPY (verde) y Texas Red (rojo). Tomado de <http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/support/Research-Tools/Fluorescence-SpectraViewer.html>.

B.7. Observe la muestra en los diferentes canales, identifique los componentes celulares marcados, su localización y distribución. Adquiera una imagen de cada canal.

B.8. Procese y analice las imágenes obtenidas (lea el tutorial de FIJI subido a la página web de la materia). Discuta los resultados obtenidos.

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>
- [7] Guías de laboratorio de las materias Tópicos en Biofísica Molecular y Física 2B&G, diseñadas por Sigaut, von Bilderling y Pietrasanta.

TUTORIALES

- <http://www.olympusmicro.com/primer/>
<http://www.olympusmicro.com/primer/anatomy/kohler.html>
<http://www.zeiss.com> ir a Fluorescence Dye and Filter Database
<http://www.leica-microsystems.com/products/light-microscopes>
<http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/support/Research-Tools/Fluorescence-SpectraViewer.html>

APÉNDICES

A. 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- Enfoque el preparado mirando a través del ocular y lentamente mueva el tornillo macrométrico.
- 7- Recorra todo el preparado y haga sus observaciones. Elija el sitio donde debe seguir observando a mayor aumento.
- 8- Cambie al objetivo de mediano aumento (20 X) y para lograr el enfoque siga 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- Realice la observación y haga sus anotaciones. Determine cuál es la estructura que va a observar a mayor aumento y colóquela en el centro del campo.
- 10- Cambie al objetivo de mayor aumento. Si 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**. NUNCA 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 debe realizar la observación moviendo constantemente el tornillo micrométrico para variar los planos de enfoque. De igual manera, abra o cierre el diafragma para regular la intensidad de la luz y mejorar el contraste. Haga sus observaciones.
- 12- Una vez finalizada la observación, aleje la platina y coloque nuevamente el objetivo de menor aumento.
- 13- Retire la muestra.
- 14- Limpie la lente objetivo si usó medio de inmersión, apague la/s lámpara/s.
- 15- Cubra el microscopio con la funda protectora.

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.

B. PROCEDIMIENTO PARA OBTENER 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.

Los pasos que deben seguirse para lograr la iluminación Köhler son los siguientes:

- 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.