

SEBBM DIVULGACIÓN

LA CIENCIA AL ALCANCE DE LA MANO



Uso de la fluorescencia y la microscopía confocal en la investigación científica

Mª Dolores Morales García

Servicio Interdepartamental de Investigación de la Universidad Autónoma de Madrid (SIdI-UAM)

Biografía

Dª Mª Dolores Morales García es licenciada en Ciencias Biológicas - especialidad de Bioquímica y Biología Molecular- (2001) por la Universidad Autónoma de Madrid. Concluye los cursos de doctorado y obtiene el Diploma de Estudios Avanzados (2003) dentro del programa de Biología Molecular en el Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (CSIC-UAM). En este centro colabora como becaria de investigación en el trabajo "Función de las células epidérmicas larvarias en el desarrollo de la epidermis abdominal de *Drosophila melanogaster*" del laboratorio de Genética del Desarrollo, liderado por el Dr. Antonio García-Bellido, donde desarrolla una amplia variedad de técnicas de biología molecular. En 2004 obtiene el título de técnico especialista avanzado en Microscopía Confocal y asume el cargo de responsable del laboratorio de Microscopía Confocal en el Servicio Interdepartamental de Investigación (SIdI-UAM), un servicio técnico que da soporte a numerosos grupos de investigación.

<http://www.sebbm.es/>

HEMEROTECA:

http://www.sebbm.es/ES/divulgacion-ciencia-para-todos_10/la-ciencia-al-alcance-de-la-mano-articulos-de-divulgacion_29

SEBBM
SEBBM

Sociedad Española
de Bioquímica y
Biología Molecular

Resumen

El uso de la Microscopía Confocal en la investigación científica supone un gran apoyo ya que posibilita un estudio tridimensional de las muestras, incluyendo su interior, y permitiendo, en determinados materiales, la obtención de imágenes de su superficie mediante reflexión de la luz.

Summary

The use of Confocal Microscopy in scientific research is a great support to perform the three-dimensional study of the samples, including its interior, and enabling, in certain materials, to visualize the surface by means of light reflection.

La característica principal de la microscopía confocal es que recoge y detecta la luz emitida por moléculas fluorescentes situadas en un mismo plano del espacio tridimensional. Esto es posible porque, por una parte, la fuente de iluminación utilizada es láser: radiación colimada en la que el haz se mantiene perfectamente lineal al propagarse. Esta luz monocroma ilumina las muestras de forma específica con una intensidad muy elevada y estable. Esta disposición permite conseguir resoluciones microscópicas subcelulares. Por otra parte, en los microscopios confocales existe una pieza llamada "diafragma de detección confocal" o "pinhole", que consiste en un pequeño orificio en el filtro detector de la luz que impide el paso de

aquella procedente de los planos de la muestra que no están enfocados. Así, se obtiene sólo la información de la región enfocada, denominada "plano de imagen primario" o "plano focal", y se elimina el resto. Como resultado final se logran imágenes de mucha mejor calidad, pudiéndose realizar cortes virtuales de las muestras analizadas.

El funcionamiento de un microscopio confocal es similar al de uno de epifluorescencia, ya que ambos se basan en el fenómeno de la fluorescencia. Las diferencias entre ambos radican en que el segundo carece del "diafragma de detección confocal", y utiliza una lámpara de mercurio como fuente de iluminación. Una lámpara que tiene una potencia muy irregular, con diferentes picos de intensidad, que se podría definir como una combinación de diversas radiaciones monocromáticas. Por ello, proporciona imágenes de peor calidad, que muestran la información de todos los planos de la muestra, enfocados o no.

La microscopía confocal es una técnica bastante moderna, cuyo concepto fue patentado por Marvin L. Minsky en 1957. Su validez práctica no se demostró hasta 1968, cuando los primeros microscopios basados en esta técnica fueron desarrollados por Eggar y Petran. Aún así, hasta 1987 la comunidad científica no empezó a utilizarla de forma generalizada, coincidiendo con la fabricación del primer microscopio confocal comercial por parte de White y Amos. Hoy en día su utilización es prácticamente universal en el campo de la biología molecular y celular.

Para explicar cómo funcionan, tanto los microscopios de epifluorescencia como los confocales, empecemos por recordar varios términos básicos de óptica. Por ejemplo, cómo la energía del fotón (E) viene dada por la relación de Planck: $E = h \times \nu$, donde h es la constante de Planck y ν es la frecuencia de la onda asociada a dicho fotón. A su vez, la frecuencia se relaciona con la longitud de onda, λ , a través de la fórmula: $c = \lambda \times \nu$, donde c es la constante que indica la velocidad de la luz en el vacío. Por tanto, a mayor longitud de onda corresponde una menor frecuencia y, en consecuencia, una menor energía. El paso de luz blanca a través de un prisma produce su descomposición en las distintas radiaciones que componen esa zona del espectro de radiaciones electromagnéticas, apareciendo la gama de colores que componen el arco iris. Estos colores espectrales se clasifican precisamente por su λ , que va desde el violeta y añil, en el extremo inferior - con $\lambda \sim 400$ nm-, hasta el rojo lejano, en el extremo superior -sobre los 750 nm-. Entre estos dos extremos se encuentran el resto de los colores perceptibles por el ojo humano. Finalmente, y de forma un tanto simplificada, se puede definir la emisión de fluorescencia como aquel fenómeno por el que ciertas moléculas emiten luz tras haber absorbido previamente una radiación de menor λ . En este proceso se pierde siempre algo de energía y, por este motivo, la luz emitida es siempre de mayor longitud de onda que la absorbida. En el caso de la microscopía confocal, las moléculas fluorescentes (fluoróforos) que interesan son aquellas que emiten luz en la zona espectral del visible. Algunas sustancias como la clorofila, o algunos aceites y ceras, poseen una fluorescencia natural o intrínseca ("fluorescencia primaria"). Sin embargo, la mayoría de las moléculas y estructuras biológicas carecen de ella, por lo que para poder visualizarlas es necesario modificarlas específicamente. Esto se consigue utilizando unos colorantes llamados fluorocromos o fluoróforos extrínsecos

("fluorescencia secundaria"). Utilizando estos fluoróforos, se pueden observar simultáneamente distintas estructuras dentro de una misma muestra, si cada una de ellas está marcada con un fluorocromo diferente (Figura). Además, en este tipo de muestras se puede estudiar la colocalización (coincidencia) de los diferentes marcadores y, por ello, de moléculas variadas, en una región concreta de la célula o el tejido estudiados. Otra de las principales aplicaciones de la microscopía confocal es el estudio de muestras "in vivo" (como células y tejidos animales y vegetales, embriones de insectos, algas, etc.) a lo largo de una secuencia temporal. De esta forma se obtiene una película en la que se monitoriza el comportamiento de un sistema o estructura biológicos, a los que se les haya aplicado algún tratamiento, a lo largo del tiempo. Empleando esta técnica también se puede determinar si dos moléculas están interaccionando en una localización subcelular concreta, mediante una técnica denominada FRET (*Transferencia resonante de energía entre moléculas fluorescentes*), o si difunden de un compartimento subcelular a otro (como en la técnica denominada FRAP (*Recuperación de la fluorescencia después de photobleaching*)). Además, si el microscopio confocal está equipado con un sistema de detección espectral, también se puede calcular en qué lugar del espectro de la luz emiten los fluorocromos, y minimizar, o incluso eliminar, los problemas de cruce de señal entre distintos colorantes que presenten una emisión muy cercana en el espectro. Finalmente en algunos materiales opacos la microscopía confocal también permite la obtención de imágenes de su superficie mediante reflexión del láser contra el material. En este caso, lo que se detecta es la luz reflejada por la superficie, de idéntica longitud de onda a la de la radiación incidente. Como los ángulos de incidencia y reflexión no coinciden, se puede hacer la medida sin recurrir a la utilización de

marcadores fluorescentes extrínsecos.

Referencias

1. An evaluation of confocal versus conventional imaging of biological structures by fluorescence light microscopy. White JG, Amos WB, Fordham M. J Cell Biol. 1987 Jul;105(1):41-8.
2. Handbook of Biological Confocal Microscopy. Second Edition. James B. Pawley.
3. Red Española de Microscopía Óptica Avanzada (REMOA): <https://redmicroscopia.wikispaces.com/home>
4. Lo que debiera saberse sobre la microscopía de fluorescencia (Zeiss). Cuarta Edición. H. M. Holz.
5. Página web del Laboratorio de Microscopía Confocal (SIDI-UAM): <http://www.uam.es/investigacion/servicios/sidi/especifica/confocal.html>
6. Methods in Cell Biology. Volume 70. Cell Biological Applications of Confocal Microscopy. Second Edition. Brian Matsumoto.
7. Methods in Molecular Biology. Volume 122. Confocal Microscopy. Methods and Protocols. Stephen W. Paddock. Humana Press.

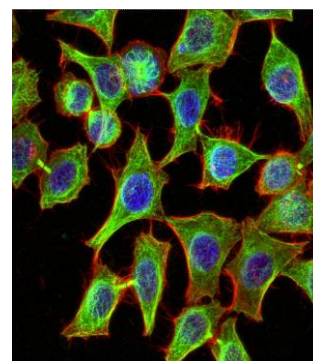


Figura. Células HeLa. Imagen cedida amablemente por el Dr. Francisco Sanz Rodríguez (Universidad Autónoma de Madrid), adquirida en un Microscopio Confocal Leica TCS SP2. Proyección en 3D de una serie de secciones adquiridas con el objetivo de 63x y una resolución de 1024x1024 píxeles, utilizando las siguientes líneas de láser: 488 nm (para el marcaje de citoesqueleto de actina, en verde), 561 nm (para visualizar la membrana plasmática, en rojo) y UV351-364 nm (para ver núcleos celulares, en azul).