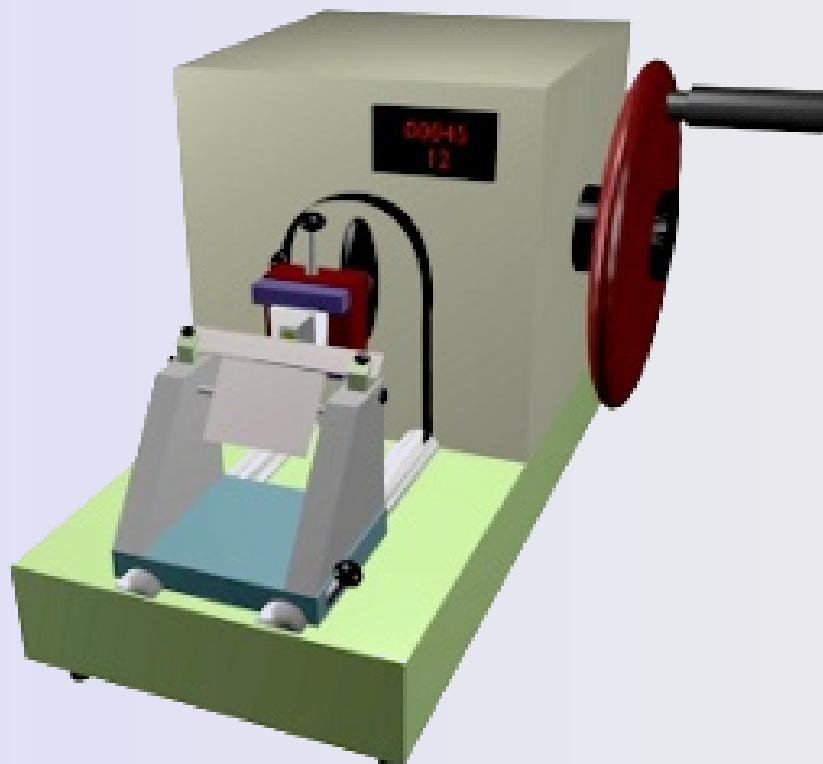


ATLAS de HISTOLOGÍA VEGETAL y ANIMAL

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: Enero 2016)

Este documento es una edición en pdf del sitio
<http://mmegias.webs2.uvigo.es/mmegias/inicio.html>

y

ha sido creado con el programa Scribus

(<http://www.scribus.net/>)

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).

ÍNDICE

Introducción	4
El proceso hisológico	5
Corte	7
Microtomo de parafina	8
Vibratomo	11
Criostato	13
Ultramicrotomo	15

Introducción

En estas páginas dedicadas a las técnicas histológicas vamos a describir los procesos 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 y tinción 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.

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 que la estructura de los tejidos está basada en la organización de los tipos de células que los componen y, salvo contadas ocasiones, las

características morfológicas de las células sólo se pueden observar con estos aparatos.

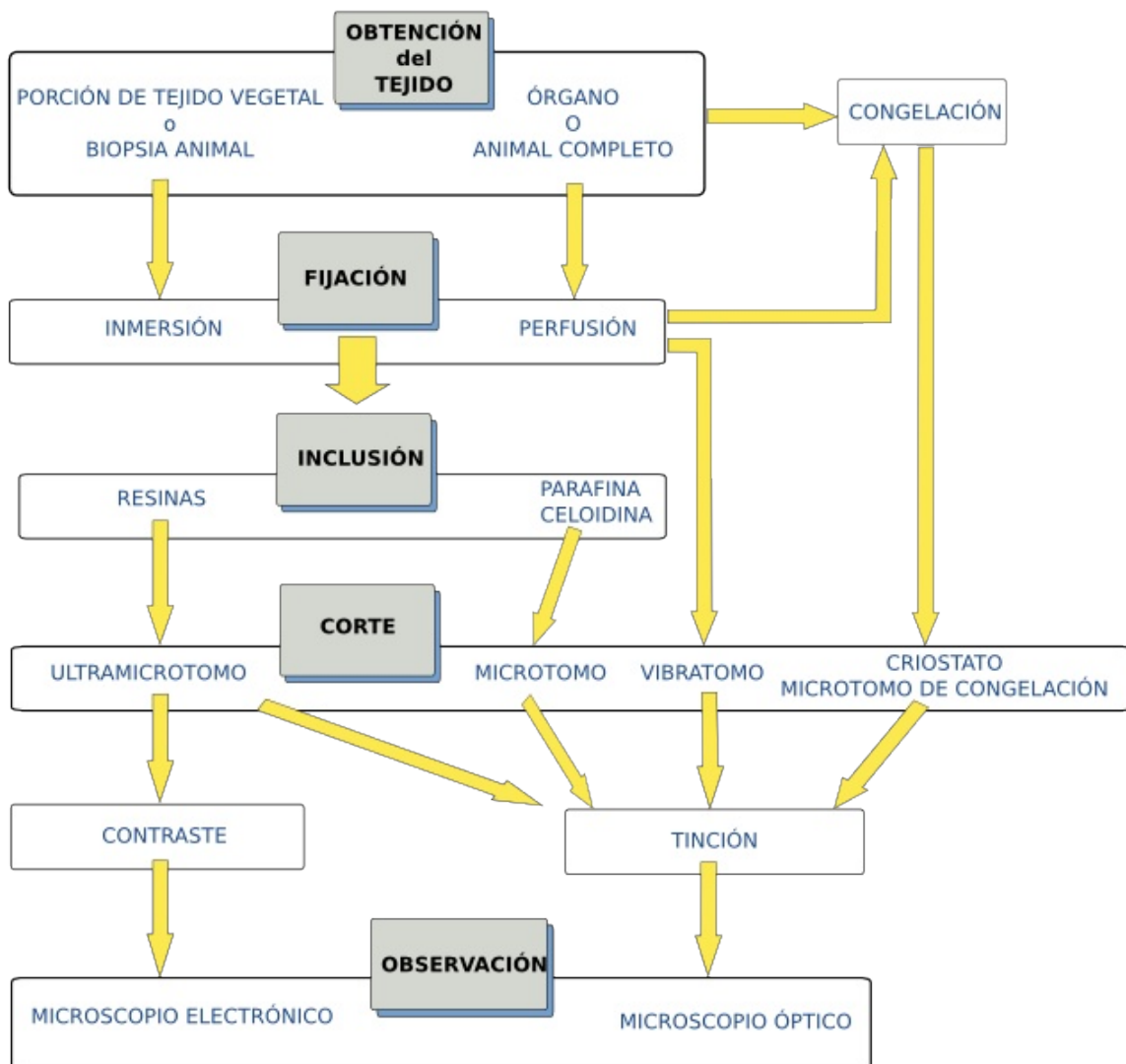
Existen procedimientos rápidos y simples para la observación de tejidos y células vivas que reciben el nombre de vitales. Por ejemplo, la observación del flujo sanguíneo en capilares del sistema circulatorio. Otra forma de observar células o tejidos vivos es mediante las técnicas histológicas supravitales,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

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 mejor o peor dependiendo del tipo de técnica. Estas páginas estarán dedicadas a este tipo de técnicas, puesto que son las más comúnmente usadas en los laboratorios de histología.

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, series de técnicas que se utilizarán dependiendo de qué característica deseemos observar. En el siguiente esquema se muestran los métodos y técnicas comúnmente empleados para 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 con unos soluciones líquidas denominadas fijadores, las cuales se usan para mantener las estructuras celulares y moleculares inalterables durante el procesamiento posterior y con una organización lo más parecida posible a como se



Esquema del proceso histológico.

encontraban en la muestra viva. También podemos fijar las moléculas de los tejidos por congelación rápida. Fijar un tejido es como hacer una fotografía de dicho tejido, su estructura se mantendrá hasta su observación. 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.

Normalmente, tras la fijación se procede a 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. 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.

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 ultrafinas (del orden de nanómetros), semifinas (de 0.5 a 2 μm), finas (entre unas 3 y 10 μm) y gruesos (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 puedan 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.

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, fluorescencia, contraste de fase, polarización o contraste de interferencia diferencial, mientras que los segundos permiten un gran poder de resolución, pudiéndose observar características ultraestructurales.

Como dijimos al comienzo existen múltiples variaciones 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. En las siguientes páginas veremos con cierto detalle algunas de las técnicas más empleadas para la observación de los tejidos.

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 si no 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 unos cuantos nanómetros hasta centenares de micras. Algunos tejidos como los de las plantas, por sus características celulares, permiten su observación en secciones de cientos de micras 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 congelación.

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

Los microtomos más usados son:

Microtomo para parafina. 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. Es un dispositivo muy sencillo que consta de un soporte para sujetar la muestra. Los cortes se realizan a mano con una 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.

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

Microtomo de congelación. Con él se consiguen secciones de 30 a unas 100 μm de grosor a parti de material congelado y se observación con el microscopio óptico.

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

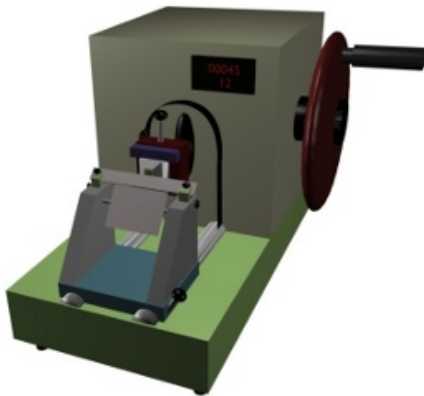
Ultramicrotomo. Con él se corta material incluido en resinas y se obtienen secciones de 1 a decenas de nanómetros de grosor. Las secciones de 0.5 μm o más se observan con el microscopio óptico, mientras que las de un grosor de decenas de nanómetros van destinadas a ser observadas con el microscopio electrónico de transmisión.

Ultracriostato: Su uso no está muy extendido pero se suele emplear cuando se necesitan secciones del orden de nanómetros 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 ya que no necesita incluir el tejido, incluso se puede cortar material no fijado.

Microtomo 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 portabloques y un sistema mecánico que permite acercar el bloque de parafina a la cuchilla, a una distancia que se corresponde con el grosor de la sección que pretendemos obtener, y realizar el corte.

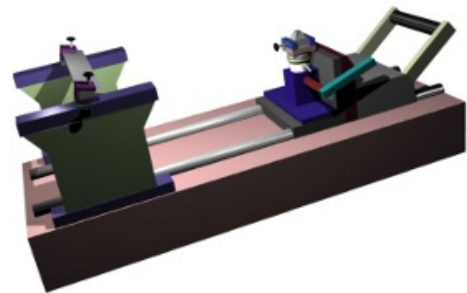


Microtomo para parafina con mecanismo de rotación.

Hay dos tipos de microtomo para parafina: el de rotación y el de deslizamiento. El microtomo de rotación provoca el corte gracias a la transformación de un movimiento de rotación en otro de ascenso y descenso del portamuestras. En el movimiento de bajada sobre la cuchilla se produce un acercamiento del portamuestras hacia la cuchilla 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 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 y es de ida y vuelta, siendo en la vuelta cuando se eleva la posición del bloque, o de la cuchilla, una distancia que nos

dará el grosor del corte.

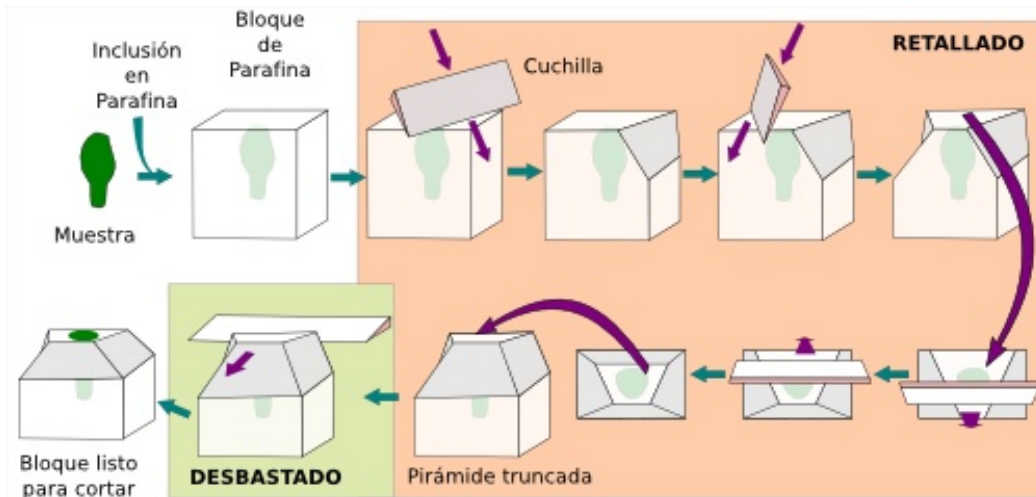
Tanto el microtomo de rotación como el de deslizamiento tienen ventajas e inconvenientes. La principal ventaja del de rotación es su precisión, la posibilidad de obtener secciones seriadas con facilidad y la automatización del proceso de corte mediante motores eléctricos. Los microtomos de deslizamiento son más



Microtomo para parafina con mecanismo de deslizamiento.

sencillos mecánicamente y su disposición permite cortar bloques más grandes o bloques de celoidina, aunque están 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. En primer lugar hay que 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 las caras permite que cada nuevo corte arrastre sin problemas al previamente cortado y, por último, las caras paralelas hacen que se obtengan tiras rectas de cortes. Una vez retallada la pirámide, y antes de obtener secciones de nuestra muestra, es necesario un

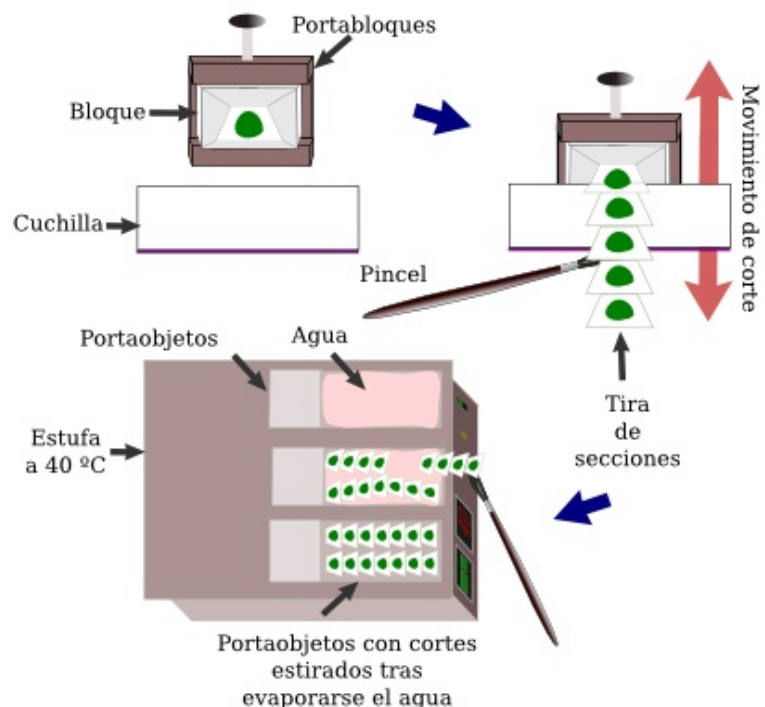


Preparación del bloque de parafina antes de iniciar la obtención de secciones útiles.

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° 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. 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 las hace extenderse sin llegar a su punto de fusión, que está en torno a los 60°C . El estiramiento se puede realizar en baños de agua con regulación térmica o sobre los propios portaobjetos cubiertos de agua y



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.

colocados sobre una plancha térmica regulable.

La superficie del portaobjetos donde se colocan las tiras de cortes ha de estar previamente tratada para que nuestro tejido quede adherido durante el

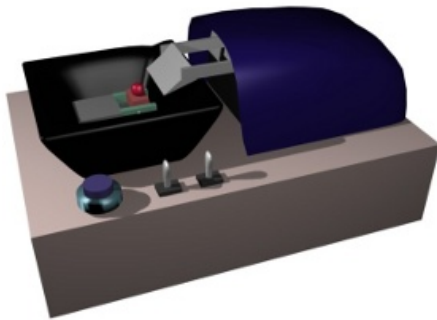
procesamiento posterior. Para ello los portaobjetos se recubren con soluciones de gelatina, albúmina, u otras sustancias y se dejan secar, de manera que hacen de adhesivo entre el cristal y nuestro tejido.

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.

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



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.

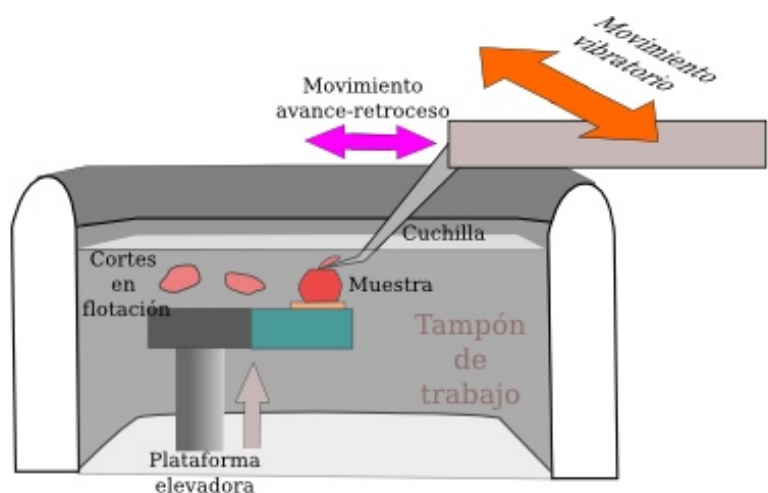
inmunocitoquímica. Además, para observar algunas características tisulares o celulares se requieren secciones gruesas del orden de 50 μm , a veces de 100 o 200 μm . Por ejemplo, para estudiar la organización espacial de determinadas células como las neuronas es recomendable hacer cortes de un grosor superior a las 50 μm y emplear inmunocitoquímica 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 corte en un microtomo de congelación o mediante el uso del vibratomo.

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 endurecida sólo mediante 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. La muestra se encuentra adherida, normalmente mediante pegamento de contacto, directamente a un bloque portamuestras que se coloca sobre la plataforma elevadora.

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.

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. Para ello tanto la muestra como el borde de corte de la cuchilla



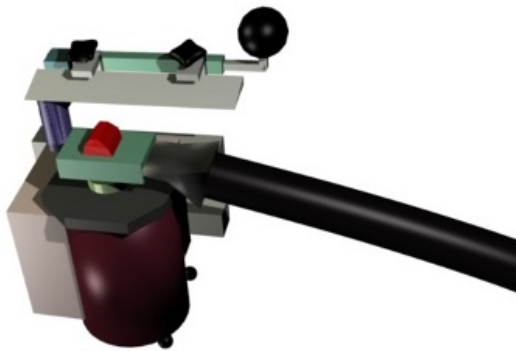
Vista lateral de la cubeta de un vibratomo.

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.

Criotomo

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



Microtomo de congelación. El tubo negro de la derecha es el encargado de enfriar el portabloques a temperaturas inferiores a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, 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.

gruesas del orden de cientos de μm . El vibratomo permite también cortes sin incluir pero no se pueden conseguir secciones finas. 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 es posible 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 cristales de hielo que deterioran las estructuras celulares.

En el caso de que no se requiera un corte rápido las muestras normalmente se fijan y

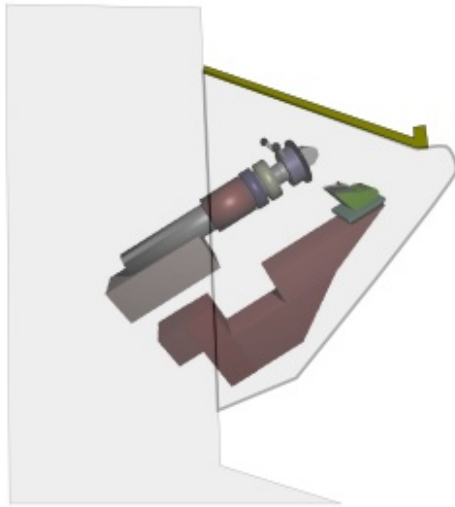
posteriormente se incuban en una solución anticongelante que contiene sacarosa y glicerol. Con ello se evita que durante la congelación se formen cristales de hielo grandes que puedan dañar las estructuras celulares. También se evitan daños tisulares con una congelación muy rápida, por ejemplo, con nitrógeno 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 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$) que dependen del aparato empleado para realizar los cortes, lo cual hace necesario el uso previo de anticongelantes.

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

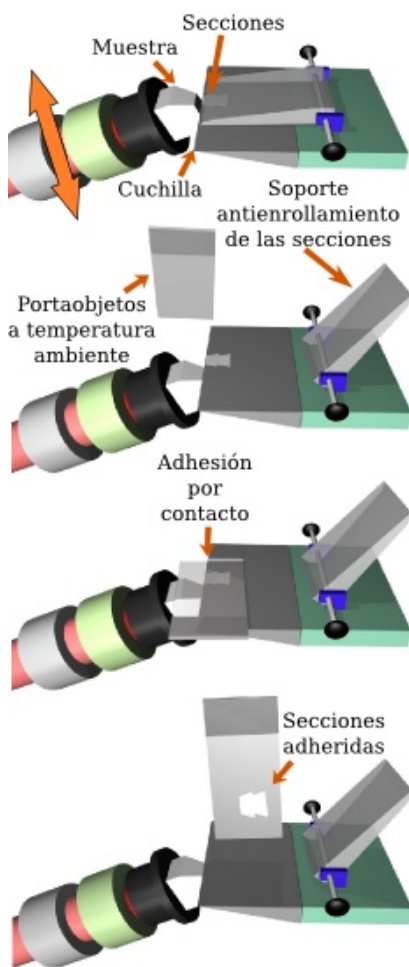


Criostato. El compartimento de color azul es la cámara refrigerada a la temperatura seleccionada. En esta cámara se encuentra la muestra, la cuchilla y es donde se recogen las secciones.

un espacio correspondiente al grosor de corte seleccionado. En los microtomos de congelación



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



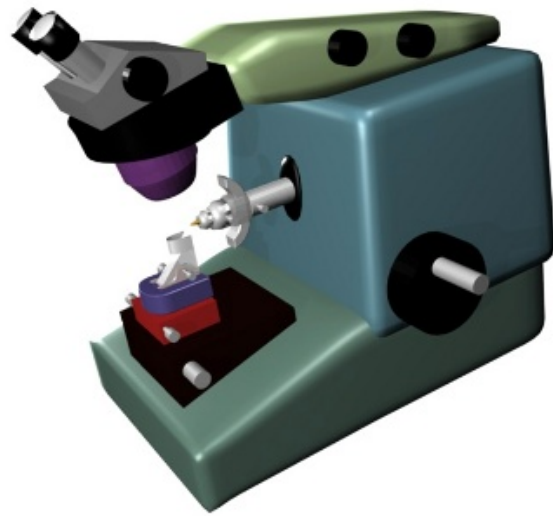
Criostato. El mecanismo de rotación y corte del criostato se encuentra dentro de una cámara refrigerada.

antiguos se producía la congelación mediante gas carbónico que había que suministrar regularmente. Actualmente se produce la congelación (de -30 a menos -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.

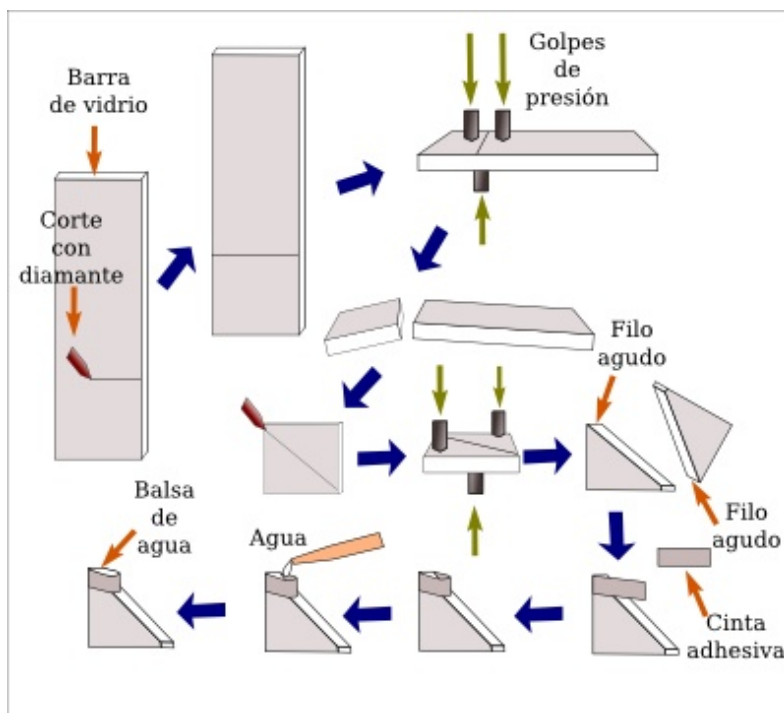
El criostato se utiliza para obtener secciones por congelación de 10 a 30 μm , aproximadamente. En este aparato todo el sistema de corte se encuentra encerrado en una cámara refrigerada cuya temperatura se puede regular, normalmente entre -20 y -30 °C. La congelación se suele hacer en una plataforma 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, encastrado pero no incluido. 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. 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.

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. 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 detectar con



Ultramicrotomo



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

microscopía electrónica moléculas que son dañadas durante el proceso de inclusión.

El ultramicrotomo tiene un diseño de corte similar al microtomo de parafina de rotación, pero mucho más preciso y sofisticado. Quizá el sistema más delicado sea el que hace avanzar el

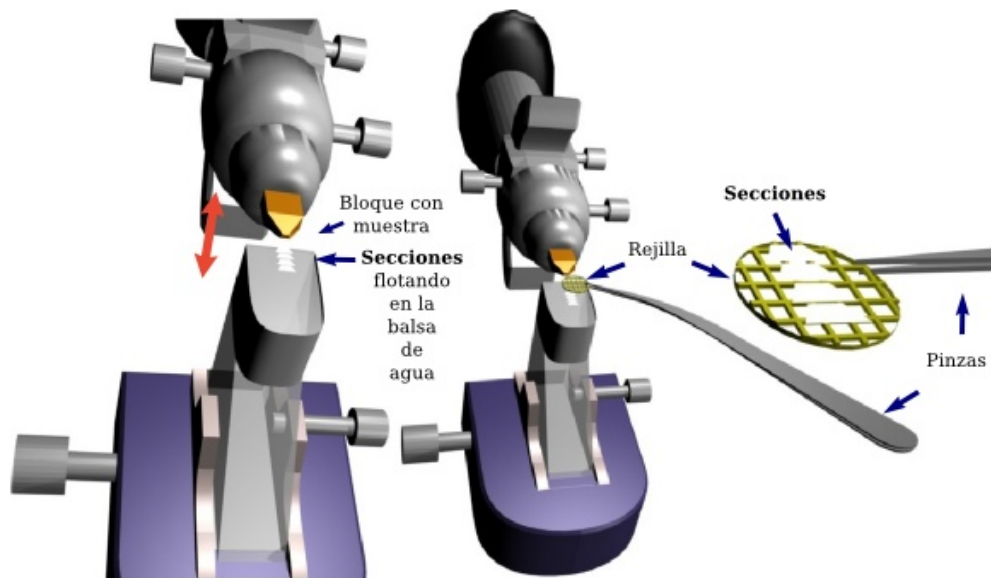
bloque sobre la cuchilla pues debe hacerlo a intervalos de varios nanómetros. Actualmente este sistema de avance es mecánico pero en los ultramicrotomos más antiguos era por calor, que producía dilatación del eje sobre el que se sujetaba la muestra. También tiene un sistema completo de orientación de 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 electrónicamente 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 piramitomo que lima y crea 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

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 barras de vidrio son capaces de producir dichas cuchillas. 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



Corte y recogida de secciones en una rejilla.

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 o 1 µm para tener una imagen de la muestra al microscopio óptico.

Las cuchillas empleadas para hacer secciones

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 obtenidos quedan flotando sobre una balsa de agua que posee la propia cuchilla y no se recojen sobre portaobjetos sino directamente sobre soportes de níquel o cobre denominados rejillas. 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 que permiten 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.