

MICROSCOPIA.

CÉSAR E. MONTALVO ARENAS.

Agosto de 2010.

El estudio detallado de los componentes de células y tejidos animales o vegetales, por el tamaño que poseen, requiere el uso de instrumentos que permitan ampliar muchas veces más la imagen de las estructuras que los constituyen.

El instrumento que fue empleado por los primeros biólogos para estudiar la célula y los tejidos, es el microscopio. El nombre deriva etimológicamente de dos raíces griegas: *mikrós*, que significa pequeño y *skopéoo*, que significa observar. Es decir el microscopio es un instrumento que sirve para observar objetos o estructuras pequeñas.

Existen dos tipos de microscopios que emplean la luz como fuente de energía para formar imágenes aumentadas y detalladas de objetos que a simple vista no es posible observar:

- a) Microscopio fotónico simple o lupa.
- b) Microscopio fotónico compuesto.

El **microscopio simple** o **lupa** es un instrumento de amplificación de imágenes que consiste en la utilización de una o más lentes convergentes en un solo sistema óptico. Dependiendo de la curvatura de la superficie de la(s) lente(s) las lupas pueden ampliar las imágenes de los objetos desde 5, 8, 10, 12, 20 y hasta 50 veces. Forman una imagen de **mayor tamaño, derecha y virtual**.

Los **microscopios fotónicos compuestos** que se emplean actualmente tienen sus antecesores en los instrumentos ópticos desarrollados, en el periodo comprendido entre 1590 y 1610, por Hans (padre) y Zacarías (hijo) Janssen; quienes mediante el tallado cuidadoso de lentes biconvexas construyeron los primeros microscopios compuestos (fig. microsc. 1).

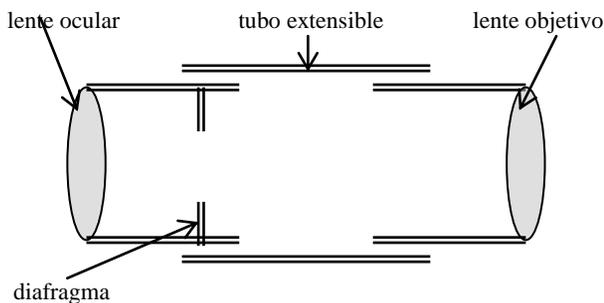


Figura microsc. 1. Diagrama que muestra los componentes del microscopio compuesto fabricado por los Jansen.

A partir de esa época, el microscopio es el instrumento más utilizado en el estudio de células y tejidos. Se fue perfeccionando, tanto en su parte óptica como en su parte

mecánica, gracias a los adelantos tecnológicos aplicados a los componentes antes mencionados.

Se denominan compuestos porque la imagen se forma mediante la utilización de tres sistemas de lentes, cada uno de ellos constituidos por lentes convergentes y divergentes.

Los sistemas de lentes son el **condensador**, los **objetivos** y los **oculares**.

En la actualidad, el microscopio fotónico es un instrumento de uso cotidiano en los laboratorios de investigación y de diagnóstico así como en las aulas de enseñanza de Biología, Embriología, Histología, Microbiología y Patología.

COMPONENTES DEL MICROSCOPIO FOTÓNICO.

El microscopio fotónico compuesto esta integrado por tres tipos de componentes:

a) **COMPONENTES MECÁNICOS:** Son aquellos que sirven de sostén, movimiento y sujeción de los sistemas ópticos y de iluminación así como de los objetos que se van a observar. Éstos se muestran en la imagen del microscopio de la figura microsc. 2:

❖ **Base o pié.** Es un soporte metálico, amplio y sólido en donde se apoyan y sostienen los otros componentes del microscopio.

❖ **Brazo, estativo o columna.** Permite la sujeción y traslado del microscopio. Soporta al tubo óptico, a la platina y el revolver.

❖ **Platina.** Superficie plana de posición horizontal que posee una perforación circular central. En ella se apoya la preparación (lámina portaobjetos que contiene a la muestra que se va a examinar) que se sujeta a la platina mediante **pinzas** o con un **carrito** o **charriot** que, mediante mandos especiales facilitan el movimiento de la preparación de derecha a izquierda y de adelante hacia atrás.

❖ **Tubo óptico.** Consiste en un cilindro metálico que suele medir 160mm o 170 mm de longitud (dependiendo del fabricante del microscopio) el cual en un extremo, está conectado al revolver o portaobjetivos y en el otro se relaciona con el (los) ocular(es).

❖ **Revolver o portaobjetivos.** Es un componente que gira alrededor de un eje con la finalidad que los objetivos que sostiene coincidan de manera perpendicular con la perforación central de la platina. En su superficie inferior posee varios agujeros donde se atornillan los objetivos.

❖ **Tornillos macrométrico y micrométrico.** Generalmente están situados en la parte inferior del brazo o columna. Pueden estar separados (en los

microscopios antiguos) o el tornillo micrométrico está incorporado en la circunferencia del tornillo macrométrico (microscopios actuales). Ambos tornillos permiten el desplazamiento de la platina hacia arriba y hacia abajo con la finalidad de acercar o alejar la preparación hacia los objetivos y así conseguir un enfoque óptimo de la imagen.

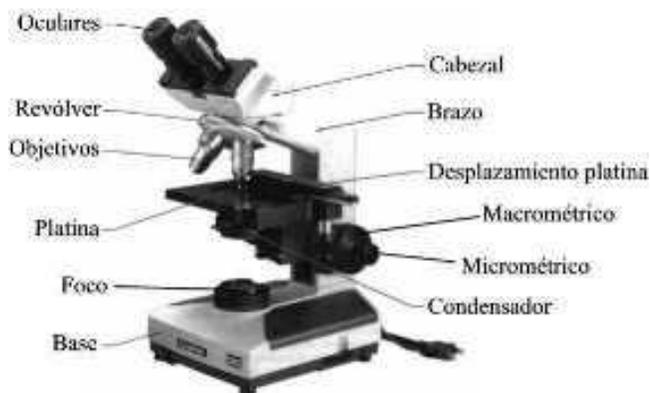


Figura microsc. 2. Principales componentes de un microscopio fotónico compuesto

El macrométrico produce desplazamientos evidentes y rápidos de la platina, en cambio el tornillo micrométrico produce movimientos imperceptibles de la platina y sirve para efectuar el enfoque fino y definitivo de la imagen. En la actualidad los microscopios tienen incorporados a los mecanismos de desplazamiento de los tornillos macro y micrométricos, topes de seguridad que impiden que éstos continúen descendiendo indefinidamente y así se evita roturas y daños a la laminilla y a las lentes de los objetivos.

- ❖ **Engranajes y cremallera.** Constituyen mecanismos de desplazamientos de las diferentes partes del microscopio.
- ❖ **Cabezal.** Es un componente situado en relación con el tubo del microscopio que alberga principalmente prismas o espejos que sirven para acondicionar en él dos o más oculares, o sistemas mecánicos que soportan cámaras fotográficas, de vídeo o sistemas de proyección de la imagen.
- b) **COMPONENTES ÓPTICOS:** Son los objetivos, los oculares, el condensador y los prismas. Los tres primeros están constituidos por sistemas de lentes positivos y negativos.
- ♦ **Condensador:** Es el componente óptico que tiene como función principal concentrar y regular los rayos luminosos que provienen de la fuente luminosa (fig. micros. 3).

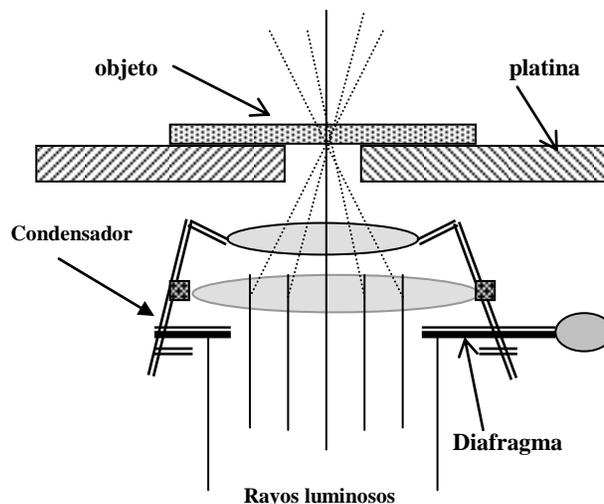


Figura microsc. 3. Diagrama de los principales componentes de un condensador y recorrido de los rayos luminosos.

Está formado por una o dos lentes convergentes que reúnen los rayos luminosos y los orientan hacia la abertura central de la platina. Mediante un mecanismo de cremallera se acerca o aleja de la platina. También tiene incorporado un diafragma iris que regula la entrada de luz. Todo ello con la finalidad de concentrar la mayor cantidad de rayos luminosos en el plano donde está situado el objeto a observar. La mayoría de los condensadores de los microscopios actuales también poseen una apertura numérica que indica la cantidad de luz que puede captar y luego enviar hacia la preparación.

- ❖ **Objetivos.** Los objetivos están considerados los elementos más importantes en la formación de la imagen microscópica, ya que estos sistemas de lentes establecen la calidad de la imagen en cuanto a su nitidez y la capacidad que tiene para captar los detalles de la misma (**poder de resolución**). Están constituidos también por un juego de lentes, en este caso, convergente y divergente, para eliminar, en la medida de lo posible, una serie de aberraciones que afectarían la calidad de las imágenes formadas.

Las lentes se disponen dentro de un soporte o camiseta de metal, en cuyo exterior están inscritas una serie de anotaciones numéricas que indican, como se observa en la figura microsc.4: el aumento propio del objetivo, la apertura numérica, el tipo de material con que están talladas las lentes (de fluorita o semiapocromáticos) o la calidad que tendrán las imágenes, al anularse en la construcción de los objetivos, algunas aberraciones de las lentes (acromáticos, apocromáticos, aplanáticos etc.) o si se debe usar alguna sustancia de inmersión.

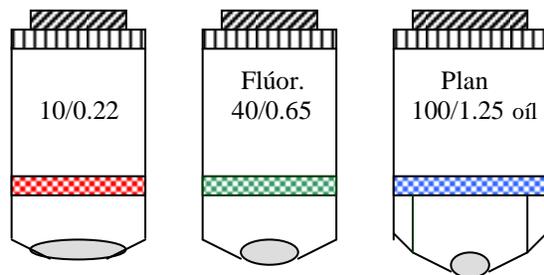


Figura micros. 4. Principales características externas de los objetivos.

Los objetivos se fabrican para ampliar las imágenes de los objetos observados en diversos aumentos; así se tienen objetivos con aumentos propios de 3.5 x, 4x, 10x, 25x, 40x, 65x y 100x. Algunos objetivos tienen alrededor de ellos una línea coloreada que indica a simple vista el aumento propio.

Los objetivos también se clasifican de acuerdo al medio que existe entre el objeto examinado y la lente frontal del objetivo. De acuerdo a esta característica son **secos** o **de inmersión**. Son objetivos secos aquellos que entre el objeto observado y el objetivo solamente existe el aire; en cambio se denominan objetivos de inmersión aquellos que requieren que entre la preparación y la lente frontal del objetivo se coloque una sustancia líquida, ésta puede ser agua, glicerina o un “aceite de inmersión”, natural como el “aceite de cedro” o aceites artificiales.

Otra clasificación de los objetivos se refiere al tipo de corrección al que deben someterse las lentes con la finalidad de disminuir o anular algunas aberraciones que se producen en las lentes, como las aberraciones cromática, de curvatura de campo, astigmatismo y de esfericidad. Dependiendo de las aberraciones corregidas los objetivos pueden ser:

- ❖ **Acromáticos.** Estos objetivos corrigen los rayos luminosos azules y rojos haciéndolos coincidir en un solo plano focal. En tanto que los otros rayos coloreados se forman en otro plano focal generando una imagen cuyos bordes se observan levemente difusos (espectro luminoso secundario). Los objetivos de los microscopios “de estudiante” son acromáticos.
- ❖ **Semiapocromáticos.** Se les conoce también como objetivos de “**fluorita**”, corrigen el espectro secundario dando como resultado imágenes de bordes más nítidos. Por la alta capacidad que tienen para transmitir las radiaciones luminosas de onda corta, se les considera como los objetivos ideales para microscopía de fluorescencia.
- ❖ **Apocromáticos.** En estos objetivos se hacen coincidir en un solo plano los rayos luminosos azules, rojos y verdes, obteniendo así una imagen de bordes sumamente nítidos, pero la corrección de esta

aberración trae consigo la acentuación de otra, que es la de curvatura de campo, pues la superficie focal de la imagen es ligeramente curva, dando como resultado que, al observar la imagen y tratar de enfocarla en la zona central del campo microscópico se desenfoca la zona periférica y viceversa.

- ❖ **Planapocromáticos.** Son los objetivos en los cuales se han corregido la mayor cantidad de aberraciones como la cromática, curvatura de campo, de esfericidad y de astigmatismo; por lo tanto se obtienen imágenes sumamente nítidas y el campo microscópico aparece totalmente plano, enfocado en toda su extensión. Son los objetivos que generan imágenes con mejor resolución, es preferible usarlos cuando se desea obtener imágenes fotográficas (fotomicrografía).

La complejidad en la construcción de los objetivos y el número de lentes que se utilizan aumenta conforme se van corrigiendo más aberraciones. Por ejemplo un objetivo planapocromático suele incorporar en su construcción entre 10 a 12 lentes. Esto, en consecuencia, encarece el costo de ellos.

La imagen que forman los objetivos es **aumentada de tamaño, invertida y real**.

Se mencionó al inicio del acápite que los objetivos están considerados como los integrantes más importantes del microscopio, pues de la calidad de sus componentes depende que, en la imagen generada a través de ellos, se puedan observar una mayor cantidad de detalles. En otros términos, los objetivos son los responsables de ofrecer imágenes mejor resueltas.

La capacidad que tienen los objetivos de formar imágenes en donde se distingan más detalles del objeto examinado depende de una serie de factores como los que se mencionan a continuación:

Índice de refracción: Se denomina así a la relación existente entre la velocidad de la luz en el aire y su velocidad en el medio transparente utilizado. De la misma manera, se pueden obtener los índices de refracción de una serie de sustancias que se utilizan en la construcción y tallado de las lentes de los objetivos.

La velocidad de la luz es de 300,000 Km/sg en el aire. Al atravesar un medio transparente como el vidrio del cual están fabricados las lentes de los microscopios, su velocidad se reduce a 200, 000 km./sg. Por lo tanto el vidrio tendrá un índice de refracción de 1.5; pues el índice de refracción de un objeto o una sustancia transparente se expresa mediante la fórmula:

$$IR = \frac{\text{Velocidad de la luz en el aire}}{\text{Velocidad de la luz en el medio}}$$

A continuación se muestran los índices de refracción de una serie de sustancias transparentes que se emplean en microscopía para construir lentes o como sustancias de inmersión:

- Agua** = 1.3300
- Aceite de inmersión** = 1.5150
- Fluorita** = 1.4340
- Vidrio (crown)** = 1.5200
- Flint** = 1.6600

Angulo de apertura: Es la capacidad de un objetivo de captar los rayos luminosos refractados cuando éstos atraviesan un medio transparente. Cuanto mayor sea este ángulo, la lente frontal del objetivo aceptará una mayor cantidad de ellos (fig. micros. 5).

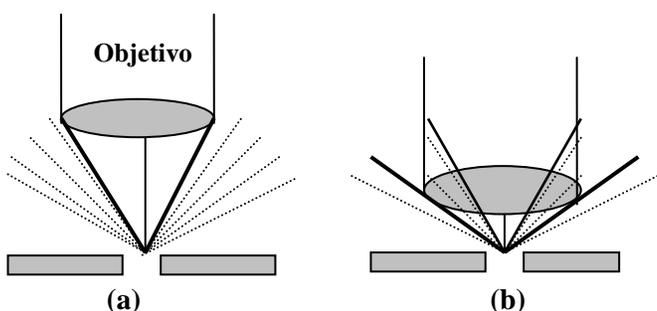


Figura microsc. 5. Rayos luminosos que forman el ángulo de apertura.

En el esquema anterior, el ángulo de apertura de la lente frontal del objetivo capta varios rayos luminosos teniendo como límite los rayos laterales del cono luminoso (líneas continuas), en cambio los rayos periféricos (líneas punteadas) no son aceptados. Esta capacidad de captación está dada fundamentalmente por la distancia que existe entre el objeto y el objetivo. Así, se puede constatar que en la figura 5a el ángulo de apertura es de aproximadamente 50°, en cambio en la figura 5b el ángulo es mucho mayor (95°) donde se observa que la lente logra captar más rayos periféricos.

Dependiendo del índice de refracción del material transparente que forma la lente del condensador, o la interfase (aire o sustancia de inmersión) que exista entre el objeto y la lente frontal del objetivo, el ángulo de apertura será mayor o menor.

Captación de rayos luminosos a través de objetivos secos y objetivos de inmersión. La figuras microsc. 6 y 7 muestran la diferencia en la captación de rayos luminosos de un objetivo (a) donde la interfase es aire y, en el objetivo (b) se ha colocado como interfase una sustancia de inmersión que posee un índice de refracción similar al del vidrio.

Los rayos luminosos que atraviesan el aire se refractan más y por lo tanto su desviación es mayor porque el índice de refracción del aire es igual a 1.0.

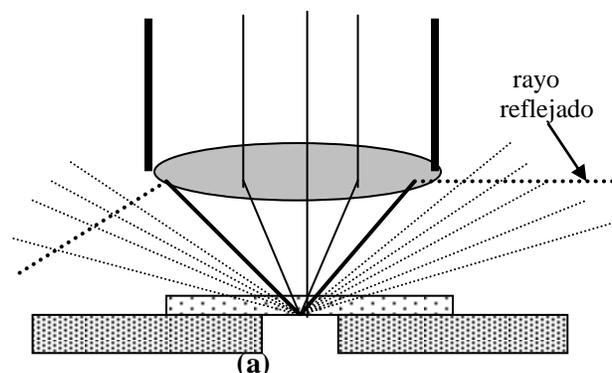


Figura microsc. 6. Trayectoria de los haces luminosos en un objetivo seco.

En la figura 6 los rayos que emergen del objeto, al llegar a esta interfase constituida por aire se refractan o su ángulo de inclinación es tal que sobrepasan el **ángulo crítico** de refracción, por lo que al llegar a la lente frontal del objetivo se reflejan en la superficie y no son captados por la lente.

En la figura (b) el índice de refracción del aceite de inmersión (1.52) es similar al del vidrio (portaobjetos, cubreobjetos y la lente frontal del objetivo) por lo tanto los rayos luminosos periféricos que emergen del objeto no se desvían y pueden ser aceptados por el objetivo, incrementándose de esa manera la cantidad de rayos luminosos que penetran al microscopio.

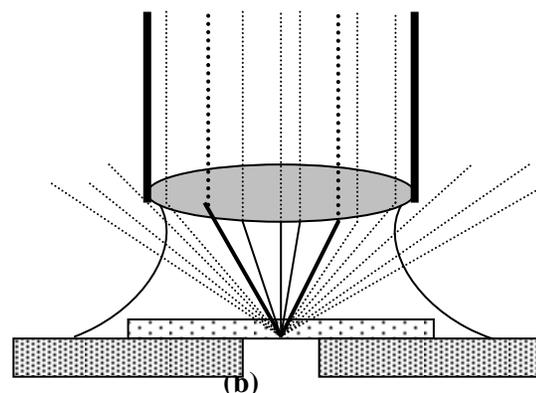


Figura microsc. 6. Trayectoria de los haces luminosos en un objetivo de inmersión.

A la mitad del ángulo de apertura se le denomina alfa (α), por ejemplo si el ángulo de apertura de un objetivo es de 50°, su valor alfa será de 25°. Este valor es importante pues permitirá calcular un factor que tiene que ver directamente con la capacidad del objetivo para formar imágenes que muestren más detalles, es decir mejor resueltas.

Apertura numérica (NA): Es una medida que indica la capacidad del objetivo de poder captar los rayos refractados por las estructuras finas de las cuales está constituido el objeto que se observa. Esta capacidad se traduce en el poder

del microscopio de formar imágenes que muestren al observador una serie de detalles del objeto que se está examinando. Cuanto mayor sea la apertura numérica de un objetivo, éste tendrá una mayor capacidad de mostrar detalles finos en la imagen que forma.

La apertura numérica de un objetivo se calcula empleando la fórmula matemática siguiente:

$$NA = n \times \sin \alpha$$

Donde **n** representa el índice de refracción de la interfase que separa el cubreobjeto de la muestra examinada y la lente frontal del objetivo y **α** es la mitad del ángulo de apertura.

La apertura numérica de un objetivo guarda una relación directamente proporcional con el aumento propio del objetivo **y también con la capacidad que tiene de mostrar mayores detalles**. Por ejemplo en la relación de objetivos que se muestran se puede comprobar lo afirmado referente al aumento del microscopio:

Aumento del objetivo	Apertura numerica
3.2x	0.07
4x	0.10
10x	0.22
10x	0.25
25x	0.45
40x	0.65
63x	0.80
100x	1.25oil

La mayoría de los denominados microscopios de estudiantes que se fabrican en la actualidad vienen implementados (AN y aumentos propios) con los objetivos que están señalados en negritas.

Aumento de un objetivo. Es la capacidad que posee un objetivo de ampliar la imagen del objeto observado. Se define como *la relación entre el tamaño de la imagen y el objeto, en valores lineales (largo y ancho)*.

En la relación anterior, un objetivo que tiene grabado en la camiseta la cifra 10x aumentará 10 veces el tamaño de la imagen del objeto examinado.

Poder de resolución. Se define así la capacidad de un objetivo de poder distinguir *la distancia mínima que debe existir entre dos puntos del objeto para que se puedan visualizar como dos puntos separados*. La calidad de una imagen, en la que se observe la claridad, nitidez y la riqueza de detalles, depende del poder de resolución del objetivo.

El **poder de resolución (PR)** de un objetivo depende de la longitud de onda (λ) del rayo luminoso utilizado y la apertura numérica del sistema óptico del objetivo.

El **PR** (d) se expresa mediante la fórmula de Abbe:

$d = \frac{1.22 \times \lambda}{2 (NA)}$ <p>(a)</p>	$d = \frac{1.22 \times \lambda}{2(NA \text{ objetivo} + NA \text{ condensador})}$ <p>(b)</p>
-----------------------------------------------------	----------------------------------------------------------------------------------------------

$d = \frac{0.61 \times \lambda}{NA}$	$d = \frac{0.61 \times \lambda}{NA \text{ objetivo} + NA \text{ condensador}}$
--------------------------------------	--------------------------------------------------------------------------------

La cifra 1.22/2 ó 0.61 es la constante de Abbe.

Esto significa que si empleamos un objetivo de AN = 1.25 con una longitud de onda de 560nm, el poder de resolución será de 273nm, la cifra obtenida nos indica que el objetivo será capaz de distinguir o resolver la imagen de dos puntos que en el objeto están separados entre sí por 273nm. Si la separación de ellos es menor a esta cifra el objetivo no podrá distinguirlos como dos puntos separados.

La cifra resultante de aplicar la fórmula se denomina **límite de resolución**.

Un cálculo más exacto del poder de resolución se obtiene cuando en la fórmula se añade la apertura numérica del condensador, tal como se observa en la fórmula (b). Cuando se efectúa correctamente la iluminación del objeto utilizando (adecuar la distancia apropiada del condensador y la regulación de captación de la luz abriendo o cerrando el diafragma iris del mismo) la apertura numérica del condensador, la imagen que forma el objetivo logra mostrar el máximo poder de resolución. Por ejemplo si se emplea el mismo objetivo del caso anterior (de AN = 1.25), el mismo tipo de luz ($\lambda = 560\text{nm}$) y se ilumina la muestra con un condensador de AN = 80 es posible comprobar lo mencionado anteriormente.

Al realizar los cálculos correspondientes resulta que el poder de resolución del objetivo, sin tomar en cuenta la AN del condensador, es de 273nm. En cambio cuando se incluye la apertura numérica del condensador el resultado es de 166nm. Estas cifras nos demuestran que cuando se realiza la iluminación del objeto mediante el uso adecuado del condensador, la capacidad del objetivo de resolver detalles mejora casi en un 60% más.

El máximo poder de resolución que se puede obtener es de 0.2 μm aproximadamente, para lo cual se requiere que el microscopio proporcione una imagen de un aumento total de 1000x a 1400x.

OCULAR.

Es otro componente óptico del microscopio, debe su nombre porque la imagen final se observa a través de él acercando el ojo a la lente "ocular" del componente.

Es el encargado de formar una segunda imagen a partir de la imagen primaria que forma el objetivo. La imagen del ocular es de mayor tamaño, virtual y derecho. Esta imagen únicamente amplía un número determinado de veces (5x, 8x, 10x, 12x) a la imagen formada por el objetivo. No añade, por más aumentos propios que posea, ningún detalle a los generados por el objetivo.

En la generalidad de los casos, los oculares están contruidos por dos lentes convergentes (planos convexos). La primera lente se denomina "de campo o frontal", está situada en la parte anterior del ocular (fig. micros.8) y es la encargada de recoger y ampliar la imagen generada por el sistema de lentes del objetivo. La lente posterior, en contacto estrecho con el ojo del observador, se denomina lente "ocular" y es la responsable de aumentar nuevamente la imagen y orientarla hacia el ojo del observador

Los oculares se clasifican, dependiendo de la disposición de las lentes y del diafragma, dentro de la camiseta metálica que los contienen, en:

Oculares negativos de Huygens. Están contruidos por dos lentes plano convexos, con la superficie convexa dirigida hacia abajo. Entre ambos se sitúa un diafragma anular, localizado en el plano focal de las lentes. En este diafragma se puede adherir un puntero o señalador que suele ser elaborado por una pequeña porción de una pestaña o pelo.

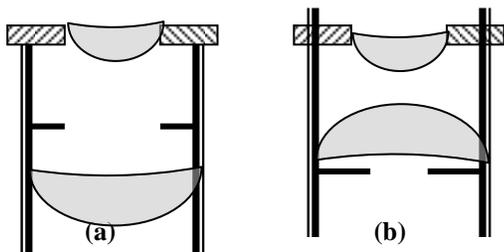


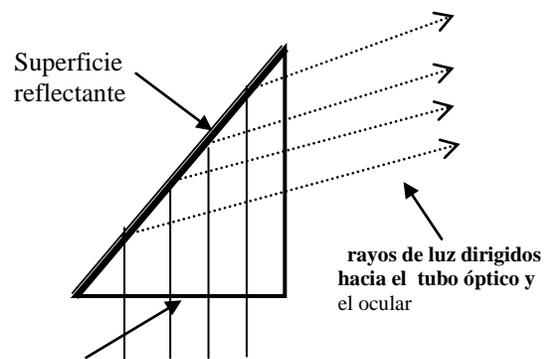
Figura microsc. 8. Diagrama de la disposición de las lentes en: (a) un ocular negativo; (b) en un ocular positivo.

Oculares positivos o de Ramsden. Las lentes planoconvexas están dispuestas con las superficies curvas dirigidas hacia adentro. El diafragma está situado por debajo de la lente de campo o frontal; en el plano donde se forma la imagen formada por el objetivo.

Además de estos oculares, existen otros tipos como los de *campo de visión amplia*; aquellos acondicionados para poder observar con los *anteojos puestos* y otros oculares que generalmente que se usan en los microscopios binoculares, denominados *oculares de compensación*. Éstos

consisten en que uno de ellos posee un sistema de lentes móviles que permite enfocar correctamente la imagen del objeto, después que el enfoque total del microscopio se ha realizado y se nota aún una imagen levemente desenfocada en uno de ellos, generalmente el izquierdo, porque al observar la imagen a través de cada ocular derecho e izquierdo se nota que una de ellas no está enfocada correctamente.

PRISMAS. En los microscopios modernos monoculares o binoculares, se requiere el empleo de prismas, estructuras transparentes que, en el caso de los microscopios monoculares, sirven para desviar los rayos luminosos de la trayectoria rectilínea del eje óptico del objetivo y dirigirlos hacia el tubo óptico ligeramente inclinado y luego hacia el ocular.



Rayos luminosos provenientes del objetivo

Figura microsc. 9. Prisma con superficie reflectante que sirve para desviar los rayos luminosos.

En los microscopios binoculares, los prismas separan los rayos luminosos provenientes del objetivo, en dos haces de luz y los dirigen a cada ocular. En ambos casos existe siempre una superficie reflectante para evitar la descomposición de la luz.

C) COMPONENTES DE ILUMINACIÓN: Se consideran dentro de este grupo a los instrumentos que proporcionan energía luminosa al microscopio. Las fuentes de energía luminosa son de dos tipos natural y artificial.

La **luz natural**, emitida por el sol, se obtiene de manera indirecta mediante un **espejo** que posee una superficie plana y otra cóncava. El espejo está situado en la superficie superior de la base o pie. Un mecanismo especial permite orientarlo hacia un lugar iluminado indirectamente por el sol (una ventana, por ejemplo) y luego dirigir el haz luminoso hacia la lente del condensador.

La **luz artificial** se genera a través de una **lámpara de bajo voltaje** (generalmente de 6 voltios) que, mediante un **reostato** regula la emisión y la intensidad de luz. Al igual que el espejo, este sistema de iluminación se inserta en la base o pie del microscopio.

En los microscopios que poseen un espejo, por carecer de una fuente de luz incorporada, también se puede emplear la luz artificial emitida por una lámpara que proyecta el haz luminoso de la misma manera como se orienta la superficie reflectante del espejo cuando se ilumina el microscopio con luz natural.

FILTROS. En diversas partes del recorrido de haz luminoso, aunque en la mayoría de los casos se sitúan entre la fuente luminosa y el condensador. Tienen por finalidad modificar la longitud de onda de la luz que ilumina el objeto a observar.

Por ejemplo, cuando se utilizan estructuras transparentes (de vidrio, plástico o gelatina) coloreadas que se localizan entre la fuente luminosa y el condensador es necesario emplear filtros azules pues modifican el color ligeramente amarillento que poseen los rayos luminosos que emite las lámparas eléctricas, transformándolos en rayos de luz “blanca”. Este color de luz es más aceptada por la retina y en las preparaciones histológicas coloreadas mejora la distinción de color de las estructuras celulares o tisulares examinadas.

Para ciertos casos de microscopía fotónica especial se requiere el auxilio de filtros especiales como en el caso de los microscopios de fluorescencia, contraste de fases y de polarización.

Dependiendo del fabricante y de los modelos de microscopios, los filtros se colocan en anillos o dispositivos especiales denominados “portafiltros” que, en el caso de los microscopios fotónicos de campo claro (de uso más frecuente), están situados inmediatamente encima de la fuente luminosa o debajo de la lente frontal del condensador.

Aumento total del microscopio fotónico compuesto. El aumento total de la imagen del microscopio compuesto se obtiene multiplicando el aumento propio del objetivo por el aumento propio del ocular:

$$AT = \text{aumento del objetivo} \times \text{aumento del ocular}$$

Aumento útil y aumento vacío del microscopio. La imagen que forma el microscopio fotónico compuesto posee características que permiten ver menor o mayor cantidad de detalles de la misma.

Se observarán más detalles cuanto mejor sea el poder de resolución del objetivo empleado. Ya se ha mencionado que la resolución de la imagen del objeto depende esencialmente de la apertura numérica del objetivo y del tipo de luz que se utilice.

El ocular solamente aumenta la imagen proporcionada por el objetivo sin añadirle a ésta alguna capacidad de resolver mejor los detalles.

Se define como aumento útil de un microscopio cuando al ampliar la imagen del objeto (a través de un juego de objetivo + ocular) se distinguen una serie de detalles, es decir se resuelven mejor las estructuras que lo integran (fig. micros. 10).

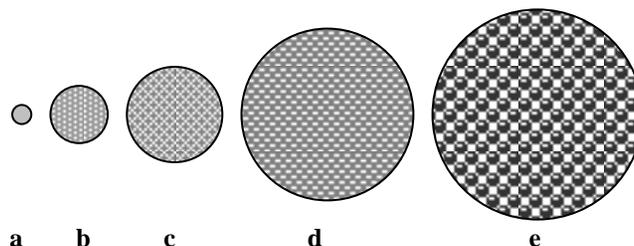


Figura microsc. 10. Imágenes que muestran el poder de resolución de los sistemas objetivo + ocular adecuados (aumento útil).
a) objeto; b) objetivo 4x; c) objetivo 10x, d) objetivo 40x y e) objetivo 100x. Se ha utilizado un ocular de 10x.

Se denomina **aumento vacío** de la imagen de un objeto, aquel que por más ampliación que se haga de la imagen, utilizando oculares de mayores aumentos, se llega a un punto en que ya no se logran distinguir más detalles (fig. microsc. 11).

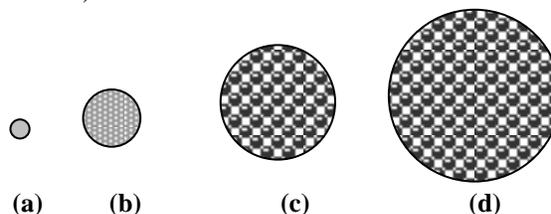


Figura microsc. 11. Imágenes que muestran un ejemplo de aumento vacío. Juego de dos objetivos 4x y 10x y de dos oculares: de 10x y 20x.
a) objeto; b) imagen con objetivo de 4x + ocular de 10x; c) imagen con objetivo de 10x + ocular de 10x y d) imagen de objetivo de 10x + ocular de 20x.

Para obtener el **aumento útil** de una imagen existe un procedimiento que nos indica el juego de objetivos con los correspondientes oculares que se debe utilizar en la ampliación de la imagen.

Una manera sencilla de calcular el aumento útil de un juego de **objetivo + ocular** es multiplicando la AN del objetivo por 1000. La cifra obtenida es el aumento total que debe tener la imagen cuando se multiplica el aumento del objetivo por el aumento del ocular, por ejemplo si se tiene un objetivo de 100x que posee una AN=1.25 el aumento máximo que debe presentar la imagen para ofrecernos la mayor cantidad de detalles es aquel que resultaría de multiplicar $1.25 \times 1000 = 1250$ aumentos, por lo tanto si el objetivo es de 100 ampliaciones debemos usar un ocular de por lo menos 12x, si usamos un ocular de 15x la ampliación de la imagen nos estaría dando un aumento vacío.

Al contrario, si empleamos un ocular de $5x = 500x$, estaríamos frente a un caso de subutilización del poder de resolución del objetivo pues no se lograría el aumento necesario para lograr observar los detalles de la imagen que el objetivo empleado ha logrado resolver.

Los límites que existen para que un objetivo pueda ofrecer al observador un adecuado poder de resolución oscilarían entre las cifras que señalan un máximo poder de resolución equivalente a multiplicar la AN del objetivo utilizado por 1000, y un mínimo poder de resolución útil equivalente a multiplicar la AN del objetivo por 500

PODER DE PENETRACIÓN O DE PROFUNDIDAD DE CAMPO. La imagen que se forma a través del microscopio proviene de un objeto sumamente delgado ($5\mu\text{m}$ a $10\mu\text{m}$ de grosor), que genera varios planos de imágenes: profundos, intermedios y superficiales.

Cuando se examina un tejido con objetivos de bajos aumentos $4x$ ó $10x$ la imagen que se observa puede enfocarse con facilidad con el tornillo macrométrico, sin que se diferencien los planos de enfoque antes mencionados, pero cuando la imagen se forma al emplear objetivos de $40x$ y $100x$, es necesario utilizar el enfoque fino a través del tornillo micrométrico, pues es mucho más evidente que si enfocamos el plano superficial, es probable que al ascender levemente la platina por acción del micrométrico logremos enfocar y visualizar con nitidez el plano focal medio o el profundo.

Por lo tanto, el poder de penetración o de profundidad de los objetivos es inversamente proporcional al aumento propio de los mismos.

Distancia libre de trabajo. Se denomina así a la distancia que existe entre la superficie de la laminilla cubreobjetos y la lente frontal del objetivo. Esta distancia será mayor cuanto menor sea el aumento propio del objetivo y viceversa.

FORMACIÓN DE LA IMAGEN A TRAVÉS DEL MICROSCOPIO FOTÓNICO. La imagen total del microscopio fotónico se forma mediante las imágenes que generan sucesivamente el objetivo y el ocular.

Para que se forme una imagen del objeto observado es indispensable que por lo menos dos rayos luminosos que inciden en el objeto iluminen una porción del mismo.

Tal como se observó en los casos de formación de imágenes, un punto iluminado del objeto transmite dos rayos luminosos: uno, orientado paralelamente al eje principal, se refracta al atravesar la lente del objetivo, en tanto que el otro se traslada en dirección oblicua hacia el centro óptico de la lente y la atraviesa sin refractarse.

En el lugar donde los dos rayos luminosos se interceptan se formará la imagen del punto iluminado. Si del objeto se transmiten dos rayos luminosos por cada punto que lo

constituyen igual numero de puntos luminosos formarán la imagen. Con la diferencia que la imagen será ampliada N número de veces correspondiente al aumento propio que posea el objetivo.

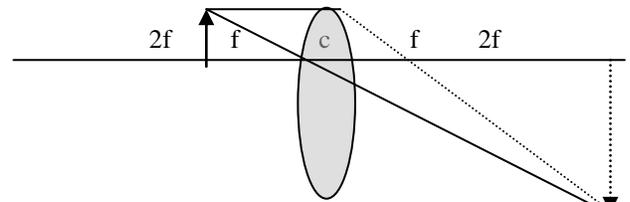


Figura microsc. 12. Características de la imagen formada por el objetivo.

Esta imagen es de **mayor tamaño, real e invertida** (ver figura microsc. 12)

Los otros rayos luminosos que llegan a la lente frontal del objetivo y que no iluminan ningún punto del objeto, al atravesar la lente, le confieren al campo microscópico una iluminación uniforme. A este tipo de iluminación se denomina de **campo claro**.

La imagen generada por el objetivo es captada posteriormente por la lente de campo del ocular y la amplía el numero de veces del aumento que aquel posee.

La imagen formada por el ocular será de **mayor tamaño, derecha con relación a la imagen formada por el objetivo y virtual** (fig. microsc. 13).

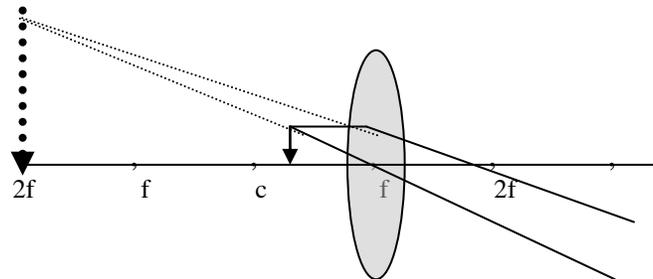


Figura microsc. 13. Características de la imagen formada por el ocular.

La imagen total formada por ambas lentes será: **aumentada de tamaño, invertida y virtual** con relación al objeto. Tal como se esquematiza en la figura Microsc 14.

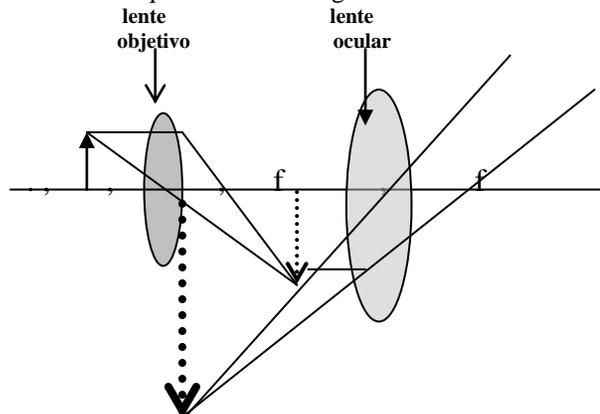


Figura microsc. 14. Características de la imagen total formada por el sistema óptico del microscopio.

TIPOS DE MICROSCOPIOS FOTÓNICOS.

Las características descritas, de los componentes del microscopio fotónico, así como la formación de las imágenes de los objetos observados corresponden al microscopio fotónico de mayor uso en los ámbitos académicos docentes y de investigación el denominado:

Microscopio de transparencia o de campo claro. Este microscopio se caracteriza porque emplea luz natural o luz artificial como energía luminosa para formar las imágenes del objeto que se observa. La imagen muestra puntos o áreas iluminadas (generalmente coloreados) sobre un fondo claro o transparente.

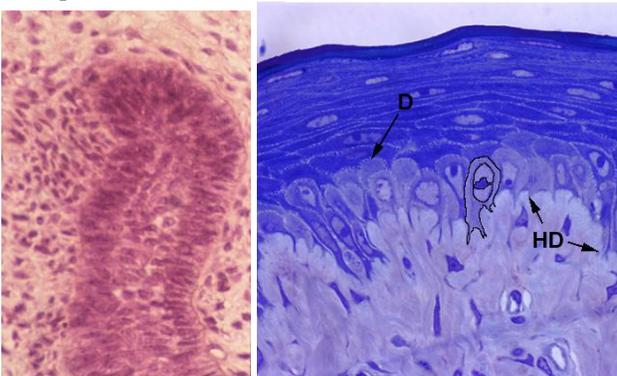


Figura microsc. 15. Las fotomicrografías muestran imágenes de células descamadas del epitelio bucal. a) imagen obtenida de células sin teñir, b) imagen obtenida con células teñidas con azul de toluidina, 400x.

Para que la imagen sea visible con nitidez es necesario que el objeto examinado este coloreado o teñido, es decir que los componentes celulares y tisulares de la estructura se contrasten mediante colorantes específicos que absorban y transmitan determinadas longitudes de onda del espectro visible. Las longitudes de onda que no se absorban son transmitidas al ojo humano o a un material fotográfico sensible dando como resultado que la estructura teñida aparece de un determinado color.

El campo microscópico aparece claro o transparente porque los rayos luminosos directos que provienen del condensador no encuentran en su camino ninguna estructura coloreada y entran como rayos de luz blanca hacia el objetivo. Si se examinan objetos sin colorear la imagen ofrecerá detalles poco contrastados, casi transparentes.

Las secciones de tejidos deben ser delgadas con un grosor de 5 μm a 10 μm . Se puede emplear secciones de mayor espesor pero la imagen no mostrará un buen poder de resolución y tampoco exhibirá contornos nítidos, pues en el campo microscópico se observarán varios planos superpuestos de las imágenes.

Microscopio de campo oscuro. Se denomina así por que La imagen que se forma está constituida por una serie de estructuras brillantes sobre un fondo oscuro.

El principio óptico de este microscopio es el de aprovechar un conjunto de rayos luminosos oblicuos que inicialmente no entran a la lente frontal del objetivo, observándose el campo microscopio totalmente oscuro.. Para que esto ocurra se requiere en primer lugar que *la apertura numérica del condensador sea mayor que la apertura numérica del objetivo*. Esta condición facilita que los rayos luminosos directos provenientes de la fuente luminosa sean impedidos de entrar a la porción central de la lente del condensador y solo penetren y emerjan de él, los rayos periféricos que al refractarse se hacen oblicuos.

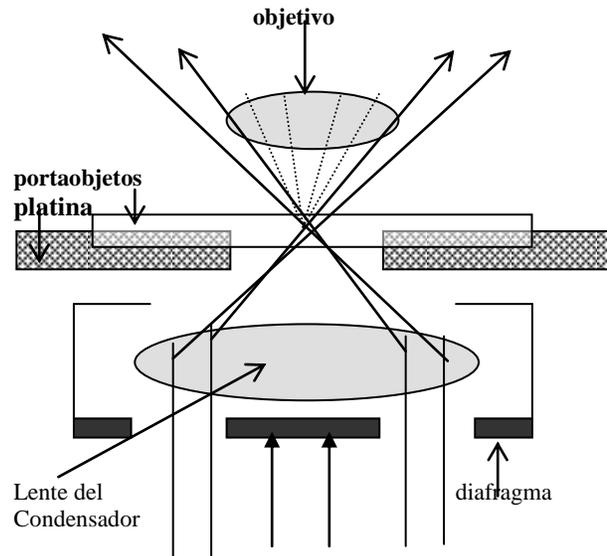


Figura microsc. 16. Diagrama que representa el recorrido de los rayos luminosos, en el sistema óptico del condensador y la desviación de los rayos luminosos oblicuos, en el microscopio de campo oscuro.

Cuando estos rayos oblicuos encuentran en su recorrido, alguna partícula, son desviados hacia la lente frontal del objetivo y la imagen de la partícula se observa brillante en medio de un fondo oscuro.



Figura microsc. 17. Imagen células, fotografiadas mediante el microscopio de campo oscuro.

Existen diversos tipos de condensadores diseñados y fabricados especialmente para la microscopía de campo oscuro.

Una manera sencilla de fabricar un diafragma que produzca campo oscuro en un microscopio de estudiante es elaborar con una cartulina negra un diafragma que se coloca debajo del condensador del microscopio (ver fig. microsc.18).



Figura microsc. 18. Esquema que muestra la manera de fabricar un diafragma para producir campo oscuro en un microscopio fotónico.

El microscopio de campo oscuro se emplea para ver células vivas (protozoarios, bacterias, células descamadas, etc.) en las cuales no se han aplicado sustancias fijadoras ni colorantes. También se observan partículas de un tamaño inferior a los 0.2 de micrómetro; esto se debe a que los rayos de luz oblicuos que inciden en ellas forman un halo luminoso brillante alrededor de las mismas. Mediante el empleo de este microscopio se distinguen con facilidad la forma y el movimiento helicoidal que muestra la espiroqueta *Treponema pallidum*, una bacteria causante de la sífilis.

MICROSCOPIO DE CONTRASTE DE FASES. Es el microscopio fotónico más utilizado para observar objetos o estructuras transparentes sin teñir. Al igual que el microscopio de campo oscuro facilita la observación de células vivas para distinguir y analizar sus componentes morfológicos y ciertas funciones que ellas puedan desarrollar (fagocitosis, mitosis, movimientos ameboides, ciliares o flagelares, etc.).

El principio óptico de este microscopio consiste en la capacidad que tiene para transformar, en los objetos transparentes, los pequeños índices de refracción que cada uno de sus componentes posee en diferencias de intensidad luminosa, ofreciendo imágenes donde las estructuras del objeto aparecen contrastadas en tonos oscuros o tonos brillantes y tonos intermedios.



Figura microsc. 19. Imagen células, fotografiadas mediante el microscopio de contraste de fases.

Cuando se trató en el tema de óptica, los índices de refracción, se afirmó que un rayo luminoso retrasaba su velocidad cuando atravesaba una sustancia transparente que poseía un índice de refracción mayor que el aire ($n = 1.00$). Los componentes celulares y tisulares de muestras sin teñir no son fácilmente observables por el ojo humano porque sus índices de refracción que posee cada uno de ellos, son de escasa diferencia entre sí. Los rayos luminosos que los atraviesan suelen retardar su recorrido en un $\frac{1}{4}$ ó $\frac{1}{2}$ longitud de onda, dependiendo de sus correspondientes índices de refracción, respecto a los rayos luminosos directos que en su recorrido no encuentran estructura alguna, por lo tanto el microscopio de contraste de fases utiliza la propiedad que tienen dos ondas luminosas desfasadas de interferir entre ellas para generar imágenes contrastadas por la mayor o menor intensidad luminosa que exhiban sus componentes.

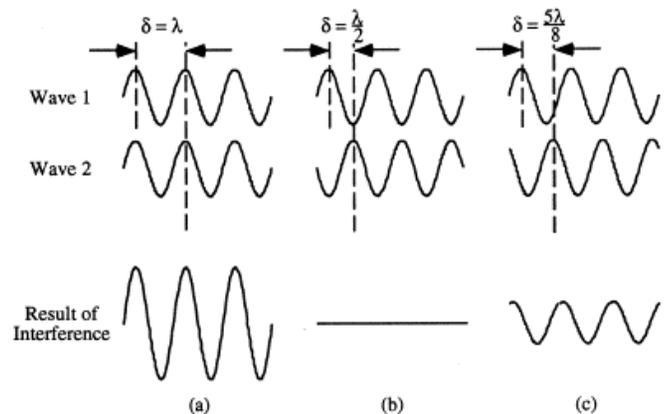


Figura microsc.20. Recorrido de dos ondas luminosas para mostrar el efecto de interferencia en: a) cuando las ondas de luz se encuentran en fase; b) cuando las ondas están desfasadas en $\frac{1}{2}$ longitud de onda y c) en un $\frac{1}{4}$ de longitud de onda.

De acuerdo a la construcción especial de ciertos aditamentos (anillo de fases y placa de fases) que posee el microscopio de contraste de fases, es factible que el sistema separe los dos rayos luminosos que inciden y emergen del objeto (el directo y el refractado) para que, de manera artificial, el rayo refractado retrase su recorrido mas o menos a la mitad de longitud de onda y cuando estos rayos de luz se interfieren puedan anularse ofreciendo una porción oscura de la imagen es decir disminución de la intensidad luminosa en un fondo iluminado formado por los rayos luminosos directos (fig. microsc. 19 21).

El microscopio de contraste de fases requiere de un condensador especial que contiene en su interior el diafragma con el anillo de fases adecuado para cada tipo de objetivos y éstos que alberguen placas de fases localizadas en el plano focal de los mismos.

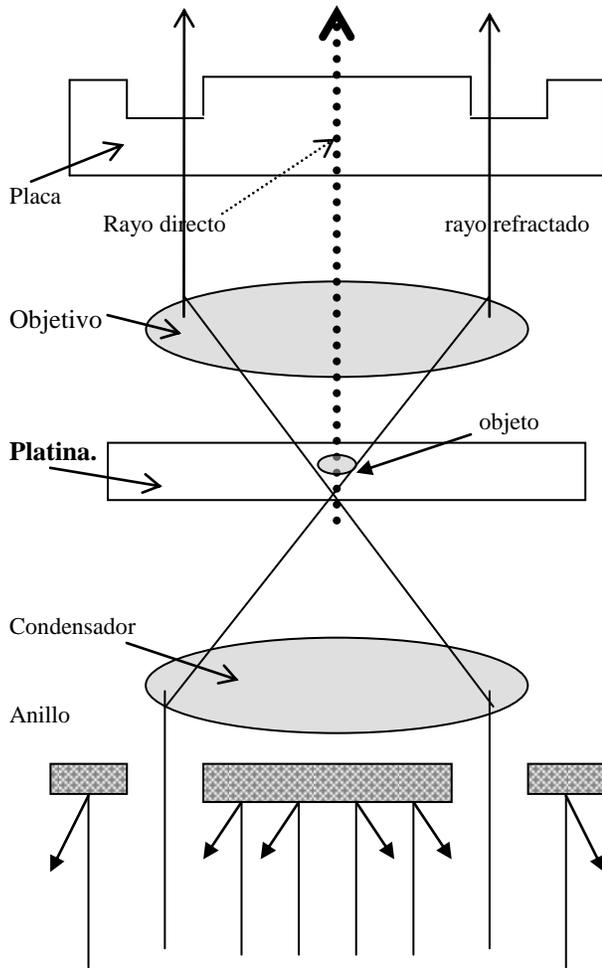


Figura microsc. 21. Diagrama que muestra la trayectoria de los rayos luminosos a través de los componentes ópticos del microscopio de contraste de fases.

MICROSCOPIO DE CONTRASTE INTERFERENCIAL DIFERENCIAL (CID) O DE NOMARSKI.

Este tipo de microscopio fue diseñado y construido basándose en los principios ópticos semejantes al microscopio de contraste de fases, porque la imagen se genera utilizando las diferencias de fase de los rayos luminosos que atraviesan el objeto observado.

La diferencia con el microscopio de contraste de fases radica en que el sistema óptico, mediante un filtro especial (de luz polarizada) hace vibrar las ondas de luz en un solo plano, más o menos en un ángulo de 45°; estas ondas de luz polarizada se dirigen a un prisma especial (de Wollaston # 1) donde en la primera parte del prisma, se dividen en dos ondas luminosas que vibran ahora en dos planos diferentes de 90° entre ellas, pero ligeramente desfasadas, emergen, después de atravesar la segunda parte del prisma, como dos ondas luminosas separadas pero ahora en fase y se dirigen al objeto para que iluminen puntos muy cercanos y los

atraviesen (Las zonas iluminadas pueden tener índices de refracción homogéneas, una zona homogénea y otra con un IR diferente o bordes de estructuras con diferentes IR, etc.). En cualquiera de los casos, la onda luminosa que atraviesa el objeto se retrasará con relación a la otra onda que no lo atraviesa, la cual servirá como referencia.

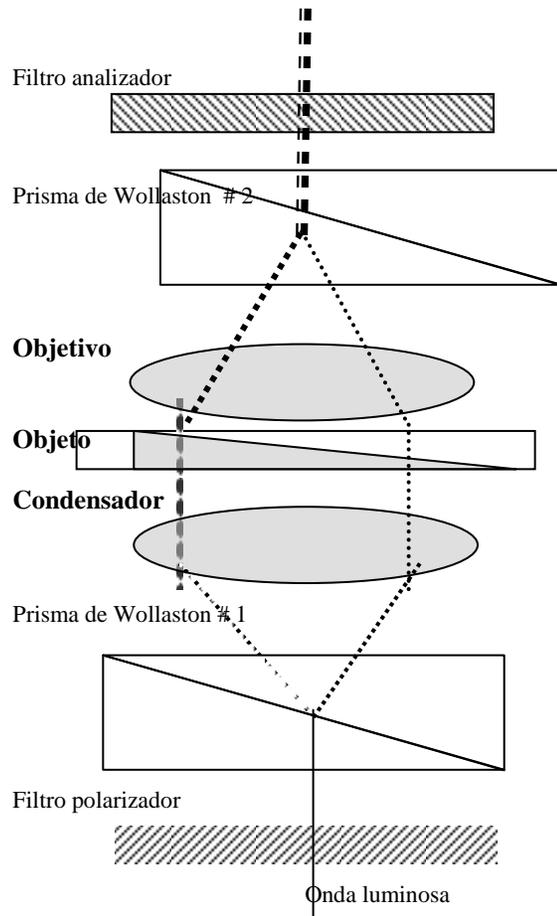


Figura microsc. 22. Diagrama que representa los componentes ópticos del microscopio CID y el recorrido de los rayos luminosos.

Considerando que el retraso está en relación directa con el grosor del objeto y con su índice refracción, el valor del retraso se puede emplear para determinar la masa por unidad de superficie del material observado, células por ejemplo y, por lo tanto la masa de sus componentes.

Las ondas luminosas que emergen del objeto entran al prisma de Wollaston # 2 (cuya estructura cristalográfica tiene una posición invertida con respecto al prisma # 1) y colocado ligeramente descentrado del eje óptico del microscopio. Las dos ondas que estaban desfasadas empiezan a ponerse en fase en la primera mitad del prisma, pero luego en la segunda parte vuelven a desfasarse un $\frac{1}{4}$ de longitud de onda y así salen del prisma, pero no pueden interferirse porque vibran en planos distintos. Se dirigen al analizador, otro filtro de polarización con su estructura cristalográfica perpendicular al primer filtro de polarización,

encargado de hacer rotar el plano de las dos ondas luminosas, los hace coincidir y se produce la interferencia. De esta manera se observa una ligera diferencia de intensidad entre la zona que fue atravesada del objeto y la porción homogénea o de menor índice de refracción que se muestra con una mayor intensidad luminosa.

Si la primera zona es un borde, por ejemplo, de una célula o de una estructura intracelular y la segunda zona es homogénea o de menor índice de refracción se observará un borde muy brillante o luminoso rodeado de una zona menos iluminada, dando el aspecto de una imagen tridimensional.

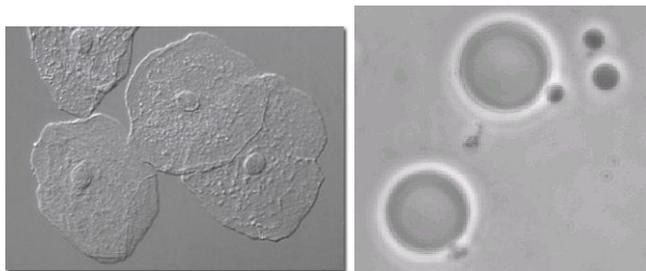


Figura microsc. 23. **Imágenes obtenidas mediante el microscopio de contraste interferencial diferencial o de Nomarsky.** a) eritrocitos normales y crenados. B) células descamadas del epitelio bucal.

El borde brillante se forma en un lado del objeto, en el otro lado ocurre un proceso inverso, el borde se oscurece y el ámbito que lo rodea muestra cierta brillantez. La imagen que se forma da la sensación visual de bajorrelieve o de un “aspecto tridimensional” (fig. microsc. 23).

MICROSCOPIO DE LUZ POLARIZADA.

Una serie de componentes biológicos, vegetales y animales, celulares o tisulares están constituidos por moléculas que por su organización cristalina, paracristalina o fibrilar en su estructuración bioquímica, adoptan determinada orientación en el espacio.

Estas estructuras orientadas en el espacio con un arreglo molecular especial, interactúan con las ondas luminosas que incidan en ellas de formas muy variadas, dependiendo de cómo ese objeto está orientado. Así, los índices de refracción del objeto serán diferentes dependiendo de los ejes de rotación del objeto. Un objeto con ejes que poseen varios índices de refracción se denomina **birrefringente**. Por la disposición espacial de los átomos y moléculas también se denominan **anisotrópicos**.

La **birrefringencia** resulta de la alineación de átomos o moléculas en un determinado plano del objeto. Estos átomos y moléculas interactúan intensamente con ondas luminosas que incidan en ellos desde una determinada dirección, haciendo que el plano de vibración de las ondas luminosas pueda ser modificado o rotado hasta en un ángulo de 45°. Las estructuras birrefringentes cuando son iluminadas con luz polarizada brillarán intensamente sobre

un fondo oscuro; en cambio su respuesta a la iluminación será muy débil o nula cuando las ondas luminosas incidan desde una dirección diferente y éstas no puedan ser modificadas en su plano de vibración.

La **birrefringencia** de una estructura depende de la disposición asimétrica regular de sus moléculas o iones, por ejemplo cristales de fosfatos y carbonatos de calcio (cristales de hidroxiapatita) del tejido óseo o ciertas inclusiones celulares como los granos de almidón (**birrefringencia cristalina o intrínseca**) o una disposición regular de unidades submicroscópicas asimétricas como los miofilamentos de miosina de las fibras musculares estriadas, los microtúbulos del huso acromático (**birrefringencia de forma**).

Se denominan estructuras **monorrefringentes** o **anisotrópicos** aquellas cuyo arreglo molecular les confiere un mismo índice de refracción. Esta disposición espacial impide que las ondas luminosas polarizadas puedan ser giradas.

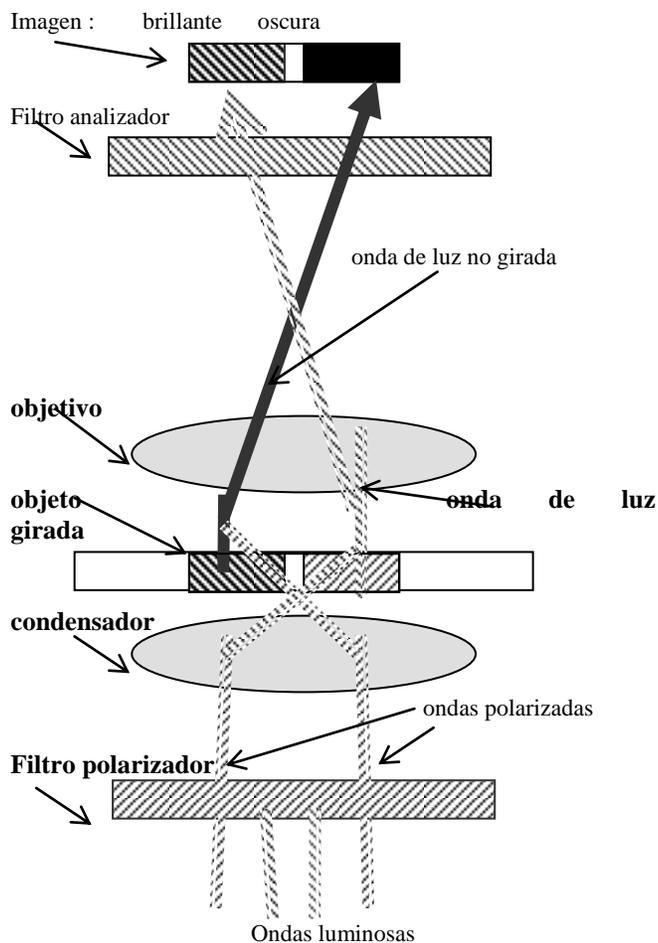


Figura microsc. 24. **Diagrama que muestra el recorrido de los rayos luminosos en el microscopio de polarización y la birrefringencia que exhibe la estructura molecular del objeto.**

Para analizar la anisotropía o birrefringencia de una estructura celular o tisular se utiliza el microscopio de luz

polarizada. Este microscopio se caracteriza porque posee entre el recorrido de los rayos luminosos dos filtros o prismas polarizadores. Uno de ellos (*filtro polarizador*) está localizado después de la fuente luminosa y antes del objeto, es el filtro encargado de polarizar la luz; el otro se localiza posterior al objeto (filtro *analizador*).

Las rejillas moleculares de cada filtro se disponen, en el microscopio de polarización, perpendiculares entre sí. Esto significa que si iluminamos el microscopio y observamos el campo microscópico, éste aparecerá totalmente oscuro, en cambio si en la platina colocamos un objeto birrefringente (fibras musculares estriadas, células vegetales conteniendo cloroplastos, células animales en mitosis, fibras colágenas, granos de almidón, etc.) la estructura cristalina o paracristalina de sus moléculas harán rotar el plano de luz polarizada que se transmitió entre ellas y lo harán coincidir con el arreglo molecular de la rejilla del filtro analizador, por lo tanto el objeto birrefringente aparecerá brillante sobre un fondo oscuro. Se emplea también para observar células y organismos microscópicos vivos.

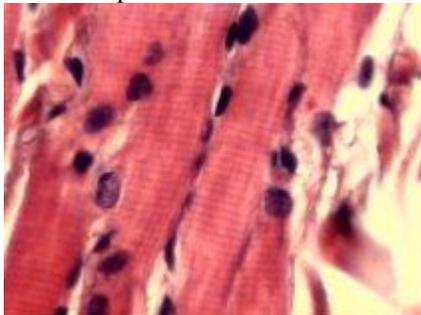


Figura microsc. 25. Fotomicrografía de una fibra muscular estriada esquelética mostrando bandas estriadas birrefringentes (anisotrópicas) y monorrefringentes (isotrópicas). La birrefringencia se debe a la disposición espacial que poseen los filamentos de miosina.

MICROSCOPIO DE FLUORESCENCIA O DE RADIACIÓN ULTRAVIOLETA.

Ciertas sustancias naturales o artificiales poseen la propiedad que cuando son estimuladas por energía de cierta longitud de onda (por ejemplo energía radiante invisible como la radiación ultravioleta o radiación luminosa violeta o azul) absorben esta energía y emiten fotones que integran ondas visibles de luz, de longitudes de onda siempre mayores que las ondas con las que fueron excitadas. Este fenómeno se denomina fluorescencia. La luz emitida se observa en forma de destellos coloreados sobre un fondo oscuro (fig. microsc.26).

La condición esencial para que se produzca fluorescencia es que la longitud de onda de la energía radiante excitatoria sea menor que la longitud de onda emitida.

La propiedad de generar fluorescencia es propia de ciertas estructuras celulares animales o vegetales. Por ejemplo la clorofila cuando es excitada por radiación ultravioleta emite radiación visible de color rojo. La vitamina “D” contenida

en células animales como los hepatocitos resplandece de un color blanco brillante.

Existen una serie de sustancias colorantes artificiales que también emiten fluorescencia cuando son excitadas. Estas sustancias se denominan “*fluorocromos*”.

Los fluorocromos se emplean para demostrar una serie de componentes celulares o tisulares pues al unirse de manera específica a algunos de ellos y ser excitados por radiación ultravioleta o longitudes de onda menores (azul, violeta) resplandecen ofreciendo imágenes de colores diferentes, generalmente de longitudes de ondas azules, verdes, amarillas, naranjas o rojas. Uno de los fluorocromos más conocidos es el naranja de acridina. Por ejemplo cuando se “colorean” células o tejidos con este fluorocromo es posible demostrar de manera específica ácidos nucleicos: El **DNA** emite radiación verde-amarillenta y el **RNA** fluoresce de color rojo.

Existen dos tipos de fluorescencia:

- a) *natural o autofluorescencia* se produce cuando determinadas estructuras o sustancias animales o vegetales, al ser excitadas con radiación ultravioleta irradian fluorescencia. Los ejemplos citados en párrafos anteriores (clorofila, Vitamina “D”, etc.), el pigmento flavina, componente del semen también es autofluorescente, corroboran lo mencionado.
- b) *fluorescencia artificial*. Es aquella que irradian, de manera específica, determinadas estructuras celulares o tisulares cuando son “coloreadas” por fluorocromos” y observadas a través del microscopio de fluorescencia. La fluorescencia artificial se aplica mediante dos procedimientos:

- ❖ *Procedimiento directo* que consiste en unir directamente el fluorocromo, a ciertos componentes de las células o tejidos; por ejemplo, el *naranja de acridina* con los ácidos nucleicos. La *auramina* con los bacilos de la tuberculosis (en este caso el *Mycobacterium tuberculosis* fluoresce de color amarillo dorado). En otros casos es posible inyectar soluciones de fluorocromos vitales al interior de las células para observar el transporte de sustancias de una célula a otra.

- ❖ *Procedimiento indirecto*. Para que se produzca fluorescencia es indispensable que el fluorocromo se ligue a una determinada sustancia proteínica, mediante enlaces covalentes (conjugados), la cual mediante la reacción inmunológica *antígeno* (componente que se desea identificar) - *anticuerpo* (sustancia ligada con el fluorocromo), se unirán de manera específica. Por ejemplo se ligan fluorocromos con anticuerpos anti-tubulina y el conjugado se vierte en un cultivo de tejidos. Gracias a este procedimiento se puede observar el huso acromático (constituido por microtúbulos) de las células

en proceso de mitosis. Así mismo se conjugan fluorocromos a anticuerpos anti-actina o anti-miosina para demostrar el citoesqueleto de células como macrófagos o fibroblastos u observar la disposición de los miofilamentos de actina y miosina en las fibras musculares.

La microscopía de fluorescencia ha permitido avanzar de manera sorprendente en la investigación de procesos fisiológicos celulares que mediante otros procedimientos no hubiera sido posible realizar. La fluorescencia permite demostrar, por la radiación luminosa que emiten, partículas sumamente pequeñas que con otros tipos de microscopios fotónicos no son fáciles de visualizar. En este tipo de procedimiento es indispensable obtener el registro fotográfico de las imágenes obtenidas.

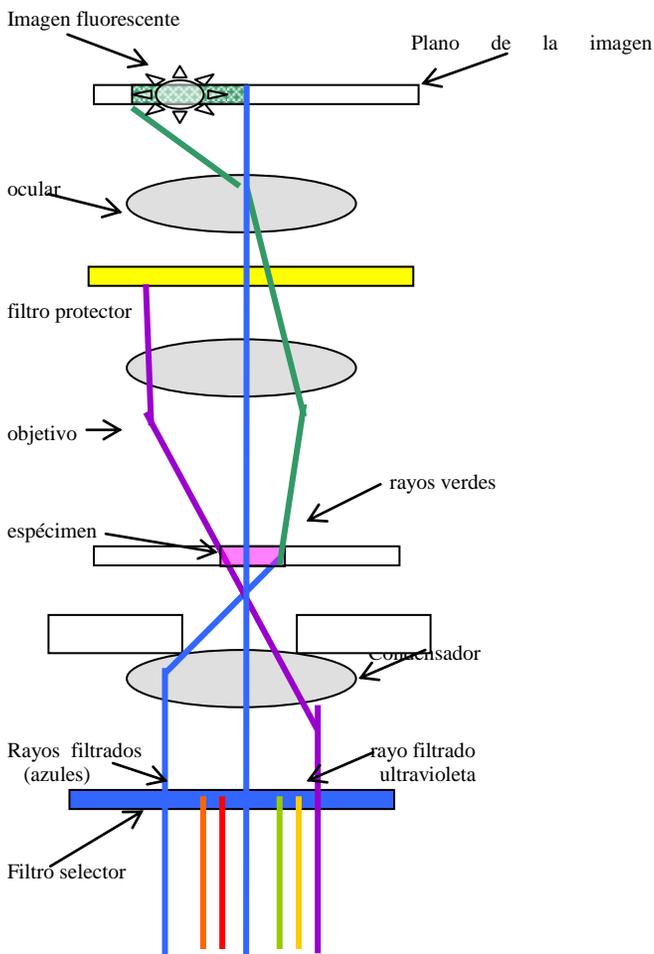


Figura microsc. 27. Diagrama que representa los principales componentes del microscopio de fluorescencia por transparencia y el recorrido de los rayos luminosos.

El microscopio de fluorescencia consta de los mismos componentes de un microscopio fotónico al que se le añaden varios aditamentos (fuente luminosa y filtros especiales) con la finalidad de que emita, de manera selectiva, radiaciones de determinadas longitudes de onda: radiación ultravioleta u ondas luminosas de color violeta, azul, ó verde.

Existen dos tipos de microscopio de fluorescencia: aquel en el cual las radiaciones excitatorias atraviesan la muestra a observar, se le denomina *microscopio de fluorescencia de transmisión o de transparencia*. Este tipo de microscopio casi está en desuso. Y el denominado *microscopio de epifluorescencia* donde la radiación excitatoria es aplicada sobre la muestra a través de un sistema incorporado al objetivo. La radiación no atraviesa el espécimen. Los aditamentos son:

- ❖ **Fuente luminosa** de gran potencia que preferentemente emita radiaciones UV, violeta, azul y verde.
- ❖ **Filtros selectores o excitadores** encargados de filtrar y seleccionar las ondas radiantes de aquellas que no se desean emplear.
- ❖ **Filtro protector o de barrera.** Es un filtro de color amarillo; está localizado entre el objetivo y el tubo óptico. Es indispensable utilizarlo para bloquear algún tipo de radiación ultravioleta que pueda haberse transmitido o reflejado y que no ejerció en la muestra actividad excitatoria (la radiación UV posee una alta energía que puede irritar e inflamar los tejidos del globo ocular).
- ❖ **Objetivos de fluorita.** Los objetivos cuyas lentes están contruidos por silicatos (vidrios de flint o de crow) poseen autofluorescencia, por lo que es necesario reemplazarlos por objetivos de fluorita. En el caso del microscopio de epifluorescencia, los objetivos están diseñados y contruidos para que ellos también funcionen como lentes condensadores proyectando la energía radiante uniformemente sobre la muestra.
- ❖ **Espejo divisor de haces.** Es un aditamento propio de este tipo de microscopio. Está situado en posición oblicua por encima del objetivo. Sus características físicas solamente le permiten reflejar, hacia el espécimen la longitud de onda filtrada y seleccionada. Radiaciones que no fueron bloqueadas por el filtro excitador atraviesan el espejo divisor y continúan su trayectoria sin ser reflejados.

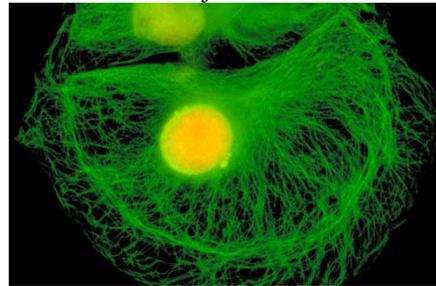


Figura microsc. 26. Fotomicrografía de estructuras celulares que muestran fluorescencia.

Imagen fluorescente → plano de la imagen ←

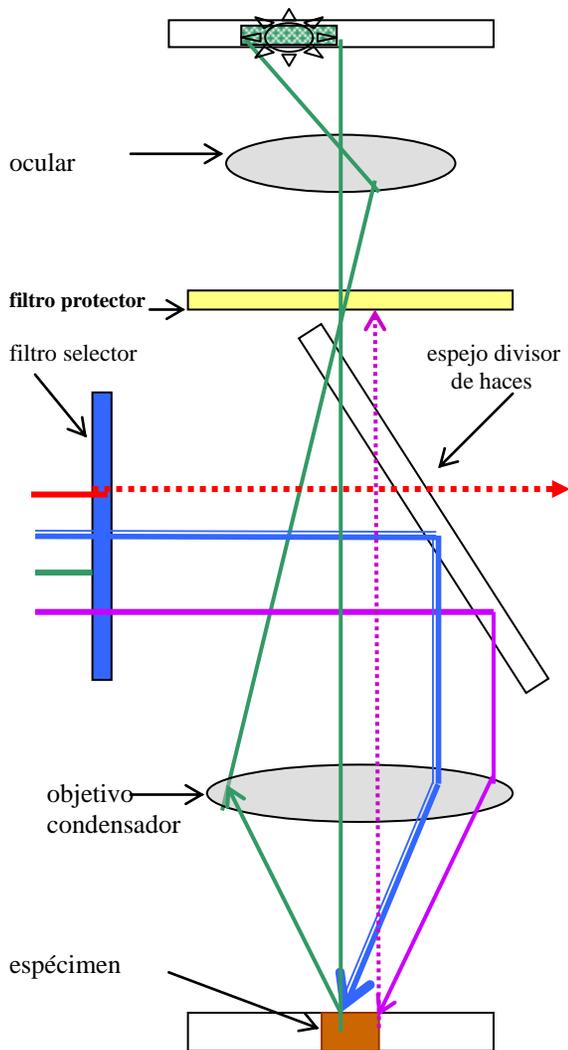


Figura microsc. 28. Diagrama que representa los principales componentes del microscopio de epifluorescencia y el recorrido de los rayos luminosos.

MICROSCOPIO TRIDIMENSIONAL DE RASTREO CONFOCAL.

Las imágenes obtenidas con los microscopios de fluorescencia, de transmisión y de epifluorescencia, tienen el inconveniente que no siempre muestran una resolución y una nitidez deseada, ya sea porque los especímenes examinados son demasiado gruesos (los componentes que fluorescen muestran varios planos focales, los que al superponerse exhiben una imagen desenfocada) o porque durante el proceso de preparación de la muestra y su observación posterior el fluorocromo tiende a ser fotooxidado por la energía radiante que lo excita y su capacidad de generar luminiscencia se pierde con rapidez; en otros casos suele difundirse lentamente y el contorno del espécimen aparece levemente difuso. Si la muestra exhibe zonas sumamente pequeñas que reaccionan al fluorocromo, el resplandor o el brillo de la imagen suele ser muy débil sobre un fondo del campo microscópico totalmente oscuro.

Esto obliga a que para obtener las imágenes fotográficas se requiere tiempos de exposición bastante prolongados (a pesar de existir material fotográfico con velocidades de exposición sumamente rápidas) lo que ocasiona que se presenten los inconvenientes mencionados anteriormente.

Ante estos inconvenientes se ha logrado diseñar y construir un microscopio denominado *microscopio fotónico tridimensional de rastreo confocal*, a través del cual se obtienen imágenes, preferentemente fluorescentes, sumamente nítidas, con una gran capacidad de resolución y sin que se produzca la fotooxidación del fluorocromo. El mecanismo de acción de este microscopio se basa en la iluminación de la muestra con un delgado *rayo laser* concentrado en un foco que recorre con rapidez, punto por punto, todos los componentes del espécimen, a una profundidad microscópica constante, de tal manera que se ilumina un plano muy delgado (plano óptico), aproximadamente calculado entre 0.5 a 0.8 de micrómetro.

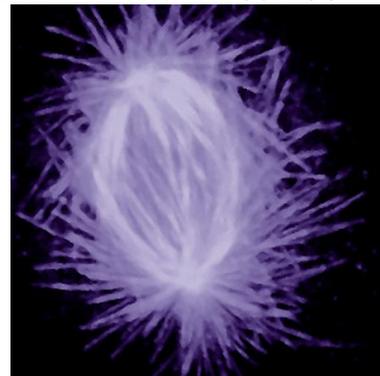


Figura microsc. 29. Imagen de una fase de la mitosis obtenida mediante microscopio tridimensional confocal.

La imagen así obtenida se recoge en un monitor y se guarda en la memoria de un procesador, el cual junta las imágenes de otros planos, inferiores o superiores hasta integrarla en una sola imagen de contornos sumamente nítidos y con una gran exhibición de detalles que, en otras condiciones, no serían posibles de observar. Mediante el sistema computarizado la imagen compuesta se puede observar en tres dimensiones e inclusive puede rotarse para ser visualizada desde diferentes ángulos.

MICROSCOPIO ELECTRÓNICO.

El microscopio fotónico tiene una capacidad máxima de mostrar detalles de la imagen de un objeto (poder de resolución), cuando entre ellos existe una distancia aproximada de 0.2 de micrómetro. Este tipo de microscopio es incapaz de ofrecer un poder de resolución mayor porque existen dos factores limitantes: la longitud de onda (λ) de la energía luminosa utilizada y la apertura numérica (A.N.) de la lente del objetivo.

La única manera de aumentar el poder de resolución de un microscopio era encontrar energía radiante con longitudes de onda menores a las que posee el espectro radiante visible.

En 1930, el físico De Broglie, basándose en estudios teóricos predijo que los electrones, emitidos bajo ciertas circunstancias, como en el vacío, por ejemplo, podían desplazarse y comportarse como ondas de energía. Comprobada esta teoría, entre 1932 y 1934, Knoll y Ruska, junto con otros científicos desarrollaron un microscopio electrónico, en el que mediante la aplicación de energía eléctrica de alto voltaje a un electrodo metálico, se emitían haces de electrones con longitudes de onda que en un principio no lograron superar el poder de resolución del microscopio fotónico pero que, en el año de 1938, después de una serie de innovaciones como el fabricar y adicionarle un condensador que orientaba, concentraba y aceleraba la marcha del haz de electrones emitidos, les permitió alcanzar imágenes con un poder de resolución cercano a los 10 nanómetros (100Å).

La longitud de onda de los electrones emitidos por el electrodo metálico (cátodo), depende del voltaje aplicado, es decir, a mayor voltaje utilizado menor será la longitud de onda del haz de electrones. La relación de λ con el poder de resolución del microscopio electrónico es:

- ❖ Con 10 kilovoltios (kV) de aceleración, se produce una longitud de onda (λ) de 0.001nm que genera, a su vez, una resolución de 10 nm.
- ❖ Con 100 kV, la λ es igual a 0.0004 nm y el poder de resolución es de 4 nm.
- ❖ Con 1000 kV, la λ es igual a 0.0001 nm y el poder de resolución es de 1 nm.

Los haces de electrones emitidos por el cátodo se desplazan en todas las direcciones del espacio, por lo tanto es necesario reorientarlos y acelerar su desplazamiento. Esto se consigue con un ánodo colocado en las cercanías de la emisión que genera un alto potencial eléctrico positivo.

Existen dos tipos de microscopios electrónicos: el **ME de transmisión** y el **ME de barrido** (scanning).



Figura microsc. 30. Fotografía de un microscopio electrónico de transmisión.

MICROSCOPIO ELECTRÓNICO DE TRANSMISIÓN.

Fue diseñado y construido basándose en los mismos principios de un microscopio fotónico; con la diferencia que en vez de usar energía luminosa emplea haces de electrones y reemplaza las lentes ópticas (de vidrio) por “lentes” construidas mediante campos electromagnéticos.

En la figura microsc. 31 se representan los principales componentes del M.E. de transmisión, los cuales son:

- ❖ **Un cátodo**, constituido por un filamento de alambre de tungsteno que se calienta e irradia un chorro de electrones cuya velocidad y longitud de onda están relacionadas con el voltaje de la energía eléctrica que se le aplica.
- ❖ **Un ánodo**, encargado de orientar los haces de electrones, reagruparlos y acelerar su recorrido.
- ❖ **“Lente” condensadora (primer campo electromagnético)**. Los haces de electrones provenientes del ánodo son concentrados por este primer campo electromagnético y dirigidos hacia el
- ❖ **Soporte de la muestra**, en este lugar, dependiendo de la densidad que posean los componentes del espécimen los haces de electrones los atraviesan, son absorbidos, reflejados o son desviados en su recorrido. Las muestras deben ser secciones sumamente delgadas para permitir el paso de los electrones. Generalmente se utilizan secciones de tejidos del orden de 20 a 100 nanómetros. El escaso grosor del espécimen dificulta la formación de la imagen por lo que es necesario “teñir” o contrastar las secciones con soluciones de sales de metales pesados (plomo, uranio, plata o vanadio), los cuales tienen cierta afinidad por determinados componentes celulares.
- ❖ **“Lente” objetivo (segundo campo electromagnético)**. Los electrones que atraviesan la muestra o los desviados por los componentes de la misma, llegan a esta zona donde son enfocados para formar una imagen ampliada. Esta imagen es recogida por la Pantalla fluorescente o placa fotográfica
- ❖ **“Lente ocular” o de proyección (tercer campo electromagnético)** que vuelve a enfocar la imagen y la proyecta, ampliada también numerosas veces, hacia la *pantalla fluorescente*. Ésta es una superficie plana constituida por un soporte de colodión donde se distribuyen partículas muy finas de sales de zinc o de fósforo verde, las cuales emiten energía luminosa (ondas de mayor longitud, visibles al ojo humano) cuando son estimuladas por el choque de los electrones. Para obtener un registro permanente de la imagen observada se reemplaza la pantalla fluorescente con una *placa fotográfica*, cuyos componentes son estimulados por los electrones de la misma manera que actúan los fotones.

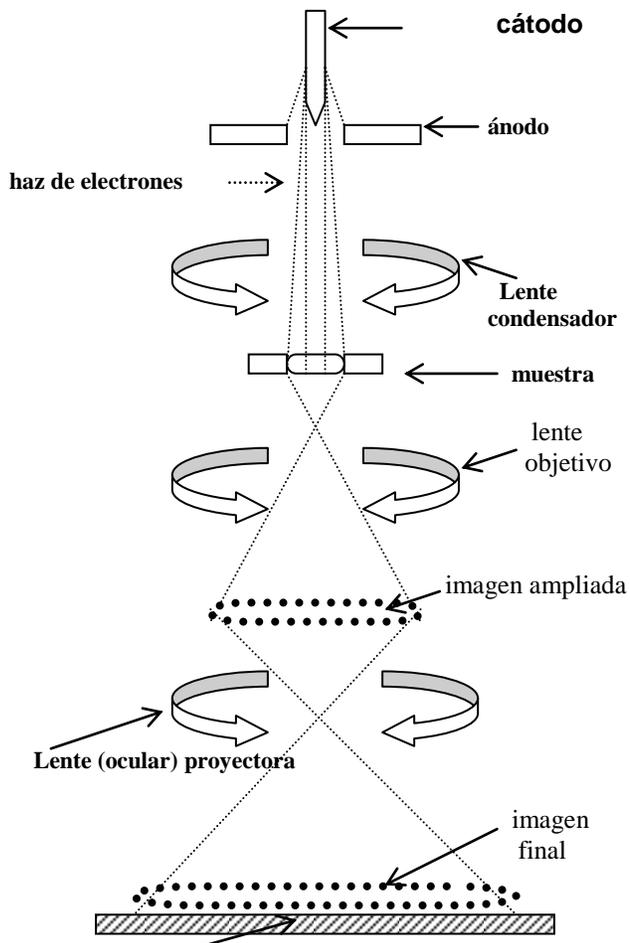


Figura microsc. 31. Diagrama que representa los componentes principales de un microscopio electrónico y el recorrido del haz de electrones.

Todos los componentes del microscopio electrónico están contenidos dentro de una columna metálica conectada a un sistema de hacer vacío. Es imprescindible que exista el vacío dentro de la columna pues los electrones son desviados fácilmente si existen en el medio partículas o moléculas suspendidas.

Los electrones que atraviesan o son desviados por estructuras del espécimen que poseen escasa o nula densidad llegan a la pantalla fluorescente y estimulan sus partículas.

Aquellos electrones que inciden en estructuras de mayor densidad, son reflejados o absorbidos, no las atraviesan y dejan zonas de la pantalla sin estimular, por lo tanto en esos lugares no se emite luminosidad. De esa manera se forma la imagen con zonas iluminadas o claras denominadas *electronlúcidas*, y otras oscuras o *electrodensas* (fig. microsc. 32).

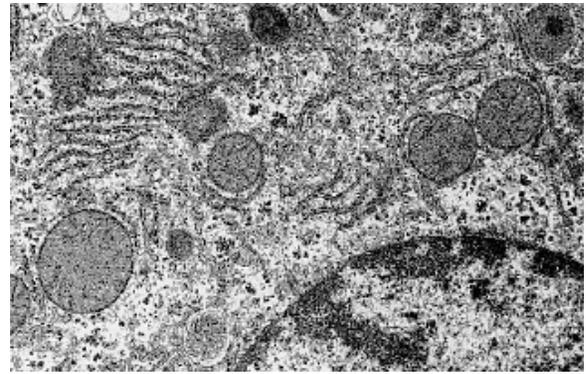


Figura microsc. 32. Fotomicrografía obtenida con el microscopio electrónico de transmisión.

El M.E. de transmisión se emplea para obtener imágenes con un gran poder de resolución que alcanza desde 0.5 a 1.0 nanómetro.

MICROSCOPIO ELECTRÓNICO DE BARRIDO (SCANNING).

Este tipo de microscopio electrónico funciona con los mismos principios electrónicos del M.E de transmisión: una fuente generadora de electrones, campos electromagnéticos que actúan como “lentes” concentradoras (3) de los haces de electrones o como ampliadoras de imágenes. La diferencia estriba en que los electrones no atraviesan el espécimen para formar las imágenes.

Los electrones se aceleran y concentran hasta formar un haz sumamente delgado de mas o menos 5 nm de diámetro que rastrea o “barre” la superficie de la muestra. Los electrones son reflejados por los componentes de la misma o al chocar con ellos generan electrones secundarios.

En ambos casos los electrones se envían e inciden en la superficie de un detector localizado en las cercanías de la muestra. Este aditamento está conectado a un amplificador que envía señales en forma de rayos catódicos a la pantalla de un monitor de televisión (ver fig. microsc. 32). Para registrar la imagen formada se utiliza una cámara fotográfica.

El M.E de barrido, ofrece imágenes con una resolución que alcanzan de 10 a 20 nm. El aumento efectivo es de 15,000 a 50,000 diámetros. Otra ventaja de este microscopio es que forma imágenes con una gran profundidad de foco; de aproximadamente 500 veces que la del microscopio fotónico. Esta propiedad le confiere a la imagen su aspecto tridimensional (fig. microsc. 34)

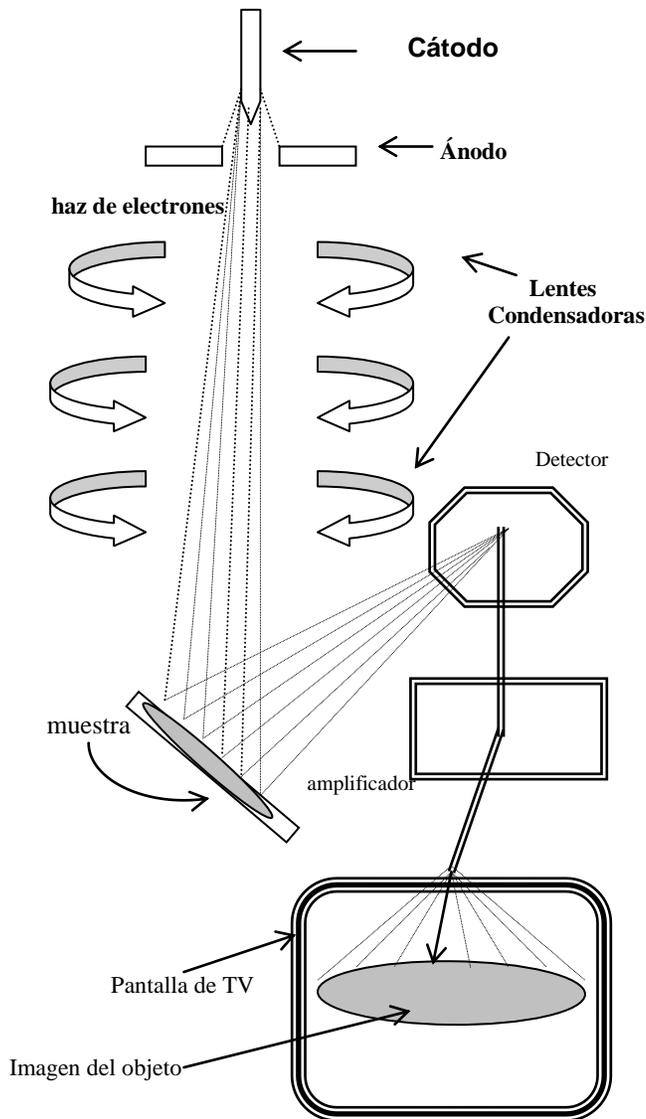


Figura microsc. 33. Esquema que representa los principales componentes del microscopio electrónico de barrido y la trayectoria del haz de electrones.

Otra diferencia radica en la preparación del espécimen que debe ser examinado; este microscopio sirve para observar su superficie constituida por una serie de diminutos relieves, sinuosidades, depresiones, grietas y prominencias, tal como se exhiben en estado viviente, pero que debe estar totalmente deshidratado pues también en este microscopio se debe trabajar en el vacío. El agua del material biológico no se puede sustituir por una sustancia de inclusión porque no se requiere efectuar secciones delgadas del tejido. En cambio, se le debe proporcionar a la superficie del espécimen la capacidad de hacerse reflectante a los electrones que incidan en ella.

La totalidad del material biológico a observar, posee un alto contenido de agua, si se desea eliminarla secándola al aire se producirían graves daños en la estructura morfológica de las

células por efecto de la tensión superficial en la interfase aire-agua. Para que esto no ocurra las muestras se preparan a través de la técnica del *secado hasta el punto crítico* en el que se sustituye el solvente de deshidratación por un gas en su estado líquido (CO_2) que, aplicándole una determinada presión y a una temperatura específica, pasa a la fase gaseosa sin pasar por el estado sólido; esto evita que el material se colapse y mantenga su superficie intacta; con todos los relieves que tuvo al estado natural.

A continuación se cubre la superficie con una capa conductora (60 a 100 nm) de carbón finamente pulverizado y posteriormente con una película de metal pesado (plata, oro, platino o paladio) del mismo grosor. Ambos elementos se depositan mediante un sistema de evaporación al vacío. De esta manera la superficie de la muestra está preparada para recibir los electrones, reflejarlos o emitir electrones secundarios.

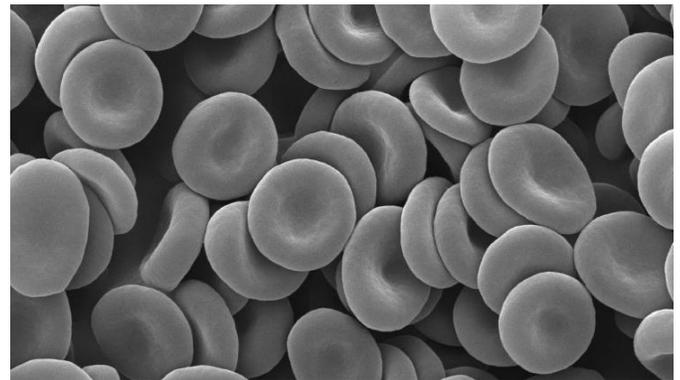


Figura microsc. 34. Imagen que forma el microscopio de "scanning" o de barrido.