

Diseño y construcción de un microscopio confocal para estudio prolongado de cultivos tridimensionales in vivo.

María Eugenia Siele, Roberto Etchenique, Ricardo Cabrera*

Departamento de Química Inorgánica, Analítica y Química Física - INQUIMAE - FCEyN - UBA

eugesiele@qi.fcen.uba.ar

La microscopía confocal permite el estudio de muestras semitransparentes de las que se obtienen imágenes tridimensionales con la ayuda de un software computacional.

El microscopio toma imágenes bidimensionales de secciones planas horizontales (x e y) como podría hacerlo -con cierta dificultad- cualquier microscopio óptico. El proceso se repite n veces en planos de diferentes alturas (z) y el software combina las n imágenes planas generando una única imagen tridimensional.

Esta especie de "tomografía óptica" de una muestra se logra gracias a que las imágenes bidimensionales se construyen a partir de la intensidad luminosa de los puntos muestreados exclusivamente en el plano focal. Para eso, un láser enfoca un punto a la vez barriendo toda una sección plana. La accesibilidad de la radiación emitida al fotodetector está limitada por un diminuto diafragma (pinhole), que permite la exclusión de la radiación emitida por los puntos de la muestra que no se encuentran en el plano focal, eliminando el fondo luminoso y fuera de foco tan común en los microscopios convencionales.

La microscopía confocal es compatible con el estudio de cultivos *in vivo* por períodos largos, o para la localización de distintos marcadores en una región concreta, o el seguimiento en el tiempo de su migración a través de la muestra.

Basándonos en el artículo publicado por I. Parker y N. Callamaras ("Construction of a confocal microscope for real-time x-y and x-z imaging" *Cell Calcium* (1999) 26 271-279), planeamos el diseño y construcción de un microscopio confocal de frecuencia de muestreo de alrededor de 1Hz y bajo costo, que pueda ser utilizado en forma continua, por ejemplo en experimentos de time-lapse de varios días.

Las características técnicas del instrumento diseñado permiten hacer experimentos de difícil implementación hasta hace poco, como la videomicroscopía confocal en tiempo real, distribución tridimensional de marcadores fluorescentes, liberación y monitoreo de compuestos enjaulados ("caged compounds") biológicamente relevantes que nuestro laboratorio viene desarrollando desde hace tiempo.