

CAPÍTULO 13

MICROSCOPIA ÓPTICA

Lisandro Jorge Falomir Lockhart y Federico Fuentes

Introducción

La microscopía es un conjunto de técnicas que se ha desarrollado por más de 300 años, que incluyen distintas metodologías altamente especializadas. Se clasifican en 3 grandes grupos: La Microscopía Óptica, la Microscopía Electrónica y la Microscopía por Sondas. Este capítulo está centrado en presentar una serie de técnicas incluidas dentro de la Microscopía Óptica que permiten estudiar procesos bioquímicos y biofísicos hasta a nivel (sub-)micrométrico, es decir a nivel de tejidos, celular, subcelular, o incluso molecular. Una de las grandes ventajas de la microscopía es que se pueden emplear los mismos fenómenos físicos, descritos en capítulos anteriores para el análisis de biomacromoléculas *in vitro*, pero ahora incorporando también información espacial, en particular, en relación a las estructuras biológicas relevantes de cada sistema en estudio, como la estructura de un tejido, la célula, el núcleo, organelas, etc..

Desde sus inicios a mediados del siglo XVII, el microscopio ha sufrido grandes cambios. Inicialmente limitado al espectro electromagnético de la luz visible al ojo humano, en las últimas décadas se han desarrollado técnicas que emplean un espectro extendido, que hoy abarca desde los rayos-X hasta el infrarrojo lejano, gracias al desarrollo de detectores específicos que reemplazan al ojo del observador. Por practicidad, este capítulo se enfocará exclusivamente en las técnicas de Microscopía Óptica, es decir, nos limitaremos al espectro visible ligeramente extendido hacia el UV y el IR; mientras que dejaremos de lado la descripción del microscopio electrónico y otras variantes. Por otro lado, junto

con al desarrollo de detectores especializados, se incorporó también la digitalización de las imágenes, potenciando así las posibilidades de análisis. Hoy en día, comprender y prever el modo de análisis de las imágenes obtenidas es, al menos, igual de importante que el diseño del ensayo en sí a través del cual se registrarán las mismas. Por tal motivo, se urge a los interesados a explorar los distintos programas disponibles según su interés o necesidad.

No se desarrollarán en este texto las descripciones correspondientes a las técnicas de Microscopía Electrónica o por Sondas, quedando también pendientes sus comparaciones e integración con las técnicas de Microscopía Óptica pendientes para futuras ediciones.

13.1. Partes del Microscopio Compuesto de Campo Amplio

Ya que para un buen uso de las técnicas de microscopía es necesario comprender cómo funciona el microscopio, primero nos centraremos en describir las partes del mismo y sus funciones. Luego describiremos algunos conceptos básicos sobre los fundamentos y los límites de la técnica, para luego sí describir las posibilidades tecnológicas más comunes en la actualidad y las ventajas de cada una. Compararemos las propiedades del microscopio de campo amplio con las del microscopio confocal, e introduciremos algunos ejemplos de técnicas de “superresolución”. Para mostrar la utilidad de cada una de las variantes, trataremos de ir incorporando ejemplos prácticos que evidencien la utilidad de cada técnica.

El microscopio compuesto que se usa en la actualidad está formado por dos tipos de componentes. Por un lado se integran los distintos elementos del camino óptico por el cual se colecta y enfoca la luz, y por otro lado tenemos distintos componentes mecánicos que forman el armazón del equipo y permiten mover los componentes ópticos y la muestra de forma precisa y reproducible (Figura 13.1). Comenzaremos describiendo los elementos ópticos y sus funciones según el recorrido que realiza la luz.

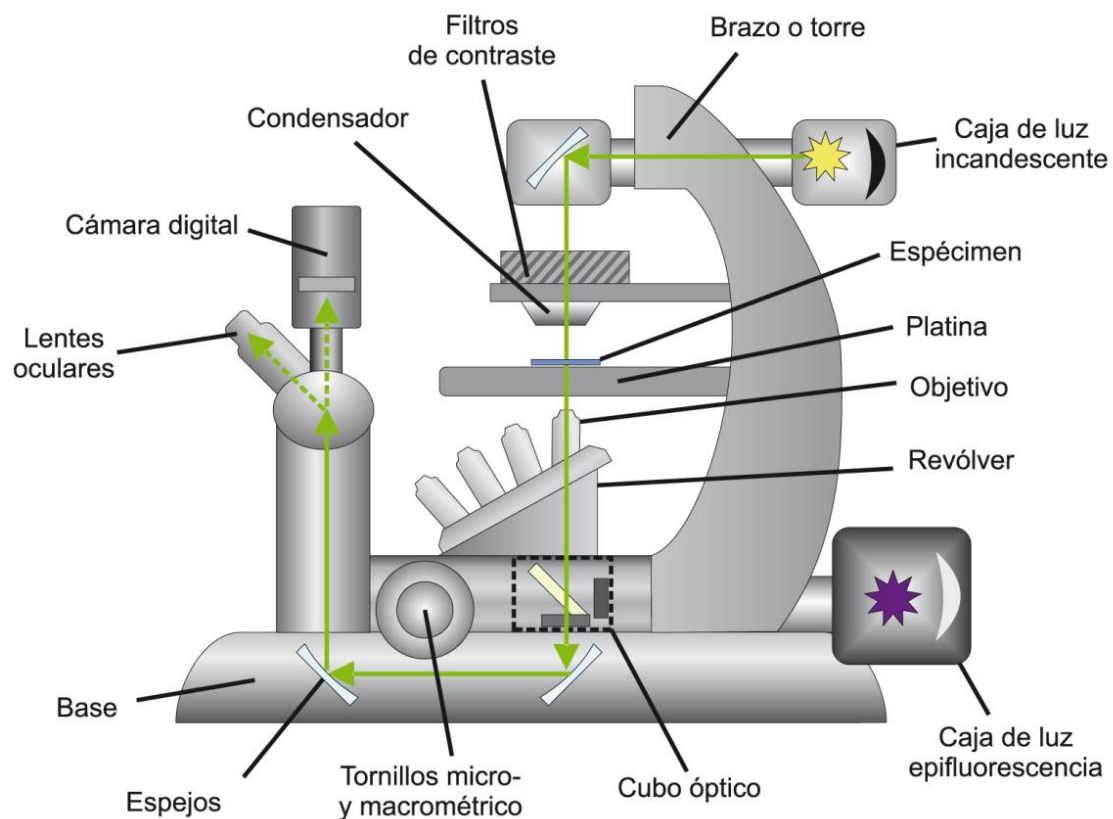


Figura 13.1. Estructura básica del Microscopio Compuesto. Este diagrama esquematiza las partes y las funciones de cada uno de los componentes de un microscopio compuesto. En particular se eligió un microscopio invertido de Epifluorescencia ya que es uno de los formatos más difundidos. El trayecto que recorre la luz desde la fuente de luz hasta el ocular se describe en líneas verdes.

- Fuente de Luz: Existen distintas fuentes de luz apropiadas para cada una de las distintas técnicas. Originalmente, un espejo se usaba para reflejar la luz solar o de una vela. Los equipos actuales están dotados, por ejemplo, de una lámpara halógena de filamento de intensidad variable para las técnicas de microscopía convencional. Sin embargo, a fin de ser empleados para microscopía de fluorescencia de campo amplio, es necesario que el microscopio cuente también con una lámpara de arco de Mercurio, que posee un espectro más amplio de emisión, en comparación a la de halógeno, y con intensidades mayores, en especial hacia el espectro UV. En ambos casos, una imagen de la fuente de luz debe ser proyectada sobre la muestra. Pero, debido a que la fuente de luz tiene una forma definida, la misma debe ser desenfocada completamente de forma tal de lograr una iluminación uniforme. Esto se conoce como “Iluminación de Köhler”, en oposición a la “Iluminación Crítica” donde se

busca obtener una imagen nítida de la fuente de luz sobre la muestra (Figura 13.2). La iluminación de Köhler tiene la ventaja de lograr una densidad de luz completamente uniforme sobre toda la muestra, reduciendo la aparición de artefactos y sombras sobre la imagen y aumentando el contraste de la misma. La iluminación de Köhler además es indispensable para técnicas como Contraste de Fase o Contraste por Interferencia Diferencial (DIC) (ver más adelante).

- Filtros: En el caso de aplicar las técnicas de Contraste de Fase o de DIC, previo al condensador, se ubica por lo general una rueda que permite intercambiar distintos elementos ópticos necesarios para cada técnica. En el caso de los microscopios de fluorescencia por transmisión también se pueden ubicar a esta altura los filtros de excitación.

-Condensador: Este componente es el encargado de enfocar la luz proveniente de la fuente de luz sobre la muestra. Está formado por dos lentes y un iris mecánico (o diafragma). Este último se emplea para regular la intensidad de luz que llega a la muestra y para ajustar la profundidad del campo de la muestra modificando la apertura numérica (NA) efectiva y el contraste de la imagen.

- Espécimen: La muestra se prepara generalmente entre dos vidrios, el portaobjetos y el cubreobjetos para poder posicionarla entre el condensador y el objetivo. El grosor del cubreobjetos debe ajustarse a las características del conjunto de objetivos disponibles para lograr enfocar bien las muestras y obtener imágenes de la máxima nitidez posible.

- Objetivo: El objetivo está formado por un conjunto de lentes. Su función es la de coleccionar la luz (reflejada, refractada o emitida por la muestra) y es una de las piezas fundamentales del equipo en la formación de la imagen, ya que sus características definen la capacidad que tiene el microscopio para distinguir detalles (poder de resolución). Actualmente los objetivos están diseñados para proyectar una imagen en el infinito, en lugar de proyectar una imagen real dentro del tubo del microscopio. La luz que proviene de la muestra se proyecta en rayos paralelos hasta ser coleccionada por las lentes del Ocular en el otro extremo del tubo del microscopio, generando una imagen real y magnificada. De esta manera es posible el agregado de componentes ópticos, como los

filtros o espejos dicróicos, en el espacio intermedio sin que se ocasionen aberraciones ópticas o modificaciones focales.

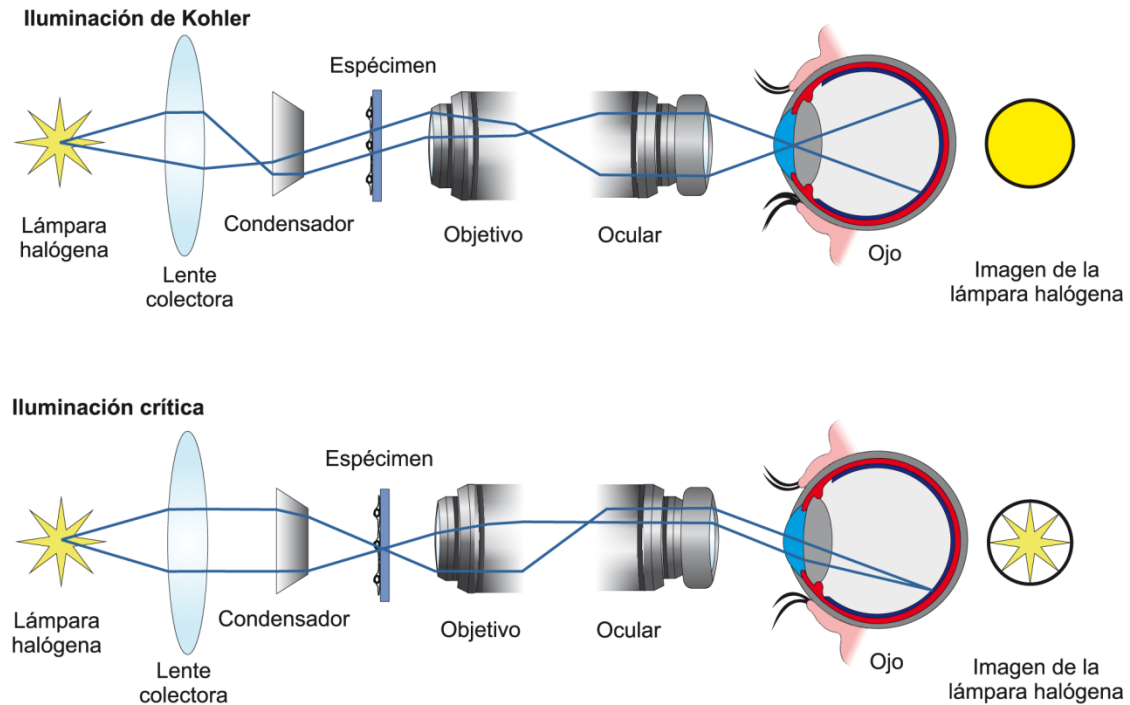


Figura 13.2. Iluminación Crítica versus Iluminación de Köhler. La iluminación crítica consiste en proyectar una imagen de la fuente de luz (filamento incandescente) sobre el plano focal del espécimen a analizar. Eso determina una iluminación no uniforme de la muestra por la forma irregular del filamento de la lámpara halógena. La iluminación de Köhler, en cambio, procura proyectar la imagen de la fuente de luz sobre el plano focal posterior del condensador de forma tal de que se encuentre completamente desenfocada sobre el plano focal de la muestra. De este modo se logra una iluminación uniforme que realza el contraste y disminuye los artefactos debidos a una iluminación despareja del espécimen.

Por lo general, se cuenta con un conjunto de objetivos intercambiables montados sobre el revólver de forma tal de poder registrar imágenes a distintos aumentos y campos de visión de distinto tamaño. Los objetivos se clasifican en “secos” o “de inmersión”, de acuerdo a si están preparados para observar la muestra a través de aire o de algún medio de mayor índice de refracción, como agua, glicerol o aceite. Se caracterizan por 4 códigos que representan la Apertura Numérica (NA, por sus siglas en inglés *Numeric Aperture*), las correcciones ópticas que realiza, si son de inmersión además indican el índice de refracción y el medio que debe usarse en combinación con el objetivo, y, por último, el factor de aumento seguido de una “X”. En la sección siguiente se explicará más en detalle la importancia de cada uno de estos parámetros. En el

caso de las técnicas de contraste de fase y DIC los objetivos deben incluir elementos extra y no pueden ser combinados libremente con los filtros.

- Filtros y Dicroicos: En el caso de la microscopía de fluorescencia se requiere filtrar la luz de excitación que atraviesa o es reflejada en el espécimen. Para ello se usan filtros dicroicos (en los equipos de Epifluorescencia) y filtros de emisión. Los filtros de emisión y de excitación deben ajustarse al/los fluoróforos que serán analizados en una misma muestra. El diseño más frecuente corresponde a los microscopios de Epifluorescencia, en los cuales los filtros de emisión, los espejos dicroicos y los filtros de emisión se pueden intercambiar de forma tal de poder adaptar así la configuración del microscopio a un rango amplio de fluoróforos. En algunos microscopios, los tres elementos se combinan en un único elemento óptico comúnmente referido como “cubo”, que se comercializan ya optimizados para distintos fluoróforos.

- Ocular: Las lentes del ocular permiten obtener un aumento que multiplica aquel realizado en primera instancia por las lentes del objetivo. Además generan una imagen de la muestra en un plano infinito de forma tal de no tener que forzar la vista. En algunos oculares se intercala en el camino óptico una pestaña o puntero que sirve como referencia. Los microscopios actuales suelen ser binoculares, es decir, cuentan con dos oculares permitiendo la observación estereoscópica. Además uno de los oculares suele permitir ajustes de foco para corregir posibles discrepancias entre los ojos del observador. La inspección ocular del preparado por el usuario es una parte fundamental de las buenas prácticas microscópicas, más allá que luego se emplee una cámara para digitalizar la imagen.

- Cámara: Los microscopios actuales suelen tener un puerto especial para adosar una cámara digital o una cámara de video. Un espejo refleja la luz que normalmente es guiada hacia los oculares por el puerto de la cámara de forma tal de poder grabar y/o digitalizar las micrografías. Existen distintos tipos de cámaras con sensores de distintas propiedades, y cada año aparecen en el mercado nuevas y mejores cámaras digitales, de mayor resolución y más rápidas. Por tal motivo es difícil hacer una descripción detallada en este capítulo introductorio sobre las características más sobresalientes de los

distintos tipos de cámaras de última generación. Aun así, es importante comprender cuál es el principio fundamental de las cámaras digitales. Brevemente, las cámaras tienen un sensor que es un arreglo de detectores puntuales capaces de registrar y cuantificar la luz que les llega, análogamente a la retina ocular. La imagen se genera a partir de los valores de intensidad registrados por cada detector puntual que se corresponde con cada pixel (unidad básica de una imagen) al que se le asigna un valor en escala de grises. Los sensores suelen ser monocromáticos, es decir, no distinguen fotones de distinta longitud de onda. Sin embargo, si no se cuenta con una cámara con propiedades espectrales, es posible separar la luz emitida o transmitida en dos o más canales empleando filtros dicróicos y de emisión, y así obtener imágenes alternativamente para cada rango de longitudes de onda. Esto genera una imagen “multicanal”, donde cada canal corresponde a una configuración particular de filtros en el microscopio.

Integrando los componentes ópticos, el microscopio compuesto se completa con una serie de elementos mecánicos que sostienen y permiten posicionar con precisión los distintos elementos ópticos y el espécimen para formar la imagen aumentada de la muestra, así como evitar que luz espuria degrade la calidad de la imagen. Los componentes mecánicos cambian ligeramente en las configuraciones “vertical” e “invertido” en sus funciones y disposición. Los más sobresalientes son los siguientes:

- Base o Carcasa del Microscopio: Funciona como soporte estable donde se apoyan o sostienen los otros componentes mecánicos y ópticos del microscopio. Además la base es responsable de proteger los elementos ópticos evitando a su vez que se muevan fuera de la calibración del equipo. Finalmente, la base es un importante elemento de protección del usuario ya que evita que la luz potente de la fuente sea reflejada accidentalmente hacia los ojos del observador, lo que podría causar severos daños y hasta ceguera. Muchos laboratorios construyen sus propios microscopios sobre una mesa óptica anti-vibratoria, y en estos casos la base está generalmente ausente, lo que requiere el uso casi obligatorio de gafas protectoras.

- Brazo o Torre: En el microscopio vertical sirve como soporte para el tubo óptico, los filtros de emisión, el revólver de objetivos y la platina. Mientras que en el microscopio invertido sostiene la caja de luz con la lámpara halógena, el condensador y los filtros de excitación o para Contraste de Fase y DIC. Los componentes restantes se ubican en la base. En ambos casos, el brazo permite sujetar y trasladar el microscopio.
- Platina: Funciona como soporte para ubicar el espécimen entre el objetivo y el condensador en forma perpendicular a la dirección del haz de luz incidente. La platina puede tener distintos adaptadores para sujetar distintos tipos de dispositivos de cultivo y preparados (placas multiwell, portaobjetos, placas de Petri, o cámaras de cultivo especializadas). Además, las platinas poseen dos tornillos o mandos de posicionamiento que permiten desplazar la muestra en el plano XY para su inspección. En el caso de las platinas motorizadas, se puede además variar en forma controlada la altura (posición en Z) de la muestra con precisión submicrométrica, de forma tal de obtener imágenes tridimensionales, o mejor dicho, una serie de imágenes bidimensionales con sus distancias focales separadas una distancia conocida.
- Caja de luz: Se conoce con este nombre a la estructura donde se encierra las lámparas que sirven como fuentes de luz. La misma contiene un espejo cóncavo que maximiza la intensidad de luz proyectada en dirección a los demás elementos ópticos. En el caso de la Iluminación de Köhler, el espejo se ubica de forma tal que las imágenes de la fuente de luz, directa y reflejada, que se forman en el camino óptico estén enfocadas (y desenfocadas) a las mismas distancias.
- Tubo óptico: Originalmente consistía de un cilindro metálico el cual estaba conectado en un extremo al ocular y en el otro al revolver de objetivos. Actualmente el diseño no es necesariamente cilíndrico, e incluyen otros elementos ópticos, como los filtros de análisis (de contraste de fase, DIC, emisión, etc.) o polarizadores.
- Revólver: Permite intercambiar los objetivos manteniendo su orientación perpendicular al espécimen. Los objetivos modernos vienen calibrados de forma tal que, al girar el revólver, se mantiene la distancia de foco sobre la

muestra. De todos modos, es recomendable alejar los objetivos de la muestra antes de cambiarlos, sobretodo en el caso de intercambiar objetivos secos por objetivos de inmersión.

- Rueda de Filtros: Sirve para intercambiar los filtros de análisis (Contraste de Fase y DIC) o de emisión, en el caso de microscopia de fluorescencia. De acuerdo al diseño, se ubican previo al condensador, o luego del revólver de objetivos. En algunos microscopios de fluorescencia se emplean ruedas de cubos de filtros, en los que se rotan como un único elemento un filtro de excitación, un dichroico y un filtro de emisión, optimizados para una única sonda fluorescente o un conjunto de sondas con propiedades muy similares.

- Tornillos Macrométrico y Micrométrico: Permiten ajustar el foco de la imagen variando la posición de los objetivos respecto del espécimen hasta alcanzar un enfoque óptimo. Existen distintos diseños según el fabricante. Pueden estar integrados en un único tornillo variable o ser independientes. El tornillo macrométrico controla movimientos rápidos y groseros de los objetivos (decenas de μm por vuelta), en cambio el tornillo micrométrico controla movimientos mucho más sutiles (fracciones de μm). Para evitar que los objetivos choquen con los especímenes y se dañen sus lentes, los microscopios actuales incorporan mecanismos de seguridad que impiden que éstos continúen acercándose indefinidamente y así se evitan roturas y daños a la muestra y a las lentes de los objetivos. Además, es recomendable respetar las técnicas básicas de microscopía para enfocar una muestra, en las cuales uno halla el foco siempre alejándose de la muestra empleando el tornillo macrométrico, y luego se realiza un ajuste fino empleando el tornillo micrométrico.

13.2. Aumento y Resolución

El microscopio es un arreglo de lentes que permite generar una imagen magnificada del objeto en estudio. Sin lentes, el ojo desnudo puede aumentar la imagen que se genera acercándose al objeto hasta una distancia mínima de

aproximadamente 25 cm. El modelo más simple de un instrumento de magnificación se conoce como lupa o lente magnificadora, y consiste en una única lente que se coloca frente al objeto. La lente produce un efecto de acercamiento del objeto logrando una imagen virtual de mayor tamaño. La magnificación (X) depende de la distancia focal (f) de la lente y de la distancia de trabajo (en el caso del ojo humano, 25 cm) (Figura 13.3A).

$$X = 25 \text{ cm} / f \quad \text{Ec. 13.1}$$

El arreglo más simple de un microscopio compuesto consta de dos lentes: la lente objetivo y la lente ocular (Figura 13.3B). La lente objetivo (X_{ob}) produce una imagen primaria real y magnificada a una distancia determinada (m) dentro del tubo óptico del microscopio. Del mismo modo, la imagen primaria es magnificada nuevamente por el ocular (X_{oc}) de la misma manera que una lupa. La magnificación total (X_t) es el producto de ambas magnificaciones:

$$X_t = X_{ob} \times X_{oc} = \frac{m}{f_{ob}} \times 25 \frac{\text{cm}}{f_{oc}} \quad \text{Ec. 13.2}$$

La capacidad de distinguir más detalles de la muestra en estudio está determinada principalmente por las características del objetivo empleado, por el tipo de luz empleada y por la técnica empleada para generar contraste. Además, los cambios de medio que debe atravesar la luz inducen una mayor pérdida de luz (información) cuanto mayor es la diferencia en los índices de refracción entre ellos. A continuación describiremos brevemente cada uno de los factores que definen el poder de aumento y de resolución de un microscopio.

- Aumento: El aumento observado es el producto de los aumentos originados a través de todos los elementos ópticos del microscopio. Así, por ejemplo, el uso de un objetivo de 10X y oculares de 10X producirían un aumento total de 100X en el tamaño de la imagen obtenida. El aumento se define como la relación lineal (largo, ancho, profundidad) entre el tamaño de la imagen y del objeto que ésta representa. Los objetivos de mayor aumento disponibles, aunque poco frecuentes, son de 150X. El uso de objetivos con aumentos mayores, está

limitado tecnológicamente por la capacidad de compensar por los distintos tipos de aberraciones ópticas generadas por las lentes de aumento, pero también por la incapacidad física de enfocar un haz de luz en un volumen menor al indicado por la ley de difracción de Abbe (ver más adelante).

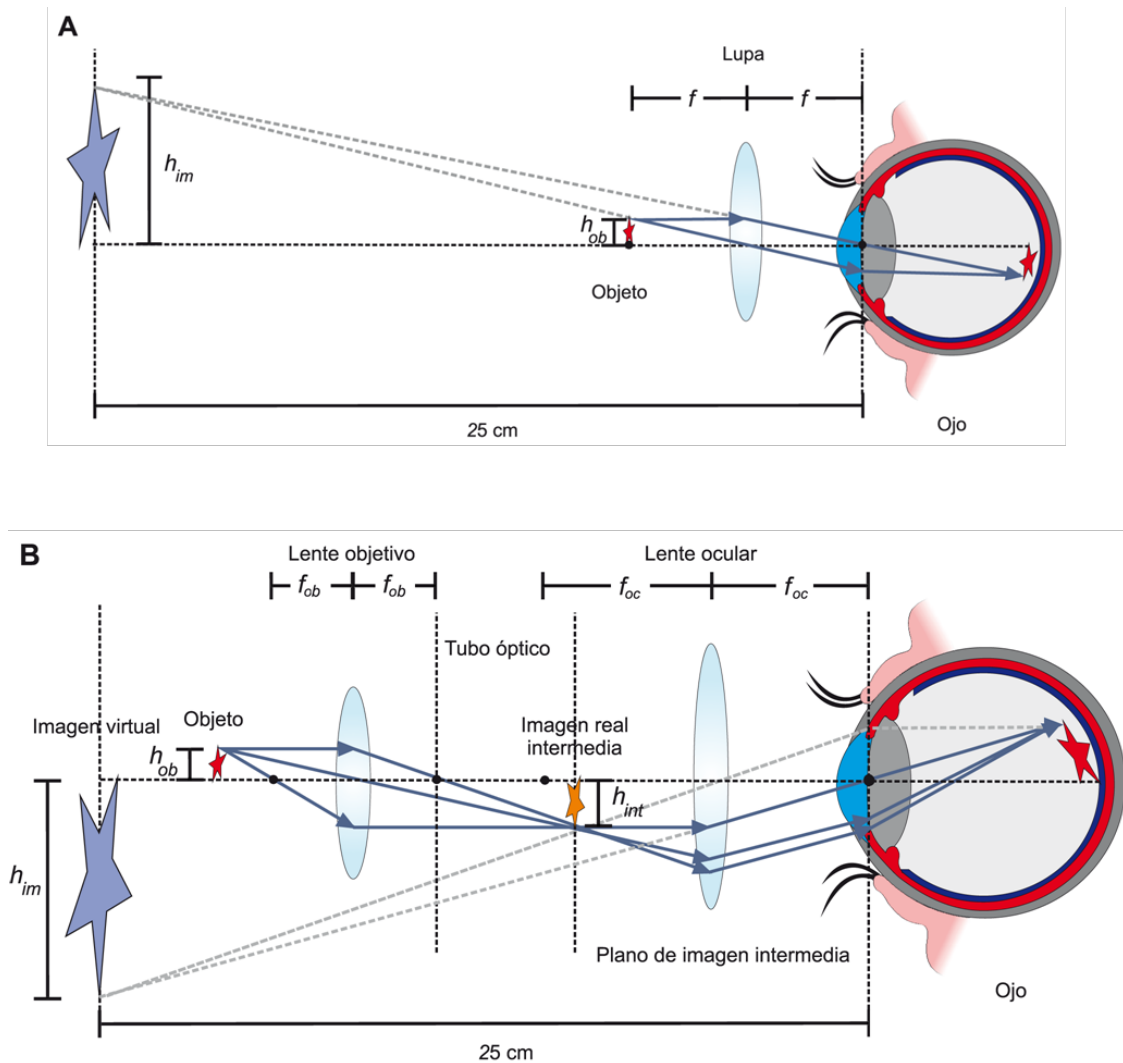


Figura 13.3. Diagramas de Rayos y Magnificación de una Imagen. Magnificación de una Lupa (A) y del microscopio Compuesto clásico (B). En cada ejemplo se observa la traza de rayos (azul) a partir de un objeto (rojo) a través de los distintos arreglos de lentes y hasta el ojo del observador. En el caso del Microscopio Compuesto, la imagen final está magnificada, invertida y es virtual (celeste). Notar además que la distancia entre el plano focal posterior de la lente objetivo y el plano de la imagen intermedia se corresponde con el largo del Tubo óptico. En el caso de objetivos corregidos al infinito, se intercala una lente adicional luego del objetivo que reenfoca la luz proveniente del plano focal (distancia de trabajo) de la lente objetivo. Esto permite intercalar lentes correctoras de aberraciones. Las distancias focales de cada lente se indican con un punto negro sobre el eje óptico (----).

Por otro lado, el uso de objetivos de mayor aumento, implica una reducción en la cantidad de fotones obtenidos por pixel de la micrografía. Bajo estas condiciones, es esencial recolectar la mayor cantidad de fotones provenientes de la muestra. En este contexto, cobra relevancia el índice de refracción del medio dispersante entre el cubreobjetos y la lente frontal del objetivo.

- Índice de Refracción (n): Esta característica de cada sustancia o compuesto traslúcido representa la relación que existe entre la velocidad de transmisión de la luz en el vacío (o, a fines prácticos, en el aire) y en dicho medio. Por lo tanto, los índices de refracción (n) son números mayores a 1. Algunos ejemplos relevantes para este capítulo son lentes (vidrio) ≈ 1.52 , aceite de inmersión ≈ 1.515 , fluorita 1.435, agua 1.330, o aire ≈ 1.000 .

$$n = \frac{\text{Velocidad de la luz en el aire}}{\text{Velocidad de la luz en el medio}} \quad \text{Ec. 13.3}$$

- Apertura Numérica (NA): representa la capacidad de un objetivo de captar la luz refractada o reflejada por la muestra. Numéricamente corresponde al producto entre el índice de refracción n y el seno de la mitad del ángulo de apertura (α). Cuanto menor sea la distancia focal y más grande sea la lente frontal del objetivo, mayor será este ángulo, y el objetivo captará una mayor proporción de luz proveniente de la muestra (Figura 13.4A).

$$NA = n \times \text{sen } \alpha \quad \text{Ec. 13.4}$$

Los haces de luz que atraviesan el cubreobjetos se refractan más al pasar del vidrio al aire y, por lo tanto, su desviación es mayor. Así, por ejemplo, en el caso de los objetivos de inmersión, el uso del correcto medio dispersante (agua, aceite o glicerol) evita que los haces de luz refracten significativamente y se pierdan, ya que no censan cambios demasiado significativos en el índice de refracción a lo largo de su camino óptico. Esto permite maximizar la proporción de fotones colectados provenientes de la muestra, significativamente mayor a si se emplea aire como medio dispersante entre el cubreobjetos y la lente del objetivo (Figuras 13.4B y 13.4C).

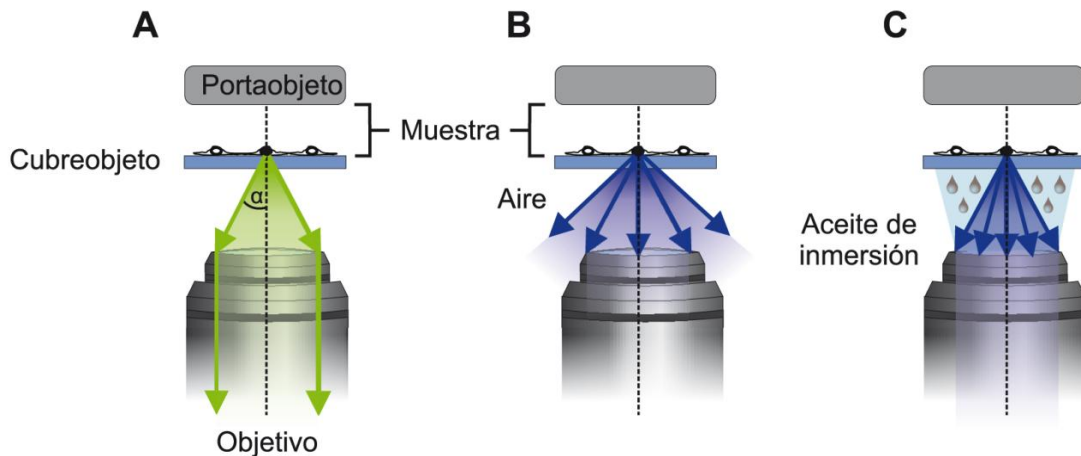


Figura 13.4 Apertura Numérica y Medio de Inmersión. La Apertura Numérica (NA) es uno de los parámetros más importantes de los objetivos, y corresponde al producto entre el índice de refracción (n) del medio dispersante y el seno de la mitad del ángulo del cono de luz que puede captar la lente objetivo (A). La cantidad de luz capturada por el objetivo depende fuertemente del medio entre el cubreobjetos y la lente. La luz se difracta al pasar de un medio de mayor a uno de menor n , tanto más cuanto mayor es la diferencia entre ambos. Por tal motivo, algunos objetivos están preparados para trabajar con distintos medios de inmersión que poseen n mayor al del aire ($n = 1$), como agua ($n = 1.33$), Glicerol ($n = 1.35 - 1.45$) o aceite de inmersión ($n = 1.515$). El n del vidrio es de 1.52.

Los parámetros de **NA** y **n** están directamente relacionados con el poder de resolución del microscopio y su capacidad de formar imágenes con detalles sub-micrométricos de la muestra en estudio. Así, cuanto mayor sea la **NA** de un objetivo y del condensador, mayor será la capacidad de distinguir detalles en la imagen que forman.

- Límite de resolución (d): Se define de este modo a la mínima distancia a la que deben ubicarse dos objetos puntuales de forma tal que sea posible distinguirlos como independientes o separados. La calidad de las micrografías en nitidez, claridad y riqueza de detalles depende en gran medida del **d** del objetivo. Según la Ley de Abbe, el **d** de un objetivo depende de la longitud de onda (λ) del haz luminoso y de la NA del objetivo y del condensador:

Microscopías de Transmisión:
$$d = \frac{1.22 \lambda}{(NA_{ob} + NA_{cond})} \quad \text{Ec. 13.5}$$

Microscopías de Epifluorescencia:
$$d = \frac{1.22 \lambda}{2 \times NA_{ob}} \quad \text{Ec. 13.6}$$

La Ecuación 13.6 corresponde al d del microscopio de epifluorescencia, donde el objetivo cumple las funciones de condensador y objetivo, por lo que $NA_{ob} = NA_{cond}$, y donde la constante $1.22/2$ (ó 0.61) se conoce como la constante de Abbe.

De la expresión de la Ley de Abbe se desprende que cuanto menor sea la longitud de onda, mayor será el poder de resolución del objetivo. Esto significa que si empleamos un objetivo de $NA = 1.40$ con luz de longitud de onda de 450 nm (como en el caso del fluoróforo DAPI), el límite de resolución será ligeramente menor a 200 nm. Este es el límite teórico pero, en la práctica, aberraciones e imperfecciones en las lentes sólo permitirán que el objetivo sea capaz de resolver la imagen de dos puntos que están separados entre sí poco más de 200 nm. De lo contrario, los dos objetos serán registrados como un único objeto.

13.3. Aberraciones

El uso de lentes esféricas en microscopía produce errores al tratar de formar una imagen plana de un objeto tridimensional de dimensiones o posiciones tales que se alejan del eje central de las lentes del objetivo. El efecto de estas se ha logrado corregir y minimizar mediante modificaciones en los diseños de los objetivos en los que se agregan distintas lentes que compensan una o más de las posibles aberraciones. Estos errores se llaman aberraciones. Los tres tipos más comunes de aberraciones son las siguientes:

- Aberración Cromática: ocurre por el diferente ángulo de difracción de la luz de distintas longitudes de onda, al igual que en la formación del Arco Iris. Esto produce un efecto tipo halo debido a que las imágenes difieren en tamaño y plano focal para cada longitud de onda proveniente del objeto en estudio. Las lentes *apocromáticas* fueron desarrolladas para corregir estas aberraciones, mediante una combinación de modificaciones en los materiales y las dimensiones de las lentes utilizadas en los objetivos.

- Aberración Esférica: la esfericidad de las lentes usadas causa que la luz que pasa por el centro de la lente se enfoque en un plano diferente al de la luz que pasa por los bordes. Esta aberración se ha corregido utilizando una combinación en serie de lentes cóncavas y convexas que tienen efectos de aberración esférica opuestos que se terminan cancelando. En estos casos los objetivos están diseñados para ser utilizados en condiciones específicas, como con cubreobjetos de un ancho determinado o junto al agregado de aceite de inmersión o algún otro medio dispersante, ya que las distorsiones de estos elementos han sido tenidas en cuenta al momento de diseñar las correcciones a la aberración esférica.

- Coma: este tipo de aberración ocurre especialmente cuando hay problemas de alineación del microscopio. Se produce por la entrada de luz lateralmente con lo que se forman distintas imágenes superpuestas de diferentes tamaños, dando la imagen de coma a partir de un objeto puntual. Esta aberración es dependiente de la forma de las lentes del objetivo. Las lentes corregidas para este defecto son denominadas *aplanares*.

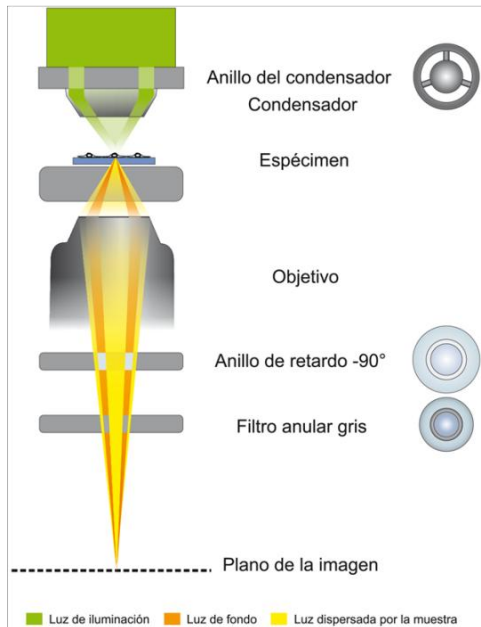
13.4. Generación de Contraste y Variantes de Microscopios de Luz Transmitida

La visualización de estructuras por microscopía depende de la capacidad de los objetos estudiados de producir contraste respecto al resto del espécimen. Las muestras celulares, por ejemplo, suelen poseer estructuras que no absorben ni generan luz con considerable eficiencia, por lo que son casi indetectables al microscopio de transmisión de luz blanca. Una alternativa para visualizar estas estructuras es mediante el uso de técnicas que generan contraste, como tinciones con colorantes o marcaciones con sondas fluorescentes. Otras técnicas de microscopía aprovechan propiedades ópticas diferentes en la muestra de estudio para generar contraste, como las técnicas de contraste de fase y de contraste por interferencia diferencial (DIC). A continuación describiremos los fundamentos de estas dos técnicas.

- Microscopio de Contraste de Fase: En los años '30, Fritz Zernicke introdujo la técnica de Contraste de Fase como método para obtener contraste de muestras no marcadas y que además permite trabajar con células vivas y estudiar procesos dinámicos. Este desarrollo le valió el premio Nobel de Física en el año 1953. La técnica se fundamenta en las pequeñas diferencias en el índice de refracción (n) que presentan las muestras (esencialmente transparentes) debido a su estructura interna. Los haces de luz resultan más retrasados y dispersos cuanto mayor es el n de las estructuras que atraviesa. Así, objetos delgados y transparentes, como las células que poseen una membrana plasmática, organelas y un sistema de endomembranas, tienen la capacidad de producir diferentes cambios en la fase de la luz transmitida y la que es dispersada. La luz transmitida y la luz refractada logran interferir entre ellas en el plano focal, lo que se registra como regiones oscuras y brillantes, y se registra en una imagen con mayor contraste (Figura 13.5A).

En la microscopía convencional los cambios de fase son leves y no generan un contraste apreciable; pero con el agregado de 3 elementos al camino óptico se logra convertir los cambios de n en cambios de intensidad apreciables. La clave está en la técnica de iluminación. En el condensador del microscopio se coloca un anillo delgado de material opaco que genera una iluminación en forma de cono hueco que se enfoca sobre la muestra. Luego de atravesar la muestra, la luz que no se refracta (luz transmitida o background) es captada por el objetivo y forma un anillo en el plano focal del objetivo, mientras que la luz difractada ocupa todo el plano focal. En éste se coloca una placa retardadora de fase construida de manera tal que la región coincidente con la del anillo de luz no desviada sea más ancha que el resto del material. Por lo tanto la luz no difractada viaja más rápidamente produciéndose un retraso extra (llegando a $1/2$ de cuarto de onda) para lograr en el plano de la imagen una interferencia y generar un contraste apreciable (Figura 13.5A).

A Microscopía de Contraste de Fase



B Microscopía de Contraste por Interferencia Diferencial

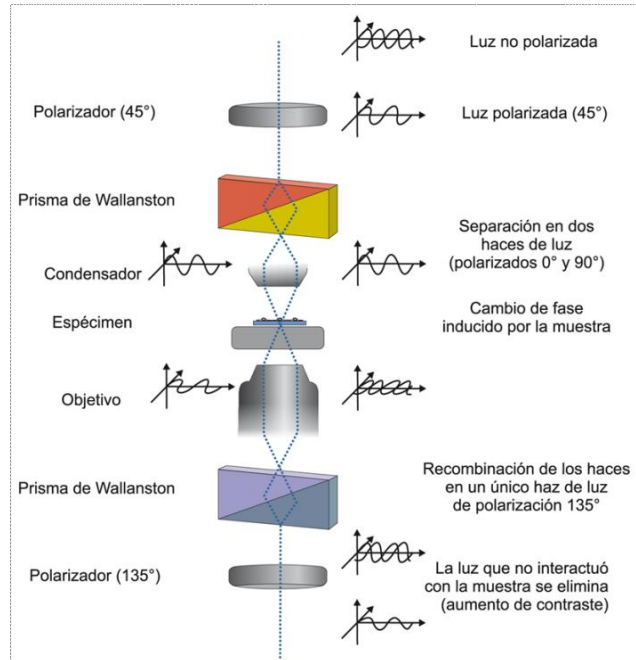


Figura 13.5 Elementos Ópticos Introducidos en el Microscopio Compuesto para Realzar el Contraste. Las técnicas de Contraste de Fase (A) y de Contraste por Interferencia Diferencial o DIC (B) son dos ejemplos de técnicas que realzan el contraste de la técnica clásica del Microscopio de Campo Claro. Ambas técnicas son ampliamente aplicadas para estudiar células vivas.

- Microscopio de Contraste por Interferencia Diferencial: El contraste por interferencia diferencial (o DIC, por *Differential Interference Contrast*) genera contraste en muestras no teñidas ni marcadas mediante el uso de luz polarizada. Esta técnica fue introducida en los años '50 por Georges Nomarsky, por lo que también se la conoce como contraste de Nomarsky. El fundamento se basa en el principio de interferometría para evidenciar información sobre el camino óptico que recorre la luz dentro del espécimen, volviendo visibles detalles de la estructura de la muestra que de lo contrario son indistinguibles. La técnica consiste en colocar un polarizador lineal y un prisma de Wollaston entre la fuente de iluminación y el condensador. El prisma de Wollaston es capaz de dividir al haz entrante de luz linealmente polarizada en dos haces paralelos y cercanos, pero que oscilan perpendicularmente uno respecto al otro. De este modo, los haces no pueden causar interferencia entre ellos en el

plano focal sobre la muestra, pero si son afectados y modifican sus propiedades de acuerdo al ancho, la densidad, la forma y el n de la muestra al atravesarla, afectando diferencialmente a cada haz. Luego de ser colectados por el objetivo, los haces paralelos son combinados por un segundo prisma de Wollaston, permitiendo el fenómeno de interferencia entre ambos haces de luz y generando así el contraste (Figura 13.5B).

Las imágenes de DIC dan una impresión de relieve no relacionado directamente con la altura del espécimen. En comparación con el uso de contraste de fase, las imágenes obtenidas por DIC tienen una mayor resolución al utilizarse completamente la apertura numérica del objetivo. Como principal limitación en esta técnica no se pueden utilizar plásticos como sostén de la muestra. Tampoco se pueden utilizar objetivos apocromáticos, que interfieren con los polarizadores.

13.5. Microscopio de Fluorescencia de Campo Amplio

El uso de compuestos fluorescentes ha sido aprovechado para la generación de contraste en distintas técnicas de microscopía. El fundamento de esta técnica se basa en la separación espectral entre la luz de excitación y la luz emitida por el o los fluoróforos. Estos se excitan con una longitud de onda específica para cada fluoróforo, y la luz emitida es detectada filtrando la luz de excitación empleando filtros específicos. Esto permite obtener imágenes de alto contraste, ya que la señal se detecta sobre un fondo oscuro. Una de las ventajas más importantes de la microscopía de fluorescencia es la posibilidad de utilizar múltiples fluoróforos para obtener señales de dos o más estructuras simultáneamente. Las señales de fluorescencia pueden ser altamente específicas de una o más moléculas de interés, o provenir de compuestos naturales presentes en las células que también son fluorescentes (autofluorescencia). Por este motivo, deben seleccionarse con cuidado los fluoróforos a emplear, priorizando aprovechar todo el rango disponible del espectro electromagnético con sondas que tengan un brillo mucho mayor a la

autofluorescencia de la muestra. Esto se puede lograr utilizando fluoróforos covalentemente unidos a anticuerpos, análogos de metabolitos o sondas de ácidos nucleicos que pueden unirse de forma específica a determinados componentes o estructuras subcelulares, o empleando fluoróforos que de por sí presentan una afinidad particular por alguna estructura subcelular. Por otro lado, el uso de proteínas fluorescentes ha revolucionado el estudio dinámico de distintos procesos celulares en células vivas, lo que fue reconocido recientemente con el premio Nobel en Química entregado a Osamu Shimomura, Martin Chalfie y Roger Y. Tsien en 2008 (ver Capítulo 2 para más detalles).

Como ya se mencionó anteriormente, existen dos formas de construir un microscopio de fluorescencia: Epifluorescencia (Figura 13.6A y 13.6B) y de Transmisión (Figura 13.6B). El microscopio de Fluorescencia de Transmisión corresponde al diseño clásico del microscopio compuesto y sigue siendo el más apto para muestras con fluorescencia débil observada a bajos aumentos (2.5X o 4X). Sin embargo, el microscopio de Epifluorescencia ha desplazado progresivamente al de Transmisión porque tiene la ventaja de que se minimiza la contaminación de la luz de excitación, que puede ser aumentada considerablemente sin afectar la calidad de la señal de fluorescencia, ya que los filtros no son perfectos. Además, en este caso, la luz de excitación es enfocada sobre la muestra a través del objetivo que funciona como condensador. La fluorescencia es emitida en todas las direcciones, y es el mismo objetivo el que finalmente colecta esta luz.

Las fuentes de iluminación más utilizadas son las lámparas de gases de alta presión de Mercurio (Hg) o Xenón (Xe) ya que emiten con suficiente intensidad, uniformidad y estabilidad como para excitar los fluoróforos de forma eficiente y repetitiva como para poder obtener imágenes comparables a fin de realizar un análisis cuantitativo y estadístico. La luz proveniente de este tipo de lámparas consta de un continuo, de intensidad relativamente baja, superpuesto a una serie de picos de muy alta intensidad a longitudes de onda definidas. Por ejemplo, la lámpara de Hg presenta picos intensos de 254, 313, 334, 365, 405,

436, 546 y 577 nm, que es a los que se recurre alternativamente para lograr excitar distintos fluoróforos.

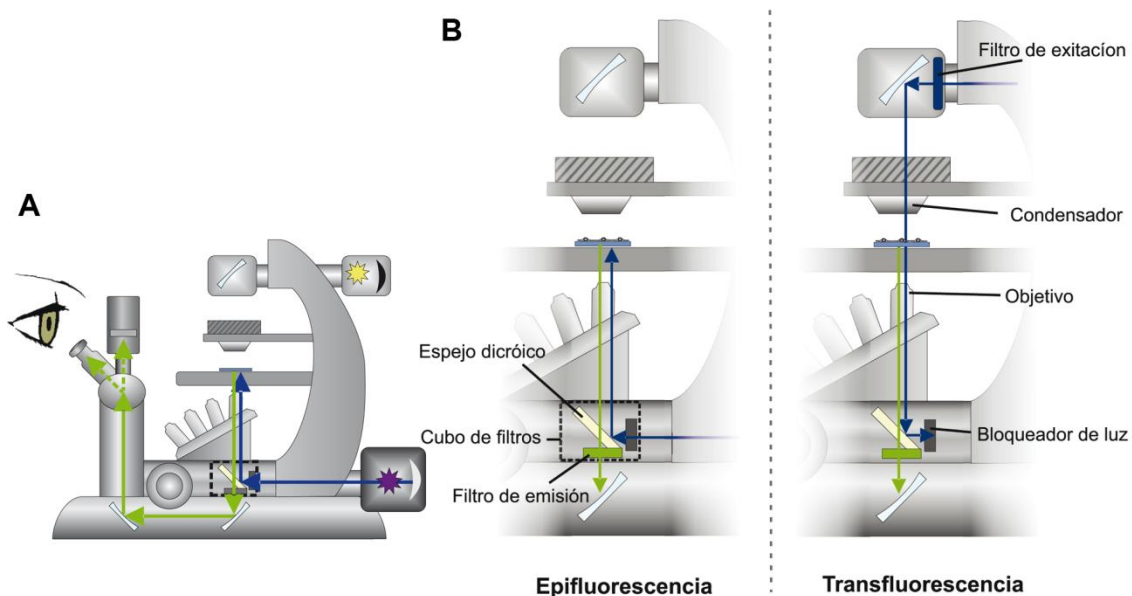


Figura 13.6. Esquema de Microscopios de Fluorescencia de Campo Amplio: Epifluorescencia vs Fluorescencia por Transmisión. Trazo de rayos en un microscopio de Epifluorescencia invertido (A). En comparación con el microscopio de campo claro, el microscopio de fluorescencia incluye una fuente de luz más potente y con un espectro extendido hacia el UV cercano, y una serie de filtros que permiten diferenciar la luz emitida de la luz de excitación (azul) de la emisión (verde). Además, debe notarse que la traza de rayos no atraviesa el condensador y, sin embargo, lo hace dos veces a través del objetivo que cumple además las funciones del primero. En el caso del microscopio de Epifluorescencia, los tres elementos ópticos nuevos (Filtro de excitación, Espejo Dicroico y Filtro de Emisión) se combinan en el Cubo de Filtros (B). En cambio, en el microscopio de Fluorescencia por Transmisión la luz de excitación se enfoca sobre la muestra a través del condensador luego de ser seleccionada por el filtro de excitación (B). La Luz no absorbida es reflejada por un espejo dicroico y/o filtrada por el filtro de emisión, mientras que la fluorescencia emitida atraviesa el filtro y es dirigida hacia el ocular o la cámara digital.

Los tres componentes específicos de un microscopio de epifluorescencia son los filtros de excitación, los espejos dicroicos y los filtros de emisión. A continuación veremos en detalle el rol que cumple cada uno de ellos.

- Filtros de Excitación: La fuente de luz emite distintos picos de alta intensidad a distintas longitudes de onda, por lo que resulta conveniente seleccionar uno de ellos por vez y así lograr excitar uno (o unos pocos) fluoróforos de la muestra a la vez. Esto permite detectar con precisión un determinado fluoróforo y distinguirlo de los otros presentes que permanecen en su estado basal (no emiten). Si los espectros lo permiten, puede combinarse el uso de distintos fluoróforos que presenten el mismo rango de excitación, pero distinto rango de

emisión. Estos fluoróforos serán distinguidos (separados espectralmente) por el filtro de emisión seleccionado. Además, pueden realizarse múltiples marcaciones en una misma muestra con fluoróforos que tengan distintos espectros de excitación. Para ello se utilizan filtros de excitación distintos que seleccionarán el pico de la fuente de luz más adecuado para cada fluoróforo.

- Espejos Dicroicos: La luz de excitación previamente filtrada debe ser desviada hacia el objetivo para enfocarla sobre la muestra. Esto se logra utilizando un espejo dicroico que refleja la luz dentro de cierto rango de longitudes de onda, pero permite el paso de luz cuyas longitudes de onda pertenecen a otro rango. Así, la fluorescencia emitida por la muestra se captura en el objetivo y regresa por el mismo camino hasta el dicroico, pero esta vez lo atraviesa camino al filtro de emisión y el detector. Los dicroicos pueden ser de paso único, o multipaso, es decir, reflejan longitudes de onda de más de un rango (bandas), y dejan pasar otro tanto. Los dicroicos de paso simple se caracterizan por la longitud de onda a la cual la mitad de la luz incidente se refleja y la otra mitad se transmite. Por lo general, las longitudes menores a la λ característica del dicroico son reflejadas y las de mayor longitud son transmitidas.

- Filtros de Emisión: La luz emitida que atraviesa el espejo dicroico es seleccionada por un filtro de emisión que funciona de manera análoga a los filtros de excitación. Los ojos del observador pueden en este caso distinguir fluoróforos de distinto color; pero, por lo general, las cámaras digitales son monocromáticas, es decir, no distinguen la luz de acuerdo a su longitud de onda. Por esta razón, las imágenes registradas se las denomina monocromáticas y están definidas en una escala de grises (ver más adelante). La elección de distintos filtros de emisión no infiere ninguna diferencia para los sensores de las cámaras digitales, por lo que las imágenes registradas con distintas configuraciones deben ser coloreadas "manualmente". Así, es importante recordar que el rango de luz transmitida por el filtro de emisión no guarda ninguna relación con el pseudocolor seleccionado para su representación a color.

Comercialmente se encuentran disponibles arreglos de estos juegos de filtros y dicroicos en forma de cubos (Figura 13.6B), que pueden ser colocados e

intercambiados en las ruedas de filtros de los microscopios. Estos cubos están diseñados para coincidir con los espectros de los fluoróforos más comúnmente utilizados (Figura 13.7). Otra manera de combinarlos es a través de ruedas intercambiables, pudiendo combinar cada uno de estos filtros de manera más versátil y ajustar así el microscopio a un rango más amplio de fluoróforos de interés.

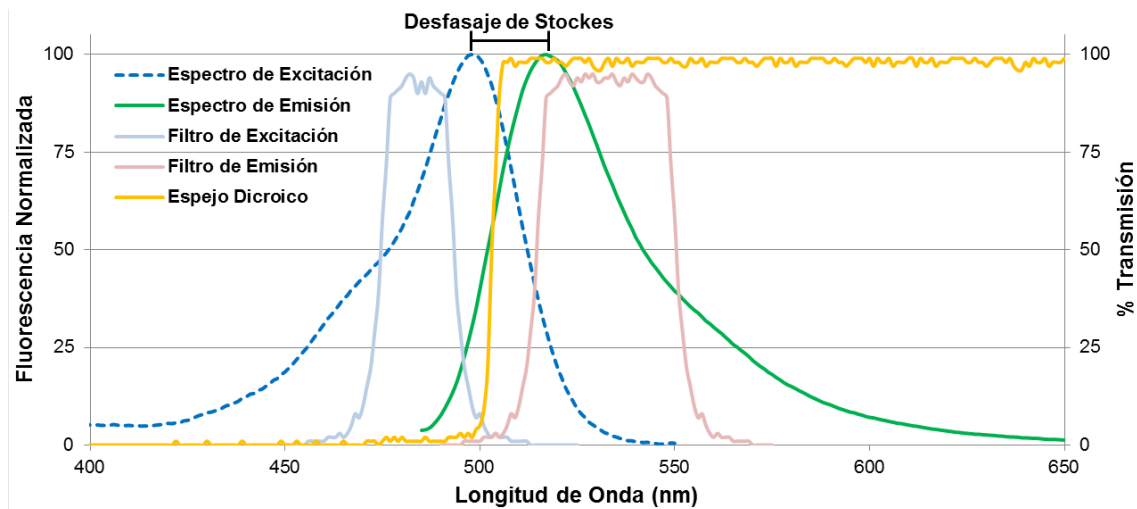


Figura 13.7. Filtros y Espejos Dicroicos para Microscopia de Fluorescencia. La selección de filtros y espejos dicroicos debe ajustarse a los espectros de excitación y emisión de cada fluoróforo. En el gráfico se muestra, a modo de ejemplo, una posible combinación de filtros para el cubo óptico correspondiente a la detección de Fluoresceína o sus derivados. Notar el solapamiento del espectro de transmisión del filtro de excitación con el espectro de excitación del fluoróforo, así como el solapamiento del filtro de emisión con el espectro de emisión de la Fluoresceína. El espejo dicroico separa la luz de excitación de la de emisión, por lo que su longitud de onda característica corresponde usualmente a algún punto dentro del desplazamiento de Stokes del fluoróforo.

Existen distintos tipos de filtros. De acuerdo a su modo de acción pueden clasificarse en filtros de absorción o de interferencia. Mientras que los primeros tienen excelentes características ópticas (bloqueo y transmisión) y son de bajo costo, suelen acarrear el problema de que toda la energía no transmitida se disipa como calor, no es fácil ajustar su selectividad y pueden presentar cierta fluorescencia ellos mismos. Por otro lado, los filtros de interferencia suelen carecer de fluorescencia y ser mucho más fácil de ajustar a (múltiples) longitudes de onda específicas, pero son más costosos y sus capacidades de bloqueo y transmisión no son tan buenas como en los primeros. A fines prácticos, los filtros también se clasifican en:

- a) Filtros de paso corto: Estos filtros dejan pasar luz por debajo de una longitud de onda característica, pero bloquean la luz de longitudes de onda mayores.
- b) Filtros de paso largo: Estos filtros dejan pasar luz por encima de una longitud de onda característica, pero bloquean la luz de longitudes de onda menores.
- c) Filtros de paso de banda: Estos filtros poseen dos longitudes de onda características, entre las cuales normalmente se permite la transmisión de la luz, mientras que se bloquean las de menor y mayor longitud de onda de dicho rango.

Los objetivos utilizados en microscopía de fluorescencia, como se mencionó previamente, tienen que cumplir una doble función, ya que se usa el mismo objetivo como condensador de la luz de excitación y como colector de la señal emitida (objetivo). Normalmente se utilizan objetivos de alta **NA**, que logran coleccionar una mayor cantidad de haces emitidos por la muestra. Otro aspecto importante es la corrección de las aberraciones cromáticas, lo que permite utilizar distintas combinaciones de moléculas fluorescentes con diferentes longitudes de onda de emisión y poder detectar más de una señal en la misma muestra. Finalmente la luz emitida es detectada a través de los oculares o mediante cámaras digitales o de video. Un tipo de cámara digital muy difundido actualmente y que tiene gran aplicación para la microscopía de fluorescencia son las cámaras con sensores CCD (por sus siglas en inglés *Charge Coupled Device* - dispositivo de carga acoplada) que generan una imagen digital. Estos sensores tienen un arreglo de detectores puntuales que almacenan la información de la cantidad de luz recibida durante la exposición como una acumulación de cargas. Luego se lee en forma ordenada dicha acumulación de cargas y se transforman a valores de grises en una escala de 8, 12 o 16 bits (con $2^8 = 256$; $2^{12} = 4096$; ó $2^{16} = 65536$ valores intermedios de grises, respectivamente) para generar la imagen.

13.6. Microscopio de Fluorescencia Confocal

En esta sección nos enfocaremos en la comparación del microscopio compuesto y el microscopio confocal, y resaltaremos las ventajas y desventajas

de cada uno de ellos. El desarrollo de la Microscopía de Fluorescencia fue revolucionada por el invento del Microscopio Confocal por Barrido Laser (o LSCM, de sus siglas en inglés Laser Scanning Confocal Microscopy), que elimina gran parte de la luz proveniente de planos fuera de focos (Figura 13.8A). La gran ventaja de esta técnica es la capacidad de reconstruir imágenes tridimensionales, que se ve potenciada además por las capacidades de análisis actual, brindando una vista más real de cómo funciona la vida. Información multidimensional puede registrarse considerando no sólo las 3 dimensiones espaciales (xyz), sino también tiempo (t) y las propiedades espectrales: longitud de onda (λ), anisotropía (r), y tiempo de vida de fluorescencia (o *fluorescence lifetime*, τ). La complejidad de los equipos ha crecido conforme aumenta las capacidades del microscopio. Sin embargo, todos los microscopios LSCM actuales normalmente tienen la capacidad de obtener imágenes de tipo $xyz\lambda$.

La Microscopía Confocal introduce cuatro nuevos elementos en la configuración del microscopio compuesto:

- Fuente de Luz Laser: Una fuente de luz puntual reemplaza a las lámparas halógenas o mercurio. A diferencia de las últimas, que se posicionan de forma tal de dar una iluminación uniforme (iluminación de Köhler), la fuente de luz puntual es proyectada sobre el plano focal de las lentes del objetivo. Esto genera una imagen puntual sobre la muestra, es decir sólo se enfoca sobre un punto definido de la muestra. Normalmente esta función la cumple un arreglo de láseres que permiten excitar fluoróforos selectiva y alternadamente a lo largo del rango UV-Visible-IR del espectro electromagnético. Los láseres pueden contar con una única línea de emisión, como el HeNe (633 nm) o los láseres de estado sólido bombeado por diodo (DPSS Laser, Diode-Pumped Solid State Laser) (por ejemplo, el Nd:YVO₄ DPSS láser de 532 nm, comúnmente empleado en punteros láser); o varias, como el láser de ion de Ar (que presenta intensidades significativas para 456, 477, 488 y 514 nm).

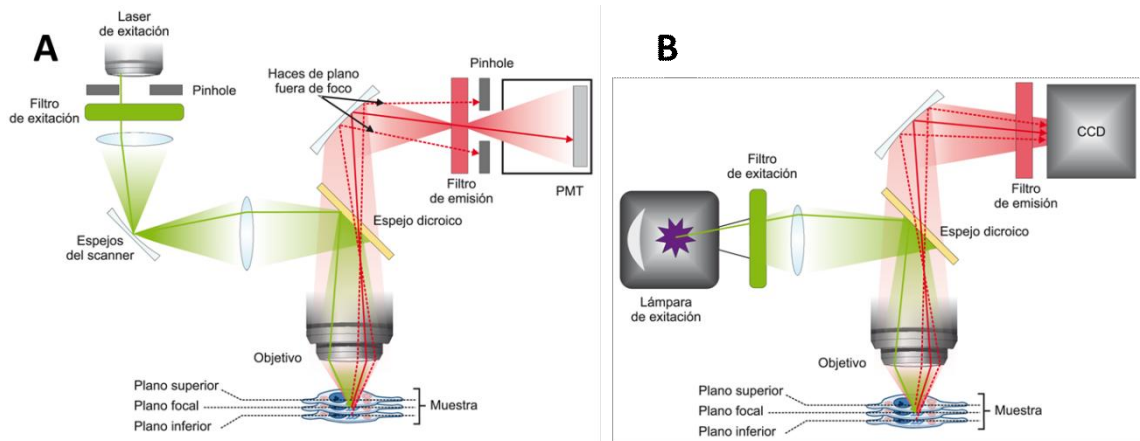


Figura 13.8. Comparación entre el Funcionamiento del Microscopio de Fluorescencia Confocal y el Microscopio de Fluorescencia de Campo Amplio. El uso de un pinhole en el Microscopio Confocal permite eliminar gran parte de la luz proveniente de planos distintos al plano focal (A), aumentando notablemente la nitidez de la imagen y aumenta la resolución de los detalles al disminuir el límite de resolución un 40% en cada dimensión de los ejes x y y . En cambio, en el Microscopio de Fluorescencia de Campo Amplio, la luz proveniente de la excitación de fluoróforos en planos distintos genera un halo no definido alrededor de las señales propias de la sección de la muestra en foco (B).

- Pinhole: La detección de la fluorescencia se limita sólo a la contribución focal de un agujero o *pinhole* en cada instante, a diferencia del plano observado en el caso de las cámaras digitales. El *pinhole*, colocado inmediatamente frente al detector, elimina la luz proveniente de planos adyacentes fuera de foco y permite un seccionamiento óptico limitado únicamente al plano focal. El *pinhole* es de apertura variable, lo que además permite ajustar el grado de seccionamiento óptico de la imagen y así asignar voxels (pixels tridimensionales) de dimensiones Δz variables. De este modo, a menor apertura del *pinhole*, menor contribución e interferencia se registra de planos fuera de foco. Por otro lado, abrir completamente el *pinhole* permite obtener una imagen con características similares a las de la microscopía convencional.

- Detector Puntual: La cámara digital se reemplaza por un detector puntual tipo Tubo Fotomultiplicador (o PMT, de sus siglas en inglés *Photo-Multiplier Tube*) o tipo Avalancha de Fotodiodos (o APD, *Avalanche Photo-Diode*), dependiendo de la sensibilidad y el rango dinámico necesario para las técnicas a emplear. Ambos detectores son dispositivos electrónicos altamente sensibles que responden con efecto fotoeléctrico transduciendo la luz recibida en una corriente de electrones. La intensidad de la corriente guarda relación con la

intensidad de luz capturada, permitiendo asignar intensidades a la fluorescencia emitida por cada pixel representado de la muestra en la imagen. Los APD suelen preferirse antes que los PMT cuando se planea llevar a cabo ensayos de partículas aisladas y únicas, ya que muestran mejores resultados con intensidades de fluorescencia muy bajas debido a que su rendimiento cuántico es significativamente superior al de los PMT. De todos modos, ambos tipos de detectores pueden operarse en el modo de conteo de fotones únicos (*Single Photon Counting*).

- Scanner: Debido a que la iluminación y la detección es puntual, la formación de la imagen requiere de un proceso de barrido sobre la muestra. Así el campo visual es recorrido físicamente mediante el movimiento de un par de espejos galvanométricos que controlan la posición del haz de luz de excitación. El movimiento de los espejos está controlado electrónicamente, lo que permite definir un número variable de pixels que formarán la imagen a ser registrada. De este modo, los valores típicos de la resolución digital de imágenes registradas por LSCM varían entre 64x64 hasta 8192x8192, permitiendo también imágenes de otros formatos, rectangulares, líneas e incluso circunferencias. Es importante ajustar apropiadamente el tiempo de residencia por pixel (también llamado tiempo de integración y es del orden del microsegundo, 10^{-6} s), ya que la alta potencia de los láseres puede promover el fotoblanqueo (degradación) de las sondas fluorescentes. Por otro lado, la necesidad de operar en el modo barrido aumenta considerablemente el tiempo necesario para obtener una misma imagen de canal único (segundos a minutos) respecto a una obtenida en un microscopio compuesto con una cámara digital (milisegundos a segundos), dependiendo del tamaño de la imagen. Por lo general resulta beneficioso reducir el tiempo de residencia por pixel y compensarlo con múltiples lecturas que se pueden promediar o sumar. Esto disminuye el fotoblanqueo de la mayoría de las sondas y mejora la calidad de la imagen al eliminar parte del ruido. Una descripción exhaustiva del funcionamiento del Microscopio Confocal puede hallarse en el libro Handbook of Biological Confocal Microscopy de James B. Pawley (Pawley, 2006).

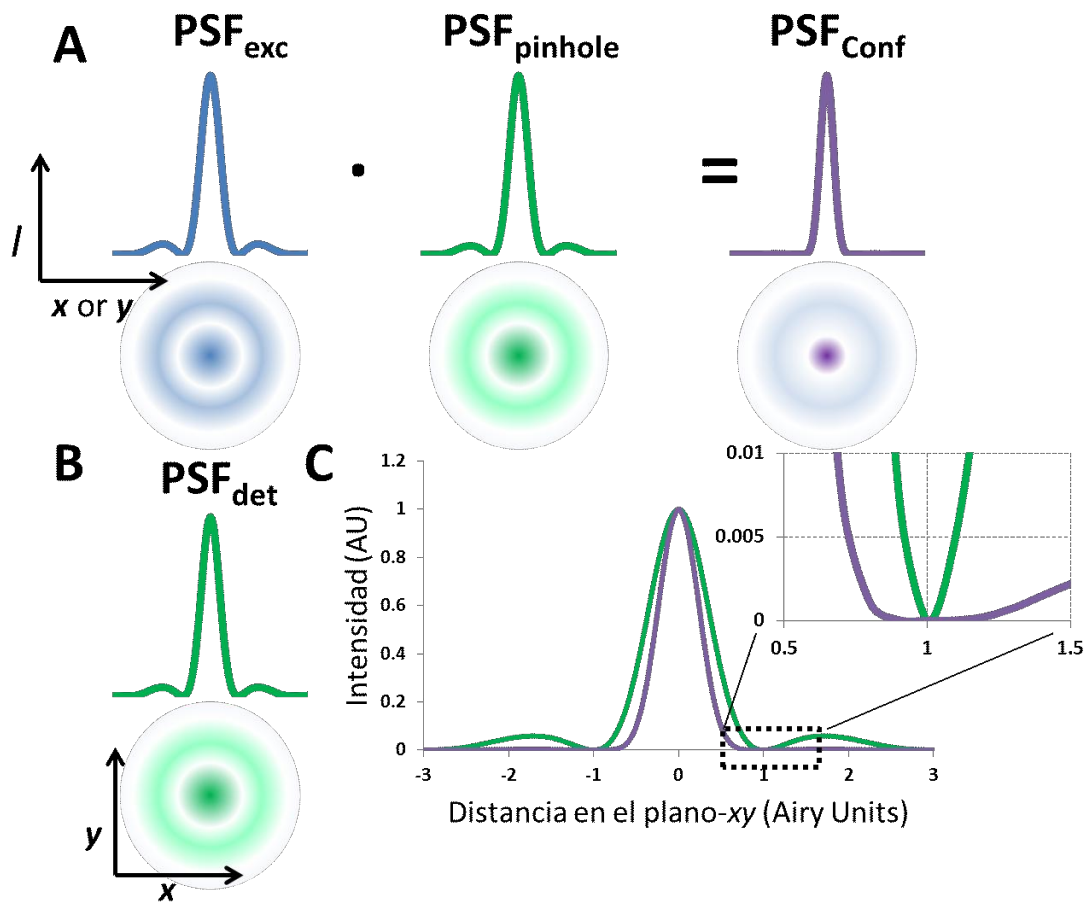


Figura 13.9. Funciones de Distribución Puntual. La Comparación de las PSF efectivas entre el Microscopio Confocal (A) y el Microscopio de Fluorescencia de Campo Amplio (B) se observa en el gráfico C. Cabe destacar que la posición de los mínimos de las PSF efectivas es la misma (ver aumento del gráfico C). El aumento en la resolución del Microscopio Confocal se debe a que su PSF efectiva decae más rápidamente, permitiendo que dos fuentes de fluorescencia puntuales estén más próximas y, aun así, poder seguir distinguiéndolas como independientes según el criterio de Rayleigh. En verde se muestran las PSF de detección de ambos microscopios, en azul se representa la PSF de excitación y en violeta la PSF confocal.

Como ya se mencionó, el aumento en el poder de resolución del LSCM se basa fundamentalmente en la detección confocal que elimina las señales difusas que provienen de los planos fuera de foco. Para comprender mejor este fenómeno debemos introducir aquí la Función de Distribución Puntal (o PSF, *Point Spread Function*) que describe la distribución de intensidad que es creada por un objeto de dimensiones menores al límite de resolución del microscopio. La PSF es en esencia un patrón de difracción que define un volumen tridimensional (Figura 13.9). En el plano-xy, la PSF tiene una forma isotrópica y recuerda a un punto o disco rodeado de aros concéntricos en los que disminuye

gradualmente el máximo de intensidad, también conocido como “Distribución de Airy”. Sin embargo, en el eje óptico la distribución es más alargada, evidenciando la anisotropía del sistema. La imagen se forma de acuerdo a la PSF global del microscopio, que es el producto de la PSF de iluminación (volumen iluminado: imagen proyectada sobre la muestra de la fuente de luz puntual) y la PSF de detección (volumen observado: proyección del *pinhole* sobre el plano focal de la muestra). La resolución espacial del LSCM se define como el ancho a mitad del máximo de intensidad (FWHM), y equivale a la mitad del diámetro del primer aro oscuro de la distribución de Airy. Este valor se conoce como “Unidad Airy”, y depende de la longitud de onda de la luz registrada y del NA del objetivo empleado. Se debe recordar que una unidad Airy en el plano-xy no tiene las mismas dimensiones físicas que en la dirección-z, que de hecho suele ser 2 o 3 veces mayor.

$$PSF_{conf} = PSF_{exc} \cdot PSF_{det}$$

Ec. 13.7

Ya que en el LSCM pueden combinarse los aumentos ópticos debido a las lentes y los aumentos electrónicos o digitales debido a los scanners, es importante comprender qué tanto se puede forzar un sistema, y hasta donde realmente tiene sentido hacerlo. Para ello se recurre al criterio de resolución de Nynquist. De acuerdo al teorema de Nynquist, la separación óptima entre voxels de una imagen debe ser la mitad del límite de resolución teórico. Una imagen registrada con una frecuencia menor pierde detalles respecto a la mejor imagen que puede obtenerse teóricamente (máximo nivel de detalles distinguibles). Del mismo modo, imágenes obtenidas con una frecuencia mayor de voxels contiene mucha información redundante y promueve el fotoblanqueo de los fluoróforos. El mismo razonamiento aplica al eje óptico, la mitad de la profundidad de la sección óptica corresponde a la mínima distancia aceptable entre planos para una reconstrucción 3D. Por ejemplo, para un fluoróforo que emita a 450 nm (DAPI) la resolución lateral sería 160 nm y la resolución axial 580 nm, para un objetivo de **NA** = 1.4 y empleando aceite como medio de inmersión (**n** = 1.515). Según el criterio de Nynquist, los voxels debería tener dimensiones no mayores a 80×80×290 nm³ (xyz). Los scanners de los LSCM

permiten registrar voxels con separaciones mucho menores a estos valores, pero uno debe recordar que la sección óptica corresponde al volumen que emite, y que un volumen mucho mayor de la muestra está siendo excitada por cada voxel registrado, lo que promueve el fotoblanqueo extenso por fuera y dentro del plano focal de toda la muestra. Por tal motivo, no es recomendable disminuir demasiado las dimensiones del voxel y así evitar el *oversampling* que comprometa la relación señal-ruido y, últimamente, la resolución de la imagen. Este es un problema que debe tenerse muy presente al momento de realizar reconstrucciones de imágenes 3D, ya que suele haber una evidente pérdida de intensidad de fluorescencia conforme se repiten los sucesivos planos a lo largo del eje óptico. Por otro lado, si la estructura a ser analizada posee dimensiones cercanas al límite de difracción, como una mitocondria (500 nm), una representación de la misma de 7×7 pixels (*xy*) se verá claramente cuadrículada (o pixelada). Uno podría aumentar la resolución digital, es decir el número de pixels por unidad de área, como para que la imagen tenga una mejor apariencia (contornos más suaves) al ser impresa o proyectada; pero es importante recordar que no se logra un aumento real de la resolución de la imagen ni una ganancia en los detalles distinguibles, que siguen estando limitados por difracción de la luz.

El uso de un *pinhole* elimina una enorme cantidad de luz, que si está disponible en las imágenes de microscopía de fluorescencia convencional. El diámetro del *pinhole* deberá tratar de fijarse lo más abierto posible manteniendo el grado de seccionamiento óptico deseado, y nunca menor a una unidad Airy. Diámetros menores a una unidad Airy producirán una pérdida de luz que no es compensada por ganancia en los detalles observados y aumentará significativamente, en cambio, el ruido de la imagen; lo que últimamente deteriora el poder de resolución del microscopio y la calidad de la imagen. La configuración óptima dependerá del aumento del objetivo empleado, del medio dispersante entre la muestra y el objetivo, de la intensidad de la muestra, su morfología y el fin del ensayo a realizar. Así, por ejemplo, se pueden obtener imágenes nítidas (al mismo aumento y con los mismo fluoróforos) de estructuras bien definidas como centriolos o membranas con el *pinhole* más

abierto que para estructuras espacialmente extendidas, como proteínas con distribución pancelular, proteínas nucleares o del retículo endoplasmático.

Entonces, ¿cuál es la ganancia efectiva en el poder de resolución del LSCM en relación al Microscopio de Fluorescencia de Campo Amplio? Si consideramos el criterio de Rayleigh para distinguir dos objetos con dimensiones inferiores al límite de difracción como entidades distintas, es necesario identificar una caída de al menos el 20 % en la suma de sus PSF. Esto coincide con el máximo de la PSF del primer objeto solapándose con el primer mínimo de la PSF del segundo. El LSCM emplea la PSF global del microscopio (PSF_{cont}), que es mucho más acotada y pronunciada que la PSF de detección solamente, como en el caso de la microscopía convencional. Esto permite que los dos objetos se encuentren un 40% más cerca (linealmente) en una muestra observada en el LSCM para ser distinguidos respecto a un microscopio convencional. Si extendemos esta mejora a las 3 dimensiones espaciales, obtenemos que el aumento de resolución tridimensional del LSCM es casi 3 veces la del microscopio compuesto (Figura 13.10).

Una de las limitaciones más importantes del LSCM es el tiempo necesario para registrar secuencialmente cada voxel de una imagen. Por tal motivo, es importante definir, según los criterios anteriormente mencionados, la distancia entre voxels (en $xyzt$) para optimizar el tiempo de registro de una imagen. Cuando se desea obtener una imagen de más de un canal (λ), además del tiempo de lectura, es necesario invertir tiempo entre cada imagen para reconfigurar los filtros y dicroicos para cada fluoróforo. Esto puede limitar considerablemente la posibilidad de realizar estudios dinámicos, dependiendo de la velocidad del proceso en estudio y de la combinación y el número de fluoróforos necesarios. Para evitar estos inconvenientes, los LSCM cuentan por lo general con más de un detector, que a su vez pueden tener capacidades espectrales ajustables a distintos fluoróforos. Esto es posible gracias a la combinación de más de una línea de excitación láser en el haz de luz incidente mediante el uso de filtros dicroicos de forma inversa a la presentada anteriormente. En este caso, el láser de mayor λ atraviesa el dicroico sobre el que se hace reflejar el láser de menor λ de forma tal que queden alineados y se

enfoquen simultáneamente sobre la muestra. Si los fluoróforos y los láseres se eligen correctamente, quedará aún suficiente ancho en las ventanas libres como para registrar la fluorescencia independiente de hasta 4 fluoróforos simultáneamente.

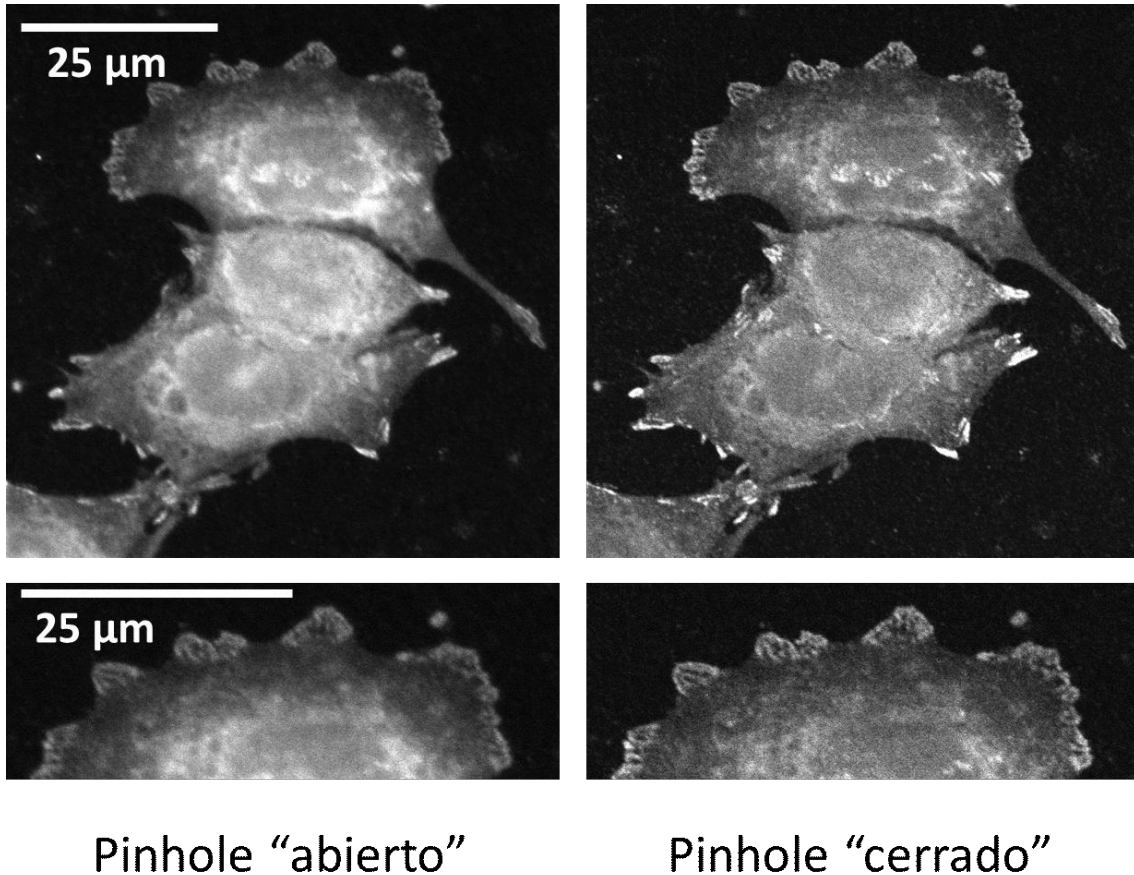


Figura 13.10. Comparación en la resolución del microscopio confocal con el Pinhole completamente abierto o bien ajustado (“cerrado”). Las imágenes corresponden a células MCF7 fijadas con paraformaldehído y reveladas por inmunohistoquímica con un anticuerpo anti-Integrina unido a Alexa-Fluor555. Las imágenes se obtuvieron empleando un objetivo 60X. En los paneles de la izquierda se distingue la luz proveniente de planos fuera de foco, en comparación con las imágenes de los paneles derechos, para los cuales el pinole se ajustó al mínimo valor para obtener la imagen confocal propiamente dicha.

Los últimos desarrollos en Acusto-Óptica se han transformado en Filtros Sintonizables Acusto-Ópticos o AOTF (de sus siglas en inglés, *Acousto-Optic Tunable Filter*) de gran utilidad en microscopía posibilitando el rápido cambio de λ seleccionadas al eliminar el tiempo necesario para hacer rodar una rueda de filtros. Los AOTF se basan en el cambio del índice de refracción (n) debido a ondas de presión que atraviesan el cristal de cuarzo en dirección perpendicular

a la dirección de incidencia del haz de luz entrante. Esto produce la deflexión de la luz a diferentes ángulos en función de su longitud de onda y de la frecuencia de oscilación al salir del cristal. Los AOTF se emplean comúnmente en microscopía en lugar de filtros, pero también resultan de gran utilidad en lugar de espejos dicróicos permitiendo separar o combinar haces de luz de distintas longitudes de onda. En este caso se los denomina AOBS (*A**cousto-**O**ptic* *B**e**a**m* *S**p**l**i**t**t**e**r*).

Otra de las ventajas que aún no discutimos del LSCM es la capacidad de obtener una representación tridimensional de la célula o de sus componentes. Las imágenes tridimensionales (3D) de un objeto se reconstruyen registrando imágenes confocales a distintos planos focales moviendo la muestra con precisión a lo largo del eje óptico, y abarcando así la profundidad completa de la estructura a ser analizada. Para llevar adelante este proceso es necesario contar con una platina motorizada que cuenta con piezoeléctricos de alta precisión (menor a 0.25 μm). La obtención de las imágenes se realiza como se describió anteriormente, pero se repite en forma secuencial mientras se traslada el plano focal en relación a la muestra. De este modo, se obtiene una pila o *stack* de imágenes confocales, donde la distancia Δz entre imagen e imagen representa la distancia entre planos focales. Cabe recordar que el LSCM no registra imágenes de forma isotrópica. Es decir, el poder de resolución en la dirección-z es inferior al poder de resolución en el plano-xy. Objetos de dimensiones inferiores al límite de difracción (<200 nm) serán registrados como elipsoides con un eje 2.5 a 3 veces mayores en la dirección-z que en el plano-xy.

Como mensaje final relacionado a la reconstrucción de imágenes 3D vamos a hacer una corta introducción al análisis por deconvolución de señales, por el cual una señal compleja puede descomponerse en una combinación lineal de varias señales simples. Este procedimiento se emplea en la mayoría de las técnicas espectroscópicas para distinguir la contribución individual de distintos componentes. En el caso de imágenes de un LSCM, la deconvolución de las señales de intensidad de fluorescencia no es sólo necesaria sino esencial si uno se propone realizar cualquier tipo de análisis cuantitativo. Trabajando

según el criterio de Nyquist, las PSF de dos voxels continuos se solapan, encontrando en cada uno información (intensidad de fluorescencia) proveniente del voxel continuo. La deconvolución reconstruye las señales originales de cada voxel y elimina el ruido y las contaminaciones de los voxels continuos. Este proceso es fundamental en la reconstrucción de las imágenes 3D, ya que la contaminación por voxels fuera de foco es más importante.

13.7. Variantes de Microscopios

Teniendo en cuenta las limitaciones de LSCM y de la microscopía de fluorescencia convencional, se han desarrollado una serie de variantes con múltiples modificaciones en la forma de iluminar la muestra. Entre ellas se destaca el Microscopio de Fluorescencia por Reflexión Total Interna (TIRFM), el Microscopio de Iluminación Estructurada (SIM), Microscopio de Disco Rotativo (o Spinning-Disk Microscope) y el Microscopio Multifotónico Confocal (coloquialmente denominado: 2-Fotones).

- Microscopía por Reflexión Total Interna (TIRF): El principal inconveniente del microscopio de fluorescencia de campo amplio es la contaminación de fluorescencia emitida de planos fuera de foco que se mezclan. La Microscopía por Reflexión Total Interna (TIRF, *Total Internal Reflection Microscopy*) es una de las técnicas desarrolladas para evitar este inconveniente. La técnica se fundamenta en la generación de una onda evanescente en la interface entre el portaobjetos y la muestra, y que sólo penetra unas pocas decenas de nanómetros (usualmente menos de 200 nm) dentro de esta última. La onda evanescente se obtiene haciendo incidir un haz de luz sobre el espécimen con un ángulo equivalente o superior al ángulo crítico a partir del cual el haz es completamente reflejado en la interface entre el cubreobjetos y la muestra (Figura 13.11). De esta forma se logra un seccionamiento óptico al excitar únicamente los fluoróforos que están dentro del rango de alcance de la onda evanescente, la cual decrece en intensidad rápidamente. Del mismo modo, esta es también la limitación más importante de esta técnica, ya que sólo

permite estudiar moléculas y procesos cercanos a la membrana plasmática basal, como por ejemplo los focos de adhesión o la fusión de vesículas a la membrana basal.

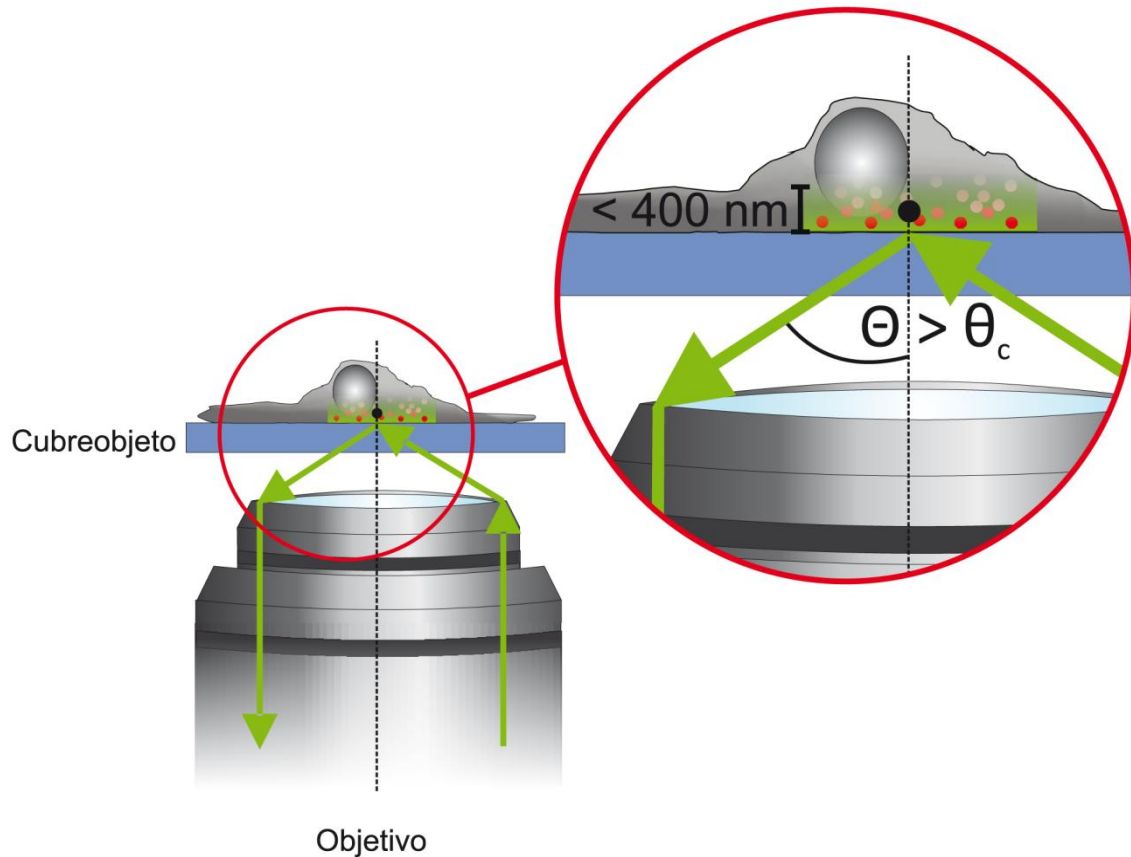


Figura 13.11. *Microscopía de Fluorescencia por Reflexión Total Interna (TIRFM).* Esta variante del Microscopio de Campo Amplio aprovecha la generación de una onda evanescente obtenida por reflexión total interna haciendo incidir la luz de excitación con un ángulo mayor al ángulo crítico (θ_c). De este modo, se logra un seccionamiento óptico de unos pocos cientos de nanómetros; suficiente como para estudiar procesos que se llevan a cabo en la cercanía de la membrana basal de células en cultivo, como la secreción de vesículas o la endocitosis de receptores de membrana.

- Microscopía por Iluminación Estructurada (SIM): Existen distintos equipos que se basan en el uso de la iluminación estructurada (Structured Illumination Microscopy) para obtener un aumento en la resolución espacial de un microscopio de fluorescencia de campo amplio. Uno de los primeros diseños empleaba la interferencia de dos haces coherentes para generar un patrón de interferencia sobre el plano focal. Rotando este patrón se registran varias imágenes que se recombinan teniendo en cuenta los patrones de iluminación para regenerar la imagen con la representación de la muestra con todos los detalles distinguidos. El aumento en la resolución se debe al uso de una

iluminación no uniforme, lo que genera una PSF de excitación más discreta, aunque no tan acotada como en el caso de la de LSCM. El patrón de iluminación empleado define el aumento en la resolución obtenido, pero esta técnica tiene el inconveniente de que se requieren obtener varias imágenes parciales que deben combinarse para obtener una imagen completa, sin acercarse demasiado a la resolución del microscopio confocal.

- Spinning-Disk Microscope: En este caso se recurre a múltiples puntos de iluminación para excitar los fluoróforos de forma discreta en el espacio. Esto se logra empleando una fuente de luz convencional para fluorescencia, pero interponiendo un disco con múltiples *pinholes*. Al hacer rotar el disco la PSF de excitación producida por cada *pinhole* recorrerá una parte de la muestra mientras se registra la fluorescencia en una cámara digital. A fines prácticos, el sistema funciona como si muchos LSCM funcionaran en paralelo sobre la misma muestra, aunque las PSF no resultan completamente independientes. El diseño del disco con orificios (Disco de Nipkow) debe ser optimizado para minimizar el solapamiento de las PSF de cada *pinhole*, ya que éste es el factor determinante del seccionamiento óptico del equipo.

- Microscopio Multifotónico Confocal: La técnica se basa en el fenómeno muy poco probable pero cuánticamente permitido de absorción conjunta de dos o más fotones. La energía aportada por todos los fotones absorbidos simultáneamente debe corresponder a la energía necesaria para producir el salto a estados excitados del fluoróforo, del mismo modo que en el fenómeno de fluorescencia clásico lo aporta un único fotón. De este modo, durante la absorción conjunta de dos fotones, la energía aportada por cada fotón debe ser la mitad de la necesaria o, lo que es lo mismo, su longitud de onda debe ser el doble de la que tendría un único fotón con la totalidad de la energía necesaria. Análogamente, en el caso de la absorción conjunta de 3 fotones, cada uno debe aportar un tercio y poseerían tres veces la λ del fotón único que produciría el mismo efecto. Sin embargo, aunque este fenómeno tiene una probabilidad no nula, esta es muy baja, y aún menor para el caso de la absorción simultánea de 3 fotones. Por lo tanto, debe recurrirse a un láser que emite en el IR en forma pulsátil y con muy alta intensidad. El hecho de que la

emisión del láser sea pulsátil, permite concentrar no sólo espacialmente sino también temporalmente los fotones en el volumen iluminado. La PSF efectiva para la excitación de un fluoróforo por la absorción de dos fotones está definida por la PSF de iluminación por un factor de probabilidad que depende de la PSF de iluminación. Esto limita naturalmente la excitación de los fluoróforos sólo a un volumen muy restringido en el plano focal. De este modo se logra un seccionamiento óptico, sin necesidad de intercalar un *pinhole* previo al detector. A fines prácticos, el Microscopio Multifotónico funciona en forma equivalente al LSCM, con la ventaja de que al emplear radiación IR presenta una capacidad de penetración de tejidos mucho mayor al LSCM convencional, unos milímetros vs. unos cientos de micrones. Por tal motivo, el Microscopio de 2-Fotones, aunque un poco más costosa, es la herramienta de elección preferida para estudios *in vivo*. Además se minimiza el daño por fototoxicidad, pero hay que tomar precauciones por el calentamiento de la muestra.

13.8. Rompiendo la Barrera de Difracción: Nanoscopías de Fluorescencia

En la última década se han desarrollado variantes de las técnicas microscópicas que brindan resoluciones espaciales del orden de unas pocas decenas de nanómetros (<70nm), llamativamente menores al límite de difracción mencionado anteriormente. Estas técnicas se conocen en su conjunto como Nanoscopías de Fluorescencia, para distinguirlas de otras Nanoscopías de sondas como el Microscopio de Fuerza Atómica (AFM) o el Microscopio Electrónico. Las Nanoscopías de fluorescencia se basan en la detección selectiva de unos pocos fluoróforos por vez. Se distinguen dos grandes grupos. Por un lado tenemos la Microscopía Confocal con Depleción Estimulada de la Emisión (STED), que es una técnica de barrido; y por el otro tenemos las técnicas estocásticas, como STORM o PALM. Todas estas técnicas pueden conciliarse bajo el concepto de Fluorescencia de Transiciones Reversibles Saturables o Intercambiables (RESOLFT, Reversible

Saturable/Switchable Optical Fluorescence Transitions) (Hofmann, 2005; Patterson, 2009). RESOLFT hace referencia a la capacidad de los fluoróforos de cambiar de estado entre uno en el que puede ser excitado y emitir fluorescencia, y otro en el que no es fluorescentemente activo o no puede excitarse. Esto permite mantener “apagados” a la gran mayoría de los fluoróforos mientras se “interroga” a unos pocos permitiendo distinguir detalles que de otro modo quedaría perdido en el solapamiento de las señales de fluorescencia simultánea. En el caso de STED esto se logra separando espacialmente a los fluoróforos analizados mediante un microscopio confocal; mientras que en STORM y PALM se los separa temporalmente mientras se registran múltiples imágenes completas en una cámara digital.

- STED: La técnica de STED es en esencia una microscopía confocal, con la salvedad de que se emplean dos láseres pulsátiles para la excitación que disparan desfasados una fracción de nanosegundo ($<10^{-9}$ seg). El segundo láser (láser STED o láser de depleción) es moldeado de forma tal que su PSF tiene forma de dona o anillo, y además tiene la función de estimular la emisión de los fluoróforos excitados con el primer láser a una longitud de onda que está fuera de la ventana registrada como fluorescencia (Figura 13.12) (Hell, 1996; Hell, 2007). La emisión estimulada es el mismo fenómeno presente en el origen de la emisión láser. La superposición de la PSF de depleción a la PSF confocal y la de PSF excitación generan una PSF global con dimensiones menores a la PSF_{conf} . Como este fenómeno depende de la intensidad del láser STED, las dimensiones de la PSF_{STED} también son ajustables variando la intensidad del segundo láser. La resolución del STED-LSCM puede variar desde la resolución del LSCM convencional (sin láser STED) y disminuir hasta alcanzar unos 30 nm en condiciones de saturación del láser STED. Sin embargo, el STED-LSCM tiene algunos inconvenientes que deben mencionarse más en detalle. Por un lado, el STED-LSCM presenta las mismas limitaciones que un LSCM convencional en cuanto al tiempo de lectura necesario para obtener una imagen.

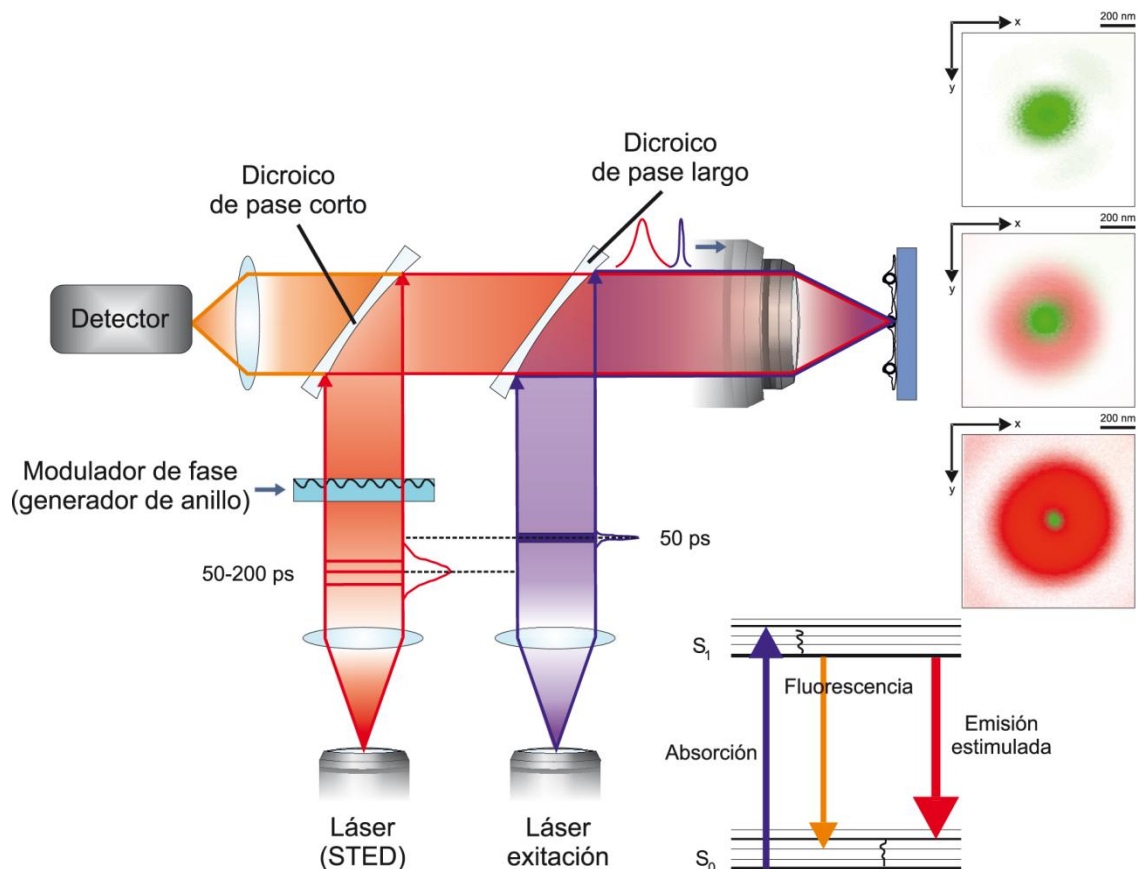


Figura 13.12. *Microscopía de Fluorescencia Confocal con Depleción Estimulada de la Emisión (STED).* Esta variante del Microscopio Confocal recurre a la emisión estimulada de los fluoróforos en un rango del espectro distinto al que se emplea para registrar la fluorescencia residual. El aumento en el poder de resolución de esta técnica reside en la forma de anillo que se le da al segundo láser (láser STED) que evita la emisión en gran parte del volumen confocal excitado, quedando únicamente la región central de la PSF_{conf} como volumen de observación efectivo. En el gráfico se muestra un esquema que ejemplifica el funcionamiento del Microscopio STED, y cómo el aumento de la intensidad del láser STED (anillo rojo) permite regular el poder de resolución (dimensiones de la PSF_{conf} efectiva (verde)).

Por otro lado, la necesidad de emplear una intensidad muy alta del láser STED sobre los fluoróforos en el estado excitado, cuando éstos son especialmente sensibles y tienen una gran tendencia a degradarse, implica que el fotoblanqueo sea demasiado grande, impidiendo a veces repetir la lectura e incluso obtener imágenes 3D o secuencias temporales. Por tal razón la técnica se restringe a un selecto grupo de fluoróforos que presentan una estabilidad inusual, como el Atto647N (Atto Tec, Alemania). Lamentablemente, no hay muchas proteínas fluorescentes aptas para STED, por lo que la técnica se emplea casi exclusivamente con muestras fijadas. Aun considerando estas

limitaciones, la técnica de STED-LSCM es relativamente joven y existen varios grupos trabajando activamente para expandir las posibilidades y aplicaciones.

- STORM: En la técnica de STED se logra aumentar la resolución al poder seleccionar espacialmente en forma más eficiente los fluoróforos idénticos que coexisten dentro en la muestra en un volumen menor al de la PSF de detección. Otra alternativa está representada por la técnica de Microscopía por Reconstrucción Óptica Estocástica (STORM, *Stochastic Optical Reconstruction Microscopy*) (Bates, 2005), en la que los fluoróforos se diferencian temporalmente al ser “activados” aleatoriamente. La técnica se basa en la inducción de un estado “oscuro” en la mayoría de los fluoróforos, generalmente un estado triplete inducida por agentes reductores y que no emite fluorescencia, pero puede ser también una transición química cis-trans o similares. Los pocos fluoróforos activos durante cada imagen registrada (idealmente una única molécula a la vez) se excitan normalmente y se registra su fluorescencia en una cámara digital. Si bien la emisión de una molécula individual se difracta unos 200 a 400 nm en el plano-xy y de 500 a 800 nm en el eje óptico, la señal de fluorescencia será registrada en más de un pixel por el sensor CCD. Basada en la distribución de intensidades registradas por cada fluoróforo, la localización de la molécula emisora puede ser determinada con alta precisión si los fluoróforos utilizados emiten un número suficiente de fotones. Por cada molécula se determina un punto en la imagen que corresponde al pico central de la distribución de luz en la PSF del fluoróforo. Si estas moléculas no se superponen, se puede localizar la posición del emisor mediante un ajuste bigaussiano con una precisión de hasta 1 nm en el plano-xy. La localización sucesiva y con alta precisión de fluoróforos individuales se emplea para reconstruir imágenes de resolución muy por debajo del límite de difracción, llegando incluso a resoluciones de 10 nm (Figura 13.13). Para lograr una detección individual de emisores en STORM se utilizan fluoróforos que pueden ser prendidos y apagados estocásticamente por pasar de un estado fluorescente a un estado "oscuro", pero además tienen que emitir un número importante de fotones ya que de esto depende la precisión en su localización. Dentro de las moléculas que cumplen estas características y

que se utilizan en STORM, podemos nombrar a la proteína YFP, y a moléculas orgánicas comerciales como Cy5, Alexa-647, entre otros. Por ejemplo, el Cy5 puede ser llevado al estado "oscuro" con un láser de 633 nm (el mismo láser que produce su emisión fluorescente) y nuevamente al estado fluorescente con un láser de 532 nm. El grado de detalle de una imagen STORM depende del número de localizaciones determinadas. Con una cámara CCD se toman imágenes sucesivas en las que en cada una de ellas se detectan unas pocas moléculas individuales. El tiempo de exposición de cada foto de la serie y la duración del tiempo de exposición deben ser ajustados tratando de detectar, por imagen, el mayor número de moléculas posible sin superposición entre las PSF de cada fluoróforo. Esta técnica permite combinar varios fluoróforos para lograr la detección simultánea de diferentes marcaciones y puede lograrse mayor resolución en el eje-z combinándola con TIRFM. Sin embargo, la principal desventaja es el tiempo necesario para la adquisición serial de imágenes que permita lograr una reconstrucción representativa del campo estudiado. Por esta razón, la técnica de STORM es mucho más lenta que STED, LSCM o la microscopía de fluorescencia de campo amplio, pudiendo requerir hasta más de media hora para obtener una única imagen STORM. Por esta razón, generalmente, no resulta compatible con la observación dinámica de procesos en células vivas.

2 μm



Figura 13.13. Imagen STORM de mitocondrias aisladas de células SH-SY5Y. Las mitocondrias aisladas fueron adsorbidas sobre un cubreobjetos con una cubierta de poly-L-Lisina y fijadas con paraformaldehído. La presencia del marcador de membrana externa TOM20 fue revelada por inmunofluorescencia basada en un anticuerpo específico contra esta proteína. En rojo se observan dos imágenes de fluorescencia de campo amplio, y en blanco las imágenes STORM de localización superpuestas a las de campo claro.

- PALM: Este es el acrónimo de Microscopía por Localización Foto-Activada (*Photo-Activable Localization Microscopy*) (Hess, 2006; Betzig, 2006). Esta técnica es análoga a la antes descrita, pero se basa en la fotoactivación secuencial de moléculas aisladas que pueden ser reconocidas y localizadas con gran precisión ajustando una distribución de intensidad que estime su posición. Una vez activado un fluoróforo se trata de obtener toda la información (fotones) que éste pueda emitir, hasta que se degrade y quede en un estado ópticamente inerte para la detección por fluorescencia antes de “encender” el siguiente fluoróforo. Todos los fotones registrados por ciclo se suponen inicialmente que provienen de un único fluoróforo (o unos pocos) y se ajusta una distribución bigaussiana (en xy) a la imagen de dicho fluoróforo para determinar su posición (máximo de la distribución). Al igual que en STORM, es necesario una gran cantidad de iteraciones a fin de poder reconstruir una imagen con suficientes detalles, por lo que nuevamente estamos limitados casi exclusivamente a muestras fijadas.

Los algoritmos para STORM y PALM actuales pueden lidiar con unos pocos fluoróforos activos al mismo tiempo, ajustando múltiples distribuciones bigaussianas en paralelo, lo que acelera notablemente el proceso de adquisición de datos y reconstrucción de la imagen (Huang, 2011). Existen varios ejemplos de aplicaciones en células en cultivo, pero el problema fundamental es lograr introducir los quenchers (STORM) o los fluoróforos (PALM) selectivamente dentro de las células. En este sentido, se han desarrollado varias proteínas fluorescentes fotoconvertibles que posibilitan el uso de PALM *in vivo* y en células en cultivo. Pero algunos autores también han logrado emplear la técnica de STORM dentro de las células recurriendo a sondas fluorescentes y a agentes reductores naturales o permeables. Al igual que en el caso de STED, estas técnicas son muy recientes y siguen desarrollándose año a año; así como otras técnicas que no hemos tenido tiempo de desarrollar en este capítulo, pero que cada vez son más populares, como 3D-SIM, Microscopía-4Pi o PAM (*Programmable Array Microscopy*).

13.9 Aplicaciones: Biofísica en el Microscopio

Las técnicas microscópicas se han convertido en una herramienta fundamental de los laboratorios de diagnóstico y de investigación. Además, la posibilidad de adaptar un gran número de las técnicas espectroscópicas al formato del microscopio permite evaluar una gran variedad de propiedades moleculares junto con su variación y su distribución dentro de la célula. Información a nivel molecular, macromolecular, de organelas y membranas, células y tejidos, volcada sobre representaciones tridimensionales de células y tejidos, e incluso su dinámica y evolución temporal, todos ellos combinados y escalables en la misma herramienta. Todo un sinfín de posibilidades para estudiar distintos procesos biológicos es lo que ofrece la microscopía. Mencionaremos a continuación sólo unos pocos ejemplos.

- Observación Directa de Células Fotosintéticas: En la observación directa de un preparado vegetal de hojas verdes al microscopio óptico (transmisión de luz blanca) pueden distinguirse sencillamente las células fotosintéticas de aquellas que cumple funciones de sostén o transporte de sustancias, ya que las primeras poseen una coloración natural por la clorofila y demás pigmentos de los fotosistemas. Además, estas muestras también presentan un alto nivel de autofluorescencia, sobretodo en el rango de 450 a 750 nm, por la emisión de los distintos pigmentos de las antenas (clorofilas, xantenos y carotenos). Este es un ejemplo sencillo que no necesita mayores preparativos para poder analizar a grandes rasgos la estructura del tejido e incluso permite reconocer los cloroplastos. Más aún, simulando distintas condiciones de iluminación, uno podría observar y registrar el movimiento de los cloroplastos dentro de las células fotosintéticas, un proceso dependiente de energía (ATP) conocido como ciclosis. Sin embargo, es complicado realizar ensayos de fluorescencia en tejidos verdes de plantas debido a la contaminación por la autofluorescencia, ya que uno debe poder diferenciarla (espectralmente, por el tiempo de vida de fluorescencia, etc.) de la señal específica buscada.
- Células Vivas o Células Muertas: Uno de los procesos celulares más estudiados es el metabolismo celular. Existen varias sondas que permiten

diferenciar una célula viva de una muerta, o cuantificar la capacidad metabólica de las células. Por ejemplo, podemos reconocer células vivas por la exclusión de colorantes vitales como el Azul de Trypán. Sin embargo, cuando la vitalidad de una célula está comprometida, su capacidad de bombear activamente el colorante fuera de la célula se ve afectada y la célula comienza a teñirse de azul (Figura 13.14A). Este ensayo es de uso frecuente en los laboratorios de biología celular y permite estimar la proporción de células vivas y muertas que uno recupera al subcultivar un cultivo de células animales. Del mismo modo, la actividad metabólica de las células puede estimarse por la acción de enzimas esterazas citoplasmáticas. Incubando las células con el fluoróforo permeable a membranas Diacetato de Fluoresceína, las esterazas podrán actuar sobre los enlaces éster y removerán los grupos acetato dotando a la fluoresceína de dos cargas negativas que no permitirán que escape fácilmente del citoplasma y vuelva a diluirse en el medio. Este ensayo es análogo al anterior, pero ahora las células vivas serán las teñidas con fluorescencia verde ($\lambda_{Exc} = 488 \text{ nm}$; $\lambda_{Em} = 530 \pm 20 \text{ nm}$), y las células muertas serán las que no presenten señal.

- Sondas con Afinidades Específicas por Tipos de Células u Organelas:

Algunos colorantes y sondas fluorescentes presentan una afinidad particular por determinados componentes o compartimentos celulares. Podemos mencionar, por ejemplo, los colorantes como Giemsa, Hematoxilina y Eosina que son colorantes con propiedades ácido-base y reconocen selectivamente estructuras o componentes catiónicos o aniónicos, siendo de gran utilidad en histología de tejidos y ensayos citogenéticos como el bandeo G de cromosomas. Las sondas fluorescentes Bromuro de Etidio, Hoechst o DAPI presentan gran afinidad por el ADN y tiñen fuertemente la matriz del núcleo celular. Por otro lado, sondas como Rodamina 123, tetrametilrosamina o sondas de la familia de las carbocianinas (MitoTrackers, Life Technologies/Molecular Probes) presentan una gran afinidad por mitocondrias funcionales. Algunas carbocianinas además quedan unidas covalentemente luego de la fijación con aldehídos gracias a grupos clorometilos que reaccionan moderadamente con tioles reactivos logrando una tinción muy específica y resistente de las mitocondrias en células vivas, tanto para ensayos dinámicos

como para aquellos preparados que serán fijados para ser combinados con inmunofluorescencia. En la Figura 13.14B se muestra un ejemplo de una imagen de dos canales fluorescentes correspondiente a una célula animal tenida con dos sondas fluorescentes con afinidades específicas por el núcleo (DRAQ5: rojo) o vesículas sináptica dopaminérgicas (FFN511: verde). En la misma figura se muestra como referencia de fondo un tercer canal correspondiente a la imagen de DIC de las mismas células.

- Inmunofluorescencia: La introducción de la inmunomarcación, uno de los ejemplos más notables de aplicaciones prácticas más versátiles, amplió considerablemente las capacidades de generar contraste específicamente de los objetos de estudio, como por ejemplo detectar proteínas, estructuras subcelulares, marcadores de membrana o patógenos, solo para nombrar algunas posibilidades. La marcación es basada en el uso de anticuerpos que reconocen solo epitopes específicos, pudiendo incluso diferenciar entre isoformas muy similares o incluso dos estados de fosforilación distintos de una misma proteína, análogamente a su uso en la técnica de western blot. Sin embargo, uno debe tener en cuenta que los anticuerpos que funcionan correctamente en membranas, no siempre son los mejores para su uso en Inmunofluorescencia (IF). Estas diferencias se deben normalmente a que en un western blot las proteínas se encuentran desplegadas y aisladas de otros componentes con los que interactúan. En IF, sin embargo, las células deben permeabilizarse previa fijación para lograr que los anticuerpos atraviesen distintas barreras membranosas; a menos que se detecten marcadores de membrana plasmática, como en la separación de células activada por fluorescencia (FACS) en citometría de flujo. La fijación se logra con agentes entrecruzantes (o *crosslinkers*), como formaldehído o glutaraldehído, o mediante la deshidratación con metanol. La fijación resulta del entrecruzamiento químico de las proteínas, lo que las mantiene en su ubicación original y más próxima a su conformación nativa, aunque con modificaciones químicas. Esto condiciona su reconocimiento por anticuerpos que solo tienen acceso a los epitopes superficiales. Pero, si los anticuerpos están bien seleccionados, uno puede distinguir una única proteína en un entorno muy

complejo con miles de proteínas distintas, aunque la abundancia de la proteína de interés sea muy baja. Así, por ejemplo, podemos identificar proteínas específicas de fracciones subcelulares en células neuronales en cultivo fijadas con formaldehído y permeabilizadas con detergentes no iónicos (Triton X-100). En la Figura 13.14C se muestran células SH-SY5Y reveladas con un anticuerpo anti-Lamp1 (marcador de lisosomas) y anti-alfa-Sinucleína (proteína soluble citosólica y asociada a membrana). En la misma figura se muestra, como referencia, la señal de una sonda afín por el ADN nuclear (DRAQ5).

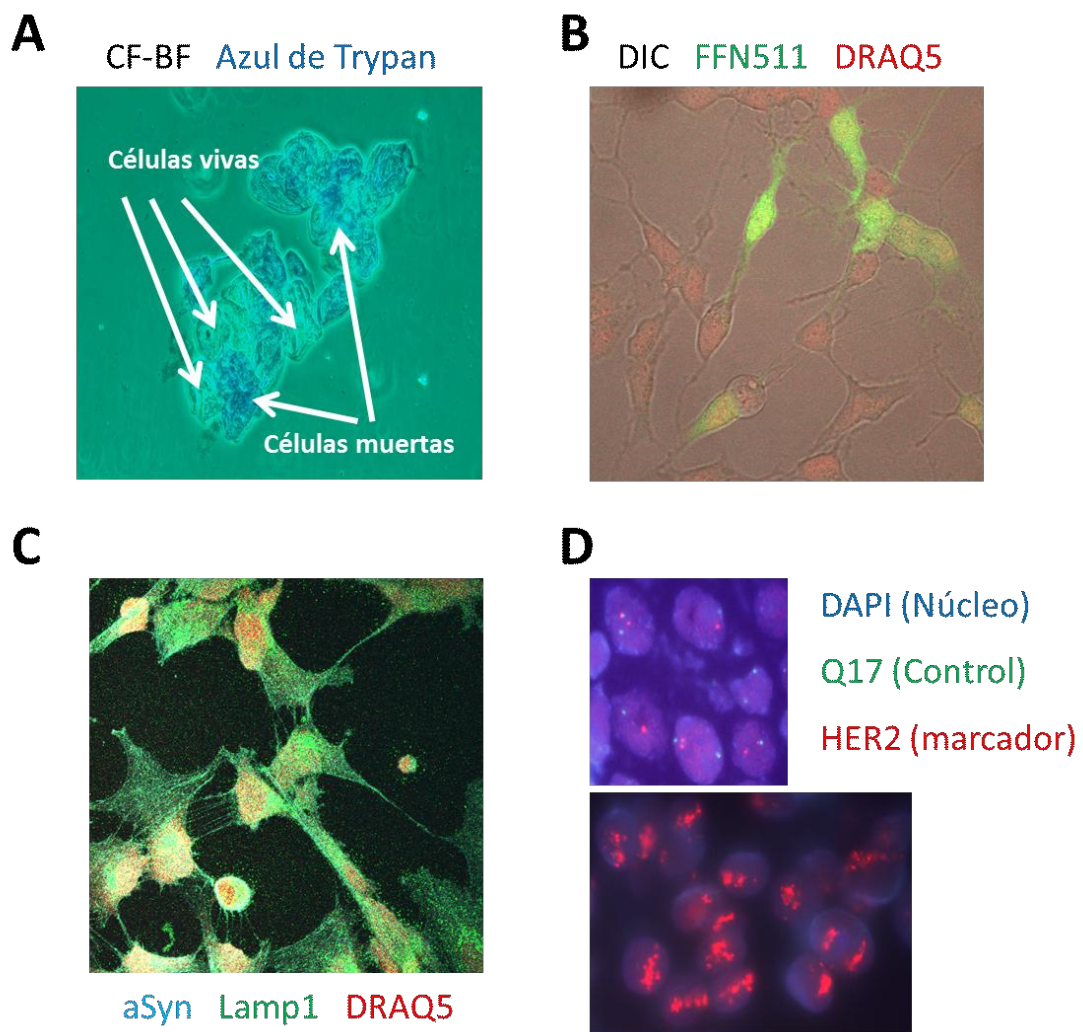


Figura 13.14. Ejemplos de aplicaciones de las técnicas de Microscopía Óptica. (A) Exclusión de Azul de Trypan como marcador vital. (B) Tinción de células vivas con colorantes con afinidades por estructuras subcelulares. (C) Inmunofluorescencia de proteínas específicas. (D) Detecciones aberraciones cromosómicas por FISH. Ver detalles sobre cada imagen en el texto.

- Sondas de Ácidos Nucleicos (FISH): La especificidad lograda por los anticuerpos al reconocer proteínas es equivalente a la lograda por sondas de ácidos nucleicos para reconocer secuencias de nucleótidos o estructuras moleculares. La técnica de Fluorescencia por Hibridación *In Situ* (FISH, *Fluorescence In Situ Hybridization*) es una herramienta común de diagnóstico citogenético ya que tiene varias ventajas respecto al bandeo cromosómico. Por ejemplo, la identificación de secuencias específicas permite determinar polisomías o traslocaciones cromosómicas identificando el origen de los cromosomas extras o modificados. Mucho más notable es su capacidad de identificar modificaciones de menor tamaño, como la amplificación de una región pequeña de un cromosoma por duplicaciones en tándem (Figura 13.14D). Estas aberraciones cromosómicas suelen estar asociadas a distintos trastornos hereditarios y al desarrollo de Cáncer, por lo que su identificación reviste relevancia diagnóstica y pronóstica irremplazable para algunas formas de esta enfermedad, ya sea para definir la sensibilidad a distintos tratamientos y/o para el seguimiento de la enfermedad y la respuesta al tratamiento.

- Interacción entre proteínas por FRET: En el Capítulo 2 se describió la técnica de FRET en detalle, así como el desarrollo de las Proteínas Fluorescentes (FPs, *Fluorescent Proteins*) con distintas propiedades foto-físicas y espectrales. Asimismo, en el Capítulo 11 se describió el uso de esta técnica para estudiar específicamente interacciones entre proteínas. En esta oportunidad aprovecharemos las propiedades del fenómeno FRET para caracterizar la interacción funcional o cambios conformacionales de un bioindicador FRET en relación a la estructura de la célula. Estos ensayos están basados en el uso de proteínas marcadas genéticamente con FPs, como por ejemplo el par CFP-YFP o GFP-RFP (Goedhart, 2011). Esta técnica permite evidenciar cambios conformacionales o de distancia cuando las FPs se encuentran en un rango de 1 a 10 nm. En el caso de dos proteínas interactuantes (con dimensiones entre 1 y 5 nm), podemos evidenciar su interacción dentro del rango de sensibilidad del par FRET, que es mucho más real que la simple colocación confocal, en la que no es posible distinguir

entre 1 a 250 nm de distancia (límite de difracción). En el caso de biosensores FRET, como el conocido sensor codificado genéticamente de calcio *Cameleon* en sus diferentes versiones (Yamada, 2011), los cambios de concentración de un ligando (ion, metabolito intermedio o fosforilación de proteínas) inducen cambios conformacionales del biosensor que modifican la distancia relativa y/o la orientación de ambas PFs modificando su r y κ^2 . Los cambios relativos pueden cuantificarse y calibrarse con una curva de concentración del ligando para poder luego estimar la disponibilidad del ligando intracelular. De forma análoga se estudia la interacción entre dos proteínas, fusionándolas independientemente a cada una de las FPs del par FRET (Adjobo-Hermans, 2011; Goedhart, 2011). Si ambas se sobreexpresan en la misma célula, es posible evidenciar la interacción entre ambas registrando la Fluorescencia del donador FRET en ausencia y presencia del aceptor FRET (Jares-Erijman, 2003; Jares-Erijman, 2006), o mediante la disminución del tiempo de vida del donador en presencia del aceptor FRET (Klarenbeek, 2011).

- FLIM-FRET: Los ensayos en los que se modifica el tiempo de vida media de un fluoróforo (τ) no así como sus otras propiedades espectrales, como FRET u homo-FRET, pueden estudiarse monitoreando los cambios en el tiempo de desexcitación del fluoróforo (*lifetime*, τ). En el caso de ensayos tipo FRET, donde la presencia del fluoróforo aceptor o un *quencher* disminuye el τ del fluoróforo dador, la técnica se conoce como FRET-FLIM (Gadella, 1995; Klarenbeek, 2011; Padilla-Parra, 2012), ya que se recurre a un microscopio en el que puede medirse el fenómeno de FRET mediante tiempos de vida de fluorescencia. Existen dos tipos de microscopios FLIM (*Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy*), los que trabajan en el dominio de tiempos y los que lo hacen en el dominio de frecuencia. En el primer caso se recurre a una fuente de luz pulsátil (20-80 MHz) que emite pulsos de luz que duran menos de un nanosegundo ($1 \text{ ns} = 10^{-9} \text{ s}$). La detección de la intensidad de fluorescencia se desfasa y clasifica en una serie de ventanas temporales (o canales) posteriores al pulso, que luego se emplean para estimar el τ del fluoróforo. En el caso del dominio de frecuencias, se emplea una fuente de luz con intensidad oscilante. La emisión de la fluorescencia se registra y se compara con el patrón temporal

de excitación y se calcula la diferencia en módulo y el desfase en la oscilación (relacionados al tiempo de vida). En ambas variantes de la técnica se pueden estimar más de un τ , así como las contribuciones de cada uno, lo que da cuenta de distintas poblaciones del fluoróforo (que se encuentran en distintos ambientes y/o que sufren distintos procesos de desexcitación).

- Ensayos dinámicos: La técnica de Recuperación de la Fluorescencia Luego del Foto-blanqueo (FRAP, *Fluorescence Recovery After Photobleaching*) permite el análisis de la movilidad de los fluoróforos en células vivas. Así, por ejemplo, proteínas fusionadas genéticamente a proteínas fluorescentes pueden monitorearse en células intactas sin la necesidad de permeabilizarlas para ingresar anticuerpos que las reconozcan. La técnica consiste en el fotoblanqueo instantáneo de un fluoróforo en una región relativamente pequeña de la célula, y entre la adquisición de una serie temporal de imágenes ($xy\lambda t$). El foto-blanqueo se logra por la sobreexcitación del fluoróforo con un haz de luz láser de alta potencia. Esta técnica, aunque no está restringida, se aplica generalmente en el LSCM, por lo que el haz láser puede posicionarse con gran precisión y describir figuras de distintas geometrías y tamaños. Al analizar la fluorescencia emitida desde la región de interés, se observa una señal estable previa al fotoblanqueo, luego una caída abrupta y finalmente una recomposición parcial de la señal original. De esta información se puede estimar la velocidad de difusión del fluoróforo y la existencia de una fracción inmóvil.

Estas técnicas han sido expandidas a aproximaciones de partículas únicas, como por ejemplo la Espectroscopía de Correlación de Fluorescencia (FCS, *Fluorescence Correlation Spectroscopy*), que permiten estimar el coeficiente de difusión de los fluoróforos de forma mucho más precisa. Esta técnica ya fue descrita en el capítulo 11, por lo que ahora sólo nos reduciremos a mencionar que la misma se aplica normalmente en formato de microscopio similar al confocal y puede adaptarse sencillamente para obtener imágenes confocales en el mismo equipo (Moens, 2011). La extrapolación del fundamento de FCS a los 3 rangos de tiempos codificados en las imágenes confocales xyt , permiten adaptar esta técnica a la evaluación procesos u objetos que presentan distintos

tiempos de difusión, desde unos pocos microsegundos ($1 \mu\text{s} = 10^{-6} \text{ s}$) a varios minutos. Esta modificación se conoce como RICS (Raster-scan Image Correlation Spectroscopy) (Rossow, 2010). Asimismo, el análisis puede expandirse al estudio de correlación cruzada (*Cross-Correlation*) de distintos fluoróforos o de moléculas del mismo fluoróforo pero en localizaciones distintas de la muestra (Choi, 2011). Desarrollos más recientes de esta técnica han devenido en una nueva técnica de microscopía llamada SOFI (*Super-resolution Optical Fluctuation Imaging*), en la que se generan imágenes en las que en cada pixel están representados los parámetros de la función de autocorrelación local (Dertinger, 2009). Esta técnica tiene particularidad de que las contribuciones por la fluorescencia de fondo o ruido son eliminadas durante el análisis de correlación.

13.10. Bibliografía sobre Microscopía Óptica

Esta fue sólo una pequeña reseña de las posibles técnicas basadas en Microscopía de Fluorescencia, por lo que les sugerimos que, de estar interesados, busquen bibliografía actualizada. A tal fin, detallamos a continuación bibliografía específica sobre cada tema detallado en este capítulo donde podrán profundizar más en sus conocimientos.

- *Fluorescencia*

- Principles of Fluorescence Spectroscopy, 3ra Edición, Joseph R. Lakowicz. Springer, 2006.
- Molecular Fluorescence: Principles and Application. 2da Edición. Bernard Valeur, Mário Nuno Berberan-Santos. Wiley-VCH, 2013.

- *Microscopía de Fluorescencia*

- Imaging: A Laboratory Manual. Rafael Yuste. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2010.

- Introduction to Optical Microscopy. Jerome Mertz. Roberts and Company Publishers, 2009.
- Fundamentals of Light Microscopy and Electronic Imaging. Douglas B. Murphy, Wiley-Liss, 2001.
- Live Cell Imaging: A Laboratory Manual. 2da Edición. Robert D. Goldman, David L. Spector, Jason R. Swedlow. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2009.

- *Microscopía Confocal*

- Handbook of Biological Confocal Microscopy. 3ra Edición. James Pawley. Springer, 2006.
- Confocal Microscopy. Methods and Protocols. Stephen W. Paddock. Series en Method in Molecular Biology, Volume 122. Springer, 1999
- Basic Confocal Microscopy. Robert L. Price, W. Gray (Jay) Jerome, Springer, 2011.

- *Superresolución*

- Nanoscopy and Multidimensional Optical Fluorescence Microscopy. Alberto Diaspro Chapman and Hall/CRC Press, 2010.

Del mismo modo, se insta a los lectores a revisar las páginas en internet de las compañías más importantes de microscopios y asociaciones de microscopistas, donde podrán encontrar material complementario, videos y demostraciones sobre fundamentos, aplicaciones y ejemplos de las distintas técnicas.

- <http://www.micro.magnet.fsu.edu/>
- <http://www.olympusmicro.com/>
- <http://www.leica-microsystems.com/>
- <http://microscopy.zeiss.com/>
- <http://www.microscopyu.com/>

Bibliografía

- Adjobo-Hermans MJ, Goedhart J, van Weeren L, Nijmeijer S, Manders EM, Offermanns S, Gadella TW Jr. Real-time visualization of heterotrimeric G protein Gq activation in living cells. *BMC Biol.* 2011 9:32, 2011.
- Adjobo-Hermans MJ, Goedhart J, van Weeren L, Nijmeijer S, Manders EM, Offermanns S, Gadella TW Jr. Real-time visualization of heterotrimeric G protein Gq activation in living cells. *BMC Biol.* 2011 9:32, 2011.
- Bates M, Blosser TR, Zhuang X. Short-range spectroscopic ruler based on a single-molecule optical switch. *Phys Rev Lett.* 94:108-101, 2005.
- Betzig E, Patterson GH, Sougrat R, Lindwasser OW, Olenych S, Bonifacino JS, Davidson MW, Lippincott-Schwartz J, Hess HF. Imaging Intracellular Fluorescent Proteins at Nanometer Resolution. *Science* 313: 1642–1645, 2006.
- Choi CK, Zareno J, Digman MA, Gratton E, Horwitz AR. Cross-correlated fluctuation analysis reveals phosphorylation-regulated paxillin-FAK complexes in nascent adhesions. *Biophys J.* 100:583-92, 2011.
- Dertinger T, Colyer R, Iyer G, Weiss S, Enderlein J. Fast, background-free, 3D super-resolution optical fluctuation imaging (SOFI). *Proc Natl Acad Sci USA.* 106:22287-22292, 2009.
- Gadella TW Jr, Jovin TM. Oligomerization of epidermal growth factor receptors on A431 cells studied by time-resolved fluorescence imaging microscopy. A stereochemical model for tyrosine kinase receptor activation. *J Cell Biol.* 129:1543-1558, 1995.
- Goedhart J, van Weeren L, Adjobo-Hermans MJ, Elzenaar I, Hink MA, Gadella TW Jr. Quantitative co-expression of proteins at the single cell level--application to a multimeric FRET sensor. *PLoS One.* 2011;6(11):e27321, 2011.
- Hell SW, Wichmann J. Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy. *Opt Lett.* 19:780-782, 1994.
- Hell SW. Far-Field Optical Nanoscopy. *Science* 316: 1153-1158, 2007
- Hess S, Giririjan T, Mason M. Ultra-High Resolution Imaging by Fluorescence Photoactivation Localization Microscopy. *Biophysical Journal* 91 (11): 4258–4272, 2006.
- Hofmann M, Eggeling C, Jakobs S, Hell SW. Breaking the diffraction barrier in fluorescence microscopy at low light intensities by using reversibly photoswitchable proteins. *Proc Natl Acad Sci USA.* 102:17565-17569, 2005.
- Huang F, Schwartz SL, Byars JM, Lidke KA. Simultaneous multiple-emitter fitting for single molecule super-resolution imaging. *Biomed Opt Express.* 2:1377-1393, 2011.
- Jares-Erijman EA, Jovin TM. FRET imaging. *Nat Biotechnol.* 21:1387-1395, 2003.
- Jares-Erijman EA, Jovin TM. Imaging molecular interactions in living cells by FRET microscopy. *Curr Opin Chem Biol.* 10:409-416, 2006.
- Klarenbeek JB, Goedhart J, Hink MA, Gadella TW, Jalink K. A mTurquoise-based cAMP sensor for both FLIM and ratiometric read-out has improved dynamic range. *PLoS One.* 6:e19170, 2011.

Moens PD, Gratton E, Salvemini IL. Fluorescence correlation spectroscopy, raster image correlation spectroscopy, and number and brightness on a commercial confocal laser scanning microscope with analog detectors (Nikon C1). *Microsc Res Tech.* 74:377-88, 2011.

Padilla-Parra S, Tramier M. FRET microscopy in the living cell: different approaches, strengths and weaknesses. *Bioessays.* 34:369-376, 2012.

Patterson GH. Fluorescence microscopy below the diffraction limit *Semin Cell Dev Biol* 20: 886–893, 2009.

Rossow MJ, Sasaki JM, Digman MA, Gratton E. Raster image correlation spectroscopy in live cells. *Nat Protoc.* 5:1761-74, 2010.

Yamada Y, Michikawa T, Hashimoto M, Horikawa K, Nagai T, Miyawaki A, Häusser M, Mikoshiba K. Quantitative comparison of genetically encoded Ca indicators in cortical pyramidal cells and cerebellar Purkinje cells. *Front Cell Neurosci.* 5:18, 2011.