

UNIDADES MULTIDISCIPLINARES DE ANÁLISIS EN LA UAM

La Universidad Autónoma de Madrid, a través del Servicio Interdepartamental de Investigación, agrupa un conjunto de infraestructuras científicas que están agrupadas en ocho unidades en función de sus principios técnicos o campos de laboratorios, los cuales poseen instrumentos de elevada complejidad técnica y que pueden ser y son utilizadas por distintas disciplinas y ramas científicas en las labores de investigación. Las citadas Unidades de análisis son las siguientes: 1) Análisis Elemental. 2) Rayos X. 3) Espectrometría de Masas. 4) Microscopía. 5) Espectroscopia Molecular. 6) Cromatografía. 7) Citometría de Flujo. 8) Análisis Térmico.

En este número de *Encuentros Multidisciplinares* se continúa con la descripción de estas Unidades de análisis con proyección multidisciplinar, iniciada el anterior número, con el fin de divulgar este tipo de infraestructuras en relación con potenciales trabajos de investigación en distintas ramas del conocimiento. En este caso se describe la Unidad de Microscopía.

IV. UNIDAD DE MICROSCOPIA

Esta Unidad de Análisis posee cinco Laboratorios:

1. Laboratorio de Microscopía de Barrido y Análisis por Energía Dispersiva de Rayos X

a) *Introducción:*

La Microscopía Electrónica de Barrido (SEM, del inglés Scanning Electron Microscopy) agrupa un conjunto de técnicas que permiten la caracterización morfológica, estructural y de composición de superficies sólidas mediante imágenes con diferente grado de resolución.

b) *Principios de la Técnica:*

Mediante el Microscopio Electrónico de Barrido son adquiridas imágenes de la superficie de una muestra a partir de su interacción con un haz de electrones enfocado sobre la misma. Esta interacción puede dar lugar a diferentes tipos de respuestas del material analizado en función de la energía del haz de electrones incidente y las características de la propia muestra. Las emisiones de partículas por el material (electrones o fotones) que pueden ser analizadas mediante la infraestructura instalada en nuestro laboratorio son:

- Electrones secundarios, SE, extraídos de la muestra por el haz de electrones incidente ofreciendo información sobre la morfología superficial de la muestra;
- Electrones retrodispersados, BSE, que son reflejados elásticamente por los átomos de la muestra y dan información sobre la distribución de elementos químicos en la misma;
- Fotones con energías en el rango de los Rayos X y que son característicos de los átomos del material bajo estudio (Espectroscopia conocida como: Energía Dispersiva de Rayos X, EDX). Esta radiación es producida por el retorno a su estado de equilibrio de átomos previamente excitados por un haz de electrones muy energético y,
- Fotones con energías en el rango visible del espectro resultantes de la recombinación de pares electrón – hueco que han sido previamente creados por la incidencia del haz de electrones sobre la muestra. Esto último es el fundamento de la Catodoluminiscencia que permite el análisis de la composición local, identificación de estructuras de bandas y detalles sobre el crecimiento de las muestras.

c) *Aplicaciones multidisciplinarias:*

- Ciencia de Materiales: estudio de semiconductores, polímeros, cerámicas, aleaciones, láminas delgadas, etc
- Geología y Petrografía: estudio morfológico, estructural y análisis químico de las muestras.
- Paleontología y Arqueología: estudio morfológico e identificación analítica.
- Determinación de la ley en monedas: análisis de la composición y abundancia relativa.
- Restauración: estudio de pigmentos pictóricos, textiles, obras de arte, pinturas, etc.
- Botánica, Biomedicina, Medicina: estudio morfológico y químico.
- Zoología: estudio morfológico.
- Medio ambiente.
- Ciencia de Materiales: estudio de semiconductores, polímeros, cerámicas, aleaciones, láminas delgadas, etc.
- Control de Calidad: seguimiento del proceso tanto estructural como de pureza.

d) Tipos de ensayos:

Estudio composicional y de superficie de las muestras que puedan entrar en la cámara del microscopio:

- Estudio morfológico de diferentes tipos de muestras secas.
- Estudio composicional cualitativo, semicuantitativo y cuantitativo mediante EDX.
- Estudio de composición de superficies y tamaño de grano.
- Realización de mapas de distribución elemental de los diferentes componentes de las muestras.
- Ensayo de Catodoluminiscencia
- Metalización de muestras con oro y cromo.

e) Normas de funcionamiento:

Condiciones generales y específicas de las muestras

Depende del tipo de muestra, pero han de ser sólidos secos, o en la última fase de deshidratación, con los tratamientos de fijación y posfijación ya realizados. El secado por punto crítico y la metalización se pueden realizar en nuestro laboratorio.

Formato de los resultados

Las imágenes deseadas se pueden llevar en papel térmico (11x 9,5 cm) o guardadas en formato *.tif, bmp, los resultados analíticos y los line - scan se pueden guardar en formato *.csv (compatible con Excel, con Origin...), y los mapeados pueden archivar como *.bmp; también se guardan en formato html dependiendo del microscopio en el que realicen los estudios.

Forma de solicitar los análisis

Ponerse en contacto con el S.I.d.I. o con el propio laboratorio para acceder a una sesión de microscopía. Las muestras deben ir acompañadas de la solicitud de ensayo generada en WEBLIMS. El usuario debe ponerse en contacto con el laboratorio ANTES de rellenar la solicitud de ensayo.

2. Laboratorio de Microscopía Electrónica de Barrido de Emisión de Campo

a) Introducción:

El microscopio electrónico de barrido de emisión de campo permite la observación y caracterización con muy alta resolución de la superficie de materiales. También es utilizado para la obtención de patrones Nanolitográficos.

b) Principios de la Técnica:

Las imágenes que se obtienen mediante este microscopio, resultan del procesamiento de las señales a que dan lugar las interacciones del haz de electrones (secundarios) con la muestra. Como se mencionó en los principios de la técnica de Microscopía de barrido, estos electrones dan información detallada de la morfología superficial de la muestra.

En este microscopio, el filamento emisor de los electrones es más fino que los utilizados en microscopía clásica convencional lo que permite que el haz tenga menor diámetro, siendo capaces de diferenciar puntos que estén muy próximos. Asimismo, la intensidad de corriente en el filamento es unas cinco veces mayor que la de un SEM convencional lo que hace que la cantidad de señal recogida por el detector sea también mucho mayor. De esta forma, esta microscopía brinda mayor y mejor resolución en las imágenes que se obtienen.

Este tipo de microscopio se utiliza también para la fabricación de patrones litográficos a escala nanométrica. En este caso, el microscopio es controlado por un programa de Nanolitografía acoplado a un ordenador, que permite reproducir sobre una muestra recubierta con resina, el patrón previamente diseñado. Esta resina es sensible a los electrones y deja ver los motivos litografiados tras un proceso de revelado.

c) Aplicaciones multidisciplinarias:

- Ciencia de Materiales: estudio de superficies y morfología en semiconductores, nanotubos, membranas, cerámicas, aleaciones, etc.
- Control de Calidad: Seguimiento de procesos estructurales.
- Diseño de patrones para Nanolitografía.

d) Tipos de ensayos:

Estudio de superficie de las muestras que puedan entrar en la cámara del microscopio:

- Estudio morfológico de diferentes tipos de muestras secas.
- Estudio de superficies y tamaño de grano.
- Realización de diseños y plantillas mediante Nanolitografía.
- Medida de perfiles de crecimiento de películas delgadas.

e) Normas de funcionamiento:

Condiciones generales y específicas de las muestras:

Depende del tipo de muestra, pero han de ser sólidos secos. Han de cumplir las especificaciones que aparecen en la solicitud de ensayo.

Formato de los resultados:

Las imágenes deseadas se pueden llevar guardadas en formato *.tif.

Forma de solicitar las sesiones:

Ponerse en contacto con el S.I.d.I. o con el propio laboratorio para acceder a una sesión de microscopía. Las muestras deben ir acompañadas de la solicitud de ensayo generada en @LIMS. El usuario debe ponerse en contacto con el laboratorio ANTES de rellenar la solicitud de ensayo.

3. Laboratorio de Microscopía Confocal

a) Introducción:

La Microscopía Confocal permite el estudio de muestras con marcaje fluorescente, haciendo secciones ópticas de las mismas.

b) Principios de la Técnica:

La característica principal de la Microscopía Confocal es que detecta y recoge la luz emitida por moléculas fluorescentes situadas en un mismo plano focal del espacio tridimensional. Esto es posible porque, por una parte, la fuente de iluminación utilizada es luz láser en la que el haz monocromático se mantiene perfectamente lineal al propagarse. Esta luz ilumina las muestras con una

intensidad muy elevada y estable. Esta disposición permite conseguir resoluciones microscópicas subcelulares.

Desde el punto de vista técnico, los microscopios confocales actuales están equipados con una pieza llamada “diafragma de detección confocal” o “pinhole”, que consiste en un pequeño orificio en el filtro detector de la luz que impide el paso de aquella procedente de los planos de la muestra que no están enfocados. Así, se obtiene sólo la información de la región enfocada, denominada “plano de imagen primario” o “plano focal”, y se elimina el resto. Como resultado final se logran imágenes de mucha mejor calidad, pudiéndose realizar cortes virtuales de las muestras analizadas. Esta Microscopía, posibilita el estudio tridimensional de las muestras, incluyendo su interior, y en determinados materiales permite la obtención de imágenes de su superficie mediante reflexión. La Microscopía Confocal también se aplica para el estudio de muestras in vivo a lo largo de una secuencia temporal o para la co-localización de distintos marcadores en una región concreta.

c) Aplicaciones multidisciplinares:

- Biología Molecular.
- Biología Vegetal.
- Fisiología.
- Medicina.
- Ciencia de Materiales.
- Microbiología.
- Biología Celular.
- Bioquímica.
- Biomedicina.
- Histología.
- Inmunología.
- Anatomía.

d) Tipos de ensayos:

- Análisis tridimensional de muestras biológicas: inmunofluorescencia en células, tejidos, organismos completos de cierto tamaño, biofilms, etc. Con posibilidad de trabajar las secciones ópticas tanto horizontal (xyz) como verticalmente (xzy).
- Estudios de colocalización de hasta cinco marcadores que emitan en el rango del ultravioleta, visible e infrarrojo. Así como de internalización y tránsito intracelular.
- Análisis de expresión génica, interacción molecular y otros procesos celulares.
- Hibridación in situ con sondas fluorescentes (FISH).
- Experimentos in vivo y a tiempo real mediante marcadores o proteínas de fusión fluorescentes (como por ejemplo, la GFP): Time-lapse, medida de iones intracelulares (análisis fisiológico de Ca²⁺), estudios en 4D.
- Reconstrucción automática de grandes estructuras a partir de software (experimentos de Tile scan), ya que ambos equipos disponen de platina motorizada (tanto para experimentos in vivo, como para muestras fijadas).
- Estudios de adquisición simultánea o secuencial de diferentes zonas de la misma muestra o distintos pocillos de una misma preparación en 2D, 3D y 4D (experimentos de Mark and Find y Time-lapse).
- Estudios de lambda scan para la detección espectral lo que permite obtener: las curvas de autofluorescencia de diferentes muestras, los espectros de emisión de los fluoróforos, si se desconocen y, eliminar o minimizar problemas de solapamiento de espectros.
- Estudio de interacciones entre proteínas mediante la técnica FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer). Modos: Acceptor Photobleaching y Sensitized Emission.
- Estudio de transporte de proteínas mediante la técnica FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching) y sus variantes: iFRAP (Inverse), FLIP (Fluorescence Loss in Photobleaching).
- Captación de imágenes con contraste de fase.

- En determinados materiales permite la obtención de imágenes de su superficie mediante reflexión y posterior análisis de superficies, rugosidad, etc.

e) Normas de funcionamiento:

Para hacer uso del servicio, efectuar las reservas de los equipos o comprar las alícuotas de reactivos y placas disponibles en el laboratorio, es necesario estar dado de alta como usuario del SIDI en la aplicación @LIMS. (Enlace al Funcionamiento del Servicio)

Debe hacerse una reserva previa del tiempo de microscopio poniéndose en contacto directamente con el laboratorio: por teléfono, por correo electrónico o a través de nuestros calendarios @lms, dentro de la aplicación @LIMS. (Ver **NORMATIVA E INSTRUCCIONES DE USO CALENDARIO DE RESERVAS @LIMS**)

Las imágenes adquiridas durante las sesiones pueden grabarse en CD, DVD y memoria USB, previamente formateada, o bien pueden descargarse a través de la red (Para más información ponerse en contacto con el laboratorio).

Para utilizar las Estaciones de trabajo off-line adicionales, con nuestros programas de Leica con licencia (uso gratuito), debe hacerse una reserva previa del tiempo de uso poniéndose en contacto directamente con el laboratorio (por teléfono o por correo electrónico).

4. Laboratorio de Microscopía Electrónica de Transmisión

a) Introducción:

El microscopio electrónico de transmisión permite el estudio a nivel ultraestructural de material biológico (células y tejidos tanto animales como vegetales). La utilización adicional de técnicas inmunocitoquímicas, aporta además información funcional sobre el material sujeto a estudio. Permite también la caracterización morfológica de materiales de forma directa, así como su composición mediante técnicas espectroscópicas asociadas.

b) Principios de la Técnica:

El microscopio electrónico de transmisión utiliza un fino haz de electrones acelerados a gran velocidad como fuente de iluminación. Dichos electrones atraviesan la muestra, produciéndose la dispersión de los mismos en diferentes trayectorias características de la ultraestructura del material observado. Colocando una barrera física de pequeña apertura angular por debajo del plano de la muestra, los electrones dispersados según ciertos ángulos, serán eliminados del haz, siendo la imagen formada menos intensa en aquellas zonas correspondientes a una mayor masa de la misma. La imagen de alta resolución formada es aumentada y proyectada sobre una pantalla fluorescente para su visualización en tiempo real, pudiendo registrarse digitalmente o en negativos para su estudio posterior.

c) Aplicaciones multidisciplinares:

- Ciencia de materiales.
- Biología Celular.
- Biomedicina
- Microbiología.
- Biología Vegetal y Animal.

d) Tipos de ensayos:

- Caracterización de distintos tipos celulares.
- Estudio de la ultraestructura celular y tisular en tejidos animales y vegetales
- Localización de componentes en la ultraestructura celular mediante inmunocitoquímica.
- Reconocimiento de virus.

- Determinación de tamaño de partícula en minerales, nanopartículas, etc.
- Estudios de agregación de nanopartículas.

e) Normas de funcionamiento:

Preparación de Muestras

Las muestras biológicas sujetas a estudio han de ser sometidas en general, a procesos de fijación, deshidratación e inclusión en resinas, que van a proporcionar a dicho material el soporte y la dureza necesarios para su seccionamiento en cortes de un grosor aproximado de 60 nm. Una característica fundamental para la observación al microscopio electrónico de cualquier muestra biológica es la interacción que se produce entre esta y el haz de electrones. Generalmente, y con el fin de mejorar dicha interacción, es necesario un proceso de contraste de las secciones con metales pesados.

Las muestras de materiales en polvo requieren, para su estudio en el microscopio electrónico de transmisión, la disolución de una cantidad muy pequeña de muestra en un disolvente orgánico inocuo para la misma, (habitualmente diclorometano, acetona o agua). Es necesario conseguir una dispersión adecuada, sumergiendo para ello la solución en un baño de ultrasonidos. La dispersión final se deposita sobre una rejilla forrada con carbón. Tras su secado, esta puede ser observada en el microscopio electrónico.

Funcionamiento del servicio

Previa a la solicitud de preparación de muestras, el usuario deberá ponerse en contacto con el Laboratorio con el fin de elegir el protocolo y las condiciones de realización del trabajo. Es importante que el usuario advierta de los posibles riesgos, ya sean tóxicos o biológicos, explicando las condiciones en que debe ser manipulado. En caso de acuerdo con el laboratorio para la realización de la preparación de la muestra se fijará fecha y hora para la entrega de la misma indicando, si es necesario, las condiciones de almacenamiento. El laboratorio está totalmente equipado para la preparación de muestras, pudiendo realizarse los procesos de fijación, postfijación, deshidratación e inclusión en resinas de tipo epoxi y acrílicas. Pueden obtenerse secciones micrométricas de material perfundido o incluido en soportes blandos con vibrotomo. En el ultramicrotomo, se obtienen secciones semifinas (1-2 μm) seriadas, que pueden ser reseccionadas a su vez en ultrafinas (60 nm). Los cortes ultrafinos se contrastan con metales pesados. En el microscopio óptico, se pueden obtener fotografías de secciones de vibrotomo o semifinas. La muestra puede recibirse en cualquier fase de la preparación completándose el proceso en el laboratorio. En aquellos casos en los que el usuario sólo requiera la utilización del microscopio electrónico, deberá igualmente ponerse en contacto con el Laboratorio e indicar la naturaleza de la muestra a observar. Para hacer uso del servicio y para efectuar las reservas de turno en el microscopio es necesario estar dado de alta como usuario del SIDI en la aplicación @LIMS.

5. Tratamiento digital de imagen científica

a) Introducción:

El tratamiento digital de la imagen científica permite procesar y analizar estas imágenes para obtener resultados con calidad suficiente para su publicación y extraer datos numéricos relevantes para su manejo e interpretación.

b) Principios de la Técnica:

La adquisición de imágenes científicas en el laboratorio de Microscopía Confocal, empleando las distintas opciones disponibles para esta técnica, conduce inmediatamente a la necesidad de procesar y analizar estas imágenes para obtener imágenes de calidad y extraer datos numéricos relevantes para su manejo e interpretación.

Además, una vez adquiridas las imágenes de interés, utilizando el Microscopio Confocal, la mayoría de los usuarios precisan asesoramiento técnico para la optimización y el tratamiento de sus imágenes; así como en la elaboración de presentaciones, tanto digitales como impresas.

Teniendo en cuenta lo anterior, cualquier persona que trabaje habitualmente con imágenes científicas presentan una demanda real de un servicio de apoyo en el tratamiento de las mismas, posterior a su adquisición.

Por otra parte y, dadas las características de este nuevo servicio, en él también tiene perfecta cabida el tratamiento de imágenes científicas obtenidas con equipos externos al laboratorio de Microscopía Confocal tales como: microscopios ópticos y de fluorescencia, microscopios electrónicos de barrido y de transmisión, etc...

El uso y tratamiento de imágenes científicas digitales se realizará siguiendo las reglas éticas referenciadas en la página web de la Red Española de Microscopía (REMOA).

c) Aplicaciones multidisciplinares:

- Biología Molecular.
- Biología Vegetal.
- Fisiología.
- Medicina.
- Ciencia de Materiales.
- Microbiología.
- Biología Celular.
- Bioquímica.
- Biomedicina.
- Histología.
- Inmunología.
- Anatomía.

d) Tipos de ensayos:

1. PROCESAMIENTO

- Optimización de la imagen
- Edición de imagen: cortar, pegar, cambiar profundidad bits, alinear imágenes, combinar y separar imágenes, redimensionar, modificación de formato
- Ajustes de: color, brillo/contraste, tono/saturación, fondo, basal y fase
- Filtros para la reducción de ruido
- Segmentación: threshold, filtros morfológicos
- Creación de proyecciones: en 3D, topológicas
- Generación de animaciones bidimensionales o tridimensionales.
- Deconvolución

2. ANÁLISIS GENERAL

- Perfiles cromáticos
- Contaje de partículas
- Determinación de áreas

3. ANÁLISIS ESPECÍFICO

- Cuantificación de: intensidad, movimiento y colocalización

4. ANÁLISIS DE MATERIALES

5. ANÁLISIS FRET, FRAP

- Extraer datos estadísticos de experimentos con técnicas F: FRET, FRAP

6. PRESENTACIONES

- Seminarios
- Artículos
- Pósters
- Trípticos

7. ELABORACIÓN DE MACROS O BARRAS DE HERRAMIENTAS PERSONALIZADAS (IMAGEJ/FIJI)

e) Normas de funcionamiento:

Para utilizar el Servicio de tratamiento digital de imagen científica, debe hacerse una reserva previa del tiempo de uso poniéndose en contacto directamente con el laboratorio (por teléfono o por correo electrónico), con el fin de estudiar junto con el usuario la problemática del análisis a realizar y la manera más adecuada de proceder en cada caso.
