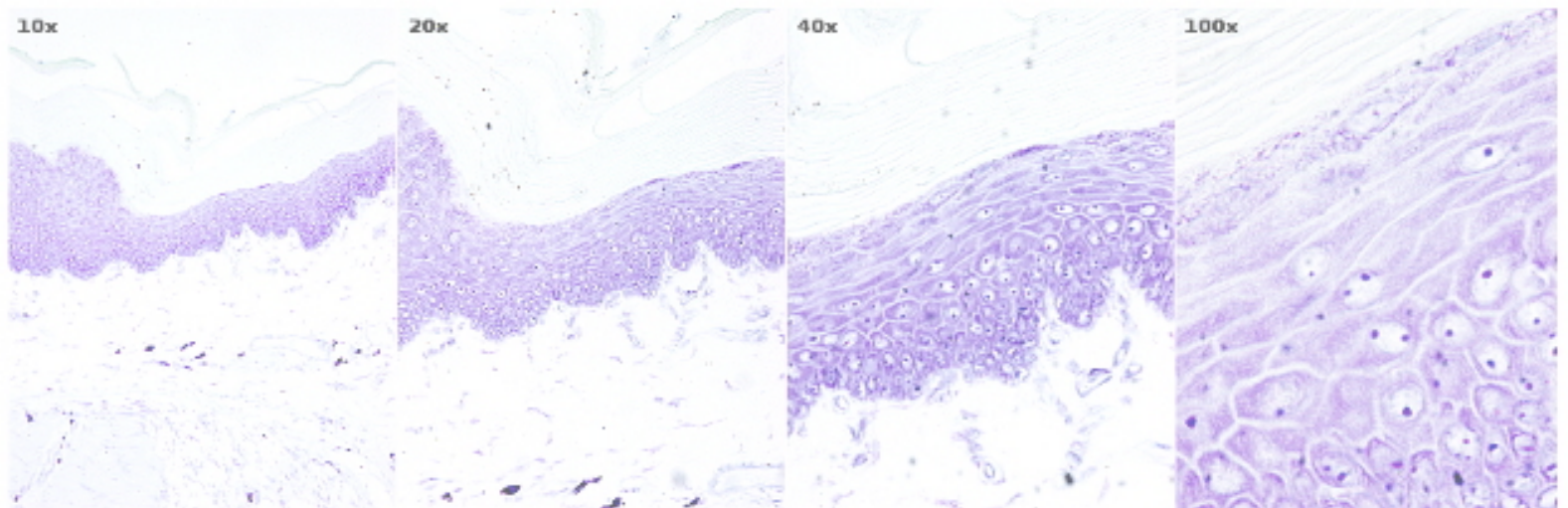


Atlas de Histología Vegetal y Animal



Técnicas histológicas

OBSERVACIÓN



Manuel Megías, Pilar Molist, Manuel A. Pombal

Departamento de Biología Funcional y Ciencias de la Salud.

Facultad de Biología. Universidad de Vigo.

(Versión: Julio 2024)

Este documento es una edición en pdf del sitio
<http://mmegias.webs4.uvigo.es/inicio.html>.

Todo el contenido de este documento se distribuye bajo
la licencia Creative Commons del tipo BY-NC-SA
(Esta licencia permite modificar, ampliar, distribuir y usar
sin restricción siempre que no se use para fines comerciales,
que el resultado tenga la misma licencia y que se nombre
a los autores)

La edición de este documento se ha realizado con el software \LaTeX
(<http://www.latex-project.org/>), usando Texstudio
(www.texstudio.org/) como editor.

Contenidos

1	Introducción	1
2	El proceso histológico	2
3	Observación	4
4	Microscopio óptico	5
5	Microscopio electrónico	8

1 Introducción

En estas páginas dedicadas a las técnicas histológicas vamos a describir los procedimientos experimentales necesarios para obtener secciones teñidas y listas para observar al microscopio partiendo de tejidos vivos extraídos de un animal o de una planta. Por tanto, dedicaremos espacios a la obtención, fijación, inclusión, corte, tinción y observación de los tejidos. Todos estos apartados seguirán el mismo esquema que los capítulos dedicados a los tejidos o a la célula, partir de un esquema básico y ampliar la información sucesivamente en páginas adicionales. No dedicaremos demasiado espacio a los instrumentos desde el punto de vista operativo, pero sí a la conveniencia de su uso y a sus capacidades. Además, se incluye un apartado de protocolos y recetas donde se incorporan los tiempos, productos y manera de proceder para llevar a cabo las tinciones más comunes y cómo preparar sus reactivos. También se han añadido algunos vídeos explicativos

La mayoría de las técnicas histológicas van encaminadas a preparar el tejido para su observación con el microscopio, bien sea éste óptico o electrónico. Ello es debido a dos razones: a) que la composición de los tejidos, salvo contadas ocasiones, no tienen contraste ni colores que permitan diferenciar sus estructuras de una manera clara y b) que la mayoría de las estructuras tisulares y celulares no se pueden discriminar a simple vista sino con la ayuda de los microscopios. Por ello hay que procesar las muestras, primero para que no se deterioren y después para resaltar sus estructuras y poder estudiarlas en detalle.

Existen procedimientos rápidos y simples para la observación de tejidos y células vivas que reciben el nombre de vitales. Los intravitales permiten la observación dentro del cuerpo. Por ejemplo, la observación del flujo sanguíneo en capilares del sistema circulatorio. Otra forma de observar células o tejidos vivos es mediante las técnicas histológicas supravitales, en las

que las células y los tejidos se mantienen o se hacen crecer fuera del organismo, como es el caso de los cultivos de células y de tejidos *in vitro*.

Las técnicas histológicas postvitales son aquellas en las que las células mueren durante el proceso, pero las características morfológicas y moleculares que poseían en estado vivo se conservan lo mejor posible, lo que depende del tipo de técnica empleada. Estas páginas estarán dedicadas a este tipo de técnicas, puesto que son las más comúnmente usadas en los laboratorios de histología.

El objetivo de toda técnica histológica es observar y estudiar la estructura general o detallada de los diferentes componentes tisulares. Estas características observadas deberían ser iguales a las que poseían los tejidos en su estado vivo. Aunque las técnicas histológicas actuales están diseñadas para disminuir al máximo las alteraciones de las características de los tejidos durante su aplicación, todas las técnicas introducen modificaciones más o menos importantes que pueden afectar de manera diferencial a diferentes componentes tisulares. Estas alteraciones se llaman artefactos y tenemos que tenerlos en cuenta a la hora de interpretar lo que observamos en el microscopio.

A lo largo de la historia de la ciencia se ha puesto a punto una gran variedad de técnicas histológicas. Algunas de ellas son generales y se utilizan para una evaluación global de las muestras, mientras que otras son más específicas y permiten la identificación y estudio de estructuras determinadas. Algo a tener en cuenta es que la selección de la técnica y sus variantes depende básicamente del tejido que queramos observar y de lo que queramos estudiar en él. Por ejemplo, no es lo mismo estudiar un tejido animal que uno vegetal, o trabajar con tejido óseo que con tejido nervioso. En las siguientes páginas vamos a presentar las técnicas más generales usadas comúnmente en los laboratorios de histología.

2 El proceso histológico

Denominamos proceso histológico a una serie de métodos y técnicas utilizados para poder estudiar las características morfológicas y moleculares de los tejidos. Hay diversos caminos para estudiar los tejidos, es decir, diversas series de técnicas que se utilizarán dependiendo de qué característica deseamos observar. En el siguiente esquema (Figura 1) se muestran los métodos y técnicas comúnmente empleados durante el procesamiento de los tejidos para su observación con los microscopios óptico o electrónico. Sin embargo, hay que tener en cuenta que existen muchas variantes a estos "caminos" y su elección dependerá del resultado final que queramos obtener.

El proceso histológico comienza con la obtención del tejido objeto de estudio. En el caso de los tejidos vegetales directamente se toman muestras de los distintos órganos que componen el cuerpo de la planta, mientras que para los tejidos animales podemos optar por dos opciones: coger una porción del tejido u órgano y procesarla o procesar primero el animal completo y luego extraer la muestra que nos interese. En cualquier caso las muestras son habitualmente fijadas. Fijar un tejido es como hacer una fotografía de dicho tejido, se lleva a cabo para mantener las estructuras celulares y moleculares inalterables durante el procesamiento posterior y con una organización lo más parecida posible a como se encontraban en la muestra viva. La fijación más habitual se lleva a cabo con unas soluciones líquidas denominadas fijadores. También podemos fijar las moléculas de los tejidos por congelación rápida. La fijación por congelación se emplea cuando la fijación química o los procesos histológicos posteriores alteran las características de la muestra que queremos estudiar, por ejemplo una molécula sensible a dichos tratamientos.

Tras la fijación es habitual incluir el tejido para posteriormente obtener secciones. Cuanto más delgada queramos que sea nuestra sección más tenemos que endurecer nuestra muestra. Esto se consigue embebiendo el tejido con sustancias líquidas que posteriormente polimerizarán (resinas) o se volverán consistentes (ceras). También se puede conseguir el mismo efecto mediante congelación rápida. Cortes

más gruesos de 40 μm se pueden cortar sin necesidad de inclusión usando el vibratomo o microtomos de congelación. Los medios de inclusión no son normalmente hidrosolubles por lo que tendremos que sustituir el agua de los tejidos por solventes orgánicos liposolubles y posteriormente sustituirlos por el medio de inclusión.

Para el caso de algunas muestras es necesario hacer un tratamiento previo a la fijación. Por ejemplo, el tejido óseo contiene minerales que dificultan su procesamiento. En este caso se suele someter a un proceso de descalcificación, tras el cual se prosigue con la inclusión de las muestras.

Tras la inclusión o la congelación se procede a cortar los tejidos, es decir, obtener secciones. Existen diferentes aparatos de corte que permiten conseguir secciones de distinto grosor: ultrafinas (del orden de nm), semifinas (de 0.5 a 2 μm), finas (entre unas 3 y 10 μm) y gruesas (mayores a 10 μm). Habitualmente las secciones se procesan para poder observarlas y estudiarlas, aunque ciertos tipos de microscopía, por ejemplo con contraste de fase, permiten observar secciones de tejidos sin procesar. Normalmente las secciones se tiñen con colorantes que son hidrosolubles, por lo que hay que eliminar el medio de inclusión para que los colorantes pueden unirse al tejido. Las secciones ultrafinas (observadas con el microscopio electrónico) o semifinas (observadas con el microscopio óptico) se pueden contrastar con metales pesados o con colorantes, respectivamente, sin necesidad de eliminar el medio de inclusión. Las secciones obtenidas a partir de muestras congeladas se puede procesar u observar una vez llevadas a temperatura ambiente.

Los tejidos procesados se observan con los microscopios. Existen dos tipos básicos de microscopios: óptico y electrónico. Los primeros ofrecen una gran versatilidad en cuanto a modos de observar los tejidos: campo claro, contraste de fase, polarización o contraste de interferencia diferencial, mientras que los segundos permiten un gran poder de resolución, pudiéndose observar características ultraestructurales como membranas celulares o incluso complejos moleculares.

Como dijimos al comienzo existen múltiples varia-

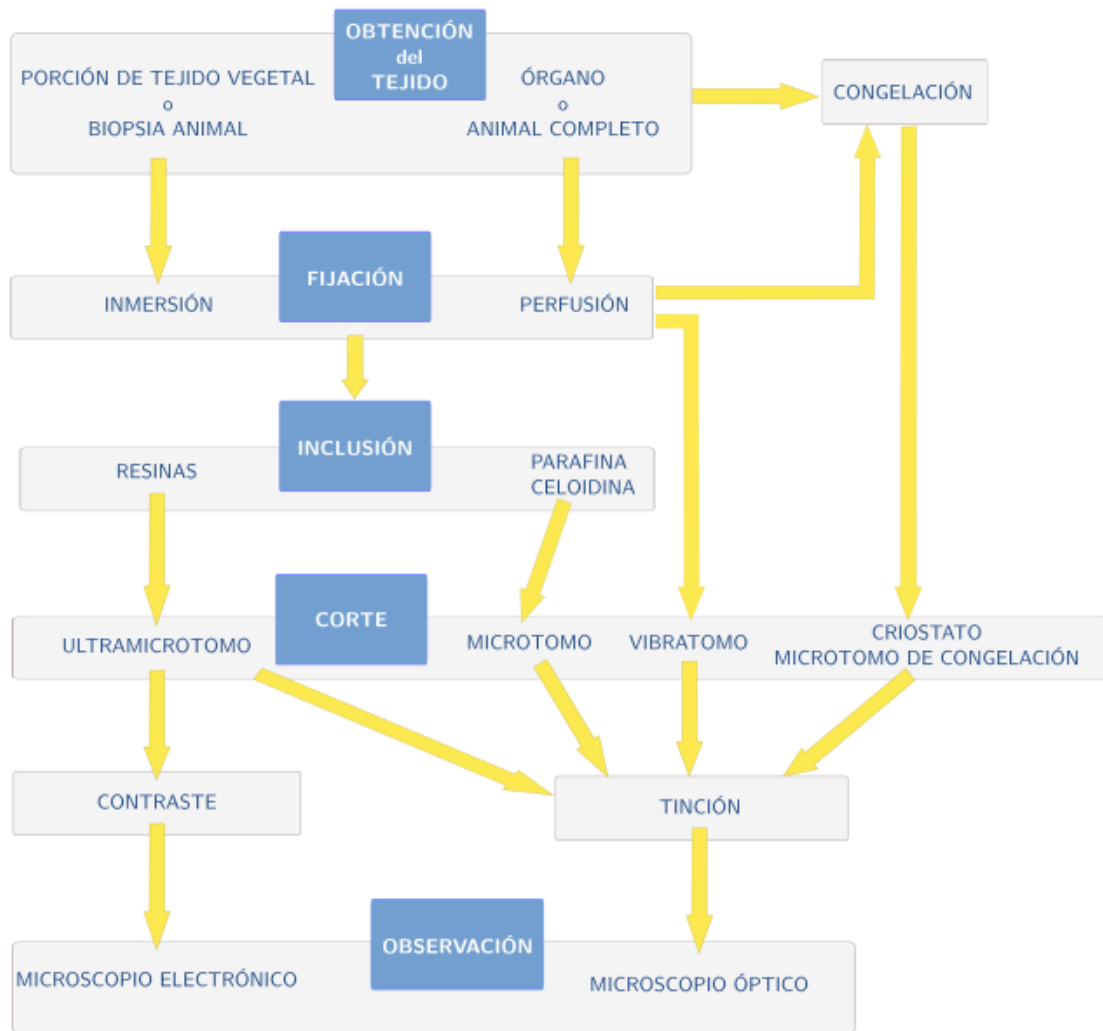


Figura 1. Esquema del proceso histológico.

ciones sobre este esquema general de procesamiento histológico. Por ejemplo, se pueden observar tejidos con el microscopio electrónico de barrido sin necesidad de incluir ni cortar, pero sólo observaremos superficies. Si queremos cuantificar nuestros resultados, por ejemplo, número de células de una estructura, tendremos que hacer un muestreo sistemático y aleatorio de la muestra, según los principios de la estereología.

Ello requerirá unas condiciones previas para que cada célula tenga la misma probabilidad de ser observada. De igual modo, si queremos observar muestras gruesas o muy gruesas puede ser buena idea someter a esas muestras a un proceso de aclarado antes de su observación. En las siguientes páginas veremos con cierto detalle algunas de las técnicas más empleadas para la observación de los tejidos.

3 Observación

El último paso de todo proceso histológico es la observación del resultado producido por la técnica realizada. El poder de resolución del ojo humano es de 0,2 mm (poder de resolución: distancia mínima a la que se discriminan dos puntos), mientras que una célula eucariota típica suele tener unas dimensiones que oscilan entre 10 y 50 micrómetros (μm ; $1 \mu\text{m} = 10^{-6} \text{ mm}$). Además, si queremos estudiar la ultraestructura celular hay que tener en cuenta que el grosor de una membrana celular es de unos 7 nanómetros (nm; $1 \text{ nm} = 10^{-6} \mu\text{m}$), mucho más pequeña. Todo ello implica que necesitamos aparatos que nos permitan aumentar la imagen que obtenemos de las muestras para discriminar estructuras tisulares diminutas como son las células o sus compartimentos. Estos aparatos se llaman microscopios.

Hay dos tipos de microscopios: los ópticos y los electrónicos.

Los microscopios ópticos, o de campo claro, utilizan la luz visible y lentes de cristal que permiten un aumento de las muestras de unas 1000 veces, con un poder de resolución de unos 0,2 micrómetros. Ésta es la máxima resolución que permite la luz visible por sus propiedades de onda. Los microscopios ópticos se usan para observaciones generales, características celulares y tisulares, y están presentes en todos los laboratorios de histología.

Los microscopios electrónicos se basan en la alta frecuencia de los electrones para conseguir un poder de resolución de hasta 1 nanómetro. Se usan para observar la ultraestructura de la célula y los tejidos, es decir, para estudiar el nivel subcelular, como orgánulos, membranas u organizaciones moleculares (por ejemplo, se pueden observar los ribosomas). Hay dos tipos de microscopios electrónicos: los de transmisión, que se usan para estudiar la ultraestructura de la célula en secciones muy finas, y el de barrido, que permite estudiar superficies.

A los microscopios, sobre todo los ópticos, se les pueden añadir dispositivos que permiten ampliar su potencialidad. Por ejemplo, al microscopio óptico se le puede adaptar una fuente luminosa y una serie de filtros para observar moléculas fluorescentes, o filtros para destacar cambios de densidad en el tejido, etcétera. A las diferentes formas de utilizar los microscopios para la observación de características de los tejidos se les llama microscopía. Así podemos hablar de microscopía óptica de contraste de fase, de fluorescencia, electrónica, etcétera.

La biología celular actual no se entiende sin estos aparatos. Su descubrimiento y su mejora constante ha sido indispensable para la formulación de la teoría celular, y para comprender, estudiar y experimentar con las células y llegar al grado de conocimiento que hoy en día disponemos de ellas (ver el apartado de la célula)

4 Microscopio óptico

El microscopio óptico es un elemento esencial para los estudios generales de histología puesto que es el que nos permite observar las diferentes características morfológicas de las células y los tejidos. Se basa en el uso de lentes para aumentar los rayos de luz que atraviesan una muestra de tejido. Su invención se remonta al siglo XVII. Desde entonces se ha ido perfeccionando hasta llegar a los modernos microscopios. Durante estos siglos, el mayor avance en cuanto a perfección y calidad se ha producido en su principal elemento, las lentes, las cuales aumentan la imagen de las secciones de tejido y permiten hacer visibles al ojo humano detalles nítidos que de otra manera sería imposible observar.

Los microscopios ópticos tienen un límite máximo de resolución de $0,2 \mu\text{m}$. El poder de resolución es la distancia mínima a la que se pueden discriminar dos puntos. Este límite viene determinado por la longitud de onda de la fuente de iluminación, en este caso la luz visible.

Contiene normalmente dos sistemas de lentes: el objetivo y el ocular. El objetivo recoge la luz que atraviesa la sección de tejido, mientras que el ocular es el que proyecta la imagen sobre la retina. El aumento total que permite un microscopio óptico se calcula multiplicando la magnificación que produce el objetivo por la que produce el ocular. Por ejemplo, si estamos usando un objetivo de 40x (aumenta 40 veces) y un ocular de 10x (aumenta 10 veces), el resultado final será de 400x, es decir, vemos la muestra aumentada 400 veces. Usando microscopios ópticos avanzados se consiguen unos 1000-1500 aumentos (objetivo de 100x junto con oculares de 10x o 15x). Algunos microscopios ópticos tienen lentes internas que producen aumentos adicionales que tendremos que tener en cuenta para calcular la magnificación de la imagen que se observa. No debemos confundir los aumentos con el poder de resolución. Por más que consigamos aumentar una imagen tomada de un microscopio, incluso con metodología digital, no se puede aumentar la resolución de la imagen.

Partes del microscopio óptico

Un microscopio óptico compuesto está formado por las siguientes partes:

Oculares. Son las lentes que forman la imagen que observaremos con nuestros ojos (Figura 2). Todos los microscopios actuales poseen dos oculares, uno para cada ojo. Por eso a los microscopios actuales se les llama binoculares. Los primeros microscopios eran monoculares, es decir, poseían un solo ocular. Hay que tener en cuenta que en los microscopios más avanzados tanto el objetivo como el ocular suelen estar compuestos por varias lentes. Al menos uno de los oculares puede regularse para alejar o acercar la lente al objetivo, permitiendo ajustar el enfoque a las condiciones de visión, dioptrías, de cada observador. Los dos oculares también se pueden acercar o separar para ajustar su separación a la separación de los ojos del observador.

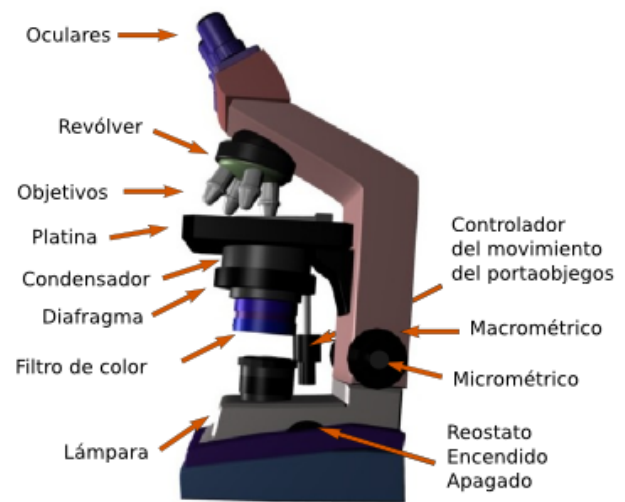


Figura 2. Partes de un microscopio simple.

Objetivos. Los objetivos son las lentes que reciben la luz directamente tras atravesar la sección histológica y quizá sean los elementos más importantes del microscopio. Hoy en día los microscopios ópticos poseen un tambor o revólver donde se encuentran varios objetivos. Cada uno de ellos posee lentes que permiten diferentes aumentos. Las magnificaciones de los objetivos más usados suelen ser de 4x, 10x, 20x, 40x y 100x. Rotando el revólver se puede seleccionar el objetivo y por tanto el aumento al que queremos ob-

servar la preparación. Aparte de los aumentos, los objetivos tienen una serie de características para mejorar la imagen. Así, pueden ser acromáticos, de fluorita o apocromáticos, los cuales corrigen alteraciones cromáticas, de campo plano que eliminan la curvatura del campo de observación, de contraste de interferencia, etcétera.

Cuando se usan objetivos de 100 aumentos (100x) es necesario emplear un líquido denominado aceite de inmersión, que se añade entre el objetivo y la muestra. Esto es debido a que la refracción de la luz es alta en el aire y provoca alteraciones en la imagen que se manifiestan cuando se usan objetivos con esta capacidad de aumento. El aceite de inmersión reduce enormemente esta refracción permitiendo imágenes mucho más nítidas (Figura 3).

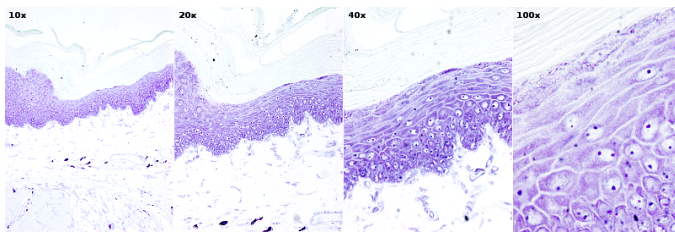


Figura 3. Imágenes resultantes del uso de objetivos con diferentes aumentos (especificados en las imágenes) al observar un epitelio estratificado plano queratinizado.

Platina. Es la plataforma donde se coloca el portaobjetos con nuestro tejido. Posee un dispositivo para sujetar el portaobjetos, el cual se puede desplazar en el plano de la platina, movimiento controlado manualmente.

Condensador. Es un dispositivo con una lente que concentra y focaliza la luz proveniente de la fuente sobre la sección de tejido.

Diafragma. Se sitúa entre la fuente luminosa y el condensador. Permite aumentar el contraste de la muestra y la profundidad de campo, es decir, el espesor de la muestra que está enfocado.

Lámpara luminosa. Es la que proporciona la luz que atraviesa la sección de tejido. Inicialmente se usaba la luz natural, la cual se podía concentrar en la sección de tejido mediante espejos cóncavos. Actualmente se usa una lámpara cuyo haz de luz atraviesa el diafragma, el condensador, la muestra, y tras ello

penetra por el objetivo y atraviesa los oculares hasta nuestros ojos (Figura 4). La intensidad de la fuente luminosa se puede regular mediante un reostato.

Macrométrico y micrométrico. El enfoque de la muestra se consigue variando la distancia de la muestra a la lente del objetivo. Esta distancia depende de los aumentos que produzca el objetivo, mayor distancia cuanto menores aumentos, y del tipo de objetivo. La distancia se controla mediante dos ruedas denominadas macrométrico y micrométrico, respectivamente. La primera permite movimientos ascendentes y descendentes amplios de la platina y la segunda ajustes finos.

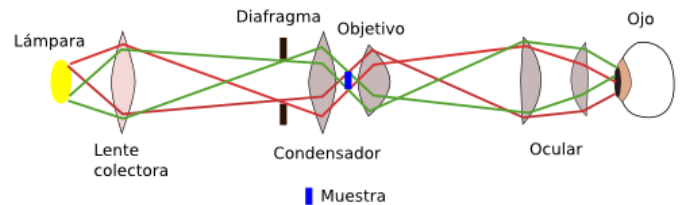


Figura 4. Recorrido de la luz desde la fuente, pasando a través de los diferentes lentes de un microscopio básico, hasta el observador.

Modificaciones

Contraste de fase. Esta modificación del microscopio de campo claro necesita de objetivos especiales y se basa en el ligero retraso que sufre la luz cuando pasa por las estructuras tisulares en función de su densidad. De esta manera se consiguen diferentes luminosidades para distintas estructuras tisulares. Se emplea para ver muestras sin teñir o acuosas, así como células vivas, por ejemplo en cultivos celulares.

Campo oscuro. La observación en campo oscuro es un buen sustituto del contraste de fase para observar especímenes sin teñir o medios acuosos. Consiste en la incorporación de un objeto opaco bajo el condensador, entre la fuente luminosa y la sección de tejido. Este objeto sólo deja pasar la luz más lateral que incidirá sobre la muestra de forma oblicua y sólo aquella luz que sea reflejada por la muestra llegará a los objetivos. Allí donde no haya tejido aparecerá oscuro y distintas densidades o propiedades del tejido reflejarán diferente cantidad de luz.

Contraste de interferencia y Nomarski. Este tipo

de microscopía aparece sólo en los microscopios más avanzados y supone tener objetivos especiales. Estos métodos dan a los tejidos un aspecto tridimensional, es decir, aumentan la profundidad de campo (espesor de tejido que está simultáneamente enfocado). Se basa en el uso de filtros que polarizan la luz, lo cual consiste en dejar pasar sólo a la ondas electromagnéticas que vibran en un determinado plano. Posteriormente pasan por un prisma que reagrupa esta luz en elementos separados por una distancia que es similar al poder de resolución del objetivo que se está usando. Existe un prisma para cada objetivo. Entonces la luz pasa por el muestra y las diferencias de densidad del tejido, como los bordes de las células o densidades del interior celular o matriz extracelular, provocarán alteraciones en la luz que se dirige hacia los objetivos, los cuales transformarán esas diferencias en cambios en la luminosidad. Todavía existe otro filtro adicional entre el objetivo y los oculares que permiten modular la luminosidad aún más.

Variantes

Esteriomicroscopio. También se llama microscopio de disección, lupa binocular o simplemente lupa. Se utiliza normalmente para manipular muestras pequeñas o para observar características que no requieren grandes aumentos, entre 7 y 40 de aumentos, aunque pueden llegar hasta 100. Pueden observarse las muestras con diferentes aumentos, lo que se consigue mediante un sistema de movimientos de lentes o intercambiando objetivos. Al ser binoculares se observan los objetos en tres dimensiones y tienen una gran distancia focal, es decir, las muestras se sitúan lejos de los objetivos, con lo que la manipulación es más fácil. La iluminación de la muestra puede venir de diferentes fuentes, que pueden ser externas.

Fluorescencia

El microscopio de fluorescencia se usa para observar sustancias fluorescentes denominadas fluoróforos. Una molécula fluorescente es aquella que es capaz de captar radiación electromagnética con una longitud de onda determinada y emitir otra radiación electromagnética con otra longitud de onda diferente, normalmente dentro del espectro de la luz visible. Los fluoróforos se utilizan como marcadores para la detección de otras moléculas tisulares, normalmente me-

dante la técnica de inmunofluorescencia. Los usados en microscopía absorben en el rango de la luz ultravioleta, normalmente producida por una lámpara de mercurio, y emiten en el rango de la luz visible. Para seleccionar el rango de longitud de onda con que serán iluminados se utilizan filtros específicos localizados entre la fuente y la muestra que sólo dejan pasar un determinado rango de frecuencias. Con un tambor de filtros se consigue iluminar la muestra con diferentes rangos de ondas electromagnéticas y por tanto activar selectivamente a diferentes fluoróforos.

La microscopía de fluorescencia nos permite usar más de un fluoróforo para detectar varias moléculas tisulares de forma simultánea siempre que los espectros de absorción y emisión de estos fluoróforos no se solapen (Figura 5), puesto que entonces sería imposible discriminarlos.

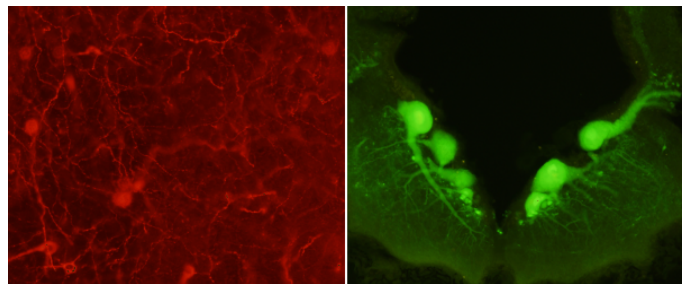


Figura 5. Imágenes de fluorescencia. A la izquierda, inmunocitoquímica para el neuropéptido Y en cerebro de rata, utilizando el fluoróforo Texas-Red. A la derecha, motoneuronas en el encéfalo de lamprea marcadas con el trazador neuronal fluoresceína que es en sí mismo un fluoróforo. Cada uno de los fluoróforos se ha estimulado con frecuencias diferentes y lo que se observa es la emisión en el espectro de la luz visible de cada uno de ellos, rojo y verde, respectivamente.

Una aplicación más avanzada de la fluorescencia se da en los microscopios confocales, los cuales permiten eliminar la luz difusa procedente de fluoróforos que están en el tejido fuera del plano de enfoque. Esta luz difusa, que aparece en los microscopios de fluorescencia convencionales, provoca una difuminación y pérdida de nitidez de la imagen. Por tanto, con el microscopio confocal se consiguen imágenes mucho más nítidas y mediante la digitalización y solapamiento de planos de foco sucesivos se pueden conseguir imágenes tridimensionales.

5 Microscopio electrónico

Cuando se quieren observar estructuras celulares que están por debajo del límite de resolución del microscopio óptico, como algunos orgánulos, membranas, estructuras citosólicas, complejos moleculares de la matriz extracelular o virus, se recurre al microscopio electrónico. Se inventó en la primera mitad del siglo XX, el primer prototipo de microscopio electrónico de transmisión fue construido por Ruska en 1933, y su aplicación a la histología desveló las estructuras celulares más pequeñas denominadas en su conjunto ultraestructura celular. Por tanto, observar ultraestructuralmente a la célula significa observarla con el microscopio electrónico. Este tipo de microscopio tiene un límite de resolución más pequeño que 1 nanómetro gracias a que no usa la radiación electromagnética de la luz visible sino la alta frecuencia de un haz de electrones que incide sobre la muestra, y permite aumentos de varios millones de veces en los microscopios electrónicos tradicionales. Los nuevos microscopios de transmisión son capaces de distinguir entre átomos y llegar a aumentos de 50 millones de veces. Actualmente, en las preparaciones histológicas, lo que limita la claridad de las imágenes es la preparación de las muestras más que la capacidad del propio microscopio. Los microscopios electrónicos son capaces de resolver estructuras moleculares y están siendo muy útiles para estudiar la conformación tridimensional de la cadena de aminoácidos en las proteínas.

El microscopio electrónico no usa lentes sino imanes que concentran los haces de electrones emitidos por un filamento. Estos imanes electromagnéticos sirven para concentrar más o menos los haces de electrones. Los cambios de aumentos se consiguen variando la velocidad de los electrones, con lo que también varía la frecuencia de onda de éstos.

Normalmente son aparatos grandes puesto que el viaje de los electrones tiene que ocurrir en vacío, si no los electrones chocarían con las partículas del aire. Por eso, tienen grandes tubos dentro de los cuales se crea y manipula el haz de electrones y donde se colocan las muestras para su observación.

En histología se usan dos tipos de microscopios electrónicos: de transmisión y de barrido.

Microscopio electrónico de transmisión

En este tipo de microscopio electrónico se produce el haz de electrones en un filamento de tungsteno que funciona como cátodo (Figura 6). Los electrones se condensan mediante electroimanes y se focalizan sobre una sección de tejido. Las secciones de tejido deben ser muy finas, se denominan ultrafinas (de unas decenas de nanómetros), para permitir que sean atravesadas por los electrones y para conseguir imágenes nítidas. Previamente las secciones deben ser tratadas con metales pesados como el osmio, el plomo y el uranilo. La función de estos metales es similar a las tinciones usadas en el microscopio óptico, dar color a las estructuras celulares, pero sólo en tonalidades de grises. Estos metales se concentran fundamentalmente en membranas y en los complejos macromoleculares. Los electrones que chocan con estos metales rebotarán y no cruzarán el tejido. Aquellos que consigan atravesar el tejido impactarán contra una pantalla fluorescente que emitirá un destello luminoso tras cada choque. Esa imagen emitida por la pantalla fluorescente es la que podemos observar nosotros. Por ello las imágenes observadas con el microscopio electrónico son siempre en blanco y negro (con tonalidades de grises) (Figura 7), aunque posteriormente se pueden colorear con un ordenador.

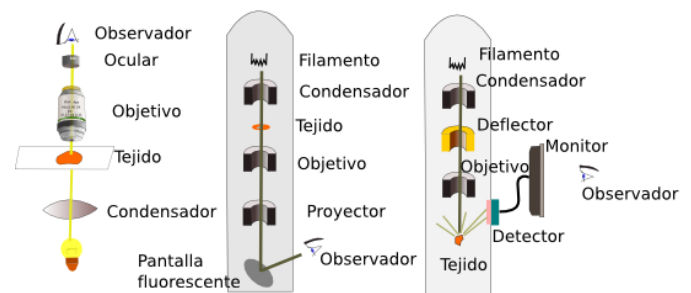


Figura 6. Comparativa de la composición básica de un microscopio óptico (izquierda), electrónico de transmisión (centro) y electrónico de barrido (derecha).

Microscopio electrónico de barrido

Los microscopios electrónicos de barrido sirven para observar superficies tisulares. Ello es posible porque los electrones no atraviesan la muestra sino que interaccionan con su superficie y rebotan. Para que esto ocurra hay que cubrir a la muestra con una máscara

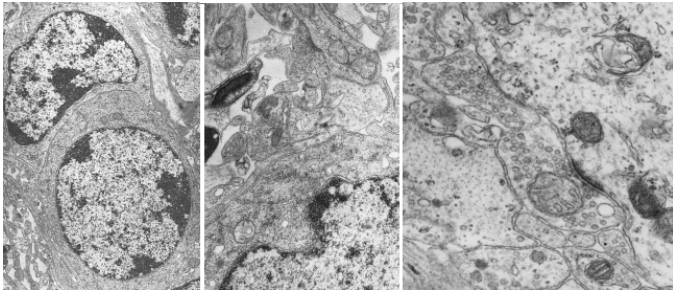


Figura 7. Imágenes tomadas en con microscopio electrónico de transmisión. Se puede ver la capacidad de estos microscopios observando el incremento de resolución de las imágenes de izquierda a derecha. Las líneas negras de la imagen de la derecha corresponden a las membranas celulares

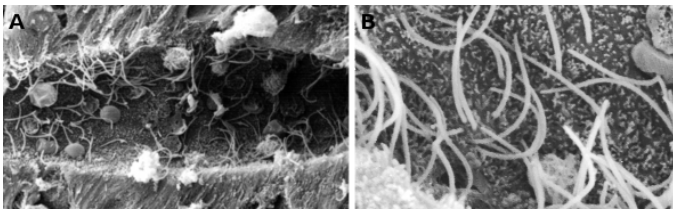


Figura 8. Imágenes obtenidas con un microscopio electrónico de barrido. Muestran el interior del canal central de una médula espinal de lamprea. Se pueden observar numerosos cilios (con más detalle en B) y pequeñas microvellosidades en los dominios apicales de las células que forman las paredes de dicho canal. (Ver imagen de barrido de estomas de una hoja).

de metales que se adapta perfectamente al relieve de la muestra. La muestra se barre con el haz de electrones y los electrones reflejados por un punto de la superficie son captados por una pantalla receptora que creará una imagen en una pantalla digital. La imagen completa se formará cuando el haz recorra toda la superficie de la muestra y se consiga información de cada uno de los puntos. Es decir, se escanea la muestra, y de ahí el nombre de microscopio de barrido, o en inglés "scannig". La resolución de estos microscopios es un orden de magnitud menor que el de transmisión.

Por supuesto, las muestras que se observan no son secciones, sino porciones de órganos con superficies de interés. Se pueden observar superficies de secciones hechas con un vibratomo o con un microtomo

de congelación, pero no aquellas que han sido incluidas en resina o parafina. Ya que sólo rastrea superficie se pueden estudiar muestras de tejido mucho más grandes y gruesas. Aunque la imagen se ve en una pantalla, y por tanto es bidimensional, el juego de sombras creado por la emisión de electrones da una idea tridimensional de la muestra (Figura 8). Es como si se le hiciera una foto.

Otros

La microscopía electrónica de transmisión permite ver la ultraestructura celular, pero en dos dimensiones. Sin embargo, una visión tridimensional a escalas nanométricas aporta mucha más información. Hay una variante de la microscopía electrónica de transmisión que se denomina tomografía electrónica, que consiste en tomar imágenes de una sección pero inclinando un ángulo determinado la sección respecto al haz de electrones en cada fotografía. Después, todas las imágenes se procesan digitalmente mediante un proceso de reconstrucción en 3D. De esta manera se consiguen imágenes tridimensionales de estructuras subcelulares.

La tomografía electrónica por congelación es una técnica que consiste en la congelación ultrarrápida de una muestra de células o tejidos. La congelación es tan rápida que el agua no se ordena en cristales de hielo, y por tanto se preservan las características de las estructuras celulares y moléculas. Luego, las muestras se retallan hasta un grosor y dimensiones adecuados, y posteriormente se observan al microscopio electrónico. La observación también se produce a temperaturas muy bajas (menos de 150 o 180 °C) en unos dispositivos ultrafríos en el interior del microscopio electrónico. La congelación preserva la muestra en su estado hidratado original. En el microscopio electrónico se toman muchas imágenes de la misma muestra, pero inclinándola un poco en cada una de ellas. Todas las imágenes se unen en una sola imagen tridimensional reconstruida mediante un programa informático. Esta técnica se aplica mucho en la determinación de la estructura tridimensional de las proteínas usando microscopios electrónicos de gran resolución.