

PRACTICA Nº 1: FUNDAMENTOS Y MANEJO DEL MICROSCOPIO ÓPTICO COMPUESTO COMÚN

Dr. Joaquín De Juan Herrero©

1. INTRODUCCIÓN:

En cualquier estudio de *Biología Celular*, *Histología* e *Histopatología* (estudio microscópico de las lesiones) se trata de obtener, a través del **microscopio** (Figura 1), datos microscópicos (**imágenes microscópicas**) de organismos o partes de los mismos (**objetos microscópicos**) normales (cerebro, riñón, ...) o alterados (lesiones: tumores, inflamaciones, ...) para analizarlos y reconstruir **modelos conceptuales microscópicos** que nos permitan explicar como están hechos los organismos y así poder responder a las diferentes preguntas que sobre ellos se hace cualquier **observador**.

FIGURA 1

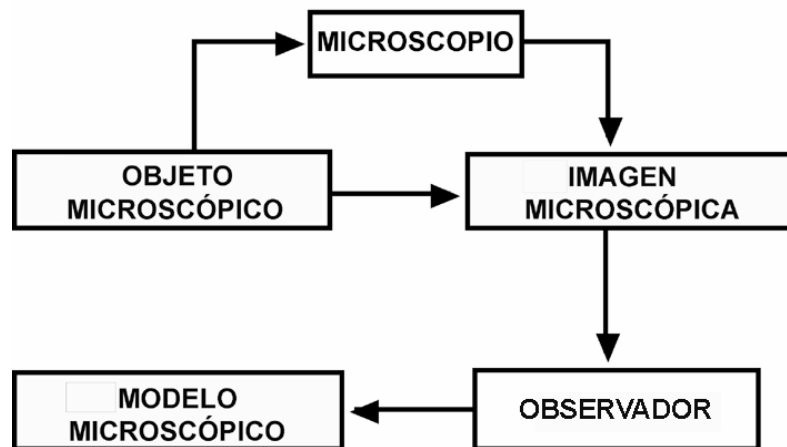


Figura 1: Principales pasos en la obtención de *datos* utilizando el microscopio. En ocasiones con el ojo desnudo o con lupas (microscopio simple) es posible observar pequeños detalles situados en la frontera entre lo macroscópico y lo microscópico (*macro-microscopía*). Imagen modificada de De Juan, 1999

Cuando el objeto de nuestro estudio son las *asociaciones celulares* de los organismos clasificados como *metafitas* y *metazoos*, las imágenes observadas con el microscopio, podemos denominarlas **imágenes histológicas** y damos el nombre de **objetos histológicos** a aquellos de donde las imágenes proceden (órganos, tejidos y células). Para obtener *imágenes histológicas*, a partir de *objetos histológicos*, es preciso someter a estos últimos a un conjunto de procedimientos de laboratorio que denominaremos **técnica histológica** y que analizaremos con más detalle en los temas del 6 al 10. No obstante, a modo de introducción, podemos definir la *técnica histológica* como el "**conjunto de actividades y procedimientos de laboratorio, que nos permiten observar y obtener, a través del microscopio, imágenes histológicas a partir de un objeto histológico**".

FIGURA 2

ADQUISICION DE CONOCIMIENTO HISTOLÓGICO

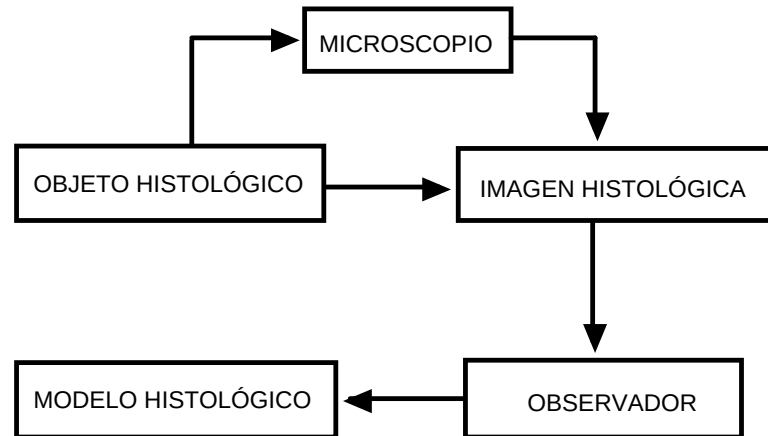


Figura 2: Principales pasos en la obtención de datos histológicos. Imagen tomada de De Juan (1999).

De forma esquemática podemos reducir a tres los *elementos básicos* a considerar en el análisis de la técnica histológica (Figura 3):

A) La existencia de un instrumento, el **microscopio** que es condición *sine qua non* para la existencia de la **Histología**. Con él observamos las **imágenes histológicas** y podemos capturarlas como fotografías. Aunque la Histología está cada vez más próxima a la Biología Molecular, la utilización del microscopio sigue siendo la característica técnica más importante de esta disciplina.

B) El **objeto** a estudiar (**objeto histológico real**) con el **microscopio**, debe ser adecuadamente preparado para su perfecta observación. Es precisamente esta manipulación y preparación del material de estudio, una parte muy importante de la **técnica histológica**.

C) La preparación del material es necesaria para que el **observador** pueda extraer, a través del **microscopio**, información de los **objetos histológicos reales** adecuadamente preparados. De esta forma el observador analiza las **imágenes histológicas** (fotos, dibujos, diapositivas, etc.) y a partir de ellas reconstruye la realidad en forma de **modelos histológicos conceptuales**. De los aspectos que el observador selecciona para su estudio, surgen nuevos problemas técnicos y se generan nuevas técnicas de estudio.

FIGURA 3.

ELEMENTOS BÁSICOS DE LA TÉCNICA HISTOLÓGICA

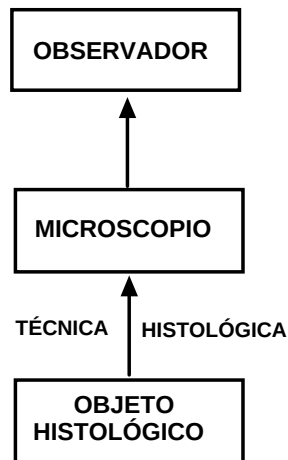


Figura 3: Los elementos básicos de la técnica histológica. Imagen tomada de De Juan (1999).

2. COMPONENTES DEL MICROSCOPIO OPTICO

2.1. El microscopio es un instrumento que permiten observar, aumentadas de tamaño, las estructuras:

Con el nombre de **microscopio** (del griego *micro* = pequeño y *skopein* = observar) nos referimos a todo instrumento que nos permite visualizar y estudiar aquellas estructuras cuyo tamaño se sitúa por debajo del nivel de resolución del ojo humano (Figura 4), es decir por debajo de las 250 μm . No es nuestra intención hacer aquí una descripción detallada de este instrumento, solamente realizaremos una descripción de la variedad más utilizada en los laboratorios de Biología, el microscopio óptico o compuesto¹. Con el nombre de *microscopio óptico o fotónico*, se recogen todos los microscopios cuyo mecanismo se basa en la transmisión de **luz visible**² y no visible (desde la ultravioleta a las radiaciones infrarrojas) a través de un sistema óptico de lentes y/o prismas y/o espejos.

Entre los microscopios ópticos, el **microscopio compuesto** es el más utilizado ya que el denominado **microscopio simple** no es más que una lupa, formada por un soporte y una lente biconvexa, que produce pocos aumentos y escaso poder de resolución. Frente a ella, el microscopio compuesto permite aumentos del orden de 1.500 a 2.000 aumentos y tiene un poder de resolución

¹ Para más información sobre la técnica histológica, el microscopio y sus variedades se puede consultar el apartado 4.3 (paginas 160-178) del libro de Joaquín De Juan (1999), *¿De qué están hechos los organismos?*. Publicaciones de la Universidad de Alicante

² Ver más adelante la figura 13

de $0,2\mu\text{m}$.

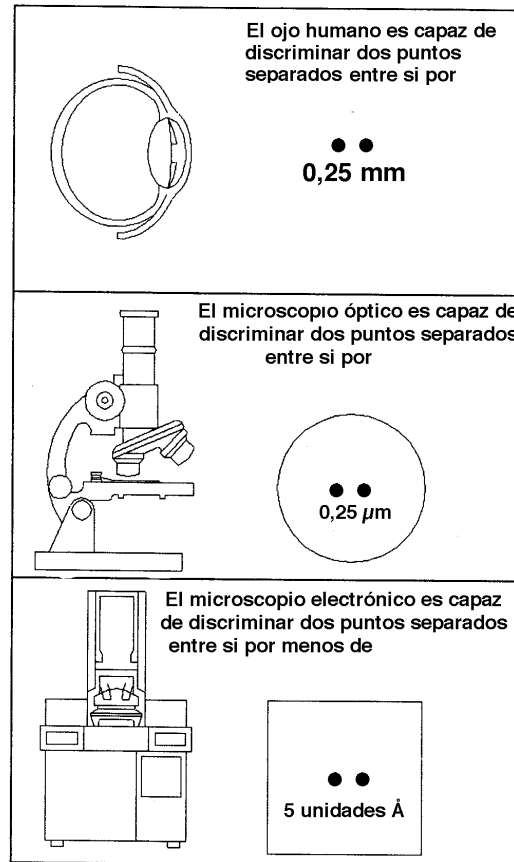


Figura 4: El poder de resolución de los instrumentos nos permite detectar objetos cada vez más pequeños (Tomado de De Juan, 1999).

2.2. Componentes básicos del microscopio óptico compuesto:

El microscopio *óptico* está compuesto por los siguientes componentes o sistemas:

- (1) Sistema mecánico
- (2) Sistema de iluminación
- (3) Sistema óptico

En los siguientes apartados y con la ayuda de las figuras de la 5 a la 11, iremos describiendo, con detalle, los diferentes elementos constitutivos de cada uno de esos tres componentes.

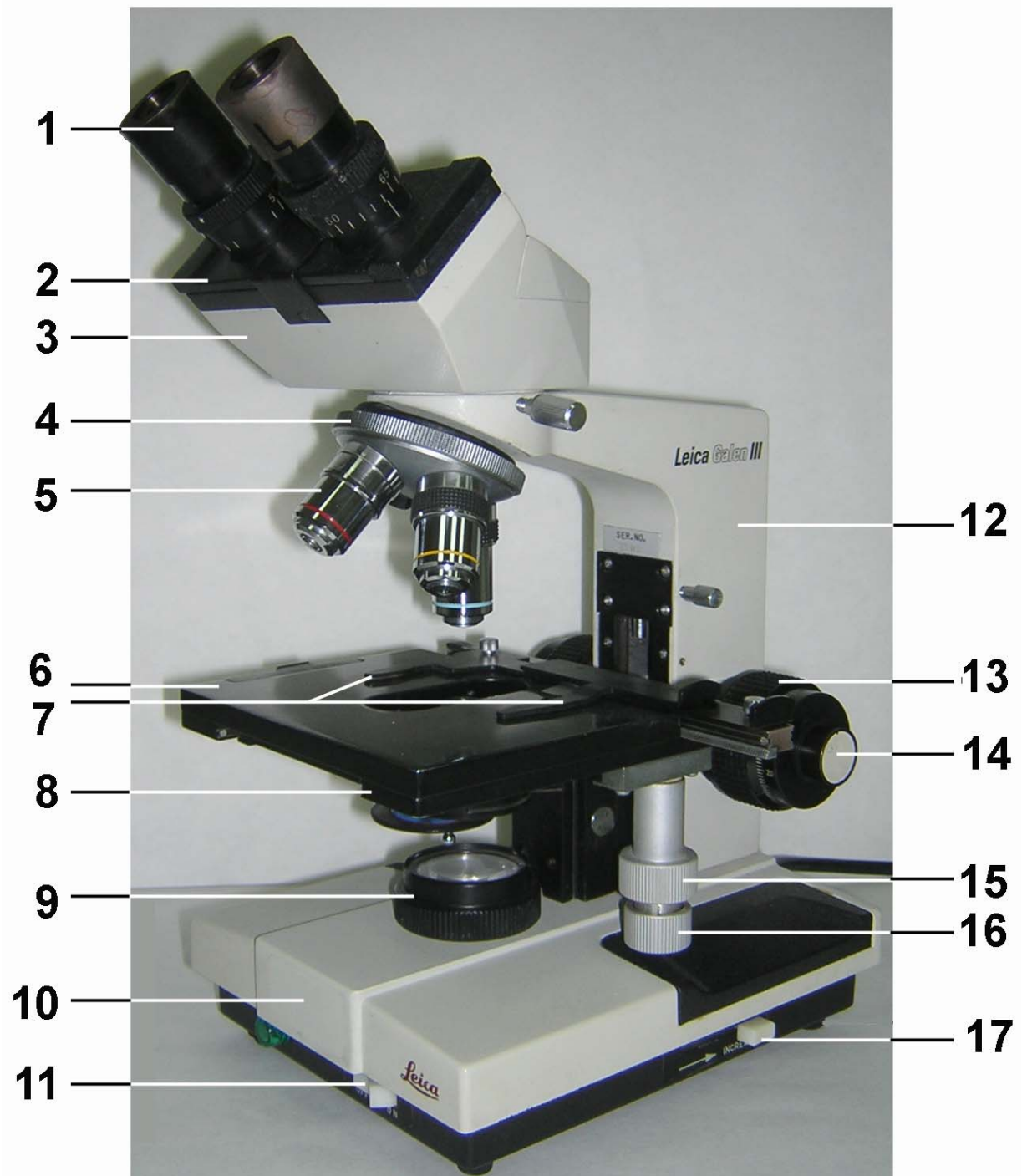


Figura 5: Microscopio óptico compuesto en el que se indican, mediante números, sus principales componentes. (1) Ocular; (2) Tubo; (3) Cabezal; (4) Revolver; (5) Objetivo; (6) Platina; (7) Pinzas para sujetar el portaobjetos; (8) Condensador; (9) Fuente luminosa con diafragma; (10) Base o pie; (11) Interruptor; (12) Brazo; (13) Macrométrico; (14) Micrométrico; (15 y 16) Mandos para de desplazamiento de la platina; (17) Botón regulador de intensidad.

2.3. El sistema mecánico del microscopio óptico:

Está constituido por el conjunto de piezas del microscopio encargadas de soportar y desplazar a los restantes componentes. Básicamente está formado por los siguientes elementos:

A) El **estativo**: Es la pieza que da soporte a todos los elementos del microscopio. Básicamente consta de una **base** o **pie** (Número 10 en la figura 5) sobre la que descansa todo el aparato. En algunos microscopios tiene forma de herradura aunque en los microscopios actuales se presenta como una placa compacta en cuyo interior se encuentra el **sistema de iluminación**. El resto del **estativo** está formado por el **brazo** que en los microscopios pequeños sirve de **asa** para su transporte (Número 12 en la figura 5), el **cabezal** (Número 3 en la figura 5) del que pende el **revolver** (Número 4 en la figura 5) y del que arranca el **tubo** (Número 2 en la figura 5). En algunos microscopios, antiguos, el brazo se halla unido al **estativo** mediante una articulación o **charnela** que permite inclinar el tubo.

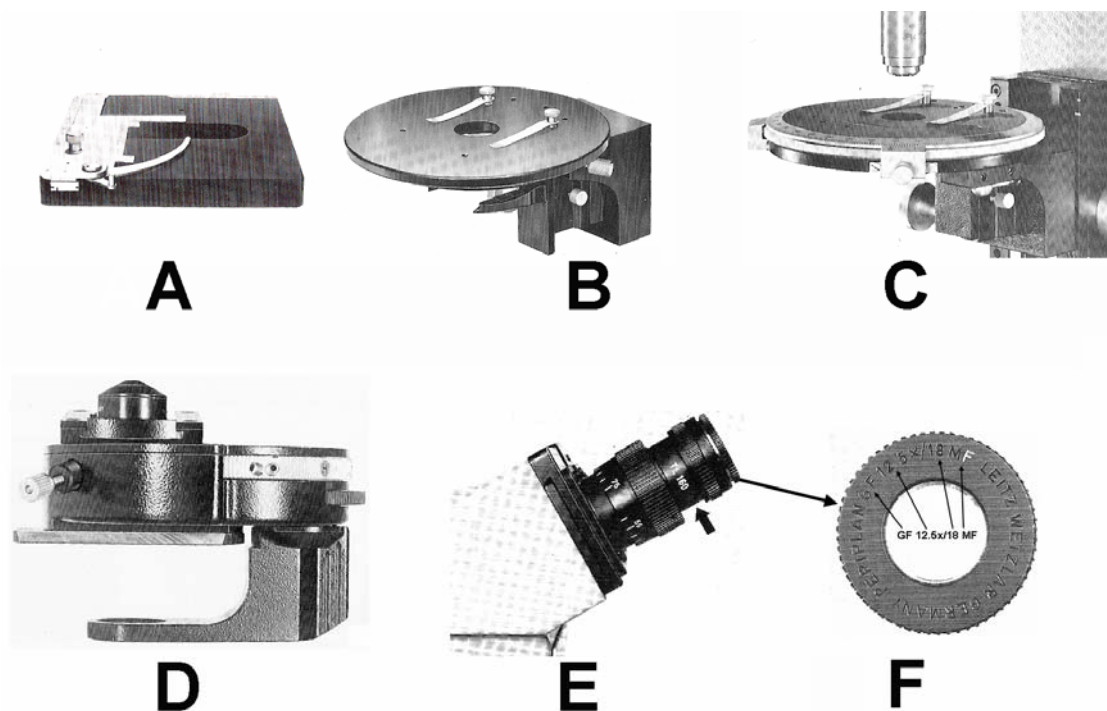


Figura 6: Diferentes componentes de un microscopio óptico compuesto. A, B y C platinas: A, cuadrada; B y C, circulares; D, condensador; E, cabezal, tubo y oculares; F, anillo giratorio del ocular con los valores del mismo: GF 12.5 x/18 MF. Donde GF es el aumento (12.5x) y MF es el índice de campo visual (18) que se explica más adelante.

B) La **platina** (Número 6 en la figura 5) y sus **mandos de desplazamiento** (Números 15 y 16 en la figura 5): La **platina**, en general móvil, es la pieza sobre la que se coloca y sujeta, mediante una **pinza** (Número 7 en la figura 5), la **preparación histológica** a observar (Figura 7), y que permite su desplazamiento a voluntad por medio de dos mandos que la mueven en sentido antero-posterior y latero-lateral (Números 15 y 16 en la figura 5). Se

trata de una placa metálica cuadrada (Letra A en la figura 6) o redonda (Letras B y C en la figura 6). La *preparación histológica* consta de un **porta objetos** (Número 1 en la figura 7 A), el **espécimen** (Número 2 en la figura 7 A) y el **cubre objetos** (Número 3 en la figura 7 A), en su caso, pues en ocasiones las preparaciones histológicas se observan sin cubrir o montar. En la figura 7B se observa un portaobjetos con su cubreobjetos, situado entre el objetivo y la platina. Con un cuentagotas se está colocando una gota de aceite de cedro sobre el cubreobjetos para observar la preparación con el objetivo de 100 X.

C) Los **mandos de enfoque** (Números 13 y 14 en la figura 5): Son mandos que desplazan la platina en sentido vertical (en algunos microscopios la platina es fija y lo que se desplaza en sentido vertical es el revolver y los objetivos). El denominado **tornillo macrométrico** (Número 13 en la figura 5) permite un primer enfoque de aproximación mientras que el **tornillo micrométrico** (Número 14 en la figura 5) realiza un enfoque fino y preciso.

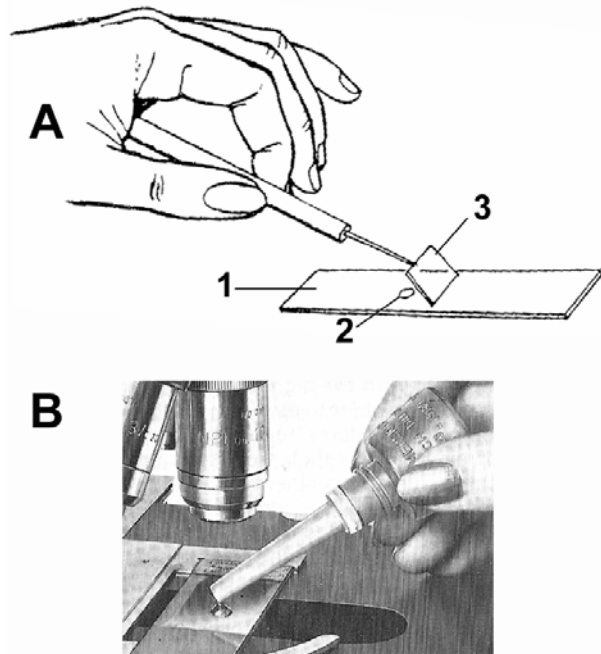


Figura 7. La preparación histológica. En A, se distinguen sus tres componentes: 1) El portaobjetos, 2) el espécimen y 3) el Cubreobjetos. En B se observa una Preparación a la que se añade, sobre el cubreobjetos, una gota de aceite de cedro para observar la preparación con un objetivo de 100 X (objetivo de inmersión)

(Realiza a continuación el ejercicio nº 1)

2.4. El sistema de iluminación:

Son las piezas del microscopio encargadas de iluminar el espécimen para que su imagen pueda ser ampliada por el sistema óptico. En general consta de una **lámpara** (Número 9 en la figura 5) y su correspondiente **transformador** ambos situados en la **base** del microscopio (Número 10 en la figura 5). Un **interruptor** (Número 11 en la figura 5) y un **botón** regulador de la intensidad (Número 17 en la figura 5) controlan la iluminación del espécimen. En algunos microscopios existe también un **diafragma de la lámpara** (Número 7 en la Figura 8) que controla el diámetro del haz luminoso.

(Realiza a continuación el ejercicio nº 2)

2.5. El sistema óptico:

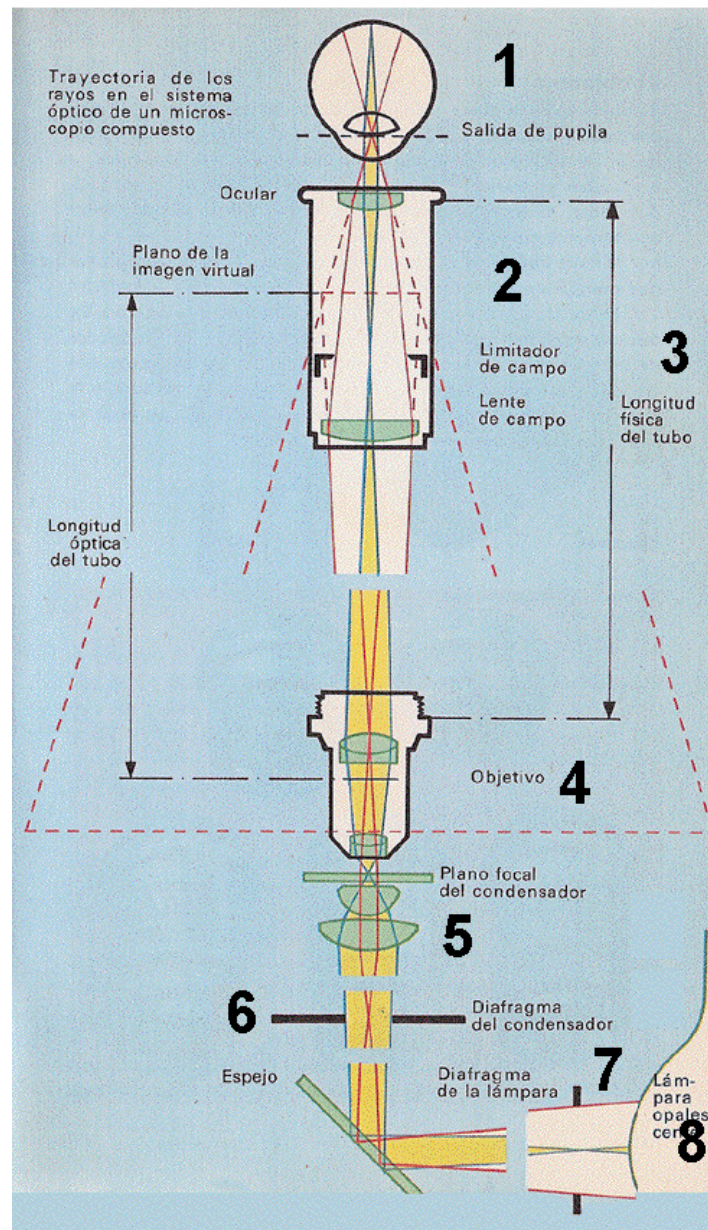


Figura 8: Trayectoria de los rayos en el sistema óptico de un microscopio óptico compuesto. Significado de los números: 1) Formación de la imagen en el globo ocular; 2) trayectoria de los rayos en el ocular; 3) Longitud física o mecánica del tubo del microscopio; 4) Trayectoria de los rayos en el objetivo; 5) Trayectoria de los rayos en el condensador; 6) Diafragma del condensador; 7) Diafragma de la fuente luminosa y 8) Fuente luminosa.

Es el encargado de aumentar las imágenes proporcionadas por los objetos histológicos. Básicamente consta de los **objetivos**, los **oculares** y el **condensador**.

A) El **condensador** (Número 8 en la figura 5 y letra D en la figura 6): Se trata de una pieza con un conjunto de lentes, situada debajo de la platina, cuya misión es concentrar la luz sobre el espécimen, a fin de conseguir una adecuada iluminación del mismo. El condensador se puede desplazar en sentido vertical mediante un mando. Así mismo posee un **diafragma** que mediante una palanca, controla la cantidad de luz sobre el espécimen.

B) Los **objetivos** (Número 5 en la figura 5; número 4 en la figura 8; todos los elementos de la figura 9): Como su nombre indica, el objetivo, es la pieza que posee la lente situada sobre el objeto a observar (Figura 7 B). Los objetivos se encuentran alojados en una pieza giratoria que recibe el nombre de **revolver** (Número 4 en la figura 5; y letras A y B de la Figura 9) y sirven para aumentar la imagen del objeto a estudiar.

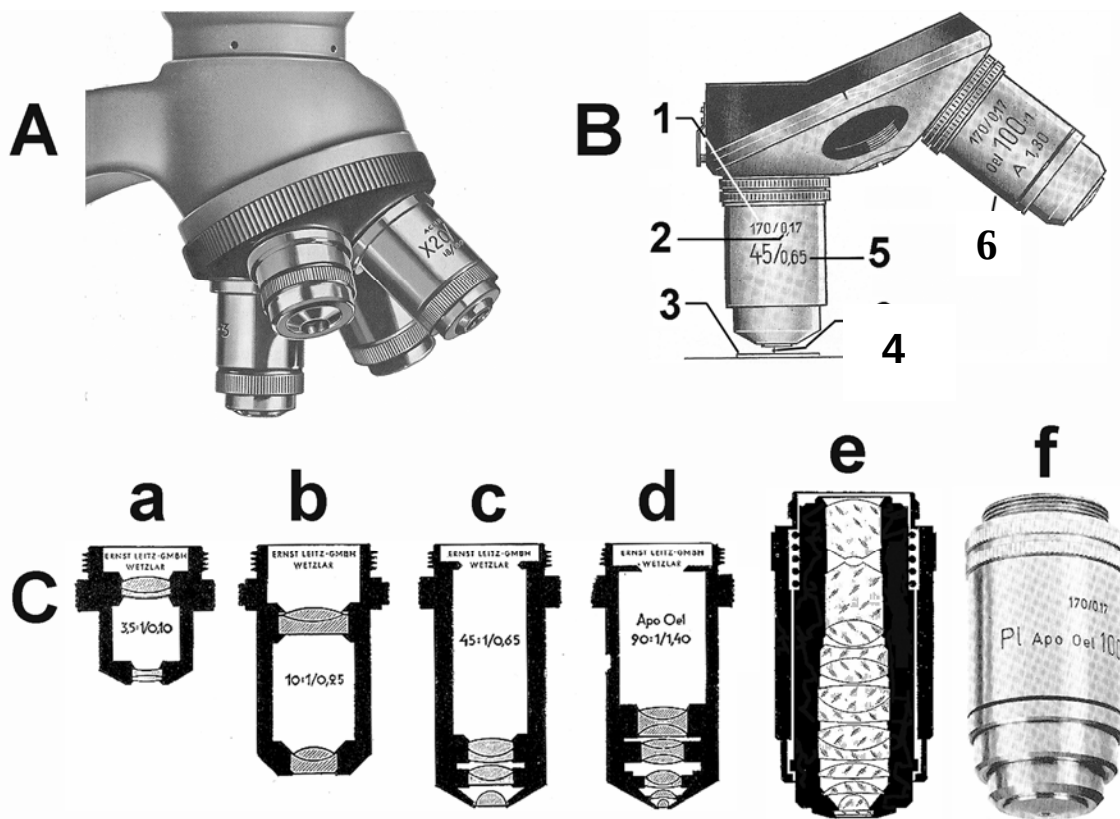


Figura 9: Revolver y objetivos. A) Visión tridimensional de un revolver con todos sus objetivos. B) Revolver con dos objetivos. Se observa el orificio donde se puede insertar otro objetivo. Los números significan lo siguiente: (1) 170 mm, longitud del tubo; (2) El cubreobjetos deberá tener un espesor de 0,17 mm aproximadamente. Si en lugar de un número, aparece un guión (-), el objetivo puede utilizarse con o sin cubreobjetos; (3) Cubreobjetos; (4) Distancia libre de trabajo; (5) 45/0,65; 45 son los aumentos del objetivo y 0,65, la apertura del objetivo. (6) Objetivo de inmersión. C) diferentes tipos de objetivos.

Los objetivos suelen llevar grabados en su cuerpo (Figura 9) una serie de inscripciones (palabras, letras y números) así como una serie de anillos de colores (Figura 10) cuyo significado explicaremos a continuación.



Figura 10: Cuatro objetivos con diferentes aumentos. ¿Sabrías de que aumentos se trata, basándote en el color de sus anillos?. Lee el párrafo siguiente.

Cada objetivo lleva grabado el valor de su **coeficiente de aumento** (Figura 9, letras B y C) o sea la capacidad de aumentar el objeto un número de veces (expresada por un número y por un anillo de color): 1 (negro); 2,5 (pardo); **4** (rojo); 6,3 (anaranjado); **10** (amarillo); 16 (verde claro); **25** (verde oscuro); **40** (azul claro); 63 (azul oscuro); **100** (blanco). De todos los objetivos expresados en la serie anterior los representados en negrita son los de utilización más frecuente. Los objetivos también pueden llevar grabado el valor de su **apertura numérica** (Figura 9, letras B y C) que indica el poder de resolución del objetivo (ver más adelante) y cuyos valores oscilan entre 0.15 y 1.30.

Otras inscripciones en los objetivos son las que hacen referencia a la **longitud mecánica del tubo** y el **espesor del cubreobjeto** (Figura 9 B). La longitud física o mecánica del tubo (Número 3 en la Figura 8) es la distancia entre la superficie de la rosca del objetivo hasta la base del ocular. En el ejemplo de la figura 9 B este valor es de 170 mm. El espesor óptimo del cubreobjeto es de 0,17 mm aunque dependiendo de la apertura numérica del objetivo este puede ser diferente. Este valor se encuentra grabado también en el objetivo, a la derecha del valor de la longitud mecánica del tubo (Figura 9 B), separado de él por una barra (170/0,17). Si en lugar de 0,17 encontramos un guión (/--) quiere decir que el objetivo es insensible a las variaciones de espesor del cubreobjeto; si lo que está grabado es /0, quiere decir que está corregido para un cubreobjeto de espesor 0, o sea, para preparaciones sin cubrir.

Los objetivos que no tienen más datos grabados son la mayor parte de los **acromáticos**. Otros objetivos pueden llevar escrito el grado de corrección de las aberraciones cromática y esférica u otras especificaciones acerca de las características de sus lentes. En este sentido y a modo de ejemplo presentamos algunas denominaciones inscritas en los objetivos:

Plan (Planacromático): Objetivo que solo tiene corrección esférica. Objetivo acromático con aplanamiento de la imagen.



NPL: Objetivo plano normal.

Neofluar: Objetivo con apertura incrementada, mejor reproducción de los colores, elevado contraste pero sin aplanamiento de la imagen.

Planapo (Planapocromático): Con aplanamiento de la imagen y máxima corrección cromática y de apertura. (Figura 9 C, letras d y f).

Ultrafluor: Objetivo especial para microscopio de luz ultravioleta, corregido para la longitud de onda entre 230 y 700 nm.

Epiplan: Objetivo para microscopio de luz reflejada, con aplanamiento de la imagen para iluminación en campo claro.

Epiplan HD: Objetivo para microscopio de luz reflejada, con aplanamiento de la imagen, iluminación en campo claro y en campo oscuro, con condensador anular de espejo o de lente.

POL: Objetivo exento de tensiones, para microscopia de luz polarizada.

Ph 2: Objetivo de contraste de fases para diafragma 2 de los condensadores de contraste de fases.

Phaco: Objetivo para contraste de fases.

m.I.: Objetivo con diafragma iris, apropiado también para luz transmitida y campo oscuro.

Korr: Objetivo con gran apertura con corrección regulable de acuerdo con los espesores del cubreobjeto.

En objetivos de grandes aumentos y con gran apertura numérica y, raramente, en objetivos pequeños especiales, se coloca entre estos y el objeto de estudio un medio fluido (Figura 7 B y Figura 12). Según el medio utilizado el objetivo lleva los siguientes anillos de colores próximos a las lentes frontales así como las siguientes palabras inscritas: **Oel** (aceite de inmersión, anillo negro, índice de refracción = 1,515; Ver la figura 9 C, letras d y f), **W** (agua; anillo blanco, índice de refracción = 1,333), **Glyz** (glicerina, anillo anaranjado, índice de refracción = 1,455), **Methylenjodid** (yoduro de metileno, anillo amarillo, índice de refracción = 1,740), etc. con índices de refracción igual al del vidrio con el fin de corregir la refracción que se produce al pasar la luz desde el objeto hasta el objetivo a través del aire. En la practica solo suele utilizarse el aceite de inmersión con objetivos de 100X.

Actualmente los objetivos están **parfocalizados** o igualados. Esto quiere decir que al pasar de uno a otro no es necesario buscar de nuevo el plano de nitidez. Esto significa que han sido construidos óptica y mecánicamente de tal forma que la distancia entre la preparación y la imagen intermedia producida por el objetivo, es siempre constante.

C) Los **oculares** (Figura 5, número 1; Figura 8, número 2; Figura 11): Llamados así por situarse próximos a los ojos, se encuentran en la parte alta del microscopio, en el extremo superior del **tubo** (Número 2 en la figura 5) que arranca del **cabezal** (Número 3 en la figura 5) donde se encuentran además un sistema de **prismas** para dirigir la trayectoria de la luz desde los objetivos a los oculares.

Los oculares aumentan por segunda vez la imagen (figura 8) según un factor que se puede ver grabado en la superficie del anillo giratorio (5X, 8X y 12,5X; Figura 6, letra F). Además también podemos ver grabado, junto al factor de aumento, el valor de su **índice de campo visual**. El campo visual de un ocular es la superficie de la imagen intermedia del tubo, formada por el objetivo, observada a través del ocular. Esta superficie se verá ampliada por el factor del ocular, es decir, por el valor del aumento expresado en el *anillo giratorio del ocular*. Así, el diámetro de una imagen de un ocular con los valores 10/18 (el 10 indica los aumentos y el 18 es el índice de campo visual) será de 180 mm a una distancia de 250 mm.

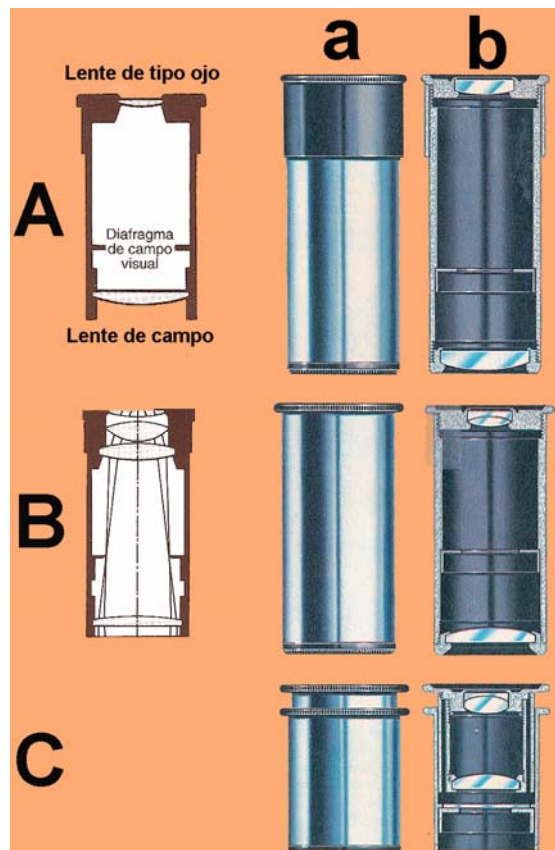


Figura 11: Tipos de oculares. A) Ocular de Huygens para objetivos acromáticos normales (tipo C). B) Ocular compensador para objetivos apocromáticos (Tipo Kpl). C) Ocular Kellner con retículo.

El diámetro real de la superficie observada se calcula dividiendo el diámetro del campo visual (o sea el índice del campo visual) por el aumento del objetivo (y eventualmente por el factor de tubo). Así, con un ocular de 10/18 y un objetivo de 25/0,56 el diámetro de la superficie observada es de $18:25 = 0,72$ mm.

Los oculares se introducen en el tubo por simple deslizamiento y pueden separarse o juntarse para adaptarse a la distancia interpupilar de cada sujeto. El grado de separación se puede comprobar en la escala existente entre los dos oculares. Cada ocular posee un **anillo giratorio** (Figura 11) para corregir los defectos de refracción del ojo del usuario.

Antes se necesitaban oculares para objetivos de bajos y altos aumentos. En la actualidad ya no son necesarios. No obstante podemos distinguir dos variedades: oculares C, empleados con los objetivos acromáticos y oculares Kpl (Kompens-plans) para el resto de los objetivos (Figura 11).

(Realiza a continuación los ejercicios nº 3 y 4)



3. CARACTERÍSTICAS QUE DEFINEN LA CALIDAD DE UN MICROSCOPIO OPTICO:

Cuatro son las características que definen la calidad de un microscopio compuesto: La **luminosidad**, el **poder de definición**, el **poder de penetración** y la **potencia**.

3.1. La **luminosidad** es la cantidad de luz que alcanza al ojo del observador. Las imágenes deben poseer buena iluminación la cual depende del sistema de iluminación del microscopio y de la calidad del sistema óptico.

3.2. El **poder de definición** que es la capacidad de proporcionar imágenes con contornos nítidos. Esta también depende de la calidad del sistema óptico. Un microscopio definirá bien cuando tenga objetivos apocromático y oculares compensados, es decir cuando se hayan corregido las aberraciones de esfericidad y cromática.

3.3. El **poder de penetración** que es la capacidad de permitir la observación simultanea de dos o más planos en el objeto observado.

3.4. La **potencia** total del microscopio que se calcula multiplicando la potencia (aumentos) del objetivo por la potencia del ocular y por el factor de tubo (normalmente igual a 1, si la longitud del tubo es la correcta, generalmente de 160 mm y si no hay ninguna lente intermedia). En el caso de un objetivo 25/0.55 y un ocular 10X/18, con un factor de tubo 1, la potencia del microscopio es de $25 \times 10 \times 1 = 250:1$. La potencia depende del poder de resolución del microscopio.

Por **poder de resolución** de un sistema óptico (Figura 4 y Figura 12) entendemos su capacidad para distinguir como distintos y separados dos puntos muy próximos entre si. Es pues su capacidad de reproducir detalles. El **límite de resolución** de un microscopio se define como la distancia mínima a partir de la cual ya no es posible distinguir la separación entre dos puntos. El poder de resolución de un microscopio óptico y por consiguiente su límite de resolución se calcula con la formula recogida en la figura 12. En dicha figura se ve como el poder de resolución depende de la longitud de onda de la luz empleada (Figura 13), del índice de refracción (n) del medio por el que pasa la luz (Figura 14) y del ángulo de desviación (θ) que esta sufre y por lo tanto de la apertura numérica (AN) del objetivo.

Figura 12: Formula del poder de resoluci3n (PR) y de la apertura num3rica (AN) de un microscopio 3ptico compuesto:

$$PR = \frac{0,61 \lambda}{n \sin \theta}$$

Donde,

0,61 = Constante

λ = Longitud de onda de la luz usada

n = Indice de refracci3n del medio

$\sin \theta$ = seno del 3ngulo θ

$n \sin \theta$ = apertura num3rica

En la figura 13 recogemos las longitudes de ondas para la luz de diferentes colores y en la Figura 14 el significado del 3ngulo θ

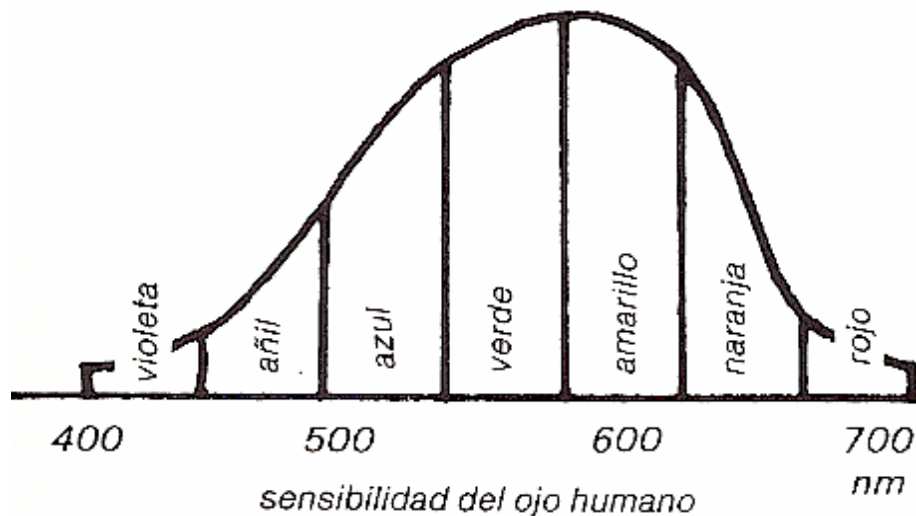


Figura 13: Longitudes de ondas para la luz de diferentes colores.

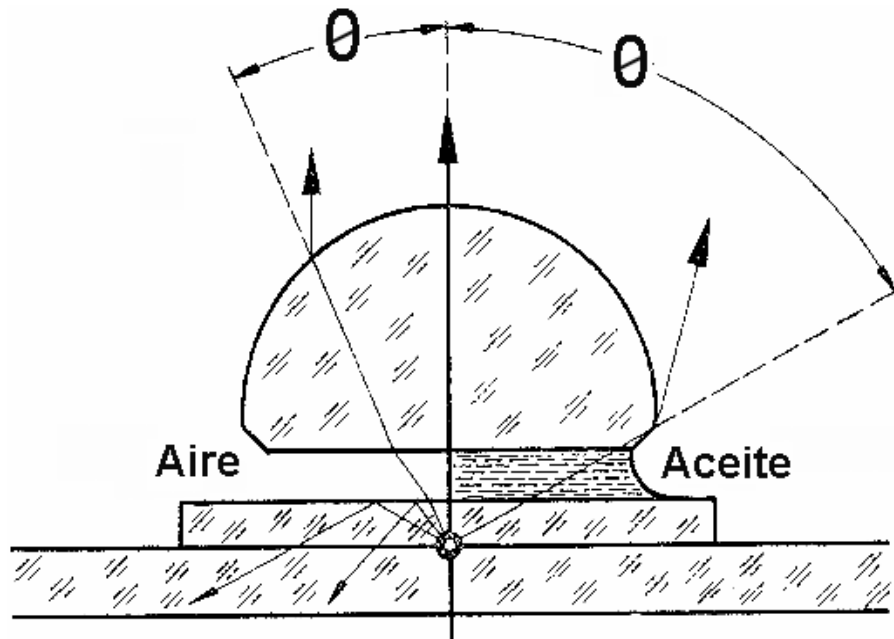


Figura 14: Ejemplo de lo que se gana en apertura numérica (AN) con la inmersión en aceite (derecha) frente a un objetivo seco (izquierda). θ es la mitad del ángulo del cono de rayos colectores para el objetivo

(Realiza a continuación, los ejercicios nº 5 y 6)

4. MANEJO DEL MICROSCOPIO OPTICO:

Una vez que te has familiarizado con el microscopio ya estás en condiciones de realizar observaciones a través de él. Para ello

REALIZA A CONTINUACION EL EJERCICIO Nº 7

5. NORMAS PARA LA OBSERVACION DE LAS PREPARACIONES A TRAVES DEL MICROSCOPIO OPTICO:

1) Con el objetivo de menor aumento (4X) recorre toda la preparación ayudándote con los mandos 4 y 5 de la figura 1 hasta que localices la estructura que te interese observar. Para ello desplaza la pletina de derecha-izquierda y de delante-atrás.

2) Una vez localizada la estructura enfoca e ilumina la preparación como hemos indicado en el apartado anterior. Cambia al siguiente objetivo y vuelve a enfocar. Sigue esta metódica con el resto de objetivos. ¡¡¡ATENCIÓN!!!, con el objetivo de 40X y superiores, una vez seleccionada la zona a observar, el enfoque se realizará solo con el micrométrico pues si se utiliza el macrométrico se puede romper la preparación.



3) Para utilizar el objetivo de inmersión, una vez enfocado e iluminado convenientemente el campo con el objetivo de 40X, gira el revolver lateralmente de tal suerte que quede en una posición intermedia entre el objetivo de 40 y el de 100X. Pon una pequeña gota de aceite de inmersión sobre la zona del espécimen a observar, es decir sobre la zona iluminada por el haz del condensador, a continuación gira el revolver hasta poner el objetivo de 100X sobre dicha zona iluminada. Enfoca la preparación utilizando exclusivamente el micrométrico. Una vez finalizada la observación con el objetivo de inmersión límpialo así como la preparación con alcohol-éter y un papel suave.

4) Terminada la observación limpia los objetivos, oculares y la preparación. Coloca el objetivo de 4X en posición de observación, baja la intensidad de la luz, apaga el microscopio mediante el interruptor, desconecta la fuente de alimentación y cubre el microscopio con su funda.

(Realiza a continuación el ejercicio nº 8)