

### 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.

### FIJADORES

Igual que para microscopía electrónica de transmisión existe una gran variedad de fijadores empleados en el tratamiento de las muestras destinadas al microscopio electrónico de barrido. Los más comunes son el glutaraldehído, el tetraóxido de osmio, una mezcla de glutaraldehído y una combinación de glutaraldehído-tetraóxido de osmio.

El fijador más empleado es el glutaraldehído en concentraciones del 1.5% a 6% , disuelto en el amortiguador de fosfato sódico ó cacodilato de sodio, 0.5 M a 1.0 M. (pH 7.2 a 7.4).

Es importante tomar en cuenta la naturaleza del espécimen a estudiar pues las células individuales como las sanguíneas, protozoarios, óvulos, espermatozoides, etc. son extremadamente sensibles a la osmolaridad del fijador, sufriendo deformaciones cuando están inmersas en soluciones hipotónicas o hipertónicas que se manifiestan al momento de la observación.

Para cada muestra biológica existe diferente tiempo de fijación: Normalmente se aplican tratamientos de 3 - 6 horas. Períodos largos de fijación en glutaraldehído eventualmente provocan endurecimiento de los tejidos que favorecen la observación al MEB, encontrándose como desventaja la posible extracción de proteínas.

Beneficioso es también el empleo de la fijación por tiempos prolongados, pues es garantía de la penetración del reactivo en el tejido, que es normalmente lenta, ya que en la microscopía electrónica de barrido generalmente se emplean muestras de considerable volumen. En estos casos es menester realizar dos cambios de la solución fijadora y mantener las muestras en refrigeración.

Cuando se hacen observaciones de material fresco al MEB, el agua contenida en los tejidos tiende a evaporarse produciendo gases contaminantes, congelamiento de la muestra o bien ruptura de su superficie por el daño de haz de electrones, provocando una imagen final con "ruidos" que imposibilitan una imagen clara del objeto. Esto se manifiesta con claridad al momento de la impresión de la micrografía. Cuando esto ocurre es preferible -- trabajar con el condensador abierto y un voltaje de aceleración de 10 kilovoltios o menos.

El estudio de materiales frescos, principalmente vegetales, es más factible en muestras recién disectadas y con buen recubrimiento, notándose una deshidratación en las estructuras a las 24 horas del montaje. Objetos duros como conchas, rocas, caracoles, etc. son de fácil observación después de un tratamiento de limpieza a base de cloralex diluido, auxiliándose con un pincel de pelo de camello.

### SECADO AL AIRE

Una de las críticas más frecuentes para los microscopistas está relacionada con la observación artefactual. Estas críticas van orientadas principalmente a señalar los errores que se presentan al dar por real la imagen de una estructura que ha sufrido cambios por efecto de las condiciones ambientales y/o cuando no se dá un tratamiento adecuado a las muestras. Esto es: Deficiencias en la fijación, la deshidratación, el recubrimiento etc. Pueden secarse al aire después de fijadas y deshidratadas, presentando una excelente imagen al MEB. Cuando se les aplica un buen recubrimiento de oro y un bajo voltaje al momento de la observación.

Cuando se requiere hacer una doble fijación se emplea glutaraldehído 2 - 3%, seguido de un lavado en el amortiguador donde se disolvió el reactivo y finalmente la postfijación con tetraóxido de osmio 1 ó 2%. Los tiempos son variables según el volumen y tipo de muestra a procesar.

### DESHIDRATACION

Posterior al método apropiado de fijación, las muestras se suelen deshidratar en etapas de distintas graduaciones con alcohol o acetona por ej. 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 85%, 95% durante 5 a 10 minutos cada una después con etanol absoluto o acetona durante 20 a 30 minutos con varios cambios. Los fragmentos grandes se deshidratan en un tubo de ensayo o vial y los organismos pequeños requieren de centrifugación durante el proceso para que no se pierdan o bien colocándolos en un portaobjetos.

Como mencionamos anteriormente a algunos organismos soportan el secado al aire sin sufrir deformaciones al final de la deshidratación o durante la observación. El procedimiento de secado más común y recomendado es el método del punto crítico, utilizando dióxido de carbono líquido o gas freon 13. Generalmente se lleva la muestra a este aparato después de alcohol absoluto o acetona. En algunos casos se lleva el tejido a acetato de isoamilo antes del secado por punto crítico.

### SECADO DE PUNTO CRITICO

Esta técnica introducida por Anderson en 1951, para microscopía electrónica de barrido, aprovecha el hecho de que en su punto crítico, un fluido pasa imperceptiblemente de líquido a

gas sin límites visibles y sin fuerzas de distorsión, es decir a ciertas temperatura y rangos de presión, un fluido se comporta como dos fases, discretas separadas (líquido y vapor están en equilibrio). Por eliminación de tensiones superficiales en punto crítico se evitan los cambios superficiales de las estructuras biológicas durante la desecación ofreciendo finalmente el microscopio electrónico de barrido una imagen real de las mismas.

Algunos autores mencionan procedimientos simples y prácticos para la técnica de desecación. Sin embargo dado lo delicado de los especímenes es preferible emplear el equipo especial recomendado para estos casos.

Existen varias marcas de estos aparatos. Generalmente se emplea más el gas carbónico con excelentes resultados y se prefiere por su fácil y barata adquisición. Los más modernos laboratorios poseen equipos de desecación a base de freon 13 considerándose el gas más adecuado para los especímenes más sensibles, sean estas embriones, hongos, etc.

### RECUBRIMIENTO DE LAS MUESTRAS

La emisión de electrones es una de las formas básicas del MEB para proporcionar una imagen tridimensional de las estructuras biológicas.

Como lo señalamos anteriormente un haz de electrones desprendidos del filamento del tubo chocan con el objeto a analizar excitando cierto número de electrones secundarios de tal forma que origina una señal.

Este fenómeno es posible gracias al recubrimiento que se le da a la muestra biológica aplicando una finísima capa de metal para prevenir ó reducir el efecto de carga eléctrica, que ocasiona el haz de electrones sobre esa muestra.

Este recubrimiento se hace al vacío con el recubridor de capa fina. Uno de los mayores factores que afectan la uniformidad de la capa fina es el tipo de material usado en el recubrimiento. Los metales más empleados son el oro, paladio, carbón o las combinaciones de ellos. El oro es de uso más generalizado debido a su fácil adquisición en forma pura o combinada, es fácilmente evaporado desde un filamento de tungsteno y tiene un alto coeficiente de emisión de electrones secundarios.

## V. OBSERVACION DE MITOSIS Y CROMOSOMAS

### I. INTRODUCCION

Los avances tecnológicos en las diversas ramas de la ciencia han permitido ir diferenciando los complicados problemas biológicos, facilitando en nuestros días una visión más precisa de la complejidad de los organismos y particularmente de la célula. Este es el caso de la citogenética, la cual se ha convertido en disciplina con un papel muy importante en el conocimiento biológico de los recursos vegetales desde el punto de vista taxonómico, de hibridación de cultivos de ingeniería genética o en la detección de los efectos de contaminación ambiental.

La citogenética requiere del conocimiento de la forma, número y asociación de los cromosomas, importantes por ser los responsables de los caracteres hereditarios en cada organismo, así como el proceso cariocinético. Durante tal proceso son elásticos y de consistencia gelatinosa pudiendo ser teñidos con facilidad por los colorantes básicos como resultado de contener una elevada proporción de DNA y proteínas.

Un método utilizado recientemente para observar cromosomas es el "Squash". Dicha técnica permite separar las células individualmente facilitando la observación de los cromosomas por su espaciamiento en el citoplasma durante la mitosis.

### 2. BREVE DESCRIPCION DE LA MITOSIS

La división celular es obviamente la primera etapa en el crecimiento y diferenciación. La formación de nuevos tejidos no puede producirse sin la división celular. Durante este proceso, se multiplicará tanto el núcleo como el citoplasma denominándose a este período de división nuclear con el término de mitosis, el cual compren