

16.372
3a. cap.

BIBLIOTECA AGROPECUARIA

DE COLOMBIA



MINISTERIO DE AGRICULTURA

INSTITUTO COLOMBIANO AGROPECUARIO

18.000.000

Laboratorio de Microscopía Electrónica
ICA - CEISA

Universidad Nacional de Colombia
Vice-rectoría de Recursos Universitarios
Centro de Microscopía

ANALIZADO

**Instructivo para toma y envío
de muestras para
Microscopía Electrónica
de Transmisión (TEM)
y para Microscopía Electrónica
de Barrido (SEM)**

Santafé de Bogotá, D.C.
Septiembre de 1992

✓
**INSTRUCTIVO PARA TOMA Y ENVIO DE MUESTRAS
PARA MICROSCOPIA ELECTRONICA DE
TRANSMISION (TEM) Y PARA MICROSCOPIA
ELECTRONICA DE BARRIDO (SEM).**

✓
Gloria Romero de Pérez*
Fernando Villafañe A.

INTRODUCCION

El uso de la Microscopía Electrónica como elemento de apoyo en aspectos de investigación, diagnóstico y docencia, ha venido incrementándose tanto en Centros Experimentales como en Universidades e Instituciones relacionadas con el proceso tecnológico del país. Este hecho ha motivado la capacitación de profesionales y técnicos en el campo de Microscopía Electrónica, necesitándose cada día más contar con los conocimientos necesarios que permitan el uso adecuado de este importante recurso.

En el presente instructivo los procedimientos de toma de muestras y fijación que se presentan constituyen una aproximación y pueden ser empleados de manera general. Sin embargo, existe una amplia variedad de métodos específicos que deben ser consultados en casos especiales. Además este instructivo busca motivar a los interesados con la información mínima necesaria sobre la toma y envío de muestras para Microscopía Electrónica, con el ánimo de que en un futuro los diferentes Sectores e Instituciones necesitados de esta tecnología amplíen su uso seguros de lograr generar los conocimientos que solucionen las numerosas limitantes que afectan al país.

* *Bióloga, M.S., Centro de Microscopía Universidad Nacional; Médico Veterinario, M.S., Ph.D., Laboratorio de Microscopía Electrónica, ICA-CEISA.*

I. ORGANOS Y TEJIDOS ANIMALES.**A. Fijación por Inmersión.**

1. Anestesia del Animal: Utilice una dosis según la especie. Por ejemplo, para una rata administre 40 mg/kg /peso corporal de pentobarbital, o 35 0/o de hidrato de cloral (0.1 ml/100 g/peso corporal) mediante inyección peritoneal.
2. Realice la disección en el área del órgano de interés y expón-galo completamente.
3. Con una pipeta pasteur, vierta la solución fijadora (glutaral-dehido al 2.5⁰/o amortiguado) sobre el órgano o tejido (Fijación "in situ").
4. Con los instrumentos de disección, separe el órgano o tejido y colóquelo sobre una placa plástica o sobre parafina solidi-ficada y roce la superficie con suficiente solución fijadora.
5. Corte con una cuchilla nueva el órgano en segmentos de 1 a 2 mm. NO EXCEDA ESTE TAMAÑO.
6. Coloque rápidamente los segmentos de tejido en viales de aproximadamente 3.5 cm x 1.5 cm que contienen la solu-ción fijadora y llévelos a 4°C (en nevera o nevera portátil con hielo y se transportan en frío).

B. Fijación por Perfusión.

La fijación por perfusión tiene ventajas desde el punto de vista de preservación de la estructura fina y es adecuada para muchos tejidos; sin embargo, en algunos casos, este método se hace imprescindible para asegurar una mejor fijación; por ejemplo, en órganos internos ricamente vascularizados como el riñón, el pulmón y el sistema nervioso central y periférico.

La presión de perfusión debe ser suficientemente alta para asegurar un buen flujo del fijador, pero no significativamente más alta que la presión arterial del animal, por lo que se debe tener en cuenta el órgano que se va a fijar.

1. Para pequeños animales (ratón, rata, hamster)*, el procedimiento es el siguiente: administre la anestesia como se indicó anteriormente. Mediante la disección abra la cavidad torácica y la cavidad abdominal; esponga el corazón; inyecte de 0.1-0.3 ml de heparina (utilice aguja 25 o 27) en la luz del ventrículo izquierdo para disminuir la coagulación sanguínea.
2. Inmediatamente coloque la aguja de perfusión en el ventrículo izquierdo, abra con tijeras la pared de la aurícula derecha o de la vena cava para permitir el flujo de sangre y de la solución salina. Inicie lentamente la perfusión del fijador. Cuando el líquido salga transparente suspenda el envío del mismo.
3. Separe el órgano y colóquelo sobre una placa plástica o de parafina solidificada y roce con la solución fijadora.
4. Corte con una cuchilla nueva el área de interés en segmentos de 1 mm². NO EXCEDA ESTE TAMAÑO.
5. Coloque las muestras de tejido en viales de 3.5 cm x 1.5 cm debidamente identificadas con un volumen de solución fijadora no inferior a diez veces el de la muestra. Llévelos a 4°C (en nevera o nevera portátil con hielo y se transportan en frío).

NOTA: Si se trata de una rata, se utilizan de 400 a 450 ml de fijador; las partes sin pelo toman color amarillo pálido. En el caso del riñón la perfusión puede hacerse por vía de la arteria renal directamente.

* Para animales de mayor talla consulte el procedimiento de perfusión.

II. ORGANOS Y TEJIDOS VEGETALES.

El siguiente procedimiento puede realizarse en el laboratorio o en el invernadero.

A. Tejidos Embrionarios o Tejidos Jóvenes.

1. Separe el tejido de la planta, y sobre una placa plástica o de parafina solidificada, corte con una cuchilla nueva el órgano en segmento de 1 mm^2 . NO EXCEDA ESTE TAMAÑO.
2. Coloque rápidamente los segmentos de tejido en viales de aproximadamente $3.5 \text{ cm} \times 1.5 \text{ cm}$ que contienen la solución fijadora y llévelos a 4°C (en nevera o nevera portátil y se transportan en frío).

B. Tejidos Adultos (raíz, tallo, hoja).

Siga el procedimiento indicado en el punto anterior.

Ciertas plantas tienden a flotar en el fijador debido a la presencia de aire dentro de vacuolas que impide una fijación rápida y uniforme. Esta dificultad se resuelve sometiendo el tejido a presión negativa (no debería ser mayor de una atmósfera por ejemplo para raíces), utilizando un aspirador, o bien se colocan los viales con los tejidos en una campana de vidrio (campana de anaerobiosis) unida a una bomba de vacío. El aire se libera en forma de pequeñas burbujas. Para semillas o tejidos especialmente lignificados debe revisarse un protocolo especial.

NOTA: La superficie de la mayoría de las plantas están cubiertas por ceras y/o pelos. Estas estructuras impiden la penetración de soluciones del fijador. El problema se puede solucionar disolviendo brevemente las estructuras impermeables en un detergente casero.

LA INMERSION TOTAL DE LOS ESPECIMENES EN EL FIJADOR DENTRO DE UN TIEMPO CORTO, ES UN PRE-REQUISITO PARA UNA FIJACION SATISFACTORIA.

III. SUSPENSIONES (CELULAS, BACTERIAS, CLOROPLASTOS, FRAGMENTOS CELULARES).

1. Tome 2 ml de la suspensión y agréguele 2 ml de solución fijadora (glutaraldehído al 2.5^o/o amortiguado).
2. Centrifugue a 3.000 r.p.m. durante cinco minutos, descarte el sobrenadante cuidadosamente.
3. Agregue al pellet una o dos gotas de agar-agar al 2^o/o a una temperatura aproximada de 45^oC. Homogenice con un palillo o con una varilla de vidrio.
4. Deje enfriar por algunos minutos dentro de una nevera y cuando el agar se gelifique, extraiga cuidadosamente el conjunto agar-muestra sobre una placa de plástico, evitando que se seque.
5. Corte pequeñas piezas de agar-muestra (0.2 x 0.4 mm) y colóquelos en viales con glutaraldehído al 2.5^o/o. Envíe las muestras al laboratorio de Microscopía Electrónica para el proceso subsiguiente.

NOTA: Se sugiere revisar la siguiente bibliografía para algunas células del tejido sanguíneo:

1. Nunes, J.F.M.; Soares, O. and Alves, de Matos A.P. Microbuffy coats of whole blood: A method for the electron microscopic study of mononuclear cells. Stain Technology 54:257, 1979.
2. Mattson, J.C.; Bergerding P.J. and Craft D.L. Fixation of platelets for scanning and transmission electron microscopy. Stain Technology 52:151, 1977.

IV. TOMA DE MUESTRAS PARA MICROSCOPIA ELECTRONICA DE BARRIDO (SEM).

Con frecuencia la superficie del especimen puede estar cubierta de sustancias como sales, mucus u otros elementos contaminantes que interfieren con la observación. En estos casos la limpieza de la superficie se puede realizar mediante un lavado con agua destilada.

Haga una disección del órgano o región de interés (si es de un animal, administre anestesia previamente como se indicó anteriormente; si el órgano es de una planta, sepárelo directamente).

El tamaño de la muestra debe ser aproximadamente de 3 mm. Si se trata de especímenes más grandes, por ejemplo insectos, se pueden cortar en piezas de tamaño conveniente.

BIBLIOTECA AGROPECUARIA

BIBLIOTECA AGROPECUARIA

**En caso de información dirigirse a:
Laboratorio de Microscopía Electrónica
ICA - CEISA
A.A. 29743 - Tel: 2447805 - 6
Santafé de Bogotá**