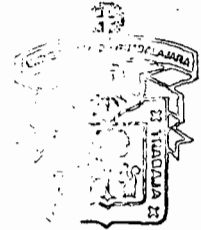


92028658

**UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA**  
**CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y**  
**AGROPECUARIAS**  
**DIVISION DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES**



CU CIBA



BIBLIOTECA CENTRAL

**LA MICROSCOPIA ELECTRONICA EN EL**  
**AREA DE LAS CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**TRABAJO DE MATERIAL DIDACTICO**  
**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:**  
**LICENCIADO EN BIOLOGIA**  
**PRESENTA:**

**ISRAEL CEJA ANDRADE**

**LAS AGUJAS, ZAPOPAN, JALISCO. AGOSTO DE 1999**



**UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA**  
CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS  
DIVISION DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES

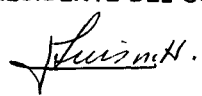
**C. ISRAEL CEJA ANDRADE  
P R E S E N T E.**

Manifestamos a Usted que con esta fecha ha sido aprobado su tema de titulación en la modalidad de ELABORACION DE MATERIAL DIDACTICO con el título "MICROSCOPIA ELECTRONICA EN EL AREA DE LAS CIENCIAS BIOLÓGICAS", para obtener la Licenciatura en Biología.

Al mismo tiempo le informamos que ha sido aceptado como Director de dicho trabajo al **DR. JUAN MORA GALINDO**, y como Asesor al **M.C. ALFONSO E. ISLAS RODRIGUEZ**.

**A T E N T A M E N T E**  
**" PIENSA Y TRABAJA "**  
**LAS AGUJAS, ZAPOPAN, JAL., ABRIL 24 DE 1998**

  
**M. EN C. ARTURO OROZCO BAROCIO**  
**PRESIDENTE DEL COMITE DE TITULACION**

  
**M. EN C. JOSE LUIS NAVARRETE HEREDIA**  
**SECRETARIO DEL COMITE DE TITULACION**

COMITE DE  
TITULACION



c.c.p. **DR. JUAN MORA GALINDO**.- Director del trabajo.  
c.c.p. **M.C. ALFONSO E. ISLAS RODRIGUEZ**.- Asesor del trabajo.  
c.c.p. El expediente del alumno.

**AOB/JLNH/memn\***

**C. M en C. Arturo Orozco Barocio.**  
**Presidente del comité de titulación de la**  
**Licenciatura en Biología**

PRESENTE

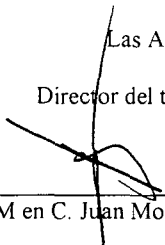
Por medio de la presente, nos permitimos informar a usted, que habiendo revisado el trabajo de titulación que realizó el pasante Israel Ceja Andrade con el título: La Microscopía Electrónica en el Área de las Ciencias Biológicas. Consideramos que ha quedado debidamente concluido, por lo anterior ponemos a su consideración el escrito final para autorización de impresión y en su caso programación de fecha de presentación y defensa del mismo.

Sin otro particular, agradecemos de antemano la atención que sirva dar a la presente y aprovechamos la ocasión para enviarle un cordial saludo.

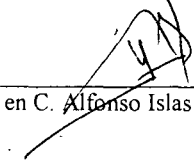
ATENTAMENTE

Las Agujas, Nextipac, Zapopan, Jal. 7 de Julio de 1999.

Director del trabajo.

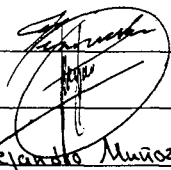

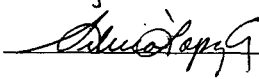
  
\_\_\_\_\_  
M en C. Juan Mora Galindo.

Asesor.

  
\_\_\_\_\_  
M en C. Alfonso Islas Rodríguez.

SINODALES

1. M en C. Fernando Alfaro Bustamante.
2. M en C. Rodrigo Castellanos Michel.
3. M en C. Alejandro Muñoz Urias.
4. M en C. Silvia Josefina López Pérez.

 ch.  
\_\_\_\_\_  
  
\_\_\_\_\_  
Alejandro Muñoz Urias  
\_\_\_\_\_  
  
\_\_\_\_\_

## RESUMEN

En la práctica diaria se ha observado la necesidad de tener un manual de principios básicos sobre *microscopía electrónica y el tratamiento de muestras*, el cual sea accesible a los estudiantes de las áreas biológicas. Ya que la importancia que tiene el desarrollo científico - tecnológico en cualquier área de la ciencia, nos hace abordar diversos tipos de investigaciones con nuevos equipos o de instrumentos de mayor alcance o precisión.

En este aspecto, la *microscopía electrónica* proporciona datos importantes en la investigación y contribuye a solucionar problemas en el área de la biología y medicina.

Con el *microscopio electrónico de transmisión* podemos realizar una *examinación directa* a nivel celular, información de vital importancia para el entendimiento sobre estructura y función y el *microscopio electrónico de barrido* permite seleccionar áreas específicas de tejidos para un *microanálisis químico*, ya que en algunos estudios la correlación entre morfología e información elemental es necesaria.

Por lo tanto, es importante para una futura investigación tener en cuenta que la *microscopía electrónica* es una herramienta con un alto poder analítico.

## DEDICATORIA

A mi madre **Victoria Andrade**.

A la memoria de mi padre **Pedro Ceja**.

A **Lety**, mi bella esposa, que con su paciencia, amor y comprensión, me dio el aliento suficiente para concluir mi formación y para continuar desarrollándome.

A **Jareth**, por enseñarme tanto de esta vida.

A todos mis hermanos, en especial a **Alicia**  
**Samuel**  
**Jorge**  
**Maricruz**

## AGRADECIMIENTOS

Primeramente quiero expresar mi mas sincera gratitud a "Dios", ya que sin el, nada de esto se hubiera logrado.

A la Universidad de Guadalajara y al Departamento de Física.

Al M en C. Rodrigo Velázquez Castillo.

Al M en C. Juan Mora Galindo

Al M en C. Alfonso Islas Rodriguez.

Al M en C. Jorge Campa Molina.

Al I.G. Scott Burns.

Al I.Q. Hermes Ulises Ramirez.

Al I.Q. Severiano Gómez Mora.

A la T.Q. S Elizabeth Santacruz Leal.

A la L.C.P Celia Muñoz Martinez.

A todo el Centro de Microscopía Electrónica.

Al C.I.B.O.

Al G.P.C. Inc.

A los profesores investigadores de la División de Ciencias Biológicas, Ciencias Basicas y CIBO.

Dr. Julio Sierra.

Dr. Carlos Álvarez.

Dr. Arturo Chavez.

Dr. Carlos Michel.

M en C. Luis Burgos.

M en C. Martín Huerta.

M.V.Z. Jesús castañeda.

Asi mismo a mis sinodales:

M en C. Fernando Alfaro Bustamente.

M en C. Rodrigo Castellanos Michel.

M en C. Alejandro Muñoz Urias.

M en C. Silvia Lopez Perez.

Finalmente a todos mis compañeros de la Licenciatura.

## INDICE

INTRODUCCION	1
1. Microscopía electrónica (Principios físicos).	3
1.1. Emisión de electrones.	3
1.2. Optica electrónica.	4
1.3. Interacción haz electrónico - materia.	5
1.3.1. Electrones transmitidos.	6
1.3.2. Dispersión elástica.	6
1.3.3. Dispersión inelástica.	7
2. Microscopio electrónico de transmisión (MET).	9
2.1. Sistema de iluminación y óptico electrónico.	10
2.2. Sistema para observación y grabado	12
2.3. Sistema de detección.	12
2.4. Contraste de imagen.	13
3. Microscopio electrónico de barrido (MEB).	15
3.1. Sistema de iluminación.	17
3.2. Sistema óptico-electrónico.	17
3.3. Sistema de detección.	18
3.4. Contraste de imagen.	20
4. Preparación de material biológico para Microscopía electrónica.	21
4.1. Fijación.	22
4.2. Deshidratación.	23
4.3. Inclusión.	24
4.3.1. Medios acrílicos	24
4.3.2. Resinas epoxicas.	25
4.3.3. Resinas poliéster.	25
4.3.4. Medios solubles en agua.	25
4.4. Métodos deshidratantes a bajas temperaturas.	25
4.4.1. Secado por punto critico.	26
4.4.2. Fractura	26
4.4.3. Secado por congelación.	26
4.4.4. Sustitución por congelación.	27
4.5. Ultramicrotomía.	28
4.5.1. Crioultramicrotomía.	28
4.6. Recubrimiento.	29
4.7. Contraste.	30
4.7.1. Tinción positiva.	30
4.8. Procesamiento rutinario para tejidos de mamífero.	31
5. Técnicas especializadas.	31
5.1. Citoquímica.	32
5.2. Autorradiografía.	32
5.3. Tinción negativa.	33
6 Riesgos y precauciones sobre el uso de reactivos.	34
7. Aplicaciones.	35
7.1. Alcances.	35
7.2. Limitaciones del M.E. y de las Instituciones.	36
7.2. Ejemplos.	37
REFERENCIAS.	41

## INTRODUCCIÓN

En primera instancia, obtenemos la información del mundo que nos rodea por nuestros sentidos. La vista es nuestro sentido dominante y nuestro mundo sensorial reside principalmente en la visión. El ojo humano tiene una capacidad de resolución (es decir, la capacidad de distinguir la distancia o separación entre dos objetos para observarlos netamente separados), de 0.1 mm aproximadamente, por lo cual escapan a su percepción gran número de fenómenos y estructuras que son de menores dimensiones a dicha resolución [1].

Las lentes de aumento, los microscopios y los telescopios proporcionan extensiones de nuestro sentido de la vista, facilitándonos observar o ver más claramente objetos pequeños o distantes. La invención y gradual perfeccionamiento de estos instrumentos permiten la exploración del mundo microscópico, así como de regiones del universo inaccesible a nuestros ojos. Muchos de los avances de la biología de los últimos cien años están estrechamente ligados a los avances del microscopio [1].

Es bien conocido que en la historia de las ciencias uno de los eventos más importantes, es el de la observación y descubrimiento de la célula; las células son estructuras pequeñas y su estudio no fue posible antes del siglo XVII. La apariencia microscópica de la célula fue descrita por primera vez por Robert Hooke en su obra *Micrographia* en 1665. La descripción más famosa de Hooke fue el grosor de las paredes celulares, en células muertas de corcho; también percibió que la superficie de plantas vivas estaban divididas en unidades microscópicas similares. Hooke utilizó un juego de lentes, el cual proporcionó 30 aumentos aproximadamente, y como resultado obtuvo datos importantes en la observación de células animales y vegetales.

Un microscopista aficionado, Anton van Leeuwenhoek, usó lentes simples de poca *longitud focal* montados entre placas para obtener varios cientos de aumentos, Leeuwenhoek guardó en secreto los detalles de su método. Es posible que redujera la aberración de los lentes simples puliéndolos a una superficie esférica, lo que le ayudó a escribir cerca de 200 publicaciones a la Royal Society sobre microorganismos. Sus reportes contenían grandes detalles morfológicos que no pudieron ser igualados por más de cien años, *contemplando formalmente el nacimiento de la microscopia óptica* [2].

La observación de la célula con el microscopio óptico proporciona poca información sobre su organización interna. La posibilidad de observar detalles morfológicos con el microscopio de luz, independientemente de la calidad de las lentes, está limitada por la naturaleza física de la luz visible que se utiliza como fuente de iluminación. E. Abbe en 1873 demostró que el límite de resolución del microscopio óptico, corresponde aproximadamente a la mitad de la longitud de onda empleada. Esta es generalmente la luz blanca, que está constituida por una mezcla de diversas longitudes de onda visibles del espectro electromagnético; siendo la longitud de onda promedio de la luz blanca de alrededor de 0.5  $\mu\text{m}$ , el límite de resolución de un buen microscopio de luz es de 0.2  $\mu\text{m}$ .

La necesidad de observar con mejor resolución y a mayores aumentos estructuras más pequeñas, condujo a los investigadores a la búsqueda de otros medios o fuentes de iluminación con longitudes de onda menores.



La utilización de la radiación ultravioleta, cuya longitud de onda es de 0.2 a 0.3  $\mu\text{m}$  y lentes de cuarzo como medio de refracción, ha permitido una resolución de aproximadamente 0.1  $\mu\text{m}$ , sin embargo el uso de este tipo de microscopía ha sido limitado. El salto más grande para mejorar enormemente la resolución, así como la amplificación, se dio con el advenimiento del microscopio electrónico.

El microscopio electrónico utiliza como fuente de iluminación un haz de electrones en lugar de luz; estos electrones se aceleran con energías de varios kiloelectron-volt y usa además bobinas electromagnéticas como lentes.

En el microscopio electrónico se pueden observar objetos 10,000 veces más pequeños que lo que lograríamos ver con un microscopio óptico, esto se debe a la utilización de una fuente de emisión con menor longitud de onda que la de la luz visible [3]. En virtud de que la longitud de onda de los electrones depende de la energía que se emplee para acelerarlos, si aplicamos 100 keV, tendremos electrones con una longitud de onda de 0.03  $\text{Å}$ , por lo que podemos ver en principio objetos cuya dimensión es del orden de estas unidades.

El establecimiento de las bases teóricas del microscopio electrónico tuvo su origen en 1924 cuando De Broglie lanzó una hipótesis en la que asociaba la naturaleza ondulatoria con cada partícula material y en especial con los electrones, en función de su velocidad de aceleración y la masa de la partícula. Dos años más tarde Bush demostró que los electrones emitidos por un filamento podían ser enfocados con simetría axial, a través de campos magnéticos que funcionaban como lentes. Gabor en 1927 construyó la primera lente electromagnética. Finalmente en 1932 Ruska y Knoll, después de intensos estudios sobre las lentes magnéticas, presentaron en Berlín el prototipo de un microscopio electrónico; en 1934 por primera vez se logró sobrepasar la resolución de los microscopios ópticos y en 1940 el estudio detallado de la célula se hizo realidad.

Desafortunadamente, aún en la actualidad no todos tienen acceso al uso de un microscopio electrónico para el análisis de muestras, ya que si bien, casi en cualquier laboratorio de enseñanza se pueden tener microscopios ópticos, no cualquier institución cuenta con un microscopio electrónico. Este equipo requiere un área de al menos 7  $\text{m}^2$  para instalarlo, junto con sus equipos y accesorios. Adicionalmente se requiere de un laboratorio que esté equipado con ultramicrotomo, equipo para preparar cuchillas, estufa y campana de extracción entre los requerimientos más necesarios. Una vez que tenemos el laboratorio como el mencionado, mediante la microscopía electrónica las pequeñas muestras de la naturaleza revelan, una tras otra sus fascinantes imágenes y lo más interesante, la observación de un objeto nos conduce a estudiar a otro.

## 1. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA, PRINCIPIOS FÍSICOS.

Las propiedades específicas de los electrones que son utilizados como fuente de emisión y las lentes electromagnéticas determinan las características del diseño de los microscopios electrónicos. Estos se constituyen básicamente por un sistema de vacío, un sistema de emisión, un sistema electro-óptico y un sistema de observación y/o detección, todos estos sistemas se encuentran en lo que se denomina la columna de un microscopio electrónico (ME).

En la columna del ME, los campos electromagnéticos (producidos por bobinas) que rodean el haz de electrones a diferentes niveles de su trayecto, son los que actúan como lentes. El trayecto de los electrones puede ser igualmente alterado o distorsionado con facilidad por la presencia de moléculas presentes en el aire, ya que estas colisionan con los electrones del haz primario. Para evitarlo se requiere de un sistema hermético de alto vacío, que elimine todo tipo de moléculas en la columna del microscopio y proteja el trayecto del haz primario, sin embargo, cabe señalar que algunos microscopios electrónicos de barrido cuentan con un sistema de bajo vacío. Este vacío se obtiene por medio de una **bomba rotatoria** y una **bomba difusora**, que constituyen el sistema de vacío.

Una vez cumplidas las especificaciones antes indicadas, los electrones se aceleran en un dispositivo denominado como **cañón electrónico**, en donde se produce una diferencia de potencial. Los electrones tendrán una longitud de onda según el principio De Broglie, que dice que la magnitud de esta longitud de onda depende de la diferencia de potencial utilizada, la cual se denomina **voltaje de aceleración**. Entre mayor es el voltaje de aceleración, menor es la longitud de onda, de manera que se aplican voltajes de aceleración tales que produzcan longitudes de onda pequeñas en los electrones y con ello, la resolución sea mejor. Por lo tanto un microscopio electrónico necesita alta tensión para alimentar la corriente eléctrica al cañón de electrones, éste se encuentra generalmente en la parte superior de la columna, se compone por un cátodo y un ánodo, esto para acelerar los electrones y formar el haz.

### 1.1. EMISIÓN DE ELECTRONES.

En microscopía electrónica los electrones se pueden emitir mediante dos mecanismos principalmente; por emisión termoiónica (utilizado para observar muestras Biológicas) y emisión de campo. En emisión termoiónica se necesita un filamento como cátodo, una cápsula de Wehnelt y un ánodo, los electrones se liberan por el calentamiento del filamento, los cuales se concentran en una pequeña área por medio de la cápsula de Wehnelt, que actúa como una lente electrostática polarizada negativamente (Fig.1).

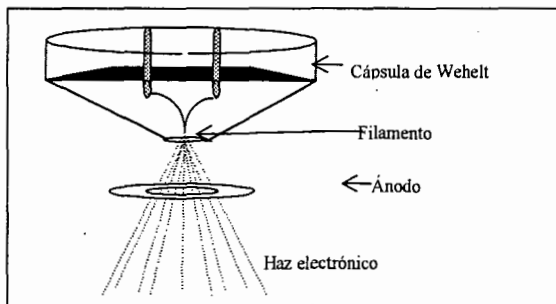


Fig. 1. Cañón de electrónico de función termoiónica, que consta de un cátodo, una cápsula de Wehnelt y un ánodo. En emisión termoiónica se utilizan frecuentemente filamentos de Tungsteno, Exaboruro de lantano y Cerio.

A partir de este dispositivo, los electrones se aceleran debido a una diferencia de potencial, formando así el haz primario que se dirige a la muestra gracias a la óptica electrónica.

## 1.2. OPTICA ELECTRONICA.

El propósito de la óptica electrónica es hacer incidir un pequeño haz electrónico sobre la muestra y dar la capacidad de poder enfocar el haz electrónico. Para lograr esto, se utilizan bobinas electromagnéticas las cuales interactúan con los electrones desviando su trayectoria, de manera similar a como lo hacen las lentes de vidrio con la luz, con la diferencia de que la lente de vidrio lo hace por el fenómeno de refracción y en la bobina por la fuerza resultante de tener una carga eléctrica en movimiento a través de un campo magnético (Fig. 2).

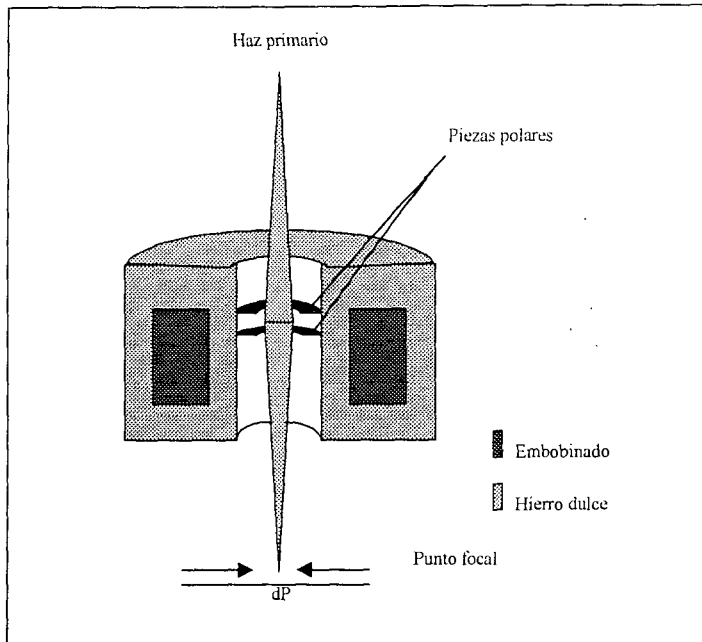


Fig. 2. Diagrama esquemático mostrando la trayectoria de los electrones a través de una lente electromagnética representada en forma transversal ( $dP$  = diámetro del haz).

Una lente electromagnética consiste de un campo magnético axial. El flujo magnético de una bobina es concentrado dentro de un pequeño volumen por piezas polares de hierro. Las líneas de campo en el vacío forman el campo electromagnético que tiene la distribución de una campana.

Al haz electrónico enfocado sobre la muestra se le conoce como diámetro del haz ó  $dP$ ; la resolución del microscopio se limita por el tamaño del diámetro del haz y la compensación del astigmatismo en las lentes finales. Para una aplicación normal en un microscopio electrónico, es posible variar el tamaño del haz, la apertura y el voltaje de aceleración.

### 1.3. INTERACCIÓN HAZ ELECTRONICO-MATERIA.

Una de las diferencias más importantes que tiene la microscopía electrónica con respecto a su similar óptica, es la interacción que existe entre los electrones del haz primario y los átomos que componen a la muestra [6]. En la figura 3 se muestran los fenómenos que se originan por la interacción del haz primario con la muestra.

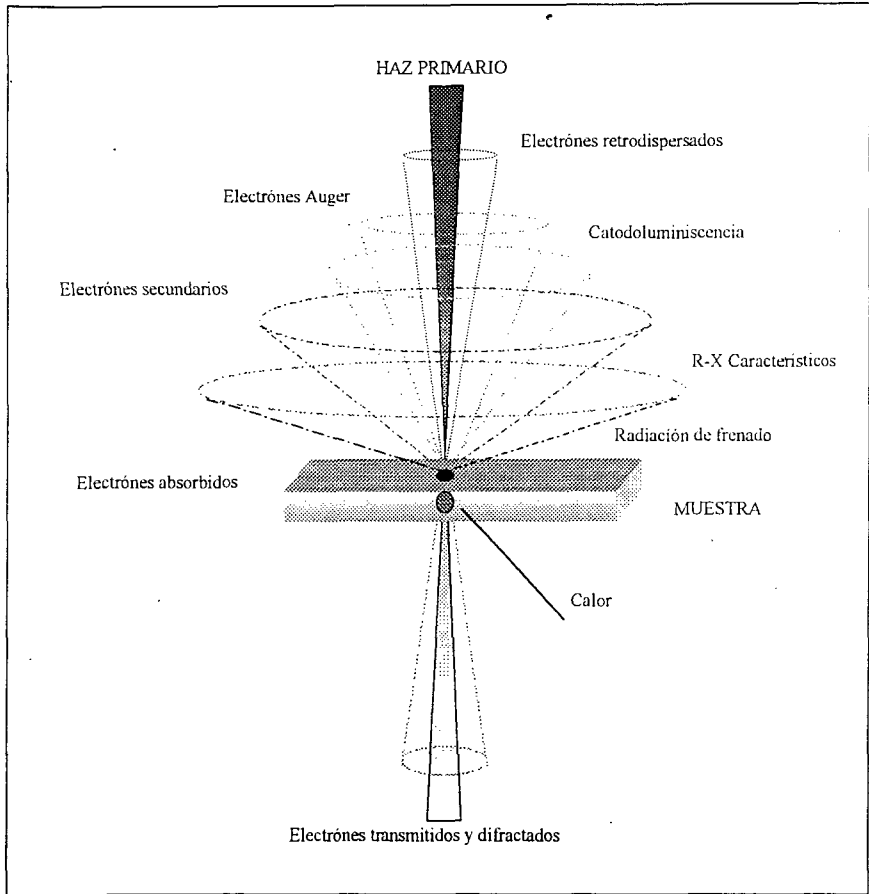


Fig.3. Esquema donde se representa los fenómenos de la interacción de los electrones del haz primario con la muestra, generalmente no se pueden utilizar todos los fenómenos en un solo tipo de microscopio \*. Los fenómenos utilizados para la microscopía electrónica de barrido se encuentran por encima de la muestra y los fenómenos utilizados por la microscopía electrónica de transmisión se localizan por debajo de dicha muestra.

La interacción producida entre el haz electrónico y la muestra se divide en: electrones transmitidos, dispersión elástica y dispersión inelástica.

\* Existen microscopios modificados que detectan los fenómenos tanto de transmisión, como los de barrido y se les conoce como STEM.

### 1.3.1. ELECTRONES TRANSMITIDOS.

Son electrones provenientes del haz primario, los cuales poseen alta energía (60 KeV o mas), estos prácticamente no encuentran interacción y son capaces de cruzar transversalmente a la muestra. Si lo hacen sin cambiar su dirección y energía original, se les denominaran electrones transmitidos [7].

### 1.3.2. DISPERSIÓN ELÁSTICA.

La dispersión elástica es cuando el haz cambia de trayectoria pero no de energía [7].

- A) Los electrones difractados son electrones que desviaron su trayectoria debido a su interacción con el arreglo estructural de algún sólido de la muestra (Fig.4).

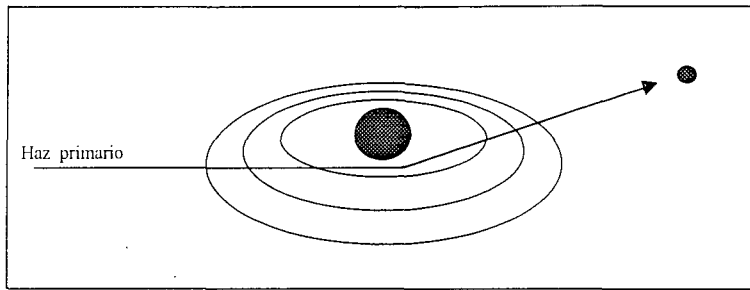


Fig. 4. Esquema donde se muestra la trayectoria de los electrones difractados sin pérdida de energía.

- B) Electrones Retrodispersados: Son electrones del haz primario que sufren una colisión con un núcleo atómico de la muestra y debido a la gran diferencia de masas, rebotan, llevando consigo una importante información del núcleo con el que interactuaron [6]. Estos electrones tienen una energía cercana a la del haz primario (fig.5).

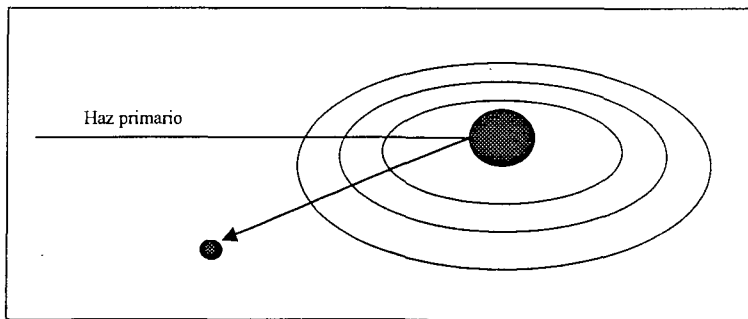


Fig. 5. Esquema representando una colisión del electrón del haz primario con un átomo de la muestra, donde los electrones retrodispersados obtienen información importante del átomo con el que interactuaron.

### 1.3.3. DISPERSIÓN INELÁSTICA.

La dispersión inelástica es aquella interacción que resulta del cambio de energía del haz primario con la muestra, tal interacción da lugar a los electrones secundarios, Auger, rayos X característicos, radiación de frenado, catodoluminiscencia y algunos electrones difractados principalmente [7]. En Biología los mas utilizados son los electrones secundarios y los rayos X característicos.

- A) Electrones Secundarios: son aquellos obtenidos de enlaces débiles, tienen poca energía y pueden escapar de la muestra para ser detectados solo si son emitidos de la superficie del material, esto debido a la incidencia de los electrones del haz primario (Fig.6) Por la misma razón, son sensibles a la topografía de la muestra, en la figura 7 los electrones creados en las cimas tienen mayores oportunidades de escapar que los creados en el hueco de la misma muestra. [6].

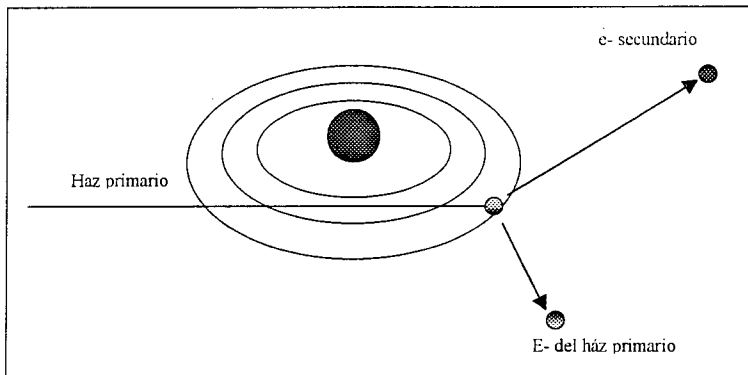


Fig. 6. Esquema donde se muestra un electrón expulsado de un átomo de la muestra, el cual también puede ser de alta energía.

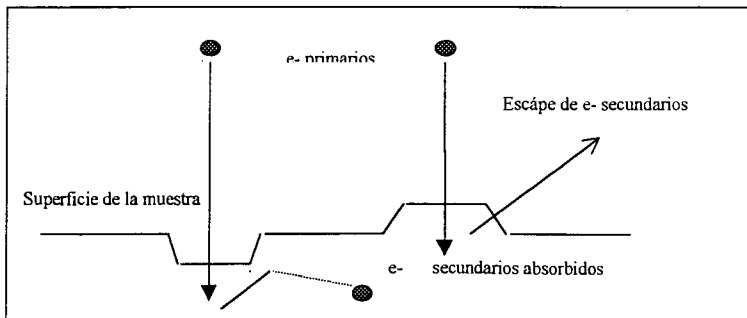


Fig. 7. En esta representación, se muestra la sensibilidad topográfica de los electrones secundarios de baja energía. Dichos electrones tienen la tendencia a proyectarse hacia afuera proviniendo de las crestas mas que de los valles de una muestra hipotética.

B) Rayos X Característicos: Son emisiones fotónicas (características de cada elemento) debidas a la formación de huecos electrónicos de enlace fuerte, en niveles de energía internos de los átomos constitutivos de la muestra debido a la interacción del haz primario (Fig.8). El sólido queda en un estado excitado; para eliminar tal excitación procederá el decaimiento de un electrón de un orbital superior, siendo este decaimiento influenciado por el núcleo atómico, lo que provoca que los fotones tengan una longitud de onda específica dependiendo del elemento emisor [7]. La diferencia en energías de los dos orbitales será la magnitud de energía que posean.

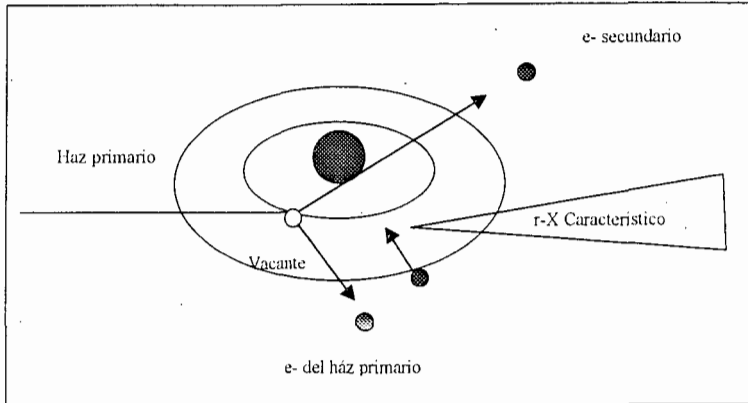


Fig.8. Esquema que representa el decaimiento de un electrón a un orbital interno, donde la pérdida de excitación produce radiación -X característica.

La dispersión electrónica elástica es más localizada que la dispersión inelástica y por lo tanto, la dispersión inelástica no contribuye a las imágenes de alta resolución, sino a los modos analíticos de espectroscopia por pérdida de energía. Todos estos fenómenos producto de la interacción electrón-materia, pueden ser usados para obtener información sobre la forma, composición, estructura cristalina, estructura electrónica, y en algunos casos las propiedades eléctricas ó magnéticas de la muestra.

Existen varios tipos de microscopía electrónica que utilizan al menos una de las interacciones antes mencionadas, pero en este trabajo nos limitaremos a la revisión en detalle de la descripción y las técnicas preparativas para microscopía electrónica de transmisión y de barrido, ya que dichas técnicas son las que más se utilizan para la observación de muestras biológicas.

## 2. MICROSCOPIO ELECTRÓNICO DE TRANSMISIÓN (MET)

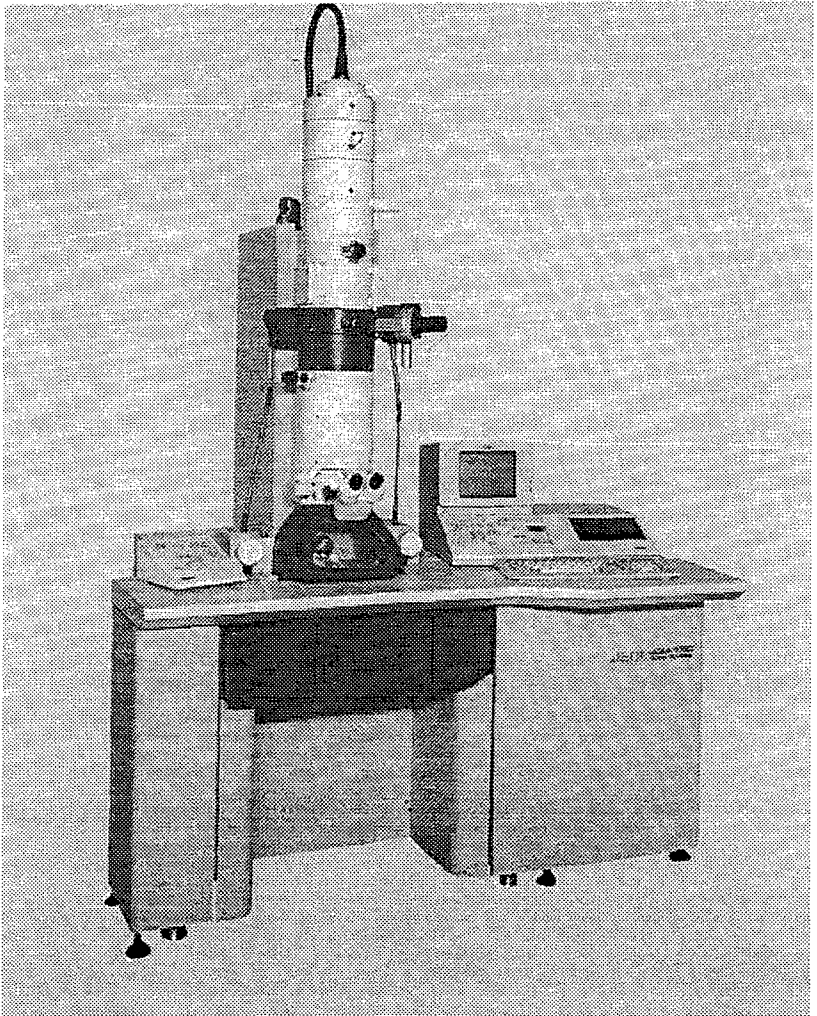


Fig.9. Microscopio Electrónico de Transmisión JEOL. JEM1010. Centro de microscopía electrónica. U de G.

El microscopio electrónico de transmisión fue el primero en desarrollarse, en el se emplean los electrones que son transmitidos y difractados a través de un corte de la muestra (fig. 3). Esto incluye dispersión elástica y la dispersión inelástica[8]. Este tipo de microscopio permite observar la microestructura, analizar la morfología y la distribución de fase de composición de las muestras. (En la figura 9 se muestra un microscopio electrónico de transmisión).



El diagrama de un microscopio electrónico de transmisión se puede dividir en cuatro secciones funcionales, las cuales están distribuidos en lo que se denomina la columna (Fig.10).

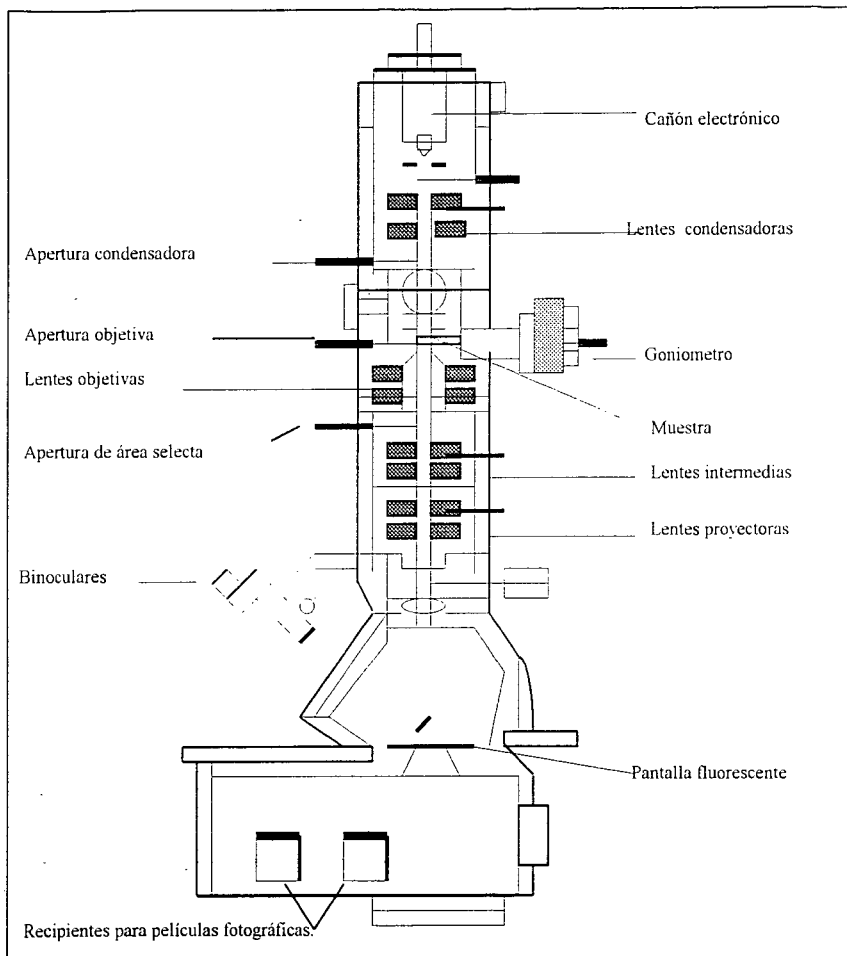


Fig.10. Diagrama esquemático de un MET donde se observan los diferentes sistemas a lo largo de la columna.

## 2.1. SISTEMA DE ILUMINACIÓN Y OPTICO ELECTRONICO.

En estos sistemas se realiza la emisión electrónica, la formación de imágenes y la amplificación, los cuales se describirán simultáneamente. En la parte superior de la columna se encuentra el cañón de electrones, que es la fuente del haz primario. Este cañón puede emitir electrones a través de un mecanismo termoiónico, utilizando un filamento como cátodo, el cual puede ser de tungsteno, de hexaboruro de lantano o cerio (Fig.1).

Alrededor del filamento se encuentra la cápsula de Wenhelt, con una apertura circular la cual está centrada en el ápice del filamento. Esta cápsula tiene una carga negativa entre 0 y 2.5 KeV. Un ánodo situado por debajo de la cápsula es el ultimo componente del cañón de electrones y consta de una placa con un orificio en torno a la apertura de la cápsula y tiene carga positiva. Con una diferencia de potencial entre el cátodo y el ánodo igual al voltaje de aceleración, el ánodo se encarga de atraer a los electrones, los cuales forman una nube en torno al filamento, acelerándolos y formando el haz de electrones.

La cápsula de Wenhelt funciona como un primer sistema de orientación convergente del haz de electrones y el voltaje de aceleración utilizado en un microscopio de transmisión convencional es de 60 a 120 KeV y de 200 a 400 KeV para alta resolución.

Posterior al cañón de electrones se encuentra un juego de dos o tres lentes condensadoras, estas lentes se emplean para hacer converger el haz de electrones hacia el eje óptico y tener un diámetro del haz lo más pequeño posible. El cañón de electrones y las lentes condensadoras conforman la fuente de iluminación del microscopio. Bajo las lentes condensadoras está la apertura condensadora y la cámara para muestra, en la cual se introduce el porta muestras, éste puede contener hasta dos de ellas.

Posteriormente se encuentra el sistema de formación de imágenes, constituido por la apertura objetiva y las lentes objetivas, estas lentes son las más importantes de un microscopio electrónico de transmisión, ya que ellas se encargan de captar todos los haces electrónicos que emergen de la muestra y formar la imagen de la misma. Los electrones llevan consigo información relevante de la interacción electrón-materia (cualquier defecto óptico que puedan presentar como aberraciones o astigmatismo, repercutirán en gran medida en la resolución del aparato).

La lente objetiva tiene dos planos posteriores importantes: su punto focal y el plano de formación de imágenes; el foco es el sitio en donde se cruzan los haces electrónicos; si colocamos una pantalla en ese lugar observaremos la imagen de una colección de puntos llamada "patrón de difracción" por lo que el foco se le denomina también "plano de difracción"; el plano de formación de imagen o "plano de imagen", es el lugar en donde la lente objetiva forma la imagen de la muestra (Fig. 11).

Para obtener un patrón de difracción se necesita la ayuda de la apertura de área selecta, la cual sirve para restringir la iluminación en una zona específica de la muestra.

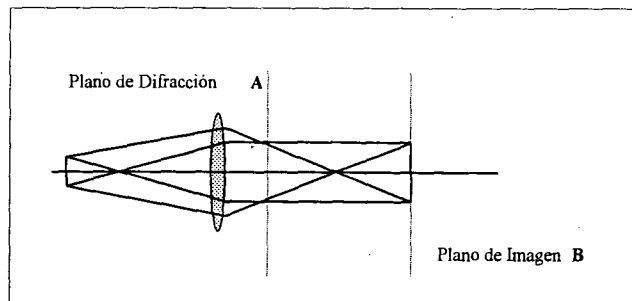


Fig.11. Diagrama de rayos de la lente objetiva mostrando su punto focal y plano de formación de imagen; el plano de difracción A es donde podemos observar patrones de difracción y en el plano de imagen B es donde podemos obtener las imágenes convencionales.

Después de la lente objetiva, se tiene el sistema de amplificación de la imagen, compuesto por las lentes intermedias y las lentes proyectoras.

Los haces electrónicos que provienen de la lente objetiva están demasiado condensados para ser observados, el papel de las lentes intermedias es hacer divergir tales haces y así lograr una imagen amplificada de la muestra. La lente proyectora se encarga de ampliar y orientar la imagen hacia la pantalla que es donde se puede observar la imagen de la muestra. Las lentes intermedias no entran en funcionamiento cuando se forma el patrón de difracción.

## 2.2. SISTEMA PARA LA OBSERVACION Y GRABADO

El sistema de observación y grabado de imágenes, consiste en una pantalla (que se encuentra bajo las lentes proyectoras), placas fotográficas y cámaras de video. La pantalla es una superficie metálica con un recubrimiento de fósforo, el cual flouorece ante la incidencia de los electrones, a su vez emite luz visible al ojo humano y se puede observar las imágenes, de tal forma que, en las regiones de la pantalla donde exista una mayor incidencia electrónica, se observará mas iluminada que en aquellas regiones donde la incidencia sea menor.

Adicionalmente a esta pantalla, se cuenta con otra pequeña pantalla, la cual se utiliza para hacer observaciones de la imagen de la muestra con mas detalle, así como para enfocar la imagen., auxiliados de unos binoculares. los cuales están por fuera de la columna.

Para conservar permanentemente las imágenes, el MET cuenta con una cámara fotográfica por debajo de la pantalla, la cual contiene placas fotográficas sensibles a los electrones. Con estas placas se logra captar las imágenes de la muestra. Otras opciones para captar imágenes son las cámaras de video, estas permiten obtener una secuencia de imágenes del microscopio para grabarse en un videocasete convencional, por otra parte, existen cámaras digitales para su almacenamiento en discos.

## 2.3. SISTEMA DE DETECCIÓN

De forma adicional, al MET se le pueden instalar equipos analíticos, ya que la interacción electrón-materia (Fig.3) genera varias señales que pueden ser utilizadas para obtener información adicional de la muestra.

Los equipos más comunes son los de Energía Dispersiva de Rayos-X (EDX), que se utiliza para la determinación cuantitativa de la composición química (elementos) de la muestra y la distribución de los elementos constitutivos en el volumen de la misma. Otro equipo es el Espectrómetro de Pérdida de Energía de Electrones (EELS), este equipo puede llevar a cabo análisis químicos de la muestra observada, la diferencia con el EDX es que éste es más sensible a elementos de bajo número atómico. Este detector evalúa la diferencia energética que tienen los electrones transmitidos después de haber tenido una interacción inelástica con la muestra, esta energía depende de la naturaleza de los átomos con los que interactuaron los electrones (Fig.12).

La información captada por este detector va desde la composición de la muestra, determinación de enlaces químicos, distancia interatómica y espesor de la muestra, entre otras cosas [7].

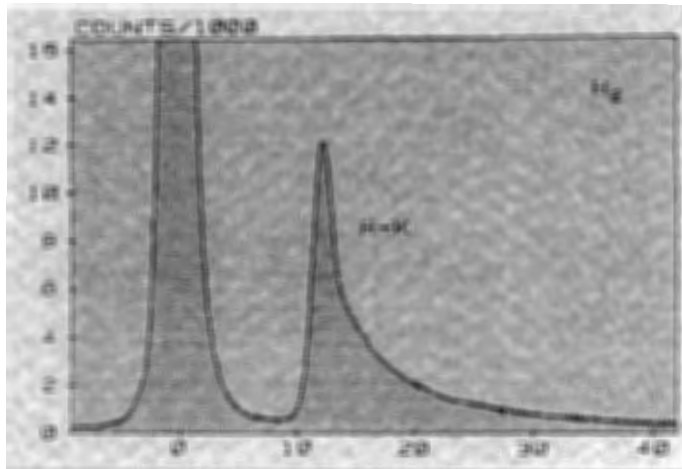


Fig.12. Espectro de pérdida de energía de electrones característico, esta curva corresponde a la diferencia energética del haz primario después de haber tenido una interacción con el Hidrógeno, donde se indica el tipo de enlace y bajo la gráfica se indican las unidades de energía en electrón -Volts. (eV).

#### 2.4. CONTRASTE DE IMAGEN.

El contraste de las imágenes obtenidas en el MET puede ser de dos tipos, por amplitud y por fase. El contraste por amplitud puede producirse al tener áreas en la muestra con diferente composición química, diferente espesor o ambos; de esta forma a mayor espesor o número atómico de los elementos contenidos en la muestra, se tendrá en la imagen regiones oscuras para campo claro y regiones claras para campo oscuro. A este contraste se le denomina también contraste por masa. El contraste por amplitud también se debe a la difracción de la muestra; aquí, la imagen será oscura en los sitios de la muestra con mayor dispersión y la imagen será clara en los sitios con menor dispersión. Este tipo de imagen se conoce como contraste de difracción.

El contraste de fase es por la interacción que ocasiona un cambio de fase en los electrones, debido al espesor de una muestra en forma de cuña; ahí, los electrones viajan a través de diferentes espesores de masa, produciéndose una imagen de franjas conocidas como “franjas de red”.

En el MET se tienen las técnicas de formación de imagen en campo claro, campo oscuro y difracción de electrones. Como se mencionó anteriormente, con la lente objetiva se pueden formar tanto la imagen de la muestra, como su patrón de difracción.

El patrón de difracción puede ser una colección de puntos si la muestra es monocristalina, puede ser un grupo de anillos concéntricos si se tiene un policristal o puede ser una colección de puntos difusos si la muestra es amorfa (fig.13). Cada punto o franja del patrón de difracción representan una familia de planos; la forma y las distancias entre sus puntos o franjas, dependen de parámetros como la longitud de cámara en el MET, el eje de zona, la simetría de la estructura cristalina y la distancia interplanar [3].

La teoría de obtención del patrón de difracción y su interpretación es un tema extenso y únicamente se cita debido a su importancia dentro de la microscopía de transmisión.

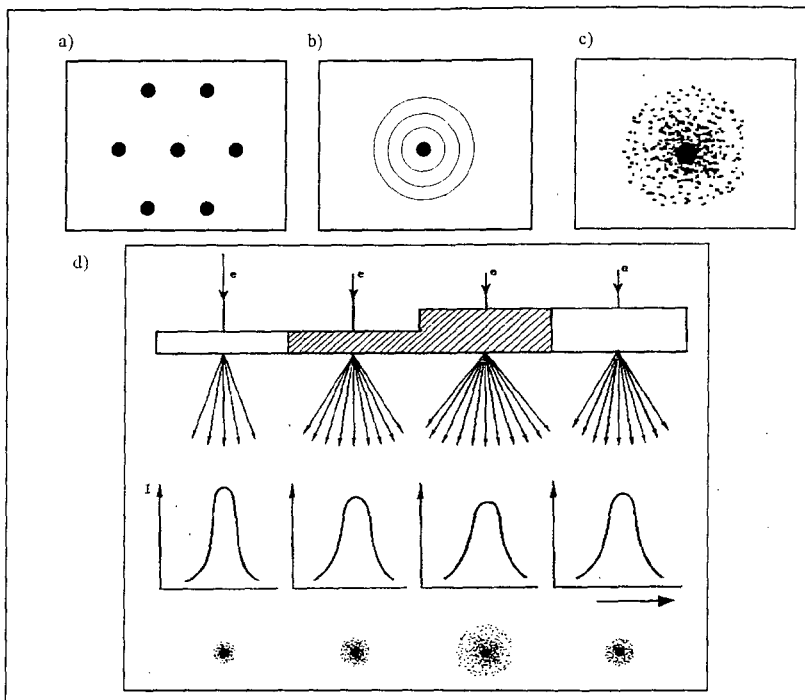


Fig. 13. Representación esquemática de patrones de Difracción; a) un monocristal, b) un policristal. c) un amorfo y d) muestra la intensidad de distribución y el patrón de Difracción final de un espécimen amorfo, donde varía el grosor y la densidad (la parte sombreada muestra una mayor densidad) [3].

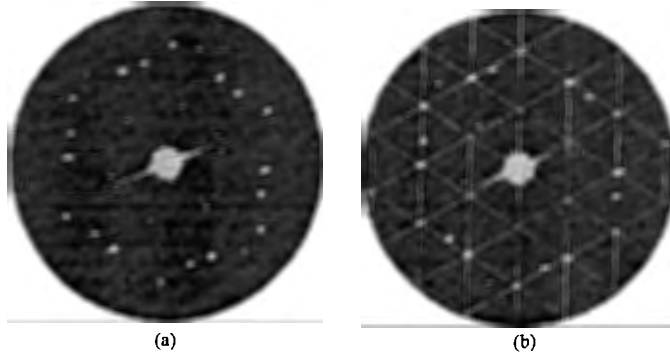


Fig. 14. Recreación de un patrón de difracción realizado a un virus del mosaico de tabaco. En el círculo (a) se observa en el centro el punto de mayor densidad (nula o menor difracción electrónica) y en el área circundante los puntos de mayor difracción. En el círculo (b) con la ayuda de líneas geométricas, se observa que este virus posee una estructura casi cristalina. [3].

### 3. MICROSCOPIO ELECTRÓNICO DE BARRIDO (MEB).

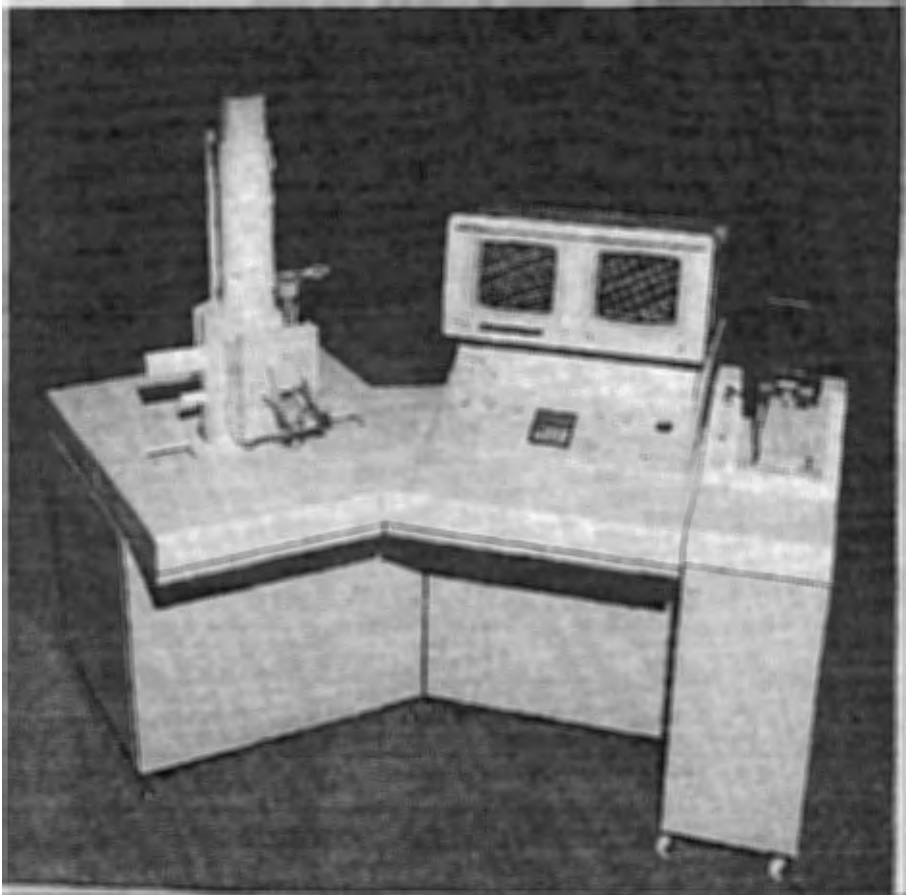


Fig. 15. Microscopio Electrónico de Barrido JEOL. JSM5400LV. Centro de microscopía electrónica. U de G.

El MEB es un instrumento que se emplea principalmente para la observación y caracterización de superficies. Para formar imágenes en este microscopio, se utilizan los electrones retrodispersados y secundarios, aunque alternativamente se pueden emplear aquellas radiaciones que están por encima de la muestra (Fig. 3). El aprovechamiento de estas últimas proporciona información adicional de la muestra, tanto estructural como de composición química.

El principio básico de un MEB es barrer punto por punto la muestra con el haz de electrones finamente enfocado. La imagen se forma en un tubo de rayos catódicos (TRC), en sincronía con el haz de electrones.

De esta forma, una imagen se construye punto por punto, mostrando las variaciones de eficiencia en la generación y recolección de la radiación seleccionada en diferentes puntos de la muestra [9] y donde la imagen se forma por los electrones secundarios principalmente.

Mediante un MEB es posible examinar y observar superficies irregulares de las distintas muestras, las imágenes nos dan una apariencia tridimensional bajo un efecto de iluminación, tal como si la luz estuviera situada en el lugar ocupado por el detector y el ojo del observador en el sitio del emisor de electrones. Dado que el haz enfocado es muy fino, el enfoque efectivo es mantenido en un rango de profundidad preciso, consecuentemente las imágenes resultantes tienen una extraordinaria profundidad de campo, de 35  $\mu\text{m}$  a 1000 ampliificaciones, lo que es mucho mayor que lo producido en un microscopio estereoscópico [4].

La resolución de un MEB es de 25 nm (aprox). Depende naturalmente de la penetración del haz de electrones. Aunque se consiga una mayor penetración, la emisión secundaria no emerge del lugar preciso de impacto del haz electrónico, sino a partir de una zona y profundidad determinada. Este tipo de electrones secundarios afecta significativamente la resolución del microscopio. A causa de estas condiciones, el aumento efectivo del MEB es de unos 30.000 diámetros para muestras biológicas [4].

Los materiales metálicos, bajo incidencia del haz electrónico emiten abundantes electrones secundarios, por lo tanto pueden ser observados en este microscopio sin previa preparación. Por el contrario las muestras no conductoras, como las biológicas (sin tratamiento) por lo general producen escasas emisiones secundarias, por lo tanto estas muestras deben ser recubiertas con una fina capa metálica, para evitar el acumulamiento de carga durante la observación [4].

Sin embargo, por la necesidad creciente de observar y analizar objetos en sus estados nativos, es decir, sin usar un tratamiento previo a la observación, se desarrollaron sistemas de bajo vacío (LV). Para aquellos investigadores del área biológica que necesitan prevenir la deformación de las muestras debido al alto vacío y el recubrimiento metálico, por ejemplo: granos de polen, esporas, hojas, hongos y tejidos suaves de plantas entre otros.

En el MEB, la cámara del cañón de electrones y el sistema de lentes que define el tamaño del haz electrónico, deben ser mantenidos en alto vacío y suma limpieza. Por lo tanto estas secciones se encuentran normalmente en vacío constante mediante una bomba rotatoria y una difusora. No obstante en el modo LV, la cámara de muestras es mantenida a bajo vacío, esta es evacuada diferencialmente por una bomba rotatoria diferente a las antes mencionadas, el grado de vacío en la cámara de muestras puede ser ajustado entre 0.1 y 1 Torr usando una perilla de ajuste de presión de la cámara.

En un bajo vacío como este, mientras que los electrones viajan en la cámara de muestras hasta alcanzar al espécimen, estos colisionan con las moléculas residuales de gas, ionizándolas. Estas moléculas de gas ionizado son atraídas hacia la superficie cargada de la muestra absorbiendo los electrones cargados de la muestra, permitiendo entonces el observar materiales no conductores aun sin cargarse.

Sin embargo, en este grado de vacío los electrones secundarios al ser usados para la observación morfológica ordinaria, no pueden ser detectados dado su baja energía. Por el contrario los electrones retrodispersados poseen una mayor energía que los electrones secundarios y son detectados como señales de imagen.

Al igual que el MET, un microscopio electrónico de barrido cuenta con los siguientes sistemas.

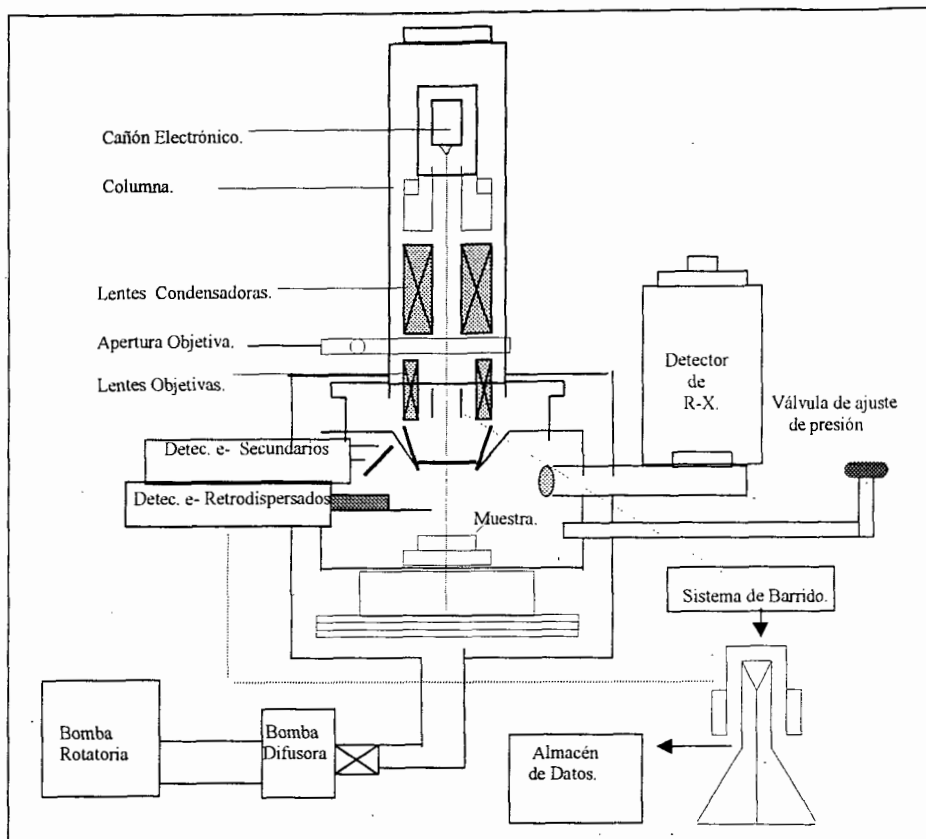


Fig. 16. Diagrama esquemático de un Microscopio Electrónico de Barrido.

### 3.1. SISTEMA DE ILUMINACION.

Un diagrama esquemático de un MEB típico se encuentra en la figura 16. La columna es la parte central del microscopio de barrido, en su parte superior se encuentra el cañón de electrones, que es la fuente del haz primario. El cañón de electrones tiene una constitución similar a la ya descrita para el microscopio electrónico de transmisión, teniendo un filamento, una cápsula de Wenheit y un ánodo, el voltaje de aceleración empleado para el microscopio electrónico de barrido va desde 0.5 a 30 Kv.

### 3.2. SISTEMA ÓPTICO-ELECTRONICO.

Debajo del cañón de electrones, en la columna del microscopio está la apertura y la lente condensadora. La apertura no es más que una laminilla con un orificio, este tiene la finalidad de filtrar el haz de electrones, permitiendo pasar solo los electrones más próximos al centro de la columna (eje óptico), con una ligera pérdida en la intensidad del haz.



La lente condensadora, que como todas las lentes en el microscopio electrónico, es una bobina electromagnética, tiene como función principal enfocar el haz de electrones, haciéndolo lo más delgado posible (de 100 a 10 nm). La profundidad de penetración de los electrones es típicamente de 1µm en algunos casos la resolución obtenible está limitada por la profundidad de penetración de los electrones.

La siguiente parte de la columna la forman la apertura y la lente objetiva. La apertura objetiva tiene control en la alineación del haz; a mayor diámetro de la apertura, mayor es la cantidad de electrones que inciden sobre la muestra.

La lente objetiva es la lente más importante del microscopio, ya que se encarga de dar el enfoque final al haz y donde el sistema generador de barrido, hace oscilar al haz de electrones en sincronía con un tubo de rayos catódicos, este sistema asiste a la lente objetiva para irradiar solo una cierta región de la muestra.

### 3.3. SISTEMA DE DETECCIÓN.

La interacción del haz primario con la muestra producirá los electrones secundarios, retrodispersados y demás radiaciones que tendrán la información de la superficie de la muestra que será analizada por los diferentes detectores (si es que el microscopio cuenta con ellos).

- Los detectores de electrones secundarios más comunes son los de centelleo, donde la punta detectora esta unida mediante fibra óptica a un fotomultiplicador y este a su vez a un tubo de rayos catódicos, esta punta esta cubierta por la celda de Faraday, la cual se polariza con una carga positiva de 250V, lo que permite que entren los electrones secundarios. (Fig.17).



Fig. 17. Esquema donde se muestra un detector de centelleo, donde son recibidos los electrones secundarios y los electrones retrodispersados, este detector tiene una gran sensibilidad para observar superficies rugosas.

- Los detectores de electrones retrodispersados utilizan un par de diodos semiconductores, los cuales se encuentran por encima de la muestra y en ambos lados del haz incidente, este detector se polariza positivamente con un voltaje de 50V donde solo los electrones retrodispersados alcanzan al detector; por otra parte este detector se utiliza cuando la cámara se encuentra trabajando en el modo LV donde la detección con electrones secundarios se vuelve imposible (Fig. 18).

Este mecanismo explica la alta eficiencia para la formación de imágenes con electrones secundarios, en comparación con el que se pueden tener con detectores de electrones retrodispersados.

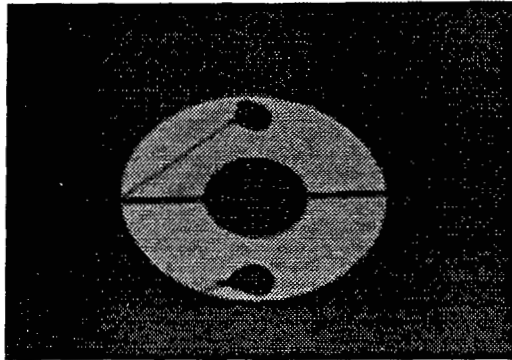


Fig. 18. Esquema donde se observa un detector de electrones retrodispersados, el cual se coloca completamente por encima de la muestra, este detector se puede utilizar para observar muestras con superficies muy homogéneas o pulidas y para observar las muestras biológicas sin tratamiento, principalmente en el modo de bajo vacío.

Por otra parte, también existen detectores de estado sólido para rayos-X, los cuales se encargan principalmente de desarrollar los métodos analíticos, estos se emplean para proporcionar información elemental cuantitativa o semicuantitativa de la muestra a partir del Na, un ejemplo de ellos es el detector de Energía Dispersiva de Rayos-X (EDX).

Los espectros de rayos-X presentan picos de intensidad pronunciada a ciertas longitudes de onda, indicando un incremento en la producción de rayos-X (fig.19) Estos picos representan energías precisas para cada elemento.

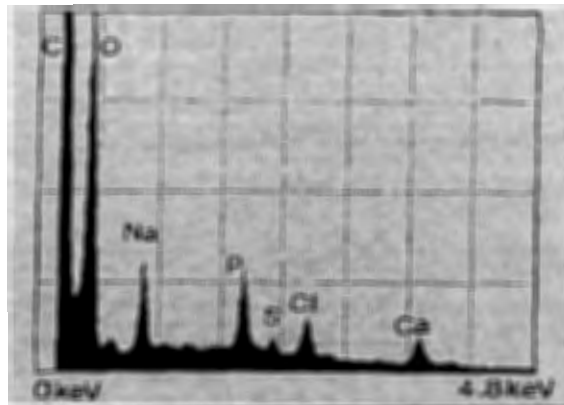


Fig. 19 Gráfica donde se observa un análisis realizado a una pieza de queso deshidratado. Los elementos contenidos en el queso son claramente detectados debido a que la muestra no sufrió ningún tipo de tratamiento ni fijación química y fue analizada a bajo vacío. Este espectro de energía dispersiva de rayos X, muestra en los diferentes picos los elementos detectados y bajo la gráfica se indica las unidades de energía en Kilo electron-Volts (KeV).

Aun cuando los rayos-X son empleados principalmente para el análisis elemental, también pueden ser usados en los modos de formación de imagen. En el mapeo elemental de rayos-X, el TRC muestra un punto brillante para cada cuanto de rayos-X característico. La concentración de puntos es una medida de la concentración de los elementos correspondientes de la muestra (fig. 20).

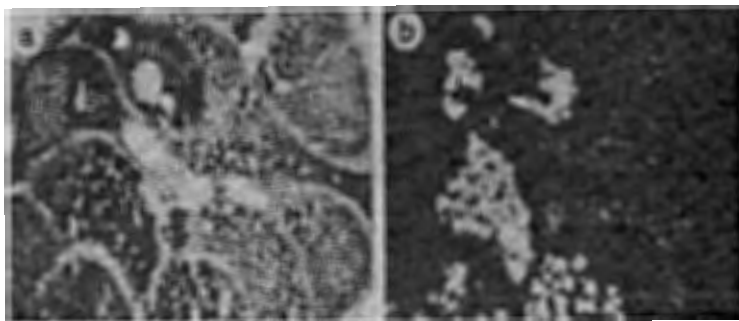


Fig. 20. Ejemplo de un mapeo elemental de rayos-X realizado en una glándula salival humana, imágenes fueron tomadas en la misma región de la muestra, donde en a) se observa la imagen convencional de la muestra y en la imagen b) se observa la presencia del Ca representado por la parte mas clara. Si se comparan las dos imágenes se concluye que los niveles de Ca se distribuyen preferentemente en los gránulos secretorios que en otros espacios intracelulares (Cortesia CME).

### 3.4. CONTRASTE DE IMAGEN.

Uno de los aspectos más sorprendentes de un MEB, es la aparente facilidad con la cual las imágenes de objetos pueden ser interpretadas por los observadores, sin embargo, es frecuente que para algunas imágenes obtenidas con esta técnica, aun sobre objetos sencillos, sea necesario tener habilidad para la interpretación de imágenes y para esto lo básico es el conocimiento del proceso completo de formación de la imagen.

#### CONTRASTE TOPOGRÁFICO

La capacidad de la imagen de electrones secundarios para mostrar la topografía de la superficie de una muestra rugosa, es una de las características más impresionantes de la técnica. El contraste topográfico se forma por variaciones en el ángulo de incidencia del haz primario, variaciones de punto por punto en la eficiencia en que los electrones son recolectados y de los efectos de penetración en bordes agudos.

Para muestras que poseen una superficie muy lisa, es posible ver contraste topográfico mas claramente utilizando una imagen formada con electrones retrodispersados. En esta imagen se puede acentuar el contraste topográfico si se inclina un poco el detector con respecto a la superficie de la muestra. El contraste topográfico en muestras de baja densidad de electrones puede mejorarse depositando sobre su superficie una capa muy delgada de un metal pesado, como el aluminio, oro u oro-paladio.

#### 4. PREPARACIÓN DE MATERIAL BIOLÓGICO PARA MICROSCOPIA ELECTRONICA.

Cualquier muestra para ser observada en un microscopio electrónico se coloca en la columna de alto vacío, de tal forma que cuando necesitamos observar material biológico, es necesario que los especímenes se encuentren completamente secos y se mantengan de forma muy similar a su estado *in vivo*, tanto como esto sea posible [10].

Sin embargo, el 70 a 80% de los componentes de un espécimen biológico es agua, si un espécimen no posee una preparación previa, el agua se evapora causando la contracción del espécimen, por lo tanto, no se obtendrá una imagen real de la muestra, particularmente cuando se trata del MET.

Para los especímenes relativamente duros y de poco contenido de agua se requiere poca preparación, ya que estos especímenes resisten la desecación sin colapsarse (granos de polen, cubiertas de semillas y cutículas de insectos entre otros) para ser observados en el microscopio electrónico de barrido. Para muestras más delicadas o en las que se deba examinar la estructura interna, se necesita recurrir a otros procedimientos y el método a escoger depende de la naturaleza de la muestra.

La opción es que el espécimen sea tratado inmediatamente después de obtenerlo, sin embargo debido a la descomposición, el espécimen no puede tener un estado real a su estado vivo, de tal forma que para observarse en un microscopio electrónico se aplica la siguiente regla general:

- Las proteínas y lípidos que constituyen al espécimen son química o físicamente fijados, para mantenerlos en un estado lo más cercano como sea posible a su estado *in vivo*.
- Se deshidrata antes de ser introducido al microscopio electrónico.

El método para preparar muestras biológicas, originalmente desarrollado para el MET ahora ha sido casi establecido, de ahí que, los especímenes para el MEB son preparados en las bases del método para transmisión.

Los especímenes preparados en secciones o cortes ultra finos son para ser observados en microscopía de transmisión, mientras que para microscopía de barrido los especímenes gruesos se usan para observar imágenes tridimensionales. Aunque hay algunas diferencias en métodos de preparación entre estas dos técnicas de observación, debe ser probado el método originalmente desarrollado para transmisión, que también trae resultados satisfactorios para barrido [10].

Lo que se describirá aquí, son procedimientos generales, por lo tanto para las necesidades individuales de observación de material biológico, se recomienda consultar libros de referencia específica para la preparación de las muestras deseadas. En todos los casos la muestra requiere ser fijada, deshidratada, incluida, cortada y contrastada cuando requiera un análisis con el MET, en cambio si se examina en el MEB, después de la fijación debe deshidratarse, desecarse y finalmente se recomienda un adecuado recubrimiento metálico.

#### 4.1 FIJACIÓN.

En general, los principios básicos de fijación y preservación que se utilizan en los estudios histológicos con microscopios ópticos, se aplican igualmente a los estudios de mayor resolución con ME, aunque los criterios y los tipos de fijadores, además de soluciones amortiguadoras son en general diferentes, por lo tanto la elección del fijador será determinada por:

- a) El tipo de técnica microscópica.
- b) La naturaleza del material que se vaya a preservar.
- c) El tamaño de la muestra.
- d) El efecto químico del fijador sobre la sustancia o estructura a estudiar.

El propósito de la fijación es preservar la estructura del tejido con la mínima alteración, de manera que se conserve en la forma lo mas parecida a su situación *in vivo*. Adicionalmente debe conferir a la muestra consistencia, que permita manipularla e inspeccionarla al microscopio electrónico. Por lo tanto, una fijación debe proveer a las moléculas la unión estable necesaria para mantenerlas juntas durante la deshidratación.

Las estructuras que se protegen con la fijación varían según la naturaleza química del fijador. se consigue una imagen mas completa cuando se utilizan conjuntamente varios fijadores. Por lo tanto, se elige el fijador de acuerdo con la naturaleza química de la estructura que se desea estudiar [11]. Hasta ahora los compuestos químicos que se usan como fijadores son varios aldehídos, tetróxido de osmio y permanganato de potasio, a estos se pueden añadir otros cuyo efecto es en parte fijar y en parte teñir. Los más comunes son sales de cromo, sales de uranio, compuestos de plomo y ácido fosfotungstenico.

Los métodos de fijación de muestras para ME deberían de ser tan variables como los especímenes mismos, sin embargo se usan procedimientos generales por lo que es aconsejable que se empleen métodos que ya han sido utilizados con muestras similares y posteriormente hacer modificaciones según lo requiera la muestra. Algunos especímenes biológicos deben ser fijados tan pronto como sea posible, ya que las estructuras finas sufren alteraciones, tanto en tejidos animales como en tejidos vegetales, los cambios ultraestructurales se deben principalmente a la pérdida de agua y la autólisis.

Algunos de los fijadores mas usados en ME se enlistan a continuación y se mencionan algunas de sus propiedades:

El tetróxido de osmio ( $\text{OsO}_4$ ) tiene dos funciones, una como fijador y otra de proporcionar electrones de contraste, entra lentamente al tejido pero su reacción es rápida, esto significa que las capas superiores del tejido impiden el progreso del fijador, por lo tanto su penetración es menor a 1mm [12]. Este fijador se utiliza comúnmente para tejidos animales ya que se asocia con lípidos, proteínas y lipoproteínas, sin reaccionar con el ARN ni en ADN. Por otra parte tiene resultados deficientes para la aplicación en plantas.

El glutaraldehído ( $\text{C}_5\text{H}_8\text{O}_2$ ) es el de mayor eficiencia de los fijadores dialdehídos y preservadores de estructuras, estabiliza y previene la distorsión durante el proceso, acrecienta la permeabilidad del tejido medio. No existe otro fijador que lo sobrepase en habilidad para entrecruzar proteínas, no imparte contraste al tejido ni cuando se tienen lípidos insolubles. Para una buena estabilidad del espécimen debe usarse tetróxido de osmio después de fijar con glutaraldehído.

El formaldehído (HCHO) es un fijador ligero usualmente usado para fijar tejidos duros que no serían penetrados por el glutaraldehído, aunque su penetración es más lenta, reacciona con proteínas, lípidos y ácidos nucleicos; combinado con el glutaraldehído forma un fijador estándar.

La fijación con permanganato de potasio (KMnO<sub>4</sub>) proporciona una penetración más profunda que el tetróxido de osmio, sin embargo se pierde mucho material celular durante y después de la fijación, proporciona un alto contraste y una excelente visualización de las membranas celulares.

La acroleína (C<sub>3</sub>H<sub>4</sub>O) se le conoce también como aldehído acrílico, penetra y reacciona más rápido que otros fijadores. Aparte de las variaciones en la duración y la temperatura de fijación, existen muchos otros procedimientos que han sido experimentados, tales como la adición de sales a fijadores, para incrementar la osmolaridad y mejorar la preservación.

Las sales de uranio actúan como fijador y como contraste, se usan antes de la deshidratación, ayuda a una estabilización fina de estructuras y previene la agrupación de ADN.

El pH del fijador debe ser cercano al del tejido de lo contrario la conducta y estructura de las proteínas se alteraría. En tejidos animales, el pH óptimo para una preservación satisfactoria de estructuras finas es de 7.2 a 7.4, pero existen excepciones; por ejemplo en células vegetales la mejor fijación es a un pH de 8.0.

Otro factor importante respecto a los fijadores, es la fuerza iónica, por ejemplo, si un fijador es isotónico, este realizara una penetración muy lenta al tejido; si es hipertónico el tejido sufrirá una contracción y finalmente si el fijador es hipotónico el tejido tendera a hincharse. La temperatura de fijación también es importante, se debe tener en cuenta que la velocidad de penetración se reduce a bajas temperaturas, por otra parte a altas temperaturas el tejido sufrirá de cambios por autólisis[13].

#### 4.2. DESHIDRATACIÓN.

La deshidratación es necesaria, ya que comúnmente se utilizan medios de inclusión que no son miscibles en agua; consecuentemente a los especímenes se les debe sustituir el agua con solventes miscibles con el medio de inclusión. Los dos agentes deshidratantes mas ampliamente usados son etanol y acetona, estos dan resultados muy similares con la mayoría de los especímenes [14], se pueden usar además el etilenglicol, el polietilenglicol, y el óxido de propileno [4].

La mayoría de las resinas son solubles en etanol y acetona, pero se mezclan mas comúnmente con óxido de propileno, este es usado con frecuencia como el último paso de la deshidratación (de enlace) antes de la inclusión en resinas epóxicas. El óxido de propileno es un reactivo diluyente y no se separa de la resina epóxica durante la polimerización, consecuentemente no hay problema si una pequeña cantidad de óxido de propileno permanece en el medio de inclusión. El óxido de propileno no debe usarse si el espécimen ha sido teñido con ácido fosfotungsténico (PTA) durante la deshidratación, ya que el óxido de propileno extrae el PTA [12].

La elección del agente deshidratante es en base a la función de la resina de inclusión, ya que por ejemplo las resinas poliéster no son solubles en etanol y el espécimen es usualmente deshidratado en acetona, o son deshidratados en etanol y posteriormente se sumergen en acetona. También se puede usar estireno como un solvente intermedio para resinas poliéster.

Las muestras pueden ser deshidratadas a baja temperatura o a temperatura ambiente. Si los tejidos fijados y sin fijar en estado húmedo se secan al aire, ocurre una inevitable retracción y deformación. En casos de células libres la extracción del agua ocasiona un aumento de la tensión superficial, por lo que se acumulan algunas sustancias no deseadas.

Si la deshidratación comienza a bajas temperaturas, esta es elevada hasta alcanzar una temperatura ambiente cuando las muestras están en solución de 90 al 95% de agente deshidratante en agua. El mayor efecto químico en la deshidratación de una muestra, es la extracción de los lípidos contenidos en ellas.

#### 4.3. INCLUSIÓN.

La inclusión de los especímenes para ME tiene al menos dos funciones principales: la primera es proporcionar una consistencia homogénea para la obtención de cortes y la segunda es permitir que sea estable durante la observación. Un medio ideal de inclusión para la ME sería aquel que tuviera la misma consistencia que la muestra analizada; pero la naturaleza variable de los materiales biológicos hace que esto sea prácticamente imposible [11]. Sin embargo, cualquier medio de inclusión que se considere para la ME, debe satisfacer en un grado razonable los siguientes criterios:

- a) La resina líquida debe ser soluble en los reactivos deshidratantes, en los de enlace o en ambos.
- b) Su viscosidad debe ser tal que penetre la muestra fácilmente.
- c) El bloque endurecido debe tener una consistencia uniforme y no debe causar contracción de las estructuras tisulares. Debe permitir la obtención de cortes delgados de 50 nm o menos, con relativa facilidad.
- d) La resina endurecida debe ser estable y no sublimarse bajo el haz de electrones.
- e) No debe contrastarse para facilitar la observación del espécimen.

Como es difícil encontrar un medio de inclusión que reúna todos los criterios antes mencionados debe escogerse un medio que de resultado óptimo para cada proyecto en especial. Existen varios medios de inclusión con propiedades que se adaptan a diferentes especímenes y tipos de estudio, entre ellos:

##### 4.3.1. Medios Acrílicos.

Los monómeros de metacrilato, hicieron posibles muchos años de valiosos estudios, pero actualmente son poco utilizados para ME. Esto se debe principalmente a los variados artificios que se pueden producir durante el procesamiento y a la inestabilidad de los cortes frente al haz de electrones, esto determina un colapso de las estructuras finas y de las membranas.

Otros factores implican la contracción de aproximadamente 20% del volumen original durante la polimerización. Ocasionalmente se presentan burbujas de gas en el bloque terminado, pero tanto estas como el daño por polimerización pueden ser superados por técnicas cuidadosas o modificadas. Cabe señalar que en la actualidad se ha logrado que estos medios eviten la contracción, por lo que se busca reincorporar a los medios acrílicos a las técnicas de inclusión para microscopía electrónica.

#### 4.3.2. Resinas Epóxicas.

El uso de las resinas epóxicas para muestras biológicas resulta el medio más frecuentemente empleado en la actualidad. Estas resinas tienen ventajas claras sobre los metacrilatos: endurecen uniformemente, tienen una contracción total de solo 2% de la resina; no presentan daño por polimerización y son estables bajo el haz de electrones. Las resinas epóxicas se polimerizan o son preservadas físicamente en forma distinta a los metacrilatos y debido a que los polímeros epóxido son de enlace cruzado, el bloque preservado final es insoluble en los solventes más comunes. Regularmente la falta de contraste entre el medio de inclusión y los tejidos hace esencial el teñido con las sales de metales pesados.

Los especímenes incluidos en resinas epóxicas proporcionan un bloque duro, que resulta ligeramente más difícil de cortar que el bloque de metacrilato, pero que tiene una resolución mucho mayor y mejor preservación de las estructuras finas de los tejidos. En general el medio de inclusión está compuesto de una o más resinas de epóxido, más uno o más endurecedores (generalmente anhídridos) y de un acelerador (generalmente una amina). También se incorpora en distintas proporciones un plastificante (dibutilftalato) [11].

#### 4.3.3. Resinas poliéster.

Los trabajos iniciales de la resina poliéster fueron para incluir bacterias, protozoarios, algunos tejidos animales y vegetales. El valor en la resolución de la ultraestructura, ausencia de retracción en el bloque final, ausencia de daños por polimerización y su estabilidad bajo el haz de electrones han quedado bien establecidos.

#### 4.3.4. Medios solubles en agua.

En virtud de que muchos investigadores requieren la información química de algunas estructuras (como calcificaciones en tumores malignos), así como la localización de enzimas dentro de los organelos celulares, esto ha conducido al desarrollo de medios de inclusión que son hidrosolubles antes de su polimerización. Estos aún siguen siendo mejorados y no pueden considerarse por ahora como de uso rutinario, aunque se evita la desnaturalización por la deshidratación con etanol y se conserva más actividad bioquímica.

Se ha demostrado que después de la fijación en aldehídos e inclusión en medios hidrosolubles, los tejidos son susceptibles de hidrólisis enzimática. Los medios solubles en agua se prestan mejor para la inclusión de material congelado en seco y los glicometacrilatos particularmente para técnicas de sustitución de congelación, lo que puede hacer una investigación importante de la citoquímica ultraestructural [11].

### 4. 4. METODOS DESHIDRATANTES A BAJAS TEMPERATURAS.

En este tipo de métodos los especímenes se preparan a bajas temperaturas para reducir la extracción de componentes lábiles por el agente de fijación, deshidratación y el medio de inclusión. En el método estándar las soluciones se mantienen congeladas (acetona, metanol, éter dietílico). Los otros métodos de baja temperatura, como la desecación por congelación, sustitución por congelación y crió ultramicrotoma involucran una congelación inicial rápida del espécimen [14].



#### 4.4.1. Secado por punto crítico.

El secado por punto crítico consiste en variar la temperatura y la presión de un líquido dentro de un recipiente transparente, en el cual se observa claramente la presencia de las fases líquida y gaseosa, manifestándose mediante la presencia de un menisco (tensión superficial), sin embargo existen ciertos valores de presión y temperatura los cuales son conocidos como valores críticos  $T_c$  y  $P_c$ , para los que el menisco desaparece y las fases líquida y gaseosa son indistinguibles (Fig.21).

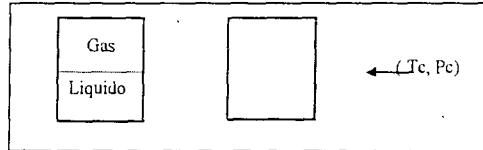


Fig. 21. Representación gráfica del equilibrio entre fases líquida-gaseosa (izquierda) y el comportamiento de la sustancia en el punto crítico (derecha).

El secado por punto crítico, (Fig.22 via 2) dá mejores resultados para prevenir los efectos dañinos de fuerzas de tensión superficial que hace el secado por aire, Para este procedimiento, inicialmente el agua en un espécimen en arreglo o no, es intercambiada por un solvente orgánico (etanol, acetona). Subsecuentemente, el espécimen se transfiere a un recipiente cerrado a presión, donde primero es infiltrado y rodeado por  $CO_2$  líquido o freón.

La temperatura y presión son aumentadas por encima de los valores críticos en el cual la fase líquida y gaseosa tienen la misma densidad, después de pasar el punto crítico la presión se reduce lentamente y la recondensación del fluido a través del enfriador adiabático se evita. (el dióxido de carbono tiene su punto crítico a  $31.1^\circ C$  y 72 atm, el freón 13 CCIF  $28^\circ C$  y 38 atm. (El del agua es de  $374^\circ C$  y 218.5 atm, y estas condiciones puede causar daño térmico a la muestra si la desecación por punto crítico se hiciera a partir del agua). El secado por punto crítico es una de las rutas más comúnmente utilizadas para procesar especímenes, particularmente tejidos, para el MEB [15].

#### 4.4.2. Fractura.

El proceso de fractura de un espécimen congelado, es a través del plano en el cual ofrece un mínimo de resistencia para aplicarle fuerza directa. En la práctica, la fractura del espécimen por tensión produce un singular plano de fractura (realizado por un separador primario o con un microtomo) donde el corte como resultado de las dos fuerzas, adquiere superficies concoidales (cóncavas y convexas), estos procedimientos se pueden realizar tanto en vacío, como a presión atmosférica; todo esto con el fin de dejar una superficie con ondulaciones de menores de  $1 \mu$  [15].

#### 4.4.3. Secado por congelación.

Si un tejido se transfiere a la columna de un microscopio en alto vacío, primero el agua del tejido hierve y la extracción subsecuente del calor latente de la evaporación causa la congelación del agua restante [14], por lo tanto la tensión superficial producida durante la evaporación, al igual que los cristales de hielo generados durante la congelación, causan severa distorsión en la mayoría de los tejidos. De manera que los especímenes deben estar fijados antes de reemplazar el agua con solventes orgánicos no fisiológicos.

En la Figura 22 (vía 3), el agua del espécimen es convertida primero en estado sólido por congelación, se sublima subsecuentemente y reduce la presión parcial del agua sobre el espécimen. El secado por congelación de solventes orgánicos dá la posibilidad de evitar los efectos dañinos causados por cristales de hielo que se forman durante el congelamiento y las fuerzas de tensión superficial durante el secado por aire [15]. Para mantener en un mínimo los cambios estructurales, las condiciones óptimas de fijación deben ser elegidas (temperatura, pH, osmolaridad) para reducir la solubilidad de los lípidos en los fluidos substitutos.

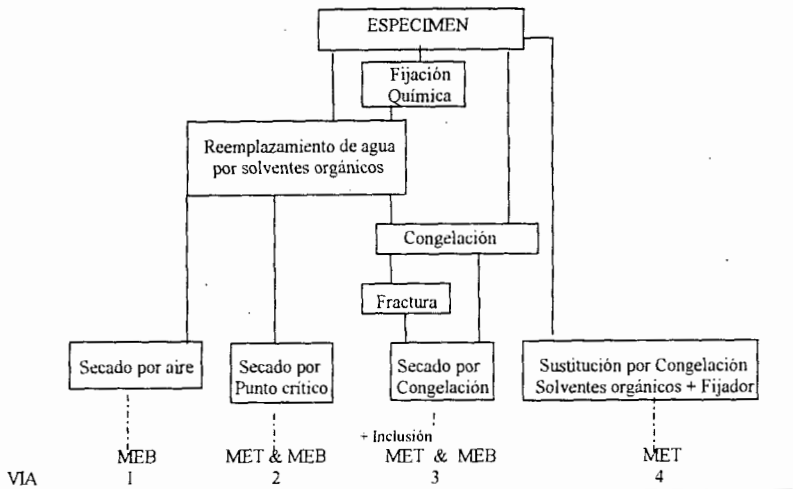


Fig.22. Diagrama esquemático que describe las diferentes vías de preparación de especímenes, que incluye la sustitución de agua con solventes orgánicos durante el proceso de montaje. La vía 1 muestra el secado por aire con solventes orgánicos; la vía 2 representa el secado por punto crítico, la vía 3 utiliza el secado por congelación y la vía 4 muestra el proceso de la sustitución por congelación.

#### 4.4.4. Sustitución por congelación.

La sustitución por congelación como técnica de preparación para ME, se basa en el congelamiento rápido de los especímenes, seguida por sustitución del hielo por un solvente orgánico a temperatura que inhiben la recrystalización dañina del agua congelada en el sistema [15].

El daño causado durante la infiltración de tejidos secos con el medio de inclusión, pueden evitarse usando el método de sustitución por congelación. Aquí, el congelamiento rápido del tejido es seguido por una solución que sustituye al hielo a temperaturas  $< 0^{\circ}\text{C}$ . Una vez el tejido congelado en la solución, se mantiene por una periodo que va desde un par de días hasta tres semanas, durante este lapso el hielo se disuelve lentamente sin distorsionar la estructura del tejido. Una vez removido el hielo del espécimen, se infiltra en resinas de metacrilato y después de la polimerización por radiación UV o por calor, son cortados.

Al igual que los otros métodos a bajas temperaturas, la meta de la sustitución por congelación es poder examinar estructuras y constituyentes del espécimen atrapados por la congelación.

#### 4.5. ULTRAMICROTOMIA.

Los microtomos diseñados específicamente para la obtención de cortes para ME se conocen con el nombre de Ultramicrotomo (fig.23). Las necesidades actuales al igual que las futuras, requieren que estos instrumentos proporcionen un medio para obtener con precisión cortes delgados, que sean de grosor uniforme reproducible y estén capacitados para obtener cortes más delgados que los histológicos.

Existen dos razones muy importantes por las cuales se debe utilizar al ultramicrotomo, primero, el MET opera regularmente de 50 – 60 keV, por lo tanto si el corte es mayor a 100 nm los electrones no serán capaces de atravesar el espécimen y segundo, las estructuras celulares pueden traslaparse en un corte grueso, por lo tanto puede confundir la apreciación de la observación. Comúnmente los cortes van de 70 a 100 nm[12].

Para lograr estas demandas, el instrumento debe ser de alta precisión, donde el avance de la muestra hasta el filo de la cuchilla debe ser totalmente controlado. La velocidad de corte (velocidad a la cual pasa el bloque por el filo de la cuchilla durante el corte de una muestra) deberá ser variable sobre una gama muy amplia y la orientación tanto de la muestra como de los soportes de la cuchilla deberán ser flexibles.

La calidad de los cortes depende de las características de las cuchillas, por lo tanto las imperfecciones de los cortes son provocados por los defectos de las cuchillas, de tal forma que se recomienda examinar cuidadosamente las cuchillas antes de ser utilizadas. Muchos defectos pueden ser detectados a simple vista rotando a contra luz la cuchilla (para una examinación mas detallada se utiliza un estereomicroscopio usando la incidencia de luz por arriba)[12].

En cuanto al tipo de cuchillas, las de diamante son superiores en capacidad que las cuchillas de cristal, ya que las primeras pueden ser utilizadas tanto en tejidos suaves como en tejidos duros. Las cuchillas de cristal dan resultados deficientes en especímenes duros, sin embargo, las de diamante son indispensables para tejidos duros, como aquellos que contengan colágenos, tejidos calcificados o tejidos botánicos. Las cuchillas de diamante son las que se utilizan para estudios de alta resolución, ya que se pueden lograr cortes de 20 nm [12].

Debido a que muchos son los factores involucrados, el corte es primordialmente un asunto de experiencia, antes de obtener un rendimiento considerable.

##### 4.5.1. Crioultramicrotomia.

La fijación química, la deshidratación y la inclusión causan distorsión biológica (actividad), esto por la extracción o dislocación de muchos componentes solubles, además de limitar reacciones químicas e inmunológicas. Por tal motivo se desarrolló la crioultramicrotomia para reducir esos efectos adversos. Esta técnica es indispensable en estudios donde se requiere la aplicación de microanálisis de rayos-X.

La crioultramicrotomia biológica puede dividirse en dos grandes grupos, los cuales se clasifican dependiendo de la preparación del espécimen. Aquellos que se criofijaron y aquellos que se fijaron químicamente. La criofijación incluye una congelación ultra rápida de especímenes sin fijación, a especímenes sin crió protector que no sufren daño con los cristales visibles en el microscopio electrónico. Esto requiere que las células vivas sean congeladas lo mas rápidamente posible.

El primer avance de la criofijación es realizar la observación y análisis de especímenes en un estado nativo donde puede ser estudiado el proceso dinámico. Algunas técnicas que requieren criofijación son para microanálisis, para alta resolución, criofractura y sustitución por congelación. Después de que la muestra está congelada, se lleva cuidadosamente a un contenedor de nitrógeno líquido, se coloca dentro de un soporte especial para especímenes, la muestra es llevada dentro de un pre-enfriador. El crioultramicrotomo corta secciones a temperaturas que varían entre  $-120$  y  $-160^{\circ}\text{C}$ . Los cortes son recolectados sobre rejillas y se criotransfieren al microscopio.

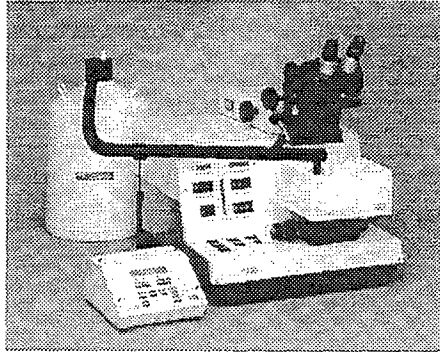


Fig.23. Ultramicrotomo RMC MT-7000. Centro de Microscopía Electrónica. U de G.

#### 4.6. RECUBRIMIENTO.

En el caso de la MEB, es necesario el recubrimiento de las muestras con materiales conductores. Hay varios métodos de preparación de películas delgadas para cubrir las muestras, de los cuales existen los recubrimientos químicos y los recubrimientos físicos.

Los métodos de recubrimiento están basados en depositar una película muy delgada de algún material conductor sobre la muestra no conductora, con la finalidad de mejorar la calidad de imagen, mediante la eliminación de la carga estática formada alrededor de la muestra causada por el barrido electrónico.

##### Recubrimiento químico.

- Este revestimiento se obtiene mediante la inmersión simple de las muestras en una solución alcohólica saturada de cloruro de oro y posterior secado al aire.

##### Recubrimiento físico.

- Este recubrimiento es usualmente con metales y en algunos casos con carbón. Esta maniobra tiene dos objetos: el de asegurar la conductividad eléctrica desde la superficie de la muestra al soporte y el de obtener una superficie que pueda emitir un gran número de electrones secundarios mediante el bombardeo de electrones.

En la actualidad los métodos más comúnmente utilizados son los de evaporación al vacío con la evaporadora de carbón, que asegura una capa de alta conductividad eléctrica; la evaporación no es directa sino oblicua en una nube. Alternativamente se emplea otro evaporador conocido como **sputtering**, el cual utiliza oro que se evapora fácilmente y emite gran número de electrones.

El doble recubrimiento con carbón y oro mediante evaporación al vacío, parece ser el más recomendado, las muestras no necesariamente deben procesarse con el doble recubrimiento, en gran parte de los estudios solo se han recubierto con oro. Es difícil llegar a una conclusión definitiva, pero no se han encontrado diferencias significativas entre los revestimientos simples y los dobles, por lo tanto, con un buen recubrimiento de oro es suficiente. En lugar de oro puede utilizarse platino-paladio, plata, cobre o aluminio.

#### 4.7. CONTRASTE.

La principal finalidad de la tinción o contraste en MET, es aumentar el contraste que presentan las muestras con el medio circunvecino, aumentando la densidad de la muestra. Esto se logra principalmente mediante el empleo de sales de metales de elevado número atómico; los átomos se depositan en estructuras de los tejidos.

El contraste puede ser altamente selectivo, sino específico para algunas estructuras y sustancias de los tejidos. La densidad es controlada mediante la cantidad de contrastante (tinción) depositada y por el grosor del corte. Las variaciones en contraste resultarán más por la calidad del corte que por la técnica de tinción [12].

##### 4.7.1. Tinción positiva.

La tinción positiva incrementa la dispersión de electrones de especímenes biológicos, este incremento es necesario por dos razones:

- 1) Los especímenes biológicos están compuestos principalmente de elementos de bajo número atómico (carbono, hidrógeno, oxígeno y nitrógeno), los cuales poseen bajo poder de dispersión electrónica.
- 2) Para obtener cortes delgados, los especímenes usualmente son incluidos en una resina epóxica, que es de origen biológico y que posee los mismos átomos que constituyen las células y tejidos.

El poder de dispersión electrónica de un espécimen aumenta, introduciendo átomos de metales pesados (osmio, uranio y plomo) en el tejido. Por lo tanto la imagen obtenida representa esencialmente la distribución de tales átomos en estructuras intracelulares [12].

Las áreas del espécimen que permiten la penetración del contrastante, aparecen oscuras en la pantalla del microscopio y las áreas que lo previenen aparecen claras. Estos valores de densidad están reservados en la impresión; áreas oscuras representan la ausencia de electrones, mientras que las áreas claras representan presencia de electrones [8].

Desde que los átomos de metales pesados se introducen en las muestras, se previene la penetración de electrones, las áreas de los cortes impregnados con estos átomos aparecen claros en la película pero oscuro en la impresión.

Los especímenes se pueden teñir durante la fijación ( $\text{OsO}_4$ ), antes o durante la deshidratación (con acetato de uranilo) y/o después del corte o microtomía (con acetato de uranilo y citrato de plomo).

#### 4.8. PROCEDIMIENTO RUTINARIO PARA TEJIDOS DE MAMÍFEROS.

Es necesario recalcar que no existe un fijador ideal para todas las muestras, esto debido a que los tejidos varían no-solo de una especie y otra, sino dentro de la misma especie existen diferentes tipos de tejidos, no obstante, se procede por lo general de la siguiente forma:

##### A) Fijación.

Se realiza con glutaraldehído al 2.5 % diluido en amortiguador de cacodilato de sodio 0.1 M, pH de 7.4, durante una hora a temperatura ambiente. Finalizada la fijación, los tejidos se lavan 2 veces con amortiguador de cacodilato.

##### B) Posfijación.

Se utiliza tetroxido de osmio al 1% en amortiguador de cacodilato de sodio 0.1 M, pH 7.4, durante una hora a temperatura ambiente. Concluida la posfijación, los tejidos se lavan con amortiguador de cacodilato.

##### C) Deshidratación.

La deshidratación es por medio de acetona o etanol en concentraciones ascendentes de 50, 70, 90 y 95 % por 10 min. cada uno. Después tres cambios en solvente al 100%. En el caso de usar etanol, los tejidos se deshidratan adicionalmente en óxido de propileno durante 20 min., dos cambios.

##### D) Infiltración.

La infiltración del tejido con la resina epoxica de inclusión (Araldita o Polybed) diluida 1:1 (vol : vol) con el solvente correspondiente (ácido de propileno o acetona) Esta etapa se efectúa en 12 - 20 horas, preferentemente en un rotor de baja velocidad.

##### E) Inclusión.

La inclusión se realiza en una resina epoxica pura; a los fragmentos se les elimina lo más posible, la resina diluida de la infiltración, se colocan y se orientan en los moldes; se etiquetan y se someten a la polimerización de la resina en un horno a 60-70°C, lo que dependerá de la resina usada, generalmente durante 20-24 horas.

##### F) Corte.

Se corta con un ultramicrotomo, con el cual se pueden obtener cortes de 0.5 - 1  $\mu\text{m}$ , los tejidos teñidos con azul de toluidina o parafénico, se pueden examinar en el microscopio óptico. De los mismos bloques se pueden obtener cortes de 60-90 nm, para el análisis en el MET.

##### G) Tinción o contraste.

Se tiñen los cortes finos, con acetato de uranilo durante 15 min. después se lava con agua destilada, se tiñe adicionalmente con citrato de plomo durante 5 min. Después de lavado con agua destilada y secada a presión y a temperatura ambiente, los cortes están listos para su observación.

#### 5. TECNICAS ESPECIALIZADAS

Si bien, con la utilización de técnicas convencionales (antes mencionadas) se obtiene gran y diversa información, el investigador requiere emplear otros métodos de tinción, por lo que se puede profundizar en el campo, utilizando técnicas más especializadas, esto para obtener o lograr la mayor información posible de la misma, por esa razón se ha desarrollado aplicaciones histoquímicas y autorradiográficas.

## 5.1. CITOQUIMICA.

La identificación y localización de componentes químicos en la célula también se pueden realizar por medio de técnicas citoquímicas. A nivel del microscopio óptico, la técnica general consiste en la producción de determinado color como resultado de la interacción de un colorante con algún componente químico de la célula. Esta metodología, empleada desde ya hace muchos años dentro de las técnicas histológicas, forman parte de lo que se conoce globalmente como histoquímica, se usa también para localizar enzimas.

Algunos métodos histoquímicos para localización de la actividad enzimática, a nivel de microscopía ordinaria, frecuentemente involucran la precipitación de metales, por lo tanto algunas técnicas pueden adaptarse para ser usadas en ME, ya que se depositan partículas pequeñas densas a los electrones en el sitio de reacciones químicas. Esta clase de estudio aunque carece de la resolución de otros métodos, proporciona información morfológica y funcional valiosa y los estudios futuros de tejidos deberán abarcar el uso de dichas técnicas [16].

Una técnica citoquímica que ha resultado de gran utilidad en la Biología Celular, es la inmunofluorescencia. Aquí, los anticuerpos específicos dirigidos contra determinado componente celular son marcados previamente con fluorocromos y su interacción con el antígeno correspondiente puede ser observada con el microscopio óptico, cuando la muestra es excitada con radiación ultravioleta, ya que esta hace que los colorantes fluorescentes emitan luz visible. La base metodológica de la inmunofluorescencia se puede aplicar en ME obteniendo así mejor resolución y por lo tanto una localización más fina de la reacción de la célula.

Este método de inmunocitoquímica modificado para ME emplea como marcadores o trazadores asociados a los anticuerpos, sustancias o partículas densas a los electrones. Entre los marcadores más utilizados se encuentran la ferritina, el oro coloidal y la peroxidasa de rábano. La ventaja de usar anticuerpos, radica en la posibilidad de demostrar la presencia de cualquier otro componente antigénico (generalmente proteínas) para visualizar al citoesqueleto.

Básicamente la técnica citoquímica requiere la fijación del espécimen con aldehídos para la preservación de enzimas y al mismo tiempo para retener el detalle morfológico. No solo debe mantenerse este equilibrio de la morfología y la densidad electrónica del producto terminal, sino que este deberá estar capacitado para resistir la técnica del procesamiento subsiguiente. Los tejidos deben ser pequeños y fijados inmediatamente después que son extirpados de su ambiente.

## 5.2. AUTORADIOGRAFIA.

En general la técnica consiste en introducir o aplicar a un animal de experimentación o a un cultivo celular, un precursor de alguna macromolécula conocida. El precursor contiene un isótopo radiactivo. Después de un tiempo determinado, se toman las muestras de tejido a estudiar y se procesan para MET. Los cortes posteriormente se cubren con una capa delgada de emulsión fotográfica con la que se deja interaccionar y después de un periodo de exposición se revelan con procedimientos fotográficos.

Los sitios de la célula que presentan radioactividad son detectados por la impresión que produce en la película fotográfica el isótopo, manifestándose como pequeños depósitos oscuros o negros que se observan en el microscopio óptico o electrónico. La autorradiografía en el MET permite una localización más precisa del sitio de la radioactividad, siendo de una resolución aproximadamente 10 veces mayor que en la microscopía óptica.

Los principios de la autorradiografía se aplican por igual en el microscopio óptico y en el MET. En este último, los cortes del tejido que contienen marca radiactiva son montados sobre rejillas, cubiertos con una emulsión fotográfica y las imágenes latentes producidas por el decaimiento del isótopo son visualizados después del procesamiento fotográfico de la emulsión de la rejilla.

Con el uso de esta técnica se ha obtenido información importante sobre diversos eventos dinámicos de la célula. Así, la localización de ácidos nucleicos, el tiempo de duplicación del ADN, la duración de etapas específicas del ciclo celular, la secuencia en la síntesis de una determinada proteína, carbohidrato o lípido, procesos de diferenciación celular, entre otras cosas, son fenómenos que han podido analizarse gracias a la autorradiografía. Para cada caso particular es importante la selección del compuesto precursor marcado con el isótopo.

El isótopo radiactivo más utilizado es el tritio, ya que emite partículas  $\beta$  de baja energía, es de menor masa y de poca penetración. Las partículas  $\beta$  emitidas por el tritio, son electrones y por lo tanto tienen carga negativa. Al llegar a la emulsión fotográfica son atrapados por las llamadas trampas de electrones, que son pequeñas imperfecciones introducidas artificialmente al cristal de bromuro de plata. Estos sitios se cargarán negativamente, lo que ocasiona que los átomos de plata de la vecindad emigren a estos sitios, neutralizando la carga y produciendo átomos de plata reducida. El proceso se repite hasta que se forma una imagen latente, lo cual se acompaña de la liberación de bromuro del cristal dejando la plata metálica.

Las emulsiones fotográficas en la autorradiografía para M.E. son de las llamadas nucleares y tienen como característica el ser geles formados por cristales muy pequeños de bromuro de plata con mayor concentración de metal. Al observar en el M.E. los depósitos de metal en los sitios de radioactividad, se presentan como pequeños filamentos negros enrollados irregularmente o como gránulos.

### 5.3. TINCIÓN NEGATIVA.

La tinción negativa es un método simple y rápido para estudiar la morfología y estructura de especímenes que no requieren un proceso tan complicado como el descrito para células y tejidos. Este método es útil para el análisis de virus, componentes celulares como ribosomas, fragmentos celulares como las membranas y macromoléculas aisladas entre las que destacan las proteínas. La tinción negativa permite la determinación de sombras a nivel molecular usando un microscopio electrónico de alta resolución.

La finalidad de la tinción negativa es incluir o impregnar las partículas completas en un medio denso de electrones, de manera que la muestra sea observada como un objeto luminoso sobre un fondo oscuro. Este método ha sido empleado por bacteriólogos desde 1890 para Microscopía óptica. Teñir negativamente provee contraste y preserva estructuras macromoleculares, así como minimizar el daño por irradiación al espécimen [8].

Un compuesto pesado para tinción negativa, es el ácido fosfotungsténico. En seco, la elevada densidad de electrones de los átomos de un metal envuelve al espécimen, la diferencia entre espécimen y la cobertura de átomos con respecto a su densidad, produce el contraste necesario (el espécimen aparece claro rodeado por un fondo oscuro). El haz electrónico pasa a través de la baja densidad electrónica del espécimen, pero no así por el fondo metálico.

El método de tinción negativa se basa en el principio de que el agente de tinción no reaccione con el espécimen, esto se completa usando la tinción al pH en el cual la atracción entre proteínas y colorante es insignificante.



En tinción positiva, los átomos de metales pesados se unen a sitios específicos en la molécula teñida [12]. Algunas de las sales metálicas más comúnmente usadas, como el acetato de uranilo, son aplicadas tanto para la tinción positiva como la negativa. La fijación con aldehído, permite la revelación de componentes internos.

Los criterios para la tinción negativa dependen no solo de la densidad de la tinción que se esta empleando, sino también de la preparación de la suspensión sobre la rejilla. La muestra por lo general se prepara sobre rejillas cubiertas con plástico o carbono, ya sea mediante nebulización, usando un nebulizador de gotas finas o colocando una gota sobre la rejilla con una micro pipeta o un asa de alambre de platino.

## 6. RIESGOS Y PRECAUCIONES DEL USO DE REACTIVOS.

La mayoría de los reactivos usados en el procesamiento de especímenes para ME son peligrosos en diversos grados. Muchos químicos para la fijación, deshidratación inclusión y tinción son potencialmente capaces de causar daños a quienes los manipulan, ellos pueden ser absorbidos por contacto con la piel o por inhalación [12].

El tetróxido de osmio debe manipularse con guantes de material impermeable, mascarilla y lentes herméticos a la penetración de gases, siempre en una campana extractora. ya que el tetróxido de osmio se volatiliza rápidamente a temperatura ambiente, sus vapores son perjudiciales a la nariz, ojos y garganta.

Los aldehídos deben manejarse con la misma precaución, puede formarse un carcinogénico espontáneamente en el aire cuando los vapores del formaldehído y el ácido clorhídrico se mezclan. El formaldehído puede causar carcinoma nasal.

Otro de los compuestos comúnmente utilizados es el cacodilato de sodio, este contiene arsénico y si se inhala o es absorbido por la piel puede causar dermatitis e inflamación en el hígado y riñón.

La acroleína es un químico riesgoso, flamable y extremadamente reactivo. Es altamente tóxico a través de vía oral y la exposición a sus vapores irrita la mucosa nasal y ocular, aunque la acroleína es moderadamente tóxica, a través de la absorción de la piel es altamente irritante.

Los componentes de todas las resinas epóxicas son iguales de peligrosas, los riesgos asociados con estas resinas es que son carcinogénicas, irritantes, flamables y muy tóxicas.

La toxicidad puede provocar una disfunción cardiaca, espasmos en el pecho y desórdenes neurológicos (debido a inhalación, ingestión y/o absorción cutánea). Las resinas emiten vapores especialmente durante su polimerización, por lo tanto debe existir ventilación en el laboratorio

El acetato de uranilo es doblemente peligroso ya que además de ser tóxico es radiactivo, la exposición a este, puede provocar cáncer y fibrosis de pulmón. Las sales de mercurio y plomo para la tinción son altamente tóxicas al igual que el permanganato de potasio.

## 7. APLICACIONES

La gran versatilidad demostrada por la microscopía electrónica permite una amplia gama de aplicaciones que incluyen desde la simple observación morfológica, pasando por la obtención de información sobre la composición y estructura de la muestra. Estas características hacen de la microscopía electrónica una de las herramientas de investigación más completas en cuanto a la cantidad y diversidad de información que proporciona.

Independientemente del área de estudio, las aplicaciones de la microscopía electrónica se pueden dividir en:

- Aplicaciones convencionales: es el tipo de aplicaciones más conocidas y aquellas que se refieren a la observación de la muestra a altas ampliaciones.
- Aplicaciones no convencionales: es donde se aplican los diversos modos de operación del microscopio para obtener información especializada acerca de la muestra.
- Experimentos dinámicos en el MEB: en este tipo de aplicaciones se aplica principalmente al área de materiales (esto incluye a algunas resinas), ya que se somete a la muestra a deformaciones que pueden ser de tensión o compresión, aplicación de campos eléctricos, dominios magnéticos y temperatura entre otros, todo esto durante el momento en que se lleva a cabo la observación.

### 7.1. ALCANCES

Si tenemos en cuenta que muchos de los progresos de la biología en los últimos cien años están estrechamente ligados a los avances del microscopio. El descubrimiento y el estudio de las bacterias, protozoos, la identificación de las células como constituyentes fundamentales de las plantas y los animales, el conocimiento de la estructura, desarrollo de los tejidos y órganos. Solo por mencionar algunos de los ejemplos más obvios; únicamente se hicieron posible por el desarrollo de microscopios cada vez más sofisticados, así como las técnicas asociadas con la preparación del espécimen.

El microscopio electrónico constituye una de las etapas más recientes de este desarrollo. Permite un examen directo a nivel de estructura más fino que cualquier otro instrumento y tal como lo hizo el microscopio óptico, el microscopio electrónico revela muchos detalles y ha extendido nuestro conocimiento de la organización de los tejidos de plantas y animales, además, se han variado radicalmente muchas de nuestras ideas acerca del modo en que se han constituido las células y de como funcionan.

Por consiguiente la microscopía electrónica como un método moderno de estudio, proporciona datos importantes a la investigación y contribuye a solucionar problemas en el área biológica y médica [17] donde se pueden señalar algunos de los alcances de los distintos equipos, ejemplo:

- El MET proporciona una examinación directa de posiciones atómicas, moléculas individuales, estudios morfológicos detallados y sus componentes pueden ser identificados, esta información es importante para la Biología Celular y Molecular. Con el MET y con otras metodologías, ha sido posible obtener un conocimiento integral de los diversos fenómenos celulares, realizando una unión estrecha entre la estructura y la función. Son entre otros, factores que han influenciado sobre el concepto de la organización celular que existe en la actualidad. además ha aumentado notablemente nuestro conocimiento de la estructura y la reproducción de los virus.

- La utilización del MEB se aplica a aquellas áreas de la biología que requieren un examen de detalles diminutos en la estructura superficial de los objetos tridimensionales pequeños. Así se ha demostrado su valor incalculable en estudios de objetos tales como, granos de polen, esporas de hongos, superficies de hojas, superficies ornamentales de semillas y frutos, cutículas, huevos de insectos, diatomeas, foraminíferos y pequeños fósiles tales como los ostrácodos[1]. Los paleontólogos pueden hacer distinciones más sutiles con fines estratigráficos.

## 7.2. LIMITACIONES DEL ME Y DE LAS INSTITUCIONES.

Si bien se ha hablado de los alcances o potenciales de los microscopios electrónicos, es necesario hacer hincapié en las limitaciones sobre la utilización de estos equipos, por ejemplo:

### A) En términos generales:

1. En los microscopios electrónicos, no es posible realizar estudios directos en soluciones acuosas.
2. Todas las imágenes obtenidas por los microscopios electrónicos, son en blanco y negro.
3. Si bien existen métodos preestablecidos para la preparación de muestras biológicas, algunos de ellos son muy laboriosos, costosos y complicados.

### B) En términos específicos:

1. En el TEM, en la mayoría de los casos, solo podemos introducir un par de muestras simultáneamente, las cuales son de un tamaño muy reducido (menores de 3 mm de diámetro), sin embargo, es el que posee una mayor resolución.
2. El MEB, debido a su resolución no alcanza a la Biología Molecular, sin embargo, puede llevar a cabo estudios topográficos de superficies celulares y la preselección de tejidos en áreas específicas para un microanálisis químico, ya que en algunos estudios la correlación entre morfología e información elemental es necesaria, donde este tipo de información se aplica para resolver problemas de diagnóstico patológico [17].

C) En términos institucionales, debido a que los microscopios electrónicos son instrumentos sofisticados, delicados y altamente costosos, no es tan simple tener acceso a los mismos.

En Guadalajara, Jal. existen a la fecha varios equipos de este tipo, de los cuales 2 son de la Universidad de Guadalajara (Ilustrados en las figuras 9 y 15) donde se hacen estudios Biológicos y de Física de Materiales. En el Centro de Investigaciones Biomedicas de Occidente del IMSS existe un MET, el cual se hacen estudios Biomedicos. En IBM de México (Corredor al Salto, Jal.) y en Motorola Guadalajara. cuentan con un MEB respectivamente, los cuales son utilizados principalmente para hacer estudios de control de calidad de componentes electrónicos.

Finalmente se debe hacer énfasis que, es importante que haya conocimiento del equipo con los que se cuenta, además que exista el conocimiento para la aplicación del microscopio electrónico en modelos biológicos y esto depende de lo que el investigador desee observar y/o estudiar con la técnica de microscopio seleccionada.

### 7.3. EJEMPLOS



Fig. 24. Figura obtenida por un MET a 15000X. Se observa un corte fino de una celula plasmática de la lamina propia del ciego del cobayo; Donde se distingue heterocromatina y eucromatina. Las cisternas del retículo endoplasmico se aprecian intensamente impregnados con yoduro de zinc y tetróxido de osmio; las estructuras redondeadas son las mitocondrias (Cortesía Mora Galindo).

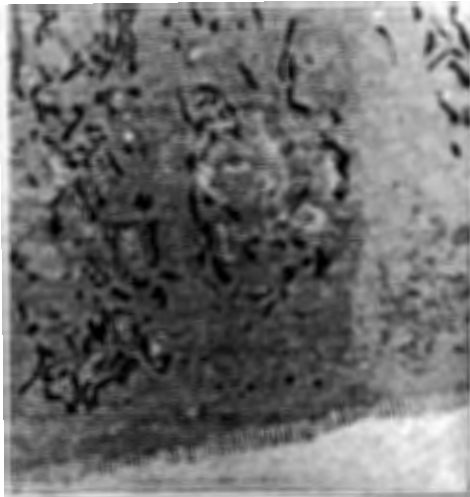


Fig.25. Fotografía tomada por un MET donde se observa un corte fino de la región superficial del epitelio cecal del cobayo, en donde se aprecian las microvellosidades. En el citoplasma se observan numerosas mitocondrias con diferente densidad a los electrones; Las zonas claras que se observan corresponden al complejo de Golgi. Tejido impregnado con yoduro de zinc y tetróxido de osmio. (Cortesía Mora Galindo).



Fig. 28. Fotografía tomada por un MEB. En la cual se observan los colpos de un grano de polen de *Opuntia rastrera*. Dicha muestra fue preparada solo con un recubrimiento metálico (Cortesía Muñoz-Ceja).

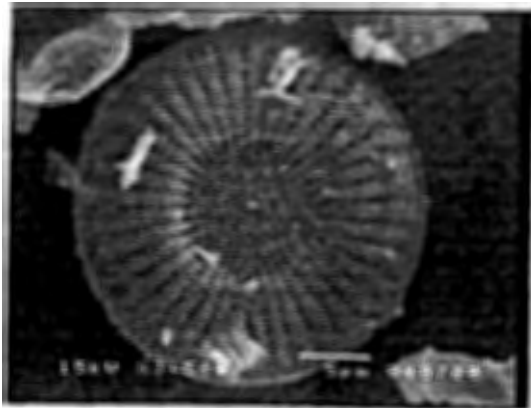


Fig.29. Imagen obtenida en un MEB donde se observa una Diatomea, Esto realizado a un estudio de tamaño de partícula de diversos polvos, Dicha muestra se preparo solo con un recubrimiento metálico (Cortesía Ceja Andrade).

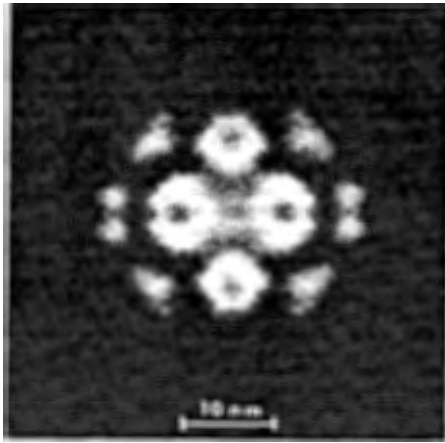


Fig.26. Imagen obtenida de un TEM, bajo un efecto de digitalización de imagen a diversos grados de inclinación de un virus del mosaico del tabaco (campo oscuro) donde se observa que este virus posee una superficie esférica (Cortesía Scott Burns).

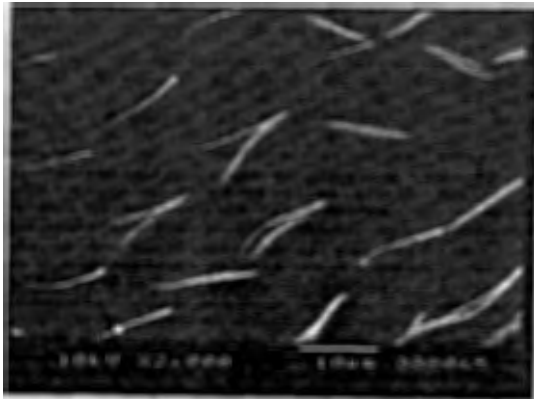


Fig.27. Esta fotografía fue tomada por un MEB. A los pelos del ala de una *Drosophila melanogaster* y en ella se observa claramente la diferencia que existe de los pelos normales de los pelos que sufrieron una mutación conocida como Multiple Wild Hair ; la muestra fue preparada con un simple recubrimiento metálico (Cortesía Alvarez-Ceja).

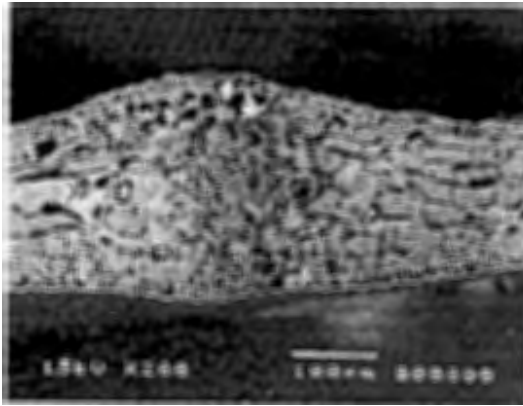


Fig.30. Imagen obtenida en un MEB en bajo vacío donde se observa el haz vascular y el mesófilo de una hoja de una gramínea, sin preparación de la muestra (sin fijación y sin deshidratación) (Cortesía Ceja Andrade).

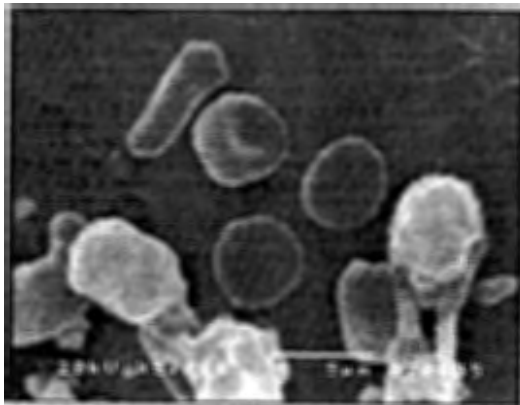


Fig.31. Imagen obtenida en un MEB, donde se observa un grupo de eritrocitos y linfocitos adheridos a un hueso de ratón. La preparación de la muestra se basó en una simple deshidratación y recubrimiento. (Cortesía Mondragon-Ceja).

## REFERENCIAS

1. Grimstone AV. *The Electron Microscope in Biology*. London: Eduard Arnold Publisher Ltd; 1981.
2. Dowben R. *Cell Biology*. New York: Harper & Row Publisher Inc; 1971.
3. Beeston B, Robert W H, Markham R. *Electron Difraccion and Optical Difraccion Techniques*. Amsterdam: North Holland Publishing Company; 1992.
4. Fujita T, Tokunaga J, Inohue H. *Atlas de la Microscopia Electronica en Medicina*. Barcelona: Editorial Espaxs; 1972.
5. Agar AW, Alderson RH, Chescoe D. *Principles and Practice of Electron Microscope Operation*. Canada: North-Holand Publishing Company; 1985.
6. KeveX Instrumens, Inc. *Energy-Dispersive X-Ray Microanalysis An Introduccion*. San Carlos California: Douglas Vaughan Editor; 1989.
7. Graham L. *Scanning Electron Microscopy and X-ray Microanalysis*. Great Britain; Analytical Chemistry by Open Learning; 1987.
8. Ludwig R. *Transmission Electron Microscopy: Physics of Image Formation and Microanalysis*. New York: Ed Board; 1985.
9. Ludwig R. *Scanning Electron Microscopy: Physics of Image Formation and Microanalysis*. New York: Ed Board; 1985.
10. Jeol. *Specimen Preparation Methods for Scanning Electron Microscopes*. Tokyo: Jeol Ltd. 1993.
11. Ralph E. Nunn. *Electron Microscopy: Preparation of Biological Specimens*. London England: Butterworth & Co., Ltd; 1970.
12. Hayat MA. *Basic Techniques for Transmission Electron Microscopy*. San Diego California: Academic Press Inc; 1986
13. Humer E. *Practical Electron Microscopy*. Canada: Cambridge University Press; 1993.
14. Audrey MG. *Fixation, Dehydration and Embedding of Biological Specimens*. Canada: Elsevier North-Holland Biomedical Press; 1991.
15. Robards AW, Sleytr UB. *Low Temperature Methods in Biological Electron Microscopy*. New York: Elsevier Science Publishing Company Inc; 1985.
16. Ralph E. Nunn. *Electron Microscopy: Microtomy, Staining and Specialized Techniques*. London England: England: Butterworth & Co., Ltd; 1976.
17. Hayat MA. *Correlative Microscopy in Biology: Instrumentation and methods*. Orlando Fl: Academic Press Inc; 1987.
18. Williams MA. *Quantitative Methods in Biology*. Canada: Elsevier North-Holland Biomedical Press; 1981.
19. Hayat MA. *Electron Microscopy of Enzymes*. New York: Van Nostrand Reinhold Company. 1973.
20. Hayat MA. *Fixation for Electron Microscopy*. New York: Academic Press Inc; 1981.



# **TESIS COMPUTARIZADAS**

**ESCRITORIO PUBLICO**

**ENCUADERNACIONES Y COPIAS**

**MONTE CAUCASO No. 100 DEPTO. 4**

**(ENTRE CALZ. INDEPENDENCIA NTE. Y SIERRA NEVADA)**

**COLONIA INDEPENDENCIA.**

**GUADALAJARA, JAL.**