

MANUAL DE MICROSCOPIA ELECTRONICA, ULTRAESTRUCTURA Y CITOLOGIA VEGETAL

VOL. 1

Dr. Alexander Lux
de la
Universidad de Bratislava,
Checoslovaquia



UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO



1020111630



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

1500
S3HQ
-B.
82

MANUAL DE
MICROSCOPIA ELECTRONICA
ULTRAESTRUCTURA
Y CITOLOGIA VEGETAL

DR. ALEXANDER LUX
Universidad de Bratislava,
Checoslovaquia.

U A N L
VOL. I



UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO

m

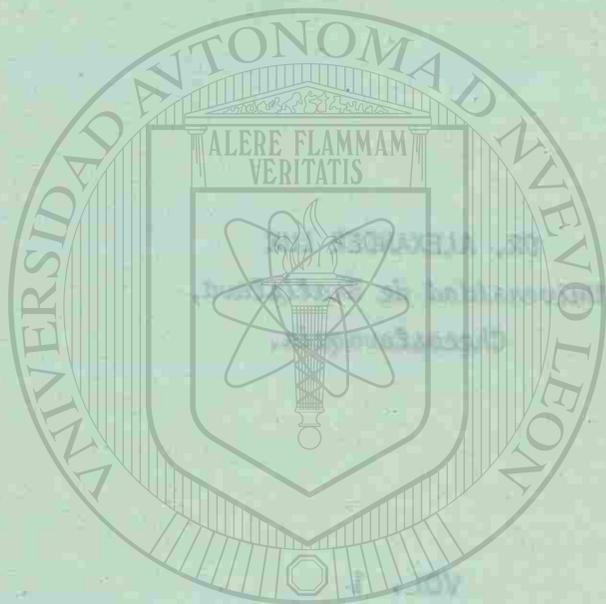
QH2L2

.E4

L8

977675

Electron Microscopy Technique
Y CITOLOGIA VEGETAL



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



FONDO UNIVERSITARIO

13-X-04 J.N.

INDICE

I. PROLOGO. 3

II. SINOPSIS HISTORICA (J. RUIZ ORDOÑEZ). . . 5

MICROSCOPIO ELECTRONICO DE TRANSMISION . 6

MICROSCOPIO ELECTRONICO DE BARRIDO. . . 8

III. PREPARACION DE MUESTRAS VEGETALES PARA OBSERVACION EN EL MICROSCOPIO ELECTRONICO DE TRANSMISION (A. LUX). 12

1. TOMA DE MUESTRAS. 15

2. FIJACION. 17

2.1. FIJADORES. 19

2.2. AMORTIGUADORES. 21

2.3. ESQUEMA DE FIJACION. 22

3. DESHIDRATAACION. 23

4. INFILTRACION CON MEDIOS DE INCLUSION. 25

4.1. ESQUEMA DE INCLUSION. 27

5. PREPARACION DE CORTES. 30

5.1. ULTRAMICROTOMOS. 30

5.2. CUCHILLAS. 32

5.3. REJILLAS. 35

5.4. TALLADO DE PIRAMIDE 36

5.5. CORTES SEMIFINOS. 38

5.6. CORTES FINOS. 38

6. TINCION. 48

7. OBSERVACION. 52

IV. METODOS DE PREPARACION DE LAS MUESTRAS EN EL MICROSCOPIO ELECTRONICO DE BARRIDO (J. RUIZ ORDOÑEZ). 53

V. OBSERVACION DE MITOSIS Y CROMOSOMAS.	59
(T.E. TORRES CEPEDA Y A. LEDEZMA M.)	
1. INTRODUCCION.	59
2. BREVE DESCRIPCION DE LA MITOSIS.	59
3. PREPARACION DE RAICES PARA OBSERVACION DE MITOSIS Y CROMOSOMAS.	64
VI. BIBLIOGRAFIA.	70

I. PROLOGO

Este manual fué preparado para un curso a nivel de postgrado. Tiene como fin acercar a los estudiantes a los modernos métodos de análisis estructurales de material biológico. La mayor parte del texto se dedica a la preparación de los tejidos vegetales para observación en el microscopio electrónico. Se explica el procesamiento de las muestras necesario para microscopía electrónica de transmisión que incluye fijación, deshidratación, inclusión y preparación de cortes ultrafinos. Otro tipo de microscopía electrónica es de barrido que sirve en biología generalmente para observar estructuras superficiales. En el texto se mencionan las técnicas más frecuentes para el tratamientos de las muestras antes de observarlas en el microscopio electrónico de barrido.

En el manual se incluyen también 2 técnicas importantes para observaciones (citológicas) en microscopio óptico. La primera se trata de cortes semifinos utilizando material procesado para observarlos en microscopía electrónica de transmisión. La segunda es una técnica con mucha importancia en citogenética y citotaxonomía, es la modificación del método de aplastamiento que sirve para la observación de mitosis y cromosomas.

Queremos aprovechar esta oportunidad para agradecer a todas las personas que nos ayudaron durante la preparación del texto sobre todo al Director de la Facultad de Ciencias Biológicas, UANL M. en C. Luis J. Galán Wong y al Jefe del Depto. de la División de Estudios de Postgrado Dr. Guillermo Compeán Jiménez por su entusiasta apoyo.

El capítulo destinado a la microscopía electrónica de barrido está fundamentado en parte en la revisión bibliográfica y sobre todo en la experiencia adquirida operando el equipo del labora-

V. OBSERVACION DE MITOSIS Y CROMOSOMAS.	59
(T.E. TORRES CEPEDA Y A. LEDEZMA M.)	
1. INTRODUCCION.	59
2. BREVE DESCRIPCION DE LA MITOSIS.	59
3. PREPARACION DE RAICES PARA OBSERVACION DE MITOSIS Y CROMOSOMAS.	64
VI. BIBLIOGRAFIA.	70

I. PROLOGO

Este manual fué preparado para un curso a nivel de postgrado. Tiene como fin acercar a los estudiantes a los modernos métodos de análisis estructurales de material biológico. La mayor parte del texto se dedica a la preparación de los tejidos vegetales para observación en el microscopio electrónico. Se explica el procesamiento de las muestras necesario para microscopía electrónica de transmisión que incluye fijación, deshidratación, inclusión y preparación de cortes ultrafinos. Otro tipo de microscopía electrónica es de barrido que sirve en biología generalmente para observar estructuras superficiales. En el texto se mencionan las técnicas más frecuentes para el tratamientos de las muestras antes de observarlas en el microscopio electrónico de barrido.

En el manual se incluyen también 2 técnicas importantes para observaciones (citológicas) en microscopio óptico. La primera se trata de cortes semifinos utilizando material procesado para observarlos en microscopía electrónica de transmisión. La segunda es una técnica con mucha importancia en citogenética y citotaxonomía, es la modificación del método de aplastamiento que sirve para la observación de mitosis y cromosomas.

Queremos aprovechar esta oportunidad para agradecer a todas las personas que nos ayudaron durante la preparación del texto sobre todo al Director de la Facultad de Ciencias Biológicas, UANL M. en C. Luis J. Galán Wong y al Jefe del Depto. de la División de Estudios de Postgrado Dr. Guillermo Compeán Jiménez por su entusiasta apoyo.

El capítulo destinado a la microscopía electrónica de barrido está fundamentado en parte en la revisión bibliográfica y sobre todo en la experiencia adquirida operando el equipo del labora-

torio de cerámica y materiales de Vitro Tec.

Nuestros agradecimientos para los Ings. Benito Becerril y Sacarías Pinal y al Dr. Abraham Velasco por su valiosa asesoría y especialmente al Lic. Jorge Loredó Murphy, Gerente de Cerámica y Materiales de Vitro Tec por las facilidades proporcionadas.

También queremos agradecer la valiosa colaboración del Sr. Pedro Rocha Ramírez por su trabajo en las ilustraciones y a la Srita. Ma. Magdalena Camarena Benavides por su eficiente contribución en la mecanografía de este texto.

II. SIPNOSIS HISTORICA

La microscopía es la ciencia que se ocupa de la observación, examen y estudio de objetos muy pequeños con la ayuda del microscopio. Nace para nosotros el 9 de Octubre de 1676, fecha en la que un comerciante holandés de la localidad de Delft, envía la primera comunicación científica de que se tenga memoria, donde da a conocer a la Royal Society de Londres, Inglaterra, sus observaciones de "animalículos" obtenidos de agua de charcas y de su propia boca, Anton Van Leeuwenhoeck fué el nombre de este holandés que consideramos el padre de la microscopía.

Posteriormente, con la participación de personas con mayor conocimiento científico y tecnológico aparecieron aparatos más avanzados; el alemán -- Ernst Abbe, que trabajaba a la sazón asociado -- con Carl Zeiss demostró matemáticamente que el perfeccionamiento del microscopio óptico (Fótico o de luz) no podría continuar en forma indefinida y que el poder máximo de resolución susceptible de alcanzar era aproximadamente de la mitad de la longitud de onda de la luz empleada ----- (5,000 Å). Este valor corresponde aproximadamente a los 250 nm (0.25 µm) por lo que una observación en uno de estos aparatos el ojo humano difícilmente recibe informaciones mayores a los -- 1,500 aumentos, independientemente de la calidad del instrumento.

Con el descubrimiento del electrón a finales del siglo XIX, por el inglés J.J. Thomson, se abrió un capítulo importante en la historia de la microscopía. Este científico demostró que los rayos emitidos por el cátodo de electrodos están formados de partículas cargadas negativamente. Estas partículas sirvieron a Louis de Broglie para presentar su tesis doctoral en 1924, demostrando que en la materia los electrones, al igual que los fotones en la luz, presentan propiedades

torio de cerámica y materiales de Vitro Tec.

Nuestros agradecimientos para los Ings. Benito Becerril y Sacarías Pinal y al Dr. Abraham Velasco por su valiosa asesoría y especialmente al Lic. Jorge Loredó Murphy, Gerente de Cerámica y Materiales de Vitro Tec por las facilidades proporcionadas.

También queremos agradecer la valiosa colaboración del Sr. Pedro Rocha Ramírez por su trabajo en las ilustraciones y a la Srita. Ma. Magdalena Camarena Benavides por su eficiente contribución en la mecanografía de este texto.

II. SIPNOSIS HISTORICA

La microscopía es la ciencia que se ocupa de la observación, examen y estudio de objetos muy pequeños con la ayuda del microscopio. Nace para nosotros el 9 de Octubre de 1676, fecha en la que un comerciante holandés de la localidad de Delft, envía la primera comunicación científica de que se tenga memoria, donde da a conocer a la Royal Society de Londres, Inglaterra, sus observaciones de "animalículos" obtenidos de agua de charcas y de su propia boca, Anton Van Leeuwenhoek fué el nombre de este holandés que consideramos el padre de la microscopía.

Posteriormente, con la participación de personas con mayor conocimiento científico y tecnológico aparecieron aparatos más avanzados; el alemán -- Ernst Abbe, que trabajaba a la sazón asociado -- con Carl Zeiss demostró matemáticamente que el perfeccionamiento del microscopio óptico (Fótico o de luz) no podría continuar en forma indefinida y que el poder máximo de resolución susceptible de alcanzar era aproximadamente de la mitad de la longitud de onda de la luz empleada ----- (5,000 Å). Este valor corresponde aproximadamente a los 250 nm (0.25 µm) por lo que una observación en uno de estos aparatos el ojo humano difícilmente recibe informaciones mayores a los -- 1,500 aumentos, independientemente de la calidad del instrumento.

Con el descubrimiento del electrón a finales del siglo XIX, por el inglés J.J. Thomson, se abrió un capítulo importante en la historia de la microscopía. Este científico demostró que los rayos emitidos por el cátodo de electrodos están formados de partículas cargadas negativamente. Estas partículas sirvieron a Louis de Broglie para presentar su tesis doctoral en 1924, demostrando que en la materia los electrones, al igual que los fotones en la luz, presentan propiedades

de onda y de partícula.

Dos años más tarde, en 1926, Bush mostró que las radiaciones eléctricas podían ser enfocadas por medio de campos magnéticos con simetría axial y que estos funcionaban como lentes. En 1927 Gabor construye la primera lente electrónica consistente en un selenoide de hierro dulce. Con estos conocimientos en el año de 1931, dos científicos alemanes, E. Ruska y M. Knoll lograron construir el primer microscopio electrónico, muy rudimentario, pues su poder de resolución era menor al del microscopio óptico de aquella época. En 1934, E. Briest y H.O. Muller modifican el microscopio de Ruska y logran sobrepasar el poder de resolución del microscopio fotónico.

Microscopio Electrónico de Transmisión

Era tan limitada la amplificación y tan pobre el poder de resolución de los primeros microscopios electrónicos, que poca o nula importancia se le dio en el campo de la investigación. Fué Krauze, en 1936, quien aplicó las técnicas básicas de preparación de diferentes materiales que fueron motivo de las primeras observaciones al microscopio electrónico. Este microscopio ha sido llamado de transmisión, ya que el haz de electrones atraviesa una fina membrana o preparación para proyectar la imagen sobre una pantalla fluorescente colocada al final de la trayectoria de este flujo de electrones que requiere de un espacio con vacío para desplazarse a través del sistema de lentes electromagnéticas.

La emisión del haz tiene su origen en un filamento de tungsteno en forma de horquilla que se encuentra rodeado por una pantalla cilíndrica o cilindro de Whentel que está polarizada negativamente con respecto al filamento. Como consecuencia de esta polarización negativa, el campo alrededor

de la apertura circular actúa como una lente electrostática que produce una imagen de pequeño diámetro en un punto situado debajo de la pantalla cilíndrica antes mencionada. A esta imagen se le conoce como entrecruzamiento.

El filamento de tungsteno o cátodo, generalmente posee una tensión de 50,000 a 60,000 voltios. Gracias al alto voltaje y al vacío en que se conducen los electrones emitidos la longitud de onda del rayo electrónico es tan corta como 0.05 nm, permitiendo un poder de resolución cercano a 1.0 nm. El cañón electrónico es el sistema óptico, consta generalmente de una lente condensadora, una lente del objetivo, una lente intermedia y una lente proyectiva.

Cada una de las lentes, menos la proyectiva, posee un diafragma que en la primera instancia sirve para evitar la dispersión de los haces luminosos cuando se desplaza en el vacío. Siendo necesario para este propósito que exista un perfecto centrado del sistema óptico que garantice que el haz de electrones lo atraviere en sentido axial. Así mismo este dispositivo sirve para ajustar la luminosidad que se requiere para suministrar determinada carga a los especímenes estudiados. La luminosidad depende directamente del diámetro del diafragma y la localización de éste dentro de la columna. Las observaciones se realizan sobre la pantalla fluorescente colocada en la parte inferior de la columna, la cual se encuentra recubierta con un material que nos permite la visión del objeto a analizar tal como si fuera una sombra reflejada sobre una superficie. Inmediatamente abajo de esta pantalla se encuentra una placa fotográfica donde se registra la imagen para su posterior revelado, impresión e interpretación. En la práctica la obtención de excelentes fotografías es de gran valor para el investigador. La calidad de estas fotografías dependerá del estado que guarda

el sistema óptico formador de la imagen, de la naturaleza de la muestra y del cuidado con que se realiza el procesamiento de la misma antes de fotografiarla.

A la fecha, múltiples y variados son los procedimientos desarrollados por los científicos para hacer posible la observación de material biológico al microscopio electrónico de transmisión. Así se proporcionan imágenes bidimensionales de tejidos vegetales o animales mediante la técnica de cortes ultrafinos, o bien de virus, bacterias o bacteriófagos, aplicando la técnica del sombreado metálico o la tinción negativa, logrando de esta manera aumentar la calidad de la visión gracias a su capacidad de amplificación y a su poder de resolución.

MICROSCOPIO ELECTRONICO DE BARRIDO

Mediante el empleo de cortes ultrafinos el microscopio electrónico de transmisión ha proporcionado a los investigadores una imagen bidimensional del interior de las células, tejidos y órganos. Con la aplicación de técnicas como la replicación, el recubrimiento metálico y/o la tinción negativa, es posible observar objetos de considerable volumen con la consiguiente pérdida de amplificación y resolución, agregándole los riesgos de contaminación para el sistema óptico. En la actualidad, estas limitaciones han quedado resueltas con el empleo del microscopio electrónico de barrido (MEB), el cual a pesar de su corta existencia ha demostrado sus beneficios gracias a su capacidad de resolución y a la profundidad de foco que proporciona al observador.

Los aspectos teóricos del MEB datan de 1930 y los primeros prototipos aparecieron en 1940 a 1950;

sin embargo, el primer MEB se ofreció a la venta en 1965. Los primeros aparatos carecían de profundidad de foco, el microscopio de luz y un poder de resolución cercano a los 25 nm. Afortunadamente en los últimos 20 años el avance tecnológico ha permitido que la resolución de un MEB alcance rangos de 5-7 nm y las amplificaciones rebasen los 100,000 aumentos, además, la emisión de otras radiaciones, como los rayos X, permiten extender su empleo para reconocer la composición elemental de una muestra y la distribución de los elementos dentro de la misma.

En primera instancia el MEB funciona como un circuito cerrado de televisión, donde un rayo electrónico generado por un filamento de tungsteno situado en la parte superior de la columna es excitado al momento de la observación por una corriente de alto voltaje. La columna se mantiene bajo un vacío aproximado de 10^{-5} Torr permitiendo que el haz de electrones se desplace libremente a través de una serie de lentes electromagnéticas, reduciendo progresivamente el diámetro del haz incidente hasta un diámetro de 5.0 nm o menos. Este haz de electrones impacta sobre la superficie de la muestra con un patrón de rastreo en líneas paralelas íntimamente espaciadas causando una excitación de electrones secundarios sobre la muestra. El número de electrones secundarios emitidos depende de la topografía de la superficie de la muestra, de su composición y de los cuidados observados durante el procesamiento. Generalmente, para muestras biológicas es obligado aplicar un recubrimiento metálico, sobre todo a aquellos especímenes que no son buenos conductores o emiten pocos electrones secundarios. Estos electrones secundarios pasan al colector que los acelera y hace que choquen con el escintilador. Aquí se producen fotones que entran y atraviesan un multiplicador lo cual sirve para producir gran número de electrones adicionales. Del fotomultiplicador pa

COMPARACION DEL MICROSCOPIO FOTICO (MF), MICROSCOPIO ELECTRONICO DE BARRIDO (MEB)
Y MICROSCOPIO ELECTRONICO DE TRANSMISION (MET)

ELEMENTOS	M.F.	M.E.T.	M.E.B.
ILUMINACION	RAYOS DE LUZ VISIBLE = 390-780 nm	RAYO ELECTRONICO = 0.005 nm	RAYO ELECTRONICO = 0.008 nm
MEDIO DE DESPLAZA- MIENTO	ATMOSFERA	VACIO	VACIO
RANGO DE AMPLIFI- CACION	DE 10x a 2,000x	DE 200x a 200,000x	DE 20x a 100,000x
LENTE	OPTICOS	ELECTROMAGNETICOS	ELECTROMAGNETICOS
RESOLUCION	REGION VISIBLE 250 nm REGION ULTRAVIOLETA 10-390 nm	0.2 a 1.0 nm	5 a 10 nm
ENFOQUE	MECANICO	ELECTRICO	ELECTRICO
IMAGENES OBTENIDAS	REFLEJADAS Y TRANSMI- TIDAS	TRANSMITIDAS	ELECTROSECUNDARIAS ELECTRODISPERSADAS
MONITOR	OBSERVACION DIRECTA	PANTALLA FLUORESCENTE	TUBO DE RAYOS CATO- DICOS (TRC)

sa cierto número de electrones a los rayos catódicos de imagen y registro (TRC), donde se hace la observación.

La forma de funcionamiento de emisión antes descrita es la más importante y más ampliamente utilizada para estudiar en tercera dimensión las muestras biológicas. Cuando se requieren análisis cuantitativos de los especímenes se puede aplicar otro tipo de radiaciones, como los rayos X, que se realiza añadiéndole espectrómetros de difracción de cristal, los espectrómetros dispersores de energía son útiles para análisis cualitativos y a veces también para cuantitativos.

Otras formas de funcionamiento del MEB es por reflexión, por luminiscencia, por conducción y por absorción.

III. Preparación de Muestras Vegetales para observación en el Microscopio Electrónico de Transmisión

Normalmente previo al estudio de tejidos de vegetales al microscopio electrónico se realiza una observación al microscopio óptico. Una vez conocidas las estructuras a este nivel y agotadas las posibilidades de análisis se inicia un nuevo mundo para el investigador: La Microscopía Electrónica.

No obstante los beneficios que ha aportado en estos años la microscopía electrónica tiene varias limitantes para observar el material biológico. Estas tienen que ver con las características del equipo pues las muestras soportan ciertas condiciones adversas durante la observación; ésto significa resistir a la deshidratación, el vacío y el impacto del flujo de electrones sobre el tejido. Otra limitante es la capacidad de penetración de los electrones en las estructuras estudiadas. Al ser muy escasa se requieren tres tipos de preparaciones especiales para observar el material biológico: Las suspensiones, las réplicas y los cortes.

A.- Las suspensiones fueron utilizadas en botánica sobre todo al inicio de microscopía electrónica y sirve para observar formas y estructuras superficiales de algunos organismos unicelulares y otras estructuras pequeñas como granulos de polen. Estos procedimientos tienen su importancia aún para la observación de bacterias y virus. Su preparación es simple, se aplica una gota de suspensión a la membrana de soporte que se encuentra sobre la rejilla microscópica, se deja secar y después de la aplicación de la película de carbón en un equipo especial, los preparados se pueden observar.

Gracias al advenimiento del MEB, este tipo de preparaciones no tiene hoy su papel de antaño para los estudios de estructuras vegetales.

B.- Las réplicas se utilizaron mucho para observar estructuras superficiales de muestras impenetrables para los electrones. Las réplicas con películas finas se hicieron por aplicación de soluciones de materiales plásticos (sobre todo Formvar) a la superficie de las muestras. Para la observación se utilizan después sólo estas películas y la muestra se quita en muestras biológicas. Este método de preparación fué eliminado con la introducción del microscopio electrónico de barrido. Las réplicas se hacen todavía de las muestras después de la aplicación del método especial crio-grabado o crio-fractura (freeze-etching, freeze-fracturing).

C.- Los cortes, tienen hoy el papel principal para estudios ultraestructurales de material vegetal. Los cortes deben ser bastantes finos (menos de 100 nm) para dejar penetrar los electrones. Para hacer estos cortes tenemos que preparar el material: fijar, deshidratar e incluir. Este procesamiento es diferente de la preparación para observaciones anatómicas e histológicas clásicas que se usan para microscopía óptica. Las diferencias resultan de la necesidad de conservar las estructuras mucho mejor o incluir muestras en material que facilite hacer los cortes suficientemente delgados. La última restricción para las observaciones en el microscopio electrónico de transmisión, resulta del contraste que debe tener el material analizado para distinguir estas estructuras.

Aproximadamente 45 años nos separan de la puesta en el mercado de los primeros microscopios electrónicos de transmisión. Durante ese tiempo, nu

merosas metodologías se han probado para estudiar las estructuras celulares con el fin de formarse una idea más cercana a la realidad, el evitar la frecuencia de artefactos en una muestra biológica fué uno de los mayores retos que enfrentaron los microscopistas. Gracias a la valiosa participación de los pioneros de la microscopía electrónica quienes nos han legado un cúmulo de conocimientos es factible, mediante un procesamiento adecuado y cuidadoso de las muestras, tener una visión clara y concisa de los organismos tal como están en la naturaleza.

En este manual no queremos dar un informe detallado de las múltiples metodologías empleadas en la microscopía electrónica ya que éstas pueden ser localizadas en otras publicaciones. Solamente queremos mencionar los procesos aplicados más frecuentemente en los laboratorios de microscopía electrónica, para estudiar mediante la preparación de cortes las células vegetales, explicar todos los pasos y poner atención a futuras dificultades y errores.

Todo procesamiento sigue este esquema:

- 1.- Tomar muestras
- 2.- Fijar
- 3.- Deshidratar
- 4.- Infiltrar con medio de solución e incluir
- 5.- Hacer cortes
- 6.- Teñir
- 7.- Observar en microscopio
- 8.- Tomar fotos e imprimir
- 9.- Interpretar resultados

1. Toma de muestras

Esta etapa del trabajo no es tan fácil como parece. Los resultados dependen mucho de la forma como se toman las muestras, al principio tenemos que saber que la penetración de los fijadores usados tanto como las resinas para la inclusión es muy limitada con el material vegetal. Esto resulta de células con paredes gruesas y del contenido de material de reserva como el almidón que son casi impenetrables. Cada tejido que se usará es diferente y se necesitan variaciones en el tratamiento. En la primera etapa del trabajo con un material desconocido podemos escoger el procesamiento según el tipo de tejido. Entre más densas sean las células y tengan paredes más gruesas, el volumen de la muestra se reducirá; las células parenquimáticas con paredes delgadas y alto contenido de agua, no causan tantos problemas para la penetración de soluciones como las células esclerenquimáticas, las células meristemáticas, las células llenas de citoplasma y vacuolas o como en las células de tejidos de reserva con bajo contenido de agua.

El volumen de las muestras debe ser aproximadamente de 1 mm^3 . La penetración la podemos facilitar si usamos cortes de material con uno de los lados que tenga menos de 1 mm. Si cortamos algunos tejidos u órganos, aunque pequeños, podremos eliminar por lo menos de un lado tejidos superficiales protectores de órganos vegetales que dificultan la penetración de los reactivos.

Para elegir adecuadamente las muestras al procesar, debemos conocer la estructura anatómica de los órganos que vamos a estudiar y saber en que dirección los queremos cortar, longitudinalmente o transversalmente. Normalmente se usan navajas nuevas lavadas con alcohol. Se debe cortar material fresco para fijar. Nunca se transporta y guarda el material sin previa fijación. Tomemos

en cuenta que se trabaja a nivel ultraestructural y toda manipulación errónea del material se expresa en las estructuras observadas. El material empleado para las observaciones anatómicas al microscopio óptico generalmente no se puede utilizar para el microscopio electrónico. Cuando se obtiene material vegetal de su habitat natural --directamente en el campo-- se toman las muestras y se colocan inmediatamente al fijador, anotando todas las condiciones imperantes en ese lugar, --así como las formas de corte. El manejo de las muestras se hace con cuidado, usando una aguja --inoxidable y sin presionar las muestras.

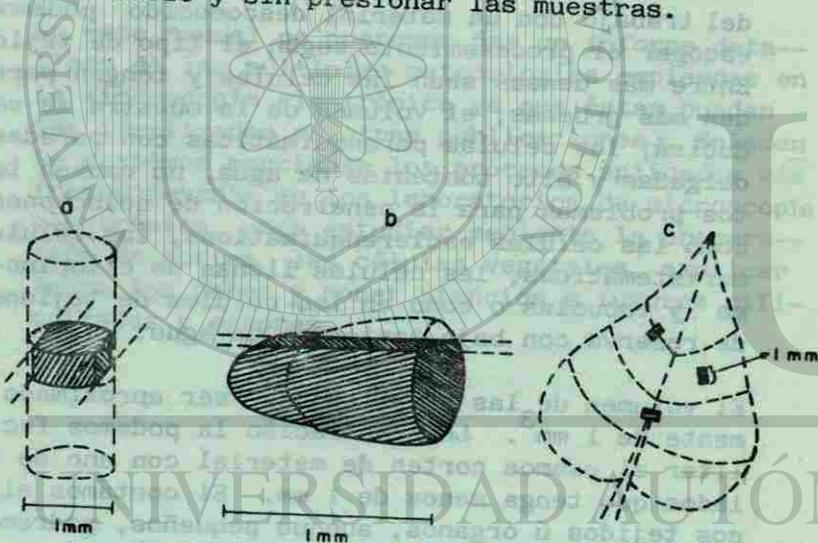


FIG. 1. Forma como se toman las muestras para facilitar la penetración de soluciones.
a) de órganos cilíndricos
b) de estructuras apicales
c) de hojas

2. Fijación

La fijación sirve para dar muerte a las células -- con un cambio mínimo de las estructuras y estabiliza los componentes químicos para que no se pierdan durante el tratamiento. Sabemos que la penetración de los fijadores a los tejidos vegetales es muy lenta y frecuentemente las células superficiales tienen una fijación muy diferente a las células localizadas más al interior de la muestra.

Los fijadores usados para microscopía electrónica de transmisión tienden a conservar las estructuras celulares sin coagular las proteínas; además, estos fijadores aumentan el contraste de las estructuras por la adición de las moléculas impermeables a los electrones. Por el contrario cuando se emplean los fijadores más comunes en microscopía óptica, como el alcohol o el ácido acético (solos o combinados), se provocan daños irreversibles para los tejidos haciendo que estos queden inservibles para estudios ultraestructurales.

Los fijadores más empleados en microscopía electrónica son dos: El glutaraldehído y el tetróxido de osmio, la fijación se hace en cierto pH, osmolaridad y temperatura. Estas condiciones junto con el tiempo de fijación y concentración del fijador influyen mucho en los resultados. Para estabilizar el pH se usan varias soluciones amortiguadoras, la más común es el fosfato. Para aumentar la osmolaridad de la solución del fijador se usa algunas veces sacarosa. La temperatura durante la fijación, varía según el autor, al principio se usaban mucho las temperaturas bajas (4°C). Esta temperatura, sin embargo, disminuye la velocidad de penetración de los fijadores dentro de los tejidos, además ciertas estructuras como los microtúbulos no se pueden observar después de una fijación a temperaturas bajas. Por esta ra-

zón la mayoría de los autores recomiendan usar - temperaturas de laboratorio (20°C) para este propósito.

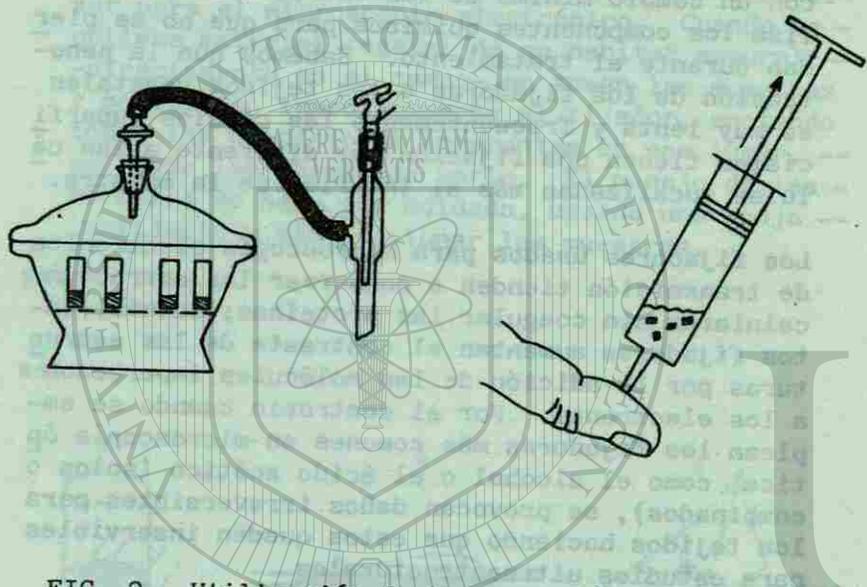


FIG. 2. Utilización de baja presión durante la fijación con una trampa de vacío y del vacío hecho con una jeringa.

La fijación la hacemos en viales pequeños. Estos son tubos de aproximadamente 1 cm de diámetro y 5 cm de longitud que debemos marcar por fuera, sin agregar papel con el número de la muestra dentro del fijador debe ser como mínimo 20 veces más que el de las muestras. Generalmente, un mililitro de fijador es suficiente para cada una de ellas. Para facilitar la penetración del reactivo se recomienda agitar las muestras durante la fijación, usando una agitadora o un aparato similar. Otro proceso que se usa con éxito en nuestro Laboratorio es la utilización de baja

presión (vacío) hecho con una trampa de vacío. - No es necesario el vacío durante todo el tiempo de fijación, ya que parece que los cambios de presión atmosférica facilitan más la penetración. El alto vacío con bomba rotatoria no es recomendable porque puede destruir las estructuras celulares finas. Cuando deseemos disminuir la presión atmosférica de las muestras colectadas en el campo y facilitar la penetración de los fijadores podemos hacer el vacío con una jeringa.

2.1. Fijadores:

- Glutaraldehído

El glutaraldehído es un dialdehído y para microscopía electrónica se necesita un reactivo limpio y nuevo. Se obtiene comercialmente en concentraciones de 25%, 50% y 70%, especialmente preparado para su uso en microscopía electrónica. Las soluciones se guardan en el refrigerador a 4°C. Para la fijación se prepara solución de 3% o 5% con amortiguador. El glutaraldehído fija muy bien la matriz de los organelos y el citoplasma, conservando bien ribosomas, microtubulos, etc. - su desventaja es un bajo contraste de las estructuras, sobre todo membranas, por eso se usa principalmente en combinación con otros fijadores. El tiempo de fijación es de 3 hasta 5 horas.

- Tetraóxido de osmio

Este excelente fijador para microscopía electrónica se consigue en forma de cristales amarillos protegidos en tubos de vidrio o también en solución acuosa al 4%, bajo nitrógeno contenido en la misma ampolleta. Para la fijación se emplean soluciones al 1% o al 2%. Disolver los cristales de tetraóxido de osmio en el agua destilada tar-

da mucho tiempo recomendándose preparar la solución con un día de anticipación a su empleo. Para guardar esta solución se deben usar recipientes de vidrio color ambar que hayan sido lavados perfectamente con mezcla crómica (ac. sulfúrico y ac. crómico). Las ampolletas que contienen el tetraóxido de osmio se lavan también perfectamente en mezcla crómica y se enjuagan en agua destilada antes de romperse. Utilizando un lápiz diamante o una lima se rayan las paredes de la ampolla y se deposita ésta en el recipiente de color ambar. Una vez dentro se rompe la ampolla con un agitador o se provoca el choque de la ampolla contra las paredes del recipiente.

El tetraóxido de osmio es peligroso y tóxico, ataca la mucosa nasal, bucal, etc. siendo obligado trabajar con extractor o al aire libre. Si queremos guardar el resto de la solución que no utilizamos inmediatamente, es mejor preparar soluciones al 4% y guardar esta en tubos preferentemente bajo solución de 1% o 2% para uso inmediato; el OsO_4 además de conservar bien todas las estructuras celulares aumenta el contraste de ellas y estabiliza los aceites. El tiempo de fijación recomendado es de 1 a 2 horas en refrigeración o a temperatura de laboratorio.

- Permanganato de Potasio (KMnO_4)

Este reactivo se usó mucho al principio de la microscopía electrónica. Su empleo en estos años es muy limitado. Se utiliza aún para la demostración de las membranas. Con KMnO_4 no se conserva la matriz de los organelos, ni el contenido del núcleo y se pierden los ribosomas. Las gotas de aceite cambian su estructura y forman artefactos y las vacuolas se modifican. Se puede utilizar para la demostración de estructuras membranosas de las células vegetales como el retículo endoplásmico y el aparato de Golgi.

- Formaldehído

La fijación con formaldehído es similar a la fijación con glutaraldehído, aunque generalmente no se obtienen resultados tan buenos. El formaldehído comercial no es lo bastante limpio para su uso en microscopía electrónica, empleándose una solución acuosa alcalinizada con polvo paraformaldehído a una temperatura de 60°C .

2.2 Amortiguadores

Para estabilizar el pH de las soluciones empleadas para preparar los fijadores en microscopía electrónica se usan soluciones amortiguadoras. El amortiguador más frecuentemente usado con tejidos vegetales es el de fosfatos, también se utilizan otros tipos como el amortiguador de veronalacetato y de cacodilato sódico.

Amortiguador de fosfatos (0.2M)

Solución A: fosfato sódico monobásico

$(\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O})$	31.2 gr.
$(\text{NaH}_2\text{PO}_4)$	27.8 gr.
agua	1000 ml.

Solución B
fosfato sódico dibásico

$(\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O})$	71.7 gr.
$(\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O})$	53.6 gr.
agua	1000 ml.

Amortiguador de pH 7.2

se prepara mezclando 28 ml. de solución A con 72 ml. de solución B.

Amortiguador de veronalacetato (0.28M)
Solución A

veronal sódico (Barbitol 2.89 gr.)

acetato sódico hidratado 1.90 gr.

acetato sódico anhidro 1.15 gr.

agua destilada 100 ml.

Solución B (0.1N HCl)

ácido clorhídrico concentrado (36-38%) 8.6 ml.

agua destilada ----- 1000 ml.

Se mezclan 2 volúmenes de solución A con 2 volúmenes de solución B y un volumen de agua, el pH se ajusta agregando ácido clorhídrico 0.1N.

Amortiguador de cacodilato (0.2M)

Solución A

cacodilato sódico ----- 42.8 gr.

agua destilada ----- 1000 ml.

Solución B

HCl concentrado (36%-38%) ----- 10 ml.

agua destilada ----- 603 ml.

amortiguador de pH 7.2

Se prepara mezclando 50 ml. de solución A con 4.2 ml. de la solución B, (se afora con agua a 200 ml.)

2.3 Esquema de fijación.

1.- Fijación con glutaraldehído diluido del 3% - al 5% en amortiguador de fosfatos de 0.1 M, pH 7.2 a temperatura de laboratorio (20°C) de 3 a 5 horas.

2.- Lavar con el amortiguador de fosfatos. Cambiar la solución 10 veces con un tiempo de 1 hasta 2 hrs. Se puede quedar en amortiguador otro día.

3.- Se hace una postfijación con tetraóxido de osmio al 2% en el mismo amortiguador de fosfatos con un tiempo de 1 hasta 2 hrs. a temperatura de laboratorio.

4.- Lavar con el amortiguador de fosfatos. Cambiar la solución 10 veces con un tiempo de 1 hasta 2 hrs. Se puede quedar en esta solución hasta otro día.

NOTA: Es muy importante eliminar los restos del fijador porque éstos pueden formar artefactos o precipitados en el tejido. Los cambios de soluciones se pueden hacer bien con una jeringa y una aguja fina, para no perder las muestras.

3. DESHIDRATACION

El agua de los tejidos vegetales se elimina y substituye por el reactivo empleado para disolver las resinas empleadas en la inclusión; excepto cuando empleamos resinas hidrosolubles que son de uso poco común en la mayoría de los laboratorios de microscopía electrónica. Los deshidratantes más comunes son el alcohol, la acetona y el óxido de propileno. Igual que en microscopía electrónica la deshidratación se realiza aumentando gradualmente la concentración de acetona o alcohol y disminuyendo el contenido de agua. Este proceso no debe hacerse con lentitud porque se extraen algunos componentes celulares.

Para la inclusión de Durcupan se usa la acetona con las siguientes concentraciones y tiempos:

1	30%	15 min.
2	50%	30 min.
3	70%	30 min.

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

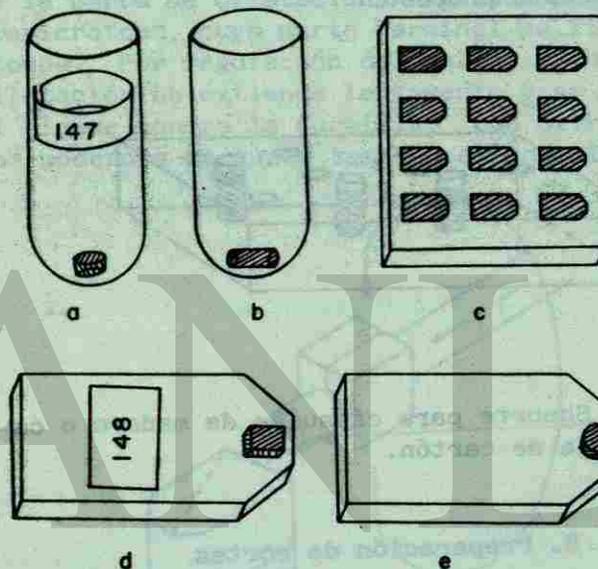


Fig. 4.

- 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.

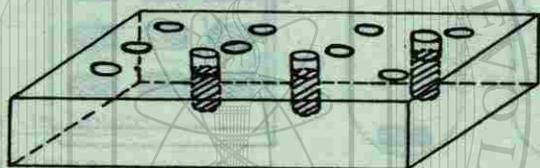


Fig. 5. Soporte para cápsulas de madera o caja de cartón.

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-

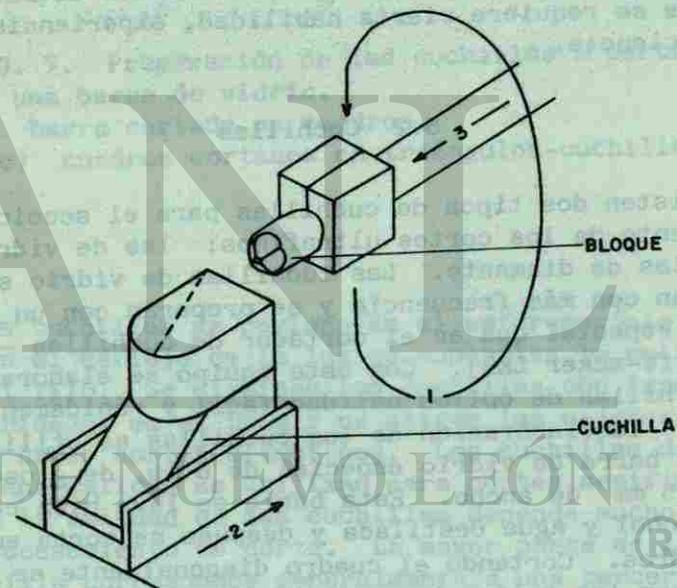


FIG. 6. Esquema de una parte del ultramicrotomo que comprende el bloque y la cuchilla.

- 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 construida 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 guantes 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.

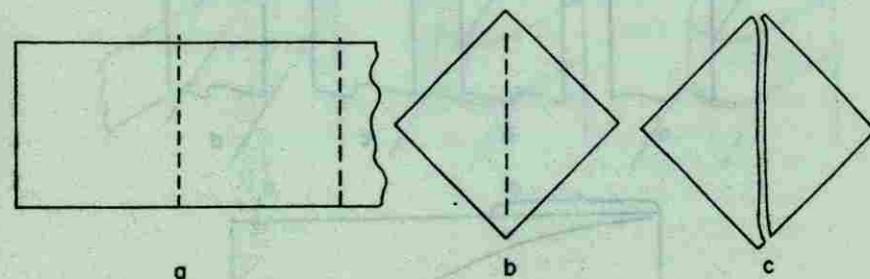


FIG. 7. Preparación de las cuchillas a partir de una barra de vidrio.
a) barra cortada en cuadros.
b,c) cuadros cortados en triángulos-cuchillas.

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.

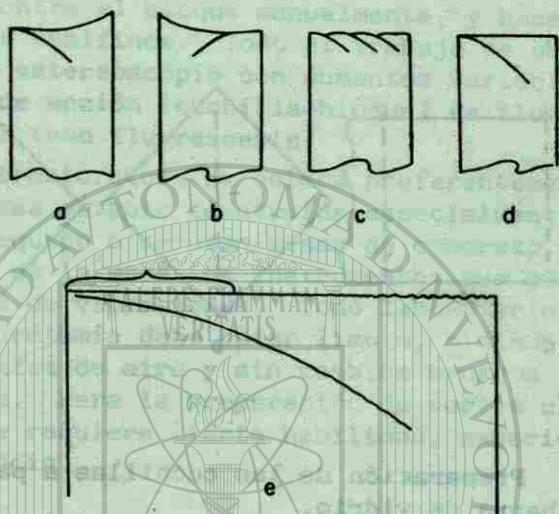


FIG. 8. Calidad de las cuchillas.
a,b,c) cuchillas malas
d) cuchilla con buen filo
e) parte del filo de la cuchilla con mejor calidad.

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.

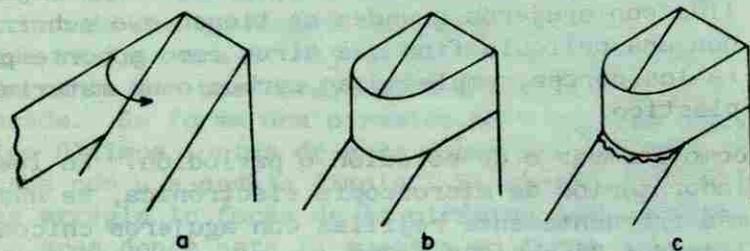


FIG. 9. Preparación de solapas
a,b) se pega una cinta metálica a la cuchilla - formando la solapa.
c) la solapa se sella con cera o esmalte de uñas.

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 PIRÁMIDE

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

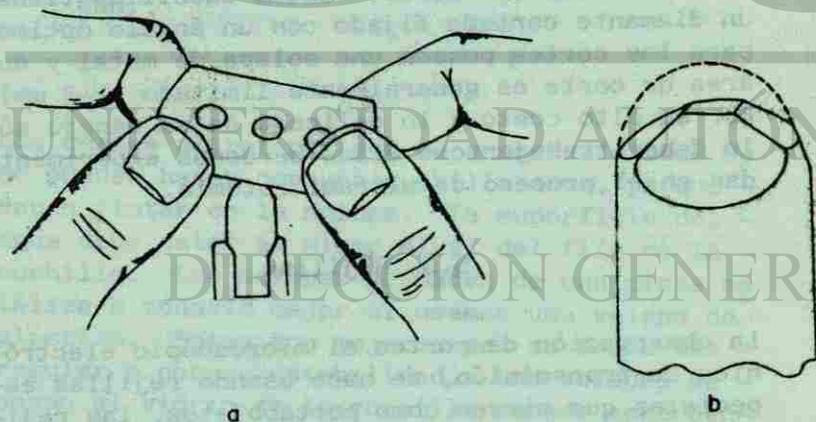


FIG. 10.

- 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.

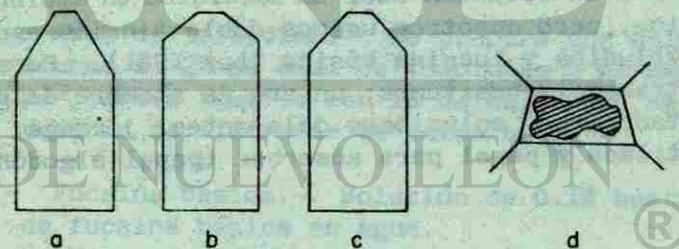


FIG. 11. Tipo de pirámide

- 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.

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.

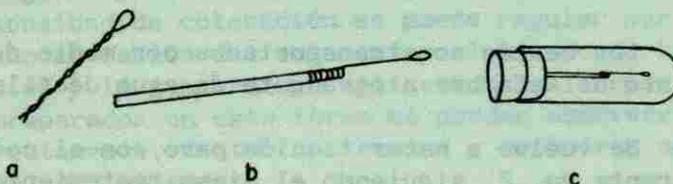


Fig. 12 Preparación del aro de alambre

- 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.

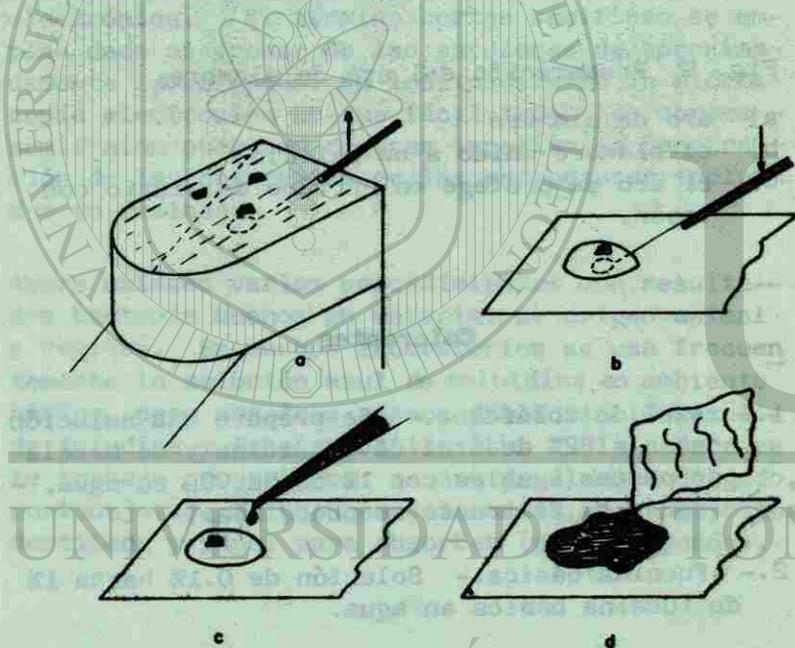


Fig. 13 Cortes semifinos.

- 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.

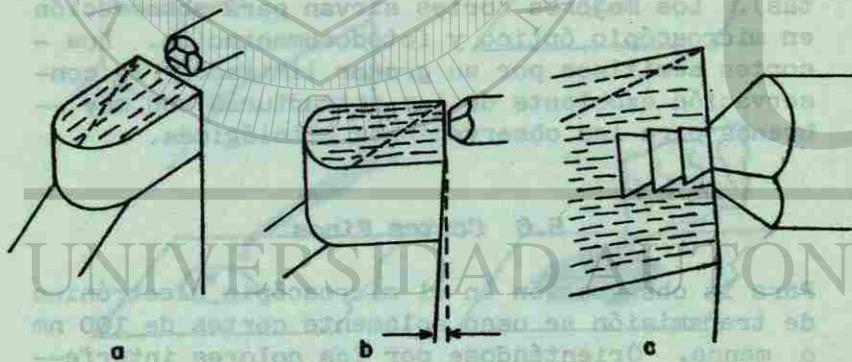


Fig. 14 Cortes finos.

- 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.

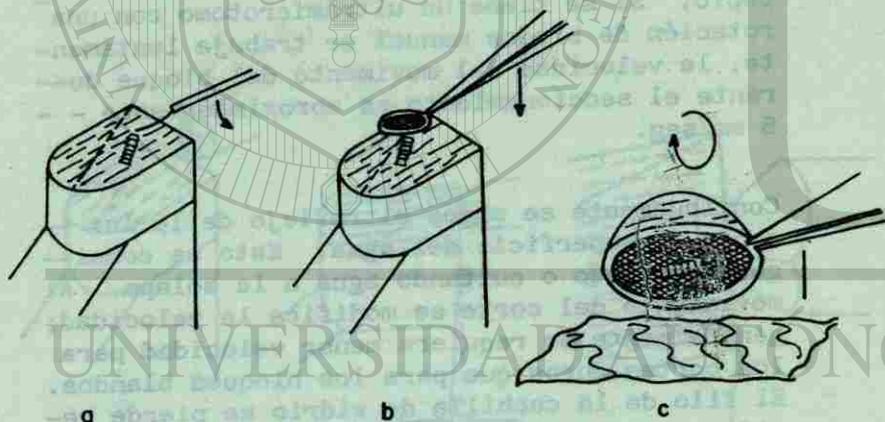


Fig. 15 Colecta de cortes.

- 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 penetrados 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 su -- ficiente para distinguir bien las estructuras y

nos permitan una excelente micrografía por eso se aplican soluciones colorantes o contrastantes -- que por interacción con algunos 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. Tifendo, 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.

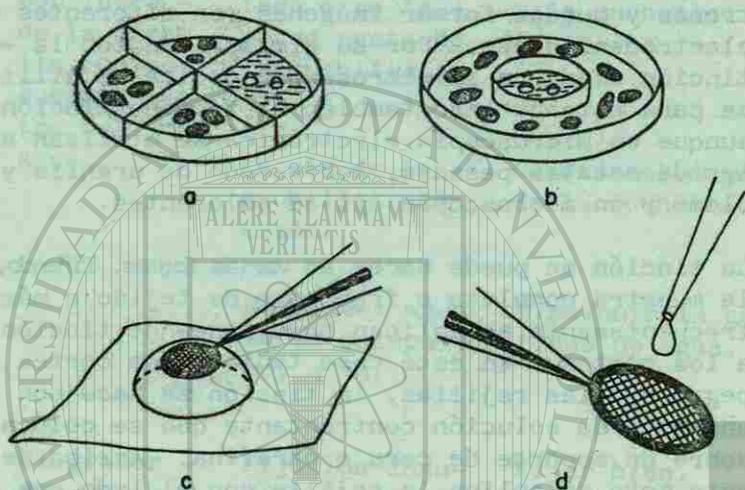


Fig. 16 Tinción.

- tinción en caja de petri dividida en cuatro partes: 3 con lentejas de NaOH y una con gotas de la solución.
- tinción en caja petri chica dentro de otra más grande con lentejas 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, lentejas 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.

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.

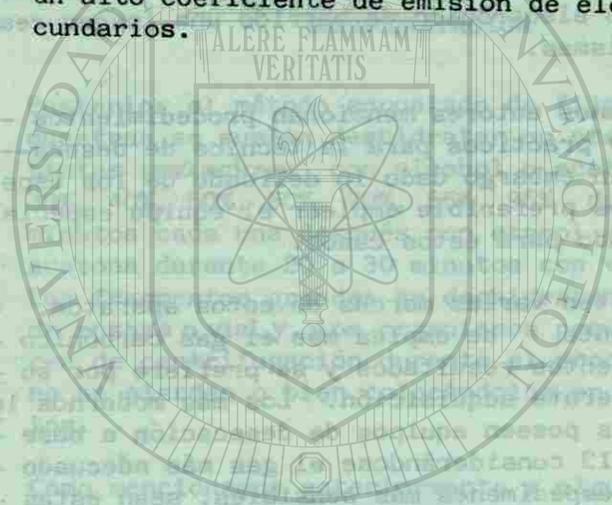
RECUBRIMIENTO DE LAS MUESTRAS

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 tungsteno 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.

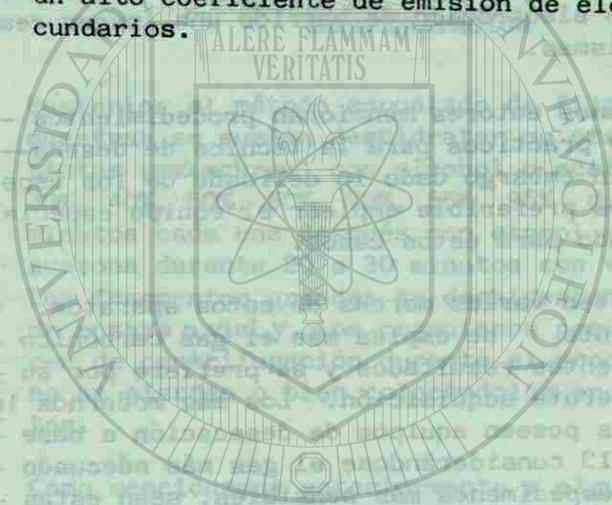
La citogenética requiere del conocimiento de la forma, número y asociación de los cromosomas, importantes por ser los responsables de los caracteres hereditarios en cada organismo, así como el proceso cariocinético. Durante tal proceso son elásticos y de consistencia gelatinosa pudiendo ser teñidos con 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

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

de cuatro fases que son: Profase, metafase, anafase y telofase y a todo el tiempo de división se le denomina como ciclo mitótico.

La división de una mitosis normal varía según las células que se consideren estudiar, por ejemplo en los estigmas de las gramíneas, el proceso de mitosis se desarrolla durante tiempos comprendidos entre 77'-110'. La profase y la telofase son las de mayor duración, realizándose la profase entre 35'-45' y la telofase de 20'-35', la metafase se desarrolla entre 7'-10' y la anafase de 15'-20'. El período de gestación de la división se conoce como interfase en la cual se lleva a cabo la duplicación del DNA. La duración de ésta en células vegetales varía entre 10 y 20 horas.

Durante el proceso de la división celular se lleva a cabo la división nuclear o cariocinesis y la del citoplasma conocida como citocinesis, en esta última se producen dos nuevos conjuntos de citoplasma. En los estadios finales de la división celular en plantas superiores el citoplasma está dividido por una placa celular cuyo crecimiento se inicia internamente y sigue hacia la periferia, hasta que completa la división de las dos células hijas.

De ordinario, la división nuclear precede directamente a la división de citoplasma, pero el núcleo no se separa en dos partes por medio de la formación de un surco o de una placa celular. El núcleo, para poder dividirse pasa por una serie de actividades y a este proceso de división nuclear indirecta es llamada mitosis, donde se originan núcleos, que tienen complementos genéticos idénticos.

INTERFASE

Durante este período el núcleo está limitado por una membrana nuclear y está lleno de una sustancia básica o matriz de aspecto más o menos homogéneo, en la cual se encuentra uno o más cuerpos pequeños llamados nucleólos y materia de cromosomas desespirilado en forma de cromatina.

PROFASE

La primera indicación de que el núcleo se está preparando para dividirse es la aparición en su sustancia básica de una masa de fibras separadas, conocidas como cromosomas y su aparición marca el inicio de esta fase. Cada cromosoma está formado por dos estructuras espiraladas una en otra, llamadas cromátidas:

A medida que continúa la profase, en cada cromosoma las cromátidas se vuelven más cortas y más gruesas y se desenrollan una de otra. Al final de la profase los nucleólos y la membrana nuclear han desaparecido y los cromátidas han formado bastones gruesos que por primera vez empiezan a moverse activamente.

La parte activa o de movimiento, no es propiedad de todo el cromosoma, sino que está restringido a una región particular del mismo llamada centrómero.

METAFASE

Los centrómeros se mueven en una dirección particular en relación a una estructura fibrilar llamada "huso", la cual se ha formado durante la profase. Los cromosomas por medio de los centrómeros emigran de cualquier posición que puedan tener en la región del "huso" al plano ecuatorial. Cuando todos los centrómeros han llegado al plano ecuatorial del "huso", la mitosis se encuentra en su siguiente fase llamada metafase.

Hasta este punto, las cromátidas de un cromosoma están aún unidas en el centrómero o cerca de él aunque en sus otras partes estén libres.

ANAFASE

En esta fase se separan los centrómeros y los dos centrómeros hijos de inmediato se apartan yendo cada uno de ellos hacia un polo opuesto del huso, con el resto de la cromátida, la cual ahora se conoce como cromosoma joven. Cuando los cromosomas han llegado a los polos, ocurre el último estadio conocido como telofase.

TELOFASE

Es este estadio los acontecimientos aparecen como inversos a los de la profase. Específicamente el huso se desintegra, se forma una nueva membrana nuclear alrededor de los cromosomas y reaparecen los nucleólos. Los cromosomas se vuelven más delgados y más largos y luego se puede ver que consisten en dos fibras delicadas (las cromátidas torcidas entre ellas). Finalmente los cromosomas pierden su identidad visible y el núcleo entra en la interfase o estadio intermitótico o metabólico.



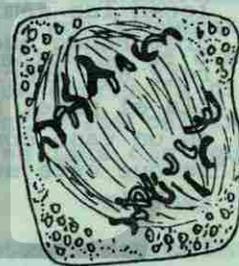
Núcleo en reposo
Interfase



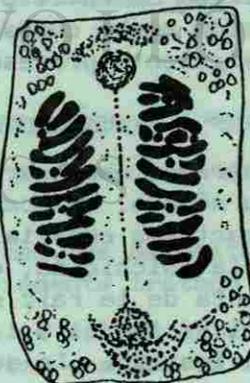
Profase



Metafase



Anafase



Telofase

3. PREPARACION DE RAICES PARA OBSERVACION DE MITOSIS Y CROMOSOMAS

Los tiempos y procesamientos que a continuación se dan fueron determinados para semillas de haba Vicia faba. Para otras especies puede variar.

Obtención del material.

Para obtener raíces de haba se escogen semillas sanas, sin daños mecánicos y que presenten testa.

Se ponen a germinar a una temperatura de 20 a 25°C. sobre un papel filtro humedecido y doblado de una de sus partes. En la cual se colocan las semillas espaciadas una de otra, procurando que el meristemo apical de la raíz del embrión quede hacia abajo. Se enrolla el papel a manera de cilindro y se coloca en un vaso con agua destilada, suficiente para que ésta suba y proporcione la humedad necesaria.

Las semillas se dejan germinar a 20°C. de tres a cinco días. Tiempo suficiente para que emerjan las raíces a las que se les cortará arriba del ápice 3 milímetros aproximadamente, con mucho cuidado pues de aquí depende ra el siguiente proceso.

PRETRATAMIENTO

Si queremos observar la forma de los cromosomas y su número, aplicamos pretratamientos con algunos reactivos especiales. Uno de los más usados es la colchicina, durante este tratamiento a la punta de la raíz se le agrega una solución de colchicina al 0.1 % por dos horas, dejándose un testigo. La solución de colchicina es un pretratamiento que se aplica para que se contraigan los cromosomas, facilitando su conteo y la clara observación de su morfología. Otro

efecto importante es el de obtener el mayor número de células en metafase por inhibición del movimiento de cromosomas.

FIJACION DE LAS MUESTRAS

Las muestras se llevan a fijación en alcohol absoluto y ácido acético en proporción 3:1 por dos horas. Después de fijadas las raíces se lavan con agua destilada varias veces, si se desean mantener las muestras se guardan en alcohol al 70% por tiempo indefinido.

MACERACION

Las raíces se ponen en un colador y se coloca encima de un vaso de precipitado conteniendo ácido clorhídrico al 1 normal y a una temperatura de 60°C. El tiempo de maceración es de 6 minutos, tiempo necesario para que ocurra la disolución de las láminas medias entre las células de las raíces. Posteriormente se lava con agua destilada.

El tiempo y la temperatura de maceración e hidrólisis en el DNA influye principalmente en el proceso de tinción; si no obtenemos resultados excelentes hay que modificar el proceso de maceración e hidrólisis, dando diferentes tiempos y/o temperatura.

TECNICA DE APLASTADO O "SQUASH"

Para este caso tomaremos la descrita por Murín, (1960):

1. Se sacan las raíces, se depositan sobre un portaobjeto previamente tratado con adhesivo.
2. Sobre las raíces se coloca un cuadro de papel celofán y se oprime con fuerza moderada con algún objeto de paredes lisas de tal manera que se forme una película de células. Esto hace que el agua excedente se elimine, quedan

do alrededor del papel la cual se extrae con un papel secante una vez realizado lo anterior se deja secar un poco cuidando ahora que el celofán no se enrolle sobre sí mismo.

TINCION

Las preparaciones se tiñen en una solución saturada de fucsina básica (0.26%), por siete minutos.

DIFERENCIACION

Para este paso se usa alcohol al 80% por un tiempo aproximado de dos minutos. Es importante observar el material al microscopio para ver el grado de coloración de los cromosomas.

DESHIDRATACION

Se pasan las laminillas a alcohol al 90% por cinco minutos, después en alcohol absoluto por otros cinco minutos.

PREPARACIONES PERMANENTES

Después de los alcoholes se pasan las laminillas por una mezcla de alcohol y xilol y se montan con resina.

Alcohol	2 partes	
Xilol	1 parte	10 min.
Alcohol	2 partes	
Xilol	2 partes	10 min.
Alcohol	1 parte	
Xilol	2 partes	10 min.
Xilol puro		De 12 hasta 24 horas.

PREPARACION DE SOLUCIONES USADAS

1. ADHESIVO.

Cantidades iguales de glicerina y albúmina de huevo se mezclan y filtran (con algodón). Para conservar la mezcla se puede poner un gramo de salicilato de sodio o un cristal de timol.

SOLUCION PARA HIDROLISIS Y MACERACION.

2. Para la hidrólisis se utilizan ácido clorhídrico 1 N.

Para 150 ml.

Acido clorhídrico concentrado	12.5 ml.
Agua destilada	137.5 ml.

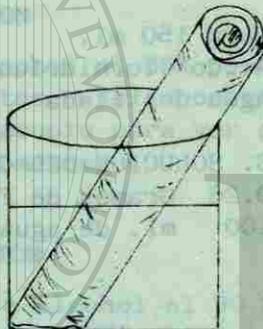
3. SOLUCION DEL COLORANTE.

0.26 Gramos de Fucsina básica	
100 ml. de agua destilada y filtrar.	

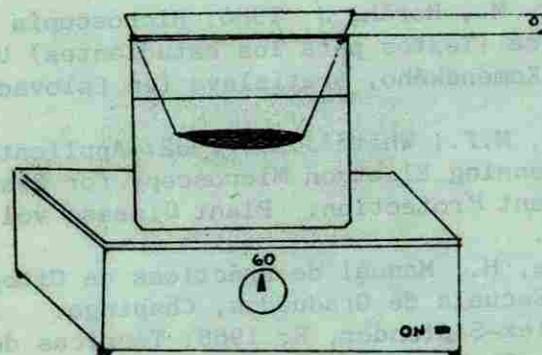


Papel Filtro Enrollando
Semillas.

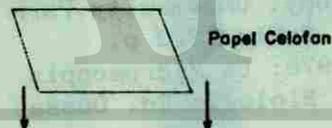
VASO CON AGUA DESTILADA Y CON EL PAPEL FILTRO ENROLLADO CONTENIENDO LAS SEMILLAS PARA GERMINAR.



SEMILLAS GERMINADAS LISTAS PARA CORTARLES EL APICE RADICULAR 3mm ANTES



VASO CON SOLUCION DE AGUA DESTILADA Y ACIDO CLORHIDRICO A 60° C, CON UN COLADOR PARA HIDROLIZAR LOS APICES DE RAIZ.



Papel Celofan



Tapon de hule



PORTAOBJETOS CON EL APICE DE RAIZ AL QUE SE SOBREPONE EL PAPEL CELOFAN.

PORTAOBJETOS CON APICE DE RAIZ Y PAPEL CELOFAN SOBRE EL QUE SE PRESIONARA CON EL TAPON DE HULE.

BIBLIOGRAFIA

1. Bobák, M., Horák, J. 1986: Microscopía Electrónica (Textos para los estudiantes) Univerzita Komenského, Bratislava (en Eslovaco), -- 99 p.
2. Brown, M.F.; White J.A., 1982: Applications of Scanning Electron Microscopy for Research in Plant Protection. *Plant Disease* vol. 66 - No. 4.
3. García, H.; Manual de Prácticas de Citogenética. Escuela de Graduados, Chapingo.
4. González-Santander, R; 1968: Técnicas de Microscopía Electrónica en Biología Ed. Aguilar Madrid, 666 p.
5. Hall C.E.; 1970: Microscopía Electrónica Ediciones Urmo, Bilbao 440 p.
6. Hayat, M.A.; 1972: Basic Electron Microscopy Techniques. Van Nostrand Reinhold Company, - New York, 119 p.
7. Hayat, M.A.; 1978: Introduction to Biological Scanning Electron Microscopy. University Park Press. Baltimore, London, Tokio. 323 p.
8. Kessel, R.G.; Shi C.Y., 1976: La Microscopía Electrónica de Barrido en Biología Ed. Dossat S.A., Madrid 351 p.
9. Lux, A; 1981: Método Rápido de Tinción de Cortes Semifinos de Material Vegetal. (en Eslovaco). *Biología*, (Bratislava) 36: 753-757.
10. Murín, A; 1960: Substitution of Celophane for Glass Covers to Facilitate Preparation of Permanent Squashes and Smears. *Stain Technol.* - 35: 351-353.
11. Rakoff, H.; 1974: Química Orgánica Fundamental, Limusa México, 1a. Ed. 620 p.
12. Swanson, C.P., Merz, T., Young, W.J., 1968: - Citogenética. Union Tipográfica, Editorial - - Hispanoamericana 321. p.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
CAPILLA ALFONSINA
BIBLIOTECA UNIVERSITARIA

educación
POR LO VEO



JUAN

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
ASOCIACIÓN GENERAL DE BIBLIOTECARIOS

Q
L