

## 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**

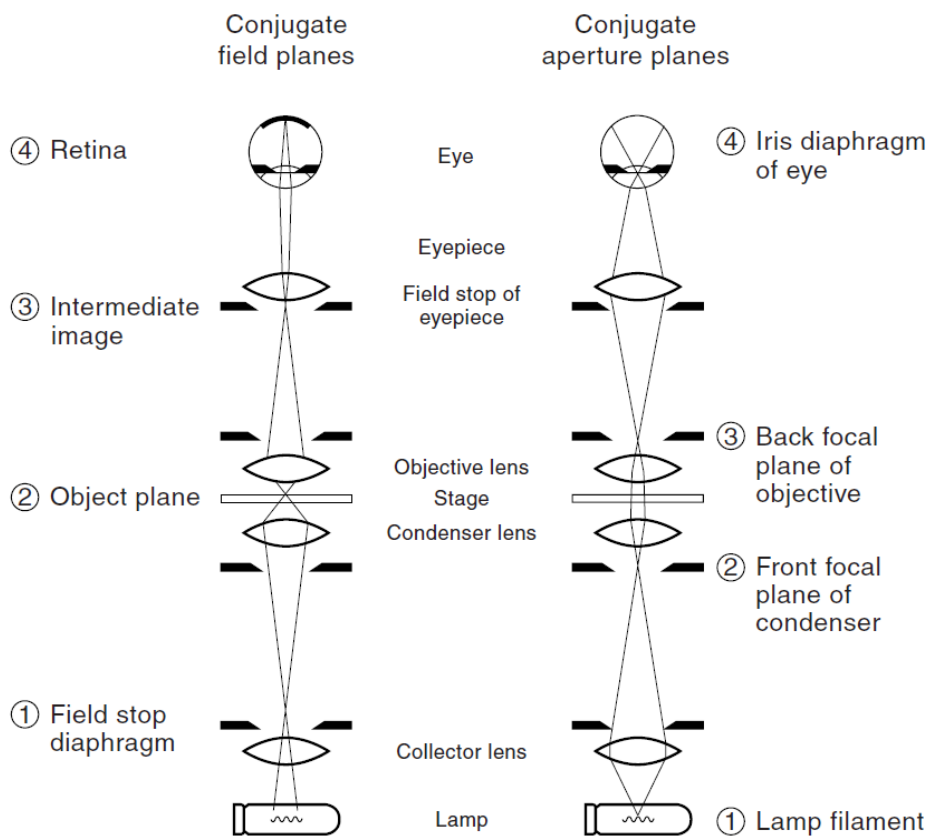
NUNCA dañar, rayar, dejar caer las lentes u otros componentes ópticos.

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.***

**PARTE A: PROCEDIMIENTO PARA OBTENER 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. 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.



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

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.

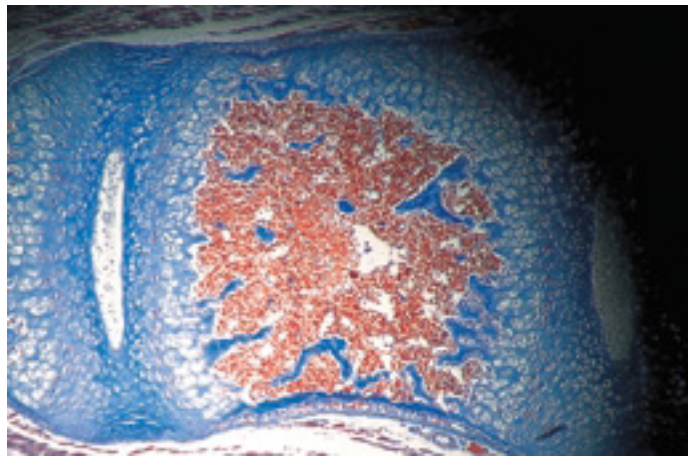
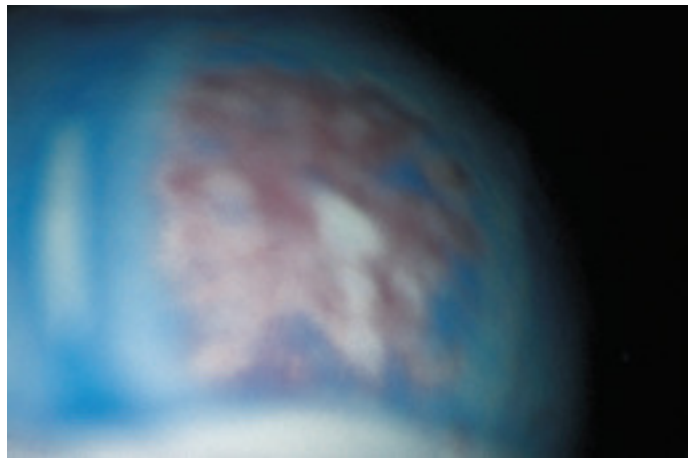
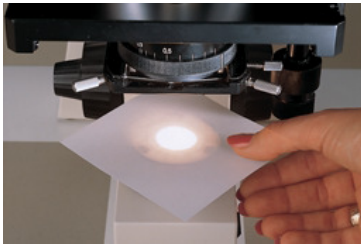
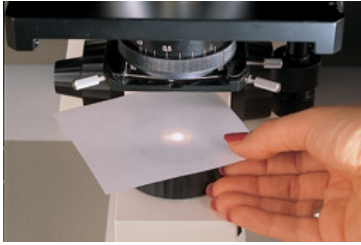
Los pasos que deben seguirse para lograr la iluminación Köhler son los siguientes:

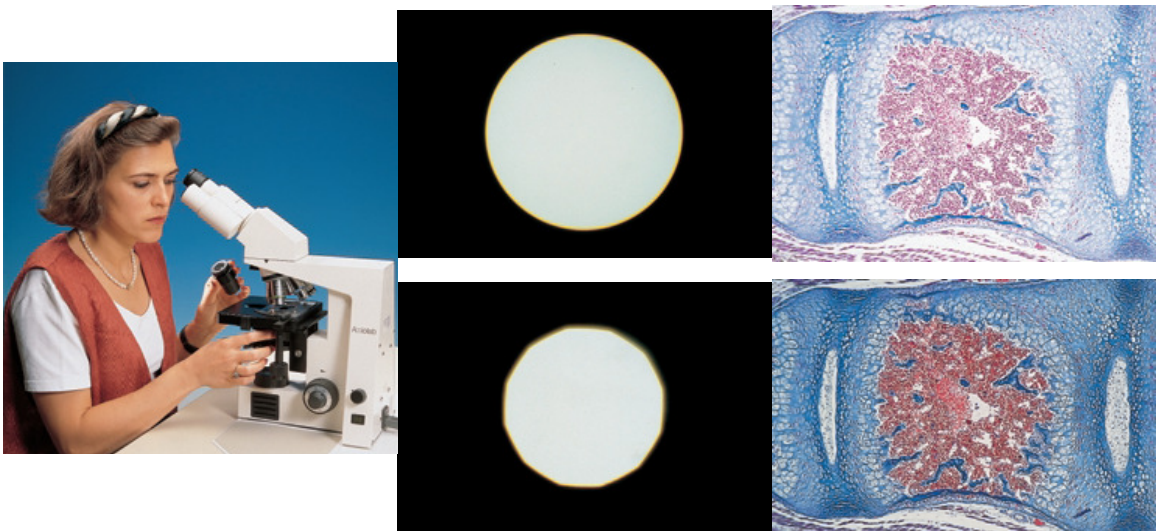
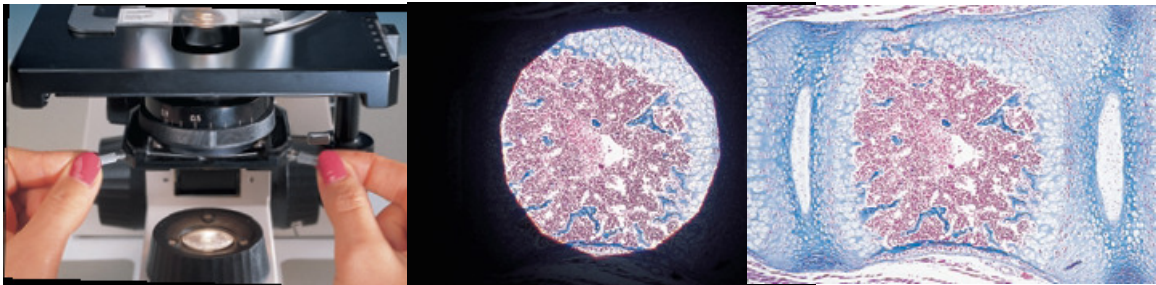
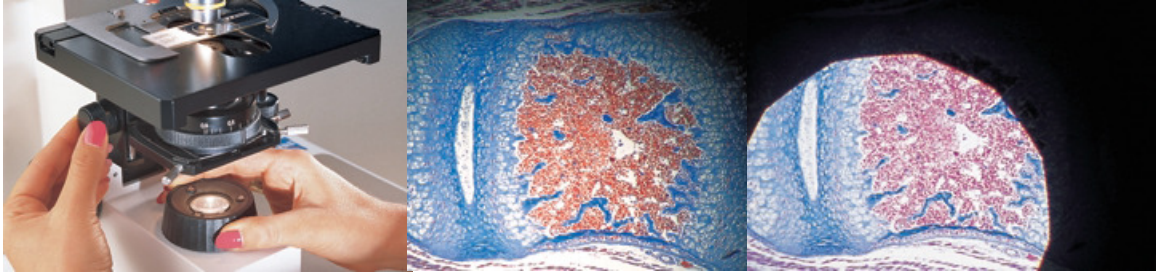
- 1- Subir el condensador hasta el tope, introduciendo la lente abatible del condensador para lograr la máxima concentración de luz sobre la muestra a observar.
- 2- Enfocar el objeto con un objetivo de poca amplificación, generalmente de 10x
- 3- Cerrar el diafragma de campo de la lámpara colectora, 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.

## **PARTE A DEL TRABAJO PRÁCTICO**

- 1. Identificar las partes y familiarizarse con el funcionamiento del microscopio compuesto.**
- 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.**
- 3. ¿ Por qué es erróneo ajustar el brillo de la imagen usando el diafragma de campo o el de apertura?. ¿Cómo debería hacerse?.**

**PASOS A SEGUIR PARA OBTENER LA ILUMINACIÓN KOEHLER**







## PARTE B: CALIBRACIÓN DE LA MAGNIFICACIÓN

### MÉTODO DE CALIBRACIÓN

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. Dentro de las posibilidades se puede **medir y cuantificar**. Consiste en la micrometría (morfometría) aproximada de los especímenes observados al microscopio.

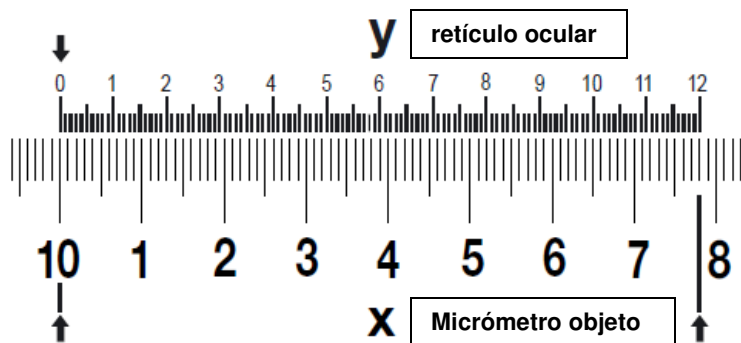
Para cuantificar longitudes, cantidades (número de células, núcleos, partículas), se emplean oculares de medición con retículos (retículo ocular micrométrico) en combinación con micrómetros especializados, patrones calibrados, cámaras de conteo y el vernier.

**Calibración del Retículo Ocular Micrométrico:** necesitamos los accesorios:

- Retículo ocular con graduación en mm
- Micrómetro objeto para calibrar

Pasos a seguir para calibrar el retículo ocular:

- Ver a través del ocular y enfocar la imagen del micrómetro objeto usando la combinación de lente objetivo 10x.
- Sobreponer el retículo ocular y el micrómetro objeto, haciendo coincidir uno de sus extremos de cada uno.
- La medición deberá ser consistente, desde el extremo en que coinciden ambas retículas hasta otra subdivisión coincidente, Fig. 1.



- La calibración retículo ocular puede ser determinado dividiendo la longitud conocida del micrómetro objeto ( $L_p$ ) entre el número de divisiones coincidente del retículo ocular ( $\#d_o$ ).

Este cálculo da por resultado el valor real de la longitud de cada subdivisión del retículo ocular (VR):

$$\frac{L_p(mm)}{\#d_o(subdivisión)} = VR_{Sub}(mm/subdivisión) \cdot (1)$$

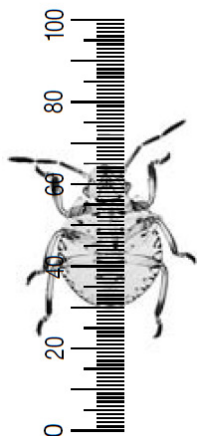
Ejemplo: Calibración del Retículo Ocular a la amplificación de cuatrocientos aumentos (400X). Para una configuración dada de lentes en un microscopio óptico (ocular de 10X y objetivo de 40X), se determina la longitud por valor de división de un ocular micrométrico. Dos (2) subdivisiones de la retícula ocular (#d<sub>o</sub> = 2 subdivisiones) coinciden con la distancia conocida de 0,3 mm con respecto al micrómetro objeto (L<sub>p</sub> = 0,3 mm). La longitud por unidad de división (VR<sub>Sub</sub>) puede ser calculada como sigue:

$$VR_{Sub} = \frac{L_p}{\#d_o} = \frac{0,3mm}{2 subdivisiones} = 0,15mm/subdivisión \cdot (2)$$

Esto significa que cada subdivisión nominal del la Retículo Ocular vale 0,15 mm vista con un lente objetivo de 40X. Nota: Para convertir el valor de milímetros (mm) a micrómetros (µm) realizar el siguiente cálculo:

$$\frac{0,3mm}{2 subdivisiones} \left( \frac{1000 \mu m}{1 mm} \right) = 150 \mu m / subdivisión \cdot (3)$$

Una vez determinado el factor de calibración podemos **medir longitudes** en nuestra muestra. Para ello:



- a) Retirar el micrómetro y enfocar el objeto a medir.
- b) Contar el número de intervalos del retículo que corresponden al tramo que se desea medir.
- c) Multiplicar el número de intervalos por el valor de calibración.

El resultado es la longitud absoluta del tramo medido, en mm (micrómetros).

$$L = \text{número de subdivisiones} \times VR_{Sub}$$



## PARTE B DEL TRABAJO PRÁCTICO

**4. Calibre la magnificación del sistema lente objetivo/ocular usando el micrómetro objeto y el retículo ocular correspondiente al microscopio empleado. Determine cuántos micrómetros hay por unidad del retículo a diferentes magnificaciones.**

a) 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  $\mu$ m  
Precisión  $\pm$  1  $\mu$ m

b) 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

**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.**

**6. Determine el diámetro promedio y la desviación estándar para las células epiteliales de la mucosa bucal y para sus núcleos (n= 10). Calcule la resolución teórica del microscopio.**

**7. ¿Por qué es necesario calibrar la magnificación?**

## PARTE C: MICROSCOPIA 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.

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. En una segunda etapa se observará la localización y distribución de distintas moléculas biológicas componentes de estructuras celulares (actina, tubulina, etc).

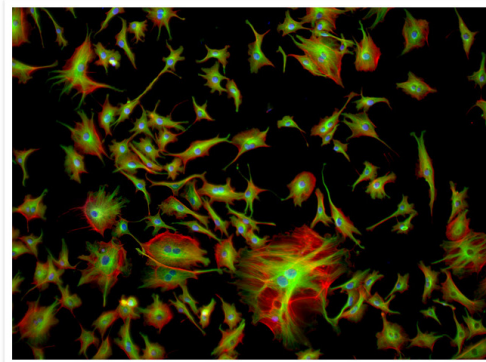
## PARTE C: MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA

**Muestra biológica:** componentes del citoesqueleto y núcleo, marcados con distintas sondas fluorescentes, de células endoteliales de arteria pulmonar bovina

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

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

*Núcleo:* marcado con DAPI (azul)



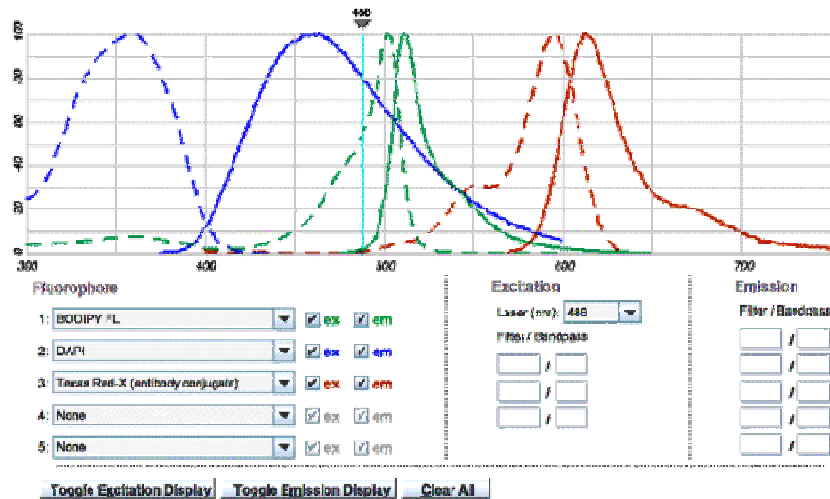
8. Identificar las partes y familiarizarse con el funcionamiento del microscopio de fluorescencia.
9. Proponga la configuración de los cubos (filtro de excitación, espejo dicroico y filtro de emisión) de acuerdo a cada fluoróforo presente en la muestra. Compare la misma con los cubos que se utilizará en el TP.
10. Observe la muestra en los diferentes canales, identifique los componentes celulares marcados, su localización y distribución. Adquiera una imagen de cada canal.
11. Discuta los resultados obtenidos.



**Fluorescence SpectraViewer**

Now you can plot and compare spectra and check for spectral compatibility for many fluorophores offered by Molecular Probes. The Spectra Viewer can conveniently be printed by capturing a screen-shot and printing the resulting image file. For printing instructions or to answer other questions you have, see our [User Guide](#).

Print Screen



**Legend**

- █ Absorption and fluorescence spectra of BOOPY-FIT (protein stain, succinimide ester method).
- █ Absorption and fluorescence spectra of DAPI (DNA stain).
- █ Fluorescence excitation spectra of Texas Red-X (antibody conjugate).

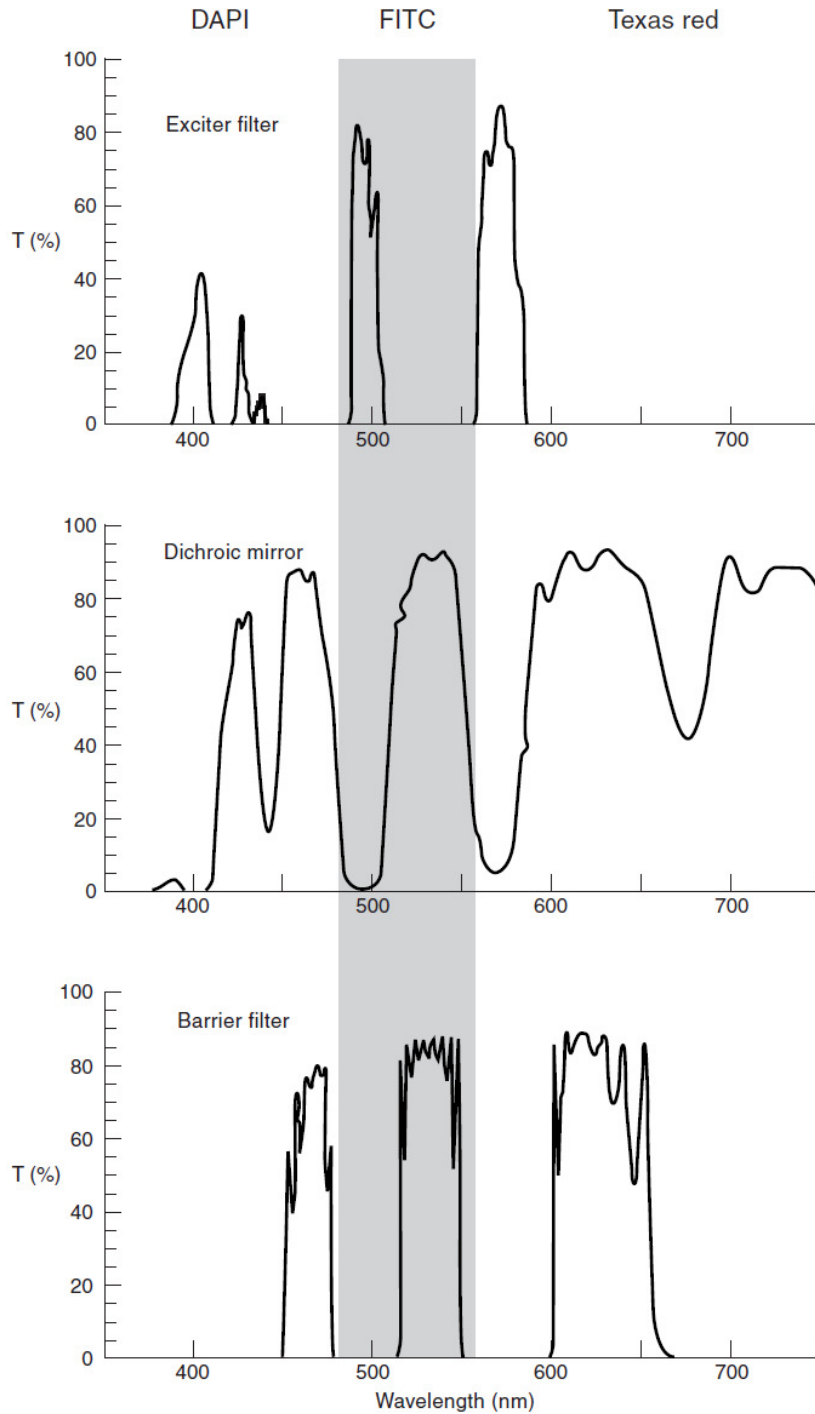
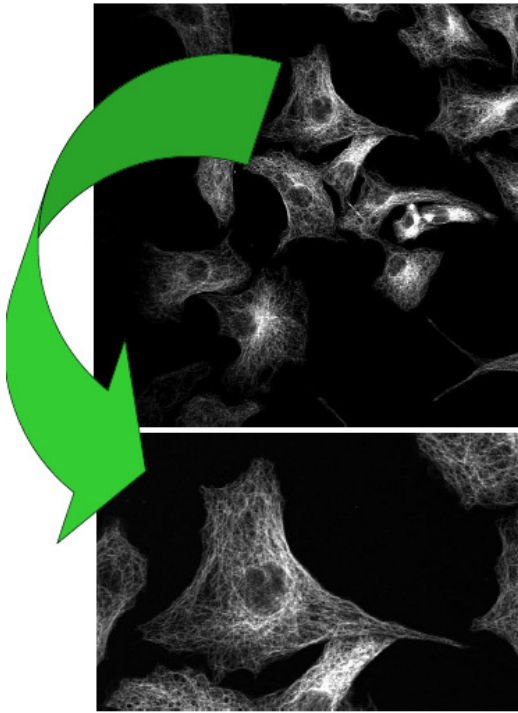


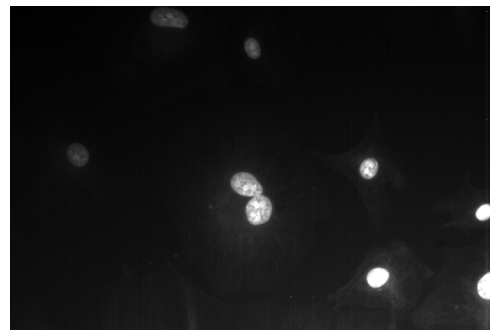
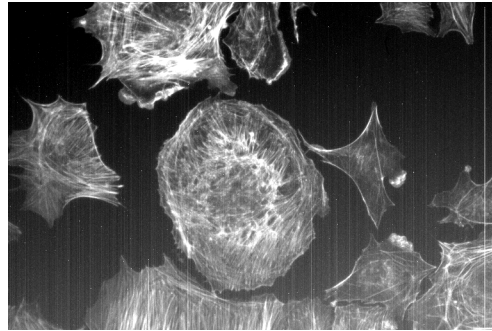
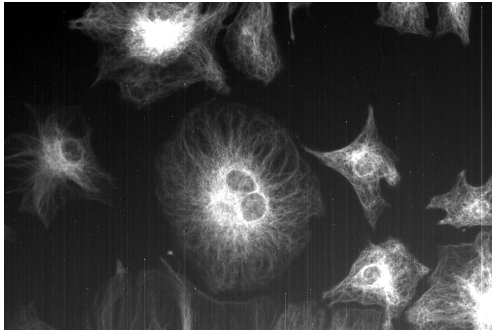
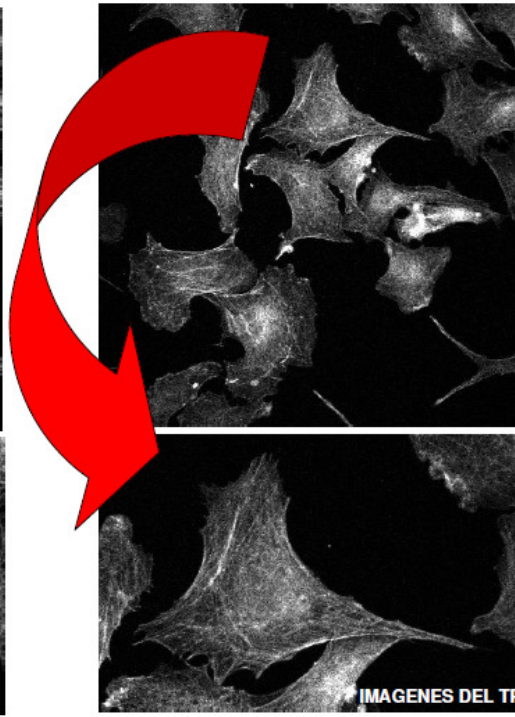
Figure 11-9

Transmission profiles of a triple-band filter set for DAPI, FITC, and Texas red. Each of the three filters contains multiple bandwidths that transmit or reflect three distinct bands of wavelengths simultaneously. The eye or camera sees a multicolor image based on the three dyes. Profiles of the exciter filter (top panel), dichroic filter (middle panel), and emission filter (bottom panel) are shown. The broad vertical band across the drawing distinguishes the spectral regions of the filters for FITC from those for DAPI and Texas red.

$\alpha$ -tubulina-BODIPY-FLUORESCINA



actina-TEXAS-RED



DAPI

**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>