

TEXTOS DOCENTS

200

PRÀCTIQUES DE CITOLOGIA

Enric Ribes Mora (coordinador)
Ma. José Amor Pérez
Carme Auladell Costa
José A. del Río Fernández
Ma. Elena Sagristà Mateo

Departament de Biologia Cel·lular

TEXTOS DOCENTS

200

PRÀCTIQUES DE CITOLOGIA

Enric Ribes Mora (coordinador)

Ma. José Amor Pérez

Carme Auladell Costa

José A. del Río Fernández

Ma. Elena Sagristà Mateo

Departament de Biologia Cel·lular

Publicacions i Edicions



UNIVERSITAT DE BARCELONA

U

B

INTRODUCCIÓ

La citologia a la llicenciatura de biologia de la Universitat de Barcelona

Els continguts de l'assignatura de citologia responen a les característiques del pla d'estudis on aquesta s'enmarca (Pla d'estudis 1992). És una assignatura troncal de primer cicle, amb una càrrega docent de 3,5 crèdits: 2 de teòrics i 1,5 de pràctics.

L'assignatura de citologia s'imparteix el primer semestre del primer cicle de la llicenciatura de biologia.

Com a assignatura troncal de primer cicle, és bàsica per a la formació de futurs llicenciats en biologia, en qualsevol de les tres especialitats: biologia sanitària, biologia d'organismes i sistemes, i la biologia agroalimentària i biotecnologia. També és bàsica per a aquells alumnes que volen accedir al segon cicle d'altres llicenciatures, com bioquímica o ciències del mar.

L'objectiu principal de l'assignatura és donar a conèixer l'estructura, l'organització i el funcionament de la cèl·lula. Amb el programa teòric de l'assignatura es pretén que els alumnes coneguin la morfologia de la cèl·lula i s'introdueixin en els aspectes moleculars i funcionals dels diferents components cel·lulars, per a poder entendre la cèl·lula com a unitat bàsica de la matèria viva. Els aspectes moleculars, genètics o de morfologia comparada de la cèl·lula seran tractats de forma més rigorosa en l'assignatura de biologia cel·lular. L'organització cel·lular procariota s'esmenta, però no és considerada com a objectiu d'estudi prioritari, ja que ho és de l'assignatura de microbiologia de la llicenciatura de biologia.

Els coneixements impartits en citologia són la base d'altres coneixements que s'aniran adquirint en diferents assignatures com la histologia vegetal i animal, la biologia cel·lular, la neurobiologia, l'organografia microscòpica i la iniciació a la histopatologia, impartides pel Departament de Biologia Cel·lular.

El segon cicle de la llicenciatura de biologia de la Facultat de Biologia de la Universitat de Barcelona, permet a l'alumne optar per una de les tres especialitats proposades en el pla d'estudis, esmentades anteriorment, o bé dissenyar un currículum amb un itinerari lliure adaptat a les seves preferències en els diferents camps de la biologia.

Les pràctiques de citologia

La citologia, com a ciència que es basa en l'observació i la verificació d'hipòtesi per mitjà del treball experimental, comporta que les classes pràctiques siguin necessàries per constatar els coneixements adquirits en les classes teòriques.

Els objectius generals dels ensenyaments pràctics de citologia són els següents:

1. Aprendre el funcionament dels diferents tipus de microscopis òptics i electrònics, així com les seves aplicacions en l'estudi de les cèl·lules.
2. Iniciar l'alumne en el processament de mostres biològiques: fixació, inclusió i tinció.
3. Observar cèl·lules en teixits i cèl·lules dissociades.
4. Identificar i caracteritzar ultraestructuralment els diferents components cel·lulars.

Les classes pràctiques de citologia s'imparteixen un dia a la setmana, durant set setmanes consecutives, a raó de dues hores setmanals, excepte una sessió que és de tres hores. La realització de les pràctiques durant un mes i mig permet que puguin ser simultànies i complementàries amb les classes de teoria de l'ensenyament de citologia.

L'assistència a les classes pràctiques és obligatòria, com també la presentació d'un quadern on es recullen els resultats i les conclusions de les sessions pràctiques.

En l'avaluació de les classes pràctiques es tindrà en compte:

L'assistència i el treball realitzat en el laboratori

El quadern de pràctiques

L'examen pràctic

Aprovar les pràctiques és imprescindible per aprovar l'assignatura de citologia.

El programa de pràctiques de citologia consta de sis blocs, cadascun amb una unitat conceptual i metodològica. Cada bloc constitueix un capítol d'aquest text-guia, el contingut del qual es detalla a continuació:

Capítol I. El microscopi òptic. Descripció bàsica. Components mecànics i òptics. Maneig del microscopi i observació de preparacions. Micrometria. Càmeres clares.

Capítol II. Observació de preparacions biològiques amb diferents modalitats de microscòpia òptica. Funcionament i utilització de diferents tipus de microscopis òptics: de camp fosc, de contrast de fase, de polarització, de contrast interferencial de Nomarski, de fluorescència i l'estereomicroscopi. Observació de protozous: estudi del moviment cel·lular. Observació de cèl·lules en cultiu. Observació d'estructures cel·lulars birefringents: paret cel·lular vegetal, grans de midó, fibres musculars estriades, teixit ossi. Detecció d'òrgans energètics per fluorescència: plastidis, mitocondris. Detecció de la cromatina nuclear amb microscòpia de fluorescència.

Capítol III. Preparació i estudi d'una extensió de sang. Introducció a la fixació i a les tècniques tintorials. Obtenció de preparacions d'extensions de sang. Observació i tipificació de les cèl·lules sanguínies. Micrometria. Càlcul de la fórmula leucocitària.

Capítol IV. Observació de cèl·lules en teixit i de cèl·lules dissociades. Preparació i obtenció de suspensions cel·lulars.

Capítol V. Estudi del nucli cel·lular interfàsic i mitòtic. Observació de cèl·lules en interfase i en mitosi. Identificació de les diferents fases de la mitosi. Càlcul de la durada de cada fase de la mitosi. Observació de cèl·lules en procés de mort cel·lular.

Capítol VI. Microscopi electrònic. Estudi ultraestructural dels diferents òrgans cel·lulars. Introducció al processament de mostres per a l'estudi ultraestructural: fixació, inclusió i contrastació. Microscopi electrònic de transmissió. Microscopi electrònic de rastreig. Introducció a diverses tècniques de microscopia electrònica. Identificació i caracterització ultraestructural dels diferents components cel·lulars.

Aquest text-guia està pensat com a suport pràctic per als estudiants i s'ha elaborat de manera que tots els conceptes i les tècniques que es treballaran en les classes pràctiques, hi estan explicades. Al final de cada capítol hi ha un qüestionari amb un nombre variable de preguntes, que serveixen per veure si l'alumne ha assolit els coneixements impartits en les pràctiques. També s'inclou una llista de referències bibliogràfiques per aprofundir tant en el vessant conceptual com el metodològic dels temes treballats.

Aquest text-guia s'ha elaborat gràcies a l'ajuda concedida pel Gabinet d'Avaluació i Innovació Universitària (GAIU) de la Universitat de Barcelona.

Enric Ribes Mora

Coordinador de l'edició del text-guia: *Pràctiques de citologia*

Departament de Biologia Cel·lular de la Universitat de Barcelona

ÍNDEX

CAPÍTOL I: El microscopi òptic

1. OBJECTIUS	5
2. INTRODUCCIÓ	5
2.1. El microscopi. Formació de la imatge i augment	5
2.2. Descripció bàsica. Components mecànics i òptics	6
2.2.1. Elements mecànics bàsics del microscopi	7
2.2.2. Elements òptics del microscopi	7
2.2.2.1. Objectiu	7
2.2.2.2. Ocular	9
2.2.2.3. Sistema d'il·luminació	10
2.3. Il·luminació de Köhler	10
2.4. Mesures en microscòpia	11
2.4.1. Mesura de distàncies horitzontals (micrometria)	11
2.5. Càmeres clares	11
3. PRÀCTICA	12
3.1. Instruccions per a la utilització del microscopi òptic	12
3.2. Procediment que cal seguir per a la il·luminació de Köhler	13
3.3. Cura i neteja del microscopi	13
3.4. Micrometria	14
3.4.1. Mètode per calibrar el micròmetre ocular	14
3.4.2. Mesura de distàncies horitzontals	14
3.5. Utilització de la càmera clara	14
4. QÜESTIONS	15
Bibliografia	16

CAPÍTOL II: Observació de preparacions biològiques amb diferents modalitats de microscòpia òptica

1. OBJECTIUS	17
2. INTRODUCCIÓ	17
2.1. Microscopi de camp fosc	18
2.2. Microscopi de contrast de fase	18
2.3. Microscopi de polarització	20
2.4. Microscopi de contrast interferencial de Nomarski	20
2.5. Microscopi de fluorescència	21
2.5.1. Components del microscopi de fluorescència	22
2.6. Microscopi confocal	23
2.7. Estereomicroscopi	23
3. PRÀCTICA	24
3.1. Il·luminació en camp fosc a petit augment	24
3.2. Il·luminació en contrast de fase	25
3.2.1. Centratge i alineació de l'equip de contrast de fase	25
3.3. Funcionament i aplicacions del microscopi de llum polaritzada	25

3.4. Il·luminació en contrast interferencial de Nomarski	26
3.5. Maneig del microscopi de fluorescència	26
3.6. Observació de protozous: estudi del moviment cel·lular.....	27
3.6.1. <i>Cultiu en aigua original</i>	27
3.6.2. <i>Muntatge en aigua</i>	29
3.6.3. <i>Muntatge en un medi viscos</i>	29
3.6.4. <i>Tinció vital de protozous</i>	29
3.7. Observació de fibres musculars estriades: identificació del citoesquelet de la fibra muscular ..	29
3.8. Observació d'estructures birefringents	30
3.8.1. <i>Observació de grans de midó</i>	31
3.8.2. <i>Observació d'altres estructures birefringents</i>	31
3.9. Observació de plastidis i mitocondris amb microscòpia de fluorescència.....	31
3.10. Detecció de la cromatina nuclear amb microscòpia de fluorescència.....	31
4. QÜESTIONS	32
Notes	34
Bibliografia	34
 CAPÍTOL III: Preparació i estudi d'una extensió de sang	
1. OBJECTIUS	35
2. INTRODUCCIÓ	35
2.1. Preparació de les mostres per a microscòpia òptica	35
2.1.1. <i>Fixació química</i>	35
2.1.2. <i>Rentat</i>	36
2.1.3. <i>Deshidratació</i>	36
2.1.4. <i>Inclusió i obtenció de talls histològics</i>	36
2.1.5. <i>Fixació física</i>	37
2.1.6. <i>Tinció</i>	37
2.2. La sang	39
2.2.1. <i>Les cèl·lules de la sang</i>	39
2.2.2. <i>El plasma</i>	42
2.3. Extensió o frotis sanguini	42
2.4. Tinció dels frotis sanguinis	42
3. PRÀCTICA	43
3.1. Obtenció d'una extensió de sang	43
3.2. Tinció de l'extensió de sang	44
3.2.1. <i>Tinció de Wright</i>	44
3.2.2. <i>Tinció de May-Grünwald-Giemsa</i>	44
3.2.3. <i>Tinció de Diff-Quick</i>	45
3.3. Càlcul de la fórmula leucocitària. Mètode manual.....	45
4. QÜESTIONS	45
Bibliografia	47
 CAPÍTOL IV: Observació de cèl·lules en teixit i de cèl·lules dissociades	
1. OBJECTIUS	49
2. INTRODUCCIÓ	49
2.1. Dissociats cel·lulars.....	50
3. PRÀCTICA	51
3.1. Dissecció del músculo <i>Mytilus galloprovincialis</i>	51
3.2. Observació del teixit branquial, de les gònades i de l'hepatopàncrees	52
3.3. Dissociat cel·lular d'un dels teixits estudiats.....	52
4. QÜESTIONS	53
Notes	54
Bibliografia	54

CAPÍTOL V: Estudi del nucli interfàsic i mitòtic

1. OBJECTIUS	55
2. INTRODUCCIÓ	55
2.1. Cicle cel·lular: fases	55
2.1.1. <i>Interfase</i>	56
2.1.2. <i>Mitosi: fases</i>	56
2.1.3. <i>Citocinesi</i>	57
2.2. Morfologia del nucli cel·lular en interfase.....	57
2.3. El nuclèol: canvis que experimenta el nuclèol durant el cicle cel·lular	58
2.4. La mort cel·lular: necrosi i apoptosi	58
3. PRÀCTICA	59
3.1. Estudi de la mitosi en cèl·lules meristemàtiques	59
3.1.1. <i>Confecció d'una preparació de meristema apical d'arrel d'all</i>	60
3.1.1.1. <i>Obtenció de preparacions de meristema tenyides amb orceïna acètica mitjançant la tècnica de l'squash</i>	61
3.1.1.2. <i>Mètode d'observació</i>	61
3.1.2. <i>Càlcul de la durada de la mitosi en el cicle cel·lular i de les diverses fases de la mitosi ...</i>	61
3.2. Observació del procés de mort cel·lular per necrosi en cèl·lules hepàtiques	61
3.2.1. <i>Obtenció de preparacions histològiques del fetge tractat amb selenit de sodi</i>	61
3.2.2. <i>Observació de la morfologia de cèl·lules de fetge normal, i en procés de mort cel·lular per necrosi</i>	62
4. QÜESTIONS	63
Bibliografia	63

CAPÍTOL VI: Microscopi electrònic. Estudi ultraestructural dels diferents orgànuls cel·lulars

1. OBJECTIUS	65
2. INTRODUCCIÓ	65
2.1. Processament del material biològic per ser observat en microscòpia electrònica.....	65
2.1.1. <i>Criomicroscòpia electrònica</i>	66
2.1.2. <i>Criomètodes</i>	66
2.2. Microscopi electrònic de transmissió (TEM)	67
2.3. Microscopi electrònic de rastreig (SEM).....	69
2.4. Introducció a diverses tècniques microscòpiques utilitzades en biologia cel·lular: criofractura, criograt, tinció negativa, citoquímiques, immunocitoquímiques i autoradiografia ...	69
2.4.1. <i>Tècniques de criofractura (Freeze-etching)</i>	70
2.4.2. <i>La tinció negativa</i>	70
2.4.3. <i>Tècniques citoquímiques</i>	70
2.4.4. <i>Tècniques d'immunocitoquímica</i>	72
2.4.5. <i>Tècniques d'autoradiografia</i>	72
3. PRÀCTICA	73
3.1. Identificació i caracterització ultraestructural dels diversos components cel·lulars.....	73
3.2. Càlcul de les dimensions de components cel·lulars i dels augments en electromicrografies	74
3.2.1. <i>Mesura de les dimensions reals dels components cel·lulars en una electromicrografia coneixent-ne l'augment</i>	74
4. QÜESTIONS	75
Bibliografia	76

CAPÍTOL I: EL MICROSCOPI ÒPTIC

Descripció bàsica. Components mecànics i òptics. Maneig del microscopi i observació de preparacions. Micrometria. Càmeres clares.

1. OBJECTIUS

- Identificar els diferents components del microscopi òptic.
- Conèixer-ne el funcionament.
- Saber-lo utilitzar correctament.
- Mesura de distàncies horitzontals.
- Utilització de la càmera clara.
- Cura i neteja del microscopi.

2. INTRODUCCIÓ

2.1. El microscopi. Formació de la imatge i augment

El microscopi és un instrument òptic format per un sistema de lents que dona lloc a imatges virtuals i augmentades d'objectes molt petits.

Essencialment el **microscopi compost**, anomenat normalment **microscopi**, consta de dos sistemes òptics: **objectiu** i **ocular**, situats en els extrems d'un tub amb un eix òptic comú. L'objecte que s'estudia se situa davant i a prop del pla focal de l'objectiu, així s'obté una primera imatge real, augmentada i invertida, de l'objecte, anomenada **imatge primària** del microscopi. L'ocular forma la **imatge final** virtual, més gran i dreta, de la imatge primària situada a la distància mínima de visió distinta o perfecta —aproximadament a 250 mm de l'ull de l'observador— (vegeu la figura 1.1).

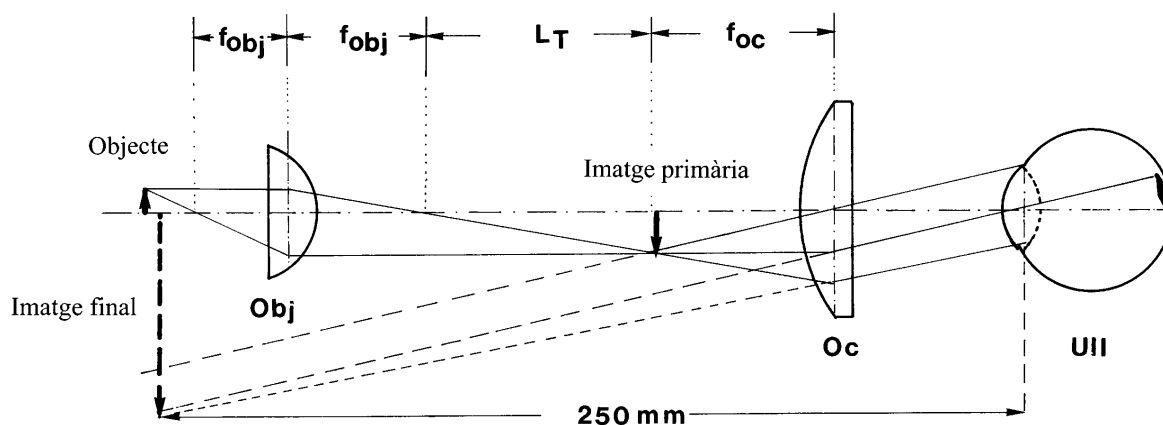


Figura 1.1. El microscopi òptic. Formació de la imatge

En el microscopi compost l'augment final és el resultat de dues amplifícacions o dos augments parcials: un, el de l'objectiu, i l'altre, el de l'ocular. El producte d'aquestes dues quantitats és l'augment total del microscopi, que equival a la relació entre les dimensions de l'objecte i les de la imatge final.

$$A_{\text{microscopi}} = A_{\text{obj}} \times A_{\text{oc}} = L_T / f_{\text{obj}} \times 250 / f_{\text{oc}}$$

L_T : longitud òptica del tub o capçal en mm

f_{obj} : distància focal de l'objectiu en mm

f_{oc} : distància focal de l'ocular en mm

250: distància mínima de visió distinta o perfecta en mm

A_{obj} : augment de l'objectiu

A_{oc} : augment de l'ocular

$A_{\text{microscopi}}$: augment total d'un microscopi

Si el tub o capçal inclou d'altres lents, ho haureu de multiplicar pel factor del tub (M_{tub}).

$$A_{\text{microscopi}} = A_{\text{obj}} \times A_{\text{oc}} \times M_{\text{tub}}$$

2.2. Descripció bàsica. Components mecànics i òptics

El microscopi consta d'uns components òptics: l'ocular, l'objectiu i el condensador, que tenen com a funció la formació de la imatge; i d'uns components mecànics, que serveixen de suport de la part òptica (vegeu la figura 1.2).

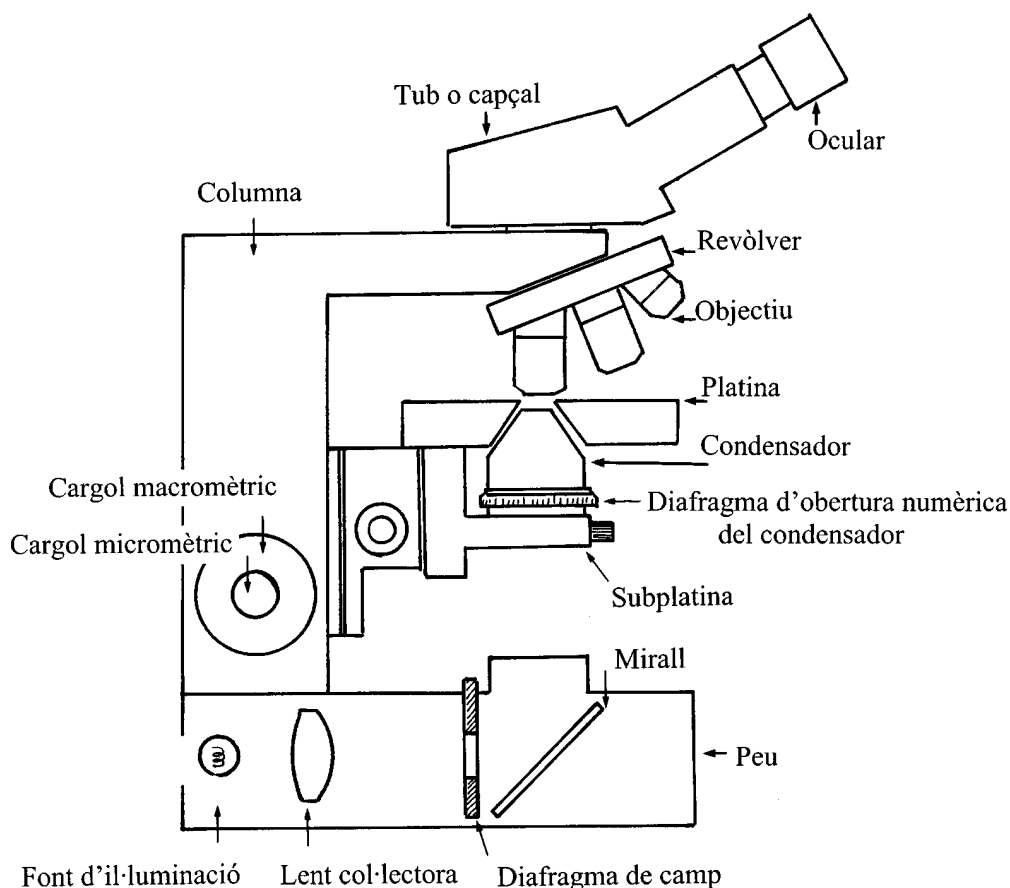


Figura 1.2. Components mecànics i òptics del microscopi

2.2.1. Elements mecànics bàsics del microscopi

Peu. Té com a missió sostenir l'instrument de la manera més estable possible. La seva massa contribueix a esmorteir les vibracions.

Columna. Serveix de suport al tub o capçal, a més de la platina i la subplatina.

Tub o capçal. Estructura cilíndrica que té en els extrems l'objectiu i l'ocular, entre els quals condueix el feix de llum. Els tubs poden ser monoculars o binoculars, segons el nombre d'oculars inserits. La seva longitud òptica, que no ha de coincidir necessàriament amb la longitud mecànica, és de 160 o 170 mm. S'entén per longitud òptica la distància que ha de recórrer la llum des de la sortida de l'objectiu fins a l'ocular.

Revòlver. Dispositiu rotatori que sosté els objectius i que permet intercanviar-los i centrar-los amb l'eix òptic.

Platina. Superfície plana inserida perpendicularment a l'eix òptic on se situa la preparació; normalment té incorporat un dispositiu que permet el desplaçament de la preparació en les direccions dels eixos X-Y, de manera que en facilita l'observació.

Subplatina. Part mecànica que subjecta el condensador.

Cargol macromètric i micromètric. Comandaments ubicats en la columna, que desplacen la platina o bé el tub (en els microscopis antics) i que serveixen per enfocar correctament la preparació.

2.2.2. Elements òptics del microscopi

2.2.2.1. Objectiu

És un sistema de lents convergents situat a l'extrem inferior del tub del microscopi que té com a finalitat obtenir una imatge real, augmentada i invertida, de l'objecte.

Els objectius estan formats per sistemes complexos de lents (doblets i triplets), que s'utilitzen per corregir les aberracions geomètriques (esfericitat, astigmatisme, coma, distorsió i curvatura del camp) i cromàtiques inherents a les lents úniques (vegeu la figura 1.3). Segons quin sigui el grau de correcció cromàtica que presenten els objectius, es classifiquen en **acromàtics**, **semiapocromàtics** i **apocromàtics**, aquests últims amb un grau més alt de correcció. Això s'aconsegueix substituint algunes lents de vidre per altres de fluorur de calci (fluorita), que és un mineral que té un poder de refracció molt baix i una dispersió cromàtica molt petita respecte al vidre.

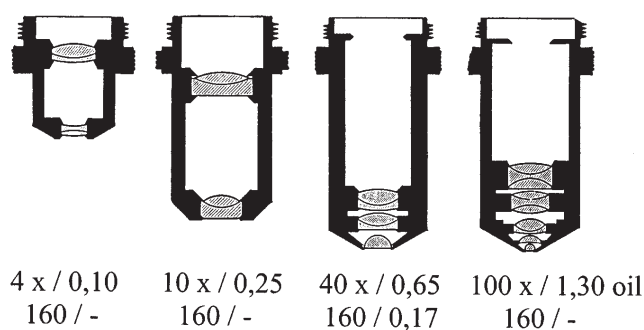


Figura 1.3. Sèrie d'objectius d'un microscopi

Els objectius apocromàtics són cars a causa de la complexitat de la seva construcció i l'elevat preu de la fluorita, això fa que només s'utilitzin per a microscopis de gamma alta i per a microfotografia. Els objectius acromàtics estan construïts amb lents de vidre, resulten més econòmics i són els que s'empren per a microscopis més senzills, com els de pràctiques.

Respecte a la curvatura de camp, es diferencien els **objectius normals** i els **objectius plans**, en els quals s'ha suprimit pràcticament la curvatura de la imatge.

Els objectius poden ser **secs**, quan entre el cobreobjectes i l'objectiu hi ha l'aire, o **d'immersió**, si entre la lent frontal de l'objectiu i el cobreobjectes hi ha una gota d'un líquid, que normalment és l'oli d'immersió, que té un índex de refracció igual que el de vidre de les lents de l'objectiu, i també del cobre i del portaobjectes, és a dir, de $n = 1,515$ (vegeu les figures 1.4 i 1.5).

Els objectius muntats en els microscopis moderns són **parafocals**, indiquen que tenen la mateixa distància entre l'extrem superior de l'objectiu i l'objecte que s'observa, cosa que facilita el procés d'enfocament.

Les principals característiques dels objectius són l'**augment** i l'**obertura numèrica**:

Augment. És la relació entre la grandària de l'objecte i la de la imatge que d'aquest forma l'objectiu. Els augments més freqüents són 4 x, 10 x i 20 x (objectius de petit augment), 40 x i 60 x (objectius d'augment mitjà) i 100 x (objectiu de gran augment).

Obertura numèrica (ON). Equival al producte de l'índex de refracció del medi (**n**) que hi ha entre la preparació i l'objectiu pel sinus del semiangle d'obertura ($\sin \beta/2$) (vegeu la figura 1.4):

$$ON = n \times \sin \beta/2$$

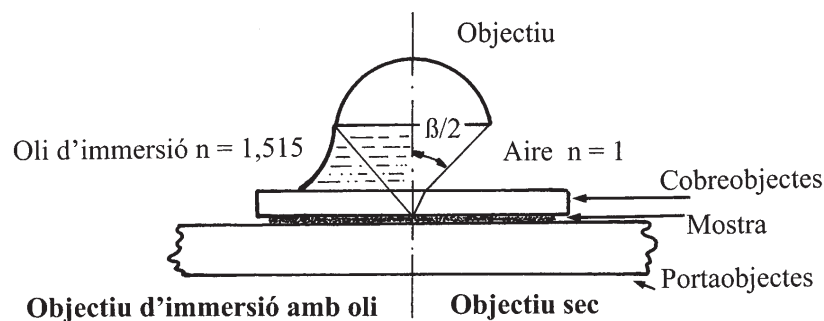


Figura 1.4. Obertura numèrica

En relació amb l'obertura numèrica, hi ha un seguit d'altres factors dels quals depèn la qualitat de la imatge microscòpica i que s'indiquen a continuació:

Poder de resolució (PR). És la capacitat de la lent objectiu per donar imatges separades de dos punts molt pròxims; depèn de l'obertura numèrica (ON) i de la longitud d'ona (λ) de la llum utilitzada. S'expressa per la fórmula d'Abbe:

$$PR = 1/d = cte \times ON/\lambda$$

$$cte = 0,61$$

on **d** és la **resolució**, que és la distància mínima a la qual poden estar situats dos punts perquè les seves imatges es vegin separades, i ve donada per l'expressió:

$$d = cte \times \lambda/ON$$

El poder de resolució és el factor del qual depèn la capacitat d'un objectiu per reproduir en la imatge els detalls d'un objecte.

Per aconseguir el màxim poder de resolució d'un microscopi cal emprar objectius d'immersió ja que amb els mateixos augments presenten una obertura numèrica més gran.

La resolució màxima del microscopi òptic és de $0,25 \mu\text{m}$, mentre que la de l'ull humà és al voltant de $0,15 \text{ mm}$.

Poder d'il·luminació. És la quantitat de llum que entra en l'objectiu per formar la imatge.

Camp visual. És la zona de la mostra que pot ésser observada sense moure-la ni canviar l'enfocament.

Poder de penetració o profunditat de focus. És la capacitat d'un objectiu per enfocar de forma simultània diferents plans de la mostra.

Els dos primers factors varien en proporcionalitat directa amb l'obertura numèrica, en canvi els dos últims varien en proporcionalitat inversa.

En les montures dels objectius hi ha unes anotacions que serveixen per identificar-los, i són: aplicació, augment propi, obertura numèrica, longitud del tub i gruix del cobreobjectes pel qual han

estat corregits, grau de correcció cromàtica, i si són d'immersió. Per exemple, un objectiu que porti les anotacions 40/1,00 Oil i 160/0,17 ens indica (vegeu la figura 1.5):

- 40 x: l'augment de l'objectiu
- 1,00: l'obertura numèrica de l'objectiu
- 160: la longitud òptica del tub o capçal en mm
- 0,17: gruix del cobreobjectes de la preparació. Si en lloc de 0,17 hi ha un guió (-), indica que aquest objectiu pot observar preparacions amb cobreobjectes o sense; si hi ha un (0), l'objectiu està construït per observar únicament preparacions sense cobreobjectes.

Altres anotacions possibles són les següents:

- Plan: objectiu pla (sense curvatura de la imatge)
- Ac: objectiu acromàtic
- Fl: objectiu de fluorita o semiapocromàtic
- Apo: objectiu apocromàtic
- PH: objectiu de contrast de fase
- DIC: objectiu de contrast interferencial de Nomarski
- Oil: objectiu d'immersió amb oli

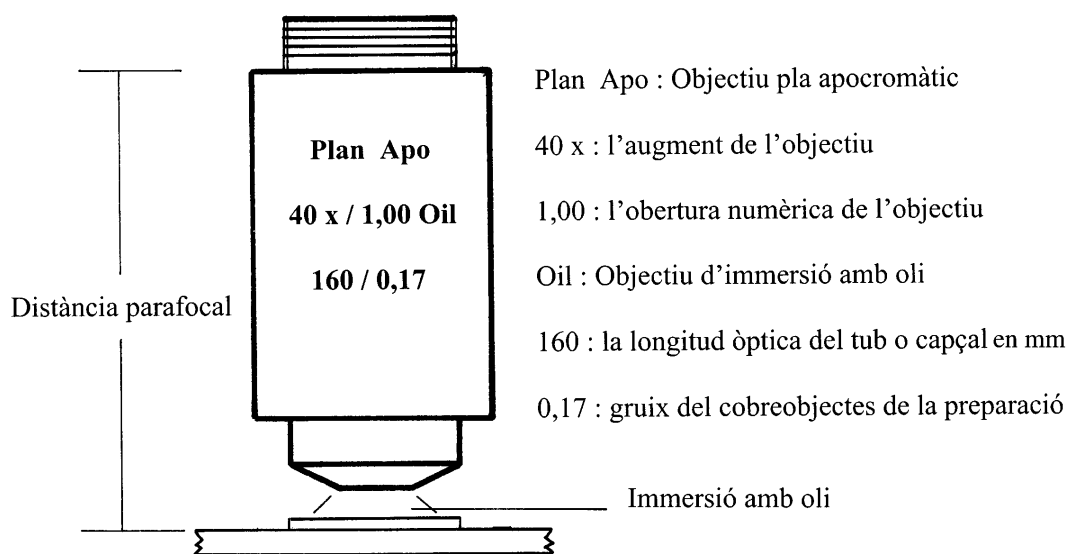


Figura 1.5. Montura de l'objectiu

2.2.2.2. Ocular

És un sistema òptic que, situat en l'extrem superior del tub del microscopi, dóna lloc a una imatge virtual, augmentada i dreta, de la imatge primària originada per l'objectiu.

Els oculars poden ser **positius**, amb el pla focal exterior al sistema òptic, i **negatius**, amb el pla focal interior. S'anomenen **oculars compensadors** quan acaben de corregir l'aberració cromàtica residual que presenta la imatge primària (vegeu la figura 1.6).

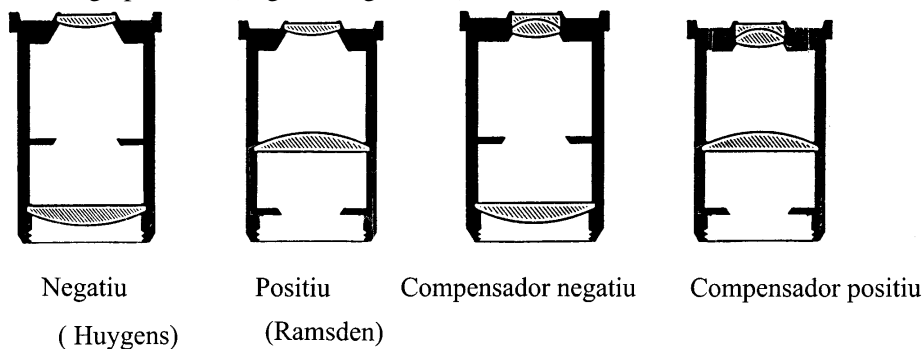


Figura 1.6. Tipus d'oculars

Els **oculars indicadors** són els que introdueixen a nivell del pla focal senyals que permeten indicar zones de l'objecte i els **oculars micromètrics** són els que insereixen reticles o divisions per tal de valorar diferents paràmetres de l'objecte.

També hi ha **oculars de projecció, fotogràfics** i d'altres que tenen aplicacions específiques.

En els oculars s'ha de tenir en compte, a més a més de l'**augment**, l'anomenat **índex de camp visual**, que indica l'àrea de la imatge primària visualitzada per l'ocular. Els valors numèrics tant d'un com de l'altre es troben gravats en la muntura de l'ocular.

2.2.2.3. Sistema d'il·luminació

Dispositiu que facilita la il·luminació correcta de la mostra per a una acurada observació microscòpica. Generalment consta de: focus lluminós (làmpada), lent col·lectora, mirall i condensador amb diafragma d'obertura (vegeu la figura 1.2).

Condensador. És un sistema de lents convergents situat a sota de la platina que concentra damunt de la mostra els feixos de llum emesos per la font d'il·luminació (vegeu la figura 1.7). Està equipat amb un diafragma iris (diafragma d'obertura) que permet controlar el con de llum incident sobre la mostra per millorar el contrast de la imatge microscòpica.

El condensador és l'element bàsic d'alguns tipus d'il·luminació especials en microscòpia com és el cas del camp fosc i del contrast de fase que utilitzen condensadors especials.

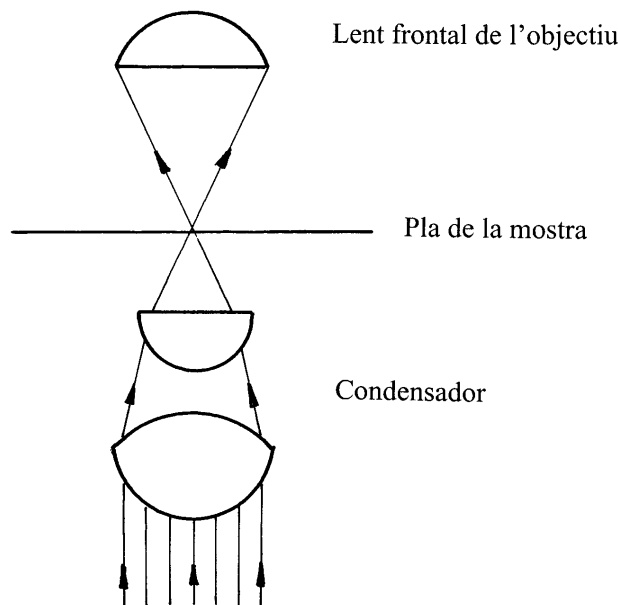


Figura 1.7. Trajectòria de la llum del condensador a l'objectiu

2.3. Il·luminació de Köhler

Consisteix a situar la imatge del filament incandescent de la làmpada de baix voltatge en el pla on es troba el diafragma d'obertura numèrica del condensador, actuant damunt la lent col·lectora, i posar la imatge del diafragma de camp en el pla de la mostra movent el condensador.

Amb la il·luminació de Köhler s'aconsegueix aprofitar el màxim nombre de raigs lluminosos emesos pel filament de la làmpada, i que aquesta llum il·luminadora es trobi uniformement repartida per tot el camp visual.

Per fer aquest tipus d'il·luminació, el microscopi ha de tenir un sistema d'il·luminació amb dos diafragmes: un d'anomenat **diafragma de camp**, situat a nivell de la lent col·lectora, i el **diafragma d'obertura numèrica** del condensador. La lent col·lectora és una lent condensadora situada al costat i davant de la làmpada.

2.4. Mesures en microscòpia

Amb l'ajut de diferents aparells podem obtenir, a més de resultats morfològics, valoracions de tipus quantitatiu, com la mesura de longituds, de diàmetres, de superfícies, de densitats numèriques (recomptes, nombre de cèl·lules per unitat de volum, etc.). Actualment es fan servir sistemes de captació, digitalització i anàlisi d'imatges que permeten obtenir de manera semiautomàtica valors morfomètrics.

2.4.1. Mesura de distàncies horitzontals (micrometria)

Una manera fàcil de mesurar les cèl·lules i les estructures que visualitzem en el microscopi és utilitzar el **micròmetre ocular** o **ocular micromètric**. Es tracta d'un disc de vidre que porta gravada una petita escala i que es col·loca dins de l'ocular. El valor de cada divisió de l'escala, pel fet d'estar situada a nivell de l'ocular, varia en funció de l'augment amb què s'observa. Per tal de saber el valor de cadascuna de les divisions en un determinat augment, es compara l'escala de l'ocular amb la del **micròmetre de platina**, **micròmetre objectiu** o **micròmetre objecte**, de la qual sabem el valor real. Aquesta operació rep el nom de **calibratge del micròmetre ocular**. El micròmetre objecte és una preparació que porta gravat, generalment, un mil·límetre dividit en 100 parts —el portaobjectes ens ho indica: 1/100, 1:100, 0,01 mm— (vegeu la figura 1.8).

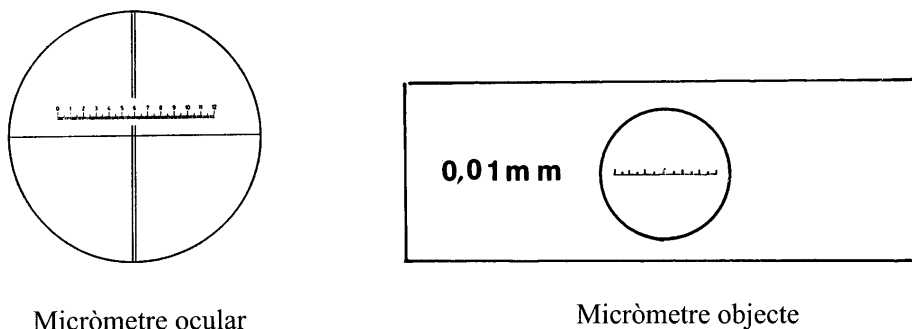


Figura 1.8. Micròmetre ocular i micròmetre objecte

2.5. Càmeres clares

Quan observem una preparació en el microscopi òptic podem obtenir informació morfològica de les estructures que la componen (forma, grandària, afinitat pels colorants, disposició...). A més de l'observació directa podem acoblar alguns aparells o sistemes de registre al microscopi, com ara dispositius de projecció, càmeres clares, càmeres fotogràfiques, de vídeo, que ens permeten en molts casos guardar la informació obtinguda.

Les **càmeres clares** són uns dispositius que, mitjançant un sistema de miralls i prismes divisors, permeten l'observació simultània, a través dels oculars del microscopi, de la imatge de l'objecte i de la punta d'un llapis situat al costat del microscopi, que serveix per resseguir la imatge damunt d'un full de paper sense deixar d'observar l'objecte (vegeu la figura 1.9).