



Universidad de la República
Facultad de Ciencias
Uruguay



**Curso Práctico de Biología Celular
MODALIDAD VIRTUAL**

Guía del estudiante

2021

Práctico 1 Modalidad virtual – Introducción a la Microscopía 1

FUNCIONAMIENTO DEL MICROSCOPIO DE LUZ, INTRODUCCIÓN A LA MICROMETRÍA. ANÁLISIS DE MEDIDAS DE LONGITUD MICROSCÓPICA

Objetivos:

- Introducción a técnicas microscópicas de uso común en Biología Celular y a herramientas básicas para el manejo de microscopios fotónicos.
- Introducción a la microscopía electrónica.

Introducción:

Desde su invención, el microscopio ha sido una herramienta de enorme importancia en el desarrollo de distintas disciplinas científicas. Si bien el uso de lentes magnificadoras para la observación de detalles en estructuras pequeñas comenzó en la antigua Roma, no fue hasta el desarrollo del microscopio de luz, durante el siglo XVII, que este instrumento fue utilizado en la biología. Una célula animal típica mide entre 10 y 20 μm de diámetro, muy por debajo del tamaño más pequeño que puede apreciar el ojo humano (100 μm). Para observar estructuras tan pequeñas y para distinguir detalles dentro de éstas, es necesario el uso de lentes magnificadoras. Una lente convexa constituye un microscopio simple, pero generalmente no logra aumentos mayores a 10 veces el tamaño real del objeto. Para obtener magnificaciones mayores se desarrolló el microscopio compuesto, el cual está constituido por un sistema de lentes que logran aumentos de más de 1000 veces el tamaño del objeto.

En el microscopio compuesto existen básicamente dos sistemas de lentes, uno ocular y otro objetivo, además de todo el sistema mecánico encargado de darle soporte. Dentro de los componentes no ópticos del microscopio se encuentran la base o pie y el brazo del microscopio, los cuales en su conjunto se denominan estativo. En la base del microscopio se localiza la fuente de luz del mismo, o el espejo responsable de dirigir la luz natural hacia la muestra. La platina constituye un soporte sobre el cual se coloca el espécimen, y posee un orificio que permite el pasaje de la luz. Asociados a esta platina existen dos tornillos que permiten el desplazamiento en el plano xy del espécimen. A ambos lados del estativo se disponen, generalmente, de forma concéntrica los tornillos de enfoque del microscopio (macrométrico y micrométrico), encargados de mover hacia arriba y abajo la platina para poner en foco el espécimen. Por encima de la platina se localiza el revólver portaobjetivo donde se encuentran las lentes objetivas de distinto aumento. La rotación del revólver coloca a cada una de las lentes en el eje óptico. Siguiendo el camino del eje óptico se encuentra el tubo donde se localizan elementos del sistema óptico.

La parte óptica propiamente dicha está constituida por el condensador, la lente objetiva y la ocular. El condensador es una lente convergente que toma los rayos de luz provenientes de la fuente y forma un cono de rayos convergentes sobre la muestra. El condensador posee un tornillo de enfoque que permite su movimiento hacia arriba y abajo para lograr una óptima iluminación del espécimen. Además, posee un diafragma o iris que regula la cantidad de luz que atraviesa el condensador y llega al espécimen, así como el ángulo del cono de luz. Las lentes oculares y objetivas son lentes convergentes, que describiremos en detalle más adelante.

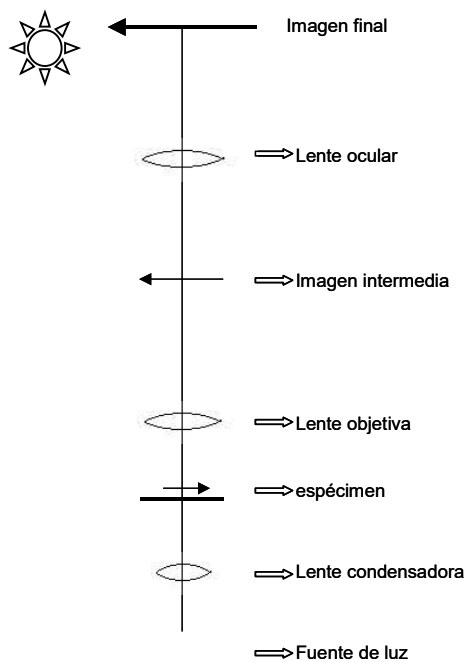


Figura 1: Esquema del funcionamiento de un microscopio compuesto. La luz proveniente de una fuente pasa a través de una lente condensadora y luego atraviesa al espécimen localizado en el soporte o platina del microscopio. La lente objetiva forma luego una imagen real (es decir que puede ser proyectada en una pantalla) intermedia que se proyecta justamente en el diafragma fijo de la lente ocular. Esta imagen es posteriormente aumentada aún más por la lente ocular generándose una imagen virtual (no puede ser proyectada en una pantalla) invertida del objeto que es percibida por el ojo como si estuviese a 2.5 cm de distancia.

Características de las lentes objetivas:

La lente objetiva está compuesta por un conjunto de lentes, de las cuales la más frontal (primera lente que atraviesan los rayos de luz en la lente objetiva) se encarga de generar una imagen magnificada del objeto. El resto de las lentes se encargan de corregir aberraciones ópticas. Las aberraciones (distorsiones) esféricas o cromáticas son inherentes al diseño de toda lente. Las aberraciones de tipo esféricas hacen que el campo se vea curvo cuando en realidad es plano. Las aberraciones cromáticas son producto de los distintos índices de refracción de las diferentes longitudes de onda que componen la luz blanca, y hacen que los objetos se vean borrosos. Las lentes objetivas que presentan correcciones para ambos tipos de aberración se denominan planapocromáticas.

La lente objetiva tiene inscripciones que indican ciertas características, tales como su aumento, apertura numérica, correcciones, etc. (figura 2). Las lentes objetivas de un microscopio, que poseen distinto poder de aumento, suelen estar diseñadas para proyectar la imagen intermedia en el mismo punto del tubo, de manera que es necesario hacer únicamente pequeñas correcciones con los tornillos de enfoque cuando se cambia de lente durante la observación. Los microscopios que poseen este tipo de lentes se denominan parafocales. Además, el centro del campo de observación es el mismo en los distintos lentes, por lo cual se denominan paracentrales.



Figura 2: Complejidad de una lente objetiva y nomenclatura estándar. (Modificado de www.olympusmicro.com)

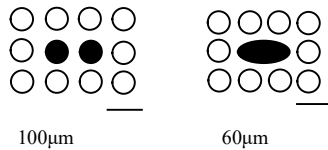
Iluminación:

Para obtener buenas imágenes es importante el uso de una correcta iluminación, utilizando tanto fuentes naturales como artificiales de luz. La iluminación debe ser brillante y uniforme en toda la muestra, lo cual se logra en los microscopios actuales utilizando el sistema de iluminación Köhler. En este sistema, una lente colectora colocada por delante de la fuente generadora de luz proyecta una imagen aumentada de la fuente de luz, cuyo foco se localiza exactamente en el diafragma o iris del condensador. Al atravesar el condensador se genera un cono de rayos de luz que iluminan de manera uniforme la muestra. El diafragma del condensador regula el ángulo del cono de luz que alcanza el espécimen. Modificando la posición del condensador con el tornillo de ajuste del condensador y variando también la apertura del diafragma iris del condensador se logra que el filamento de la fuente de luz se localice en el plano focal de la lente objetiva. Es así que se obtienen condiciones óptimas de iluminación de la muestra.

La función de un microscopio será entonces generar una imagen **aumentada** del objeto, esto es una imagen de mayor tamaño que el objeto real, y que permita apreciar los detalles del mismo, es decir que debe tener **resolución**. Generalmente a magnificaciones mayores, mayor será la resolución de la imagen, aunque esto no siempre es cierto. Es importante comprender entonces las diferencias entre aumento (tamaño de la imagen) y resolución (detalles en la imagen). Sin resolución, no importa cuán aumentada esté la imagen del objeto, esta no aportará información al observador, el aumento deja de aportar información útil para transformarse en "aumento vacío".

Límite de resolución:

El límite de resolución se define como la menor distancia que puede haber entre dos puntos para ser distinguidos como dos entidades independientes. Para el ojo humano esta distancia es de 100 μm , es decir que dos puntos que estén separados una distancia menor a 100 μm serán percibidos por el observador como un único punto.



La capacidad de distinguir (separar) detalles pequeños será entonces el poder de resolución del microscopio.

Teniendo en cuenta esta definición, el poder de resolución de un microscopio aumenta cuando la mínima distancia entre dos puntos que pueden distinguirse como dos objetos disminuye. El límite de resolución de una lente puede calcularse utilizando la ecuación de Abbe:

$$\text{Límite de Resolución} = \frac{0.61 \lambda}{A \cdot N}$$

Donde λ es la longitud de onda de trabajo, y AN es la apertura numérica, la que se calcula como:
 $AN = \eta \cdot \text{sen } \theta$.

La apertura numérica depende de dos parámetros: el ángulo de incidencia de la luz en el lente (2θ), y el índice de refracción del medio que separa el objeto de la lente objetiva (η) (figura 3). Nótese que al aumentar el ángulo de incidencia de la luz, es decir en aquellos lentes de gran apertura numérica, disminuye la distancia de trabajo, esto significa que la distancia, entre el espécimen y el extremo inferior de la lente objetiva, es muy pequeña (figura 3).

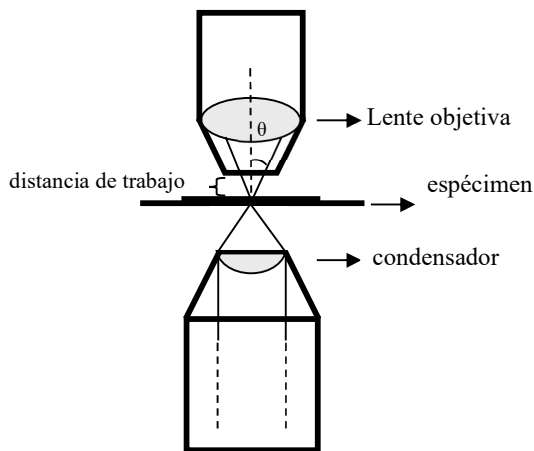


Figura 3: Apertura angular de una lente objetiva.

Considerando las ecuaciones anteriores es evidente que existen tres maneras de modificar el límite de resolución de un microscopio: variando la longitud de onda de trabajo, variando el índice de refracción, y el ángulo del cono de luz que incide sobre la muestra. Trabajando con longitudes de onda cercanas al violeta (ver apéndice), se logra el mejor poder de resolución, es decir valores de límite de resolución pequeños. Por otro lado, para modificar el ángulo del cono de luz que incide sobre la muestra puede variarse la distancia del condensador al objeto o el diseño del condensador. Para variar el índice de refracción, lo que se hace es modificar el elemento que está en contacto con el objeto y con la lente objetiva. El índice de refracción (n) del aire es 1, el del agua es 1.33 y el del aceite y vidrio es aproximadamente 1.51 (figura 4). Por tal motivo utilizando aceite entre el preparado y la lente objetiva 100x, se logra que los rayos de luz que atraviesan la muestra se desvíen poco y sean captados por la lente.

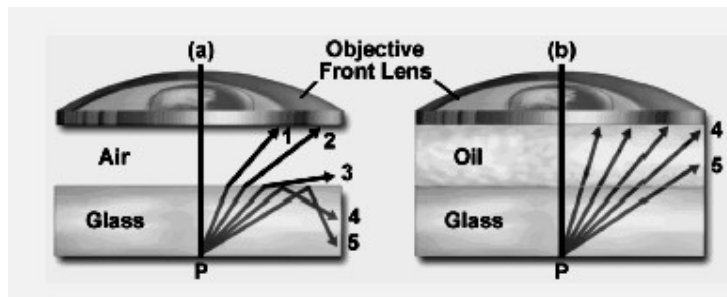


Figura 4: Principio de trabajo de lentes objetivas de inmersión en aceite. La presencia de aceite en el espacio comprendido entre el cubreobjetos y la lente objetiva, incrementa el número de rayos provenientes del espécimen que son captados por la lente objetiva. (Fuente: www.olympusmicro.com)

En algunas aplicaciones del microscopio no es necesario utilizar lentes objetivas de gran apertura numérica ya que los detalles de la muestra pueden ser apreciados utilizando lentes con aperturas numéricas más pequeñas. Esto además es importante ya que el trabajo con lentes objetivas de gran apertura numérica trae aparejado el inconveniente de la disminución de la profundidad de campo, la cual puede ser entendida como la distancia hacia arriba y abajo del plano focal real del espécimen que se encuentra en foco. Otra desventaja es que la distancia de trabajo (ver figura 3) es forzosamente menor en lentes de mayor apertura numérica (pues θ es mayor).

Tipos de microscopía de luz:

1) Microscopía de campo claro:

En este tipo de microscopía la imagen es obtenida por simple transmisión de la luz a través del preparado. Como la luz debe atravesar la muestra, esta puede ser un aplastado, un dispersado o un corte muy delgado del espécimen. Si las muestras no poseen contraste, el mismo se genera mediante la tinción del espécimen, utilizando colorantes que poseen afinidad por distintos elementos celulares. El procedimiento para obtener preparados histológicos implica una serie de etapas que se detallan a continuación.

a) Fijación: Tiene por objetivo conservar la estructura celular o tisular de manera que ésta mantenga una estructura lo más similar posible a la estructura *in vivo*. Se utilizan para esto medios físicos (congelación, calor, desecación) o químicos. Los fijadores químicos son moléculas pequeñas que penetran rápidamente en la muestra estabilizando las moléculas que componen la muestra y evitando alteraciones en el preparado y la retracción del tejido. Además, la fijación permeabiliza las células para permitir la entrada del colorante. Ejemplos de fijadores son el formaldehído, alcohol, glutaraldehído, etc.

b) Inclusión: Muchas muestras son demasiado gruesas como para examinarlas directamente, por lo cual deben realizarse cortes finos (5-10 μm). Para realizar dichos cortes las muestras son embebidas en un medio de soporte que les otorgue consistencia permitiendo una sencilla manipulación del material. Generalmente se utilizan ceras o resinas – por ejemplo, parafina - que en su estado líquido rodean y penetran en los intersticios de la muestra, y luego por enfriado o polimerización pueden ser transformados en un bloque rígido.

c) Corte: Se utiliza un aparato denominado micrótopo que posee una cuchilla muy afilada y un sistema de avance micrométrico de la muestra. Los cortes se colocan sobre un portaobjetos para su posterior tinción.

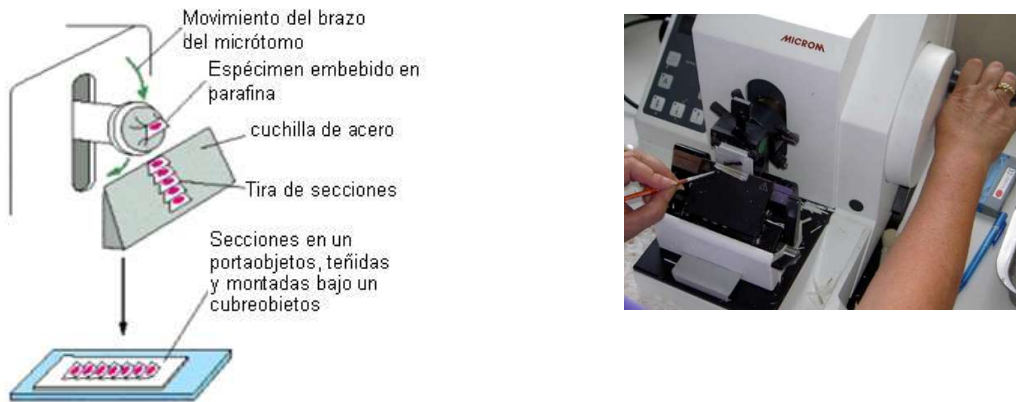


Figura 5. Esquema de un micrótopo. Una porción de tejido embebido en parafina es seccionada con una cuchilla de acero para luego teñir y observar al microscopio óptico. (Fuente: Alberts y cols., Molecular Biology of the Cell, 2004)

d) Tinción: Existe una gran cantidad de colorantes que muestran distinta afinidad por elementos particulares de la célula. Entre los más usados se encuentran la hematoxilina y la eosina. El primero de ellos tiñe de violeta estructuras celulares aniónicas como el ADN, ARN y algunas proteínas. Por su parte la eosina tiñe de rosado estructuras catiónicas como ciertas proteínas, por lo cual constituyen un buen par para realizar tinciones generales.

2) **Microscopía de contraste de fases:**

Los especímenes biológicos son generalmente transparentes, es decir que el contraste de la muestra es tan bajo que, independientemente del aumento o del poder de resolución del microscopio, el objeto es prácticamente invisible. Entonces, cuando es necesario mantener inalterada la muestra, sin teñirla, se recurre a técnicas que permiten incrementar el contraste natural. Este contraste se genera al transformar diferencias en el retardo del pasaje de la luz a través de la muestra, en diferencias en intensidad de luz que puedan ser captadas por el ojo humano o la cámara fotográfica. Los especímenes biológicos interactúan con la luz de una forma que no es uniforme, ya que retardan el pasaje de la misma de manera variable dependiendo de la estructura celular que se interponga en su camino. Este retardo dependerá

del índice de refracción o grosor de la estructura celular generándose un retardo que generalmente es de $1/4 \lambda$. El microscopio de contraste de fases está diseñado entonces, para generar contraste en los especímenes biológicos transformando las diferencias de desfase de las ondas en diferencias de amplitud (intensidad) que sean apreciables. El sistema posee un mecanismo constituido por un disco opaco con un anillo transparente que se inserta en el condensador del microscopio. Existe un anillo complementario en la lente objetiva, que tiene como función separar los rayos que atravesaron la muestra, de los que no lo hicieron. Casi toda la luz que atraviesa el anillo transparente en el condensador, pero no atraviesa la muestra, pasa luego por el anillo del objetivo. La luz que atraviesa la muestra será retrasada y no atravesará el anillo de la lente objetiva en ese plano.

El microscopio transforma el desfase de $1/4\lambda$ en uno de $1/2\lambda$. Al existir dicho desfase entre las ondas que atraviesan la muestra y las que no, éstas pueden interferir con las ondas que no son retrasadas por la muestra, de manera destructiva (desfase de $1/2\lambda$) generando oscuridad, o constructiva (desfase de λ) generando zonas brillantes (Figura 6).

Este tipo de microscopía es la elegida para seguir el transcurso de ciertos procesos biológicos ya que permite la observación de células vivas y no es necesario fijar y teñir la muestra para generar contraste.

3) Microscopía de contraste interferencial de Nomarski (DIC):

El fundamento es similar al de contraste de fases, pero reduce al mínimo los artefactos ópticos que ésta posee y aumenta la resolución. Separa por completo la luz directa de la difractada utilizando prismas y transmisión de luz a través de vías complicadas. No se observan halos brillantes donde hay cambios bruscos del índice de refracción de la luz, pero sí se genera un falso volumen de las muestras (Figura 5).

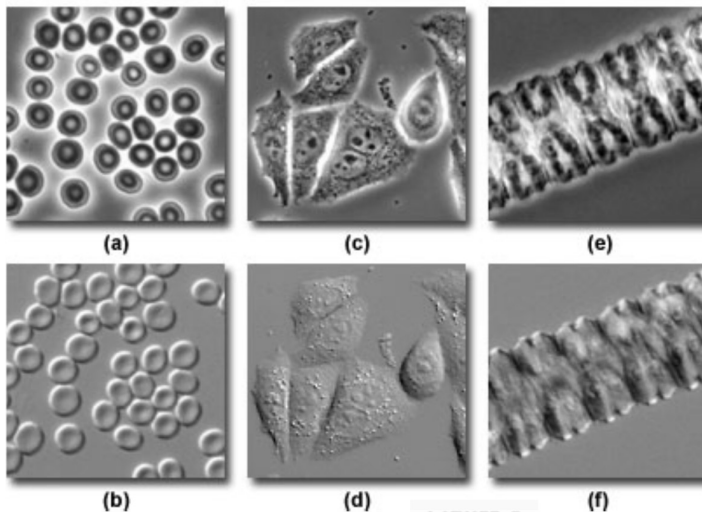


Figura 6: Observación de distintos especímenes biológicos utilizando microscopía óptica de contraste de fases (a, c, e) y microscopía de contraste interferencial (DIC) (b, d, f).
(de <http://www.olympusmicro.com>)

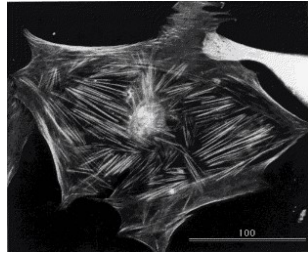
4) Microscopía de epifluorescencia:

Algunas moléculas o átomos son capaces de absorber energía, pasando de un estado basal a uno excitado o energizado, y rápidamente volver a un estado basal mediante la emisión de luz o calor. Cuando el decaimiento ocurre mediante la emisión de luz, el fenómeno se denomina fluorescencia. Las moléculas que exhiben este comportamiento son denominadas fluorocromos, y cada uno es capaz de excitarse a una determinada longitud de onda y emitir a otra longitud de onda distinta y mayor a la de excitación. Estas moléculas se utilizan en microscopía de fluorescencia para marcar ciertas estructuras celulares destacándolas del resto de los elementos que componen la célula. Esto permite identificar distintas moléculas o conjuntos de moléculas. El fluorocromo puede tener afinidad por distintos elementos celulares, o puede ser acoplado

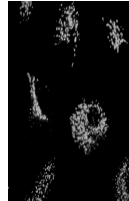
químicamente a otras moléculas como anticuerpos que reconocen específicamente cierto componente celular.

En el microscopio de epifluorescencia, la luz accede a la muestra desde la parte superior y no la atraviesa, al mismo tiempo se colecta la luz emitida por la muestra utilizando la misma lente. El microscopio cuenta con una lámpara de mercurio o xenón que emite distintas longitudes de onda que atraviesan una serie de lentes colectoras y un diafragma, hasta que alcanza un espejo que desvía la luz en sentido vertical hacia la lente objetiva y atravesando ésta hacia la muestra. Antes de llegar a la muestra la luz atraviesa un filtro que selecciona la longitud de onda de excitación dependiendo del fluorocromo que se esté utilizando. La luz emitida por la muestra es captada por la lente objetiva y luego de atravesar un sistema de filtros que impide el paso de la luz de excitación reflejada pero sí la emitida por la muestra, llega a la lente ocular (figura 7).

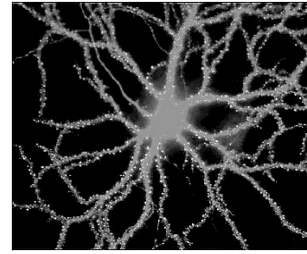
(a)



filamentos de actina



aparato de golgi



proteína de membrana neuronal

(b)

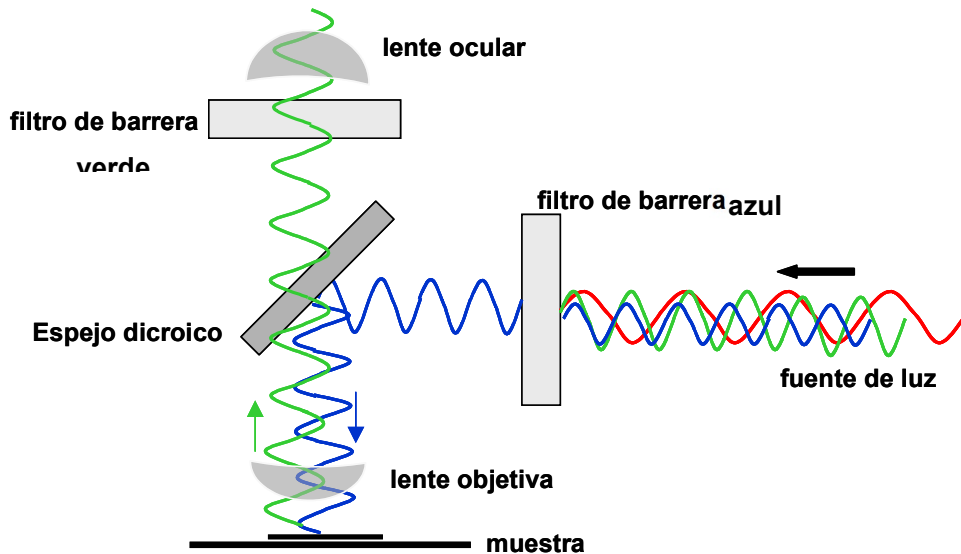


Figura 7: Imágenes de distintos elementos celulares obtenidas con epifluorescencia (a). Esquema del sistema óptico de un microscopio de epifluorescencia. La selección del juego de filtros se realiza en cada caso de acuerdo a las características espectrales del fluorocromo de elección (b).

5) **Microscopía de barrido de láser confocal:**

El principio de este tipo de microscopía es el mismo al descrito en la sección anterior, pero tiene como principal ventaja la eliminación de la señal fuera de foco. Se utiliza un láser que ilumina la muestra a diferentes alturas, generando secciones ópticas de la muestra. Además se reduce la pérdida de fluorescencia por fotooxidación debido a que la intensidad del láser puede ser regulada. Un láser escanea la superficie del preparado en el plano xy para cada plano z. Luego la señal es captada por un fotomultiplicador y digitalizada. Mediante una computadora se puede realizar el análisis y procesamiento posterior de la imagen utilizando un software especial (Figura 7). Las imágenes obtenidas para cada plano z de la muestra, pueden ser luego agrupadas para realizar reconstrucciones tridimensionales del preparado.

Un componente fundamental del microscopio láser confocal es el *pinhole*, una apertura localizada por delante del fotomultiplicador que evita el pasaje de fluorescencia de distintas regiones de la muestra que no están en foco; la luz proveniente de regiones localizadas por encima o por debajo del plano focal no converge en el pinhole y por lo tanto no será detectada por el fotomultiplicador (Figura 8).

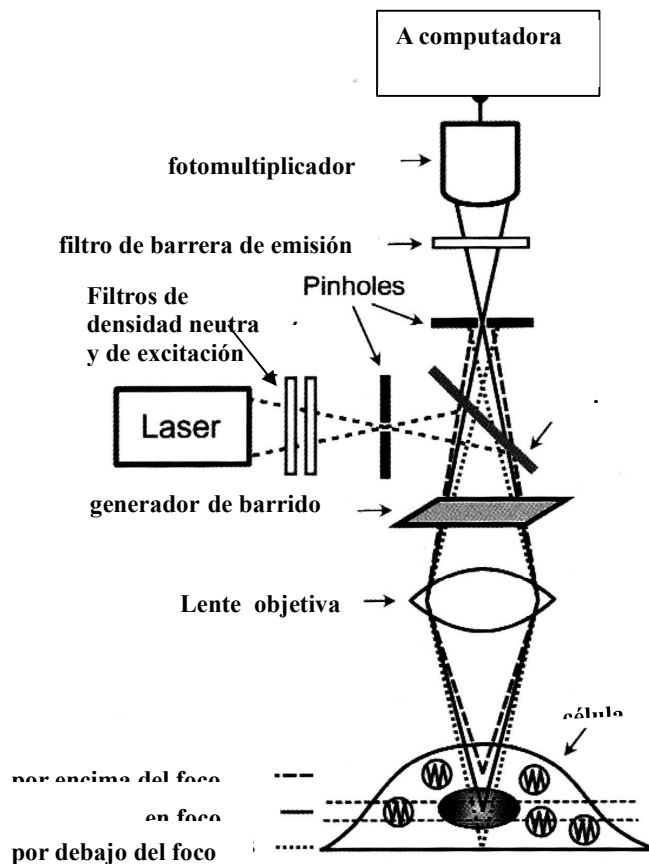


Figura 8: Esquema de microscopio laser confocal

Utilizando microscopía de epifluorescencia o láser confocal: ¿mediante qué aproximaciones experimentales es posible identificar una proteína de interés? ¿y un lípido?

APENDICE 1: Procedimiento para el uso correcto del microscopio de luz

¡ATENCIÓN!

Use los tornillos macro y micrométricos moviéndolos lentamente.

¡La rotura de cubreobjetos puede ser extremadamente perjudicial para la lente frontal del objetivo, pudiendo dañarla en forma irrecuperable!

Si desplaza un microscopio hágalo manteniendo siempre el instrumento en posición vertical, tomándolo del brazo y levantándolo, NUNCA lo arrastre sobre una superficie para moverlo (la vibración provocada afloja y desajusta las lentes).

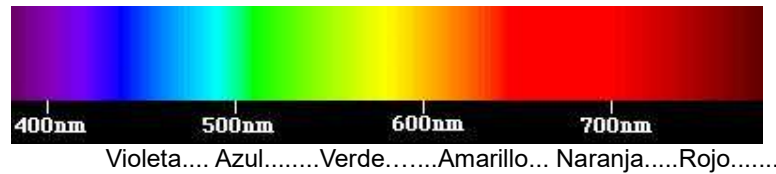
- 1** - Coloque el preparado en la platina, verificando que el cubreobjetos quede hacia arriba y que el material quede centrado en el orificio de la platina.
- 2** - Encienda la fuente de luz y ajuste el voltaje de la lámpara.
- 3** - Abra el diafragma iris del condensador al máximo.
- 4** - Suba el condensador hasta la posición máxima.
- 5** - Verifique que el material en el preparado está iluminado. En los microscopios que no tienen luz incorporada: mueva el espejo, controlando desde el exterior, hasta que la luz incida sobre el material en la platina.
- 6** - Coloque el objetivo de menor aumento en el eje óptico del instrumento.
- 7** - Observando desde el exterior y utilizando el macrométrico, acerque el objeto hasta el tope superior de la platina.
- 8** - Observando por el ocular baje la platina lentamente con el macrométrico hasta obtener una imagen nítida. Corrija el foco con el micrométrico.
- 9** - Corrija la iluminación, bajando el condensador y cerrando el diafragma iris hasta obtener el máximo de contraste en un campo uniformemente iluminado.
- 10** - Para pasar a un objetivo de mayor aumento, verifique primero si los objetivos son parafocales.
 - a) Objetivos parafocales: Coloque el objetivo de mayor aumento en el eje óptico. Corrija el foco con el micrométrico.
 - b) Objetivo no parafocal: Baje la platina con el macrométrico. Coloque el objetivo de mayor aumento en el eje óptico. Observando desde el exterior acerque el objetivo hasta un milímetro del cubreobjeto. Observe por el ocular y repita el paso 8.
- 11** - Corrija la iluminación, subiendo el condensador y modificando el diafragma iris hasta obtener condiciones de iluminación como en el paso 9.
- 12** - Para pasar a otros aumentos superiores repita los pasos 10 y 11. Para acercar el objetivo al cubreobjetos tenga en cuenta la distancia de trabajo de ese objetivo, (los valores de esa distancia están en la tabla del apéndice de este protocolo). El ayudante le dará instrucciones especiales para el enfoque e iluminación con el objetivo de inmersión.

Al terminar de trabajar, **verifique:**

- **que la platina esté seca y bájela hasta el tope.**
- **que no queda un preparado en ella.**
- **que la intensidad de la luz fue bajada al mínimo y luego apague la fuente de luz.**
- **que el tubo queda en posición vertical en los microscopios de ángulo vertical.**
- **que la lente objetiva que quedó en posición sea la de menor aumento.**
- **que el tornillo de ajuste del cabezal de los oculares esté ajustado y los oculares firmes.**

APÉNDICE 2:

Longitudes de onda (nm) en la región visible del espectro electromagnético.



Nombres y símbolos de los factores colocados delante de las unidades.

Factor	Prefijo	Símbolo
10 ⁻¹	deci	(d)
10 ⁻²	centi	(c)
10 ⁻³	mili	(m)
10 ⁻⁶	micro	(μ)
10 ⁻⁹	nano	(n)
10 ⁻¹²	pico	(p)
10 ⁻¹⁵	femto	(f)

Características de algunos objetivos plan-acromáticos

(los utilizados en clase pueden tener especificaciones diferentes)

Aumentos	Distancia de Trabajo (mm)
4x	13.80
10x	7.10
20x	1.40
40x	0.48
60x	0.43
100x(aceite)	0.20

Promedio = \bar{X}

$$\sum_{i=1}^n \frac{X_i}{n}$$

Desvío Estándar =

$$\sqrt{\sum_{i=1}^n \frac{(X_i - \bar{X})^2}{n - 1}}$$

X_i = valores obtenidos, n = número de casos

Microscopía electrónica

Los componentes estructurales de las células pueden observarse con alta resolución mediante microscopía electrónica. El microscopio electrónico resulta una herramienta indispensable a la hora de entender el contexto en el cual ocurren los procesos celulares y subcelulares. En este contexto, se denomina ultraestructura a las estructuras que son visualizadas con gran aumento y resolución, mediante microscopía electrónica.

Al estudiar los fundamentos de la microscopía óptica, expresamos el límite de resolución mediante la ecuación de Abbe ($LR = 0.61\lambda/AN$). De la misma se deduce que disminuyendo la longitud de onda se logra mejorar el límite de resolución de un microscopio. Una forma de lograr esto es utilizando un haz de electrones en lugar de luz como fuente de radiación. La longitud de onda de un haz de electrones dependerá de la velocidad de los mismos, lo que se describe mediante la ecuación de De Broglie: $\lambda = h/m_0v$, siendo h la constante de Planck y m_0 la masa del electrón. A medida que la velocidad de los electrones aumenta, disminuye su longitud de onda. En un microscopio electrónico, un haz de electrones es acelerado en condiciones de vacío mediante diferencias de potencial que van desde 10.000 a 100.000 voltios. Por ejemplo, a 60.000 voltios, la longitud de onda del haz de electrones será de 0.005 nm y el límite de resolución será de 0.003 nm, lo cual se localiza en la escala atómica. Este límite de resolución es sin embargo inalcanzable ya que las aberraciones esféricas de las lentes obligan a disminuir la apertura numérica de las mismas, por lo cual el límite de resolución real se encuentra entre 0.1-0.5 nm.

Existen básicamente dos tipos de microscopios electrónicos: en los **microscopios electrónicos de transmisión (MET)** se obtiene una imagen de los electrones “transmitidos” a través de la muestra, mientras que en los **microscopios electrónicos de barrido (MEB)** se genera la imagen correspondiente a los electrones que rebotan en la muestra, más la de los electrones secundarios emitidos por ella (arrancados al impactar el haz de electrones del microscopio) (Figuras 1 y 2).

En particular, el **MET** consta básicamente de una columna hueca en cuyo extremo superior se localiza un filamento de tungsteno que actúa como fuente de electrones. El haz de electrones generado es enfocado por una serie de electroimanes que actúan como lentes condensadoras y objetivas. La muestra se coloca en un soporte que se introduce en el trayecto del haz de electrones. Si estos no se encuentran con materia durante su trayectoria, no serán dispersados y llegarán a impactar en una pantalla en la parte inferior de la columna, observándose una estructura brillante (electrón-lúcida). Si en cambio, los electrones chocan con alguna estructura durante su trayectoria, serán dispersados, no impactarán en la pantalla y se observará una estructura oscura (electrón-densa).

La dispersión de electrones al entrar en contacto con la muestra, dependerá de su estructura (densidad atómica de sus componentes y número de átomos por unidad de área). Dado que los átomos que componen la materia orgánica son en su mayoría de peso atómico bajo (C, H, O, N, etc.), el material biológico posee poca capacidad de dispersión de electrones. Por este motivo las muestras deben ser preparadas de formas especiales. En general, para el análisis mediante MET, las muestras deben ser impregnadas con sales de metales pesados, lo que genera diferentes grados de contraste en diferentes componentes subcelulares.

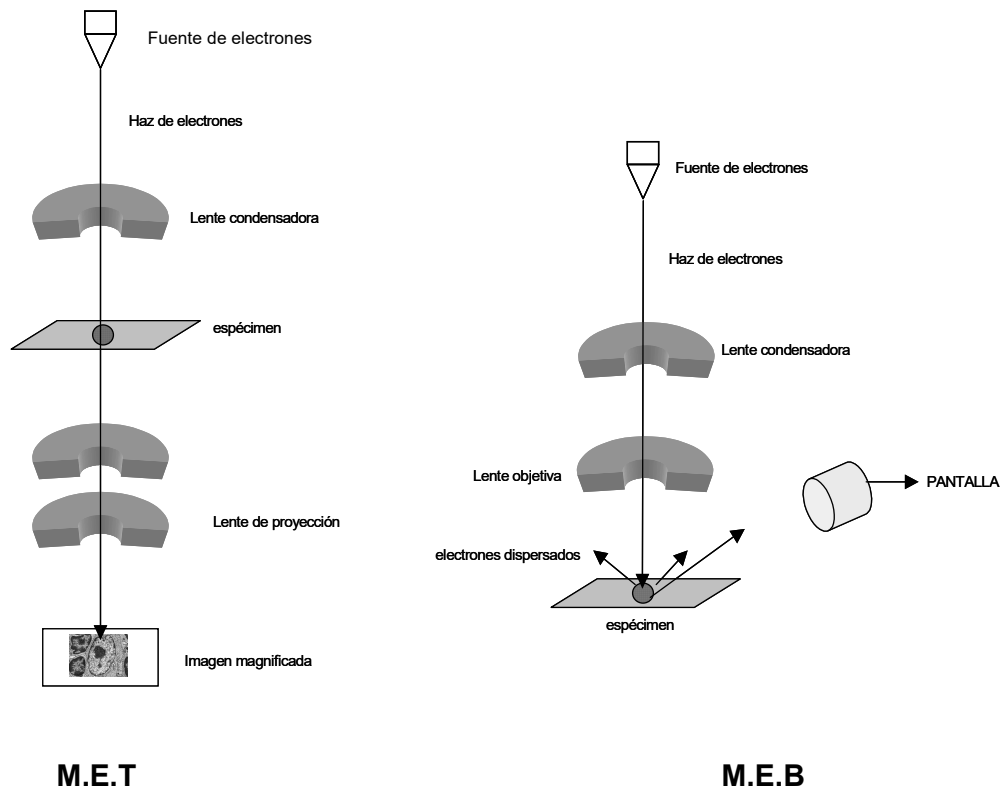


Figura 1: Diagrama esquemático de funcionamiento de microscopios electrónicos de transmisión (M.E.T) y de barrido (M.E.B).



Figura 2: Microscopios electrónicos de transmisión (izquierda) y de barrido (derecha)

Principales estrategias metodológicas para la preparación y observación de material al microscopio electrónico:

La metodología escogida para preparar las muestras, va a depender del tipo de material y del tipo de información que busquemos obtener.

Técnica de preparación de la muestra de rutina (MET)

- Fijación: paraformaldehído, glutaraldehído, tetróxido de osmio, ácido tánico.
- Inclusión: resinas de distinta naturaleza (araldita, epon, LR White, Spurr)
- Secciones ultrafinas: 40 – 70 nm.
- Contraste con sales metálicas pesadas: acetato de uranilo, citrato de plomo.

Aplicación: visualización de estructuras biológicas subcelulares.

Técnica de inmunomarcación (MET)

- Emplea anticuerpos unidos a partículas de oro coloidal (de 2 a 150 nm) como método de localización al MET. Este procedimiento puede realizarse previo a la inclusión del material en una resina (generalmente hidrofílica como el LRW), o luego de realizar las secciones ultrafinas (post-inclusión), dependiendo del protocolo a seguir.

Aplicación: localización de moléculas.

Técnica de tinción negativa (MET)

- Esparcido de partículas (fijadas o no) sobre un film de soporte.
- Sombreado con sales metálicas pesadas: acetato de uranilo, citrato de plomo, ácido fosfotúngstico.

Aplicación: visualización de microorganismos (bacterias y virus), de macromoléculas, de complejos macromoleculares o de nanopartículas de materiales inertes.

Técnica de sombreado rotativo con metales (MET)

- Sembrado de micro partículas sobre un film de soporte.
- Sombreado con oro, oro-paladio y otras aleaciones evaporadas sobre la preparación.

Aplicación: visualización de macromoléculas aisladas (ADN o proteínas), complejos macromoleculares y microorganismos.

Técnica de criofractura (MET)

- Fijación del material (en frío o no).
- Fractura de la muestra en un ambiente con alto vacío y en frío.
- Evaporación de platino-carbón o tungsteno-tántalo para construcción de una réplica de la superficie.
- Digestión de la muestra biológica con ácido (crómico o sulfúrico).

Aplicación: visualización de estructuras internas de las células y su organización tridimensional.

Técnica de criograbado profundo (MET)

- Fijación del material (en frío o no).
- Fractura de la muestra en un ambiente con alto vacío y en frío.
- Sublimación del hielo.
- Evaporación de platino-carbón o tungsteno-tántalo para construcción de la réplica. Digestión de la muestra biológica con ácido (crómico o sulfúrico).

Aplicación: visualización de elementos no solubles (del interior celular).

Técnica de rutina para Microscopía Electrónica de Barrido (MEB)

Para el análisis mediante MEB, las muestras son recubiertas por una capa de metal pesado, por lo cual se obtendrá información de la superficie de las mismas.

- Fijación: paraformaldehído, glutaraldehído, tetróxido de osmio, ácido tánico.
 - Deshidratación y secado de punto crítico con CO₂.
 - Evaporación de metales sobre la superficie de la muestra (oro, oro-paladio, platino o tungsteno).
- Aplicación: Análisis de la superficie de muestras biológicas completas o porciones de las mismas. Este tipo de microscopio permite, además, la visualización de determinados materiales sin necesidad de procesamiento previo.