



¿De dónde viene la fluorescencia para microscopía?

La fluorescencia es un fenómeno físico de luminiscencia (Lakowicz, 2006) propiedad de ciertos elementos químicos denominados fluorocromos o fluoróforos. El fluorocromo es utilizado como un marcador colorante fluorescente para crear contraste en zonas determinadas de elementos de interés, ampliamente empleado en la microscopía biológica y analítica, destacando por su gran sensibilidad y precisión. La microscopía de fluorescencia, que implica la utilización de la iluminación y detección de fluorescencia mediante sistemas microscópicos, es actualmente la técnica más popular en las ciencias médicas y biológicas. Su uso ha fomentado el avance de microscopios más

avanzados y el desarrollo de múltiples accesorios especializados en fluorescencia. Las técnicas derivadas para la tinción fluorescente de estructuras celulares son microscopía de fluorescencia confocal, de fluorescencia de superresolución, fluorescencia por excitación de dos fotones, fluorescencia por correlación de fotones y en la que nos enfocaremos la microscopía de epifluorescencia.

Técnica de epifluorescencia

El microscopio de epifluorescencia como se evidencia en la Figura 1 contiene un cabezal de observación trinocular que está acoplado a un sistema de cámara con dispositivo de carga acoplada (CCD), y tiene dos fuentes de iluminación, una para luz transmitida y la otra para observaciones episcópicas.

Un microscopio de este diseño puede combinar o alternar la fluorescencia de luz reflejada con el contraste de fase de luz transmitida, el contraste de interferencia diferencial (DIC), la luz polarizada o la observación de contraste de modulación de Hoffman (Abramowitz et al., 2007).

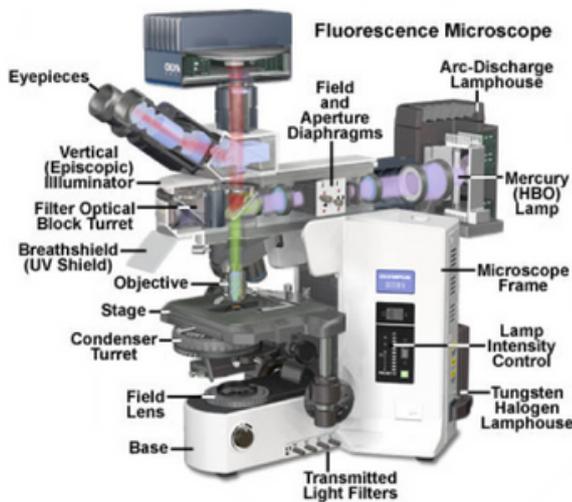


Figura 1. Microscopio de fluorescencia de luz reflejada moderno típico, también equipado para la observación de luz transmitida en una variedad de modos de mejora del contraste. Tomado de: (Abramowitz et al., 2007)

Los microscopios de epifluorescencia se caracterizan por la formación de imágenes amplificadas, donde la muestra a ser analizada es iluminada con luz incidente y la luz reflejada es la que forma la imagen, en la se ejemplifica donde la luz procedente de la fuente atraviesa un primer filtro que selecciona la longitud de onda necesaria para excitar al fluorocromo (espectro de absorción). Esta luz se refleja en un espejo dicroico e incide sobre la muestra, excitando al fluorocromo, el que emite fotones de una longitud de onda mayor que la luz incidente. La luz emitida (espectro de emisión), atraviesa el espejo dicroico y llega un segundo filtro que deja pasar únicamente la longitud de onda de emisión del fluorocromo (Ormachea & Villazón, 2017).

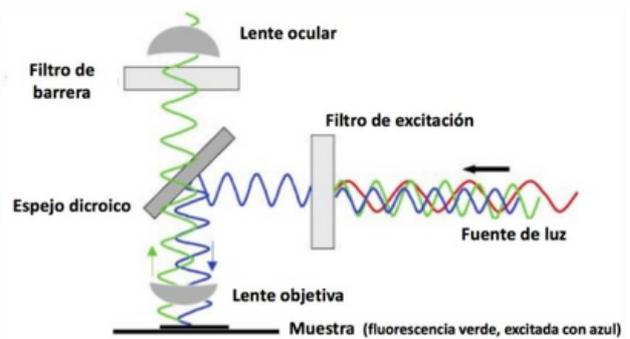


Figura 2. Funcionamiento de un microscopio de epifluorescencia. Tomado de: (Ormachea & Villazón, 2017).

Interés en el medio de las ciencias biomédicas

Se destacan dos características clave de la microscopía de fluorescencia: especificidad y sensibilidad.

Alta especificidad de las sondas fluorescentes: Las sondas fluorescentes tienen la capacidad de unirse o marcar selectivamente moléculas objetivo, cada sonda absorbe y emite luz en longitudes de onda específicas, lo que permite distinguir entre diferentes tipos de moléculas dentro de una mezcla compleja (Abramowitz et al., 2007). Esto es esencial para detectar moléculas de interés, incluso en concentraciones muy bajas, en un entorno donde hay muchas otras especies presentes.

Alta sensibilidad y resolución espacial: La técnica es altamente sensible, lo que significa que puede detectar incluso una única molécula fluorescente (Rachid, 2022). La microscopía de fluorescencia utiliza estrategias como la superresolución para localizar y estudiar moléculas individuales en escalas más pequeñas que este límite.

La microscopía de fluorescencia se ha vuelto fundamental en diversas áreas de investigación y diagnóstico en las biomédicas, aunque

inicialmente se usaba para análisis estructurales, ahora es esencial en múltiples campos de estudio. Los microscopios de fluorescencia actuales no solo brindan alta resolución y en ciertos casos superresolución, sino que también permiten obtener imágenes funcionales a gran velocidad, además, han surgido tecnologías complementarias, como los citómetros de flujo y los lectores multimodo, que también permiten capturar imágenes de manera rápida. Gracias a los avances en las cámaras, ahora es posible generar imágenes a más de 100 fotogramas por segundo manteniendo una resolución considerable.

La capacidad de la microscopía de epifluorescencia para generar un contraste alto por el fondo oscuro se da gracias a la separación de excitación y emisión, adicionalmente sólo las estructuras deseadas son visibles en la imagen y presenta una versatilidad al poder combinar múltiples colores. Para tener un resultado óptimo es clave la configuración del microscopio y la elección de los fluoruros para generar esa conexión entre la excitación, la emisión y la muestra ya que deben cohesionarse entre sí. Su relevancia se da por medio de la ampliación de aplicaciones debido a su versatilidad y expansión biomédica, accesibilidad, su velocidad y capacidad funcional más las tecnologías complementarias, lo que permite una detección específica de moléculas, facilitando así la identificación y localización de proteínas, ácidos nucleicos y otros componentes celulares.

BIBLIOGRAFIA:

1. Abramowitz, M., Herman, B., Murphy, D., & Davidson, M. (2007). Microscopía de fluorescencia, anatomía del microscopio de fluorescencia _ Olympus LS. Molecular Expressions, Evident, Olympus Life Science. <https://www.olympus-lifescience.com/es/microscope-resource/primer/techniques/fluorescence/anatomy/fluoromicroanatomy/>
2. Lakowicz, J. R. (2006). Principles of Fluorescence Spectroscopy Third Edition.
3. Ormachea, O., & Villazón, A. (2017). Desarrollo de un microscopio de epifluorescencia de bajo costo. INVESTIGACION & DESARROLLO, 17(1), 5–14. <https://doi.org/10.23881/idupbo.017.1-1i>
4. Rachid, R. (2022). Epifluorescence Microscopy. In V. Nechyporuk-Zloy (Ed.), Principles of Light Microscopy: From Basic to Advanced (pp. 57–75). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-031-04477-9_3