

UNIVERSIDAD DE SONORA
División de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Física

**Estudio del efecto del láser
infrarrojo en la variación de
enfoque de un microscopio**

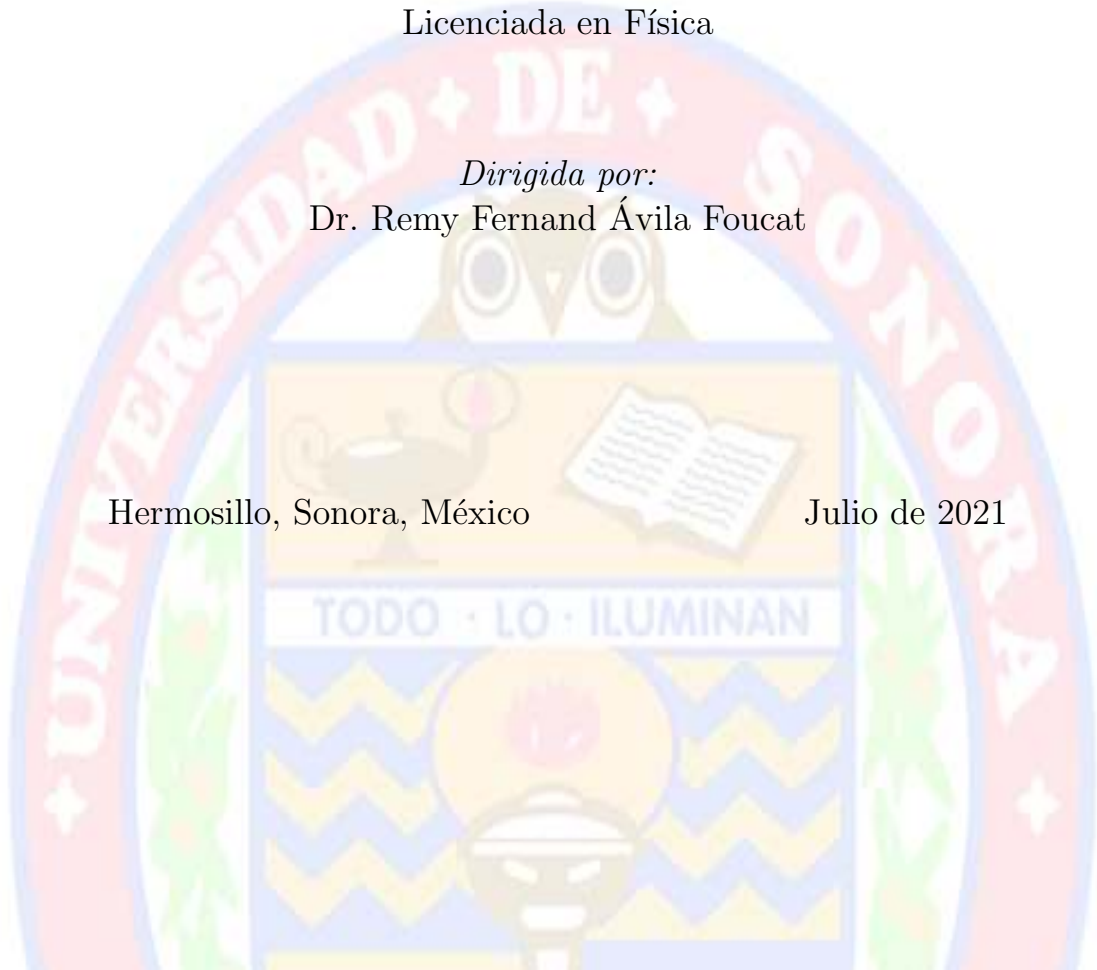
Tesis que presenta:
Melissa Matrecitos Avila

Para obtener el título de
Licenciada en Física

Dirigida por:
Dr. Remy Fernand Ávila Foucat

Hermosillo, Sonora, México

Julio de 2021



Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



**"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"**



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

Agradecimientos

No me alcanzan las palabras, ni los números, para mostrarles lo agradecida que estoy con ustedes mamá y papá, por su apoyo incondicional en cada paso de mi vida. Que si he llegado hasta donde estoy es a raíz de sus esfuerzos, por guiarme con tanto amor y comprensión. Espero poder seguir creciendo a su lado y lograr ser una persona tan extraordinaria como lo son ustedes, Nancy y Martín.

A mis hermanas, Daniela y Clarisa, quiero agradecerles por todos los momentos que han compartido conmigo, todas esas desveladas con tareas y por siempre traer alegría a mis días. También a mis niños, Marcia y Fabián, por alentarme a seguir creciendo y en especial por su apoyo durante mi estancia, la cual dio lugar a la existencia de esta tesis.

A mi tata Arturo, por que siempre que necesité algo, ahí estaba él para ayudarme en todo lo que podía. Y claro a mi tata Juan, que aunque ya no estuvo durante mi culminación de estudios, siempre fue y seguirá siendo una inspiración para dar lo mejor de mi.

A mis amigos, porque en ustedes ocho he encontrado una segunda familia, nada de esto hubiera sido igual sin su compañía y amistad, con todas las tardes de estudio y de diversión, por creer en mí en ocasiones en que ni yo misma lo hacía, no sé imaginan cuanto les quiero y agradezco. Y a ustedes dos, que a pesar de no empezar este viaje juntos, fue de lo más grato encontrarlos en mi camino.

A mi director de tesis y mentor, el Dr. Remy Avila (CFATA, UNAM), por creer en mí, darme la gran oportunidad de trabajar a su lado, por la confianza, el apoyo y las enseñanzas. Espero seguir aprendiendo de usted y que vengan muchos proyectos para continuar trabajando juntos. Al Dr. Salvador Cuevas (Instituto de Astronomía, UNAM), por su tiempo, su apoyo con el modelo y sus explicaciones, que siempre me hacían cuestionarme, reflexionar y crecer académicamente.

Al Departamento y la Comunidad de Física de la Universidad de Sonora, a mis profesores de la carrera por su gran labor de enseñanza y por generar un ambiente muy ameno durante mis estudios de licenciatura, en especial a la M.C. Rocío Gomez por su constante apoyo y estar al pendiente de mi crecimiento académico. También a mis maestros del bachillerato por impulsarme a estudiar esta ciencia tan magnífica.

Investigación realizada gracias a DGAPA-UNAM a través de la beca PAPIIT IN108420.

Resumen

La precisión y la estabilidad de la posición del foco en microscopía confocal es crucial, no solo por la nitidez de la imagen, sino también para evitar fluctuaciones radiométricas que pueden ser mal interpretadas como variaciones de la intensidad de fluorescencia en la muestra. En esta tesis se abordará el efecto de la variación en la posición del foco de un microscopio confocal provocado por un láser infrarrojo de onda continua de 810 nm con un objetivo de 60X de inmersión en aceite. De manera general observamos que al encender o apagar el láser, la posición del foco cambia hacia valores más bajos o altos en la dirección del eje z , respectivamente. La variación máxima observada fue de $2.25\ \mu\text{m}$ en un intervalo de tiempo de 600 s. La evolución temporal de la posición del foco fue ajustada por curvas exponenciales que imitan las variaciones de temperatura debidas a una fuente de calor. El análisis sugiere fuertemente que la desviación del enfoque se debe al calentamiento del aceite de inmersión.

Esta tesis se divide en cinco capítulos: en el primero, Conceptos generales (cap. 1), se habla del contexto histórico de la microscopía, una introducción a las técnicas utilizadas, hipótesis y objetivos de la tesis. Después, en el Marco teórico (cap. 2) se comenta acerca de microscopía en general y el microscopio óptico, también se menciona acerca de los microscopios utilizados en los experimentos: fluorescencia y confocal, su principio físico y la explicación básica de la formación de imágenes, de igual manera se aborda el tema de láser infrarrojo cómo pinzas ópticas y sus aplicaciones. En los Antecedentes se explica el contexto del cual vienen los datos. En el capítulo de Materiales y Métodos (cap. 3) se explican las condiciones del experimento y configuración de los componentes, así como el método para la obtención de los datos y el análisis que se les dio. En los Resultados y Discusión (cap. 4) se muestran los resultados obtenidos y un análisis cuantitativo y cualitativo de los experimentos realizados. Por último en las Conclusiones (cap. 5) se mencionan una reflexión sobre la importancia de los resultados encontrados y recomendaciones para trabajos futuros.

Índice general

Índice de figuras	VI
1. Conceptos Generales	1
1.1. Introducción	1
1.2. Justificación	4
1.3. Hipótesis	5
1.4. Objetivo	6
1.4.1. Objetivo General	6
1.4.2. Objetivos Específicos	6
2. Marco Teórico y Antecedentes	7
2.1. Microscopía	7
2.1.1. Tipos de microscopios	8
2.1.2. El microscopio óptico	9
2.2. Microscopía de fluorescencia	17
2.2.1. Principio físico de fluorescencia	18
2.2.2. Microscopio de fluorescencia	20
2.3. Microscopía confocal	24
2.3.1. Principio físico del microscopio confocal	25
2.4. Microscopía confocal de fluorescencia	27
2.4.1. Formación de imágenes	28
2.5. Uso del láser infrarrojo en pinzas ópticas	30
2.6. Antecedentes	32
3. Materiales y Métodos	34
3.1. Materiales y Equipo	34
3.1.1. Muestra	34
3.1.2. Diseño Experimental	34
3.2. Metodología	37

3.2.1. Experimento	37
3.2.2. Análisis de los Datos	38
4. Resultados y Discusión	39
4.1. Resultados	39
4.2. Discusión	46
4.2.1. Cálculos preliminares	46
4.2.2. Desarrollo del modelo	50
5. Conclusiones	53
Bibliografía	58
A. Solución a la ecuación diferencial de la temperatura	59
B. Análisis térmico del objetivo de microscopio	64

Índice de figuras

1.1. Imagen generada en un microscopio de fluorescencia confocal	2
2.1. Microscopio y sus componentes mecánicos.	10
2.2. Rayos luminosos que forman el ángulo de apertura	12
2.3. Esquema del camino luminoso recorrido entre el objetivo seco y uno de inmersión	13
2.4. Características externas de un objetivo (nomenclatura)	14
2.5. Funcionamiento general de un microscopio compuesto con co- rrección a infinito.	16
2.6. Diferencia entre imágenes obtenidas con epifluorescencia y con láser confocal	18
2.7. Proceso de la fluorescencia	19
2.8. Espectros de absorción y emisión de Alexa Fluor 555	20
2.9. Cubo de filtros de fluorescencia	22
2.10. Configuración básica de un microscopio de fluorescencia	23
2.11. Principio básico de un microscopio confocal	25
2.12. Estructura de un microscopio confocal con disco giratorio. . . .	26
2.13. Principio de funcionamiento de un microscopio confocal de barrido láser con fluorescencia.	28
2.14. Esquema básico de un microscopio confocal de barrido láser con fluorescencia.	29
3.1. Fotografía del sistema óptico.	35
3.2. Arreglo óptico.	36
3.3. Sistema de estudio.	36
3.4. Gráfico representativo del experimento.	37
3.5. Imagen de la célula.	38
4.1. Perfil de Intensidad contra posición	40

ÍNDICE DE FIGURAS

4.2.	Primeros cuatro perfiles de posición frente a intensidad . . .	41
4.3.	Siguientes cuatro perfiles de posición frente a intensidad . . .	42
4.4.	Z_μ contra tiempo de los primeros cuatro experimentos	43
4.5.	Z_μ contra tiempo de los siguientes cuatro perfiles de intensidad	44
4.6.	Desviación del foco.	46
4.7.	Trayectoria de la luz a través de un dioptrio con radio de curvatura R y con distinto índice de refracción al medio . . .	49
4.8.	Esquema óptico del movimiento del objetivo de microscopio al encender el láser NIR. En la coordenada z se mide la posición del objetivo respecto al plano horizontal.	49
A.1.	Forma de la función de Heaviside	60
B.1.	Objetivo de microscopio de inmersión 60 X.	65
B.2.	Análisis del objetivo considerando lentes paraxiales.	65

Capítulo 1

Conceptos Generales

1.1. Introducción

Al conjunto de técnicas y métodos utilizados para el estudio de objetos que no pueden ser observados a simple vista se le conoce como microscopía [1]. El instrumento utilizado para dichas observaciones se le llama microscopio. Éste fue utilizado por los primeros biólogos para estudiar los componentes de células y tejidos animales o vegetales. Actualmente, el microscopio es un instrumento básico en los laboratorios de investigación y de diagnóstico, así como en las aulas de enseñanza, en especial de biología, embriología, histología, microbiología y patología [2].

A principios de siglo XVII se desarrolló el microscopio óptico. Anton Van Leeuwenhoek realizó unas de las mejores observaciones de la época, éste utilizó diminutos lentes de vidrio colocados muy cerca del objeto y del ojo. A finales de 1600, este científico holandés logró observaciones de células sanguíneas, bacterias y estructura dentro de las células del tejido animal. La desventaja del dispositivo utilizado, aunque era muy simple, era que había que posicionar las lentes de manera muy precisa, lo que hacía que las observaciones fueran muy agotadoras en la práctica. [3]

Con el paso del tiempo, y con la creciente necesidad de observaciones más precisas y de objetos más pequeños, se desarrollaron diferentes técnicas de microscopía, así como de microscopios con fines específicos. Algunos objetos pequeños de interés científico o general están enlistados en la Tabla 1.1 seguido con sus dimensiones aproximadas[3].

Entre las técnicas de microscopía fotónica desarrolladas se encuentran [4]: campo claro, campo oscuro, contraste de fases, fluorescencia, etc. La técnica analizada en esta tesis es la de fluorescencia confocal de barrido

Objeto	Diámetro típico
Grano de arena	$1mm$
Cabello humano	$150\mu m$
Glóbulo rojo	$10\mu m$
Bacteria	$1\mu m$
Virus	$20nm$
Molécula DNA	$2nm$

Tabla 1.1: Tamaño aproximado de algunos objetos comunes y la magnificación mínima para distinguirlos.

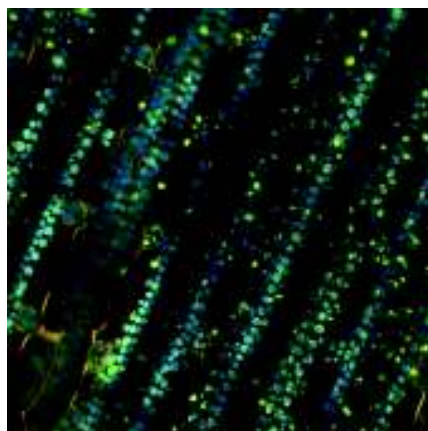


Figura 1.1: Imagen generada en un microscopio de fluorescencia confocal

láser.

La microscopía de fluorescencia consiste en iluminar la muestra y recoger la fluorescencia generado con el objetivo, para después ser proyectada en detectores de luz que forman una imagen 2D de la muestra. Sin embargo, la imagen generada contiene luz desenfocada que reduce el contraste de esta. Por otro lado, el microscopio confocal con escaneo láser, ilumina un solo punto de la muestra y un detector recoleta la luz del único punto, haciendo un barrido por toda la muestra logrando formar una imagen de un plano específico de la muestra. En este caso, una apertura confocal filtra la información desenfocada [5]. En la fig. 1.1 se muestra un ejemplo de imagen generada por un microscopio confocal con una muestra autofluorescente (pasto) excitada con tres longitudes de onda $\lambda_1 = 405nm$, $\lambda_2 = 488nm$ y $\lambda_3 = 633nm$ y con las siguientes bandas espectrales de emisión: $\lambda_1 = 410-483nm$, $\lambda_2 = 500-628nm$ y $\lambda_3 = 638 - 759nm$ respectivamente.

La microscopía de fluorescencia y la microscopía confocal de barrido láser se utilizan ampliamente en biología molecular y celular para obtener imágenes no invasivas de resolución temporal permitiendo la extracción de información cuantitativa estructural y funcional de muestras biológicas [6]. Un inconveniente importante de las técnicas es que la luz de excitación atraviesa la muestra y excita la fluorescencia a lo largo de la trayectoria óptica. Esto produce fluorescencia de las regiones que están por encima y por debajo del plano focal, desperdiciando así valiosos fluoróforos y fotones de fluorescencia. Esto es particularmente crítico cuando se trata de la obtención de imágenes de muestras vivas y especímenes durante largos períodos de tiempo, ya que la irradiación continua provoca fotodaños y fototoxicidad innecesarios. [5]

A raíz de estos inconvenientes, en las últimas décadas, se han desarrollado alternativas de imágenes para visualizar volúmenes de muestra más rápidos y grandes, con resoluciones espacio-temporales más altas durante períodos de tiempo más largos, mientras se conserva la muestra bajo niveles de irradiación [5]. Dos técnicas novedosas son: la microscopía de fluorescencia de hoja de luz y la microscopía de reconstrucción óptica estocástica.

La microscopía de fluorescencia de hoja de luz consiste en iluminar la muestra con un rayo láser laminar delgado, pero solo en la parte de la muestra que se está tomando como imagen. Luego, la fluorescencia resultante del plano de iluminación se recoge en una dirección perpendicular desde el eje de iluminación. Además, como solo se ilumina un volumen laminar delgado de la muestra, la imagen proyectada sobre la matriz de detectores 2D corresponderá a una sección óptica limpia de la muestra sin luz desenfocada. Esta imagen es equivalente a la obtenida con un microscopio confocal de barrido láser pero sin necesidad de apertura confocal. También como ventaja de la iluminación, los fluoróforos que se encuentran fuera del pequeño volumen de la hoja de luz no se iluminarán y, por lo tanto, no sufrirán fotoblanqueo. Como resultado, toda la muestra se verá aún menos afectada por la fototoxicidad, lo que aumentará su viabilidad. [5]

La microscopía de reconstrucción óptica estocástica (STORM, por las siglas en inglés de Stochastic Optical Reconstruction Microscopy), se construye una imagen de fluorescencia a partir de la localización de alta precisión de moléculas fluorescentes individuales que se encienden y apagan con luz de diferentes colores. El proceso de generación de imágenes STORM consta de una serie de ciclos de imágenes. En cada ciclo, solo se enciende una fracción de los fluoróforos en el campo de visión, de modo que cada uno de

los fluoróforos activos se puede resolver ópticamente del resto, es decir, sus imágenes no se superponen. Esto permite determinar la posición de estos fluoróforos con gran precisión. La repetición de este proceso durante varios ciclos, cada uno de los cuales provoca la activación de un subconjunto estocásticamente diferente de fluoróforos, permite determinar las posiciones de muchos fluoróforos y, por lo tanto, reconstruir una imagen general [6].

La microscopía confocal se puede utilizar en combinación con otras técnicas ópticas ya sea con la misma instrumentación o adaptando otros elementos ópticos. Por ejemplo, junto con la microscopía confocal de fluorescencia, se puede utilizar un láser de infrarrojo cercano para atrapar objetos de escala micrométrica en una configuración de pinzas ópticas [7]

Algunas de las aplicaciones más sofisticadas de las pinzas ópticas son [8, 7]: proyección de matrices de muchas trampas para atrapar múltiples objetos en geometrías predefinidas, potenciales ópticos de forma libre donde es posible observar fácilmente su excitación térmica, formación de sistemas modelo para la termodinámica fuera del equilibrio, entre otros. El uso de esta herramienta no es único en la física, sino también en otras ciencias como la biología. Algunos experimentos notables realizados con pinzas ópticas son en [8]: motores moleculares, natación y motilidad, dinámica del ADN y algunos más.

En esta tesis se presenta el efecto de un láser de infrarrojo cercano en un microscopio confocal. Los experimentos fueron realizados durante observaciones de microscopía confocal en fibroblastos. Al hacer incidir en la muestra un láser infrarrojo para estimular la célula, la posición del foco disminuía y el efecto era reversible al apagar el láser infrarrojo.

1.2. Justificación

Las técnicas abordadas en esta tesis tienen una gran cantidad de aplicaciones para el estudio de muestras biológicas, así como herramientas de estudio en otras ciencias. El uso de la microscopía de fluorescencia para sondear fenómenos biológicos se está expandiendo rápidamente a todos los campos de la biología celular y molecular. Desde la comprensión de los principios físicos del proceso de fluorescencia, hasta en la ingeniería genética de proteínas fluorescentes para controlar las actividades celulares vivas, es que se entrelazan profundamente la biología y las técnicas de microscopía de fluorescencia [9]. En conjunto, la microscopía de fluorescencia con el microscopio confocal de barrido láser, se obtienen imágenes sumamente nítidas, con una

gran capacidad de resolución, incluso se pueden hacer reconstrucciones en 3D que permiten mejor visualización de la muestra desde diferentes ángulos [2]. En cuanto a las pinzas ópticas, se puede decir que son una gran herramienta para estudios en biología, medicina, física, y muchas ciencias más, ya que con las trampas ópticas es posible el estudio de motores moleculares, dinámica del ADN, potenciales ópticos, etc. [8, 7]

Un ejemplo donde se utilizan en conjunto las tres técnicas, es durante la observación de células vivas con el microscopio confocal, aquí las pinzas ópticas pueden aliviar el grave problema de la borrosidad del movimiento de los objetos en movimiento fijándolos espacialmente. Así éstas técnicas se convierten en excelentes herramientas de imagen para la micromanipulación 3D [7].

Cómo la microscopía confocal de fluorescencia, es el modo que se usa con más frecuencia en aplicaciones biológicas [10], y las muestras analizadas van desde los nanómetros hasta micrómetros (Tabla 1.1), la exactitud de la posición del foco es de vital importancia, ya que ésta está relacionada con la intensidad captada por el microscopio y puede llegar a causar confusiones respecto a los estudios que se estén analizando. Otro motivo relevante sobre la posición del foco, es que si ésta cambia en el tiempo, se llegan a omitir planos ópticos cruciales de la muestra, incluso del tamaño de organelos, virus o de células procariotas [11].

Al caracterizar este efecto, es posible conocer la evolución temporal de la posición del foco. Esto ajustando curvas exponenciales que imiten las variaciones de temperatura debidas a una fuente de calor. Así se puede contemplar el efecto y evitar errores en las mediciones.

1.3. Hipótesis

1. La introducción de un láser infrarrojo en el trayecto óptico de un microscopio confocal puede afectar de forma medible la posición del foco.
2. Un láser infrarrojo de 810 nm calienta el aceite de inmersión Cargille Tipo 37 entre la muestra y el objetivo provocando un cambio en el índice de refracción y por tanto en la posición de enfoque del microscopio.

1.4. Objetivo

1.4.1. Objetivo General

1. Estudiar y caracterizar el efecto de la variación en la posición del foco de un microscopio confocal provocado por un láser infrarrojo (NIR) de onda continua que incide en el interior de un objetivo de inmersión en aceite.
2. Proponer una explicación física que sea consistente con las observaciones.

1.4.2. Objetivos Específicos

- Desarrollar una metodología para determinar o cuantificar la posición de enfoque de forma experimental.
- Analizar y caracterizar la variación de la posición del foco como función del tiempo de exposición al láser infrarrojo.
- Determinar la relación empírica entre el cambio de posición del foco y el tiempo de exposición al láser infrarrojo.
- Calcular el cambio de temperatura en el aceite de inmersión provocado por un láser infrarrojo de 810 nm y con una potencia a la salida del objetivo de microscopio de 40 mW.
- Calcular la variación del foco provocado por la temperatura.
- Comparar/analizar los cálculos teóricos y los resultados experimentales.

Capítulo 2

Marco Teórico y Antecedentes

2.1. Microscopía

La microscopía se puede definir como la observación de objetos muy pequeños, que normalmente no es posibles ver a simple vista, a través de un aparato llamado microscopio [12]. Dependiendo de la complejidad de los sistemas ópticos que conforman los microscopios podemos diferenciar entre dos tipos [2]:

- El microscopio simple.
- El microscopio compuesto.

El microscopio simple consiste en un sistema óptico de una sola lente convergente. La imagen que forman es virtual, aumentada y derecha. Aproximadamente pueden aumentar la imagen desde 5, 8, 10, 20 o hasta 50 veces, esto depende de las curvaturas de la lente que lo componen. Por otro lado, el microscopio compuesto, utiliza mínimo 3 sistemas ópticos para formar las imágenes: el condensador, los objetivos y los oculares. Estos a su vez están constituidos por lentes convergentes y divergentes [2].

Dependiendo de la manera en que se forma la imagen, los microscopios compuestos se pueden clasificar en: microscopios con longitud de tubo fijo o finito y microscopios con corrección a infinito. Los primeros dispositivos forman una imagen virtual ampliada mediante la combinación de una lente primaria, también llamada objetivo, y una lente secundaria, conocida como ocular [13], tienen una distancia específica desde la abertura de la boquilla,

donde se fija el cilindro del objetivo, hasta el asiento ocular en los tubos del ocular. El diseño asume que cuando la muestra se coloca enfocada, está a unos pocos micrómetros más lejos que el plano focal frontal del objetivo. Las longitudes de tubos finitos fueron estandarizadas en 160 milímetros durante el siglo XIX por la Royal Microscopical Society (RMS) y gozaron de una amplia aceptación durante más de 100 años [14]. Sin embargo, durante los últimos años, los principales fabricantes de microscopios han optado por utilizar sistemas ópticos corregidos a infinito. Son llamados así, no por el gran espacio que hay entre las lentes, sino por los rayos paralelos que salen del objetivo y llegan a la lente de tubo, formando una imagen intermedia antes de llegar a los oculares. La ventaja de estos sistemas es que permiten introducir componentes ópticos como prismas de contraste de interferencia diferencial, polarizadores y otros más en el camino óptico de los rayos paralelos, sin provocar grandes aberraciones [14].

Antes de iniciar una observación hay que tener en cuenta algunas consideraciones, por ejemplo, hay ocasiones en que, para obtener mejores imágenes de objetos a través del microscopio, la muestra se debe preparar, ya sea con cortes, técnicas de color, etc. En otros casos en los que es necesario un gran aumento, lo que se prepara es el objetivo, usando un objetivo especial de inmersión, se le coloca una gota de aceite para llenar el espacio entre el objetivo y la muestra, así se obtiene una mejor resolución en las imágenes [12]. Estas consideraciones dependen del tipo de microscopía a utilizar.

2.1.1. Tipos de microscopios

Se pueden clasificar los microscopios considerando diferentes aspectos, como el número de lentes (mencionado anteriormente), el sistema de iluminación, la transmisión de luz, número de oculares, entre otros. Dentro de estas clasificaciones existe una que distingue entre microscopio fotónicos, aquellos con un haz de fotones, y los microscopios electrónicos, los que tienen un haz de electrones. A continuación, se va a diferenciar entre los microscopios fotónicos considerando el tipo de luz que ilumina la muestra, así tenemos[4]:

- Microscopio óptico: la muestra es iluminada con luz visible.
- Microscopio de luz ultravioleta: como su nombre lo indica, la muestra se ilumina con luz ultravioleta.
- Microscopio de luz polarizada: este microscopio es una variante del

microscopio óptico, la diferencia es que se utilizan dos polarizadores para seleccionar la dirección de polarización deseada.

- Microscopio de fluorescencia: utilizan propiedades de fluorescencia para generar imágenes de la muestra. puede usar luz coherente o incoherente. esto tiene que ver con la fase e interferencia. Láser luz coherente y la lámpara es incoherente.

Dependiendo de la muestra, la información que se desee obtener y el aumento necesario para el análisis es que se selecciona el tipo de microscopio a utilizar.

A continuación, se describirá el funcionamiento y componentes esenciales del microscopio, que la mayoría de los microscopios mencionados anteriormente contienen, haciendo referencia al más básico: el microscopio óptico compuesto con corrección a infinito.

2.1.2. El microscopio óptico

Como se mencionó anteriormente, el microscopio óptico es una instrumento que se utiliza para ver objetos pequeños aumentados [13]. Los objetos a observar, en general, son tan pequeños que no se pueden distinguir con el ojo humano, incluso ni con una lupa. Los componentes de un microscopio se pueden dividir en tres categorías: componentes ópticos, mecánicos y de iluminación.

Componentes mecánicos

Son aquellos que sirven de sostén, movimiento y sujeción de los sistemas ópticos y de iluminación, así como de los objetos que se van a observar. Algunos son: la base o pie, brazo, platina, tubo óptico, portaobjetivos, tornillos macrométrico y micrométrico y cabezal [2]. Los objetos a observar, por lo regular, se colocan entre una lámina portaobjetos y una lámina cubreobjetos, ambos de vidrio, los cuales se sitúan encima de la platina del microscopio [15].

La importancia de los componentes mecánicos recae en que el enfoque del objetivo. Este se realiza variando la distancia relativa entre la platina y objetivo, mediante tornillos macro- y micro-métrico. Cabe señalar que pequeños desplazamientos en la posición de la muestra, dan lugar a grandes variaciones en la posición de la imagen intermedia. El mecanismo de enfoque del microscopio es crítico, por ello consta de dos ajustes: uno grueso (tornillo macrométrico) y uno fino (tornillo micrométrico). Con estos ajustes también

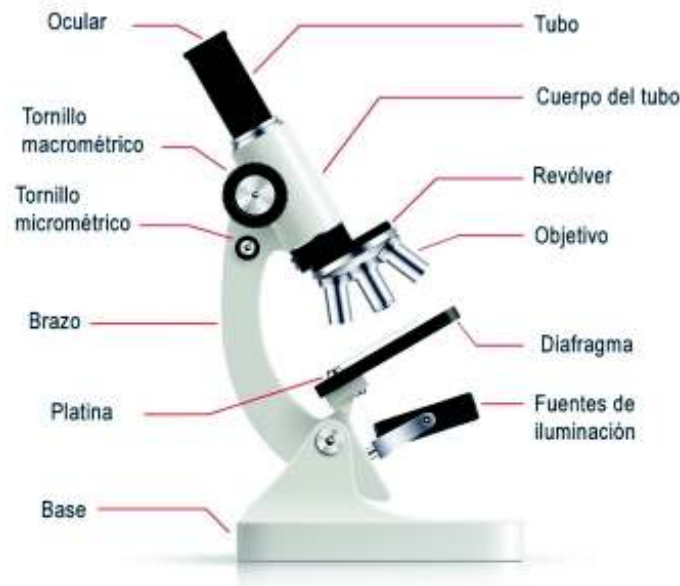


Figura 2.1: Microscopio y sus componentes mecánicos.

Imagen tomada de

<https://www.lifeder.com/partes-microscopio-optico/>

se pueden compensar las pequeñas ametropías esféricas que puedan afectar al observador [15] y obtener mejores imágenes.

Componentes ópticos

Son aquellos con los que se da la formación de la imagen, entre ellos está el ocular, la lente de tubo, el condensador, prismas y objetivos. Este último es el elemento crucial a la hora de formar imágenes, ya que su sistema de lentes establece la calidad de la imagen obtenida de la muestra, ajustando a su nitidez y resolución [2]. Continuando con la descripción de los componentes ópticos, el ocular es el encargado de formar una imagen a partir de la imagen formada por el objetivo y la lente de tubo. La imagen del ocular es aumentada, virtual y derecha [16]. Los prismas son estructuras transparentes que sirven para cambiar la trayectoria de los rayos luminosos provenientes del objetivo y dirigirlos finalmente hacia el ocular. Por otra parte, el condensador concentra y regula los rayos luminosos provenientes de la fuente luminosa. La cantidad de luz que puede captar está relacionada con la apertura numérica que éste posee [2]. El objetivo y la lente

Sustancia	Índice de refracción
Aire	1.000293
Agua	1.333
Etanol	1.361
Vidrio (crown)	1.55

Tabla 2.1: Índice de refracción de sustancias utilizadas en microscopía.

del tubo forman juntos un sistema de lentes que produce una imagen intermedia a una distancia finita dentro del tubo del microscopio. La región entre el objetivo y la lente del tubo (espacio infinito) proporciona un camino de rayos de luz paralelos, en el que se pueden colocar componentes ópticos complejos sin la introducción de aberraciones esféricas o, modificación de la distancia de trabajo del objetivo. [14]. Por último, el objetivo de microscopio tiene como función principal la formación de imágenes ampliadas de los objetos, aunque en ocasiones también puede cumplir a la vez con el papel del condensador [17]. Los accesorios se pueden diseñar para producir un valor exacto de aumento $1x$, sin alterar la alineación entre el objetivo y la lente del tubo. Esto es posible porque los accesorios ópticos colocados en un conjunto de ondas de luz paralelas no cambian la ubicación, ni el punto focal de la imagen [14]. Debido a la gran importancia que tienen los objetivos como parte del sistema óptico, vale la pena profundizar en el tema.

Objetivos de Microscopio

Al ser los encargados de la formación de imágenes y la calidad de estas, los objetivos son considerados los elementos más importantes en el sistema óptico del microscopio. Están constituidos por una serie de lentes convergentes y divergentes que compensan las aberraciones que podrían darse en las imágenes formadas [2]. Se puede distinguir entre distintos tipos de objetivos, pero para comprender estas especificaciones es necesario comentar algunos conceptos básicos sobre óptica:

- El índice de refracción (n) [16] de un material, es la relación entre la velocidad de la luz en el vacío y la velocidad en el medio utilizado. Algunos valores para sustancias que se utilizan en microscopía se mencionan en la tabla 2.1.
- El ángulo de apertura [2], es el ángulo máximo formado por los rayos luminosos que son captados por el objetivo. El ángulo de apertura y la

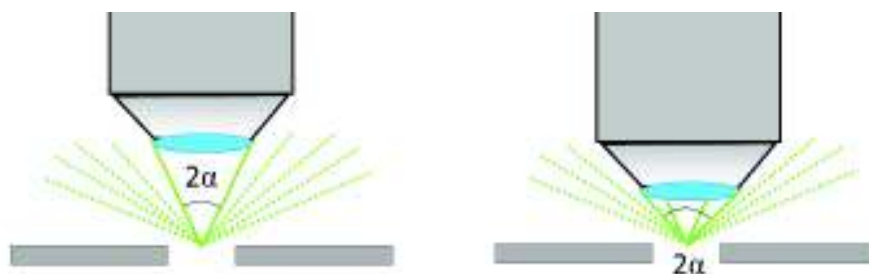


Figura 2.2: Rayos luminosos que forman el ángulo de apertura

cantidad de rayos captados son dos cantidades directamente proporcionales. La fig. 2.2 es un esquema de la relación entre la cantidad de rayos luminoso captados por el objetivo y el ángulo de apertura. A la mitad del ángulo de apertura se le denomina alfa (α), por ejemplo, si el ángulo de apertura de un objetivo es de 50° , su valor α será de 25° .

- La apertura numérica (NA por sus siglas en inglés), es una medida del poder de captación de luz del sistema. Puede tener valores que van desde aproximadamente 0.07 para objetivos de baja potencia, hasta aproximadamente 1.4 para objetivos de alta potencia [16]. Con n , como el índice de refracción del medio donde provienen los rayos y α , la mitad del ángulo de apertura, la NA se calcula mediante la siguiente expresión:

$$NA = n \cdot \text{sen}(\alpha) \quad (2.1)$$

- Se denomina distancia de trabajo (WD por sus siglas en inglés), a la distancia que existe entre la superficie del cubreobjetos y la lente frontal del objetivo. Esta distancia será mayor cuanto menor sea el aumento propio del objetivo y viceversa. [2]

De la fig. 2.2 se puede observar que entre más cerca está el objetivo del objeto, mayor es la cantidad de rayos luminosos que entran al objetivo. Sin embargo, en fig. 2.2 (b) aún se pueden observar rayos periféricos refractados que no entran al objetivo. Cómo se menciona en [16] el brillo de la imagen depende, en parte, de la cantidad de luz captada por el objetivo, por ello es importante maximizar la cantidad de luz que entra al objetivo. Esto se puede lograr poniendo un medio con un índice de refracción parecido al del vidrio entre el objetivo y el cubreobjetos, evitando la desviación de los rayos

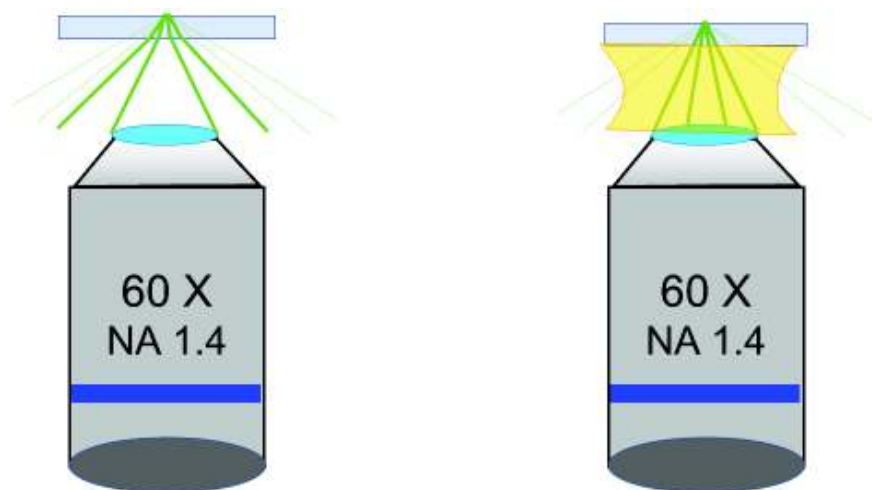


Figura 2.3: Esquema del camino luminoso recorrido entre el objetivo seco y uno de inmersión

debido a la refracción de éstos al cruzar el aire. Los objetivos que utilizan un medio distinto al aire para la formación de imágenes se conocen como objetivos de inmersión.

En la fig. 2.3 (a) se puede observar cómo los rayos luminosos al atravesar el aire son refractados y tienen una mayor desviación, mientras que en fig. 2.3 (b) al ser colocado un medio con índice de refracción parecido al del vidrio, los rayos son refractados en menor medida, teniendo una escasa desviación y por tanto, entrando mayor cantidad de rayos al objetivo. En el caso de los objetivos del microscopio sumergidos en aire o secos ($n=1$), la apertura numérica es inferior a la unidad, mientras que si el objetivo es de inmersión ($n > 1$), la apertura numérica puede llegar a ser superior a la unidad [15]. Las sustancias que se pueden utilizar entre el cubreobjetos y la lente frontal del objetivo de inmersión pueden ser agua, glicerina, o aceites naturales como el de cedro o bien, de tipo artificial [2].

Estructuralmente, los objetivos [2, 18] son un conjunto de lentes dentro de un soporte de metal, con anotaciones sobre sus características en el exterior como los son: aumento (algunos tienen una línea coloreada que indica el tamaño del aumento), apertura numérica, tipo de material con que están tallados los lentes, el tipo de aberraciones anuladas en su construcción o, si es de inmersión o seco, como se muestra en la fig. 2.4. Una clasificación relevante en los objetivos, concierne al tipo de correcciones que tienen las

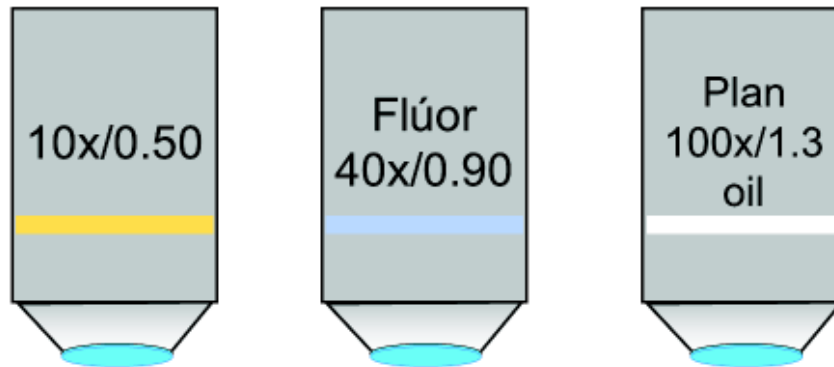


Figura 2.4: Características externas de un objetivo (nomenclatura)

lentes con el fin de anular parcial o completamente algunas aberraciones: cromática, de curvatura de campo, astigmatismo y de esfericidad. Así los objetivos pueden ser [2], [18]:

- Acromáticos: tienen corrección para la luz azul y roja, haciendo coincidir sus rayos en un solo plano focal, mientras que los rayos de otras longitudes de onda se forman en otro plano focal generando una imagen cuyos bordes se observan levemente difusos (espectro luminoso secundario).
- Semiapocromáticos: o también conocidos como objetivos de fluorita, corrigen el espectro secundario dando como resultado imágenes de bordes más nítidos. Por la alta capacidad que tienen para transmitir las radiaciones luminosas de onda corta, se les considera como los objetivos ideales para microscopía de fluorescencia.
- Apocromáticos: hacen coincidir en un solo plano los rayos luminosos azules, rojos y verdes, obteniendo así una imagen de bordes sumamente nítidos, pero la corrección de esta aberración trae consigo la curvatura de campo, pues la superficie focal de la imagen es ligeramente curva, dando como resultado que, al observar la imagen y tratar de enfocarla en la zona central del campo microscópico, se desenfoca la zona periférica y viceversa.
- Planapocromáticos: son corregidos para la mayor cantidad de aberraciones como la cromática, curvatura de campo, de esfericidad y de astigmatismo; por lo tanto, se obtienen imágenes sumamente nítidas

y el campo microscópico aparece totalmente plano, enfocado en toda su extensión. Son los objetivos que generan imágenes con mejor resolución.

Componentes de iluminación

Los componentes de iluminación son los instrumentos que suministran luz al microscopio. Entre estos se encuentran las fuentes de energía luminosa y los filtros.

Las fuentes de energía luminosa pueden ser de dos tipos: natural y artificial. La luz natural es la emitida por el sol, se obtiene indirectamente mediante un espejo que posee una superficie plana y otra cóncava. El espejo está situado en la superficie superior de la base o pie. Un mecanismo especial permite orientarlo hacia un lugar iluminado indirectamente por el sol, como una ventana por ejemplo, y luego dirigir el haz luminoso hacia la lente del condensador. Por otro lado, la luz artificial se genera a través de una lámpara de bajo voltaje que, mediante un reóstato regula la emisión y la intensidad de luz. Al igual que el espejo, este sistema de iluminación se inserta en la base o pie del microscopio [2].

Los filtros son estructuras transparentes que tienen como fin, modificar la longitud de onda de la luz que ilumina la muestra. Se encuentran en diversas locaciones de la trayectoria de la luz. Para ciertos casos de microscopía óptica especial, se requiere el auxilio de filtros especiales como en el caso de los microscopios de fluorescencia, contraste de fases y de polarización.[2]

La iluminación de la muestra es un aspecto importante de la microscopía óptica, ya que dependiendo de ésta, es posible capturar imágenes de muestras que parecieran invisibles. Anteriormente, los microscopios usaban luz de lámpara e iluminación crítica, en la que la fuente de luz se enfocaba en el plano de la muestra. Este método resultó inadecuado, más aún con la invención de fuentes de luz eléctrica en las que la estructura del filamento dominaba las características de la muestra. August Köhler propuso un método de iluminación robusto y flexible en 1893. Esta configuración implica una combinación de dos lentes y dos aberturas para generar una iluminación uniforme en el plano de la muestra. Este método se conoció como iluminación de Köhler y desde entonces, ha sido el pilar de la microscopía de fluorescencia y de campo brillante. Así, con distintas modificaciones a los métodos de iluminación, fue que se desarrollaron técnicas de microscopía cada vez más precisas en la formación de imágenes [19].

Formación de imágenes

Para entender la formación de la imagen, seguiremos los rayos saliendo del objeto, continuando por su camino óptico hasta la imagen final. Como se

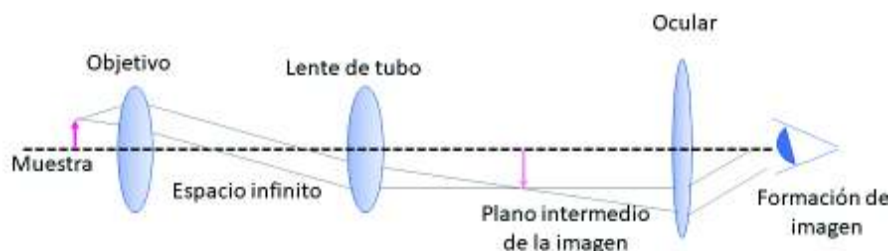


Figura 2.5: Funcionamiento general de un microscopio compuesto con corrección a infinito.

Diseño óptico de un microscopio compuesto con corrección a infinito y su trazo de rayos a través de los lentes.

muestra en la fig. 2.5, el microscopio está formado por tres lentes, el objetivo, la lente de tubo y el ocular. El objeto O a estudiar, se coloca a una distancia cercana al plano focal del objetivo, que produce un haz de rayos paralelos que viajan hasta la lente de tubo. Al espacio entre el objetivo y la lente de tubo se le conoce como espacio infinito, que es donde se colocan los componentes ópticos auxiliares mencionados anteriormente. La luz recogida por la lente de tubo se enfoca en el plano de imagen intermedio y, posteriormente, el ocular la amplía. Se deben tener precauciones con la cantidad de componentes ópticos auxiliares colocados en el espacio infinito, ya que el espacio para colocarlos es finito, además, colocar la lente de tubo demasiado lejos del objetivo reduce el número de ondas de luz periféricas recolectadas por la lente, lo que da como resultado imágenes con bordes oscuros o borrosos y reduce el rendimiento del microscopio [14].

El aumento producido por un objetivo corregido al infinito, se calcula dividiendo la distancia focal de la lente de tubo por la distancia focal del objetivo. A medida que aumenta la distancia focal de la lente de tubo, también aumenta la distancia al plano de imagen intermedio, lo que da como resultado una longitud total del tubo más larga. Las longitudes de tubo entre 200 y 250 milímetros se consideran óptimas, porque las distancias focales más largas producirán un ángulo fuera del eje más pequeño para los rayos de luz diagonales, reduciendo los artefactos del sistema [14].

2.2. Microscopía de fluorescencia

El proceso conocido como fluorescencia consiste en la absorción de luz de una longitud de onda particular y, después de un cierto período de tiempo (denominado vida útil de la fluorescencia), la luz es emitida con una longitud de onda mayor a la incidente [20, 21]. A diferencia de la fosforescencia, la emisión de luz a través del proceso de fluorescencia es casi simultánea con la absorción de la luz de excitación, excepto por un retardo de tiempo relativamente corto entre la absorción y la emisión de fotones, que suele tener una duración inferior a un microsegundo; mientras que en la fosforescencia, la emisión persiste más tiempo después de que se ha extinguido la luz de excitación [22].

La absorción y emisión de energía por moléculas en forma de luz, pueden ocurrir solo en ciertas longitudes de onda, siendo una característica particular de cada material [21]. Un ejemplo es la fluoresceína, que es un fluoróforo común que emite luz verde cuando se estimula con luz de excitación azul [20]. Comúnmente, las moléculas fluorescentes se unen a partes específicas de la muestra, y es así, que al aprovechar las distintas longitudes de onda de absorción y emisión de éstas, es posible distinguir entre distintas partes del objeto analizado [20].

El microscopio de fluorescencia contiene los mismos componentes que el microscopio óptico, pero se le añaden varios elementos: fuente luminosa especializada, filtros y espejos especiales, esto con la finalidad de que emita solo ciertas radiaciones con longitudes de onda determinada [2]. La luz de excitación se envía a la muestra a través del objetivo del microscopio. Un espejo especial, conocido como espejo divisor de haz dicróico, permite la separación de la luz de excitación de la fluorescencia emitida [17]. La luz de excitación es detectada por un fotomultiplicador.

Dos grandes tipos de uso de la microscopía de fluorescencia son la epifluorescencia y la de láser confocal. La característica principal de la microscopía confocal, es que recoge y detecta la luz emitida por moléculas fluorescentes situadas en un mismo plano del espacio tridimensional, además, la fuente de iluminación utilizada es láser, el cual, se mantiene perfectamente lineal al propagarse. Esta luz ilumina las muestras de forma específica con una intensidad muy elevada y estable, permitiendo conseguir resoluciones microscópicas subcelulares. La epifluorescencia carece del diafragma de detección confocal y utiliza una lámpara de mercurio como fuente de iluminación, que tiene una potencia muy irregular, con diferentes picos de intensidad,

que se podrían definir como una combinación de diversas radiaciones monocromáticas. Es por ello que la epifluorescencia, proporciona imágenes de baja calidad, que muestran la información de todos los planos del objeto, ya sea enfocados o no [23]. En la fig. 2.6 se muestran imágenes tomadas con cada una de las técnicas de fluorescencia mencionadas.

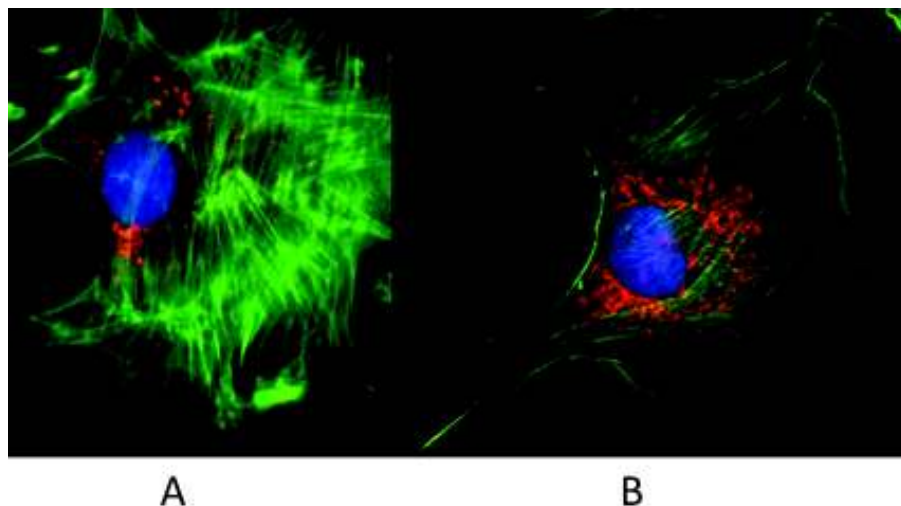


Figura 2.6: Diferencia entre imágenes obtenidas con epifluorescencia y con láser confocal

En ambas imágenes se muestran células endoteliales de la arteria pulmonar bovina (BPAE), sin embargo en A) se utiliza epifluorescencia y en B) láser confocal. En B) se pueden observar detalles más finos de la célula, así como bordes más nítidos.

Imagen tomada de:

https://microscopyolutions.ca/2012/05/31/any_way_you_slice_it/

2.2.1. Principio físico de fluorescencia

Cuando los compuestos fluorescentes en su llamado estado fundamental, absorben energía en forma de fotones, pueden producirse alteraciones en los estados electrónico, vibratorio y rotacional de la molécula. La energía absorbida mueve electrones a un orbital diferente que, en promedio, está más lejos del núcleo. Esta transición a un estado excitado ocurre muy rápidamente (en femtosegundos). Posteriormente pierde un poco de energía, debido a distintas interacciones y cae a un estado de excitación más bajo. Toda esta energía absorbida finalmente se pierde, emitiendo fotones de menor energía y regresa a su estado fundamental [17, 20]. En la fig. 2.7 se muestra un esquema del proceso de fluorescencia.

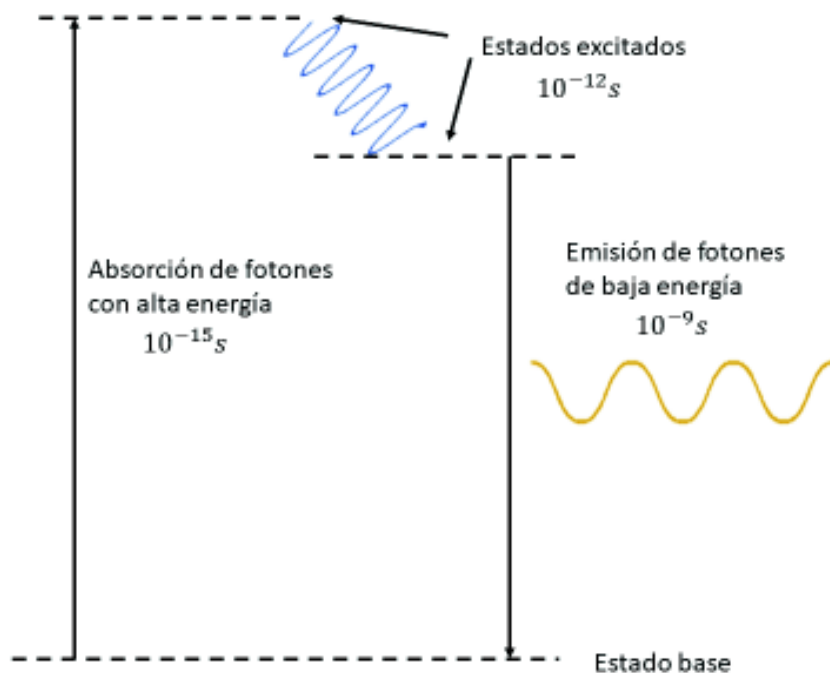


Figura 2.7: Proceso de la fluorescencia

La línea horizontal punteada más larga representa el estado base de la molécula, al ser excitada con un fotón de alta energía, esta pasa un estado excitado de alta energía, casi instantáneamente libera un poco de energía cayendo a un estado excitado de menor energía. Posteriormente libera la energía restante en forma de fotones volviendo a su estado base de energía.

La diferencia entre las longitudes de onda excitantes y emitidas, conocida como cambio de Stokes, es la propiedad crítica que hace que la fluorescencia sea tan poderosa [17]. A medida que aumentan los valores de desplazamiento de Stokes, se vuelve más fácil separar la excitación de la luz de emisión mediante el uso de combinaciones de filtros de fluorescencia [22]. La microscopía de fluorescencia requiere que los objetos de interés sean fluorescentes. Las moléculas que se utilizan en virtud de sus propiedades fluorescentes se denominan fluoróforos. Los orbitales de electrones más externos en la molécula de fluoróforo determinan, tanto su eficiencia como compuesto fluorescente, como las longitudes de onda de absorción y emisión. Un ejemplo de tinte es [22] Alexa Fluor 555, una sonda útil que absorbe la luz en la región amarillo-verde y produce una emisión amarillo-naranja, como se observa en la fig. 2.8. Para lograr la máxima intensidad de fluorescencia, un fluoróforo (a menudo

denominado tinte), generalmente se excita en longitudes de onda cercanas o en el pico de la curva de excitación, y se selecciona para la detección el rango más amplio posible de longitudes de onda de emisión que incluyen el pico de emisión. La selección de longitudes de onda de excitación y emisión se basa típicamente en filtros de interferencia [22].

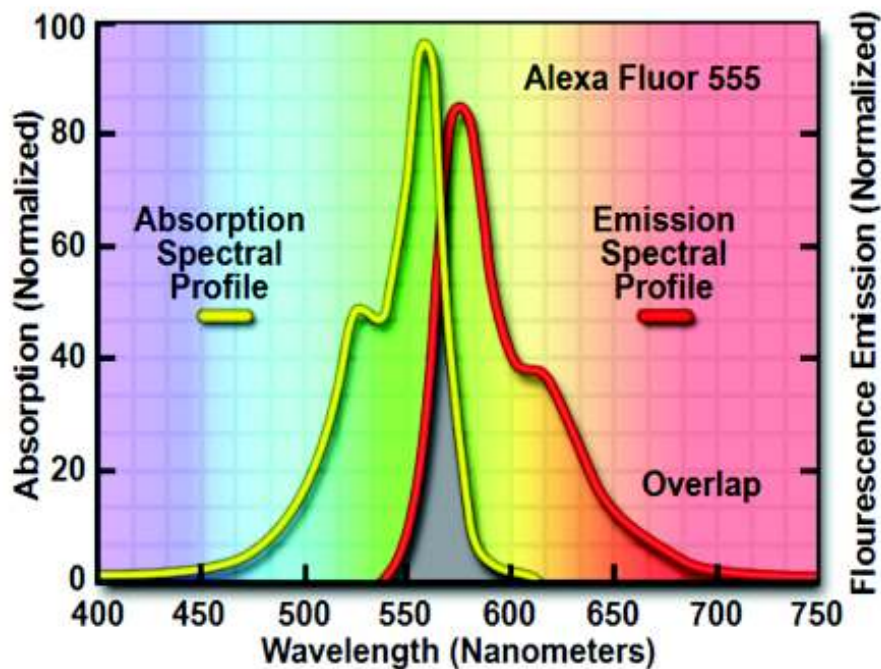


Figura 2.8: Espectros de absorción y emisión de Alexa Fluor 555
 El pico de intensidad de emisión del fluoróforo suele ser más bajo en longitud de onda y magnitud que el exhibido por el pico de excitación, y el perfil espectral de emisión (curva) es a menudo una casi una imagen especular de la curva de excitación, pero recorrida a longitudes de onda más largas. Imagen tomada de [22].

2.2.2. Microscopio de fluorescencia

Los objetivos principales de los microscopio de fluorescencia son [17]:

1. Suministrar una adecuada longitud de onda para luz de excitación.
2. Separar la luz de excitación de la luz emitida.

3. Recolectar la mayor cantidad de fluorescencia emitida.
4. Proporcionar imágenes con detalles finos de la muestra.

Para que se cumplan los objetivos hay que utilizar indicadores de fluorescencia con grandes cambios de Stokes, así, la luz de excitación y la de emisión tendrán una adecuada diferencia de longitudes de onda, por lo que su separación con filtros ópticos será exitosa, permitiendo obtener imágenes nítidas de la muestra [24]. Los aditamentos básicos para el microscopio son [2, 24]:

- Fuente de excitación: ya sea una fuente puntual brillante, es decir, láser (láser confocal) o una lámpara de mercurio (epifluorescencia).
- Objetivos de fluorita ya que los objetivos cuyas lentes están construidas por silicatos (vidrios de flint o de crow) poseen autofluorescencia.
- Cubo de filtros es el elemento convencional utilizado para alinear los filtros en la trayectoria de la luz de excitación y emisión. El cubo de filtro tradicional normalmente lleva un filtro de excitación, un espejo dicroico a 45° y un filtro de barrera o emisión, como se muestra en la fig. 2.9. El cubo guía la luz desde la fuente de excitación, pasando por el filtro de excitación hacia la muestra y de vuelta, la luz es separada por el espejo dicroico, dirigiendo la emisión a su respectivo filtro para pasar así al detector.

Los microscopios de fluorescencia modernos son capaces de acomodar entre cuatro y seis cubos de filtros y permiten al usuario colocar fácilmente filtros de barrera y excitación de repuesto del mercado de accesorios, así como espejos dicroicos. Hay otros microscopios en los que los filtros de excitación y emisión no están ubicados en un cubo de filtros, sino en un cambiador de filtro automático donde se pueden cambiar rápidamente dentro y fuera del camino de la luz [24].

El funcionamiento de los componentes del cubo de filtros es:

- Dicroico: sirve como elemento óptico principal que separa la luz de excitación y emisión. El modo común de funcionamiento, es que la longitud de onda de excitación más corta se refleja hacia la muestra y la longitud de onda más larga emitida se transmite por el espejo dicroico. Sin embargo, los espejos dicroicos también se pueden utilizar para reflejar longitudes de onda más largas y para transmitir longitudes de onda más cortas [24].

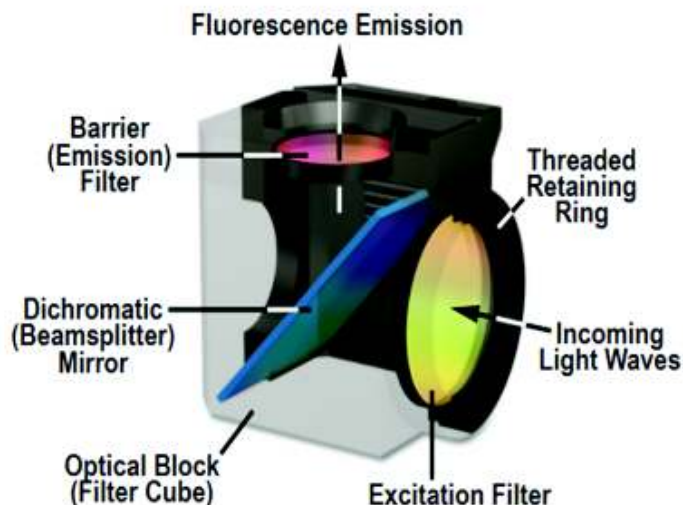


Figura 2.9: Cubo de filtros de fluorescencia
 el cubo dirige la luz desde la fuente de excitación a la muestra y desde la muestra al detector pasando por los filtros de excitación y emisión, siendo separados por el espejo dicroico. Imagen tomada de [22]

- Filtros de bloqueo: para mejorar la selección de longitudes de onda de excitación/emisión apropiadas, además de la discriminación de longitud de onda por el espejo dicroico, resulta común agregar filtros de excitación y emisión [24, 25]. El filtro de excitación asegura que solo se transmitan las longitudes de onda requeridas, por lo general, se utiliza un filtro de paso de banda con buen bloqueo de la luz fuera de las longitudes de onda de paso de banda especificadas. El filtro de emisión sólo necesita bloquear cualquier luz de excitación restante, aquí, la elección de un filtro de paso largo tiene la ventaja de que se puede recoger toda la luz del espectro de emisión [24].

La formación de imágenes en el microscopio de fluorescencia se da, primeramente, tiñendo la muestra con un fluoróforo determinado, posteriormente se ilumina la muestra con luz de una longitud de onda particular establecida por el fluoróforo, formando una imagen con luz emitida de una longitud de onda mayor. En la fig. 2.10, la luz de excitación es azul y la luz emitida es verde. El microscopio utiliza un espejo dicroico que refleja la luz más corta

que una determinada longitud de onda, pero transmite luz de mayor longitud de onda, por lo tanto, la luz de la fuente principal se refleja y pasa a través del objetivo a la muestra, mientras que la luz de longitud de onda más larga de la muestra fluorescente, pasa a través del objetivo y del espejo dicroico [20]. La existencia del desplazamiento de Stokes y la propiedad especial del espejo divisor de haz dicroico descrita anteriormente, permiten la separación de la luz de excitación de la fluorescencia emitida [17]. Los filtros de emisión bloquean la luz no deseada. La fluorescencia es detectada por cámaras (campo amplio) o PMT (escaneo láser). [24]

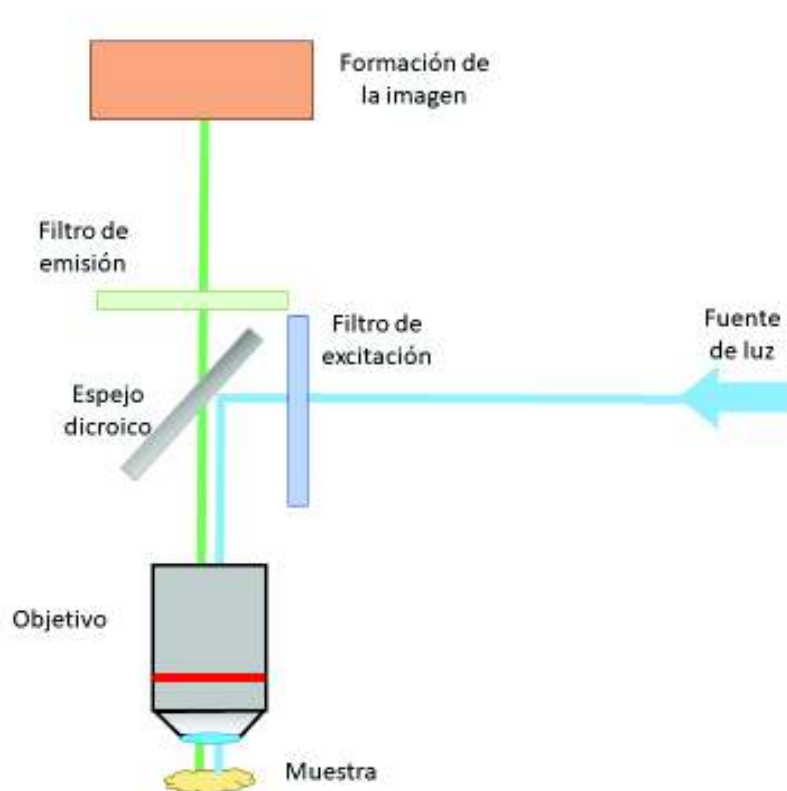


Figura 2.10: Configuración básica de un microscopio de fluorescencia
 La luz proveniente de la fuente pasa por el filtro de excitación y es reflejada por el espejo dicroico iluminando la muestra, esta emite luz con longitud de onda más corta que atraviesa el espejo dicroico y pasa por el filtro de emisión, llegando posteriormente al fotomultiplicador donde se forma la imagen.

2.3. Microscopía confocal

En 1955 Marvin Minsky desarrolló la microscopía confocal. Su invento consistía en la construcción de imágenes punto por punto, enfocando un punto de luz secuencialmente a través de una muestra y luego recolectando los rayos que regresan. La ventaja de la iluminación punto por punto, es que evita la mayor parte de la luz dispersa no deseada que oscurece una imagen cuando se ilumina toda la muestra al mismo tiempo; además, la luz que regresaba de la muestra atravesaba una segunda apertura que rechazaba los rayos que no provenían directamente del punto focal. Los rayos de luz deseados restantes serían luego recogidos por un fotomultiplicador y la imagen se reconstruiría gradualmente utilizando una pantalla de larga persistencia.[26]

En la actualidad, los microscopios confocales han mantenido los elementos clave del diseño de Minsky: las aberturas por donde se recoge la luz que forman las imágenes y la iluminación punto por punto de la muestra. Sin embargo, los avances tecnológicos, en especial en óptica y electrónica, han mejorado la técnica de escaneo confocal, sobre todo en velocidad de escaneo, calidad y almacenamiento de imágenes [20].

El microscopio confocal se construye colocando un orificio delante del fotodetector [10]. El mecanismo de acción de este microscopio se basa en la iluminación de la muestra con un delgado rayo láser concentrado en un foco que recorre con rapidez, punto por punto, todos los componentes del espécimen, a una profundidad microscópica constante, de tal manera que el colector colecta la luz de un plano muy delgado (plano óptico), aproximadamente calculado entre 0.5 a 0.8 de micrómetros. [2]

La imagen obtenida se recoge en un monitor y se guarda en la memoria de la computadora, la cual junta las imágenes de otros planos, inferiores o superiores hasta integrarla en una sola imagen de contornos sumamente nítidos y con una gran exhibición de detalles que, en otras condiciones, no serían posibles de observar. Mediante el sistema computarizado, la imagen compuesta se puede observar en tres dimensiones e inclusive puede rotarse para ser visualizada desde diferentes ángulos. [2]

Los microscopios confocales tienen varias ventajas sobre los microscopios convencionales, principalmente la capacidad de obtener imágenes en tres dimensiones, niveles reducidos de luz dispersa y resolución mejorada. Las aplicaciones se encuentran principalmente en biología y medicina, en imágenes de fluorescencia tridimensional, especialmente de muestras vivas, así como también en varias áreas industriales, utilizada para metrología di-

mensional y perfilado de superficies en el modo de reflexión. [10]

2.3.1. Principio físico del microscopio confocal

Para comprender el principio básico de un microscopio confocal, podemos considerar un par de lentes que enfocan la luz desde el punto focal de una lente, al punto focal de la otra y una pantalla con un orificio, llamado pinhole, situado en el punto focal de la segunda lente. Esto se puede observar en la fig. 2.11. Al colocar una muestra en el foco de la lente 1, consideramos dos posiciones para formar la imagen, los rayos azules, que se forman exactamente sobre el punto focal de la lente y los rayos verdes que están cercanos al punto focal pero no sobre éste. Es importante aclarar que, el color de los rayos es solo para diferenciar los caminos ópticos de los puntos considerados, no para distinguir entre las longitudes de onda de la luz. Se puede observar que los rayos azules forman una imagen sobre el punto focal de la lente 2, mientras que los rayos verdes la forman en otro lugar. Además el pinhole solo deja pasar la luz de los rayos azules, ya que obstruye el camino de los verdes [20].

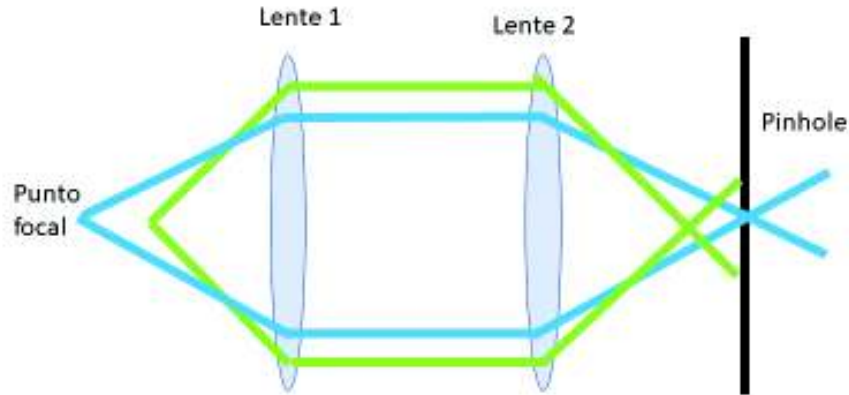


Figura 2.11: Principio básico de un microscopio confocal

Los rayos color azul están en el punto focal de ambas lentes, es decir que están enfocados, mientras que los rayos color verde están fuera de focos de las lentes, así en la pantalla solo se forma la imagen de los rayos azules y los verdes, son bloqueados.

Debido a que el punto focal del objetivo forma una imagen donde se encuentra el orificio en la pantalla, esos dos puntos se conocen como puntos

conjugados o puntos confocales, de ahí el nombre de la técnica.[20].

En los microscopios confocales modernos, se han desarrollado dos técnicas fundamentalmente diferentes para la exploración por haz:

- El escaneo de haz único, constituye uno de los métodos más populares empleados en la mayoría de los microscopios de escaneo láser comerciales, utiliza un par de espejos galvanométricos controlados por computadora, para escanear la muestra a una velocidad del orden de un fotograma por segundo.[27]
- Escaneo con disco giratorio, a través de éste se iluminan simultáneamente muchos puntos con la luz de excitación y se detecta la fluorescencia producida en cada punto en paralelo, tal y como se muestra en la fig. 2.12. Un disco confocal giratorio explora los puntos de excitación, mientras que los orificios correspondientes en el plano de imagen intermedio reducen la fluorescencia desenfocada. [28]

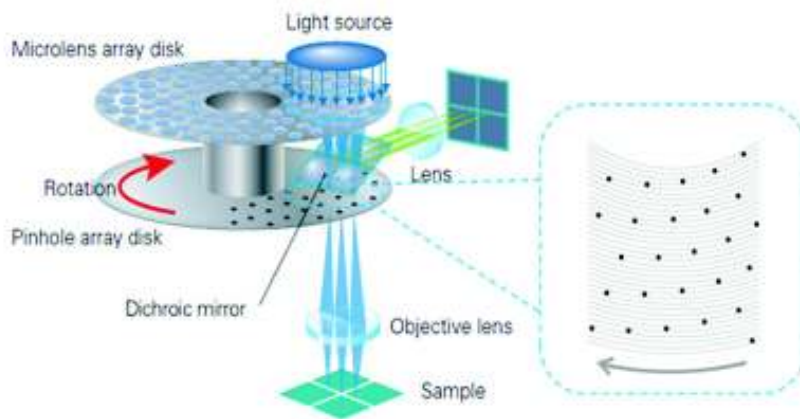


Figura 2.12: Estructura de un microscopio confocal con disco giratorio.
Imagen tomada de [28]

La mayoría de los microscopios confocales generan una sola imagen en 0.1 a 1 s [20], sin embargo, para muchos procesos dinámicos, esta velocidad puede ser demasiado lenta, ya que en imágenes 2D, las velocidades lentas pueden dañar la muestra, o en las imágenes 3D provocan un tiempo de espera muy largo debido a que se requieren varias pilas de imágenes [20]. Una manera de aumentar la velocidad de captura de imágenes para cada

tipo de microscopio confocal son: la utilización del disco de Nipkow, que es un diseño alternativo del disco giratorio, y un microscopio confocal que utiliza un deflector acústico-óptico (AOD) para dirigir la luz de excitación [27, 9].

2.4. Microscopía confocal de fluorescencia

Los microscopios de fluorescencia tienen la desventaja de que no siempre forman imágenes con una resolución y nitidez adecuadas. Esto puede ser ocasionado por varias causas: muestras demasiado gruesas, tiempos de exposición muy prolongados o problemas con los fluoróforos (fotooxidación, contornos difusos o intensidad muy débil). Una herramienta útil que previene dichas dificultades es el microscopio confocal en simultáneo con la microscopía de fluorescencia [2].

La unión de estos dos microscopios permite la formación de imágenes de mayor resolución, contraste y nitidez comparada con la microscopía óptica convencional. Las observaciones con fluorescencia hechas con un microscopio confocal ha permitido avances importantes en ciencias como biología, medicina, materiales, etc. El principio fundamental de la microscopía confocal de fluorescencia consiste en utilizar un láser de una determinada longitud de onda para excitar las moléculas fluorescentes que se encuentren en la muestra previamente preparada. Éstas emiten luz con una longitud de onda mayor a la de excitación y mediante la utilización de filtros, espejos y un orificio pequeño (pinhole) se forma la imagen del plano enfocado evitando a luz reflejada o fluorescente procedente de los planos fuera de foco. El láser se aplica en forma de barrido, punto por punto, en una pequeña parte del espécimen, que penetra la muestra, obteniendo así imágenes de diferentes planos focales que permiten el análisis tridimensional de las estructuras analizadas sin causar grandes daños a la muestra [29].

En general, la microscopía de fluorescencia utiliza tintes que emiten fluorescencia cuando son estimulados por luz de determinadas longitudes de onda y se agregan a la muestra según el propósito de la imagen. En algunos casos, se puede usar más de un fluoróforo al mismo tiempo, y al cambiar la luz de excitación o al observar a diferentes longitudes de onda de emisión, se pueden distinguir diferentes partes de la muestra [9]. Para esto, se han diseñado fluoróforos que se dirigen e identifican específicamente estructuras subcelulares como el citoplasma, el retículo sarcoplásmico, los núcleos y las mitocondrias[27].

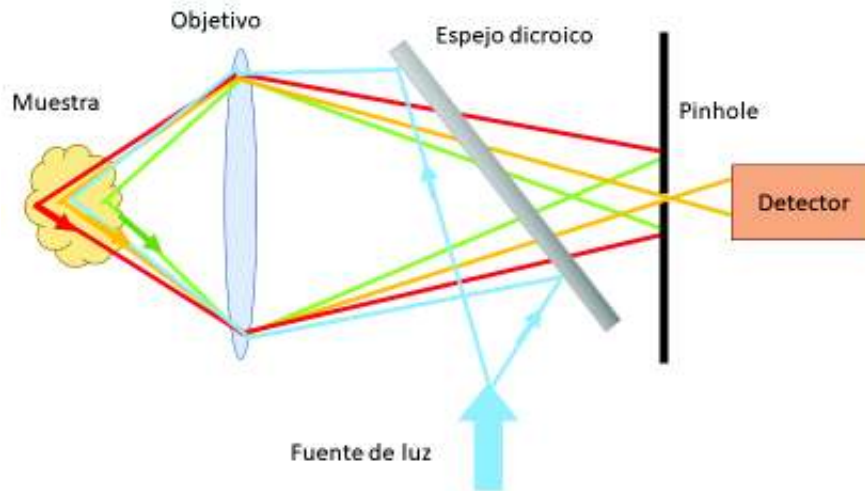


Figura 2.13: Principio de funcionamiento de un microscopio confocal de barrido láser con fluorescencia.

La luz láser se enfoca en la muestra gruesa mediante la reflexión del espejo dicroico (DM) y la lente del objetivo. El láser excita la fluorescencia en toda la muestra que pasa a través del DM y se enfoca en el plano de la imagen. El pinhole solo permite que la luz del plano confocal de la muestra llegue al tubo fotomultiplicador (PMT). [24]

2.4.1. Formación de imágenes

Todos los diseños modernos de microscopios confocales de escaneo láser se centran en un microscopio óptico convencional vertical o invertido de nivel de investigación. Para entender mejor el funcionamiento del microscopio, se tomará de referencia la fig. 2.14 para ilustrar el proceso de formación de imágenes. Se utilizan uno o más sistemas láser como fuente de luz para excitar los fluoróforos en la muestra [27], que se puede identificar como una luz de excitación verde en la fig. 2.14. La luz se refleja en un espejo dicroico, que la dirige a un conjunto de espejos de exploración vertical y horizontal. Estos espejos motorizados escanean el láser a través de la muestra. Cuando el láser de excitación golpea la muestra, genera altas intensidades de fluorescencia en un punto focal bien definido. Tanto la luz láser (rayo verde) como la fluorescencia de emisión resultante (rayo amarillo), pasan a través del mismo objetivo y espejos que se utilizan para escanear la luz de excitación del láser y luego pasa a través del espejo dicroico. El espejo refleja la luz verde entrante de mayor energía (de menor longitud de onda), pero permite

que la de menor energía (de mayor longitud de onda), luz amarilla, pase por los filtros hacía la lente de tubo, enfocándose en el pinhole que elimina la luz dispersa. La luz enfocada que pasa a través del orificio se mide con un detector de luz. El resultado final es que la luz se recoge desde un punto muy enfocado. Las imágenes de la muestra escaneada se pueden reconstruir punto por punto [9].

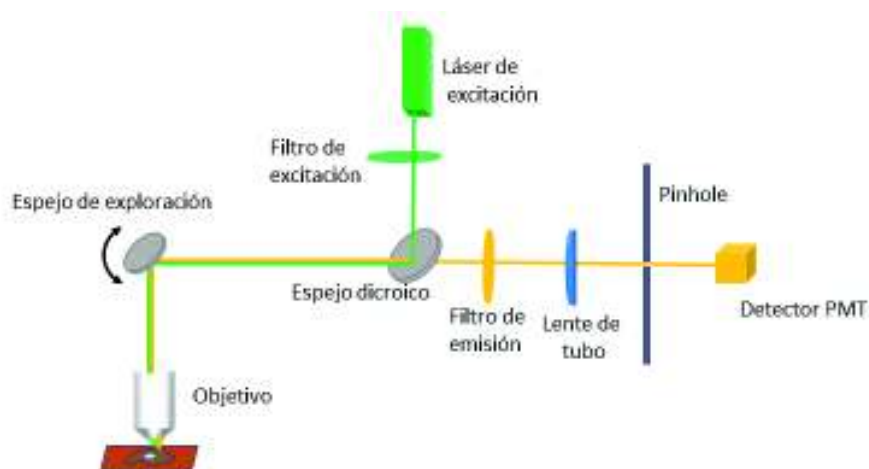


Figura 2.14: Esquema básico de un microscopio confocal de barrido láser con fluorescencia.

Configuración básica de un microscopio confocal de fluorescencia. Los espejos de exploración escanean la luz del láser a través de la muestra. El seccionamiento óptico ocurre cuando la luz pasa a través de un orificio en su camino hacia el detector.

La imagen creada por el microscopio confocal es de una región plana y delgada de la muestra, conocido como sección óptica [20]. La información de la imagen se recopila punto por punto con un detector especializado, como un tubo fotomultiplicador o un fotodiodo de avalancha, y luego se digitaliza para su procesamiento en la computadora, que también controla los espejos de escaneo y otros dispositivos para facilitar la recolección y visualización de imágenes. Después de que se ha adquirido y almacenado una serie de imágenes (generalmente secciones ópticas en serie) en medios digitales, el análisis se puede realizar utilizando distintos paquetes de software de procesamiento de imágenes [20].

2.5. Uso del láser infrarrojo en pinzas ópticas

Al hablar de microscopía es común que al mencionar usos de luz venga a la idea de formación de imágenes y la espectroscopia, olvidando una de las aplicaciones en auge de los últimos años, las pinzas ópticas. Aunque la fuerza ejercida por el momento de los fotones pareciera una cantidad insignificante, a escalas micrométricas, o hasta nanométricas, los efectos del campo óptico toman un valor sustancial y de gran alcance. [30]

Este dispositivo es conocido por distintos nombres: trampa óptica, pinzas ópticas o incluso, pinzas láser [31]. Comúnmente se utiliza luz infrarroja ya que, al ser menos energética en comparación con la luz visible, no causa tanto daño en la materia biológica y es posible realizar mayor cantidad de experimentos en distintas muestras [32].

En 1970 Arthur Ashkin, diseñó un experimento para medir la presión de radiación ejercida por un láser de onda continuo, logrando atrapar y mover microesferas transparentes de látex suspendidas en agua [32]. Dieciséis años más tarde, Ashkin y sus colaboradores demostraron que un solo rayo láser bien enfocado puede contener una partícula dieléctrica en un potencial 3D estable, dando lugar al nacimiento de la trampa óptica de haz único [8]. Arthur Ashkin denominó su invento con el nombre de "pinzas ópticas". En 2018, fue otorgado el Premio Nobel del Física por invenciones pioneras en el campo de la física láser a Arthur Ashkin por las pinzas ópticas y su aplicación a sistemas biológicos, y conjuntamente a Gérard Mourou y Donna Strickland por su método de generar pulsos ópticos ultracortos de alta intensidad [33]. Las pinzas ópticas, consisten en el confinamiento espacial de partículas dieléctricas microscópicas por la acción de fuerzas producidas por el cambio en el momento de los fotones de un rayo láser, altamente enfocado que es desviado por la partícula [34].

Las fuerzas que actúan sobre las partículas capturadas con pinzas ópticas son: la fuerza de dispersión, la fuerza asociada con el gradiente de irradiancia del campo eléctrico y la fuerza de unión óptica [34, 7]. Las fuerzas ópticas, que son de orden de piconewton, y las escalas de longitud micrométrica hacen de las pinzas ópticas una herramienta perfecta para estudiar una variedad de fenómenos microscópicos, desde la física coloidal hasta la biología molecular, ya que se pueden utilizar para fijar y mover partículas dieléctricas y, además, para medir con precisión fuerzas que parecieran imposibles de cuantificar. Desde el artículo seminal de Ashkin, muchos trabajos han abordado la física subyacente del atrapamiento óptico, la construcción y uso de instrumentos

de medición de fuerza y manipulación óptica efectivos, como el Microscopio de Fuerza Atómica (AFM). [8, 31]

Se ha reconocido que las pinzas ópticas tienen el mayor impacto dentro del campo más amplio de la micromanipulación óptica. Si bien, la técnica es poderosa e importante para proporcionar un minúsculo transductor de fuerza calibrable, un ímpetu importante que se ha desarrollado en el área ha sido explorar múltiples trampas e interacciones entre partículas [30]. La capacidad no solo de ver, sino de aplicar y medir fuerzas en la escala micrométrica ha abierto nuevas posibilidades en las ciencias físicas y de la vida, incluido el trabajo con moléculas individuales, nuevos materiales y máquinas microscópicas, [8].

Algunas de las aplicaciones más sofisticadas de las pinzas ópticas son [8, 7]: proyección de matrices de muchas trampas para atrapar múltiples objetos en geometrías predefinidas, potenciales ópticos de forma libre donde es posible observar fácilmente su excitación térmica (esta propiedad ha permitido el análisis de importantes efectos microtermodinámicos como el teorema de fluctuación-disipación y saltos sobre una barrera potencial), formación de sistemas modelo para la termodinámica fuera del equilibrio, entre otros. El uso de esta herramienta no es único en la física, sino también en otras ciencias como la biología. Algunos experimentos notables realizados con pinzas ópticas son en [8]:

- Motores moleculares: utilizando el "interferómetro de atrapamiento óptico", se logró medir los pasos dados por una molécula de kinesina mientras caminaba a lo largo de un microtúbulo. El instrumento fue lo suficientemente sensible para precisar los pasos de $8nm$ dados por el motor, una distancia que se establece por el espaciamiento de los monómeros de tubulina que forman el microtúbulo.
- Natación y motilidad: al aprender los trucos que la naturaleza emplea para moverse en un entorno donde la fricción importa más que la masa, es posible comprender mejor las bacterias y las algas que habitan este mundo microscópico, además, es posible aplicar ese conocimiento para el diseño micromáquinas más efectivas, lo suficientemente pequeñas como para desplazarse dentro de un vaso sanguíneo y realizar una cirugía sin más invasión del cuerpo que una simple inyección.
- Dinámica del ADN: colocando una trampa óptica en cada extremo a lo largo del ADN, es posible estirarlo y medir la fuerza y extensión del

polímero a medida que se deforma bajo tensión. El análisis del comportamiento de una molécula, a medida que se estira, da información valiosa sobre la estructura que tiene y permite mediciones de la fuerza necesaria para cambiar la conformación del polímero.

Las pinzas ópticas de un solo haz presentan una excelente herramienta para diversos estudios biomédicos, coloidales y fundamentales. En los microscopios confocales de barrido láser, los láseres se pueden utilizar para la formación de imágenes, así como herramientas para la manipulación de objetos microscópicos. En este último caso, la luz del láser adicional para las pinzas ópticas debe enfocarse en el plano del objeto del microscopio confocal. Tanto la captura de imágenes como la captura con pinzas ópticas se pueden realizar utilizando el mismo objetivo. En este caso, la sección óptica en Z para imágenes 3D desplaza las pinzas ópticas con el plano focal del objetivo a lo largo del eje óptico, de modo que un objeto atrapado permanece posicionado en el plano focal. El microscopio confocal ensambla las secciones ópticas bidimensionales para finalmente reconstituir una imagen tridimensional. Utilizando estas capacidades de corte combinadas con las posibilidades de manipulación 3D de las pinzas ópticas, los microscopio confocal son excelentes herramientas de imagen para la micromanipulación 3D [7].

Particularmente en el microscopio confocal, donde el tiempo de escaneo por fotograma es del orden de segundos, las pinzas ópticas pueden aliviar el grave problema de la borrosidad del movimiento de los objetos en movimiento fijándolos espacialmente, incluso dentro de células vivas. Así existe la oportunidad para la manipulación subcelular y el estudio de procesos celulares que requieren un posicionamiento preciso de los orgánulos celulares. Los ejemplos incluyen la manipulación de núcleos celulares, así como orgánulos en células vegetales y el desplazamiento de cromosomas [7].

2.6. Antecedentes

En una estancia de investigación en el Instituto de Ciencias Fotónicas ICFO, el Dr. Remy Ávila y su grupo de investigación, trabajaban en observaciones de fluorescencia en la membrana plasmática de fibroblastos bajo la influencia de un láser infrarrojo. Utilizaron microscopía confocal para obtener imágenes de las membranas celulares y realizaron la recuperación de la fluorescencia después de los experimentos de fotoblanqueo (FRAP), mien-

tras que un láser Ti:Sa de onda continua de 810 nm de longitud de onda se enfocaba en el área de interés. El láser NIR (por las siglas en inglés de Near-Infrared) se acopló al microscopio confocal utilizando un espejo dichroico. Los resultados fueron publicados en el artículo “Effects of near infrared focused laser on the fluorescence of labelled cell membrane” [35].

Además de los experimentos llevados a cabo en las células, se realizaron observaciones en el fondo de la muestra, donde no había célula, y se percibieron ligeros desenfoces del microscopio cuando el láser era puesto sobre la célula. Cuando el láser se enciende o apaga, la posición de enfoque se desplaza hacia valores más bajos o más altos de la coordenada vertical z , respectivamente. Este trabajo consiste en cuantificar los efectos observados.

Capítulo 3

Materiales y Métodos

3.1. Materiales y Equipo

3.1.1. Muestra

La muestra en la que se observó el fenómeno estaba siendo utilizada para el estudio de células marcadas con FM4-64 como se menciona en [35]. Sin embargo, los datos analizados provienen de regiones del fondo de la muestra donde solo había tinte FM4-64 (Invitorgen, F34653) sobre una delgada capa de colágena (sin células). El tinte se diluyó en medio celular y se preparó de acuerdo con [35]. Seguido, la muestra se colocó en el microscopio confocal y el cubreobjetos recubierto de colágeno es puesto en contacto con el aceite de inmersión (Cargille Immersion Oil Type 37). Durante los experimentos, la muestra se montó dentro de la cámara con una temperatura controlada a 37 ° C.

3.1.2. Diseño Experimental

El sistema óptico completo utilizado en los experimentos se muestra en la fig. 3.1. En la fig. 3.2 se proporciona un esquema del diseño óptico. El microscopio confocal utilizado se basa en un microscopio invertido Nikon Eclipse Ti equipado con un sistema confocal C1si. Para obtener imágenes confocales, utiliza un láser verde (longitud de onda de 561 nm) como fuente de luz de excitación, un objetivo de inmersión en aceite con aumento de 60x con apertura numérica de 1.4, aceite de inmersión Cargille Tipo 37 y cubreobjetos recubiertos de colágeno de 0,17 mm de espesor. Las imágenes de transmisión se adquieren usando un fotomultiplicador (PMT). Durante los experimentos, la muestra se monta dentro de una cámara con tempera-

CAPÍTULO 3. MATERIALES Y MÉTODOS

tura mantenida a 37°C usando una mini-incubadora de marca Tokai Hit que se instala sobre la platina del microscopio. Incorporado al microscopio, se encuentra un láser de onda continua de 810 nm de longitud de onda y una potencia de 40 mW a la salida del objetivo del microscopio. El láser se introduce al sistema mediante un espejo dichroico (FF720-SDi01-25 \times 36) y la posición del láser enfocado sobre la muestra se controla con espejos galvanométricos. Imágenes de campo claro podían ser adquiridas utilizando una cámara CMOS (DCC1545M-Torlabs); este detector es sensible a la radiación de 810 nm y se utilizó para determinar la posición del láser. Para el láser infrarrojo se utiliza un resonador marca Coherent modelo Mira 900-F [36] y un láser de bombeo Verdi V6 [37]. Estos generan el láser NIR y se sintoniza la emisión del láser a 810 nm. Estos típicamente se usan para la emisión de pulsos ultracortos, pero se utilizó en modo de onda continua. Para tener 40mW a la salida del objetivo de microscopio, en la zona del obturador había 740mW de potencia del láser. La potencia mayor del láser es de 3W.



Figura 3.1: Fotografía del sistema óptico.

A la izquierda el láser NIR, en medio el microscopio Nikon y a la derecha los monitores. Abajo del microscopio están los láseres del confocal y los componentes electrónicos que están arriba del microscopio controlan un láser del confocal, un obturador del láser NIR y los espejos galvanométricos del láser NIR.

Específicamente el sistema que se estudiará a profundidad es el comprendido desde la lente del objetivo en contacto con el aceite hasta la incubadora

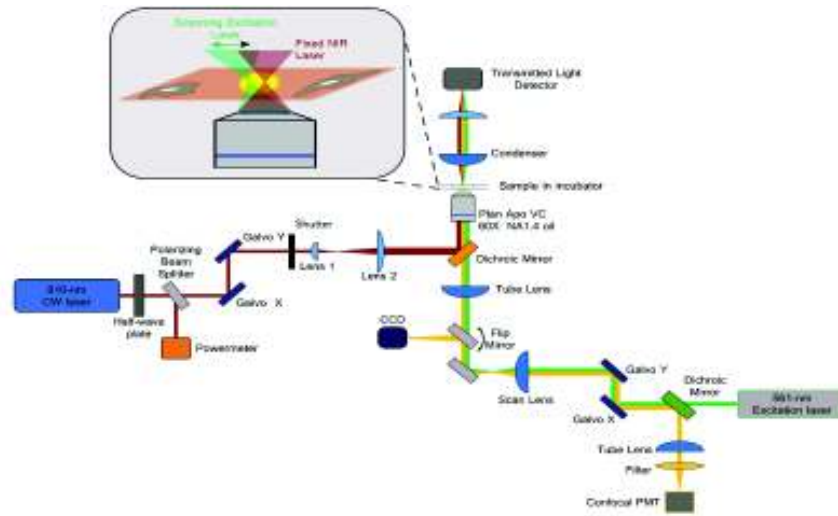


Figura 3.2: Arreglo óptico.

Esquema del microscopio confocal utilizado durante los experimentos. En este arreglo se observa una variación de enfoque al momento de encender un láser NIR.

Tokai Hit, incluyendo el aceite de inmersión, el cubreobjetos, la muestra y el portaobjetos (cubreobjetos), ver fig. 3.3.

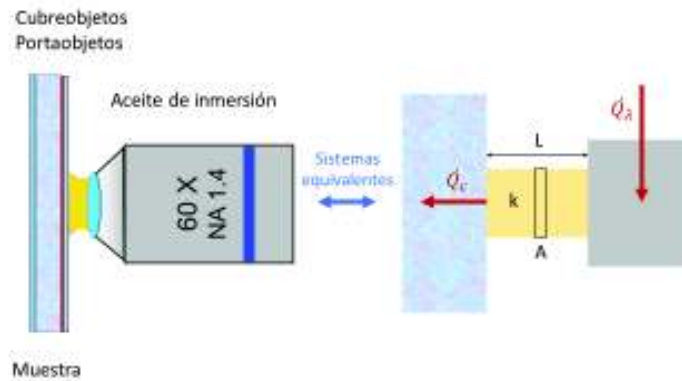


Figura 3.3: Sistema de estudio.

Acercamiento al arreglo óptico donde se estudia el efecto del láser NIR. En esta sección del sistema óptico es concentrada gran cantidad de luz del láser y por ello es importante su estudio a detalle.

3.2. Metodología

3.2.1. Experimento

El experimento consiste en tomar imágenes de la muestra con el microscopio confocal. Para lograrlo, se excita la muestra con el láser verde a una longitud de onda de 561 nm y se detecta la fluorescencia con el detector confocal PMT en la banda espectral comprendida entre 567.5 y 642.5 nm. Se obtienen distintas imágenes de fluorescencia para distintos planos arriba y abajo de la superficie del cubreobjetos. A la colección de imágenes con distintas posiciones z se le llama z -stack. Para cada muestra se toman distintos z -stack cuyas posiciones en z están distribuidas uniformemente. Los valores de z van de 0.5 a 0.75 μm con un intervalo de tiempo entre cada plano de 4.52 s, como se muestra en fig. 3.4. Durante cada experimento, se cambia el estado de encendido o apagado del láser NIR. El estado del láser infrarrojo (encendido / apagado) se determinó utilizando el fotomultiplicador de transmisión.

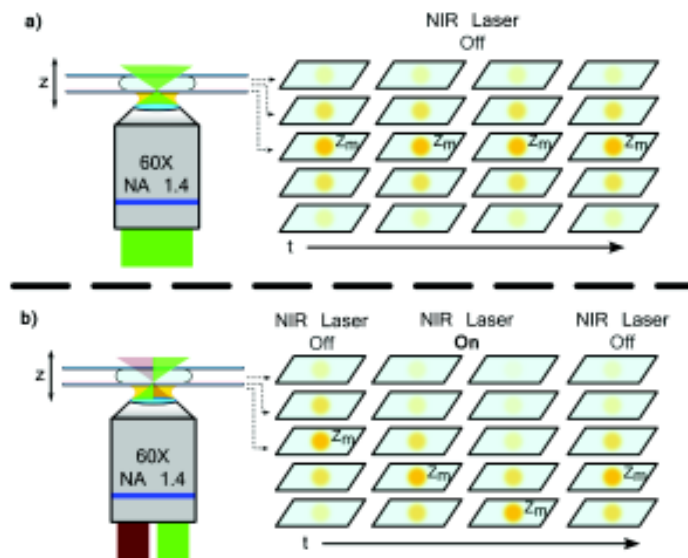


Figura 3.4: Gráfico representativo del experimento.

Experimento utilizado para medir la variación del foco provocada por un NIR láser: se mide la intensidad de fluorescencia del fondo de la muestra en varios planos. Al estar apagado el NIR láser (a) no se observa variación en el enfoque del microscopio, pero al encender el láser (b), la posición de enfoque cambia y se determina por el cambio de la intensidad máxima de fluorescencia.

3.2.2. Análisis de los Datos

Para medir la variación de enfoque, se calculó la intensidad promedio del área donde no había células (solo fluoróforos) en cada nivel de Z . Un ejemplo del área seleccionada es la que se muestra en la fig. 3.5. Con las mediciones de intensidad promedio se crean perfiles de intensidad de fluorescencia frente posición (en la dirección z). Cada perfil consta de 5 medidas de la intensidad media en la región de interés. Se consideraron diez experimentos con un mínimo de 11 y un máximo de 34 perfiles de intensidad. Se analizaron un total de 206 perfiles. Se trazaron gráficos de posición versus intensidad para cada experimento. Para evitar la superposición entre los datos e identificar claramente cada perfil de intensidad, se agregó una cantidad de 120 AU por número de perfil a los valores de intensidad medidos. Luego se ajustó una curva gaussiana a cada perfil y se determinó la posición Z_{μ} , que corresponde a la posición donde se encuentra el máximo de la curva de intensidad ajustada.

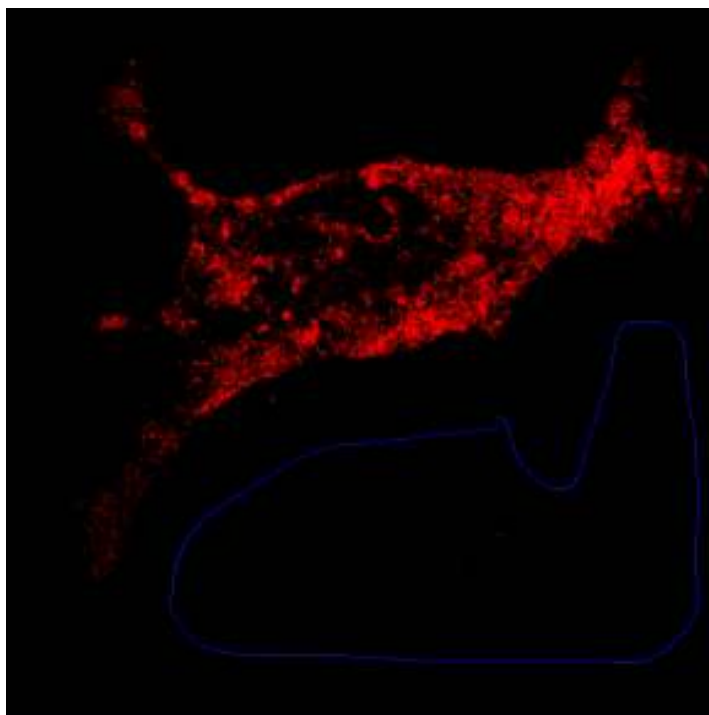


Figura 3.5: Imagen de la célula.

Imagen generada por microscopía de fluorescencia de la célula. Se incluye también el contorno del área seleccionada para obtener los datos de intensidad.

Capítulo 4

Resultados y Discusión

4.1. Resultados

Los experimentos consistieron en la observación del tinte fluorescente en el microscopio confocal y la obtención de varias imágenes fluorescentes en diferentes planos en dirección de z para cada muestra. Haciendo un análisis de la intensidad de fluorescencia en un área de interés para cada imagen, obtuvimos perfiles de intensidad (posición en la dirección z contra intensidad). Se ajustó una curva gaussiana a cada perfil de intensidad. Esto con el propósito de determinar el valor máximo de intensidad para cada posición vertical, a este valor de posición se le nombró Z_μ . Así, Z_μ corresponde a la mejor posición de enfoque.

Para formar los perfiles de intensidad, se hicieron gráficas de posición contra intensidad, y para diferenciar entre los Z-stack de cada experimento, se les suma un valor arbitrario a la intensidad medida con respecto al perfil tomado en un t anterior. Exceptuando un experimento, el valor sumado de intensidad para diferencias entre Z-stacks fue de 120 AU.

Cuando el láser NIR está en estado OFF 1, observamos que los perfiles de intensidad no cambiaron significativamente, por lo que la posición Z_μ tampoco cambió. Esto se puede ver en la fig. 4.2 (primer conjunto de líneas negras en (a)). Por otro lado, cuando se encendió el láser NIR, observamos que la posición del valor de intensidad máxima en los perfiles (Z_μ) disminuye, ver datos rojos en las figs. 4.2.

Una vez obtenidos los valores de Z_μ de los perfiles de intensidad (fig. 4.2), se graficaron estos valores en función del tiempo, como se muestra en la fig. 4.4. Para las gráficas de Z_μ frente a tiempo, se consideraron cuatro estados para el láser:

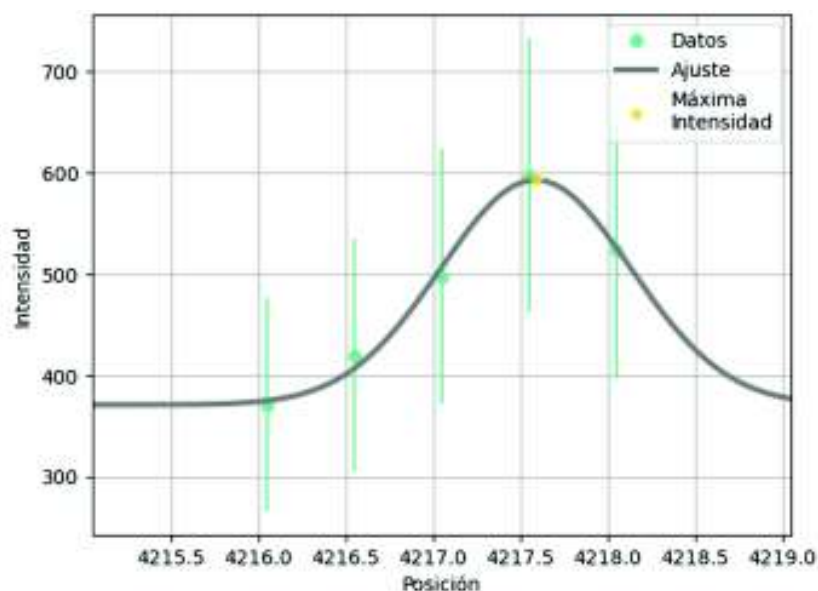
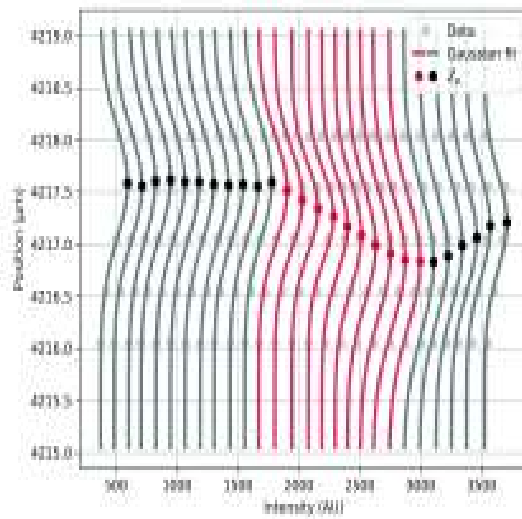


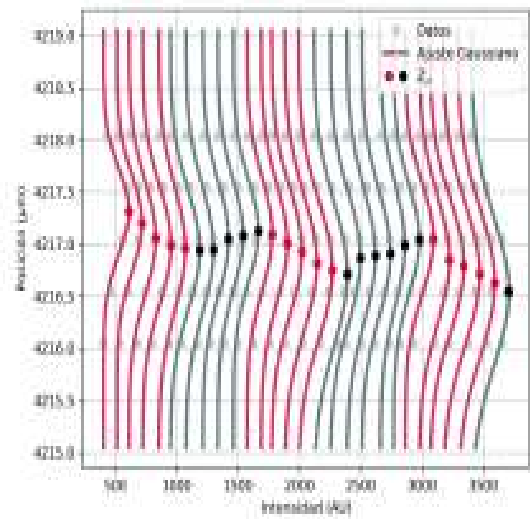
Figura 4.1: Perfil de Intensidad contra posición
Ajuste gaussiano de los datos de intensidad contra posición para un Z-stack.

- ON indica que el láser está encendido.
- OFF 1 implica que el láser está apagado y el estado anterior también estaba apagado.
- OFF 2 significa que el láser está apagado con el estado anterior encendido.
- OFF 3 denota que el láser está apagado sin información del estado anterior.

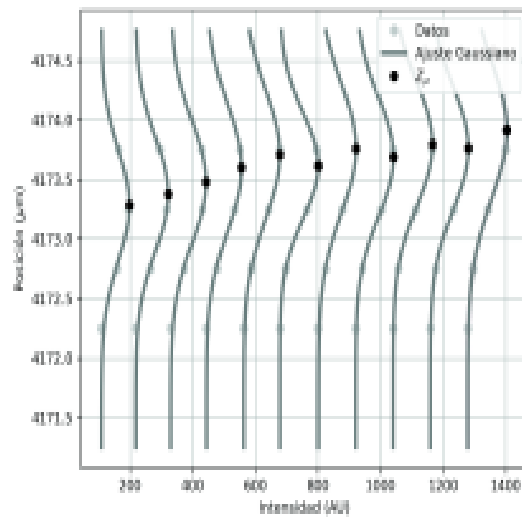
Podemos notar que en la fig. 4.4a, que Z_μ mantiene un valor constante respecto al tiempo en el estado OFF 1. En el momento en que el láser NIR pasa al estado ON, el valor de Z_μ disminuye respecto a su posición anterior. Sin embargo, cuando el láser se apaga nuevamente, Z_μ comienza a aumentar su valor, este fenómeno se puede observar en las figs. 4.4a, 4.4b, 4.5a, 4.5b y 4.5c. También es posible observar que el efecto en la variación del foco ocurre con mayor velocidad en el estado ON, que en el estado OFF 2. Este comportamiento también es apreciable para las figs. 4.5. En las figs. 4.4c, 4.4d y 4.5d se presentan tres casos con un solo estado del láser, lo cual permite una mejor observación del efecto ya que tiene una duración más larga a



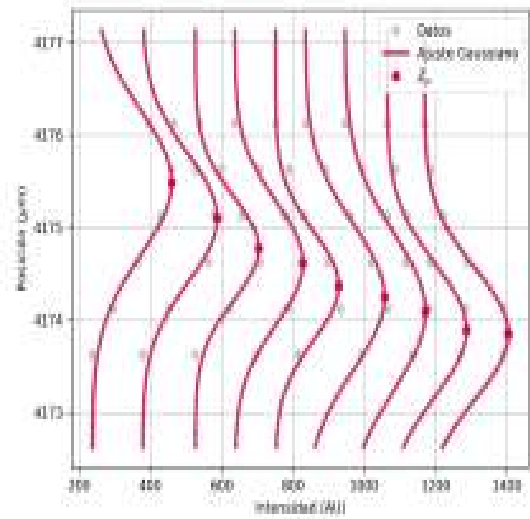
(a) Primer experimento



(b) Segundo experimento

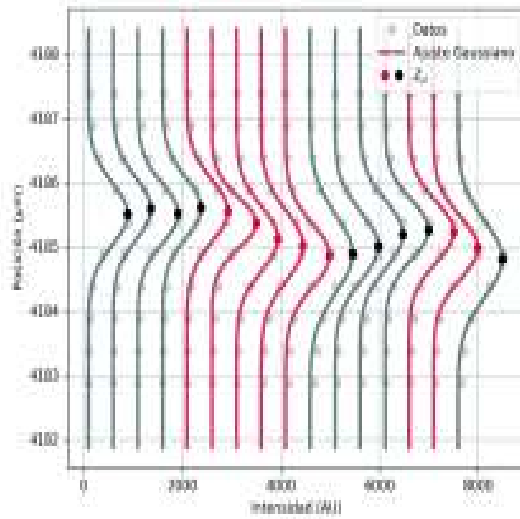


(c) Tercer experimento

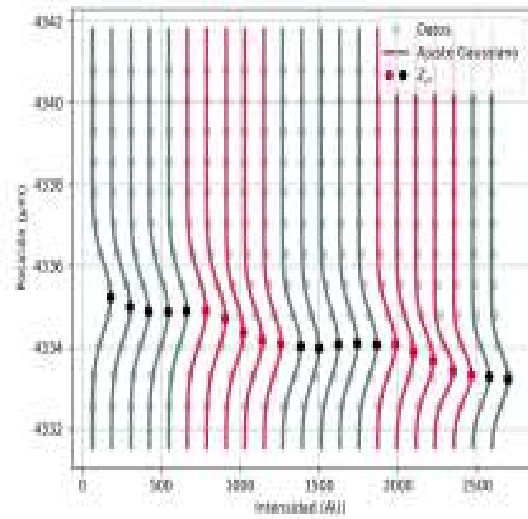


(d) Cuarto experimento

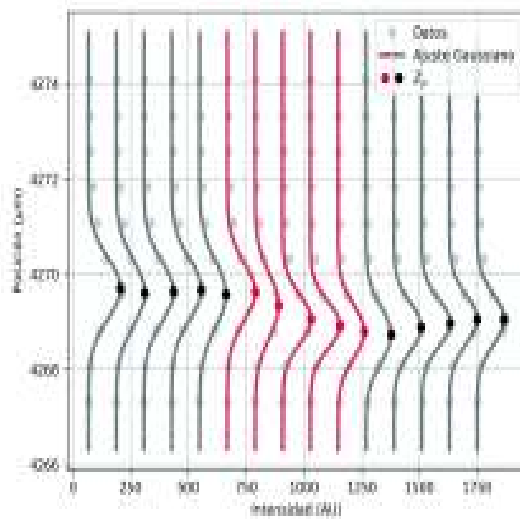
Figura 4.2: Primeros cuatros perfiles de posición frente a intensidad . La figura muestra los perfiles de intensidad, el ajuste gaussiano y los valores de Z_μ obtenidos en dos experimentos. El color del perfil marca el estado del láser, el rojo corresponde a que el láser NIR está encendido y el negro cuando está apagado.



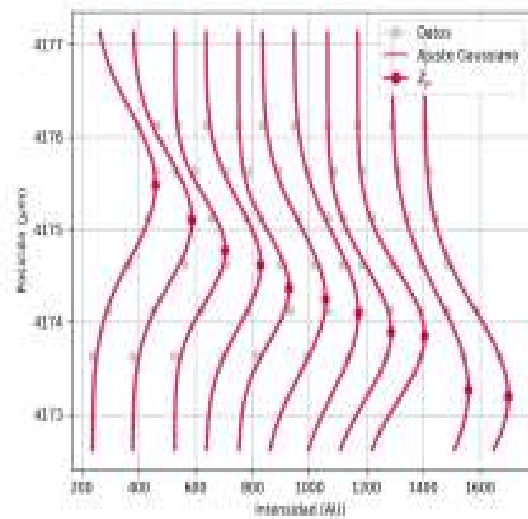
(a) Quinto experimento



(b) Sexto experimento

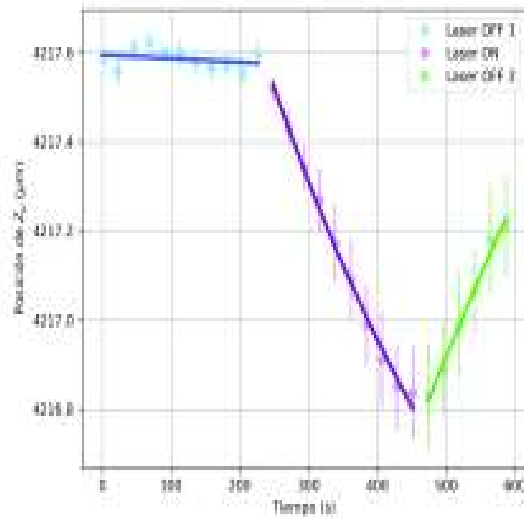


(c) Séptimo experimento

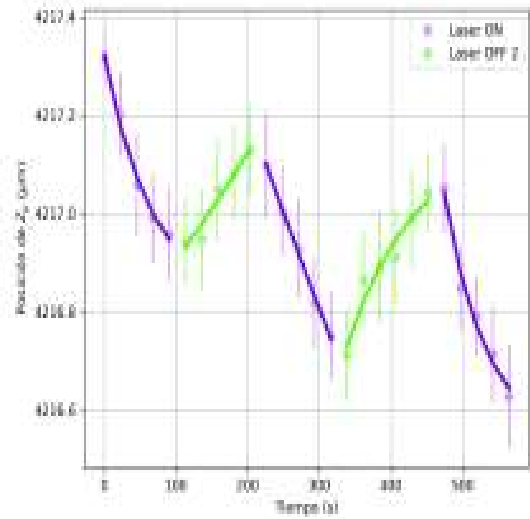


(d) Octavo experimento

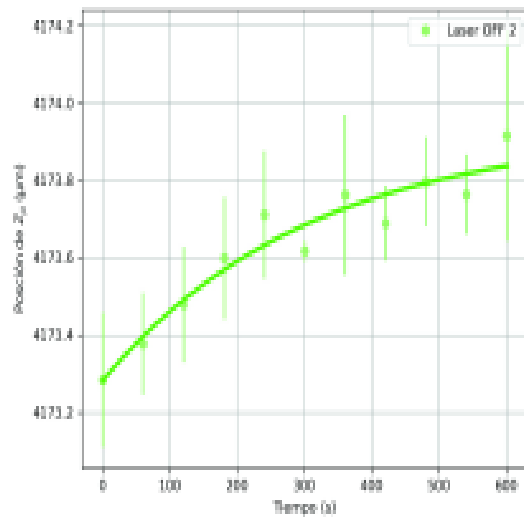
Figura 4.3: Sigüentes cuatro perfiles de posición frente a intensidad . La figura muestra los perfiles de intensidad, el ajuste gaussiano y los valores de Z_μ obtenidos en distintos experimentos a los mencionados en la fig.+ 4.2. El color del perfil marca el estado del láser, el rojo corresponde a que el láser NIR está encendido y el negro cuando está apagado.



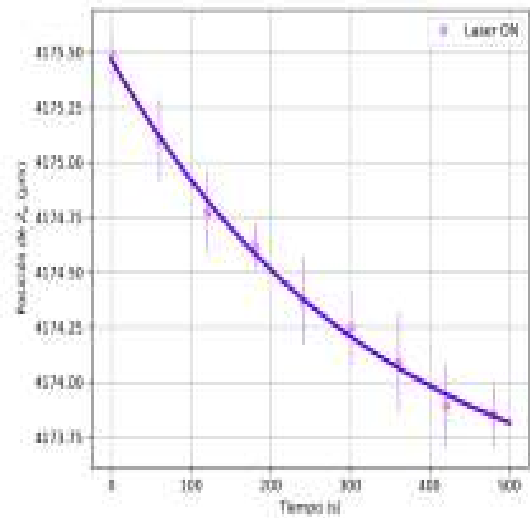
(a) Primer experimento



(b) Segundo experimento

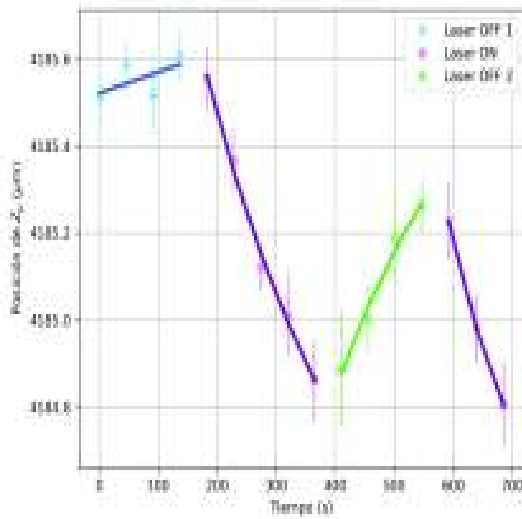


(c) Tercer experimento

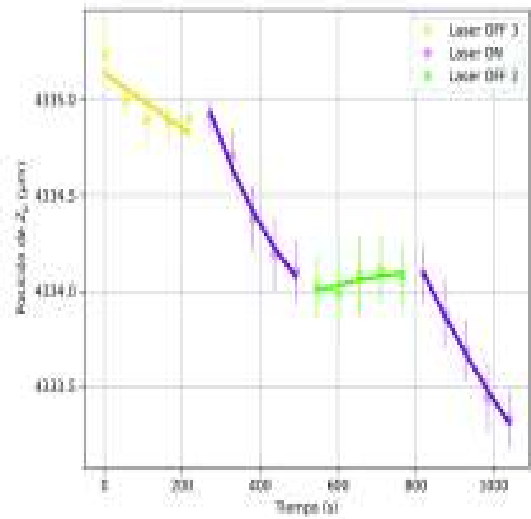


(d) Cuarto experimento

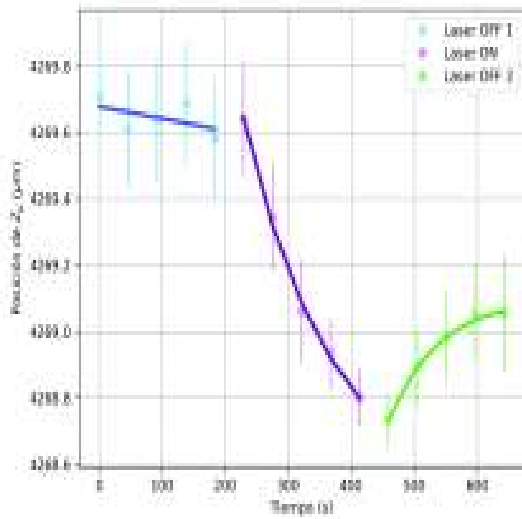
Figura 4.4: Z_μ contra tiempo de los primeros cuatro experimentos
 Los experimentos presentados corresponden respectivamente a los mostrados en la fig. 4.2. Z_μ disminuye cuando se enciende el láser NIR y aumenta cuando se apaga el láser.



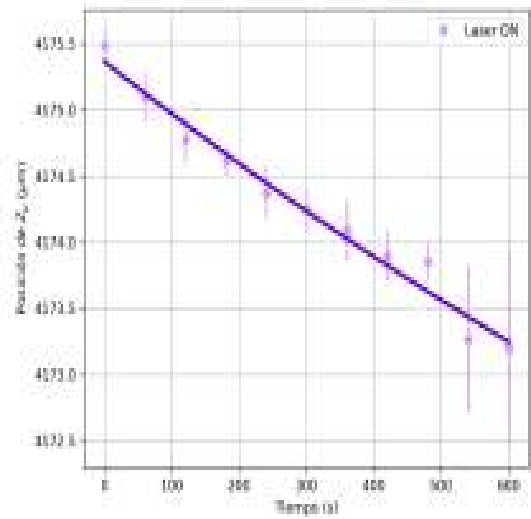
(a) Quinto experimento



(b) Sexto experimento



(c) Séptimo experimento



(d) Octavo experimento

Figura 4.5: Z_μ contra tiempo de los siguientes cuatro perfiles de intensidad. Los experimentos presentados corresponden respectivamente a los mostrados en la fig. 4.3. Z_μ disminuye cuando se enciende el láser NIR y aumenta cuando se apaga el láser.

comparación de los otros. La disminución máxima medida fue de $2.25 \mu m$ en un intervalo de 600s, en el caso donde solo esta presente el estado ON en la fig 4.5d. Para la incertidumbre de los ajustes, para las gráficas de Z_μ contra tiempo, el valor máxima que tienen es de $0,4\mu m$ que es menor a la resolución del microscopio, excepto por las dos últimas mediciones en la fig. 4.5d , esto se debe a que el valor de Z_μ no está dentro del intervalo de las mediciones, provocando una mayor incertidumbre que en las demás mediciones.

Los datos de la figs. 4.4 y 4.5 se ajustaron a una curva exponencial de la forma

$$Z(t) = c + a(1 - e^{-k \cdot t}), \quad (4.1)$$

donde la ec. 4.1 nos da un modelo para la posición de máxima intensidad Z_μ con respecto al tiempo. Es importante mencionar que para el láser en estado ON el valor de a es negativo, pero es positivo cuando el láser está en estado OFF 2. El significado físico de las constantes, así como el modelo, se explican en la sección 4.2.

Para tener un panorama más general acerca del efecto, se tomaron todas las mediciones realizadas en cada experimento y, respecto a la primera medición en cada cambio de estado del láser, se trasladaron al origen. Esto con el fin de tener una mejor visualización de la variación en la posición de Z_μ . Cómo los estados que nos dan información más relevante acerca del efecto son el estado ON y OFF 2, se procedió a colocar la información de ambos estados en una sola figura, como se muestra en fig. 4.6. Así sencillamente se puede observar el comportamiento de ambos efectos y visualizar como los datos con estado ON tienden a tener un cambio negativo en su posición a lo largo del tiempo con mayor velocidad que los datos con estado OFF 2, los cuales tiende a incrementar su posición con respecto al tiempo. El ajuste de la ec. 4.1 a los datos del láser ON y OFF 2 en la fig. 4.6, arroja los valores promedio para las constantes a y k , mostrados en la tabla 4.1.

Estado del láser	Parámetro	
	a [μm]	k [s^{-1}]
ON	$-3,3259 \pm 0,4055$	$0,0015 \pm 0,0003$
OFF 2	$0,61117 \pm 0,0872$	$0,00432 \pm 0,0012$

Tabla 4.1: Parámetros ajustados

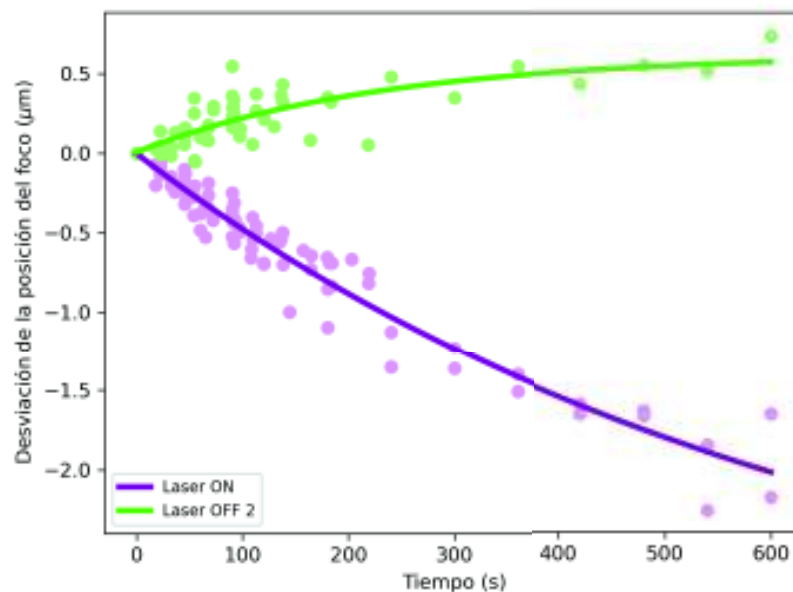


Figura 4.6: Desviación del foco.

Los datos con estado ON tienden a tener un cambio negativo en su posición a lo largo del tiempo, mientras que OFF 2 tiende a incrementar su posición con respecto al tiempo.

4.2. Discusión

4.2.1. Cálculos preliminares

¿Cuánto podría subir la temperatura del aceite de inmersión por efectos de la radiación del láser?

Se hizo al principio un análisis rápido pensando en que la muestra era un cuerpo negro. Esta consideración podría ser falsa ya que la muestra y la radiación del láser no es un sistema en equilibrio térmico. Hay que pensar en un sistema que se va calentando, la relación que se puede utilizar es:

$$Q = mC_p\Delta T, \quad (4.2)$$

$$[Q] = \text{Joules}, [m] = \text{kg}, [C_p] = \frac{\text{J}}{\text{kg}\cdot\text{K}}$$

donde m es la masa de la muestra, C_p la capacidad térmica del aceite y ΔT el incremento/decremento de temperatura.

Propiedades del aceite de inmersión.

La densidad del aceite de inmersión para el Cargille type 37 [38] es:

$$\rho_{37} = 0,917gcm^{-3}, \rho_{37} = 917kgm^{-3}, \quad (4.3)$$

comparando con el aceite Cargille Code 1160 Immersion Oil [39]

$$\rho_{1160} = 1,059gcm^{-3}. \quad (4.4)$$

Al tener valores muy parecidos en densidad podemos tomar el valor del calor específico para el Cargille Code 1160 y utilizarlo para el Cargille type 37, así:

$$C_p = 0,46 \frac{cal}{gC} = 1,926 \times 10^3 \frac{J}{kgK}, \quad (4.5)$$

será el valor utilizado para el calor específico del Cargille type 37.

Masa de la muestra

El volumen que se calienta en la muestra corresponde al campo del microscopio dado por:

$$V = 100\mu m \times 100\mu m \times WD, \quad (4.6)$$

donde WD es la distancia trabajo por sus siglas en inglés, que en el sistema óptico tiene un valor de $WD = 0,15mm$, así el volumen:

$$V = 10^{-4}m \times 10^{-4}m \times 0,15^{-3}m = 0,15 \times 10^{-11}m^3, \quad (4.7)$$

entonces la masa

$$m = V\rho = (0,15 \times 10^{-11}m^3)(917kgm^{-3}) = 1,375 \times 10^{-9}kg. \quad (4.8)$$

Radiación del láser que calienta la muestra.

La transmitancia del aceite es, de acuerdo a Cargille:

$$\tau = 99\% \text{ en } 10cm \rightarrow \tau = 0,99 \text{ en } 10cm, \quad (4.9)$$

la transmisión en los materiales sigue una ley exponencial:

$$\tau = e^{-\alpha x}, \quad (4.10)$$

donde x es el espesor de la muestra. Calculando α (absorción):

$$\alpha = -\frac{\ln(\tau)}{x} = -\frac{\ln(0,99)}{0,1m} = \frac{0,010050}{0,1m} = 0,1\frac{1}{m}, \quad (4.11)$$

La absorción del aceite β en una distancia equivalente a WD :

$$\beta = 1 - \tau = 1 - e^{-(0,1)(0,15 \times 10^{-3})} = 1 - 0,99985 = 1,5 \times 10^{-5}. \quad (4.12)$$

La potencia del láser a la salida del objetivo es de $40mW$. La energía absorbida por segundo es:

$$P = (40 \times 10^{-3} \frac{J}{s})(\beta) = (40 \times 10^{-3} \frac{J}{s})(1,5 \times 10^{-5}) = 6 \times 10^{-7} \frac{J}{s} \quad (4.13)$$

Incremento de temperatura

Despejando ΔT de la expresión para P :

$$P = mC_p \Delta T \left[\frac{K}{s} \right] \quad (4.14)$$

$$\Delta T = \frac{P}{mC_p} = \frac{6 \times 10^{-7} \frac{J}{s}}{(1,375 \times 10^{-9} kg)(1,926 \times 10^3 \frac{J}{kgK})} = 2,26 \times 10^{-1} \frac{K}{s} \quad (4.15)$$

En un minuto se tiene:

$$\Delta T = (2,26 \times 10^{-1} \frac{K}{s})(60s) = 13,5 K \quad (4.16)$$

Cálculo de desviación.

Para el cálculo de la desviación del foco del microscopio, parte de la ecuación fundamental de un dioptrio 4.7:

$$\frac{n'}{s'} - \frac{n}{s} = \frac{n' - n}{R} \quad (4.17)$$

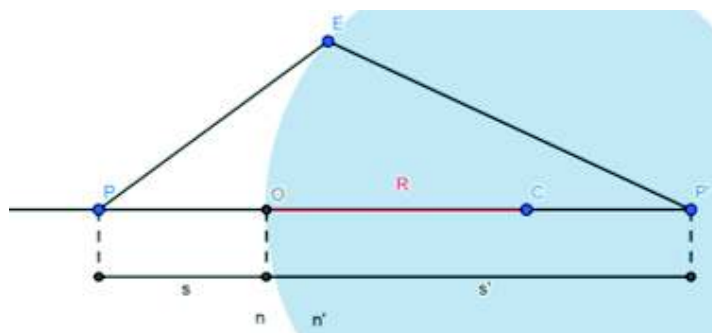


Figura 4.7: Trayectoria de la luz a través de un dioptrio con radio de curvatura R y con distinto índice de refracción al medio

cómo la dioptra es plana ($R = \infty$):

$$\frac{n'}{s'} = \frac{n}{s}, \quad (4.18)$$

despejando s' :

$$s' = \frac{n'}{n} \cdot s. \quad (4.19)$$

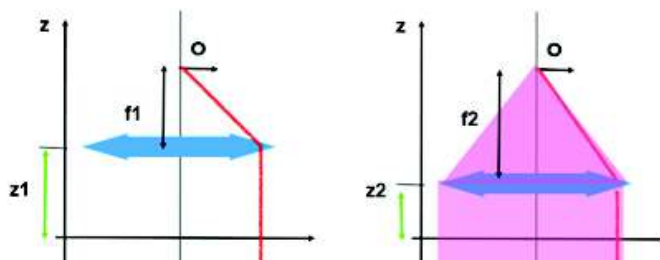


Figura 4.8: Esquema óptico del movimiento del objetivo de microscopio al encender el láser NIR. En la coordenada z se mide la posición del objetivo respecto al plano horizontal.

En la fig. 4.8 se observa que la distancia entre el objeto O y el plano de referencia para posición del objetivo es una constante (c), así se puede escribir que:

$$Z + s' = c. \quad (4.20)$$

Es posible reescribir la ec. (4.19) cómo:

$$c - s' = c - \frac{n'}{n} \cdot s, \quad (4.21)$$

y usando la ec. (4.20), se obtiene:

$$Z = c - \frac{n'}{n} \cdot s. \quad (4.22)$$

Tomando el diferencial con respecto a la temperatura de la ec. (4.22)

$$\frac{d}{dT} Z = \frac{n'}{n^2} \cdot s \frac{dn}{dT}, \quad (4.23)$$

y cómo $n' \approx n$,

$$\frac{d}{dT} Z = \frac{s}{n} \frac{dn}{dT}, \quad (4.24)$$

donde $s = WD$ es la distancia de trabajo del objetivo, n el índice de refracción del aceite y $\frac{dn}{dT} = 0,00035 \frac{1}{C}$ (Cargille), queda

$$\frac{dZ}{dT} = \frac{WD}{n} \frac{dn}{dT}, \quad (4.25)$$

sustituyendo en ec. 4.25, sustituyendo:

$$\frac{dZ}{dT} = \frac{0,15}{1,5} (-0,00035 \frac{1}{C}) = -0,000035 \frac{mm}{K}, \quad (4.26)$$

de este modo si aumenta la temperatura disminuye la posición del foco.

4.2.2. Desarrollo del modelo

Debido a las formas de las gráficas en fig. 4.4 y fig. 4.6, se consideran 2 posibilidades para el modelo: efectos térmicos en el interior de las lentes del objetivo del microscopio o efectos térmicos en el aceite de inmersión.

Los efectos en las lentes se estudiaron mediante un modelo óptico de un microscopio completo en el software ZEMAX Optic Studio utilizando la prescripción óptica descrita en la patente estadounidense 651902 (2003), muy similar al objetivo de inmersión en aceite Nikon Plan Apo 60X / 1.4. Se simularon diferencias de temperatura en lentes críticas como las lentes aplanáticas que hacían contacto con el aceite de inmersión y las lentes alejadas de la muestra. Las diferencias de temperatura de 27 °C no introducen un desenfoque de más de 0,05 μm . Otro análisis se realizó aplicando fórmulas generales para el aceite de inmersión y la primera lente esférica aplanática de

un objetivo de microscopio. Los cálculos se describen en el Apéndice B. Los resultados obtenidos arrojaron información que evidencia una compensación térmica entre las lentes debido a su geometría.

Respecto a los efectos térmico en el aceite de inmersión, reescribimos la ec. 4.25 en términos de las variables utilizadas, así

$$\frac{dZ_\mu}{dT} = \frac{WD}{n} \frac{dn}{dT}, \quad (4.27)$$

los parámetros usados están descritos en la sección 4.2.1. El cambio en la posición del foco en función del tiempo sería:

$$Z_\mu - Z_0 = \frac{WD}{n} \frac{dn}{dT} \cdot (T(t) - T_0). \quad (4.28)$$

Para calcular la función de temperatura en términos de tiempo, se propone una ecuación de energía que muestra el comportamiento de inyección y extracción de energía en el sistema a estudiar (aceite de inmersión, cubreobjetos, muestra, portaobjetos y la incubadora Tokai Hit), ver fig. 3.3. Así, P expresa la energía por segundo que se inyecta al aceite de inmersión. Para la energía que se extrae del aceite por conducción y que es recogido por el sistema de estabilización de temperatura del microscopio, expresamos

$$\dot{Q}_c = -C_t A \frac{d}{dx} T \quad (4.29)$$

donde C_t es la conductividad térmica equivalente, A es el área donde se conduce este flujo y $\frac{d}{dx} T$ es el gradiente de temperatura el sistema. Así el calentamiento/enfriamiento del aceite esta dado por el flujo del láser más la conducción hacia el reservorio, esto es:

$$mC_p \frac{d}{dt} T = P - C_A \frac{d}{dx} T \quad (4.30)$$

donde m es la masa del aceite y C_p la capacidad calorífica del aceite. Se puede reescribir el gradiente de temperatura como la diferencia de temperaturas entre el aceite de inmersión y el cubreobjetos por la longitud del sistema equivalente cómo

$$C_t A \frac{d}{dx} T = \frac{C_t A}{L} (T - T_0), \quad (4.31)$$

tomando

$$h = \frac{C_t A}{L} \quad (4.32)$$

como el parámetro de extracción de calor, se puede reescribir la ecuación (4.30) cómo:

$$mC_p \frac{d}{dt}T + h(T - T_0) = P \quad (4.33)$$

La solución a esta ecuación usando transformaciones de Laplace es

$$T(t) = T_0 + \frac{P}{h}(1 - e^{-\frac{h}{mC_p}(t-\tau)})H(t) - \frac{P}{h}(1 - e^{-\frac{h}{mC_p}(t-\tau)})H(t - \tau), \quad (4.34)$$

donde $H(t)$ es la función escalón de Heaviside. El procedimiento para encontrar la solución está adjunto en el Apéndice A.

Con ec. 4.34 y ec. 4.28 es posible escribir la expresión para el desplazamiento de Z_μ en función del tiempo

$$Z_\mu - Z_0 = \frac{WD}{n} \frac{dn}{dT} \cdot \left(\frac{P}{h}(1 - e^{-\frac{h}{mC_p}(t)})H(t) - \frac{P}{h}(1 - e^{-\frac{h}{mC_p}(t-\tau)})H(t-\tau) \right), \quad (4.35)$$

La ec.4.35 representa una secuencia de estados ON-OFF, considerando solo un estado para el láser, se reduce al modelo ajustado por Z en ec. 4.1. En fin el modelo para el láser encendido queda:

$$Z_\mu(t) = Z_0 - 0,0005\mu m(1 - e^{-\frac{h}{mC_p}t}) \quad (4.36)$$

donde Z_0 será la posición inicial del foco.

Los valores obtenidos en el ajuste de la fig. 4.6, arrojan diferentes valores para la constante k , dependiendo de el estado ON y OFF del láser, esto se debe a que la velocidad de calentamiento depende del cambio de temperatura. Al comienzo de los experimentos, la temperatura de la lente en contacto con el aceite de inmersión es menor que la temperatura después de calentar con el láser, por lo tanto se enfría más lentamente de lo que se calienta.

Al obtener la expresión teórica para Z_μ podemos observar que los valores de a y k en realidad no son independientes, ya que ambos dependen del valor de μ y por lo tanto habría que restringir a un parámetro el ajuste. Con lo que se esperaría valores similares de estos.

De ec. 4.35 para Z_μ se observa que el cambio en la posición del foco se genera por el cambio en el índice de refracción del aceite causado por el cambio de temperatura en el sistema. Los datos se ajustan al modelo mostrando un efecto transitorio en la posición del foco debido a efectos térmicos.

Capítulo 5

Conclusiones

En esta tesis se estudió el efecto de la variación en la posición del foco de un microscopio confocal provocado por un láser infrarrojo (NIR) de onda continua de 810 nm con un objetivo de 60X de inmersión en aceite. Primeramente, se obtuvieron distintas imágenes de fluorescencia de la muestra mientras se encendía o apagaba el láser NIR. Con las imágenes obtenidas, se seleccionó el área donde no había célula y se midió la intensidad promedio de dicha área. Para cada pila de imágenes, de cada experimento, se ajustó una curva gaussiana y se determinó la posición de intensidad máxima Z_{μ} de los diferentes perfiles, así como su coordenada temporal. Posteriormente se hicieron gráficas de posición de Z_{μ} contra tiempo para observar su evolución temporal, así como distintos ajustes de expresiones a los datos. Por último, realizamos un análisis cualitativo y cuantitativo de los fenómenos que intervenían en el efecto y se compararon los datos teóricos con los experimentales.

Respecto a los objetivos de esta tesis, se desarrolló satisfactoriamente una metodología para determinar la posición de enfoque de manera experimental y con las gráficas obtenidas que posible analizar la variación de la posición del foco como función del tiempo de exposición al láser infrarrojo. Con esto fue posible caracterizar el efecto de un láser infrarrojo de 810 nm y potencia a la salida del objetivo de microscopio de 40 mW sobre el enfoque en microscopia confocal. Por otro lado, con el análisis de los fenómenos físicos presentes en el efecto, fue posible determinar la relación empírica entre el cambio de posición del foco y el tiempo de exposición al láser infrarrojo, calcular el cambio de temperatura en el aceite de inmersión provocado por un láser infrarrojo de 810 nm y potencia a la salida del objetivo de microscopio de 40 mW y con la combinación de esos cálculos calcular la variación del foco

provocado por la temperatura. Así la propuesta de explicación física del experimento es coherente con los resultados ya que la ecuación resultante ajustó aceptablemente los datos.

Al cumplir satisfactoriamente con los objetivos y con los resultados observados, es posible decir que la introducción de un láser infrarrojo en el trayecto óptico de un microscopio confocal puede afectar de forma medible la posición del foco. Esto debido a que el Láser infrarrojo de 810 nm calienta el aceite de inmersión Cargille Tipo 37 que se encuentra entre la muestra y el objetivo provocando un cambio en el índice de refracción y por tanto en la posición de enfoque del microscopio.

Fluctuaciones en la posición de enfoque del microscopio pueden traer confusiones en el entendimiento de experimentos realizados, por ello la precisión del foco es imprescindible para una correcta aplicación de las técnicas utilizadas para la elaboración de esta tesis. Esto llevaría a seguir estudiando un mundo que pareciera invisible, desde distintos enfoques por la gran cantidad de aplicaciones que estas técnicas tienen, sobre todo en las ciencias de la salud. Algunas de las aplicaciones más conocidas son: el análisis de fuerzas en células, instrumentos de micromanipulación 3D y obtención de imágenes con gran nitidez y resolución, entre otras. A través de las aplicaciones es que se tiene una mejor comprensión estructural de muestras de estudio micrométricas, y se conoce mejor el funcionamiento de procesos celulares o fenómenos naturales en la microescala. Además, de las aplicaciones multidisciplinarias, también funcionan como una gran herramienta para estudiar fenómenos propios de la física y análisis de conceptos teóricos, en ramas como reología, termodinámica, hidrodinámica y por supuesto óptica.

Las Recomendaciones para trabajos futuros son:

- Para terminar de caracterizar el efecto, la recomendación sería volver hacer el experimento, pero midiendo la temperatura del aceite, esto se puede hacer con microsondas de fibra óptica micrométrica [40] o con materiales fluorescentes con propiedades dependientes de la temperatura [41] para investigar más a detalle el fenómeno.
- Para solucionar el efecto del desenfoque, se podría desarrollar un aceite de inmersión que no se caliente o que sus efectos térmicos sean despreciables. O bien, se podría incluir un sistema activo de retroalimentación que este midiendo constantemente la posición del foco y controlando su desplazamiento, como el Perfect Focus System de Nikon [42, 43].

Bibliografía

- [1] B. Notario Collado, “Microscopia,” 2021.
- [2] C. E. Montalvo Arenas, “Microscopía,” 2010.
- [3] R. F. Egerton, *Physical Principles of Electron Microscopy*. Edmonton, Alberta, Canada: Springer US, first ed., 2005.
- [4] “Tipos de microscopios,” Jan 2021.
- [5] O. E. Olarte, J. Andilla, E. J. Gualda, and P. Loza-Alvarez, “Light-sheet microscopy: a tutorial,” *Adv. Opt. Photon.*, vol. 10, pp. 111–179, Mar 2018.
- [6] M. J. Rust, M. Bates, and X. Zhuang, “Stochastic optical reconstruction microscopy (storm) provides sub-diffraction-limit image resolution,” *Nat Methods*, Oct 2006.
- [7] A. Hoffmann, G.örste@, G. Pilarczyk, S. Monajembashi, V. Uhl, and K. O. Greulich, “Optical tweezers for confocal microscopy,” *Applied Physics B: Lasers and Optics*, vol. 71, no. 5, pp. 747–753, 2000.
- [8] R. W. Bowman and M. J. Padgett, “Optical trapping and binding,” *Reports on Progress in Physics*, vol. 76, no. 2, 2013.
- [9] A. Nwaneshiudu, C. Kuschal, F. H. Sakamoto, R. Rox Anderson, K. Schwarzenberger, and R. C. Young, “Introduction to confocal microscopy,” *Journal of Investigative Dermatology*, vol. 132, no. 12, pp. 1–5, 2012.
- [10] C. J. R. Sheppard, “Scanning confocal microscopy,” *Encyclopedia of Optical Engineering*, p. 2525–2544, May 2014.
- [11] P. M. Manuel Megías, “Atlas de histología vegetal y animal.” <https://mmegias.webs.uvigo.es/5-celulas/1-diversidad.php>, Dec 2020.

BIBLIOGRAFÍA

- [12] P. Instruments, “Microscopía.” <https://www.pce-iberica.es/instrumentos-de-medida/instrumentos-laboratorios/microscopia.htm>, 2014.
- [13] Y. H. D. and F. R. A., *Física Universitaria con Física Moderna*, vol. 2, ch. 2: Óptica. PEARSON EDUCACIÓN, decimosegunda ed., 2009.
- [14] T. Goulette, C. D. Howard, and M. W. Davidson, “Infinity optical systems.” <https://www.microscopyu.com/microscopy-basics/infinity-optical-systems>.
- [15] M. Millán, M. García-Varela, J. Soteras, and E. Cabré, *Óptica geométrica*. Ariel Ciencias, Ariel, 2004.
- [16] E. Hecht, *Optics*. Pearson education, Addison-Wesley, 2002.
- [17] J. W. Lichtman and J. A. Conchello, “Fluorescence microscopy,” *Nature Methods*, vol. 2, no. 12, pp. 910–919, 2005.
- [18] K. R. Primavera and M. W. Davidson, “Properties of microscope objectives.”
- [19] B. R. Masters, “Structured Illumination Microscopy,” *Springer Series in Optical Sciences*, vol. 227, pp. 233–260, 2020.
- [20] D. A. Peterson, “Confocal Microscopy,” *Encyclopedia of Movement Disorders*, pp. 250–252, 2010.
- [21] B. Herman, “Fluorescence Microscopy,” in *Current Protocols in Cell Biology*, pp. 1–10, 1998.
- [22] K. R. Spring and M. W. Davidson, “Introduction to fluorescence microscopy.” <https://www.microscopyu.com/techniques/fluorescence/introduction-to-fluorescence-microscopy>.
- [23] M. D. Morales García, “Uso de la fluorescencia y la microscopía confocal en la investigación científica,” *SEBBM DIVULGACIÓN*, 2012.
- [24] M. J. Sanderson, I. Smith, I. Parker, and M. D. Bootman, “Cold Spring Harb Protoc,” *Physiology & behavior*, vol. 2014, no. 10, pp. 1–36, 2016.
- [25] I. de Investigaciones Biotecnológicas, “Microscopía óptica.” <http://www.iib.unsam.edu.ar/archivos/docencia/licenciatura/biotecnologia/2017/BioCel/1505840656.pdf>.

BIBLIOGRAFÍA

- [26] M. Minsky, “Memoir on inventing the confocal scanning microscope,” *Scanning*, vol. 10, no. 4, p. 128–138, 1988.
- [27] N. S. Claxton, T. J. Fellers, and M. W. Davidson, “Laser Scanning Confocal Microscopy (LSCM),” *SpringerReference*, vol. 1979, no. 21, 2011.
- [28] O. LS, “How olympus super resolution and spinning disk technology achieves fast, deep, and reliable live cell super resolution imaging.” https://www.olympus-lifescience.com/es/resources/white-papers/super_resolution/.
- [29] C. C. T. R. CONICET, “Microscopio confocal de barrido láser.” <https://www.rosario-conicet.gov.ar/equipamiento/centrodecomputosdealtorendimiento-2>.
- [30] T. Čížmr, L. C. Romero, K. Dholakia, and D. L. Andrews, “Multiple optical trapping and binding: New routes to self-assembly,” *Journal of Physics B: Atomic, Molecular and Optical Physics*, vol. 43, no. 10, 2010.
- [31] A. . G. P. Morris, Victor J. & Kirby, *Atomic Force Microscopy for Biologists*, ch. 8: Other Probe Microscopes. Imperial College Press, second ed., 2010.
- [32] K. Volke Sepúlveda, I. Ricárdez Vargas, and R. Ramos García. <https://www.revistaciencia.amc.edu.mx/index.php/ediciones-antteriores/82-vol-58-num-4-octubre-diciembre-2007/comunicaciones-libres/131-pinzas-opticas-las-delicadas-manos-de-la-luz>, Oct 2019.
- [33] “The nobel prize in physics 2018.” <https://www.nobelprize.org/prizes/physics/2018/summary/>.
- [34] R. Avila, J. Ascencio-Rodríguez, D. Tapia-Merino, O. G. Rodríguez-Herrera, and A. González-Suárez, “Optical concatenation of a large number of beads with a single-beam optical tweezer,” *Optics Letters*, vol. 42, no. 7, p. 1393, 2017.
- [35] R. Avila, E. Tamariz, N. Medina-Villalobos, J. Andilla, M. Marsal, and P. Loza-Alvarez, “Effects of near infrared focused laser on the fluorescence of labelled cell membrane,” *Scientific Reports*, vol. 8, no. 1, pp. 1–11, 2018.
- [36] I. Coherent, “Mira - flexible ultrafast ti:s lasers.”
- [37] I. Coherent, “Verdi - high performance cw green lasers.”

BIBLIOGRAFÍA

- [38] C. LABORATORIES, “Immersion oil type 37,” Apr 2018.
- [39] C. LABORATORIES, “Cargille immersion liquid code 1160,” Oct 2016.
- [40] A. Hernández-arenas, R. Pimentel-domínguez, J. R. Vélez-cordero, and J. Hernández-cordero, *A fiber optic probe for thermal therapy*. 2020.
- [41] R. Pimentel-Domínguez, A. M. Velázquez-Benítez, J. R. Vélez-Cordero, M. Hautefeuille, F. Sánchez-Arévalo, and J. Hernández-Cordero, “Photothermal effects and applications of polydimethylsiloxane membranes with carbon nanoparticles,” *Polymers*, vol. 8, no. 4, 2016.
- [42] J. S. Silfies, E. G. Lieser, S. A. Schwartz, T. B. Gines, A. B. Coker, and M. W. Davidson, “The nikon perfect focus system (pfs).” <https://www.microscopyu.com/tutorials/the-nikon-perfect-focus-system-pfs>, 2021.
- [43] J. S. Silfies, E. G. Lieser, S. A. Schwartz, and M. W. Davidson, “The nikon perfect focus system (pfs).” <https://www.microscopyu.com/applications/live-cell-imaging/nykon-perfect-focus-system>, 2021.
- [44] R. K. Nagle, E. B. Saff, A. D. Snider, A. P. V. Oscar, and L. F. Ernesto, *Ecuaciones diferenciales y problemas con valores en la frontera*. Pearson Educacion, cuarta edición ed., 2005.

Apéndice A

Solución a la ecuación diferencial de la temperatura

La ec. diferencial obtenida para la temperatura en función del tiempo es:

$$mC_p \frac{d}{dt} T + h(T - T_0) = P(t). \quad (\text{A.1})$$

Aplicando el cambio de variable $\mathcal{T} = T - T_0$, la ec. (A.1) queda:

$$mC_p \frac{d}{dt} (\mathcal{T} + T_0) + h\mathcal{T} = P(t), \quad (\text{A.2})$$

y cómo T_0 es una constante, la ecuación diferencial se reduce a:

$$mC_p \frac{d}{dt} \mathcal{T} + h\mathcal{T} = P(t). \quad (\text{A.3})$$

$P(t)$ indica si el láser está encendido o apagado, por lo que se puede escribir en términos de la función escalón de Heaviside ($H(t)$):

$$P(t) = P[H(t) - H(t - \tau)]. \quad (\text{A.4})$$

Sean:

$$\mathcal{L}[\mathcal{T}(t)] = r(s), \quad (\text{A.5})$$

$$\mathcal{L}[P(t)] = q(s), \quad (\text{A.6})$$

las transformadas de Laplace de la temperatura y de la función $P(t)$.

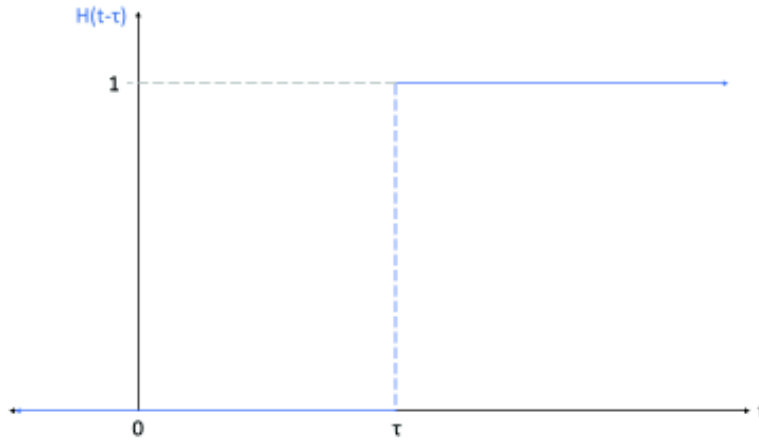


Figura A.1: Forma de la función de Heaviside

Sustituyendo la ec. (A.4) en la ec. (A.6):

$$\mathcal{L}[P[H(t) - H(t - \tau)]] = q(s), \quad (\text{A.7})$$

resultando

$$P \cdot \mathcal{L}[H(t) - H(t - \tau)] = q(s), \quad (\text{A.8})$$

y cómo se menciona en las tablas de transformadas de Laplace que aparecen en [44], la transformada de Laplace para la función escalón y función escalón retrasada τ segundos es:

$$\mathcal{L}[H(t)] = \frac{1}{s} \quad (\text{A.9})$$

$$\mathcal{L}[H(t - \tau)] = \frac{1}{s} e^{-\tau s} \quad (\text{A.10})$$

De la ec. (A.8), al sustituir las ecs. (A.9) y (A.10), la expresión para $q(s)$ queda:

$$q(s) = \frac{P}{s} (1 - e^{-\tau s}). \quad (\text{A.11})$$

Ahora aplicando la transformada de Laplace a la ec. (A.3):

$$\mathcal{L}[mC_p \frac{d}{dt} \mathcal{T} + h\mathcal{T}] = \mathcal{L}[P(t)], \quad (\text{A.12})$$

Y sustituyendo primero la ec. (A.6) y posteriormente la ec. (A.11) en la ec. (A.12), resulta:

$$\mathcal{L}[mC_p \frac{d}{dt} \mathcal{T} + h\mathcal{T}] = \frac{P}{s}(1 - e^{-\tau s}). \quad (\text{A.13})$$

Desarrollando el lado izquierdo de la ec. (A.13)

$$\mathcal{L}[mC_p \frac{d}{dt} \mathcal{T} + h\mathcal{T}] = mC_p[s \cdot r(s) - \mathcal{T}(t=0)] + h \cdot r(s), \quad (\text{A.14})$$

y cómo $\mathcal{T}(t=0) = T(t=0) - T_0 = 0$, la ecuación anterior pasa a la forma

$$\mathcal{L}[mC_p \frac{d}{dt} \mathcal{T} + h\mathcal{T}] = mC_p s r(s) + h r(s). \quad (\text{A.15})$$

Sustituyendo la ec. (A.15) en la ec. (A.13)

$$mC_p s r(s) + h r(s) = \frac{P}{s}(1 - e^{-\tau s}). \quad (\text{A.16})$$

Ahora despejando $r(s)$

$$r(s)(mC_p s + h) = \frac{P}{s}(1 - e^{-\tau s}), \quad (\text{A.17})$$

$$r(s) = \frac{P}{s(mC_p s + h)}(1 - e^{-\tau s}), \quad (\text{A.18})$$

y reescribiendo, se obtiene la expresión

$$r(s) = \frac{P}{mC_p s(s + \frac{h}{mC_p})}(1 - e^{-\tau s}). \quad (\text{A.19})$$

Aplicando la transformada inversa a la expresión anterior

$$\mathcal{L}^{-1}[r(s)] = \mathcal{L}^{-1}\left[\frac{P}{mC_p s(s + \frac{h}{mC_p})}\right] - \mathcal{L}^{-1}\left[\frac{P e^{-\tau s}}{mC_p s(s + \frac{h}{mC_p})}\right]. \quad (\text{A.20})$$

Simplificando el primer término de la ec. (A.20)

$$\frac{P}{mC_p s(s + \frac{h}{mC_p})} = \frac{P}{mC_p} \left[\frac{k_1}{s} + \frac{k_2}{s + \frac{h}{mC_p}} \right], \quad (\text{A.21})$$

así, k_1 y k_2 :

$$\frac{k_1(s + \frac{h}{mC_p})}{s(s + \frac{h}{mC_p})} + \frac{k_2 s}{s(s + \frac{h}{mC_p})} = \frac{1}{s(s + \frac{h}{mC_p})}, \quad (\text{A.22})$$

$$k_1 s + \frac{k_1 h}{mC_p} + k_2 s = 1. \quad (\text{A.23})$$

De aquí

$$k_1 = -k_2 \quad (\text{A.24})$$

y

$$k_1 = \frac{mC_p}{h}. \quad (\text{A.25})$$

Sustituyendo los valores de k_1 y k_2 en (A.21)

$$\frac{P}{mC_p s(s + \frac{h}{mC_p})} = \frac{P}{mC_p} \left[\frac{\frac{mC_p}{h}}{s} - \frac{\frac{mC_p}{h}}{s + \frac{h}{mC_p}} \right], \quad (\text{A.26})$$

y simplificando el resultado

$$\frac{P}{mC_p s(s + \frac{h}{mC_p})} = \frac{P}{h} \left[\frac{1}{s} - \frac{1}{s + \frac{h}{mC_p}} \right], \quad (\text{A.27})$$

así, su transformada inversa es entonces:

$$\mathcal{L}^{-1} \left[\frac{P}{mC_p s(s + \frac{h}{mC_p})} \right] = \frac{P}{h} \mathcal{L}^{-1} \left[\frac{1}{s} - \frac{1}{s + \frac{h}{mC_p}} \right]. \quad (\text{A.28})$$

Ahora, de tablas de transformadas de Laplace en [44],

$$\mathcal{L}^{-1} \left[\frac{1}{s} - \frac{1}{s + \frac{h}{mC_p}} \right] = (1 - e^{-\frac{h}{mC_p} t}) H(t), \quad (\text{A.29})$$

resultando

$$\mathcal{L}^{-1} \left[\frac{P}{mC_p s(s + \frac{h}{mC_p})} \right] = \frac{P}{h} (1 - e^{-\frac{h}{mC_p} t}) H(t). \quad (\text{A.30})$$

APÉNDICE A. SOLUCIÓN A LA ECUACIÓN DIFERENCIAL DE LA
TEMPERATURA

Y para el segundo término de la ec. (A.20), se utiliza la propiedad de las transformadas de Laplace:

$$f(t - t_0)H(t - t_0) = e^{-t_0s}F(s), \quad (\text{A.31})$$

entonces,

$$\mathcal{L}^{-1}\left[\frac{Pe^{-\tau s}}{mC_p s(s + \frac{h}{mC_p})}\right] = \frac{P}{h}(1 - e^{-\frac{h}{mC_p}(t-\tau)})H(t - \tau). \quad (\text{A.32})$$

Sustituyendo las ecs. (A.30) y (A.34) en la ec. (A.20) y teniendo en cuenta la ec. (A.5), se obtiene la solución a la ecuación diferencial (A.1) es:

$$\mathcal{T}(t) = \frac{P}{h}(1 - e^{-\frac{h}{mC_p}t})H(t) - \frac{P}{h}(1 - e^{-\frac{h}{mC_p}(t-\tau)})H(t - \tau), \quad (\text{A.33})$$

y recordando el cambio de variable, la solución a la ec. (A.1) es:

$$T(t) = T_0 + \frac{P}{h}(1 - e^{-\frac{h}{mC_p}t})H(t) - \frac{P}{h}(1 - e^{-\frac{h}{mC_p}(t-\tau)})H(t - \tau). \quad (\text{A.34})$$

Apéndice B

Análisis térmico del objetivo de microscopio

En el marco de la colaboración con el grupo del Dr. Remy Ávila, el Dr. Salvador Cuevas Cardona, del Instituto de Astronomía en UNAM, realizó un análisis del objetivo de microscopio, para observar el cambio en la posición del foco del objetivo debido a un aumento de temperatura por efecto de iluminación del láser.

La simulación fue hecha en el programa de diseño óptico y optimización Zemax. Se examinó un sistema óptico similar al objetivo de microscopio de inmersión en aceite 60X de NIKON utilizado en las mediciones, con un láser de onda continua con longitud de onda de 808 nm.

En la fig. B.1 se muestran las lentes consideradas para el modelado térmico del objetivo. En primer lugar, se calculó la sensibilidad de enfoque del objetivo de microscopio modelando la muestra y las tres primeras lentes: la esfera pequeña L1, la esfera que la rodea L2 y la lente menisco L3. El resto del sistema óptico se modeló con lentes paraxiales, como se muestra en la fig. B.2. Se encontró que la muestra, L1 y L2 se compensaban térmicamente, mientras que L3 contribuía a una variación de foco de $-80 \times 10^{-6} \text{mm}/^\circ\text{C}$. De este modo, para variar la posición del foco una cantidad de 2 micras se requiere un cambio de temperatura de 25 grados. Sin embargo, no se consideran las posibles compensaciones térmicas de las otras lentes del objetivo.

Posteriormente se analizó la muestra considerando las demás lentes en dos casos: en el caso 1, la temperatura de la muestra, L1 y L2 se establece a 37°C, mientras que en L3 se hacía variar la temperatura entre 20°C a 47°C. La temperatura del resto de las lentes a 20°C. En el caso 2, la temperatura de la muestra, L1 y L2 se establece a 37°C, las demás lentes a 20°C excepto

APÉNDICE B. ANÁLISIS TÉRMICO DEL OBJETIVO DE MICROSCOPIO

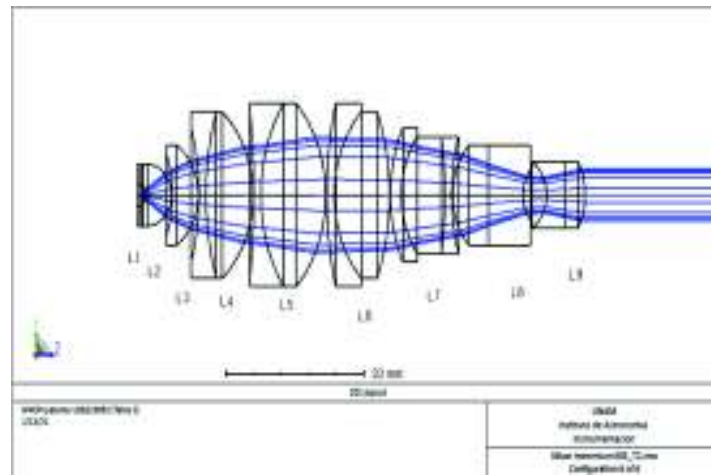


Figura B.1: Objetivo de microscopio de inmersión 60 X. El sistema óptico incluye el porta-objetos, cubreobjetos, el líquido de inmersión y las lentes de tubo. No se modeló el comportamiento térmico del líquido de inmersión.

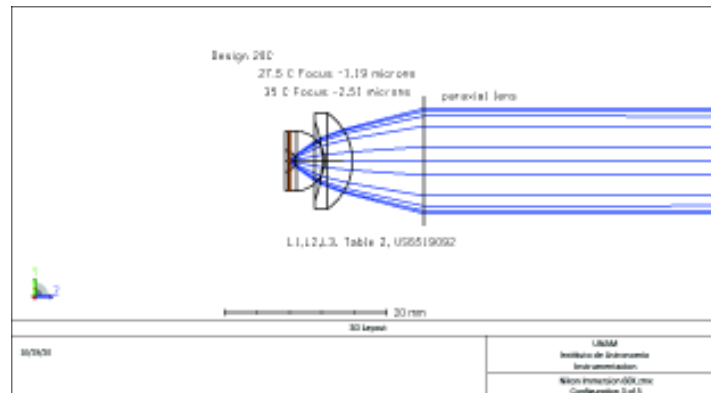


Figura B.2: Análisis del objetivo considerando lentes paraxiales.

el doblete L9, cuya temperatura se hizo variar entre 20°C a 47°C.

En ambos casos no hubo cambios mayores a $0,1\mu m$ en todo el intervalo de variación y la razón de Strehl, que es una medida de la calidad óptica de instrumentos de proyección de imágenes, es superior a 0,99. En conclusión, el objetivo está muy bien compensado térmicamente.