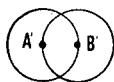


EL MICROSCOPIO ELECTRÓNICO Y SUS APLICACIONES A LA BIOLOGÍA *

Mlle. M. CORDIER

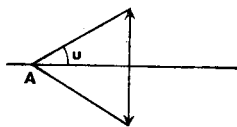
Licenciada en Ciencias por la Sorbona. - Subdirectora del Instituto Francés de Barcelona.

LA invención del microscopio se remonta a los principios del siglo XVII, en cuya época los hermanos JANSSEN, holandeses, tuvieron la idea de asociar varias lentes, obteniendo así el primer microscopio compuesto. Conocidos son todos los perfeccionamientos sucesivos sufridos por este aparato hasta llegar al estado en que le conocemos actualmente; fué principalmente durante el siglo XIX que se lograron los perfeccionamientos más importantes, hasta lograr finalmente un aparato cuyo poder separador es de 0,2 micras. Efectivamente el poder separador de un instrumento óptico está limitado por diversos fenómenos, entre los cuales el más importante es el de difracción; según este fenómeno, un sistema óptico cualquiera, como, por ejemplo, una lente, no da como imagen de un punto geométrico otro punto geométrico, sino un pequeño círculo luminoso; se considera que dos puntos objeto A y B están ópticamente separados



cuando los centros de las manchas imagen están separados por una distancia igual al radio de una de ellas. Pero este radio viene dado por la fórmula clásica de

Abbe $y = \frac{1,22 \lambda}{2 n \cdot \text{seno } u}$ en donde λ es la longitud de onda



de la luz incidente, n el índice de refracción del medio situado delante de la lente y u el semiángulo de abertura del haz incidente. Operando, pues, con el microscopio en las mejores condiciones posibles, es decir, utilizando

la luz ultravioleta cuya longitud de onda es corta, un objetivo de inmersión y un gran ángulo de abertura, se llega al poder separador anteriormente indicado, lo que corresponde a un aumento de 2 a 3.000 aproximadamente. Pero es imposible alcanzar más allá.

Sin embargo, desde hace unos veinte años, se ha puesto en práctica una nueva óptica, que permite obtener aumentos mucho mayores: la óptica elec-

* Conferencia pronunciada en la Real Academia de Medicina de Barcelona. Sesión científica del día 5 de mayo de 1949. Presidencia: Dr. F. Corominas.

trónica. Los dos principios fundamentales de esta nueva óptica son los siguientes:

1) La idea genial que LUIS DE BROGLIE presentó en 1921, según la cual a todo corpúsculo material debe ser asociada una onda cuya longitud viene dada por la fórmula $\lambda = \frac{h}{m \cdot v}$ o $\lambda = \frac{h}{p}$, siendo h la constante universal de Planck, que desempeña un papel fundamental en todas las nuevas teorías atómicas y cuánticas, cuyo valor es $6,61 \times 10^{-27}$; m , la masa de la partícula y v su velocidad, siendo p la cantidad de movimiento de la partícula.

Hay que hacer notar que cuando LUIS DE BROGLIE emitió su hipótesis, la onda a la que se refería era para él una simple ficción matemática; pero, en 1927, dos físicos americanos, DAVISSON y GERMER, le dieron una realidad física al obtener, con un haz de electrones atravesando un cristal, figuras de difrac-

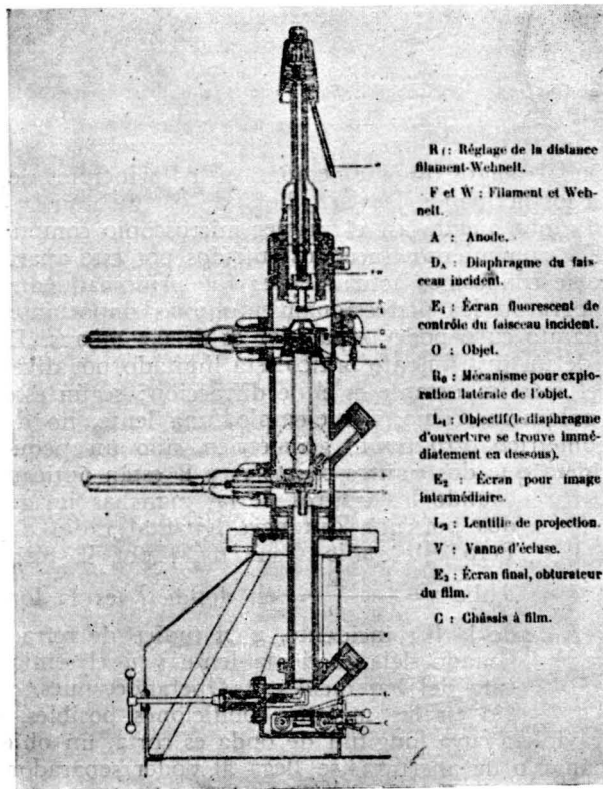


Fig. 1. — Esquema del microscopio electrónico

ción comparables punto por punto a las figuras de difracción obtenidas con cristales y rayos X. El experimento de estos dos físicos permitió, además, medir la longitud asociada a los electrones y encontraron que el valor medido correspondía exactamente al valor teórico previsto por LUIS DE BROGLIE.

Pero, si las partículas utilizadas son electrones (cuya masa en reposo vale $0,9 \times 10^{-27}$ gramos), animados de velocidades de varias decenas de millares de kilómetros por segundo, les corresponde una longitud de onda del orden de $0,04 \text{ \AA}$, es decir, 100.000 veces más corta que la de las radiaciones violetas, que

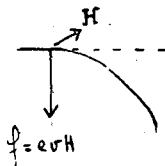
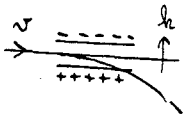
vale, como es sabido, 4.000 \AA (1 \AA (Angström vale $\frac{1}{10.000}$ de micra); teniendo

en cuenta que las condiciones de abertura del haz incidente no son las mismas en óptica electrónica que en óptica ordinaria, resulta que el poder separador de un microscopio electrónico podrá ser 1.000 veces mayor que el de un microscopio ordinario; se ve, pues, todo el progreso que así se ha realizado.

2) El segundo hecho fundamental es que un haz de electrones puede ser, en ciertas condiciones, desviado y focalizado como un haz luminoso cuando atraviesa una lente.

Estos factores que pueden modificar la dirección de una trayectoria de electrones, son: un campo eléctrico y un campo magnético, es decir, espacios en donde reinen o bien fuerzas eléctricas, o bien fuerzas magnéticas.

Sea, en efecto, una trayectoria electrónica horizontal; el electrón se desplaza con una velocidad v ; pasa entre las dos armaduras de un condensador cargado, entre las cuales, por lo tanto, existe un campo eléctrico h ; este electrón estará entonces sometido a una fuerza perpendicular a su dirección primitiva, de valor $f = e \times h$ (siendo e la carga eléctrica elemental del electrón, es decir, $4,77 \times 10^{-10}$ unidades electrostáticas). Bajo la influencia de esta fuerza, el electrón se desvía de su trayectoria inicial para tomar una trayectoria parabólica.



Igualmente, si el electrón inicial pasa entre los dos polos de un imán que crea un campo magnético H , dirigido, por ejemplo, perpendicularmente al plano del papel y de delante a atrás, el electrón estará entonces sometido a una fuerza perpendicular a su trayectoria y dirigida hacia abajo, cuyo valor será: $f = evH$, siendo v su velocidad. Bajo la influencia de esta fuerza, el electrón tomará una trayectoria circular.

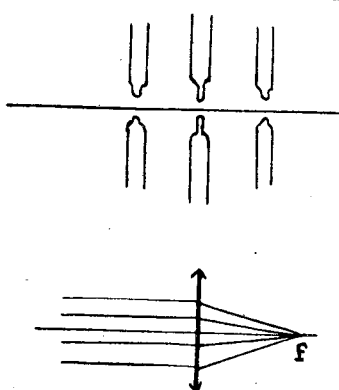
Si damos entonces al campo eléctrico o al campo magnético una situación determinada en el espacio, se podrán obtener fenómenos de focalización; lo que quiere decir que un haz de electrones incidentes viniendo todos de un mismo punto objeto, será transformado, después de cruzar el campo, en un haz refractado cuyos rayos convergerán todos en un mismo punto, que será, por lo tanto, la imagen del punto objeto.

Todavía hay más: un objeto plano podrá tener en el sistema una imagen plana, parecido geoméricamente al objeto. Tenemos entonces completamente las condiciones de la óptica geométrica, y así se concibe que se pueda hablar de óptica electrónica.

Las condiciones que debe reunir el campo para que esto se realice, son: presentar una simetría esférica o más corrientemente cilíndrica; es decir, que el campo deberá tener un eje de simetría de revolución que constituya el eje óptico del sistema, de manera que un objeto plano perpendicular a este eje dé una imagen plana parecida geoméricamente e igualmente perpendicular al eje. Nos limitaremos a la descripción del microscopio electrónico que utiliza campos eléctricos, es decir, a lo que se llama el microscopio electrónico electrostático.

Los órganos esenciales de tal microscopio serán los que actuarán como las lentes en un microscopio, y se llaman por esta razón lentes electrostáticas.

Una lente electrostática está formada, generalmente, por un conjunto de tres diafragmas metálicos, provistos de orificios muy pequeños para permitir el paso del haz electrónico, presentando una disposición simétrica, el diafragma central elevado a un potencial que podemos llamar potencial cero, y los dos diafragmas laterales elevados a un mismo potencial, que podrá ser de 50.000, 60.000 e incluso 80.000 voltios. Un sistema así actúa sobre un haz luminoso; es decir, que para un sistema tal, se puede hablar de distancia focal, siendo, como sabemos, el foco imagen de este sistema el punto del eje principal donde



convergen los rayos refractados correspondientes los rayos incidentes paralelos al eje principal. Los factores que actúan sobre la distancia focal de una lente de esta naturaleza son: el diámetro del orificio practicado en el diafragma central (que siempre inferior a un milímetro), el espesor del diafragma central, la distancia entre el diafragma central y los diafragmas laterales, y la diferencia de potencial entre los diafragmas. Así, para una diferencia de potencial de 60.000 voltios, una separación entre los diafragmas de 1,7 mm., la distancia focal es de 2 mm.; en otro caso, la diferencia de potencial de 80.000 voltios con una separación de 3 mm. dará una distancia focal de 5 mm. Los diafragmas deben estar contruídos en metales pesados, como el tungsteno, el tántalo o aceros especiales; sus superficies deben ser lo más lisas posible, puesto que se deben procurar evitar las descargas que podrían producirse entre los diafragmas y que destruirían la lente.

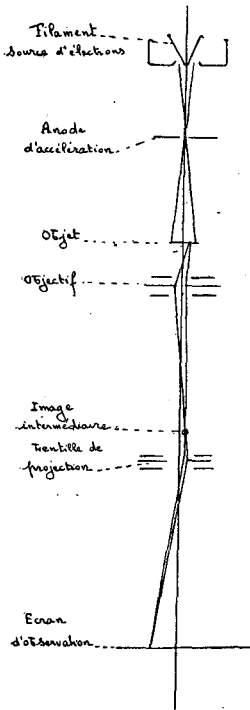
Un microscopio electrónico (Fig. 1) estará, por lo tanto constituido como un microscopio ordinario; constará de:

1) Un sistema de iluminación del objeto es decir, un sistema productor de electrones, que se llama un cañón de electrones, formado esencialmente por un cátodo caliente constituido por un hilo de tungsteno de 1/10 a 1/20 de mm. de diámetro que emite electrones; estos electrones serán acelerados por la presencia de un ánodo provisto de un orificio muy fino, que servirá a la vez de diafragma al haz de electrones y de acelerador, puesto que se encuentra a un potencial elevado respecto al cátodo.

2) El portaobjetos; el objeto debe ser extremadamente fino, ya que los electrones son absorbidos por la materia muy fuertemente; por eso se utilizan generalmente portaobjetos de colodión o de resinas plásticas, a los que se les llega a dar espesores del orden de 15 a 20 milimicras; el objeto, también extremadamente delgado, se colocará sobre este portaobjetos.

3) La lente objetivo, que está colocada muy cerca del objeto y que nos dará de éste una imagen aumentada de 60 a 100 veces.

4) La lente de proyección, que tiene generalmente una distancia focal



un poco más corta que la del objetivo y que nos dará la imagen definitiva de la imagen objetiva, aumentada, aproximadamente, unas 100 veces.

5) Una pantalla de observación formada por una substancia fluorescente, como el sulfuro de bario o el tungstato de calcio, que se ilumina por el choque de los electrones, haciendo así sensible para el observador la imagen definitiva. La pantalla de observación puede ser sustituida por una placa fotográfica, y así se puede incluso aumentar más tarde la imagen fotográfica. Como en el microscopio óptico, las posiciones relativas de las dos lentes se determinan de antemano definitivamente y se enfoca desplazando el objeto con respecto a la lente objetivo; el enfoque es relativamente fácil, ya que el haz electrónico está extremadamente suelto, de tal modo que la profundidad del campo es relativamente grande, aproximadamente 5 micras; esto constituye una ventaja para la facilidad de enfoque, pero un inconveniente si se quieren observar diferentes planos en el objeto, ya que éste se encuentra enfocado al mismo tiempo en todo su espesor. Los diafragmas centrales de las lentes se mantienen al mismo potencial que el cátodo productor de electrones, a fin de suprimir los inconvenientes que podrían presentarse por una variación accidental de los potenciales eléctricos.

Naturalmente, el microscopio debe estar completamente cerrado y en su interior debe hacerse un vacío extremado, de 1/100.000 a 1/1.000.000 de mm. de mercurio, sin el cual los electrones no podrían desplazarse.

El microscopio electrónico es, por lo tanto, un aparato complicado que necesita para su funcionamiento una instalación eléctrica capaz de producir potenciales altos, tan estables como sea posible, y un sistema de enrarecimiento que pueda producir un vacío extremado. A pesar de esto, la perfección de la técnica ha permitido poner en servicio aparatos de fácil manejo para el operador. Así, el microscopio electrónico de la Compañía General Francesa de T. S. H. tiene una duración de enrarecimiento total de tres minutos, una duración de colocación de uno a algunos segundos, una duración de cambio de objetos de tres minutos y una duración de cambio de film inferior a 10 minutos. (Fig. 2).

Con los microscopios electrónicos actuales se llega a un aumento total del orden de 50.000 a 60.000, permitiendo un poder separador de aproximadamente 8 milimicras, de donde resulta que, en términos generales, en el mejor de los casos, el aumento de este aparato es aproximadamente 30 veces el de los microscopios ópticos.

Debido a esto, nuestros conocimientos han adelantado un gran paso en el campo de las dimensiones pequeñas; en particular, el microscopio electrónico puede prestar grandes servicios en el estudio de las aleaciones, de las superficies metálicas y del desgaste que éstas experimentan durante su funcionamiento.

Ha permitido, igualmente, grandes progresos en el campo de la biología. Una célula tiene un tamaño del orden de 1/100.000 de mm., es decir, de 10 micras; se encuentra dentro de los límites del poder separador del microscopio óptico, así como también un gran número de microbios. Y podríamos decir, en cierta manera, que hay una coyuntura favorable en el hecho de que las células animales y vegetales y muchos agentes patógenos tienen dimensiones que entran justamente dentro de las posibilidades del microscopio óptico; sin lo cual la

biología y la medicina no habrían podido hacer los progresos inmensos que han hecho durante la segunda mitad del siglo XIX). Las estructuras de cuerpos cuyos tamaños son del orden de $1/10$ y de $1/100$ de micra son inaccesibles para el microscopio óptico; se las puede poner de manifiesto por medios indirectos, como el ultramicroscopio; pero éste no es más que un medio imperfecto, que permite solamente descubrir los objetos submicroscópicos, pero no conocer sus detalles. Entre la $1/100$ de micra y la $1/1.000$, no existía ningún medio de investigación, lo que corresponde al tipo de organización molecular. Más allá, han sido dados datos muy exactos por medio de los diafragmas de difracción de los rayos X: se conoce así la organización de los cristales y se puede alcanzar el orden de tamaño de las moléculas.

Y este dominio, que permanecía virgen, el de los tamaños entre $1/10$ y $1/1.000$ de micra, es precisamente el que hoy se puede explorar con el microscopio electrónico. No hay duda que para esta observación se presentan serias dificultades: es preciso que el grosor de los objetos que se hayan de examinar

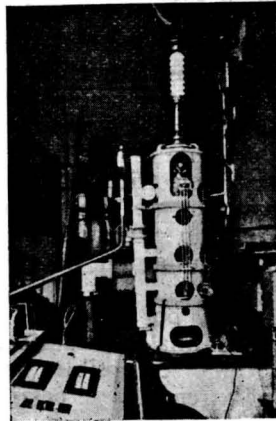


Fig. 2.—Microscopio electrónico. Aspecto exterior

sea sumamente reducido; por otra parte, como hemos indicado ya, la profundidad del campo del microscopio electrónico, del orden de 5 micras, es grande y no permite una exploración del objeto en profundidad; además, la observación debe hacerse en el vacío y bajo la acción de electrones animados de grandes velocidades, es decir, en condiciones abióticas. Sin embargo, VON ARLENNE ha podido obtener la germinación de esporos bacterianos después de haber pasado por el microscopio electrónico.

La observación de las células llamadas eucariotas, es decir, pertenecientes a tejidos de organismos superiores, es bastante delicada, toda vez que es preciso extenderlas en capas muy delgadas; algunos experimentadores han logrado extender en una capa suficientemente delgada, sobre un hilo de resina polivinílica, células embrionarias cultivadas *in vitro*; de esta manera se ha podido observar la constitución de las mitocondrias, que se presentan en forma de intestinos arrollados, de estructura heterogénea; asimismo, la substancia fundamental del citoplasma es granular o reticulada, con partículas de 30 a 150 m (es decir, de 30 a 150 milésimas de micra).

Pero la técnica que parece dar mejores resultados para estas observaciones es la de la separación de los constituyentes de la célula, inaugurada por BENSLEY

y HOERR. CLAUDE y FULHAM (1945) han estudiado mitocondrias aisladas de células linfosarcomatosas, que son cuerpos esféricos de 0,6 a 1,3 micras, poseedores, quizá, de una fina membrana periférica.

Se han hecho estudios interesantes sobre las fibrillas musculares lisas de determinados moluscos (JAKUS, HALL y SMITH, 1944), las cuales, después de un tratamiento con ácido ósmico, presentan una estriación transversal de períodos comprendidos entre 29 y 47 milimicras, siendo las más frecuentes entre 33 y 39 milimicras, lo que corresponde a una periodicidad aproximadamente 100 veces menor que la de las fibras musculares estriadas. Esto indujo a pensar que las cadenas moleculares tienen primeramente disposiciones estructurales que todavía desconocemos y forman después el elemento fibrilar visible.

Pero donde los descubrimientos debidos al microscopio electrónico han sido más espectaculares, ha sido en el campo de las células prokariotas, es decir, las células elementales. En efecto, se ha podido estudiar lo que se llama los inframicrobios, que pueden relacionarse con las bacterias visibles, y sobre todo los virus, de naturaleza especial, y que hasta ahora habían permanecido invisibles para el microscopio óptico.



Fig. 3.—Lisis de un bacilo de la disentería por el bacteriófago

Parece que, para algunos de estos virus, existe una confusión entre el dominio de la materia viva y el de las moléculas inertes.

Se pueden distinguir varias clases de virus. En primer lugar, los virus vegetales, cuyo tipo más representativo parecen ser los que se llaman mosaicos, particularmente el mosaico del tabaco, estudiado por STANLEY en 1936; este biólogo ha aislado este virus, cuyo peso molecular es 43×10^6 , y lo ha obtenido en forma de una núcleoproteína cristalizada, cuyos cristales producen figuras de difracción con los rayos X (obtenidas por BERNAL en 1941): las moléculas de este virus tienen, por lo tanto, una estructura periódica regular y pueden, por otro lado, colocarse según una organización determinada; son macromoléculas en forma de bastoncillos de $280/1.00$ o a $15/1.000$ de micra, que se asocian por los extremos o por los lados para formar estructuras cristalinas regulares que alcanzan dimensiones microscópicas. No se conoce todavía la reproducción de este virus.

En segundo lugar se encuentran los virusproteínas animales, tales como el virus de la influenza, que se presenta en forma de partículas esféricas, cuyas dimensiones son aún objeto de discusión, ya que el tamaño grande encontrado por algunos podría ser debido a la adsorción de sustancias extrañas.

Citemos también el virus cuadrangular de la vacuna, que es una núcleo-proteína, que se presenta con una capa superficial progresivamente condensada y cinco zonas internas más densas, distribuidas de una manera regular; este virus tiene una composición química complicada. Algunos biólogos, como ANDERSON y GREEN (1942), consideraron a estos virus, no como moléculas, sino como entidades complejas, en las cuales las zonas densas desempeñarían el papel de los cuerpos nucleínicos de las bacterias; en efecto, al observar estos virus, no se ve ninguna figura de división; su tamaño, sin embargo, no es uniforme, pero al estudiar sistemáticamente su distribución, se observa que ésta obedece solamente a la casualidad, lo que no se produciría si algunas de las células se encontraran en vías de división.

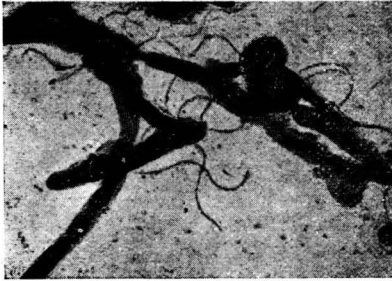


Fig. 4.—Estructura interna del *Bacterium vibrio albensis* de SONNENCHEIN

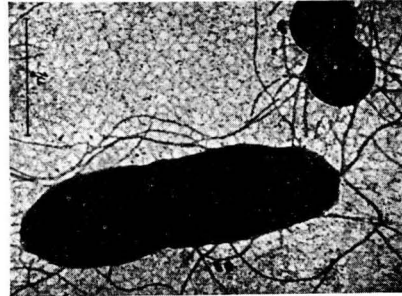


Fig. 5.—Bacilo del tétanos y cocos piógenos. Los flagelos corresponden al bacilo del tétanos. Nótese los límites precisos de los cocos. Aumento: 37.000[×]

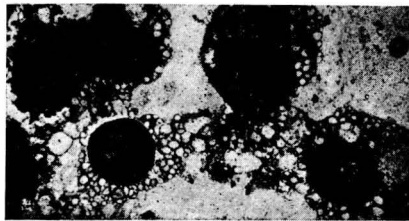


Fig. 6.—Células cancerosas. El protoplasma ofrece una estructura en panel, muy evidente.

Finalmente, tenemos los virus bacterianos, como los bacteriófagos (fig. 3), que son elementos espermatomorfos que digieren las bacterias; tienen una estructura heterogénea que recuerda la de los virus cuadrangulares, y, como éstos, no se dividen por bipartición. Se distinguen dos clases de bacteriófagos, la categoría ∞ que tiene una cabeza redonda, de 45 a 50/1.000 micras, de diámetro, y la categoría δ , que tiene una cabeza ovalada, de 65 a 80/1.000 de micra y presenta zonas claras y oscuras; ambas categorías están provistas de una cola que tiene, aproximadamente, 120/1.000 de micra de longitud.

Con lo dicho no hemos expuesto más que algunos ejemplos de los importantes descubrimientos que ha permitido el microscopio electrónico. No hay duda que, en lo sucesivo, nuestros conocimientos se extenderán sobre otros muchos puntos que hasta el presente desconocemos en absoluto. Sin embargo, en éste, como en todos los progresos técnicos, debe preverse un límite; en primer

lugar, no tenemos la seguridad de que la ola de electrones recibida por el objeto no lo modifique; y en segundo lugar, a medida que va siendo mayor el poder amplificador del aparato, va siendo más delicada la interpretación de las imágenes obtenidas.

Actualmente se estudia la construcción de microscopios protónicos; por tener el protón una masa de 1.840 veces mayor que la del electrón, la longitud de onda asociada que le corresponde, según la fórmula de LUIS DE BROGLIE, es, a energía igual, 1.840 veces más pequeña; por lo tanto, un microscopio protónico debe tener un poder separador todavía mayor que un microscopio electrónico; pero toda vez que el protón tiene una masa grande, su energía cinética es también grande, y al chocar con el objeto puede desplazarle y hacer que su imagen fotográfica adolezca de lo que se llama *fou*, esto es, que aparezca desfocada. Vemos, pues, que la posibilidad de aumento microscópico ha de tener un límite; sin embargo, estamos todavía lejos de haber agotado las posibilidades del microscopio electrónico, del cual aun se puede esperar mucho, sobre todo en el terreno de la biología.

**TRANSPULMIN**

Bronconeumonías

SOLVOCHIN

fecciones pulmonares

SOLVOCHIN - CALCIO

Neumonía crupal

KAMILLOSAN

Terapéutica de la Manzanilla

FOSVITANON

Tónico reconstituyente

GLUDERGIN

Pomada cicatrizante

SEPTOQUINA

Quinina + Sulfamida

SIMPATOL

Hipotensión

TUSSIPECT

Expectorante

PANDIGAL

Tónico cardíaco

CLAUDEN

Hemostático

TIMOFISINA

Oxitóxico

PICOROL

Dermatosis

LOBELINA REDER

Estados asfícticos

F E L S O L

Antiasmático

Laboratorios Gustavo Reder, S. A. - Madrid