



1.1.1.3. Microscopia de Barrido Confocal

1.1.1.3.1. Historia



En 1957 Marvin Minsky padre de la inteligencia artificial estudiando el sistema nervioso pensó que si el pudiera verlo en sus diferentes niveles podría entender como funcionaban los circuitos neuronales, entonces fue así como desarrolló esta técnica llamada por el "microscopio de barrido por etapas, de doble enfoque" (1).

Marvin Minsky en los años cincuenta construyó y patentó un microscopio de barrido por etapas de doble enfoque que permitía observar con claridad capas sucesivas de una muestra sin tener que rebanar el espécimen en finos cortes. Treinta años después su método es llamado *microscopia de barrido confocal*, proceso de microscopia óptica más notable en nuestro siglo (1).

El microscopio de barrido confocal combina el microscopio de fluorescencia con imagen electrónica y puntos de luz suministrados por láser dirigido al espécimen en particular para obtener imágenes tridimensionales (2).

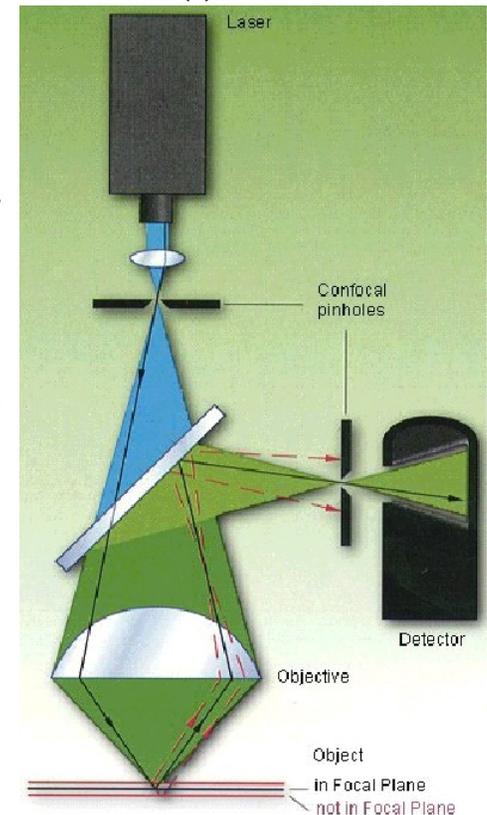
En los microscopios ópticos cuando el objetivo enfoca luz tomada de planos por encima y por debajo de la superficie que se observa, la imagen se hace rápidamente borrosa, entonces, Minsky pensó que lo ideal sería recoger la luz reflejada del plano de interés solamente, pero sin embargo los tejidos ubicados por encima y por debajo de ese plano también refleja luz mostrando imágenes borrosas. La dispersión disminuye el contraste y se produce cuando la luz incide sobre las partículas y estas la reflejan a otras partículas adyacentes hasta alcanzar la superficie detectora.

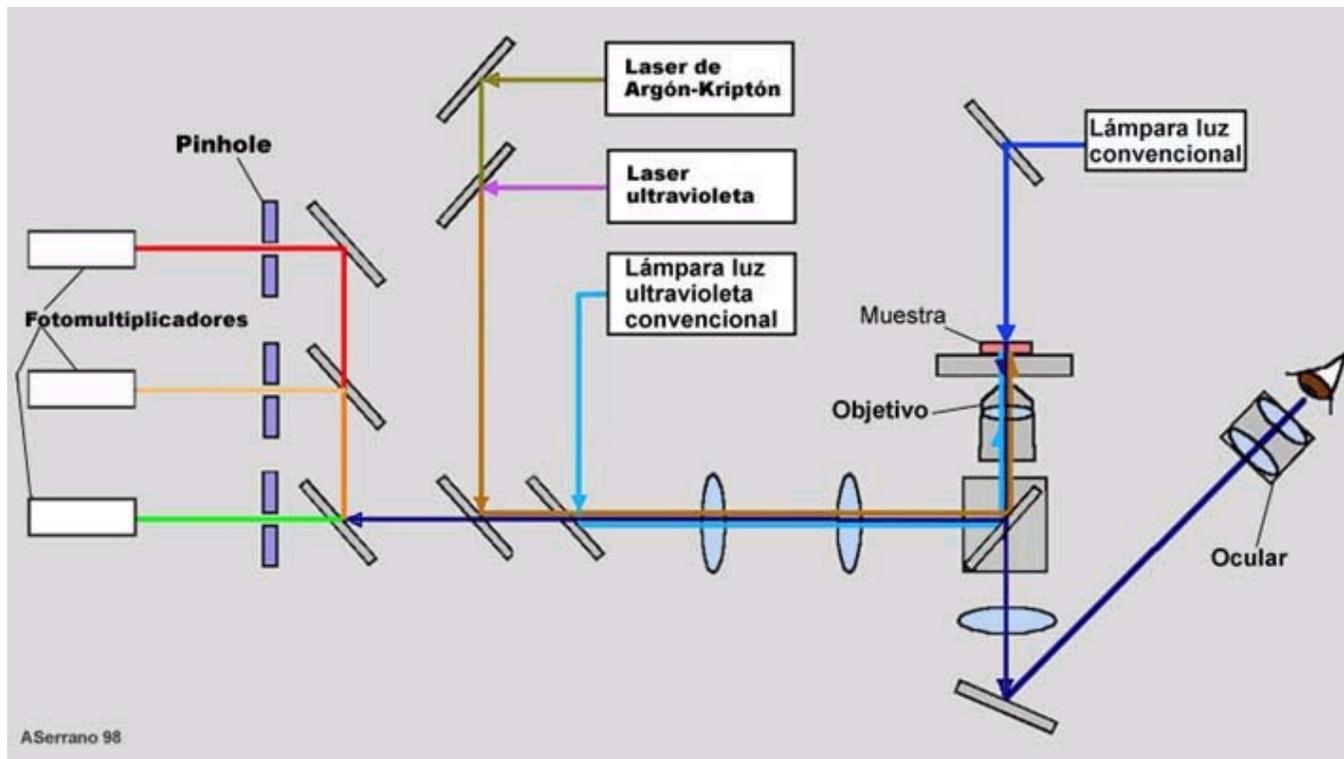
Entonces Minsky hizo pasar la luz de iluminación a través de un objetivo pinhole, que enfoca los rayos garantizando un punto de luz nítido e intenso sobre una porción mínima de la muestra a la profundidad deseada, así garantizaba que esa zona sería la más intensamente iluminada y en consecuencia la que más luz reflejaba.

Sin embargo de esta manera no garantizaba que la luz devuelta por los tejidos que estaban por encima y por debajo del punto que él quería observar no llegaran a la superficie del detector. Entonces realizó un segundo ajuste, impidiendo también que la luz que el tejido encima y debajo del plano focal reflejaba alcanzara la superficie receptora, por medio de una máscara con una apertura pequeña, de modo que solo la luz de regreso reflejada por el plano focal pasara a través de el orificio hasta la superficie detectora (1).

1.1.1.3.2. Componentes

En la figura se observa el microscopio confocal con sus componentes fundamentales.





1.1.1.3.2.1. Fuente luminosa.

Luz amplificada por emisión estimulada de radiación, Láser (*Light amplification by stimulated emission of radiation*).

1.1.1.3.2.2 . Espejo dichroico.

Refleja totalmente la luz que incide con un ángulo de cerca de 45°. El termino dichroico proviene de dicróismo del griego dichromatismós y es la propiedad de presentar de manera alternativa dos coloraciones según la dirección de los rayos de luz incidentes.

1.1.1.3.2.3. Ranura detectora Pinhole.

Esta ranura sólo permite el paso de la luz reflejada por el plano focal.

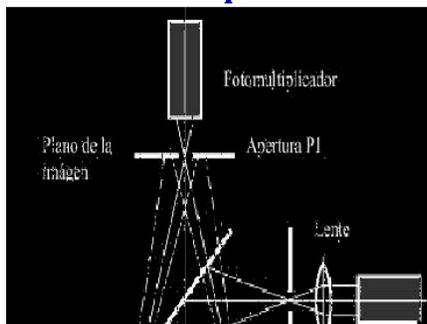
1.1.1.3.2.4. Lente objetivo.

Permite enfocar el rayo de luz reflejado por el espejo dichroico hacia el plano focal de la muestra.

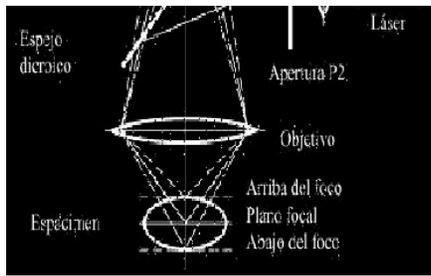
1.1.1.3.2.5. Detector.

Recibe el haz de luz y genera una imagen.

1.1.1.3.3. Principios de Funcionamiento.



Debido a que la cantidad de luz incidente sobre la muestra es tan pequeña, es necesario usar fuentes poderosas. La fuente de luz es un rayo láser que se hace pasar a través del pinhole, este haz de luz pasa a través del espejo, como se observa en la figura 1, posteriormente el haz pasa a través del lente objetivo el cual lo enfoca sobre la muestra. La luz emitida por la muestra es recibida por el lente objetivo y reflejada por el espejo dichroico que refleja totalmente la luz que llega en un ángulo de 45°. Esta luz pasa a través de la apertura pinhole que no permite el paso de la fluorescencia originada por los planos fuera de foco. Entonces sólo la luz del plano focal llega al detector. Inicialmente este tipo de técnica permitía observar claramente un sólo punto por lo cual era necesario hacer un barrido de la muestra, que requería un mayor tiempo para obtener una imagen completa. Para acelerar la velocidad de obtención de la imagen algunos microscopios desplazan el haz por medios de espejos oscilantes, que obligan a que la luz que incide en ellos fluya rápidamente a través de la muestra (5,6). Estos espejos permiten construir la imagen en menos de 1



segundo. Otros sistemas usan rendijas que aceleran el proceso barriendo líneas en lugar de puntos. Actualmente estos microscopios se complementan con el procesamiento digital de imágenes dando como resultado la construcción tridimensional de las muestras (1).

1.1.1.3.4. Preparación de la Muestra.

La preparación de las muestras varía según los procedimientos y las estructuras que se deseen visualizar. Por ejemplo: Células HeLa se tienen en medio de cultivo y son fijadas con glutaraldehído y PBS (solución buffer de fosfatos) y MgSO₄. Luego son lavadas con PBS y tratadas con boro hídrico, Triton X-100 en PBS. Se colocan luego los anticuerpos monoclonales de antitubulina y FITC y finalmente son montadas en glicerol, para ser observadas al microscopio confocal observando imágenes nítidas y detalladas de los microtubulos. Los huevos de *Psammehinus miliaris* fertilizados son colocados en glicerol al 40% y son colocados en laminas cubiertas con poli-L-lisina, luego fijadas con metanol y tratadas con anticuerpos antitubulina que diferencia los centros mitoticos periféricos. Las células de una línea celular de plasmacitoma son fijadas al 3.5% de formaldehído permeabilizado con saponina y tratado con anticuerpos purificados contra endoplasmina. Las glándulas salivares de *Drosopila*; se realiza disección de la larva y se colocan en buffer A y cromomicina A3 que es un fluorocromo específico del DNA así se observa el núcleo. Los embriones de nematodos se colocan en láminas recubiertas con poli-L-lisina congeladas en hielo seco, fijados con metanol y luego tratados con anticuerpos antitubulina y FITC (6). Depende de los procedimientos y las estructuras que se deseen visualizar (4). Sin embargo, la preparación de las muestras es igual a la utilizada para microscopía de fluorescencia convencional y/o citometría de flujo, en cuanto a los métodos de fijación y la tinción o marcaje. Es importante tener en cuenta algunos aspectos (6).

1.1.1.3.4.1. Fijación.

Cuando es necesaria se deben respetar los lugares de reconocimiento del anticuerpo y minimizar la presencia de artefactos. En general no son adecuados los fijadores como el glutaraldehído, porque exageran la autofluorescencia de la muestra, y son adecuados el paraformaldehído (4% en solución salina isotónica) y metanol o acetona fríos (-20°C).

1.1.1.3.4.2. Secciones Histológicas.

El grosor depende de la distancia de trabajo propia de cada objetivo, de la penetrabilidad del anticuerpo o de los fluorocromos empleados en la tinción y de las propiedades de transparencia de los tejidos que conforman la muestra.

1.1.1.3.4.3. Atenuación de la fluorescencia.

Se debe limitar el tiempo de observación, puesto que los radicales libres que se producen durante el tiempo de excitación de los fluorocromos dañan las células y los tejidos no fijados.

1.1.1.3.4.4. Conservación de las muestras.

Deben ser protegidas de la luz, analizadas rápidamente y almacenadas en frío.

1.1.1.3.5. Utilidades



Este tipo de técnica sirve para estudiar la estructura de materiales biológicos, siendo muy útil en investigación biomédica. Permite monitorizar los movimientos de las moléculas dentro de las células. Por ejemplo el movimiento del Calcio. Permite además localizar anticuerpos para estudios de inmunocitoquímica con mayor resolución que la microscopía convencional, realizar hibridación histoquímica in situ de alta resolución con procedimientos no isotópicos para localizar la posición de las secuencias de los ácidos nucleicos en las células. Una de las grandes cualidades es que permite la visualización en tres dimensiones incluyendo el interior y permite registrar procesos de secreción en células vivas con marcadores como el FM1-43 (/).

Con el uso de software y posterior al procesamiento de la imagen permite realizar colecciones de secuencias seriadas, reconstrucciones en 3D, medidas de colocalización de marcadores, imágenes laterales del objeto, superposición de imágenes obtenidas por diferentes técnicas.

1.1.1.3.6. Precauciones

Es necesario tener en cuenta todas las normas de bioseguridad existentes para el manejo de materiales y sustancias en el laboratorio.

Además es necesario garantizar un medio de trabajo seguro, es decir, que el piso sea el adecuado y este adecuadamente aseado, que los materiales de trabajo se encuentren en orden y adecuadamente marcados, contar con todos los elementos de protección personal necesarios para el laboratorio (guantes, tapabocas, gorro, bata). Adicionalmente es importante que las personas que trabajan en el laboratorio tengan

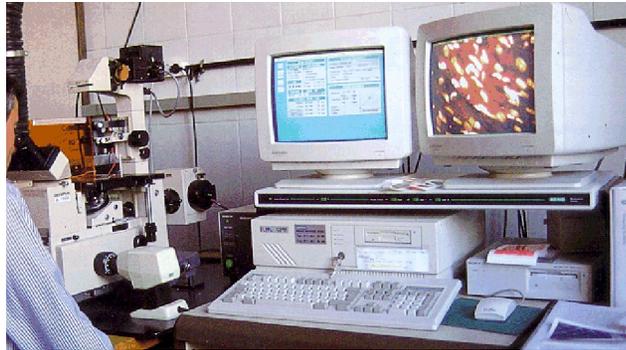
consciencia de los riesgos a los que están expuestos, con el fin de evitar al máximo las conductas inadecuadas que puedan predisponer a la presentación de accidentes.

Es primordial que cada quien conozca las practicas y las técnicas de manipulación, es decir, que cada quien sepa con exactitud que va a hacer al interior del laboratorio.

1.1.1.3.7. Ventajas

Permite realizar seccionamientos ópticos, es decir que para observar los tejidos en sus diferentes niveles no es necesario dañar el tejido con seccionamientos reales. Permite una alta claridad en las imágenes, por lo cual existe la posibilidad de tener un alto grado de diferenciación. Adicionalmente permite la visualización de uno o más tintes de marcaje. Permite realizar cortes ópticos en los diferentes planos pudiendo reconstruir de esta manera imágenes en tercera dimensión (3).

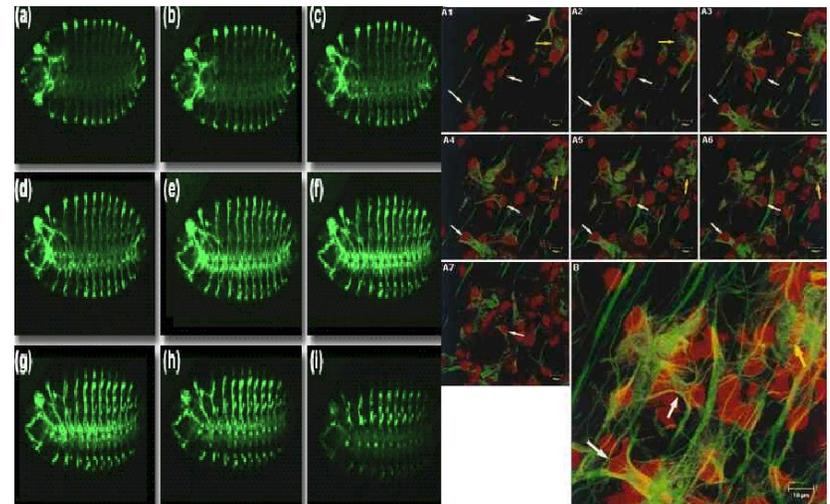
Brinda una alta calidad en tercera dimensión permitiendo realizar perfiles de superficie, medir profundidades y definir parámetros volumétricos.



Este microscopio consigue elevada resolución por tres procesos fundamentales: Primero se enfoca la luz mediante un lente objetivo, creando un haz biconico cuyo vértice o foco ilumina una zona de la muestra a la profundidad deseada. Luego la luz reflejada por esta área es enfocada y concentrada en un punto, permitiéndole que pase en su totalidad a través de una abertura confocal que es captada por un dispositivo detector como una video cámara. Por último la luz es trasladada de una zona a otra hasta explorar el plano por completo (1,2,3). Este barrido se obtiene por reflexión del haz luminosos en un espejo oscilante situado entre el espejo dicronico y las lentes del objetivo de tal forma que el punto luminoso y el diafragma confocal del detector permanezcan en registro (3). Se utilizan microscopios con un rayo de luz en X-axis con un espejo de Polygon y en el Y-axis un espejo de galvanometer-driven, con un ion láser de argón que opera a 488 nm para lograr excitar la fuente luminosa.

El microscopio óptico convencional nos da imágenes degradadas y borrosas por la información que queda fuera del foco de las zonas de la muestra situadas encima y debajo del plano focal. El microscopio confocal, gracias a que utiliza los métodos electrónicos anteriormente enunciados permite enfocar un plano escogido de una muestra fina, eliminando la luz que proviene de las zonas fuera de foco superiores o inferiores a este plano (3). Además se obtienen imágenes detalladas de secciones del interior de una estructura intacta.

El microscopio confocal posee un sistema de lentes (NA 1.3) que pueden ser de forma circular con una resolución de 1/1.4 o anular con una resolución de 1/1.75 (4), obteniendo series de secciones ópticas a diferentes profundidades del espécimen archivadas en un ordenador para reconstruir la imagen tridimensional (5).



Literatura citada

1. Lichtman J. 1994. Investigación y Ciencia. La ciencia de la luz. Microscopía confocal. 29:36-41
2. Cooper, G. 1997. The cell. London. Oxford University. p. 23-24.
3. Albert, B. Biología molecular y celular. Como se estudian las células. pg. 154-157.
4. Slayter, E. 1992. Light and electron microscopy. M. University Press. pg. 280-284
5. Wilson, T. 1984. Theory and practice of Scanning Optical Microscopy. Academic Press INC (London) pg. 50, 123-124.
6. White, J., Amos, W. and Forham, M. 1987. An evaluation of confocal versus conventional imaging of biological structures by fluorescence light microscopy. J. Cell Biol. 105(1): 41-48.

http://country.cnb.uam.es/Photonic_sp/review/confocal.htm

<http://www.fisio.buap.mx/online/confocal/confocal.htm>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

<http://www.fisio.buap.mx/online/confocal/confocal.htm>

[Página anterior](#)