

1. TIPOS DE MICROSCOPIA:

1.1 Microscopía óptica normal (de campo brillante coloreado): El material a observar se colorea con colorantes específicos que aumentan el contraste y revelan detalles que no aprecian de otra manera.

1.1.1 Microscopía de campo brillante: el material se observa sin coloración. La luz pasa directamente y se aprecian detalles que estén naturalmente coloreados.

El microscopio en campo oscuro utiliza una luz muy intensa en forma de un cono hueco concentrado sobre el espécimen. El campo de visión del objetivo se encuentra en la zona hueca del cono de luz y sólo recoge la luz que se refleja en el objeto. Por ello las porciones claras del espécimen aparecen como un fondo oscuro y los objetos minúsculos que se están analizando aparecen como una luz brillante sobre el fondo. Esta forma de iluminación se utiliza para analizar elementos biológicos transparentes y sin manchas, invisibles con iluminación normal.

1.1.2 Microscopía en contraste de fase: se usa principalmente para aumentar el contraste entre las partes claras y oscuras de las células sin colorear. Es ideal para especímenes delgados, o células aisladas. El microscopio de fase ilumina el espécimen con un cono hueco de luz, como en el microscopio en campo oscuro. Sin embargo en el microscopio de fase el cono de luz es más estrecho y entra en el campo de visión del objetivo, que contiene un dispositivo en forma de anillo que reduce la intensidad de la luz y provoca un cambio de fase de un cuarto de la longitud de onda. Este tipo de iluminación provoca variaciones minúsculas en el índice de refracción de un espécimen transparente, haciéndolo visible. Este tipo de microscopio es muy útil a la hora de examinar tejidos vivos, por lo que se utiliza con frecuencia en biología y medicina

1.1.3 Nomarski, microscopía diferencial de contraste de interferencia (DIC). Utiliza dos rayos de luz polarizada y las imágenes combinadas aparecen como si la célula estuviera proyectando sombras hacia un lado. Fue diseñado para observar relieves de especímenes muy difíciles de manejar, es muy utilizado en los tratamientos de fertilización in-vitro actuales. DIC se usa cuando el espécimen es muy grueso para usar contraste de fases

Transmitted Light Techniques in Live-Cell Imaging

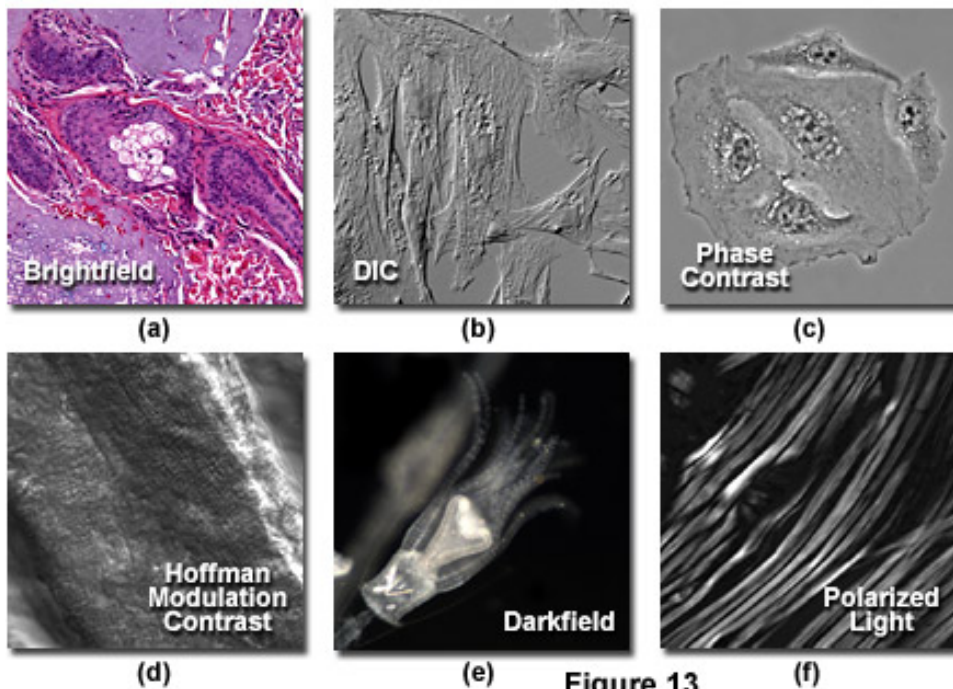


Figure 13

1.2 Microscopía de fluorescencia: una sustancia natural en las células o un colorante fluorescente aplicado al corte es estimulado por un haz de luz, emitiendo parte de la energía absorbida como rayas luminosas: esto se conoce como fluorescencia. La luz fluorescente de mayor longitud de onda se observa como si viniera directamente del colorante.

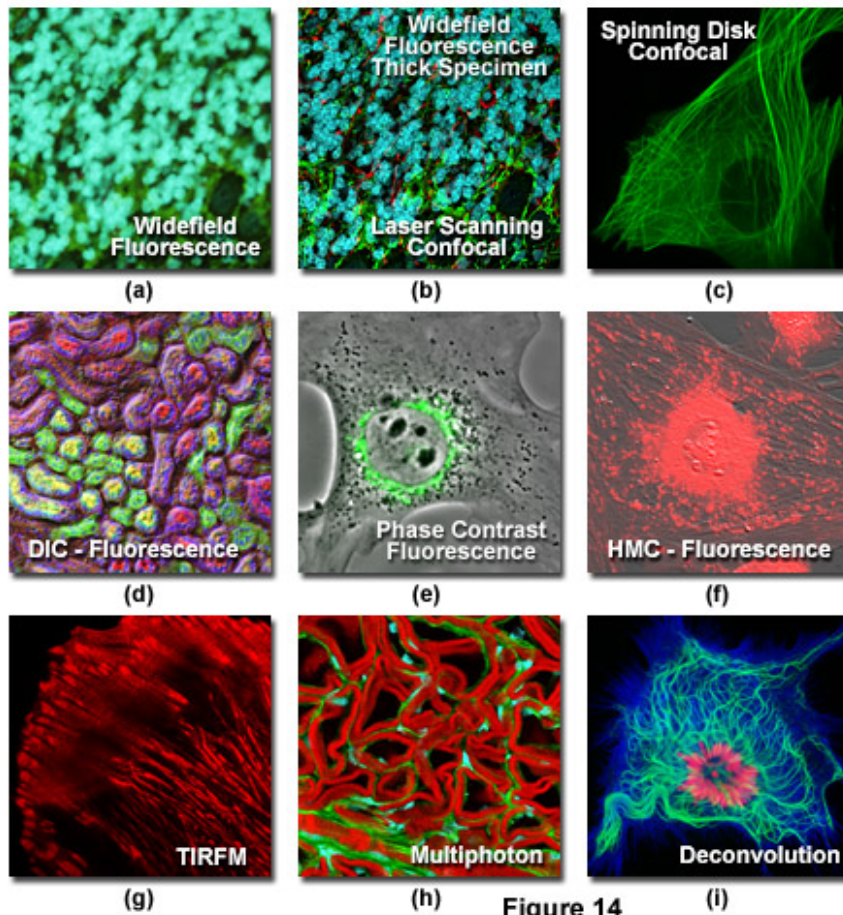
Microscopio de fluorescencia:

Microscopio que incorpora una lámpara especial, que actúa emitiendo una luz excitadora de los fluorocromos, con los que se tiñen las muestras a observar, y que posee además un filtro especial, que permite el paso de la luz emitida por el fluorocromo.

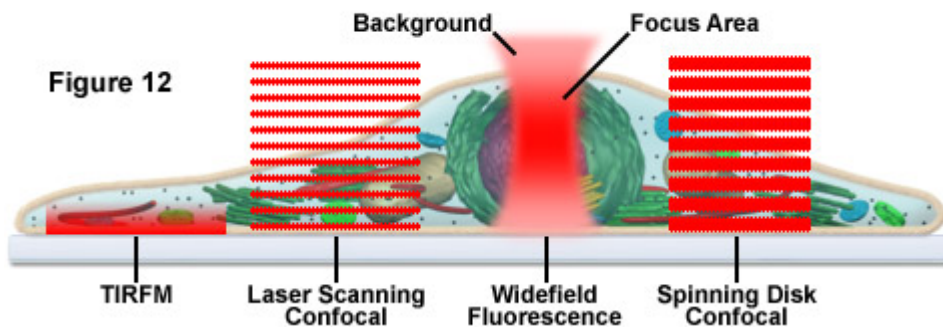
1.3 Un **microscopio confocal** es un microscopio capaz de obtener imágenes tridimensionales de la célula. Se basa en un principio similar al de un microscopio de fluorescencia, pero se utilizan dos diafragmas confocales (uno antes de la muestra y otro después) capaces de enfocar la iluminación en un único punto de la muestra. Se utiliza un láser como fuente luminosa, y con él se va barriendo la muestra por todo su volumen, plano a plano, creando muchas imágenes bidimensionales que un ordenador interpreta, generando finalmente una imagen tridimensional del objeto.

Para observar preparaciones con este microscopio es necesario teñirlas con sustancias fluorescentes o marcarlas con sustancias conjugadas con fluorocromos, como los anticuerpos.

Advanced Fluorescence Techniques in Live-Cell Imaging



Fluorescence Imaging Modes in Live-Cell Microscopy



1.2.2 Técnicas utilizadas en el confocal:

1.2.2.1 Marcajes con múltiples fluoróforos

Suele ser lo más utilizado. En este caso se detectan varios marcadores simultáneamente utilizando diferentes fluoróforos. Lo más importante es que dichos fluoróforos tengan unos perfiles de excitación y emisión lo menos solapantes posible y tener el juego de filtros de emisión adecuado que permitan separar perfectamente la emisión de los diferentes fluoróforos. Asimismo es necesario disponer de las líneas de láser necesarias para excitar óptimamente todos ellos.

Todo esto es debido a que el mayor problema que se encuentra en los marcajes múltiples es el del “bleedthrough”, del que ya se ha hablado previamente. Es fundamental estar seguro de que lo que se está observando en un canal procede de uno solo de los fluoróforos. Para ello la emisión de cada fluoróforo se distribuye a un fotomultiplicador independiente que dispone de unos filtros específicos para un determinado tipo de fluoróforos. Es importante adquirir de manera secuencial los diferentes canales, excitando individualmente los fluoróforos. De esta manera se consigue una mejor separación entre los mismos. Es recomendable en cualquier caso realizar los controles convencionales de autofluorescencia (observando las preparaciones en ausencia de anticuerpos) y de anticuerpos secundarios (observando las preparaciones incubadas sólo con los mismos) para reconocer las señales específicas. También conviene optimizar la dilución de los anticuerpos primarios y secundarios para evitar artefactos. En la figura 6 se muestra un ejemplo de marcaje triple.

1.2.2.2 Recuperación de la Fluorescencia Después del “P hotobleaching” (FRAP).

Consiste en destruir la fluorescencia en una muy pequeña región del campo de observación (ROI), aumentando mucho el “zoom” y haciéndole incidir una elevada intensidad de láser durante un largo período de tiempo. A continuación, se disminuye de nuevo el “zoom” y la intensidad de láser, recogiendo desde ese momento imágenes cada cierto tiempo (“timelapse”). De esta manera se puede visualizar la difusión del fluoróforo hacia la zona carente de fluorescencia, permitiendo estudiar la fluidez de membranas, el movimiento de moléculas en la célula, etc.

1.2.2.3 Transferencia de Energía de Resonancia Fluorescente (FRET).

Cuando dos fluoróforos se encuentran muy próximos (entre 10 y 100 Å) la energía de la emisión de uno de ellos (donador) puede ser transferida al segundo, siempre y cuando la longitud de onda de la emisión del donador coincida con la de excitación del aceptor. De manera que si ambos fluoróforos se encuentran lo suficientemente próximos, excitando al donador se podrá detectar la emisión del aceptor. Otra aproximación a esta técnica es estudiar la emisión del donador antes y después de destruir la fluorescencia

del aceptor (“photobleaching”). Si se está teniendo lugar FRET la emisión del donador disminuye puesto que la energía es transferida al aceptor. Si se destruye la capacidad de excitación del aceptor la emisión del donador aumentará. Por tanto, estas técnicas nos permiten en su conjunto el estudio de la interacción entre proteínas que lleven acoplados fluoróforos ya que sólo si interaccionan entre sí las proteínas los fluoróforos se encontrarán lo suficientemente próximos como para detectar FRET.

2. POSIBLES CAUSAS DE UNA MALA IMAGEN.

Podemos enumerar diferentes aspectos revisables para el diagnóstico de una mala imagen:

1. Verificar que la iluminación sea la correcta.
2. Verificar que las lentes del objetivo estén limpias.
3. Comprobar que entre el diafragma de campo y el de abertura, no haya ningún filtro difusor.
4. El centrado del revólver portaobjetivos debe ser el correcto.
5. El portaobjetos y el cubreobjetos deben estar limpios. Comprobar que el primero esté bien colocado, y que no haya dos cubreobjetos superpuestos.
6. Verificar la limpieza de todo el sistema óptico. Esto se puede efectuar haciendo girar por separado los oculares que el microscopio posea, comprobando si las pequeñas motas de suciedad se mueven. Si es así, es que hay que limpiar el ocular. Luego, habrá que hacer girar el tubo ocular en su conjunto; éste no debe ser desmontado nunca, pero sí se pueden limpiar cuidadosamente los prismas soplando sobre las superficies accesibles. El objetivo puede limpiarse desenroscándolo ligeramente y ayudándose de un pincel seco.
7. Comprobar que el aceite de inmersión sea el suficiente, sin burbujas ni impurezas, y que no sea fluorescente.
8. Asegurarse de que el objetivo está bien enroscado.
9. Verificar el grosor del cubreobjetos, portaobjetos y medio de montaje, que es decisivo, sobre todo en medianos y grandes aumentos. Es importante, igualmente, no colocar dos cubreobjetos superpuestos.
10. La montura del condensador debe estar bien centrada y la frontal bien sujeta, en el caso de que sea abatible. Comprobar que la cremallera esté bien apretada, para mantener la posición.
11. La intensidad lumínica no debe ser débil, ni excesiva. No hay que regularla nunca con el diafragma del condensador.
12. Tener cuidado de no utilizar objetivos de contraste de fases para observaciones de campo claro, sobre todo cuando trabajamos con grandes aumentos.
13. Si el microscopio tiene espejo, es necesario comprobar que la cara plana sea la que proyecte el haz luminoso sobre el diafragma del condensador.
14. Utilizar una combinación correcta entre el ocular y el objetivo, pues puede ocurrir que el ocular sea demasiado potente.
15. Comprobar que la preparación esté bien hecha, comparándola con una preparación test.
16. En contraste de fases, es común el error en el centrado del anillo de iluminación. Aunque éste puede descentrarse debido a la geometría de las estructuras.
17. En observaciones con fluorescencia, las fluorescencias parásitas que se pueden descubrir pueden ser debidas a: el medio de montaje, al aceite de inmersión, una óptica inadecuada, el uso de un filtro incapaz de cortar los rayos de excitación.

18. Si el medio de montaje tiene un índice de refracción muy similar al del objeto incoloro, éste no podrá verse, ni con contraste de fases, ni con contraste interferencial.
19. Si se observa una neblina solamente en los bordes del campo, se deberá a una mala corrección de esfericidad del campo por parte del sistema óptico.
20. La oscuridad del campo puede darse por el incorrecto centrado del sistema de iluminación. Por eso, deberá revisarse: la posición del espejo, la altura del condensador, la posición del diafragma, que puede estar demasiado cerrado o descentrado, sobre todo en monturas que permiten la iluminación oblicua.
21. Si se produce un desplazamiento de la imagen cuando varía el enfoque, el problema se debe a un defecto del microscopio, que puede afectar al juego del mando micrométrico, o a una iluminación oblicua. Esto se soluciona rectificando la posición del espejo, obteniéndose así una iluminación correcta.
22. Si se observa que la iluminación no es homogénea, su causa puede ser el propio aparato (fallo de centrado, polvo o manchas sobre el espejo o sobre las lentes del condensador) o a agentes exteriores (barras de ventanas u objetos interpuestos en la trayectoria de los rayos lumínicos).

Una vez obtenida la imagen...

3. PROCESOS DE LAS IMÁGENES:

IMAGEN REAL



IMAGEN DIGITAL

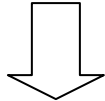
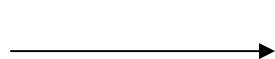


IMAGEN TRANSFORMADA

MANIPULACION DEL HISTOGRAMA

Operaciones aritméticas en una imagen
Operaciones aritméticas entre dos imágenes.



PROCESO {
CORRECCION
REALCE
RESTAURACION



Operaciones punto a punto. Son aplicaciones que afectan a todo el histograma (una cte.) que hace que no sea destructiva pero al final de varias constantes si afectan a la imagen final.

4. PROGRAMAS UTILIZADOS HABITUALMENTE:

- Imaje J (Gratis)
- Adobe Photoshop
- Hyugens (Deconvolución)
- Imarys (imagen tridimensional)

Cualquier otro que nos valga para lo que deseamos, siempre que no deterioremos la imagen y por su puesto, no engañemos nuestros resultados.