



MICROSCOPIA CONFOCAL: PUENTE MULTIDISCIPLINARIO EN LA CIENCIA

Jesús Domínguez Bravo, Hoziel Alfonso Lugo Martínez, Amairany Rivero Oliver, Fernando Nava Palafox, Natalia Gutiérrez Aldana, Angel Gabriel Hernández Nateras, Lopez Franco Flor Dikandy

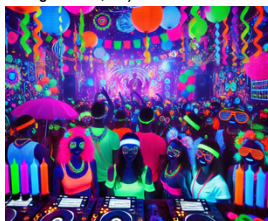
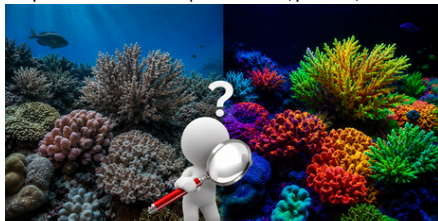
Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología, Escuela Superior de Ingeniería Química e Industrias Extractivas, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional, Ciudad de México, México.

Trabajo de la asignatura de Técnicas de caracterización II del programa de Doctorado en Nanociencias y Micro-nanotecnologías. Dirigido por la Dra. María de Jesús Perea Flores



Te has preguntado porqué algunos objetos brillan en la oscuridad... ¿Magia o ciencia? Hablemos de la fluorescencia

La fluorescencia es la capacidad de algunas moléculas (fluoróforos) para absorber un tipo de luz (como la ultravioleta) y emitirla casi al instante como luz visible (de 400 a 700 nm dentro del espectro electromagnético). Estas moléculas con la propiedad de fluorescer (autofluorescencia), se pueden encontrar en la naturaleza, tales como los pigmentos que dan color a las frutas y verduras; o en los corales y anémonas del mar, que brillan con diferentes tonalidades. Cuando un material no tiene estas moléculas, también es posible adquirirlas (fluorescencia inducida), tales como FITC, Calcofluor, y muchos más; y pueden ser tan específicas que se asocian a un compuesto o una estructura (tinción de ADN, proteínas, membranas, microorganismos, etc).

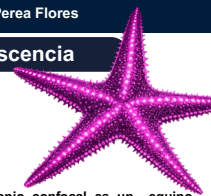


¿Cómo podemos observar?
¿Microscopio confocal?



Fig. 1.- Microscopio confocal (LSM 880, Carl Zeiss, Alemania).

Un microscopio confocal es un equipo que utiliza el fenómeno fluorescencia para generar imágenes de alta resolución. Para ello, la muestra se marca con colorantes fluorescentes específicos o, cuando sus componentes lo permiten, se aprovecha su autofluorescencia natural. En lugar de iluminar toda la muestra, el microscopio enfoca un haz de luz láser sobre un punto diminuto y específico de la muestra. Las moléculas fluorescentes de esa región absorben y emiten la luz, y se contruye la imagen de un solo plano focal.



¿Pero? ¿Para qué es útil el fenómeno de fluorescencia?

En la naturaleza, la fluorescencia no es un adorno sin propósito, cumple funciones clave para la supervivencia. Algunos animales, como los alacranes o ciertas aves, emplean su brillo fluorescente para camuflarse, o para reconocerse durante el apareamiento. El ser humano imita este fenómeno porque resulta tremendamente útil: aprovechamos la fluorescencia para crear pinturas de seguridad y señalización que brillan en discotecas o carreteras, para fabricar billetes que sean difíciles de falsificar, y sobre todo en medicina y biología, donde la fluorescencia nos permite ver células, rastrear tumores o estudiar el funcionamiento del cerebro en tiempo real, entre otras aplicaciones. En definitiva la fluorescencia es una herramienta práctica en la ciencia y en la vida cotidiana que nos ayuda a ver lo invisible.

Ventajas del microscopio confocal

- ✓ Eliminación de luz fuera de foco, mejorando significativamente la calidad de imagen
- ✓ Mayor contraste con respecto a la microscopía de fluorescencia convencional.
- ✓ Alta resolución espacial, cercana a 200 nm.
- ✓ Obtención de cortes ópticos y reconstrucciones 3D.
- ✓ Versatilidad de modos de empleo adaptados a diversas disciplinas



Áreas de Oportunidad

BIOMEDICINA

Permite estudiar la interacción celular, distribución intracelular de compuestos y viabilidad celular. Es útil para analizar niosoma, visualizando su localización, transporte y comportamiento dentro de células y tejidos, y realizar reconstrucciones 3D de procesos biológicos utilizando marcadores como Rodamina [1].

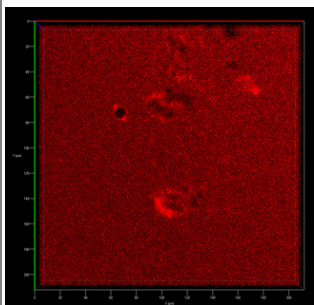


Fig. 2.- Imagen de microscopía confocal de niosomas marcados con rodamina

MICROBIOLOGÍA Y MICOLOGÍA

Facilita la visualización 3D de microorganismos filamentosos, como hongos, permitiendo analizar la arquitectura del micelio, hifas y ramificaciones. Es útil para estudios de crecimiento, formación de biopelículas e interacción con superficies [2,3]. Se utilizó la fluorescencia de un marcador Calcofluor.

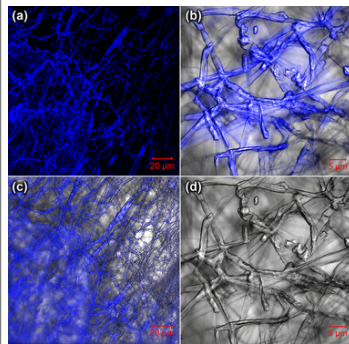


Figura 3. Estructuras fúngicas observadas mediante microscopía confocal. (a,c) red filamentosas de hifas; (b,d) detalle de las ramificaciones. Barras de escala: 20 µm y 5 µm.

BIOLOGÍA

Permite reconstruir en 3D la morfología de estructuras biológicas como pétalos de girasol, mapeando la rugosidad de sus células epidérmicas y la distribución de pigmentos mediante autofluorescencia. Sus aplicaciones abarcan botánica, nanotecnología y biomimética para el diseño de materiales con propiedades ópticas, o superficies hidrofóbicas avanzadas

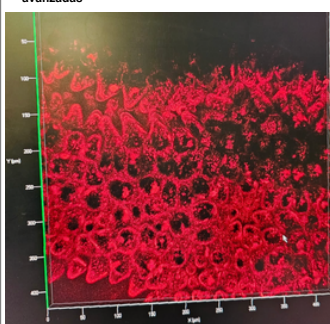


Fig. 4.- Reconstrucción 3D de estructura de pétalo de girasol.

ANÁLISIS DE ALIMENTOS

Permite obtener imágenes tridimensionales de la microestructura de alimentos, identificar componentes (proteínas, grasas, almidones) y detectar microorganismos. Es clave para evaluar la calidad, inocuidad y cambios estructurales por procesos como calentamiento, fermentación, congelación o digestión [4-6].

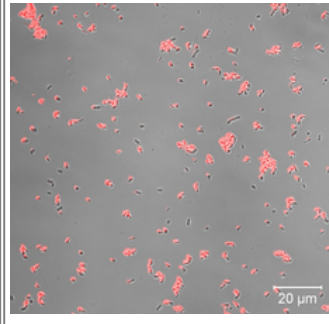


Fig. 5.- Imagen de microscopía confocal de la caracterización de *Lactobacillus Plantarum* (autofluorescencia).

Modo Espectral

Permite separar las señales de fluorescencia intrínsecas de diferentes fluoróforos para su análisis individual

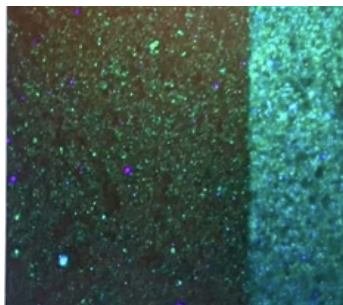


Figura 6. Separación espectral de señales de fluorescencia intrínseca.

Análisis 2D (Barrido 2D)

Barrido en dos direcciones para la captura de imágenes bidimensionales

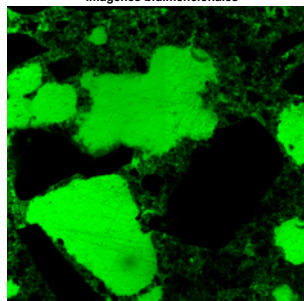


Fig. 7.- Imagen de microscopía confocal de un mortero impregnado con la mezcla de resina epóxica y marcador Yellow solvent [7].

¿Cómo podemos obtener las imágenes en un microscopio confocal?

Obtiene series de planos ópticos para reconstruir modelos tridimensionales de la muestra

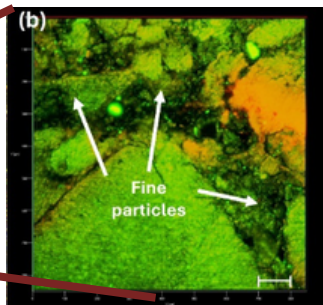


Figura 8. Imagen de microscopía confocal de autofluorescencia de biocompuesto con partículas de cáscara de pistache [8,9].



Referencias

