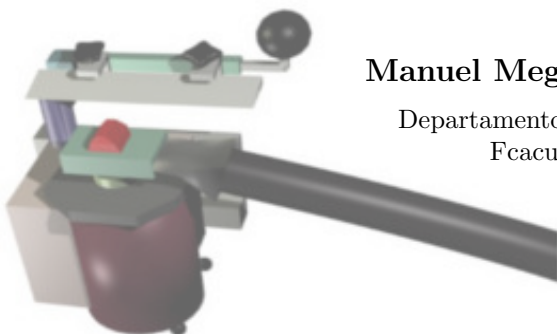
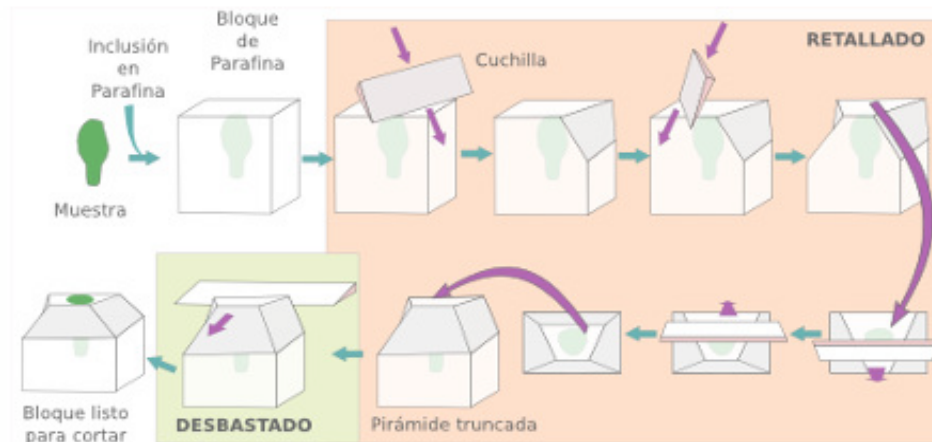


Técnicas histológicas

CORTE



Manuel Megías, Pilar Molist, Manuel A. Pombal

Departamento de Biología Funcional y Ciencias de la Salud.

Facultad de Biología. Universidad de Vigo.

(Versión: Julio 2024)

Este documento es una edición en pdf del sitio
<http://mmegias.webs.uvigo.es/inicio.html>.

Todo el contenido de este documento se distribuye bajo
la licencia Creative Commons del tipo BY-NC-SA
(Esta licencia permite modificar, ampliar, distribuir y usar
sin restricción siempre que no se use para fines comerciales,
que el resultado tenga la misma licencia y que se nombre
a los autores)

La edición de este documento se ha realizado con el software \LaTeX
(<http://www.latex-project.org/>), usando Texstudio
(www.texstudio.org/) como editor.

Contenidos

| | | |
|----------|-------------------------------|-----------|
| 1 | Introducción | 1 |
| 2 | El proceso histológico | 2 |
| 3 | Corte | 4 |
| 4 | Microtomos de parafina | 6 |
| 5 | Vibratomo | 9 |
| 6 | Criotomos | 11 |
| 7 | Ultramicrotomo | 13 |

1 Introducción

En estas páginas dedicadas a las técnicas histológicas vamos a describir los procedimientos experimentales necesarios para obtener secciones teñidas y listas para observar al microscopio partiendo de tejidos vivos extraídos de un animal o de una planta. Por tanto, dedicaremos espacios a la obtención, fijación, inclusión, corte, tinción y observación de los tejidos. Todos estos apartados seguirán el mismo esquema que los capítulos dedicados a los tejidos o a la célula, partir de un esquema básico y ampliar la información sucesivamente en páginas adicionales. No dedicaremos demasiado espacio a los instrumentos desde el punto de vista operativo, pero sí a la conveniencia de su uso y a sus capacidades. Además, se incluye un apartado de protocolos y recetas donde se incorporan los tiempos, productos y manera de proceder para llevar a cabo las tinciones más comunes y cómo preparar sus reactivos. También se han añadido algunos vídeos explicativos

La mayoría de las técnicas histológicas van encaminadas a preparar el tejido para su observación con el microscopio, bien sea éste óptico o electrónico. Ello es debido a dos razones: a) que la composición de los tejidos, salvo contadas ocasiones, no tienen contraste ni colores que permitan diferenciar sus estructuras de una manera clara y b) que la mayoría de las estructuras tisulares y celulares no se pueden discriminar a simple vista sino con la ayuda de los microscopios. Por ello hay que procesar las muestras, primero para que no se deterioren y después para resaltar sus estructuras y poder estudiarlas en detalle.

Existen procedimientos rápidos y simples para la observación de tejidos y células vivas que reciben el nombre de vitales. Los intravitales permiten la observación dentro del cuerpo. Por ejemplo, la observación del flujo sanguíneo en capilares del sistema circulatorio. Otra forma de observar células o tejidos vivos es mediante las técnicas histológicas supravitales, en las

que las células y los tejidos se mantienen o se hacen crecer fuera del organismo, como es el caso de los cultivos de células y de tejidos *in vitro*.

Las técnicas histológicas postvitales son aquellas en las que las células mueren durante el proceso, pero las características morfológicas y moleculares que poseían en estado vivo se conservan lo mejor posible, lo que depende del tipo de técnica empleada. Estas páginas estarán dedicadas a este tipo de técnicas, puesto que son las más comúnmente usadas en los laboratorios de histología.

El objetivo de toda técnica histológica es observar y estudiar la estructura general o detallada de los diferentes componentes tisulares. Estas características observadas deberían ser iguales a las que poseían los tejidos en su estado vivo. Aunque las técnicas histológicas actuales están diseñadas para disminuir al máximo las alteraciones de las características de los tejidos durante su aplicación, todas las técnicas introducen modificaciones más o menos importantes que pueden afectar de manera diferencial a diferentes componentes tisulares. Estas alteraciones se llaman artefactos y tenemos que tenerlos en cuenta a la hora de interpretar lo que observamos en el microscopio.

A lo largo de la historia de la ciencia se ha puesto a punto una gran variedad de técnicas histológicas. Algunas de ellas son generales y se utilizan para una evaluación global de las muestras, mientras que otras son más específicas y permiten la identificación y estudio de estructuras determinadas. Algo a tener en cuenta es que la selección de la técnica y sus variantes depende básicamente del tejido que queramos observar y de lo que queramos estudiar en él. Por ejemplo, no es lo mismo estudiar un tejido animal que uno vegetal, o trabajar con tejido óseo que con tejido nervioso. En las siguientes páginas vamos a presentar las técnicas más generales usadas comúnmente en los laboratorios de histología.

2 El proceso histológico

Denominamos proceso histológico a una serie de métodos y técnicas utilizados para poder estudiar las características morfológicas y moleculares de los tejidos. Hay diversos caminos para estudiar los tejidos, es decir, diversas series de técnicas que se utilizarán dependiendo de qué característica deseemos observar. En el siguiente esquema (Figura 1) se muestran los métodos y técnicas comúnmente empleados durante el procesamiento de los tejidos para su observación con los microscopios óptico o electrónico. Sin embargo, hay que tener en cuenta que existen muchas variantes a estos "caminos" y su elección dependerá del resultado final que queramos obtener.

El proceso histológico comienza con la obtención del tejido objeto de estudio. En el caso de los tejidos vegetales directamente se toman muestras de los distintos órganos que componen el cuerpo de la planta, mientras que para los tejidos animales podemos optar por dos opciones: coger una porción del tejido u órgano y procesarla o procesar primero el animal completo y luego extraer la muestra que nos interese. En cualquier caso las muestras son habitualmente fijadas. Fijar un tejido es como hacer una fotografía de dicho tejido, se lleva a cabo para mantener las estructuras celulares y moleculares inalterables durante el procesamiento posterior y con una organización lo más parecida posible a como se encontraban en la muestra viva. La fijación más habitual se lleva a cabo con unas soluciones líquidas denominadas fijadores. También podemos fijar las moléculas de los tejidos por congelación rápida. La fijación por congelación se emplea cuando la fijación química o los procesos histológicos posteriores alteran las características de la muestra que queremos estudiar, por ejemplo una molécula sensible a dichos tratamientos.

Tras la fijación es habitual incluir el tejido para posteriormente obtener secciones. Cuanto más delgada queramos que sea nuestra sección más tenemos que endurecer nuestra muestra. Esto se consigue embebiendo el tejido con sustancias líquidas que posteriormente polimerizarán (resinas) o se volverán consistentes (ceras). También se puede conseguir el mismo efecto mediante congelación rápida. Cortes

más gruesos de 40 μm se pueden cortar sin necesidad de inclusión usando el vibratomo o microtomos de congelación. Los medios de inclusión no son normalmente hidrosolubles por lo que tendremos que sustituir el agua de los tejidos por solventes orgánicos liposolubles y posteriormente sustituirlos por el medio de inclusión.

Para el caso de algunas muestras es necesario hacer un tratamiento previo a la fijación. Por ejemplo, el tejido óseo contiene minerales que dificultan su procesamiento. En este caso se suele someter a un proceso de descalcificación, tras el cual se prosigue con la inclusión de las muestras.

Tras la inclusión o la congelación se procede a cortar los tejidos, es decir, obtener secciones. Existen diferentes aparatos de corte que permiten conseguir secciones de distinto grosor: ultrafinas (del orden de nm), semifinas (de 0.5 a 2 μm), finas (entre unas 3 y 10 μm) y gruesas (mayores a 10 μm). Habitualmente las secciones se procesan para poder observarlas y estudiarlas, aunque ciertos tipos de microscopía, por ejemplo con contraste de fase, permiten observar secciones de tejidos sin procesar. Normalmente las secciones se tiñen con colorantes que son hidrosolubles, por lo que hay que eliminar el medio de inclusión para que los colorantes pueden unirse al tejido. Las secciones ultrafinas (observadas con el microscopio electrónico) o semifinas (observadas con el microscopio óptico) se pueden contrastar con metales pesados o con colorantes, respectivamente, sin necesidad de eliminar el medio de inclusión. Las secciones obtenidas a partir de muestras congeladas se puede procesar u observar una vez llevadas a temperatura ambiente.

Los tejidos procesados se observan con los microscopios. Existen dos tipos básicos de microscopios: óptico y electrónico. Los primeros ofrecen una gran versatilidad en cuanto a modos de observar los tejidos: campo claro, contraste de fase, polarización o contraste de interferencia diferencial, mientras que los segundos permiten un gran poder de resolución, pudiéndose observar características ultraestructurales como membranas celulares o incluso complejos moleculares.

Como dijimos al comienzo existen múltiples varia-

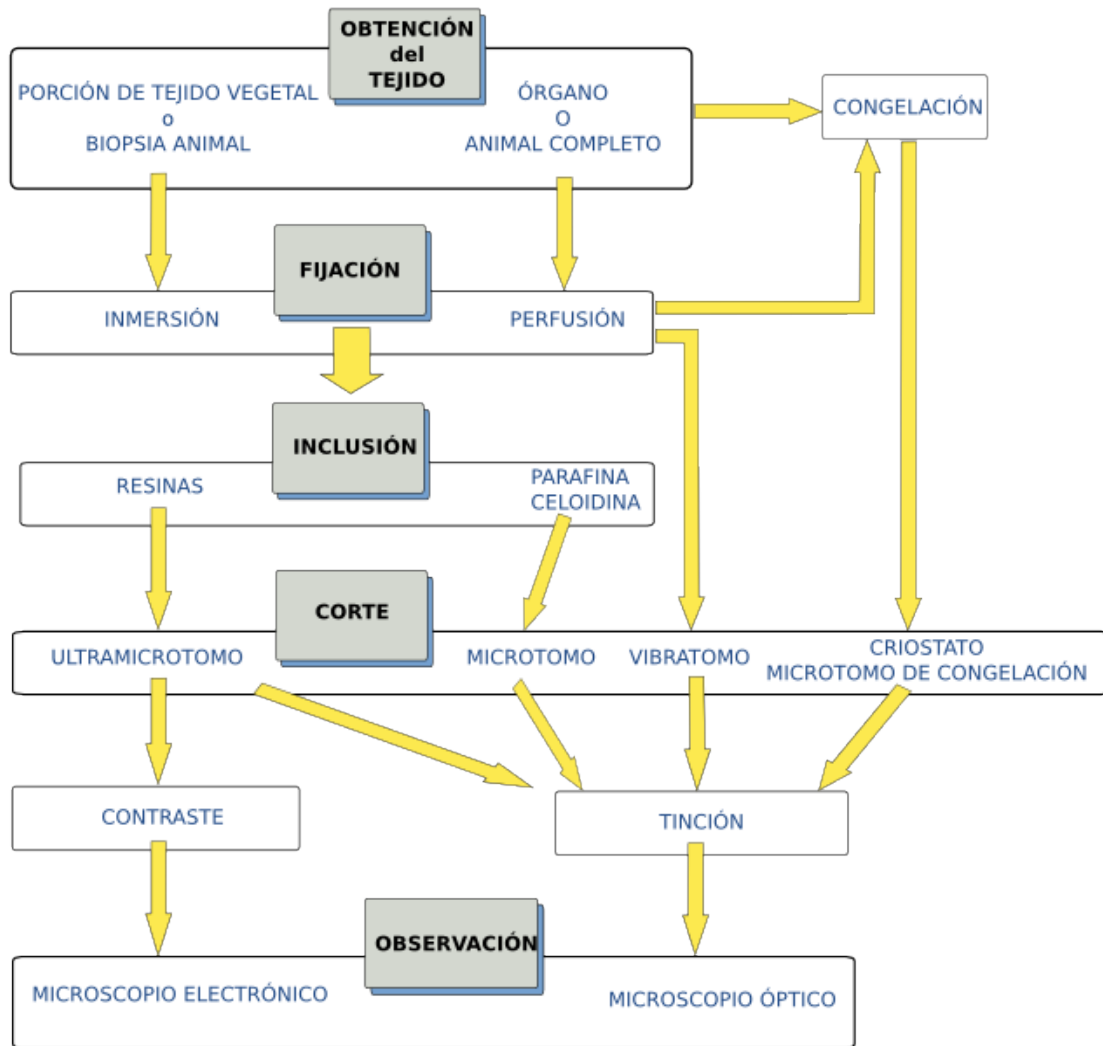


Figura 1: Esquema del proceso histológico.

ciones sobre este esquema general de procesamiento histológico. Por ejemplo, se pueden observar tejidos con el microscopio electrónico de barrido sin necesidad de incluir ni cortar, pero sólo observaremos superficies. Si queremos cuantificar nuestros resultados, por ejemplo, número de células de una estructura, tendremos que hacer un muestreo sistemático y aleatorio de la muestra, según los principios de la estereología.

Ello requerirá unas condiciones previas para que cada célula tenga la misma probabilidad de ser observada. De igual modo, si queremos observar muestras gruesas o muy gruesas puede ser buena idea someter a esas muestras a un proceso de aclarado antes de su observación. En las siguientes páginas veremos con cierto detalle algunas de las técnicas más empleadas para la observación de los tejidos.

3 Corte

Las características tisulares y celulares finas se observan con los microscopios. Sin embargo, con estos aparatos sólo se pueden observar muestras de tejido que tengan un grosor muy pequeño, ya que de no ser así hay problemas de difusión y penetración de la luz en el caso de los microscopios ópticos y de penetración de los electrones en el caso del microscopio electrónico de transmisión. Por tanto tenemos que hacer secciones de los tejidos que queremos estudiar, las cuales pueden ir desde un grosor de decenas de nanómetros (nm) hasta centenares de micrómetros (μm). Algunos tejidos como los de las plantas, por sus características celulares, permiten su observación en secciones de cientos de μm de grosor. Otros tipos de muestras, como la sangre o los cultivos celulares, pueden observarse directamente puesto que las células se extienden en una capa de una o unas pocas células de grosor.

Como hemos mencionado en las páginas anteriores, podemos decir que cuanto más delgada queramos hacer una sección de tejido más endurecido ha de estar dicho tejido antes de seccionarlo. La dureza de los tejidos depende de sus características (por ejemplo, las paredes celulares hacen que las plantas tengan tejidos duros), de la fijación que hayamos realizado y sobre todo del material en el que hayamos incluido dicho tejido. Una manera más directa de endurecer el tejido es mediante la congelación.

Los aparatos mecánicos para hacer secciones se denominan microtomos. Existen diferentes tipos según el grosor que queramos conseguir en nuestras secciones, según el medio de inclusión en el que se encuentre el tejido y según el proceso de endurecimiento de la muestra: por congelación o por inclusión.

Los microtomos más usados son:

Microtomo para parafina (Figura 2). Se utiliza principalmente para material incluido en parafina y se obtienen secciones de 5 a 20 μm de grosor. Estas secciones se observan con el microscopio óptico.

Microtomo manual (Figura 3). Es un dispositivo muy sencillo que consta de un soporte para sujetar la muestra. Los cortes se realizan a mano con una

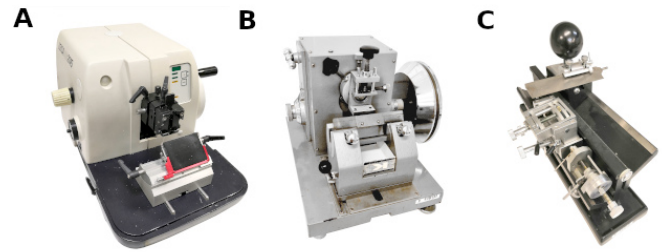


Figura 2: Microtomos de parafina. A) Microtomo de rotación moderno con corte automatizado. B) Microtomo de rotación antiguo totalmente mecánico. C) Microtomo de deslizamiento.

cuchilla. Este microtomo se usa prácticamente sólo para tejidos vegetales, los cuales son duros gracias a las paredes vegetales. Hace cortes gruesos, 100 μm o más, observables con el microscopio óptico.

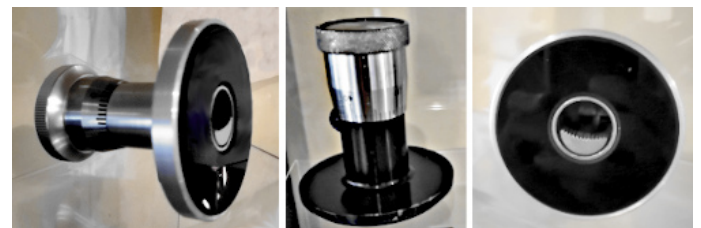


Figura 3: Microtomo manual.

Vibratomo (Figura 4). Corta material no incluido, aunque sí fijado o duro, en secciones que pueden ir desde 30 hasta centenares de μm de grosor. Estas secciones se observan con el microscopio óptico.



Figura 4: Vibratomo. La cubeta, de color negro, ha de estar llena de tampón de trabajo durante el proceso de corte de manera que la cuchilla y la muestra, de color rojo, y las secciones que se obtienen están sumergidos.

Microtomo de congelación. Con él se consiguen sec-

ciones de 30 a unas 100 μm de grosor a partir de material congelado y se observan con el microscopio óptico.

Criostato (Figura 5). Consigue secciones a partir de material congelado y se obtienen grosores de 10 a 40 μm , para observar con el microscopio óptico.



Figura 5: Criostato. El compartimento de color violeta es la cámara enfriada a la temperatura seleccionada. En esta cámara se encuentra la muestra, la cuchilla y es donde se recogen las secciones.

Ultramicrotomo. Con él se corta material incluido en resinas y se obtienen secciones habitualmente de una pocas decenas de nm de grosor, pero también entre 0,5 y 1 μm . Las secciones de 0,5 μm o más se observan con el microscopio óptico, mientras que las de un grosor de decenas de nm van destinadas a ser observadas con el microscopio electrónico de transmisión.

Ultracriostato. Su uso no está muy extendido pero se suele emplear cuando se necesitan secciones del orden de nm de material que no se debe incluir. Estas secciones van destinadas a su observación con el microscopio electrónico de transmisión.

Los aparatos de corte más usados tradicionalmente para estudiar las características generales de los tejidos y de las células son el microtomo para material incluido en parafina para observaciones con el microscopio óptico y el ultramicrotomo para observaciones con el microscopio electrónico de transmisión. El criostato se usa también frecuentemente en microscopía óptica por el ahorro de tiempo que supone, por la preservación molecular, ya que no necesita incluir el tejido, e incluso porque se puede cortar material no fijado.

4 Microtomos de parafina

Los microtomos para cortar material incluido en parafina son probablemente los más usados en los laboratorios de histología. Todos poseen varias partes comunes: una cuchilla, un portamuestras y un sistema mecánico que permite avanzar el bloque de parafina, con la muestra dentro, sobre la cuchilla un intervalo de distancia que se corresponde con el grosor de la sección que pretendemos obtener, y realizar el corte.

Hay dos tipos de microtomos para parafina: el de rotación y el de deslizamiento. El microtomo de rotación (Figura 6) provoca el corte gracias a la transformación de un movimiento de rotación en otro de ascenso y descenso del portamuestras que sostiene a la muestra incluida en parafina. En el movimiento de subida se produce un acercamiento del portamuestras hacia la cuchilla mayor o menor según el grosor de corte seleccionado. En el portamuestras existe un sistema mecánico que permite orientar la superficie de corte de la muestra respecto a la cuchilla. En estos microtomos la cuchilla se mantiene fija durante el proceso de corte, pero puede regularse el ángulo de ataque, es decir, el ángulo de la hoja de la cuchilla respecto a la superficie de la muestra. Con el microtomo de deslizamiento (Figura 7) se obtienen cortes mediante un movimiento de deslizamiento del bloque sobre la cuchilla, o viceversa. En estos microtomos el movimiento lo proporciona directamente la mano, que es de ida y vuelta, siendo en la vuelta cuando se eleva la posición del bloque, o disminuye la de la cuchilla, una distancia que nos dará el grosor del corte.

Tanto el microtomo de rotación como el de deslizamiento tienen ventajas e inconvenientes. La principal ventaja del de rotación es su precisión, la posibilidad de obtener secciones seriadas con facilidad y la automatización del proceso de corte mediante motores eléctricos. Los microtomos de deslizamiento son más sencillos mecánicamente y su disposición permite cortar bloques más grandes, o bloques de celodina, aunque este tipo de microtomos está cayendo en desuso.

Hay que llevar a cabo una serie de procesos sobre el bloque de parafina antes de hacer el primer corte útil a nuestra muestra (Figura 8). En primer lugar hay que



Figura 6: Microtomo para parafina con mecanismo de rotación.

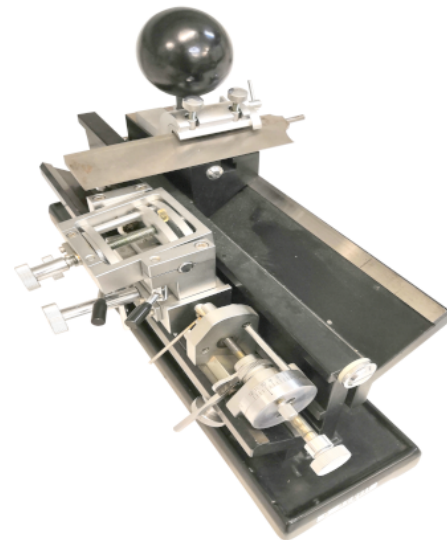


Figura 7: Microtomo para parafina con mecanismo de deslizamiento.

retallar el bloque hasta hacer una pirámide truncada. Antes de retallar hay que considerar cual de las caras laterales de esta pirámide será el frente de ataque, es decir, cual será la que primero se ponga en contacto con la cuchilla. Esta cara deberá ser más ancha que la opuesta, y ambas han de ser paralelas. Con el retallado se consigue una buena orientación de nuestra

muestra en las secciones, la diferencia en el tamaño de la caras permite que cada nuevo corte arrastre sin problemas al previamente cortado y, por último, al ser las caras paralelas permite que se obtengan tiras rectas de cortes. Una vez retallada la pirámide, y antes de obtener secciones de nuestra muestra, es necesario un proceso de desbastado, es decir, la eliminación del espesor de parafina que hay entre la superficie del bloque y nuestra muestra.

Otro aspecto que hemos de tener en cuenta antes de empezar a cortar es el ángulo de ataque o inclinación de la cuchilla respecto a la superficie de corte de la pirámide. Lo normal es orientar la cuchilla con un ángulo de unos 10 grados respecto a la superficie de corte, aunque se puede modificar según nuestras necesidades.

Una vez comenzado el corte de nuestra muestra se obtienen tiras de secciones unidas por las caras paralelas a la cuchilla (Figura 9). Estas tiras se suelen manipular con pinceles o lancetas y, antes de su fijación definitiva en la superficie de un portaobjetos, han de estirarse para que nuestro tejido quede perfectamente extendido. Aprovechando la hidrofobicidad de la parafina, las secciones se colocan sobre agua calentada a unos 35 °C a 40 °C y el calor estira la secciones sin llegar a su punto de fusión de la parafina, que está en torno a los 60 °C. El estiramiento se pue-

de realizar en baños de agua con regulación térmica o sobre los propios portaobjetos cubiertos de agua y colocados sobre una plancha térmica regulable (Figura 4).

Una vez que el agua se ha evaporado y están extendidas las tiras de cortes de parafina sobre el portaobjetos, se procede a un secado exhaustivo en una estufa a una temperatura de entre 35 °C y 40 °C durante toda la noche. Una vez secos, los portaobjetos con las secciones están listos para el procesamiento posterior.

La superficie del portaobjetos donde se colocan las tiras de cortes ha de estar previamente tratada para que nuestro tejido quede adherido durante el procesamiento posterior. Para ello los portaobjetos se recubren con soluciones de gelatina, albúmina, u otras sustancias. Cuando se evapora el agua estas sustancias hacen de adhesivo entre el cristal y nuestro tejido.

Una vez que el agua se ha evaporado y están extendidas las tiras de cortes de parafina sobre el portaobjetos, se procede a un secado exhaustivo en una estufa a una temperatura de entre 35 °C y 40 °C durante toda la noche. Una vez secos, los portaobjetos con las secciones están listos para el procesamiento posterior.

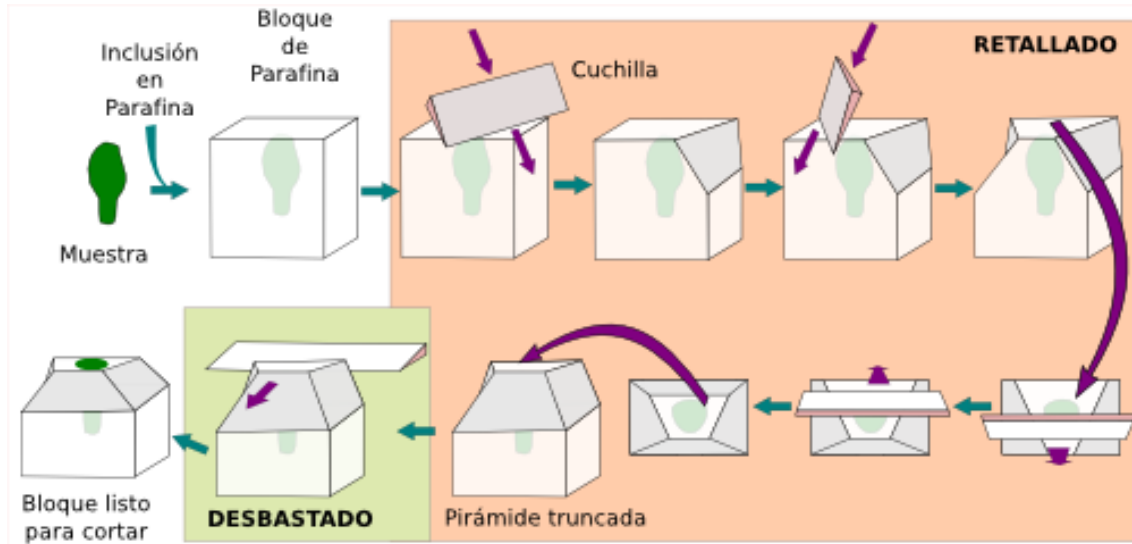


Figura 8: Preparación del bloque de parafina antes de iniciar la obtención de secciones útiles.

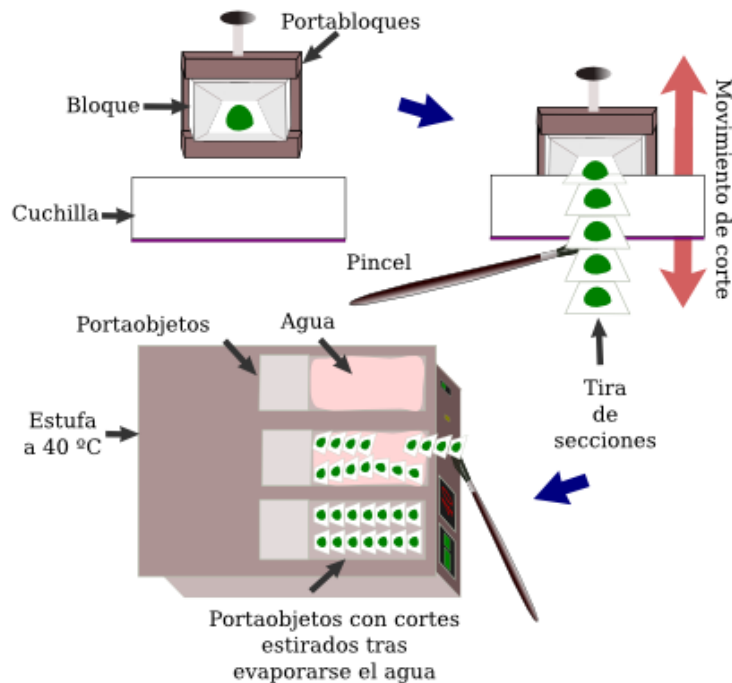


Figura 9: Una vez se ha retallado y desbastado el bloque se obtienen las secciones en tiras que serán colocadas sobre un portaobjetos cubierto con agua calentada a unos 40 °C. El portaobjetos ha sido tratado previamente con soluciones adhesivas. El calor y la hidrofobicidad de la parafina hace que las secciones se estiren sobre la superficie del agua y una vez evaporada queden adheridas al portaobjetos.

5 Vibratomo

Puede haber varias razones para evitar la inclusión de un tejido del que posteriormente obtener secciones. Durante los procesos de inclusión, como las inclusiones en parafina o en resinas tipo epoxy, se ha de someter a las muestras a deshidratación. Esto ocasiona a veces daño en algunas moléculas o regiones moleculares que son las que queremos detectar posteriormente con técnicas como la inmunohistoquímica o la hibridación *in situ*. Además, para observar algunas características tisulares o celulares se requieren secciones gruesas del orden de 50 μm , a veces de 100 o 200 μm . Por ejemplo, para estudiar la organización espacial de determinadas células como las neuronas es recomendable hacer cortes de un grosor superior a las 50 μm y emplear inmunohistoquímica o histoquímica para ponerlas de manifiesto. La obtención de secciones gruesas sin necesidad de inclusión se puede conseguir de dos maneras diferentes: mediante congelación de la muestra y posterior corte en un microtomo de congelación o mediante el uso del vibratomo (Figura 10).



Figura 10: Vibratomo. La cubeta, de color negro, ha de estar llena de tampón de trabajo durante el proceso de corte de manera que la cuchilla y la muestra, de color rojo, y las secciones que se obtienen están sumergidos.

El vibratomo es un aparato con el que se obtienen secciones de un grosor que puede oscilar entre las 40-50 μm hasta varios centenares de μm partiendo de una muestra animal o vegetal endurecida sólo me-

dante fijación. El mecanismo de corte consiste de una plataforma sobre la que se sitúa la muestra, que puede regularse en altura y nos permite seleccionar el grosor del corte, y de una cuchilla de borde muy afilado que se desplaza horizontalmente sobre la muestra realizando el corte. La característica del vibratomo es que la cuchilla, además de avanzar sobre la muestra, posee un movimiento de vibración lateral a modo de sierra que facilita el corte y evita arrastrar el tejido (Figura 11). La muestra se encuentra adherida, normalmente mediante pegamento de contacto (Figura 12), directamente a un bloque portamuestras que se coloca sobre la plataforma elevadora.

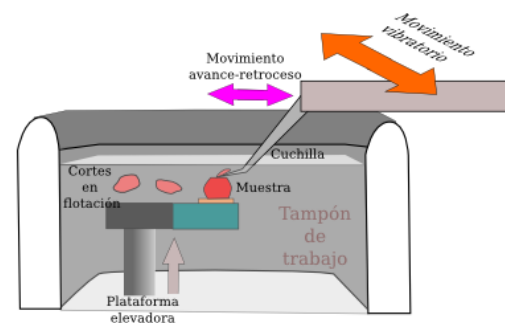


Figura 11: Vista lateral de la cubeta de un vibratomo.

No todas las muestras son apropiadas para ser cortadas en un vibratomo. Así, aquellas que sean muy blandas o que posean porciones demasiado duras o elásticas son normalmente arrastradas por la cuchilla, a pesar de que disminuyamos la velocidad de avance y aumentemos la oscilación de la cuchilla. Es decir, la muestra ha de tener una cierta consistencia y no poseer elementos distorsionadores del corte.

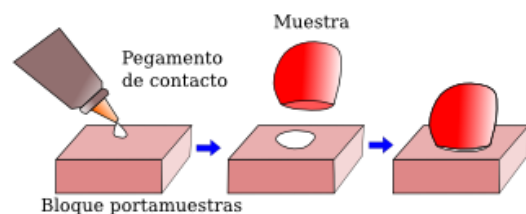


Figura 12: Pegado de la muestra al bloque portamuestras.

Otra característica del vibratomo es que todo el proceso de corte se realiza bajo una solución acuosa que normalmente es una solución tamponada o una solución salina (Figura 2). Para ello tanto la mues-

tra como el borde de corte de la cuchilla han de estar sumergidos y los cortes que se obtienen se denominan cortes en flotación, es decir, no sujetos a ningún soporte. Estos cortes se pueden procesar de esta manera, flotando, o adherirse a un portaobjetos y procesarlos después. Sin embargo, el proceso de secado necesario para la adhesión al portaobjetos suele conllevar alteraciones de la calidad del tejido. Así, los cortes se suelen procesar durante toda la técnica en flotación y posteriormente se montan sobre portaobjetos para su observación con el microscopio óptico.

Hay que tener en cuenta que los cortes de vibratomo son muy gruesos y están en muy buenas condiciones de preservación. Si se quieren detectar moléculas en zonas profundas de la sección normalmente se procede a una permeabilización del tejido. Esto suele hacerse con detergentes como el Tween-20 o el Triton-X100, o con congelaciones rápidas a muy bajas temperaturas cuando queremos preservar las membranas.

6 Criotomos

La congelación de los tejidos es una manera rápida de endurecerlos sin necesidad de inclusión. Esto tiene una serie de ventajas. a) La preservación molecular es máxima, lo cual es muy importante si el procesamiento posterior requiere el reconocimiento molecular. b) Las muestras congeladas pueden cortarse en secciones finas, del orden de 5-15 μm , y más gruesas del orden de cientos de μm , pero también en secciones ultrafinas del orden de nanómetros. c) La obtención de buenas secciones no depende del tipo de tejido (excepto tejidos mineralizados como el hueso o aquellos excesivamente cornificados). d) Por último, es posiblemente la manera más rápida de obtener secciones puesto que se puede congelar la muestra sin necesidad de fijación y cortarla de inmediato, como las biopsias. Pero para preservar correctamente la estructura del tejido ha de ser una congelación muy rápida, normalmente en isopentano enfriado con nitrógeno líquido, lo que evita la formación de grandes cristales de hielo que deterioran las estructuras celulares.

Los dos aparatos más usados para realizar cortes por congelación son el microtomo de congelación y el criostato.

El microtomo de congelación (Figura 13) realiza cortes de decenas de μm de grosor y consiste en una plataforma que se enfría a bajas temperaturas sobre la que se coloca la muestra. Tras cada corte la plataforma se eleva un espacio correspondiente al grosor de corte seleccionado. En los microtomos de congelación antiguos se producía la congelación mediante gas carbónico que había que suministrar regularmente. Actualmente se produce la congelación (de -30°C a -40°C) de la plataforma mediante tubos que parten de un sistema de refrigeración externo al propio dispositivo de corte. Además, existe la posibilidad de congelar también la cuchilla si se desea. En los aparatos actuales la muestra se congela por contacto directo con la plataforma y su temperatura es constante durante todo el tiempo de corte. Las secciones que se obtienen, de decenas a cientos de μm , se recogen con un pincel, se añaden a un recipiente con tampón de trabajo y se trabaja con ellas en flotación, igual que en el caso del vibratomo. celulares.

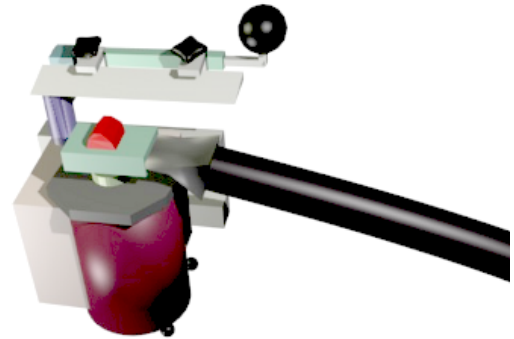


Figura 13: Microtomo de congelación. El tubo negro de la derecha es el encargado de enfriar el portabloques a temperaturas inferiores a -20°C , lo cual congela a su vez a la muestra (color rojo). Las secciones se recogen de la cuchilla con un pincel y se colocan en tampón de trabajo.

En el caso de que no se requiera un corte rápido las muestras normalmente se fijan y posteriormente se sumergen en una solución anticongelante que contiene sacarosa y glicerol. Con ello se evita que durante la congelación se formen cristales de hielo grandes que puedan dañar las estructuras celulares. También se evitan daños tisulares con una congelación muy rápida, por ejemplo, con nitrógeno líquido. Dicha congelación permite preservar incluso la ultraestructura celular y observarla al microscopio electrónico, siempre con el uso previo de anticongelantes. Para observaciones que no necesiten una preservación ultraestructural se suele realizar la congelación de la muestra a temperaturas superiores (entre -80°C y -20°C) que dependen del aparato empleado para realizar los cortes.

El criostato (Figura 14) se utiliza para obtener secciones por congelación de 10 a 30 μm de grosor, aproximadamente. En este aparato todo el sistema de corte se encuentra encerrado en una cámara refrigerada cuya temperatura se puede regular, normalmente entre -20 y -30°C (Figura 15). La congelación se suele hacer en una plataforma dentro de la propia cámara refrigerada que se encuentra a una temperatura inferior, en torno a -50°C . También se puede congelar el tejido externamente con la rapidez que deseemos, por ejemplo con nitrógeno líquido, pero es conveniente colocar la muestra en la cámara del

criostato hasta que consiga igualar su temperatura con la de ésta para obtener secciones homogéneas. Antes de la congelación, la muestra se encastra en un medio que es líquido a temperatura ambiente y sólido a la de corte. Por tanto, tenemos nuestra muestra en un bloque sólido, encastrada pero no incluida. Esto permite manipular la muestra y adherirla a un soporte portamuestras, el cual se fijará a un eje que avanza sobre la cuchilla. La preparación del bloque y el mecanismo de corte es similar al que se describió para el microtomo de rotación para parafina. Las secciones que se van obteniendo se adhieren por contacto a portaobjetos con superficies adhesivas (Figura 16). Las secciones se descongelan rápidamente en este proceso de pegado puesto que los portaobjetos están a temperatura ambiente y una vez secas pueden procesarse para las técnicas que deseemos.



Figura 14: Criostato. El compartimento de color azul es la cámara refrigerada a la temperatura seleccionada. En esta cámara se encuentra la muestra, la cuchilla y es donde se recogen las secciones.

Todavía existe un tipo de criotomo mucho más sofisticado denominado ultracriotomo. Este aparato se emplea para obtener secciones ultrafinas, del orden de decenas de nanómetros, para su observación con el microscopio electrónico de transmisión. La ven-

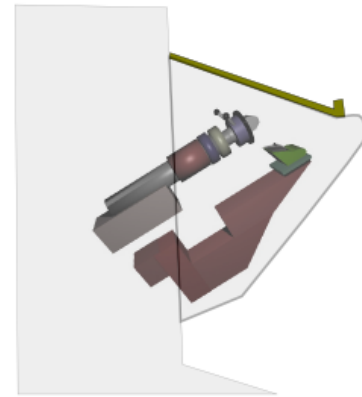


Figura 15: Criostato. El mecanismo de rotación y corte del criostato se encuentra dentro de una cámara refrigerada.

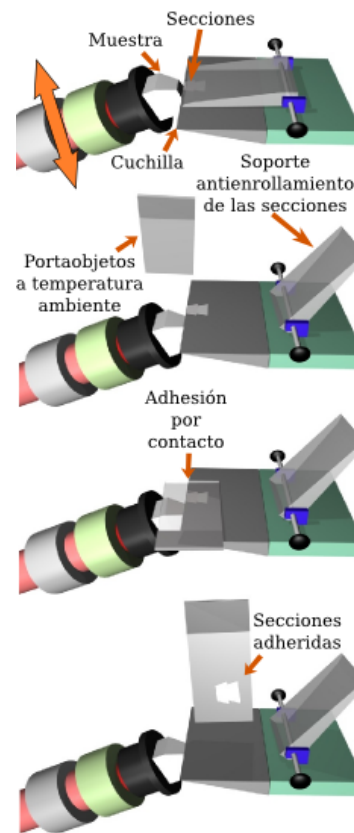


Figura 16: Criostato. Proceso mediante el que se pegan las secciones a un portaobjetos.

taja de este aparato respecto al ultramicrotomo (ver en siguiente página) es que los tejidos no pasan por solventes orgánicos, ni temperaturas elevadas, y por tanto la preservación molecular es mayor.

7 Ultramicrotomo

Para la observación con detalle de la ultraestructura celular es necesario realizar secciones muy delgadas, del orden de nanómetros, denominadas ultrafinas, y observarlas con el microscopio electrónico de transmisión. Para ello se incluye la muestra en resina, generalmente de tipo epoxy, que una vez polimerizada resulta en un bloque de gran dureza. La obtención de secciones ultrafinas se lleva a cabo con un aparato denominado ultramicrotomo (Figura 17). Otra manera menos habitual de obtener secciones ultrafinas es mediante el ultracriotomo, para lo cual la muestra se congela y se corta en una cámara refrigerada a muy bajas temperaturas. Este último es un mecanismo similar al visto para el criostato. Es un aparato que sólo se usa cuando queremos estudiar con microscopía electrónica moléculas que son dañadas durante el proceso de inclusión.

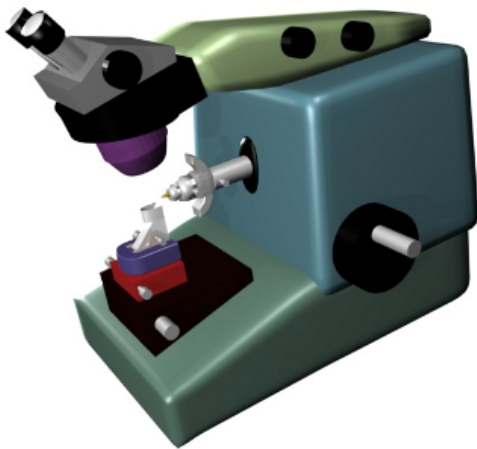


Figura 17: Ultramicrotomo

El ultramicrotomo tiene un diseño para hacer secciones de un modo similar al microtomo de parafina de rotación, pero mucho más preciso y sofisticado. Quizá el sistema más delicado sea el que hace avanzar el bloque sobre la cuchilla pues debe hacerlo a intervalos de varios nanómetros. Actualmente este sistema de avance es mecánico, pero en los ultramicrotomos más antiguos era por calor, que producía dilatación del eje sobre el que se sujetaba la muestra. También tiene un sistema completo de orientación de la muestra sobre el borde de la cuchilla para que el

plano de corte se pueda orientar perfectamente a la superficie de nuestra muestra. Al realizar cortes muy delgados cualquier vibración o cambio de temperatura afecta la homogeneidad del grosor del corte, por tanto el ultramicrotomo debe situarse en una habitación donde no haya vibraciones y mantenerla a temperatura constante para evitar dilataciones del brazo que porta la muestra, dentro de lo posible. Además, estos aparatos se colocan sobre mesas especiales para disminuir las vibraciones. Todos los ultramicrotomos actuales tienen un panel de control externo al aparato desde donde se controla el proceso de corte: inicio de corte, grosor de la sección, velocidad de corte, ventana de corte, iluminación de la muestra, etcétera.

Antes de realizar el primer corte ultrafino de una muestra, al igual que ocurría con los cortes de parafina, es necesario retallar y desbastar el bloque para crear una pirámide truncada. Aunque todo este proceso se puede hacer a mano con una cuchilla, se suele utilizar un aparato denominado piramidotomo con el que se liman y crean las caras de la pirámide con un dispositivo a modo de torno, además de producir el desbastado para obtener la superficie de corte. Hay que tener en cuenta que este proceso ha de ser preciso porque la superficie de corte debe ser muy pequeña, en torno a unos 0,5 mm². Los lados de la superficie de corte deben ser similares a los descritos para el corte en inclusiones de parafina, dos lados han de ser paralelos y uno más grande que el otro. Con esto nos aseguramos que una nueva sección empujará a la previa del borde de la cuchilla y que conseguiremos tiras rectas de secciones. Antes de hacer las secciones ultrafinas se suele hacer una sección semifina, de 0,5 a 1 µm de espesor para observar una imagen de la muestra al microscopio óptico. Esto es útil para dar contexto a las imágenes de microscopía electrónica que se obtendrán.

Las cuchillas empleadas para hacer secciones ultrafinas son específicas para este tipo de aparatos puesto que han de tener unos filos muy agudos. Las más comúnmente usadas son de vidrio especial y se obtienen mediante unos aparatos que mediante ralladuras con puntas de diamante y golpes secos sobre las barras de vidrio son capaces de producir dichas cuchillas (Figura 18). Sin embargo, la mejor calidad de corte se consigue con cuchillas con filo de diamante,

pero son mucha más caras. Aunque los ultramicrotomos actuales tienen mecanismos de corte precisos, durante el proceso de corte se pueden obtener secciones de distinto grosor. El grosor de una sección ultrafina se conoce por el color que produce el reflejo de la luz sobre su superficie. Este color puede ser gris (menos de 60 nm), plata (60 a 90 nm), oro pálido (90 a 120 nm), oro intenso (120 a 150 nm), púrpura (150 a 190 nm), etcétera.

Las secciones ultrafinas recién obtenidas quedan flotando sobre una balsa de agua que posee la propia cuchilla y no se recogen sobre portaobjetos sino directamente sobre soportes de níquel o cobre denominados rejillas (Figuras 19 y 20). Son discos circulares con un enrejado de hilos que dejan cavidades, las cuales son

de distinto tamaño según el tipo de rejilla, normalmente desde 100 a varios cientos de μm cuadradas. Estas rejillas tienen la ventaja de permitir una gran nitidez de las imágenes del tejido que ofrece el microscopio electrónico puesto que los electrones sólo atraviesan la sección antes de incidir sobre la pantalla de visualización. Sin embargo, presentan el problema de que la porción de sección que caiga sobre el hilo de la rejilla quedará oculto. Por ello existen las "rejillas" de ojal, que tienen una sola cavidad y suficientemente grande como para que quepa un corte entero. Obviamente es necesario suministrar un soporte para que la sección no se cuele por la cavidad. Este soporte es normalmente una membrana muy fina hecha de una sustancia denominada formvar, la cual deja pasar los electrones y sostiene a las secciones.

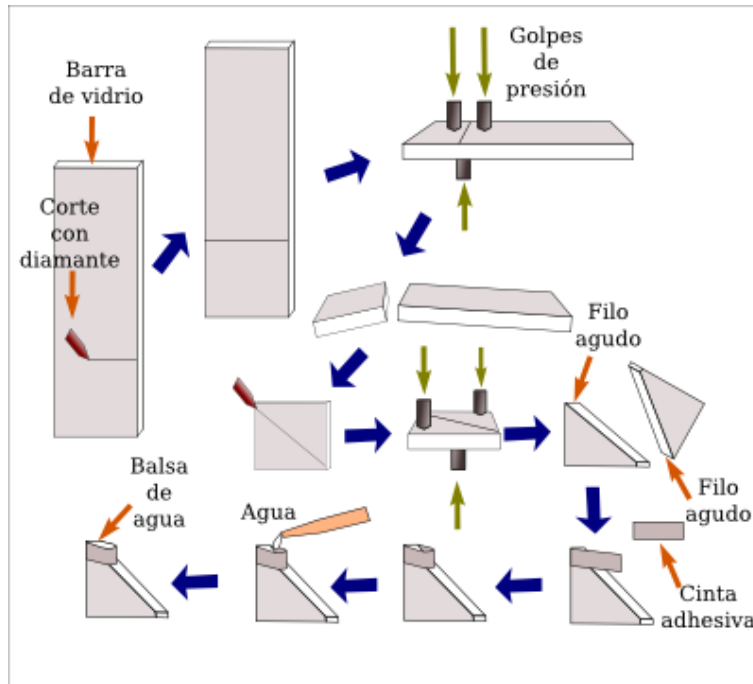


Figura 18: Proceso por el que se obtiene una cuchilla para hacer cortes en el ultramicrotomo.

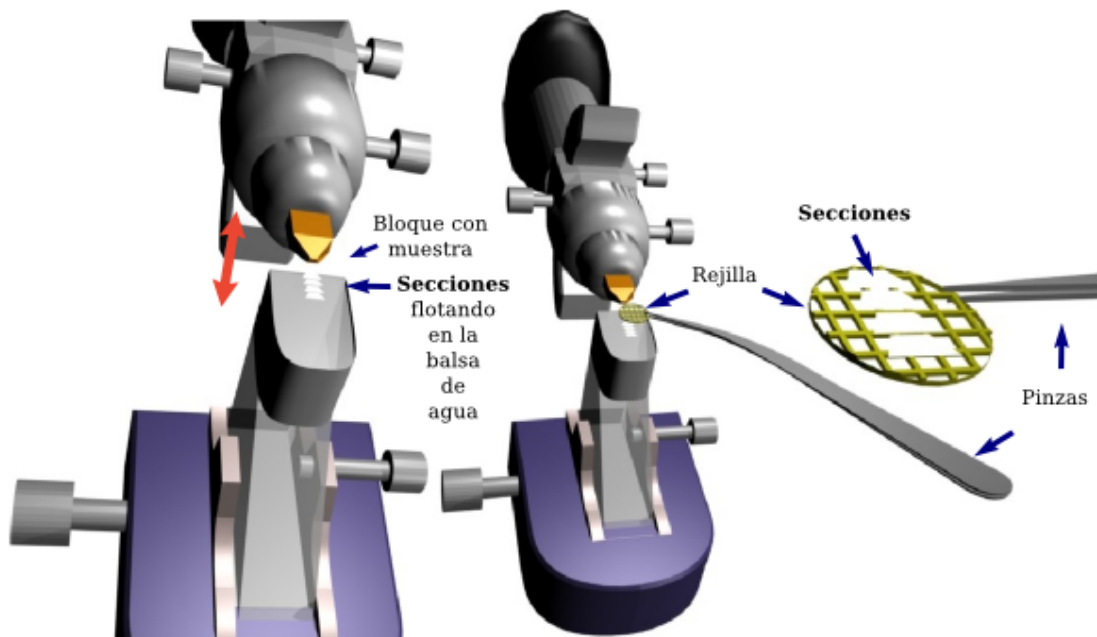


Figura 19: Corte y recogida de secciones en una rejilla.



Figura 20: Tipos de rejillas para la recojida de cortes ultrafinos.