

Resumen

La microscopía de hoja de luz, también conocida como microscopía de iluminación de plano selectivo (SPIM) es una tecnología en crecimiento que combina el seccionamiento óptico con la obtención de imágenes de múltiples vistas. Esto permite la observación de muestras biológicas y de organismos en alta resolución con una modalidad tomográfica (múltiples cortes a lo largo del eje de detección) si la muestra es traslúcida y si la muestra es opaca, se pueden observar sus bordes en diferentes profundidades. A comparación de la microscopía de campo amplio o la confocal fluorescente, la microscopía de hoja de luz solo ilumina la sección de la muestra correspondiente al plano que está siendo detectado por lo que los efectos del fotoblanqueamiento y la fototoxicidad son minimizados, lo que posibilita la observación por periodos prolongados, incluso en organismos vivos. Adicional a lo ya mencionado, el uso de algoritmos computacionales permite una reconstrucción tridimensional, incluso en diferentes puntos en el tiempo, lo que genera una imagen estática o un video 3D según se requiera. En este trabajo se muestra la implementación de la SPIM de tipo 1 o L-SPIM, la cual consiste en un brazo de iluminación y, a 90°, un brazo de detección y los resultados obtenidos al analizar organismos como la *Artemia Salina*, así como una reconstrucción tridimensional de las imágenes obtenidas.

Introducción

La observación y estudio de muestras como organismos vivos, tejidos y células requiere métodos de microscopía que sean cuidadosos con la muestra y proporcionen información 3D rápida con alta resolución espacial y temporal en campos de visión (FOV) grandes. Para hacerlo, la microscopía de fluorescencia de campo amplio (WFM) y la microscopía confocal de fluorescencia de barrido láser (LSCM) han sido durante mucho tiempo los métodos de elección para obtener imágenes de muestras biológicas. En WFM, todo el volumen de la muestra se ilumina y la fluorescencia generada se recoge mediante una lente de objetivo, que luego se proyecta en un dispositivo detector como puede ser una cámara (figura 1). Este proceso permite obtener rápidamente una imagen de fluorescencia de la muestra. Sin embargo, una imagen de este tipo contiene luz desenfocada que reduce considerablemente su contraste y obstaculiza gravemente cualquier capacidad de seccionamiento óptico. Un inconveniente importante de WFM y LSCM es que la luz de excitación atraviesa la muestra y excita la fluorescencia a lo largo de la trayectoria óptica. Esto produce fluorescencia de 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. La microscopía de fluorescencia de hoja de luz (LSFM) ha demostrado ser una técnica capaz de lograr la obtención de imágenes microscópicas con bajo fotodaño, alta resolución y con la posibilidad de un seccionamiento óptico [1]. En esencia, LSFM consiste en iluminar la muestra con un rayo láser laminar delgado, generalmente denominado hoja de luz (LS), pero solo en la parte de la muestra que se está tomando como imagen (figura 2).

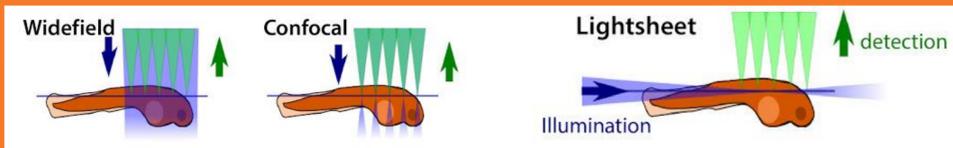


Figura 1: Comparación de la dirección de la luz de iluminación (flecha azul) y detección (flecha verde) entre las técnicas de microscopía de campo amplio (Widefield), microscopía confocal de barrido láser (Confocal) y microscopía de hoja de luz (Lightsheet)

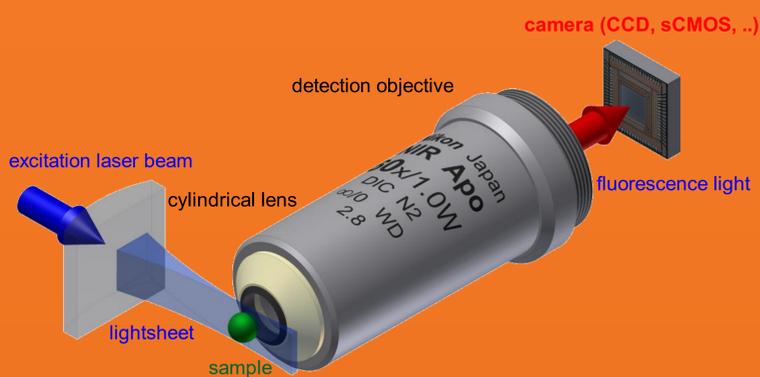


Figura 2: Esquema básico de un microscopio de fluorescencia de hoja de luz (LSFM)

Objetivos

- Llevar a cabo una configuración de microscopio de hoja de luz conocida como SPIM de tipo 1 o L-SPIM, el cual consiste en un brazo de iluminación y uno de detección.
- Capturas imágenes de muestras con un tamaño adecuado para probar y perfeccionar la técnica, como los huevecillos de *Artemia Salina*.
- Procesar las imágenes para obtener una reconstrucción 3D.

Metodología

Un SPIM consta de cinco unidades básicas [3]:

- La unidad de detección: es un microscopio de campo amplio de fluorescencia simplificado, es decir, un microscopio digital basado en una cámara.
- La unidad de iluminación: esta forma la hoja de luz que ilumina la pequeña porción de la muestra que se encuentra en el plano focal de la unidad de detección.
- La unidad láser: proporciona un haz colimado para la unidad de iluminación.
- La unidad de movimiento: controla la posición de la muestra en relación con la configuración óptica estacionaria.
- La unidad de control: opera el hardware y controla el proceso de adquisición de datos.

En la configuración L-SPIM que se usa en este trabajo se coloca una lente objetivo de iluminación que enfoca fuertemente al haz que previamente fue afectado por la lente cilíndrica y se hace incidir en el contenedor de la muestra. El foco de el haz está alineado con la muestra. Una lente objetivo de detección se coloca a 90° respecto del eje de la lente de iluminación. A la salida de la lente de detección se coloca un filtro que permite detectar únicamente la luz proveniente de la fluorescencia de la muestra. A continuación un sensor CCD se encarga de recolectar la luz y digitalizar la información obtenida. La configuración se muestra en la (fig. 3)

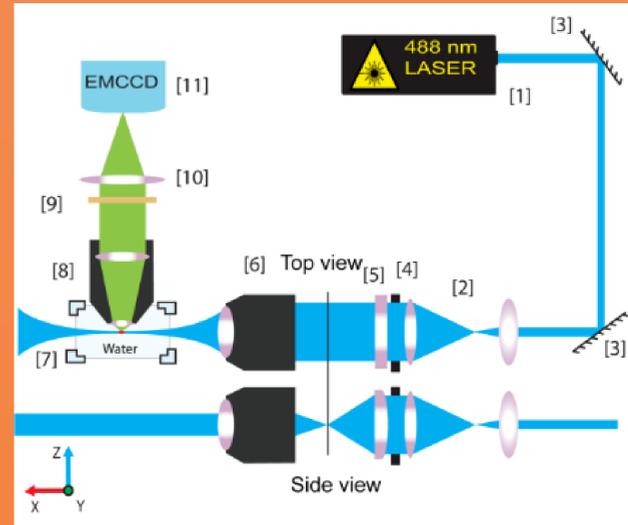


Figura 3: Vista esquemática de SPIM-1: [1] láser (488nm), [2] expansor de haz (x4), [3] espejos de alineación, [4] diafragma, [5] lente cilíndrica (f=15cm), [6] objetivo de iluminación (20x, NA=0.28) [7] contenedor de muestra, [8] objetivo de detección (10x, NA=0.25) [9] filtro de fluorescencia, [10] tube lens (f=200mm), [11] cámara (CCD).

Una parte importante en esta técnica es la colocación de la muestra, ya que difiere de las técnicas convencionales donde la colocación se hace sobre un porta objetos. Aquí es necesaria la inmersión de la muestra en agar (concentración en agua del 0.6%) para mantenerla suspendida y tener libertad de rotarla; para conseguir esto se hace uso de tubos capilares (figura 4, B) y un holder personalizado. Cuando se quiere estudiar la muestra se extrae parcialmente el agar contenido en el tubo capilar y se coloca en un recipiente transparente que contiene agua, esto con la finalidad de evitar cambios bruscos de índice de refracción (interfaz aire-agar) cerca de la muestra y para prevenir un cambio de tamaño del agar al ser expuesto al aire. En esta modalidad de estudio se adquiere un conjunto de imágenes de una misma muestra. Cada imagen corresponde al plano o sección de la muestra que está siendo iluminado. Haciendo un movimiento de la muestra a lo largo del eje de detección se puede obtener la información requerida. Para conseguir un movimiento de la muestra uniforme y rápido se utiliza un control motorizado que es controlado por un software personalizado (hecho en LabView), el cual adquiere las imágenes y después mueve la muestra de manera automatizada. En la preparación del agar se usan perlas fluorescentes disueltas en él, las cuales servirán para la posterior alineación de las imágenes en los diversos ángulos de adquisición.

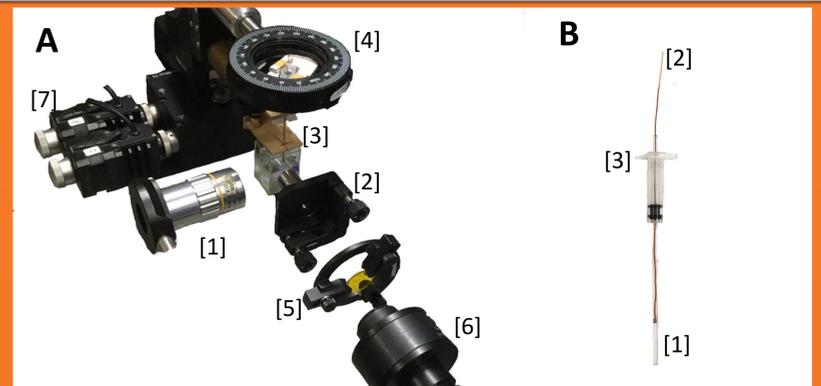


Figura 4. Imagen A: Arreglo experimental. [1] Lente objetivo de iluminación, [2] Lente objetivo de detección, [3] Recipiente con agua y holder personalizado, [4] base giratoria, [5] filtro cromático, [6] tube lens [7] base motorizada; Imagen B: [1] Tubo capilar (d=1mm), [2] alambre de cobre con función de émbolo, [3] sujetador del tubo capilar.

Resultados

Las imágenes obtenidas, alineadas y fusionadas de un huevecillo de *Artemia* y de una *Artemia* de 12 horas de nacida se muestran en la figura 5.

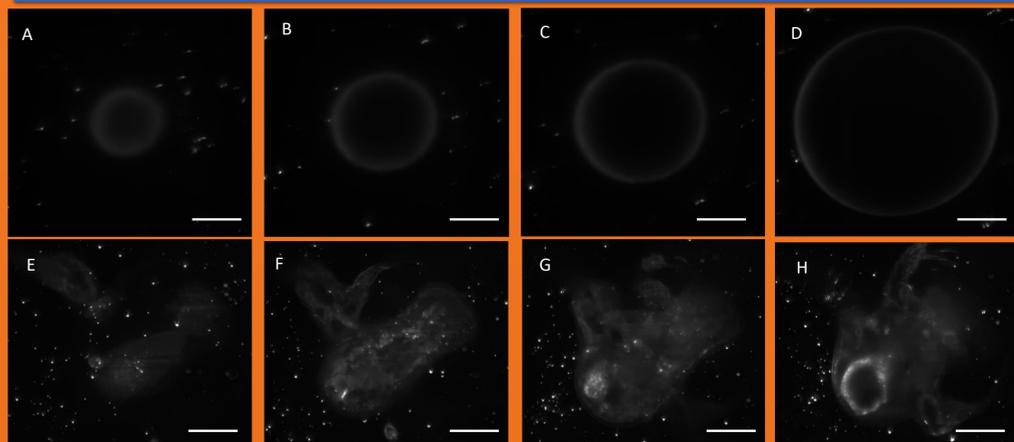


Figura 5. Imágenes A-D: huevecillo de *Artemia Salina* mostrado en diferentes cortes axiales; escala 50µm. Imágenes E-H: *Artemia Salina* tras 12 horas de su nacimiento en diferentes cortes axiales. Los puntos blancos que rodean la muestra son partículas fluorescentes usadas para la alineación de las muestras.

Conclusiones

La técnica de microscopía de hoja de luz es una tecnología en desarrollo que aporta múltiples beneficios al estudio de material biológico. La combinación de esta técnica con otras tecnologías, como el uso de haces exóticos, supera las limitantes que se muestra en la versión de microscopía de hoja de luz mostrada en este trabajo como lo son las sobras ocasionadas por la propia estructura de la muestra o el rápido ensanchamiento del haz Gaussiano utilizado. La técnica de L-SPIM se empleó exitosamente y se proseguirá con el estudio de más muestras.

Referencias:

- [1] J. Huisken, J. Swoger, F. Del Bene, J. Wittbrodt, and E. H. K. Stelzer, "Optical sectioning deep inside live embryos by selective plane illumination microscopy," *Science* 305, 1007–1009 (2004).
- [2] Singh, A. P., Krieger, J. W., Buchholz, J., Charbon, E., Langowski, J., & Wohland, T. (2013). The performance of 2D array detectors for light sheet based fluorescence correlation spectroscopy. *Optics express*, 21(7), 8652-8668.
- [3] Engelbrecht, C. J., & Stelzer, E. H. (2006). Resolution enhancement in a light-sheet-based microscope (SPIM). *Optics Letters*, 31(10), 1477. doi:10.1364/ol.31.001477
- [4] Fernandez, A. G., Mis, E. K., Bargmann, B. O. R., Birnbaum, K. D., & Piano, F. (2010). Automated sorting of live *C. elegans* using laFACS. *Nature Methods*, 7(6), 417–418. https://doi.org/10.1038/nmeth.f.304
- [5] Olarte, O. E., Andilla, J., Gualda, E. J., & Loza-Alvarez, P. (2018). Light-sheet microscopy: a tutorial. *Advances in Optics and Photonics*, 10(1), 111-179.