

Laboratorio de Electromagnetismo y Óptica (ByG)
1er cuat. 2021

TP Nº 5: Microscopía óptica, resolución y procesamiento de imágenes

Objetivos

Estudiar cómo afecta la resolución del microscopio en la visualización de las diferentes muestras. Procesar y analizar las imágenes de fluorescencia. Determinar experimentalmente 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.

Introducción

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.

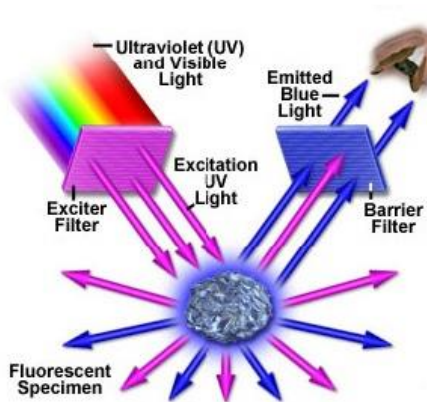


Figura 1. Representación de una muestra en el Microscopio de Fluorescencia. Por medio de un filtro de excitación se seleccionan las longitudes de onda específicas de la luz de una fuente UV-visible. Un filtro de barrera permite el paso de la luz fluorescente emitida bloqueando la luz UV reflejada. La 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.

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.

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 2a. La selección de los filtros apropiados es la clave para que esta microscopía funcione.

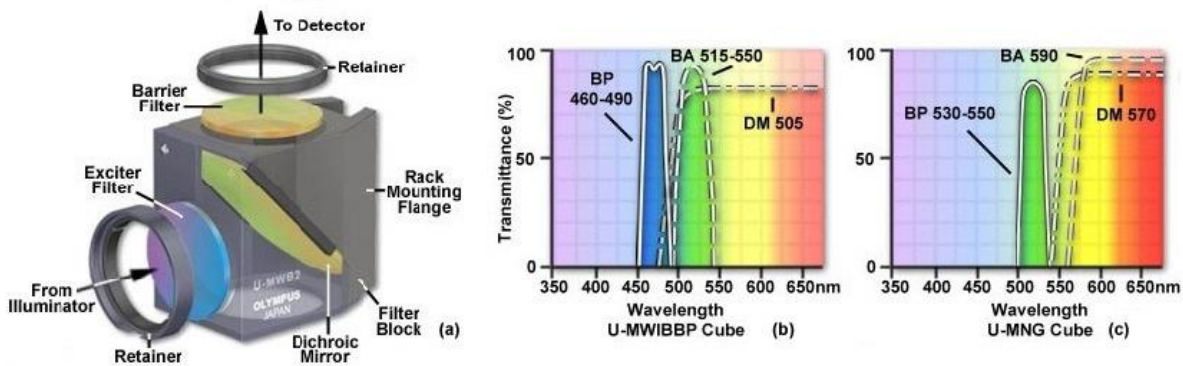


Figura 2. (a) Cubo de filtros de un Microscopio de Fluorescencia. (b) Espectros de los filtros que conforman el cubo U-MWIBBP: excitación BP 460-490, emisión BA 515-550 y dicroico DM 505. (c) Espectros de los filtros del cubo U-MNG: excitación BP 530-550, emisión BA 590 y dicroico DM 570. Modificado 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 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.

Actividades

A partir de las imágenes obtenidas con un microscopio de fluorescencia resolver los ítems pedidos. El microscopio con el cual se obtuvieron las imágenes 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*)

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*).

PARTE A

Estudio de la resolución del microscopio óptico (consultar apunte)

A.1 A partir del análisis de la imagen de la grilla de calibración (mínima división $10\mu\text{m}$) obtenida con el objetivo de 40X, $\text{NA}=0.75$, determine el tamaño del píxel en las imágenes adquiridas con este objetivo y el campo observado.

Grilla_calibración_40x_NA075.tiff

Para objetivo 40x NA 0.75:	
Tamaño píxel	
Tamaño del campo observado	

A.2. A partir del análisis de las imágenes de microesferas de distintos diámetros (40, 500 y 3000 nm) tomadas con el objetivo de 40X, $\text{NA}=0.75$ y calcular el diámetro de la imagen de las microesferas, empleando la calibración realizada en la parte anterior. Muestre un perfil de intensidades analizado que sea representativo de cada tamaño de microesfera.

microesferas_3000nm_40xNA075.tiff
 microesferas_500nm_40xNA075.tiff
 microesferas_40nm_40xNA075.tiff

Valor nominal del diámetro de las microesferas (μm)	Valor experimental promedio
0.04	
0.5	
3	

A.3 Compare el valor medido con el valor nominal de las microesferas y discuta las diferencias observadas. Para responder:

A.3.1 ¿Se puede medir el tamaño de todas las microesferas a partir de las imágenes tomadas?

A.3.2 ¿Cuál cree que es el límite de resolución del microscopio? Estime la resolución real del microscopio usando el objetivo 40x NA 0.75. Compárela con la ideal.

A.3.3 Usando el mismo microscopio y lente objetivo: ¿De qué tamaño se observaría una microesfera de diámetro nominal 200 nm?

A.3.4 ¿y una microesfera de tamaño $1.5\mu\text{m}$?

PARTE B

Muestra de células endoteliales de arteria pulmonar bovina que tiene marcados con distintas sondas fluorescentes componentes del citoesqueleto y núcleo (Figura 3):

Actina: filamentos detectados con faloidina 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)

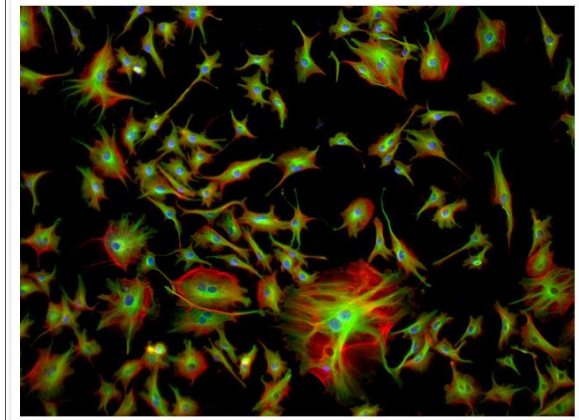


Figura 3. Imagen de fluorescencia de células endoteliales de arteria pulmonar bovina.

B.1 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 de fluorescencia que tiene el microscopio.

En la Figura 4 se muestran los espectros de excitación y emisión de los distintos fluoróforos empleados.

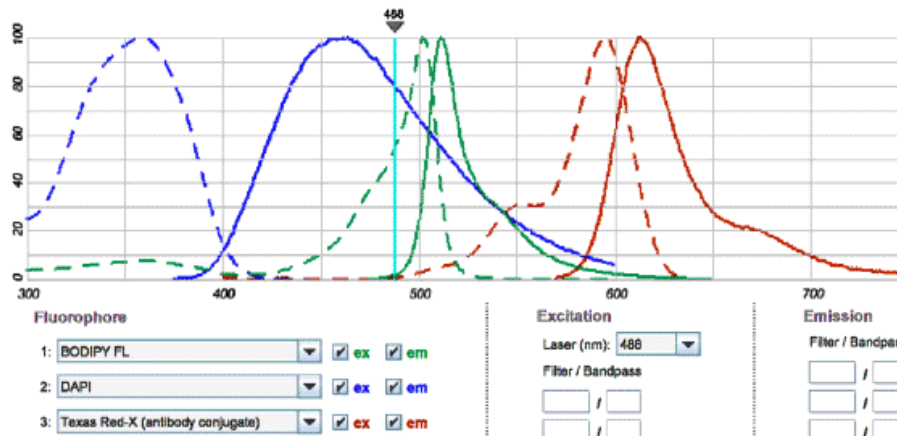


Figura 4. Espectros de excitación (línea de puntos) y emisión (línea llena) de los tres fluoróforos presentes en la muestra: DAPI (azul), BODIPY (verde) y Texas Red (rojo). Tomado de <http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/support/Research-Tools/Fluorescence-SpectraViewer.html>.

B.2 Observe las imágenes de la muestra obtenida utilizando los diferentes cubos, identifique los componentes celulares marcados, su localización y distribución.

B.3 Procese y analice las imágenes obtenidas (lea el tutorial de Procesamiento de imágenes subido a la página web de la materia). Discuta los resultados obtenidos.

Apéndice

Función de dispersión de punto (PSF)

La función de dispersión de punto (del inglés *Point Spread Function* o PSF) se define como el patrón de difracción tridimensional de la luz emitida por un punto infinitesimalmente pequeño en el espécimen y transmitido al plano imagen a través de una lente objetivo de apertura numérica NA. Cuando un objeto puntual de estas características emite luz, una fracción de la misma es colectada por el objetivo y enfocada en el punto correspondiente del plano imagen. Sin embargo, el límite de difracción hace que el objetivo no pueda enfocar la luz emitida a un punto infinitesimalmente pequeño en el plano imagen. En cambio, las ondas de luz convergen e interfieren en el punto focal produciendo un patrón de difracción de anillos concéntricos de luz alrededor de un disco central brillante, en el plano de la imagen (x - y), denominado patrón de difracción de Airy. El máximo central del patrón se denomina disco de Airy y determina la resolución lateral del microscopio (r_{xy}), que depende de la longitud de onda de emisión (λ) y la NA del objetivo, según la ecuación 1.

$$r_{xy} = \frac{0.6\lambda}{NA} \quad (1)$$

Donde para la definición de la resolución se considera el **criterio de Rayleigh**, que establece que dos objetos pueden resolverse si el primer mínimo del disco de Airy de uno de los objetos coincide con el máximo central del disco del segundo objeto (**Figura 5**).

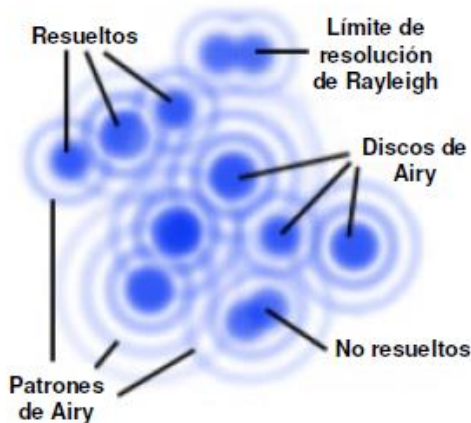


Figura 5. Resolución. Esquema de una imagen de partículas de tamaño sub-resolución. Se observan los patrones de difracción de Airy proveniente de cada una de las partículas en caso de que su distancia sea mayor a la resolución lateral. Tomado de ².

La resolución del microscopio está entonces directamente relacionada con las dimensiones de la PSF, y puede no sólo estimarse a través de los parámetros del microscopio y fluoróforo utilizados, sino también medirse experimentalmente. Es posible medir experimentalmente la PSF en el microscopio a través de la adquisición con el mismo de imágenes de partículas de tamaño menor a la resolución del microscopio (suelen emplearse para estas mediciones esferas fluorescentes de dimensiones sub-resolución).

Es importante tener en cuenta que en la resolución final y el contraste en las imágenes tomadas con el microscopio, estará determinada no sólo por la PSF sino también por el número de fotones colectados, el rango dinámico de la señal, las aberraciones ópticas del sistema y el número de píxeles por unidad de área con los que se tome la imagen. El tamaño de los píxeles suele elegirse en relación a la PSF, en términos de un buen muestreo de la señal. Por lo general se considera el criterio de Nyquist según el cual, la frecuencia muestreo de una señal debe ser de por lo menos del doble de frecuencia que la señal. En el caso de una imagen, esto corresponde a un tamaño de píxel menor a la mitad de las dimensiones de la PSF.

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] Guía de trabajos prácticos de la materia optativa Tópicos en Biofísica Molecular, de la FCEN-UBA. Docentes Lía Pietrasanta, Catalina von Bilderling
- [8] Curso de Microscopía de fluorescencia, auspiciados por el Sistema Nacional de Microscopía, docentes Lía Pietrasanta, Catalina von Bilderling y Lorena Sigaut

Tutoriales

<http://www.olympusmicro.com/primer/>

<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>

Lorena Sigaut, lorena@df.uba.ar