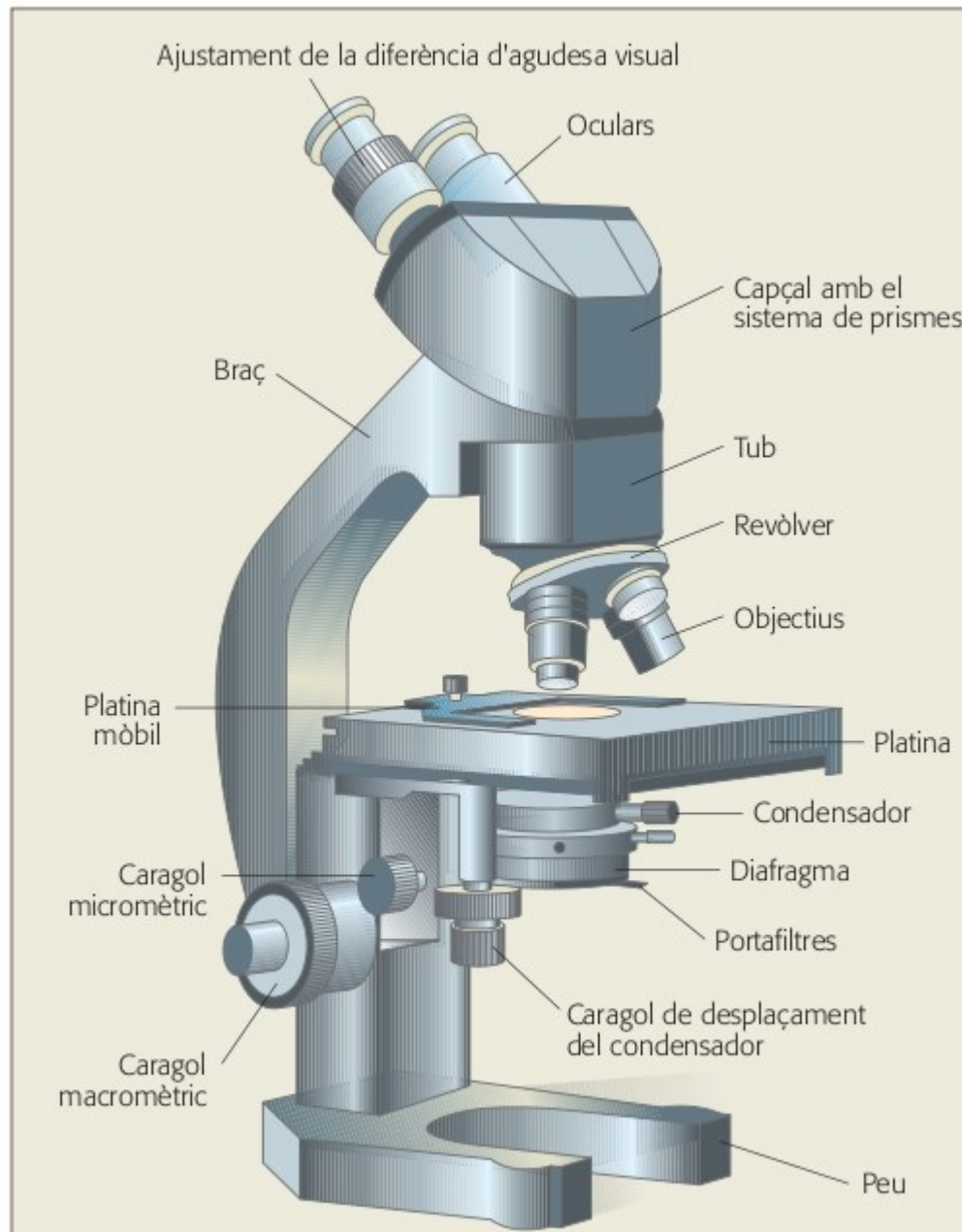


# Microscòpia òptica

# El microscopi ÒPTIC

- Sistema de lents que **fa servir la llum** per produir una imatge virtual augmentada de la mostra.
- Permet augments de l'ordre de **1500 a 2000 augments** i te un **poder de resolució de  $0,2\mu\text{m}$** .
- El microscopi òptic consta de:
  - Un **sistema de lents**. Les lents són **l'objectiu** i **l'ocular**, destinades a formar la imatge, **i el condensador**, encarregada d'il·luminar correctament la mostra.
  - Un **sistema d'il·luminació**. La font de llum.
  - Un **sistema mecànic**. Elements encarregats de suportar i desplaçar la resta de sistemes: tub, platina, cargol macromètric, cargol micromètric, braç, peu, etc.

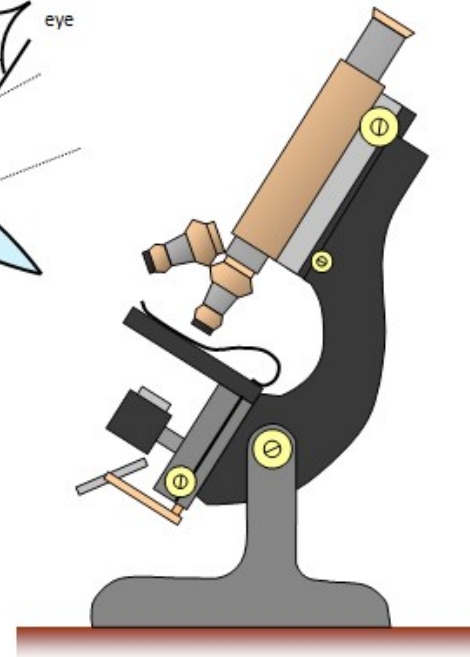
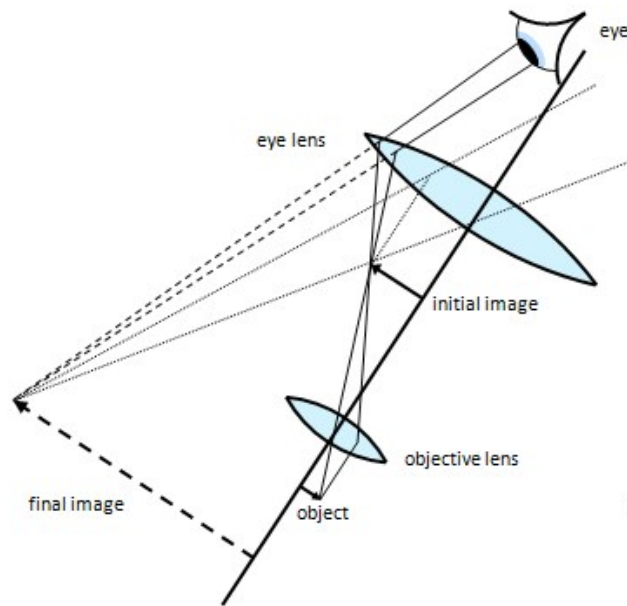


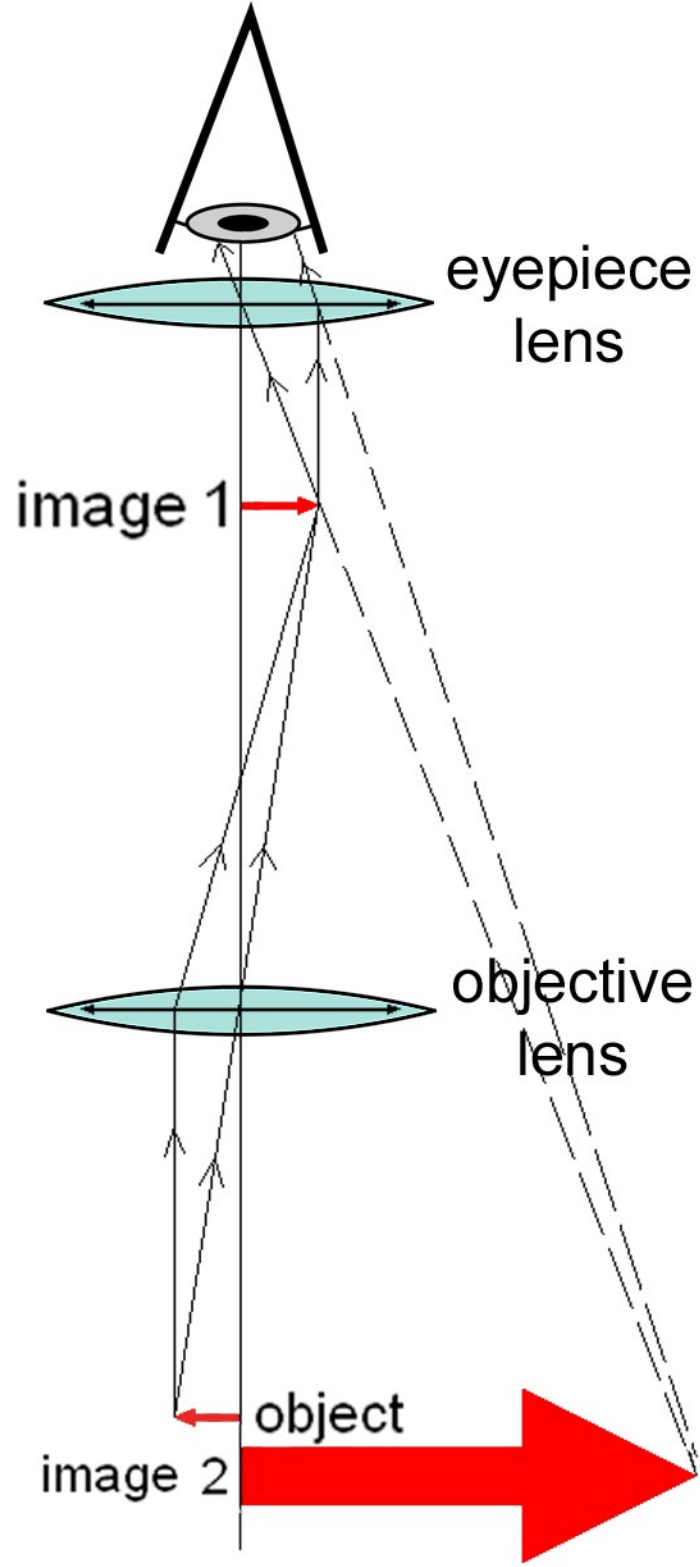
Microscopi òptic binocular amb els principals components.

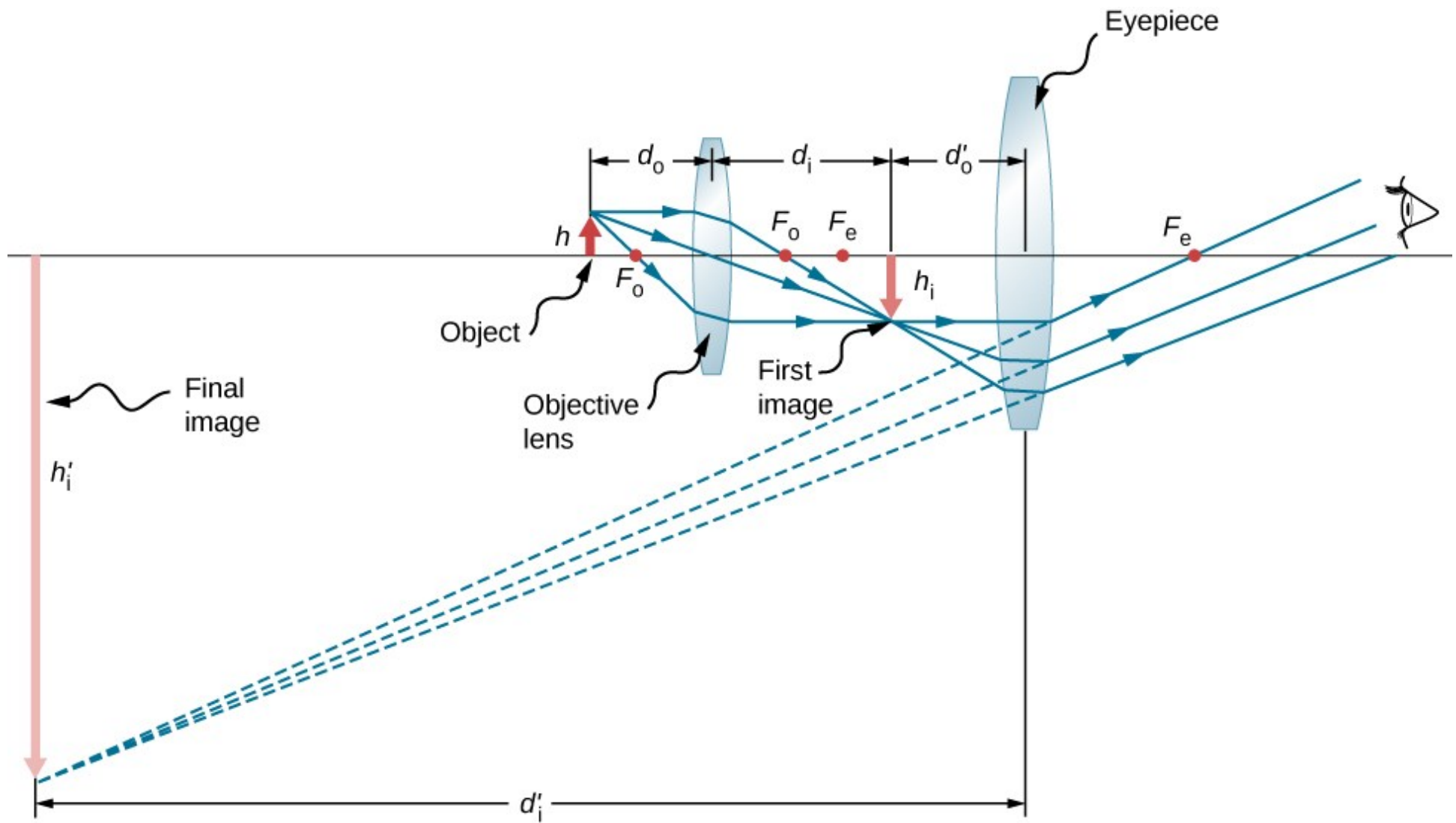
Els rajos lluminosos procedents de la font d'il·luminació són concentrats pel condensador sobre la preparació.

Un cop la llum travessa la mostra passa a l'objectiu, que produeix una imatge augmentada de l'objecte. Aquesta imatge serà posteriorment augmentada per l'ocular.

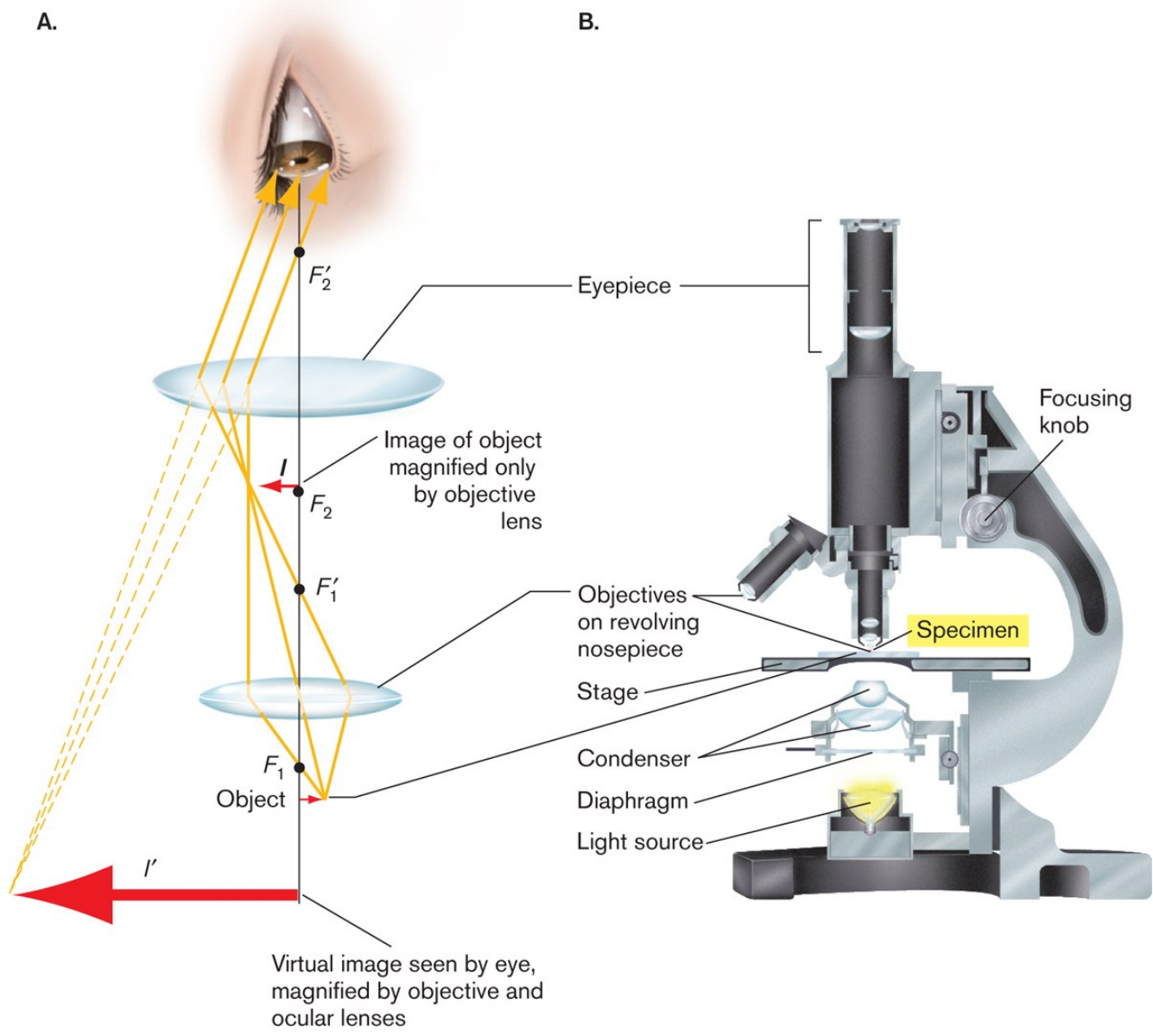
L'augment total donat pel microscopi és el producte de l'augment de l'objectiu per l'augment de l'ocular.





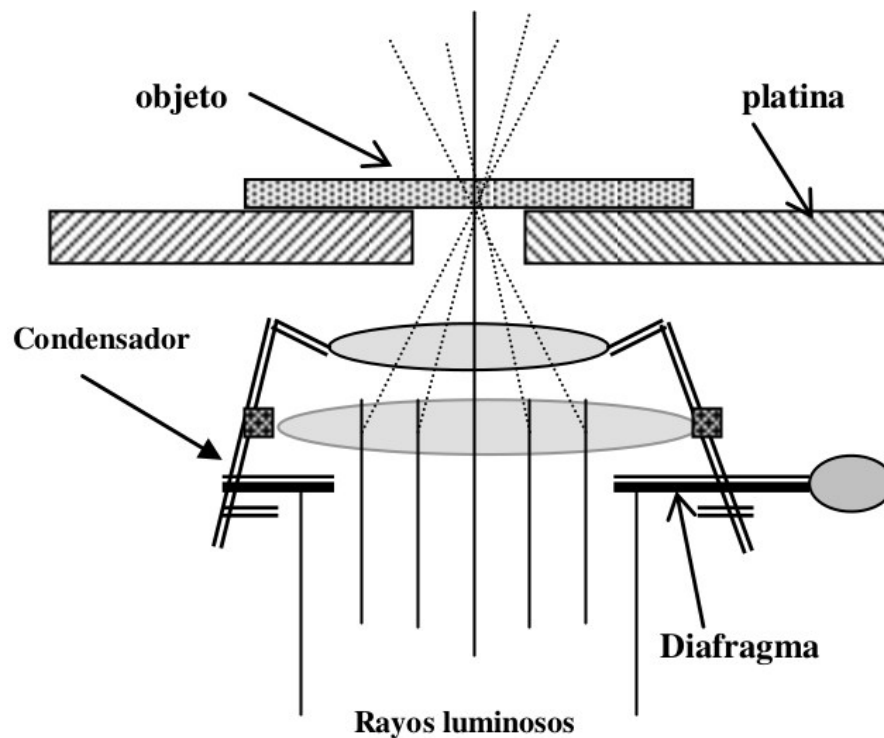


L'objecte es troba situat més enllà de la distància focal de l'objectiu, produint una imatge real i invertida que és més gran que l'objecte. Aquesta primera imatge serveix com a objecte per a l'ocular. L'ocular es col·loca de manera que la primera imatge es troba dintre de la seva distància focal, de manera que pot augmentar-la encara més. D'alguna manera, l'ocular actua com una lupa que engrandeix la imatge produïda per l'objectiu. La imatge produïda per l'ocular és una imatge virtual augmentada. La imatge final continua invertida però està més allunyada de l'observador que de l'objecte, la qual cosa facilita la seva visualització.



# El condensador

- Sistema de lents convergents, situat per sota de la platina, encarregat d'il·luminar adequadament la mostra per tal d'assolir el màxim rendiment de l'objectiu.



El condensador concentra i focalitza el feix de llum procedent de la font lluminosa sobre la preparació. Té incorporat un **diafragma iris** que regula l'entrada de llum.



# L'objectiu:

Sistema de lents convergents, situades més a prop de la mostra. Donen imatges molt augmentades de l'objecte, reals i invertides.

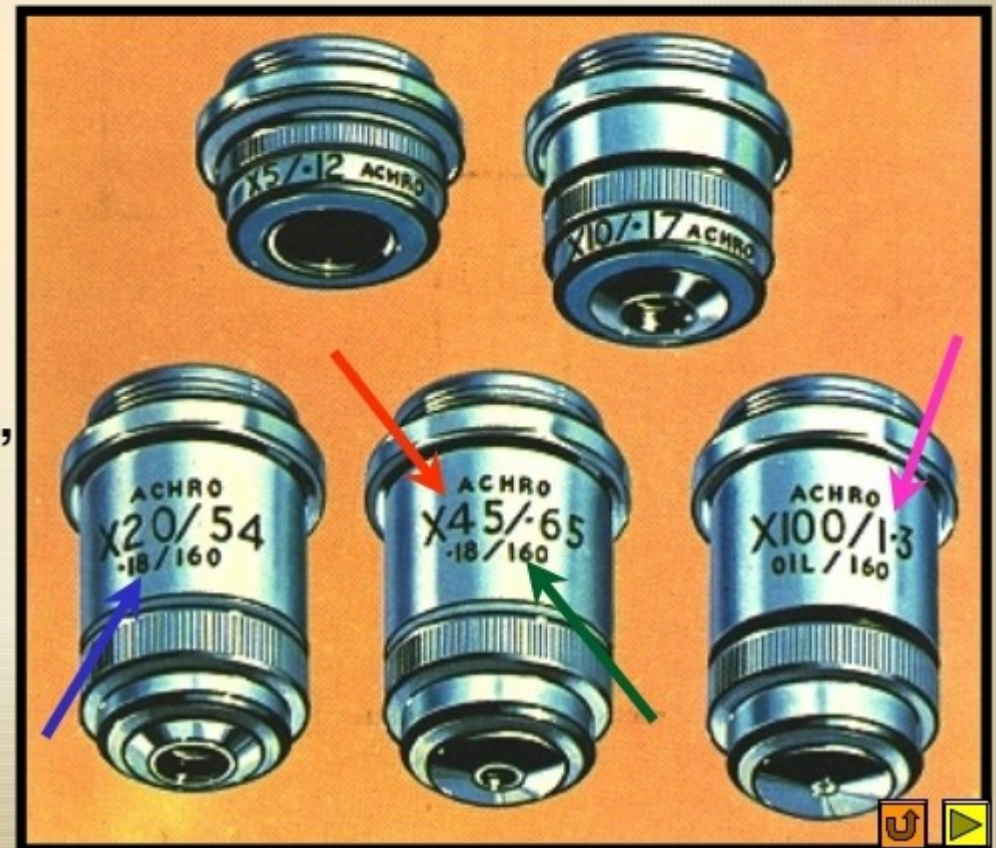
- Les principals característiques són:
  - L'augment que proporciona.
  - L'obertura numèrica. Propietat de la lent relacionada amb la quantitat de llum que pot recollir l'objectiu per formar l'imatge. Com més gran, major resolució té l'objectiu i més nítida és la imatge que es forma.



# Los objetivos

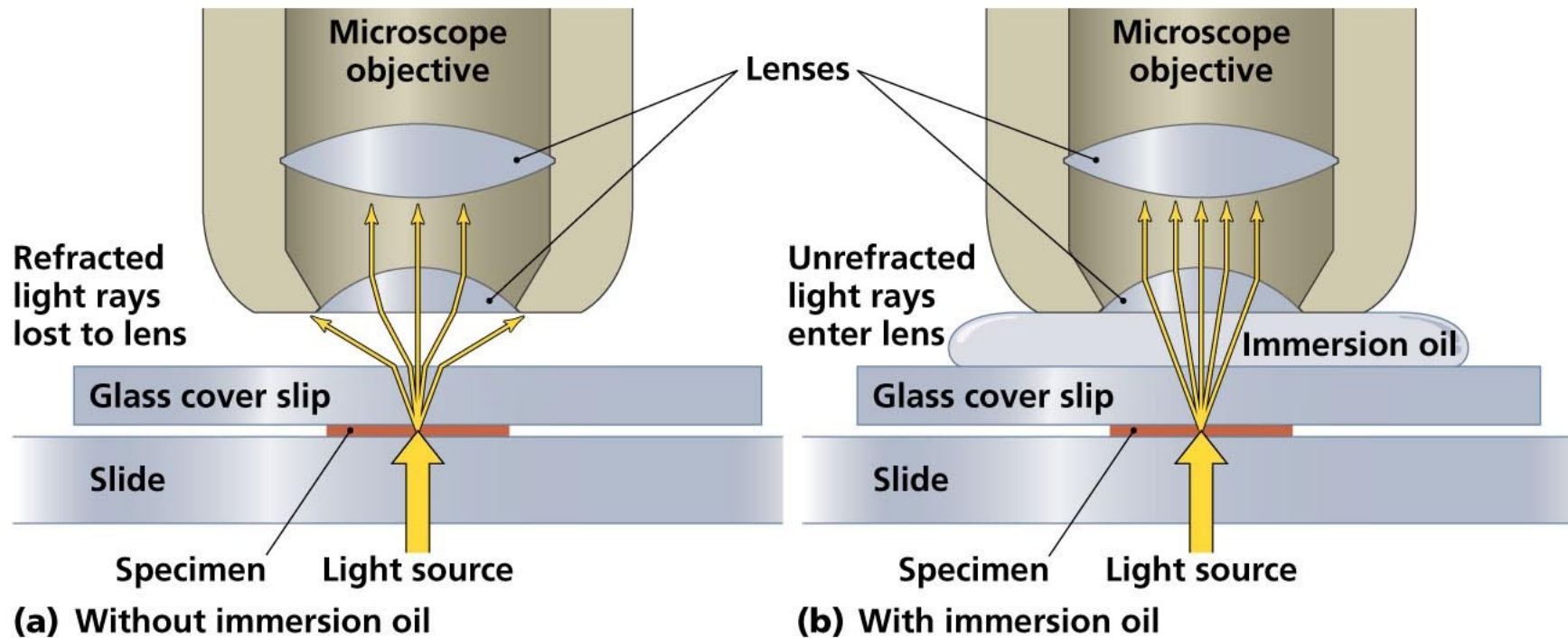


**Aumentos:** x 5, x10, x20, x45, x100  
**Apertura Numérica:** 0.12, 0.17, 0.54, 0.65, 1.3  
**Longitud del tubo:** 160 mm  
**Grosor del cubreobjetos:** 0.18 mm



Com major sigui el nombre de raigs que, procedents de la mostra, entrin a l'objectiu (major O.N), major serà la definició de la imatge.

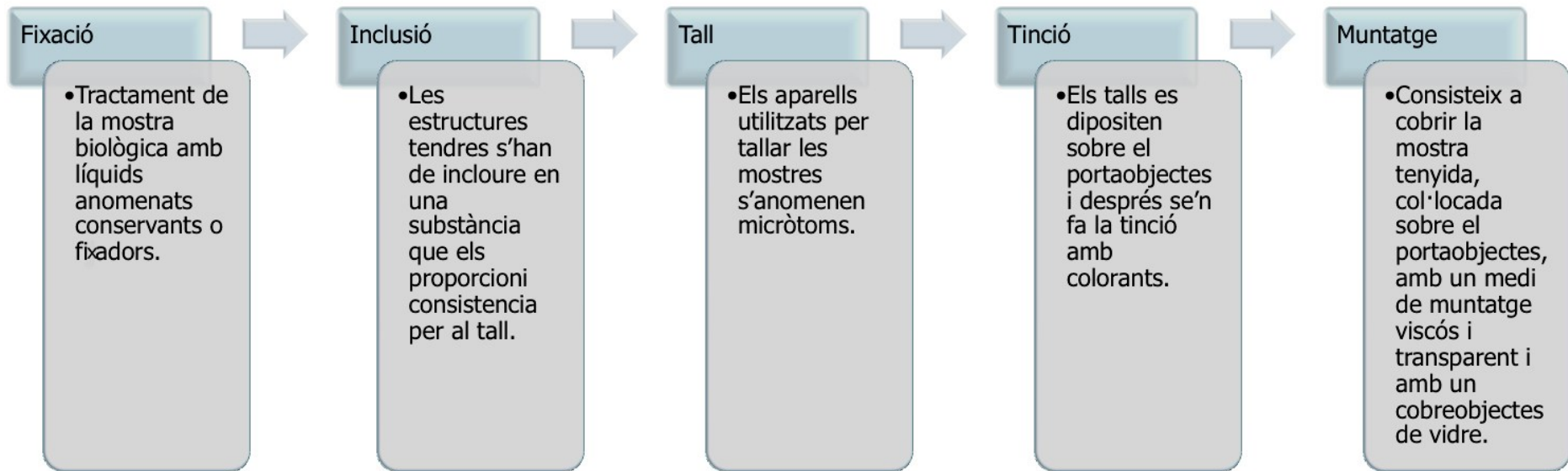
Una estratègia utilitzada per augmentar l'obertura numèrica consisteix en l'ús de les immersions en diferents líquids (s'augmenta així l'índex de refracció entre la preparació i la lent)



Copyright © 2006 Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings.

Una immersió en oli permet que tots els raigs que surtin de l'objecte siguin aprofitables per a la formació de la imatge.

# Preparació de mostres per al microscopi òptic



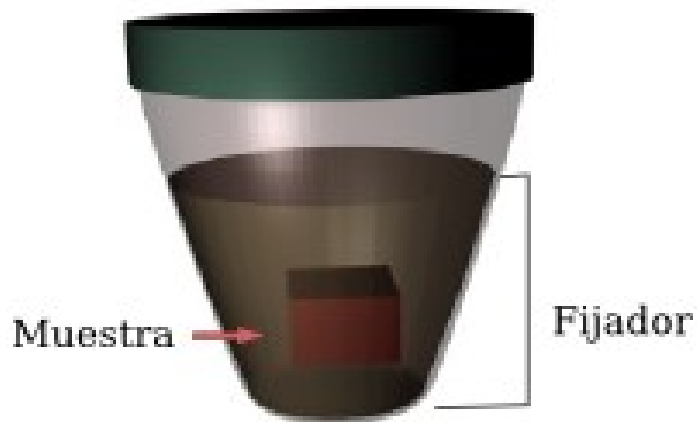


# Fixació

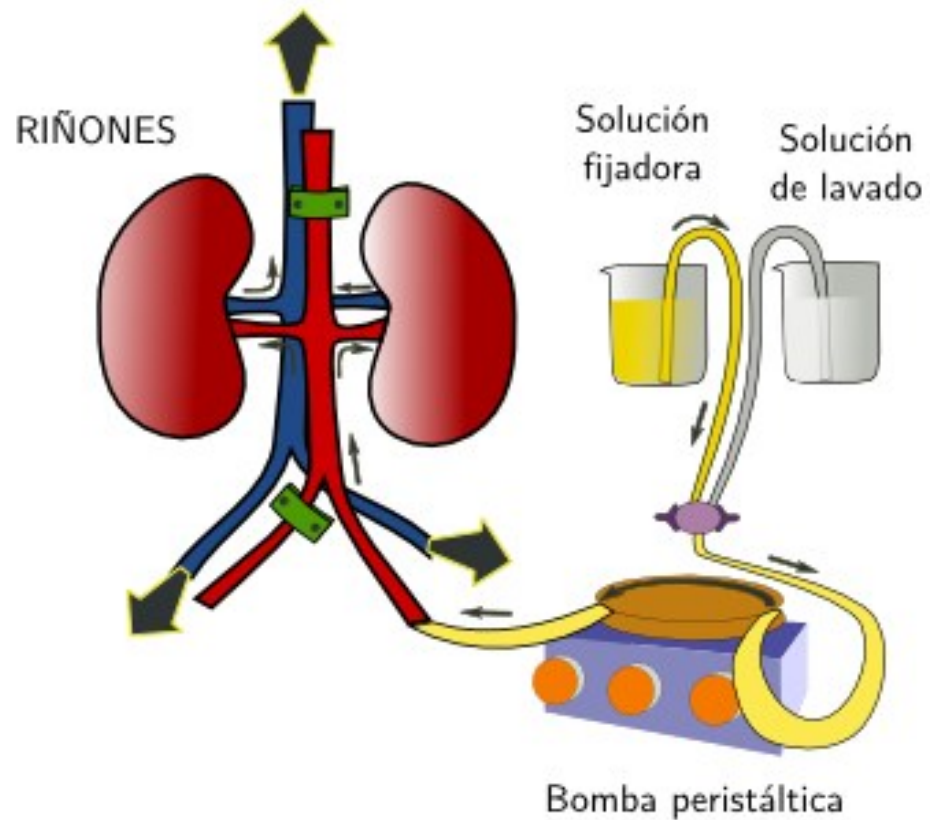
- Objectiu: **conservar la mostra**, és a dir, preservar la morfologia de les cèl·lules, la seva organització interna i la seva composició química.
- Fixadors químics: alcohol etílic 70%, formaldehid,...
- Fixadors físics: la calor, el fred.

# Tipus de fixació

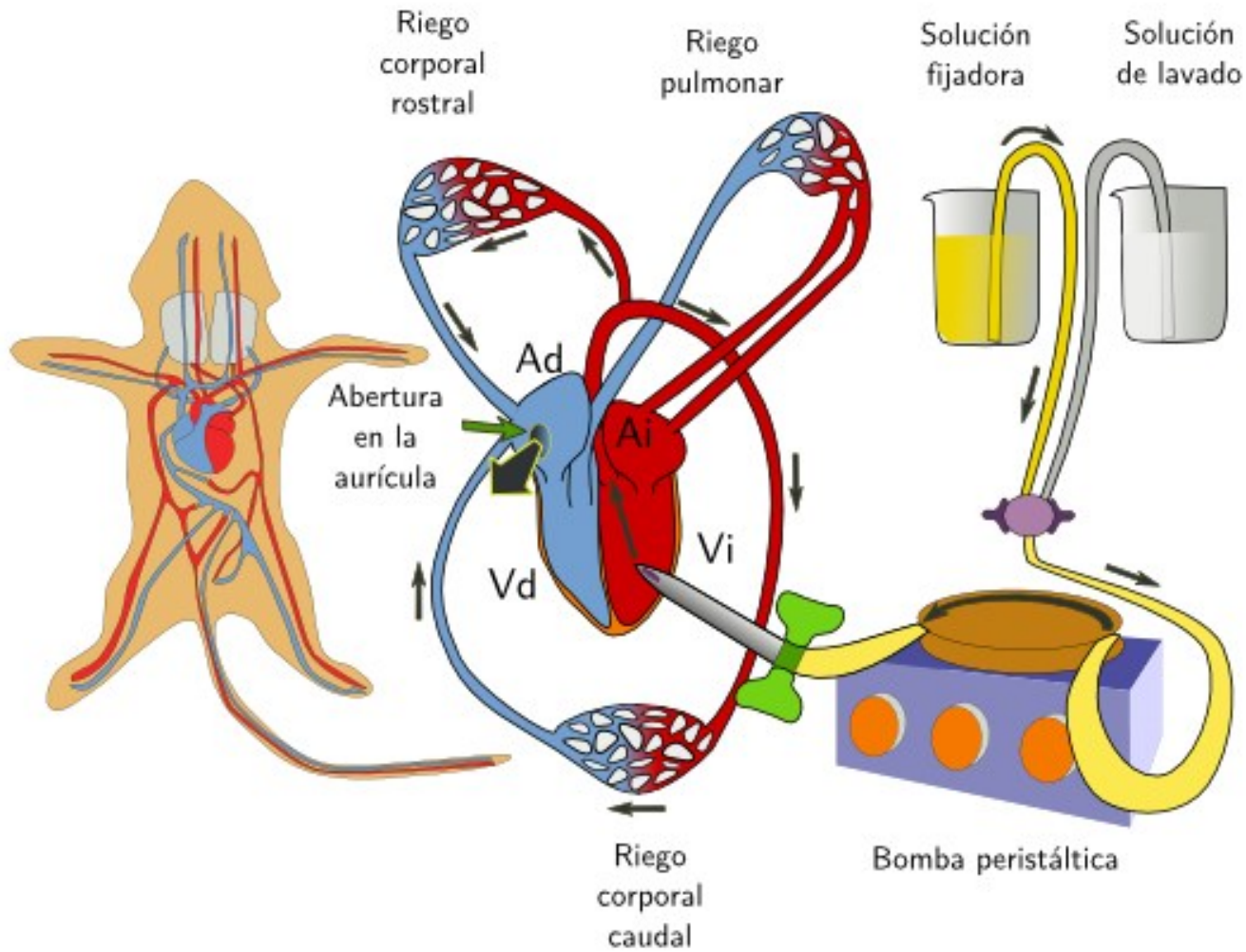
## Per immersió



## Per perfusió (a través del sistema circulatori)



Fijación por perfusión de un órgano. Mediante perfusión se consigue que la solución fijadora llegue a todas las células del órgano a través del sistema sanguíneo. Mediante una bomba peristáltica se introduce la solución fijadora a través de la arteria que irriga el órgano. Se obturan todos aquellos vasos arteriales que no conducen al órgano.

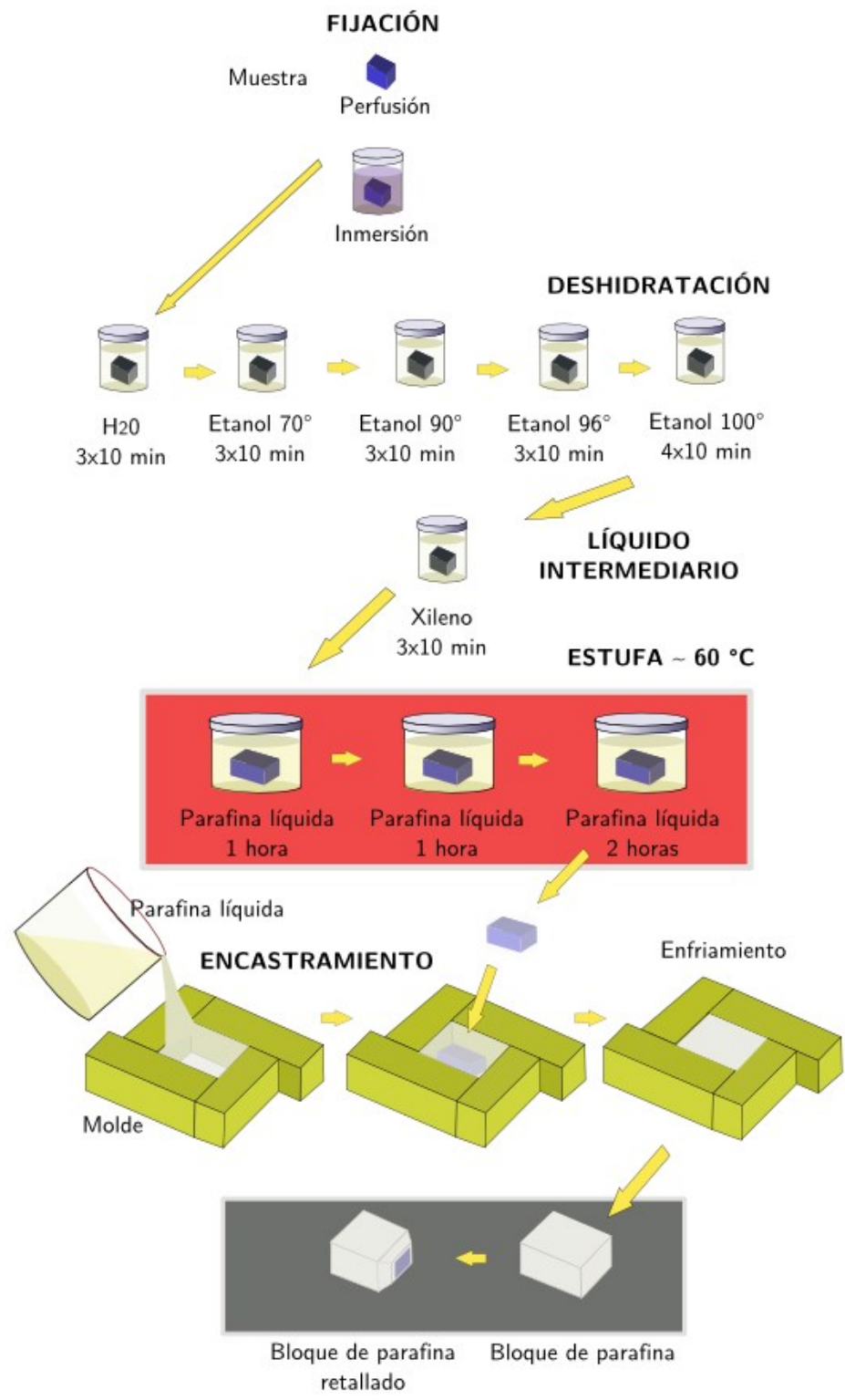


Fijación por perfusión de un organismo completo. Mediante este tipo de perfusión se introduce la solución fijadora en el sistema sanguíneo. La bomba peristáltica aporta la presión suficiente permitiendo al fijador entrar a través del ventrículo izquierdo (Vi) y pasar a la aorta, desde la cual se distribuye por todo el cuerpo (excepto por el circuito pulmonar). Tras pasar por la red capilar, la solución fijadora pasa a los vasos venosos que terminan por verter su contenido en la aurícula derecha (Ad). A esta cavidad hay que hacerle una abertura para que la solución fijadora, una vez realizada su función, salga del circuito. Ai: aurícula izquierda; Vd: ventrículo derecho.

# Inclusió

- Objectiu: **donar rigidesa** per evitar-ne la deformació durant el tall.
- Abans s'ha de **deshidratar** perquè el medi d'inclusió és hidròfob i cal eliminar l'aigua per fer una bona inclusió.

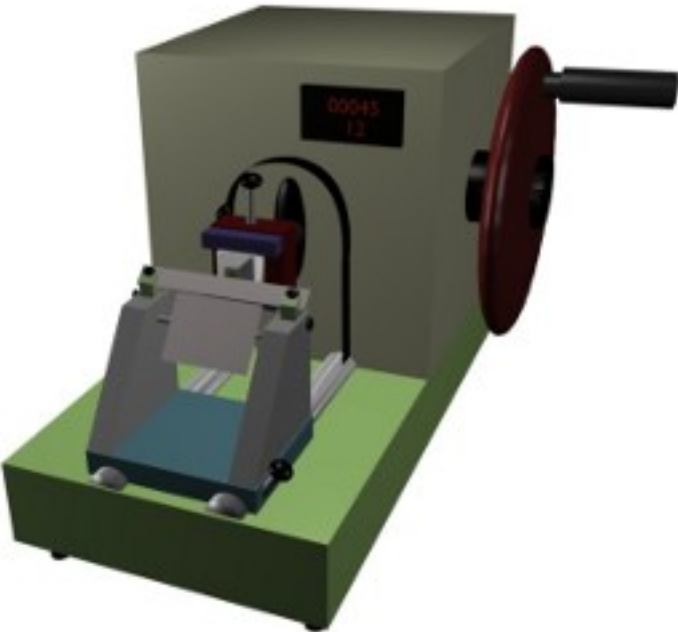




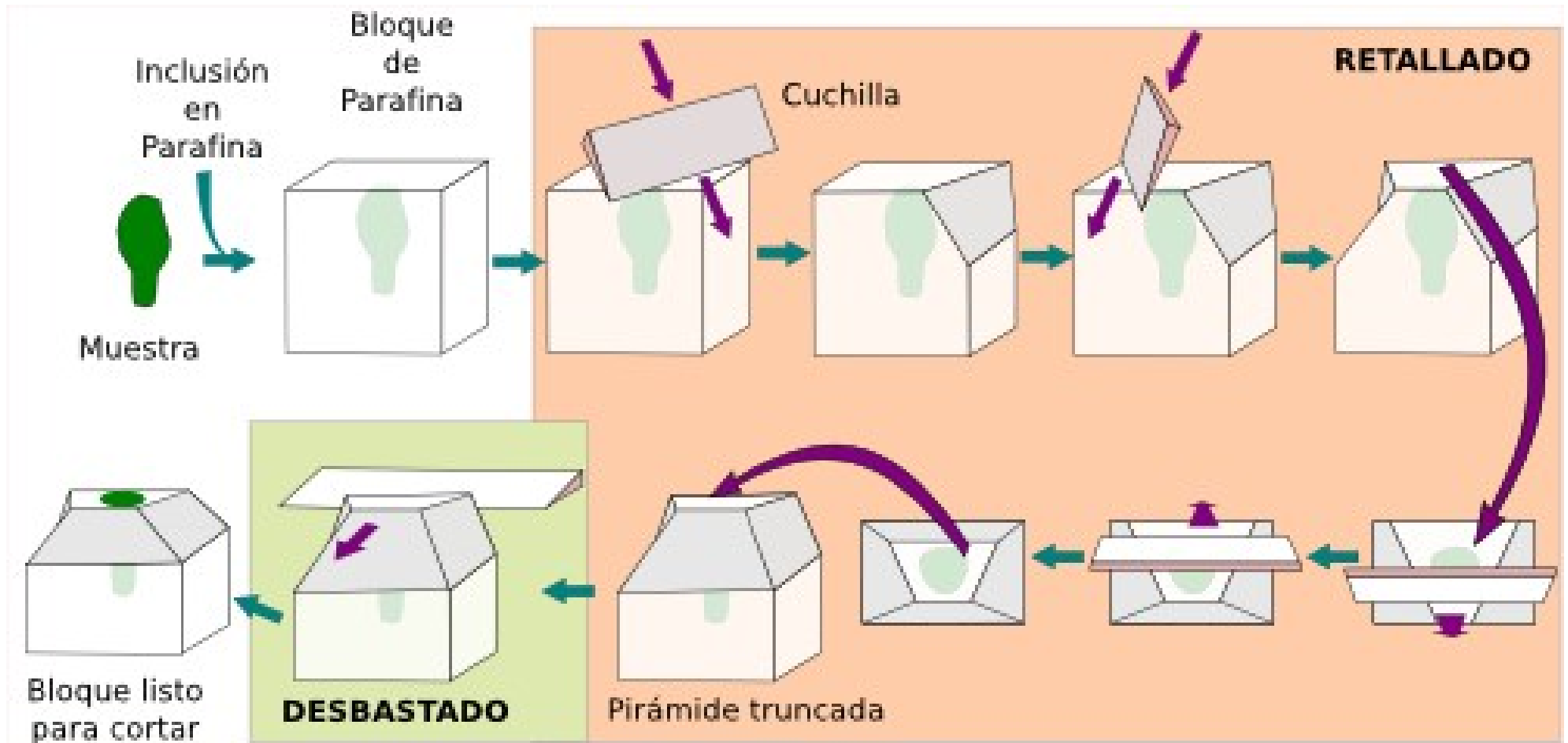
# Tall

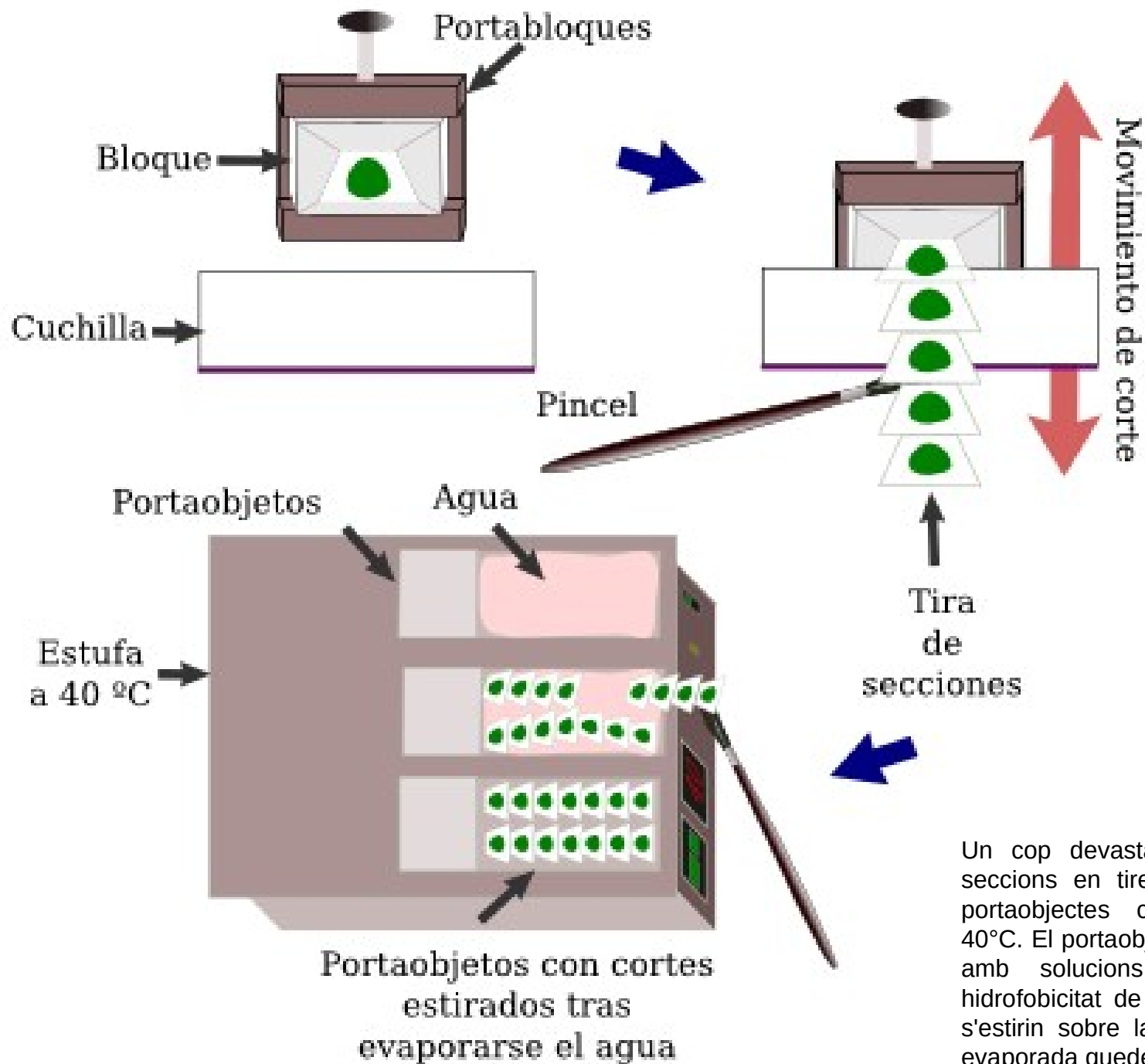
- Objectiu: hem de **tallar la mostra** en capes fines per deixar passar la llum i poder formar la imatge.
- Aparell: **micròtom.**
- Gruix mostra: 6-12 $\mu$ m

# Micròtoms



# Preparació del bloc de parafina per ser tallat





Un cop devastat i retallat el bloc, s'obtenen seccions en tires que es col·loquen sobre un portaobjectes cobert amb aigua calenta a uns 40°C. El portaobjectes ha estat tractat prèviament amb solucions adhesives. El calor i la hidrofobicitat de la parafina fa que les seccions s'estirin sobre la superfície de l'aigua i un cop evaporada queden adherides al portaobjectes.

# Tinció

- Objectiu: les mostres són incolores i transparents a la llum, **cal tenyir-les** per observar les estructures.
- Segons les estructures que es vulguin destacar, s'utilitzen uns colorants o uns altres.

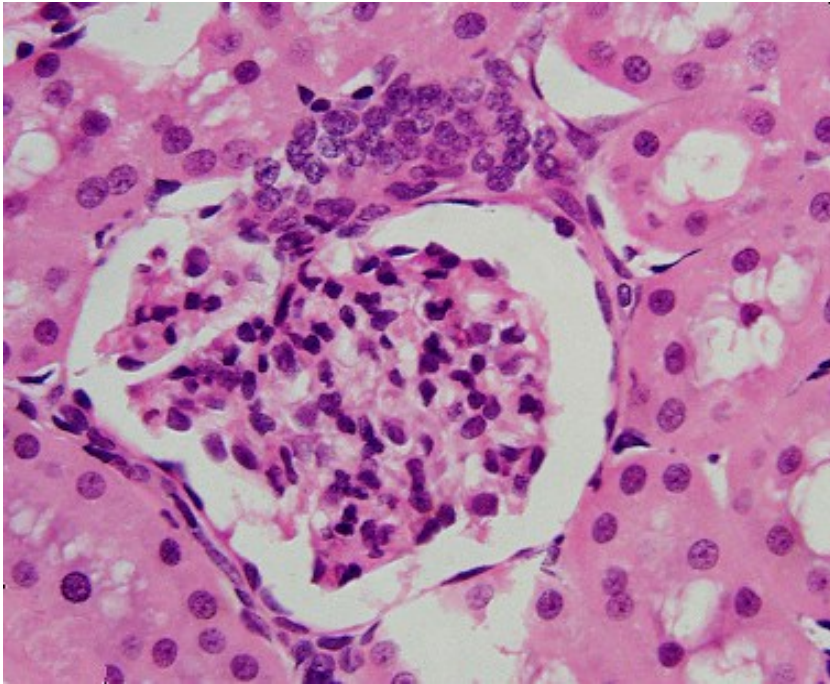
# Muntatge

- Objectiu: preparar la mostra per observar-la.
- Es cobreix la mostra amb medi de muntatge viscos i transparent, i després es col·loca al damunt un cobreobjectes per protegir-la.

Exemple colorants:

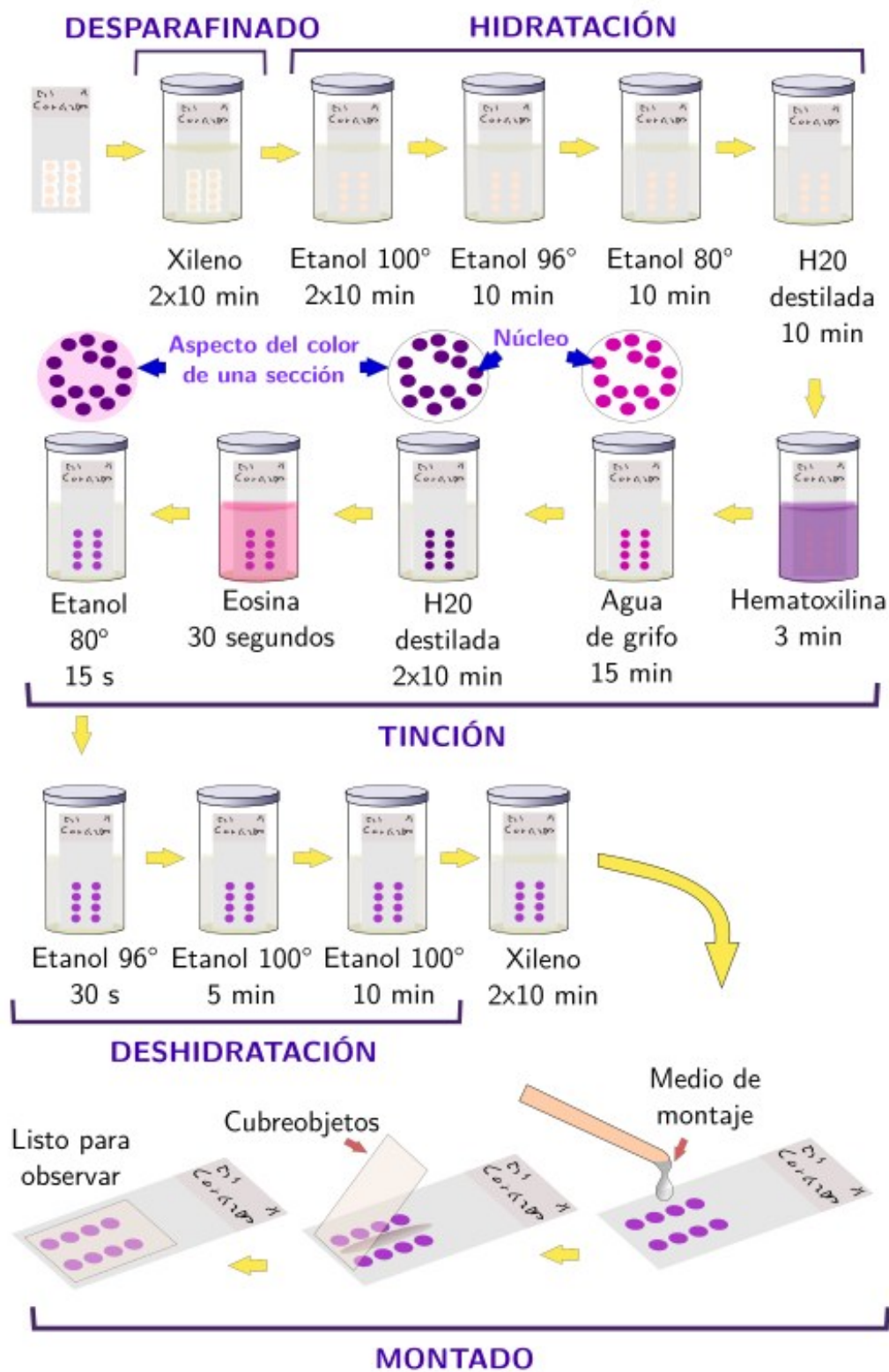
**hematoxilina** (nucli) i **eosina** (citoplasma)

Abans de procedir a la tinció pròpiament, si es parteix de talls de parafina, s'han de dur a terme uns **tractaments previs** ja que els colorants són hidrosolubles.



Secció d'un glomèrul d'un ronyó de mamífer obtinguda a partir d'una inclusió de parafina i tenyit amb hematoxilina-eosina.

Els nuclis apareixen de color violeta (hematoxilina) i el citoplasma de color rosat (eosina)



Pasos que se siguen durante una tinción general de hematoxilina-eosina. Los tiempos son aproximativos porque dependen del grosor de los cortes y de la concentración de los colorantes. El desparafinado elimina el medio de inclusión, la parafina. La deshidratación final es necesaria porque el medio de montaje no suele ser hidrosoluble. Estos medios de montaje no afectan al tejido, ni a los colorantes y tienen unas propiedades ópticas excelentes. Además, conservan las preparaciones durante años en buenas condiciones. Tras el montaje y secado (evaporación del xileno), las secciones se puede observar con el microscopio óptico.



# Microscòpia electrònica

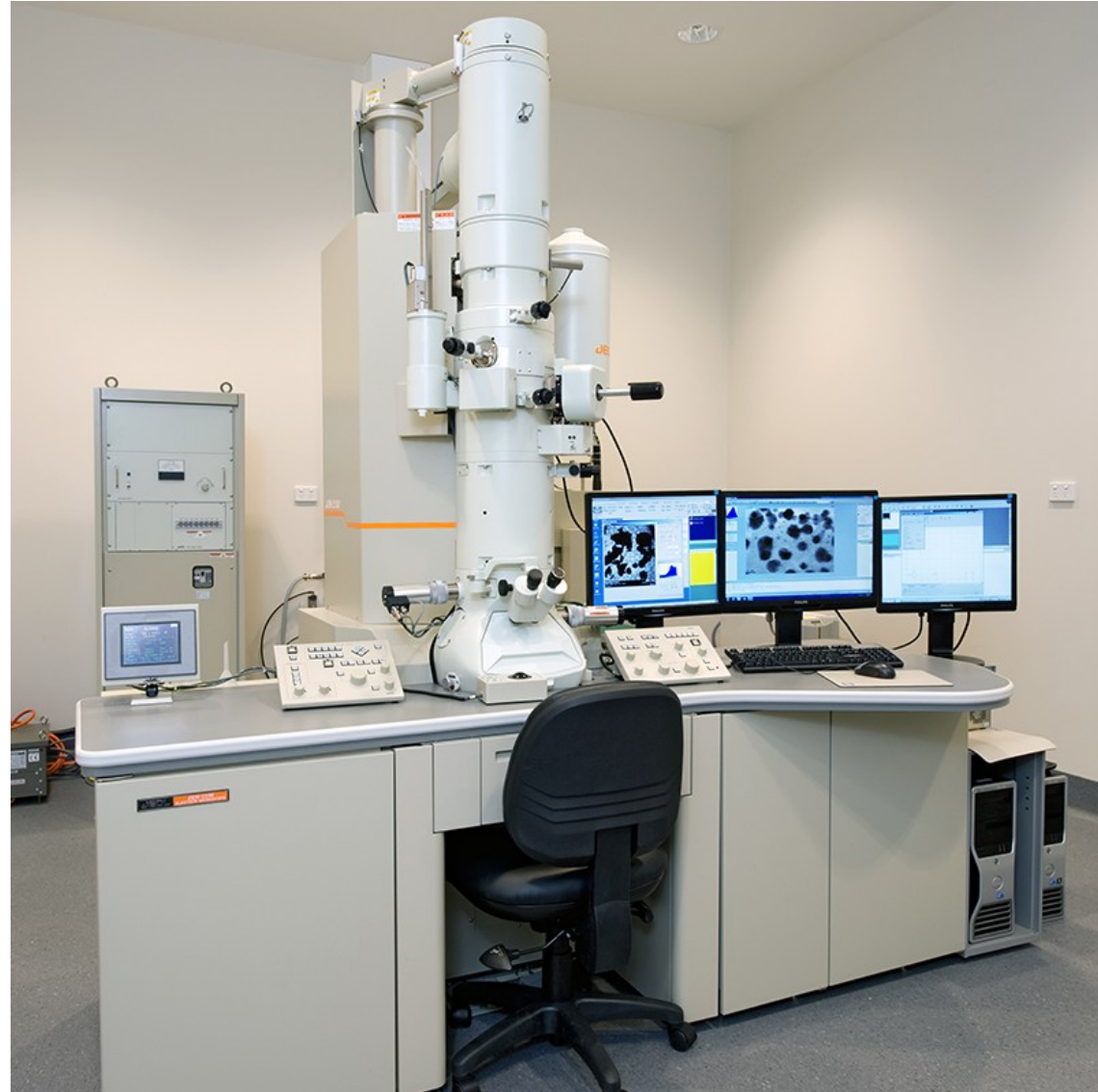
# El microscopi ELECTRÒNIC

- Es recorre al microscopi electrònic quan es volen observar estructures que estan per sota del poder de resolució del m.o. (**ultraestructures**)
- El **gran poder de resolució** del m.e s'aconsegueix gràcies a que no es fa servir la radiació electromagnètica de la llum visible sino l'alta freqüència d'un **feix d'electrons** que incideix sobre una mostra.
- El m.e no usa lents de vidre, sinó **electroimants**.
- Normalment són **aparells molt grans** ja que els electrons han de viatjar pel **buit**.

# El microscopi ELECTRÒNIC

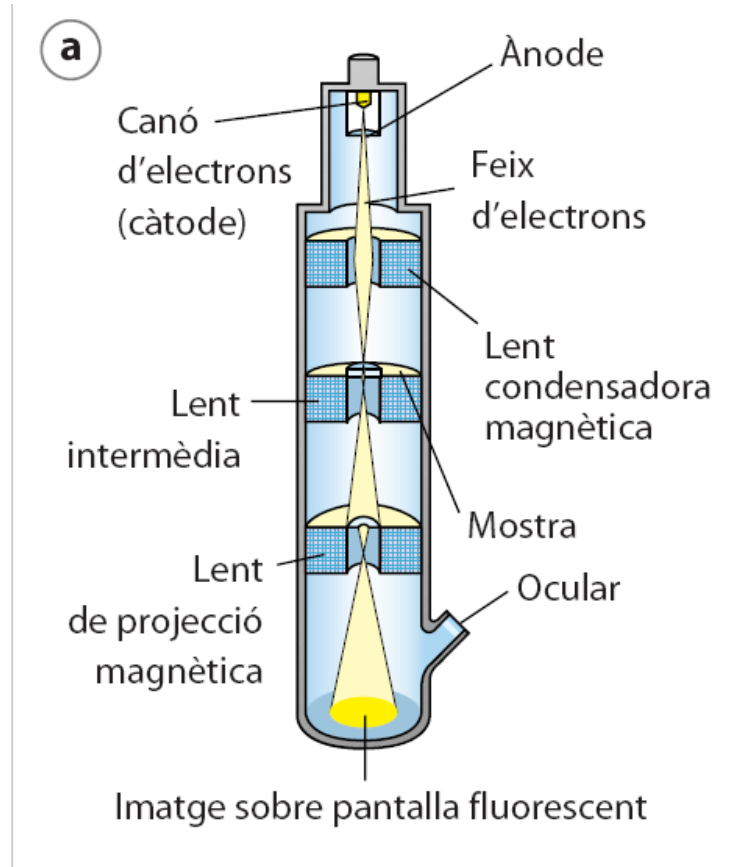
Hi ha dos tipus principals:

- Microscopi electrònic de transmissió (MET)
- Microscopi electrònic de rastreig (MES)



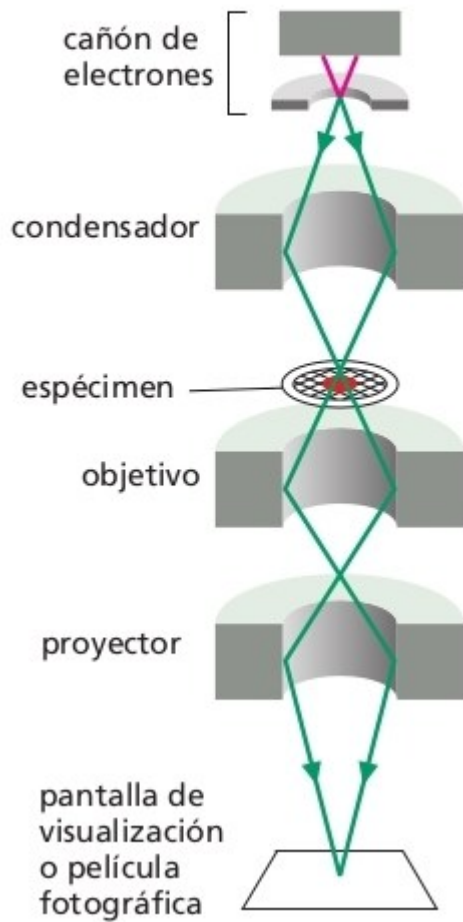
# Microscopi electrònic de transmissió (MET)

- El MET està format per una columna en què es fa el buit, amb un **filament o càtode** en la part superior que emet electrons. Els e- són concentrats sobre el pla on es disposa la mostra mitjançant uns **electroimants** situats a l'interior de la columna (fan igual que el condensador en un m.o). Després el feix d'electrons travessa la mostra i, a continuació, dos electroimants que funcionen com a lents donen una imatge augmentada de l'objecte.
- Alguns del e- que arriben a la mostra són dispersats, d'acord amb la densitat del material. Els e- que travessen la mostra xocaran contra una pantalla fluorescent emeten una llum per cada xoc. Com que els electrons dispersats no apareixen a la imatge, les regions més denses de la mostra apareixen fosques i les menys denses (transparentes als e-) apareixen més clares.
- **Les seccions de teixit han de ser ultrafines** per poder ser travessades pel electrons.
- Prèviament la mostra ha de rebre un **tractament amb sals de metalls pesants per tal de donar contrast** a la imatge que s'obtindrà (ressaltar estructures).



a) Esquema d'un microscopi electrònic.

# MICROSCOPIO ELECTRÓNICO DE TRANSMISIÓN



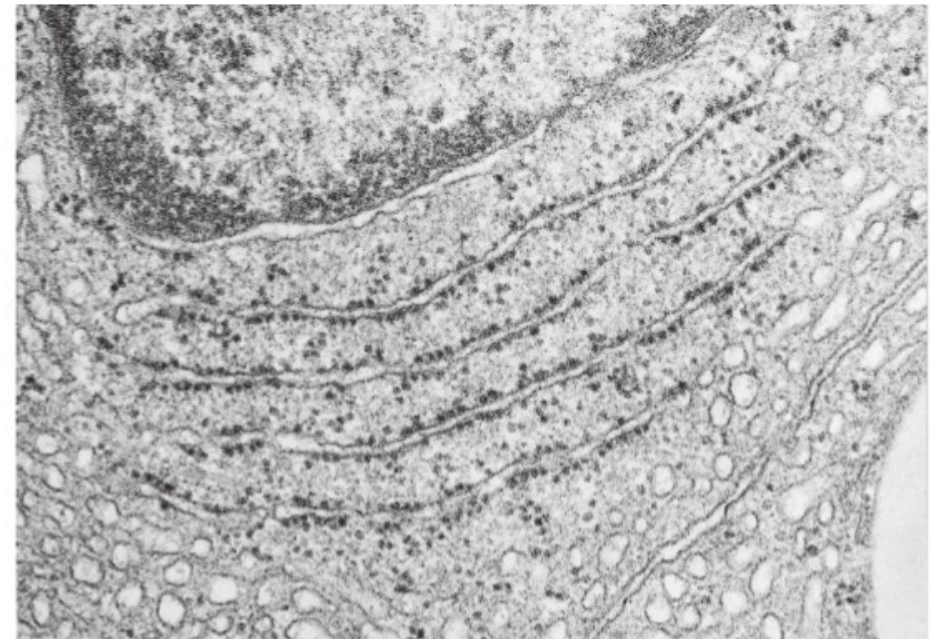
Courtesy of Philips Electron Optics, with permission from FEI Co.



# M.E.T

Augments: fins a 1.000.000x.

Poder de resolució: 4 Å

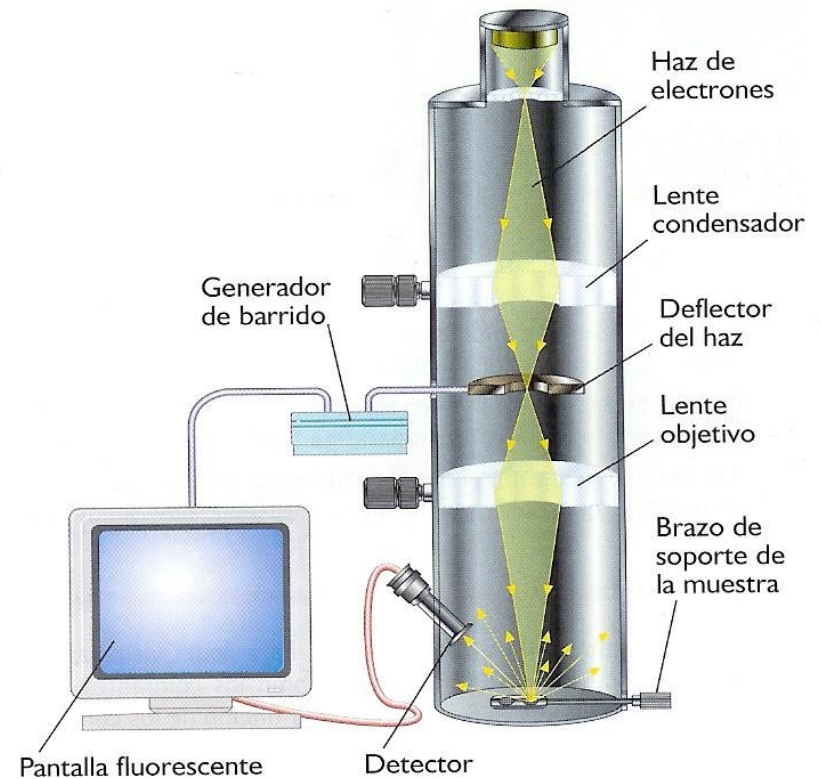


0.5 μm



# Microscopi electrònic de rastreig (MES)

- El MES serveix **per observar superfícies** tissulars.
- En aquest microscopi **el feix d'electrons es reflecteix sobre la superfície de la mostra** en lloc de travessar-la. Per a que això pugui passar s'ha de cobrir la mostra amb una capa de metall pesant com l'or que s'adapti perfectament al relleu de la mostra i no deixi passar els electrons.
- Quan els electrons xoquen amb la mostra es produeixen uns electrons «secundaris» sobre la superfície metal·litzada que seran detectats i convertits en **imatge sobre una pantalla digital** (són els e-reflectits els que formen la imatge).
- No es necessari fer talls fins.
- **La mostra es escanejada** punt per punt amb el feix d'electrons.
- La **imatge** obtinguda es **tridimensional**



Esquema de un microscopio electrónico de barrido.

# M.E.S

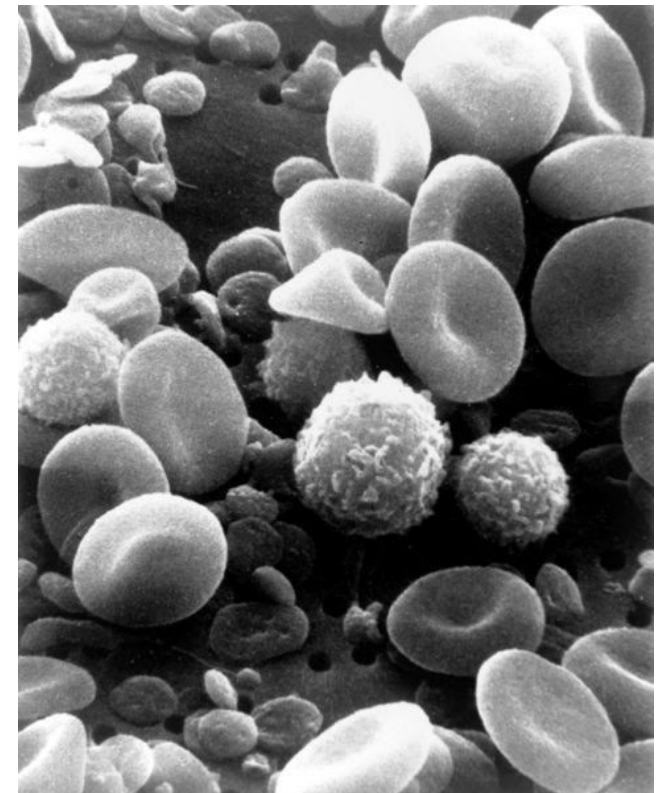
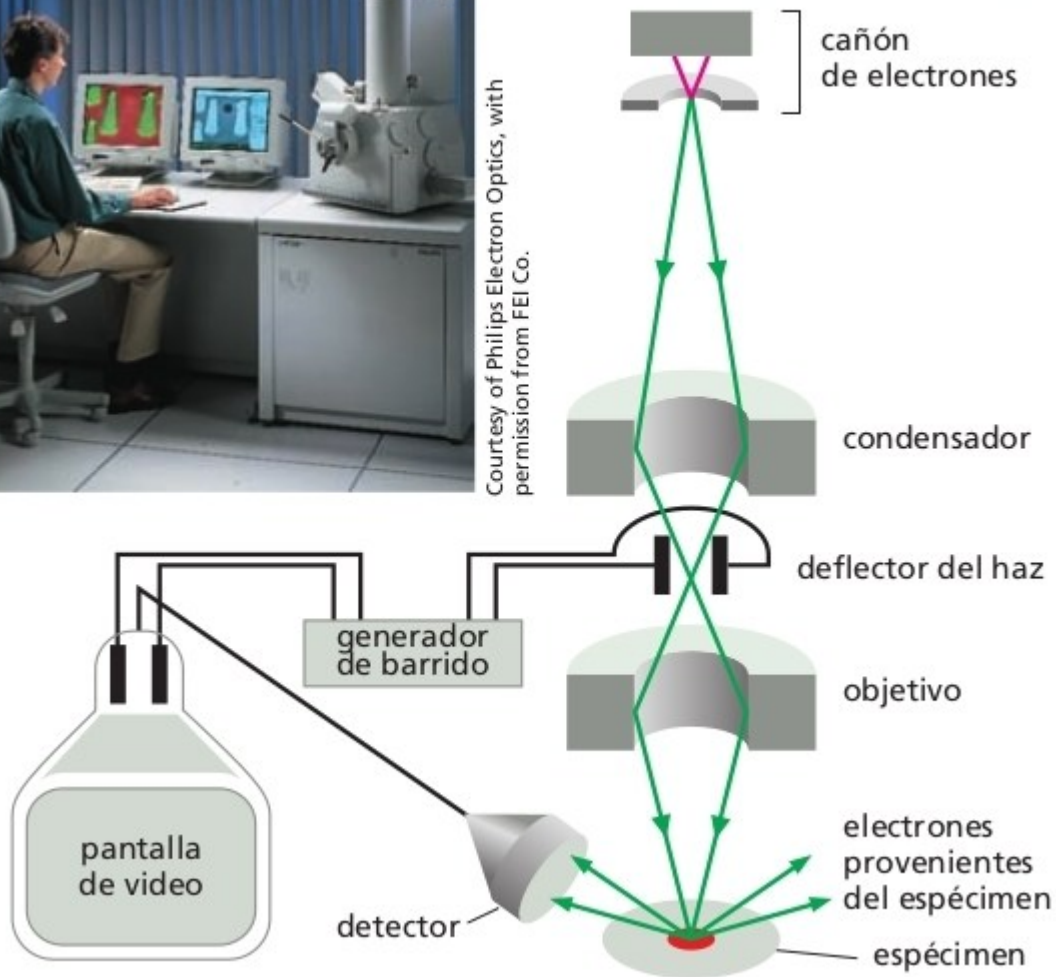
Augments: fins a 200.000x.

Poder de resolució: 200 Å

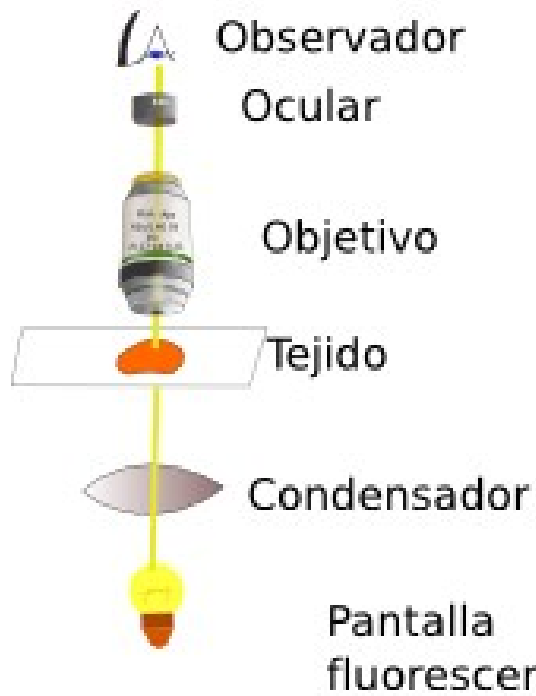


Courtesy of Philips Electron Optics, with permission from FEI Co.

## MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO



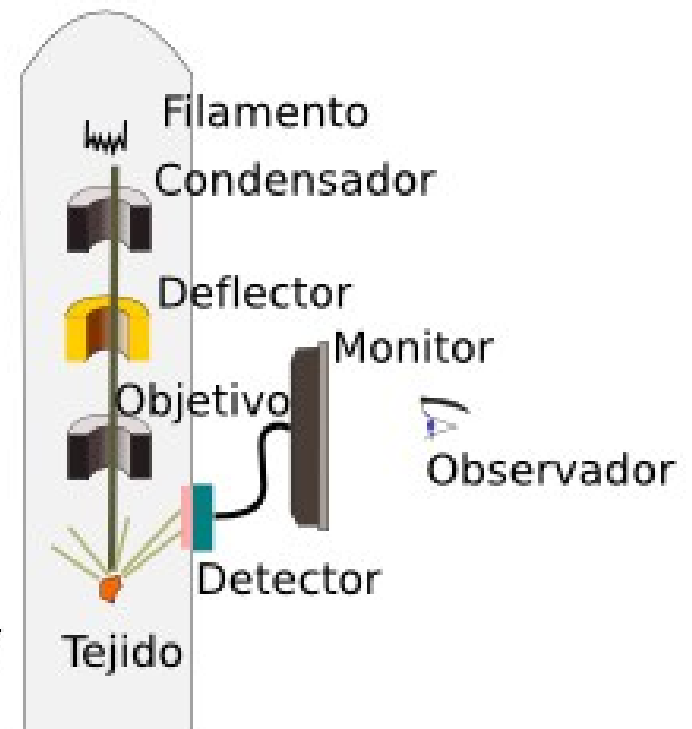
M.O



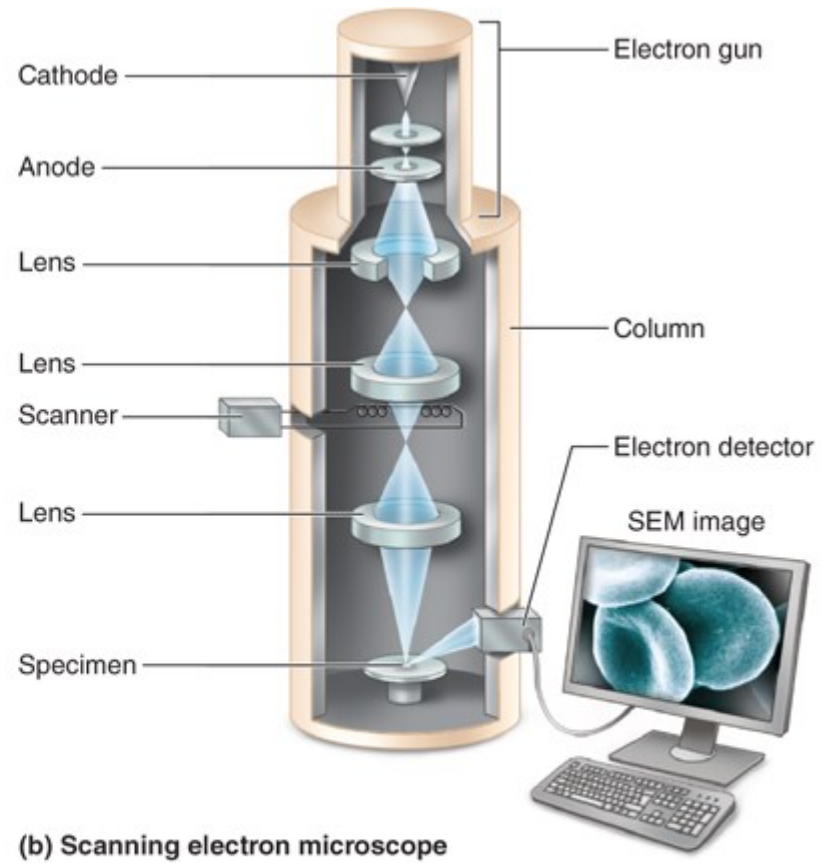
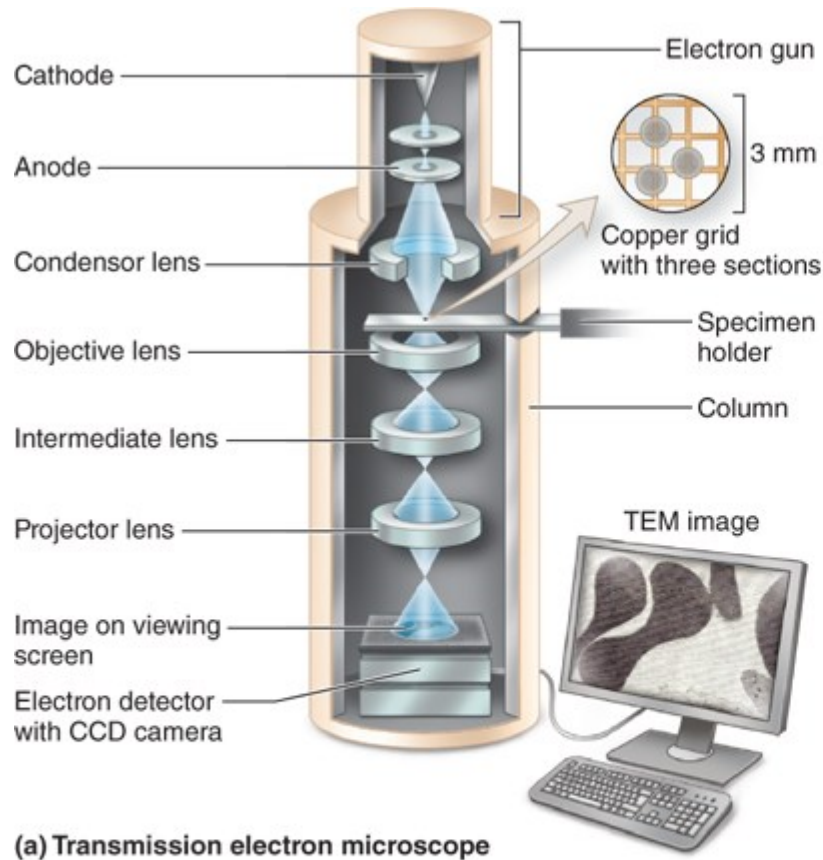
M.E.T



M.E.S

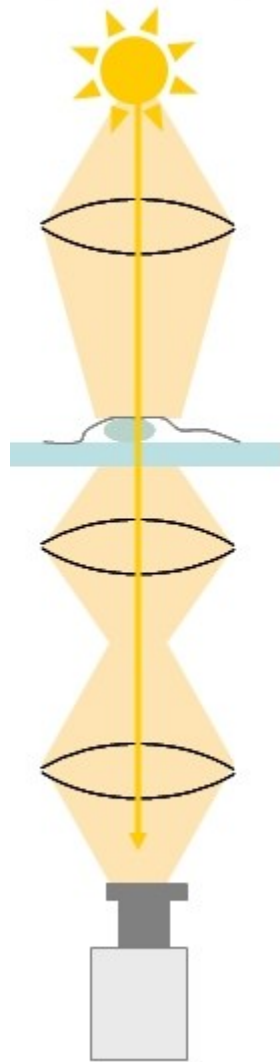




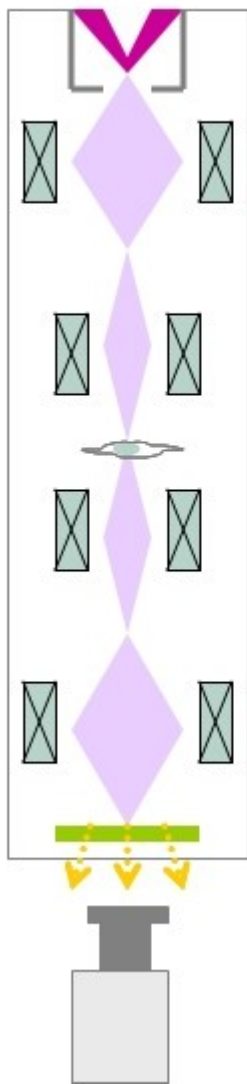


Source: Anthony L. Mescher: Junqueira's Basic Histology, 14th Edition.  
 www.accessmedicine.com  
 Copyright © McGraw-Hill Education. All rights reserved.

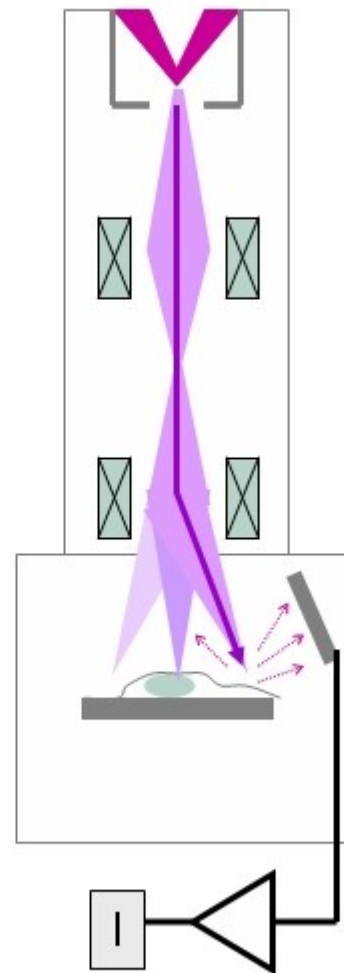
Optical



TEM

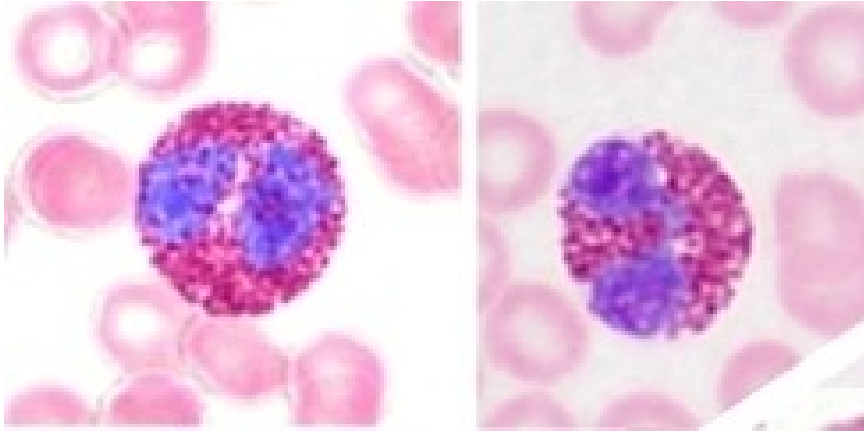


SEM

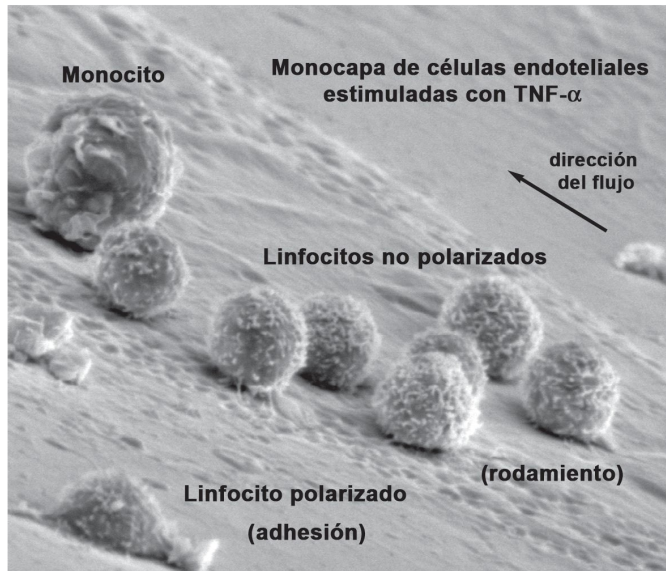
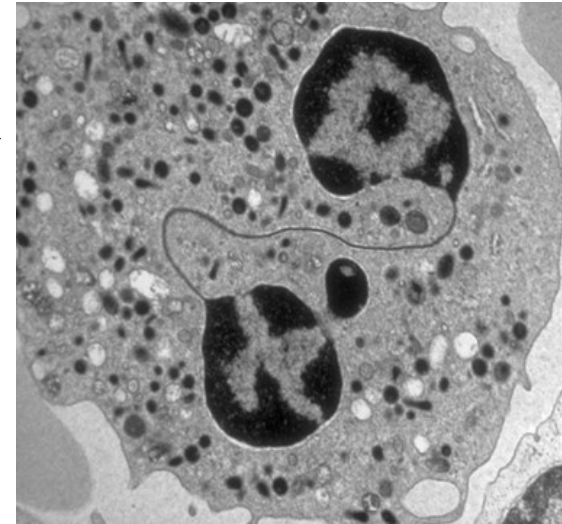


# Exemple: limfòcits.

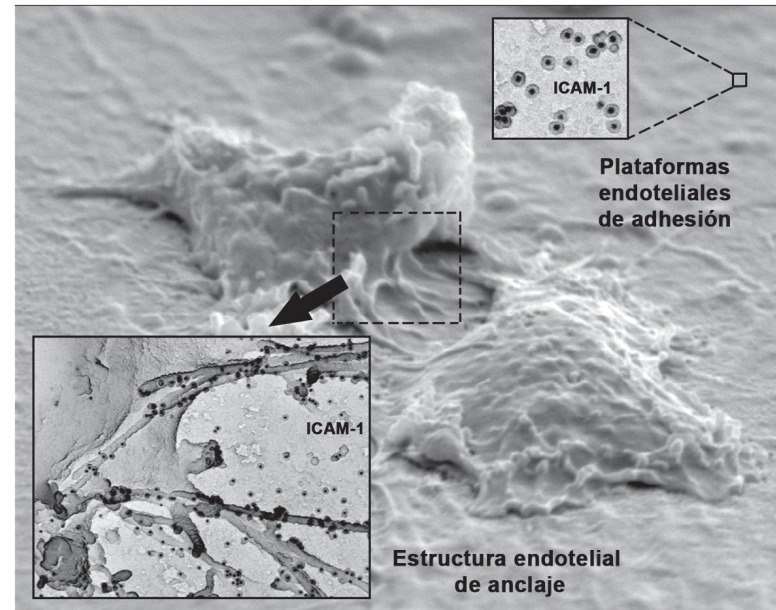
Microscopi òptic



M.E.T



M.E.S

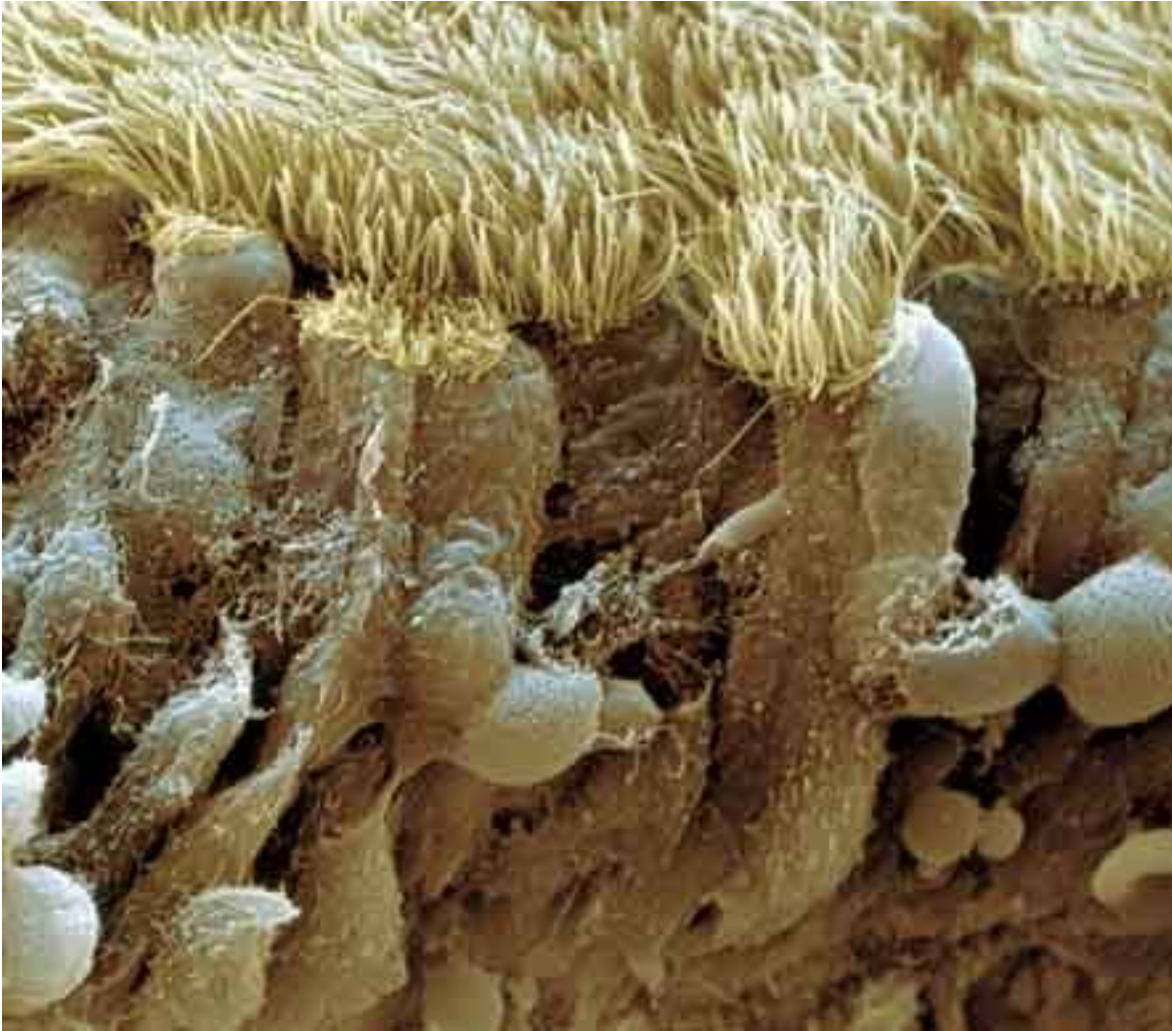


# Quin microscopi és?

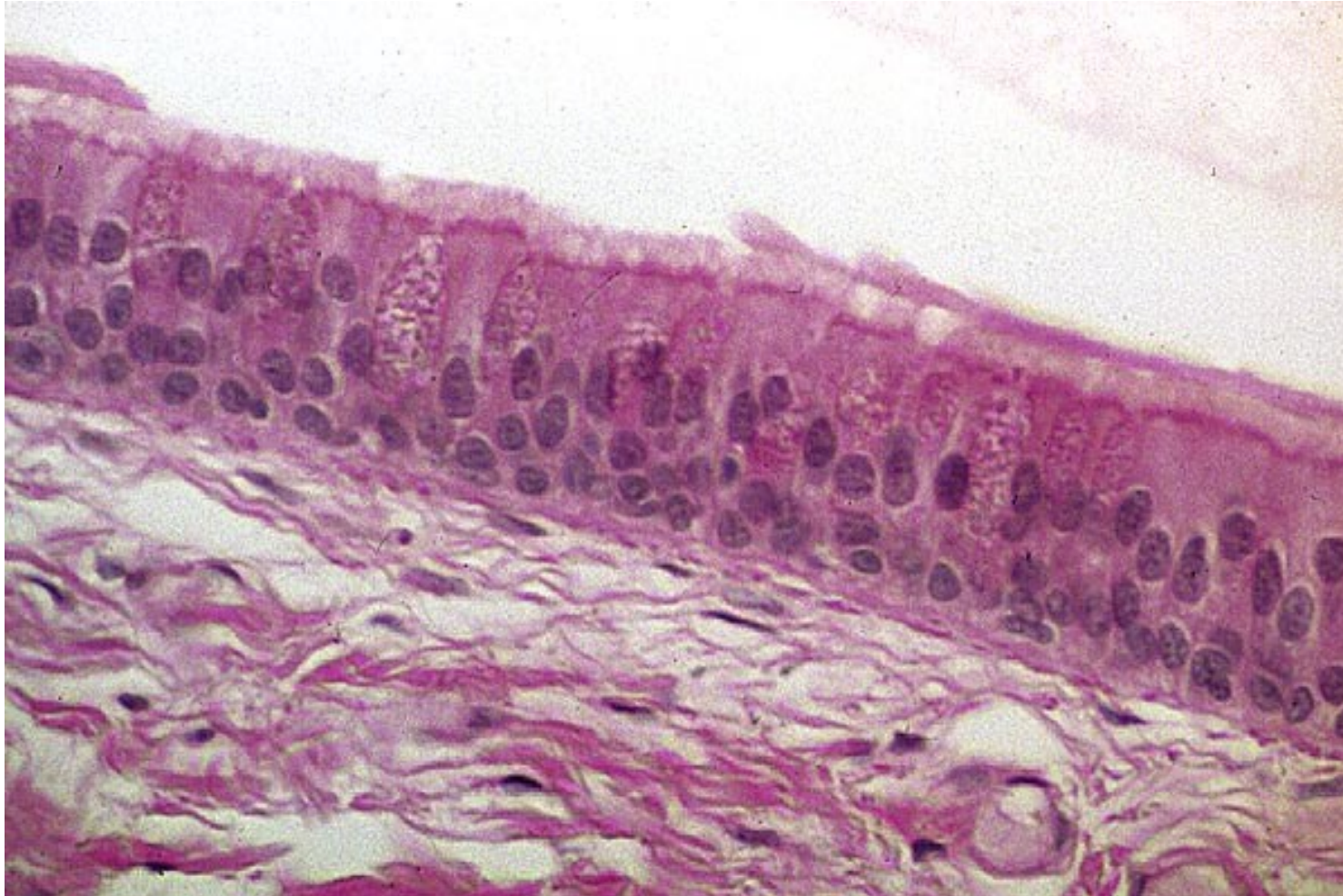




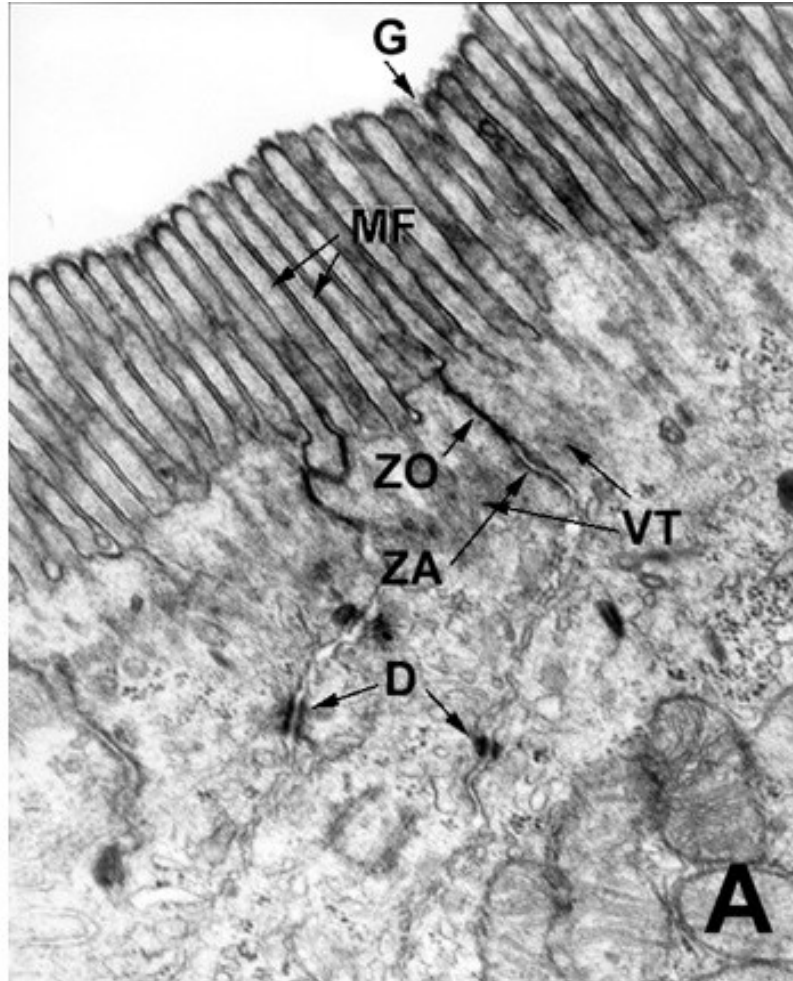
# Epiteli nasal



# Epiteli respiratori



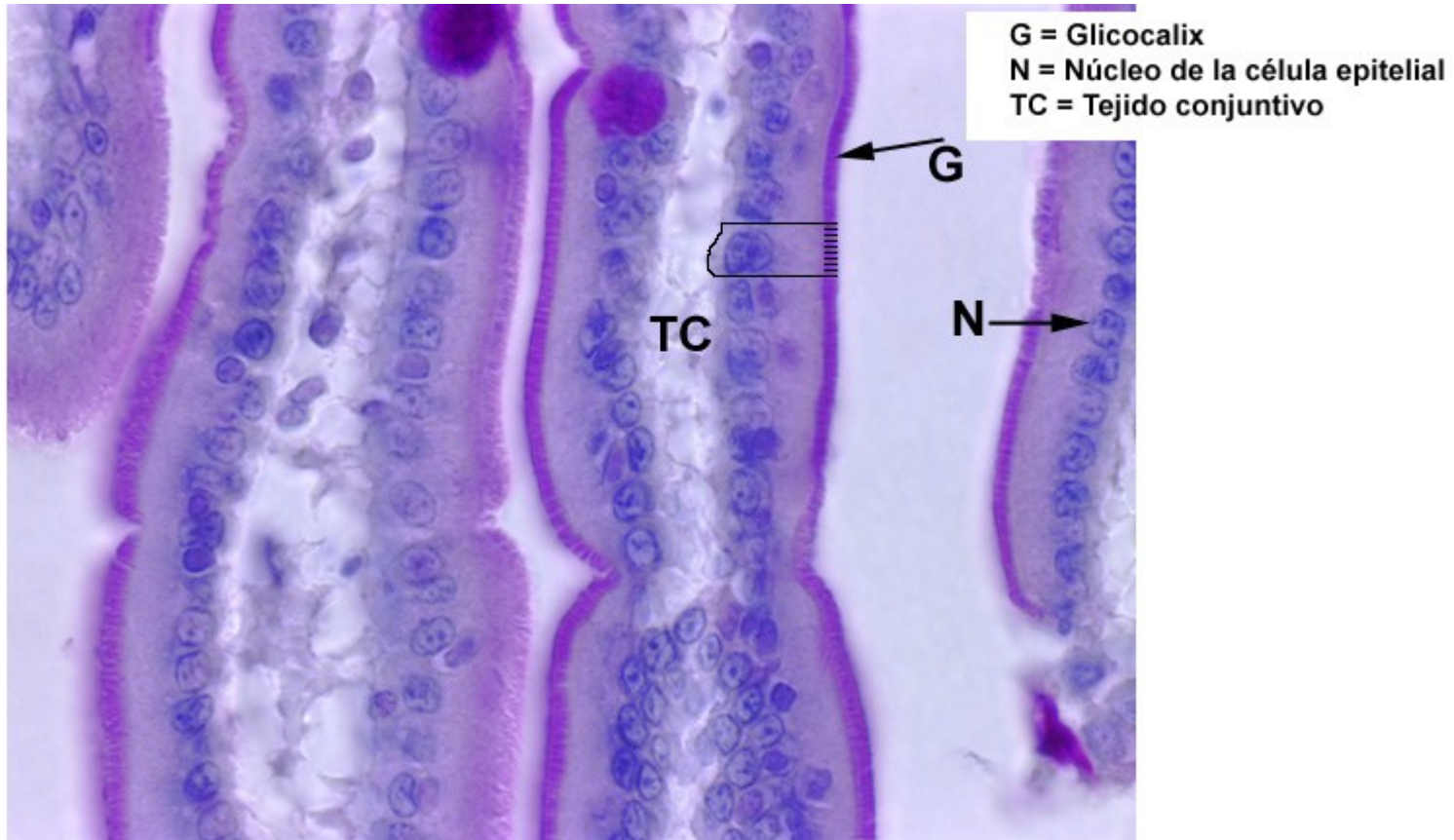
# Epiteli intestinal



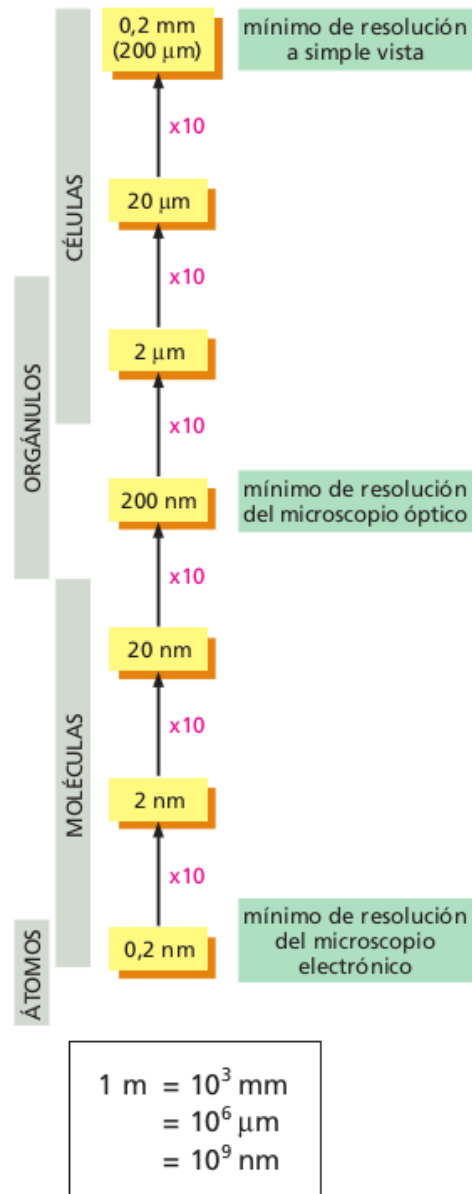
- D= Desmosoma
- G= Glicocalix
- MF= Microfilamentos
- VT= Velo terminal
- ZA= Zónula adherente
- ZO= Zónula ocluyente



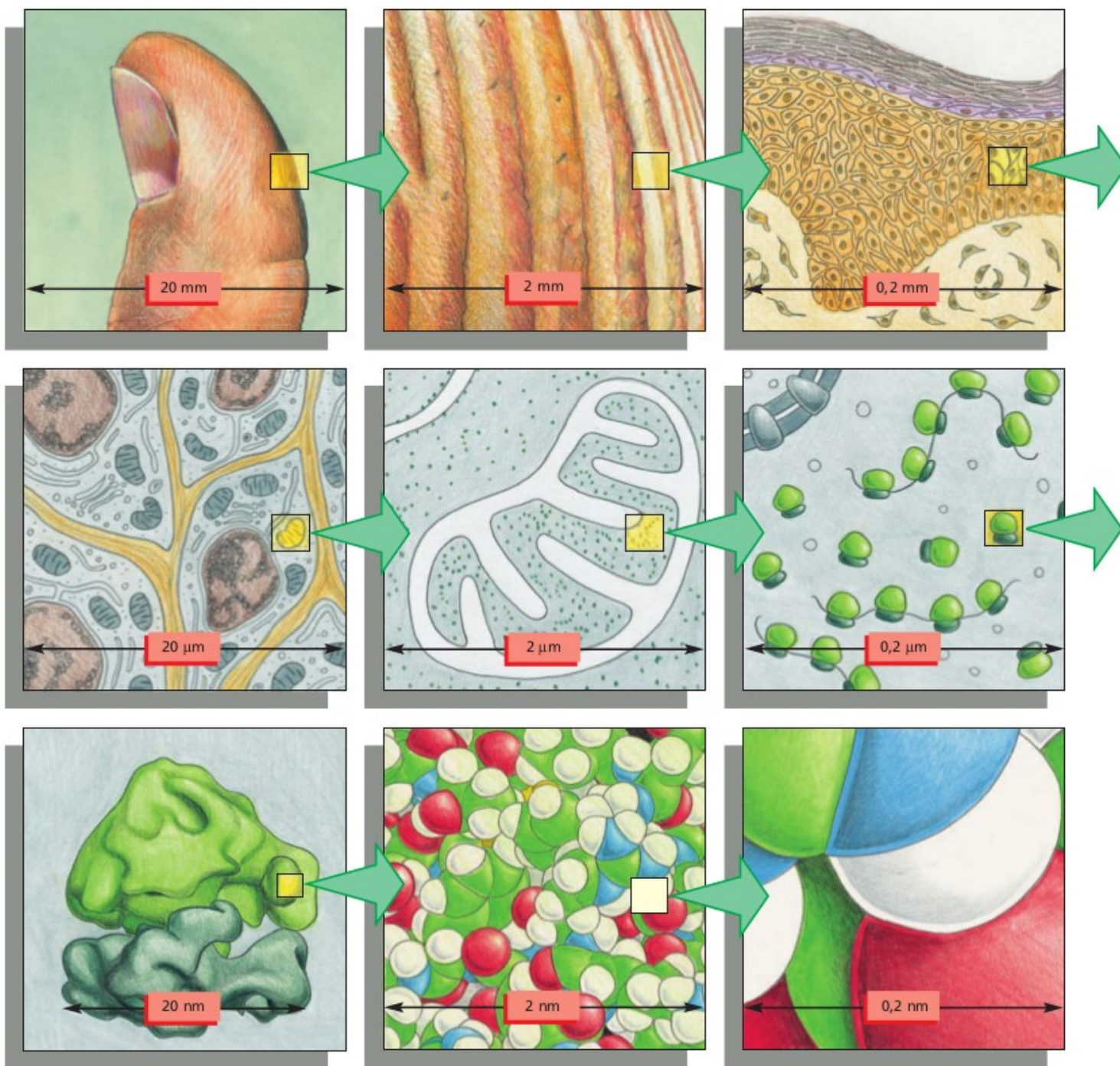
# Epiteli intestinal







**Figura 1-6. ¿Qué podemos observar?** Este esquema indica los tamaños de las células y de sus componentes, y las unidades utilizadas para su medición.



**Figura 1-9. ¿Qué tamaño alcanzan la célula y sus componentes?** Este diagrama da una idea de la escala entre las células vivas y los átomos. Cada recuadro muestra una imagen que luego es aumentada 10 veces en una progresión imaginaria desde el pulgar, pasando por células cutáneas, una mitocondria, un ribosoma y, por último, un grupo de átomos que forman parte de una de las muchas moléculas de proteínas de nuestro organismo. Los detalles de la estructura molecular, ilustradas en los dos últimos recuadros, están por debajo del poder de resolución del microscopio electrónico.