

# **Metodología de la microscopía electrónica de transmisión/barrido**

Asunción Campos Rosende

Sección de Genética.  
Hospital Materno Infantil "Teresa Herrera".  
La Coruña.

Actualmente, el término microscopio electrónico no se refiere a un instrumento con un diseño determinado, sino mas bien a una gama de instrumentos que ofrecen imágenes aumentadas de una muestra específica.

Desde que en el año 1931 Ruska obtuviera las primeras imágenes con un microscopio electrónico hasta hoy, podemos agrupar estos aparatos en varios tipos, cuyas siglas están tomadas de sus nombres en inglés:

- TEM: Transmission Electron Microscope.
- HVEM: High Voltage Electron Microscope.
- SEM: Scanning Electron Microscope.
- STEM: Scanning Transmission Electron Microscope.
- STM: Scanning Tunnelling Microscope.

El microscopio electrónico emite un haz de electrones que puede producir magnificaciones progresivas hasta 1 millón de aumentos, mientras que el poder de resolución del microscopio óptico llega aproximadamente a 1.250 aumentos. El poder de resolución es la distancia más pequeña entre dos puntos del objeto que se puede diferenciar.

## **Microscopio electrónico de transmisión**

Un microscopio electrónico de transmisión consta de los siguientes elementos:

- Sistema de iluminación, formado por el cañón de electrones y dos lentes condensadoras (que son los que iluminan la muestra).

- El portamuestras.
- Lente objetivo, que es la que da la primera imagen de la muestra.
- El sistema de aumento que consta de 3-4 lentes denominadas lente de difracción, lente intermedia y lentes proyectoras. Dan la imagen final de la muestra.
- Sistema de visualización de la imagen: pantalla y oculares. (Fig. 1).

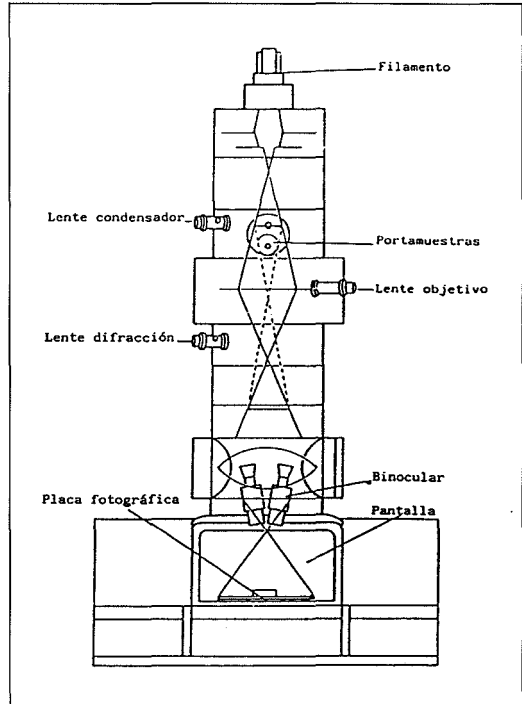
## Técnicas de Microscopía Electrónica (M.E.)

En diversos laboratorios desde 1965, se ha venido intentando desarrollar sistemas que permitan aplicar el ME a distintos tipos de muestras.

Antes de visualizar los tejidos biológicos al microscopio electrónico, es necesaria la aplicación de técnica especiales. Este material debe estar en unas condiciones tales, que el espesor de la muestra no sobrepase las 0,2 micras.

Los preparativos del tejido humano para su visualización al M.E. deben seguir los siguientes pasos:

Fijación, deshidratación, inclusión, corte, montaje y tinción.



*Figura 1.-Principios elementales del Microscopio Electrónico. Un haz de electrones parte de un filamento, es condensado por lentes electromagnéticas que atraviesan la muestra a estudiar. La imagen es proyectada en una pantalla que se puede ver, bien directamente o bien a través de un binocular.*

## Fijación

La fijación tiene por objeto parar la función del tejido estabilizando indefinidamente su estructura.

Los fijadores que más se utilizan en M.E. son el tetróxido de Osmio, el glutaraldehído y el formolaldehído porque son fijadores que protegen a las estructuras celulares durante la deshidratación y congelación de las mismas.

El glutaraldehído es un reactivo que fija las proteínas; no conviene utilizarlo a más del 2% porque puede artefactar la muestra.

El tetróxido de osmio se usa normalmente al 1% porque también puede artefactar a más concentración, sobre todo el DNA. Es muy importante tener en cuenta que el pH del osmio y del glutaraldehído deben estar entre 6,8 y 7,6.

## **Deshidratación**

Los tejidos que van a ser fijados posteriormente con tetróxido de osmio, deben pasarse por al menos dos cambios de glutaraldehído fresco, antes de que se realice la deshidratación. Esto se hace para impedir que el tetróxido de osmio reaccione con el alcohol. Se extrae el fijador del frasco con una pipeta pasteur y comienza la deshidratación con alcoholes crecientes, comenzando por alcohol al 30%. La deshidratación debe ser paulatina para evitar cambios bruscos en la estructura celular.

## **Inclusión**

Solamente con una buena inclusión es posible cortar los tejidos lo suficientemente finos para que puedan observarse con nitidez al microscopio electrónico.

La inclusión tiene por objeto incluir el material biológico en un medio que sea posible cortar en laminillas de espesor entre 150-250 angstroms.

Hay una variedad de polímeros que se utilizan en la actualidad pero generalmente los más prácticos son las resinas como el acrílico Epón. Debido a que el alcohol no se mezcla bien con el Epón, se debe utilizar óxido de propileno como solvente intermedio. Hay que tener en cuenta que cuando se trabaja con óxido de propileno debe extremarse el cuidado y no retirarlo totalmente de la muestra porque se evapora muy pronto, la muestra queda blanquecina y no es correcto.

Para la inclusión es necesario preparar la solución de Epón:

Solución A - Epón 812 .....62 ml  
Dodecemilsuccinic Anhidride ....100 ml

Solución B - Epón 812 .....100 ml  
Methyl Nadic Anhidride .....89 ml

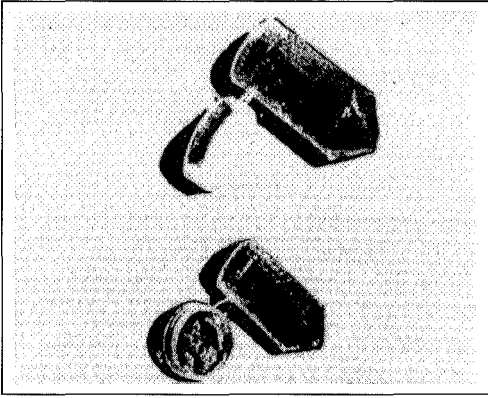
En la preparación de la mezcla se toman:

Solución A .....2 ml

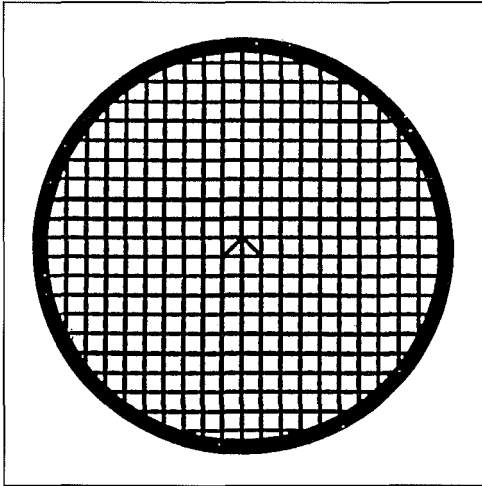
Ambas se guardan en nevera a 4°C

Solución B ..... 4 ml

Retirar el Epón de la nevera 1/2 hora antes de la inclusión. Llenar las cápsulas de inclusión (que suelen ser de gelatina o plástico) (Fig. 2), con 2-3 gotas de la solu-



*Figura 2.-Cápsulas para inclusión de material.*



*Figura 3.-Modelo de rejilla de M.E. Después de cubrirla con film, queda preparada para procesar con las distintas técnicas.*

te preparada con unas solapas de cinta aislante por los lados formando una pequeña balsa y procurando que el borde más afilado sea el propio filo de la cuchilla, se ajustan los tornillos del microtomo para que la relación entre taco, cuchilla y balsa sea la idónea para empezar a hacer los cortes.

Las cuchillas para el ultramicrotomo suelen ser de vidrio o de diamante. Las cuchillas de vidrio pueden hacerse a mano o utilizar cualquiera de los modelos de máquinas para hacer cuchillas que están en el mercado. Las cuchillas de diamante vienen preparadas de fábrica.

ción habiendo colocado la muestra dentro de la cápsula en la posición deseada con una etiqueta de papel de seda para la identificación de la muestra, utilizando una aguja histológica. La mezcla de inclusión no debe llevar burbujas, para ello dejar reposar la mezcla después de su homogeneización.

Dejar la muestra en la estufa a 60°C durante 2 días para completar la polimerización de la resina.

Cuando el bloque se ha polimerizado, las cápsulas se extraen del bloque endurecido. Esto se puede hacer de varias maneras, o con un prensador de cápsulas o cortándolas con una hoja de afeitar o una hoja de bisturí.

### Cortes

Los tacos de inclusión, una vez retirada la cápsula que sirvió de molde deben tallarse con la ayuda de una lupa o del propio microtomo para obtener una pirámide truncada cuadrangular para facilitar así el corte ultrafino. El tallado de la pirámide debe realizarse con una cuchilla extremadamente afilada para que las zonas de corte queden transparentes.

Una vez tallada la pirámide y colocada la cuchilla previamente

Los cortes finos se ponen sobre unos soportes especiales para poder observarlos al M.E., que se denominan rejillas y las hay de diversos materiales: platino, oro, níquel y cobre. Todas tienen un tamaño standard de 3,5 mm y un borde sólido para poder cogerlas con las pinzas adecuadas. Las rejillas pueden utilizarse directamente o con una película fina, bien de carbón o bien de formvar. Nosotros utilizamos el Formvar al 0,25 ó al 0,5% disuelto en cloroformo. (Fig. 3).

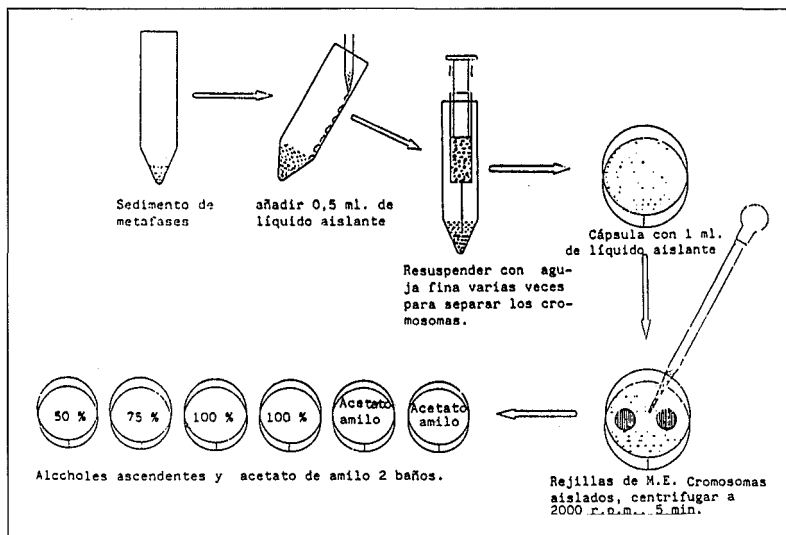
## **Tinción**

Los cortes gruesos se transfieren a un portaobjetos que contiene gotas de agua donde se colocan los cortes. Aquí se pueden corregir las posibles dobleces ayudándonos con una aguja histológica. Para el secado del corte y su adhesión firme al porta, se pueden secar poniéndolo encima de una placa caliente. Estos cortes control se tiñen con azul de metileno al 2% en agua destilada.

## **Técnica para la visualización de cromosomas al MET**

Nosotros utilizamos el aislamiento de cromosomas, que es muy eficaz para estudiar estas estructuras; el líquido de aislamiento permite estabilizar la cromatina a la vez que se deshace la membrana celular. El método de aislamiento está basado en disolver la membrana celular y aislar los cromosomas. Consiste en someter a la población celular, después de un choque hipotónico a un líquido aislante ácido a base de tritón X-100 al 1%, CIMg 6 mM y ácido cítrico al 1%, y así separar los cromosomas mediante resuspensión de los mismos en ese medio. Para pasar la suspensión de cromosomas a las rejillas de microscopía electrónica, en primer lugar hay que cubrir las rejillas con Formvar al 0,5% en cloroformo en un frasco de boca ancha para que se pueda introducir un portaobjeto que se impregna del film de Formvar; se hace un corte en cada extremo del porta y se hace la flotación de la lámina de Formvar en un cristizador con agua. Se colocan las rejillas sobre el Formvar, se le pone encima un trozo de papel de filtro un poco más grande que el porta y con una maniobra rápida pero suave, las extraemos dándoles la vuelta. Se dejan secar en la estufa 3-4 horas, y una vez secas, separar las rejillas con el film del papel de filtro con una pinza fina de microscopía electrónica. Quedan así preparadas las rejillas para depositar encima los cromosomas aislados. En una cápsula pequeña se pone 1 ml de líquido aislante, en el fondo de la misma poner las rejillas con el formvar. Con una pipeta pasteur, echar suavemente la suspensión de cromosomas aislados y centrifugar a 2.000 rpm durante 5 minutos. Pasar las rejillas con los cromosomas por alcoholes crecientes (5) cada uno y acetato de amilo 2 baños. Dejar evaporar totalmente las rejillas procedentes del acetato de amilo y ya están preparadas para su observación al microscopio electrónico. (Fig. 4).

La dificultad estriba en poder examinar las metafases enteras con los métodos convencionales de microscopía electrónica por la complejidad de dichos métodos. Trabajar con metafases enteras tiene la ventaja de poder utilizar similares patrones de bandejo que los utilizados por el microscopio óptico, pero con un



**Figura 4.-Aislamiento de cromosomas para su visualización al M. Electrónico de Transmisión.**

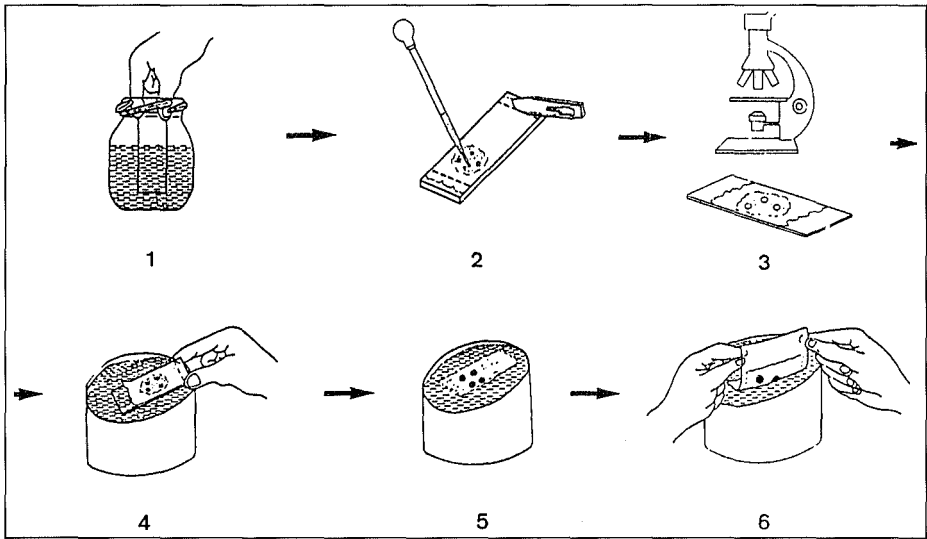
poder de resolución mucho mayor, lo que permitiría poder diagnosticar aberraciones cromosómicas pequeñas, que actualmente no son visibles con la microscopía óptica.

En nuestro laboratorio hemos desarrollado un sistema que permite utilizar las técnicas citogenéticas habituales al microscopio electrónico de transmisión. Se obtienen las metafases a partir de cultivo de linfocitos. La extensión de las metafases se realiza en portaobjetos limpios previamente impregnados con soporte de film fotográfico al 1% en cloroformo. Las metafases se observan al microscopio óptico y se marcan las idóneas con un objetivo marcador que está cargado con tinta china, lo que permite colocar exactamente las rejillas en el lugar elegido cuando se haga flotar el film en un cristalizador con agua, de la misma forma de como hicimos el Formvar. (Fig. 5).

Dejar secar en la estufa a 60°C 3-4 h. Una vez secas, separar las rejillas del papel de filtro. Quedan así preparadas las rejillas para hacerles las distintas técnicas de tinción y bandeado.

### **Aislamiento de cromosomas de dinoflagelados**

No sólo utilizamos la técnica de aislamiento en cromosomas humanos, sino también puede hacerse con material procedente de cultivos de otros organismos, como por ejemplo cultivos de dinoflagelados, organismo marino que constituye una división del reino protista. Los cultivos de dinoflagelados se sacrifican cuando están en fase exponencial, se concentran por centrifugación a 1500 rpm duran-



**Figura 5.-Extensión citogenética de metafases sobre film para microscopio electrónico.**

- 1.-Preparación de film.
- 2.-Extensión de las metafases sobre el portaobjetos con el film.
- 3.-Localización de metafases al Microscopio óptico con objetivo marcador.
- 4.-Flotar el film en un cristalizador con agua, previo corte con hoja de bisturí en los extremos del portaobjetos.
- 5.-Film con metafases flotando. Aplicar rejillas sobre círculos del objetivo marcador.
- 6.-Extracción del film con las rejillas y metafases, con papel de filtro.

te 10 minutos. Después de resuspender el botón celular en CIK 75% + medio T/2 a pH 6,5 + CIH, se centrifuga a 1200 rpm 5 minutos.

Sobre el botón celular se añade líquido aislante, elaborado de la misma forma que para cromosomas humanos, durante 30 minutos a temperatura ambiente sin resuspender el sedimento. Resuspender el botón celular presionando con un homogeneizador aproximadamente 10-12 veces, con objeto de romper mecánicamente las paredes celulares. Si están aislados o no, se comprueba examinando una pequeña muestra al microscopio óptico. La suspensión de dinoflagelados así aislados se centrifuga sobre las rejillas de microscopía electrónica cubiertas con una lámina de Formvar al 0,5% en Cloroformo. Se procede a la deshidratación en alcoholes crecientes y acetato de amilo.

Otro material que también hemos observado al M.E.T. es el moco cervical. El moco cervical es la secreción producida por las criptas del cuello del útero. Es un hidrogel que se modifica en los distintos momentos del ciclo menstrual en la mujer. El moco cervical al desecarse tiene la propiedad de formar cristales similares a las hojas de un helecho, por ello no necesita ningún tratamiento especial

para observarlo al M.E. Tiene la ventaja de que sólo necesitamos las rejillas de microscopía electrónica preparadas sobre papel de filtro y recubiertas con una lámina de Formvar. Se pone el material encima, se deja secar bien y ya están preparadas para ver al microscopio electrónico.

### **Microscopía Electrónica de Rastreo (Scanning)**

En 1935 Knoll construyó el primer microscopio de Barrido, pero no se comercializó hasta 1965.

En el Scanning, un haz de electrones con una energía entre 1 y 50 Kv, se hace incidir sobre una muestra gruesa, opaca a los electrones. Aquí, a diferencia del M.E.T. el haz de electrones no atraviesa la muestra sino que choca con la muestra y se focaliza sobre la superficie de la misma, describiendo un conjunto de líneas paralelas. La corriente electrónica emitida por la muestra se recoge y amplifica.

Los componentes del microscopio electrónico de barrido son:

1.-El sistema de iluminación formado por el cañón de electrones que consta de un filamento de Wolframio, un conjunto de lentes condensadoras y el sistema de reflexión responsable del barrido del haz electrónico.

2.-El porta muestras, que permite mover la muestra en 3 direcciones perpendiculares entre si. Se puede girar e inclinar de tal manera que el haz de electrones alcance cualquier parte de su superficie.

3.- El sistema de visualización de la imagen es distinta a lo que sucede en el microscopio de transmisión, en el que toda la imagen se observa y registra al mismo tiempo. En el microscopio de barrido ambas operaciones se realizan secuencialmente.

### **Técnica de visualización de cromosomas vegetales al M.E. Scanning (Vicia faba).**

Se obtienen las raíces de las habas poniéndolas en un ambiente húmedo en la oscuridad durante 3-4 días. Se tratan con colchicina durante 3 horas.

La porción merismética se trocea con una hoja de bisturí. Los trozos se sumergen en dimetilsulfoxido al 50% en cacodilato sódico 0,1M a pH 7,4,  $\text{CaCl}_2$  1mM,  $\text{MgCl}_2$  5mM y PMSF 1 mM (Phenylmethylsulfony fluoride) durante 2 minutos para que se ablanden. El material así preparado, se lava abundantemente en tampón cacodilato sódico 0,1M (pH 7,4), sacarosa al 4% y se deja en esta mezcla durante 10 minutos a 4°C.

Se fija con glutaraldehído al 4% durante 24 horas. A continuación se hace una post-fijación con tetróxido de osmio al 1% durante 2 horas. Deshidratación con alcoholes crecientes hasta un último baño de etanol al 100% y acetona pura. Se efectúa el punto crítico con dióxido de carbono líquido y el revestimiento con platinum-paladium usando el aparato de sputtering.



## **Cromosomas animales al scanning con técnica de bandas G**

Las células pueden ser cultivadas en monocapa o en suspensión. Una vez sacrificado el cultivo previa incubación durante 3 horas con colchicina, se efectúa la extensión con secado al aire sobre cubreobjetos redondos del tamaño de los soportes que se introducirán en el portamuestras del scanning. Se efectúa la técnica de bandas G por el método convencional de tripsina-giensa. Después del lavado de las bandas G en tampón fosfato pH 6,8 y sin dejar secar la preparación se hace una fijación en glutaraldehído al 3% en el tampón fosfato pH 6,8 durante 30-60 minutos. Lavar abundantemente en el mismo tampón. Fijar con Osmio al 1% en el tampón fosfato durante 20 minutos. Lavar 3 veces con agua destilada. TCH (Thiocarbohidracide) a saturación en agua destilada, 20 minutos. Lavar 3 veces en agua destilada. Efectuar el punto crítico y visualizar al scanning.

## BIBLIOGRAFÍA

- 1.-DU PRAW, E.J. (1965). Macromolecular organization of nuclei and chromosomes. A folded fiber model based on whole-mount electron microscopy. *Nature*, 206:338-343.
- 2.-GONZALEZ, R.; PAREJA, R. & BALLESTEROS, C. (1991). *Microscopía electrónica*. Eudema Universidad.
- 3.-GOYANES, V.J.; MATSUI, S. & SANDBERG, A.A. (1980). The basis of chromatin fiber assembly within chromosomes studied by histone DNA cross-linking followed by trypsin digestion. *Chromosoma*, 78:123-135.
- 4.-GOYANES, V.J. & MÉNDEZ, J. (1981). Karyotyping by electron microscopy condensation-inhibition of G-bands in human and Chinese hamster chromosomes by a BrdU-Hoechst 33258 treatment. *Cancer Genet. Cytogenet.*, 4:45-51.
- 5.-GOYANES, V.J. & MÉNDEZ, J. (1982). Karyotyping chromosomes by electron microscopy II. A method for the sequential examination of spread and banded metaphases by light and electron microscopy. *Hum. Genet.*, 62:355-357.
- 6.-GOYANES, V.J. & MÉNDEZ, J. (1982). *Microscopía electrónica de alteraciones cromosómicas estructurales*. Desarrollo experimental. *Iberam. Invest. Clin.*, 1:11-23.
- 7.-GOYANES, V.J. & SCHVARTZMAN, B. (1984). Electron microscopy of sister chromatid exchanges. *Cytogenet. Cell Genet.*, 36:612-616.
- 8.-GOYANES, V.J. (1985). Electron microscopy of Chromosomes: Toward an ultrastructural cytogenetics?. *Cancer Genet. Cytogenet.*, 15:349-367.
- 9.-HSU, T.C. (1979). *Human and Mammalian Cytogenetics*. An Historical perspective.
- 10.-NAHOAKI KUME & KEIZO MARUYAMA (1986). Effects of NaCl on Vicia Chromosomes Studied by Scanning Electron Microscopy. *J. Electron Microsc.*, 35:3,288-291.
- 11.-SUSUMU TAKAYAMA, TOSHIHIKO TANIGUCHI & HARUO KITASUMI (1985). Scanning Electron Microscopic Examination of the Secondary Constriction of Vero Cells. *Exp. Cell. Res.* 157:556-560.
- 12.-YUNIS, J.J. (1974). *Structure and Molecular Organization of Chromosomes*. Human Chromosome Methodology, 2<sup>o</sup> ed.