

APORTACIONES DE LA MICROSCOPIA ELECTRONICA A LA HISTOLOGIA NORMAL*

DR. ANTONIO VILLASANA ESCOBAR

LA DESCRIPCIÓN de la estructura de la materia viva ha sido una de las principales preocupaciones de los que estudian biología y el detalle con el que se ha hecho la descripción ha corrido al parejo con los métodos utilizables para la visualización directa de la estructura.

En los últimos años el interés en problemas concernientes a la ultraestructura de los sistemas biológicos ha aumentado enormemente. El campo de la ultraestructura biológica y de la organización molecular de los sistemas vivos ha suministrado un campo común de reunión que permite comparar y utilizar los resultados obtenidos de una variedad de campos de investigación tales como la histología, la anatomía patológica, la bioquímica y la biofísica así como la fisiología y la farmacología. Entre la multitud de métodos que han contribuido bastante al conocimiento de la ultraestructura está la microscopía electrónica.

En este trabajo presentamos a ustedes una somera revisión de las aportaciones que ha dado la microscopía electrónica a la histología normal, esperando que pueda ser de alguna novedad e interés.

Aunque el primer microscopio electrónico fue construido en 1932 por Knoll, Ruska y von Borries en Alemania, sólo hasta esta última década se han desarrollado técnicas de preparaciones adecuadas de tejidos para su examen con este aparato.

Dichas técnicas difieren de la microscopía óptica habitual esencialmente en lo siguiente: 1) el bloque de tejido usado es muy pequeño (menos de 1 mm. por lado); 2) el tejido debe ser muy fresco y tiene que ser fijado inmediatamente, pues los cambios postmortem son muy notorios bajo el microscopio electrónico. Paladé en 1952 introdujo el tetroxido de osmio en solución buffer cerca de la neutralidad, que se considera como el mejor fijador para estos propósitos

* Trabajo de ingreso leído en la sesión ordinaria del 22 de julio de 1959.

en la actualidad; 3) el tejido después de fijado y deshidratado es incluido en un material plástico. El material casi universalmente empleado hoy día es el n-butyl-metacrilato introducido por Newman y col.² en 1949; 4) los cortes deben ser de una delgadez extraordinaria ($\frac{1}{40}$ de micra) para lo cual se requieren por una parte "ultramicrotomos" de diversos tipos que permiten el avance del bloque $\frac{1}{40}$ a $\frac{1}{10}$ de micra y por otra el empleo de "cuchillas de vidrio" usando el borde de fractura de una lámina de vidrio introducidas por Latta y Hartmann³.

Por lo pequeño y delgado de los cortes, la sección de ellos debe hacerse bajo un microscopio estereoscópico y los cortes se reciben en un pequeño reservorio que lleva la cuchilla.

Respecto al aspecto técnico del microscopio electrónico no es el propósito de este trabajo describirlo, sino revisar lo que se ha logrado con su uso. Dice acertadamente Policard en su libro sobre estructuras inframicroscópicas⁴: "...La microscopía electrónica es una técnica complicada. Sus instrumentos son de un precio muy elevado. Ella sólo es accesible a un pequeño número de laboratorios y de equipos. Sin embargo, es necesario que fisiólogos y patólogos (y el médico en general agregaríamos), conozca los resultados adquiridos en estos nuevos dominios que ellos no pueden explorar por sí mismos. Los resultados aportados por la microscopía electrónica pueden ser utilizados sin estar por ello obligados a conocer el empleo ni manejar este instrumento".

El material acumulado en el corto plazo de aproximadamente 10 años es enorme. En la actualidad además de las revistas especializadas multitud de revistas incluyen continuamente hallazgos con esta técnica.

Conviene también señalar que por las manipulaciones inherentes a la técnica, sobre las observaciones con el microscopio electrónico se cierne la misma amenaza que tuvo durante mucho tiempo la histología clásica, es decir, que algunas de las cosas observadas pudieran ser artefactos de la técnica. También los microscopistas electrónicos confrontan las dificultades que tienen los que cultivan células, de observar la imagen de una estructura siendo el problema cómo interpretarla.

El orden de exposición seguido es el de la histología clásica considerando primero las aportaciones hechas a la citología, después lo logrado en el estudio de los tejidos y finalmente las aportaciones a la estructura fina de algunos órganos.

CITOLOGÍA

Quizás podría sumarse lo alcanzado por la microscopía electrónica en el estudio de la ultraestructura de las células señalando que se han descubierto en ellas un conjunto asombroso de membranas y dobles membranas, de vesículas, gránulos y fibrillas. Esto explica por lo menos en parte cómo pueden las células vivas por el aislamiento parcial o casi total o bien temporal que dan estas

membranas o vesículas a partes del protoplasma poder llevar a cabo sus complejas actividades.

MEMBRANA PLASMÁTICA

El microscopio electrónico ha permitido la visualización clara de la membrana plasmática como una estructura neta de 60 a 100 Å, visible con el microscopio de luz sólo en algunas células como el eritrocito. Vería mucho en su complejidad siendo plana por sus lados en algunas células mientras que en otras envía prolongaciones que corresponden a recesos en los que embona con sus vecinas. Los bordes apicales que ve hacia alguna luz presentan elaboradas modificaciones generales como salientes o microvellosidades (el borde estriado de la microscopía de luz). Granger y Baker⁵ han estimado que una sola célula del epitelio intestinal tendría 3,000 microvellosidades. En las células con función de absorción estas estructuras sugieren que servirían para aumentar la superficie de absorción; sin embargo, también se observan en células secretoras. Frecuentemente esta superficie libre presenta invaginaciones dentro del citoplasma o poros que comunican con un complejo sistema de canalículos. A veces es la base de la célula como en el tubo sinuoso distal del riñón que presenta pliegues o tabiques que originan estrechos compartimientos.

También se han demostrado especializaciones de la membrana en las superficies de contacto de células adyacentes como desmosomas y barras terminales. Se pensaba que un cemento intercelular mantendría adheridas a las células. En la actualidad se piensa que la cohesión celular se debe a fuerzas de atracción molecular como las que unen a un antígeno con un anticuerpo. El paso de células entre otras células se comprendería mejor como la separación temporal y después reunión de los sitios de atracción específica que más bien como una disolución y después reformación del cemento intercelular.

RETÍCULO ENDOPLÁSMICO

El nombre de retículo endoplásmico originado por Porter ha persistido y se sigue usando aunque sea incorrecto, para designar una serie de vesículas que quizás estén conectadas entre sí (retículo), de diverso aspecto y tamaño, tanto en el ecto como en el endoplasma. Un nombre más genérico y al parecer más correcto es el de "citomembranas" dado por Sjöstrand⁶ que implica no sólo al retículo endoplásmico sino también a la membrana plasmática misma y a la membrana nuclear externa que señalamos más adelante. No quedaría incluido dentro de este término ni el llamado aparato de Golgi que aunque siendo un sistema de vesículas se le individualiza como un organoide diferente y tampoco se incluye al ergatoplasma aunque guarda muy estrecha relación anatómica y sobre todo quizás funcional con las citomembranas. Se distinguen dos tipos de vesículas membranosas en el "retículo endoplásmico" las "lisas" y las "rugosas".

Estas últimas son llamadas así por tener por fuera de ellas gránulos de ácido ribonucleico o granos de Palade que forman el ergatoplasma. Cerca de la membrana plasmática las vesículas son de tipo liso y algunos autores piensan que podrían formarse por invaginación de ella. También se distinguen vesículas aplastadas y distendidas, alargadas y curvadas. Finalmente cabe señalar que el retículo endoplásmico es más aparente en células con intensa actividad metabólica como las células pancreáticas, hepáticas y nerviosas. Recientemente Bennett⁷ ha emitido la teoría que el retículo endoplásmico podría permitir el paso y la difusión rápida de la acetilcolina a todo el interior de la célula muscular esquelética para permitir la despolarización de la membrana y desencadenar la contracción muscular.

ERGASTOPLASMA

El concepto de este organoide y de las citomembranas ha sido causa del embrollo tanto semántico como real debido a que su conocimiento ha ido cambiando conforme se han podido practicar cortes más finos y observar con mayor amplificación las células. Originalmente quedó englobado dentro del retículo endoplásmico, pues en parte se adhiere a vesículas constituyendo las llamadas vesículas "rugosas". Se debe a Palade⁷ la brillante demostración que vesículas y granos son dos entidades distintas. Por ultracentrifugación obtuvo una información con un elevado contenido en vesículas con gránulos adheridos a ellas. El mostró que cuando esta fracción era tratada con ribonucleados los gránulos desaparecían. Tratando preparaciones semejantes con deoxicolato se producía la disolución de las vesículas membranosas. Esto permitió la centrifugación de los gránulos, los cuales contenían 80 a 90% de RNA de la fracción. Los gránulos de Palade como desde entonces se llaman son los responsables de la basófila del citoplasma y son la llamada sustancia cromidial o cromófila del citoplasma. Desde el siglo pasado Garnier y Bouin habían denominado ergastoplasma a esta parte del citoplasma para señalar su participación funcional activa, hecho que ha sido ampliamente comprobado por estudios bioquímicos recientes, siendo al parecer estas núcleoproteínas capaces de sintetizar otras proteínas. Importa señalar que la producción de proteínas para el crecimiento, es decir, la formación de nuevas células no presenta la misma estructura que la elaboración de proteínas que se secretan. Los tejidos embrionarios y las células neoplásicas aunque tienen muchos gránulos, relativamente pocos se hallan adheridos a vesículas y éstas son poco numerosas mientras que las células que sintetizan proteínas para secreción sí tienen muchas vesículas con granos adheridos.

MITOCONDRIAS

Es asombrosa la cantidad de información que se ha reunido sobre este organoide de las células en los últimos años. Desde su aislamiento por homogenado

y ultracentrifugación por Bensley, el análisis bioquímico ha descubierto en ellas los sistemas enzimáticos que intervienen en el llamado "molino metabólico" que juegan un papel capital en la respiración celular y en el aprovechamiento y almacenamiento de la energía que utilizará la célula para su funcionamiento.

Con el microscopio de luz, siendo extraordinariamente lábiles y difíciles de teñir se veían gránulos o bastoncitos. En cultivos de células y con contraste de fase destacan con gran claridad y aun se las ve fraccionarse. Con el microscopio electrónico se ha visto que están formadas por una doble membrana que emite particiones o "crestas mitocondriales" variables en número y extensión. Palade y Sjöstrand han contribuido mucho al conocimiento de su estructura. Serían según Green¹⁷ "máquinas bioquímicas" que intervendrían en funciones orgánicas tales como la contracción muscular, la conducción nerviosa, la visión, el transporte renal y en funciones celulares como transporte a través de membranas, fotosíntesis, oxidaciones del ciclo cítrico y en procesos biosintéticos. Se encontrarían en todas las células acrobicas, animales, vegetales y microbianas. Según Green se podrían subdividir ya sea miniaturizándose conservando todos los sistemas enzimáticos o bien ir perdiendo enzimas y formando partículas submitocondriales transportadoras de electrones.

Aparato de Goldi. La estructura del aparato de Goldi ha quedado bien definida por la microscopía electrónica, aunque su naturaleza química y funciones siguen en controversia. Dalton,⁹ Sjöstrand¹⁰ y Bernhard han contribuido a su conocimiento. Estaría formado por: 1) una serie de 5 a 6 vacuolas grandes en pares dispuestas en herradura, circunscribiendo un espacio que contiene, 2) vesículas membranosas lisas dispuestas paralelamente, y 3) un número variable de microvesículas. Probablemente estaría relacionado con la secreción.

Centro celular. El pequeño punto o puntos vistos con el microscopio de luz que constituye el centrosoma es una formación cilíndrica abierta, cuya pared contiene probablemente 9 fibrillas al parecer dobles y huecas, rodeadas de un material oscuro y denso. Se asocia a la formación de fibrillas (huso acromático y a los cilios).

Protofibrillas, microfibrillas o filamentos. Las más estudiadas han sido las musculares que se citan adelante.

Núcleo. Membrana nuclear. Hartman¹⁸ describió por primera vez una doble membrana en el núcleo de las células nerviosas, lo que se ha comprobado para muchas de otras células. La membrana externa es gruesa, rugosa (por la presencia de granos de Palade) y a veces continua con las vesículas del retículo endoplásmico por lo que se considera dentro de las citomembranas como una membrana citoplasmática interna. El espacio intermedio es regular aunque a veces es amplio por salientes de la membrana externa. De trecho a trecho la membrana nuclear presenta *poros*, siendo ésto un dato más que hace pensar que exista un recambio activo nucleocitoplasmático.

Nucleolo. Contrariamente a lo que sería de esperar por la imagen vesicular

refrigente, nítida del nucleolo, éste visto con microscopio electrónico, no tiene membrana que lo limite ni es una estructura homogénea. Consiste de acúmulos de gránulos, de 10 a 15 $m\mu$ de diámetro, con gran poder de dispersión de los electrones. Frecuentemente estos gránulos se disponen como cordones anchos anastomosados, formando un retículo como esponja. (Núcleolonema de Estable y Sotelo). Entre ellos hay una sustancia nucleoplásmica o "pars amorfa". Contiene abundante R.N.A. y se le ha visto en cultivos de células movilizarse, contactar la membrana nuclear y aún expulsar material hacia el citoplasma. Casperson ha sugerido que el nucleolo es un centro de síntesis proteica.

Cromosomas. Defraudando las esperanzas de muchos investigadores la microscopia electrónica no ha revelado datos estructurales de estos elementos. Debe tenerse presente sin embargo, que entre más delgado sea el corte como para microscopía electrónica, sólo podrán verse partes de un cromosoma. El material cromosómico del núcleo en interfase o en división celular no está limitado por membrana y está formado por granos aún más finos que los del nucleolo (3 a 5 $m\mu$) a veces dispuestos en hileras paralelas. Se considera que la organización estructural de los cromosomas se encuentra cerca o a nivel molecular, más allá, por ahora del poder de resolución del microscopio electrónico.

Inclusiones del citoplasma. (Gránulos de secreción). Entre las células secretoras más estudiadas se encuentran las pancreáticas. En ellas los granos de secreción o gránulos de zimógeno se ven rodeadas de una membrana lisa. Existen diversas teorías acerca de su formación. Para unos se formarían en vesículas rugosas que se desprenderían del sistema de vesículas que les dan origen y al crecer desaparecerían los gránulos externos, dando origen a una vesícula lisa. Para otros investigadores se formarían en las vesículas lisas del aparato de Golgi.

Otras inclusiones como el glicógeno, se ven al microscopio electrónico como áreas claras amorfas. En células reticulares y macrófagos, Bessis y col.¹⁹ han podido ver inclusiones granulares y regulares que corresponderían a ferritina por la desintegración con hemólisis o no de los glóbulos rojos.

Substancias intercelulares. A los brillantes estudios bioquímicos de Meyer sobre los mucopolisacáridos, a la definición del concepto de las enfermedades llamadas "de la colágena" y al descubrimiento y aplicación clínica de esteroides de la corteza suprarrenal y del HACT en esta enfermedad, se ha venido a sumar el conocimiento de la ultraestructura de la colágena, la reticulina y la elástica componentes fibrosos de las sustancias intersticiales.

La fibra colágena más delgada observada con el microscopio de luz, cuando se examina con el microscopio electrónico está formada por multitud de fibras "primarias" unidas por una sustancia amorfa poco aparente. Cada fibra presenta bandas transversales periódicas cada 640 $\text{\AA}$ que le dan aspecto estríado. En algunos animales se ha demostrado que cada una de estas fibrillas está compuesta de haces de fibrillas más finas o protofibrillas de igual periodicidad. Las fibras reticulares son más delgadas, pero exhiben la misma periodicidad de

las colágenas. El microscopio electrónico ha resuelto el debate de más de 50 años sobre la semejanza o diferente naturaleza entre estas fibras. Las fibras elásticas no presentan periodicidad sino que son homogéneas.

TEJIDOS. (TEJIDO CONJUNTIVO) FIBROGÉNESIS

El microscopio electrónico ha venido a avivar una vieja controversia sobre el origen intra o extracelular de la colágena o bien en la superficie de los fibroblastos. Un punto que no hay que perder de vista es que las fibras se forman y desaparecen continuamente con gran facilidad y que probablemente haya varias modalidades de formación. Costero y colaboradores han aportado datos por medio del cultivo de células de la formación intracelular normalmente.

Macrófagos. Palade ha observado que la membrana plasmática presenta muy numerosos pseudópodos delgados que verosíblemente están relacionados con su actividad fagocitaria.

Células plasmáticas. Los cortes de plasmocitos o células cianófilas de Cajal han revelado que contienen en su citoplasma mucho mayor cantidad de vesículas aplanadas rugosas (ergastoplasma) que la mayoría de las células, así como un aparato de Golgi bien desarrollado, sugiriendo que estas células elaboran una secreción protéica, cosa que se ha probado por métodos inmunohistoquímicos por Coons, Leduc y Connolly.¹¹

Tejido óseo. Robinson y Cameron¹² han señalado que en las micrografías electrónicas de alta resolución de cortes de hueso no decalcificado aparece la substancia mineral casi siempre como microcristales alargados en forma de agujas de 30 a 40 Å de ancho y 200 Å de largo. El corte transversal de estos cristales tiene forma hexagonal o circular. Tales cristales representan una superficie considerable calculada en 130 m.² por gm. que explicaría la facilidad del recambio continuo que se supone existe. Los cristales se disponen típicamente a lo largo de las fibras colágenas en cierta relación con su periodicidad. El cartílago calcificado tiene otra estructura.

Tejido hematopoyético y sangre. Marcel Bessis ha hecho un estudio cuidadoso de multitud de puntos de estos tejidos que consigna en su tratado de Citología Sanguínea. Citemos solo dos: la ultraestructura del megacariocito y de la fibrina. La prueba final que las plaquetas se desprenden del citoplasma del megacariocito se obtiene en micrografías electrónicas en las cuales se observa que se forman pequeños compartimientos por vesículas membranosas lisas en relación tal vez con la membrana plasmática. En el citoplasma del megacariocito se ven los gránulos específicos de las plaquetas. La fibrina aparece dispuesta en hilos con una periodicidad axial de 230 Å, distinta pues de las de la colágena.

Tejido muscular. (Esquelético voluntario). Cada una de las miofibrillas que forman las células con sus bandas claras, isotrópicas o I, con su línea central Z y los discos oscuros, anisótropos o A, con su disco claro central H, se les ha visto

constituídas por miofilamentos dispuestos en registro. Serían de dos tipos: unos delgados que ocuparían el disco claro y llegarían hasta el borde el disco H y otros gruesos que ocuparían el disco oscuro. Transversalmente estos miofilamentos estarían formando sistemas hexagonales regulares, unidos por puentes cada 60° a lo largo de los miofilamentos. Estos datos y otros más han hecho postular a Huxley y Hanson ¹³ una hipótesis lógica de la contracción muscular en su aspecto mecánico y no químico como ha señalado Szent-Györgyi.

Tejido nervioso. (Fibras nerviosas). Fernández Morán señaló por primera vez que la mielina se dispone en capas concéntricas separadas por dobles membranas que son invaginaciones de la membrana plasmática de la célula de Schwann y comunican el exterior con el axoplasma. Espacios semejantes serían las cisuras de Schmidt-Lanterman según ha señalado Robertson.

ORGANOGRAFÍA

Corazón. Otro de los problemas resueltos por la microscopía electrónica es la constitución celular del corazón. Muir, Kisch ²⁰ y otros han demostrado que el músculo cardíaco no es un sincitio sino que existe una membrana plasmática, la cual en el adulto a veces está dispuesta en escalera, a nivel del disco intercalar, rodeada de un material oscuro denso.

Pulmón. Prueba definitiva del revestimiento epitelial del alvéolo pulmonar ha sido dada por el microscopio electrónico. Los cilios de las vías respiratorias se les ha visto formados por una estructura tubular con 11 filamentos, dos centrales y nueve periféricos, que van a terminar en un centriólo o cuerpo basal en el citoplasma. Igual estructura presenta en otras partes como el oviducto y el flagelo del espermatozoide tiene una estructura bastante semejante.

Riñón. (Glomérulo). El estudio de la estructura del glomérulo especialmente por Hall ¹⁴ y Pease ¹⁵ ha revelado dos hechos interesantes: el fenestramiento del capilar glomerular con poros de aproximadamente 0.1 de μ y las múltiples prolongaciones de las células de la cápsula de Bowman a las que se les ha dado el nombre de "podocitos" por este hecho. El cuerpo del podocito con su núcleo está separado del capilar por un espacio "subpodocítico" lleno de filtrado glomerular. Del cuerpo saldrían brazos o prolongaciones que corren paralelas al capilar y también separadas de él. Finalmente saldrían procesos menores o pies que irían a sentar en el capilar entre los poros. La única membrana entre la sangre y el filtrado es la membrana basal del endotelio.

Testículo. Los trabajos de Fawcetty y Burgos ¹⁶ así como otros investigadores, han revelado que la membrana basal del túbulo seminífero consta de dos porciones: una fibrosa externa y la otra granular, homogénea interna. Esta última presenta salientes en botón de camisa o en forma de ganchos que embonan con hoquedades en la célula de Sertoli. También han visto que las diferentes fases de diferenciación de la espermatogonia ocupa recesos en la célula de Sertoli,

de donde verosíblemente reciben su nutrición. La transformación del espermatozoido en espermátide ha sido seguida con notable precisión, formándose en una de las vesículas del aparato de Golgi el gránulo acrosómico (futuro acrosoma) constituyendo un capuchón el resto de la vesícula. La cromatina del núcleo se condensa por debajo de él, se agrupan las mitocondrias, resto del aparato de Golgi y el centriolo, a partir del cual se desarrolla el flagelo con la estructura peculiar esbozada antes.

Los datos mencionados apenas son algunos de los más salientes de la multitud de los hasta hoy reportados. La microscopía electrónica apenas se encuentra en desarrollo, y sin duda debemos esperar mucho de ella en el futuro, lo cual contribuirá con los datos obtenidos por otras disciplinas el mejor conocimiento de la estructura de la materia viva.

REFERENCIAS

1. Palade, G. E. *A study of fixation for electron microscopy*. J. Exptl. Med. 95:285, 1952.
2. Newman, S. B., E. Borysko & M. Swerdlow. *New sectioning techniques for light and electron microscopy*. Science 110:66, 1949.
3. Latta, H. y J. F. Hartmann. *Use of glass edge in thin sectioning for electron microscopy*. Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 74:236, 1950.
4. Policard, A. y Dand, C. A. *Les structures inframicroscopiques normales et pathologiques des cellules et tissus*. Masson et Cie., 1958.
5. Granger, B. y Baker, R. F. *Electron microscope investigation of the striated border of intestinal epithelium*. Anat. Rec. 107, 423-41, 1950.
6. Sjöstrand, F. S. *The ultrastructure of the ground substance of cytoplasm en: Fine Structure of Cells*. New York, Interscience, 1955.
7. Bennett, H. S. *Modern concepts of structure of striated muscle*. Am. J. Phys. Med. 34: 46-67, 1955.
8. Palade, G. E. *The endoplasmic reticulum*. J. Biophysic. & Biochem. Cytol. (Supp.) 2:85, 1956.
9. Dalton, A. J., y Félix, M. D. J. *Biophysic. & Biochem. Cytol. (Supp.)* 2:79.
10. Sjöstrand, F. S., y Hanzon, V. *Ultrastructure of Golgi apparatus of exocrine cells of mouse pancreas*. Exper. Cell. Res. 7:415, 1954.
11. Coons, A. H., Leduc, E. H., y Connolly, J. M. *Studies on antibody production: I. A method for the histochemical demonstration of specific antibody and its application to a study of the hyperimmune rabbit*. J. Exper. Med. 102:49-60, 1955.
12. Robinson, R. A., y Cameron, D. F. *Electron microscopy of cartilage and bone matrix at the distal epiphyseal line of the femur in the newborn infant*. J. Biophys. & Biochem. Cytol. (Supp.) 2:253, 1956.
13. Huxley, H. E. *Electron microscope studies of the organisation of the filaments in striated muscle*. Biochim. et biophys. acta 12:387-394, 1953.
14. Hall, B. V. *Further studies of the normal structure of the renal glomerulus*. Proc. Sixth Ann. Conf. Nephrotic Syndrome, p. 1, New York, National Nephrosis Foundation, 1954.
15. Pease, D. C., y Baker, R. F. *Electron microscopy of the kidney*. Am. J. Anat. 87:249, 1950.
16. Fawcett, D. W., y Burgos, M. H. *Ciba Foundation Colloquia on Ageing*. Vol. 2, p. 86, London, Churchill.
17. Green, D. E. *Mitochondrial Structure and Function*. Lab. Invest. 8:443-459, 1959.
18. Hartmann, J. F. *An electron optical study of sections of central nervous system*. J. Comp. Neurol. 99:201, 1953.
19. Bessis, M., y Breton-Gorius, J. *Etude au microscope électronique des granulations ferrugineuses des érythrocytes normaux et pathologiques*. Rev. Hémat., 12, 43, 1957.
20. Kisch, B. *Elektronenmikroskopische Untersuchungen am Herzen*. Zeit. Wiss. Mikr., 62, 510, 1956.

APORTACIONES DE LA MICROSCOPIA ELECTRONICA
A LA HISTOLOGIA NORMAL

COMENTARIO AL TRABAJO DE INGRESO
DEL DR. ANTONIO VILLASANA ESCOBAR*

DRA. ROSARIO BARROSO-MOGUEL

HASTA HACE 48 horas esperaba haber asistido a esta sesión de nuestra Academia para tener la satisfacción de escuchar el trabajo de ingreso de mi antiguo compañero de estudios en la Facultad de Medicina y buen amigo, el Dr. Antonio Villasana, y el comentario oficial a mi admirado maestro, el actual decano de la Sección, Sr. Dr. Manuel Martínez Báez. Estaba segura que trabajo y comentario iban a dejarme un agradable recuerdo, tanto por su contenido científico como por su significado emocional.

Pero las cosas han cambiado de aspecto en estos dos últimos días. El señor Dr. Manuel Martínez Báez está fuera del país, cumpliendo una delicada e importante comisión y no ha podido dejar escrito su comentario. En esta situación de emergencia me he sentido obligada a no rechazar la súplica de mi compañero y amigo y a escribir unas cuartillas a propósito de su trabajo de ingreso. Ya suponía que tal trabajo iba a ser importante y del mayor interés, como pude comprobar al leerlo y ustedes acaban de afirmar al escucharlo. Sin embargo, he aquí que no lo he disfrutado como esperaba, por culpa de la preocupación de sentir sobre mí la responsabilidad de comentarlo, ya que temo que, sin práctica en este tipo de crítica, mis palabras no sean las adecuadas para hacer resaltar ante los no especializados en el restringido campo de la microscopía electrónica, la singular importancia del trabajo del Dr. Villasana. Sin embargo, no puedo menos de intentarlo.

Cuando Antonio van Leeuwenhoeck comenzó a usar sistemáticamente el microscopio, la primera dificultad que debió vencer para usar el nuevo instru-

* Leído en la sesión ordinaria del 22 de julio de 1959.

mento con éxito fué la de reducir los tejidos de las plantas y de los animales a secciones tan delgadas que resultasen transparentes y, enseguida, la de encontrar un artificio que permitiese diferenciar las distintas partes de los tejidos cuando éstas tienen índice de refracción similar y no están coloreadas. Dicho en otras palabras; construido el microscopio, era fácil ver con él los infusorios que pululan en una gota de agua. Pero si ponemos la hoja de un árbol o el pétalo de una flor en la platina, el instrumento óptico sólo nos revela detalles de la superficie, si iluminamos el objeto por reflexión, o borrosas imágenes sin contornos precisos, si lo iluminamos aprovechando su moderada traslucidez. Por ello hubieron de construirse de inmediato aparatos para obtener cortes finos o microtomos, con los cuales la hoja o el pétalo muestran su estructura celular y sus granulaciones coloreadas. Los colorantes derivados de la anilina y otros más que nos fueron proporcionados por los químicos, completaron la técnica micrográfica que nos ha permitido a los médicos reconocer la imagen microscópica de la enfermedad, la patología celular, que dijo Virchow hace exactamente 100 años.

Perfeccionado microscopio, microtomo y colorantes, la ilusión de todo morfológico fué, durante muchos años, llegar al mayor aumento posible para ver, no sólo las células, sino sus componentes elementales. Pronto los físicos nos enseñaron que la fabricación y tallado de lentes capaces de proporcionar imágenes amplificadas sin aberraciones cromática y de esfericidad, propias para la obtención de imágenes precisas, estaba limitada al rendimiento máximo de 3,000 diámetros.

Especialmente gracias a los trabajos de Ernesto Carlos Abbé, se han construido instrumentos de gran precisión, cuyo poder resolutivo alcanza hasta $\frac{1}{10}$ de micra si empleamos como fuente luminosa a los rayos ultravioletas. Pero los electrones, al desplazarse con alta velocidad representan vibraciones cuya longitud de onda es 100,000 veces más corta que la de los fotones de la luz ordinaria por lo que, teóricamente, con ellos podemos ver objetos 100,000 veces menores. Con los modernos microscopios electrónicos es fácil alcanzar una resolución de 0.001 de micra, por lo que se utiliza el Angström = 0.0001 micras, como unidad de medida. En efecto, en los últimos 20 años la amplificación útil de las imágenes subió bruscamente hasta el millón de diámetros gracias al empleo de dichas radiaciones de onda muy corta y al uso de campos magnéticos en lugar de lentes. La imagen así obtenida no es visible directamente; es necesario utilizar pantallas fluoroscópicas para la selección del campo, y la placa fotográfica para retener sus detalles finos. Estos, gracias a la moderna técnica del revelado de grano fino, pueden amplificarse por proyección en proporción considerable. Por supuesto, ahora es necesario reducir los tejidos a secciones mucho más finas, que se miden por milimicras. Al principio se utilizó el artificio de suspender las estructuras en un líquido con el que se constituía una delicadísima membrana tendida en un orificio no mayor que el ojo de una aguja. Pero esta técnica, muy útil para estudiar partículas como los virus o las grandes moléculas proteicas, resultaba poco útil para el análisis de los tejidos, los cuales debían pulverizarse para

poder ser amplificados. De esta necesidad ha nacido el ultramicrotomo, que usa cuchillas de gran dureza (cuarzo, diamante), mecanismos automáticos de gran precisión e inclusión en materias plásticas, según nos ha resumido ya el Dr. Villasana. Estos cortes deben colocarse en alto vacío para que polvo y humedad no empañen las imágenes con toscos artefactos, y los electrones atraviesen el campo sin obstáculos.

En estas condiciones, las estructuras no pueden teñirse porque los colorantes no cambian la densidad electrónica; esta es la razón por la que en lugar de anilinas, se emplea ahora el sombreado metálico con oro, plata y paladio, lo que destaca en relieve las distintas estructuras fotografiadas.

Toda la morfología se ha ampliado con el nuevo instrumento en forma trascendental. Aunque sólo estamos en los comienzos, parece imposible que el doctor Villasana haya podido reunir en el breve espacio de que ha dispuesto para leer su trabajo, un resumen tan completo del estado actual de nuestros conocimientos sobre microscopía electrónica aplicada a la Histología Normal. Con estos progresos empiezan ya a estorbarnos los organitos intracelulares para poder ver en el protoplasma la distribución de las moléculas. Se antoja, por lo tanto, que la morfología ha ampliado su aspecto químico, que la bioquímica está cayendo en los dominios de la morfología. Y que, si el microscopio electrónico sigue, como hasta ahora, los pasos fundamentales del microscopio fotónico, el próximo paso de las ciencias atómicas, consistirá en permitirnos el estudio de las imágenes electrónicas en material vivo. Ojalá que el propio Dr. Villasana pueda traernos en un día no muy lejano películas cinematográficas demostrándonos la actividad vital de ultraestructuras y de moléculas.

El Dr. Antonio Villasana Escobar, nuestro nuevo compañero y colaborador en la Academia es un modesto y entusiasta trabajador de laboratorio. Primero al lado del también recientemente aceptado Académico Dr. Gabriel Alvarez Fuertes en la Escuela Nacional de Medicina, luego en el laboratorio de Investigaciones Anatomopatológicas del Hospital General y en el Instituto Nacional de Cardiología con nuestro maestros el Dr. Isaac Costero, más tarde como Patólogo Ayudante en el Instituto de Enfermedades Tropicales con el Dr. Manuel Martínez Báez, también como becario de la Fundación Rockefeller en la Universidad de Washington, San Luis Missouri, Estados Unidos, como Patólogo del Hospital Infantil al lado de nuestro compañero el Dr. Maximiliano Salas, y del Seguro Social, finalmente ahora como Profesor a Tiempo Completo de la Escuela Nacional de Medicina, ha realizado una labor continua y callada de trabajo efectivo que le permitirá contribuir brillantemente a las actividades de esta Academia, la Sociedad Médica más antigua y prestigiosa del país.