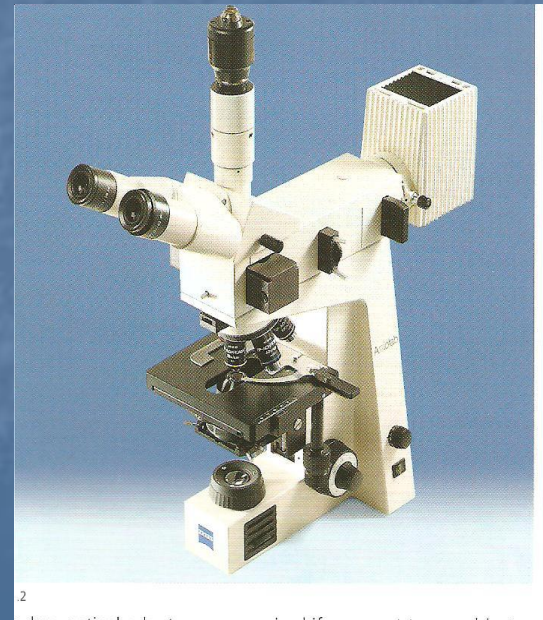
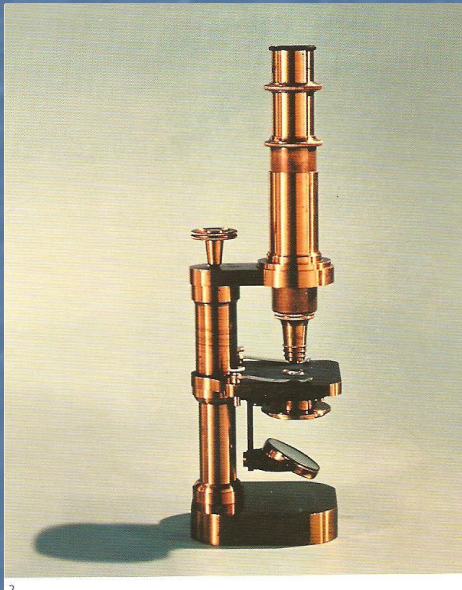
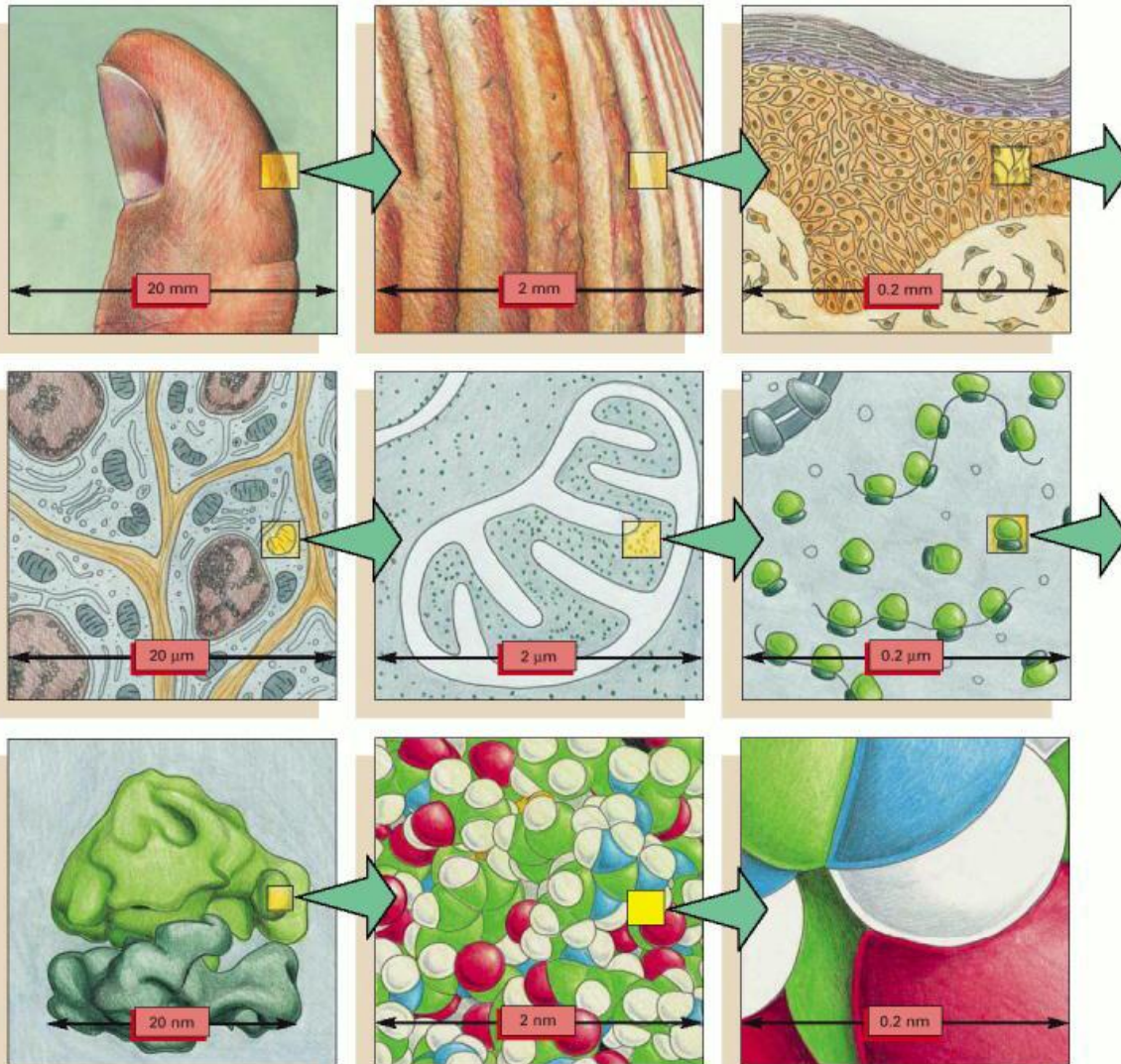


CONCEPTOS BÁSICOS DE MICROSCOPIA

Patricia Pérez-Alzola, MSc

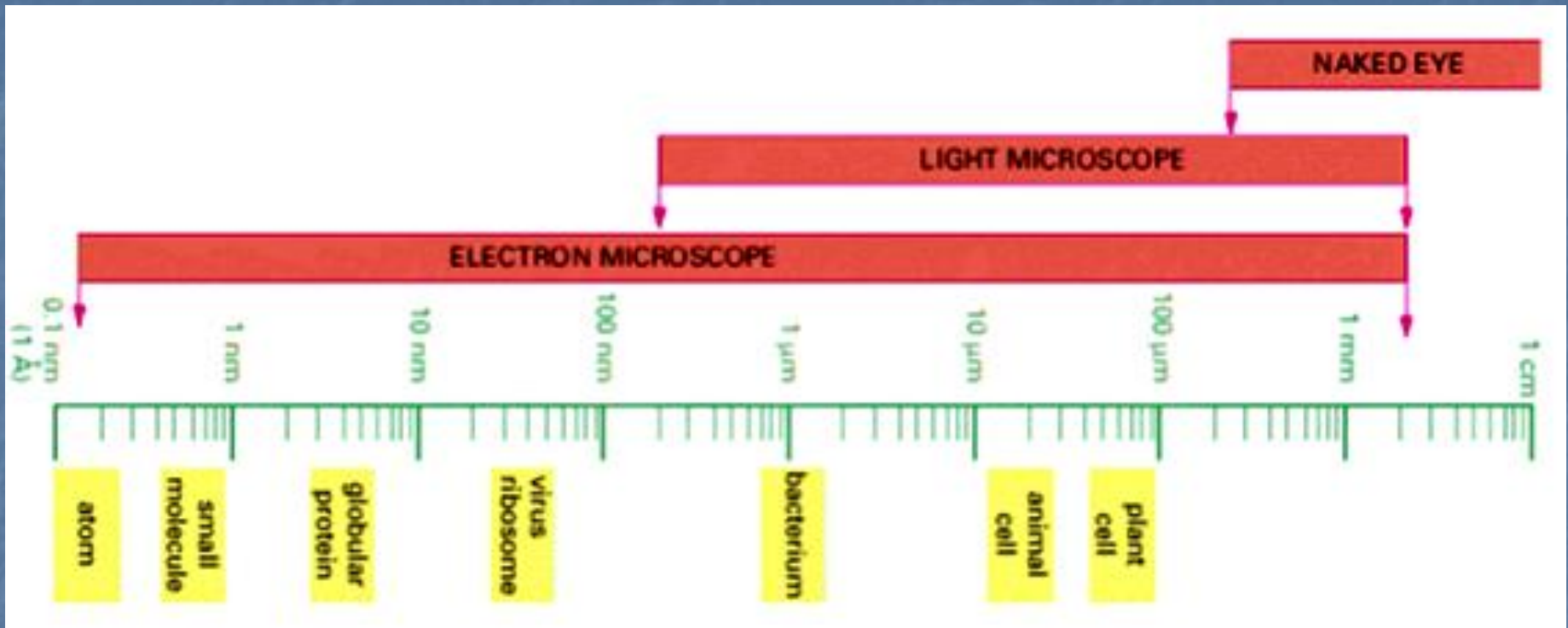


TÉCNICAS DE MICROSCOPIA



- 1611 **Kepler**
microscopio compuesto
- 1655 **Hooke** (célula)
- 1674 **Leeuwenhoek** (protozoos)
- 1838 **Schleiden y Schawn**
Teoría Celular
- 1879 **Abbé** mejora microscopio
- 1882 **Koch** tinciones
- 1886 **Zeiss** mejora microscopio
- 1930 **Lebedeff**
Mic. de Interferencia
- 1931 **Ruska y col.**
MET
- 1932 **Zernicke**
Mic. De Contraste de fase
- 1952 **Normansky**
Mic. Interfer. Diferencial
- 1965 **Cambridge Int.**
MEB
- 1968 **Petran y col.**
Mic. Confocal

PODER DE RESOLUCIÓN

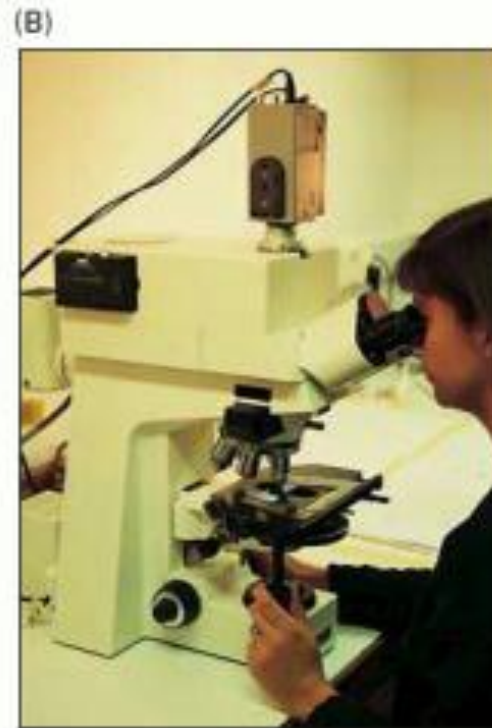
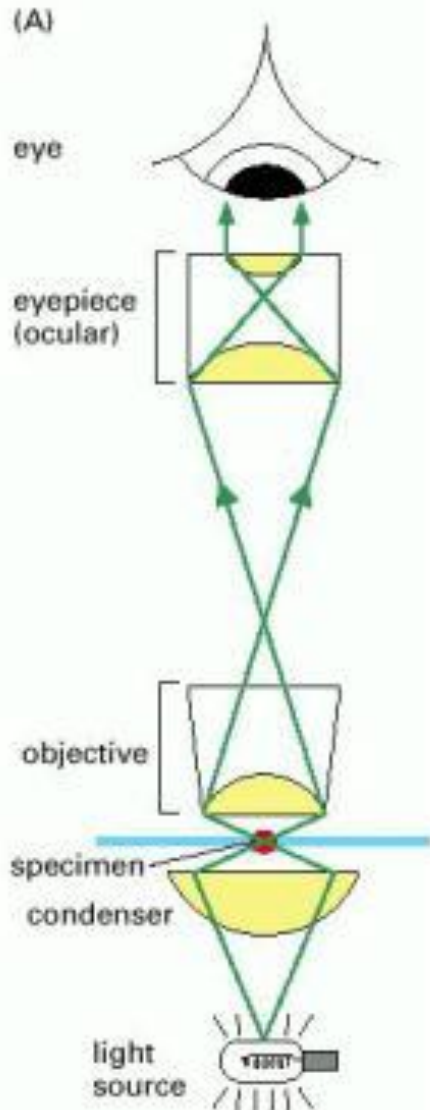


Microscopio de Luz : $0,2 \mu\text{m}$ (200 nm)

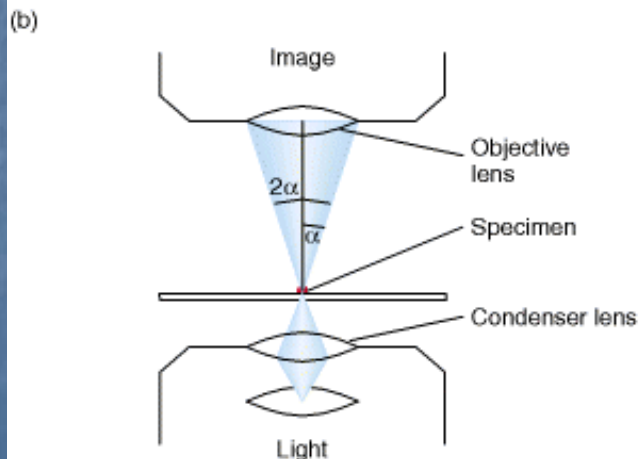
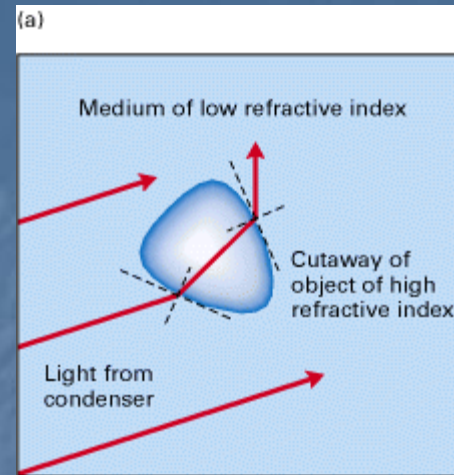
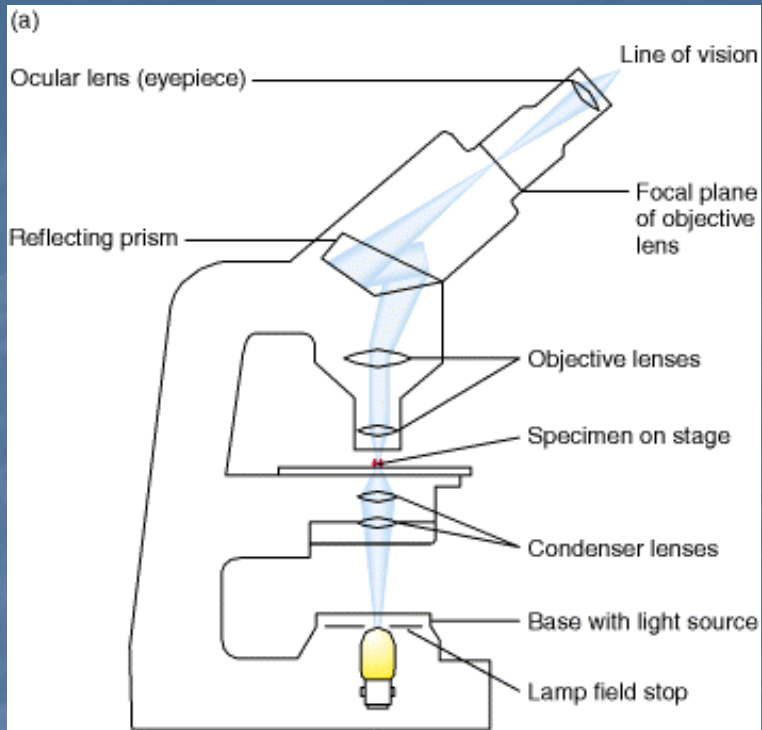
Microscopio Electrónico de Transmisión: 0,1 nm

Microscopio Electrónico de Barrido: 10 nm

MICROSCOPIA OPTICA O DE LUZ



- M. de Luz corriente o de Campo Claro
- M. de Contraste de Fase
- M. de Interferencia (DIC)
- M. de Campo Oscuro
- M. de Fluorescencia
- M. Confocal



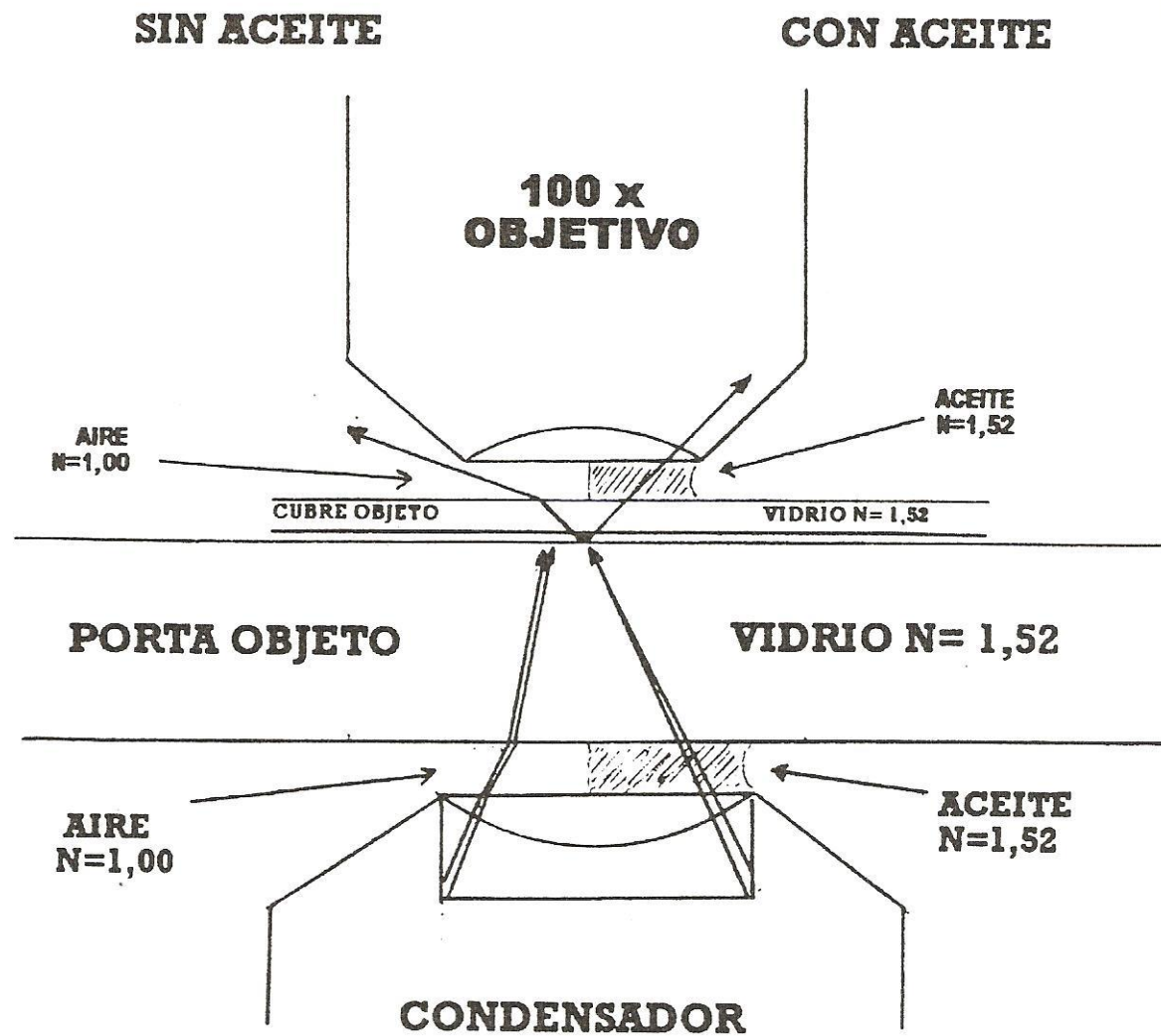
Resolución : $0,61 \lambda / n \sin \alpha$ (A.N)

λ : longitud de onda de la luz (luz blanca $0,53\mu\text{m}$)

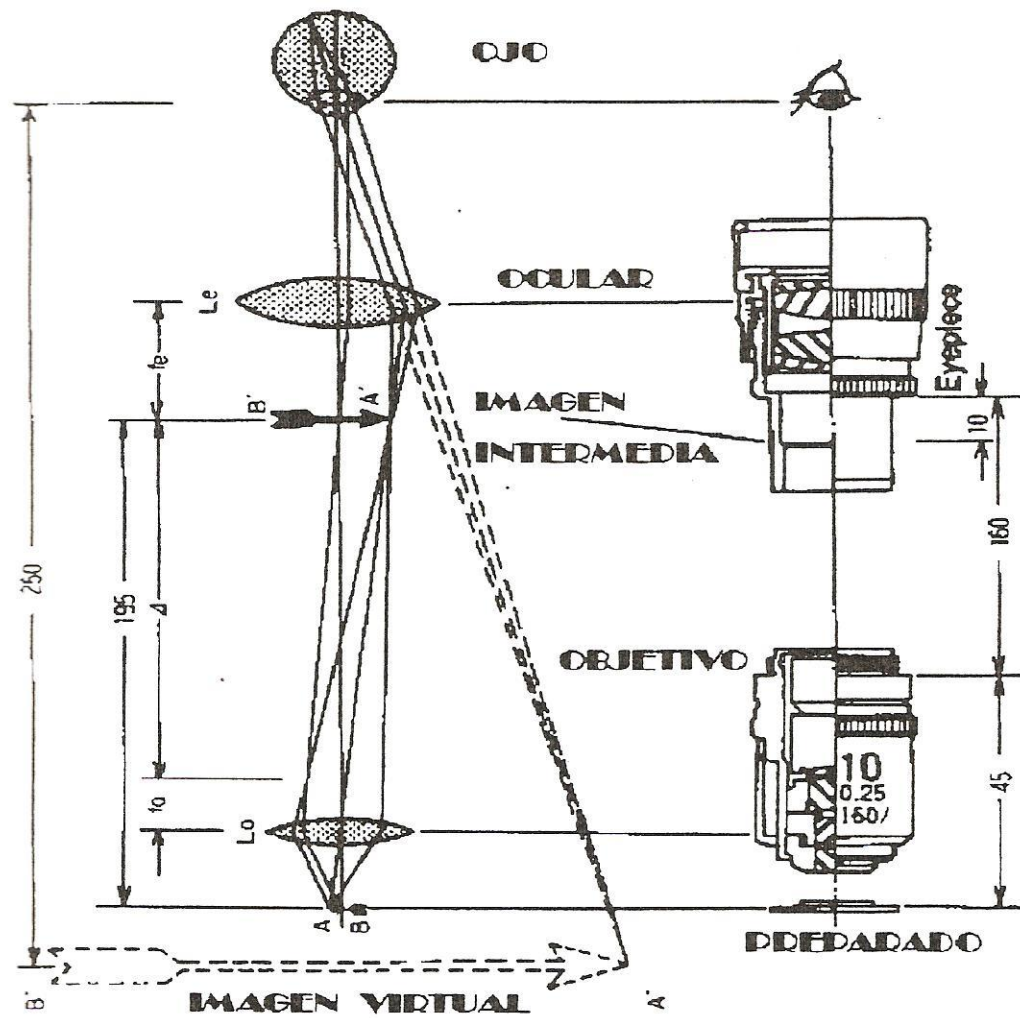
n : índice de refracción del medio (1,4 aceite de inmersión)

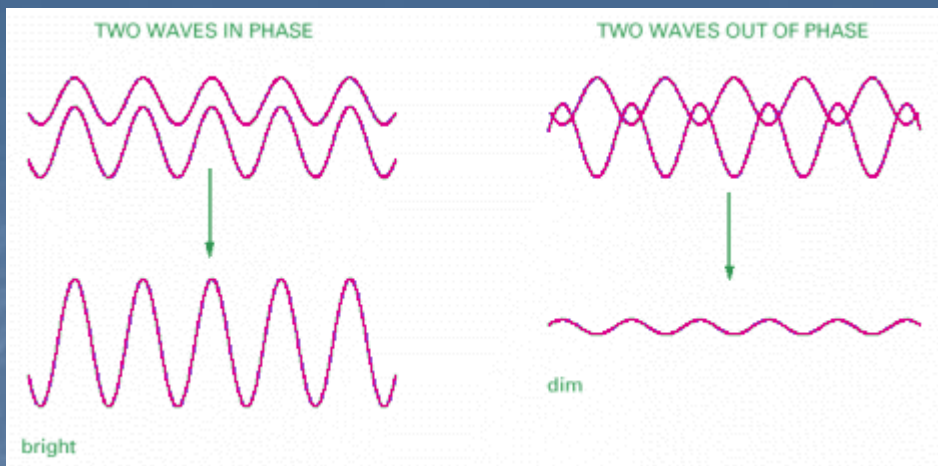
α : la mitad del ángulo del cono de luz (el máximo posible es 180° , por tanto $\sin$ es 1)

Aumento total: aumento del ocular x aumento del objetivo



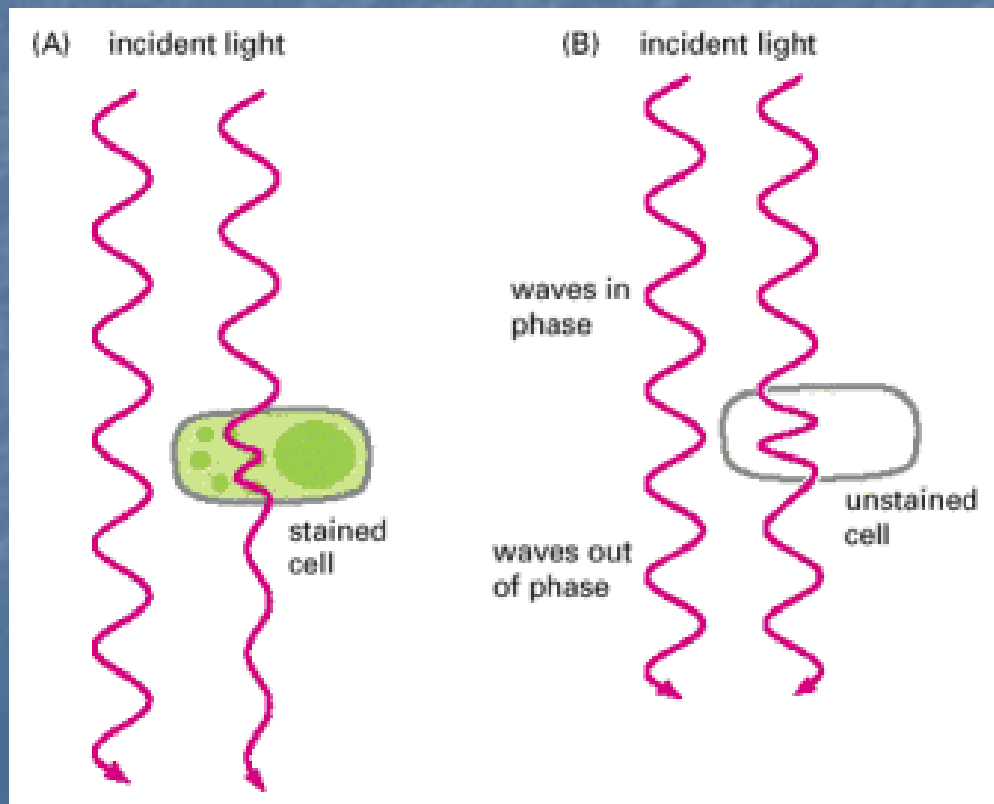
Se observa que con un índice de refracción igual al del vidrio, el haz de luz sigue una trayectoria recta, contrariamente a lo que sucede por ejemplo con el aire en el cual el haz de luz se refracta al pasar del vidrio al aire. El vidrio tiene un índice de refracción de 1,525 y el aire tienen un índice de refracción de 1,00 por lo tanto se trata de igualar el índice de refracción del vidrio con el de un medio de inmersión.





M. de Contraste de Fase:

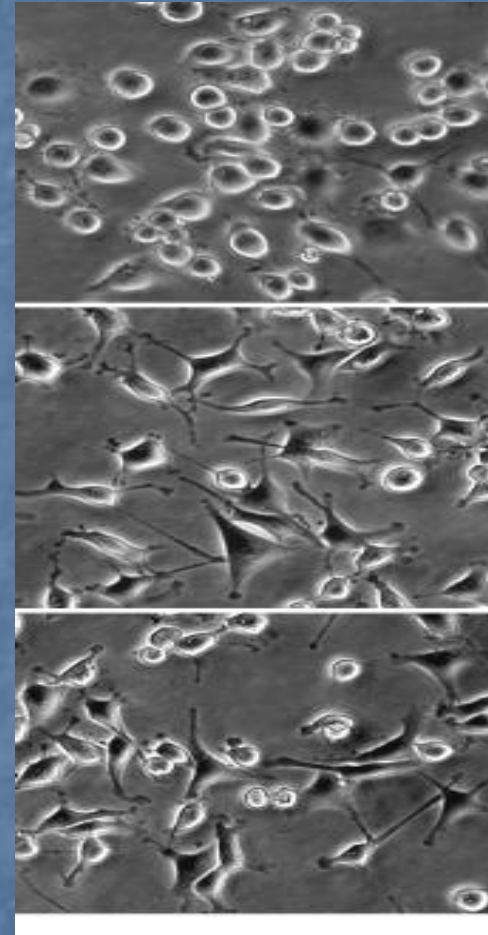
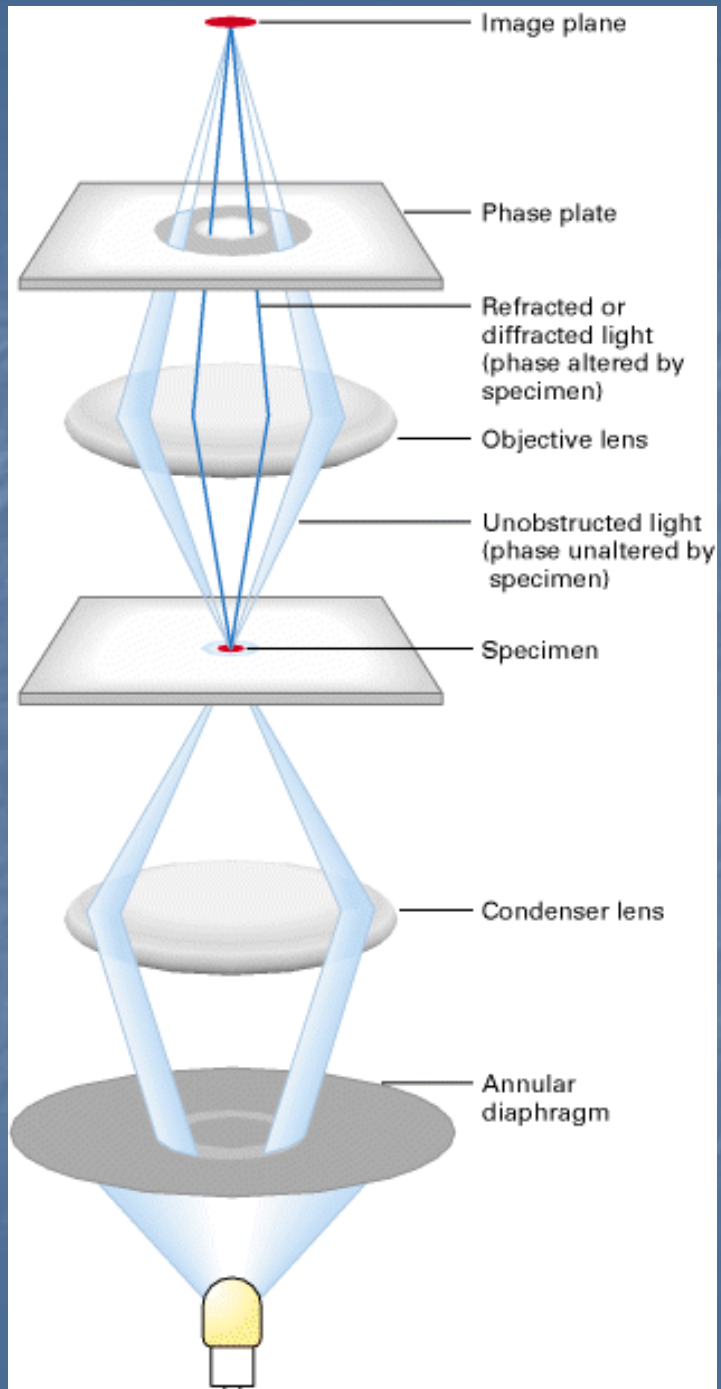
Genera una imagen en la que el grado de luminosidad u oscuridad de una zona depende de su índice de refracción, el que produce cambios en la fase de la onda luminosa



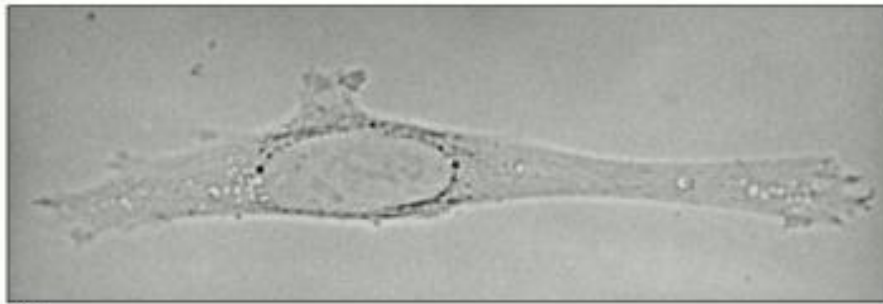
M. de Interferencia o de Normanski:

Genera una imagen en la que la muestra parece formar una sombra sobre un lado dada por una diferencia en el índice de refracción y el grosor de la muestra

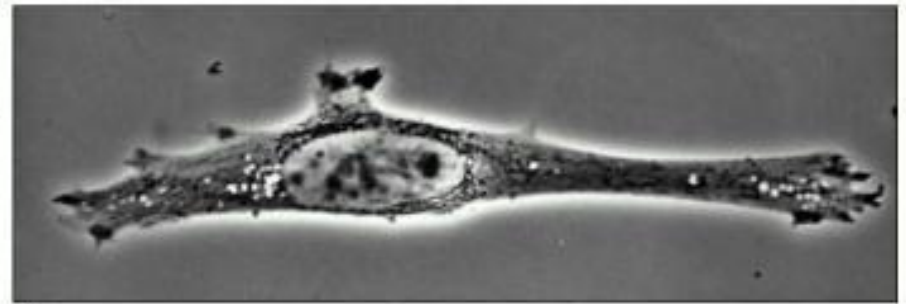
Microscopio de Contraste de Fase



Fibroblastos observados con distintos tipos de Microscopios



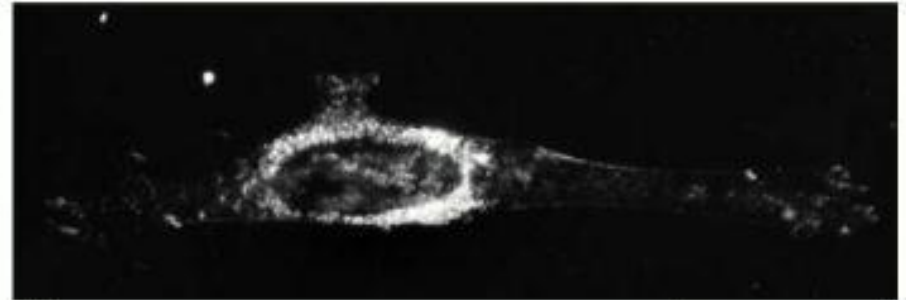
(A)



(B)



(C)

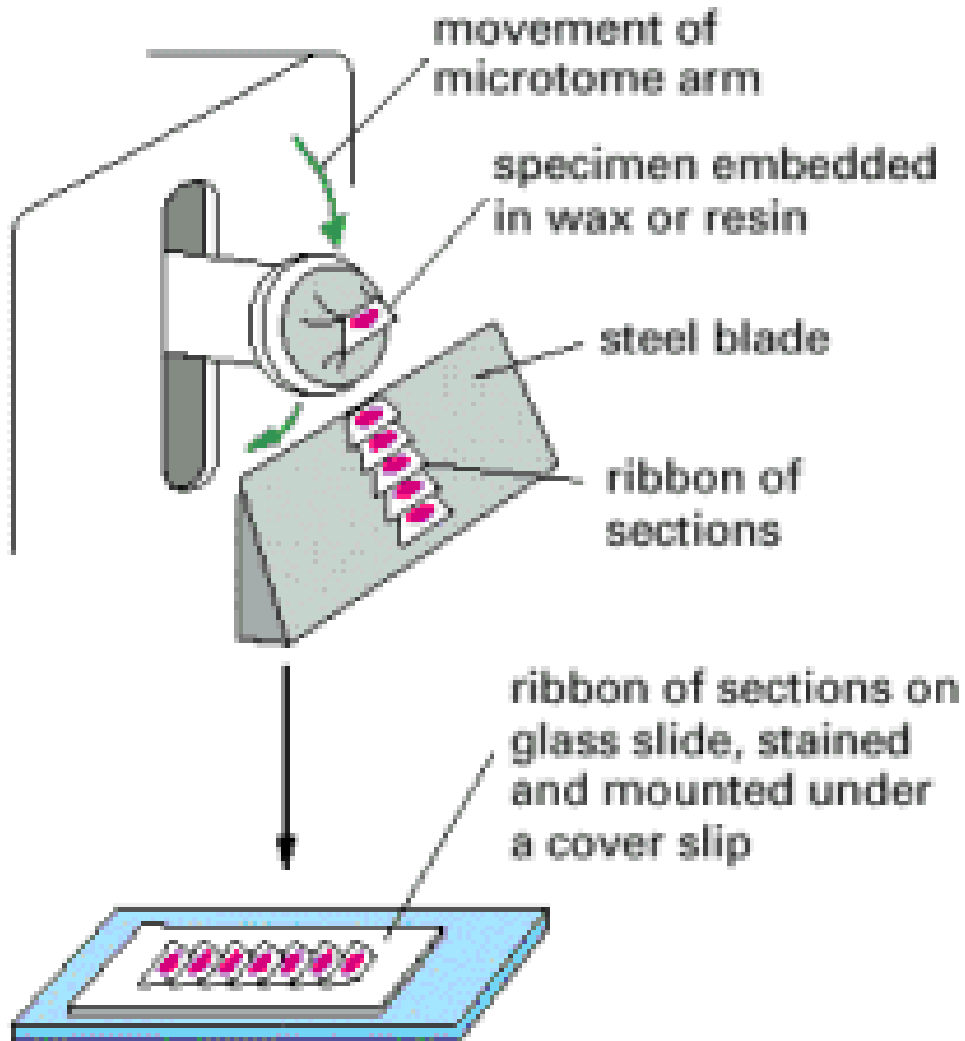


(D)

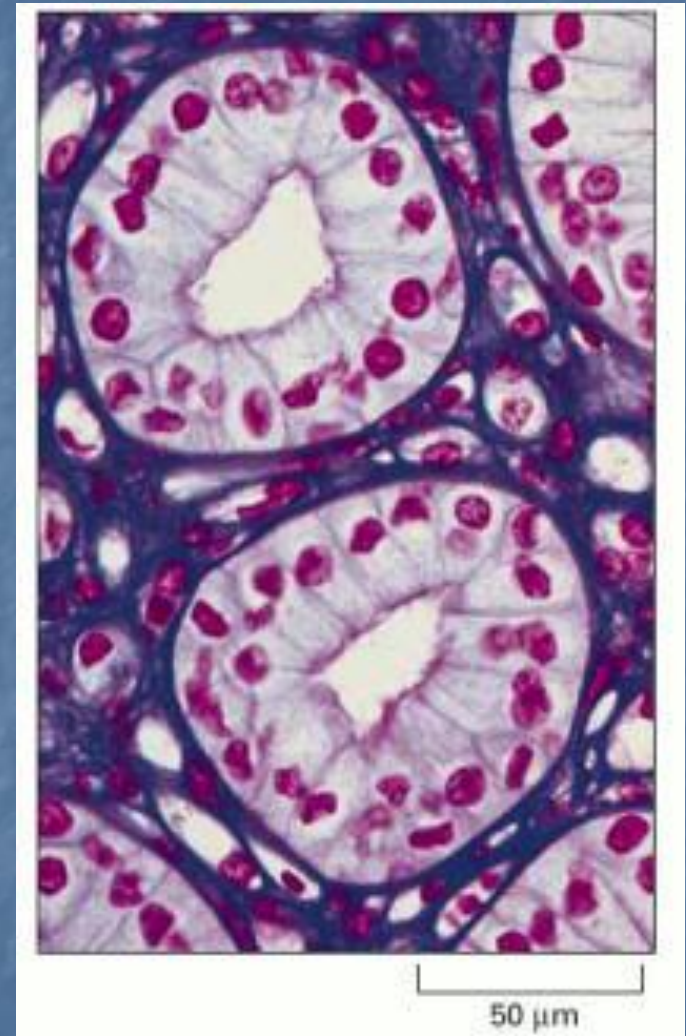
50 μm

- A: Microscopia de Campo Claro
- B: Microscopia de Contraste de Fase
- C: Microscopia de Normanski
- D: Microscopia de Campo Oscuro

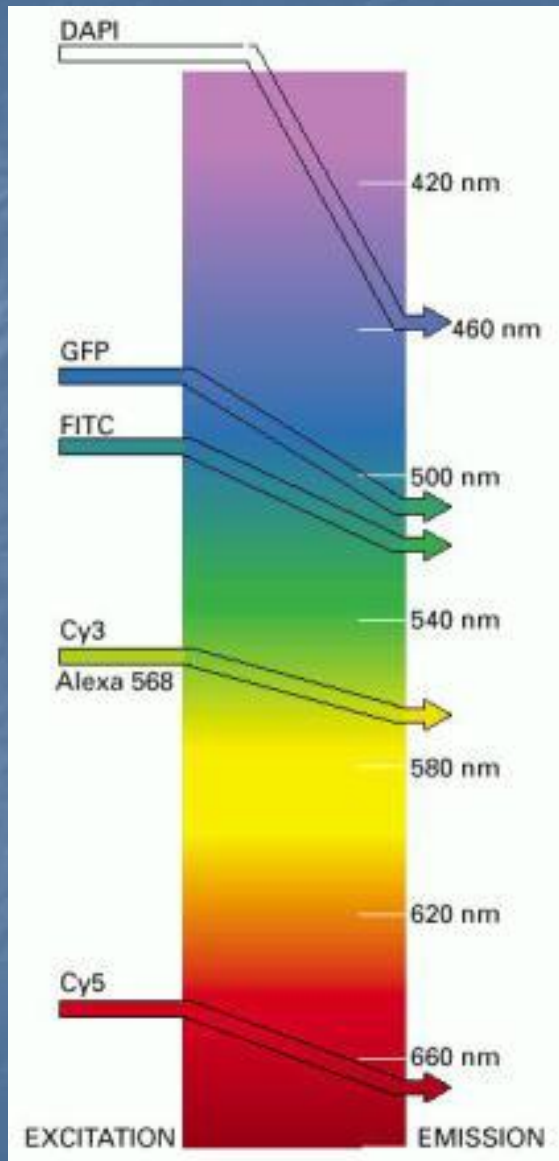
Micrótopo



Tinción: Hematoxilina-eosina



MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA



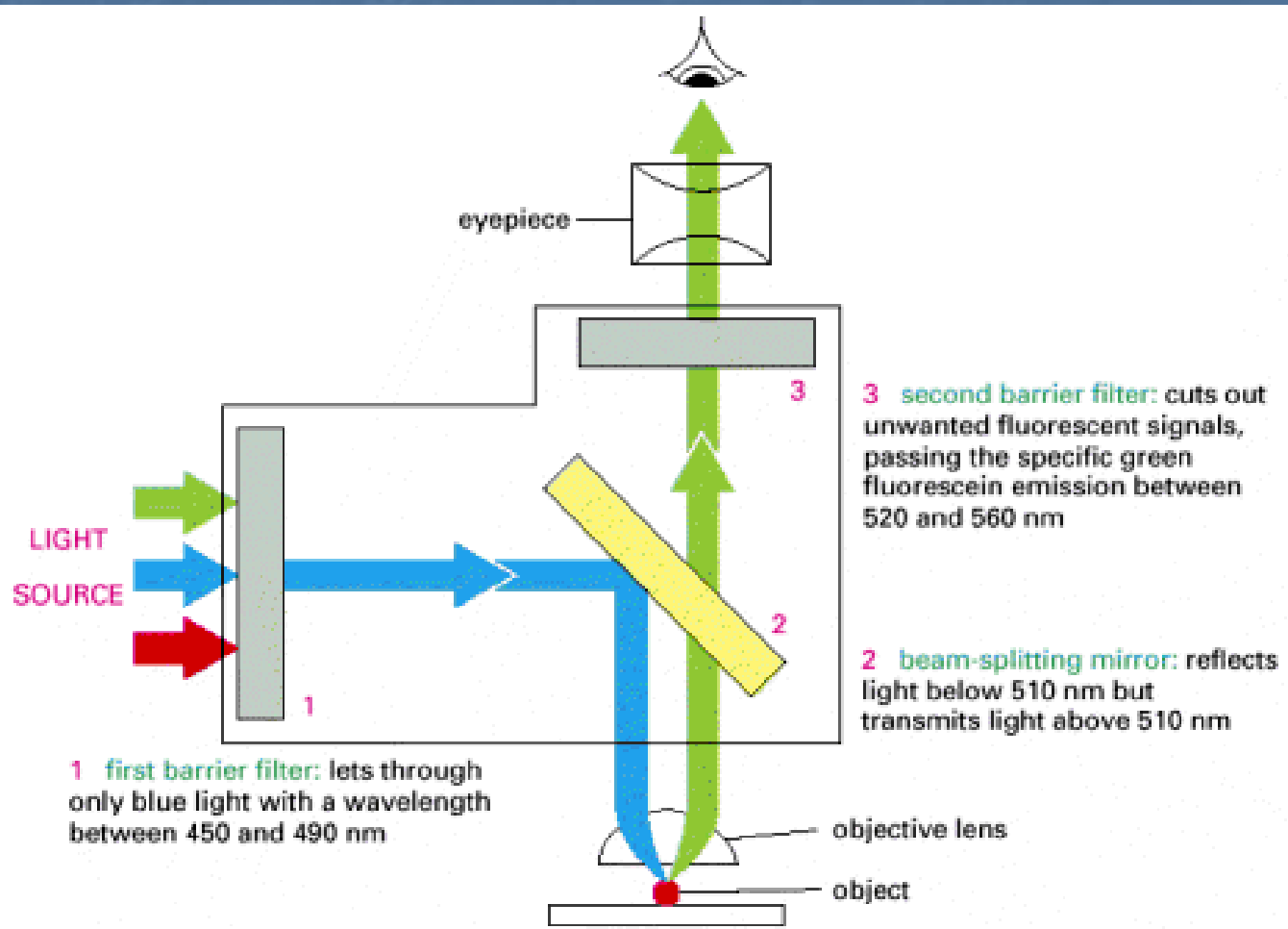
Molécula fluorescente: absorbe luz en una longitud y emite luz en una longitud de onda distinta

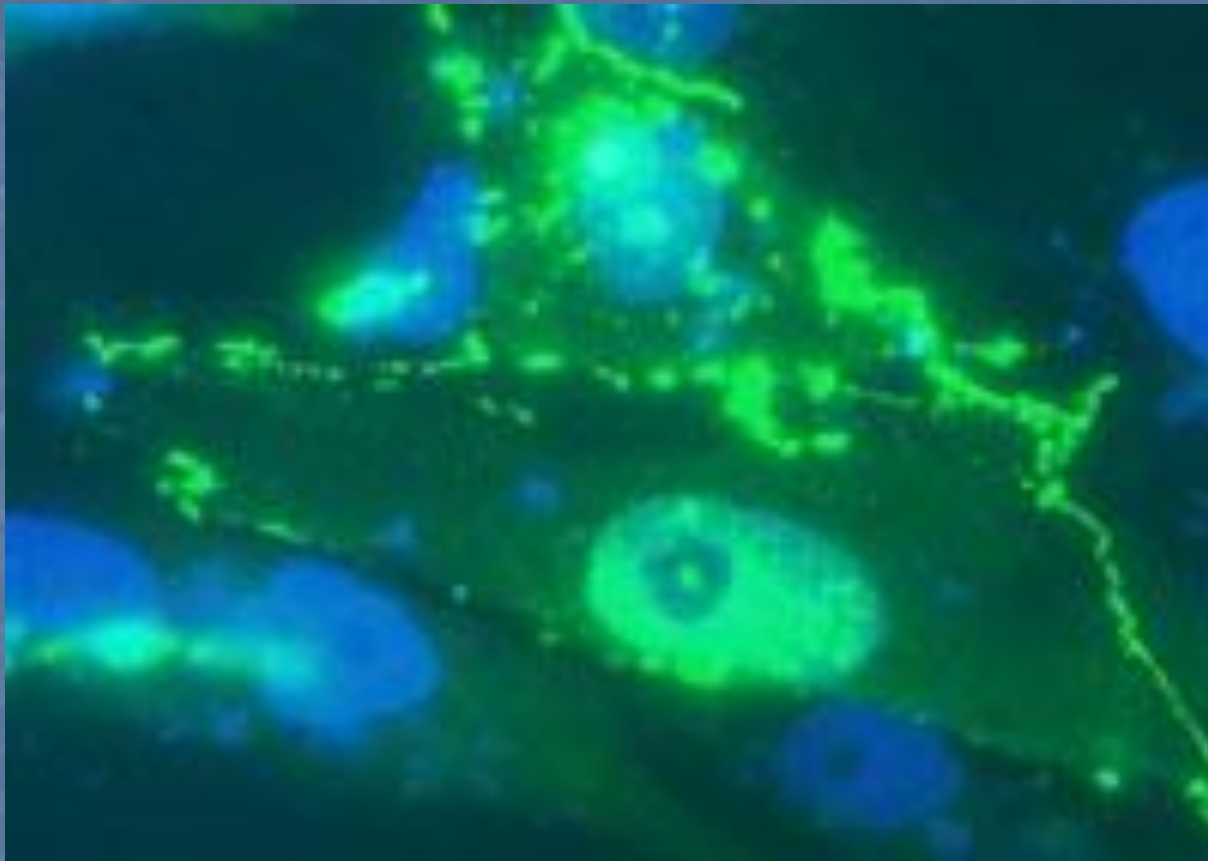
Dapi, Hoechst = tinción de cromatina
Absorben en UV emiten en azul

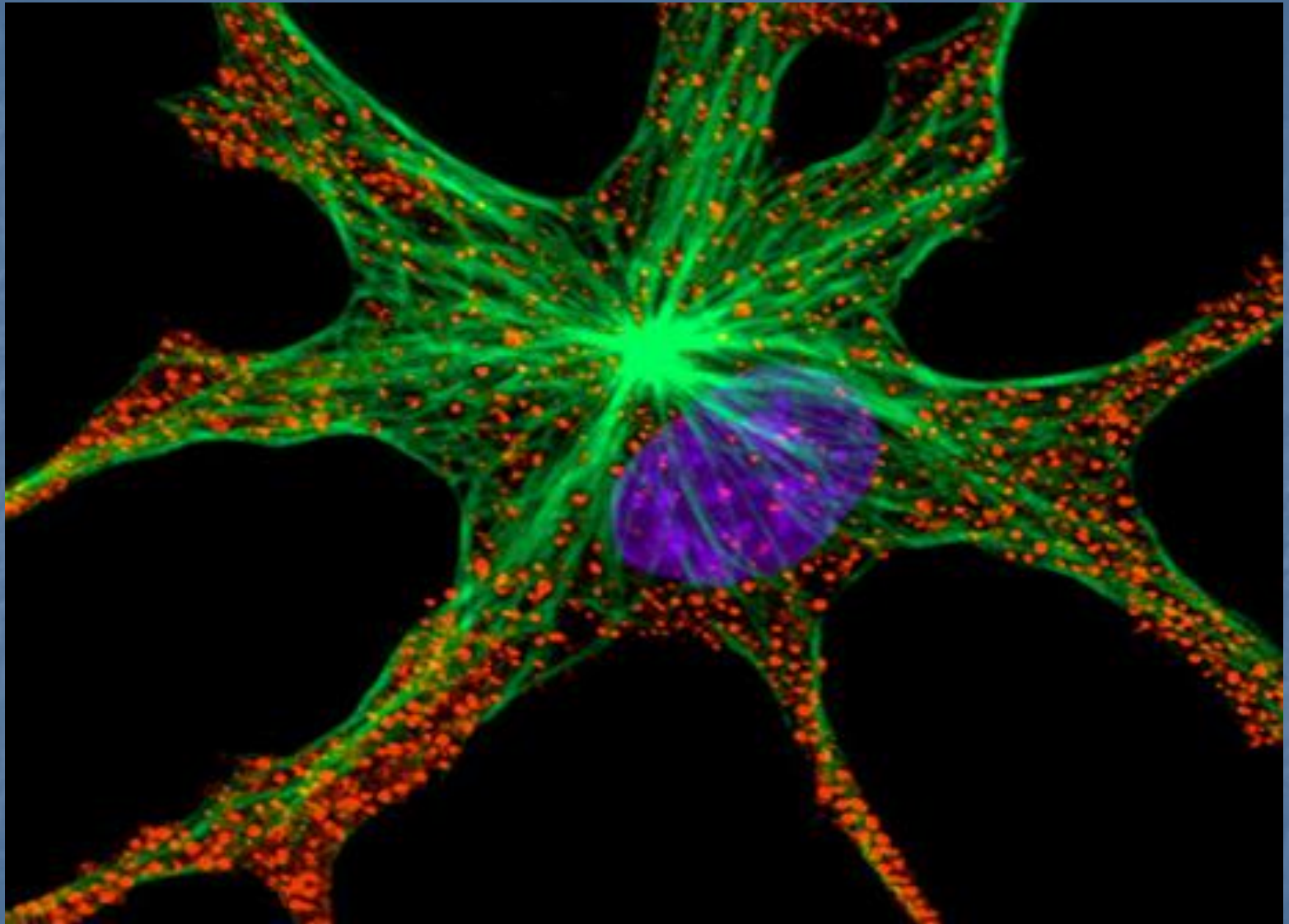
Fluoresceína
Absorbe en el azul emite en el verde

Rodamina
Absorbe en el verde-amarillo emite en el rojo

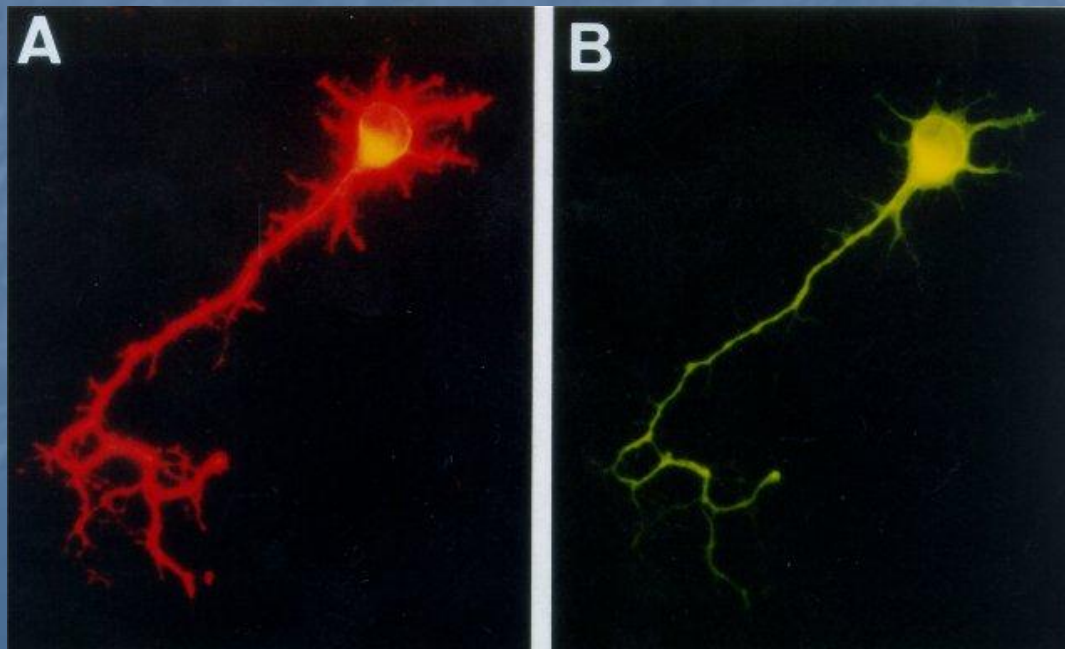
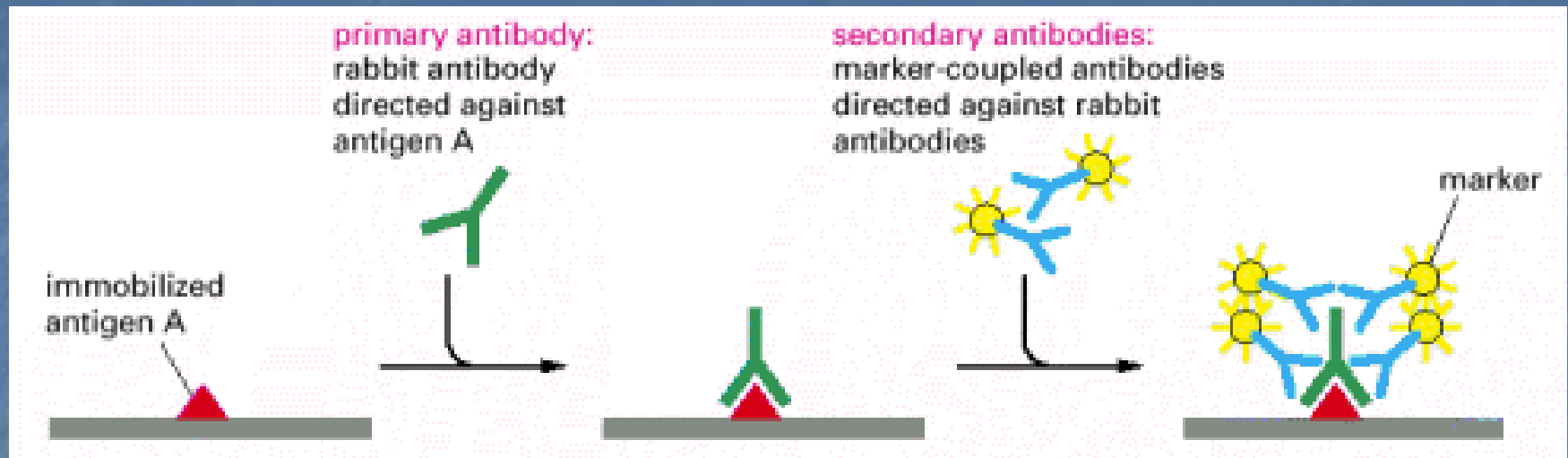
MICROSCOPIO DE FLUORESCENCIA



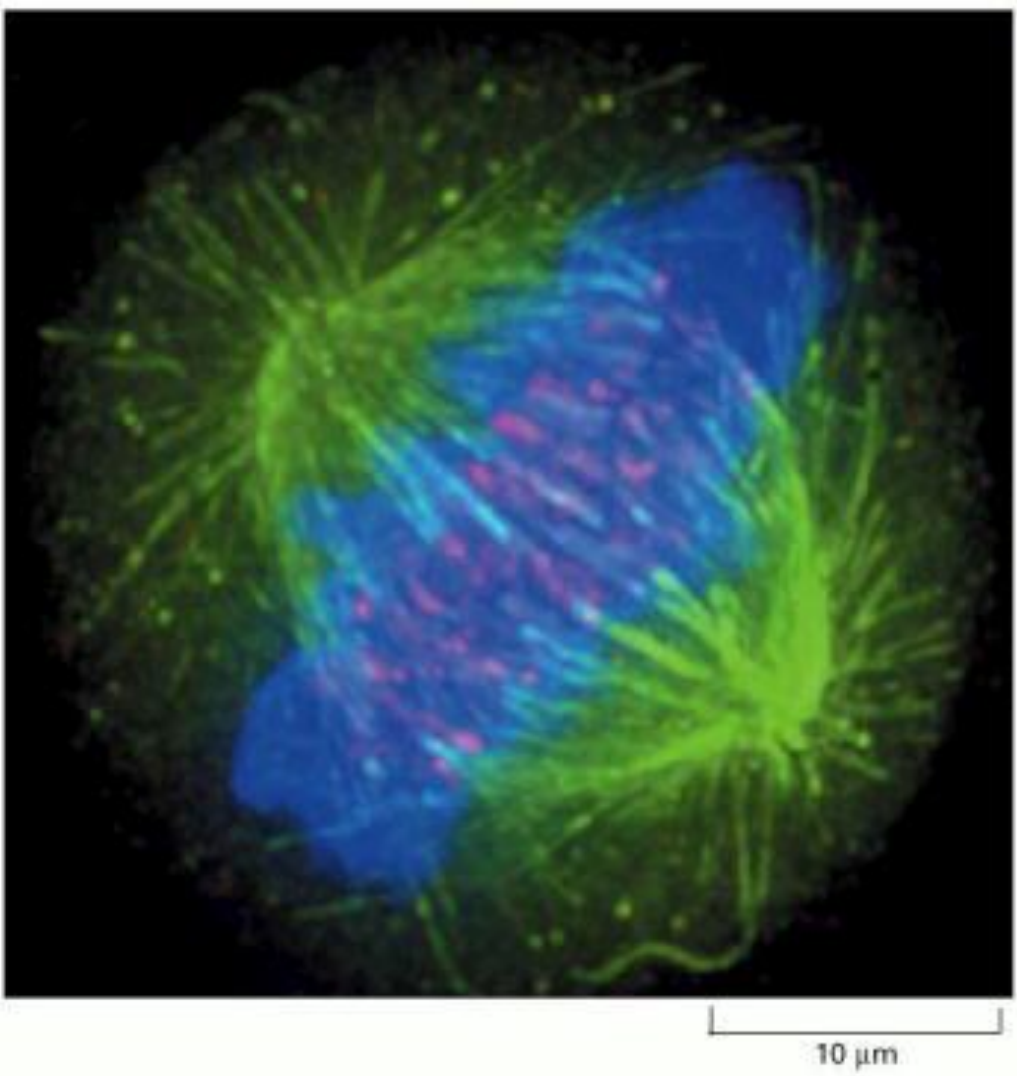




INMUNOFLUORESCENCIA



COLOCALIZACIÓN DE MOLÉCULAS



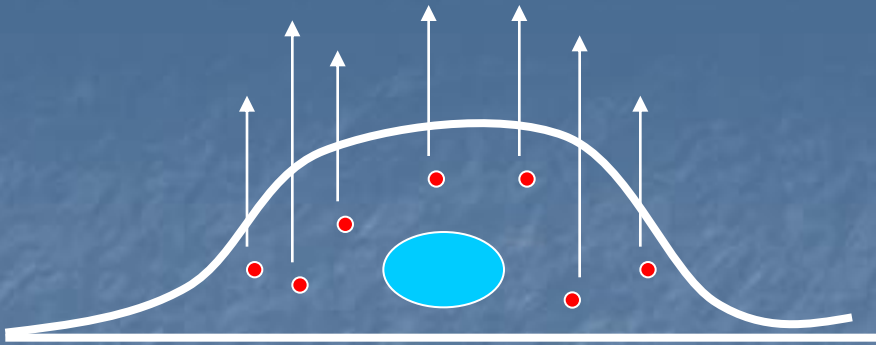
Cromosomas: DAPI

Microtúbulos:

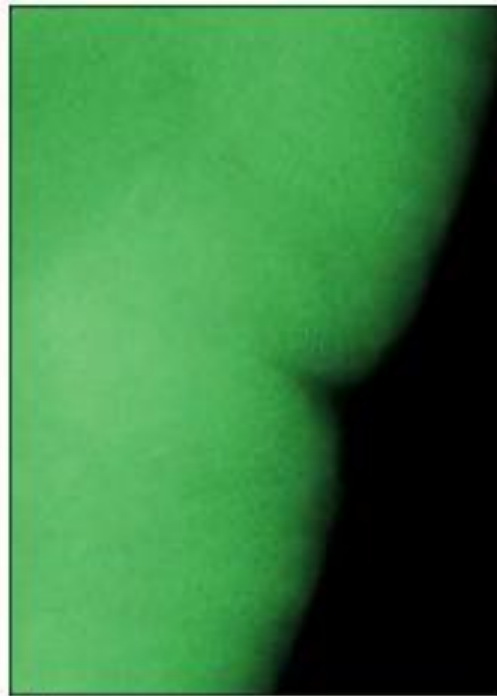
Anticuerpos anti - Tubulina en conejo
Segundo Ac Anti IgG conejo-FITC

Centrómeros:

Anticuerpo anti- Proteína
centromérica en ratón
Segundo Ac anti IgG ratón- Rodamina



El microscopio confocal hace más nítidas las imágenes



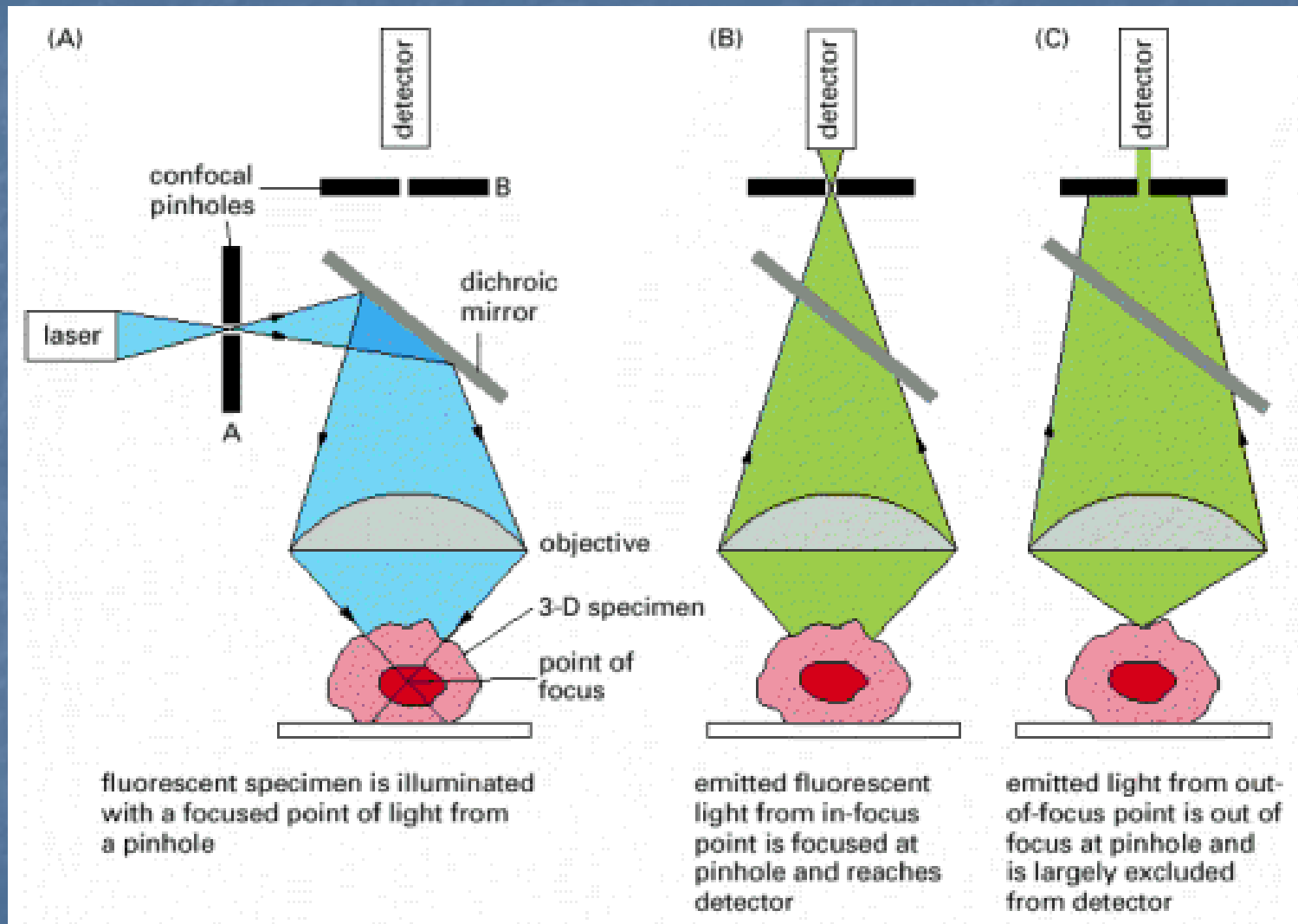
(A)



(B)

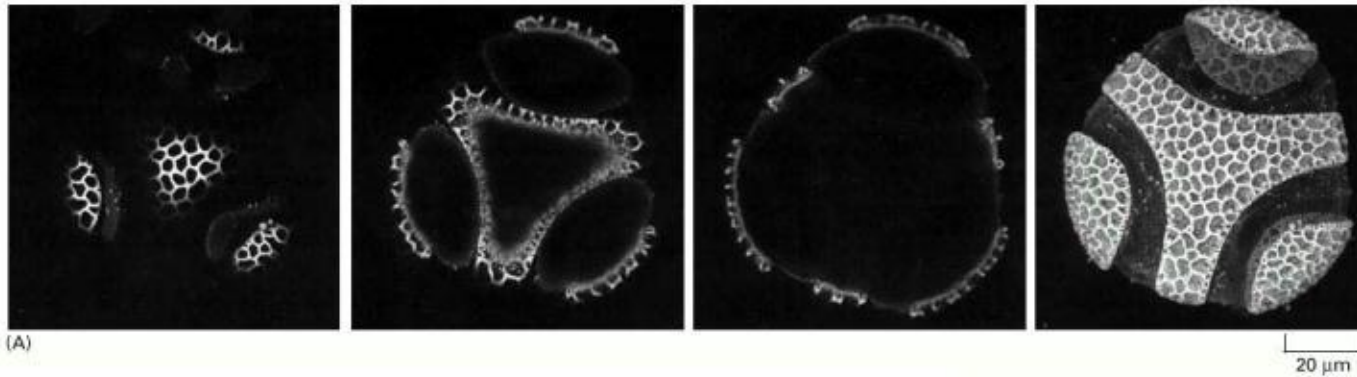
10 μm

MICROSCOPIA CONFOCAL



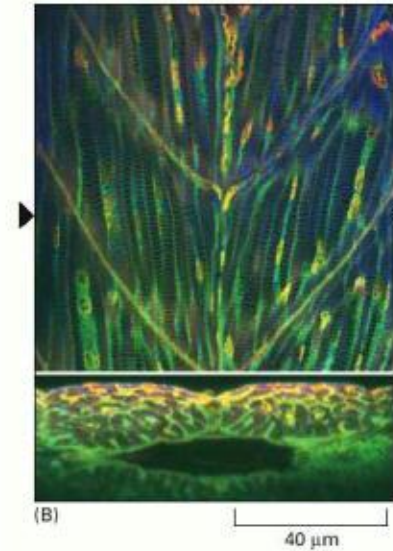
Construcción tridimensional con microscopia Confocal

Grano de polen



Cola de embrión de Pez Cebra

Reconstrucción a partir de una
sección óptica transversal a nivel
de las flechas



Visualización de moléculas en células vivas

Microinyección : Célula por célula

Electroporación: Se crean poros en la membrana plasmática sin dañar las membranas internas de las células

Vesículas membranosas: se deben fusionar con la membrana plasmática

Indicadores Fluorescentes:

Uno que se une fuertemente a Ca^{2+} y emite a una longitud de onda distinta a cuando está libre. Se pueden estudiar los cambios en las concentraciones de Ca^{2+} , segundo a segundo.

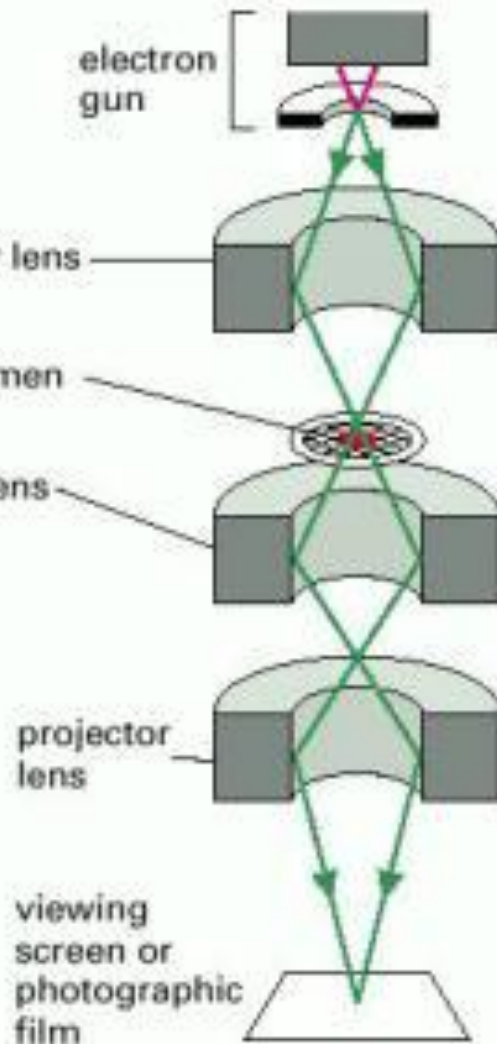
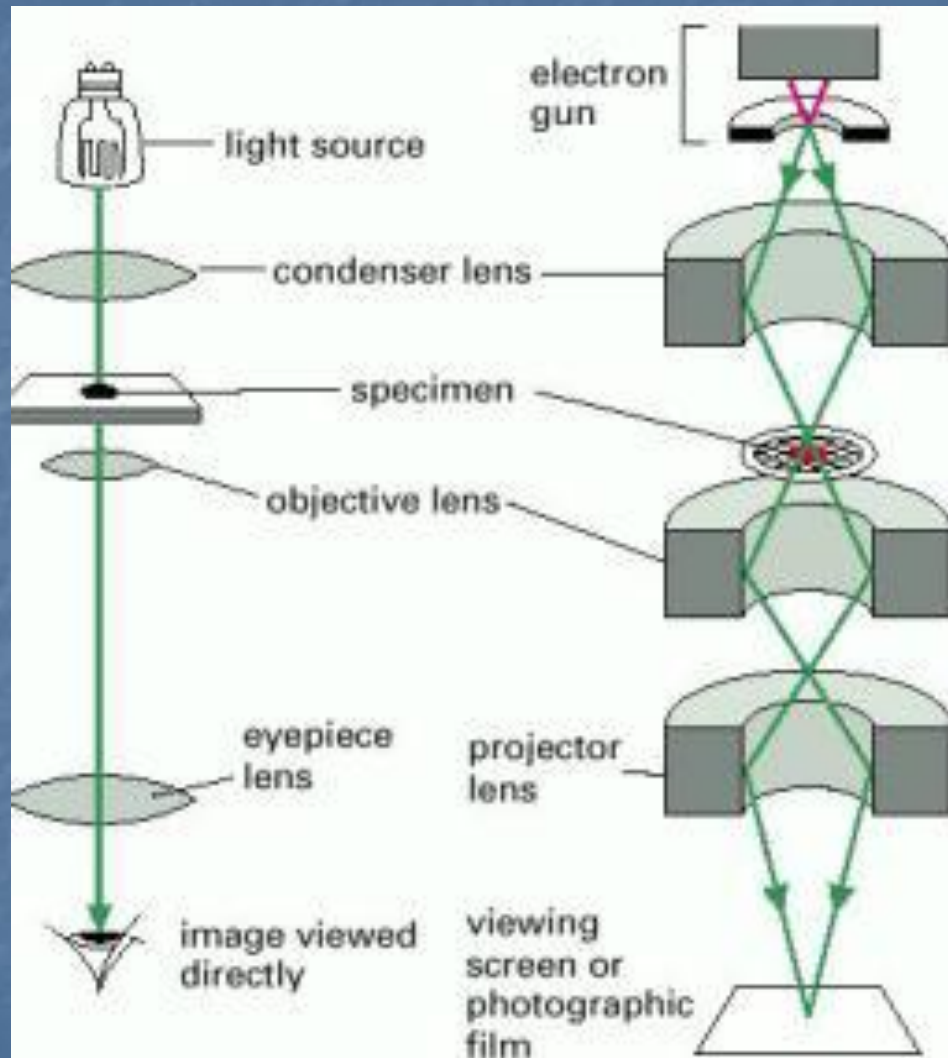
Análogos Fluorescentes:

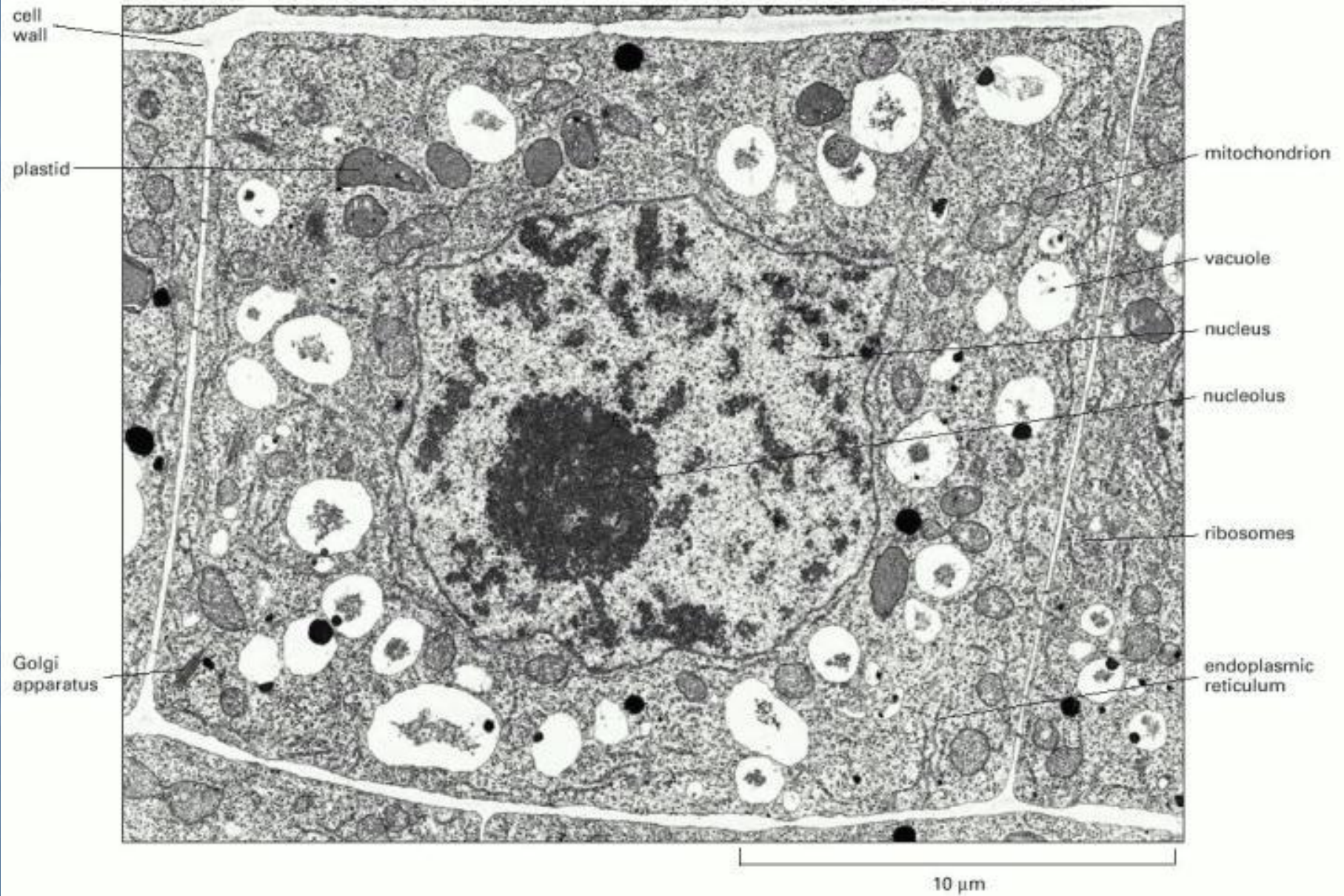
Una proteína purificada es acoplada a una tinción fluorescente. Se puede visualizar su destino dentro de la célula

GFP (Proteína Fluorescente Verde)

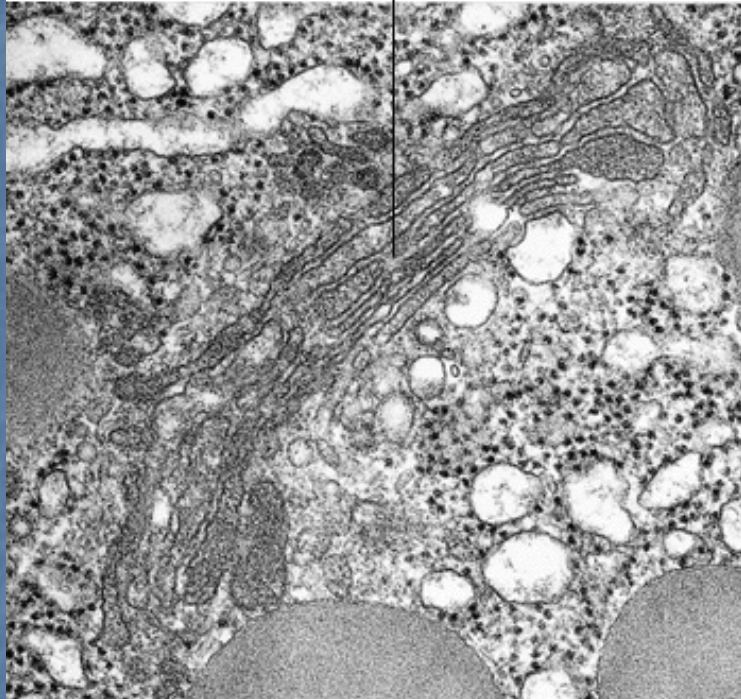
Molécula reportera para monitorear la expresión génica. La secuencia de DNA codificante de GFP se puede insertar al principio o al final de un gen para otra proteína, o después de una secuencia regulatoria

MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN

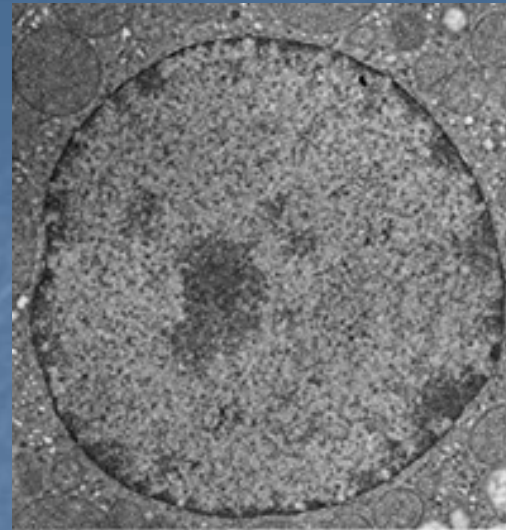




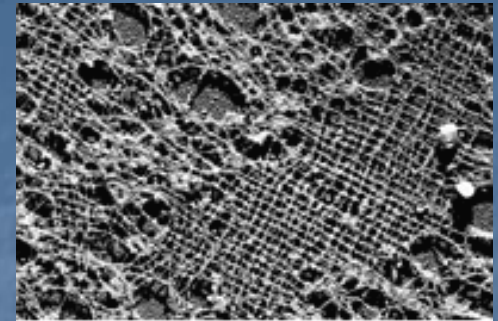
Golgi apparatus



1 μm



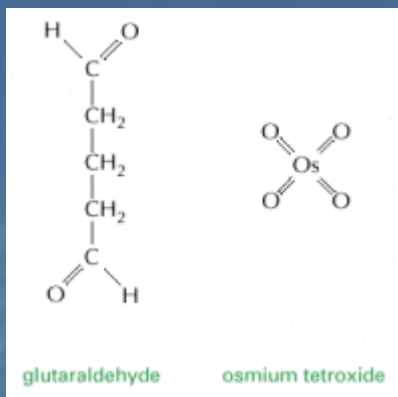
5 μm



1 μm



200 nm

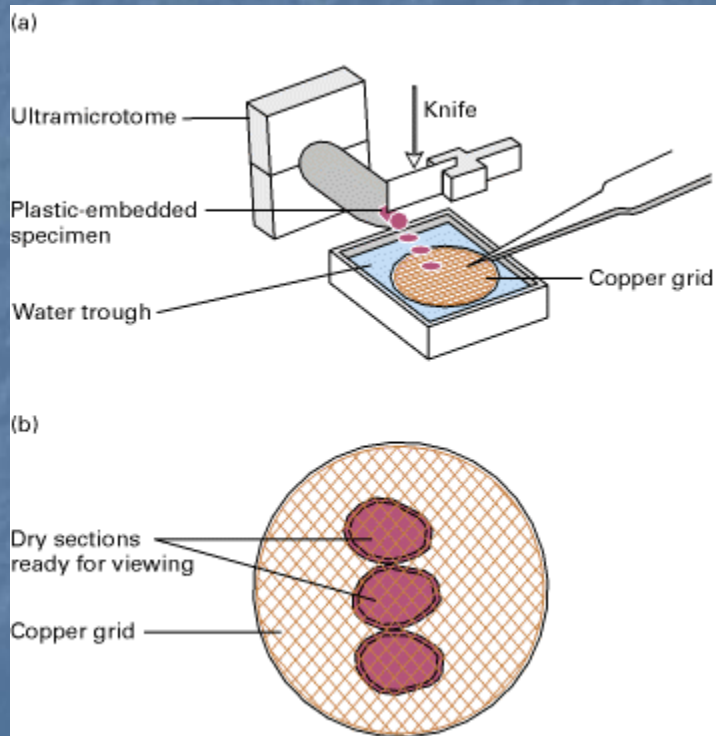


Fijadores:

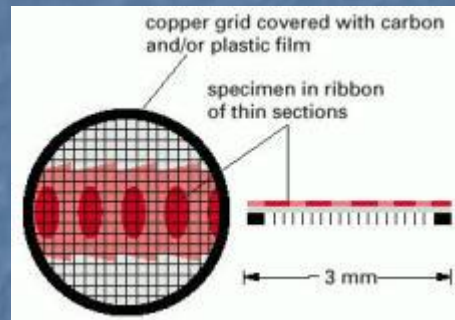
Glutaraldehído: Entrecruzamientos entre proteínas

Tetróxido de Osmio: Estabilización de membranas

Resinas monoméricas que polimerizan para formar un bloque
Sólido de plástico duro



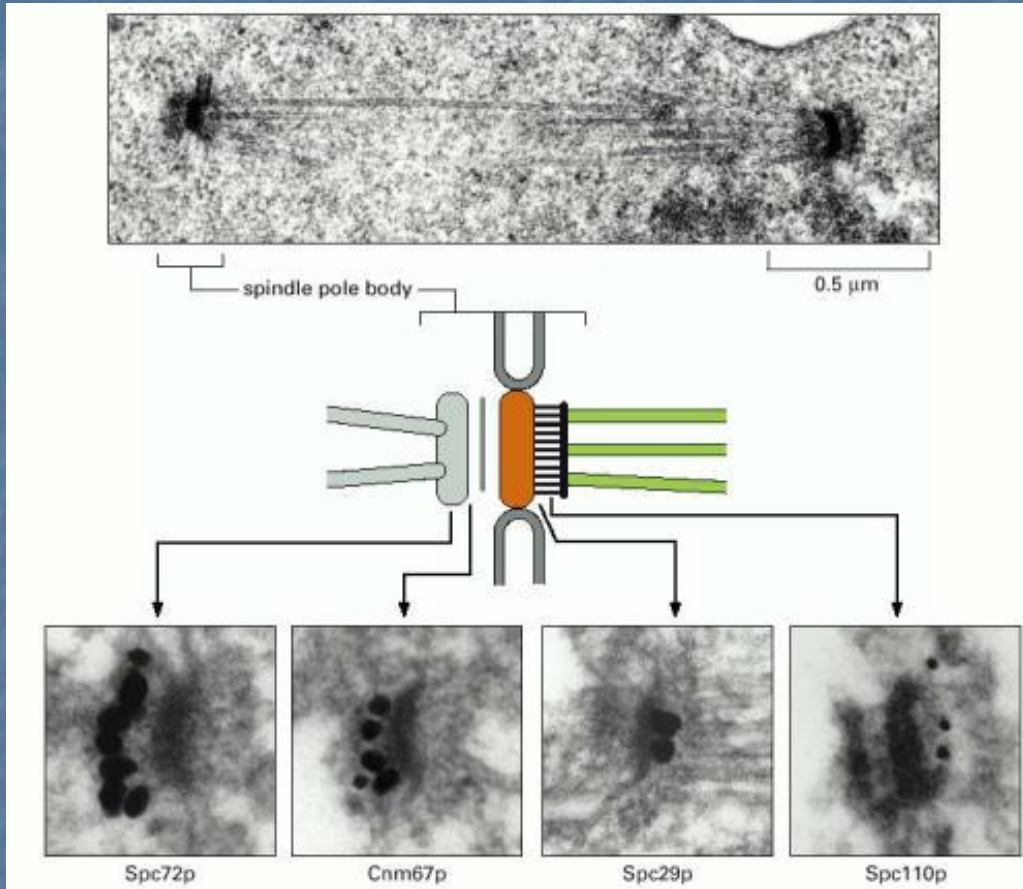
Cortes muy finos de 50 a 100 nm de grosor en
Un ultramicrotomo con cuchilla de vidrio o
diamante



Se recogen en una
grilla de cobre

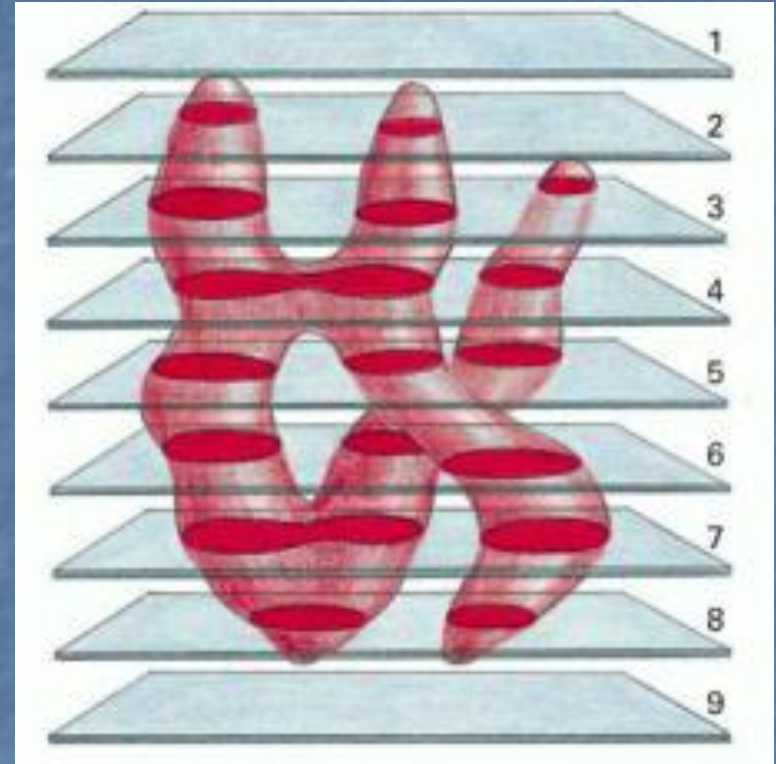
Contraste con sales de metales pesados como
Acetato de uranilo o acetato de plomo

Inmunocitoquímica con anticuerpos marcados con oro coloidal

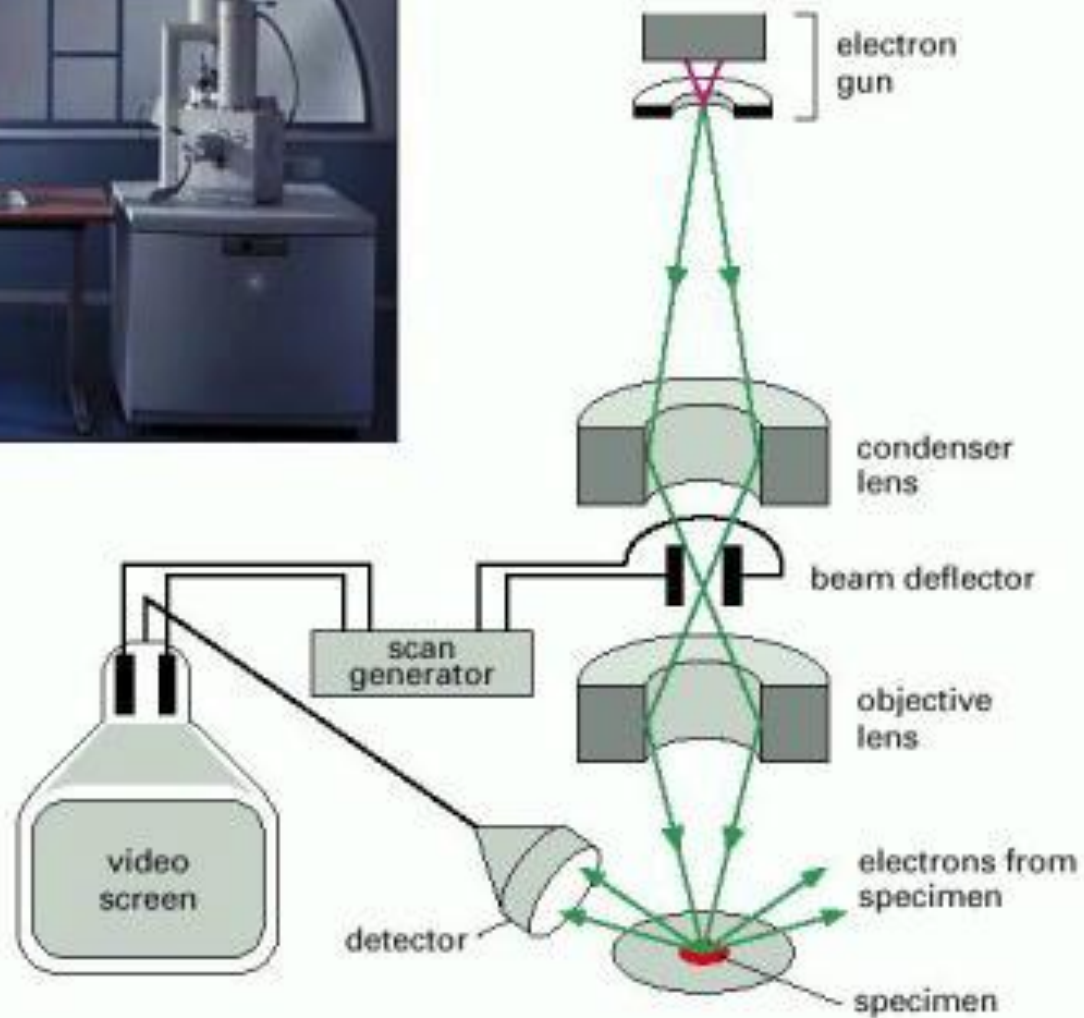


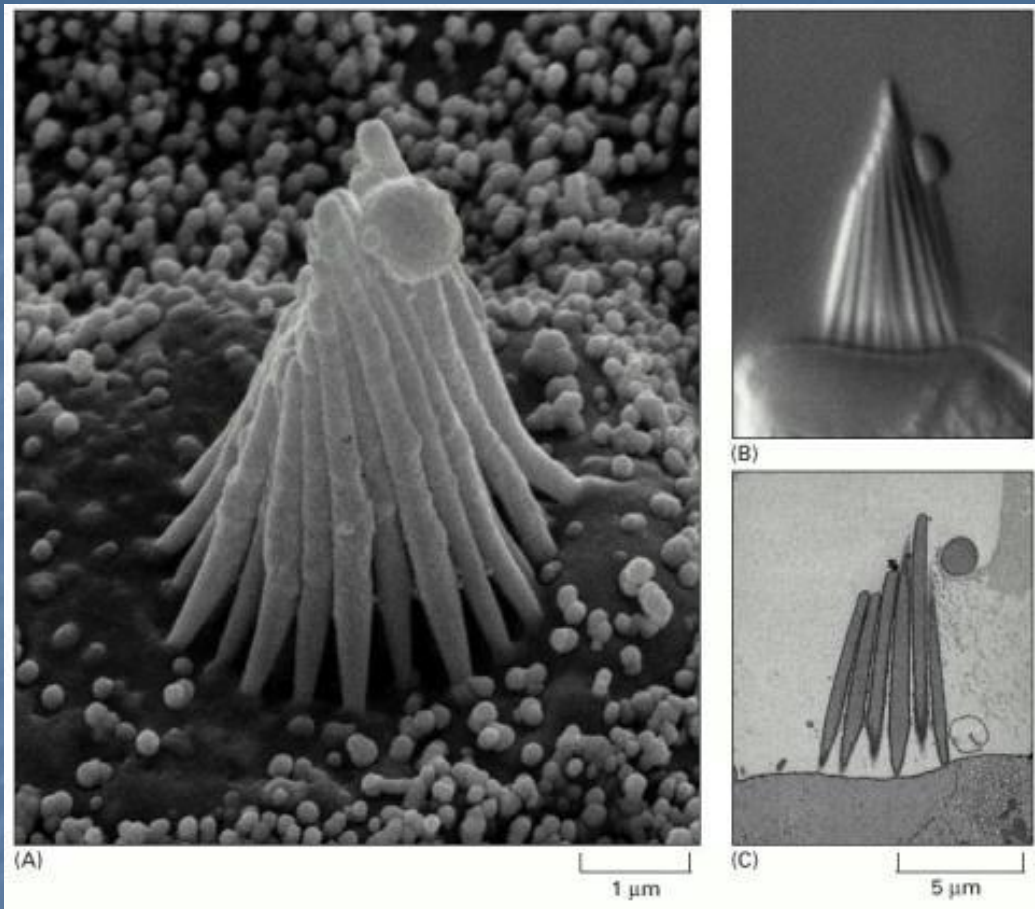
Localización de 4 proteínas en el cuerpo polar del huso mitótico de levaduras

Reconstrucción Tridimensional por cortes seriado

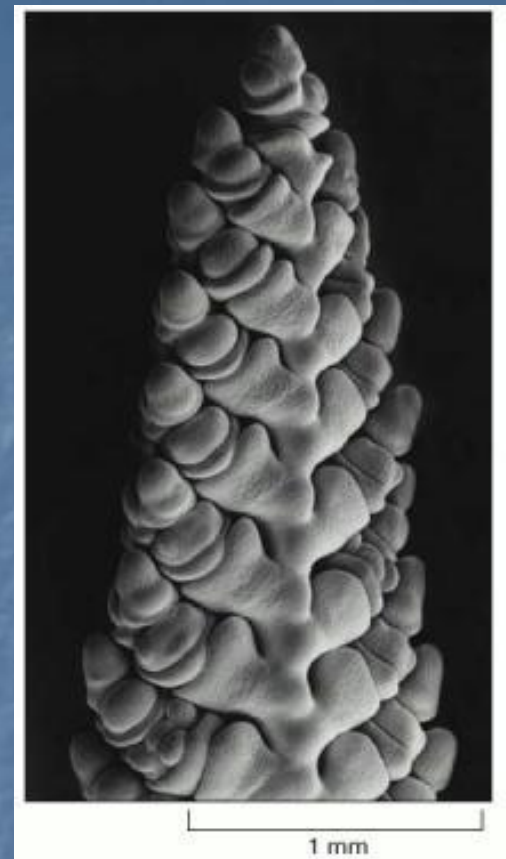


MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO



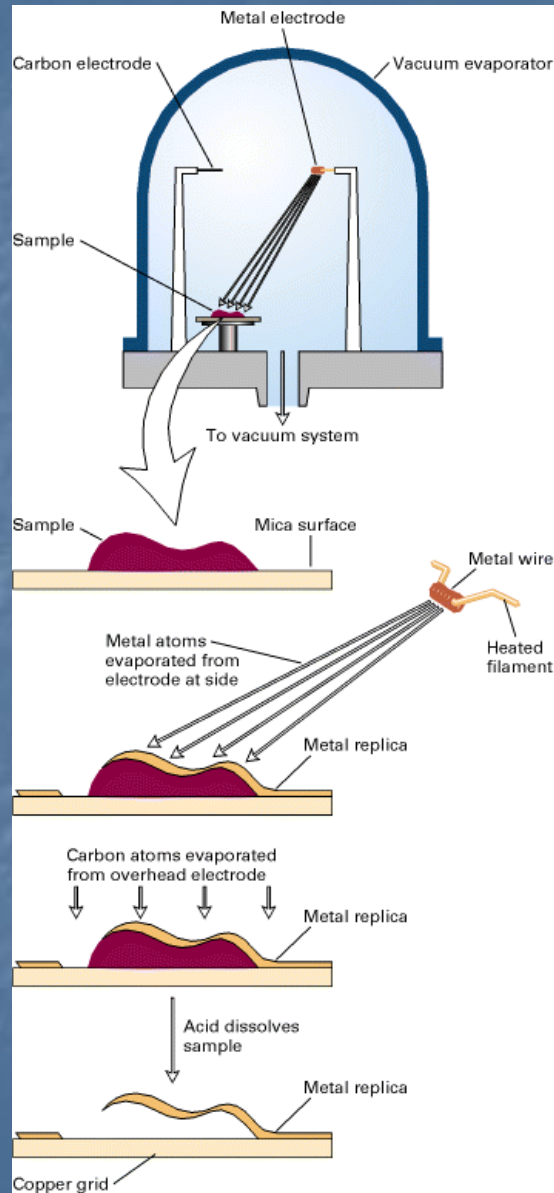
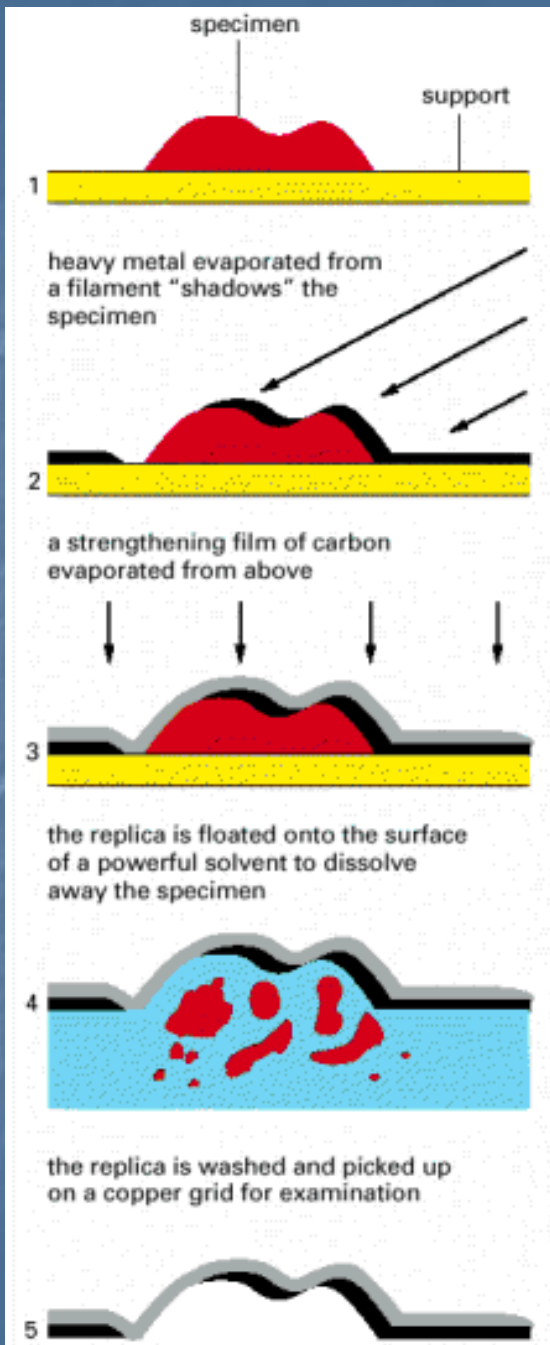


Estereocilla del oído interno de una rana
 A: Microscopia electrónica de barrido
 B: Microscopia de Interferencia (DIC)
 C: Microscopia electrónica de transmisión



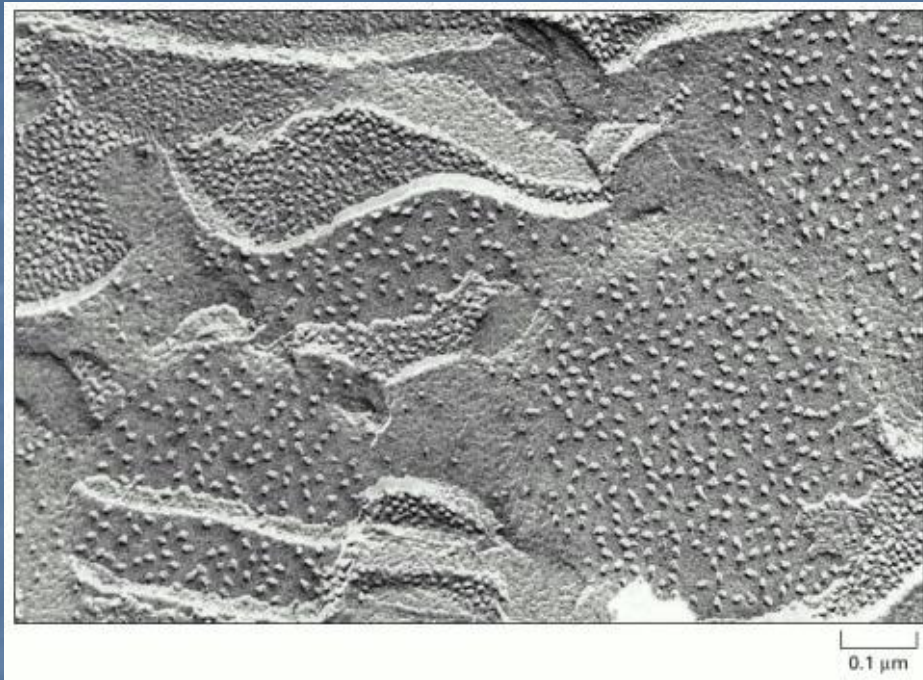
Flor del trigo o espiga
 Congelada y cubierta
 con un metal

Sombreo con metales



Se produce una replica de la superficie del espécimen que puede ser observada al MET, con mayor aumento y mayor resolución que en el MEB

Freeze-fracture (congelamiento y fractura) y Freeze-etch



Se visualiza el interior de las membranas
Las células son congeladas y luego el bloque congelado es fracturado con una cuchilla
El plano de fractura pasa por la región hidrofóbica de la bicapa lipídica.
Membrana del tilacoide con el complejo del fotosistema II