



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

**Uso de Técnicas Microscópicas y
Moleculares en la Interpretación de la
Enfermedad.**

T E S I N A

Que para obtener el Título de:

CIRUJANA DENTISTA

Presenta:

Alejandra García Hernández.

DIRECTORA

Dra. Elba R. Leyva Huerta.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Elba R. Leyva Huerta', is written over the name of the director.

MÉXICO, D.F.

2004



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA**

A mi casa de estudios la Universidad Nacional Autónoma de México que me ofreció un mundo de oportunidades y conocimientos.

A todos los profesores que a lo largo de este camino han sabido impulsarme y apoyarme.

A mi asesora la Dra. Elba Leyva por su apoyo al realizar este trabajo.

A mi Mamá: Gracias por darme la vida, por amarme, cuidarme y apoyarme en todo momento a pesar de las diferencias, por ser un ejemplo.

A mi papá: Gracias por darme la vida, por amarme, cuidarme, por respetar mis decisiones, por darme seguridad y apoyo.

A mis hermanas: Por siempre estar en el lugar y momento adecuado, por existir, por sus consejos y cariño.

A mi hermanito: Por ser libre, por sus pláticas, por su apoyo en las unidades de medida, por quererme.

A la niña más linda Kenia: Por ser la alegría y orgullo de la familia, por su cariño y ternura.

A mis abuelos maternos: a Chenchita, por su ejemplo, por su lucha, por su grandeza.

A mis abuelos paternos que desde el cielo saben que todo esto es por su cariño incondicional.

A mi tía Julia en especial por su ternura, consejos y por su entrega hacia los demás.

A Martita y al "Profe" por apoyo comprensión y cariño.

A todos mis amigos y amigas que si quisiera hacer una lista sería más grande que el propio trabajo. En especial a Odin (por ser tan especial), Bicho, Jazmín, Adriana, Wendy, Cristina, (por compartir los momentos más felices y difíciles en la carrera), Anayté, Bere, Olivia, Quique, Pepe, Guicho, Jovan, J. Arturo, Carlillos, Silva, Adrián, Tathi, Viri, Álvaro, a todos los del grupo 4 de la FO de mi generación.

Uso de técnicas Microscópicas y Moleculares en la Interpretación de la Enfermedad.

INDICE

INTRODUCCIÓN

1. Microscopía.....	4
2. Microscopia Óptica.....	5
2.1. Microscopia de Campo Claro.....	10
2.1.1. Microscopia de Campo Oscuro.....	14
2.1.2. Microscopia de Interferencia.....	16
2.1.3. Microscopia de Contraste de Fases.....	17
2.1.4. Microscopia de Fluorescencia.....	21
3. Microscopia Electrónica.....	24
3.1 Microscopia Electrónica por Transmisión.....	26
3.1.1 Microscopia Electrónica de Barrido.....	39
3.1.2 Microscopia Confocal.....	46
4. Biología Molecular.....	51
4.1 Hibridación in situ.....	52
4.1.2. Fluorimetría.....	59
4.1.2.1. Citometría de Flujo.....	60
4.1.3. Reacción en Cadena de la Polimerasa.....	76

CONCLUSIONES

BIBLIOGRAFÍA

GLOSARIO

INTRODUCCIÓN.

Este trabajo consiste en una recopilación de la información que pretende describir las distintas y principales técnicas, Microscópicas y Moleculares, así como sus objetivos, usos y aplicaciones dentro del campo de la Medicina, la Genética, la Inmunología, la Biología y la Odontología.

Estas técnicas nos permiten estudiar diferentes enfermedades, desde sus inicios hasta su evolución dentro del organismo humano por medio del análisis o estudio de unas cuantas células.

Entre las técnicas mas importantes tenemos a la Microscopia Óptica, de Campo Claro, de Campo Oscuro, de Interferencia, de Contraste de Fases, de Fluorescencia, la Microscopia Electrónica, por Transmisión, de Barrido, y la Confocal, entre las Moleculares tenemos la Hibridación in situ, Citometría de Flujo y la Reacción en Cadena de la Polimerasa.

Este conjunto de técnicas tienen como propósito común ser un auxiliar en el Diagnóstico, Pronóstico y en algunas ocasiones en el Tratamiento de la enfermedad.

1. Microscopia.

El Microscopio⁵ fue el primer instrumento que se utilizó para estudiar la microestructura de los organismos y sus orígenes se remontan a la civilización asiria (a. de C.) con el uso de la lupa.

Los médicos griegos y romanos conocían las lentes biconvexas, sus propiedades y las usaban para observar tejidos enfermos, miopía, etc.

En el siglo XIII, Roger Bacon estudió y estableció las propiedades de las lentes biconvexas y se refirió a ellas como las lentes que incrementan el ángulo visual.

Galileo y Georges Haefnagel (siglo XVII) observaron insectos.

Descartes y principalmente el holandés Anthony Van Leeuwenhoek⁷ promovió la microscopía. Este último pulía las lentes planoconvexas y biconvexas para sus microscopios simples, logrando ampliaciones de 30 a 200 veces. Fue el primero en observar y dibujar protozoarios, células sanguíneas, espermatozoides y descubrió las bacterias.

Los primeros microscopios simples fueron construidos en el año 1662 por Hartsoeker, en 1664 por Leeuwenhoek, en 1702 por Wilson y en 1716 por Joblot y estaban constituidos por una sola lente que se dirigía hacia la luz para que ésta pasara hacia el objeto. En Inglaterra otros ensayos fueron realizados por Brewster, Goring y en Francia por Chevalier, donde se llegaron a utilizar diamantes para tallarlos y su alto precio impidió que se prosiguiera con ellos. W. De Hyde Wollastone (766-1826) aplicó el sistema de doblete a la microscopía, el cual consistía en dos lentes separadas con líquido, lo cual permitía reducir las aberraciones y tener mejores ampliaciones.

Otros científicos como Brewster, Charles, Lord Stanhope, Divini, Wilson (1702) y Jablot y Swammerdan (1910) siguieron trabajando con dobletes modificados y montados en diversas formas.¹

Gracias a todos los descubrimientos que marcaron el inicio de la microscopía nos llevan a lo que hoy conocemos como los distintos tipos de microscopios entre los cuales podemos destacar por sus usos y aplicaciones en biología molecular y particularmente en odontología a los Microscopios Ópticos como son: de luz (campo claro), de Contraste de Fases, de Campo Oscuro, de Interferencia, de Fluorescencia, los de Microscopía Electrónica que a su vez presentan ciertas variantes como son: el de Transmisión, de Barrido y el Confocal por lo que tenemos un gran avance en la interpretación de las enfermedades²

Así que el microscopio cuya función es la observación y estudio de objetos pequeños y preparaciones, es sin duda, el instrumento óptico más importante en los laboratorios, hospitales, centros de educación e investigación. Se utiliza sobre todo en las ciencias naturales (fisiología, geología y medicina) y también en metalurgia.¹

Siendo un instrumento que amplifica la imagen de un objeto pequeño. Mediante un sistema de lentes y fuentes de iluminación se puede hacer visible un objeto microscópico. Los microscopios puede aumentar de 100 a cientos de miles de veces el tamaño original.²

2. Microscopía Óptica

El microscopio óptico⁵ es un instrumento mecánico que modula energía y amplifica el ángulo de visión humana para producir imágenes amplificadas de un objeto cualquiera permitiendo ver el objetivo más grande. El tamaño del objeto se obtiene multiplicando la amplificación del objetivo por la del ocular, mientras que la calidad y la nitidez de la imagen depende del objetivo, ya que la amplificación del ocular no da más detalle pues sólo produce una imagen mayor.¹

Componentes del Microscopio Óptico:

Está formado principalmente por tres sistemas: mecánico, óptico y de iluminación.

a) Sistema mecánico: La parte mecánica o cuerpo del microscopio consiste en un armazón metálico que sostiene al sistema óptico y en ocasiones, al de iluminación. Está compuesto por: un soporte (pie o base y el brazo), platina (el lugar donde se deposita la preparación), controles de enfoque [tornillos macrométricos (aproxima el enfoque) y micrométricos (que consigue el enfoque correcto)]²⁵, portaobjetos, portacondensador y portafiltros.

b) Sistema óptico: Consiste en tres juegos de lentes (objetivo, ocular⁶ y condensador⁵) y el tubo que es la parte óptico-mecánica, situada en la parte superior del microscopio (puede ser monocular, binocular y foto-tubo-ocular, a esta última se le puede incorporar una cámara fotográfica o de televisión). Los microscopios que se usan normalmente en microbiología e histología están equipados con tres objetivos: bajo poder, alto poder y objetivo de inmersión (aceite, glicerina, agua, etc.)

1. El objetivo es la pieza más importante del microscopio, ya que controla el aumento y la calidad de la imagen, están montados sobre una pieza que se llama revolver que puede rotarse para alinear el objetivo deseado con el condensador.² Los objetivos tienen características propias en cuanto su grado de corrección a las aberraciones como por ejemplo son: objetivos acromáticos que presentan una imagen sin visos y colores del arco iris, objetivos plano acromáticos que presentan una imagen con aplanamiento sin visos y colores del arco iris, objetivos plano apocromáticos que presentan una imagen de máxima corrección sin visos y colores del arco iris, de máxima apertura numérica y con aplanamiento, el objetivo neofluar que está fabricado con lentes de fluorita, con apertura incrementada, reproduce mejor los colores, eleva el contraste pero sin aplanamiento de la

imagen. Y por último los objetivos plan-neofluar con apertura incrementada, que mejoran los colores, elevando el contraste con aplanamiento de la imagen.²⁵ Los objetivos presentan las cifras de aumento grabadas en un lado, en primer lugar se expresa el aumento, que se reconoce porque las casas distribuidoras ponen un código de color en la parte superior para facilitar al usuario el coeficiente del aumento del objetivo en uso, la segunda cifra indica la apertura numérica de la lente, las terceras cifras serian aquellas como 160/0.17 (la cifra 160 expresa la longitud del tubo (mm) con el que se debe utilizar y 0.17, indica el espesor requerido del cubreobjetos), por último estaría inscrito su medio de inmersión (si no esta la indicación el medio de inmersión es el aire), que puede ser aceite, glicerina, agua, etc.

2. El ocular es por donde se examina y amplifica la imagen producida por el objetivo, los oculares están situados en el tubo siendo la parte final externa. Tienen aumento propio (4X, 5X, 6.3X, 8X, 10X, 12.5X, 16X, 20X o 25X), también cuentan con un diámetro de campo visual que es un número precedido de una diagonal posterior al aumento, por ejemplo 10X/20, (20 sería el diámetro). Principalmente se utilizan: el de Huygens, para conjunción con objetivos acromáticos normales y el compensador, para objetivos apocromáticos.^(1,6)
3. El Condensador permite una iluminación correcta del objeto, o sea, un cono de luz tamaño y naturaleza adecuados para resultados óptimos,⁶ está provisto de varios elementos como: el lente auxiliar (evita la pérdida de luz), el lente condensador, de diafragma de iris o de contraste (elemento que nos permite contrastar la imagen, mejorando los detalles gráficos en la preparación) y la lente frontal (con la que se logra que la preparación aparezca uniformemente iluminada).

c) Sistema de iluminación: Esta compuesto por una fuente luminosa o lámpara y diafragma de la lámpara (no todos lo tienen, su función es regular el diámetro de la emisión de la luz⁵ a fin de que se ilumine sólo el área del campo visual)

Puede ser suministrada esta iluminación por luz externa y un espejo que la dirige hacia arriba o por una lámpara colocada en la base (las usadas son las de incandescencia con filamento y placa de tungsteno-halógeno de bajo voltaje)²⁴

En la figura 1 podemos observar las diferentes partes que componen este tipo de microscopía³¹

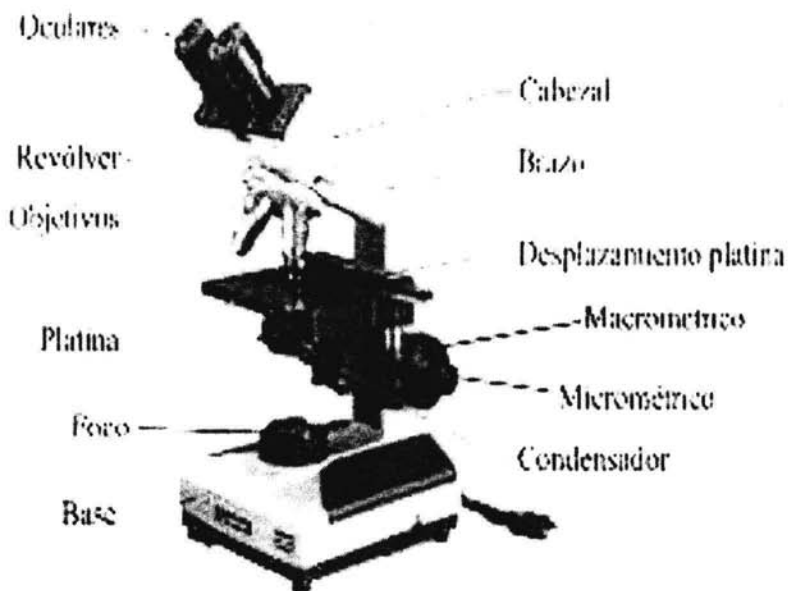


Figura 1 Partes del Microscopio Óptico de arriba hacia abajo, ocular, cabezal, revolver, brazo, objetivos, platina, tornillo macrométrico, tornillo micrométrico, condensador, foco y base. Tomado de www.oseacortes.com/practicas/microscopio.htm

En el examen microscópico de células vivas, es conveniente obtener un preparado permanente (láminilla) en el cual las células quedan preservadas, en tres etapas que son: fijación, tinción o coloración y corte.

Primera Etapa: La fijación tiene por objeto evitar la autólisis²⁸, que es la destrucción de la célula por sus propias enzimas, impedir la actividad y la proliferación de las bacterias, endurecer las células, para que resistan mejor las siguientes etapas de la técnica, aumentar la afinidad de las estructuras celulares a los colorantes, para que sea más fácil colorearlas.

Puede efectuarse por medio del calor (bacterias), pero es más empleada la fijación química, mediante sustancias llamadas fijadores por ejemplo el cloruro de mercurio (que precipita las proteínas), mientras que otros solamente causan su coagulación, como es el formaldehído, el glutaraldehído, el tetraóxido de osmio.

Segunda Etapa: Los cortes se hacen en secciones muy finas (espesor de 3 a 6 micras)²⁶ en un aparato llamado microtomo. Para su corte se incluyen en ceras o parafinas para proteger la muestra y se utilizan cuchillas de acero altamente afiladas, estos cortes permiten el estudio de estructuras complejas, a través de la imagen directa de las capas profundas.²⁸

Tercera Etapa: La tinción o coloración se lleva a cabo porque casi todos los organismos son incoloros, la mayoría de los colorantes histológicos se comportan como bases o como ácidos. Las moléculas ácidas como el ADN y ARN son basófilas, esto es, que tienen afinidad por los colorantes básicos, por ejemplo: el azul de toluidina y el azul de metileno, la hematoxilina. Los colorantes ácidos como la eosina, naranja G y fucsina ácida tiñen principalmente los componentes básicos de las proteínas citoplasmáticas. La coloración de las células se debe a la combinación de los colorantes con las proteínas que las componen.

2.1 Microscopia de Luz, Campo Claro (fotónico)

Generalidades.

En este tipo de microscopia se usa como fuente de luz directa una bombilla o bien la luz solar, para poder observar cualquier tipo de microorganismo debemos recordar que estos son transparentes por lo que es difícil distinguirlos y hay que teñirlos², uno de los principales problemas de las tinciones es que no pueden utilizarse con células vivas, pues son tóxicos, o las condiciones de tinción lo son, o no pueden penetrar a la célula.²⁷ En la **figura 2** se muestra un corte histológico teñido con hematoxilina y eosina.

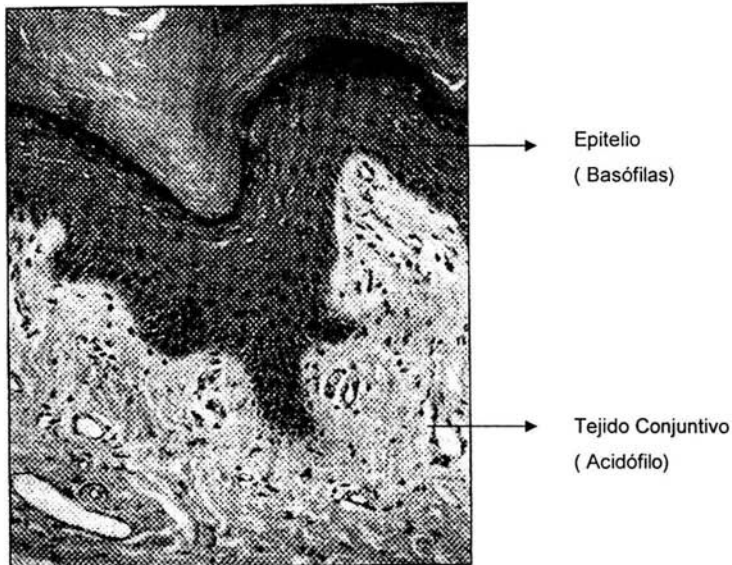


Figura 2. Sección de piel humana teñida con una combinación de colorantes de eosina y hematoxilina. Tomada de Biología Molecular de la Célula, Bruce, 1994.

Los Microscopios de este tipo producen un aumento de 1000 veces el tamaño original y su límite es de 2000 veces aproximadamente.

El límite de resolución esta determinado por la longitud de onda de la luz visible, que abarca desde 0.4 μm (violeta) hasta 0.7 μm (rojo)

Técnica y procedimiento

Este tipo de microscopio básicamente esta constituido por:

Una fuente de luz de brillo uniforme

Un soporte del objeto y una lente de aumento corregida para las diferentes aberraciones

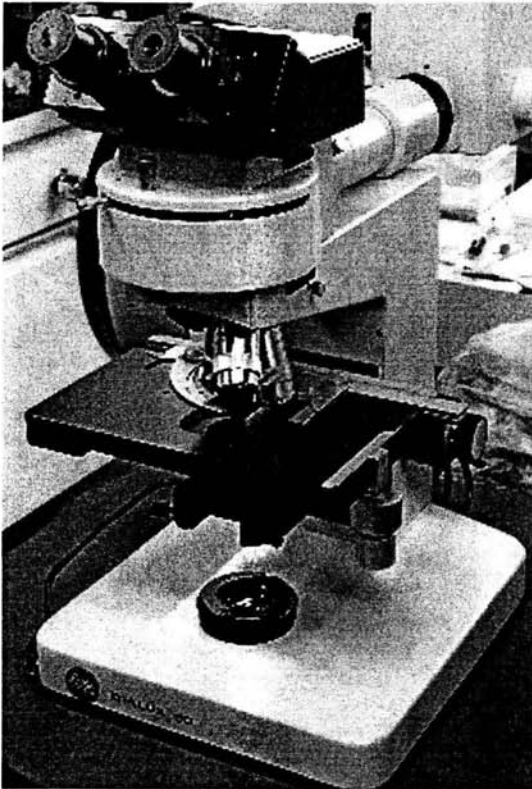


Figura 3. Microscopio fotónico. Cortesía del laboratorio CENICA de la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa.

Una vez que se cuenta con todo el equipo necesario se prepara la muestra para su estudio:

1. Se fija (por lo que se inmovilizan todas las sustancias macromoleculares, para que se mantengan lo más cerca posible la estructura de la célula en vida).
2. Posterior a esto se deshidratan los tejidos, en acetona y se incluyen en cera, lo cual proporciona un soporte mecánico para el corte que se realiza en el microtomo.
3. Posterior al corte las preparaciones se sumergen en tolueno y xilol, para eliminar la cera y en condiciones de ser teñidos.
4. Ya que se realiza la tinción, se monta un cubreobjetos sobre el tejido y la preparación está casi lista para ser observada.²⁷
5. Para poder observarse en el microscopio la iluminación del objeto tiene que satisfacer dos condiciones:

1ª Tiene que proporcionar un haz de luz cuya divergencia, cuando salga del plano del objeto, sea por lo menos tan grande como el ángulo formado por el lente y un punto del objeto, (la luz incidente tiene que llenar la apertura numérica del objetivo).

2ª La iluminación debe ser uniforme a través de la muestra y tiene que ser posible controlar la intensidad y eliminar la luz dispersada.

Para conseguir estas condiciones se emplea una fuente de luz de pequeñas dimensiones, que se enfoca a un área muy pequeña, utilizando un juego de lentes montados sobre una sola unidad denominada condensador, que es simplemente un objetivo que funciona con la trayectoria de la luz invertida.

Existen tres tipos básicos de condensadores para este tipo de microscopia: el de Abbé (con dos lentes separadas por aire)³, el aplanático (los cuales son intercambiables a todos los efectos) y el acromático (que mejora la corrección del color). El condensador se utiliza tanto para la iluminación crítica como para la Iluminación de Köhler.

En la iluminación crítica la fuente de la luz se enfoca mediante las lentes del condensador, de tal forma que el objeto quede iluminado por un cono de luz, o sea, que la posición del condensador respecto al objeto, se ajusta de manera que el área iluminada sea lo más pequeña posible, observando con el ojo desnudo, y tan brillante como sea posible si se observa a través del ocular y el objetivo, cuando esta enfocado sobre el objeto, esta técnica requiere de un pantalla difusora delante de la fuente de luz para evitar la formación de la imagen de la estructura del filamento de la bombilla sobre el objeto.⁴

La iluminación Köhler es más intensa y se controla de forma precisa. Entre la fuente de luz y el condensador se coloca una lente accesoria, llamada lente de campo, la cual forma una imagen de la fuente lumínica en el plano focal del condensador como haces paralelos. Atraviesan el objeto con varios ángulos, que se incrementan según lo hace la distancia de los puntos de la fuente luminosa al eje óptico, por lo tanto el objeto es iluminado por un juego de haces que constituyen un cono de luz. El condensador puede ajustarse de tal manera que la imagen de la lente de campo se forme en el plano focal posterior del objetivo, se logra disminuyendo el diafragma de iris de campo y enfocando sobre el objeto con el condensador, esto proporciona una iluminación uniforme como la de la lente de campo^(1,4)

Usos y aplicaciones.

Las aplicaciones de este tipo de microscopia son: Para la detección de microorganismos celulares, su unidad estructural, su crecimiento, las características de los cromosomas durante la mitosis de células animales, vegetales y humanas, al observar por este tipo de microscopio se pueden identificar preparaciones teñidas para detectar un sin fin de enfermedades.

Figura 3. Ejemplo de un Microscopio de luz.

2.1.1 Microscopia de Campo Oscuro.

Generalidades

Para este tipo de microscopia es necesario usar un condensador y objetivo especial que suministra luz oblicua, la cual no penetra ni asciende en el tubo del microscopio a menos que sea desviada o dispersada por el objeto.¹ Evitando que la luz del condensador llegue al objetivo, se logra un fondo oscuro sobre el cual pueda resaltar la muestra iluminada². De modo que en la técnica de iluminación de campo oscuro, sólo se pueden distinguir la forma y el tamaño de la cubierta externa del objeto, pudiendo distinguir si es móvil o no, pero la estructura interna permanecía invisible³

Técnica.

Es necesario contar con:

Condensador especial de campo oscuro.

Montura centrable

Diafragma de iris en el objetivo

Iluminación de gran intensidad

Portaobjetos de 1,2 mm de grueso

Aceite de inmersión

Ya que se cuenta con todo lo anterior se procede a:

1. Dirigir la luz hacia el fondo del condensador completamente abierto. Mirando el condensador por encima, se puede ver si toda la parte superior está iluminada por igual.
2. Se aplica una gota de aceite de inmersión que no contenga burbujas de aire, en la parte superior del condensador, usando el control de enfoque que esta por debajo de la platina, se baja este hasta que la parte superior de la platina quede por debajo del nivel.
3. Se coloca la preparación en la platina, sujetándola con las pinzas.

4. Se sube el condensador hasta que el aceite entre en contacto con la parte de abajo de la preparación y se sigue subiendo despacio hasta que el aceite se extienda por el borde de la parte superior del condensador.³
5. Usando el objetivo de 16 mm, se enfoca el objeto. Con toda probabilidad se verá un anillo luminoso con pequeñas partículas iluminadas (polvo) con un centro negro.
6. Usando los controles del cerrado, se ajusta la posición del condensador hasta que el anillo luminoso esté en el centro del campo.
7. Entonces se enfoca el condensador, moviéndolo muy delicadamente hacia arriba y hacia abajo, para reducir el anillo de luz a un disco sólido de luz, cuyo diámetro sea lo más pequeño posible.
8. Por último levantamos el tubo del microscopio y, girando el revolver, ponemos el objetivo de inmersión en aceite en posición. Se aplica una gota de aceite de inmersión a la preparación sobre el centro del condensador. Se baja el objetivo hasta tocar el aceite y, muy suavemente, se completa el enfoque. Esto debería proporcionar un dibujo perfecto sobre campo oscuro.³

Usos y aplicaciones

En general la iluminación en campo oscuro se usa con grandes aumentos, especialmente con objetivos de inmersión en aceite, para la observación de organismos vivos, con el objeto de apreciar su tamaño, forma y movilidad si la tuvieran. Una aplicación importante es el análisis de espiroquetas y tricomonas en enfermedades venéreas.

Es de gran utilidad en el recuento de partículas pequeñas que son difíciles de ver en un campo claro.

Permite observar cualquier objeto que refracte luz, por ejemplo, los contornos de la célula, núcleo, mitocondrias, cilios, gotitas de aceite, vacuolas o inclusiones, además, son visibles los centrosomas, husos y cromosomas.¹

En la actualidad esta técnica se utiliza poco, debido a su escaso poder resolutivo ⁴

2.1.2 Microscopia de Interferencia o Contraste⁵ Diferencial de Interferencia.

Generalidades

Estos microscopios consiguen una total separación de los haces directos difractados usando complejas vías de luz y prismas, siendo caro y difícil de emplear.²⁷ Al igual que la microscopia de contraste⁵ de fases, la microscopia de interferencia es capaz de convertir diferencias de fases en diferencias de intensidad, con la ventaja de que no se produce halo y de que es posible efectuar algunas mediciones cuantitativas.

Técnica

La técnica que se lleva a cabo para este tipo de microscopia consiste en la disposición más efectiva del instrumento (el aparato de Dyson) que emplea un sistema complejo de superficies plateadas y reflectoras que divide la luz que sale de un objeto, de tal manera que una fracción atraviesa el medio circundante y una placa de corrimiento de fase. Cuando se combina esta fracción con la fracción restante de la luz, esto es, la que sufre el cambio de fase, se produce una interferencia.⁴ De esta forma los cambios de fase producidos por las regiones del objeto que tiene diferentes índices de refracción y/o espesor, se convierten en diferencias de intensidad.

Usos y aplicaciones

Al utilizar esta técnica se pueden ver células vivas, en donde se observa la concentración proteica dentro de las mismas, al intensificarse el contraste de

estas por no existir el halo producido por el microscopio de contraste de fases, se pueden ver estos detalles pequeños que no se distinguirían con otro tipo de microscopía.

Teniendo que esta concentración de un material conocido se puede determinar, si se conoce el índice de refracción y el incremento específico de refracción (cambio del índice de refracción por una unidad de cantidad de soluto)⁴

También se pueden realizar mediciones cuantitativas, pudiendo medir la variación de la trayectoria óptica entre una partícula y el medio circundante

2.1.3 Microscopía de Contraste de Fases.

Generalidades

El microscopio de Contraste de Fases es un tipo de microscopio de Interferencia, pues convierte la diferencia de los índices de refracción en diferencias de intensidad, las cuales ya pueden ser percibidas por el ojo²⁷, se logra sin necesidad de alterar la muestra por tinción o por cualquier otro procedimiento, en este tipo de microscopía se pueden ver células y tejidos vivos en su estado natural, permitiendo ver con bastante detalle y buen contraste aquellos objetos tan transparentes, que con la luz ordinaria son prácticamente invisibles³, Mediante el condensador y un objetivo especial se controla la iluminación siguiendo diferentes rutas a través de las distintas partes de una célula. El resultado es una imagen con diferentes grados de brillo y oscuridad. Con este método, el material denso aparece brillante, mientras que las partes de la célula que tienen una densidad cercana al agua (citoplasma) aparecen oscuras. La desventaja biológica más grande en este tipo de microscopios es que sólo sirve para ver células aisladas o pequeñas

capas de estas, también existe una pérdida de resolución y diferentes tipos de halos, sombras que son el resultado de bordes o límites en donde tienen lugar cambios bruscos de los índices de refracción.²⁷

Técnica.

La microscopia de contraste de fases puede realizarse tanto con microscopios monoculares, como binoculares y los objetivos que se utilizan para esta técnica se les incorpora una placa de fase como es el caso de la serie acromática de 16,4 y 2 mm (de inmersión en aceite) y los objetivos de fluorita de 3,6 y 2 (ambos de inmersión en aceite), en general estas placas para fase están pensadas para producir una fase positiva, con las que se obtiene que las partes más gruesas y refractables del objeto aparezcan oscuras.

El sistema básico del microscopio de contraste de fases es:

Una lámpara con condensador y control de intensidad

Un disco anular, situado en el plano focal posterior del condensador del microscopio

Una placa de fase, colocada en el interior del objetivo en su plano focal posterior (cada objetivo debe tener su propia placa de fase)

Un tubo telescópico auxiliar que se usa para poder ver la placa de fase dentro del objetivo cuando se pone en lugar del ocular normal, ya que con este no puede verse y de este modo puede ponerse la imagen exactamente sobre el anillo oscuro de la placa de fase.

Ya que se cuenta con todo lo anterior se procede a:

1. Dirigir la luz del microscopio, enfocando el objetivo o el condensador o ambas cosas a la vez, deberá verse el diafragma de iris, que estará parcialmente cerrado, y si es necesario se centrará el diafragma y se

corregirá el ángulo de luz de la lámpara para que sea completamente axial.

2. Se colocara la preparación en la platina y, mirando por el ocular normal, se enfoca el objetivo que lleva la placa de fase hasta conseguir un enfoque aproximado del objeto.
3. Se quita el ocular y se inserta el tubo telescópico auxiliar, se enfoca el ocular del tubo telescópico hasta obtener una imagen clara del anillo oscuro de la placa de fase, insertándose el disco anular.
4. Se enfoca el condensador hasta conseguir una imagen clara del disco anular que varía con los cambios de enfoque del condensador, por lo que se tienen que corregir y si es necesario, se debe centrar el soporte del disco anular, y sobreponer el disco anular brillante sobre el anillo oscuro de la placa de fase o hacer que el anillo de la placa de fase rodee el disco anular.³
5. Cuando el disco anular brillante está completamente superpuesto al anillo oscuro de la placa de fase, el microscopio está dispuesto para el trabajo con contraste de fases, entonces, se sustituye el tubo telescópico por el ocular normal.
6. Se hace un retoque final del enfoque del objetivo, algunas veces hace falta realizar un ligero ajuste del enfoque del condensador para producir el máximo contraste, con la mayor parte de los objetos es fácil distinguir con una sencilla observación si el microscopio está en contraste de fases; por el cambio de aspecto que sufre el objeto.
7. Y por último para cambiar la preparación, usando el mismo objetivo, sólo se necesitarán pequeñas modificaciones del enfoque del condensador para compensar el cambio de grosor del portaobjetos (para cada grosor debe subirse o bajarse el objetivo, para que le objeto quede bien enfocado), este movimiento tiene que ser compensado por un movimiento similar del condensador para mantener el anillo brillante sobre el anillo oscuro de la placa de fase

del nuevo objetivo, cada cambio de objetivo requiere también un cambio de disco anular correspondiente.

Usos y aplicaciones.

Antes de la aparición de este tipo de microscopia, la única posibilidad de observar objetos transparentes es su estado natural (sin matarlos o teñirlos), era usando la técnica de iluminación de campo oscuro en la que sólo se distinguía si eran o no móviles, pero la estructura interna permanecía invisible, siendo el contraste de fases la forma ideal para objetos muy transparentes. ^(2,3)

La única condición que debe cumplir la muestra es la de ser y no absorbente, ya que este microscopio se basa solamente en las diferencias de fase, para los objetos absorbentes, las diferencias de intensidad se suman a los efectos de las fases, resultando a menudo un contraste reducido y una imagen de escasa calidad. ⁴

Este tipo de microscopia es de gran valor para poner de manifiesto los organelos de las células vivas, teniendo así, que el núcleo contrasta fuertemente con el citoplasma, distinguiéndose con facilidad componentes citoplasmáticos (mitocondrias, vacuolas y gotas de grasa) El nucleolo y los cromosomas son especialmente visibles, las membranas pueden verse claramente como una línea oscura con un halo brillante en cualquiera de los lados, aunque a causa de este, las membranas sencillas no se distinguen con facilidad de las dobles. En objetos pequeños como las bacterias, es difícil observar detalles debido al efecto del halo sobre la pared celular, sin embargo se coloca la bacteria en un medio cuyo índice de refracción sea igual al de la pared celular o al del citoplasma, siendo más fácil distinguir detalles internos, tales como los cuerpos nucleares. ⁴

2.1.4 Microscopia de Fluorescencia:

Generalidades

La base de este tipo de microscopia es la fluorescencia⁵ que presentan ciertas sustancias si se les ilumina o radia con luz de onda corta (ultravioleta, azul), siendo capaces de convertir esta luz de onda corta que es invisible, en la luz de onda larga (verde, amarillo y rojo)² que es visible.

Existen varias sustancias naturales, en particular entre los vegetales (clorofila en tallos y hojas)²⁵, algunas ceras, vitaminas, aceites de inmersión, medios de inclusión o fijación y minerales, que sin ninguna preparación presentan fluorescencia de colores específicos cuando se radian con rayos ultravioleta; denominados fluorocromos (fluorescencia primaria), los cuales se aplican en soluciones muy diluidas (1 por 1000 a 1 por 10 000) a distintos tejidos como una tinción biológica mostrando una especificidad, para distinguirse o identificarse por el tipo de fluorescencia del fluorocromo asimilado (fluorescencia secundaria).³ El hecho de que los colorantes se usen en concentraciones tan diluidas reduce al mínimo los posibles daños a la célula, especialmente células vivas.

Los fluorocromos más utilizados en este tipo de microscopia son: auramina, azul de anilina, naranja de acridina (para ácidos nucleicos)⁴, la tioflavina S, amarillo thiazo G, fucsina, corifosfina O, isotiocinato de fluorescencia y entre los antibióticos la tetraciclina.

Los especímenes de mayor interés en el campo médico-biológico (células, tejidos, cultivos de células) no fluorescen, por tanto hay que ponerlos en condiciones de emitir radiación fluorescente útil, con el propósito de enfatizar las áreas de interés analítico²⁵, muchos objetos tienen muy baja intensidad por lo cual debe buscarse el máximo contraste posible, evitando que la luz del día o de la misma habitación del laboratorio llegue al microscopio, también podemos trabajar en una cámara oscura³ para asegurarnos que la técnica no falle.

Técnica.

Lo primero que se necesita para desarrollar esta técnica es:

Una fuente de rayos ultravioleta de gran intensidad

Una lámpara de descarga de mercurio de alta presión, que se monta en una cápsula bien ventilada con un condensador de lentes de cristal y a veces con un reflector metálico para los rayos que emergen por detrás del condensador, estas lámparas emiten rayos ultravioletas, calor y luz visible al mismo tiempo, por lo mismo tiene que usarse un sistema de filtros de absorción que eviten que el calor de los rayos altere la preparación que no es seca para este tipo de microscopia.³ Para este propósito existen diferentes combinaciones de filtros por ejemplo:

El filtro de Wood, OX.1 (Chance) es transparente a los rayos ultravioletas, pero es opaco a la luz visible, excepto a la luz roja de longitud de onda muy larga, y a los rayos infrarrojos, produciendo de este modo un fondo oscuro.

El filtro de interferencia que reduce el espectro ultravioleta a un banda estrecha, a cuya longitud de onda el cristal es bastante transparente y las sustancias fluorescentes bastante activas. Este filtro es opaco para las longitudes de onda visibles, excepto para el azul oscuro, este color residual neutraliza el color rojo que deja pasar el filtro OX.1, produciéndose así un fondo negro intenso.

Hay que tener en cuenta que es muy importante el uso del filtro, pues una vez que, los rayos ultravioleta han radiado el material, han cumplido su misión y deben eliminarse, pues la exposición prolongada a esta luz puede causar serios daños al observador, especialmente a los ojos.

Frecuentemente se utilizan dos colorantes fluorescentes: la fluoresceína, que cuando es excitada por la luz azul emite una fluorescencia amarillo-verdosa intensa, y la rodamina, que cuando es excitada con una luz verde-amarilla emite una fluorescencia de color rojo intenso; ambas moléculas son

detectadas separadamente en el microscopio, por medio de filtros específicos para cada colorante.¹⁷ Un ejemplo de esto es la **Figura 4**, donde se observa la distribución de moléculas diferentes de una misma región en un embrión fijado, donde se utilizaron tres juegos de diferentes filtros y colorantes específicos.

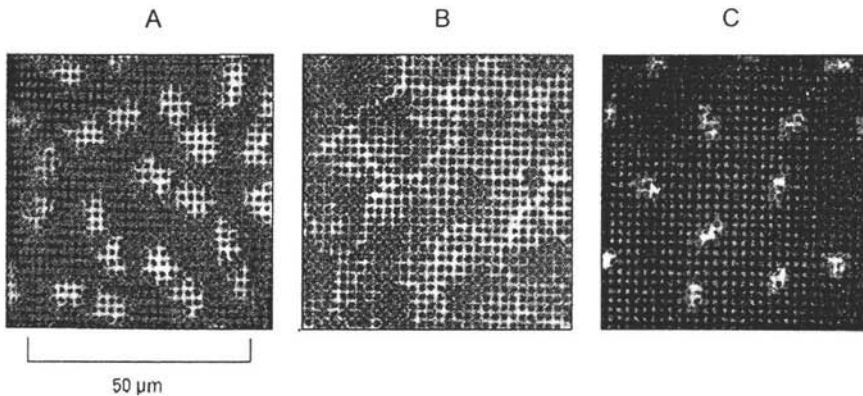


Figura 4. De izquierda a derecha observamos: (A) una zona de microtúbulos marcados con un anticuerpo acoplado a fluoresceína, (B) filamentos de actina con un anticuerpo acoplado a rodamina y (C) marcada con un colorante que únicamente emite fluorescencia cuando se une a ADN. *Biología Molecular de la Célula*, Bruce 1994.

Usos y aplicaciones

Se utiliza para visualizar componentes de difícil observación, para localizar sustancias mediante enlaces específicos y para determinar:

- a) En Botánica, Micología y en Mineralogía, la presencia de sustancias con fluorescencia primaria, la podemos utilizar en diversas técnicas de laboratorio como: en hibridación in situ o el PCR como veremos más adelante.

- b) El estudio de bacilos en esputos con tuberculosis, usando la tinción de auramina, (pudiéndolos observar en un tono amarillo luminoso), que hace los recuentos más fáciles y exactos.
- c) En el diagnóstico temprano de tumores malignos (con la técnica del naranja de acridina) un núcleo normal lo vamos a observar amarillo verdoso, y en cambio el núcleo anormal ó alterado en un tono naranja ígneo.
- d) En la técnica de anticuerpos trazadores (método de Coon) que consiste en hacer visibles los antígenos marcando los anticuerpos que reaccionan con ellos, con un colorante fluorescente, aplicable a la mayoría de las enfermedades autoinmunes.

3. Microscopia Electrónica.

Generalidades

La necesidad de observar con mejor resolución y mayor aumento las estructuras celulares más pequeñas, llevó a los investigadores a buscar otras fuentes de iluminación con menor longitud de onda que permitieran tener mejores resultados en el estudio de la muestra. Un intento fue sustituir la luz blanca por luz ultravioleta, dando como resultado una modificación casi total del aparato, debido a que la luz ultravioleta no atraviesa el vidrio, siendo necesario emplear lentes, portaobjetos y cubreobjetos de cuarzo y espejos de aluminio o plata.¹⁷ Como la radiación ultravioleta no puede ser detectada por el ojo humano, también era necesario usar sistemas fluorescentes y fotográficos para la obtención de las imágenes, teniendo que renunciar de igual modo a los condensadores y objetivos de inmersión, con todo esto se logró que el poder de resolución fuera de $0.1\mu\text{m}$ (sólo dos veces mayor que el microscopio normal), o sea, un mínimo avance, en la

capacidad de este microscopio para permitir la observación y el estudio de los organelos celulares que no dependía exclusivamente de estas modificaciones, y seguía limitado a la naturaleza física de la luz.

Lo que ayudo al desarrollo de esta nueva forma de microscopia fue la obtención de radiaciones con longitud de onda menor que la luz visible que se logró por los hallazgos de L. de Broglie (1924) quien demostró el comportamiento ondulatorio de los electrones¹ y los resultados por Busch (1926) quién descubrió que los electrones emitidos por un filamento de tungsteno precalentado pueden ser enfocados por campos magnéticos, estos conocimientos iniciaron el desarrollo de este tipo de óptica, que culminó en los años 1930-1933 con la invención del microscopio electrónico por Ruska.¹, la **Figura 5** nos da un ejemplo del modelo actual de este microscopio.

Así tenemos que los microscopios electrónicos utilizan rayos de electrones en lugar de la luz, lo que les permite tener un poder de resolución muy elevado. La longitud de onda de los rayos de electrones es de 0,005-0,0003 nm, muy corta comparada con la de la luz visible (426-750 nm; violeta, rojo). Es posible con el microscopio electrónico observar objetos separados por una distancia de 0,003 μm , comparado con los 0,25 μm de un microscopio óptico²

Estos electrones que se utilizan en el microscopio electrónico, se obtienen mediante el fenómeno termiónico que se basa en la capacidad que tienen los metales, al calentarse, de convertir sus electrones de valencia en electrones libres, se usa el wolframio o tungsteno por su alto peso molecular y punto de fusión alto, además de una evaporación muy reducida y las lentes que se utilizan son campos magnéticos axiales localmente fuertes que van en dirección del haz de electrones, los más sencillos están constituidos por una bobina corta a través de la cual circula una corriente eléctrica continua, teniendo la ventaja de que en estas lentes se puede variar la distancia focal

al ajustar la intensidad eléctrica que circula por la bobina, sin tener que recurrir a los sistemas mecánicos como en el caso de la microscopia óptica.

Existen distintos tipos de Microscopia Electrónica como son:

a) Microscopia Electrónica de Transmisión: Da imágenes por medio de electrones que atraviesan la muestra como lo hace la luz en el Microscopio Óptico.⁵

b) Microscopia Electrónica de Barrido: Nos proporciona imágenes y datos por medio de un haz de electrones que recorre la superficie de una muestra, transformándola en corrientes eléctricas que formarán la imagen en un monitor.⁵

c) Microscopia Electrónica Confocal: Utiliza métodos electrónicos dando imágenes que permiten enfocar un plano escogido de la muestra, eliminando la luz que proviene de las zonas que están fuera de foco superior e inferior a este plano, proporcionándonos una imagen nítida de una fina sección.¹⁵

3.1 Microscopio Electrónico de Transmisión (MET)

Generalidades.

Este microscopio nos permite ver objetos mucho más pequeños y texturas más finas que los microscopios ópticos, debido a su mayor poder de resolución, siendo una característica numérica ó parámetro de sistemas ópticos (de luz o de electrones) que define su capacidad de dar imagen de detalles muy pequeños del objeto.

El MET tiene un poder de resolución de entre 0.15 y 0.25 nm, que es 1000 veces mayor que el microscopio de luz.

El sistema óptico de un MET puede suministrar aumentos variables entre unas decenas y unas 500,000 veces.⁸ Siendo un instrumento que

utiliza un haz de electrones acelerados para irradiar una muestra⁵ delgada por una de sus caras, dando una imagen formada por los electrones que emergen de la cara contraria.

En el MET, un haz de electrones de muy alta energía (hasta 200 kV) incide sobre una muestra preparada de forma que posee una zona delgada transparente a los electrones. Los electrones que atraviesan la muestra forman una imagen sobre una pantalla fluorescente, lo que permite la observación de la microestructura del material en cuestión. Por otra parte, dentro del material los electrones sufren diferentes interacciones. Una de ellas es la infiltración cristalográfica⁶. Otra interacción produce la emisión de rayos X característicos que proporcionan información química y elemental de volúmenes submicrométricos de la muestra.⁹

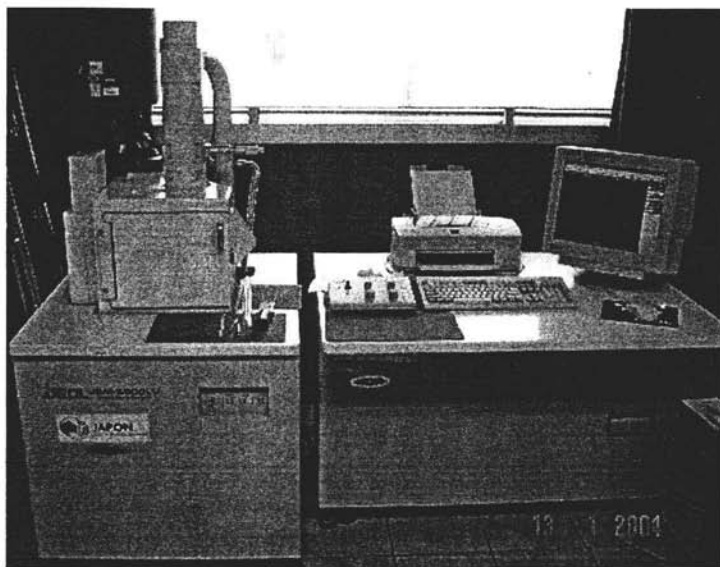


Figura 5. Cortesía del laboratorio SENICA de la UAM-Iztapalapa y del Dr. José Sepúlveda Sánchez, donde se muestra un MET

Es un instrumento grande, pesado no portátil, requiere de un lugar oscuro, libre de polvo, de vibraciones, de campo magnético y ventilado.⁸

Este tipo de microscopio básicamente está constituido por:

a) Óptica electrónica (generalmente llamada columna por ser cilíndrica y vertical)¹. Está formada de arriba abajo por el dispositivo productor de electrones o cañón electrónico, seguido por una o más lentes condensadoras (2 generalmente) que concentran el haz electrónico sobre el objeto de estudio. Debajo de estas lentes se encuentra la cámara del objeto. Una platina a la que queda unido el objeto dentro de esta cámara que puede ser movida mecánicamente por el operador.

Por debajo de esta cámara se encuentran 3 lentes: La primera es el objetivo, la lente más perfeccionada, tanto por la precisión y acabado de sus piezas, como por la estabilización de su corriente de alimentación.

La segunda lente de observación es la lente intermediaria o primera proyectora, que agranda un trozo de la imagen del objeto creada por el objetivo.

La tercera lente de aumento la realiza la lente proyectora, la que tomando una parte de la segunda imagen y la proyecta aumentada sobre la pantalla fluorescente, en la que la imagen electrónica final se hace visible al ojo humano.³

b) Sistema de vacío cuya función es mantener una presión baja en el interior de la columna. El vacío de un MET se debe rehacer cada vez que se apaga el aparato, por lo que cuenta con compuertas de vacío que se abren y se cierran comunicando o aislando diferentes partes del microscopio, estas permiten colocar y sacar muestras y cambiar el material fotográfico sin alterar el alto vacío de la columna⁸

c) Sistema de enfriamiento, este dispositivo está constituido por agua (destilada) que circula en serpentines metálicos que es enfriada por acción

de un compresor similar al de los refrigeradores, el que finalmente disipa el calor al aire.

d) Corrientes de alimentación y sus controles, donde las principales necesidades de alimentación del MET son las del cañón del haz de electrones acelerados y las de las lentes.

e) Dispositivos de registro de la imagen, aquí la forma más habitual de obtener un registro de la imagen que se ve en la pantalla fluorescente es la fotografía.¹ Todos los MET tienen dispositivos destinados a exponer película fotográfica, especial para este microscopio, que se encuentra en la columna de óptica electrónica. El proceso físico por el cual se lleva la toma, el revelado y fijado son los convencionales de cualquier fotografía de blanco y negro. La visualización del registro de la imagen puede realizarse por medios electrónicos, como una cámara de televisión situada cerca de la pantalla donde se ve la imagen final.³ Esta cámara transforma la imagen electrónica en una imagen luminosa.

La imagen proporcionada por la cámara se puede ver en varios monitores, existen varios tipos de cámara entre ellas están algunas diseñadas para imágenes muy débiles como son: las cámaras con intensificador de imágenes y las cámaras de barrido lento.

Se digitaliza la imagen por medio de una computadora y un programa especial llamado "Codificador Digital", y una vez digitalizada la imagen se observa como la **Figura 6** que:

1. Puede almacenarse en un CD y observarse en el monitor.
2. Puede imprimirse en un papel especial
3. Se puede fotografiar la imagen de un monitor con una cámara común¹.
4. Pueden calcularse los más diversos parámetros de la imagen o conjuntos de imágenes y extraer conjuntos individuales.

5. Pueden editarse, cambiar el contraste o disminuirlo, aumentar la gama de grises, atribuir colores falsos, también se puede rotar la imagen para mostrar sus distintas caras. Los cortes como son casi bidimensionales no pueden mostrar el volumen del cuerpo ni las caras perpendiculares a los cortes.⁸

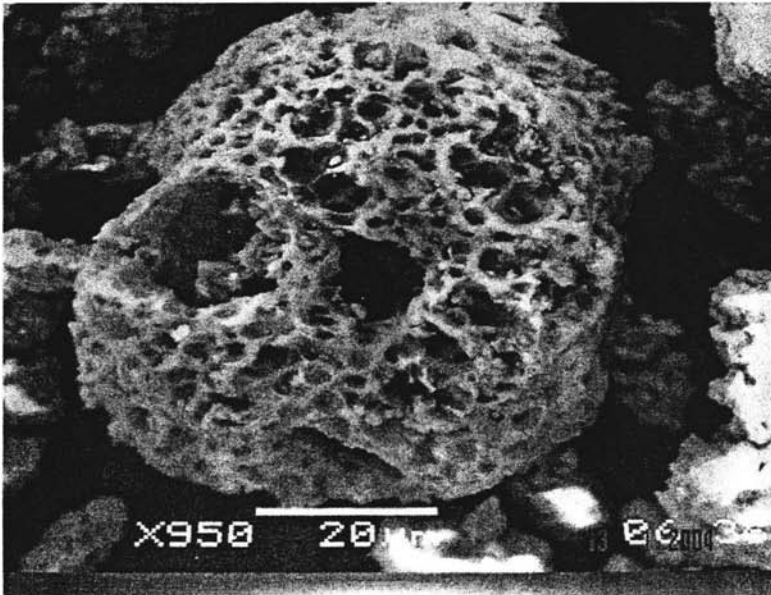


Figura 6. Partícula de metal tomada del medio ambiente en el DF, Cortesía del Dr. José Sepúlveda Sánchez, investigador de la UAM-Iztapalapa.

Técnica y procedimiento.

Las condiciones para la preparación del material biológico son las siguientes:

1. Las muestras se deben conservar a muy baja presión (vacío) en el interior de la columna óptica electrónica.
2. La muestra debe estar seca, de lo contrario, las moléculas de agua se vaporizarán y pueden invadir el espacio por donde circulan los

electrones produciendo la dispersión de los mismos provocando la pérdida de la nitidez de la imagen.

3. Se corta en secciones muy finas con un espesor menor de 0.1 nm. Para que los electrones lo atraviesen.

Entonces la preparación del material consta de los siguientes pasos:

a) fijación, b) deshidratación, c) inclusión, d) corte y e) contraste.⁸

a) Fijación:

Debemos conservar la estructura fina de las células (ultraestructura) y alterar lo menos posible su composición cuando queremos realizar estudios citoquímicos, inmunohistoquímicos o hibridación in situ con ácidos nucleicos⁶, como ya mencionamos en la microscopia óptica hay 2 tipos de fijación una química y otra física.

Fijación química: En el caso de la microscopia electrónica también se emplea el uso del glutaraldehído y/o formaldehído además del tetraóxido de osmio¹ porque coagulan las proteínas, causando modificaciones mínimas en la estructura celular. Cada uno de estos presenta cualidades deseables a la vez que ciertos inconvenientes, por eso las mezclas fijadoras se preparan en proporciones variables, con el objeto de compensar las deficiencias de cada uno de ellos, por lo general estas mezclas contienen otras sustancias como los amortiguadores⁶ que dan al fijador un pH (7.3 constante durante todo el proceso) y presión osmótica semejantes a las existentes en el medio en donde vivía la célula²⁶, además tienen la función de no producir fuerzas osmóticas a través de las membranas biológicas para evitar alteraciones debidas a cambios bruscos de pH. Las más empleadas son los fosfatos y el cacodilato (s-colidina o veronal-acetato)¹.

Para conservar de la ultraestructura de la muestra la fijación tiene que ser muy rápida para evitar alteraciones debidas a la anoxia y a la acción de enzimas hidrolíticas endógenas.

Al terminar la fijación se retira el alhéido lavando la muestra varias veces con el amortiguador.

A veces es seguido este proceso por un tratamiento de tetraóxido de osmio (que es un tipo aditivo, no coagulante), llamado post fijación¹¹ que proporciona estabilidad química, cohesión física¹ y vuelve más permeables las membranas, lo que impide daños por cambios osmóticos durante los tratamientos subsecuentes.

Después de la post fijación puede quitarse el exceso de tetraóxido lavando con el amortiguador ó, según, se recomienda en algunos laboratorios, puede pasarse la muestra a la deshidratación –etanol al 70%-directamente.

Fijación física: Para la preparación de la muestra en el microscopio electrónico esta etapa consiste en congelar la muestra por procedimientos que no requieren aparatos muy complejos como es el de "Pulverización" (se lleva a cabo con propano previamente enfriado con nitrógeno líquido)⁸ el de "Impacto" que se puede emplear en cultivos de células o en trozos de tejidos (consiste en proyectar a velocidad la muestra sobre un espejo de cobre, previamente enfriado con nitrógeno líquido) y el de congelación a "Alta presión" (que es el único de los tres que si requiere de un aparato complejo y de alto precio, siendo también el único que permite conservar todas las estructuras de la célula de la muestra, llevándola a una presión de 2000 barios, congelarla en un chorro de nitrógeno líquido y descomprimir rápidamente) después de que la muestra está congelada se debe cuidar que su temperatura no sea mayor a los -80° C y puede ser seguida de distintos procedimientos como: La fractura y réplica mediante evaporación de carbono y metales: Este método permite principalmente el estudio de las membranas. Consiste en la criofijación de un espécimen, seguida por

la fractura de la muestra a temperaturas muy bajas (-150 y -190° C) con una capa de carbón-platino. Este recubrimiento es parcial porque el metal y el carbono solamente se depositan sobre las superficies que puedan ser accesibles. Una vez obtenida la capa de recubrimiento, la muestra se pasa a temperatura ambiente, quedando sólo una capa delgada de decenas de nanómetros de espesor, de carbón con algunas regiones sombreadas por el metal (platino).⁸

Terminada la fijación se continúa con el segundo paso que es la:

b) Deshidratación

Que sería la sustitución del agua de la muestra, por medio de la deshidratación con acetona a temperatura controlada para evitar que se cristalice el agua cuando ha sido sustituida el agua por la cetona.⁸ **Figura 7**

Se realiza con líquidos que se mezclan en el agua celular y al aumentar su concentración la desplazan, hasta sustituirla totalmente, empleándose al etanol (que hidrata mejor) o la acetona (que es más miscible con los principales métodos de inclusión), teniendo que estos procedimientos de imbibición⁶ de la muestra se llaman inclusión y constituyen el siguiente paso para la preparación del material biológico.²⁷

Se continúa con el tercer paso que es:

c) Inclusión:

Se lleva a cabo después de la deshidratación, se empapa la muestra con algún monómero de alguna sustancia plástica (**Figura 7**), que pueda polimerizarse en condiciones compatibles con la conservación de las estructuras finas de las células y adquiera la dureza necesaria para ser cortada en secciones no mayores de 0.15 µm de espesor.

Los monómeros mas usados para la inclusión son:

1. Resinas epóxicas²⁶: endurecen de manera uniforme, sin producir daño a la hora de polimerizar formando polímeros ramificados, siendo muy estables ante al bombardeo de electrones.
2. Resinas poliéster: son utilizadas para incluir bacterias, protozoarios y algunos tejidos animales y vegetales (vestopal es el más usado por la alta resolución de observación, por su estabilidad y bajo daño al polimerizar)³
3. Medios acrílicos: metacrilatos (poco usados) por producir inestabilidad de los cortes frente al haz de electrones lo que ocasiona un colapso de las membranas y estructuras celulares

Ya concluida la inclusión tenemos al cuarto paso que es:

e) El corte⁶ de la muestra congelada, para que esta no se dañe se emplea el "crioultramicrotomo" que va a mantener la muestra a baja temperatura, estos cortes se llevan a cabo en equipos llamados "ultramicrotomos"¹, (*Figura 7*), que permiten realizar cortes entre 30 nm hasta 1µm se, empleando una cuchilla de vidrio de 2.5 cm de lado y 8 mm de grosor que el propio microscopista crea, con facilidad en una máquina recortadora, de bajo costo y desechable, pero esta cuchilla pierde el filo con facilidad así que se emplea una cuchilla de diamante, con calidad de corte y duración muy superiores a la anterior pero muy cara.⁸ Se debe tener cuidado a la hora de cortar para no deformar la muestra.

Y por último el quinto paso

f) Contraste:

El contraste en la imagen lleva a cabo debido a la dispersión que sufren los electrones al interaccionar con los átomos de la muestra, puede suceder que al observarse los cortes ultrafinos de tejido, carezcan de contraste o presenten muy poco, por lo que se realiza la tinción.

Se utilizan tres distintos tipos de tinciones que son: Positiva, negativa y sombreada.²⁶

1. Tinción Positiva, es el método de contraste con metales que se unen a los tejidos, es el más empleado y puede llevarse antes de la inclusión⁸, algunos microscopista utilizan el acetato de uranio por sus propiedades fijadoras y porque aumenta el contraste de los cromosomas, núcleolos y ribosomas pues forma enlaces químicos con las estructuras que tiene ácidos nucleicos, también utilizan el citrato de plomo por ser más selectivo que el anterior para las células proteicas.¹
2. Tinción Negativa, en esta las células organelas aisladas o virus son inmersos en soluciones de sustancias que dispersan los electrones y luego son examinadas al microscopio, el "colorante negativo" permanece entre las estructuras y penetra en sus depresiones y orificios, de modo que al microscopio, la estructura aparece clara y rodeada por un material electrodensso, que es el "colorante", esta técnica es muy empleada en el estudio de agregados de alto peso molecular como las partículas de virus, ribosomas, colágena, microtúbulos, microfilamentos y ácidos nucleicos.²⁶
3. Sombreado: es una técnica equivalente a la negativa, por el sombreado mediante la evaporación de metales de elevado peso atómico como el cobre, oro, vanadio, uranio, plata o platino y tetróxido de osmio, (siendo este último un excelente fijador³) que se depositan sobre las diferentes estructuras celulares permitiendo el contraste para estudiar las características topográficas de la muestra, observar con gran detalle la estructura de pequeñas partículas, macromoléculas como ácidos nucleicos, ribosomas pared celular y otras fracciones

celulares, también se utilizan en la preparación de muestras obtenidas por congelación utilizando sales de metales

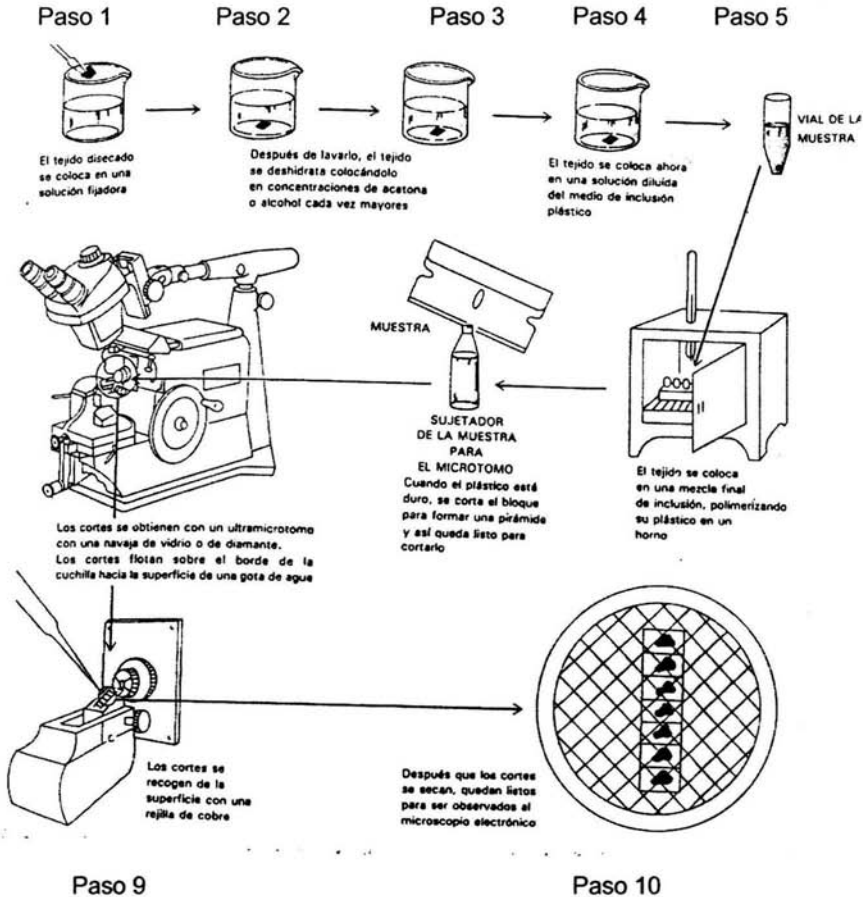


Figura 7. Paso 1 Solución Fijadora, Paso 2 y 3 después de lavar el tejido se deshidrata con acetona y alcohol, Paso 4 y 5 se coloca en una sustancia de inclusión (plástico), Paso 6 el tejido se coloca con una sustancia de inclusión (resina) en un horno, Paso 7 Aumento del dispositivo en donde se coloca la muestra en el microtomo para su corte. Paso 8 Aparato donde se realizan los cortes para esta técnica "Ultramicrotomo", Paso 9 Aumento del dispositivos (rejilla de cobre) donde se recogen los cortes, Paso 10 Corte listo para ser observado, Biología Celular, Karp 1998.

Usos y Aplicaciones

Siendo un instrumento que normalmente es utilizado para el estudio a alta resolución de materiales metálicos y cerámicos sus aplicaciones más usuales son:

Caracterización microestructural de regiones submicrométricas, estudio de fenómenos como transformaciones de fase, difusión, recristalización (grados), crecimiento de grano, etc.⁹

Análisis químico de volúmenes submicrométricos, como segregación de elementos en borde de grano.

Estudio de la morfología, estructura y composición de partículas finas, Caracterización de películas delgadas depositadas, películas producidas por implantación iónica y otros métodos de modificación de superficies, y microcircuitos electrónicos.⁹

Es una técnica única entre las técnicas de caracterización de materiales pues permite tanto la caracterización microestructural mediante imágenes de alta resolución, como la obtención de información química y cristalografía de regiones submicrométricas de la muestra a estudiar. ^(10,11,12)

En el campo de la Odontología permite hacer análisis de las estructuras y características histológicas del esmalte dental²³, como se observa en el estudio comparativo del análisis morfológico de las estructuras oclusales en premolares y molares humanos²³ de las **Figuras 8 y 9**

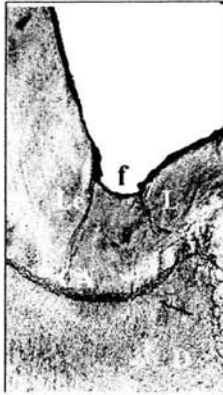


Figura 8. Microscopia Óptica. Fosa Oclusal (f) de un órgano dentario en forma de U. A nivel de los ángulos parten dos laminillas del esmalte (Le) con distintas características: una de ellas presenta un corto trayecto y se bifurca, la otra es más ancha. En todo el espesor del esmalte se observan prismas cortados en forma irregular. En la (CAD) Unión amelo dentinaria, se observa una desmineralización por un proceso carioso, (D) Dentina.



Figura 9. Microscopia Electrónica de Transmisión revela a diferentes aumentos contraste del por el mayor contenido orgánico de los surcos intercuspídeos en interfase con el tejido adamantino (Ha), prismas de esmalte (P), y la dentina. Amerise, Cristian www.scielo.org.ve/scielo.htm, 2002

3.1.1. Microscopia Electrónica de Barrido (MEB)

Generalidades.

El MEB un microscopio que proporciona imágenes y datos físico-químicos, por medio de un delgadísimo haz de electrones que recorre dicha superficie y de detectores que traducen las señales que de ella emanan, transformándolas en corrientes eléctricas que se emplean en formar una imagen en un monitor de televisión, produciendo las mejores fotografías de superficies celulares en los últimos años

Tiene una resolución de 20-50 nm, capacidad de amplificación de 20x a 50 000x y profundidad de campo 300 veces mayor que el microscopio electrónico de transmisión.^(1,8)

Este microscopio básicamente está constituido por

- a) óptica electrónica
- b) cámara del espécimen
- c) circuitos de alimentación

a) La óptica electrónica: Está formada por un cañón electrónico, por los dispositivos de barrido y por lentes electromagnéticas condensadoras (3 generalmente).

El cañón del MEB cumple las mismas funciones que el MET: como ya se explicó es generador y acelerador de electrones y consta de una lente convergente que enfoca el haz formando una pequeña imagen de la región emisora, siendo la resolución del MEB mayor cuando menor sea el diámetro de la región iluminada en la muestra.

Las lentes electromagnéticas (condensadoras), producen imágenes reales y de menor tamaño de la primera imagen de la fuente de emisión en el MEB, siendo lo fundamental eliminar una región redonda y lo más pequeña posible del espécimen. A la última de las tres lentes se le llama objetivo y tiene un control fino que permite graduar el diámetro de la región iluminada de la muestra, por lo tanto da la máxima nitidez en la imagen.

Actualmente ya sólo tiene un cañón de emisión de campo, una lente condensadora una lente objetivo que está compuesta por un campo magnético que da lugar a dos lentes convergentes y un campo electrostático que forma una lente divergente. Los dispositivos de barrido se encuentran por encima de la lente objetivo y permiten que el haz se desplace sobre el objeto a observar formando algo similar a renglones, hasta "barrer" una superficie rectangular de tamaño variable con el control de aumento.¹⁷

b) Cámara del espécimen. Es una cámara amplia para dar cabida a objetos de varios centímetros, o aun decímetros de diámetro y está situada en la parte inferior de la columna de óptica electrónica.

Como el MEB explora únicamente la superficie superior del objeto, el soporte de la muestra no tiene que permitir el paso de electrones y esta formado por una plataforma móvil.

c) Circuitos de alimentación. Los circuitos de alimentación de los lentes así como el generador y regulador de alta tensión son similares a los del MET. El generador de barrido permite que el rastreo de la superficie del objeto y el barrido del monitor de observación sean sincrónicos. Esta sincronía de barridos hace que cada "punto" del renglón que se dibuja, se observe al mismo tiempo en los dos monitores.⁸

d) Detectores: Los más empleados en el estudio de las muestras biológicas son:

1. Detectores de electrones secundarios emitidos por la muestra, estos electrones secundarios (se observan en la **Figura 10**)²⁹, se producen en un volumen pequeño del espécimen, cercano al lugar donde incide el haz electrónico en ese instante, proporcionando una imagen de mayor resolución que la suministrada por otros detectores.

Los electrones secundarios emitidos por la muestra son los que se utilizan comúnmente para estudios morfológicos de especímenes biológicos.

2. Detectores del haz retrodispersados²⁹ para la muestra se observan en la **Figura 10**, estos electrones provienen de un volumen del objeto más grande que el volumen del que se originan los secundarios, siendo menos eficientes que los secundarios, para informar sobre la composición anatómica de la región, pueden servir para dar imágenes de superficies.

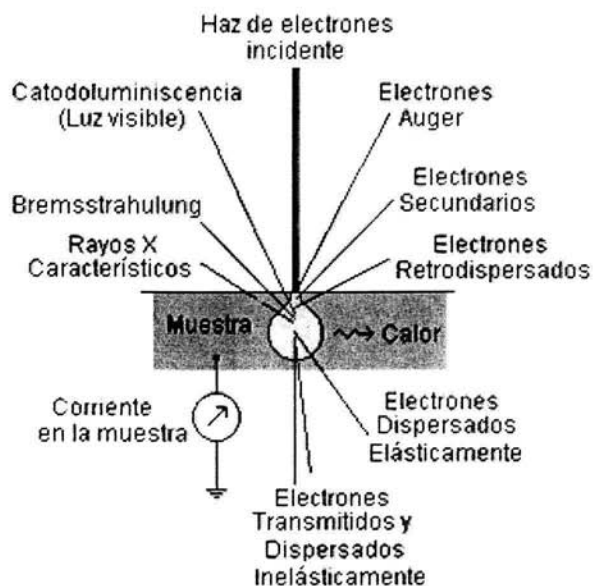


Figura 10. Indica gráficamente los electrones que emite la muestra.

www.geocites.com/capecanavera/lab/1987/menu.htm, 1987

3. Detectores de rayos X emitidos por la muestra, se observan en la **Figura 10** y permiten realizar análisis elementales de la muestra, en donde se puede demostrar la distribución de un determinado elemento o de varios tipos de átomos diferentes en la muestra en estudio²⁹, o si existe o no en una zona del espécimen cierto elemento, y aun estimar cuantitativamente la abundancia de un elemento en relación con su posición en la célula o tejido. Por ejemplo, se puede determinar si hay fósforo, magnesio u otros elementos cercanos a la superficie. En la zona iluminada por el haz electrónico la intensidad de la emisión en materiales biológicos, es generalmente débil por lo que los detectores deben abarcar el mayor ángulo sólido sobre la muestra y estar lo más cerca posible. Cuanto menor sea el diámetro del área de la superficie de la muestra iluminada por el haz electrónico, menor será el volumen de emisión y mayor la resolución. En los MEB modernos las imágenes se digitalizan de rutina, se pueden memorizar y se pueden observar aun cuando el haz haya dejado de barrer la zona, lo que facilita poner en posición el haz sobre la estructura que se va analizar. La cuantificación de la abundancia de un elemento presenta algunos problemas, pues mediciones en diferentes regiones de especímenes tridimensionales, es decir no planos o casi planos dependen mucho de la topografía de la superficie del objeto, de manera que serían comparables únicamente las medidas realizadas sobre superficies con similares ángulos con respecto al haz y con respecto al detector.

4. Detectores de electrones por la cara del espécimen contraria a la irradiada (barrido-transmisión): La detección de los electrones que atraviesan una muestra delgada, por el lado contrario al barrido por el haz, da lugar al procedimiento llamado microscopía electrónica de barrido transmisión⁸. Se pueden obtener imágenes de fondo claro y de fondo oscuro, de alto contraste. En general el sistema de barrido

transmisión proporciona imágenes de cortes de un espesor de media micra o más, de mayor nitidez que el microscopio de transmisión convencional, pero no aporta información muy importante al conocimiento biológico. Actualmente este sistema se encuentra desplazado con mucha ventaja por el microscopio de transmisión provisto del filtro de energía de electrones.⁸

Técnica y procedimiento.

Pasos:

1. Se fija la muestra biológica en glutaraldehído.
2. Se trata con tetróxido de osmio (como en la fijación química del MET que ya se explico).
3. Se realiza la deshidratación con etanol al 70%¹¹ por 15 minutos aproximadamente. (Cuando se termina de deshidratar la muestra por completo se puede enfriar en nitrógeno líquido y hacer una fractura para revelar detalles internos de la muestra).
4. Después se seca a punto crítico
5. Y se cubre con metal (oro) o con carbón un ejemplo de esto es la **Figura 11.**
6. Se toma en cuenta la inclinación y rotación que se le da a la muestra pues de esto dependerán los efectos de luz y sombra que presente a la hora que la observemos en el microscopio.
7. Nos tardamos en realizar este procedimiento completo alrededor de dos o tres días aproximadamente y en dado caso que la muestra sea conductiva (metales) no se necesita de este procedimiento.

La preparación de las muestras para ser observadas con el MEB consta de varios procedimientos que adaptan el objeto de estudio a las características físicas del instrumento. Las dos características más importantes para realizar esta técnica implican que la muestra no emita vapores (para que se

mantenga la baja presión) y que sea conductora (para evitar la concentración de electrones en la muestra y la deformación de la imagen por el efecto de la carga electrostática), son la desecación y los métodos que hacen la muestra conductora.

1. La desecación, se emplea para tener uno de los principales requisitos que es una muestra completamente seca, este procedimiento consta de dos tipos: a) por punto crítico⁶ y b) por congelación-desecación.

a) Por punto crítico: Todo este procedimiento se realiza en un aparato no muy caro con sustancias muy accesibles como la acetona con la que se empapa la muestra y se coloca en este aparato de "punto crítico" que es una cámara especial que resiste por lo menos 73 atmósferas, que se puede calentar, y que permite la entrada de bióxido de carbono y la salida de gases.⁸ En esta cámara se hace la sustitución de acetona por el bióxido líquido a 73 atmósferas de presión, a una temperatura ambiente y después se calienta a 31° C para que desaparezca la interfase, manteniendo esa temperatura se deja escapar el gas, obteniéndose el material seco

b) Por congelación: El procedimiento para lograr la congelación y que la muestra conserve su estructura fina es el mismo que ya se describió en el tratamiento de esta para el MET

2. Los métodos para hacer conductora la muestra, consisten en cubrir la muestra con metales de tal forma que los detalles de la superficie se puedan observar con facilidad y también con la finalidad de hacerla conductora no solo en la superficie, sino también en su interior, para realizar este procedimiento se acostumbra adherir la muestra al portaobjeto por medio de una pintura o pegamento conductor, que contiene plata o carbón. Este recubrimiento se puede hacer por evaporación de carbón o metales en un

recipiente de alto vacío o por átomos removidos de un cátodo diámano con iones de alta energía.

Cumplidos estos procedimientos se puede observar en el MEB el material biológico para su estudio y análisis.

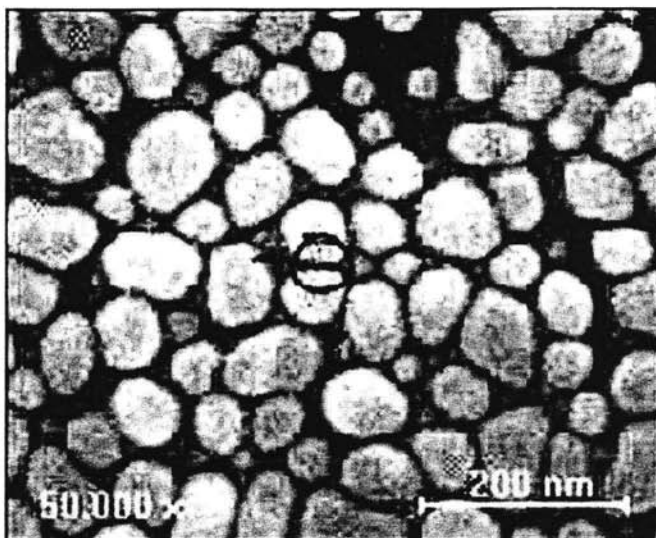


Figura 11. Micrografía tomada a 50.000 aumentos, corresponde a partículas de oro, depositadas sobre carbón. www.geocites.com/capecanavera/lab/1987/menu.htm, 1987

Usos y aplicaciones.

Odontología y biomateriales

Las características del MEB lo han convertido en una herramienta insustituible en estos campos de aplicación, donde ha posibilitado no sólo avances en la investigación biomédica sino mejoras en los materiales empleados en la reparación de los tejidos lesionados (prótesis, amalgamas, etc.). La utilidad del MEB se extiende desde valorar el efecto en las superficies dentarias de los diferentes aparatos de limpieza, a la localización bacteriana en la periodontitis juvenil, o en el cemento apical, la inserción

epitelial en la periodontitis crónica del adulto.¹⁶ Las porcelanas dentales, las propiedades de los agentes de unión que sellan las separaciones existentes entre la dentina y los materiales de restauración (resinas), los cambios de fase en las amalgamas, siendo todos ellos objeto de estudios por este tipo de microscopía. También hay estudios para valorar el crecimiento de hueso en prótesis de cadera de materiales porosos, el empleo del MEB ha permitido diferenciar con facilidad al hueso de los alambres metálicos y de los tejidos blandos y cuantificar así el crecimiento del hueso, método que ofrece un prometedor futuro.^(16,23)

Sistema digestivo y urinario

Pronóstico o diagnóstico inequívoco en la patología gastrointestinal.

Estudio de los ecosistemas bacterianos presentes en la mucosa gastrointestinal.

Hematología

Tiene un papel importante en el estudio de las células de sangre periférica, al permitir el análisis tridimensional de la superficie celular, por la importancia que posee en la relación con otras células y moléculas, estas células sanguíneas son el tipo de muestra cuya preparación es más delicada para su estudio.¹⁶

3.1.2. Microscopía Confocal

Generalidades

La espifluorescencia constituye una de las técnicas de microscopía óptica más utilizadas actualmente en el área de la investigación biomédica.

Su desarrollo es debido, por un lado, a la progresiva optimización de las técnicas de tinción y marcaje con fluorocromos y, por otro lado, al aumento

del poder de resolución óptica proporcionado por el uso del microscopio Confocal.

La configuración de este tipo de microscopio está basada en la propuesta original de Marvin Minsky (1957) y el actual modelo³⁰ es el que se muestra en la **Figura 12**.

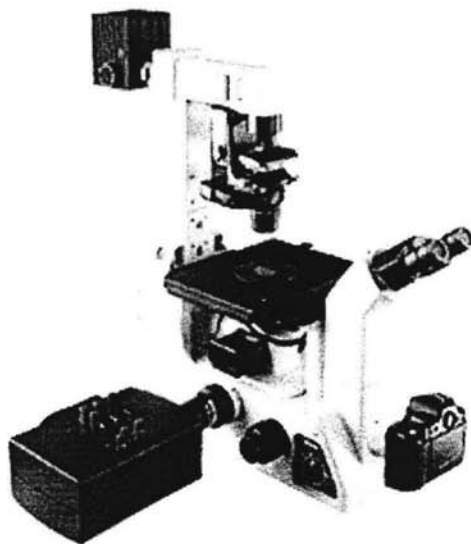


Figura 12. Microscopio Confocal Nikon C1 marca registrada, www.oseacortes.com/practicas/microscopio.htm

Este instrumento presenta las siguientes características:

a) Dispone de una fuente de iluminación, todos los microscopios Confocales utilizan el láser por sus propiedades de intensidad lumínica, selección de longitud de onda y uniformidad (emisión continua), los de uso frecuente son los argón (488-514 nm), criptón (568-647 nm) y helio-neón (543-633 nm) para iluminar en el espectro de luz visible. La luz ultravioleta (UV),

está incorporada sólo en algunos equipos, y a que se requiere de un láser especial de argón o helio-cadmio y, cromáticas significativas cuando transmite luz ultravioleta.¹⁷

b) En el sistema óptico, el criterio de selección de espejos, filtros y objetivos depende de un factor denominado "eficacia de transferencia óptica", siendo este un parámetro que corresponde a la relación entre la intensidad de la imagen producida por el objeto y la intensidad de la luz incidente. Su valor es dependiente de la longitud de onda de la luz y de las características de difracción de los espejos y filtros, los objetivos más adecuados son los que combinan las características de los filtros, espejos, de la apertura numérica y están libres de aberraciones cromáticas.

c) La fluorescencia emitida por el punto iluminado accede al detector atravesando una apertura o diafragma (pinhole) que excluye la luz emitida por elementos situados en puntos alejados del plano focal.

d) la imagen bidimensional (ejes x, y) del objeto situado en el plano focal se obtiene mediante el barrido de la preparación con la luz puntual.¹⁵

La profundidad de campo (0,5-1,5 μm) del microscopio Confocal proporciona información a partir de una sección óptica muy definida, en lugar de toda la muestra. Se procura eliminar prácticamente todas las señales procedentes de fuera del plano de foco, lo cual además de evitar la degradación de la imagen incrementa el contraste y la sensibilidad de la detección.

Este tipo de microscopía permite el estudio de muestras con marcaje fluorescente, haciendo secciones ópticas de las mismas, excitándolas punto a punto por medio de un láser, teniendo que la longitud de onda de emisión de la muestra es mayor a la de excitación, y es esta última la que al pasar por un pequeño diafragma permite la detección de un solo plano focal.

Técnica y procedimiento.

Pasos:

1. La célula que se va a estudiar se coloca en el microscopio y se ilumina.
2. Enfocándose con una resolución de 0.1 mm x 0.1 mm en el plano XY, y de 0.2 mm en el eje Z.
3. Ya enfocada se fotoexita por medio de un láser, el cual finamente barre punto a punto la muestra. Al hacer esto cada área de la célula o de la preparación emite una fluorescencia que es captada por un fotomultiplicador
4. El Fotomultiplicador recibe una señal análoga que es convertida en digital por medio de un programa especial, que a su vez proyecta la imagen virtual en una pantalla.¹³
5. En esta pantalla digitalizada la imagen tridimensional se puede girar para ser analizada en sus diferentes ángulos ó también se puede reconstruir o seccionar para el estudio de estructuras internas en células vivas.¹⁷

Estas secciones se pueden realizar no sólo en el plano XY (perpendicular al eje óptico del microscopio), sino también verticalmente (paralelo al eje óptico) en los planos XZ o bien YZ, con el seccionamiento vertical (XZ o YZ) las células se barren en profundidad (eje Z) y también lateralmente (ejes Z o Y), generando imágenes en paralelo al eje óptico del microscopio, dando información del plano focal a partir de las muestras y pueden mostrar variaciones de altura, las secciones ópticas tomadas en los sucesivos planos focales (series Z) pueden ser reconstruidas informáticamente para producir una visión tridimensional de la muestra.³⁴

Usos y Aplicaciones.

Se utiliza para el estudio de la fisiología y toxicología de los receptores ionotrópicos del ácido glutámico en cultivos primarios de neuronas en ratas, midiendo la variación del nivel intracelular del calcio.

Estudio tridimensional de muestras incluyendo su exterior y para determinar en algunos materiales la reflexión, en la búsqueda de la localización de distintos marcadores en una región concreta.

Evita los problemas de espectros o solapamiento, así mismo separa la emisión de los marcajes fluorescentes y posible auto fluorescencia de la muestra.¹³ En la **Figura 13** se muestra una comparación de tejidos de un embrión en estado de gástrula en la microscopía convencional y con el microscopio confocal.

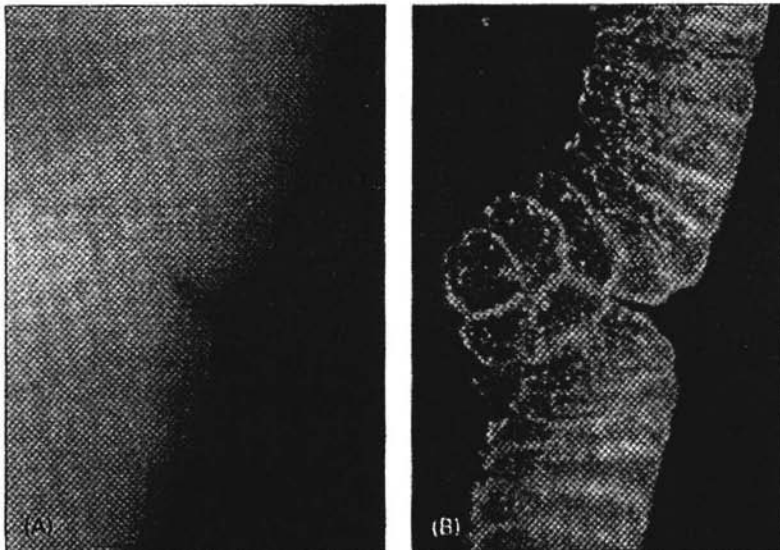


Figura 13. Podemos observar la diferencia de enfoque y definición entre las dos técnicas a) Microscopía Convencional, b) Microscopía Confocal, en los tejidos de un embrión. *Biología Molecular de la célula*, Bruce 1994

4. Biología Molecular

La base histórica y moderna de la biología celular es la microscopía. Sin embargo, en la actualidad los métodos microscópicos se han fusionado con los de la bioquímica, la genética y la biología molecular para proporcionar una perspectiva más amplia en el estudio de las células como unidades vivas dinámicas, lo cual ha atribuido que el análisis de las células se haga desde un punto de vista más dinámico y comprensivo. En biología celular se intenta observar, comprender y explicar cómo se correlacionan la estructura y la función, y cómo esta última se regula dentro del marco de espacio y tiempo de un sistema.³²

La evolución humana, biológica y social coincide con el desarrollo gradual de los medios con los cuales se manipula el medio ambiente, o sea, los seres humanos han adquirido la habilidad de reproducir herramientas cada vez más complejas y en muchos aspectos, los logros tecnológicos ejercen un variado impacto en la calidad de la vida y en el medio ambiente.

La biología molecular trabaja con objetos que el hombre no es capaz de ver, oír o tocar en forma directa y a pesar de este inconveniente las células son objeto de estudio que constituye un tributo a la curiosidad humana en su inquietud por descubrir nuevas formas en el tratamiento de las enfermedades.²⁷

A partir de la evolución de métodos mucho más sensibles para la separación de los diversos componentes de una reacción química, la detección y el número de clases de moléculas biológicas se desarrolló el empleo de trazadores radioactivos que marcaron el avance más significativo en las técnicas moleculares como son: Hibridación in situ, Reacción en Cadena de la Polimerasa y la Citometría de Flujo¹⁷

4.1 Hibridación.

Generalidades

Es una técnica que parte de una mezcla desnaturalizada de moléculas distintas de ADN pero con secuencias parecidas (puede ser ADN que codifica la misma proteína en especies distintas). Posteriormente al renaturalizar se pueden asociar parcialmente dos hebras procedentes de moléculas duplex (puede ser homoduplex ADN-ARN o heteroduplex ADN-ARN) distintas, formando ADN híbridos (doble hebra, con regiones de apareamiento y de no apareamiento). Esta formación de moléculas dobles de ADN o ARN cuyas hebras tienen distinto origen (especie o ácido nucleico) recibe el nombre de hibridación⁵. Para desnaturalizar una molécula de ADN y poder llevar a cabo la hibridación existen 3 métodos principales que se explican gráficamente en la **Figura 14** y son¹⁸:

1. Desnaturalización de ADN por medio de temperatura: Primero por calentamiento gradual donde se pierde la estructura secundaria y por consiguiente se separan las hebras. El enfriamiento lento se lleva a cabo sin llegar a los 20 o 30° C siendo reversible este procedimiento y por último el enfriamiento brusco siendo una desnaturalización irreversible llegando a perder su funcionalidad las hebras de ADN.
2. Desnaturalización por ácidos y bases: Se puede hacer en condiciones alcalinas pues el apareamiento de bases debilita el pH de la molécula de ADN o neutralizando podemos producir el efecto contrario, o sea, renaturalizar y si tenemos que el pH es ácido y fuerte pierde su estructura primaria molecular, siendo irreversible este Proceso.
3. Desnaturalización por agentes químicos: Con frecuencia se realiza en moléculas sencillas de DNA altamente polares, con grupos amino y

carboxilo, estos les permite competir en la formación de enlaces de hidrógeno con estos grupos, facilitando la ruptura de sus apareamientos y la separación de las hebras provocando así la desnaturalización.¹⁷

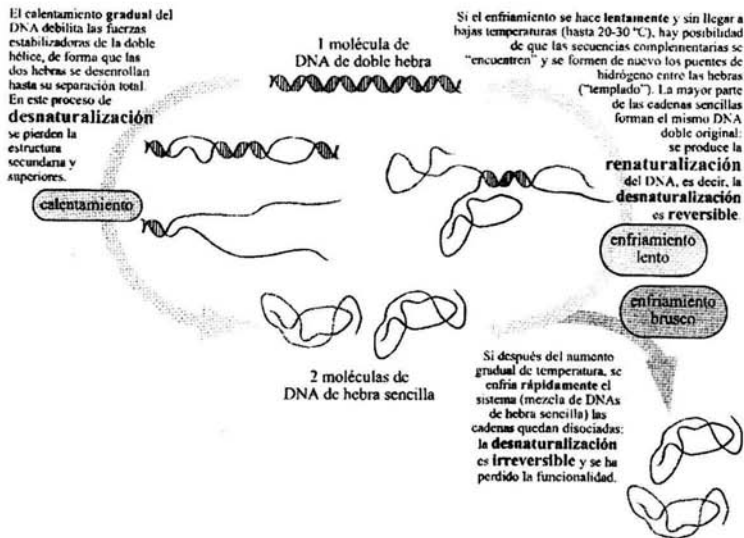


FIGURA 14. Esquema donde se muestran los tres principales métodos de Desnaturalización, 1. Desnaturalización por medio de temperaturas, 2. Desnaturalización por ácidos y bases. 3. Desnaturalización por agentes químicos. *Biología Molecular e Ingeniería Genética*, Luque 2002

Hibridación in situ

La Hibridación in situ es la hibridación de fragmentos marcados de ADN de una hebra o de ARN con secuencias complementarias (sondas⁵) a ADN/ARN celular, que en condiciones apropiadas forman híbridos estables, la hibridación puede hacerse sobre soportes sólidos (soporte de nylon o nitrocelulosa), en solución (in vitro), en cortes de tejido o en preparaciones celulares (in situ). Se pueden usar sondas marcadas con elementos

radioactivos, pero como se necesita protección y manipulación especiales no son de elección para su uso rutinario.¹⁴

Existen 2 tipos de técnicas que son:

Hibridación in situ tisular e Hibridación in situ cromosómica.

Hibridación in situ tisular

Es una técnica mediante la cual se estudia la distribución y densidad de un gen o molécula de ARNm en una célula o en un tejido utilizando una sonda de ADN o ARN de una sola cadena.

Se realiza sobre cortes de tejido, células intactas y núcleos aislados. En muchos casos, se lleva a cabo directamente sobre tejidos fijados con formalina, incluidos en parafina, congelados, etc. Es una modalidad de hibridación particularmente importante para detectar virus patógenos, para diagnosticar células cancerosas como consecuencia de cambios genéticos o para estudiar cambios en la expresión genética detectando secuencias en el ARN celular. En este caso, tras una fijación suave de la preparación, se añaden sondas de ADN complementario (cADN) de hebra sencilla. La detección se realiza por autorradiografía y examen de la película fotográfica bajo el microscopio, o por microscopía de fluorescencia, si se empleo este marcaje para la sonda.¹⁸

Hibridación in situ cromosómica

La técnica de Hibridación in situ FISH (fluorescence in situ hybridization) combina las técnicas citogenéticas y las técnicas de biología molecular, para permitir la ubicación física de regiones cromosomales que presentan secuencias hipervariables, genes implicados en patologías y pseudogenes.

Se realiza sobre preparaciones en portaobjetos de cromosomas metafásicos o prometafásicos, tratadas con fijadores para preservar las características morfológicas del cromosoma.

Se requiere separar la secuencia de ADN mediante calor, algún álcali o formamida para permitir su hibridación con la sonda, inicialmente se

emplearon sondas radioactivas, pero problemas técnicos en la detección de la señal limitaban su utilidad. Se ha conseguido aumentar la sensibilidad y resolución con el empleo de sondas marcadas con fluorescencia. En esta técnica, la detección se hace por microscopio de fluorescencia, de forma directa o por método indirecto.¹⁷

Técnica y procedimiento

La hibridación depende de la secuencia diana a detectar en la muestra y la disponibilidad de una sonda u oligonucleótido de secuencia complementaria a la diana.

Las "sondas" son un fragmento corto de ácido nucleico, de secuencia conocida y complementaria a la secuencia diana, marcado de forma que permita su detección (radioactivo, coloreado, fluorescente)

El empleo de las sondas eleva la sensibilidad de la hibridación, hasta un millón de veces superior a la detección directa por otros métodos. La sonda se convierte en un elemento esencial para cualquier estudio molecular, en especial para estudiar la variabilidad o polimorfismo del genoma.¹⁷

Preparación de las Sondas

Existen diferentes métodos para obtener sondas tanto de DNA (en hebra doble) como de RNA (hebra sencilla). La sonda siempre ha de encontrarse en forma de hebra sencilla, para lo cual se acude a la simple desnaturalización de las sondas de doble hebra.

Las sondas se clasifican por:

*Longitud o tamaño de la secuencia diana, *método marcaje y detección, *tamaño de la sonda, *método de preparación.

Existen 2 tipos de Sondas: Las de tipo convencionales y las sintéticas
Sondas Convencionales.

También llamadas sondas genómicas, clonadas o biológicas, fueron las primeras utilizadas y han contribuido al progreso de la Biología Molecular.

Sondas Sintéticas.

La capacidad de síntesis química es esencial en Ingeniería Genética no sólo para preparar sondas, sino también para modificar parcial o totalmente un producto génico o para sintetizar genes completos. En general se obtienen sondas de ADN más cortas que por clonación. El método más popular es la síntesis de sondas cortas de A llamadas oligonucleótidos o simplemente oligos¹⁸.

Las sondas sintéticas se diseñan de forma que contengan la secuencia complementaria a una zona del DNA diana (de una parte del gen que sugiere analizar). El objetivo es preparar un oligonucleótido que pueda hibridarse con dicho ADN

Marcaje de sondas.

El empleo de sondas de ADN o ARN como herramientas analíticas para localizar secuencias diana por ensayos de hibridación requiere obligatoriamente un proceso de marcaje de la sonda que permita su detección. La molécula o grupo marcador puede tener diversa naturaleza, siempre y cuando se pueda detectar su presencia de forma directa o indirecta.

Los marcadores más utilizados son isótopos radioactivos, fluorocromos y enzimas. Dando lugar a métodos sencillos, que detectan concentraciones muy bajas de la sonda.

El marcaje de la sonda debe ser estable bajo diversas condiciones:

- a) temperatura
- b) detergentes
- c) disolventes¹⁹

Tipos de marcaje

1) In vivo (en cultivo) Se suministran nucleótidos radioactivos a células en cultivo, que los incorporan en sus ácidos nucleicos de nuevas síntesis (para preparar DNA viral marcado en células infectadas por virus.

2) in vitro: Puede hacerse empleando isótopos radiactivos o por otros métodos alternativos como se observa en la **Figura 15**



Figura 15 Hibridación, Cortesía del laboratorio de Biomédicas de la UNAM.

Existen dos tipos de técnicas de hibridación dependiendo de los tipos de sondas que se utilicen (ADNc, oligonucleótidos, ARN) y como estén marcadas las mismas:

- 1) Técnica isotópica o radioactiva (sondas marcadas con: ^{32}P , ^{35}S , ^3H)
- 2) Técnica no isotópica o no radioactiva (sondas marcadas con digoxigenina, peroxidasa, biotina, etc)

Las técnicas no-isotópicas o colorimétricas son más rápidas y permiten una localización más precisa de la reacción. Las sondas marcadas sin elementos radioactivos son más estables. La sensibilidad es igual o levemente inferior a la de los métodos isotópicos.

La sensibilidad de la técnica depende del:

- 1) efecto de la preparación del tejido sobre la retención y accesibilidad de ADN celular blanco o ARN

- 2) tipos de sondas, eficiencia de la marcación de la sonda y sensibilidad del método utilizado para la detección de la señal
- 3) efecto de las condiciones de hibridación in situ sobre la eficiencia de la hibridación.

Usos y Aplicaciones:

La Hibridación es una técnica de importante aplicación práctica en todas las áreas de la Biología Molecular e Ingeniería Cinética, en especial la patología Molecular.

Las aplicaciones en el FISH dada la gran detectabilidad de los fluorocromos actuales se puede emplear con fines diversos y se ha convertido en una técnica con un elevado potencial diagnóstico en cromosomopatías, genes tumorales, virología, trasplantes, etc.¹⁹

Permite estudiar con más detalle aspectos relacionados con el mapeo genético, con los diferentes mecanismos de evolución, el diagnóstico de enfermedades hereditarias y el análisis de procesos cancerosos.

La hibridación in situ se utiliza primordialmente en la detección de bajo número de copias de virus como agentes infecciosos (CMV) y agentes carcinógenos (HPV, HBV, EBV).

En enfermedades genéticas para identificar y diagnosticar anomalías cromosómicas (minicromosómicas y anomalías infracromosómicas)

Localizar regiones con fragilidad cromosómica y alteraciones estructurales de oncogenes y puntos de ruptura implicados en desordenes de algunas neoplasias.

4.2. Fluorimetría.

Ciertas moléculas poseen la propiedad de ser fluorescente, es decir la capacidad de absorber energía de la radiación electromagnética (luz visible o ultravioleta), que las hace pasar a un estado electrónico excitado desde el cual vuelven al estado original, liberando energía en forma de luz. Como la energía de la radiación electromagnética emitida es siempre inferior a la absorbida, la longitud de onda de la luz emitida es superior a la luz absorbida.¹⁸ Cada compuesto con esta propiedad denominado fluoróforo, posee espectros característicos de excitación y de emisión (el de excitación es normalmente similar al de absorción). Si es un colorante, se denomina fluorocromo.

El empleo de fluoróforos y fluorocromos como moléculas marcadoras es de gran utilidad, pues ofrece la posibilidad de detectar distintas moléculas y células en muy pequeña cantidad y sin los riesgos asociados al marcaje con isótopos radioactivos.

En Biología Molecular se utilizan principalmente dos tipos de fluorocromos: agentes intercalantes que se unen al ácido nucleico y sirven así para detectarlo en geles de electroforesis o gradientes de densidad (tales como el bromuro de etilio, naranja de acridina y colorantes), y fluorocromos unidos de forma covalente a sondas de hibridación y a cebadores de PCR (fluoresceína, rojo Texas, rodaminas, etc.).

La detección se puede realizar mediante:

- a) Espectrofluorímetro y lector de microplacas: Que miden la fluorescencia promedio de la muestra.
- b) Densitómetro de fluorescencia: En geles de electroforesis, blots o cromatografías en placa
- c) Microscopio de Fluorescencia: En donde se permite observar secciones de tejido o células individuales, de forma semicuantitativa

- d) Citómetro de Flujo: Donde se permite medir células individuales, de forma cuantitativa. ¹⁸

4.2.1. Citometría de Flujo

Generalidades

La Citometría de Flujo es un proceso en el cual se hacen pasar células individuales ó partículas biológicas, en forma individual, como corriente líquida, por un orificio estrecho y luego se determina por medio de sensores sus propiedades físicas (tamaño, complejidad celular) o químicas en base a fluorescencia que emiten tras ser marcadas con un fluorocromo unido a otra partícula (anticuerpo, lecitina, neoglucoconjugado, etc)¹⁴.

El aparato con el que se realiza está técnica se llama Citómetro⁵ de flujo y lo podemos observar en la **Figura 16**.

La intersección de cada célula con la luz láser provoca la emisión de una serie de señales luminosas que permite diferenciar poblaciones celulares dentro de la muestra analizada. ¹⁹

La Citometría de Flujo es un método de lectura rápida que permite analizar un elevado número de células (de 10.000 a 50.000 para cada anticuerpo monoclonal) y proporciona un registro computarizado de los resultados.

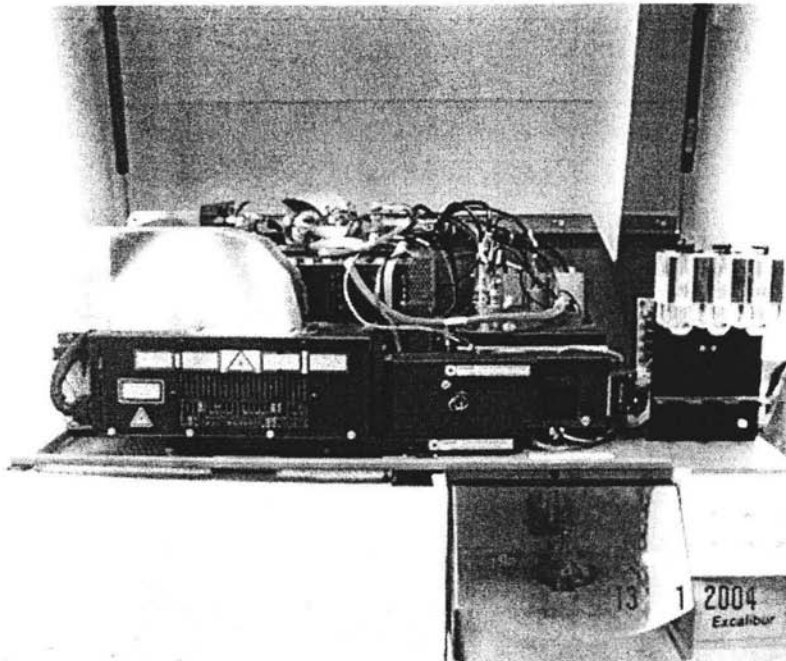


Figura 16. Citómetro de flujo, cortesía del laboratorio de Biología Molecular de la UAM-Iztapalapa.

Los sistemas básicos que componen a un citómetro de flujo son:

Los fluidos: Que nos sirven para introducir, analizar y medir células.

Los ópticos: Que nos sirven como una fuente de excitación y colección óptica para generar y coleccionar las señales de luz.

Los electrónicos: Que nos sirven para convertir las señales ópticas a señales electrónicas proporcionales y digitalizarlas para análisis en la computadora.¹⁴

Los componentes básicos de un citómetro van a ser el circuito de admisión de la muestra, el haz de luz láser, el bloque óptico cuyo objetivo es el de recoger la fluorescencia emitida por la célula y de este modo puede cuantificar esa emisión. Los resultados obtenidos de fluorescencia quedan reflejados en una pantalla en la cual, mediante diferentes programas, se representan en forma las células analizadas, permite la cuantificación de ADN y la determinación de la actividad proliferativa de la población celular.

Técnica y procedimiento.

El procedimiento de Citometría de flujo consta de dos etapas y se ejemplifican en la **Figura 17**.

Caracterización y Separación.

- a) Caracterización de la población celular: analizador, citómetro de flujo o citofluorímetro.

El sistema consigue que la suspensión celular llegue en condiciones de flujo laminar, formando un chorro muy fino que, como una consecuencia de la dilución, contiene las células individuales en suspensión. Estas pasan así de una en una a través de un haz luminoso láser, cuya longitud de onda permite la excitación de los marcadores fluorescentes incorporados previamente a la célula. En la luz emergente de cada célula se analiza la dispersión y la intensidad de la fluorescencia (emisión)

- b) Separación de células: clasificador de células activado por fluorescencia (FACS)

La corriente de líquido, tras pasar por el punto de detección, se transforma en una sucesión de gotas muy pequeñas (como consecuencia de una vibración aplicada por ultrasonidos a la cámara de flujo), las

cuales tienen como máximo una sola célula. Al mismo tiempo, en función de los resultados del análisis anterior de la célula, el clasificador aplica automáticamente a cada gota un pulso de voltaje que le proporciona una carga eléctrica.

El usuario define previamente el pulso que se ha de aplicar a cada gota (y, por tanto, el signo y cuantía de la carga que adquirirá), en función de criterios sobre los parámetros del análisis en el citómetro. El sistema informático que controla analizador y clasificador permite tal decisión en el breve intervalo transcurrido entre el paso de cada célula por el detector y la formación de la gota que la contiene. Al mismo tiempo, todos los datos de cada célula se almacenan para su estudio posterior.

A continuación las gotas cargadas pasan por un campo eléctrico, donde se desvían de acuerdo con su carga para caer en distintos tubos de recolección de muestra; de esta manera se consigue la separación de subpoblaciones celulares de acuerdo con los criterios definidos (combinación de tamaño, estructura y fluorescencia).¹⁸

Parámetros medibles por Citometría de Flujo.

Tamaño y complejidad interna

Receptores de superficie

Cambios en la membrana celular

Contenido de ADN y ARN

Síntesis de ADN

Estado de óxido-reducción

Actividad enzimática

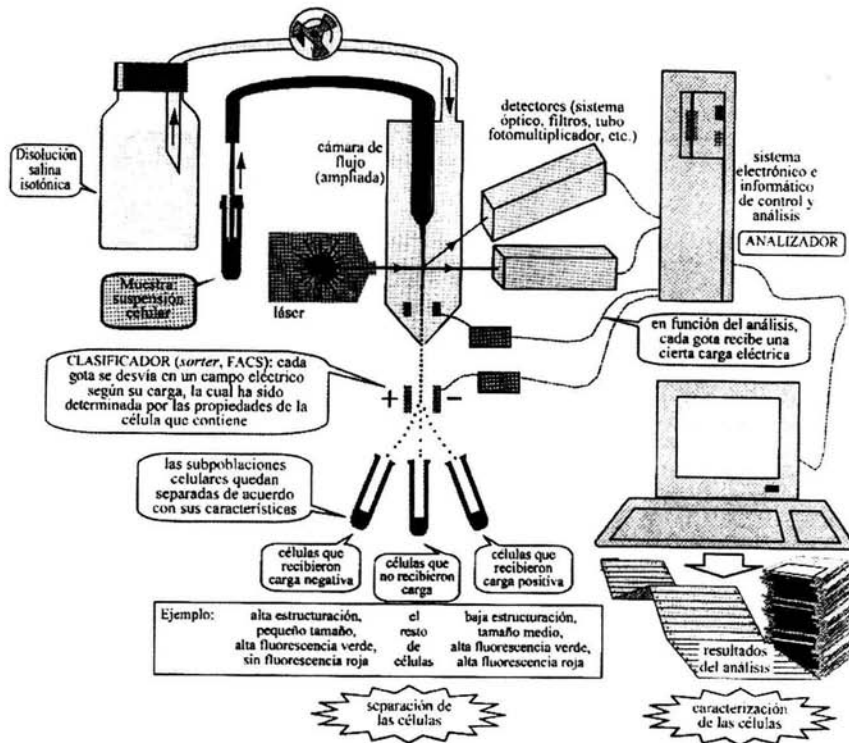


Figura 17. Pasos del procedimiento de la Citometría de flujo, Biología Molecular e Ingeniería Genética, Luque 2002

Cuadro con ejemplos de propiedades analizadas en Citometría de flujo por medio de diferentes parámetros.

Parámetro medido	Propiedades celulares analizadas
Dispersión perpendicular de la luz (refracción) o FSC	Tamaño (diámetro y razón de volumen núcleo/citoplasma)
Dispersión perpendicular de la luz	Arquitectura interna (grado de estructuración subcelular, contenido de orgánulos, granularidad, rugosidad...)
Intensidad de fluorescencia ¹⁸	Cantidad de fluorocromos marcadores previamente incorporados a la célula.

	Comúnmente se usan anticuerpos, marcados con fluorocromos, contra antígenos de las superficies celulares o bien colorantes o sondas que se fijan al DNA.
--	--

Usos y Aplicaciones

Los usos y las aplicaciones son en este caso la caracterización y separación de células por Citometría de Flujo. En la actualidad es un método de separación importante en investigación biomédica y en el laboratorio clínico, especialmente por su capacidad para el análisis automático de suspensiones celulares, pues se basa en el transporte de una suspensión celular (células sanguíneas, aspirado medular, tejidos disociados, etc.), impulsada por un flujo de disolución isotónica, al punto de medición o cámara de flujo. En su aplicación habitual, la Citometría de flujo analiza y separa células previamente marcadas con un fluorocromo.

La Citometría de flujo siendo una herramienta fundamental, eficaz y con un gran potencial a futuro tiene por objetivos:

- Mediciones objetivas, cuantitativas muy precisas.
- Análisis rápido: de 500 a 400 células por segundo
- Detección simultánea de diferentes características
- Medición de muy diversos aspectos celulares (estructurales y funcionales).

Así como la detección y cuantificación de antígenos: Identificación de antígenos mediante anticuerpos monoclonales marcados con diferentes fluorocromos, que permiten la identificación y clasificación de diferentes células tanto normales como alteradas

En la detección de Inmunoglobulinas humanas para diagnóstico, monitoreo y tratamiento de enfermedades autoinmunes como purpura trombocitopénica idiopática, anemias hemolíticas y neutropenia, así como esclerosis múltiple, lupus eritematoso y artritis reumatoide, y en subpoblaciones linfocitarias del Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida.

En el recuento de ADN, de receptores progesterona (célula en tumores de mama), de células de sangre periférica y de médula ósea (obtenidas para trasplante).

Con esta técnica se puede establecer el origen, la subclasificación del grado en que se encuentran las lesiones de baja malignidad ayudando, en el diagnóstico cuando los cambios morfológicos son equívocos o no hay certeza de estos, aportando información del pronóstico tomando en cuenta el estadio en que se encuentran, además de monitorear la respuesta en el tratamiento, valorando la posibilidad de una recidiva

Por último existen otras aplicaciones como en el caso del Cariotipo de flujo (que es un tipo mapeo genético)¹⁹

4.3. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Generalidades.

Es una técnica que imita la habilidad natural de la célula de duplicar el ADN, generando múltiples copias de una secuencia específica de nucleótidos de un organismo, detectando cantidades diminutas de organismos con alta especificidad. Como se observa en la **Figura 18**, se basa en la multiplicación in vitro de una región de ADN elegida, partiendo de una cantidad mínima y en pocas horas producir enormes cantidades de la molécula inicial²⁰

Considerada hoy en día una herramienta imprescindible en el Laboratorio de Biología Molecular e Ingeniería Genética, el objetivo de esta técnica es la amplificación directa de un gen o un fragmento de ADN, o indirecta de un RNA, presente en mezclas de muy diversas fuentes, sin necesidad de una purificación previa de la muestra original.

Se puede hacer a partir de:

- a) homogenizados
- b) extractos de tejido
- c) sangre completa
- d) mezclas de fragmento de DNA obtenidos con enzimas de restricción
- e) muestras resultantes de la extracción
- f) aislamiento de DNA

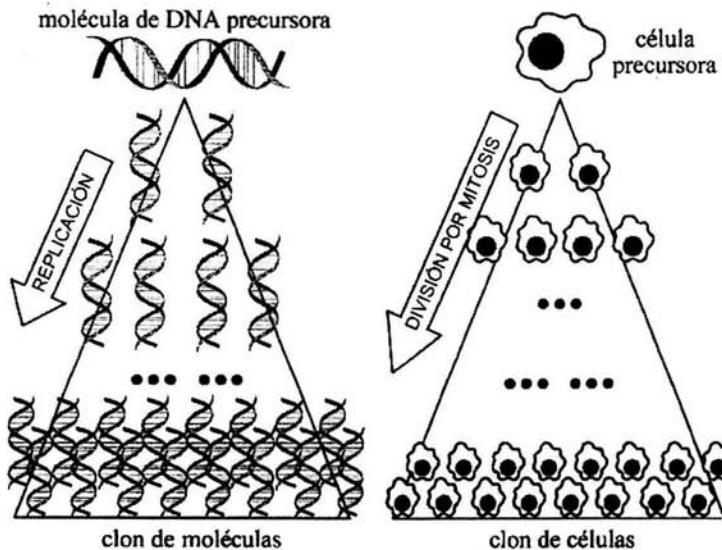


Figura18. Clon de moléculas y células. Biología Molecular e Ingeniería Genética, Luque 2002

Técnica.

1. Ciclo PCR

Mediante la aplicación en forma cíclica de estos tres procesos (desnaturalización, unión, extensión), se consiguen múltiples copias del fragmento de ácido nucleico en un corto espacio de tiempo.¹⁸

En teoría es un método sencillo, sensible y relativamente rápido para amplificar secuencias, requiriéndose un control preciso de las variables que condicionan este triple proceso (secuencia, diana, cebador, enzimas y resto de componentes), además de instrumentos adecuados llamados termocicladores de ADN (que automáticamente controla y alterna temperaturas durante periodos programados de tiempo por el número apropiado de ciclos usualmente de 30 a 40 ciclos), para establecer las condiciones de cada etapa y repetirlas cíclicamente (tiempo temperatura, número de ciclos, etc.) esta automatización es sencilla y de bajo costo

Este ciclo consta de tres pasos:

1. Desnaturalización (para dar hebras sencillas)
2. Unión (alineación, hibridación o etapa de templado)
3. Extensión (replicación, enlongación)¹⁸

Los tres pasos²⁰ se muestra gráficamente en la **Figura 19**

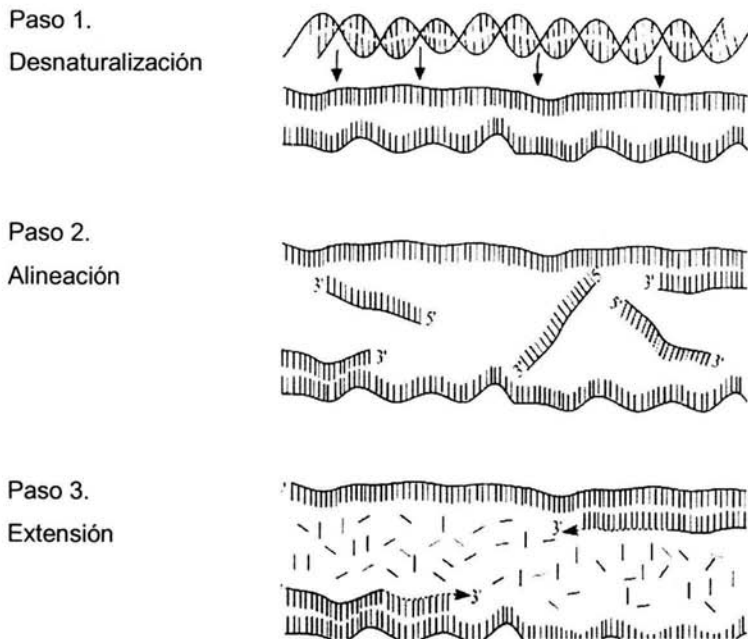


Figura 19.

Esquema que muestra los tres diferentes pasos del PCR, Desnaturalización, Alineación y Extensión. The Polymerase Chain Reaction. Mullis, 1994

Paso 1. Desnaturalización por calor

Usualmente se lleva a cabo a una temperatura mayor o igual a 90°C ²⁰ separando la doble hebra de ADN en 2 hebras sencillas rompiendo los enlaces entre la desoxirribosa y los grupos fosfato permanecen intactos.²¹

Calentamiento para la separación de las dos hebras del ADN, mediante una incubación breve (30-120 s) a una temperatura entre 68 y 97°C , que debe ser superior a la fusión de la región de ADN que se quiere amplificar.¹⁸

Paso 2. Alineación (Unión del partidor al objetivo)

Los partidores son secuencias sintéticas cortas de ADN de una sola hebra que consiste de 20 a 30 bases. Son específicos y delimitan la región

objetivo del genoma del organismo de interés. Se incluyen dos partidores en la reacción de la PCR, cada uno complementario de una de las hebras de ADN que se separan durante la desnaturalización. Usualmente, este proceso se lleva a cabo entre 40° C y 65° C, dependiendo de la longitud y la secuencia de bases de los partidores. Esto permite la unión específica de los partidores a su hebra complementaria.²¹

Templado o Hibridación: Enfriamiento rápido por debajo de la temperatura de fusión (T_m) de forma que se permite la hibridación de las hebras sencillas del ADN de interés con los oligos cebadores. Generalmente se usan temperaturas de 37°C a 65°C que se mantienen entre 10 y 20 s.¹⁸

Paso3. Extensión

Una vez que los partidores se unieron a sus secuencias complementarias, se eleva la temperatura a 72° C y la enzima Taq DNA polimerasa se usa para explicar las hebras de ADN. La Taq polimerasa comienza el proceso de extensión en dirección 5' a 3' agregando los nucleótidos correspondientes, obteniéndose la hebra complementaria de ADN.²⁰

Al final del ciclo de la PCR, hay 2 dobles hebras de ADN idénticas a la original, cada nueva hebra producida se denomina ampliación.

Conforme la PCR continúa, se crean primero 2, 4, 8,..... $2n$ copias (n = número de copias) la secuencia objetivo es copiada una y otra vez con el objeto de hacer millones de copias.²¹

Elongación o Replicación: Etapa de amplificación propiamente dicha (72°C-75°C, 1-3 min), en la que la ADN polimerasa termoestable elonga los cebadores, empleando como molde ambas hebras originales.¹⁸

Además de las 3 etapas de cada ciclo, comúnmente se añade una etapa previa y una final al conjunto de todos los ciclos.

La previa a elevada temperatura (incluso a superior a las de las etapas de desnaturalización), sirve para inactivar proteasas y nucleasas de la muestra, así como para asegurar la desnaturalización completa del ADN de partida, especialmente si este es de gran tamaño o posee regiones muy compactadas.

La etapa final, consiste en una prolongación de la última enlongación, para permitir que se complementen todos los fragmentos.²⁰

Características del proceso

- a) Rendimiento: Puesto que los productos de cada ciclo sirven de molde para el siguiente, la acumulación de copias (tanto totales como dianas) es exponencial en vez de lineal, sin embargo en la práctica el rendimiento de cada etapa no es completo, por lo que las cifras se ven algo reducidas. A pesar de ello, siguen siendo muy elevadas. Se han desarrollado modificaciones al método descrito, encaminadas a aumentar la eficiencia, sobre todo en tiempo y temperatura de templado.
- b) Duración: La duración de cada una de las tres etapas de cada ciclo y el número de ciclos deben optimizarse, dependiendo de la secuencia concreta que se quiera amplificar. En muchos casos, la elección, de estas condiciones debe hacerse de forma empírica.
- c) Especificidad: Es muy elevada y está determinada especialmente por la secuencia de los cebadores utilizados y por las condiciones de templado. Se puede determinar la especificidad analizando por electroforesis los productos generados: la aparición de una banda única indica que la técnica es específica, por ejemplo, si la temperatura de templado se reduce excesivamente se producen falsos positivos debidos, fundamentalmente a apareamientos imperfectos del cebador con secuencias distintas de la diana, aunque similares, que resultan así también amplificadas.

- d) Capacidad de detección: Es muy alta, tanto que la PCR puede permitir detectar una única molécula de ADN en casi cualquier tipo de muestra clínica, forense o arqueológica (célula, pelo, semen, etc.). Sin embargo esta característica supone también un elevado riesgo contaminación por moléculas de origen ajeno a la muestra.³²
- e) Fidelidad: La capacidad de copiar secuencias con precisión, sin introducir mutaciones (cambios en la secuencia de nucleótidos). Esta característica depende sobre todo de que la enzima empleada tenga o no actividad correctora de prueba. La elección de la enzima dependerá del objetivo de la PCR. No es muy importante la fidelidad si sólo se pretende obtener una sonda, pero es fundamental si el objetivo es la identificación de mutaciones poco frecuentes.¹⁸

Variantes del Método.

1. PCR "Larga" (Long PCR) o LA-PCR (Longer and Accurate PCR) más larga y exacta.

Objetivo: Superar los límites de la PCR convencional para amplificar con fidelidad regiones diana de gran tamaño (entre 5 y 40 kb). El principal factor limitante es la ausencia de actividad correctora de pruebas en la polimerasa Taq, por lo que se añade una cantidad menor de otra enzima con capacidad de corrección de pruebas para contrarrestar la carencia de esta actividad y, al mismo tiempo, seguir aprovechando la eficacia de elongación de la polimerasa principal (Taq o similar).

2. PCR "anidada"

La especificidad puede aumentarse realizando una segunda reacción de PCR, con cebadores nuevos que hibridan dentro del fragmento diana amplificado por el primer par, dando así lugar a productos no específicos

generados en la primera PCR (que se observan en la electroforesis como varias bandas o una banda difusa), que por ello no resultarán amplificadas en la segunda. Este método también sirve para aumentar el factor de amplificación conseguido, al suponer dos rondas de amplificación.³²

3. PCR inversa.

Esta variante se emplea para clonar regiones desconocidas de un DNA, situadas en posición vecinal a secuencias diana conocidas, en lugar de amplificar la región interna, flanqueada por dos cebadores (PCR convencional), se amplifica la región externa que flaquea a los cebadores, es necesario cortar el ADN a en ambos lados de la región diana con una enzima de restricción, de tal forma que los extremos cohesivos resultantes puedan hibridar entre sí, formando una molécula circular, esta es ligada por una ligasa y se realiza la PCR con cebadores que hibriden con los extremos de la secuencia conocida, por lo que la elongación se extenderá, alrededor del círculo, generando copias de ADN normal, por la posición de ambos cebadores.

4. PCR con cebadores.

Consiste en la amplificación de una región de ADN de secuencia desconocida ligando a sus fragmentos de restricción unos adaptadores, oligonucleótidos sintéticos con extremos cohesivos compatibles con los generados en la muestra, una vez desnaturalizados, se añaden cebadores específicos para las secuencias de los adaptadores, así se amplifica el conjunto de adaptadores y secuencia diana, pero debe de saberse que se amplifican por igual todos los fragmentos de restricción presentes y no sólo uno.

5. PCR asimétrica.

Aquí se trata de generar copias de hebra sencilla de un ADN, siendo la variante más sencilla, donde se añaden cantidades muy diferentes de ambos cebadores, de modo que tras los primeros ciclos de PCR uno de ellos se agota y, disponibles y a suficientes copias del ADN diana, sólo una de sus hebras sigue amplificándose gracias al cebador más abundante.³²

6. RT-PCR: amplificación de ARN

El nombre de transcriptasa inversa, indica que se trata de una amplificación de RNA (especialmente mRNA) a través de la síntesis previa de su cADN (DNA complementario al ARN), que después se amplifica por PCR, aquí no se obtiene copias de ARN se partida, sino de ADN, aunque se conserva obviamente la secuencia de aquél. Siendo el método con mayor capacidad de detección para las mediciones de expresión genética in vitro, se utiliza para amplificar mARNs de células asequibles (sanguíneas), con una expresión elevada de ciertos genes (globina), o en análisis de transcritos de genes expresados en grado mínimo.

Usos y Aplicaciones:

En la práctica de Medicina Forense: A partir de una escasa muestra determina la culpabilidad de un sospechoso.

En pruebas de Paternidad: Para establecer parentescos familiares.

En Pruebas Evolutivas o Arqueológicas: Comprende el estudio de muestras fósiles en distintos periodos, estableciendo parentescos entre ellos.

En Genética: Para establecer diagnóstico rápido en mutaciones responsables de la enfermedad. Determina infecciones virales o bacterianas, con una muestra amplificada de ADN, obteniendo la carga viral del paciente

Investigaciones Biológicas.²²

Y en el Diagnóstico Clínico: Para obtener el diagnóstico clínico de la enfermedad tomando una muestra mínima de material genético, copiar la secuencia de interés las veces necesarias y generar suficiente cantidad de muestra para detectar la presencia o ausencia de patógenos y en muchos casos realizar la cuantificación del mismo.³²

CONCLUSIONES.

Al término de este trabajo se revisaron cada una de las técnicas Microscópicas y Moleculares lo que permitió ver las diferencias significativas entre cada una de estas, así tenemos que la más importante entre las técnicas Microscópicas Convencionales y las Electrónicas es el poder de resolución, sin embargo la aplicación de la Microscopía Electrónica en la investigación Biológica tuvo que esperar hasta que se encontraran técnicas adecuadas para la conservación de la muestra y se perfeccionaran los métodos para la obtención de cortes ultradelgados.

El descubrimiento de la inmunocitoquímica y de los sistemas de computación de análisis de imágenes, entre otros, dieron origen a la Microscopía Confocal, así mismo el uso de fluorocromos y de procesos más minuciosos y sensibles impulsaron durante las dos últimas décadas a una serie de procedimientos de laboratorio que facilitan en mucho el análisis del ADN, llamadas Técnicas Moleculares como la Hibridación in situ, la Reacción en Cadena de la Polimerasa y la Citometría de Flujo, todas han permitido cruzar barreras naturales entre especies y analizar genes de cualquier organismo.

Una de las consecuencias más importantes derivadas fue la producción de fragmentos de ácidos nucleicos a gran escala, abriendo las puertas a la secuencia de estos y a las disciplinas como el Diagnóstico Molecular y la Terapia Genética.

GLOSARIO

Amortiguador: Sustancia química que impide que se produzcan cambios bruscos en el pH, mediante el intercambio de protones manteniendo la concentración de iones de hidrógeno.

Amplificación: Es la relación entre el tamaño aparente del objeto y su tamaño real.

Anoxia: Falta de oxígeno en la sangre o en los tejidos corporales.

Citómetro: Analiza las células en suspensión que interfieren de forma individual con una fuente de luz. Dispositivo para contar células sanguíneas.

Condensador: Conjunto de lentes colocadas sobre el foco luminoso, que alinea toda la luz en un haz.

Contraste: Diferencia de intensidad entre el medio y el objeto.

Corte: rebanada de material limitada por caras planas y casi lisas.

Cristalografía: Conjunto de técnicas de separación de mezclas de gases, líquidos o sólidos, basados en la distinta afinidad de estas sustancias por dos medios distintos, fase móvil y fase estática o sorbente.

Desnaturalización: Acción de alterar las propiedades o condiciones de una cosa, desvirtuándola, destrucción del cáncer común de un asustancia.

Fluorescencia: Fenómeno que presentan ciertas sustancias, si se les ilumina o radia con luz de onda corta y son capaces de convertir esta luz de onda corta (invisible), en la luz de onda larga (visible).

Gen: Cada una de las partículas dispuestas de un orden fijo a lo largo de los cromosomas y que determinan la aparición de los caracteres hereditarios en los virus, las bacterias, las plantas y los animales.

Hibridación: Proceso mediante el cual dos cadenas complementarias de ácido nucleico forman una doble hélice durante un periodo de unión. Formación de un par de ácidos nucleicos total o parcialmente complementarios mediante la asociación de hebras aisladas.

Imbibición: Acción o efecto de embeber agua, absorción de un líquido.

Isotónico: (de *iso* del griego, *tonos*, tensión), que posee una tonicidad igual a otra dada, especialmente de las soluciones salinas cuya concentración molecular en sales es igual a la del suero, de la sangre, tiene la misma presión osmótica que este y no produce la desintegración de los glóbulos rojos.

Luz: Es una manifestación de la energía universal que se desplaza por ondas y que no se necesita medio elástico para su transporte.

Microscopía: Ciencia que se encarga de la construcción y empleo del microscopio.

Microscopio: Instrumento óptico destinado a observar de cerca objetos extremadamente diminutos. La combinación de sus lentes hace que lo que se mira aparezca con dimensiones extraordinariamente aumentadas, volviéndose perceptible lo que no lo es a simple vista. Diccionario de ciencias de la salud.

Microscopía de Contraste: Método de la microscopía que convierte las variaciones del índice de refracción del objeto en variaciones de intensidad de la imagen.

Mitocondria: Pequeños componentes esféricos o en forma de bastoncillo que se encuentran en el citoplasma de las células, encerradas en una doble membrana, con un espacio de la membrana interna entre las dos unidades, al interior invaginado hacia dentro del orgánulo con una serie de proyecciones.

Muestra: es la rotura irregular que sigue las regiones de menor tenacidad del material y que resulta en una superficie con un importante relieve.

Nucleótido: Compuesto derivado del ácido nucleico, cuando éste se desdobra por acción de la nucleasa.

Nucleasa: Enzima o grupo enzimático que actúa como catalizador en la descomposición del ácido nucleico en nucleótido.

Ocular: Perteneciente o relativo a los ojos. Lente o conjunto de lentes del microscopio colocados más cerca de los ojos del observador.

Óptica: Es el estudio de la interacción de las ondas de la luz con medios reflectores y medios refractores. Gran diccionario de las ciencias.

Protoplasma: Sustancia de estructura coloidal y carácter viscoso y traslúcido, que contiene una gran cantidad de agua y constituye el material esencial de todas las células animales y vegetales.

Punto crítico: se le llama a las condiciones de presión y temperatura únicas para cada sustancia, en las que la densidad de su fase líquida y la de vapor son iguales y la interfase entre ellas desaparece y así evitamos la tensión superficial y se puede dejar escapar el vapor hacia la atmósfera, recuperando la muestra seca.

Radioactiva: Referente a los cuerpos dotados de radioactividad (actino, polonio, radio).

Sonda: Fragmento corto de ácido nucleico, de secuencia conocida y complementaria.

Termociclador: Instrumento que se utiliza en el PCR que automáticamente controla y alterna temperaturas durante periodos programados, para establecer las etapas de esta técnica y repetirlas cíclicamente.

Ultramicrotomo: Instrumento para realizar cortes titulares muy delgados, especiales para ser observados en el microscopio electrónico.

Vacuola: Cualquier espacio de pequeño tamaño que se forma en el protoplasma de una célula.

BIBLIOGRAFÍA.

¹ Moran, Mª Genoveva González. Técnicas en Biología Celular, Teoría y Práctica. Editorial AGT Editor, S.A. México, DF. 1996.

² Mateos, Pedro. Observación de los Microorganismos: El Microscopio, Preparación y Examen de Muestras. Universidad de Salamanca, 2001.
<http://www.edicion-micro.usal.es/web/educativo/micro2/tema02.html>

³ Casastelli, J.D. Microscopía Teórico-Práctica. Editorial Ediciones Urmo. Londres, 1995.

⁴ Freifelder. D. Técnicas de Bioquímica y Biología Molecular. Editorial Reverté. España, 1991

⁵ Mingot, Galiana. Gran Diccionario de las Ciencias. Tomo I-IV Ediciones Larousse, Paris 1987

⁶ Piñeiro G, Ramón, Pérez de la P, Evangelina, Leyva M, Joaquin. Diccionario de Términos Médicos Editorial McGraw-Hill- Interamericana. España, 2000.

⁷ De Kruijff, Paul. Los Cazadores de Microbios. Ediciones Quinto Sol, S.A. de C.V. México DF. 1998

⁸ Vásquez Nin, Gerardo, Echeverría. Olga. Introducción a la Microscopía Electrónica Aplicada a las Ciencias Biológicas. Editorial UNAM y Fondo de Cultura Económica, 2000 México DF.

⁹ Centro de Investigaciones Energéticas, Medioambientales y Tecnológicas. Caracterización Microestructural de los Materiales por Microscopía de Transmisión. Mayo, 2003 www.ciemat.es/capacidades/caramima.htm

¹⁰ Universidad de Alicante, 1998
www.ua.es/investigación/sti/pdf/microscopia_electronica

¹¹ Barrera, Liliana. Microscopía Electrónica del Epitelio Sinusal en Pacientes con Sinusitis Crónica. Colombia, 2000
www.encolombia.com/medicina/otorrino/

- ¹² Fernández C. Asunción. Instituto de Ciencia de Materiales de Sevilla. Servicios de Investigación. España, 2002.
www.icmse.cartuja.CSIC.es/servicios/met.htm
- ¹³ Morales G, M^a Dolores Universidad Autónoma de Madrid Enero, 2004.
www.uam.es/investigación/servicios/sidi/especifica/confoc
- ¹⁴ Juan Rosai, M.D. Ackerman's. Surgical Pathology Editorial Mosby Company. USA, 1998.
- ¹⁵ Verona, Alonso; Palomares, T. Microscopía Confocal: Principios y Aplicaciones. Universidad de Oviedo, Asturias. 2001
www.uniovi.es/sic/esp/confocal.htm
- ¹⁶ M. Aballe, J. López Ruíz, J.M. Badía y P. Adeva. Microscopia Electrónica de Barrido y Microanálisis por Rayos X. Editorial Rueda, Madrid 1996.
- ¹⁷ Bruce Alberts, Bray Dennes, Julian Lewis, Martin Raff. Biología Molecular de la célula. Editorial Omega, Barcelona 1994.
- ¹⁸ Luque José, Herráez Ángel. Biología Molecular e Ingeniería Genética. Editorial Harcourt, España, 2002.
- ¹⁹ Gascon Mariño, Antonio. Boletín Oncológico N° 8, 1998.
www.opolanco.es/Apat/Boletin2/CITOFUJO.htm
- ²⁰ Laboratorios Roche. ¿Que es PCR? Chile, 2003.
[www.us.labsystem.roche.co/pcr/mainpage,htm](http://www.us.labsystem.roche.co/pcr/mainpage.htm).
- ²¹ Gfriffin G Hugo. PCR Technology.Current Innovations. Editorial CRC Press. USA, 1994.
- ²² Biología Molecular, PCR. 2000.
www.bioinformatics.weizmann.ac.il/mb/bioguide/per/contents.html
- ²³ Amerise Christian, Delgado AM, Meheris H. Análisis Morfoestructural con Microscopía Óptica y Electrónica de Transmisión del Esmalte Dentario Humano en Superficies Oclusales. Venezuela, 2002.
www.scielo.org.ve/scielo.php?scrip=sci_arttextpid
- ²⁴ Microscopia Inventos, 1999 www.Educar.org/inventos/elmicroscopio.asp

- ²⁵ Sánchez Rincón Ana Rosa, Reyes Ortiz Norberto. Manual de Microscopía Óptica. Editorial Asociación de químicos del INNSZ. México, 1992
- ²⁶ L.C. Junqueira y J. Carneiro. Biología Celular. Editorial La Prensa Médica Mexicana SA de CV. México 1976
- ²⁷ Karp Gerald. Biología Celular. Editorial McGraw-Hill. USA, 1998.
- ²⁸ Norvikoff, Alex B. Estructura y Dinámica Celular, Editorial Interamericana USA, 1978.
- ²⁹ Unidad de Microscopía Electrónica. Algunas Aplicaciones en el Control de Productos. México, 1987.
www.Geocites.com/capecanavera/lab/1987/menu.htm
- ³⁰ Nikon. Sistema Confocal. México, 2000
www.tecnicaenlaboratorios.com/Nikon/Confocal.htm
- ³¹ Cortés, José. Partes de un Microscopio Óptico Compuesto. Recursos Didácticos para Biología. España, 2000.
www.joseacortes.com/practicas/microscopio.htm.
- ³² Mullis, K.B, Ferré, R.A. The Polimerase Chain Reaction. Editorial Birkhäuser . Boston, USA, 1994.
- ³⁴ Burgal, María. Microscopía Citofotométrica de Barrido Láser Confocal. Madrid, 1996. www.ochoa.fib.es/memoria/res_lab_micros_conf.htm
-