

5.5 CORTES SEMIFINOS

Los cortes semifinos que se observan en el estudio preliminar de microscopía óptica se hacen con el material incluido para microscopía electrónica, - estos cortes son más finos que los obtenidos por la técnica de inclusión en parafina y usados para estudios de anatomía y citología clásica, pero no son tan finos que los usados para microscopía --- electrónica. El término cortes semifinos se emplea dado el grosor de las secciones de aproximadamente $1\mu\text{m}$ o menos. En los inicios de la microscopía electrónica no fué fácil teñir los cortes - semifinos pues las resinas impedían la penetración de los colorantes en las estructuras incluidas en resinas.

Ahora existen varios procedimientos con resultados bastante buenos en material de origen animal y vegetal. En muchos laboratorios se usa frecuentemente la solución azul de toluidina en ambiente básico, pero nosotros usamos doble tinción: azul - de toluidina y fucsina básica (Lux 1981). Para este trabajo necesitamos: un aro de alambre delgado, portaobjetos, soluciones colorantes, jeringa, agua destilada y papel para absorber (papel algodón).

Preparaciones del Aro de Alambre

Si no se obtiene el aro comercialmente se puede preparar con alambre inoxidable, muy delgado, o bien utilizar el alambre ultrafino que se usa como filamento en focos. Por medio de unas pinzas finas se forma el aro de un diámetro aproximado a los 2 mm., el alambre se pega a un palo de madera o vidrio y se guarda después en un tubo o vial.

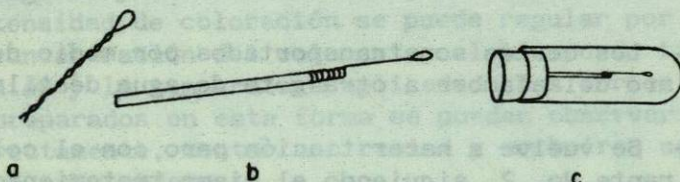


Fig. 12 Preparación del aro de alambre

- a) aro de alambre
- b) el alambre unido a un palillo
- c) el aro se protege en un tubo de vidrio con tapón.

Colorantes

- 1.- Azul de toluidina.- Se prepara una solución acuosa al 2% de azul de toluidina y se mezcla por partes iguales con 1% de Na_2CO_3 en agua, - después de filtrarse se puede usar.
- 2.- Fucsina básica.- Solución de 0.1% hasta 1% de fucsina básica en agua.

Preparación:

- 1.- Los cortes hechos con el ultramicrotomo con acercamiento manual y un grosor aproximado de $1\mu\text{m}$, se juntan en la solapa de la cuchilla.
- 2.- Se coloca una gota de agua sobre un portaobjetos. Los cortes elegidos se captan o recogen con el aro de alambre y se depositan sobre la gota de agua del portaobjetos.

- 3.- Se ponen unas gotas de colorante No. 1 a la gota de agua anterior y se calientan en una termoplaca aproximadamente a 60°C durante 3 minutos.
- 4.- Los cortes son transportados por medio del aro del alambre a otra gota de agua destilada.
- 5.- Se vuelve a hacer tinción pero con el colorante No. 2, siguiendo el mismo tratamiento que está el el punto 3.

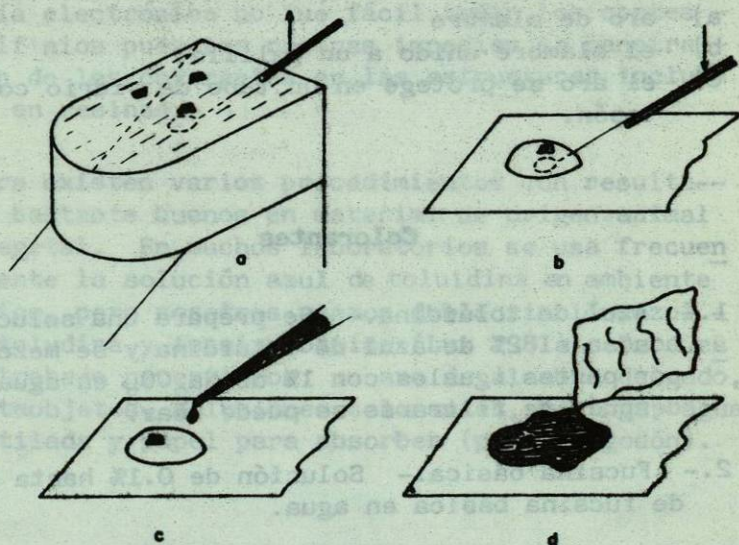


Fig. 13 Cortes semifinos.

- a) los cortes son colectados con el aro
- b) los cortes se depositan sobre una gota de agua en el portaobjetos.
- c) se agregan unas gotas de colorante
- d) el colorante se absorbe con papel filtro

- 6.- Se transportan los cortes a otra gota de agua destilada, el agua es absorbida con papel algodón y los cortes se dejan secar. La intensidad de coloración se puede regular por la concentración del colorante, el tiempo de tinción y la temperatura aplicada. Los cortes preparados en esta forma se pueden observar directamente, montar con resina y cubrirse con un cubreobjetos.

Con los cortes semifinos además de estudiar las estructuras biológicas se elige el área adecuada para realizar el corte fino y detectar posibles defectos de procesamiento. Los defectos más comunes son las burbujas de aire dentro de los tejidos, partes del tejido o células con deficiente penetración de los fijadores, o las resinas o mala polimerización. De vez en cuando se observan tejidos dañados por la preparación (células rotas). Los mejores cortes sirven para observación en microscopio óptico y fotodocumentación. Los cortes semifinos por su grosor limitado y la conservación excelente de las estructuras son muy buenos para las observaciones citológicas.

5.6 Cortes Finos

Para la observación en el microscopio electrónico de transmisión se usan solamente cortes de 100 nm o menos. Orientándose por los colores interferentes se puede saber el grosor de los cortes. Se pueden usar cortes de color gris, plata u oro.

- gris 60 nm o menos
- plata 60-90 nm
- oro 90-150 nm

Los cortes color rojo, azul y verde no son penetrables por los electrones. Cuanto mas pequeña sea el área de corte mejores serán los resultados.

Obtención de los Cortes Finos

1. Se fija bien la cuchilla en el sujetador del microtomo. La cuchilla de vidrio se acomoda con un ángulo de filo a 3° .
2. Se fija el bloque en el sujetador orientando el canto del área cortada para que sea paralela con el filo de la cuchilla.
3. En la solapa de la cuchilla se pone agua bidestilada con un filtro milipore y se observa el reflejo de la luz con el esteroscópico.
4. La parte buena del filo de la cuchilla se ubica frente al área a seccionar.

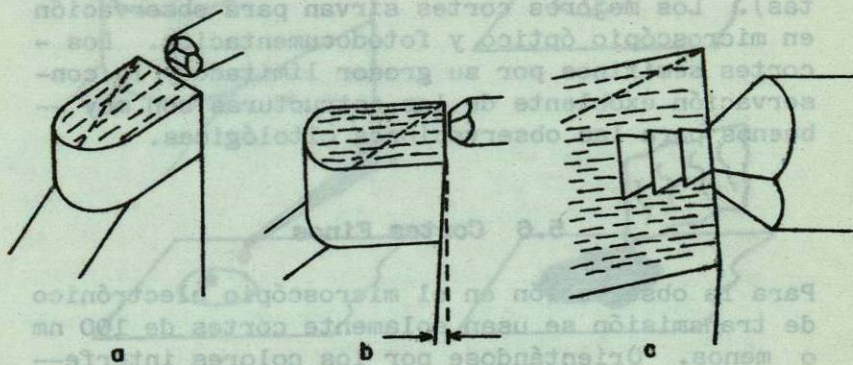


Fig. 14 Cortes finos.

- a) posición del bloque contra el filo de la cuchilla
- b) arreglo del ángulo de la cuchilla
- c) formación de una tira de cortes sobre el agua de la solapa.

5. Empezamos acercando la cuchilla contra el bloque, al principio con el tornillo macrométrico después con el micrométrico. Finalmente empezamos a hacer el movimiento del bloque.

El acercamiento es un proceso difícil en la obtención de cortes. El primer corte debe ser bastante delgado para que no dañe el filo de la cuchilla.

6. Para hacer los cortes se ajusta el selector del ultramicrotomo al grosor que se quieran estos y la velocidad de circulación del bloque. Para modificar el grosor y la velocidad se sigue el proceso continuamente en el esteroscópico. Si se tiene un ultramicrotomo con una rotación de bloque manual se trabaja lentamente, la velocidad del movimiento del bloque durante el seccionamiento es aproximadamente 5 mm/seg.

Continuamente se sigue el reflejo de la luz sobre la superficie del agua. Esto se consigue añadiendo o quitando agua a la solapa. Al movimiento del corte se modifica la velocidad; generalmente se requiere menor velocidad para los cortes duros que para los bloques blandos. El filo de la cuchilla de vidrio se pierde rápidamente dando como resultado cortes malos, por lo tanto no se recomienda hacer más de 20 a 30 secciones en la misma área de la cuchilla. Cuando se cambia el lugar de corte se tiene que empezar con el acercamiento de nuevo (Punto 5). Si ya se tienen bastantes cortes buenos acumulados en la solapa se interrumpe el trabajo.

7. Los cortes, preferiblemente una tira de cortes, se separan del filo de la cuchilla con movimientos cuidadosos de un pelo o pestaña

pegado a un palo, moviendo los cortes sin tocarlos, solamente la acción del pelo en el agua. Juntarlos en el centro de la solapa.

8. Cuando se tienen cortes con ondulaciones se pueden extender con la aplicación de vapores del cloroformo. Este proceso no se necesita ni se recomienda siempre, pero algunas veces nos puede ayudar. Los vapores se aplican por acercamiento de un aplicador cubierto con un pedazo de piel de ciervo, empapada con cloroformo. Este proceso se realiza con mucho cuidado por que los cortes se pueden extender demasiado y romperse.

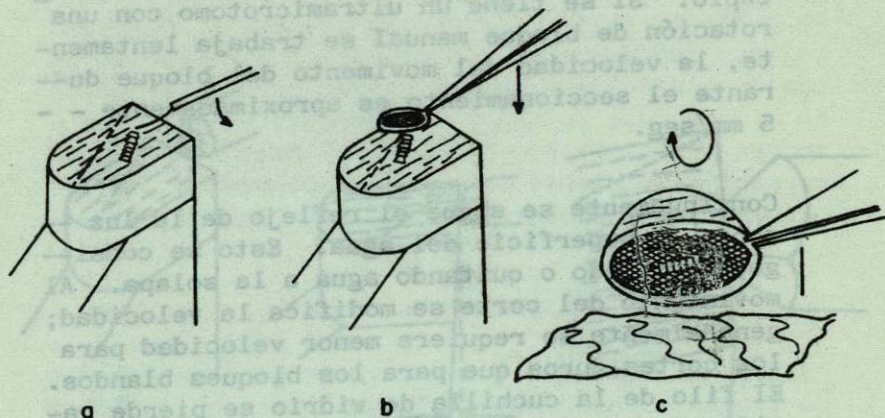


Fig. 15 Colecta de cortes.

- a) los cortes se juntan en el centro de la solapa, usando un pelo
 b) los cortes se toman con una rejilla
 c) se pone la rejilla con los cortes sobre el papel filtro.

9. Los cortes se capturan con una rejilla sostenida por una pinzas. Esta rejilla se coloca sobre los cortes. Teniendo cuidado de que el acercamiento sea lento y que la rejilla esté paralela al nivel del agua. Los cortes se pueden sujetar también desde abajo, después de sumergir la rejilla bajo el nivel del agua moviendola directamente bajo los cortes.
10. Se deposita la rejilla con los cortes sobre un papel filtro colocado en una caja petri, éstos deben estar en la parte superior de la rejilla, el papel absorbe el agua secando los cortes sin maltratarlos.

ALGUNOS DEFECTOS DE LOS CORTES

<u>Error</u>	<u>Causas posibles</u>	<u>Cómo se puede evitar</u>
Rayas verticales del corte al filo de la cuchilla.	Dientes de la cuchilla.	Cambiando la pieza de lugar en la cuchilla.
Rayas paralelas del corte al filo de la cuchilla.	Bloques muy duros. fijación insuficiente de la cuchilla o del bloque.	Disminuir la velocidad. Fijarlos bien.

Cortes con grosor diferente.	Vibraciones en el laboratorio.	Evitar fuentes de vibraciones.
	Cuchillas desfiladas.	Cambiar la cuchilla.
	Cuchilla y bloque que insuficientemente fijados.	Fijar bien.
	Cambio de temperatura en el laboratorio.	Estabilizar la temperatura.
	Bloques muy blandos.	Poner los bloques a 60°C durante 24 hs. o incluir de nuevo.
No se forma la tira.	Paredes irregulares de la pirámide.	Arreglar la pirámide.
	La pared de la pirámide no está paralela al filo de la cuchilla.	Arreglar la posición de la pirámide.
	Electricidad estática.	Tocar el bloque con papel filtro mojado para evitar esta electricidad.

Durante varios ciclos no se hacen cortes y -- después se hace un corte muy grueso.	El ángulo de la cuchilla es inadecuado.	Cambiar ángulo.
	Fijación insuficiente del bloque y de la cuchilla.	Fijar bien.
	Bloques muy blandos.	Poner los bloques a 60°C durante 24 hs. o reducir el área del corte.
	Cuchilla desfilada.	Cambiar la cuchilla.
Los cortes se descomponen en la superficie del agua.	Tejidos con mala penetración	Incluir de nuevo.
	Resina mal mezclada.	Incluir de nuevo.
	Bloques muy blandos.	Poner los bloques a 60°C durante 24 hs.
Se forman cortes sólo de resina y los objetos incluidos no son cortados.	Tejidos mal penetrados por la resina.	Incluir de nuevo.
	Objetos duros que no se pueden cortar con cuchilla de vidrio.	Usar cuchilla de diamante.

Los cortes se deslizan por fuera de la cuchilla, no se quedan dentro del agua.	Gota de agua - en el área cortada o en la pared recta de la cuchilla.	Secar con papel algodón el bloque y la cuchilla.
	Angulo de la cuchilla inadecuado.	Cambiar el ángulo de la cuchilla.
	Nivel del agua en la solapa muy alto.	Disminuir la cantidad de agua.
El grosor del corte es irregular (cortes con varios colores).	Fijación insuficiente de la cuchilla o el bloque.	Fijar bien.
	El ángulo de la pirámide es muy agudo.	Bajar el ángulo de la pirámide.
	Tejidos mal p _e netrados por la resina.	Incluir de nuevo.

6. Tinción

Una de las limitantes en la observación de las estructuras celulares al microscopio electrónico de transmisión es el bajo contraste de éstas, pues, aunque usémos fijadores que aumenten el contraste como tetraóxido de osmio este no es suficiente para distinguir bien las estructuras y

nos permitan una excelente micrografía por eso se aplican soluciones colorantes o contrastantes -- que por interacción con algunas estructuras permiten que estas tengan más absorbancia de electrones y puedan formar imágenes con diferentes electrodensidades. Por su similaridad con la tinción usada en la microscopía óptica se utiliza para este proceso también el término tinción, aunque en microscopía electrónica se utilizan sales de metales pesados, sobre todo de uranio y plomo y en microscopía óptica colorantes.

La tinción se puede hacer en varias formas. Tificando, la muestra completa o fragmento de tejido o más frecuentemente se aplican soluciones de tinción a los cortes. En este caso teñimos los cortes pegados a las rejillas, la tinción se hace con una gota de solución contrastante que se coloca sobre un soporte de cera o parafina. Arriba de esta gota se aplica la rejilla con el lado que tiene los cortes en contacto con la superficie de la gota y la rejilla se deja flotar durante el proceso de tinción. Toda la manipulación de las rejillas se hace con precaución trabajando con pinzas finas agudas. La tinción se hace en un ambiente cerrado dentro de una caja de petri.

La solución contrastante se elimina lavando bien con agua bidestilada filtrada. Esto es mejor -- con el flujo de la piceta o en un vaso de precipitado agitando la rejilla con cuidado. Al final, las rejillas con las secciones se dejan secar -- uniéndolas a papel filtro dentro de una caja de petri. Las secciones deben estar sobre la parte superior de la rejilla sin tocar el papel. El proceso de tinción es muy sensible a las condiciones ambientales y se trabaja siempre con soluciones recién preparadas o centrifugadas siguiendo el esquema con cuidado. Las fallas en la tinción pueden destruir todo el trabajo anterior -- por la formación de precipitados en los cortes.

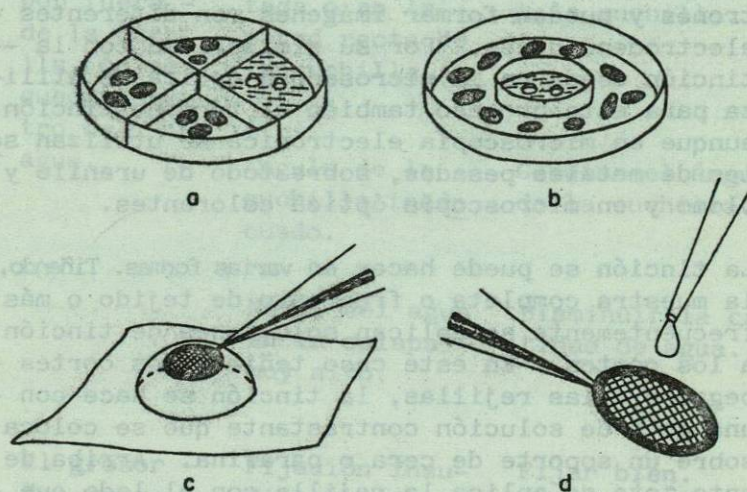


Fig. 16 Tinción.

- tinción en caja de petri dividida en cuatro partes: 3 con lentes de NaOH y una con gotas de la solución.
- tinción en caja petri chica dentro de otra más grande con lentes de NaOH
- tinción de la rejilla en la superficie de una gota de solución
- después de la tinción las rejillas se lavan con flujo de agua.

Proceso de doble tinción con acetato de uranilo y citrato de plomo. (Venable Coggeshall 1965).

1. Acetato de uranilo.

Para la tinción se utiliza una solución de acetato de uranilo al 2% en agua bidestilada. Antes de usarse se filtra con el filtro mili-

pore. Las gotas de la solución se ponen arriba de una placa de cera usada por los dentistas o una placa de parafilm cerrada en una caja de petri con ambiente húmedo; la humedad se puede aumentar con papel filtro mojado con agua destilada que se pone abajo de la placa de cera, todavía es mejor poner la cera con gotas de la solución en una caja más pequeña dentro de otra caja más grande, que tengo el papel filtro mojado. El tiempo de tinción es de 20 minutos o más.

2. Citrato de Plomo.

Se prepara la solución de citrato de plomo al 0.2% en agua bidestilada. 9 ml. de esta solución se mezclan con 1 ml. de NaOH 1N en agua, antes de preparar las soluciones se hierve el agua para que se desprendan impurezas gaseosas y se deja enfriar. La tinción se hace como en punto 1, solamente hay que eliminar del ambiente CO_2 , por eso se colocan en la caja de Petri, lentes de NaOH. También se puede poner un papel filtro humedecido con hidróxido de sodio. El tiempo de tinción es de 5 hasta 7 minutos.

El citrato de plomo se puede preparar según el método de Reynolds (1963) de nitrato de plomo y citrato sódico, la solución la preparamos con:

- nitrato de plomo	1.33 gr.
- citrato sódico	1.76 gr.
- agua destilada	30 ml.

Añadimos a esta solución 0.8 ml. de hidróxido sódico 1N y completamos con agua destilada a 50 ml.

102111630

7. Observación

La observación de los cortes en el microscopio electrónico la empezamos con aumentos bajos. Generalmente las conclusiones se hacen sobre fotografías, por lo tanto, se toman micrografías de las áreas interesantes para nuestro estudio, -- posteriormente los negativos se imprimen con -- una amplificación que facilite las fotografías definitivas empleando un papel fotográfico de -- alta calidad. Hay que utilizar papel fotográfico de alto contraste (F-5 duro) pues a los negativos generalmente les falta contraste. Para -- la impresión debemos destinar el tiempo y el -- cuidado necesario para conseguir un trabajo --- excelente.

IV. METODOS DE PREPARACION DE LAS MUESTRAS EN EL MICROSCOPIO ELECTRONICO DE BARRIDO

A pesar del poco tiempo que tiene de utilizarse -- el microscopio electrónico de barrido (MEB) mucho es lo que ha aportado como herramienta de investigación, siendo beneficiado gracias a los progresos realizados con anterioridad en la metodología aplicada a la microscopía óptica y a la microscopía electrónica de transmisión.

Sin embargo su utilización en biología no es muy generalizada, debido principalmente al alto costo -- del aparato, aunado a las dificultades para manejar tejidos blandos hidratados. Para superar este último inconveniente es indispensable la adquisición de equipo adicional que permita manejar la muestra adecuadamente y obtener una imagen útil, con una estrecha relación con la realidad.

Múltiples son los procedimientos que nos permiten conocer en una imagen tridimensional las estructuras de los seres vivos. En esta oportunidad mencionaremos los más comunes en la mayoría de los -- laboratorios de investigación.

MATERIAL FRESCO

La observación de material fresco al MEB es tan -- antigua como el aparato mismo ya que no se requiere de fijación. Los objetos duros como dientes, huesos, uñas, semillas, polen, etc., después de -- la limpieza necesaria pueden observarse sin mayores complicaciones algunas veces sin necesidad de recubrirlos.

También resiste las condiciones del MEB el material fresco de origen vegetal, previo recubrimiento y observación con voltaje de aceleración -- menor a los 15 KV y con tiempos cortos de exposición al impacto de los electrones.