

PARTE I

Un enfoque evolutivo de la célula

Roberto A. Rovasio, Aldo R. Eynard y Mirta A. Valentich

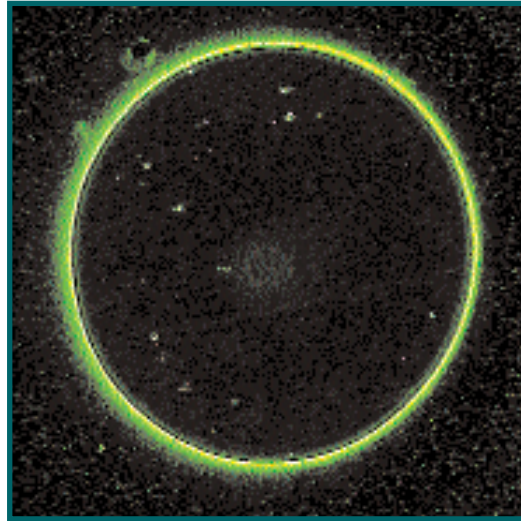


Fig. I-0. Imaginando una protocélula. Estructura vesicular con contenido orgánico, rodeada por una membrana visible con microscopía de fluorescencia (véase fig. I-1). “Todas las formas de vida están compuestas por moléculas que no están vivas por sí mismas. Pero, de qué manera difiere la materia viva de la no viva? Cómo podría surgir una primitiva forma de vida de un conjunto de moléculas no vivas? La transición de la materia no viva a la materia viva usualmente emerge en el contexto del origen de la vida.” (Del párrafo inicial de Rasmussen et al., 2004).

En el estudio inicial de la célula con frecuencia nos preguntamos sobre el origen de esta unidad de los seres vivos, y es razonable pensar que no siempre la célula fue como hoy la conocemos. Hace unos 3 000 millones de años, cuando la Tierra estaba en gran parte sumergida en la sopa prebiótica, no existían las células que darían origen a todos los seres vivos. Sin embargo, comenzaban a darse las condiciones fisicoquímicas para que ellas existieran luego de una larga evolución (fig. I-0).

¿Cuáles serían esas condiciones? En primer lugar –siguiendo a las prolongadas eras de convulsiones volcánicas y millones de toneladas de materia hirviendo que comenzaban a enfriarse–, no es difícil imaginar la aparición de situaciones fisicoquímicas adecuadas para la formación de las primeras moléculas orgánicas simples. Así como hoy conocemos en detalle las formas de unión de unas moléculas con otras, no hay razón para pensar que en aquella etapa prebiótica no existieran “afinidades” para las uniones entre esas moléculas orgánicas. Así, la unión de unas moléculas con otras, con cierto grado de selectividad, daría origen a la formación de los polímeros primigenios.

PARTE I

■ **Capítulo 1**

Métodos generales para el estudio de las células y los tejidos 10

Roberto A. Rovasio, Aldo R. Eynard y Mirta A. Valentich

■ **Capítulo 2**

El núcleo como centro interactivo de control celular 33

Mirta A. Valentich, Guillermina A. Bongiovanni y Roberto A. Rovasio

■ **Capítulo 3**

Líneas de montaje, tránsito y destino de macromoléculas y membranas para exportación y para uso interno 72

Mirta A. Valentich y R. Olga Calderón

■ **Capítulo 4**

Evolución de las fuentes de energía y su transformación 90

Mirta A. Valentich y R. Olga Calderón

■ **Capítulo 5**

Relaciones de la célula hacia su interior y con su medio exterior 103

Roberto A. Rovasio, Mirta A. Valentich y Aldo R. Eynard

EL CAMINO HACIA LA PROTOCÉLULA

Como se mencionó en el párrafo introductorio –avalado por abundante evidencia–, podemos imaginar el inicio del largo camino que dará origen a la **célula**^(*), como un enorme caldero que contiene miríadas de las primeras **moléculas orgánicas simples** (fig. I-1 A). Moléculas que, por afinidades fisicoquímicas que no serían necesariamente diferentes de las del tiempo actual, determinaron uniones entre ellas. Estos enlaces permitirían el surgimiento de conjuntos moleculares que denominamos los **polímeros primigenios** (fig. I-1 B). Considerando el comportamiento fisicoquímico de las moléculas “modernas”, tampoco es difícil imaginar que en aquella época los constituyentes de los primitivos polímeros tuviesen sus propias preferencias de unión, cuya resultante sería otro polímero, complementario del primero (fig. I-1 C). A la luz de nuestros actuales conocimientos, los cambios que acabamos de describir no sólo fueron posibles, sino muy probables. Lo difícil para nuestra dimensión humana es, precisamente, imaginar que para llegar a esos cambios, hicieron falta muchos millones de años de **evolución molecular**, y muchos trillones de interacciones moleculares fallidas, hasta que algunas de ellas comenzaron a ser estables. Es difícil de imaginar –pero no imposible de conceptualizar– que muchos de los cambios que ocurren en nuestras modernas células (o en un tubo de ensayo) en segundos o minutos, demoraron millones de años en “ensayos” hasta llegar a un estado fisicoquímico estable y reproducible.

¿Cómo continúa esta historia prebiótica? Ya tenemos moléculas orgánicas simples formando polímeros. No hay razón para pensar que las moléculas integrantes de esos polímeros no hayan tenido afinidad para unirse con otras moléculas simples y que éstas, a su vez, puedan haberse unido entre sí para formar un nuevo polímero (fig. I-1 D). Podemos agregar a este razonamiento los millones de años que hacen falta, que nunca serán pocos... Pero, he aquí un nuevo cambio que será esencial para la vida tal como hoy la conocemos, cual es la adquisición de la capacidad de **auto-duplicación de un polímero** (fig. I-1 B-D).

En síntesis, en el viejo y largo camino hacia la **protocélula** ya tenemos los elementos que serán la base de muchos procesos importantes para la célula moderna y el núcleo fundamental de todos los sistemas biológicos. La formación de polímeros y la capacidad de autoduplicación de los mismos forman la base de los procesos de **síntesis biológica** y de la **transferencia de información** (fig. I-1 A-D).

Sin embargo, a pesar de la importancia de esos millones de años de evolución molecular, aún esta-

mos lejos de la protocélula. Para que ella pudiera existir –sobre la base del conocimiento actual– fueron necesarias al menos dos condiciones. En primer lugar, que el nuevo polímero (fig. I-1 D) pudiera tener un efecto “favorable” o “perturbador”, es decir, un efecto regulador sobre los otros polímeros (fig. I-1 + y –). Sin embargo, estos efectos estarían tan diluidos en las toneladas de sopa prebiótica del antiguo planeta que la acción reguladora en ese **sistema abierto** sería intrascendente para la población general de moléculas. Para la transformación en un **sistema cerrado** fue necesaria la segunda condición, bajo la forma de otro tipo de molécula orgánica simple, que seguramente formó parte del joven planeta en aquella primitiva era geológica. Los lípidos (grasas) –como veremos en detalle más adelante–, cuando son agitados en un medio acuoso rico en minerales y sales, tienen la propiedad de autoensamblarse en envolturas con forma de vesícula con líquido encerrado en su interior. En la primitiva sopa, el líquido no faltaba y las agitadas convulsiones tampoco, que hacían muy probable que a lo largo del tiempo se fueran dando las condiciones para la producción del primer **compartimiento** vesicular con polímeros en su interior (fig. I-1 ★). En este **sistema cerrado**, si la producción de un nuevo polímero tuviera un efecto favorable sobre los otros polímeros (fig. I-1 +), el resultado sería una mayor estabilidad del sistema; por el contrario, si el efecto fuese perturbador, la resultante sería el estancamiento o la destrucción del microsistema (fig. I-1 –). Es decir, la **selección natural** a nivel molecular operaría con mayor eficiencia en un sistema cerrado como el descrito. Y esto nos pone en los umbrales de la primitiva protocélula, un sistema que contiene los elementos básicos para seguir evolucionando hacia una mayor complejidad. **La selección natural en el ámbito molecular condicionó la evolución química, precediendo a la evolución biológica. Esa primitiva selección natural pudo realizarse debido a la formación del primer compartimiento.**

DE LOS PROCARIONTES A LOS EUCARIONTES: LA GANANCIA DE COMPARTIMIENTOS

Con los componentes básicos de la protocélula y luego de unos cuantos millones de años adicionales de evolución y selección natural, nos encontramos con la ancestral y actual **célula procarionte** (bacterias en su mayor parte). Éstas son las células más simples y primitivas que podemos conocer en nuestros días. Son pequeñas y poseen un **nucleoide** o componente nuclear de **ácido desoxirribonucleico** (DNA) que no está separado del resto del protoplasma. Por otra parte, su envoltura membranosa adquirió complejidad y frecuentemente se rodea con cubiertas externas (**pared celular**) formada por

* Las palabras en **negrita** se definen en el Glosario.

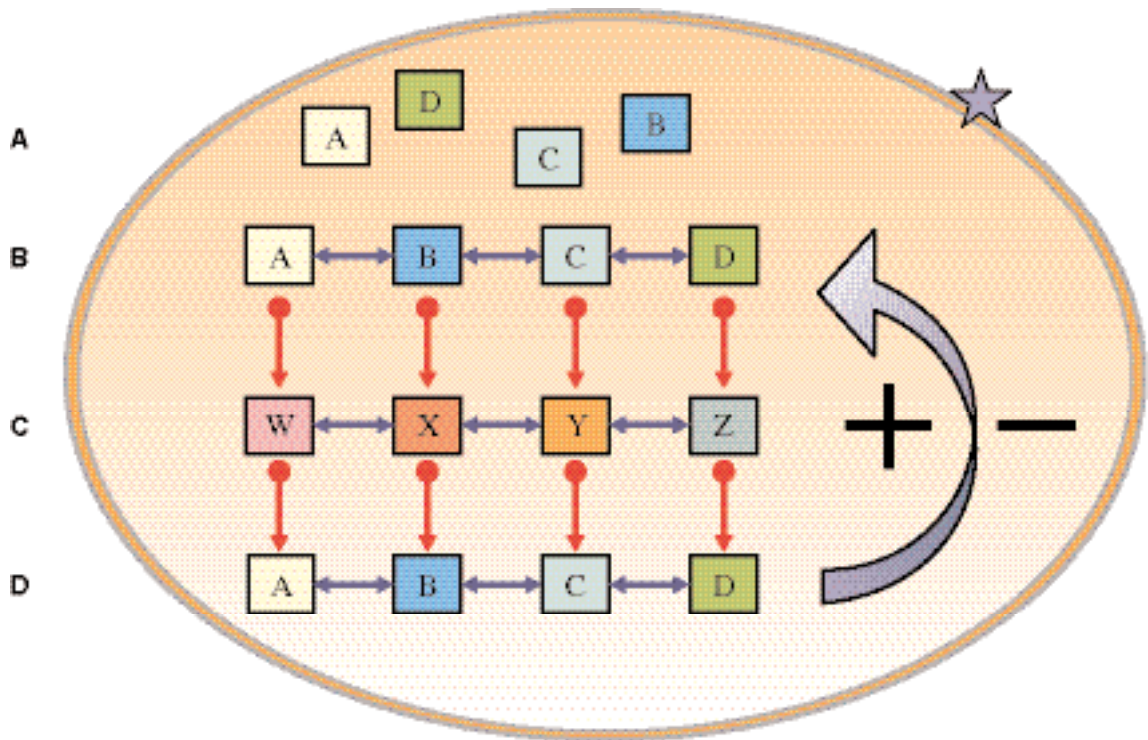


Fig. I-1. Etapas en la evolución hacia la protocélula. **A.** Moléculas orgánicas simples. **B.** Polímero primigenio. **C.** Polímero complementario. **D.** Nuevo polímero. (+) y (-) Efecto favorable o desfavorable sobre el polímero primigenio. ★ Formación del primer compartimiento = protocélula.

diferentes componentes moleculares que cumplen funciones definidas. Sin embargo, la membrana celular rara vez, o transitoriamente, forma prolongaciones o tabicamientos intracelulares (cuadro I-1).

El camino desde la célula procarionte primitiva hasta la **célula eucarionte** significó un enorme incremento de la complejidad (véase cuadro I-1). Sin embargo, esa complejidad podría resumirse en un concepto básico y general: la **compartimentación**. La célula eucarionte –característica de organismos más evolucionados– posee dos compartimientos principales (**núcleo** y **citoplasma**), delimitados por estructuras membranosas, al igual que las numerosas estructuras (**organoides**) localizadas en el compartimiento citoplasmático.

Las enormes diferencias entre bacterias y células eucariontes son notables en cuanto a tamaño, estructura y funciones. Sin embargo, esta diversidad parece enmascarar las numerosas semejanzas entre estos diferentes tipos celulares. Por ejemplo, si observamos la composición química de las bacterias, podremos comprobar que es casi idéntica a la de las células eucariontes y que una de las escasas diferencias es su tamaño (cuadro I-2). Más adelante en este libro se notarán otras semejanzas, diferencias e

interacciones entre las células procariontes y las células eucariontes.

¿Cómo se llegó a tal grado de compartimentación en la célula eucarionte? El simple sentido común nos indica que algo frágil (polímero primitivo o moderno DNA) se preserva mejor si está protegido. Probablemente, la célula primitiva (protocélula o bacteria ancestral) experimentó pequeños cambios a lo largo de **genes**, con resultados favorables o desfavorables que marcaron la evolución de la compartimentación. La célula eucarionte moderna, que alcanzó el nivel más alto de complejidad, seguramente es el resultado de una selección natural que comenzó con la formación y la estabilización de un **compartimiento nuclear** (fig. I-2 A, B). Por el contrario, otras estirpes celulares como las bacterias actuales, protegen su DNA mediante la especialización y el reforzamiento de envolturas de su único compartimiento protoplasmático, pero al costo de mantener una estructura general pequeña, primitiva y rígida. Eventualmente, al producirse una invaginación de la membrana celular, que arrastró y rodeó el DNA, otras porciones de la misma membrana unida a ribosomas formaron el primitivo **retículo endoplasmático** (RE) (fig. I-2 B). Esto explicaría

Cuadro I-1. Características diferenciales entre células procariontes y células eucariontes

Características	Procariontes	Eucariontes
Organismos	Bacterias y cianobacterias	Protistas, hongos, plantas y animales
Tamaño	Pequeño (1-10 µm)	Grande (10-100 µm)
Sistema genético	DNA circular no asociado con proteínas en cromosomas	DNA lineal asociado con proteínas en cromosomas
	Nucleoide sin membrana	Núcleo con membrana
	Poco DNA repetitivo	DNA repetitivo
División celular	Fisión, gemación, no hay mitosis	Varias formas asociadas con mitosis
	Separación de cromosomas por unión a la membrana celular	Separación de cromosomas por arrastre de microtúbulos
Sistema sexual	Transferencia unidireccional de genes de donador a receptor	Fusión de genomas gaméticos asociada con meiosis
RNA y proteínas	Sintetizados en el mismo compartimiento	RNA síntesis/procesado en núcleo Proteínas en citoplasma
Membranas internas	Sólo transitorias	Numerosos tipos y variedades
Metabolismo	Anaeróbico o aeróbico	Aeróbico
Nutrición	Difusión. Algunos fotosintetizadores	Absorción, ingestión, secreción, fotosíntesis. Mecanismos complejos con organoides especializados
Organización celular	Ausente, principalmente unicelulares	Compleja, principalmente multicelulares, con muchas variedades celulares
Motilidad citoplasmática	No posee citoesqueleto	Citoesqueleto y motores moleculares
	Endocitosis y exocitosis ausente	Transporte vesicular Endocitosis y exocitosis
Motilidad global	Flagelos simples en ciertas bacterias	Cilios y flagelos complejos Migración sobre sustrato celular o extracelular

por qué, como veremos las membranas interna y externa de la envoltura nuclear se continúan con la membrana del RE. También existen sólidos criterios moleculares que apoyan la propuesta de que la **mitocondria** se originó de una bacteria aerobia ancestral, al ser internalizada por un eucarionte primitivo, seguido por la adaptación simbiótica que les permitió a ambos tipos celulares obtener ventajas funcionales y evolutivas (fig. I-2 B). El origen del **cloroplasto** de las células vegetales sería similar, pero por simbiosis con una bacteria fotosintética (fig. I-2 C). En ambos casos, se sabe que muchas características moleculares de estos organoides (DNA, RNA, enzimas, etc.) son de “tipo bacteriano”, ambos están envueltos por una doble membrana (la externa derivada de la membrana plasmática) y ambos están fuera del circuito topológico de endomembranas (fig. I-2 D).

COMPARTIMIENTOS Y FUNCIONES: LA MEMBRANA CELULAR

El concepto de compartimentación –básico y fundamental para el conocimiento de la biología celular– visualiza *el citoplasma como un conjunto de espacios con diferente contenido, limitados por distintos tipos de membranas* (fig. I-2 D). Así, todos los organoides están rodeados por una **membrana** (o dos, con menos frecuencia) que delimitan espacios con una organización ultraestructural, composición química, propiedades físicas y funciones características. Muchas de las enzimas que catalizan las funciones celulares se encuentran distribuidas en forma selectiva en los diferentes compartimientos, ya sea en sus componentes membranosos o en los espacios que delimitan. Las membranas, a la vez que separan

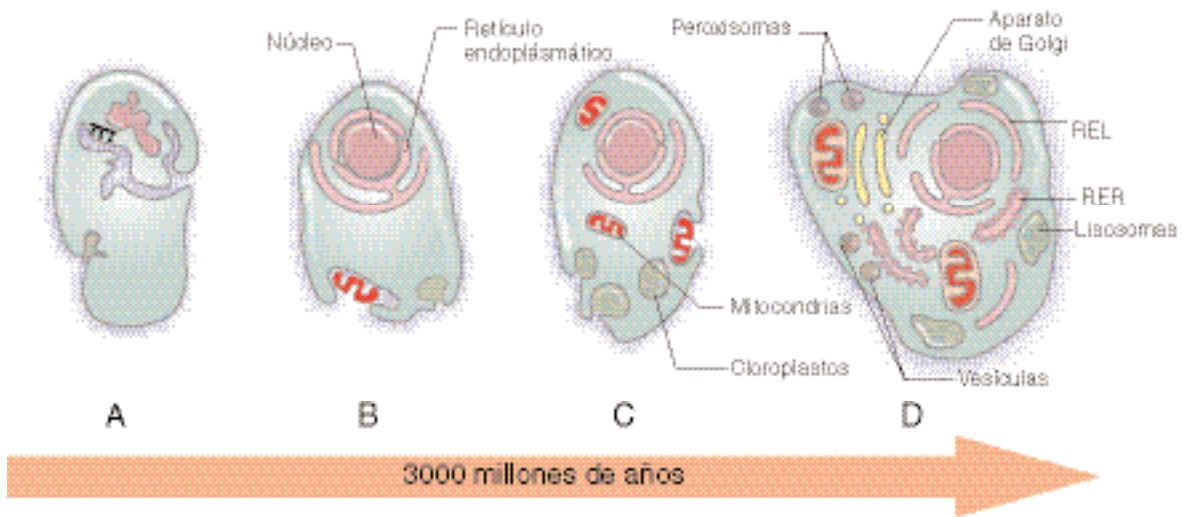


Fig. I-2. Posible evolución de los compartimentos celulares. **A.** Adquisición de envoltura nuclear y retículo endoplasmático. **B.** Mitocondrias. **C.** Cloroplastos. **D.** Endomembranas de un eucarionte actual. REL: retículo endoplasmático liso. RER: retículo endoplasmático rugoso.

medios de composiciones diversas y con frecuencia incompatibles, permiten y regulan la interacción entre los compartimentos. La coordinación de las actividades de la membrana mantiene un funcionamiento eficiente de la célula en tanto reciba el aporte indispensable de nutrientes y oxígeno que asegure las **condiciones homeostáticas** constantes y controladas. Además, el funcionamiento correcto de la célula involucra interacciones con otras células y con el medio extracelular, todo lo cual se realiza a

través de una o más membranas, lo cual determina el estado de salud de la célula y del organismo que integra.

¿Qué estructura posee la membrana que explique el elevado número y variedad de sus funciones? La respuesta, también en este caso, debe referir a la **evolución**, pero esta vez a la “evolución del conocimiento”. A lo largo de muchos decenios resultaba obvio que la célula debía tener una estructura bidimensional que la contuviera. Sin embargo, el mi-

Cuadro I-2. Diferencias en composición química y volumen entre procariontes y eucariontes

Composición química	Bacteria (E. coli)	Célula de mamífero
	% del peso celular	
Agua	70	70
Iones inorgánicos	1	1
Metabolitos pequeños	3	3
Proteínas	15	18
RNA	6	1,1
DNA	1	0,25
Fosfolípidos	2	3
Otros lípidos	1	2
Polisacáridos	2	2
Volumen total	$2 \times 10^{-12} \text{ cm}^3$	$4 \times 10^{-9} \text{ cm}^3$
Volumen relativo	1	2000

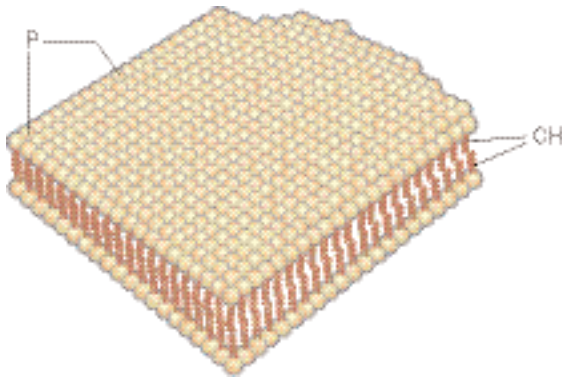


Fig. I-3. La membrana celular según el modelo de Gorter-Grendel, con su doble capa de fosfolípidos orientados con sus cabezas polares (P) hacia el exterior y las cadenas hidrófobas (CH) hacia el interior de la bicapa. (Gorter y Grendel, 1925).

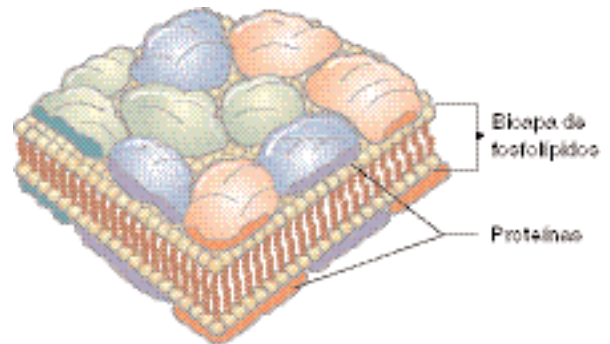


Fig. I-4. La membrana celular según el modelo de Danielli-Davson, con su doble capa de fosfolípidos y las proteínas globulares adsorbidas a sus superficies externa e interna. (Danielli y Davson, 1935).

croscopio utilizado durante muchos años para describir en detalle muchos tipos celulares no permitió visualizarla, por lo que durante largo tiempo el concepto de *membrana celular* permaneció en el ámbito de las intuiciones o las especulaciones. Cuando las herramientas tecnológicas lo permitieron, se avanzó sobre la idea de la composición lipídica de la membrana propuesta por Overton en 1902. Para ello, dos científicos seleccionaron un modelo experimental simple, el eritrocito de mamífero formado esencialmente por una envoltura membranosa y un contenido homogéneo, sin núcleo ni organoides. Luego de eliminar el contenido, analizaron la envoltura del eritrocito, describieron su composición en lípidos y, calculando el espacio que ocupaban, concluyeron que la membrana plasmática estaría formada por una doble capa de lípidos, lo que estableció las bases estructurales de lo que se conoce como el **modelo de Gorter-Grendel** (fig. I-3). Este modelo teórico, basado sobre datos biofísicos y químicos, explicaba parcialmente la permeabilidad de la membrana a las sustancias lipofílicas y la fusión espontánea entre membranas (véase cap. 5, cuadro 5-1), pero no podía explicar muchas otras funciones celulares, para lo cual el modelo resultaba insuficiente.

Durante 25 años, el concepto de membrana no se modificó, a pesar de que sólo explicaba parcialmente el mecanismo de permeabilidad de moléculas liposolubles o hidrófobas, y no podía explicar muchas otras funciones de la membrana celular. Por esta necesidad “funcional”, el modelo debió evolucionar y se propuso el agregado de capas externa e interna de proteínas globulares adheridas (adsorbidas) a la bicapa de fosfolípidos, que conformó el **modelo de Danielli-Davson** (fig. I-4). Esta participación proteica en la membrana, aunque

tampoco explicaba el mecanismo, ayudaba a visualizar mejor el transporte de moléculas hidrófilas y la antigenicidad de la célula (véase cap. 5, cuadro 5-1).

Sin embargo, el concepto de membrana aún no contenía los elementos que permitieran comprender otras funciones y tampoco había acuerdo en la estructura molecular y forma de integración de las capas proteicas con los lípidos de la membrana. En la década de 1950, la estructura de la membrana se visualizó con los primeros microscopios electrónicos como una doble capa **osmiófila** y, sobre una base cuantitativa proporcionada por los datos ultraestructurales, Robertson postuló en 1962 que las proteínas superficiales debían disponerse en forma extendida sobre la superficie lipídica. Esta estructura y la visualización de la bicapa lipídica contribuyeron a consolidar el concepto universal aún vigente de **unidad de membrana**, apoyado en particular por la semejanza estructural entre las membranas artificiales y diferentes tipos de membranas naturales (fig. I-5).

Pasaron casi cuarenta años para que el modelo de la membrana celular ganara nuevos componentes, nueva estructura y mayor dinamismo. Durante esa tercera etapa se hicieron contribuciones trascendentes a la estructura de la membrana que, con ligeras variantes, permanecen hasta la actualidad. Sobre la base de los modelos anteriores se propuso la incorporación de **glucolípidos** y **glucoproteínas** como *parte integral* de la membrana y no adsorbidos como en el modelo anterior. Estas moléculas estarían interaccionando con la región hidrófoba de la bicapa lipídica, exhibiendo su porción glucídica hacia la superficie externa de la célula. Esta última característica permitió también que se reconociera la existencia real del **glucocáliz** como un componente intrín-

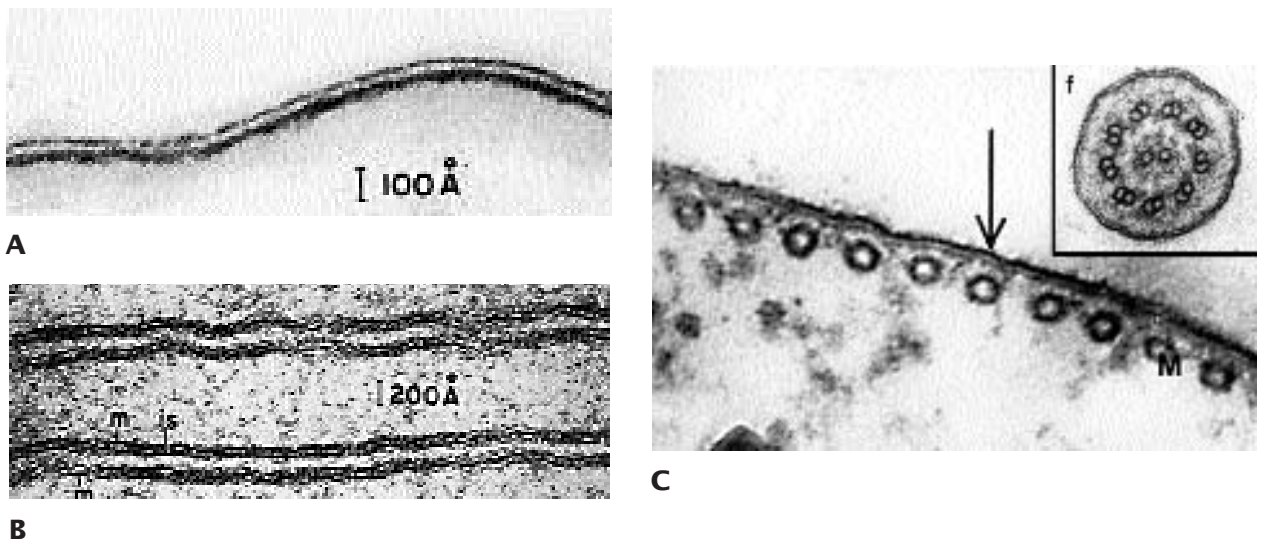


Fig. I-5. A. Micrografía electrónica de membrana artificial formada por el ensamble espontáneo de lípido-proteína-agua. (W. Stoeckenius, tomada de De Robertis et al., fig. 7.7, 1968.) B. Membrana de dos células intestinales contiguas. (Tomada de De Robertis et al., fig. 8.3, 1968.) C. Membrana plasmática del cuerpo (flecha) y corte transversal de flagelo (f) de *Trypanosoma cruzi*. (Rovasio, 1976.)

seco de la superficie celular (véase cap. 5, figs. 5-2, 5-3 y 5-13) y no como un simple “artefacto de técnica” que los microscopistas visualizaban desde hacía varios años.

Además, se agregó al modelo un concepto dinámico que fue muy movilizador en las ciencias biológicas. Se propuso que los diferentes componentes de la membrana tenían capacidad para moverse y realizar diferentes tipos de movimientos moleculares, como girar, bascular entre las superficies externa e interna (*flip-flop*) y desplazarse tangencialmente a lo largo y a lo ancho de la membrana. Se concretaba así el **modelo de Singer-Nicolson** (fig. I-6).

Este concepto de membrana, también denominado **modelo del “mosaico fluido”**, concibe un “mosaico” como zonas más viscosas de la membrana, que se mueven entre áreas más fluidas a la temperatura corporal de cada especie. La integración en este modelo de los componentes estructurales y dinámicos mencionados, en paralelo con los avances tecnológicos y enfoques experimentales que permitieron apoyarlo, contribuyeron a explicar y fundamentar muchas de las funciones celulares para las cuales la participación de la membrana es esencial, como el **flujo de membrana**, el funcionamiento de los **receptores**, el **reconocimiento celular**, la **actividad enzimática superficial**, la **adhesión célula-célula** y la **adhesión célula-sustrato**, la **motilidad celular** en un líquido, la **migración celular** sobre sustratos, los fenómenos de **endocitosis** y **exocitosis**,

los **cambios de forma celular**, la **interacción** y el **reclutamiento de ligandos** (*capping*), muchos **fenómenos inmunes** y de **histocompatibilidad** (véase cap. 5, cuadro 5-1). Paralelamente, permitió determinar la heterogeneidad fisicoquímica entre membranas de diferentes células y entre diferentes **dominios** de una misma membrana, así como la **asimetría** entre los componentes superficiales y citosólicos de una membrana.

NIVELES DE ORGANIZACIÓN CELULAR

Llegar al concepto de que la célula actual es el resultado de un prolongado y complejo mecanismo evolutivo nos permitirá introducirnos en los cinco capítulos de la **Parte I** del libro, en los que trataremos inicialmente algunos métodos e instrumentos para estudiar la célula, para detallar a continuación sus principales estructuras, funciones y productos. Esos conocimientos darán las condiciones adecuadas para entender que los organismos de muchos **metazoarios**, como el ser humano, están formados por un elevado número de células (cerebro = ¡¡¡ 10^{12} células!!!) y que éstas no se disponen al azar, sino que se encuentran distribuidas con distintos grados de complejidad en los diferentes **niveles de organización**.

En la **Parte II** (capítulos 6 a 10) veremos cómo las células se agrupan en diversas **poblaciones celulares**

res y cómo éstas se organizan en estructuras más complejas para formar los **tejidos** (epitelial, nervioso, muscular, etc.). La formación de esos patrones complejos requieren interacciones celulares y moleculares precisas, con lo cual integraremos la **embriogénesis**, como desarrollo progresivo de niveles de organización de complejidad creciente a partir de una sola célula. Y también estudiaremos la **histogénesis**, es decir, la formación de los **tejidos básicos** y sus derivados a lo largo de las **etapas embrionarias** y su mantenimiento en la **etapa adulta**.

Finalmente, en la **Parte III** (capítulos 11 a 15) desarrollaremos un nivel de organización superior al tratar la integración entre los diversos tejidos para formar los **órganos** y la coordinación de éstos en **sistemas**. Este tratamiento, en simultáneo con las etapas embrionario-fetales, permitirá integrar los conocimientos de forma y actividad celular-tisular con su desarrollo a lo largo del tiempo (**complejidad espacio-temporal**).

En resumen, las células, los tejidos, los órganos y los sistemas son parte de los diferentes niveles que se organizan en un organismo vivo a lo largo del tiempo y de cuya equilibrada integración dependen todos los procesos vitales. La manera armónica y coordinada del funcionamiento normal en el estado de salud se considerará en los ejemplos sobre los cambios que se producen en las células y en los tejidos en el estado de enfermedad, cuando su estructura, función o mecanismo de regulación resultan alterados.

EL ESTUDIO DE CÉLULAS Y TEJIDOS, SU RELACIÓN CON OTRAS ÁREAS BIOMÉDICAS

La **biología celular**, la **histología** y la **embriología** son áreas interdisciplinarias que convergen para el estudio de diversos aspectos de la estructura, la función y la regulación de conjuntos celulares integrados y organizados a lo largo del desarrollo de un organismo desde su etapa unicelular hasta su muerte. A su vez, esas disciplinas fundamentan y se involucran en múltiples áreas del conocimiento de las ciencias biomédicas.

La biología celular proporciona las bases estructurales de los cambios químicos y metabólicos estudiados en **química biológica**, así como de las características funcionales correspondientes a la **fisiología**; son numerosos los mecanismos celulares y moleculares –así como las herramientas utilizadas para su estudio– que requieren los fundamentos de la **biofísica**. La histología se relaciona con la **anatomía**, ya que ésta no se integra desde lo fun-

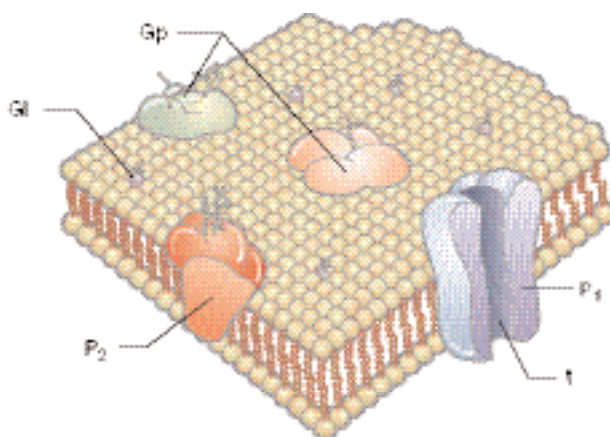


Fig. I-6. La membrana celular según el modelo de Singer-Nicolson, con la doble capa de lípidos y las proteínas integrales que atraviesan total (P_1) o parcialmente (P_2) la membrana. Una de las proteínas integrales forma un canal o túnel (t) que comunica ambas superficies de la membrana. Se indican también los glucolípidos (Gl) y las glucoproteínas (Gp) con sus residuos azúcares hacia el lado externo de la membrana formando el glucocálix. (Singer y Nicolson, 1972)

cional si se desconoce la estructura histológica, así como no se comprende el estudio microscópico de los tejidos y los órganos si no se conoce la anatomía global. Asimismo, el conocimiento de las estructuras y las funciones normales de células y tejidos forma la base y la síntesis integradora del conocimiento para poder encarar el estudio de la **anatomía patológica**. Por otra parte, tanto la biología celular como la histología no sólo están estrechamente relacionadas con la **embriología** y la **biología del desarrollo**, sino que constituyen sus bases conceptuales, ya que todas las estructuras que forman el individuo son producto de complejos procesos de **proliferación**, **crecimiento**, **diferenciación**, **cambio de forma** y **movilización celular**. A su vez, los conocimientos de embriología son fundamentales para un buen desarrollo conceptual de disciplinas como **ginecología**, **obstetricia** y **cardiología**, entre otras. Finalmente, los contenidos y las estrategias de la biología celular, la histología y la embriología en el estado de salud son condicionantes para la adquisición de conocimientos sobre el estado de **enfermedad**, en las áreas de **clínica**, **cirugía** y **patología**, ya que tanto en situaciones normales como patológicas existe una estrecha correlación entre la estructura, la química y la función.

1

Métodos generales para el estudio de las células y los tejidos

Roberto A. Rovasio, Aldo R. Eynard y Mirta A. Valentich

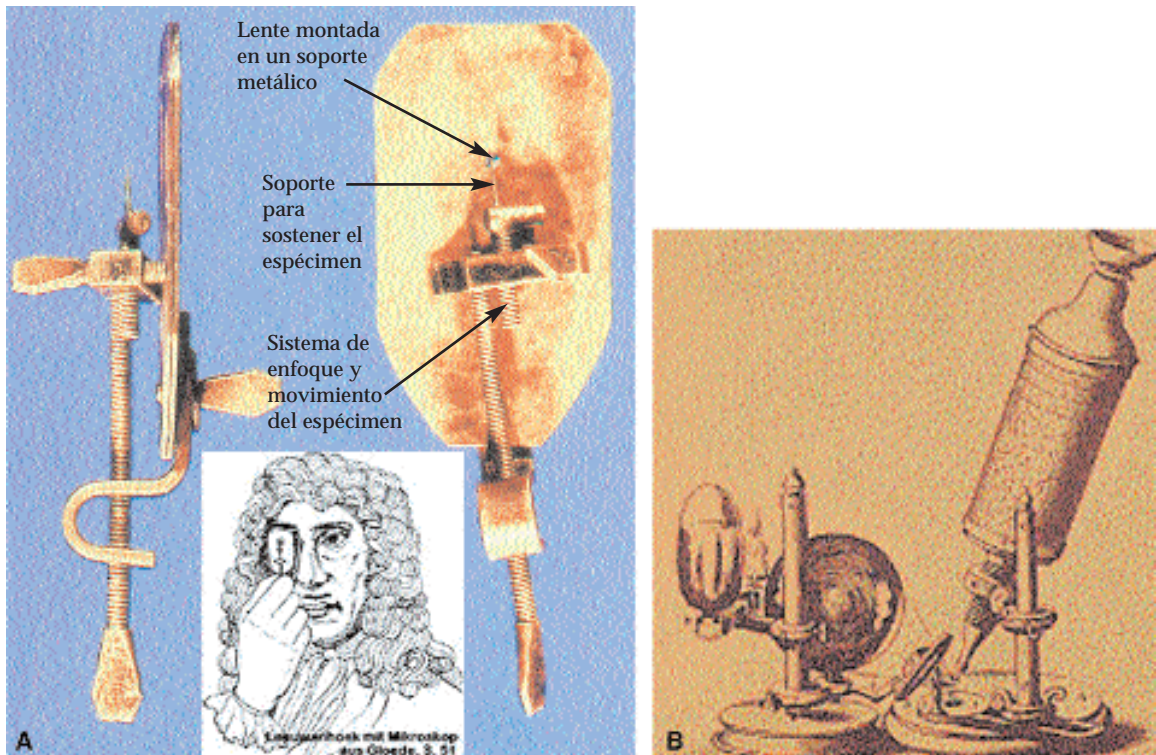


Fig. 1-0. A. Microscopio simple inventado por Antoni van Leeuwenhoek (1632-1723), vista posterior (derecha) y lateral (izquierda), y manera de utilizarlo por el autor (recuadro). B. Microscopio compuesto inventado por Robert Hooke (1635-1703).

Resumen conceptual

El conocimiento de la célula y de los tejidos se inicia en el siglo XVI con la invención de los primeros microscopios, que permitieron cruzar el límite impuesto por la resolución del ojo humano. Durante los primeros años, la observación de pequeños organismos o de partes diminutas de estructuras biológicas mayores estuvo restringida a los objetos tal como podían obtenerse en su estado natural. Posteriormente se desarrollaron métodos para la preservación de los especímenes, para lograr mayores contrastes que permitieran evaluar mejor su estructura y para analizar sus componentes. Ese largo camino, iniciado hace mucho tiempo, se mantiene en la actualidad y traza un paralelismo permanente entre el avance tecnológico y los progresivos descubrimientos científicos.

Aunque los sistemas aplicados para el estudio de células y tejidos son numerosos, los requerimientos básicos que veremos a continuación son: 1) material de estudio preparado en forma adecuada (técnicas citohistológicas) y 2) instrumental para su visualización y estudio (microscopios). En este capítulo se pasará revista a algunos métodos básicos que permiten estudiar la célula y los tejidos animales en su estructura y en diversos aspectos de su composición química y función.

TÉCNICA CITOHISTOLÓGICA Y MICROSCOPIAS

Técnica citohistológica

La **técnica citohistológica** es el conjunto de procedimientos aplicados para preservar la estructura y la organización de células y tejidos, a fin de obtener una **preparación microscópica** que permita su examen con un **microscopio óptico** (MO). Si bien existen técnicas para el estudio de células vivas, en muchos casos es necesario interrumpir los procesos vitales, es decir, matar las células para hacer posible su estudio microscópico. Es muy importante saber que el conjunto de técnicas de preparación indispensables para el estudio de los tejidos normales *es el mismo que se utiliza para el análisis de tejidos patológicos*. Los procedimientos de la técnica citohistológica incluyen una serie de etapas (cuadro 1-1; figs. 1-1 y 1-2):

Observaciones importantes

Toma de la muestra: manipulación delicada para evitar su deformación. La muestra puede obtenerse

de un individuo vivo (**biopsia**) o muerto (**necropsia**).

Fijación: la acción más importante es la desnaturalización de las proteínas, entre ellas las enzimas hidrolíticas que producirían la **autólisis**. Además de los fijadores químicos (con una relación “volumen fijador/volumen muestra” de 40/1), puede utilizarse la **congelación**, sobre todo para el estudio de una **biopsia** durante el acto operatorio.

Deshidratación: el alcohol más utilizado es el etanol en concentraciones crecientes de 70% > 80% > 95% > 100%, durante una hora o más en cada uno de ellos, según el tamaño de la muestra.

Aclaración: en esta etapa intermedia se elimina el alcohol del tejido y éste se impregna con un solvente de la parafina que, además, le otorga transparencia.

Inclusión en parafina: la parafina penetra en los tejidos y desplaza al agente aclarante, durante 5 a 20 horas según la naturaleza y las dimensiones de la muestra. Luego, la muestra se deposita en pequeños recipientes y se deja solidificar.

Preparación del taco: el bloque de parafina con la muestra incluida se pega en un soporte de madera o plástico (**taco**), para poder fijarlo al micró-tomo.

Cuadro 1-1. Etapas de la técnica histológica*

Etapas	Fundamento / Precauciones	Producto / Instrumento
Toma de la muestra	Pequeño tamaño (2-3 mm)	Bisturí, hoja de afeitar
Fijación	Detiene procesos vitales, evita la autólisis	Formol 10%, 12-24 h, vol. 40/1
Deshidratación	Facilita la penetración de solventes	Etanol en graduación ascendente
Aclaración	Favorece la penetración de la parafina	Xilol, benzol
Inclusión en parafina	Otorga dureza para poder realizar cortes	Parafina (45 a 60 °C), estufa
Preparación del taco	Soporte para el montaje en el micró-tomo	Bloque de madera o plástico
Corte	Permite la visualización de estructuras pequeñas	Micró-tomo
Montaje del corte sobre un portaobjetos	Soporte para su observación al microscopio	Portaobjetos
Desparafinación	Facilita la penetración del alcohol	Xilol, benzol
Hidratación	Permite la penetración de colorantes acuosos	Etanol en graduación descendente hasta el agua destilada
Coloración	Otorga colores diferenciales a la muestra	Hematoxilina-eosina
Deshidratación	Facilita el montaje con medios hidró-fobos	Etanol en graduación ascendente
Aclaración	Otorga transparencia a los tejidos	Xilol, benzol
Montaje de cubreobjetos	Permite obtener una preparación permanente	Cubreobjetos + resinas

* La descripción en el cuadro y en el texto se refiere al procesamiento de tejidos sólidos. Para procesar células aisladas, obtenidas *in vivo* o *in vitro*, se modifican algunos procedimientos, manteniéndose los lineamientos generales.

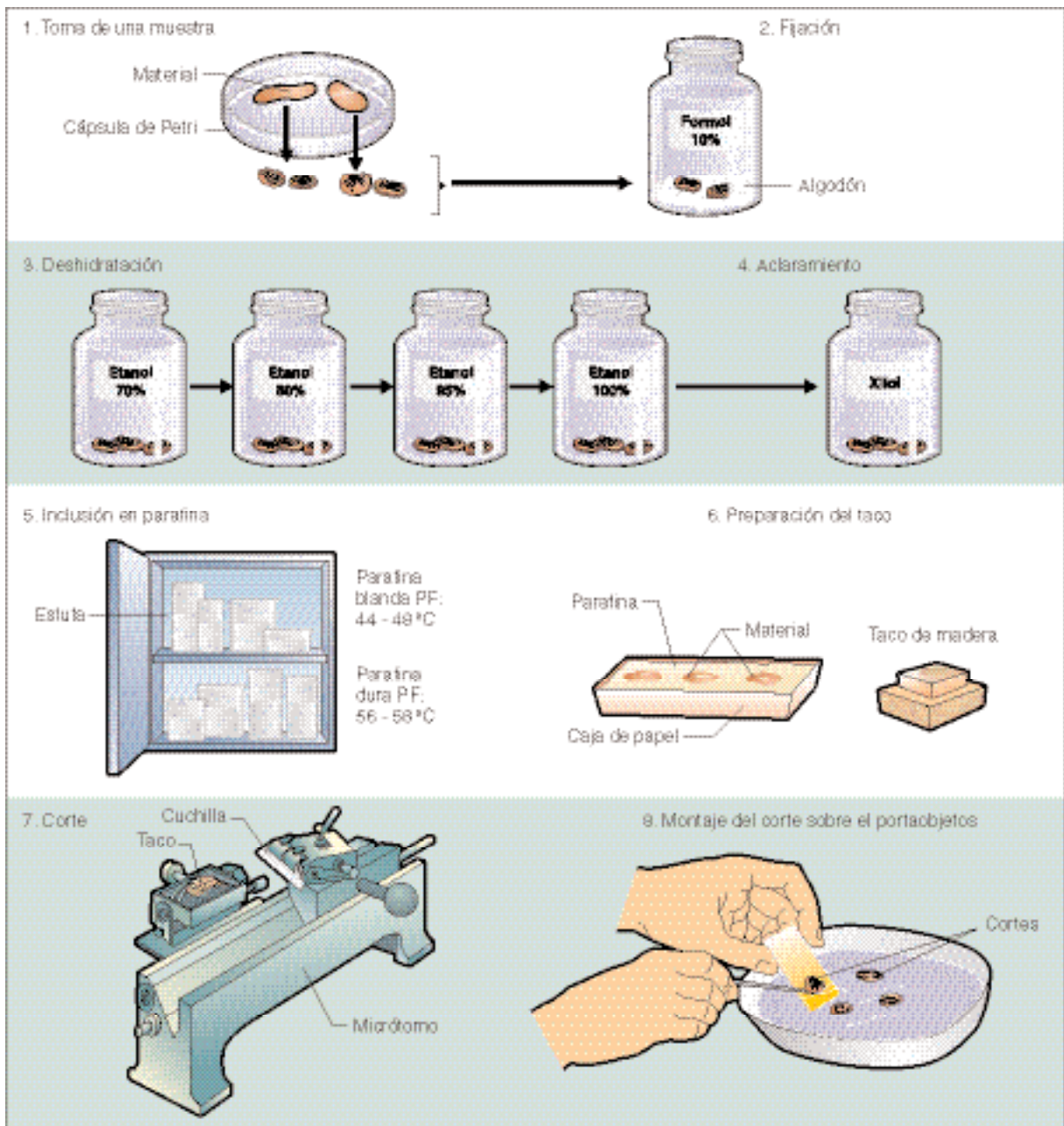


Fig. 1-1. Técnica histológica. Desde la toma de la muestra hasta el montaje del corte.

Corte: se realiza con un instrumento de precisión llamado **micrótopo**, a fin de obtener cortes muy delgados (8-10 μm) y uniformes que permitan visualizar estructuras muy pequeñas. Los tejidos fijados por congelación (véase Fijación) se seccionan mediante un **micrótopo de congelación** o con un **criostato**, instrumentos adecuados para mantener la muestra por debajo de $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Montaje del corte sobre un portaobjetos: los cortes se depositan en la superficie de un recipiente

con agua y luego se montan sobre un **portaobjetos** de vidrio y se dejan secar.

Desparafinación: este paso intermedio es necesario para permitir la penetración del alcohol del paso subsiguiente, ya que los solventes usados son miscibles tanto en parafina como en alcohol.

Hidratación: para permitir la penetración de los colorantes, que en su mayoría están en solución acuosa, la muestra se debe hidratar en soluciones de

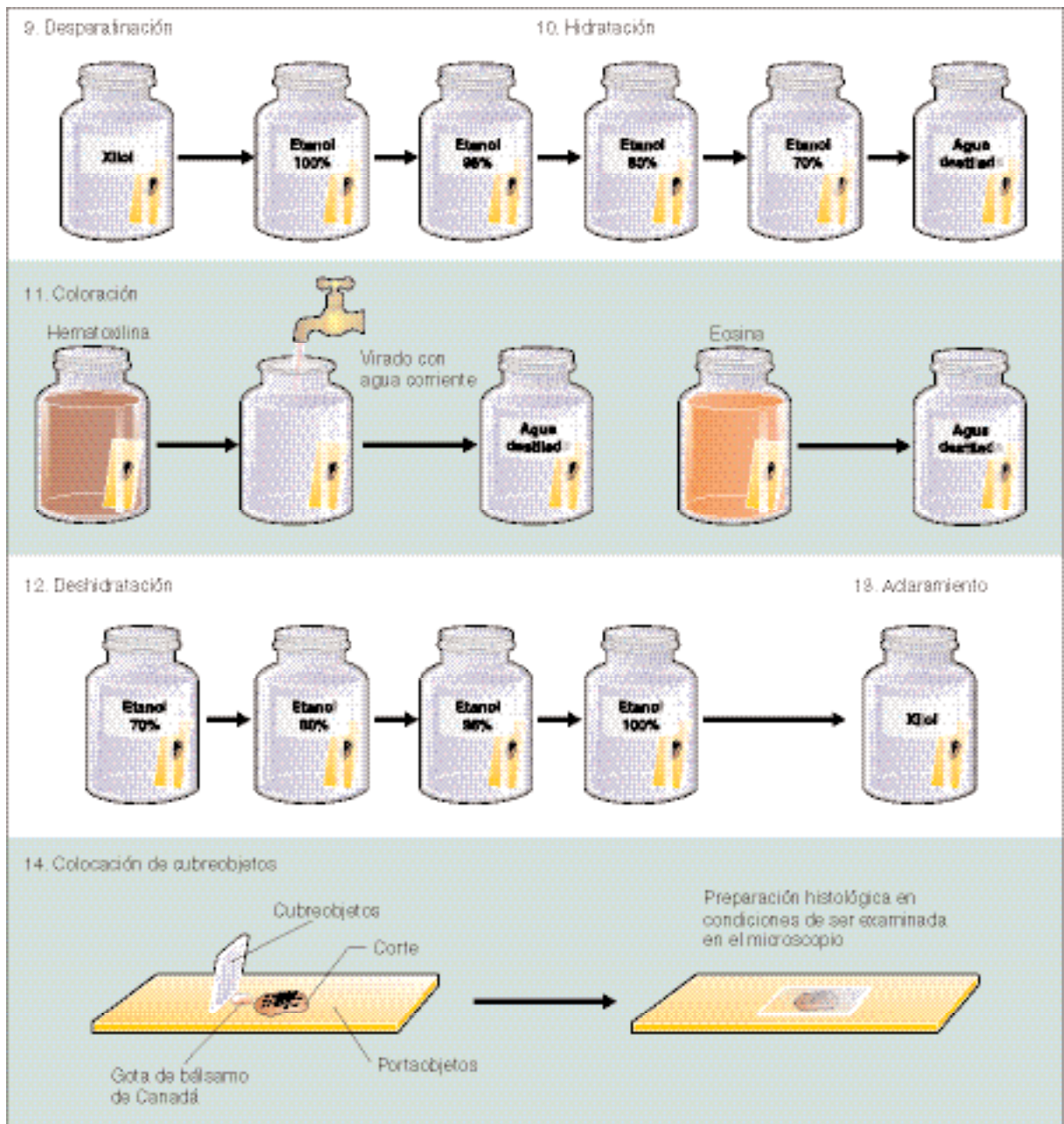


Fig. 1-2. Técnica histológica. Desde la desparafinación hasta la preparación microscópica permanente.

etanol diluidas progresivamente (100% > 95% > 80% > 70%), hasta el lavado final con agua destilada.

Coloración: el uso de **colorantes** es necesario porque el contraste de los tejidos es insuficiente para su observación con un microscopio común. En un colorante hay grupos químicos que le otorgan propiedades iónicas al colorante, los cuales se pueden clasificar en **colorantes básicos (colorantes catiónicos)** por la presencia del grupo amino (-NH₂), por ejemplo, **hematoxilina**, fucsina básica, azul de toluidina, azul de metileno, o **colorantes ácidos (colorantes**

aniónicos) por la presencia del grupo carboxilo (-COOH), por ejemplo, **eosina**.

El método de coloración convencional más utilizado en histología e histopatología se conoce como **hematoxilina-eosina** (fig. 1-3). La hematoxilina es un **colorante nuclear** que se comporta como un colorante básico al teñir los componentes ácidos de los tejidos; por ejemplo, los núcleos celulares, por su contenido en DNA, se observan de color azul-violáceo. La eosina es un **colorante citoplasmático**, ácido, que tiñe los componentes básicos de los tejidos; por ejem-

Cuadro 1-2. Coloraciones empíricas y sus aplicaciones

Coloraciones	Aplicaciones
Hematoxilina de Mayer	Núcleos celulares
Eosina	Citoplasma
Hematoxilina férrica	Núcleo, estriaciones del músculo esquelético
Aldehído fucsina y orceína	Fibras elásticas
Hematoxilina fosfotúngstica	Núcleo, mitocondrias, colágeno
Impregnación argéntica	Aparato de Golgi, neuronas
May Grünwald-Giemsa	Células sanguíneas

plo, el citoplasma celular de distintas tonalidades de rojo. El fundamento de la acción de estos y otros colorantes no se conoce, por lo que se denominan **coloraciones empíricas** (cuadro 1-2; véase fig. 1-3).

Deshidratación: debido a que el medio de montaje no es miscible con el agua, ésta se debe eliminar mediante inmersiones del portaobjetos con el corte histológico en soluciones de etanol de graduación creciente (70% > 80% > 95% > 100%).

Aclaración: los reactivos utilizados (xilol o benzol), además de eliminar el alcohol, facilitan la penetración de la resina del medio de montaje y otorga transparencia al corte de tejido.

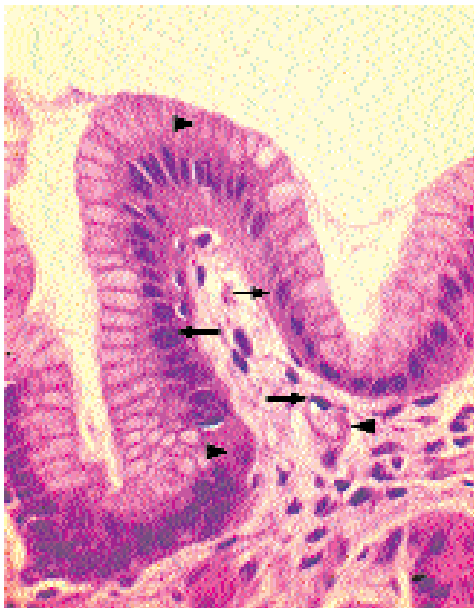


Fig. 1-3. Epitelio cilíndrico simple de la mucosa gástrica. Se observan núcleos teñidos con hematoxilina (flechas) y citoplasma teñido con eosina (cabezas de flecha) (mediante aumento).

Montaje del cubreobjetos: a fin de obtener una preparación permanente, el corte se cubre con un vidrio delgado, adherido con un medio de montaje natural (Bálsamo de Canadá) o sintético.

Artefactos de la técnica

Los **artefactos de la técnica** son alteraciones que se producen por fallas en alguna etapa de la técnica citohistológica y que se reflejan en la preparación microscópica. Defectos en la fijación, la deshidratación y la inclusión pueden ser causas de desgarros y retracciones en los tejidos, que llevan a la aparición de espacios que no tienen existencia real. Asimismo, si la acidez del formol no se neutraliza, pueden aparecer gránulos coloreados por interacción del ácido fórmico con la hemoglobina (**pigmento de formalina**). Durante la sección con el micrótopo pueden aparecer rayas producidas por melladuras de la cuchilla. Si el corte no se extiende perfectamente sobre el portaobjetos, puede haber pliegues y arrugas. Los defectos en la coloración también pueden ser provocados por la calidad y la preparación de las mezclas colorantes o por una fijación insuficiente. Es importante saber discriminar los artefactos de la técnica de las estructuras normales en una preparación microscópica, ya que de lo contrario se puede cometer un error en el diagnóstico o en la conclusión del estudio.

Técnicas citoquímicas

Las **técnicas citoquímicas** proporcionan *información química localizada* sobre la célula o tejido en estudio. Algunas son muy específicas y proporcionan datos cuantitativos, por lo cual permiten obtener resultados analíticos y funcionales más completos que las técnicas empíricas. No son “coloraciones”, sino reacciones fisicoquímicas cuyo producto final es coloreado, con lo cual se identifica y localiza una mo-

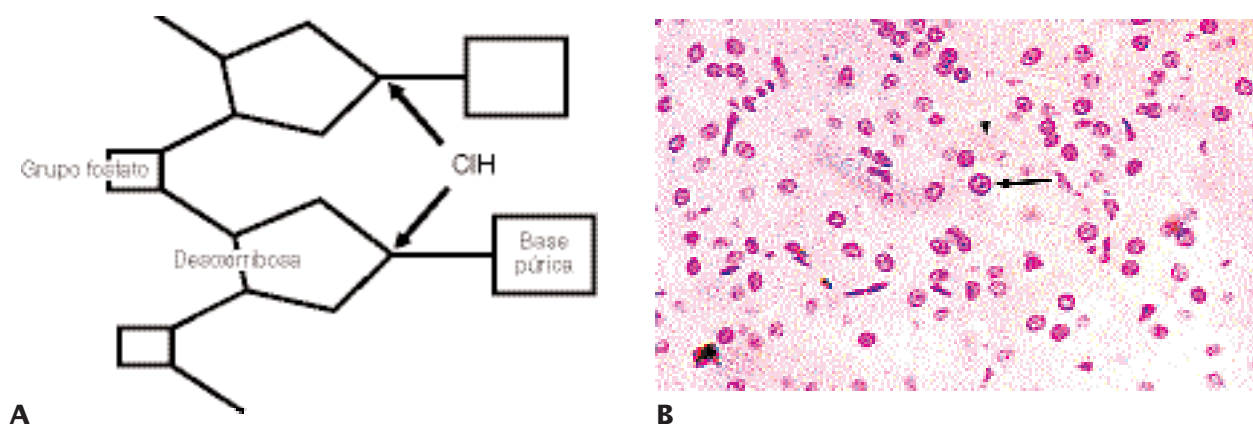


Fig. 1-4. Reacción de Feulgen. **A.** Fundamento, sitios de ataque de la hidrólisis ácida (flecha). **B.** Hígado (mediano aumento). Nótese el DNA de la cromatina nuclear (flecha) y el pequeño puntillado del DNA mitocondrial (cabeza de flecha).

lécula o su actividad en la célula o tejido observado. La interpretación correcta de una técnica citoquímica requiere la realización de **controles** adecuados, que son particulares para cada caso. Los siguientes son algunos ejemplos de este tipo de técnicas.

Reacción de Feulgen

La **reacción de Feulgen** demuestra selectivamente el DNA. Para ello, en un primer paso, la preparación se somete a una hidrólisis con ácido clorhídrico (CIH), la cual produce: 1) separación de las bases púricas del DNA y 2) apertura del anillo desoxirribosa (fig. 1-4), que pasa a una forma molecular abierta y deja grupos aldehídos al descubierto. En el siguiente paso, los aldehídos reaccionan con el **reactivo de Schiff**, que produce un color rojo magenta en las zonas donde se encuentra el DNA. La unión entre aldehídos y reactivo de Schiff es estequiométrica; es decir, el número de moléculas del reactivo unido mantiene una relación constante con la cantidad de DNA. Esto permite realizar la cuantificación del contenido de DNA por medición de la coloración obtenida en preparaciones microscópicas mediante un **microespectrofotómetro**.

El **control negativo** se obtiene al someter preparaciones microscópicas del mismo material en estudio a digestiones previas con desoxirribonucleasa (DNAasa), enzima que degrada selectivamente el DNA y, por lo tanto, la reacción debida al DNA será negativa. El **control positivo** consiste en un corte histológico de cualquier tejido conocido que contenga núcleos celulares (DNA).

Reacción de PAS (periodic acid-Schiff)

Se inicia con una oxidación con ácido peryódico (HIO_4), que reacciona con grupos hidroxilos libres de una hexosa o con grupos adyacentes hidroxilo y amino de una hexosamina, convirtiéndolos en grupos aldehídos con rotura de la unión carbono-carbono (fig. 1-5 A). En un segundo paso, los aldehídos reaccionan con el **reactivo de Schiff** y producen un complejo estable de color rojo magenta en los sitios donde se encuentran los azúcares mencionados (fig. 1-5 B, véase también fig. 1-20B). En las estructuras celulares o extracelulares, la mayor parte de esta reacción corresponde a **glucógeno** y **glucoproteínas**.

Como **control negativo** de la presencia de glucógeno se realiza una preincubación de la preparación con la enzima **amilasa**, que digiere específicamente el glucógeno (véase fig. 1-5 C). Para ello, puede usarse una preparación pura de amilasa, o simplemente saliva cuyo contenido en esta enzima es abundante. En este caso, la reacción de PAS será negativa en los sitios ocupados por el glucógeno, mientras que seguirá siendo positiva en los lugares que contiene glucoproteínas. Como **control negativo** de la presencia de glucoproteínas se realiza una preincubación de la preparación con glucosidasas específicas con el fin de hidrolizar estos carbohidratos complejos. En este caso, los sitios negativos corresponden a los sitios de las glucoproteínas hidrolizadas y los sitios PAS positivos corresponderán a otras clases de glucoproteínas o a glucógeno. Como **control positivo** se utilizan preparaciones microscópicas conocidas por poseer glucógeno (hígado, músculo) o glucoproteínas (membranas basales, glucocáliz, glándulas mucosas).

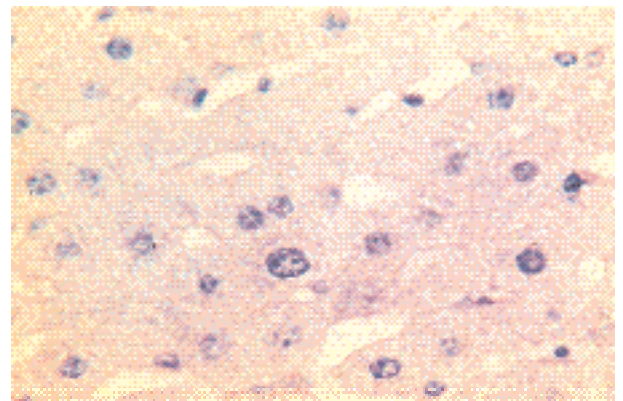
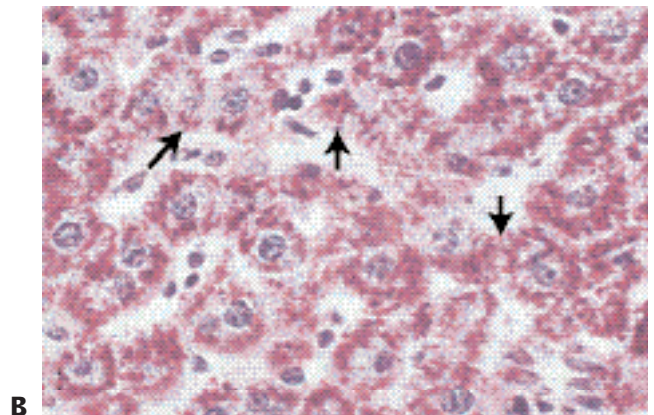
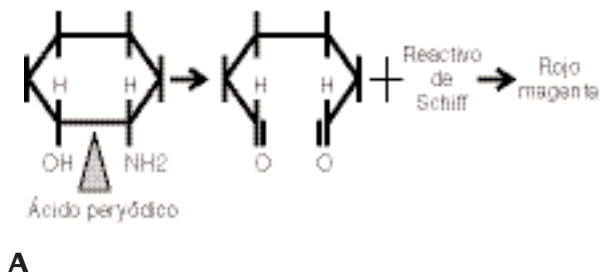


Fig. 1-5. Reacción de PAS. **A.** Fundamento, sitio de la oxidación con HIO_4 (cabeza de flecha). **B.** Hígado (PAS-hematoxilina) (mediano aumento). Nótese los grupos de glucógeno (flecha). **C.** Preparación equivalente digerida previamente con amilasa.

Nota: Obsérvese que el **reactivo de Schiff** es el mismo en la **reacción de Feulgen** y en la **técnica de PAS**, pero el fundamento, los mecanismos de la reacción, la especificidad y los resultados en ambas técnicas son diferentes.

Colorantes metacromáticos

Se denomina **metacromasia** a la tinción de algunos componentes de los tejidos de un color distinto que el del colorante utilizado, en tanto que cuando se tiñen del mismo color recibe el nombre de **ortocromasia**. Ciertos colorantes básicos (catiónicos) tienen propiedades metacromáticas; al colorante metacromático se unen los grupos sulfatos, carboxilos y fosfatos, que están presentes en muchos proteoglucanos, ácidos nucleicos y algunos lípidos.

Determinación de una actividad enzimática

En este caso, se demuestran la presencia y la localización de un compuesto químico mediante su actividad enzimática. Usaremos como ejemplo la **acti-**

vidad de la fosfatasa ácida (fig. 1-6). En una primera etapa, la preparación microscópica se incubó en un medio que contiene el **sustrato** de la **enzima** cuya actividad queremos demostrar (véase fig. 1-6, **glicerofosfato**). En este caso, si la **enzima fosfatasa ácida** está contenida en las estructuras celulares en estudio (**lisosomas**), actúa sobre el sustrato presente en el medio de incubación y lo hidroliza liberando las moléculas de glicerol y de fosfato. Estos últimos quedan localizados en el sitio de la enzima donde se combina con iones plomo o calcio para formar un producto insoluble (fosfato de plomo o de calcio). Éste es incoloro pero puede visualizarse con el microscopio electrónico porque es denso a los electrones. Para poder visualizar el producto de la reacción con el microscopio óptico es necesario continuar la técnica agregando sulfuro de amonio al medio de incubación, lo que produce un precipitado de color pardo (sulfuro de plomo) en el sitio donde está localizada la enzima (véase fig. 1-6).

Se realiza un **control negativo** omitiendo el sustrato en el medio de incubación o introduciendo un inhibidor de la actividad enzimática. El **control positivo** consiste en utilizar preparaciones que son conocidas por poseer actividad de fosfatasa ácida. Por ejemplo, lisosomas de macrófagos, de hígado, etc.

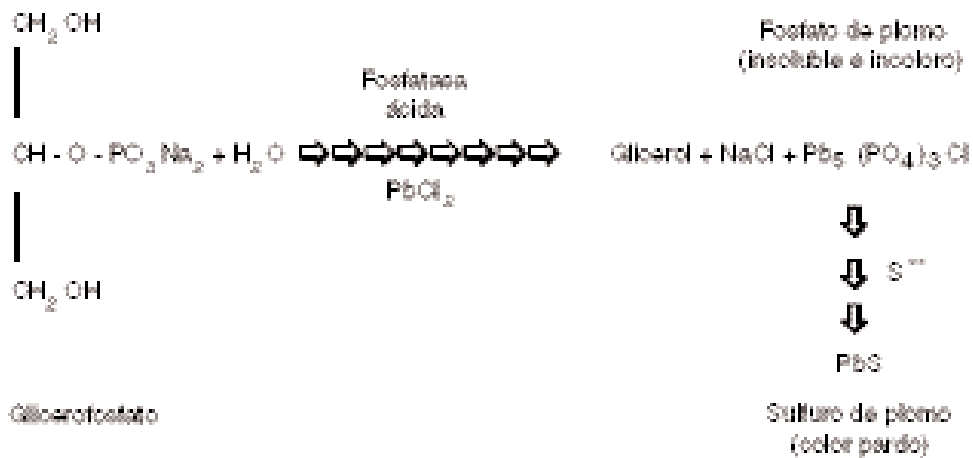


Fig. 1-6. Técnica histoquímica para demostrar la actividad de fosfatasa ácida.

Técnicas inmunocitoquímicas

Los métodos inmunocitoquímicos consisten en la visualización de un componente celular (organoide, macromolécula, etc.) mediante una **reacción antígeno-anticuerpo** (Ag-Ac). En este caso, el elemento en estudio funciona como **antígeno** (Ag), mientras que el **anticuerpo** (Ac) específico se agrega a la preparación donde se une con aquél. A su vez, el anticuerpo debe estar unido a un **marcador** que permita su visualización mediante algún sistema óptico (fig. 1-7). Sobre células y tejidos, los marcadores más comunes son **colorantes fluorescentes**, **enzimas** o **partículas electrondensas** y su elección depende del tipo y procesamiento del material, de la finalidad del estudio y de su observación con microscopio óptico o con microscopio electrónico (véase fig. 1-7).

La unión entre antígeno y anticuerpo (**unión epítope-paratope**) se realiza mediante enlaces no covalentes relativamente débiles. Esta característica y la gran especificidad del anticuerpo por su antígeno hacen de este mecanismo una herramienta muy poderosa en biología celular, ya que permite identificar y localizar moléculas presentes en las células y los tejidos usando los anticuerpos correspondientes marcados adecuadamente. [Se recomienda estudiar los conceptos inmunológicos básicos (véase cap. 8) a fin de comprender mejor los fundamentos metodológicos de estas técnicas.]

Técnica inmunocitoquímica directa

En este caso, el **anticuerpo primario** (que se une al antígeno) está marcado y los marcadores usados se

pueden visualizar con microscopía óptica o electrónica (fig. 1-7 A). No es una técnica muy utilizada, ya que requiere que cada tipo de anticuerpo esté unido a un marcador en forma directa y permanente. Esta técnica fue reemplazada por las técnicas indirectas, que permiten utilizar el mismo anticuerpo secundario (marcado) para visualizar muchas clases de anticuerpos primarios, lo que también facilita el incremento de la marcación (véase el siguiente apartado).

Técnicas inmunocitoquímicas indirectas

En este tipo de reacción, el **anticuerpo primario** no está marcado. En consecuencia, para poder visualizar la reacción, se utiliza un **anticuerpo secundario**, que es un **anticuerpo anti-anticuerpo** (anti-inmunoglobulina), que está marcado y permite visualizar el complejo Ag-Ac-Ac (véase fig. 1-7 B).

Diferencias entre técnica directa y técnicas indirectas

Para que un Ac reconozca y se “pegue” a un Ag, ambos deben pertenecer a especies animales diferentes. Por ejemplo, en el caso de la **técnica directa**, si queremos detectar un Ag presente en eritrocitos de ratón, tendremos que usar un “**Ac de conejo, anti-eritrocito de ratón, marcado**”. En el caso de la **técnica indirecta** podremos usar el mismo sistema sin marcador (“**Ac de conejo, anti-eritrocito de ratón**”) y, posteriormente, agregar un “**Ac secundario de cabra, anti-inmunoglobulina de conejo, marcado**”. El

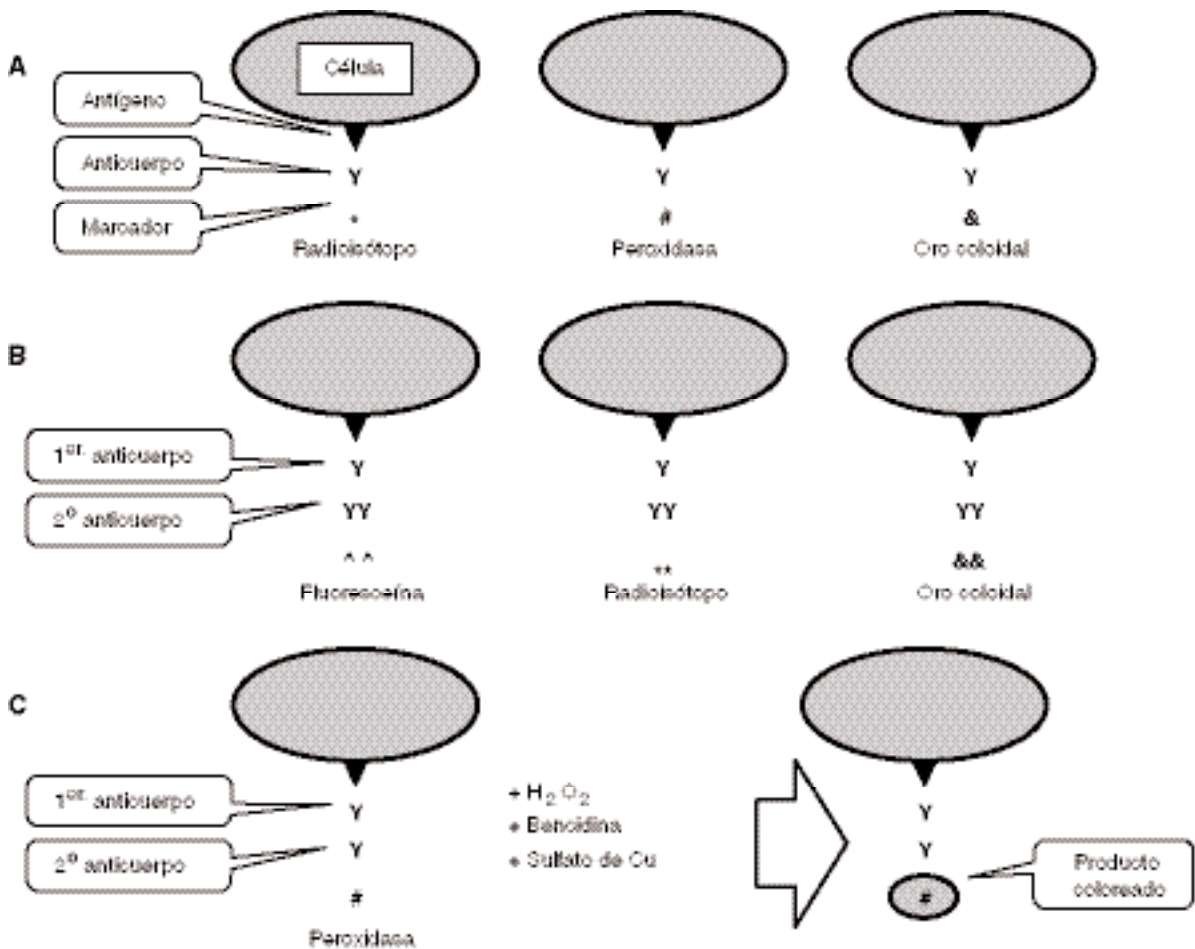


Fig. 1-7. Esquema de los métodos inmunocitoquímicos directos (A) e indirectos (B y C).

uso de un Ac secundario en las técnicas indirectas tiene varias ventajas. Por una parte, permite utilizar el mismo Ac secundario marcado, independientemente de la especificidad del Ac primario utilizado, ya que la especificidad está determinada por el Ac primario. Por otra parte, la introducción del Ac secundario marcado aumenta la sensibilidad del método, ya que pueden unirse más moléculas marcadas por cada molécula de Ag (compárense A y B de la fig. 1-7).

En la figura 1-7 B se esquematiza el revelado del complejo Ag-Ac primario mediante Ac secundarios marcados con colorantes fluorescentes, radioisótopos y oro coloidal. En los métodos de revelado que utilizan enzimas como marcadores (véase fig. 1-7 C, *peroxidasa*) es necesario adicionar al medio de incubación el sustrato de la enzima utilizada (véase fig. 1-7 C, H_2O_2), cuya actividad generalmente se manifiesta por la formación de un producto coloreado (véase fig. 1-7 C, *sulfato de cobre*).

Un método inmunocitoquímico indirecto muy

sensible es el llamado **peroxidasa-antiperoxidasa** (PAP) (véase fig. 1-8). Consiste en incubar el material antigénico con un Ac primario específico, luego con un Ac secundario (véase fig. 1-8, *punte*) y después con un Ac terciario marcado con el **complejo PAP**, seguido del revelado de la enzima. Debido a que el Ac secundario actúa como puente entre el Ac primario y el terciario, es necesario que ambos, primario y terciario, se obtengan de la misma especie animal. Por ejemplo, para detectar moléculas de miosina (proteína muscular) en músculo de ratón podremos utilizar un Ac primario de conejo antimiosina de ratón, luego un Ac secundario de cabra antiinmunoglobulina de conejo y, por último, un Ac terciario de conejo marcado con el complejo PAP (véase fig. 1-8).

En la aplicación de las técnicas de inmunomarcación existen dos tipos principales de problemas:

- 1) La **sobremarcación**, que consiste en una coloración de fondo difusa (*background*) o de precipi-

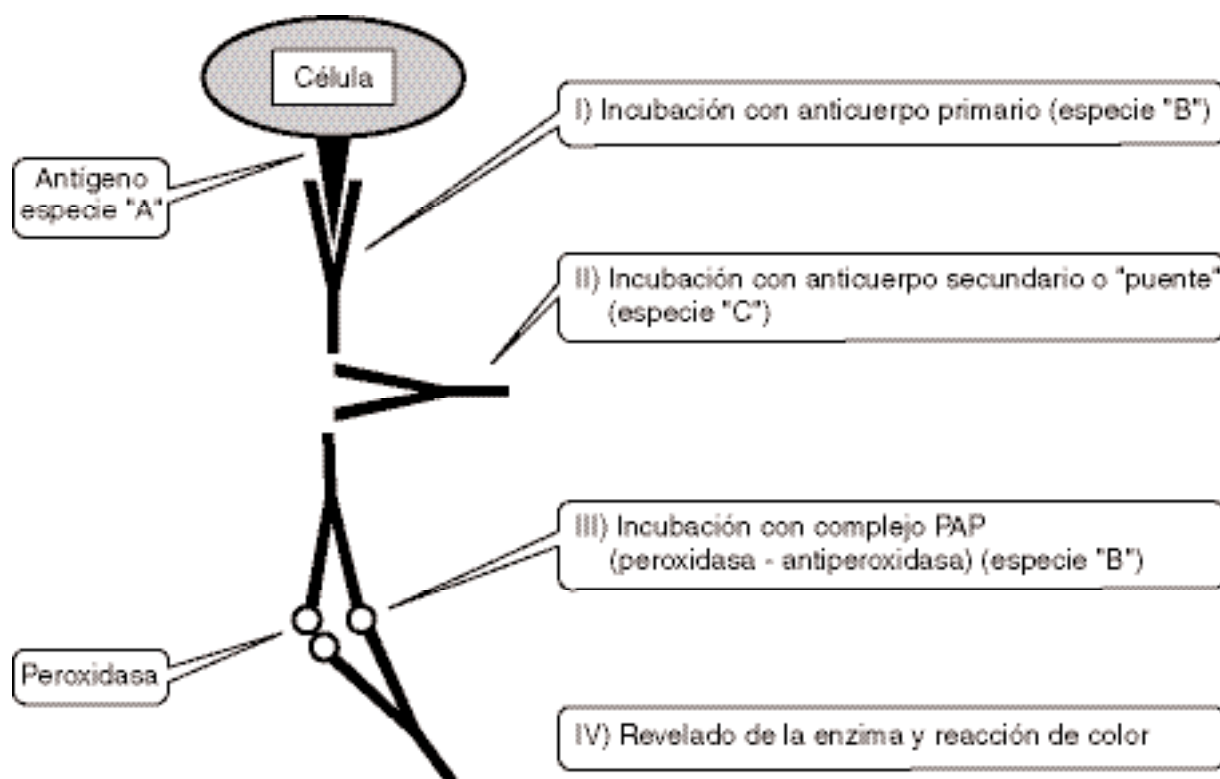


Fig. 1-8. Esquema de un método inmunocitoquímico indirecto y marcación con el complejo "peroxidasa-antiperoxidasa" (PAP).

tado del marcador localizado fuera del sitio normal del antígeno que debemos visualizar. Este tipo de problema dificulta la interpretación de la inmunomarcación y puede estar provocado por la falta de especificidad del Ac primario o secundario, o por la movilización del Ag por fijación deficiente, o por solubilización del Ag, o por reacción cruzada con otras moléculas antigénicas que comparten epítopes similares.

- 2) La **submarcación**, que es la marcación escasa o ausente del Ag en tejidos en los cuales se conoce su presencia. La causa, en general, es la destrucción del Ag por un tratamiento indebido, o por fijación inadecuada, o utilización de concentraciones bajas del Ac, o tiempos de incubación o temperatura inadecuados. Para reconocer y solucionar estos inconvenientes deben realizarse controles adecuados y variaciones de las técnicas, que son particulares para cada caso en estudio y cuyo detalle excede los alcances de este libro.

La elección entre diferentes métodos inmunocitoquímicos depende de muchos factores, como el ti-

po de Ag en estudio (mayor o menor labilidad frente a fijadores histológicos, ubicación dentro de la estructura en estudio, etc.), del equipamiento que se ha de utilizar (microscopía óptica, de fluorescencia, electrónica, etc.), de la disponibilidad de reactivos, etc. Asimismo, el método seleccionado será directamente dependiente del trabajo o investigación que se desea realizar, por ejemplo, la determinación de la **proliferación celular** (fig. 1-9). En el cuadro 1-3 se señalan las ventajas y los inconvenientes de algunos métodos de inmunomarcación.

Por otra parte, existen métodos de fluorescencia que no utilizan anticuerpos marcados con fluorocromos, sino moléculas que adquieren fluorescencia bajo alguna condición biológica, química o física. Por ejemplo, un método para evaluar la **viabilidad celular** se basa en la determinación simultánea de células vivas y muertas mediante marcadores que reconocen dos parámetros de viabilidad celular: 1) la actividad de esterasa intracelular con el reactivo calceína AM y 2) la integridad de la membrana celular con el reactivo etidio H-1. La calceína AM, que no es fluorescen-

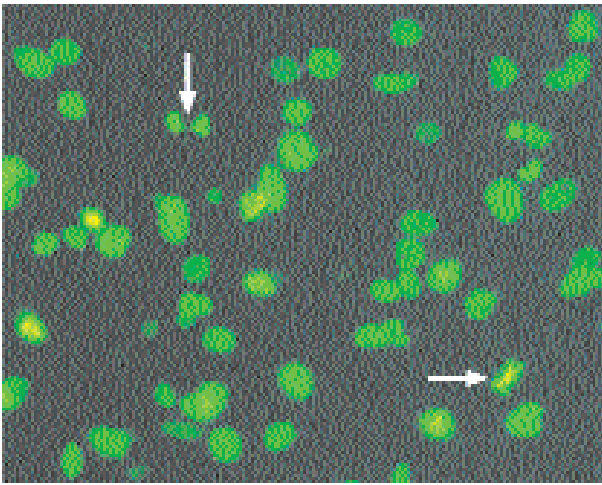


Fig. 1-9. Cultivo celular con un método inmunocitoquímico para evaluar la proliferación celular. Se incubó el cultivo con bromodesoxiuridina (BrdU), un análogo de la uridina que se incorpora al DNA durante la división celular y luego se demuestra su incorporación mediante un anticuerpo primario anti-BrdU y un anticuerpo secundario marcado con un fluorocromo (fluoresceína = verde). Se determina la proporción de células en proliferación mediante la expresión “células marcadas/total de células”. Se observan figuras de mitosis (flechas).

te, penetra en células vivas y es convertida, por la actividad de la esterasa mitocondrial, en el colorante polianiónico calceína, que es retenido por las células vivas y fluoresce intensamente en color verde (véase fig. 1-10). Por su parte, el etidio H-1 no penetra la membrana plasmática de células vivas, pero penetra

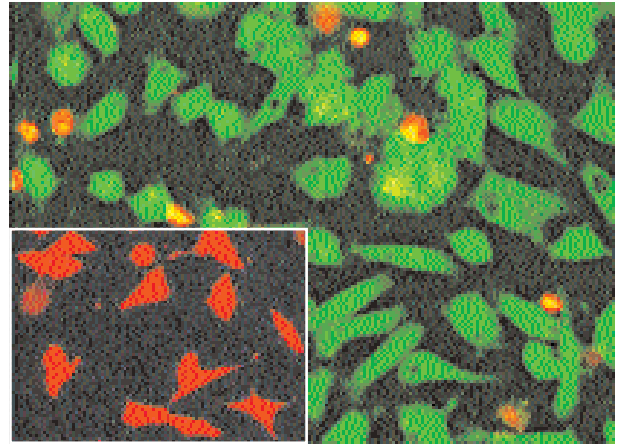


Fig. 1-10. Cultivo celular con un método de fluorescencia para evaluar la viabilidad celular. Pueden observarse células vivas (verdes) y muertas (rojas) luego del método de calceína-etidio. Un control positivo (recuadro) muestra todas células muertas luego del tratamiento con un tóxico.

la membrana dañada de las células muertas y aumenta 40 veces su fluorescencia al unirse con los ácidos nucleicos, con una señal fluorescente de color rojo (fig. 1-10).

Microscopias

Microscopio óptico

El **microscopio óptico (MO)** (**microscopio de luz visible**, **microscopio fotónico** o **microscopio de campo claro**) está compuesto por un estativo o par-

Cuadro 1-3. Ventajas y desventajas de algunos métodos de inmunomarcación

Inmunofluorescencia	Inmunoperoxidasa	Inmunorradiografía
Sensibilidad buena	Sensibilidad buena	Sensibilidad muy buena
Se aplica usualmente en tejidos frescos o fijados y congelados	Puede aplicarse sobre tejidos incluidos en parafina	Se aplica sobre tejidos frescos o incluidos en parafina o resina
Buena conservación de la morfología	Excelente conservación de la morfología	Excelente conservación de la morfología
Lábil conservación de la marcación	Conservación indefinida de la marcación	Conservación indefinida de la marcación
Utiliza microscopía de fluorescencia	Utiliza microscopía óptica convencional	Utiliza microscopía óptica convencional
Buena definición de Ag extracelulares e intracelulares	Mala localización de Ag extracelulares y buena de Ag intracelulares	Buena localización de Ag extracelulares e intracelulares

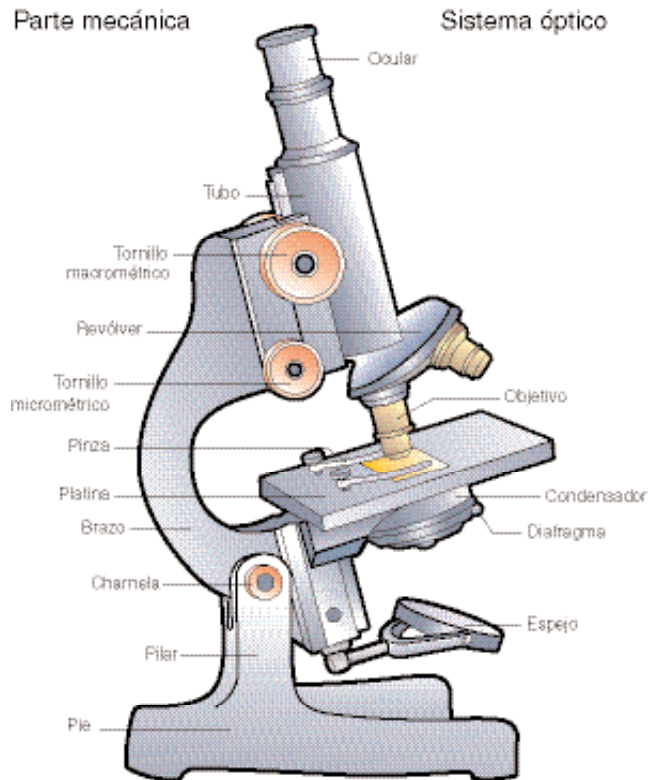


Fig. 1-11. Esquema de un microscopio óptico común.

te mecánica (fig. 1-11, lado izquierdo) y por un sistema óptico (fig. 1-11, lado derecho).

A través del sistema óptico se refractan los rayos luminosos provenientes del objeto en estudio para proporcionar una *imagen final de mayor tamaño, invertida y virtual* (fig. 1-12). Para lograr este resultado, el objeto en estudio debe ser transparente y poseer contraste para poder discriminar sus distintos componentes. Como mencionamos en el apartado **Técnica citohistológica**, la transparencia se logra en parte con cortes muy delgados del material en estudio (figs. 1-3 a 1-5) o mediante el estudio de “extendidos celulares” o bien con cultivos de células aisladas (figs. 1-9, 1-10 y 1-15). El contraste adecuado se alcanza por medio de diferentes tipos de coloraciones o mediante sistemas ópticos particulares (fig. 1-15) (p. ej., microscopio de contraste de fase o microscopio de interferencia).

Los siguientes conceptos referidos a un sistema óptico son muy importantes para conocer el funcionamiento y el uso correcto del microscopio.

Poder de resolución

El **poder de resolución** (PR) es la capacidad pa-

ra distinguir los más finos detalles de las estructuras en estudio; o sea, dar imágenes distintas (separadas) de dos puntos situados muy cerca entre sí en el objeto de estudio. Esta característica depende de la **longitud de onda** de la radiación utilizada (λ) y de la **abertura numérica** (AN) de la lente. Esta última depende a su vez del **índice de refracción** del medio que atraviesa la radiación (η) y del seno del semiángulo de apertura de la lente (α) (cuadro 1-4).

$$AN = \eta \times \text{sen } \alpha$$

Se denomina **ángulo de apertura** al limitado por los rayos más periféricos del cono de luz que penetra en una lente.

El PR es directamente proporcional a la AN. Así, un objetivo con mayor AN tendrá mayor PR que un objetivo con menor AN.

El PR es inversamente proporcional a la longitud de onda (λ). Si utilizamos una fuente de radiación con una longitud corta (p. ej., luz ultravioleta o electrones), el PR será mayor (véase fundamentos del microscopio electrónico, más adelante).

Límite de resolución

Esta propiedad deriva del concepto anterior. El **límite de resolución** (LR) es la distancia mínima que separa dos puntos para poder ser discriminados como tales (o el objeto más pequeño que puede ser visualizado). Es la inversa del poder de resolución y depende principalmente de la longitud de onda (λ) utilizada.

$$\text{LR} = \frac{0,61 \times \lambda}{\text{AN}}$$

El LR para:

- el ojo humano = 0,1 mm
- el microscopio óptico = 0,2 μm
- el microscopio electrónico = 2 a 10 Å .

En general, un tipo de luz no puede emplearse para resolver estructuras más pequeñas que su propia longitud de onda. Así, el LR del MO está dado por la longitud de onda de la luz visible, que va desde 400 nm (violeta) hasta 700 nm (rojo). En términos prácticos, una bacteria y una mitocondria son los objetos más pequeños que pueden ser visualizados claramente en este tipo de microscopio (fig. 1-13).

Poder de penetración

Es el que permite observar diferentes planos de la preparación en una misma posición del enfoque. Es inversamente proporcional a la AN y a la magnificación de la lente.

Poder de definición

Es la capacidad de dar imágenes claras de contornos nítidos.

Distancia focal

Es la distancia entre el centro óptico de una lente y el foco donde se reúnen todos los rayos luminosos que la atraviesan.

Distancia frontal

Es la distancia entre la preparación microscópica y la lente inferior del objetivo. *Nota:* Debe recordarse que en los objetivos de inmersión, esta distancia es de apenas 0,1 mm. ¡precaución, al hacer en enfoque a mayor aumento! (véase fig. 1-12).

Objetivos secos

Son objetivos que se utilizan con interposición de aire entre la preparación y el objetivo (3 \times , 10 \times , 20 \times , 40 \times). ¡Precaución! ¡No usar aceite de inmersión!

Objetivos de inmersión

Son objetivos que se utilizan interponiendo una delgada capa de aceite entre la preparación y el objetivo (40 \times , 60 \times , 100 \times). Tienen el propósito de lograr un mayor aprovechamiento de los rayos luminosos periféricos. *Nota:* Debe recordarse que en los objetivos de inmersión, esta distancia es de apenas 0,1 mm. ¡Precaución al hacer en enfoque a mayor aumento! (véase fig. 1-12).

Magnificación o aumentos

Se calcula multiplicando los aumentos correspondientes a los sistemas ópticos empleados (ocular \times objetivo). Es directamente proporcional a la AN, aunque no es necesariamente proporcional al PR (cuadro 1-5).

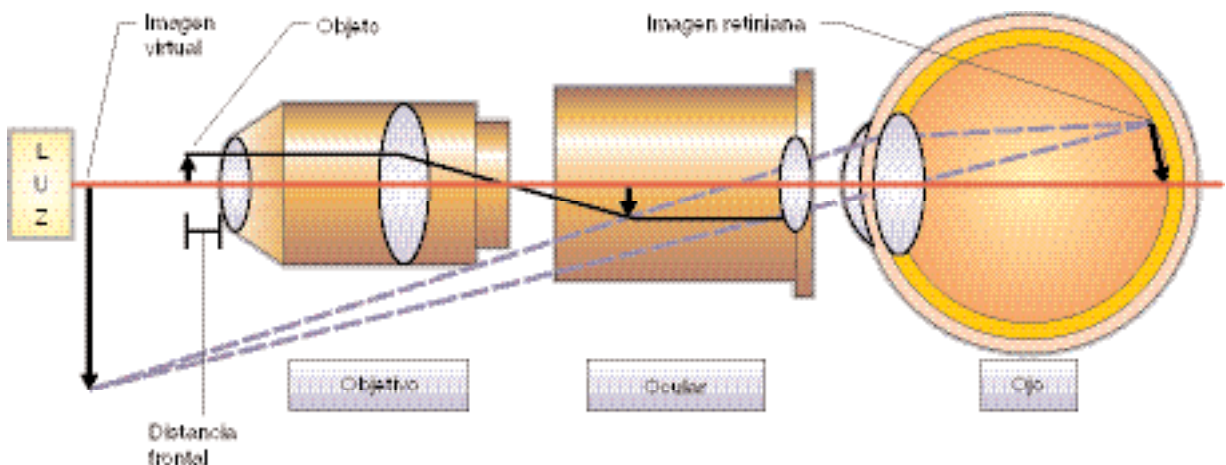


Fig. 1-12. Formación de la imagen en el microscopio y en la retina del observador.

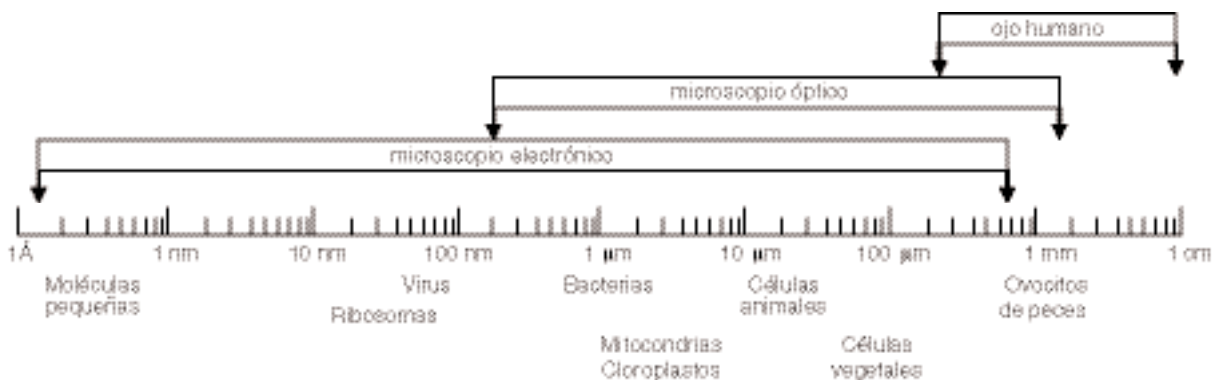
Cuadro 1-4. Valores para el cálculo del poder de resolución

Valor máximo del seno de α	= 0,1
Valor máximo del índice de refracción	= 1,6
Longitud de onda (λ) de la radiación:	
infrarroja	≥ 700 nm
roja	= 700 nm
anaranjada	= 610 nm
amarilla	= 565 nm
blanca	= 550 nm
verde	= 515 nm
azul	= 463 nm
índigo	= 428 nm
violeta	= 400 nm
ultravioleta	≤ 400 nm
rayos X	= 1 nm
electrones	= 0,005 nm

El MO es adecuado para estudiar células y tejidos previamente fijados y coloreados. Como ya vimos, la coloración de las preparaciones citohistológicas tiene por objeto provocar la absorción diferencial de la luz, con el propósito de visualizar las diversas estructuras con colores distintos. Esa diferente capacidad de absorción produce modificaciones en la amplitud (intensidad) de la onda luminosa (fig.1-14 A-C). Cuanto más absorbente sea el material en estudio, menor será la amplitud (intensidad) de la onda luminosa que lo atraviesa y la resultante será la visualización de colores diferentes.

Por otra parte, para estudiar células u organismos vivos, a los cuales no es posible colorear, es necesario recurrir a otros sistemas ópticos, como el **microscopio de contraste de fase** o el **microscopio de interferencia**. En estos casos, se aprovecha una característica propia de los diferentes componentes

celulares que, aun siendo transparentes a la luz, poseen distintas densidades relativas; es decir, diferente concentración de materia por unidad de volumen. Así, los materiales que tienen distintos índices de refracción permiten diferentes velocidades de las ondas de luz que los atraviesan (véase fig. 1-14 A, B, D-G). Cuanto mayor es la densidad de una estructura, mayor es su índice de refracción y menor la velocidad de la luz que la atraviesa; es decir, las ondas de luz se retardan y cambian de fase. Con el MO común no es posible discriminar pequeñas diferencias en los índices de refracción o absorción en las estructuras celulares no coloreadas. En cambio, los MO de contraste de fase y de interferencia están diseñados para utilizar las características ópticas mencionadas y traducirlas en imágenes con grados visibles y diferenciales de contraste y brillo (fig. 1-15).

**Fig. 1-13.** Escala y tamaño de objetos que pueden visualizarse con diferentes ópticas.

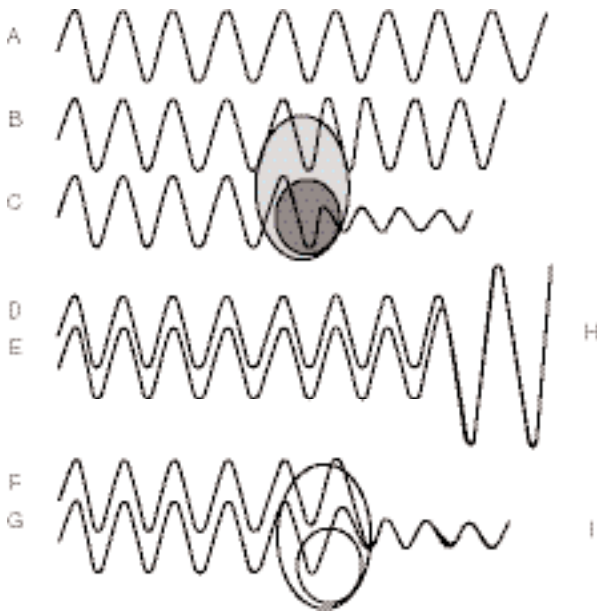


Fig. 1-14. Esquema del paso de ondas luminosas a través de una célula coloreada (A, B, C) y una célula no coloreada (F, G). Se señalan ondas luminosas que atraviesan: 1) medios homogéneos (A, D, E); 2) medios con mayor índice de refracción y no absorbentes (= retardo de fase) (B, F, G) y 3) medio con mayor índice de refracción y absorbente (= retardo de fase y disminución de la amplitud o intensidad) (C). Cuando colisionan ondas que están en la misma fase (D y E) se produce una “interferencia constructiva” con aumento de intensidad luminosa (D + E = H). Por el contrario, si las ondas están desfasadas, se produce una “interferencia destructiva” con disminución de la intensidad (F + G = I) y ésta es la base del principio de la microscopía de contraste de fase.

Microscopio de contraste de fase

Es un MO de luz visible que posee diafragmas anulares en los sistemas ópticos del **objetivo** (fig. 1-16 a) y del **condensador** (véase fig. 1-16 b) que modifican (aceleran o retardan) los rayos luminosos periféricos con respecto a los centrales que atraviesan el objeto (véase fig. 1-16). La imagen final recibida por el ocular (véase fig. 1-16 c) depende del efecto de interferencia entre la imagen directa dada por los rayos centrales (no modificados) (véase fig. 1-16 A) y la imagen proporcionada por los rayos más periféricos (acelerados o retrasados) (véase fig. 1-16 B). Si ambos conjuntos de rayos luminosos están *en fase*, se suman y el objeto aparece más brillante que el medio que lo rodea (véase fig. 1-14 D + E = H); pero si ambos rayos están *fuera de fase*, las ondas se anulan y el objeto se verá más oscuro (véase fig. 1-14 F + G = I). Las variaciones entre estas situa-

ciones extremas proporciona una imagen final con una gama de grises (distintas intensidades), que refleja las diferentes densidades e índices de refracción de la preparación estudiada (véase fig. 1-15). En síntesis, la función del microscopio de contraste de fase es combinar las ondas desfasadas y convertir las diferencias de fase en diferencias de amplitud (intensidad luminosa) a fin de poder detectar detalles en materiales no coloreados, por ejemplo, en células vivas, mantenidas o cultivadas in vitro.

Microscopio de contraste por interferencia diferencial

El microscopio de contraste por interferencia diferencial (DIC) posee un polarizador que filtra la luz que vibra en un solo plano y un juego de prismas especiales. Uno de ellos, ubicado cerca del condensador o sobre él, desdobra el rayo incidente en dos componentes (dos ondas) que atraviesan la muestra. Los dos rayos luego son combinados nuevamente por un segundo prisma que los hace interferir para formar una imagen de aspecto tridimensional. Este microscopio fue diseñado para observar relieves en superficie de especímenes voluminosos, o difíciles de manejar o muy gruesos como para ser observados con el microscopio de contraste de fase. Con el microscopio de interferencia también se pueden cuantificar los cambios de índices de refracción. Como la densidad óptica y el retardo de fase del haz luminoso son proporcionales a la masa de la muestra, es posible obtener datos cuantitativos de componentes celulares mediante la comparación de un haz luminoso de referencia con las ondas de fase retardadas. Además, es posible traducir los cambios de fase como cambios de color y así se obtienen imágenes de células vivas y “coloreadas” por medios ópticos.

Microscopio de fondo oscuro

Se basa en la dispersión de la luz que provocan estructuras que pueden estar por debajo del límite de resolución o en el límite de estructuras con diferente índice de refracción. Esto se logra con un condensador que sólo permite iluminar la preparación en forma muy oblicua (fig. 1-17). Así, los componentes celulares se observan brillantes por la dispersión de la luz (véase fig. 1-17 B) sobre un fondo negro, ya que la luz que no incide sobre las estructuras estudiadas no entra en el objetivo (véase fig. 1-17 A). Este microscopio, aunque no permite visualizar los detalles estructurales, permite resolver partículas más pequeñas que las observadas con el microscopio común de campo claro. El efecto óptico es semejante a la visualización de las pequeñas partículas que flotan en el aire de una habitación oscura donde entra un delgado rayo luminoso.

Cuadro 1-5. Niveles microscópicos en biología

<i>Unidad de medida</i>	<i>Valor de la unidad</i>	<i>Método de estudio</i>	<i>Estructura visualizada</i>
milímetro (mm)	10^{-3} m	Ojo Lupa	Órganos. Tejidos Células grandes
Micrómetro (μm)	10^{-6} m	Microscopias ópticas	Tejidos. Células Organoides grandes
Nanómetro (nm)	10^{-9} m	Microscopia electrónica Microscopia de polarización	Componentes subcelulares Virus Macromoléculas
Angström (Å)	10^{-10} m	Microscopia electrónica Difracción de rayos X Microscopia de efecto túnel	Estructura molecular Estructura atómica

Microscopio de polarización

También es un microscopio óptico de luz visible, pero se basa en el uso de luz polarizada y permite obtener información acerca del ordenamiento de las moléculas del objeto estudiado. Los materiales que poseen el mismo índice de refracción en todas las direcciones se denominan **isotrópicos** porque no poseen una disposición regular u ordenada de sus constituyentes y la luz polarizada los atraviesa a la misma velocidad cualquiera que sea la dirección del plano de incidencia. Por el contrario, un mate-

rial es **anisotrópico** o **birrefringente** cuando la disposición ordenada de sus componentes en un plano definido hace que la velocidad de la luz polarizada difiera según la dirección del plano de vibración de la onda luminosa. En este último caso, las estructuras en estudio presentan diferentes índices de refracción que corresponden a las diferentes velocidades de transmisión de la luz que, a su vez, depende de la disposición molecular de sus componentes.

Para que puedan observarse estas características en las preparaciones citohistológicas, este tipo de microscopio posee un cristal **polarizador** en la zona del

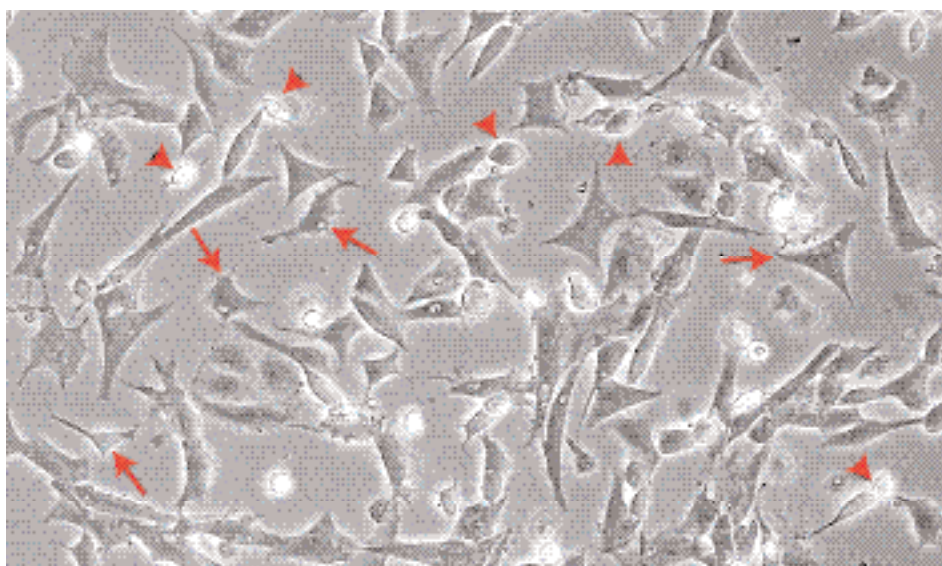


Fig. 1-15. Cultivo primario de células neurales con microscopía de contraste de fase. Se observan células de diferentes formas y tamaños que reflejan la distinta adhesividad al sustrato; algunas presentan filopodios o proyecciones periféricas que indican motilidad celular (flechas) y otras están en proceso de división (cabezas de flecha).

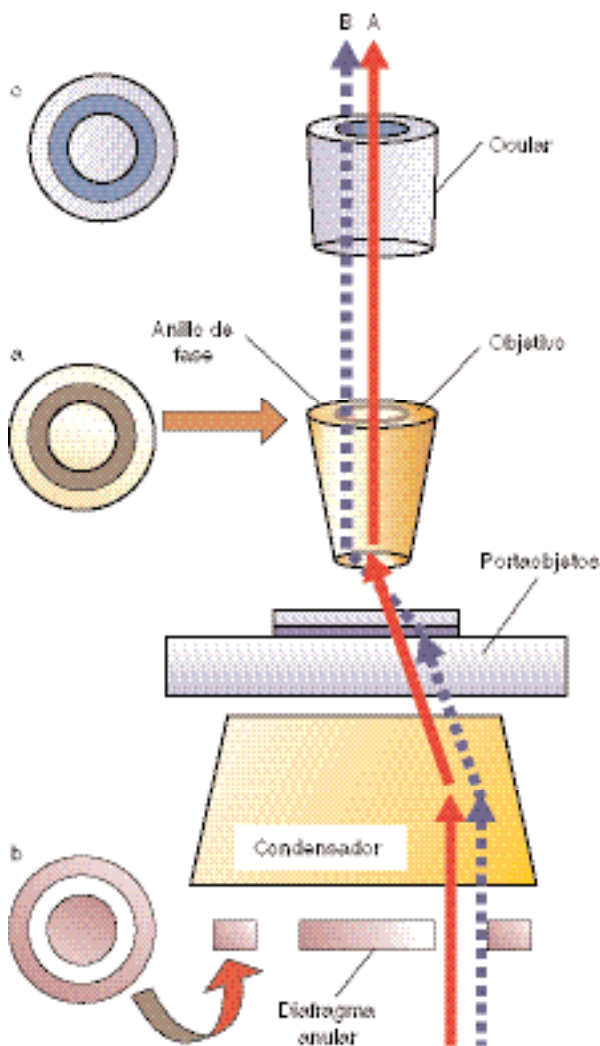


Fig. 1-16. Esquema simplificado de la trayectoria de la luz en un microscopio de contraste de fase. El anillo de fase (a) del objetivo es fijo y el diafragma anular del condensador (b) es móvil y se deben hacer coincidir al alinear el microscopio, tal como se muestra en la imagen del campo óptico alineado a nivel del ocular (c). A. Rayos no modificados. B. Rayos modificados (véase explicación en el texto).

condensador que se encarga de uniformar en un solo plano del espacio las vibraciones de la onda de luz que luego atraviesa la preparación en estudio. También tiene un cristal **analizador**, montado sobre el objetivo, que al ser rotado alrededor del eje óptico permite estudiar la orientación de los rayos luminosos provenientes de la fuente y la muestra. En una muestra observada con este microscopio, las zonas cuya disposición macromolecular es regular y muy ordenada (p. ej., las bandas transversales del músculo

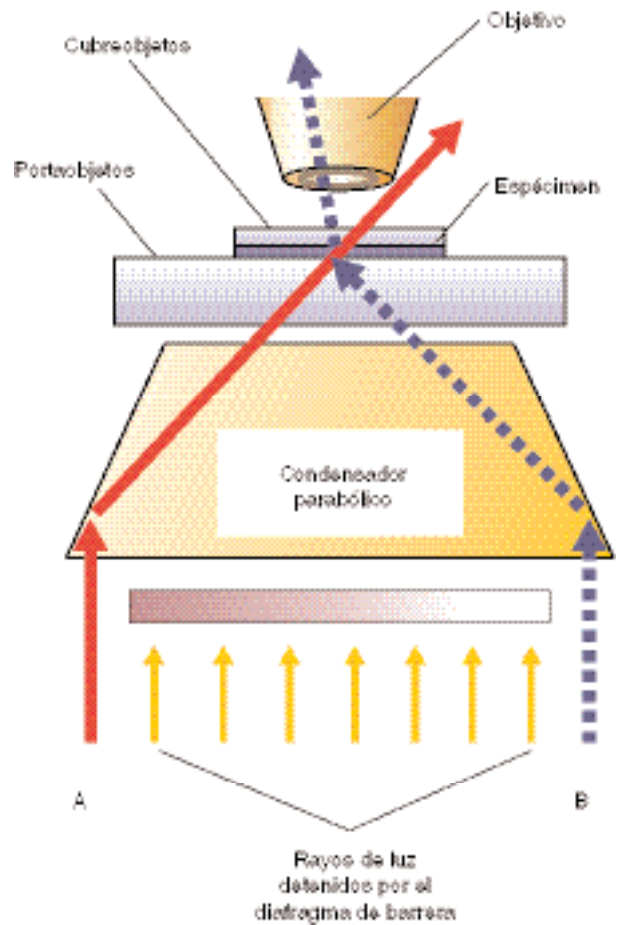


Fig. 1-17. Esquema simplificado de la trayectoria de la luz en un microscopio de fondo oscuro (véase explicación en el texto).

esquelético, el huso mitótico, las estructuras cristalinas, etc.) se observan más brillantes o más oscuras (birrefringencia) que aquellas cuyos componentes se disponen al azar y más desordenados.

Microscopio de fluorescencia

Este microscopio posee el estativo mecánico y los componentes básicos similares a un microscopio óptico común, pero en vez de luz blanca utiliza **luz ultravioleta** y **filtros** que producen la excitación de la radiación en ciertas longitudes de onda que dependen de los componentes de la muestra en estudio o de los **colorantes fluorescentes** utilizados. Aunque ciertos componentes biológicos poseen **autofluorescencia** (p. ej., la vitamina A), este microscopio se usa con más frecuencia para estudiar materiales previamente marcados con colorantes como

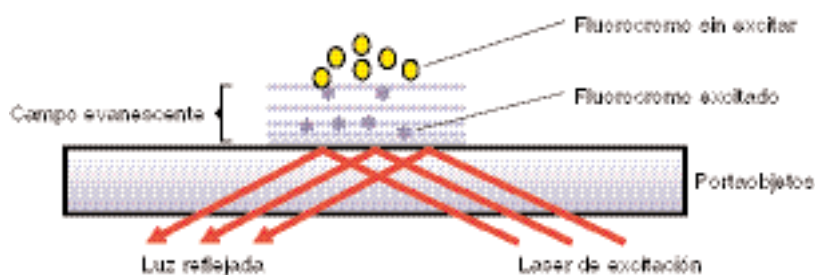


Fig. 1-18. Fundamento de la microscopía TIRF.

la **fluoresceína** (fluorescencia verde), la **rodamina** (fluorescencia roja) o el **colorante de Hoechst** (fluorescencia azul). Como ya se mencionó, la marcación de anticuerpos con colorantes fluorescentes es un método muy utilizado para identificar y localizar diferentes tipos de moléculas mediante las **técnicas inmunocitoquímicas** (véase fig. 1-9), aunque también existen métodos que no utilizan anticuerpos marcados con fluorocromos, sino moléculas que adquieren fluorescencia en respuesta a cambios químicos, físicos o biológicos (véase fig. 1-10).

Microscopio láser confocalizado

Es un tipo de microscopio óptico de fluorescencia que incluye una fuente de emisión de **luz láser**. Debido a un sistema óptico particular y a las características físicas de la **radiación láser**, se pueden localizar con gran precisión estructuras subcelulares marcadas con colorantes fluorescentes y con muy baja o nula coloración de fondo (*background*). Además, las imágenes se integran y se analizan en un sistema computarizado que permite realizar la reconstrucción tridimensional del objeto estudiado a partir de los *cortes ópticos seriados* del espécimen, así como múltiples análisis cualitativos y cuantitativos de las preparaciones estudiadas.

Microscopio TIRF (total internal reflection fluorescence)

Este microscopio fue diseñado para el estudio de células en un medio acuoso y en el que el portaobjetos sobre el cual se encuentran tiene un índice de refracción mayor que ese medio. Si se ilumina la muestra desde abajo con un haz de luz láser que incide con cierto ángulo, toda la luz que pasa por el portaobjetos se refleja y no atraviesa la muestra debido a las diferencias en los índices de refracción. Sin embargo, la luz que llega hasta la vecindad de la muestra es capaz de generar un campo electro-

magnético que se propaga en ese medio de menor índice de refracción. Este campo decae a medida que se aleja de la preparación, por lo que se denomina "campo evanescente". El resultado es la excitación del fluorocromo en una capa muy delgada, de unos 100 nm, que corresponden a la región más próxima al portaobjetos (fig. 1-18). Este microscopio se aplica al estudio de los puntos de contacto entre una célula y el sustrato, o a los procesos dinámicos que ocurren entre membranas y vesículas, en células vivas, ya que este tipo de microscopía no funciona bien con material fijado y montado porque los medios de montaje poseen un índice de refracción similar al de los materiales de soporte.

Microscopio de dos fotones

Se basa sobre la estimulación de un fluorocromo de modo simultáneo por dos fotones. La energía de ambos fotones se suma y juntos son capaces de estimular del mismo modo que lo haría un solo fotón con el doble de energía (doble de frecuencia). La tecnología multifotón ofrece varias ventajas para el estudio de muestras biológicas:

1. *Excitación de la muestra en un único punto*, ya que sólo se excita el punto donde convergen los pares de fotones en el plano focal. El resto de la muestra, al no ser estimulada, no emite nuevos fotones por lo que no es preciso eliminar la luz de las zonas fuera de foco, responsable del *background*.
2. *Posibilidad de excitar fluorocromos* con un rango de excitación con longitud de onda menor que la fuente de luz, por absorción simultánea de dos o más fotones. Al absorberse dos fotones, la excitación que se consigue es equivalente a la de un solo fotón con una frecuencia doble. En la práctica, esto nos permite excitar con infrarrojo fluorocromos que sólo son posibles de excitar en el ultravioleta.
3. *Alta capacidad de penetración de los fotones*, lo que

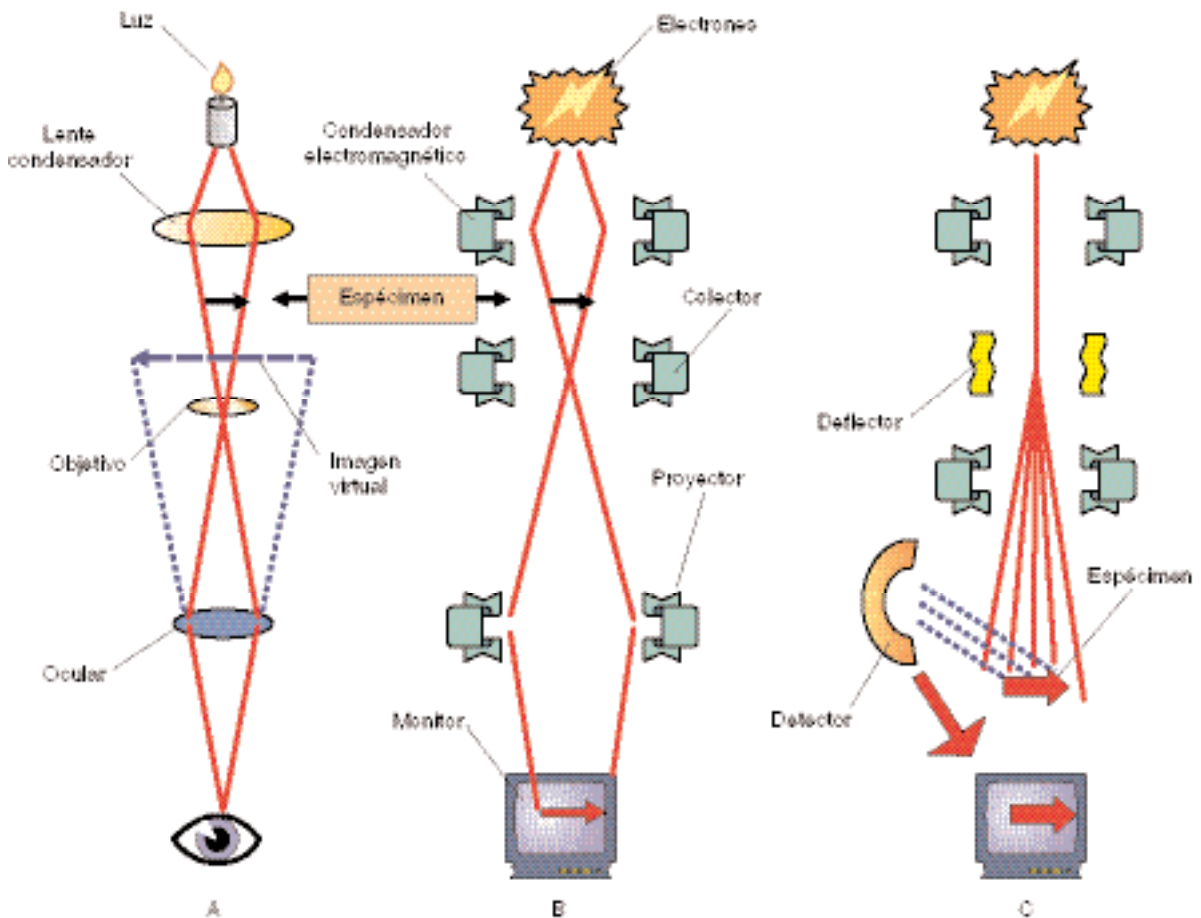


Fig. 1-19. Esquemas comparativos de microscopios óptico (A), electrónico de transmisión (B) y electrónico de barrido (C).

es ideal para estudiar muestras gruesas como embriones enteros vivos. A diferencia del sistema microscópico convencional, no es preciso cortar las muestras ya que se puede estudiar un trozo de tejido excitando sólo una zona.

4. *Menor daño de la muestra*, dado que al estimularse sólo en el plano focal no se daña el resto de la muestra. Uno de los principales objetivos de los estudios de microscopía in vivo es capturar imágenes con alta penetración y daño mínimo de la muestra por fototoxicidad. Esto es especialmente importante cuando el material que se estudia son embriones que luego deben ser reimplantados.

Nota: El microscopio láser confocalizado, el microscopio TIRF (*total internal reflection fluorescence*), el microscopio de dos fotones, el microscopio de "efecto túnel" y otros de tecnología muy avanzada que brindan información estructural y funcional a nivel molecular y atómico no son actualmente de uso común en la práctica microscópica convencio-

nal o cotidiana, ni en cualquier centro biomédico de tipo asistencial. Sin embargo, estos y otros tipos de microscopios se utilizan en laboratorios de investigación biológica en diferentes partes del mundo y forman parte de la tecnología que proporciona el caudal de conocimientos que el profesional del área de la salud (aunque no lo practique en forma personal) no puede dejar de conocer conceptualmente.

Microscopio electrónico de transmisión

El microscopio electrónico de transmisión (MET) posee los componentes básicos equivalentes al microscopio óptico (fig. 1-19 A, B), pero en lugar de una fuente de luz utiliza un tubo de **radiación de electrones** y en vez de lentes de cristal posee **lentes o bobinas electromagnéticas**. Los **electrones**, que en el vacío se desplazan en línea recta, son desviados por las bobinas de una manera similar a la refracción que

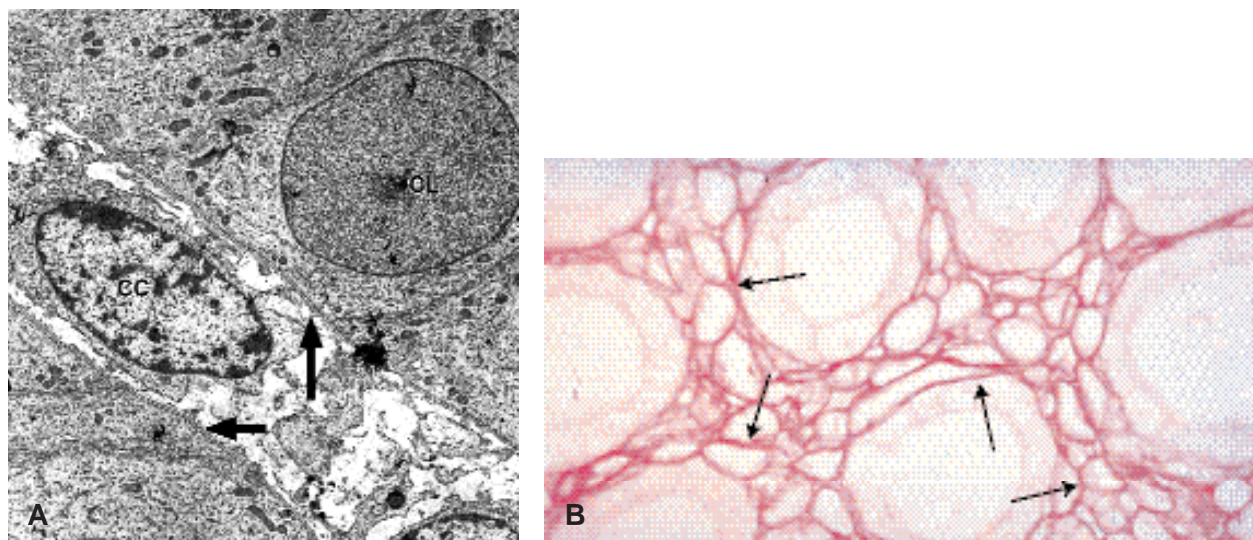


Fig. 1-20 A. Células epiteliales de riñón (dominio basolateral) y fibroblasto de la estroma con microscopía electrónica de transmisión. Nótese los núcleos con cromatina laxa (CL), cromatina condensada (CC) y la membrana basal (flecha). B. Membrana basal de tubos colectores, asas de Henle y capilares (flechas) se marcan con la técnica de PAS por su contenido en glucoproteínas.

producen las lentes ópticas sobre los rayos luminosos. Luego de emitirse desde un tubo de rayos catódicos a un voltaje de 50.000 a 100.000 voltios, los electrones se concentran por acción de una **bobina condensadora** sobre la muestra en estudio (véase fig. 1-19 B), donde chocan y cambian de dirección según la electrodensidad de las partículas que componen la muestra. Cuanto mayor es el número atómico de los componentes de la muestra, mayor será la dispersión de los electrones. Como la mayor parte de los átomos que forman las estructuras biológicas poseen un número atómico bajo, se deben utilizar átomos pesados (*Os, Pb, Au, U*, etc.), como **colorantes electrodensos** que desvían mucho los electrones y proporcionan densidad a las diferentes estructuras celulares. Luego de atravesar la muestra, los electrones son concentrados por una **bobina colectora** y proyectados sobre una **pantalla fluorescente** o **película fotográfica**, donde se forma la imagen y se efectúa el estudio (véase fig. 1-19 B). Las zonas o estructuras que por su **densidad** dispersan más a los electrones se observan como **áreas oscuras** en la pantalla o película fotográfica (fig. 1-20 A). Al contrario de lo que ocurre en la microscopía óptica, los haces de electrones no son visibles directamente por el ojo, por lo que se debe efectuar el estudio directamente sobre la pantalla fluorescente, sobre la fotografía o sobre un monitor.

En un trabajo de rutina de MET en biología celular, como ejemplo indicativo, se trabaja normalmente hasta unos 30.000 a 50.000 aumentos directos sobre la pantalla. En trabajos a **alta resolución** (estudio de las partículas que componen organoides, estructura de membrana, etc.) se suele trabajar con

hasta 100.000 a 200.000 aumentos directos y se puede llegar al millón de aumentos. Además, por ampliación fotográfica la imagen se puede incrementar 5 veces o más y llegar a aumentos reales del orden de los 10 millones o más. En este orden de aumentos se debe trabajar con una técnica muy depurada en la preparación del material y contar con suficiente experiencia en la interpretación de los datos estructurales, ya que en muchos casos resulta difícil discriminar entre estructuras reales o artefactos de la técnica.

Es importante considerar que la posibilidad de lograr aumentos importantes en MET depende de la corta longitud de onda de los electrones (véanse los apartados “Poder de resolución” y “Límite de resolución”). Como ya mencionamos, dos objetos se ven separados cuando la distancia entre ellos es mayor que la mitad de la longitud de onda empleada para su estudio. Por ejemplo, la longitud de onda de la luz blanca (de unos 550 nm), establece un límite de resolución para el MO de unos 0,2 μm . Como la longitud de onda de los electrones es muy pequeña (0,005 nm), el límite de resolución del MET se sitúa entre los 2 y los 10 Å , lo cual es teóricamente suficiente para visualizar la mayor parte de las macromoléculas biológicas cuyas dimensiones están en el orden de los 10 a los 100 Å .

Microscopía electrónica de transmisión de alto voltaje

Es un MET que utiliza emisiones de electrones acelerados a varios *millones de voltios*, lo que permi-

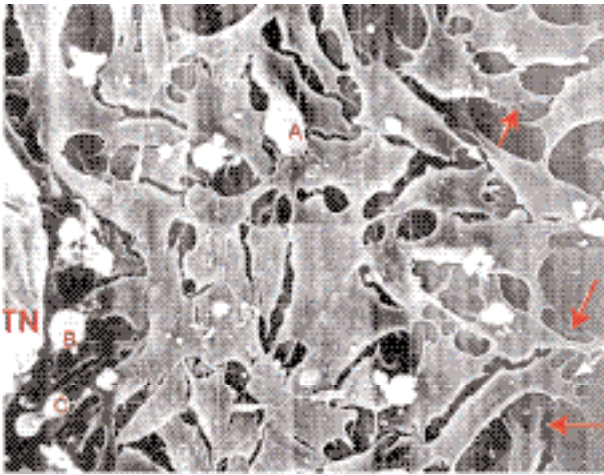


Fig. 1-21. Cultivo primario de células neurales con microscopía electrónica de barrido. Compárese con la preparación equivalente de la figura 1-15; se observan células de diferentes formas y tamaños; algunas con proyecciones periféricas que indican motilidad celular (flechas) y otras en proceso de división (A, B, C).

te penetrar cortes muy gruesos y estudiar la estructura tridimensional de los componentes subcelulares dado que posee un enorme poder de resolución y penetración. Con este instrumento se pueden hacer estudios sobre células enteras cultivadas, lo que permite discriminar mejor las relaciones e interacciones entre los diferentes organoides que en materiales seccionados.

Microscopio electrónico de barrido

El microscopio electrónico de barrido (MEB) permite observar la superficie de especímenes gruesos y de organismos enteros que no se podrían estudiar con el MET. Para ello, el haz electrónico no atraviesa la muestra, sino que realiza un barrido por toda la superficie del material en estudio (véase fig. 1-19 C). Este impacto de los **electrones primarios** sobre el espécimen produce la emisión de **electrones secundarios** y, con dependencia de la geometría de la superficie del espécimen, son captados por un detector, integrados y proyectados en la pantalla de un monitor (véase fig. 1-19 C). Es decir, construye una imagen basada sobre el grado y la dirección de la dispersión de electrones secundarios, que varía de acuerdo con las diferentes características geométricas y la opacidad electrónica de la muestra. El resultado final es una **imagen tridimensional** con elevado poder de resolución (fig. 1-21). Además, con adaptaciones del mismo equipo denominados “detectores de sondas electrónicas” es posible realizar el análisis de la emisión se-

cundaria de rayos X, con lo cual se pueden detectar la concentración y la distribución de diferentes elementos químicos de la muestra.

BIBLIOGRAFÍA Y LECTURAS ADICIONALES

- Bernstein M. Prebiotic materials from on and off the early Earth. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2006;361:1689-700.
- Bhadriraju K, Elliott JT, Nguyen M, Plant AL. Quantifying myosin light chain phosphorylation in single adherent cells with automated fluorescence microscopy. *BMC Cell Biol.* 2007; 8: 43-4.
- Danielli JF, Davson H. A contribution to the theory of permeability of thin films. *J Cell Physiol* 1935;5:495.
- De Robertis EDP, Nowinski WW, Saez FA. *Biología Celular*. 7ª ed. Buenos Aires: Editorial El Ateneo; 1968.
- De Robertis EMF, Hib J. *Fundamentos de Biología Celular y Molecular*. 3ª ed. Buenos Aires: Editorial El Ateneo; 1997.
- Gorter E, Grendell F. On bimolecular layers of lipoids on the chromocytes of the blood. *J Exp Med* 1925;41:439-43.
- Ham AW, Cormack DH. *Tratado de Histología*. 8ª ed. Ed Interamericana; 1985.
- Hopwood D. Cell and tissue fixation 1972-1982. *Histochemical J* 1985;17:389-442.
- McManus JFK, Moury RW. *Staining Methods Histological and Histochemical*. New York: Hoeber; 1960.
- Pearse AGE. *Histochemistry-Theoretical and Applied*. 2ª ed. Boston: Little Brown and Co; 1960.
- Pease DC, Porter KR. *Electron microscopy and ultramicrotomy*. *J Cell Biol* 1981;91:287-92.
- Polak JM, Van Noorden. *An introduction to immunocytochemistry*. Oxford: Roy Microscopy Soc Microscopy Handbook Ser; 1984.
- Ramón y Cajal S, De Castro F. *Elementos de técnica micrográfica del sistema nervioso*. España: Ed Tipográfica Artística; 1933.
- Rasmussen S, Chen L, Deamer D, Krakauer DC, Packard NH, Stadler PF, Bedau MA. Evolution. Transitions from nonliving to living matter. *Science* 2004;303(5660):963-5.
- Robertson J. The membrane of the living cells. *Sci Am* 1962;206:64-72.
- Rovasio RA. *Citoquímica y ultraestructura de superficies celulares*. Tesis Doctoral. Fac de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba (Arg); 1976.
- Scarpelli DG, Kanczak NM. Ultrastructural cytochemistry: limitations and applications. *Int Rev Exp Pathol* 1965;4:55-67.
- Singer SJ, Nicolson GL. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* 1972;75:720-31.
- St John J, Lovell-Badge R. Human-animal cytoplasmic hybrid embryos, mitochondria, and an energetic debate. *Nat Cell Biol.* 2007; 9: 988-92.
- Sun MG, Williams J, Munoz-Pinedo C, Perkins GA, Brown JM, Ellisman MH, Green DR, Frey TG. Correlated three-dimensional light and electron microscopy reveals transformation of mitochondria during apoptosis. *Nat Cell Biol.* 2007; 9: 1057-65.
- Yang G, Houghtaling BR, Gaetz J, Liu JZ, Danuser G, Kapoor TM. Architectural dynamics of the meiotic spindle revealed by single-fluorophore imaging. *Nat Cell Biol.* 2007; 9: 1233-42.
- Zilberberg L, ten Dijke P, Sakai LY, Rifkin DB. A rapid and sensitive bioassay to measure bone morphogenetic protein activity. *BMC Cell Biol.* 2007; 8: 41-2.

PÁGINAS WEB

- <http://www.protocol-online.org/>
- <http://www.monografias.com/trabajos11/intecnic/intecnic.shtml>

<http://www.vet.unicen.edu.ar/catedras/cHistologia/Tecnicas-histologicas.PDF>

<http://www.anatomohistologia.uns.edu.ar/plantilla.asp?zona=modtecnica>

http://es.wikipedia.org/wiki/T%C3%A9cnica_histol%C3%B3gica

http://es.wikipedia.org/wiki/T%C3%A9cnica_histol%C3%B3gica

<http://www.e-histologia.unileon.es/1inicio/home/tecnicas.htm>

<http://www.conocimientosweb.net/dcmf/ficha509.html>

http://www.unich.it/offerta/perfez2005/locandina_microscopia.pdf

<http://es.wikipedia.org/wiki/Microscop%C3%ADa>

<http://www.monografias.com/trabajos7/micro/micro.shtml>

AUTOEVALUACIÓN

Señale la única opción de respuesta correcta

1. La "teoría celular" sostiene que:

- a) Las células son las unidades morfológicas y fisiológicas de todos los organismos vivientes.
- b) Las células se originan sólo de otras células y su continuidad depende de su material genético.
- c) Las propiedades de un organismo depende de las de sus células individuales.
- d) Todo lo anterior es correcto.

2. Señale una de las opciones que caracterizan sólo a los seres vivos:

- a) Ácidos nucleicos.
- b) Compuestos de nitrógeno.
- c) Compuestos de carbono.
- d) Agua.

3. Es característico de las células eucariontes:

- a) Tener núcleos organizados.
- b) Tener DNA circular.
- c) No tener nucléolos.
- d) Nada de lo anterior.

4. Los componentes basófilos de la célula son:

- a) DNA y RNA.
- b) RNA y mitocondrias.
- c) REL.
- d) Nucléolo y aparato de Golgi.

5. Señale cuál de las siguientes alternativas se debe usar para observar el DNA de células de ratón:

- a) Técnica de PAS.
- b) Técnica inmunocitoquímica directa con anticuerpo de ratón anti-RNA de conejo.
- c) Técnica de Feulgen.
- d) Técnica inmunocitoquímica con anticuerpo de cabra antitubulina de ratón.

6. El grosor habitual de un corte para MET es:

- a) Mayor que el de la membrana plasmática y menor que el diámetro de una célula vegetal.
- b) Menor que el grosor de un corte para MO y mayor que el diámetro de una mitocondria.

- c) Aproximadamente igual al diámetro del núcleo.
- d) Nada de lo anterior.

7. El límite de resolución de un sistema óptico es:

- a) La distancia entre el objetivo y la preparación.
- b) La distancia mínima que separa dos puntos que pueden ser discriminados como tales.
- c) La capacidad de dar imágenes claras.
- d) La distancia entre el centro de una lente y el punto donde se reúnen todos los rayos de luz.

8. Marque la opción correcta:

- a) El núcleo celular está rodeado por una membrana bilipídica.
- b) La envoltura nuclear posee poros de 5 μm de diámetro.
- c) La envoltura nuclear está formada por dos membranas.
- d) El núcleo celular está rodeado por una envoltura de doble membrana que se continúa con el nucléolo.

9. El poder de resolución de un microscopio óptico es:

- a) Mayor que el de un microscopio electrónico de transmisión.
- b) Menor que el de un microscopio de fluorescencia.
- c) Menor que el de un microscopio electrónico de barrido.
- d) Mayor que el de un microscopio de contraste de interferencia.

10. Indique el tipo de microscopio necesario para ver un componente de la envoltura nuclear utilizando un anticuerpo secundario conjugado con oro coloidal:

- a) Microscopio de contraste de fase.
- b) Microscopio electrónico de transmisión.
- c) Microscopio de fluorescencia con el filtro de excitación / análisis para fluoresceína.
- d) Microscopio de fluorescencia con el filtro de excitación / análisis para rodamina.

Indique si las siguientes afirmaciones son **verdaderas** o **falsas**. En las falsas subraye el(los) elemento(s) erróneo(s)

1. Las células de un organismo pluricelular, aunque contienen el mismo DNA, pueden ser muy diferentes, ya que utilizan la información genética para dirigir sus actividades bioquímicas según las señales que reciben de su medio ambiente.
 V F
2. El núcleo es el organoide más importante en la mayoría de las células vegetales y animales, porque contiene la información genética del organismo, almacenada en las moléculas de RNA; los otros componentes de la célula constituyen el citoplasma.
 V F
3. Las células vivas están compuestas principalmente por un número limitado de elementos, cuatro de los cuales (C, H, S, Fe) componen en conjunto el 96,5% de su masa.
 V F
4. Los organismos vivos contienen un conjunto característico y restringido de pequeñas moléculas complejas, basadas en el carbono, que son esencialmente iguales en todas las especies vivas; ellas son los azúcares, los ácidos grasos, los aminoácidos y los nucleótidos.
 V F
5. Muchos miles de proteínas en una célula eucarionte típica son reguladas por ciclos de fosforilación y desfosforilación, o mediante la unión e hidrólisis de GTP por una proteína fijadora de GTP.
 V F
6. Los cromosomas de células eucariontes consisten en DNA estrechamente unido a una masa casi igual de proteínas especializadas, cuya función es plegar el RNA en una forma laxa de modo que pueda caber en el núcleo celular; este complejo de DNA + proteína de los cromosomas se llama carioteca.
 V F
7. El flujo de la información genética en todas las células vivas es DNA > RNA > proteína y la conversión de las instrucciones genéticas de DNA hacia RNA y proteínas se denomina expresión génica.
 V F
8. En el DNA de la célula eucarionte, la mayor parte de los genes está constituida por pequeñas regiones (exones) intercaladas con regiones no codificantes (intrones). Cuando un gen procarionte es transcrito del DNA al RNA, los exones y los intrones son copiados.
 V F
9. La traducción de la secuencia de nucleótidos del mRNA en proteínas tiene lugar en el núcleo sobre grandes ribonucleoproteínas ensambladas denominadas ribosomas. Se unen al mRNA y se desplazan paso a paso a lo largo de la cadena de mRNA traduciendo el mensaje a proteína.
 V F
10. La mayoría de las proteínas de los organoides se elaboran en el citosol y se transportan hacia el interior del organoide donde funcionan; las señales para su distribución son determinadas por la secuencia de aminoácidos, que guían a las proteínas hacia el organoide correspondiente, mientras que las proteínas que actúan en el citosol poseen señales determinadas por la secuencia de nucleótidos y permanecen donde se fabrican.
 V F