

LA MICROSCOPIA CONFOCAL

Enrique Soto Eguibar

Centro de Ciencias Fisiológicas
Instituto de Ciencias
Universidad Autónoma de Puebla

Desde la antigüedad se conocían las propiedades de aumento de las lentes de cristal y, en el siglo XIII, la lupa era comúnmente usada por relojeros, joyeros y mercaderes de tejidos. Las primeras lentes que fueron sistemáticamente utilizadas para la observación microscópica en biología fueron las pulidas por Antony Van Leeuwenhoek (1632-1723), quien en el siglo XVII, desarrolló una especial habilidad para pulir lentes de la mejor calidad. Leeuwenhoek estudió todo tipo de muestras, usando para sus observaciones lentes simples -pulidas en la forma que tienen actualmente las lupas- y montadas en engarzaduras de oro y plata. Con estos instrumentos Leeuwenhoek descubrió los glóbulos de la sangre, diversos protozoarios y las bacterias.

El microscopio compuesto está constituido por varias lentes que permiten corregir aberraciones de tipo cromático y esférico y fue inventado unos años antes (entre 1591 y 1608) por el holandés Zacharias Jensen. Este tipo de microscopios tenía una lente objetivo convexa y un ocular cóncavo. Posteriormente Johannes Kepler diseñó un microscopio compuesto en que ambos, el objetivo y el ocular, eran convexas. Este es el prototipo de los microscopios actuales (véase la figura 1).

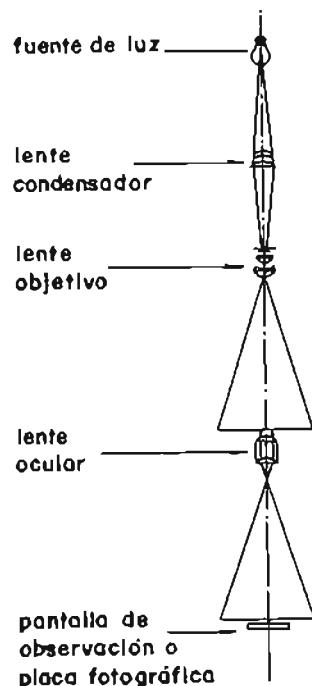
El uso del microscopio, ya fuera éste simple o compuesto, permitió que científicos excepcionales como Robert Hooke (1635-1713), Marcello Malpighi (1628-1694) y Leeuwenhoek reconocieran y establecieran la importancia de estudiar la organización microscópica de los seres vivientes. Este nuevo enfoque, el análisis de la estructura de los

seres vivientes, es, aún en la actualidad, un tema de intenso trabajo científico que está lejos de ser completamente resuelto.

Los avances posteriores en la construcción de microscopios se han basado en el perfeccionamiento de la óptica y la iluminación, sin modificarse en su esencia los principios básicos de operación de este magnífico instrumento.

Desafortunadamente, la observación de seres vivientes ha estado limitada porque éstos tienen grosorres variables y transmiten y reflejan la luz de manera no uniforme. Las áreas fuera del plano focal degradan la imagen haciéndola borrosa, disminuyendo el contraste y la resolución, dificultando así la observación de las estructuras que componen un espécimen. Este efecto que aquí denominamos como de velo, o borosidad, es especialmente notable en los espécímenes vivientes, en los que no se tiene control sobre el grosor de la muestra. Desde el siglo pasado, este problema se ha resuelto fijando y cortando los tejidos en rebanadas muy delgadas (hasta de 0.5 micras). Esto elimina, en su

FIGURA 1



Los microscopios que usan dos o más sistemas de lentes son llamados microscopios compuestos. Éstos son los que ordinariamente se encuentran en los laboratorios. La lente que se encuentra más cercana al espécimen se denomina objetivo; tiene una distancia focal corta y forma una imagen real y aumentada, que es el objeto del segundo sistema de lentes, denominado ocular. El condensador tiene la función de concentrar la luz sobre el espécimen.

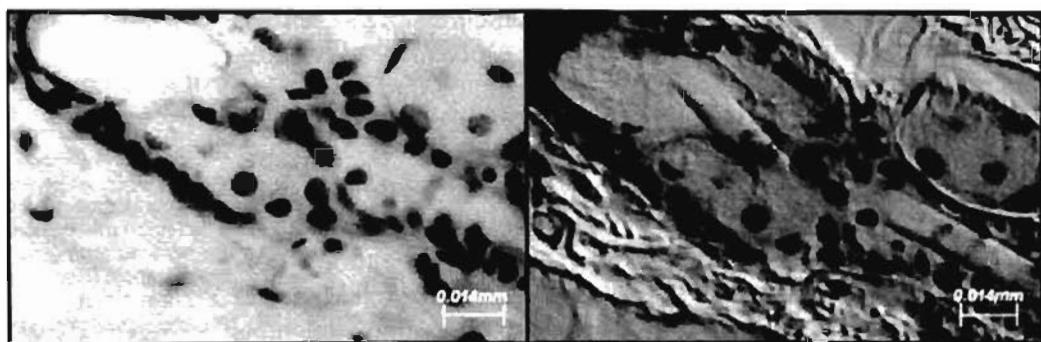
mayoría, la distorsión debida a las regiones que se encuentran fuera del plano focal del lente y pueden obtenerse imágenes de muy alta resolución. Sin embargo, este procedimiento de fijación y corte implica a su vez la destrucción de los tejidos. El problema en general fue claramente descrito por el mismísimo Don Santiago Ramón y Cajal, quien refiriéndose a la calidad de las imágenes que obtenía con la microfotografía escribió: “[...] no ha sido posible para nosotros contravenir las inexorables leyes de la óptica. Es bien conocido que cuando una sección es gruesa ($40 \mu\text{m}$ o más) y contiene células dispuestas en varios planos y orientadas de diversas maneras, poco se puede lograr tratando de enfocar un grupo de células; las imágenes de aquellas que se encuentran por arriba o por abajo y que están fuera de foco, proyectan sombras que disturban la pureza y claridad de la imagen.”

Para contrarrestar parte de las limitantes en la observación de especímenes vivientes, en el año 1935, Fritz Zernike desarrolló el microscopio de contraste de fases, razón por la cual le fue otorgado el Premio Nobel de Física en 1953. Los detalles de un objeto en el microscopio óptico estándar se ven debido a que los especímenes tienen partes de diferente densidad; por lo tanto, muestras completamente transparentes, como algunos seres vivos, son difícilmente distinguibles. El contraste de fases es especialmente útil para observar es-

pecímenes transparentes, debido a que hace distinguibles detalles que no lo son con el microscopio estándar. Esta técnica se basa en que los objetos transparentes tienen pequeñas variaciones en su índice de refracción de un punto a otro; esto genera un espectro de difracción por detrás del plano focal del objetivo. Las ondas difractadas por las irregularidades del objeto se encuentran fuera de fase respecto a las que no han sido refractadas; al introducir el microscopio un desplazamiento artificial de la fase de las ondas no difractadas, se produce un efecto de interferencia y aumento en el contraste del campo. Sin embargo, al observar especímenes vivos de grosor variable, existen diversas porciones del objeto que quedan fuera del plano focal del objetivo y que degradan significativamente la calidad de la imagen que se puede observar.

Posteriormente se han construido nuevos sistemas de iluminación y ópticos que ofrecen un alto contraste y resolución en muestras biológicas; éstos son los microscopios con óptica de Nomarsky o de contraste diferencial interferencial y el de modulación de contraste de Hoffman; ambos, como en el microscopio de contraste de fases, convierten la información de fases en un aumento en el contraste de la imagen. Como resultado de esto, la intensidad de cualquier punto de la imagen es proporcional a la diferencia de fase generada por el espécimen, lo que determina un aumento notable de la definición de

FIGURA 2



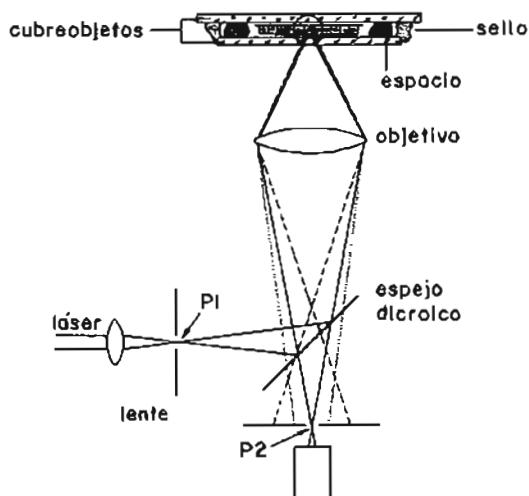
Imágenes de la piel de ratón; a la izquierda con microscopio de campo claro (estándar); a la derecha con óptica de modulación de contraste de Hoffman.

las regiones que tienen diferentes grosores, o índices de refracción; particularmente los bordes de cualquier estructura (véase la figura 2).

En la última década se han desarrollado procedimientos que permiten incrementar significativamente la resolución del microscopio óptico. Minski, en 1961, propuso un nuevo tipo de microscopio para la observación de especímenes vivos con un alto contraste y mejor resolución, comparable únicamente a la que se obtenía anteriormente con microscopios electrónicos de barrido a bajo aumento o luego de complejos procesos de análisis digital de imágenes.

Este nuevo tipo de microscopio se basa en eliminar el velo que, en una imagen de microscopía óptica normal, producen las regiones que se encuentran fuera del plano de foco. Para esto, se ha optado por pasar la luz que incide sobre la muestra por un pequeño agujero o ranura y enfocarla en el plano de la imagen de un objetivo de gran apertura numérica (véase la figura 3). De esta manera, la luz que es reflejada por el punto que se encuentra en el plano focal del objetivo, regresa al mismo y es reenfocada y transmitida a su vez por un pequeño agujero o ranura sin ninguna pérdida. En cambio, la luz dispersada o emitida por los puntos que se encuentran fuera del plano de la imagen es atenuada o bloqueada completamente. De esta manera, se obtiene una imagen de alto contraste y definición de un punto en el plano focal, sin que haya una contribución significativa de las regiones que se encuentran fuera de foco. Debido a que las aperturas tanto de la iluminación como del retorno de la imagen tienen un foco común. A este tipo de microscopio se le ha denominado como "microscopio confocal". Puede resumirse su función diciendo que la microscopía confocal se

FIGURA 3



La fuente de luz, rayo láser, se hace pasar por una ranura (P1) e incidir en un espejo dicroico. De ahí se enfoca en la muestra, pasando por el objetivo del microscopio. La luz emitida por la muestra es colectada por el objetivo y se enfoca en una ranura detectora (P2). La luz proveniente de los planos fuera de foco incide fuera de la ranura detectora (líneas punteadas). Tomado de Baccallao y Stelzer, 1989.

basa en mejorar la relación entre la señal y el ruido de la imagen.

En la figura 3 se muestra el esquema de un tipo particular de microscopio confocal, en el cual, la fuente de luz que se utiliza es un rayo láser. El haz de luz se hace pasar por una ranura (P1) e incidir en un espejo dicroico (que refleja totalmente la luz con un ángulo de cerca de 45 grados), para posteriormente enfocarlo sobre la muestra usando el propio objetivo del microscopio. La luz emitida por la muestra es colectada por el mismo objetivo y, pasando a través del espejo dicroico es enfocada en una ranura detectora (P2). La luz que penetra a menor o mayor profundidad en la muestra (planos fuera de foco), incide por delante o por detrás de la ranura detectora (haces de luz representados en líneas punteadas en la figura 3). Debido a que la cantidad de luz que llega a la muestra es sumamente pequeña, es necesario usar fuentes de iluminación muy poderosas como es el rayo láser.

El procedimiento descrito nos da la imagen de un pequeño punto de la muestra. Para obtener una imagen

completa, es necesario usar complejos procedimientos que permitan mover el punto de iluminación en toda la muestra, e integrar esta imagen formada de puntos individuales en una imagen única. Para esto, se usan sistemas que permiten desplazar la muestra o mover el punto de iluminación, barriendo toda el área que se desea observar. Por esto último, se denomina a los microscopios como "microscopio confocal de barrido". Resulta obvio que, para construir una imagen, es necesario recorrer toda la muestra de manera uniforme, además de que el rayo de iluminación y la vía de retorno deberán estar perfectamente alineadas. Esto implica que la mayoría de los instrumentos que hasta ahora se han desarrollado, se basen en complejos sistemas electromecánicos que resultan en un alto costo, ya que tienen que

generarse pequeños desplazamientos perfectamente uniformes, e integrarse la imagen en un computador.

Para eliminar el problema asociado con el diseño de sistemas que permitan barrer la imagen, se han ofrecido diversas alternativas, algunas de las cuales se encuentran ya en microscopios confocales comerciales. Uno de éstos es el microscopio confocal en que el barrido lo hace el haz de luz. Para ello se utilizan espejos dicroicos que vibran rápidamente recorriendo todo el espécimen. Otra solución al problema lo constituye el "microscopio confocal de barrido en cascada", en el cual, un pequeño anillo que se encuentra por detrás del objetivo tiene múltiples hoyos (de 20 a 60 micras de diámetro) en forma de espiral; al rotar este anillo, se genera una imagen completa de toda la preparación, tomando simultáneamente muestras de una gran cantidad de puntos no adyacentes. Este tipo de microscopio tiene la ventaja de que se obtienen imágenes en tiempo real, permitiendo la observación directa en el microscopio.

Cualquiera que sea el procedimiento que se utilice para barrer la muestra, las imágenes del microscopio confocal son notablemente superiores a las que se obtienen con el microscopio óptico convencional, ya que las imágenes generadas contienen detalles volumétricos y de textura imposibles de alcanzar con este último. Una ventaja adicional se obtiene en los casos en que se desea explorar especímenes con fluorescencia. En estos casos, el efecto deletéreo que sobre la imagen tienen las áreas fuera de foco es especialmente notable; además, la iluminación de la muestra hace que se pierda rápidamente la fluorescencia (véase la figura 4). Por estas razones, el microscopio confocal es especialmente ventajoso para observar especímenes fluorescentes, ya que además de eliminar el efecto de las regiones fuera de foco, solamente se ilumina una pequeñísima región de la muestra en cada momento, eliminándose con

FIGURA 4

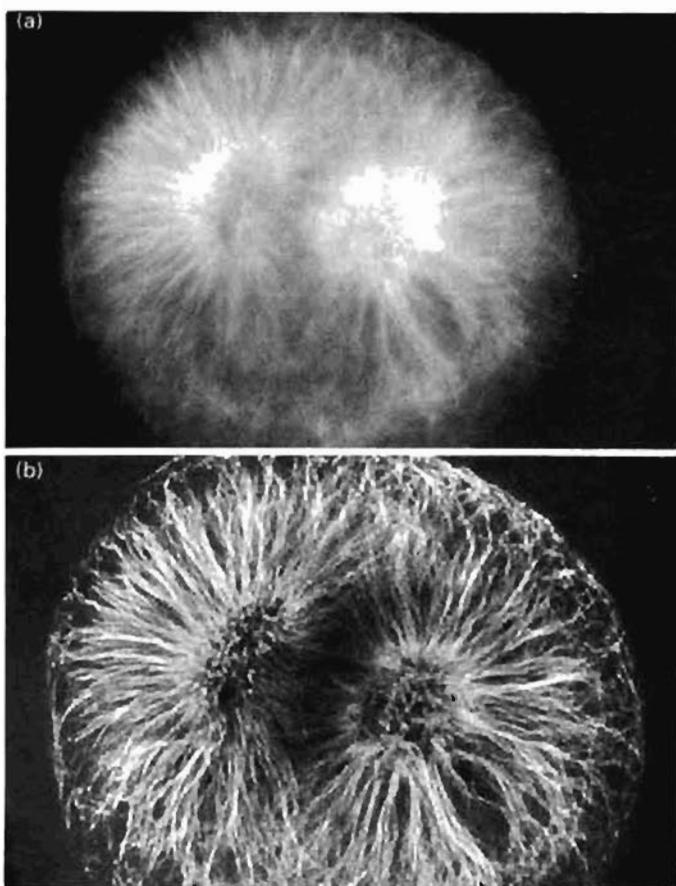


Imagen de fluorescencia tomada con a) microscopio no confocal y b) microscopio confocal.

ello el efecto de "blanqueado" que, sobre la fluorescencia, induce la iluminación continua.

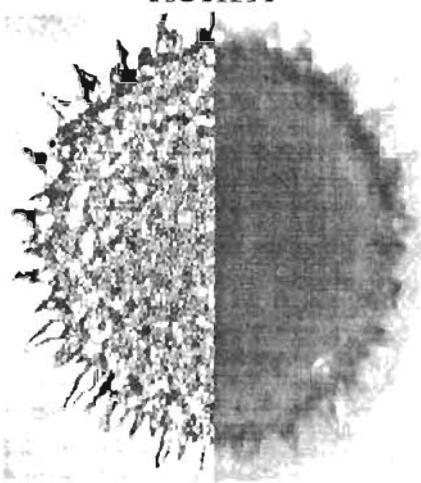
La microscopía confocal permite también estudiar los especímenes usando luz transmitida o reflejada, ello implica que se puedan estudiar muestras que, por su grosor o por sus características, no son transparentes. Esto ha permitido que se desarrollen nuevas técnicas de preparación de los especímenes a observar, las cuales no implican el corte en rebanadas delgadas como se hacia anteriormente, ampliando así significativamente las posibilidades de estudiar las relaciones estructura-función, ya sea a nivel uni o multicelular.

Se han desarrollado, además de la microscopía confocal, otros métodos que permiten mejorar significativamente la calidad de las imágenes que se obtienen con el microscopio óptico. Estos métodos se basan en el procesamiento digital de imágenes, por medio de procedimientos matemáticos que permiten calcular y eliminar el velo debido a las regiones que se encuentran fuera de foco (véase la figura 5). Otros métodos para mejorar la calidad de imágenes en la microscopía óptica se basan en modificaciones en los ángulos de incidencia de la luz y en el uso de varios haces de luz para iluminar las muestras.

La importancia de la microscopía confocal radica entonces en que constituye una nueva y poderosa herramienta para examinar las estructuras celulares y sus funciones. Podemos resumir sus ventajas diciendo que: 1) pueden observarse tejidos intactos así como secciones gruesas sin necesidad de hacer cortes histológicos, 2) se obtiene un aumento notable en la resolución, especialmente en muestras con fluorescencia, 3) reduce el blanqueado de la fluorescencia, 4) permite hacer reconstrucciones tridimensionales más precisas, de mejor calidad y en menor tiempo que por otros métodos. Por todo lo anterior, es claro que en el corto plazo, el microscopio confocal pasará a formar

parte del instrumental normal de trabajo, tanto en laboratorios de análisis clínico-patológico, como en los laboratorios de investigación básica, ya que se ha convertido en un auxiliar indispensable en los estudios de tipo funcional, en los cuales se pretende determinar los procesos que se llevan a cabo en tejidos vivos. Como resultado del desarrollo de la microscopía confocal, y de los métodos digitales de análisis de imágenes, es posible actualmente abordar cuestiones relativas a las relaciones estructura-función en los seres vivos, que anteriormente eran incontestables.

FIGURA 5



Grano de polen. A la derecha sin procesamiento, a la izquierda, luego del procesamiento por deconvolución.

Lecturas recomendadas

Bacallao, R. y Stelzer, H.K.. Preservation of biological specimens for observation in a confocal fluorescence microscope and operational principles of confocal fluorescence microscopy. *Methods in Cell Biology*, Vol. 31, 1989, pp. 437-452.

Hall, C.E., Microscope, *Encyclopaedia Britannica*, William Benton Publisher, Chicago, 1970, pp. 383-402.

Murray, J.M., Neuropathology in depth - The role of confocal microscopy, *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, Vol 51, 1992, pp. 475-487.

Rostand, J., *Introducción a la historia de la biología*, Ediciones Península, Barcelona, 1979.

Wilson, T. y Sheppard, C.J.R., *Theory and practice of Scanning Optical Microscopy*, Academic Press, London, England, 1984.

Wallen, P., Confocal microscopy in chemical neuroanatomy, *Journal of Chemical Neuroanatomy*, Vol. 4, 1991, pp. 387-395.

Wright, S.J. y Schatten, G., Confocal fluorescence microscopy and three dimensional reconstruction, *Journal of Electron Microscopy Technique*, Vol. 18, 1991, pp. 2-10.