

4	90%	30 min.
5	100%	30 min.
6	100%	30 min.

Los reactivos usados para deshidratación son higroscópicos. Consiguiéndose en el mercado con un contenido de agua aproximadamente del 4%. Esta agua causa problemas y artefactos, eliminándose con gránulos de silicato o bien con sulfato de cobre anhidro o cloruro de calcio anhidro. Aunque estos reactivos no son tan confiables como los gránulos de silicato. La deshidratación la hacemos en los mismos viales usados para la fijación, asegurándonos de que están siempre bien tapados. El cambio de soluciones lo hacemos con la jeringa. Debemos cambiar las soluciones deshidratantes rápidamente porque se evaporan secándose las muestras.

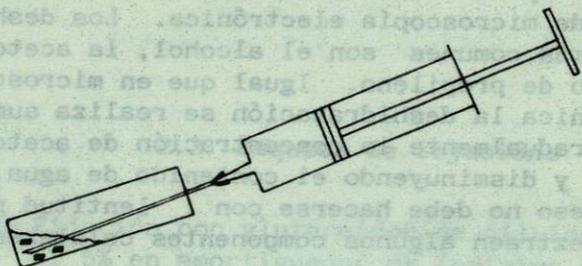


FIG. 3. Cambio de soluciones hecho con una jeringa.

4. INFILTRACION CON MEDIOS DE INCLUSION

Los medios de inclusión que se utilizan en microscopía electrónica de transmisión, tienen ciertas características especiales. Poseen principalmente una rápida penetración en los tejidos sin cambios artificiales de las estructuras celulares y una dureza suficiente para hacer cortes ultrafinos. Puesto que los medios de inclusión usados en microscopía óptica no se pueden utilizar para este tipo de trabajo, la única posibilidad fué usar otros materiales que en forma monómera fueran líquidos con poca viscosidad y después de la polimerización se cambiarán a una forma sólida bastante dura. Los metacrilatos fueron los primeros medios de este tipo. Ahora se utilizan diferentes epóxidos como Epon, Durcupan, Araldit y el medio de Spurr. Los productores anexan con los medios de inclusión el esquema de uso y su preparación. Las resinas se preparan de varios componentes (generalmente 4) éstas se deben mezclar bien. El tiempo para hacer la mezcla de algunas resinas puede tardar varias horas. Se necesita modificar la cantidad de algunos componentes de estos medios, sobre todo los que causan dureza o suavidad para trabajar con diferentes tejidos.

El cambio de los disolventes por resinas dentro de los tejidos y células tarda mucho tiempo, para evitar los cambios de las estructuras y formación de artefactos, se recomienda aumentar la cantidad de la resina y disminuir la cantidad del disolvente lentamente.

Por su desigual penetración y por las diferencias de preservación de las estructuras no se recomienda cambiar el tipo de medio de inclusión durante los mismos experimentos. Con material ve-

getal se obtienen muy buenos resultados usando - el medio de Spurr por su baja viscosidad. Con - ciertas modificaciones del proceso mencionado an - teriormente se tienen buenos resultados cuando - se emplea Durcupan. En el laboratorio de micros - copia electrónica de la Facultad de Ciencias Bio - lógicas se utiliza con éxito la resina epoxi Med - cast.

Fórmula de la mezcla de Durcupan recomendada por los productores

Durcupan No. 1	Componente	Cantidad
	A/M	10 ml.
	B	10 ml.
	D	0.2 ml.
Durcupan No. 2	A/M	10 ml.
	B	10 ml.
	D	0.1-0.2 ml.
	C	0.3-0.4 ml.

Modificación usada para tejidos vegetales en nuestro laboratorio.

Durcupan No. 1	Componente	Cantidad
	A/M	10 ml.
	B	10 ml.
	D	0.3 ml.
	C	0.3 ml.
Durcupan No. 2	A/M	10 ml.
	B	10 ml.
	D	0.3 ml.
	C	0.4 ml.

NOTA: La polimerización empieza después de la - adición del acelerador (componente C), reco - mendando trabajar con temperaturas cercanas - a los 20°C. Si no aplicamos el acelerador -

en la mezcla No. 1, el cambio de la resina -- No. 1 por la No. 2 es bastante lento por -- las características de los tejidos vegetales ya mencionadas, provocando que la polimeri - zación dentro de los tejidos sea insuficien - te y se dificulte el proceso de corte. La - resina Durcupan se mezcla en tubos graduados de 20 ml. a partir de los componentes A/M y B más la adición B y C con pipeta de 1 ml. -- Con 20 ml. de solución se incluye un máximo de - 10 muestras. Para 5 muestras se recomienda pre - parar la solución en tubos de 10 ml.

4.1. ESQUEMA DE INCLUSION

Las muestras deshidratadas están en tubos tapa - dos conteniendo acetona absoluta ú óxido de pro - pileno. El disolvente se extrae con una jeringa y se depositan las siguientes soluciones.

1	Durcupan No. 1	- 1 parte		
	acetona absoluta	- 3 partes	1 hora	20°C
2	Durcupan No. 1	- 2 partes		
	acetona absoluta	- 2 partes	1 hora	20°C
3	Durcupan No. 1	- 3 partes		
	acetona absoluta	- 1 parte	1 hora	20°C
4	Durcupan No. 1	Puro	durante	20°C
			toda la	
			noche	
5	Durcupan No. 2		20 min.	60°C
6	Durcupan No. 2	Incluir en	48 hrs.	70°C
		cápsulas -		
		(polimeri -		
		zación).		

Otros tipos de resinas más frecuentemente usados y sus esquemas para preparar las mezclas.

Epon 812

Mezcla A: Epon 812: 5 ml.
DDSA 8 ml.

Mezcla B: Epon 812: 8 ml.
NMA 7 ml.

Mezcla final para incluir :

A ---- 13 ml.

B ---- 15 ml.

DMP --- 16 gotas

Resina de Spurr

ERL 4206 10 gr.

DER 736 6 gr.

NSA 26 gr.

S-1 0.4 gr.

Resina LX 112 (WPE 149): Medcast

Mezcla A Resina 80 gr.
DDSA 105.6 gr.

Mezcla B Resina 100 gr.
NMA 88.3 gr.

Mezcla final para incluir (mezcla medio dura)

A ----- 5 gr.

B ----- 5 gr.

Acelerador 0.14 gr.

(DMP 30)

NOTA: Las muestras caen por sedimentación permitiendo retirar la resina inclinando el tubo. Para facilitar la penetración y el cambio de soluciones en los tejidos, mezclamos las resinas con las muestras después de cada paso. Durante la manipulación se recomienda trabajar con cuidado,

tapar bien los tubos y usar guantes. Los sobrantes de la resina usada durante la inclusión se vierten en un vaso o botella. No se deben tirar al drenaje.

Orientación de las muestras

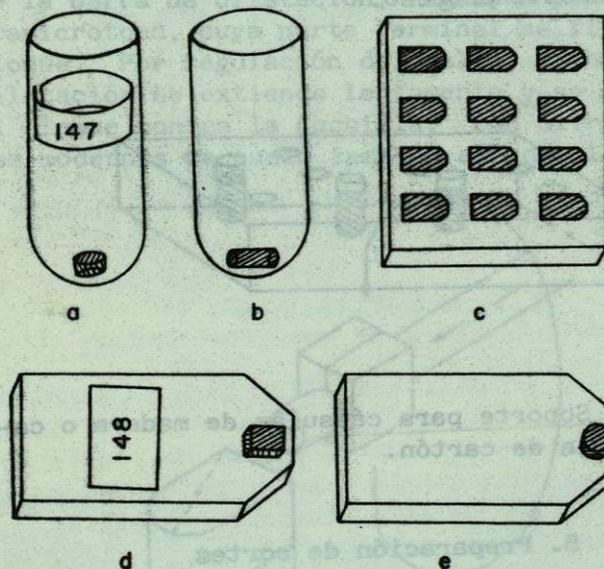


Fig. 4.

- Cápsula con una muestra de un órgano cilíndrico grueso (raíz o tallo) preparada para hacer cortes transversales y marcada con un papel que tenga el número de la muestra.
- Cápsula con una muestra de órgano cilíndrico delgado (raíz o tallo) preparada para hacer cortes longitudinales.
- Molde con bloques.
- Bloque de molde con muestra de órgano plano (hoja).
- Bloque de molde con muestra de órgano cilíndrico grueso (raíz o tallo) para hacer cortes longitudinales.

Para obtener los bloques que sirvan posteriormente en la ultramicrotomía, los cortes se incluyen en moldes de silicón. Cada bloque tiene una etiqueta y para hacerla legible debe estar marcada con lápiz o máquina. La orientación del corte es muy importante y debe dedicarse suficiente tiempo a este proceso.

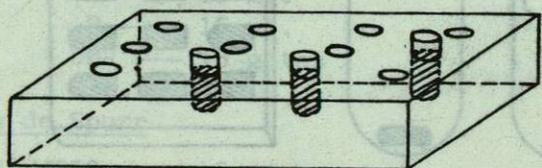


Fig. 5. Soporte para cápsulas de madera o caja de cartón.

5. Preparación de cortes

5.1. Ultramicrotomos

Los cortes ultrafinos se hacen con el ultramicrotomo. La falta de este equipo retrasó cierto tiempo el uso del microscopio electrónico en la mayoría de las ramas biológicas pues los microtomos usados para microscopía óptica no tenían capacidad para hacer los cortes suficientemente delgados necesarios en la microscopía electrónica. Los primeros ultramicrotomos fueron contruidos por Sjöstrand en Suecia y en E.E.U.U. Porter y Blum en 1952 y 1953 respectivamente. Los ultramicrotomos actuales son producidos por varias firmas, los más cono-

cidos y usados con de las casas de LKB, REICHERT y SORVALL. Casi todos los ultramicrotomos modernos son automáticos con regulación de la rotación y avance térmico del bloque contra la cuchilla. La rotación del bloque la hace el motor. El avance del bloque y por lo tanto el grosor de los cortes se debe al calentamiento de la barra de dilatación, regulada por el ultramicrotomo, cuya parte terminal se fija al bloque. Por regulación del calor, la barra de dilatación se extiende lentamente y se acerca el bloque contra la cuchilla. Con ultramicrotomos modernos se puede también acercar la cuchi-

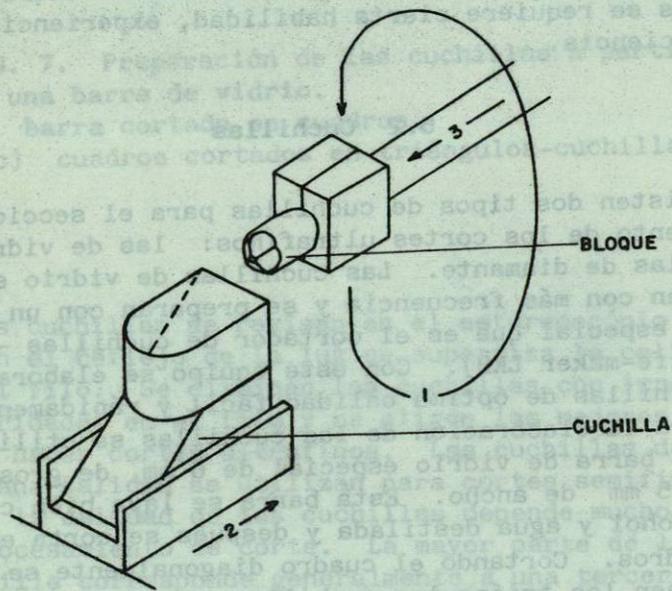


FIG. 6. Esquema de una parte del ultramicrotomo que comprende el bloque y la cuchilla.

- 1) rotación de la vara con el bloque
- 2) acercamiento de la cuchilla contra el bloque (manualmente).
- 3) acercamiento del bloque contra la cuchilla (automático).

lla contra el bloque manualmente, y hacer los cortes semifinos. Todo el trabajo se observa en el estereoscópio con aumentos variables. El área de acción (cuchilla-bloque) es iluminada por el tubo fluorescente.

El ultramicrotomo se coloca preferentemente en una mesa estable construída especialmente para este equipo o se usan mesas de concreto. Se eliminan de la mesa los instrumentos que pueden ser fuente de vibraciones. Todo laboratorio de ultramicrotomía debe estar limpio, aislado, sin movimientos de aire y sin cambios bruscos de temperatura. Para la preparación de cortes ultrafinos se requiere cierta habilidad, experiencia y paciencia.

5.2 Cuchillas

Existen dos tipos de cuchillas para el seccionamiento de los cortes ultrafinos: las de vidrio y las de diamante. Las cuchillas de vidrio se usan con más frecuencia y se preparan con un equipo especial que es el cortador de cuchillas (Knife-maker LKB). Con este equipo se elaboran cuchillas de óptima calidad fácil y rápidamente. Para la elaboración de las cuchillas se utiliza una barra de vidrio especial de 6 mm de grosor y 25 mm de ancho. Esta barra se lava bien con alcohol y agua destilada y después se corta en cuadros. Cortando el cuadro diagonalmente se obtienen los triángulos-cuchillas. Para sujetar la barra se usan ganchos o pinzas evitando cogerla con las manos. El ultramicrotomo es un instrumento delicado. Para mejor aprovechamiento de este equipo se recomienda leer el instructivo. Anexo al ultramicrotomo el productor envía un manual para su uso. Si carecemos de este aparato podemos hacerlas usando un lápiz diamante y pinzas especiales, este trabajo es difícil, se requiere mucha paciencia y habilidad.

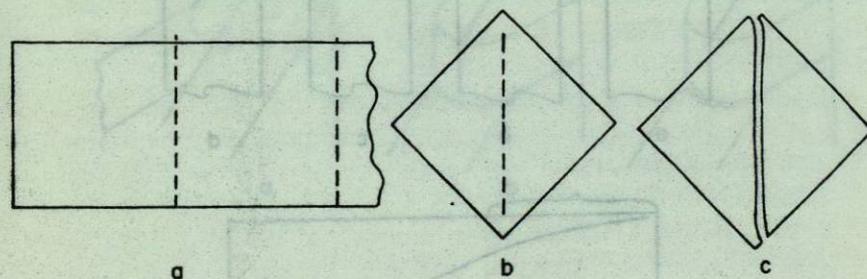


FIG. 7. Preparación de las cuchillas a partir de una barra de vidrio.
a) barra cortada en cuadros.
b,c) cuadros cortados en triángulos-cuchillas.

Las cuchillas se revisan en el estereoscópio. Con el reflejo de la luz se supervisa la calidad del filo. Se eliminan las cuchillas con irregularidades en el filo y se eligen las mejores para hacer cortes ultrafinos. Las cuchillas de mediana calidad se utilizan para cortes semifinos. De la calidad de las cuchillas depende mucho el procesamiento de corte. La mayor parte de la cuchilla corresponde generalmente a una tercera parte de la sección izquierda, la sección a la derecha corresponde a la sección de mala calidad. Las cuchillas se guardan en cajas cerradas, la manipulación se hace con cuidado sin tocar la parte del filo. Las cuchillas pierden el filo con el tiempo, preferentemente se usan recién hechas.

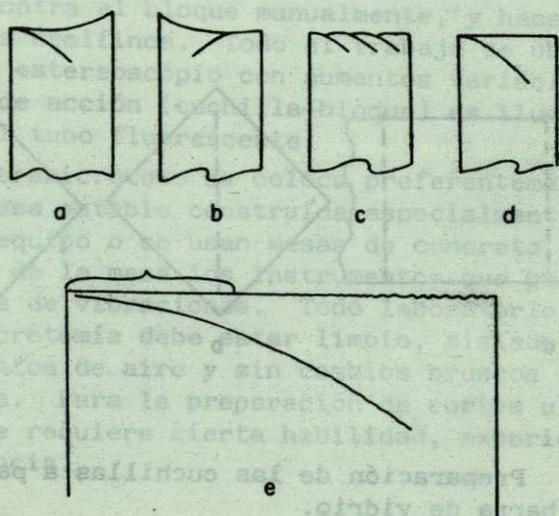


FIG. 8. Calidad de las cuchillas.

- a,b,c) cuchillas malas
 d) cuchilla con buen filo
 e) parte del filo de la cuchilla con mejor calidad.

Los cortes ultrafinos por su grosor limitado no se pueden hacer con una cuchilla seca, ya que deben flotar en la solapa. La superficie del agua debe estar al mismo nivel del filo de la cuchilla. Las solapas se hacen de una cinta metálica o todavía mejor si usamos una solapa de plástico. Estas son mejores por su forma más regular y por su estabilidad. Las solapas se pegan al vidrio de la cuchilla usando cera dental. Esta se calienta y se aplica usando una lanzeta o aguja inoxidable o bien se puede pegar con esmalte de uñas.

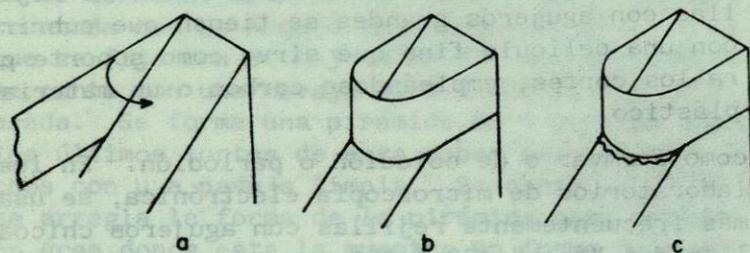


FIG. 9. Preparación de solapas

- a,b) se pega una cinta metálica a la cuchilla - formando la solapa.
 c) la solapa se sella con cera o esmalte de uñas.

Con las cuchillas de diamante se pueden hacer -- cortes más fácilmente y de mejor calidad. Por su alto precio generalmente sólo se utilizan para objetos que por su dureza no se pueden cortar con cuchillas de vidrio. Estas cuchillas tienen un diamante cortado fijado con un ángulo óptimo para los cortes, poseen una solapa de metal y su área de corte es generalmente limitado (1-2 mm). Por su alto costo y lo delicado de su manejo sólo deben trabajar con ellas personas experimentadas en el proceso de ultramicrotomía.

5.3 Rejillas

La observación de cortes al microscopio electrónico de transmisión, se hace usando rejillas especiales que sirven como portaobjetos, las rejillas más frecuentemente usadas son de 3 mm de diámetro hechas de cobre. Otros materiales usados son oro, platino, paladio y níquel y tienen

varias formas y tamaños de agujeros. Las rejillas con agujeros grandes se tienen que cubrir con una película fina que sirve como soporte para los cortes, empleándose carbón o un material plástico.

como formvar o de colodión o parlodión. En los laboratorios de microscopía electrónica, se usan más frecuentemente rejillas con agujeros chicos -- llamados "mesh" 400 ó 300 que no se necesitan cubrir con películas. Las caras de las rejillas -- son diferentes, una es opaca y la otra es brillante. Los cortes tienen mejor adherencia a la parte opaca antes de usar las rejillas se limpian con acetona y se dejan secar.

5.4 TALLADO DE LA PIRAMIDE

Previo al seleccionamiento de las muestras al ultramicrotomo se llevan estas al proceso de tallado de la pirámide. Para tal efecto se rebaja la

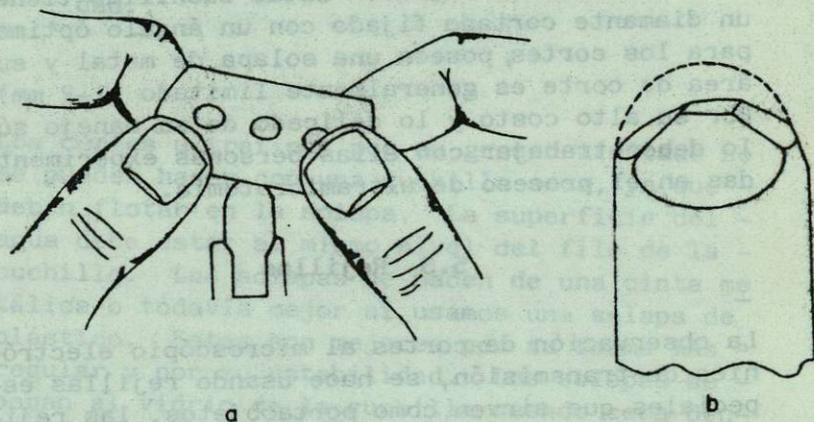


FIG. 10.

- a) rebajamiento del bloque con la navaja
b) pirámide formada por el rebajamiento

parte terminal del bloque formando una pirámide -- truncada con un ángulo aproximado de 90° . El bloque se fija con el sujetador del ultramicrotomo y se corta con una navaja dura o cuchilla de vidrio usada. Se forma una pirámide de 4 paredes iguales, los últimos cortes de ésta deben ser planos y hechos con una navaja limpia. Se corta la punta y se arregla la forma de la pirámide para obtener -- un área donde esta la muestra en forma de cuadrado o preferentemente de trapecio. La parte más -- larga de la pirámide será la primera que tocará -- el filo de la cuchilla y la parte opuesta debe -- ser paralela a ésta. La punta se corta de nuevo, en el microtomo, usando una cuchilla. Si es necesario se arregla la forma del área una vez más. Se elimina toda la resina alrededor de la muestra conservando la forma de trapecio. Con esto se tiene el bloque listo para hacer cortes semifinos.

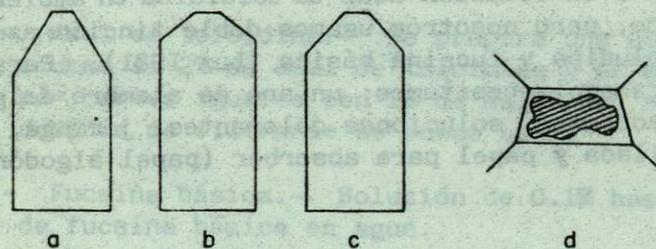


FIG. 11. Tipo de pirámide

- a) pirámide con ángulo muy agudo
b) pirámide con ángulo muy obtuso
c) forma de pirámide correcta
d) área superior de la pirámide preparada para hacer los cortes.