

TÉCNICAS DE IMAGEN EN BIOLOGÍA

TÉCNICAS DE IMAGEN EN BIOLOGÍA

Juan Luis Martínez (Ed.)

**N. Anadón, A.M. Coto, J.M. Fraga, A. González,
J.L. Martínez, A.M. Nistal, D. Tolivia**

Vicerrectorado de Postgrado y Títulos Propios. Universidad de Oviedo

Fotografía de cubierta: Lóbulos cefálicos de *Gyrodactylus* sp. (Platyhelminthes: Monogenea), parásito de trucha.

Maquetación: Delio Tolviva Cadrecha

ISBN

© 2002

AUTORES

Nuria Anadón Alvarez. Departamento de Biología de Organismos y Sistemas. Universidad de Oviedo.

Ana María Coto Montes. Departamento de Morfología y Biología Celular. Universidad de Oviedo.

Aída González Díaz. Departamento de Biología de Organismos y Sistemas. Universidad de Oviedo.

Juan Luis Martínez Alvarez. Departamento de Biología de Organismos y Sistemas. Universidad de Oviedo.

Jorge Martínez Fraga. Departamento de Morfología y Biología Celular. Universidad de Oviedo.

Angel Martínez Nistal. Servicio de Proceso de Imágenes y Tecnologías Multimedia. Universidad de Oviedo.

Delio Tolivia Fernández. Departamento de Morfología y Biología Celular. Universidad de Oviedo.

PREFACIO

En Biología, la forma *es* la función. Una de las características de los organismos vivos es la capacidad de transformar la información en los distintos niveles de organización. La información genética, contenida en la secuencia de nucleótidos del ADN en forma lineal, se traduce en una información tridimensional cuando la correspondiente cadena de aminoácidos adquiere su conformación espacial, la cual, a su vez, da lugar a una capacidad funcional específica. La diferenciación celular comporta, simultáneamente, el desarrollo de unas características estructurales, morfológicas, y la adquisición de una posibilidad funcional determinada. Así pues, en el caso de la materia viva, forma y función son dos conceptos interrelacionados íntimamente. Cuando estudiamos la forma de una estructura viva no lo hacemos por motivos meramente estéticos ni por simple ansia de conocimiento abstracto; lo hacemos porque a partir del conocimiento morfológico podemos entender mejor cómo funciona esa estructura y, en definitiva, avanzar en su comprensión global. El conocimiento de la forma implica, de una u otra manera, la obtención de una imagen que, dada la escala de los elementos estructurales básicos de la materia viva, en la mayoría de los casos debe ser obtenida por métodos de microscopía. Desde Leeuwenhoek, en el siglo XVII, el desarrollo de la ciencias biológicas y el desarrollo de las técnicas que permiten la obtención de imágenes han ido estrechamente ligados. Así fueron desarrollándose los distintos tipos de microscopía óptica, la microscopía electrónica, la microscopía láser confocal... Por otra parte, las técnicas han incorporado la posibilidad de visualizar no sólo la forma, sino también la composición química (histoquímica, citoquímica...) y, en cierta manera, la propia función (inmunohistoquímica...). A finales del siglo XX, a los métodos de obtención de imágenes se han sumado las técnicas informáticas que permiten su almacenamiento, tratamiento y análisis, aumentando espectacularmente las posibilidades de la imagen como herramienta del conocimiento. Además, la imagen digital puede ser analizada cuantitativamente, y la cuantificación de los diversos parámetros de la imagen –y, por tanto, de los diversos componentes de la materia viva– incrementa notablemente las posibilidades de su estudio científico.

En este libro hemos tratado de reunir los aspectos básicos de esos dos mundos implicados actualmente en el estudio morfológico de los organismos vivos: el de la microscopía y el de la informática aplicada al análisis de imágenes. No se trata en ningún caso de un texto en el que se recopilen exhaustivamente protocolos concretos de las distintas técnicas (para eso deberá recurrirse a la bibliografía citada en cada capítulo); se trata más bien de ofrecer una información acerca de cuáles son las principales técnicas existentes hoy en día, qué posibilidades ofrece su

aplicación en el campo de la biología, y qué características debe tener la muestra biológica para poder ser estudiada con cada una de estas técnicas.

Aunque originalmente fue concebido como documentación para el Programa de Doctorado del Departamento de Biología de Organismos y Sistemas de la Universidad de Oviedo, este texto puede contribuir a ayudar a todos aquellos estudiantes, tanto de Pregrado como de Postgrado, que busquen información básica sobre las posibilidades que ofrece el mundo de la imagen en los estudios biológicos, o que requieran una orientación preliminar sobre las técnicas que, eventualmente, podrían ser de interés para su campo de investigación concreto.

Juan Luis Martínez

ÍNDICE

I. MICROSCOPIA FOTÓNICA.

- 1.- Conceptos previos
- 2.- Construcción de imágenes
- 3.- Imágenes reales y virtuales
- 4.- Campo de imágenes reales y virtuales
- 5.- Tamaño de las imágenes reales
- 6.- Aumento visual
- 7.- Microscopio fotónico
 - 7.1.- Los objetivos
 - 7.2.- Los oculares
 - 7.3.- El condensador
- 8.- Camino óptico
- 9.- Interferencias
- 10.- Difracción e interferencia
 - 10.1.- Discos de Airy
 - 10.2.- Criterio de Lord Rayleigh
- 11.- Poder de resolución
- 12.- Aumento y resolución
- 13.- Poder de resolución del microscopio
- 14.- Estimación del aumento útil
- 15.- Significado de la inmersión
- 16.- Control de la iluminación
 - 16.1.- Iluminación de Köhler
- 17.- Microscopía fotónica especial
 - 17.1.- Microscopio de campo oscuro
 - 17.2.- Microscopio de luz ultravioleta
 - 17.3.- Microscopio de fluorescencia
 - 17.4.- Microscopio de polarización
 - 17.5.- Microscopio de contraste de fases
 - 17.6.- Microscopios interferenciales

II. TÉCNICAS HISTOLÓGICAS GENERALES.

- 1.- Preparación del material
 - 1.1.- Exámen de material vivo
 - 1.2.- Narcotización
- 2.- Fijación
 - 2.1.- Cualidades que deben tener los fijadores
 - 2.2.- Líquidos fijadores generales
 - 2.3.- Fórmulas para fijadores
 - 2.3.1.- Bouin
 - 2.3.2.- Formaldehído al 4% en agua de mar
- 3.- Confección de preparaciones de animales “in toto”

- 3.1.- Fórmulas para coloración en bloque
 - 3.1.1.- Carmín borácico
 - 3.1.2.- Carmín lítico
- 3.2.- Montaje “in toto”
- 4.- Técnicas de inclusión
 - 4.1.- Inclusión en parafina
 - 4.1.1.- Procedimiento de deshidratación
 - 4.1.2.- Impregnación con parafina
 - 4.1.3.- Método de Celoidina-Parafina de Peterfi
 - 4.1.4.- Inclusión en parafina dura y orientación de las piezas
- 5.- Tallado de los bloques y realización de los cortes
 - 5.1.- Extensión de los cortes
 - 5.2.- Paso de los cortes al portaobjetos y pegado de los mismos
- 6.- Preparación de cortes por congelación
- 7.- Tinción de los cortes incluidos en parafina
 - 7.1.- Desparafinado
 - 7.2.- Hidratación con agua
 - 7.3.- Tinción
- 8.- Montaje de las preparaciones
- 9.- Cómo medir objetos microscópicos

III. HISTOQUÍMICA, AUTORADIOGRAFÍA Y CRIMÉTODOS.

- 1.- Citoquímica y histoquímica
 - 1.1.- Introducción
 - 1.2.- Conservación de la muestra
 - 1.3.- Tinciones
- 2.- Autorradiografía
 - 2.1.- Introducción
 - 2.2.- Radioisótopos
 - 2.3.- Dosis de compuestos radiactivos
 - 2.4.- Administración del compuesto radiactivo
 - 2.5.- Detección del radioisótopo: emulsiones nucleares
 - 2.6.- Métodos en autorradiografía para MET
 - 2.6.1.- Método con rejilla
 - 2.6.1.1.- Ultramicrotomía y montaje de las secciones
 - 2.6.1.2.- Recubrimiento de las secciones con la emulsión
 - 2.6.1.3.- Exposición
 - 2.6.1.4.- Revelado
 - 2.6.2.- Método sobre sustrato plano
 - 2.6.2.1.- Ultramicrotomía y montaje de las secciones
 - 2.6.2.2.- Recubrimiento de las secciones con la emulsión
 - 2.6.2.2.a.- Técnica *dipping*
 - 2.6.2.2.b.- Técnica del *loop*
 - 2.6.2.3.- Revelado y exposición
 - 2.6.2.4.- Transferencia de las secciones a rejillas

- 3.- Criométodos
 - 3.1.- Introducción
 - 3.2.- Criofijación
 - 3.3.- Crioprotectores
 - 3.4.- Crioultramicrotomía
 - 3.5.- Criosustitución
 - 3.6.- Crioinclusión
 - 3.7.- Crio fractura

IV. INMUNOHISTOQUÍMICA E INMUNOCITOQUÍMICA.

- 1.- Introducción
- 2.- ¿Por qué elegir el método de inmunohistoquímica?
- 3.- Preparación del tejido
 - 3.1- Fijación
- 4.- El primer anticuerpo
 - 4.1- Comprobación del anticuerpo
 - 4.2.- Almacenamiento y manipulación del anticuerpo
- 5.- Elección del método de inmunodetección
 - 5.1.- Peroxidasa anti-peroxidasa (PAP) y fosfatasa alcalina (ALP)
 - 5.2.- Complejo Avidina-Biotina y Estreptavidina-Biotina (complejos ABC)
 - 5.3.- Elección del marcador
 - 5.3.1.- Isotiocianato de fluoresceína (FITC)
 - 5.3.2.- Peroxidasa de rábano (Horseradish peroxidase) (HRP)
 - 5.3.3.- Fosfatasa alcalina (ALP)
 - 5.3.4.- Oro
- 6.- Elección del método
 - 6.1.-Protocolo
- 7.- Inmunomarcaje para microscopía electrónica: Inmunocitoquímica
 - 7.1.- Aspectos prácticos
 - 7.1.1.- Marcaje con Oro
 - 7.1.2.- Marcaje con proteína A-Oro
 - 7.1.3.- Método de avidina-biotina
 - 7.2.- Fijación
 - 7.3.- Resinas
 - 7.4.- Dilución de los anticuerpos para inmunocitoquímica
 - 7.5.- Elección del método de inmunocitoquímica
 - 7.5.1.- Protocolo 1
 - 7.5.2.- Protocolo 2
 - 7.6.- Doble marcaje con oro para inmunocitoquímica
 - 7.7.- Prevención de la unión inespecífica
- 8.- Controles
 - 8.1.- Control de los reactivos
 - 8.2.- Control del tejido
 - 8.3.- Control del primer anticuerpo

V. MICROSCOPIA LÁSER CONFOCAL.

- 1.- Introducción
- 2.- Bases instrumentales
- 3.- Ventajas de la microscopía confocal
- 4.- Prestaciones del sistema
- 5.- Proceso de imágenes y microscopía confocal
- 6.- Aplicaciones de la microscopía confocal
- 7.- Perspectivas futuras

VI. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN Y DE BARRIDO.

- 1.- Microscopía electrónica
 - 1.1.- Principios generales
 - 1.2.- Formación de la imagen en el Microscopio Electrónico de Transmisión (TEM)
 - 1.3.- Formación de la imagen en el Microscopio Electrónico de *Scanning* (SEM)
- 2.- Preparación de muestras para TEM
 - 2.1.- Fijación
 - 2.1.1.- Fijadores
 - 2.1.2.- Concentración, Temperatura
 - 2.1.3.- Tampones
 - 2.1.4.- Osmolaridad
 - 2.1.5.- Composición iónica
 - 2.1.6.- Tiempo
 - 2.1.7.- Aplicación del fijador
 - 2.2.- Lavados
 - 2.3.- Deshidratación
 - 2.4.- Inclusión
 - 2.4.1.- Medios de inclusión
 - 2.4.2.- Procedimiento
 - 2.4.3.- Criterios de buena preservación de la muestra
 - 2.5.- Ultramicrotomía
 - 2.5.1.- Cuchillas
 - 2.5.2.- Tallado
 - 2.5.3.- Ultramicrotomo
 - 2.5.4.- Secciones semifinas
 - 2.5.5.- Secciones ultrafinas
 - 2.5.6.- Rejillas
 - 2.6.- Tinción
- 3.- Preparación de muestras para SEM
 - 3.1.- Desecación por punto crítico
 - 3.2.- Metalización

VII. ANÁLISIS DE IMAGENES.

- 1.- Introducción
- 2.- Fundamentos del proceso digital de imágenes
- 3.- Equipamiento de análisis de imágenes
 - 3.1.- Dispositivos de captación de imágenes
 - 3.2.- Ordenador
 - 3.3.- Impresoras
- 4.- Archivo de imágenes
- 5.- Proceso de imágenes
- 6.- Clasificación de imágenes
- 7.- Cuantificación

