

# *Fundamentos de la microscopía confocal espectral*

*Andrés Esteban Cantos y Covadonga Alonso Martí  
Laboratorio de Interacción virus-célula  
Departamento de Biotecnología del INIA*

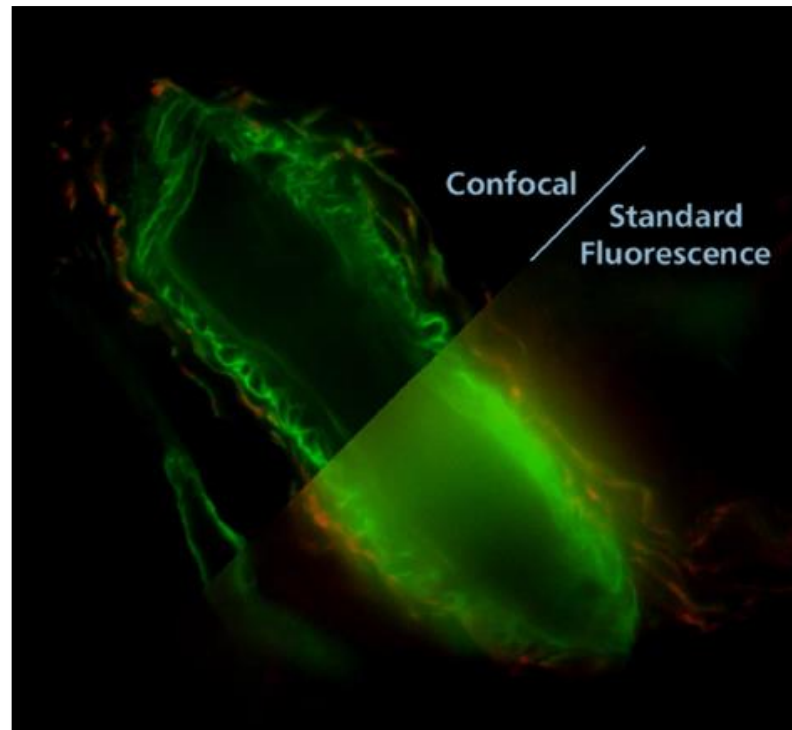


MINISTERIO  
DE ECONOMÍA, INDUSTRIA  
Y COMPETITIVIDAD



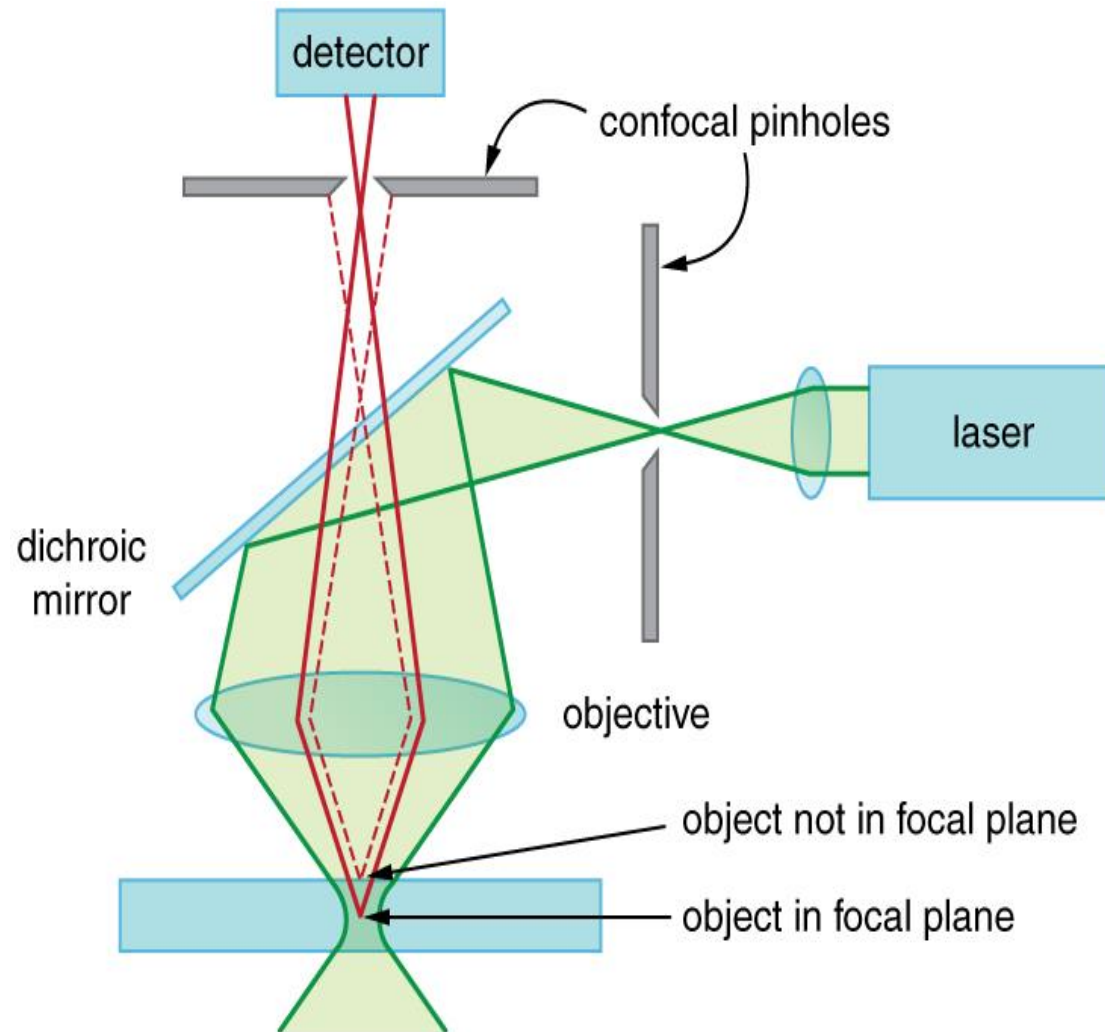
## ¿Qué es la microscopía confocal?

Es una modalidad de microscopía de fluorescencia que incrementa la resolución y el contraste de la imagen gracias a dos diafragmas especiales denominados **pinholes**, que eliminan la luz procedente de los planos situados fuera de foco permitiendo el enfoque de la iluminación en un único punto de la muestra.



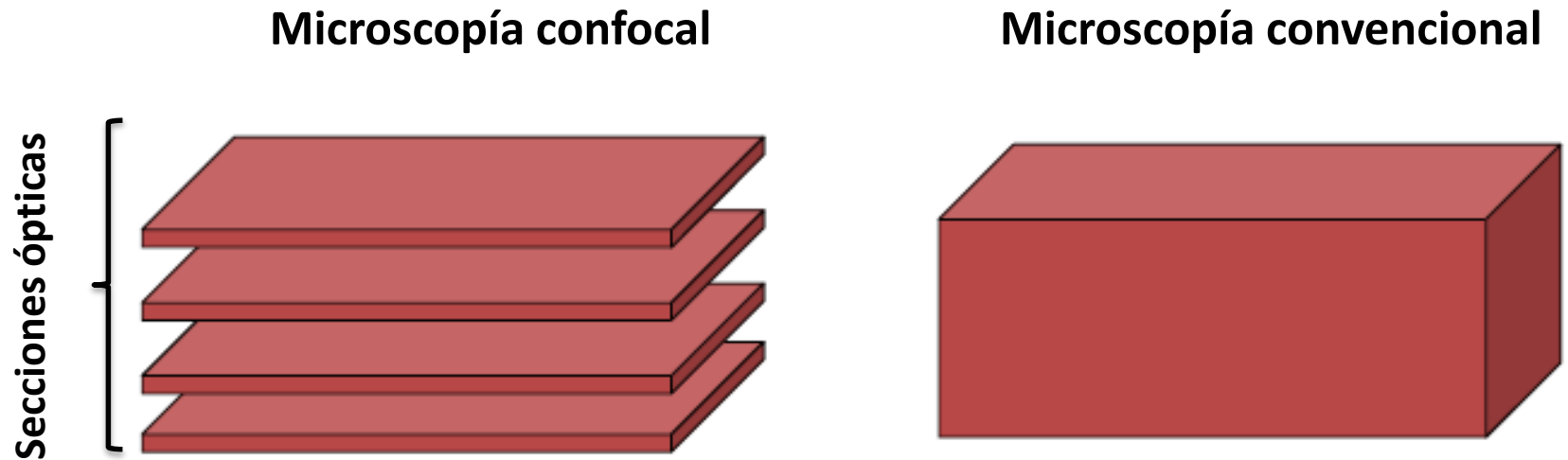
Comparación entre microscopía confocal y convencional

## Fundamento del pinhole

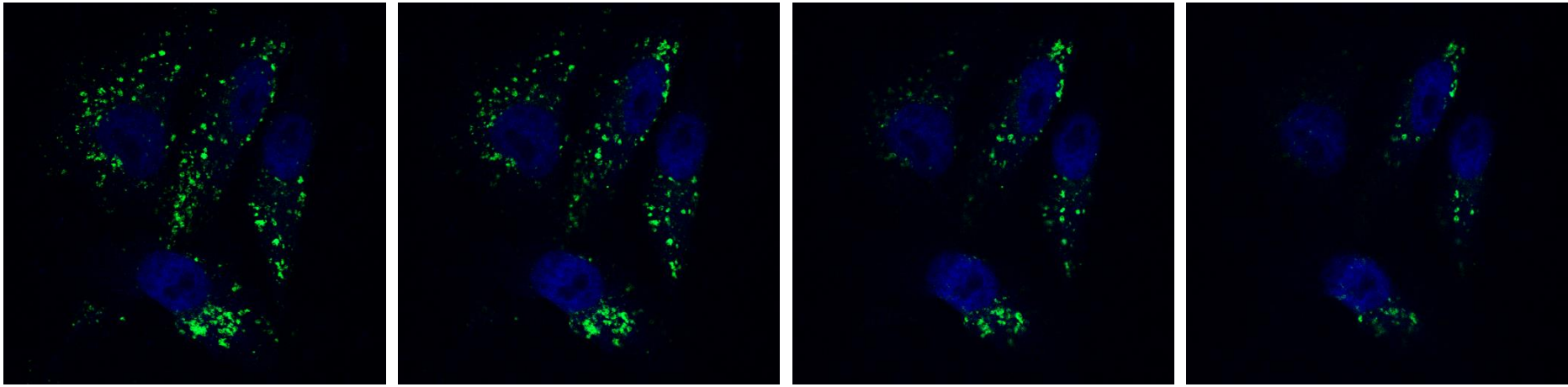


Tomado de:

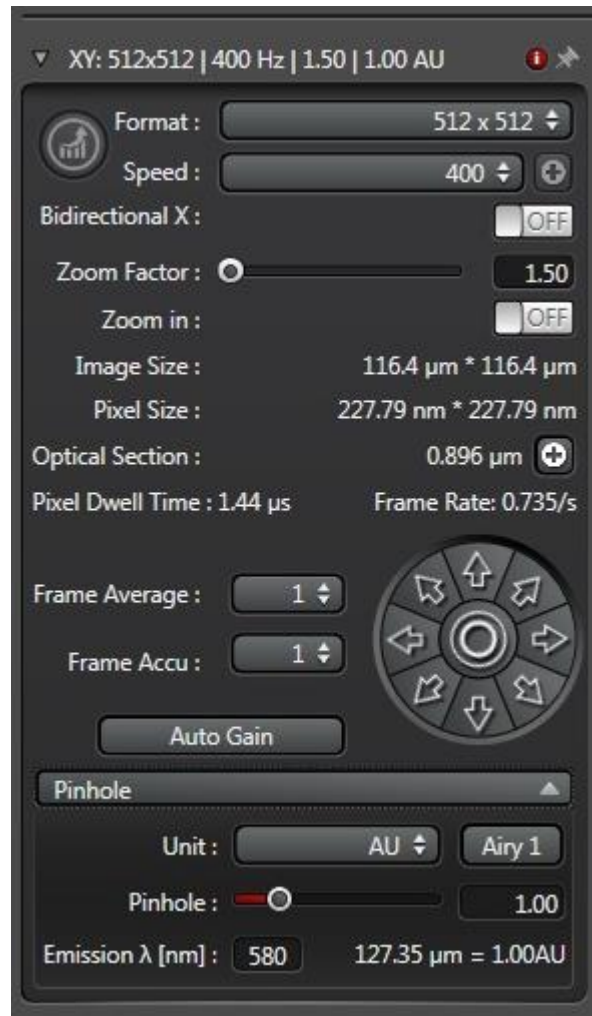
<http://archive.cnx.org/contents/4cfd3c2d-dad1-4133-8dae-0c321a6577a4@1/extended-topic-microscopy-enhanced-by-the-wave-characteristics-of-light>



A diferencia de la microscopía convencional, los sistemas confocales permiten generar **imágenes tridimensionales** al tomar y superponer imágenes de diferentes planos focales (secciones ópticas)



**Ejemplo de diferentes imágenes focales de una muestra**



← Selección de Airy 1

El diámetro del pinhole se representa en unidades de airy. Al seleccionar un objetivo en el confocal, el sistema ajusta el pinhole a un valor óptimo denominado **unidad de Airy 1**, el cual permite el paso de gran parte de la luz procedente únicamente del plano focal.

El diámetro del pinhole no es fijo y puede modificarse

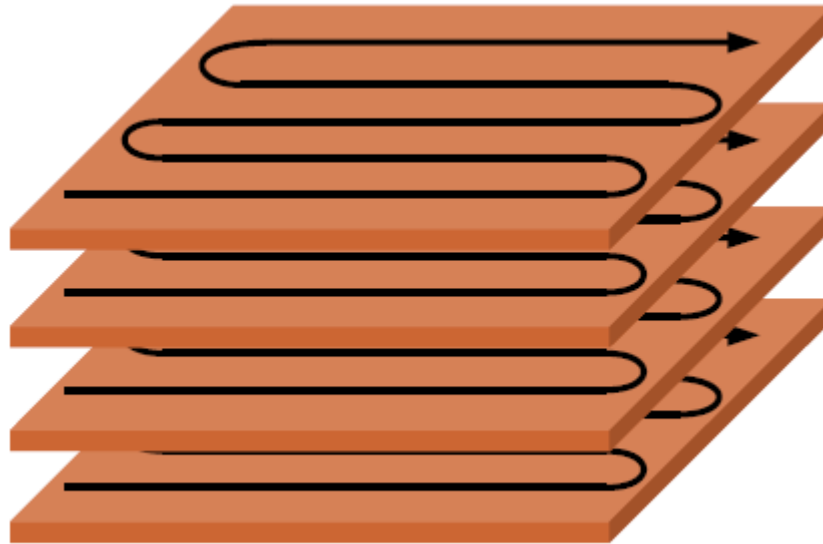


## **Si se disminuye el diámetro**

- ✓ Sección óptica más fina
- ✓ Mayor resolución en Z
- ✓ Menor señal de fluorescencia

## **Si se aumenta el diámetro**

- ✓ Sección óptica más gruesa
- ✓ Menor resolución en Z
- ✓ Mayor señal de fluorescencia



Los microscopios confocales utilizan ***láseres*** como fuente de excitación, los cuales realizan un **barrido** en dirección X e Y por toda la muestra, punto a punto y plano a plano.



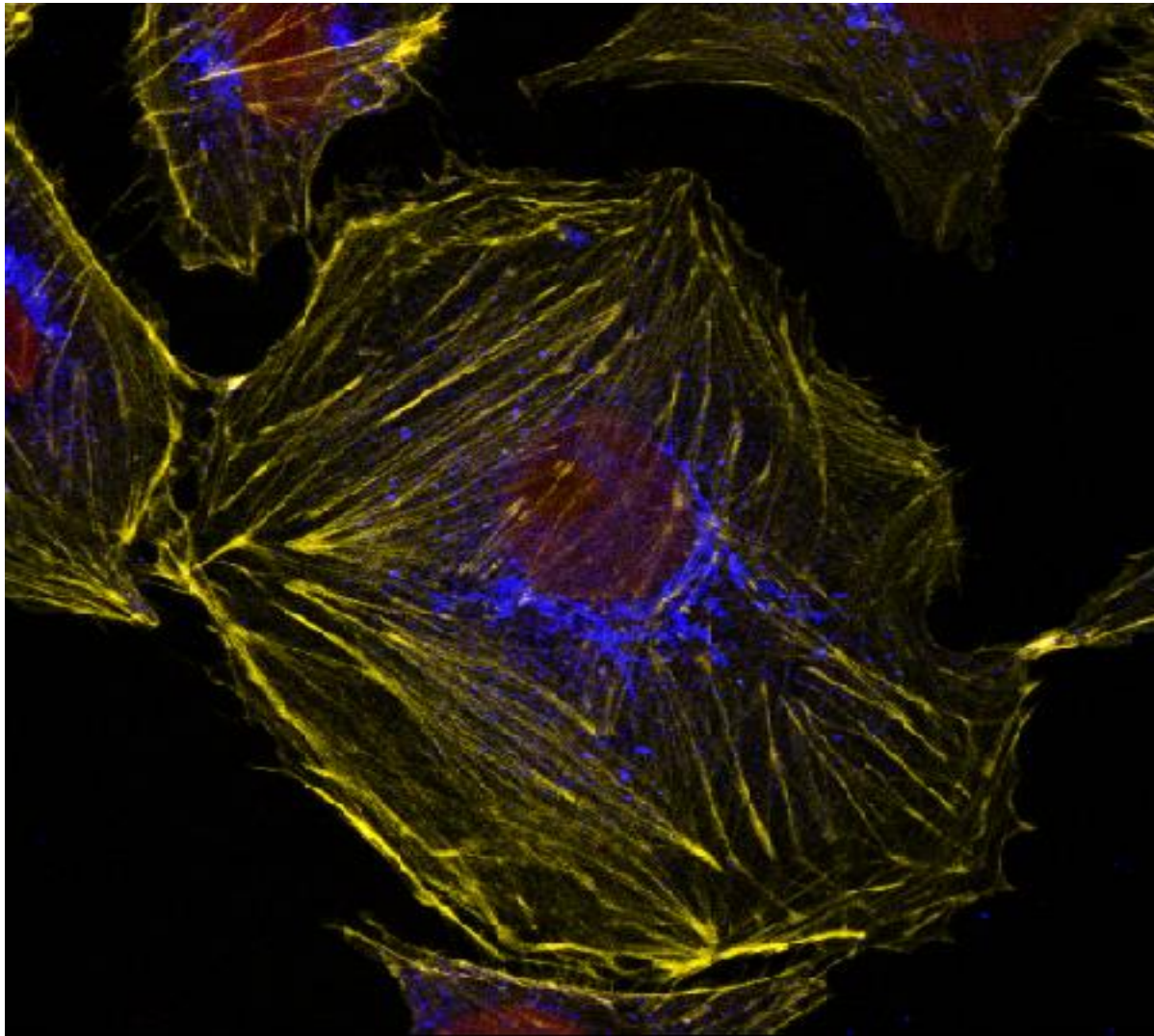


Imagen confocal: marcaje endosomal y de citoesqueleto en células VERO. A. Esteban

## Principales diferencias entre microscopía confocal y convencional

|                                     | M. confocal                                      | M. convencional                                       |
|-------------------------------------|--|---|
| Fuente de iluminación               | Láseres (adquisición de la imagen punto a punto) | Lámparas de g, Xn                                     |
| Separación de la señal              | Sistemas AOBS, filtros de emisión                | Espejos dicroicos, filtros de emisión                 |
| Sistema de detección                | Fotomultiplicadores                              | Cámaras CCD   |
| Calidad de la imagen                | Información de plano focal (alta resolución)     | Información de planos fuera de foco (peor resolución) |
| Reconstrucciones 3D y 4D            | Sí   | No  |
| Zoom óptico controlado por software | Sí   | No  |
| Rotación de la imagen               | Sí   | No  |

## Nuevas tecnologías en microscopía confocal

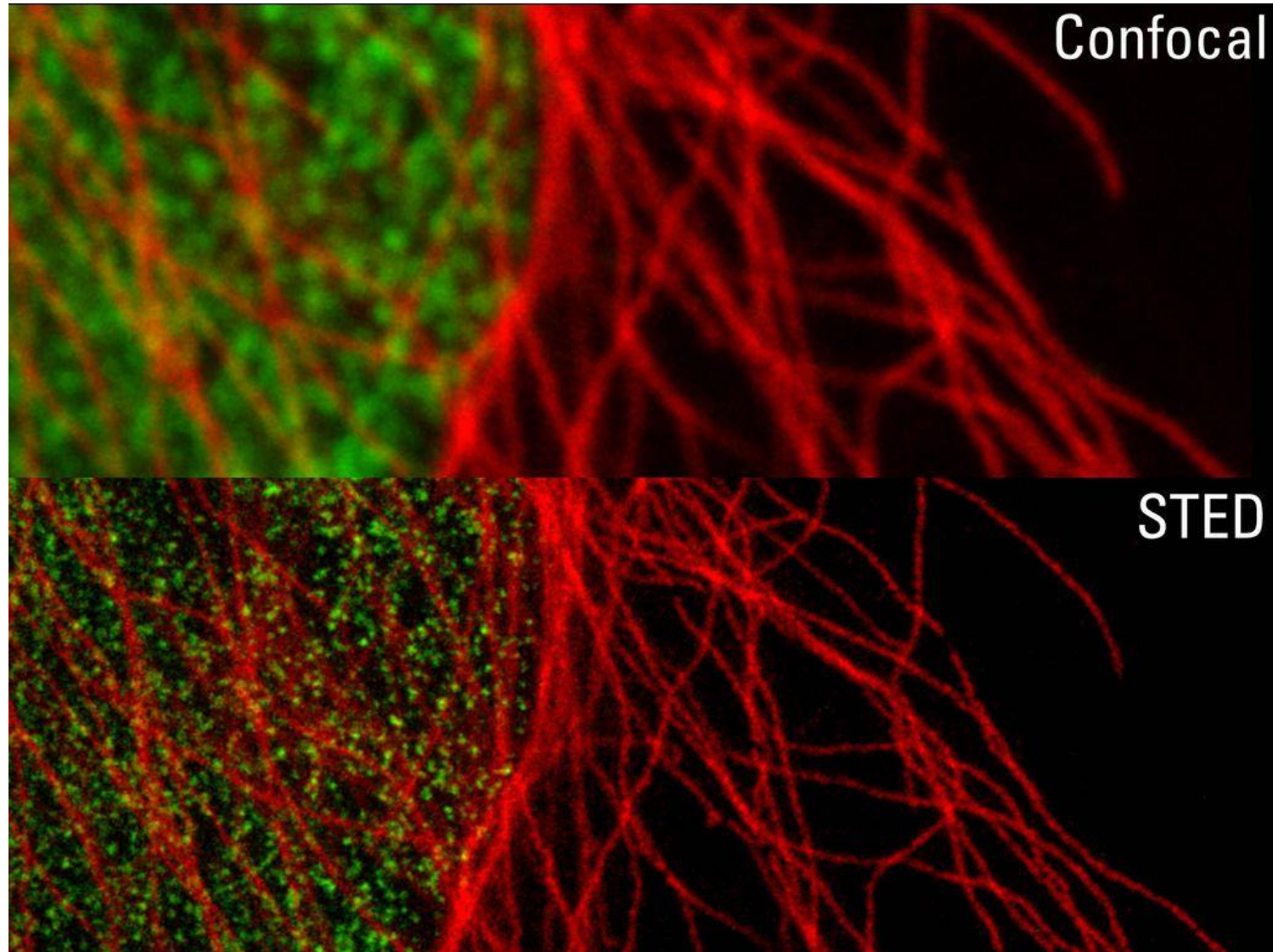
### **STED: *Stimulated Emission Depletion*:**

- ✓ Aumenta la resolución en XY por encima del límite de Abbe (200 nm)

Un segundo láser (en forma de anillo) incide sobre la muestra justo después de ser excitada con un primer láser. Las zonas donde incide el segundo láser no emiten fluorescencia, pues los fotones excitados con el primero vuelven a su estado basal al excitarse por segunda vez. Esto permite que la zona situada dentro del anillo (no incididas por el segundo láser) sean visualizadas con mayor nitidez

### **Detectores híbridos (HyD):**

- ✓ Detectores con mucha más sensibilidad que permiten menor cantidad de luz. Mejoran la relación señal/ruido.

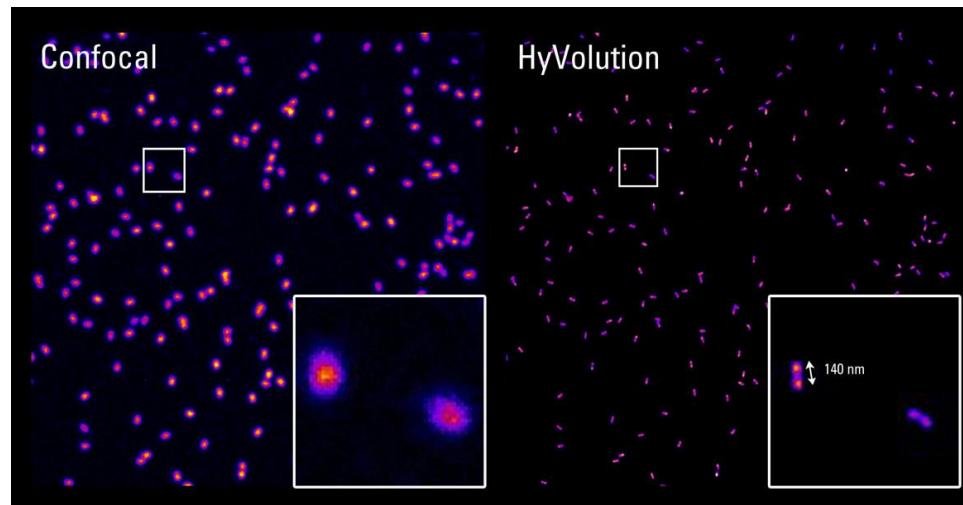


Confocal VS STED. Tomado de [www.leica-microsystem.com](http://www.leica-microsystem.com)

## Deconvolución:

- ✓ Es un sistema que modeliza matemáticamente el proceso de formación de una imagen que sufre degradación por desenfoque y ruido. En definitiva muestra lo que un sistema óptico no puede ver, separando estructuras que antes no se podían diferenciar.

## HyVolution (deconvolución + detectores híbridos)



Confocal VS HyVolution. Tomado de [www.leica-microsystem.com](http://www.leica-microsystem.com)