



Seminario N°:Microscopía

Prof. Carolina Álvarez C.

18 de marzo 2008

Cuáles son los problemas que dificultan la observación de las microestructuras biológicas?

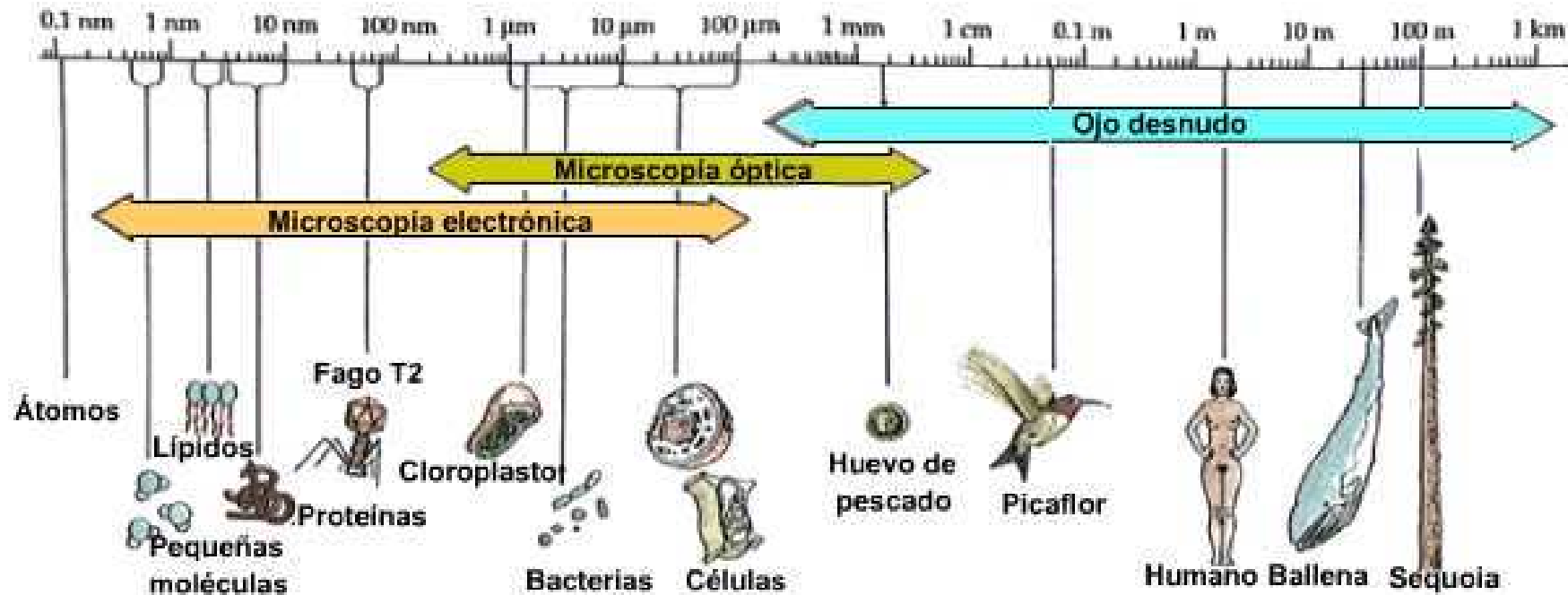
a) Los pequeños tamaños de las células y sus organelas

b) Su transparencia a la luz visible

Soluciones: Construcción y perfeccionamiento de instrumentos como Microscopios y desarrollo de técnicas de tinción, las cuales permiten aumentar el contraste entre las distintas estructuras y entre ellas y su entorno

El tipo más común y el primero que se inventó es el microscopio óptico. Se trata de un instrumento óptico que contiene una o varias lentes que permiten obtener una imagen aumentada del objeto y que funciona por refracción.

Relación entre algunos tamaños importantes de considerar:



Escala de longitud

- 1 m = 100 cm
- 1 cm = 10 mm
- 1 mm = 1000 μm
- 1 μm (micrómetro o micra) = 1×10^{-6} m
- 1 nm (nanómetro) = 1×10^{-9} m
- 1 Å (Angström) = 1×10^{-10} m

Ej: ¿Cuántos nanómetros están contenidos en 5 mm?

$$1 \text{ mm} \rightarrow 1 \times 10^{-3} \text{ m}$$

$$1 \text{ nm} \rightarrow 1 \times 10^{-9} \text{ m}$$

$$5 \text{ mm} \rightarrow X$$

$$X \rightarrow 5 \times 10^{-3} \text{ m}$$

$$X = 5 \times 10^{-3} \text{ m}$$

$$X = 5 \times 10^{-6} \text{ m}$$

$$\text{ó } 0,005$$

$$\text{ó } 500.000 \text{ nm}$$

Antecedentes históricos destacables para la microscopia óptica:

- 1609: Galileo creó los primeros telescopios
- 1611: Kepler sugirió la idea de cómo crear un microscopio compuesto
- 1655: Hooke observando cortes de corcho descubrió la existencia de pequeñas “celdillas” que lo conformaban que denominó células
- 1674: van Leeuwenhoek informó el descubrimiento de protozoos gracias a su aporte en la creación de lentes
- 1838: Schleiden y Schwann propusieron que la célula es la estructura básica de la vida
- 1881: Retzius describió con ayuda de tinciones gran cantidad de tejidos
- 1932: Ruska y Knoll crearon el microscopio electrónico

Partes del microscopio divididas según función

- **Partes óptica:** Está constituido por una serie de lentes que permiten aumentar y además dar nitidez a la imagen.

Oculares: están situados en el extremo superior del tubo, cerca del ojo del observador. Tienen como función multiplicar el aumento logrado por el objetivo, el aumento que se logra con ellos se representa por un número entero acompañado de una X, lo cual significa tantos números, ejemplo 4x

Objetivos: ubicados en el extremo inferior del tubo en la pieza llamada "revólver" y son los que están cerca del objeto que se va a observar. Los objetivos pueden ser "secos" o de "inmersión".

- secos, se denominan así porque no es necesario añadirles ninguna sustancia para usarlos, entre ellos y la preparación, sus aumentos pueden ser de 10X, 15X, 20X, 43X, 45X, 60X.
- inmersión, para usar estos objetivos es necesario añadir una gota de aceite de inmersión que permite que no se desvíe la luz y se pierda la refracción, los aumentos suelen ser de 100X y se distingue por la palabra OIL.

- **Partes mecánica:** Son una serie de piezas donde se instalan los lentes y posee mecanismos de movimiento controlado para el enfoque, las piezas que forman este sistema son:

Soporte o brazo: une el tubo a la platina y sirve para tomar el microscopio y trasladarlo de un lugar a otro.

Base o pie: estructura metálica que sirve de sostén y da estabilidad.

Tubo ocular: tiene forma cilíndrica y está ennegrecido internamente para evitar las molestias que ocasionan los reflejos de la luz. En su parte superior se encuentra un orificio donde se coloca el ocular y en la parte inferior lleva el "revólver" que soporta los objetivos.

Tornillo macrométrico: permite realizar movimientos verticales grandes, es decir mueve el tubo de arriba hacia abajo permitiendo un enfoque rápido.

Tornillo micrométrico: permite realizar movimiento lentos, por lo cual sirve para afinar y precisar el enfoque.

Revólver: estructura circular giratoria donde van enroscados los objetivos. Permite la colocación en posición correcta del objetivo que se va a usar.

Platina: se utiliza para colocar la preparación u objeto que se va a observar, puede ser fija o giratoria, tiene un hueco en el centro para dejar pasar los rayos luminosos.

Pinzas del portaobjeto: sirven para sostener la preparación.

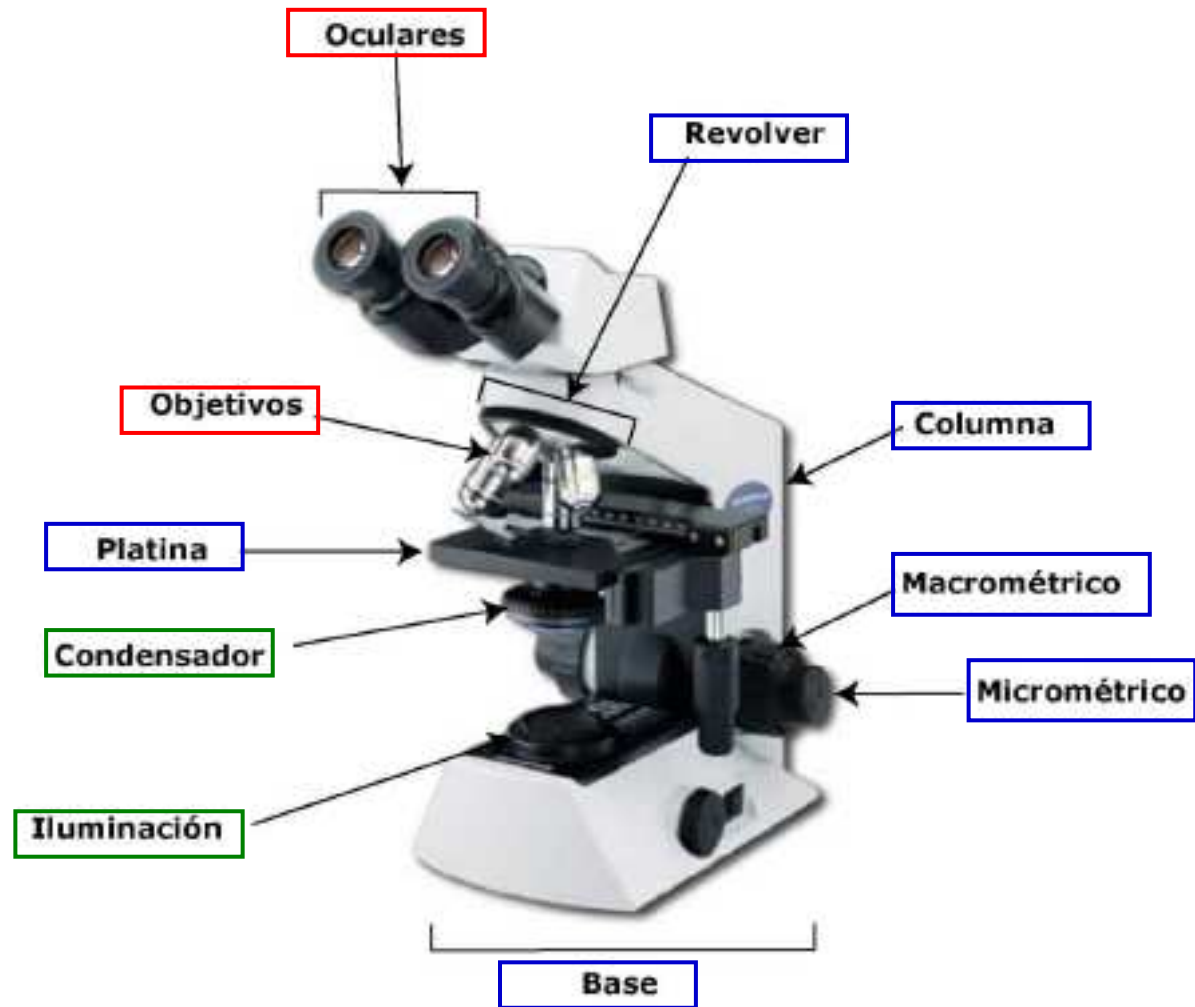
- **Partes de iluminación:** está constituido por las partes del microscopio, cuya función está relacionada con la entrada de luz a través del aparato que ilumina la preparación. Está compuesto por:

Lámpara: se encuentra ubicado debajo del condensador, su función es la de desviar los rayos de luz hacia el objeto que se va a observar.

Condensador, es una lente o sistema de lentes que se encuentran colocado debajo de la platina y su función es la de concentrar la luz sobre el objeto que se va a observar.

Diafragma, disco horadado situado en la parte inferior del condensador, que regula la cantidad de luz que debe pasar a través de éste hacia la platina.

Microscopio óptico



Formación de la imagen

Se produce una imagen real,
invertida y de mayor tamaño

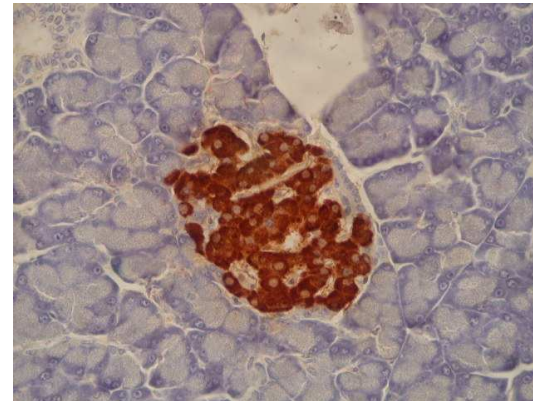
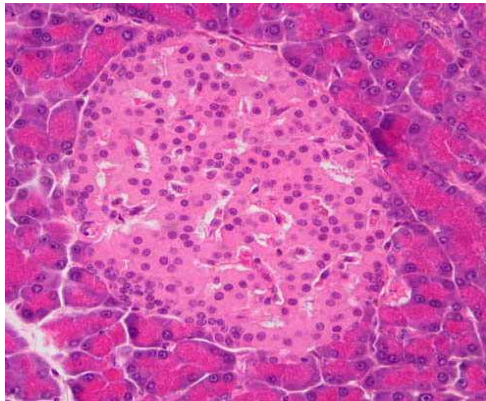


Propiedades del microscopio

- Poder de resolución: distancia mínima entre dos puntos próximos que pueden verse separados. El ojo humano tiene un poder de resolución de 1/10 de milímetros, o sea, de 100 micras. El microscopio óptico tiene un poder de resolución de 0,2 micras o 200 nanómetros o 2000 Angstrom, mejoran la visión unas 500 veces a la del ojo humano.
- Poder de ampliación: producto de la amplificación del objetivo y del ocular, se obtiene de la multiplicación de ambos.
- Poder de penetración: consiste en la capacidad que tiene el microscopio de permitir la observación de diversos planos del objeto estudiado de manera simultánea.
- Poder de definición: capacidad para formar imágenes nítidas y de bordes definidos, depende de la calidad del lente.

Preparación de muestras para su uso en microscopia

- Preparaciones permanentes: son muestras sometidas a largos procesos de fijación, seccionamiento, deshidratación y distintos tipos de tinciones que permiten distinguir diferentes estructuras celulares.



Muestras de islotes pancreáticos de rata sometidos a diferentes tinciones.

A la izquierda Eosina/hematoxilina y a la derecha DAB/ hematoxilina

- Preparaciones frescas: preparadas en el momento que se observaran y tienen una corta duración. Necesitan mantenerse permanentemente hidratadas y pueden ser teñidas para su mejor observación.
- Ej: protozoos, paramecios, amebas
- Catafilos de cebolla
- Espermatozoides vivos

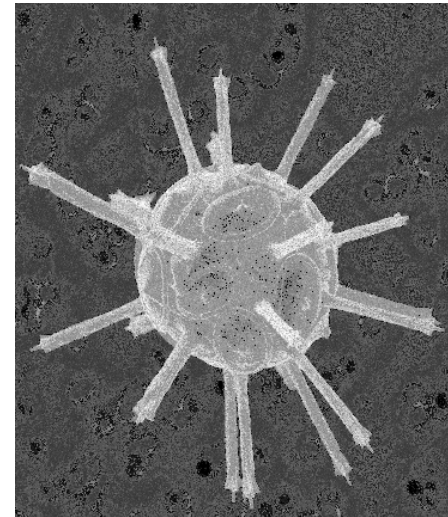
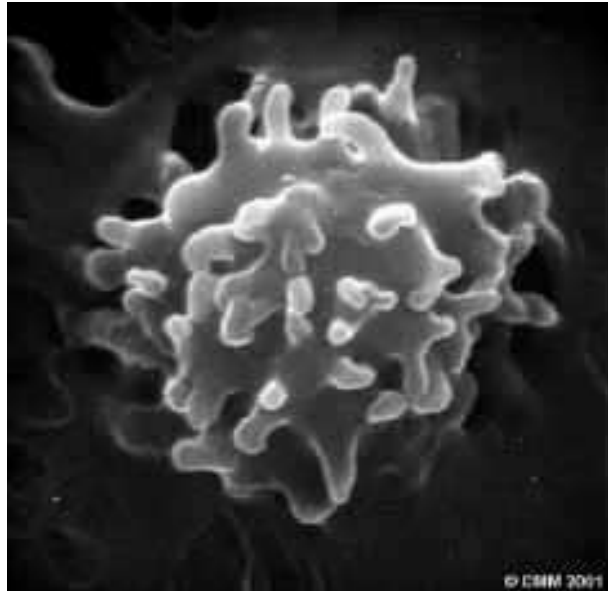
IMPORTANTE: Permite la observación de muestras vivas lo que representa una ventaja al compararse en las muestras permanentes.

Otros tipos de microscopios:

- **Microscopia electrónica:** funcionan emitiendo un haz de electrones sobre la estructura cuya longitud de onda no puede ser captada por microscopios ópticos , los preparados deben ser cortados en capas muy finas, las imágenes obtenidas siempre son en blanco y negro, por el uso de finas placas de metales pesados.

ME de transmisión (MET): que cuenta con un cañón de electrones, lentes magnéticas, un sistema de vacío y una fuente de tungsteno.

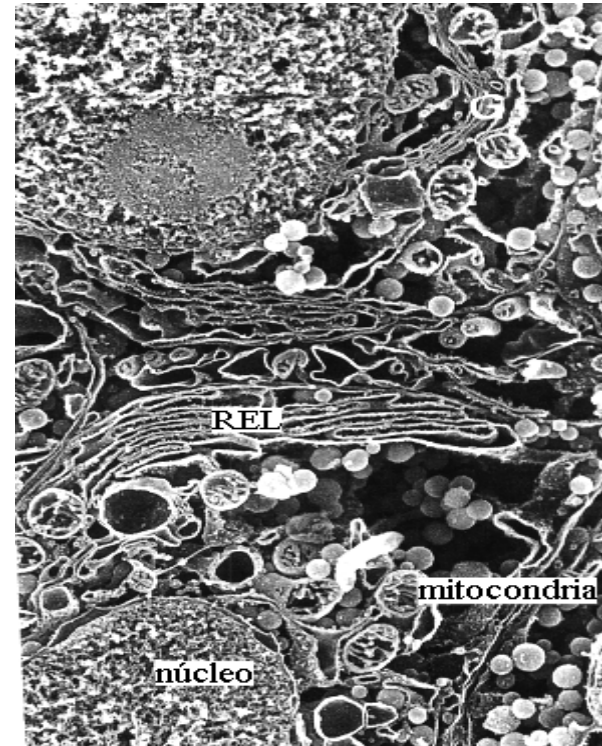
Algunos ejemplos de MET de izquierda a derecha: glóbulo blanco humano, mitocondria y estructura viral



- ME de barrido (MEB) : que tiene menor aumento que el de transmisión. Fue inventado en la década de 1980, conocido como Scan Microscope, y permite una visión más clara de las estructuras en cuanto a textura, casi como si se tratara de tres dimensiones.



A la izquierda bacilos en división, a la der. Corte transversal de una célula.



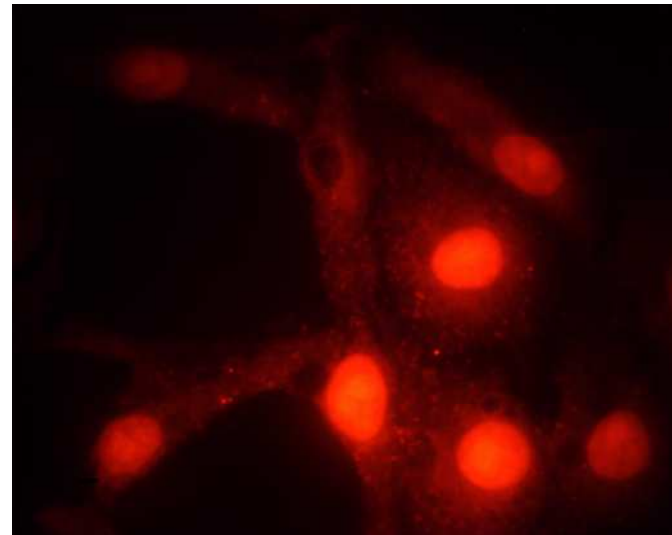
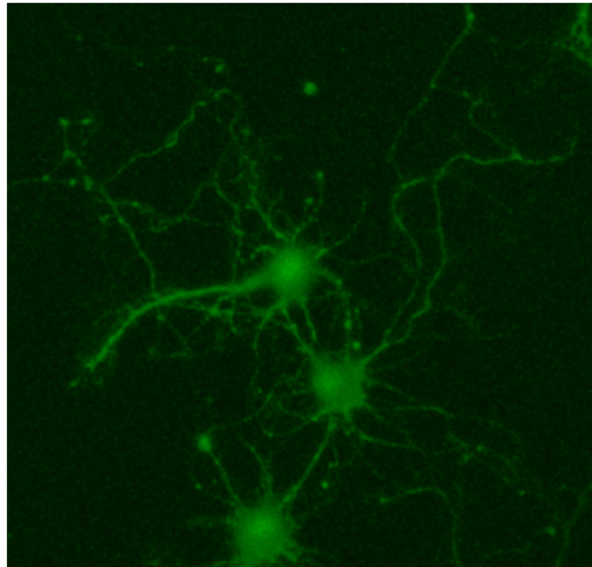
- **Microscopia de contraste de fase:** por medio del cambio de fase de luz se obtienen imágenes iluminadas y fondos oscuros. Permite el seguimiento de procesos celulares como mitosis.

Ej: A la izquierda Células de retina humanas, a la der. Componentes de la placa bacteria dental



•**Microscopia de fluorescencia:**La fluorescencia es la propiedad que tienen algunas sustancias de emitir luz propia cuando inciden sobre ellos radiaciones energéticas, por lo que pueden ser usadas para teñir estructuras específicas celulares por el uso de proteínas marcadoras de organelos.

A la izquierda neurona marcada con proteína fluorescente verde, a la derecha núcleos de células HeLa marcadas con yoduro de propidio



Ejemplos de uso habitual en la clínica:

- Microscopia de contra fase: conteo, caracterización y viabilidad de espermatozoides
- Microscopia óptica: sedimento urinario, conteo de células sanguíneas, PAP, observaciones histopatológicas, muestras microbiológicas.
- Microscopia de fluorescencia: presencia de proteínas marcadoras de patologías en biopsias.