

MICROSCOPIA

Presentación:

El microscopio es un instrumento que permite observar objetos no perceptibles a simple vista. Esto se logra mediante un sistema óptico compuesto por lentes, que forman y amplifican la imagen del objeto en observación. El término, surge en el siglo XVII y deriva de las palabras griegas *mikrós* (pequeño) y *skopéoo* (observar).

Según el número y la posición de las lentes se distinguen dos tipos de microscopios ópticos:

- Microscopio simple: comúnmente llamado lupa. Está constituido por una lente, o un sistema de lentes que actúan como si fuera una lente simple.

- Microscopio compuesto: está constituido por la combinación de dos sistemas de lentes convergentes: uno, próximo al ojo del observador, el ocular, y otro próximo al objeto, denominado objetivo.

El uso de las lupas se remonta a la civilización asiria, habiéndose encontrado en las ruinas de Nínive cristales de rocas tallados en forma de lentes plano-convexas (Figura 1)



Figura 1: Primera lente de la que se tiene conocimiento en la historia de la humanidad. Se trata de una lente plano convexa de cristal de roca tallada toscamente, encontrada en las excavaciones de Nínive por el arqueólogo británico Sir Austin Henry Layard en 1847.

Sin embargo, el verdadero impulsor de la microscopía fue el holandés Antón van Leeuwenhoek (1632-1723) [Figura 2]. Construía microscopios simples con lentes convexas que él mismo pulía, con las que realizó diversas observaciones. Estudió la composición de la sangre, observó protozoos, y descubrió las bacterias

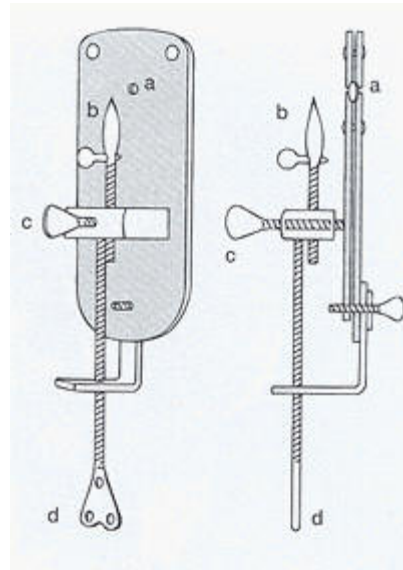


Figura 2: A la izquierda, un retrato de Antón van Leeuwenhoek (1632-1723). A la derecha, un esquema del microscopio de Leeuwenhoek: a) posición de la lente, b) punta de soporte del objeto a ser observado, c y d) tornillos de regulación.

El primer microscopio compuesto fue construido en 1590 por el holandés Zacarías Hanssen, hijo de un tallador de cristales. Unos años después el italiano Galileo Galilei también desarrolló microscopios compuestos muy interesantes (Figura 3).

A principios del siglo XVII el microscopio sufre importantes modificaciones, no sólo en lo que concierne a la óptica, sino también en lo que se refiere a la mecánica. Entre ellos se destacan los contruidos por Robert Hook, con los que logra observar por primera vez células en preparados de corcho. También fueron importantes los aportes de Bonnani (1691), Joblot (1776), Cuff- Baker (1744), entre otros.

Todos estos aparatos, a pesar de lograr buenas amplificaciones, daban imágenes muy defectuosas a causa de las aberraciones cromáticas y esféricas y así muchos investigadores volvieron al microscopio simple.

Estas aberraciones fueron corregidas gracias a la incorporación del objetivo apocromático, por parte del óptico londinense Dolland. Este objetivo consiste en dos lentes superpuestas, una convergente, y otra divergente. Desde esa época, hasta nuestros días, el microscopio compuesto no ha cesado de perfeccionarse, incorporándose nuevos accesorios como el revólver portaobjetivos, la visión binocular, etc.



Figura 3: A la izquierda: Microscopio compuesto realizado por los hermanos Juan y Zacharias Janssen en 1590, en Midelburg, Holanda. Está formado por dos tubos de latón, soportando una lente cada uno, que se deslizan dentro de otro tubo de latón lo que permite el enfoque. Se considera el primer microscopio compuesto de la historia. A la derecha: Microscopio compuesto de Galileo Galilei, 1612. Posee dos lentes instaladas en dos cilindros de madera que se deslizan sobre uno exterior de cartón, forrado de cuero verde, permitiendo el enfoque. El acabado, con tapadera incluida, es de un marcado carácter renacentista italiano.

El microscopio compuesto consta de dos partes (Figura 4):

1. Parte mecánica: tiene la finalidad de sostener la preparación a examinar y soportar todo el sistema óptico del microscopio. Consta de:

1.1. Pie: soporta al resto del microscopio, en los microscopios antiguos posee forma de herradura y está constituido por una estructura metálica, pesada.

1.2. Platina: es la estructura que sostiene al preparado que se desea observar. Posee en el centro un orificio circular que permite el pasaje de los rayos que van a iluminar al preparado. Puede ser fija o móvil; en este último caso el movimiento horizontal es producido por un par de tornillos laterales. Esto posibilita recorrer al preparado en todas direcciones.

1.3. Tubo: en él está instalado el sistema óptico. Actualmente son corrientes los aparatos binoculares (dos oculares) que facilitan la visión con los dos ojos y los revólveres portaobjetivos, con los cuales se pueden cambiar los objetivos instantáneamente, sin desenfocar la preparación. El enfoque se hace mediante unos tornillos llamados macrométricos y micrométricos, que permiten desplazamientos verticales groseros y finos, respectivamente.

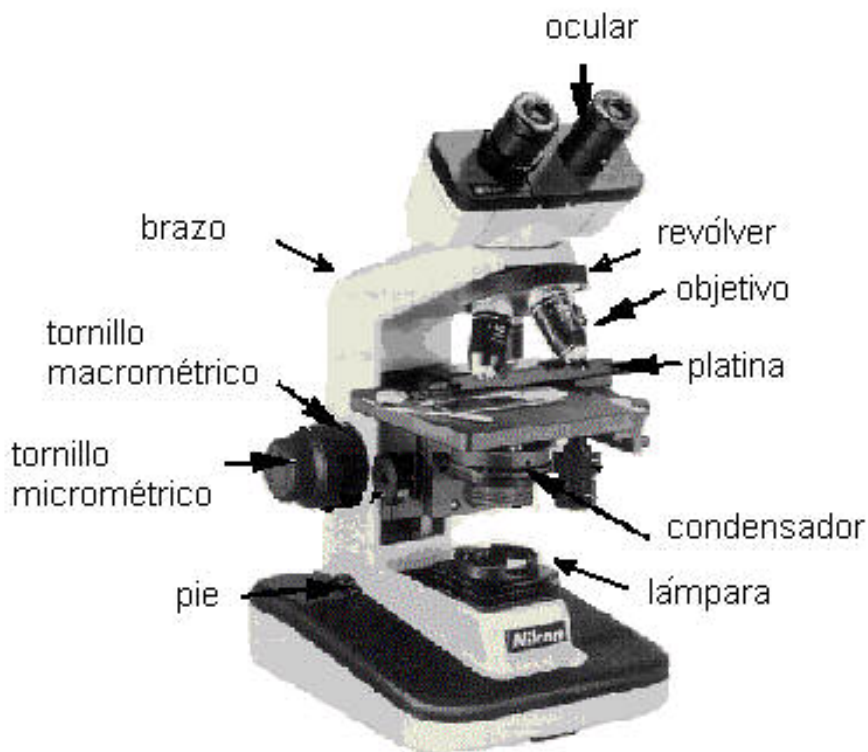


Figura 4: Partes del microscopio óptico.

2. Parte óptica: Está formada por dos sistemas de lentes convergentes centradas sobre un eje óptico común, denominados objetivo y ocular, y por el sistema de iluminación, que facilita y mejora la observación microscópica.

2.1. Objetivos: Se insertan en el revólver del microscopio y se distinguen dos tipos:

2.1.1. **Objetivos en seco**: En éstos, el aire se interpone entre la lente y el preparado. Los objetivos más comúnmente utilizados son de 4, 10, y 40 x.

2.1.2. **Objetivos de inmersión**: Se distinguen de los anteriores porque entre la lente y el preparado se debe interponer un medio transparente con un índice de refracción (n) superior al del aire ($n = 1$), y semejante al del vidrio ($n = 1,5$). El medio utilizado es un aceite de inmersión, como por ejemplo el aceite de cedro. Son aptos para la observación de bacterias, finas estructuras etc.

2.2. Ocular: Permite observar la imagen del objeto formada por el objetivo, actuando como una lupa. Está compuesta por dos lentes: la *inferior* o colectora, y la *superior*, o lente ocular.

2.3. Sistema de iluminación:

Situado debajo de la platina, está formado por:

2.3.1. Lámpara ó espejo de iluminación.

2.3.2. Condensador: Posee la función de concentrar sobre el preparado los rayos luminosos procedentes de la fuente de luz.

2.3.3. Diafragma: Situado debajo del condensador, sirve para graduar la cantidad de luz que llega al objeto.

2.3.4. Filtros de luz: Son placas de vidrios, coloreadas, que dejan pasar las radiaciones de longitud de onda deseadas, absorbiendo las restantes.

En la Figura 5, se representa la formación de la imagen en el microscopio compuesto. Puede apreciarse que el objeto (preparado) está situado, con respecto al objetivo, entre el foco y la doble distancia focal. Por lo tanto, el objetivo formará una imagen real, invertida, y muy aumentada con respecto al objeto. Esta imagen a su vez actúa como objeto frente al ocular, encontrándose entre el foco y la lente de este sistema. Por lo tanto, el ocular forma una imagen virtual, derecha y muy aumentada, de modo que llega al ojo del observador invertida con respecto al objeto, virtual, y muy aumentada.

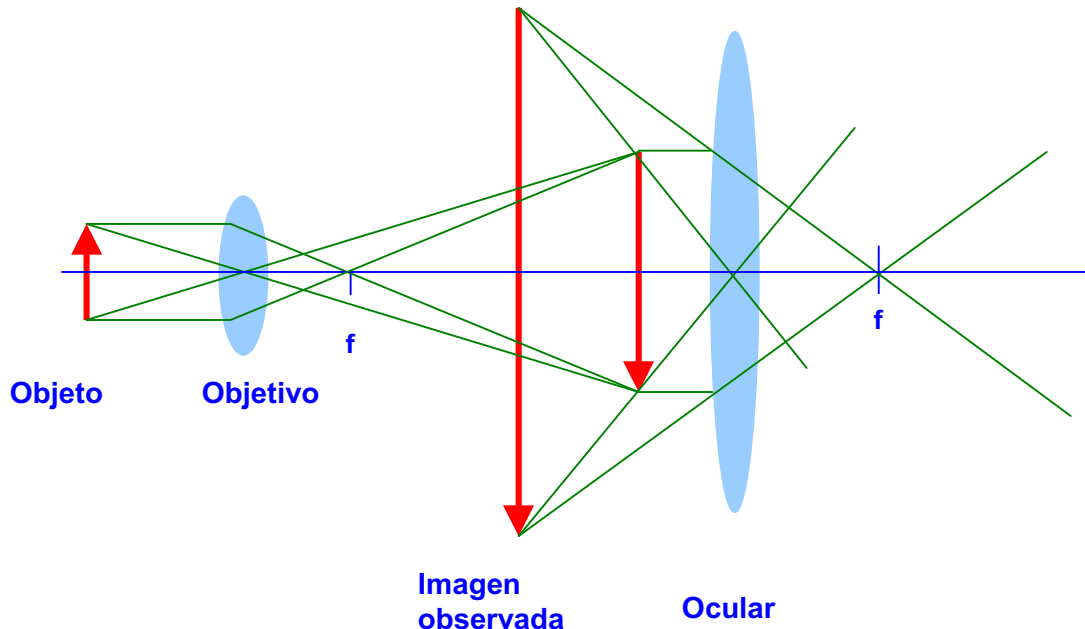


Figura 5: Formación de la imagen en el microscopio compuesto.

Capacidad de ampliación y poder de resolución de los instrumentos ópticos:

Dos características determinan la claridad con que puede ser visto un objeto. Una de ellas es la **capacidad de ampliación** del instrumento, que es la relación del tamaño de la imagen vista con el microscopio y el tamaño real del objeto. Los mejores microscopios ópticos permiten una ampliación no mayor de 1.000 -1200 veces, mientras que un microscopio electrónico puede elevarla hasta 250.000 veces o más. La otra característica, es el **poder de resolución** o posibilidad de observar detalles finos. Es la capacidad del instrumento para dar imágenes distintas de dos puntos situados muy cerca uno del otro. El **límite de resolución (E)** se define como la mínima distancia a la cual dos puntos pueden distinguirse como tales y no como un punto borroso. Está dado por la siguiente ecuación:

$$E = \lambda / AN$$

Dónde:

λ : Longitud de onda de la luz

AN: Apertura numérica del objetivo, que a su vez está dada por la expresión:

$$AN = n \cdot \text{sen } \theta$$

Dónde:

n: índice de refracción del medio (en el caso del aire $n=1$).

θ : semiángulo ($\frac{1}{2} \theta$) de la abertura del cono luminoso que entra a la lente frontal del objetivo (Figura 6).

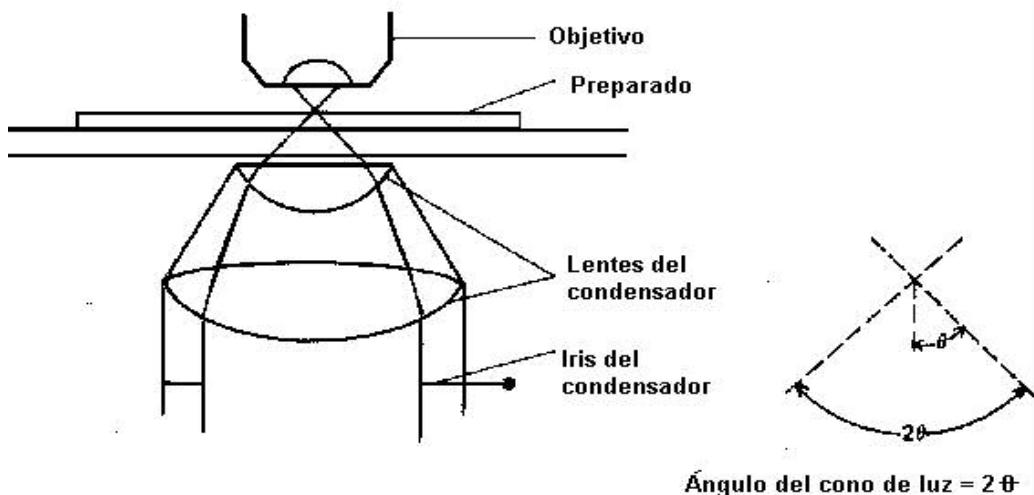


Figura 6: Esquema ilustrativo del cono que incide sobre el objetivo.

Es importante recordar que el límite de resolución es la inversa del poder de resolución, de modo que cuanto mayor sea este, menor será el límite de resolución.

Puesto que el $\text{sen } \theta$ no puede ser mayor de 1, y que el índice de refracción de los mejores materiales ópticos no puede ser superior a 1,6, usando aceite de inmersión, la máxima AN de las lentes es de aproximadamente 1,4. De este modo, usando luz blanca el poder de resolución es de $250 \text{ nm} = 0,25 \text{ }\mu\text{m}$.

A medida que aumenta la apertura numérica de los objetivos, E disminuye, y aumenta la posibilidad de ver un mayor número de trazos en 1 mm del objeto observado (Tabla 1).

Tabla 1: Relación existente entre la apertura numérica (AN), el límite del poder de resolución (E) y el número de trazos observables en 1 mm de objeto, para objetivos a seco y de inmersión.

Tipo de objetivo	AN= n. sen θ	E = λ /AN	Número de trazos observables en 1 mm
Seco	0,1	5,50	180
	0,3	1,84	550
	0,6	0,92	1.100
De inmersión	0,9	0,62	1.650
	1,2	0,46	2.000
	1,4	0,38	2.500

Cuidado del microscopio:

El microscopio es un valioso instrumento. Para que pueda servir eficazmente año tras año, es necesario que se le dispense el cuidado adecuado. Por este motivo, recuerde las siguientes indicaciones:

- Evite mover el microscopio cuando la lámpara esté encendida, ya que el filamento de la lámpara incandescente es extremadamente sensible.
- Para desplazarlo a distancia, emplee los correspondientes tornillos de fijación.
- No toque las lentes de oculares y objetivos con los dedos, para evitar mancharlos con su grasitud natural
- No cambie de lugar su microscopio, ni las lentes.
- Luego de usar el microscopio, límpielo con un paño de lino, libre de polvo, o con algodón hidrófilo. Verifique que no hayan quedado preparados sobre la platina.
- Déjelo con el objetivo de menor aumento, la platina lo más próxima posible a él, y protegido con la cubierta correspondiente.

Microscopio electrónico de transmisión

Las células y sus componentes son tan pequeños que los microscopios ópticos comunes sólo pueden distinguir los detalles gruesos de las estructuras celulares. En la mayor parte de los casos todo lo que puede observarse es el

contorno de las estructuras y su capacidad de teñirse por alguna sustancia y no por otra. No fue sino hasta que se desarrolló el microscopio electrónico, en la década de los '30 y cuyo empleo se difundió más ampliamente en los años '50, que los investigadores estuvieron en condiciones de estudiar los detalles finos o ultraestructura de las células.

Con el microscopio electrónico de transmisión, el poder de resolución aumentó cerca de 1000 veces respecto del microscopio óptico. Esto se logra empleando "iluminación" de una longitud de onda mucho más corta, que consiste de haces de electrones, en lugar de rayos de luz. Los electrones son emitidos por un cátodo de tungsteno, cuyo potencial eléctrico se mantiene en 50.000 – 100.000 volt, mientras que el del ánodo, cerca del extremo del tubo, es cero. Esa caída de voltaje produce la aceleración de los electrones a medida que se desplazan hacia el ánodo. Una lente condensadora enfoca el haz de electrones sobre la muestra; las lentes objetivo y proyector enfocan los electrones que atraviesan la muestra y los proyectan sobre una pantalla de observación o una película fotográfica (debe entenderse que aquí las "lentes" son sistemas electromagnéticos).

La microscopía electrónica de transmisión, suministra en la actualidad un poder de resolución de aproximadamente 0,2 nm, unas 500 mil veces mayor que el ojo humano. Esa medida equivale más o menos al doble del diámetro de un átomo de hidrógeno.



Figura 6: Fotografía de un microscopio electrónico de trasmisión.

Tanto en el microscopio óptico, como en el microscopio electrónico de transmisión, la formación de una imagen con contraste perceptible exigen que diferentes partes de la célula difieran en su transparencia al haz de iluminación, ya sean rayos de luz, o electrones. Las partes del espécimen que permiten el paso de la luz o los electrones aparecen brillantes, mientras que las partes que bloquean el paso del haz de iluminación, aparecen oscuras.

Las células vivas, son casi completamente transparentes a la luz y a los electrones, porque casi el 70% de su peso está constituido por agua. Para crear suficiente contraste cuando se usa el microscopio óptico, las células deben ser

tratadas con colorantes, u otras sustancias que se adhieran diferencialmente a componentes subcelulares específicos, o reaccionen con ellos, produciendo regiones de opacidad diferente. Para el microscopio electrónico, los especímenes se tratan por lo general con compuestos de metales pesados.

Después que el espécimen ha sido teñido, todo el colorante que no se haya adherido a las superficies, debe ser lavado. Sin embargo las células son bastante frágiles y cualquier tratamiento energético, disociaría su estructura. Para resolver este problema, los especímenes biológicos se “fijan” antes de teñirlos. Este procedimiento implica un tratamiento con compuestos que “amarran” las estructuras a su lugar, habitualmente por formación de enlaces covalentes adicionales entre las moléculas. Por ejemplo, los aldehídos (como el glutaraldehído) reaccionan con los grupos amino de las moléculas proteicas, enlazando las moléculas de proteínas contiguas en una estructura bastante rígida. El tetróxido de osmio se usa a menudo para la preparación de especímenes para microscopía electrónica, y actúa uniendo entre sí las moléculas de lípidos.

Los procedimientos de fijación y tinción suelen realizarse sobre grupos de células, como por ejemplo, un trozo de tejido. Estos especímenes son demasiado gruesos para permitir el paso de los rayos lumínicos o de los electrones. Para poder examinarlos con el microscopio óptico, o con el microscopio electrónico de transmisión, deben ser cortados en secciones tan finas que las regiones sin teñir resulten transparentes.

Microscopio electrónico de barrido:

Este microscopio permite que el investigador observe la superficie de muestras no cortadas, que no se pueden ver con el equipo de transmisión, porque los electrones atraviesan toda la muestra. El espécimen se fija, se seca, y se recubre con una capa delgada de metal pesado, por ejemplo, platino, por evaporación al vacío. Un haz de electrones intenso, dentro del microscopio, barre la muestra con rapidez. Las moléculas de la muestra se excitan y liberan electrones secundarios (Figura 7) que se enfocan hacia un detector de centelleo. La señal resultante se muestra en un tubo de rayos catódicos. Dado que la cantidad de electrones secundarios producidos por cualquier punto de la muestra depende del ángulo del haz incidente, respecto de la superficie, las microfotografías electrónicas de barrido tienen aspecto tridimensional.

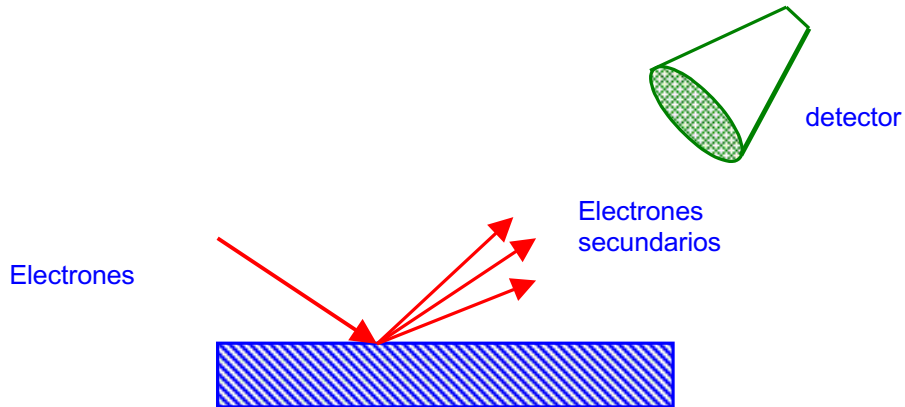


Figura 7: Esquema representativo del funcionamiento del microscopio electrónico de barrido.

En resumen, mientras que en el microscopio electrónico de transmisión los electrones atraviesan el preparado, en el de barrido un haz de electrones “barre” la superficie. De este modo el primero permite estudiar la ultraestructura de las células, mientras que el segundo es ideal para obtener y reconocer la topografía de la misma, ya que produce imágenes tridimensionales (Figura 8).

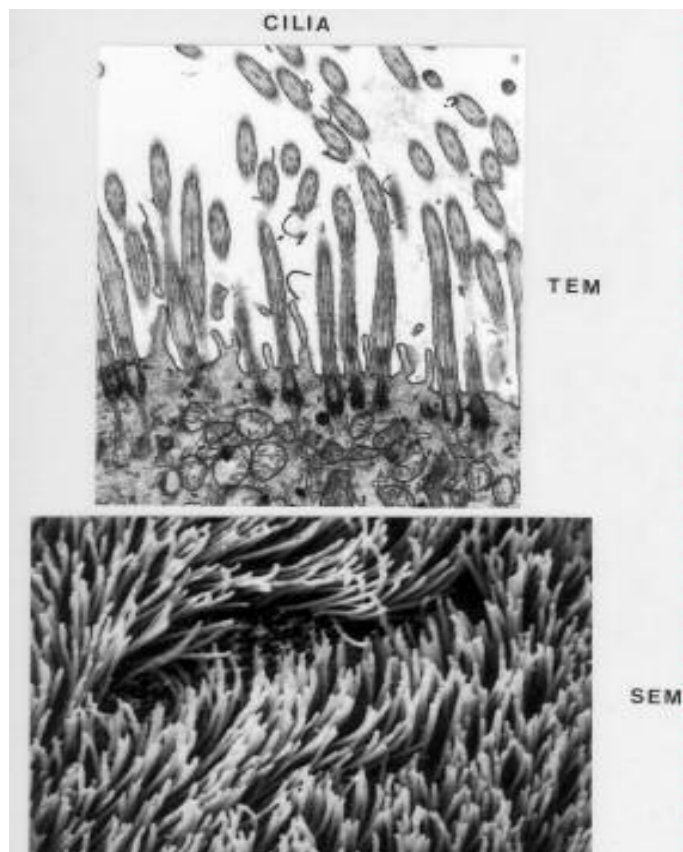


Figura 8: Microfotografías de un corte de traquea, tomada con microscopio electrónico de transmisión (arriba) y de barrido (abajo). Note que la microfotografía obtenida con TEM revela la ultraestructura, mientras que aquella proveniente del SEM permite estudiar la “topografía” del tejido, ya que provee imágenes tridimensionales.

Por último, en la Figura 9, se presenta una comparación entre la microscopía óptica y la electrónica de transmisión y de barrido.

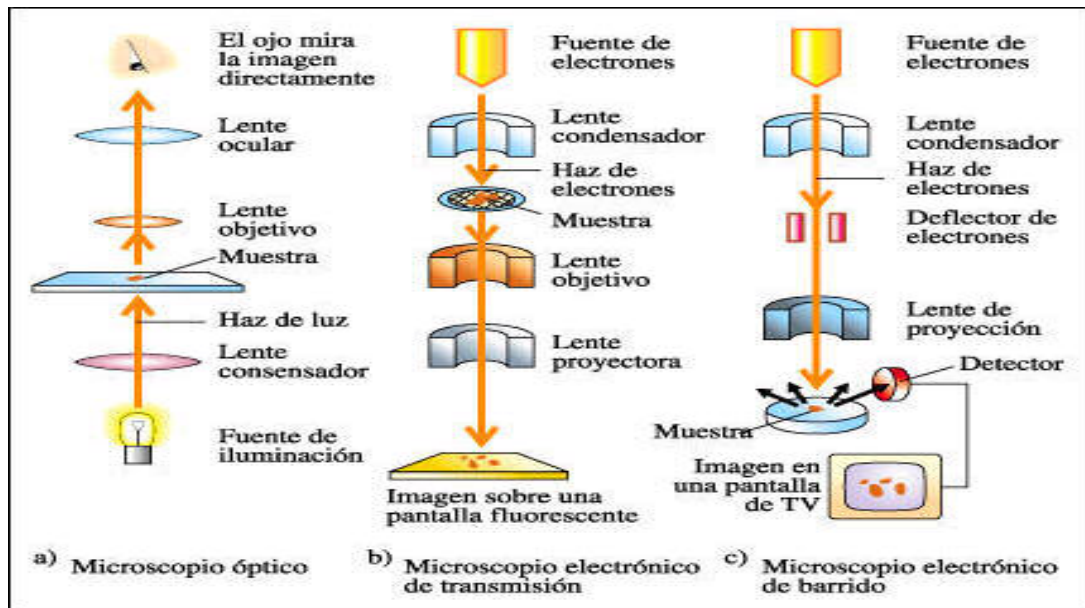


Figura 9: Comparación entre microscopios. a) Óptico. b) Electrónico de transmisión. c) Electrónico de barrido. Según Curtis *et al.* 2000. Biología, 6ta. Edición. Editorial Médica Panamericana

Este trabajo práctico tiene como objetivos desarrollar destrezas en:

- La elaboración de preparados microscópicos, y uso del microscopio óptico.
- La estimación de las dimensiones de especímenes.
- La identificación e interpretación de fotografías tomadas con microscopio electrónico de transmisión y/o barrido.

Aspectos teóricos necesarios:

Para comprender los fundamentos teóricos de este práctico, Ud. deberá dominar previamente los siguientes temas:

- Lentes; tipos, características y propiedades
- Formación de imágenes; casos, marcha de los rayos en el microscopio óptico.

Para ello la cátedra aconseja consultar en la bibliografía y recursos de INTERNET recomendados.

Actividades:

1) Compruebe las características de la imagen formada por el microscopio óptico:

Corte de un diario letras pequeñas, "a", "b", o "e". Haga con ellas un preparado temporario, procediendo de la siguiente manera (Figura 10):

- 1) Coloque una gota de agua sobre el portaobjetos.
- 2) Con la ayuda de una aguja histológica coloque el material sobre la gota de agua.
- 3) Coloque un cubreobjetos en un ángulo de 45°.
- 4) Apoye el cubreobjetos sobre la gota de agua, y déjelo deslizar suavemente, de modo que escape el aire y se evite la presencia de burbujas.
- 5) Si el material no queda completamente cubierto por el agua y comienza a secarse, agregue una gota de agua en la orilla del cubreobjetos, sin levantarlo, ya que ésta penetrará por capilaridad.

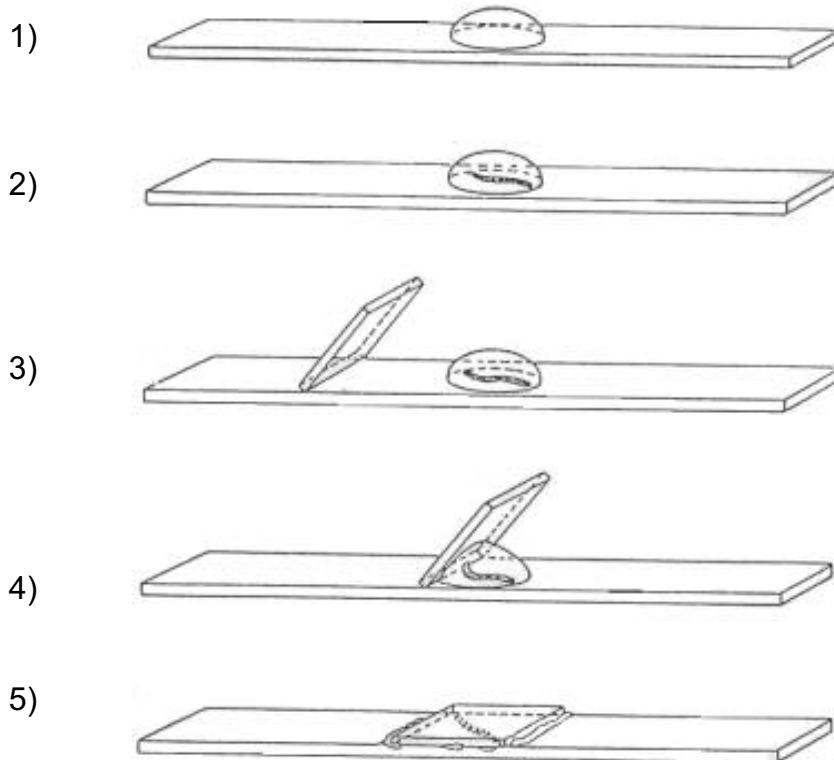


Figura 10: Montaje del material, para la obtención de un preparado temporario.

A continuación:

- a) Encienda la lámpara del microscopio.
- b) Baje la platina y coloque el preparado fijándolo con los sujetadores; cuide que el cubreobjetos quede hacia arriba.
- c) Tenga en cuenta que, salvo excepciones que le serán señaladas, el condensador debe estar colocado en el tope superior.
- d) Coloque el objetivo de menor aumento. Para enfocar correctamente, y sin riesgo de deteriorar el objetivo, éste se aproxima al preparado hasta obtener una distancia mínima, sin que ambos se toquen. Recuerde: enfoque por alejamiento

de objetivo/platina, nunca por aproximación, pues se corre el riesgo de dañar el preparado, y sobre todo, el objetivo.

- e) Mire por el ocular, y haga descender la platina lentamente mediante el tornillo macrométrico, hasta que logre ver la preparación más o menos enfocada.
- f) Seguidamente, logre el enfoque adecuado con el tornillo micrométrico.
- g) Compare la posición de las letras en la imagen obtenida, con la posición en que fueron montadas en el preparado. ¿Por qué el microscopio cambia la posición de las letras?. Fundamente su respuesta mediante un esquema.
- h) Calcule el aumento de la imagen.
- i) Dibuje las letras, tal como las observa en el microscopio.
- j) Vea el preparado con un objetivo de mayor aumento. ¿Con qué aumento observa una mayor proporción de la letra
- k) Examine y dibuje fibras de algodón, lana y seda, con diferentes aumentos
- l) Repita la operación con cabellos de diferentes características.

2) Realice mediciones con auxilio de la regla micrométrica:

El tamaño de los objetos observados con el microscopio compuesto puede ser estimado determinando el diámetro del campo de observación, utilizando un objetivo particular. Luego, el tamaño del espécimen se estima comparándolo con el diámetro del campo de observación. Para ello:

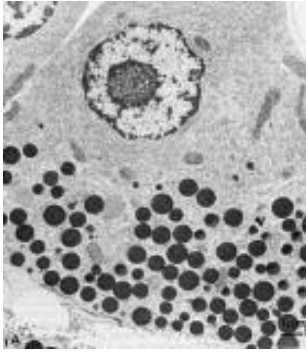
- a) Coloque sobre un portaobjetos una pequeña regla transparente, milimetrada. Enfóquela con el objetivo de menor aumento.
- b) Mueva la regla de modo que el comienzo de la escala milimetrada coincida con el extremo izquierdo del campo de observación.
- c) Cuente el número de trazos desde el extremo izquierdo, hasta el derecho. Si éste último no coincide con una línea, estime la fracción correspondiente. Expresé la medida en mm y μ m.
- d) Cuidadosamente enfoque la regla con el objetivo de 40x. Note que el diámetro del campo es inferior a 1 mm. Reemplace la regla por un portaobjetos graduado (éste es un portaobjetos, que presenta gravada en su superficie una escala muy pequeña). Estime el diámetro del campo del objetivo 40x.
- e) Ahora puede estimar el diámetro del campo de los otros objetivos, por comparación con cualquiera de los anteriores. Para ello se emplea la siguiente relación:

Aumento total de A x diámetro de A = aumento total de B x diámetro de B
--

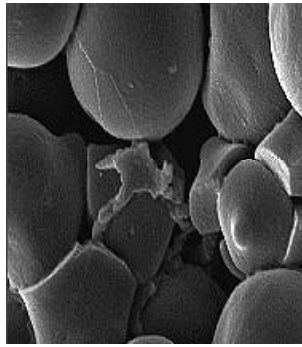
Recuerde que el aumento total = aumento del objetivo x aumento del ocular.

Estime el tamaño de diferentes especímenes comparándolos con el diámetro del campo de observación.

3) Microscopía electrónica: Indique a qué tipo de microscopía electrónica corresponde cada microfotografía.



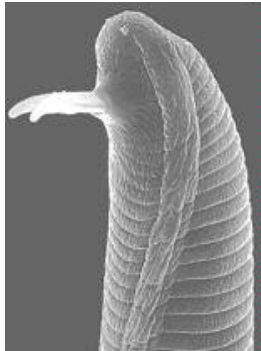
Célula pancreática



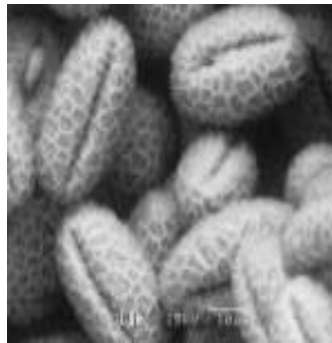
Gránulos de almidón



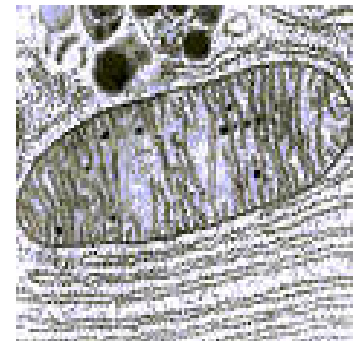
Escherichia coli



Meloidogyne sasserii



Granos de polen



Mitocondria

Cuestionario:

- 1) Dibuje las siguientes lentes convergentes: cóncavo-convexa, biconvexa, planoconvexa.
- 2) Dibuje las siguientes lentes divergentes: cóncava-convexa, biconvexa, planocóncava.
- 3) Esquematice la formación de imágenes en lentes convergentes cuando el objeto se encuentra :
 - a- Infinito
 - b- Entre el infinito y $2f$
 - c- En $2f$
 - d- Entre $2f$ y f
 - e- En f
 - f: Entre f y la lente
- 4) ¿Qué función desempeñan los filtros en la microscopía óptica?.
- 6) Menciones las principales aberraciones de las lentes.
- 7) Ud. quiere estudiar la ultraestructura de un organoide. ¿qué tipo de microscopía electrónica emplearía? ¿por qué?.

Bibliografía recomendada:

Curtis, H. 2000. **Biología**, 6ta. Edición. Editorial Médica Panamericana.

Karp, G.1998. **Biología celular y molecular**. 1º edición en español. Editorial McGraw-Hill Interamericana.

Lodish, H; Berk, A; Zipursky, S; Matsudaira, P; Baltimore, D; Darnell, J. 2000. **Biología celular y molecular**. Editorial Médica Panamericana

Recursos de INTERNET:

En esta dirección encontrará un completo libro de Biología, generado por la Universidad Nacional de La Plata:

<http://www.biol.unlp.edu.ar/biologia>

En la siguiente dirección encontrará un “museo virtual de la historia del microscopio”, perteneciente a la Universidad de Salamanca, España:

<http://campus.usal.es/~histologia/museo/microsco/museo.htm>