

Microscopía de fluorescencia

FRANCISCO SALIDO-RENGELL*

L OS MÉTODOS DE MICROSCOPIA de fluorescencia han tomado más y más importancia en los últimos años, especialmente desde que se ha logrado marcar a los anticuerpos con un colorante fluorescente, sin quitarles su propiedad inmunológica. A esta forma de aplicar el método de fluorescencia se le ha llamado "Técnica de los Anticuerpos Fluorescentes".

Por lo general, puede decirse, que cuando una partícula extraña entra al organismo, provoca una reacción netamente específica. Es decir, que esa partícula se comporta como un antígeno. Muchas sustancias pueden comportarse de esta manera. Por ejemplo, los polisacáridos de la pared bacteriana; proteínas del capsido viral, etc. La respuesta del organismo al estímulo antigénico es la formación de anticuerpos. Encontrar los sitios donde estos anticuerpos se forman o localizar al antígeno en los tejidos de un organismo son los problemas básicos que pueden resolverse con las técnicas de inmunofluorescencia.

Los colorantes que se usan en histología, por lo general, tiñen por absorción, proceso en el cual no hay una verdadera reacción química entre el sustrato y el colorante. Luego, el primer problema que se planteó fue encontrar la forma de unir químicamente a los anticuerpos con un colorante. Al transformar a la fluoresceína en isotiocinato se resolvió la dificultad, ya que este grupo tiene una gran afinidad por la molécula de proteína.

El propósito de este trabajo es dar a conocer las bases teóricas de la fluorescencia y su uso en microscopía.

* Jefe de Histopatología Instituto Nacional de Virología. S. S. A.

TEORÍA

Para entender el fenómeno de la fluorescencia es necesario saber qué pasa si una molécula absorbe luz. La luz es una onda electromagnética, es decir, que oscila periódicamente. Esta periodicidad está dada por la fuerza de un campo eléctrico. Si una onda electromagnética choca con una molécula los electrones de ésta, que no están firmemente unidos, oscilan cuando la luz pasa entre ellos por razón de la carga eléctrica. Este fenómeno requiere energía; la energía sólo puede ser aprovechada de la luz que pasa al través de la molécula y entonces se dice que se ha absorbido luz. La energía que se ha tomado de la luz no se pierde. Esta energía puede aparecer en diversas formas, como calor, como energía que activa una reacción química, y también puede ser transformada en luz de mayor longitud de onda; como en la luminiscencia. Siempre que una molécula emite luz, al fenómeno se le llama "*luminiscencia*".

Esta luminiscencia que se produce por absorción de luz se llama "fotoluminiscencia" y la luz emitida siempre es de mayor longitud de onda que la luz excitadora.

En todos los procesos de fotoluminiscencia hay un lapso entre la absorción o excitación y la emisión de luz por la molécula. Si el lapso entre uno y otro proceso es de más 10^{-4} segundos al fenómeno se le llama fosforescencia, en tanto que, si el lapso es de menos de 10^{-4} segundos se le llama fluorescencia.

Si se toma en cuenta que la longitud de onda de la luz varía entre 400 μ y 800 μ , puesto que cada uno de los colores del espectro luminoso tiene una longitud de onda distinta, siendo la del rojo la mayor y la del violeta la menor, visibles por el ojo humano. Ahora bien, la luz no es un flujo continuo de energía, sino que es un flujo intermitente. Cada emisión de energía puede decirse que es una unidad llamada "quantum" de energía es mayor. Por lo tanto la energía producida por la luz ultravioleta es superior a la de la luz roja o infrarroja.

Básicamente, la fluorescencia consiste en una serie de fenómenos sucesivos. Una onda luminosa llega a una molécula; esta molécula absorbe la luz y entra entonces en un estado de "excitación". La luz que es absorbida proporciona la energía y la molécula excitada emite luz propia de mayor longitud de onda que la luz excitadora y por lo tanto de color diferente.

Para que la fluorescencia se produzca en condiciones óptimas deben reunirse los siguientes requisitos:

1. La luz excitadora debe ser de una longitud de onda muy pequeña para que produzca una gran cantidad de energía. La mejor fuente para obtener la mayor cantidad de luz adecuada es la de mercurio, que proporciona gran cantidad de luz ultravioleta y azul violeta.

2. Las sustancias deben manejarse a baja temperatura pues las elevaciones térmicas aceleran los procesos de absorción y emisión de luz por las moléculas fluorescentes.

3. Desde el punto de vista químico los compuestos con radicales OH^- , OCH_3 , $=\text{CH}_2$, NH_2 , y $\text{N}(\text{CH}_3)_2$ aumentan la eficiencia de producción de energía. Las moléculas con radicales CO^- , COOH^- , CN^- , $\text{CH}=\text{O}$, NO_2 y $-\text{CH}=\text{CH}-$ la disminuyen.

4. La viscosidad de las soluciones aumenta también la eficiencia de producción de energía. Por lo tanto, conviene trabajar con soluciones de alta viscosidad.

5. El pH de las soluciones es también de mucha importancia y por ello debe trabajarse con soluciones amortiguadoras de pH 7.4 a 7.6 o bien a pH 9.0, según la parte del proceso que se está llevando al cabo. Tampoco debe concentrarse el colorante, pues se pierde la eficiencia de la fluorescencia; lo más ventajoso es usar compuestos que produzcan fluorescencia verde pues este color es el que capta mejor el ojo humano.

EL MICROSCOPIO DE FLUORESCENCIA

Cualquier microscopio ordinario es útil para hacer observaciones con luz ultravioleta. Desde luego debe equiparse con el equipo adicional que se menciona a continuación.

Primero, debe contarse con una fuente luminosa muy intensa y rica en rayos ultravioleta y azul violeta. Las lámparas de mercurio a presión son las mejores. Naturalmente la lámpara debe estar cubierta con una campana metálica con ventilación suficiente para que el observador esté protegido debidamente de la luz intensa.

Frente a la fuente luminosa deben colocarse filtros que absorban el calor de los rayos luminosos y delante, filtros excitadores que dejen pasar solamente rayos ultravioleta y azul violeta. (Los filtros Schott nos han dado excelentes resultados). En la figura 1, se ilustra la disposición

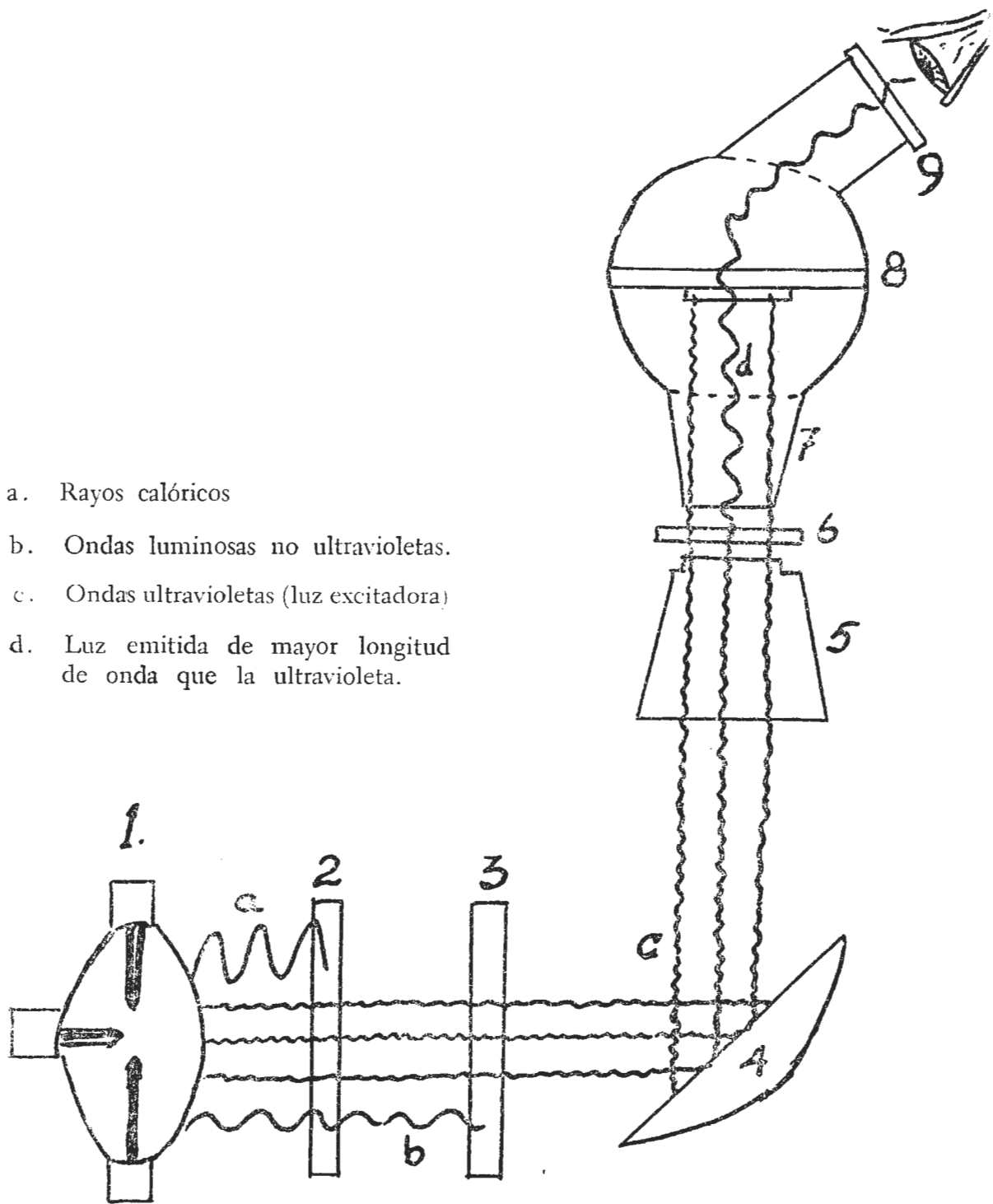


Fig. 1

DIAGRAMA DEL DISPOSITIVO DE FLUORESCENCIA

- | | |
|-------------------------------|---------------------------|
| 1. Lámpara de Mercurio. | 5. Condensador cardioide. |
| 2. Filtro de rayos catódicos. | 6. Preparación. |
| 3. Filtro excitador. | 7. Objetivo. |
| 4. Espejo de aluminio. | 8. Filtro inhibidor. |
| | 9. Ocular. |

de los filtros en relación con la óptica del microscopio para la mejor comprensión de lo que aquí se expone.

Para la correcta iluminación del microscopio y para evitar la pérdida de luz ultravioleta, se recomienda el uso de espejos de aluminio que han demostrado ser los más adecuados.

Para trabajar con anticuerpos fluorescentes, la iluminación correcta se logra con condensadores de campo oscuro que deben tener apertura numérica mayor que el objetivo que se está usando. En esta forma se obtiene el verdadero campo oscuro. El condensador de campo oscuro con apertura numérica 1.20 ó 1.40 es lo que puede tomarse como más útil.

Sobre la lente frontal del condensador se pone una gota de aceite de inmersión que no tenga fluorescencia propia y siempre debe tenerse cuidado de que no se formen burbujas de aire. El vidrio de las laminillas portaobjetos y cubreobjetos debe ser de la mejor calidad óptica.

En general, los objetivos de 10x, 25x y 40x son los que dan al observador todas las posibilidades para la observación. De cualquier manera, el objetivo de inmersión ya sea de 90x ó de 100x debe estar provisto de un diafragma iris con objeto de poder ampliar la apertura numérica y conseguir mejor visualización.

Entre los objetivos y los oculares o bien entre los oculares y el ojo del observador, debe intercalarse un juego de filtros (Schott) llamados inhibidores y que evitan el paso de todos los rayos ultravioletas o azul violeta que no excitan al colorante fluorescente y que sólo dejan pasar la luz propia de la fluorescencia. El color del filtro para obtener mejores resultados es el amarillo ámbar.