



Memoria del XLIX Taller de Actualización Bioquímica, Facultad de Medicina; UNAM

Microscopio Confocal: consideraciones prácticas para adquirir imágenes de buena calidad.

Confocal microscopy: practical considerations to acquire a good quality images.

Poot-Hernández, Augusto César¹ y Rincón-Heredia, Ruth^{2*}

1. Unidad de Bioinformática y Manejo de la información. Instituto de Fisiología Celular, UNAM.
2. Unidad de Imagenología. Instituto de Fisiología Celular, UNAM.

* Correspondencia: Instituto de Fisiología Celular, Circuito Exterior s/n, Ciudad Universitaria, Coyoacán, CDMX, México. CP. 04510.
Tel: +52(55)56225610. rincon@ifc.unam.mx

Resumen

La microscopía confocal es una gran herramienta en el área biológica que desde la década de los 80's nos ha permitido conocer la interacción de estructuras celulares, así como su dinámica, ya que en un sistema confocal es posible captar a las células en movimiento (vivas). La física y la óptica detrás de la microscopía confocal se enseña con frecuencia en las aulas; sin embargo, el entendimiento de los aspectos físicos no va de la mano con el uso del microscopio confocal o con la adquisición de imágenes. Es necesario que además de entender los fenómenos físicos, se entiendan los parámetros programables en un microscopio confocal. De esa manera, estudiantes e investigadores podrán utilizar la microscopía confocal para resolver sus cuestionamientos biológicos con pleno conocimiento de las consideraciones necesarias para programar el equipo, sin caer en errores comunes a la hora de adquirir imágenes. En este trabajo presentamos algunas consideraciones de los parámetros ajustables en un microscopio confocal, necesarios para obtener una imagen de calidad.

Palabras claves: potencia láser, rango dinámico, ganancia maestra, resolución, velocidad.

Abstract

Confocal microscopy is a great tool in the biological area, since the 80's has allowed us to understand the interaction of cellular structures, as well as their dynamics, since in a confocal system it is possible to capture cells in movement (alive). The physics and the optics behind confocal microscopy are frequently taught in classrooms; however, the understanding of the physical aspects does not go hand in hand with the use of the confocal microscope or with the acquisition of the images. It is necessary that in addition to understanding the physical phenomena, the programmable parameters in a confocal microscope are understood. In this way, students and researchers will be able to use confocal microscopy to solve the biological questions with full knowledge of the necessary considerations, to program the equipment, without falling into common errors when acquiring images. In this work, we present some considerations of the adjustable parameters in a confocal microscope, necessary to obtain quality images.

Keywords: laser power, dynamic range, master gain, resolution, speed.

Introducción

La microscopía confocal es una idea que originalmente surgió en 1955 debido al gran interés de Marvin L. Minsky por comprender el funcionamiento del cerebro y más en particular de las redes neuronales, pero ello suponía un problema: para ver las conexiones neuronales tendría que ver un arreglo tridimensional del cerebro, lo cual resultaba imposible con las técnicas disponibles hasta el momento, ya que las técnicas de iluminación no le permitirían ver más que una maraña de fibras en el mejor de los casos. El Profesor Minsky comprendía que los problemas a los que se enfrentaba no eran debidos a la opacidad del tejido, sino a la dispersión de la luz. Rápidamente comprendió que, si lograba diseñar un sistema en el que se pudiera limitar el paso de la luz a una región o plano lo suficientemente delgado impidiendo que entrara la luz dispersa, se podría eliminar el problema. Ese concepto es lo que hoy conocemos como apertura confocal o “pinhole”. Sin embargo, aun introduciendo el pinhole a la salida de la fuente de iluminación, parte de la luz inicialmente enfocada será dispersada por los puntos desenfocados de la muestra hacia otros puntos en el plano de la imagen, estos rayos también pueden ser rechazados colocando un segundo pinhole en el plano de la imagen que se encuentra más allá de la salida de la luz del objetivo (antes del detector).

A pesar de que en aquella época no había disponibilidad de la tecnología láser, el arreglo de 2 aperturas confocales permitía generar una iluminación coherente utilizando una fuente de arco de zirconia. Empleando un fotomultiplicador de bajo ruido, se observó por primera vez una imagen confocal reconstruida en la pantalla de un visor de radar militar de larga persistencia, la imagen se pudo proyectar por alrededor de 10 segundos, que fue el tiempo que duró el barrido de la muestra (Figura 1).

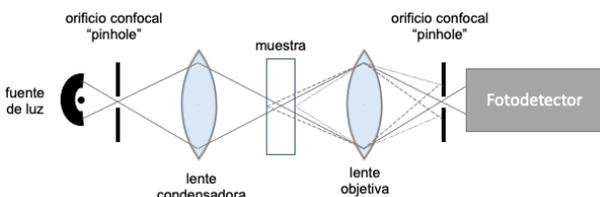


Figura 1. Diseño del microscopio confocal de Minsky. Se observan las dos aperturas confocales o pinhole; una delante de la fuente de luz y por debajo de la lente condensadora y otra delante de la lente del objetivo. Los dos pinholes y el punto iluminado en la muestra son confocales; cualquier otro plano en la muestra estaría mal iluminado y su emisión no pasaría a través del pinhole.

No obstante, de tener frente a sí una gran aportación científica, Minsky no realizó ninguna publicación respecto a su invención; de hecho, fue gracias a la insistencia de su cuñado, que Minsky decidió patentar su invención en 1961 (1–3). De hecho, ésta gran invención no tomó auge sino hasta su reinención y su posterior comercialización a finales de la década de los 80's. La mayoría de los investigadores están de acuerdo en que la microscopía confocal biológica se inició con el diseño confocal publicado por White y Amos en 1985 en el *Journal of Cell Biology*; pero más importante -y para los fines que a nosotros nos interesan- hasta que Amos y colaboradores (4), demostraron que la Microscopía Confocal de Barrido Láser ofrece diversas ventajas para los científicos del área biológica; la principal ventaja es que rechaza las señales de interferencia de las estructuras fuera de foco que tienen como consecuencia una pérdida en la calidad de la imagen. La microscopía confocal permite la obtención de imágenes con una calidad notable comparada con las imágenes de microscopía de epifluorescencia; siempre y cuando se comprendan los parámetros básicos y las consideraciones prácticas necesarias para obtener el resultado que se desea.

Generalidades de la microscopía de luz

En la microscopía óptica, la luz proveniente de la fuente de iluminación pasa a través de la muestra; esta luz se transmite de manera uniforme sobre el campo de visión del microscopio. Si el espécimen es más grueso que la profundidad de foco de la lente del objetivo, la luz proveniente de las estructuras por arriba y por debajo del plano enfocado, también serán observables. En la microscopía de fluorescencia, cualquier fluorocromo o marca fluorescente presente en la muestra y que estén por arriba o por debajo del plano focal, también serán estimulados, y esa luz fluorescente entrará al detector. Esta luz procedente de las estructuras desenfocadas se sumará a la luz procedente del plano enfocado y como resultado se observará una imagen desenfocada y dificultará la resolución de los detalles, especialmente cuando existan estructuras superpuestas.

El Microscopio Confocal de Barrido Láser

La microscopía confocal es una forma de microscopía óptica en la que la luz de iluminación y la óptica de recolección de la luz se enfocan en el mismo punto limitado por la difracción en la muestra. A diferencia del microscopio de epifluorescencia (campo amplio), el microscopio confocal ilumina solo un punto de la muestra, en lugar de todo el campo de visión de la lente del objetivo, en el detector. Para

generar una imagen completa, la muestra es iluminada punto por punto, de manera que las secciones de la muestra que no están en el punto focal contribuyen muy poco a la imagen enfocada. Lo que elimina de

manera efectiva el problema de la luz desenfocada (Figura 2) (5).

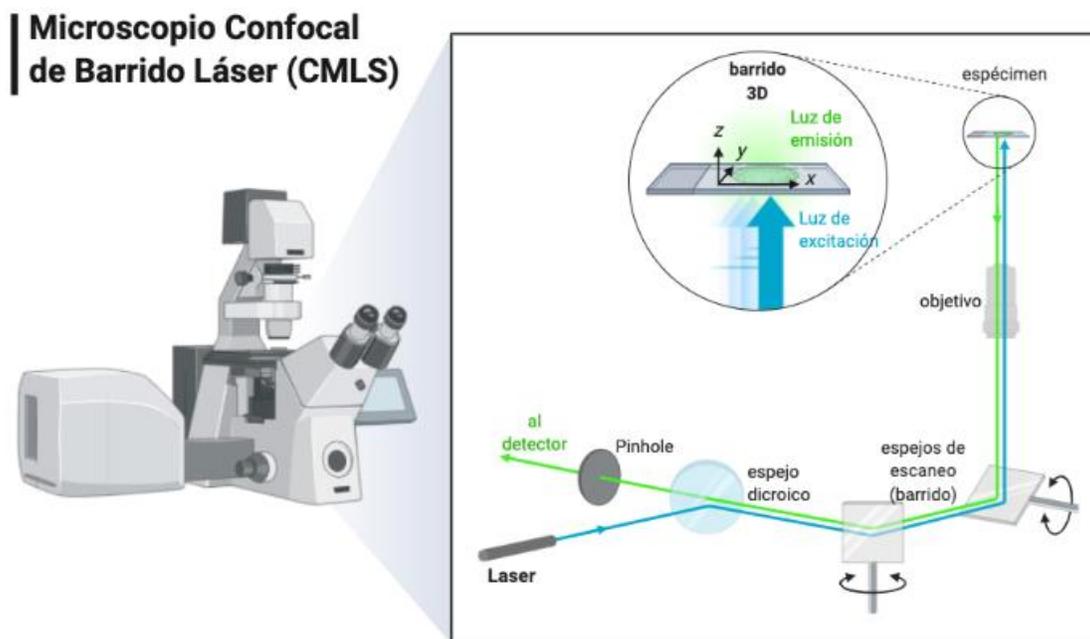


Figura 2. Microscopio confocal de barrido láser. La iluminación de una fuente de luz coherente (láser) es reflejada por un espejo dicróico y conducida a diferentes planos mediante los espejos de barrido a la abertura posterior del objetivo (trayectoria de la línea azul), hasta iluminar al espécimen. La lente del objetivo enfoca la luz en un punto de difracción limitada (un disco de Airy) dentro de la muestra. La fluorescencia (o reflexión) en el punto focal y dentro de los conos de iluminación por encima y por debajo del punto enfocado, se excitan y emiten fluorescencia en todas las direcciones (observe el círculo de aumento del espécimen). La fluorescencia capturada por el objetivo (trayectoria de la línea verde) pasa a través del espejo dicróico porque la fluorescencia tiene una longitud de onda más larga que la excitación. El orificio confocal "pinhole" permite que la fluorescencia del punto focal llegue al fotodetector y bloquea la fluorescencia de las áreas desenfocadas.

Descripción de la técnica

Más allá de la física y la precisión electrónica que hay detrás de la microscopía confocal, es necesario que entendamos los aspectos modificables que nos permiten generar una imagen confocal. Posiblemente uno de los aspectos más confusos al momento de utilizar el microscopio confocal es la selección y ajuste de los parámetros. Antes de adquirir una imagen en el microscopio confocal es fundamental saber para qué quiero esa imagen, es decir, qué pregunta biológica me ayudará a resolver. En ese sentido es importante cuestionarnos si la adquisición es parte de un experimento de colocación, será la imagen que se incluya en una publicación, si se requerirá realizar la cuantificación de la fluorescencia, o bien, si se trata de un ensayo de dinámica celular.

Si sabemos por qué queremos adquirir imágenes en el microscopio confocal, será más sencillo entender qué ajustes debemos realizar para obtener las imágenes que realmente requieren y también nos

ayudará a entender cuáles son los controles mínimos que se necesitan para probar sus hipótesis. Al trabajar con el microscopio confocal entendemos que, al modificar un parámetro para obtener una imagen, estaremos comprometiendo otra característica en la imagen (Figura 3).

El triángulo de los compromisos

En la figura 3 observamos los tres ejes sustantivos de una imagen confocal: 1) La relación señal/ruido o sensibilidad, que deseablemente debe ser alta. Esto quiere decir que la imagen que obtenga debe tener mucha señal y poco ruido. 2) La velocidad o rapidez con la que se adquiere la imagen y que tienen que ver con factores importantísimos como el tiempo de permanencia del píxel (el tiempo en el que el láser estará incidiendo en nuestra muestra punto por punto). 3) La resolución, que deberá ser el parámetro predilecto si se desean resolver estructuras muy pequeñas.



Figura 3. El triángulo equilátero de los compromisos en la microscopía confocal. Los pilares fundamentales de la microscopía confocal son la relación señal/ruido o sensibilidad, la resolución y la velocidad. Todos son igual de importantes, pero al elegir uno en particular se comprometen los otros dos. Lo anterior se ve multiplicado si se desean adquisiciones tridimensionales, en donde un pilar adicional será la profundidad de la muestra y por tanto de las secciones ópticas que se desean adquirir.

El problema es que “nada es gratis en la microscopía confocal” y al decidir que requiere captar una imagen/evento lo más rápido posible, entonces la resolución y/o la sensibilidad se verán comprometidas; si requiere resolver estructuras muy pequeñas o delgadas entonces la velocidad se verá comprometida. Estas decisiones se deben de tomar desde que se está planeando el experimento y no al momento de adquirir las imágenes, ya que de otro modo sus adquisiciones podrían no ser comparables entre sí.

A continuación, iremos desarrollando cada uno de los componentes de un microscopio confocal, responsable de algún parámetro programable en el equipo, de esa manera podrá tener las herramientas necesarias para decidir qué parámetros son importantes para su muestra y cómo obtener la mejor imagen confocal para resolver sus cuestionamientos biológicos.

Componentes de programación modificable en el microscopio confocal

1. El pinhole u orificio confocal

La función principal del pinhole es bloquear la luz proveniente de los campos fuera de foco para que ésta no llegue al detector. Si el pinhole es pequeño (<1 AU), la luz desenfocada que se encuentra por encima

o por debajo del plano enfocado es bloqueada por el pinhole (figura 4b). Si el diámetro del pinhole aumenta, entonces la luz que está por arriba y por debajo del plano enfocado entrará al detector. Si abrimos el pinhole a su valor máximo, el microscopio confocal puede producir imágenes similares a las que se obtienen con un microscopio de epifluorescencia de campo amplio, es decir, perdemos la confocalidad (Figura 4c) (6).

Al acudir al microscopio confocal es común que primero se realice la observación de la muestra en epifluorescencia para elegir la zona de interés; sin embargo, al pasar la imagen al modo confocal ocasionalmente ocurre que no alcanzamos a distinguir ninguna señal y de inmediato nos preguntamos si es necesario aumentar la potencia del láser, o bien, aumentar el voltaje del detector. No obstante, antes de tomar esa decisión debemos realizar un ajuste del enfoque para verificar si en realidad estamos en el punto más brillante de la muestra. Si a pesar de ajustar el plano de enfoque continuamos sin observar señal alguna, podemos abrir el pinhole para encontrar dicha señal y posteriormente cerrarlo nuevamente para continuar realizando los ajustes necesarios al microscopio.

Para lograr la mejor resolución, es ideal utilizar un diámetro de pinhole de 1 Unidad de Airy al adquirir imágenes. Cuando se tienen muestras con demasiada señal, es posible reducir el diámetro del pinhole a valores menores de 1AU y con ello ganaremos una mejor resolución; sin embargo, es una condición poco común en muestras biológicas.

2. Áreas de barrido: la relación entre píxeles y resolución

Los microscopios confocales adquieren imágenes digitales y en los equipos actuales podemos incluso variar la cantidad de píxeles y el área de escaneo o barrido que integrarán la imagen (7). En la figura 5, se observa que al adquirir una imagen con una matriz de píxeles de 512×512 , o bien, de 1024×1024 píxeles, el área de escaneo no cambia; aunque la resolución por píxel sí. Es decir, en ambos casos tendremos como resultado un área adquirida de $159.7 \times 159.7 \mu\text{m}$, pero la información contenida en la imagen estará generada por píxeles de $0.32 \mu\text{m}$ o $0.16 \mu\text{m}$ respectivamente.

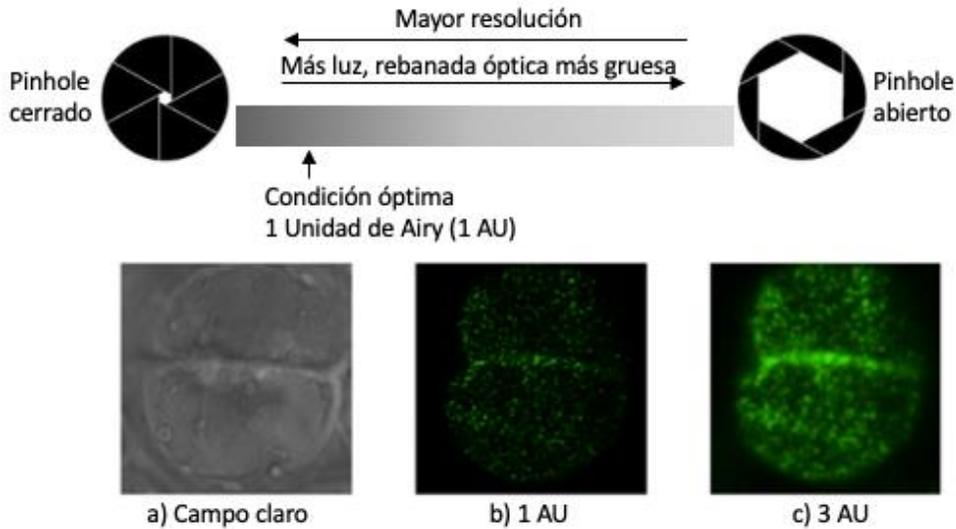


Figura 4. El aumento en el tamaño de la apertura confocal resulta en la pérdida de la confocalidad. Si se utiliza un pinhole de valores de diámetro pequeño tendremos mayor resolución; mientras que al abrir el pinhole entrará más luz de los planos fuera de foco, teniendo como resultado la observación de una rebanada óptica más gruesa. a) Imagen de campo claro del espécimen, luz transmitida. b) El diámetro óptimo del pinhole para obtener una imagen confocal es 1 Unidad de Airy (1 AU, por sus siglas en inglés). c) El valor de apertura máxima del pinhole es de 3 AU. Modificado de (6).

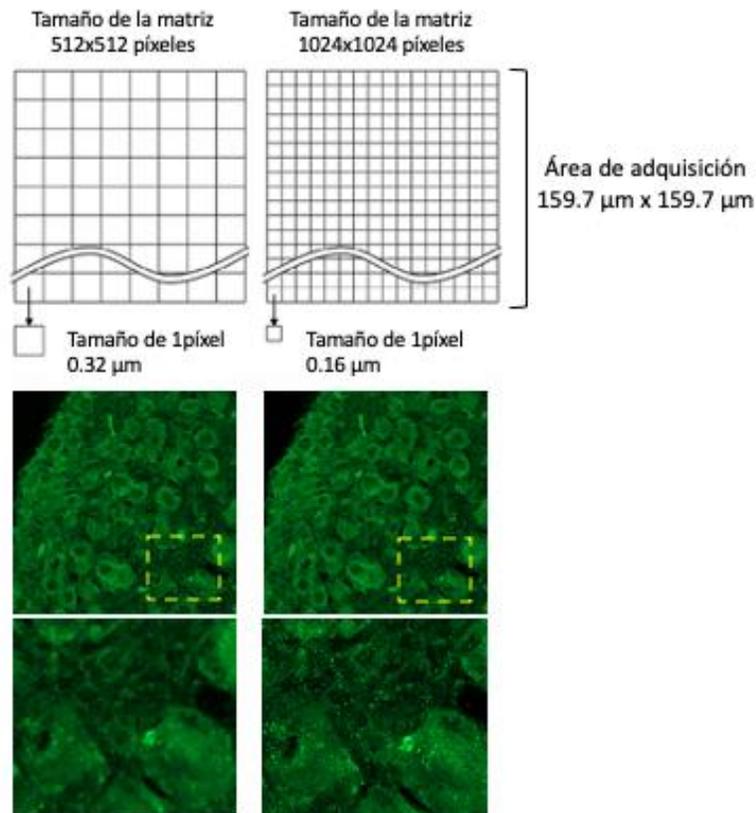


Figura 5. Se observan dos arreglos de matrices de píxeles, a pesar de ser de distintos tamaños de píxeles el área de adquisición es la misma, es decir, la imagen obtenida no cambiará. Sin embargo, sí habrá cambios en la resolución digital debidos al tamaño de píxel contenido en cada uno de los arreglos. Las imágenes observadas comprenden a la misma región de un ovario, en donde se realizó una inmunofluorescencia contra el receptor a IP3. La adquisición de la imagen se llevó a cabo con un objetivo 40x, se mantuvieron todos los parámetros iguales para ambas imágenes (izquierda y derecha), solo se modificó el tamaño de la matriz de píxeles.

Es importante que no confundamos la resolución digital de la imagen adquirida (matriz de píxeles) con la resolución óptica que nos proporciona el sistema confocal; la cual está dada por la apertura numérica (NA) del objetivo empleado y la longitud de onda del láser de excitación (Criterio de Resolución de Rayleigh) (8).

Ecuación 1. Criterio de Resolución lateral (x, y) de Rayleigh para un sistema de microscopía confocal:

$$R(x,y) = (0.4 * \lambda) / NA$$

Es un hecho que puede haber arreglos de matrices de píxeles diferentes a los mostrados en este texto; sin embargo, los utilizados de manera convencional son los que hemos discutido. Los valores en micras por píxel cuadrado pueden variar entre diferentes marcas de microscopios, pero la idea general se mantiene.

2.1 Velocidad de barrido y tiempo de permanencia del píxel

Cuando la luz incide sobre la muestra, se emiten fotones de fluorescencia y algunos entran en la lente del objetivo. Algunos de estos fotones pasan a través del pinhole y llegan al detector. En el camino de la luz láser de un confocal hay pequeños espejos que giran rápidamente mediante un motor galvanométrico, éstos

permiten que el punto de la luz láser se mueva a través de la muestra en el eje x, lo que da como resultado la iluminación de una línea de puntos en la muestra que emanan fotones, los cuales serán detectados. Si la luz detectada en el espejo galvanométrico que se mueve en dirección x se dirige a otro galvanómetro que gira en el ángulo y, tendremos como resultado una imagen bidimensional formada por muchos puntos individuales que forman una serie de líneas, que dan origen a una imagen.

El tiempo que el láser ilumina un punto de la muestra, se denomina tiempo de permanencia del píxel. Entre mayor sea el tiempo de permanencia de píxel, la luz del láser excitará a los fluoróforos y se detectarán más fotones emitidos dando una señal más brillante. En la figura 6 observamos claramente que, al aumentar el tiempo de permanencia de píxel, disminuyendo la velocidad de adquisición, se observa una imagen de mayor resolución.

La figura 6, nos permite recordar el triángulo de los compromisos de la microscopía confocal en donde al aumentar la velocidad, también aumentamos la señal de ruido. Lo anterior no es necesariamente una desventaja si se está consciente de que lo que desea ganar en la adquisición es tiempo; por ejemplo, en una adquisición o seguimiento *in vivo*, o bien, en la realización de un mapa o mosaico que contenga un arreglo de imágenes.

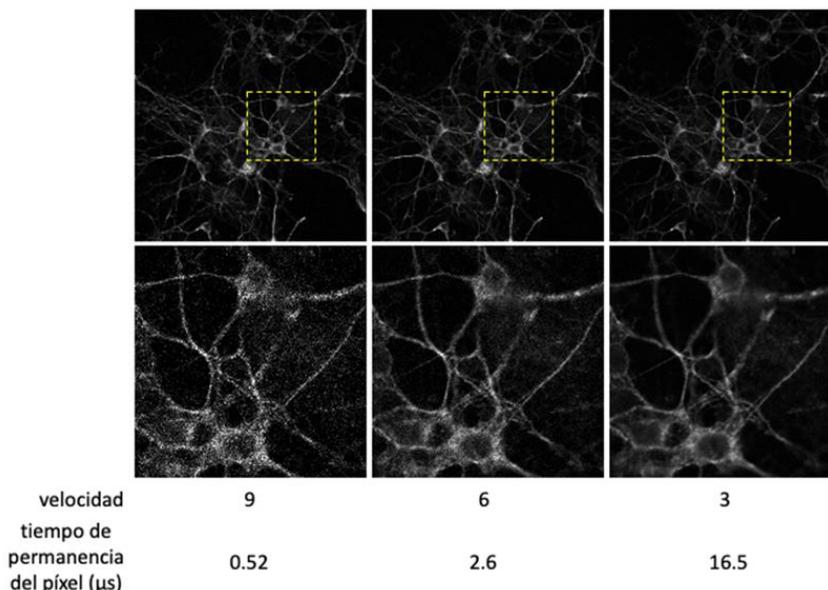


Figura 6. Velocidad de adquisición de la imagen en modo unidireccional. Observe que al disminuir la velocidad de escaneo (9, 6 y 3 unidades arbitrarias de velocidad), aumenta el tiempo de permanencia del píxel. Si multiplicamos estos tiempos por el número de píxeles de cada imagen obtendremos el tiempo total de adquisición. Para la velocidad de 9, el tiempo total de adquisición es de 3.8 segundos. En la velocidad 6 es de 15.19 segundos y en la velocidad 3 el tiempo total de la adquisición es de 1 minuto y 19 segundos (los valores de tiempo indicados en esta figura contemplan el tiempo de adquisición por cuadro, es decir, por una rebanada óptica).

Si se desea más velocidad en la adquisición, es posible cambiar al modo de adquisición bidireccional, en el que posterior a un ajuste de fase, se puede aprovechar el regreso del láser a la siguiente fila en x , para que en el retorno también realice el barrido de la muestra; sin embargo, esto no reduce el tiempo a la mitad como podría suponerse. De hecho, los valores

de tiempo de permanencia de píxel observados en la figura 7 no son diferentes de los que se presentan en la figura anterior. Lo que cambia es el tiempo total de la adquisición.

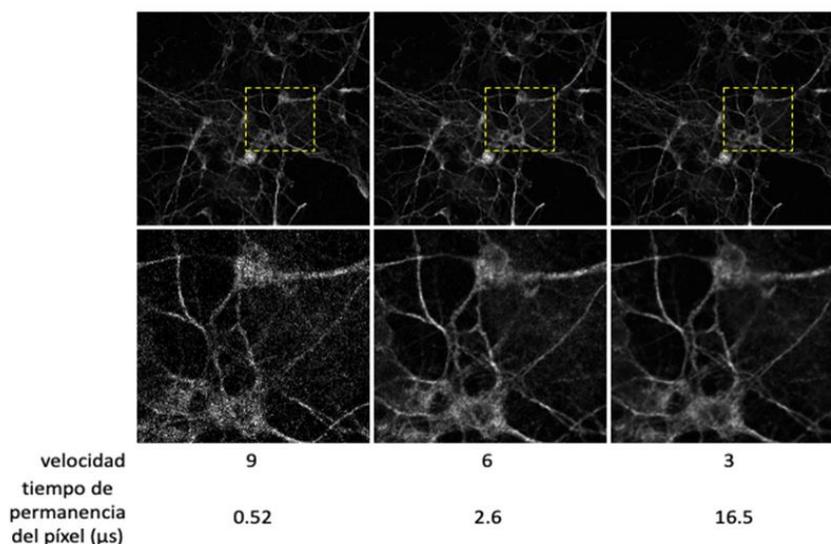


Figura 7. Velocidad de adquisición de la imagen en modo bidireccional. Uno de los modos de programación preferidos para ganar tiempo en la adquisición es el modo bidireccional, en el cual el barrido de la muestra se hace en ambos sentidos, de x_1 a x_{1024} y de x_{1024} a x_1 en cada plano y (contemplando el ejemplo de una matriz de 1024×1024 píxeles); sin embargo, la ganancia de tiempo no es la mitad con respecto a las imágenes adquiridas en el modo unidireccional, así para la velocidad de 9, el tiempo total de adquisición es de 2.53 segundos. En la velocidad 6 es de 10.13 segundos y en la velocidad 3 el tiempo total de la adquisición es de 1 minuto y 7 segundos. Lo anterior es debido a que no hay cambios en el tiempo de permanencia del píxel.

En la figura 8, observamos la reconstrucción de un ovario de ratón utilizando una matriz de 512×512 píxeles para cada uno de los cuadros que forman el mapa; dando como resultado una matriz final de 2560×3072 píxeles. Lo anterior supone un experimento que consume mucho tiempo de adquisición; el cual puede reducirse utilizando 1) un tiempo de permanencia de píxel mínimo y 2) al utilizar el modo de programación bidireccional.

dónde cada píxel proporciona su propio valor de intensidad dependiendo de la profundidad de bit que se utilice.

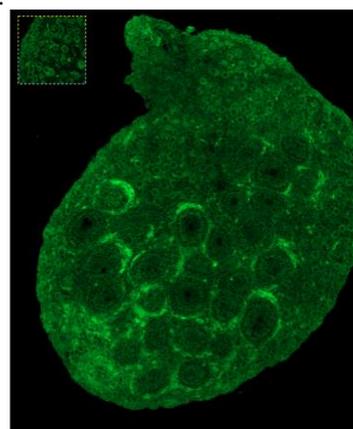


Figura 8. Mapa de un ovario de ratón, en verde se observa el receptor de IP3. El equipo se programó utilizando un arreglo de 5×6 imágenes en el modo bidireccional a una velocidad de 9. Observe el inserto de la parte superior de la imagen, el cual representa el tamaño de cada una de las imágenes que forman este mapa.

Parámetros de detección

1. Ajuste de la imagen y de los controles del detector

i) Rango Dinámico

Para adquirir las mejores imágenes de microscopía confocal es esencial capturar toda la información, es decir, tanto los valores más oscuros como los datos más brillantes. Lo anterior se ve representado generalmente en un histograma conformado por los datos punto por punto provenientes de la imagen; en

Es así que al programar imágenes de 8 bits obtendremos una posibilidad de 256 tonos grises. Recordemos que el lenguaje computacional es binario y que las posibilidades se encuentran entre el 0 y el 1. De esta forma, el sistema binario se ve representado por un 2, el cual se eleva a la octava potencia para tener el calculo de grises que estarán contenidos en nuestra imagen y que darán un valor específico a cada

píxel (2^8). Si la imagen que adquirimos es de 16 bits, entonces tendremos 65,536 tonos de gris en el rango dinámico de nuestra imagen (2^{16}).

El ajuste correcto de los valores de la ganancia maestra y el nivel de negros es fundamental para obtener un rango dinámico óptimo (Figura 9).

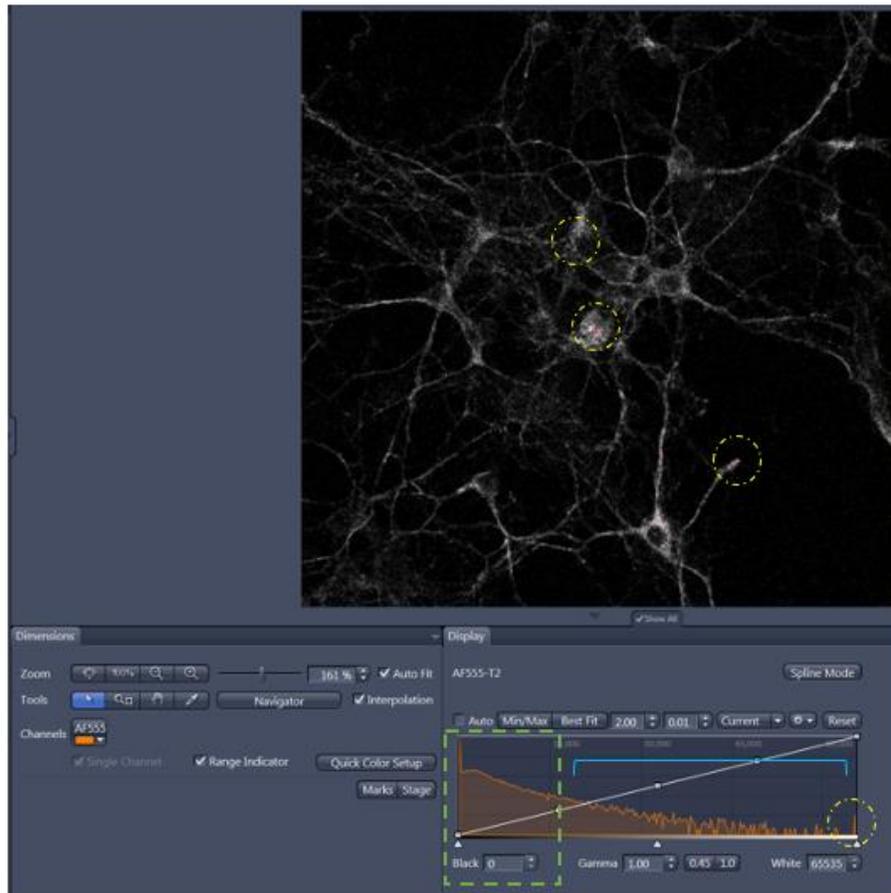


Figura 9. Rango dinámico. Para obtener una imagen confocal de buena calidad, es necesario capturar tanto los valores más oscuros (recuadro punteado verde), como los valores más brillantes (círculos punteados amarillos); ambos en la rebanada óptica más brillante de la muestra de interés. En el corchete azul observamos que los valores intermedios se encuentran formando una rampa, son esos valores de hecho los que nuestros ojos alcanzan a captar.

ii) Ganancia maestra

El microscopio confocal de barrido láser recolecta las señales de fluorescencia emitidas con un fotodetector. Los tubos fotomultiplicadores son los detectores más comunes en los microscopios confocales, utilizan un tubo fotomultiplicador (PMT) para captar los fotones emitidos que resultan del proceso de fluorescencia. Un PMT tiene un fotocátodo sensible a la luz que convierte a los fotones capturados en fotoelectrones, que luego se amplifican a través de una serie de dinodos (un arreglo de placas por medio

de las cuales chocan los fotoelectrones, al tiempo que se multiplican). Esto permite digitalizar la señal a través de un convertidor de un sistema analógico a uno digital y, por lo tanto, el software del sistema confocal puede adquirir la imagen como valores de escala de grises a la profundidad de bits programada.

Tradicionalmente los PMT tienen una eficiencia cuántica muy pobre de alrededor del 20%, sin embargo, son muy utilizados debido a la relación señal/ruido que guardan y a su alto rango dinámico (10).

La ganancia (ganancia maestra o alto voltaje HV), es una medida relativa de la amplificación que se aplica al sistema de detección de fotones. En general, los ajustes de ganancia más altos, dan como resultado

imágenes más brillantes ya que se observa una señal aumentada. No obstante, a medida que se aumenta la ganancia, el aumento del ruido se vuelve evidente en la imagen (Figura 10).

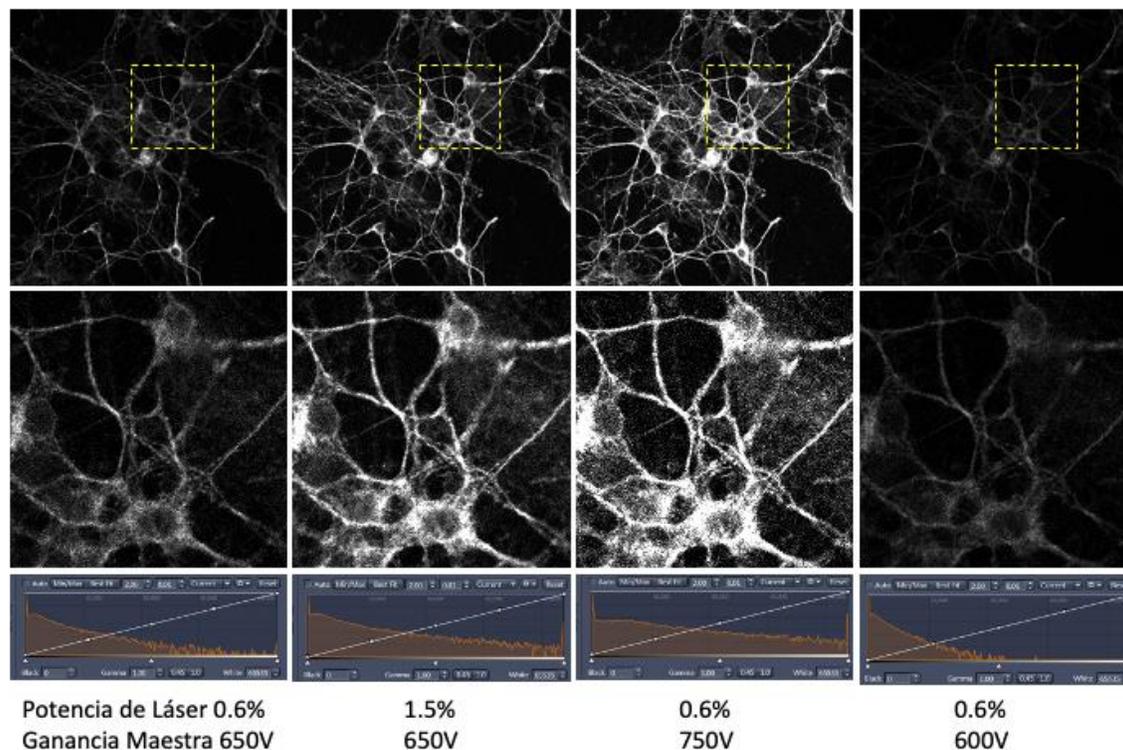


Figura 10. Ajustes de la imagen confocal con diversos parámetros de ganancia o de potencia del láser para utilizar el rango dinámico completo. Las imágenes de la parte superior muestran la adquisición completa, el recuadro amarillo con líneas punteadas, representa el sitio de donde se obtuvo el inserto de las imágenes del centro. En la parte inferior se observa el gráfico de utilización del rango dinámico, usando diferentes variables de programación del equipo. Las imágenes observadas corresponden a un cultivo de neuronas de corteza de ratón de 8 días *in vitro*, a las que se les realizó una inmunofluorescencia contra la proteína MAP-2, observadas con un objetivo 40x de inmersión en aceite.

En la figura 10 (columna 1), observamos una imagen confocal programada con una potencia de láser de 0.6% y una ganancia maestra de 650 voltios (V), aún cuando la imagen no es la más brillante en el panel completo, sí es la mejor programada ya que se observa que se utiliza el rango dinámico completo en donde hay muchos píxeles de valores oscuros, una rampa que muestra valores de grises y una espiga al final del histograma que representa pequeñas zonas de saturación que nos indica que estamos aprovechando toda la profundidad de bit. En el caso de las imágenes presentadas en esa figura, se trabajó con una profundidad de 16 bits, lo que significa que tenemos 65,536 valores de grises en esa imagen, en donde 0 es el negro absoluto y 65,534 representa el valor blanco (saturación), pasando por una gama de

grises contenida en los valores intermedios. En la tercera columna de la figura 10, se observa que, al

aumentar la ganancia maestra a 750 V, aumenta la saturación de la imagen lo que se traduce en más píxeles blancos y una mayor señal de ruido (a pesar de mantener el mismo valor de la potencia de láser).

Por otro lado, en la última columna observamos una imagen subóptima, en la que, al programar el equipo con una ganancia maestra de 600 V, se desaprovechan $\frac{2}{3}$ del rango dinámico, lo que nos da como resultado una imagen sin brillo, en la que las estructuras con valores más oscuros se pierden en la adquisición y por lo tanto también disminuye el ruido de la imagen.

iii) Compensación de desplazamiento (offset) o nivel de negro

La compensación en el nivel de negro de la imagen, conocida más comúnmente como offset es un

ajuste que se realiza en los amplificadores, con la que se puede realizar un desplazamiento positivo o negativo del histograma del rango dinámico. No está representado por ninguna unidad de medida, solo números positivos o negativos, al aumentar los valores a números positivos del histograma del rango dinámico, las imágenes se verán más brillantes; mientras que al reducir el desplazamiento las áreas de valores intermedios (grises), se vuelven oscuras. Es

importante saber que, al utilizar valores negativos, estamos perdiendo señal (Figura 11). Es muy común que al utilizar la microscopía confocal intentemos reducir el ruido de la imagen utilizando valores negativos de offset; sin embargo, esa es una de las prácticas más nocivas de la microscopía confocal y que deben evitarse a toda costa. Los valores permitidos para ajustar el nivel de negro son: -1, 0 y 1.

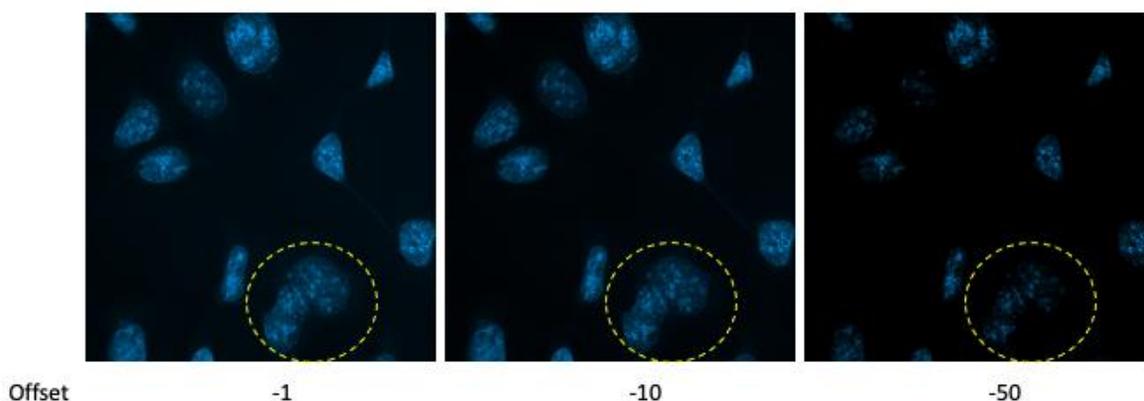


Figura 11. Ajuste en los niveles de negro en una imagen confocal. Al utilizar valores muy negativos en este parámetro perdemos información en la adquisición. Núcleos de la corteza cerebral de ratón teñidos con DAPI y adquiridos con un objetivo de inmersión en aceite de 40x. Se utilizaron valores negativos de offset: -1, -10 y -50. Los demás parámetros fueron mantenidos; porcentaje de láser 0.6%, ganancia maestra: 650 V.

2. Poder láser

Los sistemas confocales de barrido láser, utilizan emisión láser como fuente de luz colimada para generar un punto de excitación limitado por difracción en el plano focal de una muestra. Actualmente, aún encontramos láseres basados en gas; los más comunes son los de He/Ne, que generan líneas láser de 546 o 633 nm (una u otra), y los de gas Argón, que generan líneas láser de 488 y 514 nm. Los sistemas confocales más modernos han sustituido los láseres basados en gas por láseres de estado sólido y de diodo, debido a las ventajas que proporcionan, por ejemplo: menor emisión de calor y el hecho de que no necesitan refrigeración. Además, son de tamaños más compactos y tienen frecuencias de modulación estabilidad más rápidas. La mayoría de los Microscopios confocales están diseñados para realizar adquisiciones con múltiples fluoróforos, lo que se traduce en la necesidad de configurar los equipos con arreglos de varios láseres (5, 9).

Al estar frente al microscopio confocal un parámetro que llama mucho la atención es la potencia del láser. Frecuentemente consideramos que si nuestra imagen tiene poca intensidad “deberíamos” aumentar

la potencia del láser; sin embargo, esto no es necesariamente cierto, de hecho, una regla de oro en microscopía confocal es “utilizar la potencia de láser más baja para obtener una imagen aceptable”. Cuando no logramos obtener una imagen con un ajuste de rango dinámico adecuado y ya hemos modificado los demás parámetros en el microscopio, entonces podemos recurrir al aumento de la potencia del láser. Siempre debemos considerar que aumentar la potencia del láser tendrá varias consecuencias negativas para la muestra: la fototoxicidad y el fotoblanqueo.

No existe un valor ideal para utilizar el láser de un sistema confocal, de hecho, cada fabricante puede mostrarnos valores completamente diferentes dependiendo del punto de la ruta óptica en el que se mide esa potencia del láser. Lo que siempre debemos tomar en cuenta es que el uso de la potencia de láser más baja durante el menor tiempo posible preservará mejor la fluorescencia o la actividad biológica en su muestra. En la primera columna de la figura 10, observamos una imagen confocal en la que se utiliza un porcentaje de láser de 0.6%; mientras que en la columna 2 de la figura 10, notamos un aumento en la potencia del láser a 1.5% (un poco más del doble). Aunque ambos valores son muy bajos, observamos

que, al aumentar la potencia del láser, también aumenta el brillo de esta. Lo que tiene una consecuencia en la saturación de las estructuras, en las que pueden no resolverse las estructuras más finas.

3. Seccionamiento óptico o z-stack

Una ventaja del microscopio confocal es la capacidad de adquirir secciones ópticas y crear representaciones tridimensionales de una muestra (Figura 12) -esto nos recuerda la idea original de lo que Minsky quería resolver-, sin cortarla (o al menos no del todo).

Para generar imágenes tridimensionales en el confocal es necesario cambiar el foco de la muestra en

un volumen específico con una distancia conocida entre rebanadas ópticas (4). El grosor de una sección óptica está determinado por la apertura numérica del objetivo con el que se realice la adquisición y el diámetro del pinhole, así como de la longitud de onda de excitación. El diámetro del pinhole no es un valor constante aún cuando se utilice 1 AU, el diámetro en micras dependerá como ya se mencionó antes de la longitud de onda y la apertura numérica (11). Si queremos conservar la información en las tres dimensiones de la muestra, es necesario que las imágenes recopiladas sean las adecuadas en x , y , z (10, 12).

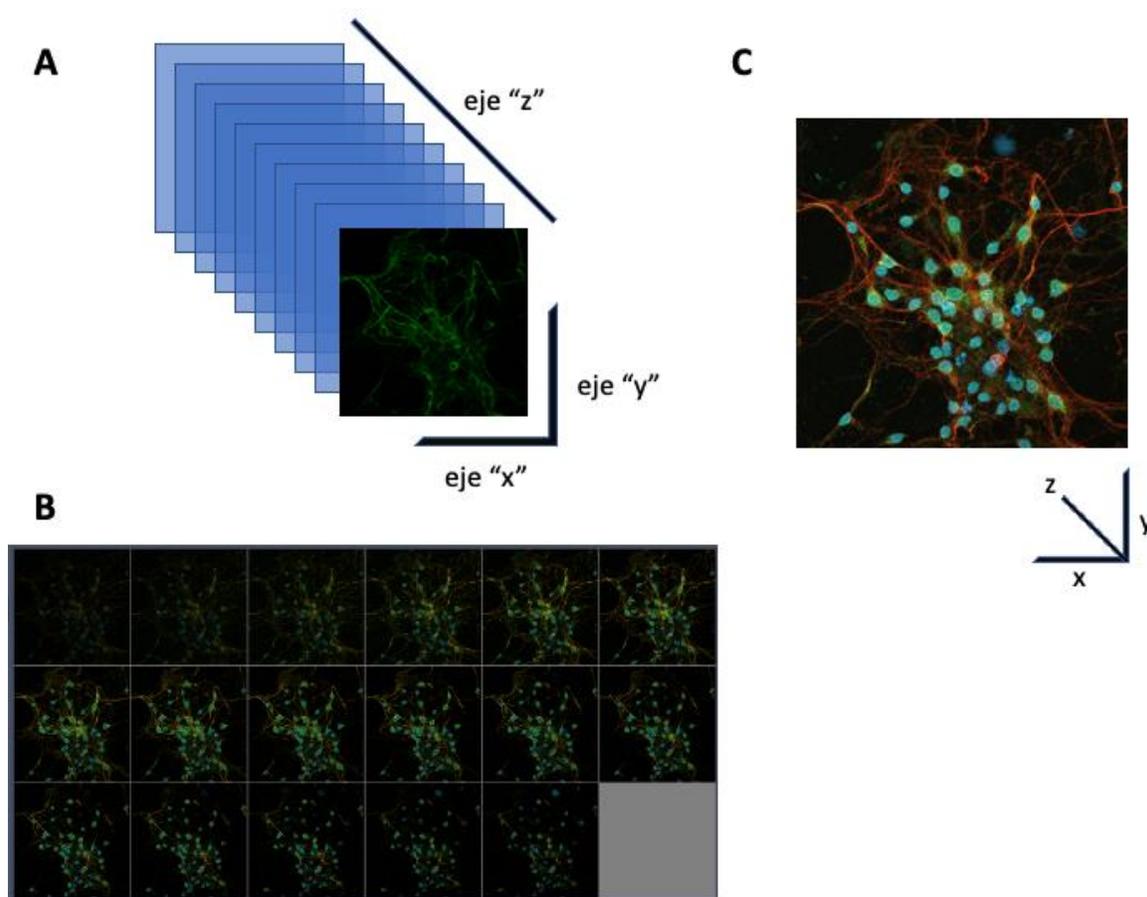


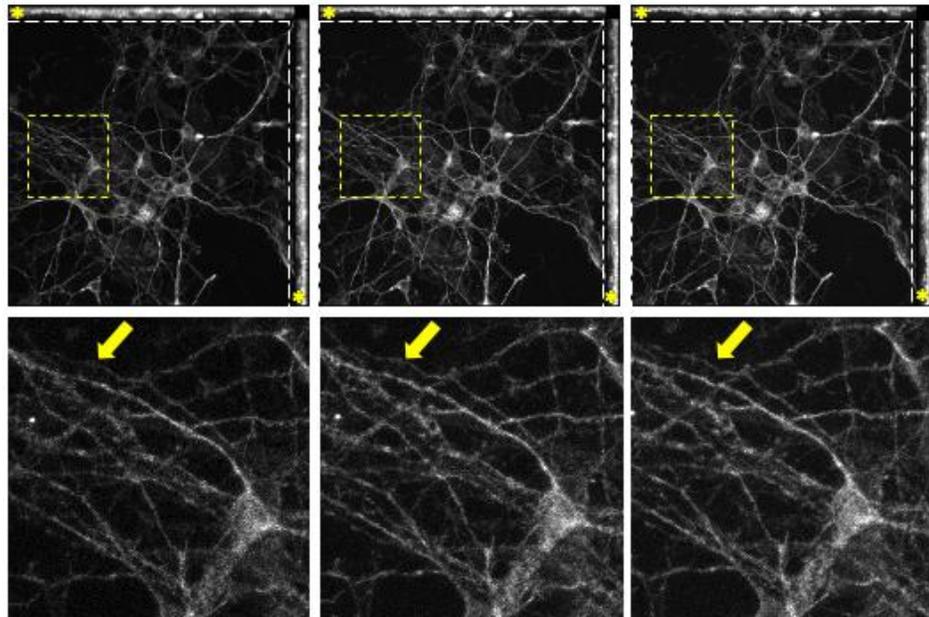
Figura 12. Seccionamiento óptico de una imagen adquirida en un microscopio confocal. En el panel A se observa una pila de imágenes adquiridas en los ejes x , y , z . Si acomodamos en orden creciente esas imágenes podemos observar la galería conformada por cada una de las rebanadas ópticas de la muestra (B). Si se realiza una proyección máxima de todas las secciones ópticas, es decir, si se apilan; se obtiene una imagen tridimensional que contiene la información de la pila (C).

En la figura 13, observamos las proyecciones máximas de 3 pilas de imágenes (z-stacks) con diferentes tamaños en el intervalo de seccionamiento óptico de las imágenes (en micras) y por lo tanto en el número de rebanadas ópticas obtenidas, al tratarse del

mismo volumen. Ello trae como consecuencia la pérdida de información, en aquellas imágenes en las que se realiza un submuestreo y la pérdida de la proporción tridimensional en el caso de las imágenes en las que se realiza el sobremuestreo, ya que no

ganaremos resolución lateral al realizar esta práctica nociva. Los sistemas confocales modernos están programados para sugerir el número de cortes ópticos,

óptimos para el objetivo y tamaño de matriz utilizado en una adquisición particular.



Rebanadas Ópticas (#)	7	13	28
Intervalos (μm)	1	0.5	0.26

Figura 13. Proyecciones máximas de un cultivo de neuronas en el que se realizaron rebanadas ópticas con submuestreo (columna 1), óptimas (columna 2) y sobremuestreo (columna 3). Los parámetros de láser, ganancia, offset y velocidad se mantuvieron constantes. Se utilizó un objetivo de inmersión en aceite de 40x.

Características generales para el procesamiento de una muestra biológica para su observación en el microscopio confocal.

Ya hemos discutido la ventaja de conocer los parámetros modificables en un microscopio confocal, además del tipo de imágenes con alto contraste que nos puede brindar al obtener rebanadas ópticas, lo que permite eliminar la luz fuera de foco. Sin embargo, el microscopio confocal no mejorará una muestra que haya sido mal procesada. Para adquirir una buena imagen, es necesario tener una buena muestra. Si bien la preparación de muestras requiere de conocer varios conceptos fisicoquímicos y biológicos. A continuación, mencionaremos algunos consejos mínimos a considerar al momento de preparar su muestra (Figura 14).

1. Perfusión y/o lavado. Al trabajar con tejidos animales o cultivos celulares, es necesario retirar el material biológico que no se desea preservar, como pueden ser las células sanguíneas, restos celulares, medio de cultivo, entre otros. Cuando realizamos la

fijación de la muestra sin lavar, estaremos sumando ruido innecesariamente (Figura 14-1).

2. Fijación. Hay muchos fijadores utilizables para el trabajo con muestras biológicas; sin embargo, es necesario saber las ventajas que nos ofrece cada uno. Es así como el fijador de elección para preservar una muestra biológica es el paraformaldehído (PFA) al 4%, aunque es bien sabido que puede traer como consecuencia negativa que el tejido autofluoresca. Lo anterior ocurre debido al tiempo que se deja la muestra en el fijador. Los tejidos deben fijarse y procesarse preferentemente en un tren continuo, ya que los aldehídos no son soluciones idóneas para almacenar muestras a lo largo del tiempo. Existen diferentes protocolos para el uso del PFA dependiendo del tipo de muestra a fijar, pero lo que es una constante es que nuestra muestra no debe pasar más de 24 h en el fijador (en el caso de tejidos completos; para el caso de cultivos celulares, 30 minutos serán suficientes).

Otro error común al fijar un tejido es utilizar un fijador viejo; los fijadores químicos como los aldehídos, deben estar frescos al momento de

utilizarse. Su preparación debe ser de no más de 24 h. Al almacenar el PFA por más del tiempo indicado, se volatilizará y cambiará su composición química.

Finalmente, deberá considerar que, al fijar un tejido con aldehídos el volumen de fijación tendrá que ser de al menos 20 veces el volumen del tejido en cuestión (Figura 14-1, -2).

3. *Cortes/espesor de la muestra.* Aunque la teoría indica que es posible observar muestras de hasta 100 micras de espesor, a través del microscopio confocal, la práctica nos demuestra que muestras >80 micras, no se observan muy bien, no solo por el recorrido que el láser debe hacer a través de la muestra, sino por la poca penetración que pueden tener los colorantes y/o anticuerpos en un tejido tan grueso. Si se desea observar un tejido más grueso, se recomienda clarificar el tejido y asegurarse de tener un protocolo adecuado para la penetración de los anticuerpos. Se obtienen mejores resultados de marcaje y adquisición al utilizar cortes de entre 5 – 40 micras, las cuales pueden obtenerse en un criostato. Aunque, recuerde que antes de cortar las muestras en un instrumento de seccionamiento que requiere temperaturas bajo cero, deberá crio-protector el tejido utilizando gradientes de sacarosa (Figura 14-3).

4. *Permeabilización.* La utilización de diferentes detergentes es requerida para la permeabilización del tejido. En ocasiones se puede pensar que no se requiere permeabilizar el espécimen debido a que la proteína de interés se encuentra en la membrana; no obstante, es importante verificar si el epítipo del anticuerpo a utilizar se encuentra en la cara externa o la cara interna de la membrana.

5. *Bloqueo.* Es un paso muy importante en la preparación de muestras, muchos anticuerpos comerciales requieren de la preparación de una solución de bloqueo específica, por lo que siempre es importante verificar la hoja técnica del anticuerpo a utilizar, así como contemplar el uso de un protocolo diferente cuando vamos a cambiar de espécimen y/o anticuerpo.

6. *Elección de anticuerpos secundarios.* Antes de comprar un anticuerpo debemos revisar el catálogo de opciones. En ese sentido, algunas recomendaciones incluyen seleccionar anticuerpos hechos en especies poco comunes; por ejemplo: burro, caballo o alpaca. Que el fluorocromo seleccionado sea de una longitud de excitación alcanzable, que presente una longitud de onda detectable, que presente una fluorescencia de alto rendimiento y que sea fotoestable.

7. *Controles de anticuerpos.* Al iniciar una inmunofluorescencia para un tejido y/o proteína con la que no se tiene experiencia, es fundamental, realizar los controles de tinción adecuados. Estos podrían incluir a) un control positivo de una línea celular o tejido que se sabe que expresa la proteína de interés, lo cual nos permitirá saber que el anticuerpo primario funciona; b) un control negativo, en una línea celular o tejido que se sabe que no expresa la proteína de interés, no proporciona tinción alguna; c) alternativamente, si se trata de una proteína de amplia distribución se podría utilizar un péptido de competencia que bloquee la unión del anticuerpo primario al epítipo al cual está dirigido; y d) un control de unión no específica (UNE), en el que se prueba que el anticuerpo secundario no proporciona ninguna tinción por sí mismo (esto se hace sin colocar el anticuerpo primario).

8. *Medio de montaje.* Son sustancias que evitan la oxidación de la muestra debida a su exposición a la luz y por lo tanto evitan su apagamiento. Es posible que preparemos medios de montaje sencillos/caseros como lo es la mezcla de Glicreol+PBS, aunque tendremos que estar conscientes que la muestra no se mantendrá brillante por mucho tiempo. Independientemente del uso de un medio de montaje casero o comercial, otro aspecto a considerar es que se debe evitar a toda costa la inclusión de burbujas al realizar el montaje, ya que esto cambiará las características de la muestra en diversos aspectos. (Figura 14-8)

9. *Cubreobjetos.* En la actualidad existen diversos materiales para cultivar células, organoides u otros especímenes, a pesar de estos avances en la tecnología de los materiales, si se desea observar la muestra con objetivos de magnificaciones amplias (mayores a 20x), siempre debe de utilizarse vidrio del número 1 (cajas de Petri de fondo de vidrio, cubreobjetos, multicámaras de fondo de vidrio, etc.); ya que tiene el espesor indicado para su observación al microscopio.

10. *Sellado de la muestra.* Muchos medios de montaje comerciales tienen la característica de secar con el tiempo; a pesar de ello, es necesario sellar la muestra para preservarla correctamente, ya que, por el efecto de la presión atmosférica, las muestras tienden a secarse y/o integrar burbujas. El sellado de la muestra puede efectuarse con barniz de uñas de cualquier marca y costo, siempre y cuando se realice únicamente en el borde del cubreobjetos y al día siguiente de haber montado la preparación para que éste no se mezcle con la solución de montaje y se introduzca a la preparación, ya que también fluorescerá.

11. Temperatura de conservación. Es deseable que una vez que se haya preparado la muestra, esperemos un par de días a que esta seque, lo cual puede ser a 4° C y en obscuridad. Después de haber observado la preparación al microscopio podrán preservarse a 4° C, o bien, a -20° C si así lo permiten las especificaciones técnicas del anticuerpo. Después de almacenar las muestras por largos periodos de tiempo, por ejemplo, 3 meses o un año, es necesario dejar que se equilibren a la temperatura ambiente, antes de observarlas al microscopio.

Lo descrito anteriormente son algunos consejos para el mejoramiento en la preparación de una muestra biológica, pero de ninguna manera describe el protocolo completo de la preparación de esta.

Comentarios finales

La obtención de una buena imagen confocal depende del entendimiento de los conceptos alrededor de ésta herramienta, la familiarización que se tenga con la modificación de los parámetros ajustables en el equipo; sin embargo, lo más importante es que antes de utilizar el microscopio confocal es contar con una muestra bien preparada ya que el evitar la luz fuera de foco no es lo único necesario para tener éxito en nuestros resultados y más importante aún, es haber planteado cuál es la pregunta que queremos responder. Adicionalmente habrá que pensar en la mejor manera de analizar las imágenes obtenidas.

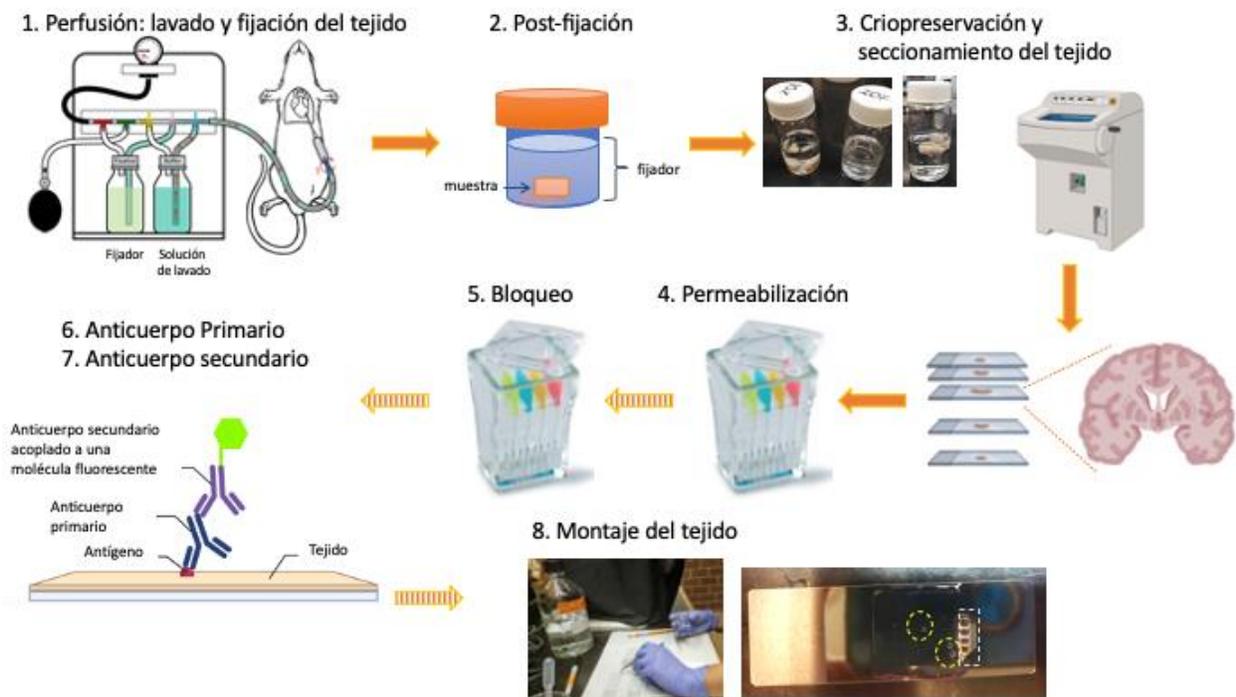


Figura 14. Procedimiento general para el procesamiento de tejidos para su observación al microscopio. 1) Al trabajar con especímenes completos siempre se preferirá perfundir con solución salina o PBS para retirar los residuos sanguíneos, posteriormente también se realizará una perfusión con el agente fijador, generalmente se prefiere el uso del PFA al 4%. 2) Es necesario realizar una post-fijación del tejido, la cual no debería exceder 18 h en el medio fijativo. Observe que el volumen del fijador debe ser de al menos 20 veces mayor al volumen del tejido. 3) Hay varias formas de seccionar los tejidos; sin embargo, para la microscopia confocal es preferible tener secciones de tejido de 5 a 40 micras, para lo cual deberá utilizarse un criostato, en ese sentido, después de la post-fijación, los tejidos deberán pasar por un gradiente de sacarosa que va del 10 al 30%. Posteriormente deberán cortarse en el criostato eligiendo la temperatura adecuada dependiendo del tejido a seccionar. Las secciones de tejido pueden ser recogidas en portaobjetos, o bien, en multicámaras que contengan PBS, para realizar el proceso de la inmunofluorescencia en flotación. 4) Es recomendable permeabilizar el tejido para promover la penetración de los anticuerpos. 5) Hay varias soluciones de bloqueo, es importante consultar la hoja técnica del anticuerpo primario a utilizar para ver cuál es el más recomendable. 6) La incubación con el anticuerpo primario no deberá basarse en las concentraciones que utiliza en técnicas diferentes como Western Blot o ELISA, ya que presentan diferentes sensibilidades. Es deseable realizar controles positivos y negativos de las preparaciones para establecer la especificidad del anticuerpo. 7) La incubación del anticuerpo secundario en un tejido, no deberá ser mayor a las 2 h y en una línea celular, no deberá ser mayor a 30 minutos. 8) El montaje de las preparaciones deberá realizarse con cubreobjetos de vidrio del número 1, con un medio de montaje que incorpore en su composición agentes de “antiapagado” de la señal y que eviten la oxidación de los anticuerpos por efecto de la incidencia del láser. Asimismo, es recomendable esperar un par de días antes de observar las muestras al microscopio, esto permitirá que el medio de montaje haya secado y se observen más brillantes las muestras.

Agradecimientos

La figura 1, se realizó con el programa en línea BioRender. Agradecemos a Fernando Hernández Real, estudiante del Laboratorio del Dr. Tovar y Romo, por proveernos del cultivo de neuronas de corteza de ratón para realizar las inmunofluorescencias y adquisiciones de microscopía

confocal presentadas en este trabajo; a Diana Millán Aldaco por proveernos de las muestras de ovario de ratón con las cuales se realizaron las adquisiciones en el modo mosaico; así como al Dr. Nicolás Jiménez Pérez, integrante de la Unidad de Imagenología del IFC, por la lectura crítica del manuscrito, así como sus sugerencias para nutrir este trabajo.

Referencias

- Masters, B. R. (1996) Selected Papers on Confocal Microscopy, Society of Photo Optical
- Winston, P. H. (2016) Marvin L. Minsky (1927-2016). *Nature*. 530, 282
- Minsky, M. (1988) Memoir on inventing the confocal scanning microscope. *Scanning*. 10, 128–138
- Amos, W. B., White, J. G., and Fordham, M. (1987) Use of confocal imaging in the study of biological structures. *Applied Optics*. 26, 3239
- Murphy, D. B. (2002) Fundamentals of Light Microscopy and Electronic Imaging, John Wiley & Sons
- Li, J., Xue, F., and Blu, T. (2017) Fast and accurate three-dimensional point spread function computation for fluorescence microscopy. *J. Opt. Soc. Am. A Opt. Image Sci. Vis.* 34, 1029–1034
- Jackson, W. (2015) The Size of Digital Imaging: Resolution. *Digital Image Compositing Fundamentals*. 10.1007/978-1-4842-4060-1_2
- The Rayleigh Criterion for Microscope Resolution (2020) Edinburgh Instruments. [online] <https://www.edinst.com/blog/the-rayleigh-criterion-for-microscope-resolution/> (Accessed February 14, 2022)
- Bayguinov, P. O., Oakley, D. M., Shih, C.-C., Geanon, D. J., Joens, M. S., and Fitzpatrick, J. A. J. (2018) Modern Laser Scanning Confocal Microscopy. *Curr. Protoc. Cytom.* 85, e39
- Smith, C. L. (2011) Basic confocal microscopy. *Curr. Protoc. Neurosci.* Chapter 2, Unit 2.2
- Conchello, J.-A., and Lichtman, J. W. (2005) Optical sectioning microscopy. *Nat. Methods*. 2, 920–931
- Goldstein, M., and Watkins, S. (2008) Immunohistochemistry. *Curr. Protoc. Mol. Biol.* Chapter 14, Unit 14.6
- Gage, G. J., Kipke, D. R., and Shain, W. (2012) Whole animal perfusion fixation for rodents. *J. Vis. Exp.* 10.3791/3564
- Melan, M. A., and Sluder, G. (1992) Redistribution and differential extraction of soluble proteins in permeabilized cultured cells. Implications for immunofluorescence microscopy. *J. Cell Sci.* 101 (Pt 4), 731–743
- Im, K., Mareninov, S., Diaz, M. F. P., and Yong, W. H. (2019) An Introduction to Performing Immunofluorescence Staining. *Methods Mol. Biol.* 1897, 299–311



DRA. RUTH RINCÓN HEREDIA
ORCID: 0000-0002-5070-938X

Estudió Ingeniería en Biotecnología en la Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología del

Instituto Politécnico Nacional. Realizó sus estudios de Maestría y Doctorado en Ciencias con especialidad en Farmacología en el Centro de Investigaciones y de Estudios Avanzados (CINVESTAV-IPN), campus Zacatenco. Durante sus estudios de posgrado utilizó la microscopía confocal como una herramienta necesaria para entender el mecanismo de internalización de las proteínas de las Uniones Oclusoras del epitelio renal. Colaboró como becaria posdoctoral en el laboratorio del Dr. Arturo Hernández Cruz durante 3 años.

Impartió clases en la carrera de Médico Cirujano en la Facultad de Estudios Iztacala, UNAM durante 7 años y también ha impartido clases en la Facultad de Ciencias. Por su formación y su experiencia profesionales, le gusta decir que tiene el corazón guinda y la piel dorada.

Es jefa de la Unidad de Imagenología del Instituto de Fisiología Celular, UNAM desde el 2018.

Pertenece al Sistema Nacional de Investigadores (nivel 1). Cuenta con 17 artículos en revistas internacionales indizadas y dos capítulos en libros.