

CARACTERIZACIÓN DE LA INTERFAZ OBJETIVO - PORTAMUESTRAS EN UN MICROSCOPIO CONFOCAL: UN FACTOR DETERMINANTE PARA EL ÓPTIMO ESTUDIO DE IMÁGENES

GRUPO DE INVESTIGACIÓN: ENSEÑANZA DE LA FÍSICA
PROYECTO DE INVESTIGACIÓN: ÓPTICA APLICADA
INVESTIGADORA: MYRIAM HERRERA PALOMA¹
COINVESTIGADOR: JESÚS ARNOLDO DAZA FIGUEREDO²

RESUMEN

Conocer la información que aportan los elementos de sistemas ópticos formadores de imágenes, es un aspecto determinante en el procesamiento óptimo de imágenes.

Se realiza la caracterización de la interfase óptica (objetivo, aceite, portamuestras), y se compara la funcionalidad del vidrio portaobjeto con una membrana polimérica Formvar como portamuestras, haciendo uso de un sistema comparativo de análisis de imágenes obtenidas por procesos de difracción en el microscopio confocal de escaneo laser FluoView 1000 (FV1000) Olympus, que permite digitalización y reconstrucción tridimensional de la interfase sin incluir el espécimen.

El proceso obtenido es validado con los métodos utilizados en el laboratorio, por comparación de imágenes del vidrio portaobjeto, la membrana y un tardígrado como espécimen, para resaltar su aplicación.

PALABRAS CLAVE

Confocal, Interface, membrana de Formvar, escaneo láser, tardígrado.

ABSTRACT

To know the information that they contribute the elements of systems optic images, construction is a decisive aspect in the good images processing.

The characterization of the optical interfase is made (objective, oil, sample-device), and it compares the functionality of the sample glass device with a polimerics Formvar membrane to like sample-device, making use of a comparative system of analysis of images obtained by processing of diffraction in the confocal microscope of laser scanning FluoView laser 1000 (FV1000) Olympus, that allows digitalization and three-dimensional reconstruction of the interfase without including the specimen.

The process obtained is validated with the methods used in the laboratory, by comparing images of the sample glass sample - device membrane and tardígrado like specimen to emphasize its application.

KEY WORDS

Confocal, Interface, membrane of Formvar, laser, tardígrado.

Fecha recepción del artículo: Agosto 28 de 2009

Fecha de aceptación del artículo: Septiembre 30 de 2009

1 Magíster en Física, candidata a Doctorado en Física Óptica Aplicada, Departamento de Ciencias Básicas, Facultad de Ingeniería, Universidad Libre, Bogotá.

2 Docente Investigador, Centro de Microscopía, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia.

INTRODUCCIÓN

Los continuos avances de procesos de innovación tecnológica han llevado a todas las áreas del saber a transformar información en conocimiento, construyendo indicadores cualitativos y cuantitativos que reflejan de manera objetiva sus resultados en investigaciones para contribuir a validarlos científicamente.

La ciencia ha analizado e investigado información de la materia, utilizando imágenes observadas por el ojo humano y por lo registrado con sensores ópticos. Cada día estos dispositivos presentan mayor capacidad de lectura y resolución.

Diferentes grupos de investigación están incursionando en el mundo microscópico y nanométrico donde el átomo guarda mucha información. Al abordar estudios sobre objetos de tamaño nanométrico, las herramientas no siempre están al alcance de todos los grupos de investigación; pero esto no puede ser un impedimento para dar solución a problemas en el ámbito científico.

El avance que se ha tenido en el campo de la Microscopía con respecto a la fuente, al procesamiento de la muestra, al receptor de la información y al procesador de la información, han permitido llegar a microscopios que emplean procesos ópticos cada vez de mayor calidad mejorando la resolución, el contraste y llegando a la reconstrucción tridimensional, 3D de la imagen.

Una problemática que presenta el procesamiento de imágenes es la de tratar de minimizar la información no útil en la imagen primaria a estudiar. Es por este motivo que es importante caracterizar el efecto de los diferentes elementos que forman parte de la interface óptica utilizada.

Para hacer el estudio comparativo se ha utilizado cubre-objetos de vidrio y membranas poliméricas de Formvar. Se han elegido animales microscópicos como los tardígrados para analizar sus imágenes. Estos animales presentan una estructura biológica tridimensional dinámica que permite su reconstrucción 3D a partir de sumar los planos a lo largo del eje Z de los diferentes cortes en el plano X Y. A partir de la información obtenida, es posible realizar la modelación de sistemas físicos.

Los tardígrados, son animales que pueden sobrevivir a las condiciones del espacio: su característica principal es la de sobrevivir en condiciones medioambientales extremas como temperaturas entre -272°C y los 149°C , inmersión en alcohol, en éter.

Haciendo uso de los avances tecnológicos se estudia esta estructura biológica, para obtener las referencias que permitan modelar y comparar posteriormente con otro espécimen que adquieran cierta patología.

Al utilizar como portamuestras membranas o filtros poliméricos, este medio de cultivo genera respuestas adicionales a la muestra con respecto a la autofluorescencia, por consiguiente se hace necesario su caracterización previa para evitar el enmascaramiento de la cofocalización cuando se usan fluorocromos con longitudes de onda muy cercanas a la longitud de onda generada por el filtro.

Con este propósito, en el presente trabajo se realiza una caracterización de la interfase óptica (objetivo – portamuestra) mediante el uso de escaneo láser con microscopía confocal. Se ejemplifica a través del estudio de microorganismo (tardígrado) al cual se le realiza una reconstrucción tridimensional utilizando el Vitral Software³.

³ Vitral Software creado para este fin en la Pontificia Universidad Javeriana con la Colaboración del Ingeniero Óscar Chavarro del Grupo de Investigación "SIDRE" Facultad de Ingeniería de Sistema y Jesús Daza del grupo de investigación "MEM" (Microscopía de Estructuras Macromoleculares) de la Facultad de Ciencias.

La imagen en la Ciencia llega a convertirse en un puente de acercamiento entre Investigadores y la Sociedad, ya que contribuye a que el conocimiento científico forme parte de la cultura popular.

1. MÉTODOS UTILIZADOS

La eficiencia de un equipo de microscopía está condicionada a la disposición de sus componentes ópticos entre la fuente de iluminación (excitación) y los dispositivos de captura. El camino óptico entre ambos es alterado por el espécimen y los elementos que forman parte de la interface óptica del montaje; convencionalmente se utiliza como portamuestras un vidrio de 0.17 mm de espesor, el cual genera reflexiones, refracciones y difracciones cuando interactúa el haz de luz al atravesar la interface.

La distancia de trabajo que es ocupada por el aceite de inmersión, también produce cambios en el camino óptico debido a la turbidez o a las burbujas generadas cuando es agitado en el momento de su uso.

Se utiliza un microscopio confocal de escaneo láser, FluoView1000 (FV1000) Olympus con un sistema de distribución espectral lineal en el rango de 400nm a 800 nm que define el poder de la resolución (R); este microscopio realiza barridos láser sincronizados, pues mientras un haz excita la muestra, un segundo haz permite la obtención de la imagen. Este proceso óptico incrementa el contraste, la nitidez, produce mayor resolución vertical y horizontal, y principalmente da la posibilidad de obtener secciones ópticas, (frames) de la muestra permitiendo su reconstrucción tridimensional.

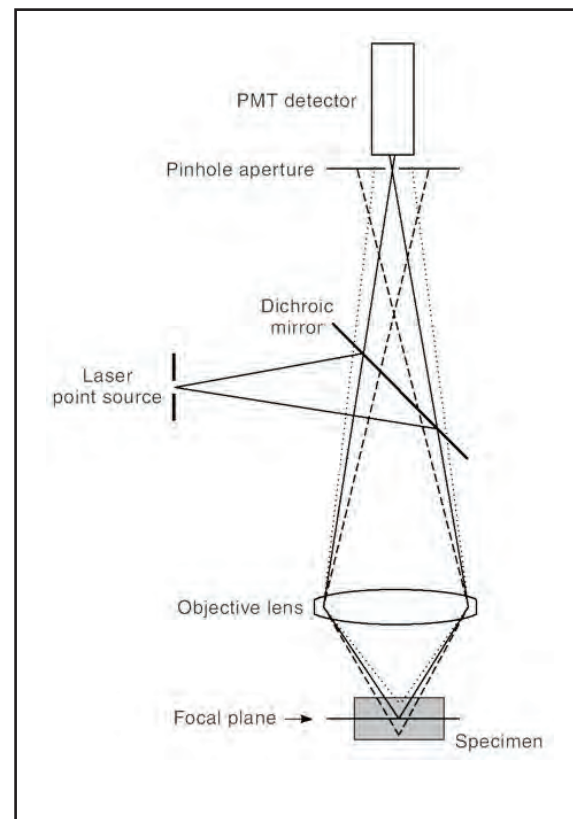
La Figura 1 describe el camino óptico del microscopio confocal. La luz láser que procede de la fuente de iluminación utilizada, atraviesa un primer diafragma o

pinhole; una parte de la luz es reflejada por un espejo dicróico, para luego ser enfocada en un punto de la muestra por medio de la lente del objetivo.

Este punto iluminado emite una señal lumínica por proceso de fluorescencia y reflexión, vuelve por el mismo camino óptico, pasa por el espejo dicróico, siendo enfocado hacia un detector que tiene un segundo diafragma o pinhole, delante de él, filtrando así las señales lumínicas fuera de foco.

Figura 1

Esquema del camino óptico del principio de la microscopía confocal. Para la luz procedente de los puntos fuera del plano confocal es eliminada por el diafragma o pinhole que llega al detector.



Como el microscopio cuenta con los dos pinhole, éstos deben estar perfectamente alineados para detectar la señal lumínica del plano focal. Con el sistema de barrido beam scanning, es decir, con el láser desplazándose por la muestra, se barren todos los puntos que ha focalizado la luz del láser de forma coherente, con alta intensidad y velocidad de barrido.

La señal lumínica detectada se recoge en un fotomultiplicador, para ser transformada en una señal de video que la digitaliza y almacena en un ordenador, para su procesamiento digital de manera que pueda visualizarse posteriormente en el monitor.

Los puntos que el sistema de barrido registra, son los analizados en términos del poder resolutivo que se obtiene de la apertura circular del objetivo del microscopio.

La luz láser al pasar por el objetivo crea un patrón de difracción formado por la apertura circular, correspondiente a un punto brillante, rodeado de una serie de anillos brillantes y oscuros, los llamados discos de Airy; el radio angular θ_1 que corresponde al anillo central, viene dado por:

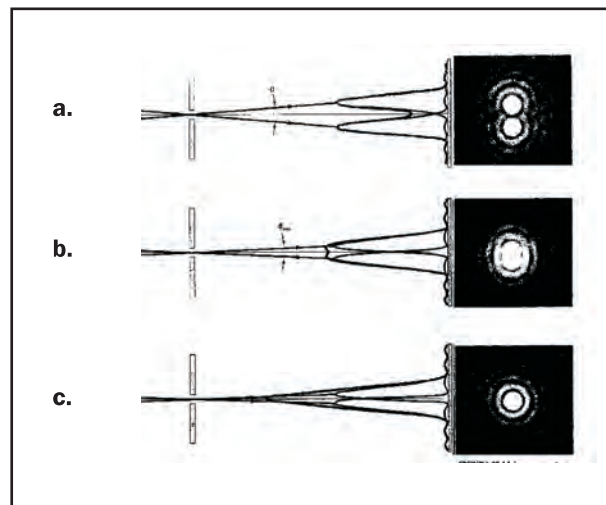
$$\text{Sen } \theta_1 = 1,22 \lambda / D$$

Siendo D el diámetro de la abertura y λ la longitud de onda la luz láser. Teóricamente se afirma que el 85% de la energía lumínica incide dentro del disco de Airy. Debido a las magnitudes aquí trabajadas, para obtener una imagen de alta resolución, es decir, que se registre la información de la muestra punto a punto, es necesario que los puntos registrados en el barrido cumplan con el Criterio de Rayleigh, donde “Dos puntos se podrán resolver apenas, si el máximo de la imagen de difracción del primero está sobre el primer mínimo de la imagen de difracción del segundo”.

La Figura 2 corresponde a anillos de Airy, donde se resalta el criterio de Rayleigh, quedando satisfecho cuando la separación angular de los dos puntos es justamente θ_{min} .

Figura 2

a. b. c. Corresponden al patrón de difracción de una abertura circular asociada al pinhole al leer dos puntos de la muestra. (Gráfica de Física Vol II, Fisbhane).



La captura de los dos puntos en: **a)** es la resolución completa y espacial del sistema óptico del microscopio; **b)** presenta la imagen resuelta de los dos puntos; se puede resolver, pues la separación angular corresponde a θ_{min} ; para **c)** los dos puntos no tienen resolución, existe una superposición de los dos anillos; la imagen de los dos puntos están en el límite de resolución espacial.

La abertura numérica NA que se utiliza en el objetivo del microscopio constituye otra característica importante a tener en cuenta; expresada en términos del diámetro de la abertura .

$$NA = 1,22 \lambda / 2D$$

Este parámetro está relacionado con el poder de resolución del objetivo empleado y corresponde a la mínima distancia que puede haber entre dos anillos brillantes para poder identificarlos como independientes. A la vez, el poder de resolución R está determinado por la longitud de onda λ de la luz láser empleada y la apertura numérica NA con:

$$R = 0,61 \lambda / NA$$

Este proceso óptico de difracción es importante en la formación de la imagen y en particular, define criterios límites de capacidad en la resolución espacial. En efecto, la imagen de dos puntos espacialmente separados en el plano de la muestra y que emite radiación incoherentemente entre sí, se van a representar en el plano de la imagen por dos anillos de Airy.

Con la apertura numérica en función del índice de refracción n , su expresión:

$$NA = n \sin \theta$$

Fue aplicada en el experimento; se utilizó un aceite de inmersión de $n = 1,515$, una distancia de trabajo aproximada de 1 mm; para $NA = 1,4$ y un poder de resolución en el rango de $0,17 \mu\text{m}$ a $0,24 \mu\text{m}$, para las longitudes de onda de la radiación láser utilizada.

Se alcanzaron resoluciones de $0,17 \mu\text{m}$ en horizontal y $0,23 \mu\text{m}$ en vertical, aproximadamente. Cada imagen obtenida representa un solo plano del espécimen. Al registrar imágenes sucesivas de los diferentes planos que conforman la muestra, se puede obtener una reconstrucción total del espécimen, mostrando características de la imagen que no serían visibles en la imagen original, como la profundidad, la superposición de texturas, intensidades y a la vez hacer un estudio plano por plano de la imagen de la muestra.

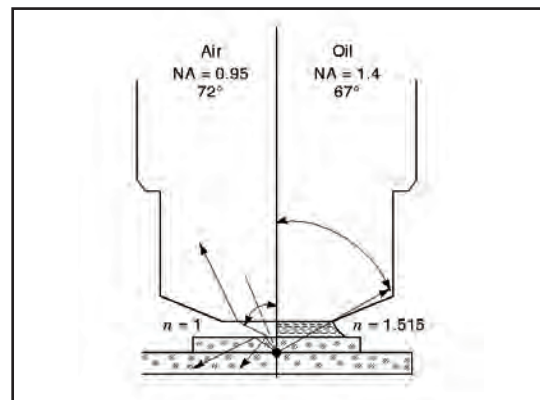
2. ANÁLISIS DE RESULTADOS

Se realizó un barrido láser con el microscopio FluoView1000 (FV1000) Olympus, de un vidrio cubreobjetos de $0,17 \text{ mm}$ de espesor y de una membrana polimérica de Formvar, fotosensible de espesor entre 80 y 100 nm con el objetivo de tener criterios en el momento de preparar y examinar ópticamente los diferentes tipos de muestras logrando varias imágenes de los elementos portamuestras a ser utilizados para llevar el espécimen al microscopio.

Con el microscopio confocal se empieza el estudio desde la interfase conformada entre la lente objetiva, el aceite de inmersión y el portamuestras. El aceite de inmersión, que es utilizado para conectar la superficie superior del portamuestras con el objetivo, permite mayor tramitancia de la luz y menos pérdidas por refracción, se esperaría que la luz atravesase estos medios como si fuera uno solo; la Figura 3 esquematiza el proceso comparativo.

Figura 3

En la mitad izquierda se muestra la situación sin la capa de aceite de inmersión, es decir, en un espacio seco, el aire ($NA = 0,95$). En la parte derecha se muestran tres capas: aceite de inmersión, la muestra y el portamuestra de vidrio o la membrana, ($NA = 1,4$).

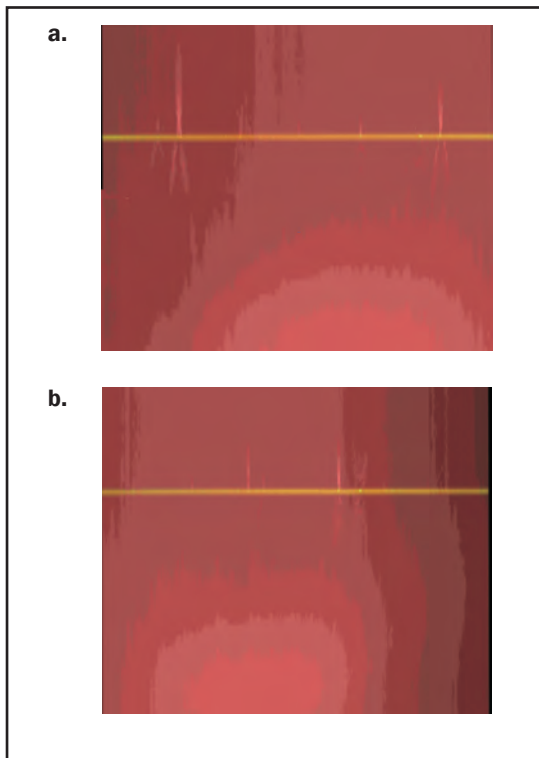


Al hacer el estudio de la interfase óptica utilizando el vidrio calibre 0,17 mm como portamuestra, se obtiene la imagen de una sección transversal del plano X - Z.

La Figura 4 a. y b corresponde a las imágenes de esta interfase. En estas imágenes se observan diferentes intensidades, correspondientes a la interferencia de la luz láser con el aceite de inmersión que hay en la interfase; la línea amarilla, es el corte transversal del vidrio que deja ver efectos de difracción por irregularidades de éste; estos haces de luz serían registrados en el fotomultiplicador, aportando información que no correspondería a la muestra motivo de estudio.

Figura 4

Escaneo láser del vidrio cubreobjetos. Los cortes transversales a y b, están en el plano X - Z.



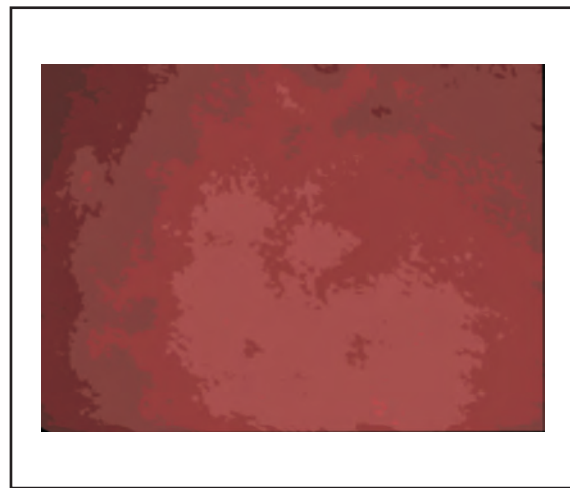
Por otra parte, también fue observado y detectado la presencia de burbujas en la superficie de contacto vidrio-aceite que se desprenden y migran al retirar la lente objetiva, ocasionando también interferencia con el haz luminoso. Estas irregularidades, traen como consecuencia información de iluminación indeseada y de difícil detección en el momento de explorar una imagen.

Utilizando la membrana polimérica de Formvar, de espesor aproximado entre 80nm y 100 nm., como portamuestra en la interfase óptica se realiza el barrido láser de la sección transversal del plano X - Z.

En la Figura 5 se observa la interacción de la luz láser con el aceite de inmersión; la luz atraviesa los tres medios donde no se observa división entre ellos, se comportan como si tuvieran el mismo índice de refracción. Se aspira que estas membranas sean el sustrato óptimo del medio de cultivo sobre el cual se obtienen diferentes cuadros de escaneo en el eje z (frames) y a partir de ellos realizar la reconstrucción 3D.

Figura 5

Interface con membrana, corte transversal en el plano X - Z. No se aprecia las divisiones de los medios que conforman la membrana y el aceite.

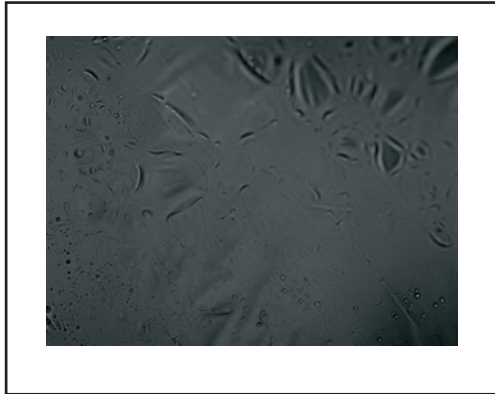


Éste es uno de los criterios para elegir membranas como soporte de muestras que van a ser analizadas en el microscopio confocal, aun cuando la selección de la membrana correcta para estudio no es fácil; las poliméricas presentan mejores resultados ópticos, es decir, para saber cuál es la mejor, es necesario hacer el estudio correspondiente y tener criterios claros para no perder información de los puntos de la muestra motivo de estudio.

La humedad de la membrana causada por el aceite, es observada en la imagen de la Figura 6.

Figura 6

Membrana Polimérica (Formvar), imagen obtenida del plano X - Y, correspondiente a la membrana húmeda.

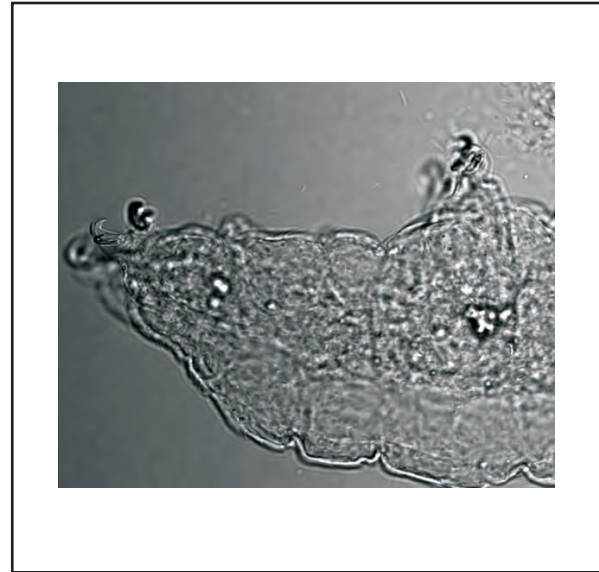


En este paso se elimina tanto la superficie de reflexión que antes se veía en la interface de vidrio como el índice de refracción del medio por humedecimiento de la membrana. El aspecto rugoso de la membrana puede ser eliminado con vapores de xilol de ser necesario. La respuesta de autofluorescencia es de 496 ± 2 nm en la cresta fluorescente.

Al eliminar la rugosidad, en la membrana se observa una textura homogénea, de tal forma que al analizar el espécimen, y teniendo como soporte la membrana, se define el contorno y bordes de la imagen con alta definición y nitidez.

Figura 7

Espécimen sobre membrana polimérica. Se observa la textura polimérica de la membrana que no interfiere con las partes del espécimen.

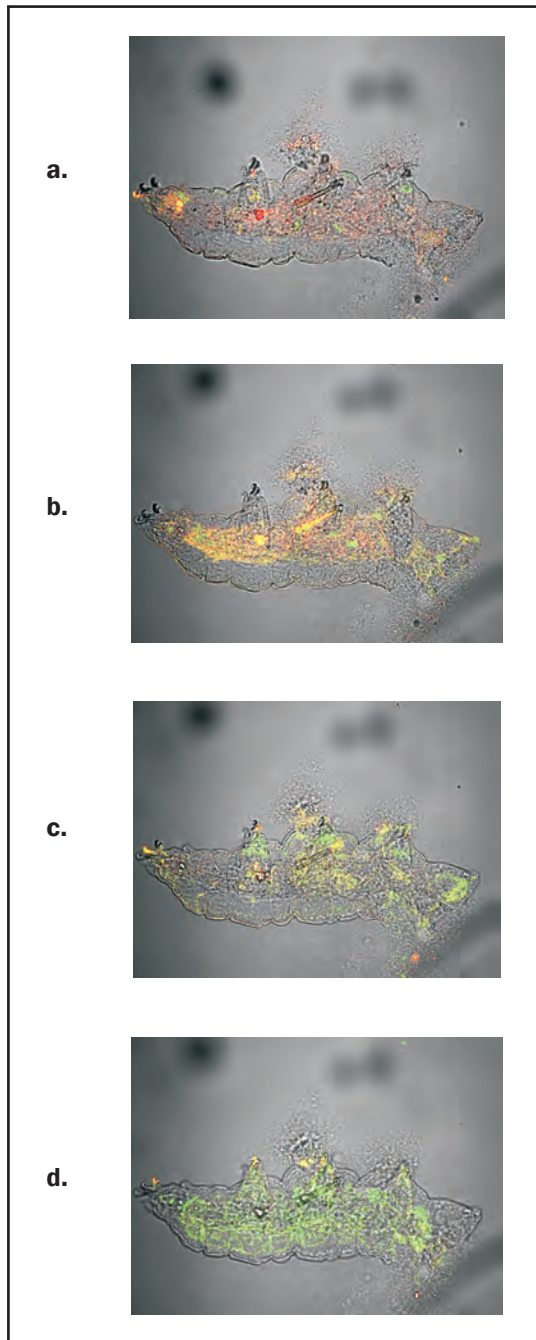


El secado de la membrana hace que ésta se endurezca y temple para llevarla a un mejor manejo. La Figura 7 muestra homogeneidad en la textura. La utilización de la membrana optimiza la resolución para obtener información útil realizando, filtrado o suavizando la imagen motivo de estudio.

Como aplicación, y para resaltar las características ópticas de la membrana como portamuestras, se utilizó un espécimen, en este caso un tardígrado, para identificar propiedades de la imagen que serían motivo de estudio en la reconstrucción tridimensional de ella. Se obtuvo una secuencia de quince cortes (frames) del tardígrado, cuyas imágenes se obtuvieron mediante el barrido láser sobre la membrana polimérica, ya caracterizada. Se presentan resultados experimentales satisfactorios de las imágenes obtenidas con el microscopio confocal.

Figura 8

Resumen de la secuencia de quince cortes de un tardígrado con barrido láser. Las figuras a, b, c, d corresponden a los planos uno, cinco, diez y quince respectivamente.



Cada una de las imágenes de la Figura 8 corresponde a cuatro de los quince planos del tardígrado.

Con la superposición de la secuencia de los distintos planos que se obtienen de la muestra, se hace la reconstrucción tridimensional del espécimen.

Es aquí donde se puede analizar plano a plano para recoger la información punto a punto, pues cada uno de éstos entrega diferentes resultados. Al obtener la superposición de los planos la imagen tridimensional puede ser girada y procesada buscando una mayor información y calidad de la misma dentro del volumen de la muestra.

Procesando cada imagen se pueden reconocer sus componentes, encontrar formas, líneas e interacciones entre los microelementos, estudiar el brillo y los cambios suaves o abruptos que se presentan para ser comparados con patrones normalizados.

CONCLUSIONES

Uno de los factores ópticos determinantes para una óptima lectura de una imagen, se refiere a los criterios presentados en el análisis de la interface del microscopio.

Las normas y especificaciones de los fabricantes forman parte de las variables a investigar, pues al procesar una imagen se presentan parámetros que no pueden ser generalizados.

La digitalización de una imagen permite obtener un incremento de posibilidades para ampliar las características y extraer información de una muestra, permitiendo una modificación reversible de la imagen. El procesamiento de estas imágenes es el siguiente paso a investigar para leer en ellas la información que nanométricamente guardan.

Al utilizar las características ópticas de la microscopía confocal y los métodos del procesamiento de las imágenes, es alcanzable estudiar la estructura y las funciones en los seres vivos que antes ameritaban mayor esfuerzo para su conocimiento.

La importancia en estos procesos microscópicos radica en que se constituye en una excelente herramienta para estudiar estructuras celulares y sus funciones; pueden observarse tejidos al igual que secciones gruesas sin necesidad de hacer cortes histológicos al leer los

diferentes planos (frames) y con ellos, hacer reconstrucción tridimensional con precisión, calidad en menor tiempo y determinando los procesos biológicos que se llevan a cabo en los seres vivos.

RECONOCIMIENTO

Especial reconocimiento por su aporte para el desarrollo de este trabajo a Docentes, Investigadores y estudiantes pertenecientes al Centro de Microscopía de la Pontificia Universidad Javeriana de Bogotá donde se desarrolló el trabajo experimental.

BIBLIOGRAFÍA

A.D. CHAPMAN, Australian Biodiversity Information, Services, Australia, 2005.

CARREÑO F., ANTÓN M.A., Óptica Física, Prentice Hall, Madrid, 2001.

E. HECHT, Óptica, Addison Wesley, Madrid, 2000.

FISHBANE PAUL M., Física para Ciencias e Ingeniería, Volumen II, Editorial Prentice Hall.

J.VIVES, J. AGUILAR, Manual de técnicas de Laboratorio en Hematología, tercera Edición 2006, pag.69-77

MURPHY DOUGLAS B., Fundamentals of light microscopy and electronic imaging, Wiley Liss, 2001, pp.91

PRATT W. K., Digital Image Processing, Fourth Edition, Wiley, 2007.

SANZ, J.M., CALVO, J.I., PRÁDANOS, P., HERNÁNDEZ, H., Caracterización de membranas poliméricas mediante porosimetría de desplazamiento líquido-líquido, Congreso Nacional de Materiales, 2004 pp. 742-740.

INFOGRAFÍA

ARENAS A. Jesús, Contribuciones de la Física en la historia de la Microscopía, Revista Digital Universitaria. Disponible: <http://www.revista.unam.mx/vol6/num7/art70>

POBLET M.ENRIQUE, ALFARO F. LUIS, Obtención de imágenes digitales, Capítulo 4, p. 16. Disponible: <http://www.seap.es/telepatologia04.pdf>