



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE
MEXICO**

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia



**TECNICA PARA OBSERVACION EN MICROSCOPIO
ELECTRONICO DE CULTIVO DE TEJIDOS**

T E S I S

Que para obtener el titulo de:

MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

P r e s e n t a :

PABLO GARCIA ALBA

Asesores: M.V.Z. AURORA VELAZQUEZ E.

M. C. SILVIA GOMEZ E.

México, D. F.

1982



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

RESUMEN :

Con ésta técnica se pretende establecer - en forma rutinaria una metodología sencilla para estudiar la estructura fina de cultivos celulares, tratando de conservar fundamentalmente la ubicación y relación del cultivo celular con respecto al sustrato sobre el cual crece.

Se cultivaron células pK15 en botellas de plástico Falcon, al completarse el crecimiento del cultivo, se realizaron "in situ" los diversos pasos del procesamiento del material biológico para microscopía electrónica, así como también la inclusión y polimerización.

Una vez polimerizado el medio de inclusión se cortó la botella en pequeños bloques y se prepararon las superficies para la obtención de cortes control de 1 μm . de grosor que se observaron al microscopio óptico previa tinción con azul de toluidina o paragon para la selección de áreas óptimas y posteriormente, de éstas áreas, se procedió a la obtención de cortes finos (600 a 900 Å) para ser observados al microscopio electrónico.

De ésta manera se trataron de aprovechar las propiedades de corte del poliestireno, material con el que se fabrican las botellas Falcon que suponemos son muy similares a las propiedades de corte de las resinas epóxicas.

INTRODUCCION:

La microscopía electrónica constituye un recurso de gran valor para estudiar a nivel molecular material biológico de diversa índole, de tal modo que en la actualidad se cuenta con un acervo enorme de información ultraestructural, que ha permitido dilucidar problemas básicos de biología celular, problemas de orden diagnóstico e inclusive taxonómicos como es en el área de parasitología.

Aun cuando en 1945 todavía no se establecía la metodología para obtener cortes de tejidos con un grosor de 600 a 800 Å para ser observados al microscopio electrónico; -- Porter, Claude y Fullam en 1945 (19) y Porter en 1954 (20) aprovechando que los cultivos celulares en monocapa se extienden formando zonas muy delgadas, hicieron directamente algunas observaciones interesantes de la estructura fina de éstas células, crecidas en superficie de vidrio, células que solamente fueron fijadas y deshidratadas.

Como resultado de éstas observaciones nació el término de retículo endoplásmico; retículo para referirse a filamentos y vesículas distribuidas a manera de redcillas; endoplásmico para indicar que éstas redcillas se encontraban confinadas a la parte más interna del citoplasma celular. Sin embargo el detalle de las estructuras intracitoplásmicas obtenido con esta metodología no se compara cuando se estuvo en posibilidades de

-efectuar cortes finos de dichos cultivos, siendo así como se pudo determinar que el retículo endoplásmico se extiende también a la parte más externa del citoplasma.

Para la obtención de cortes finos es imprescindible incluir la muestra en medio de gran dureza, actualmente existen en el mercado una amplia diversidad de éstos medios, desde los solubles en agua que se utilizan con fines citoquímicos como son el glicol metacrilato (13), aquon (8), durcopan (26) por citar algunos, hasta los insolubles en agua que son utilizados rutinariamente, tales como las resinas epóxicas, grupo al que pertenece el epón 812 (4), la araldita (7), el maraglás (6), etc. y -- por último el grupo de los poliésteres al que pertenece el vestopal W (24) y otros. El manejo de cultivos celulares se dificulta considerablemente ya que es sumamente difícil despegar el cultivo del sustrato sobre el cual son cultivadas las células.

Existen varias recomendaciones de diversos autores para resolver éste problema, Howatson y Almeida (12), Nishiura y Rangan (18) recomendaron colocar las muestras ya polimerizadas sobre bloques de dióxido de carbono sólido (hielo seco), en donde probablemente por el enfriamiento brusco experimentado se lleva a cabo una retracción del medio de inclusión, que permite separar con relativa facilidad el cultivo del sustrato donde crece; se trató de un método eficiente cuando el medio de inclusión es el metacrilato de Newman (17), actualmente no utilizó -

-ya que con mucha frecuencia causa serios daños al tejido durante la polimerización debido a una retracción considerable del volumen de la muestra como se puede observar en la figura No.1.

Actualmente los medios de inclusión más ampliamente utilizados son las resinas epóxicas, pero también tienen el inconveniente en el caso particular de los cultivos celulares, que al polimerizarse durante un período prolongado, el cultivo se adhiere fuertemente al sustrato, de tal modo que el dióxido de carbono resulta ineficaz para producir la separación.

Para debilitar ésta adhesión Heyner (11) aplicó en la superficie en donde creció el cultivo una delgada capa de colágena; Robins y Gonatas (21) y Sparvoli (25) recomendaron la aplicación por el método de sombreado de una película de carbón; Egeberg (3) utilizó una delgada capa de resina epóxica - polimerizó previamente y sobre ésta, adecuadamente esterilizada, creció el cultivo; Firket (4) recomendó el uso de Melinex "0" de dos micras de grueso, se trata de películas de poliéster transparentes, no tóxicas que se utilizaron con buenos resultados en cultivos de células Hela, así como de fibroblastos y mioblastos de pollo, inclusive en períodos de incubación prolongados.

Otros autores recomendaron revestimientos del sustrato con silicón, con formvard o bien efectuando el cultivo celular en la superficie de filtros millipore previamente este

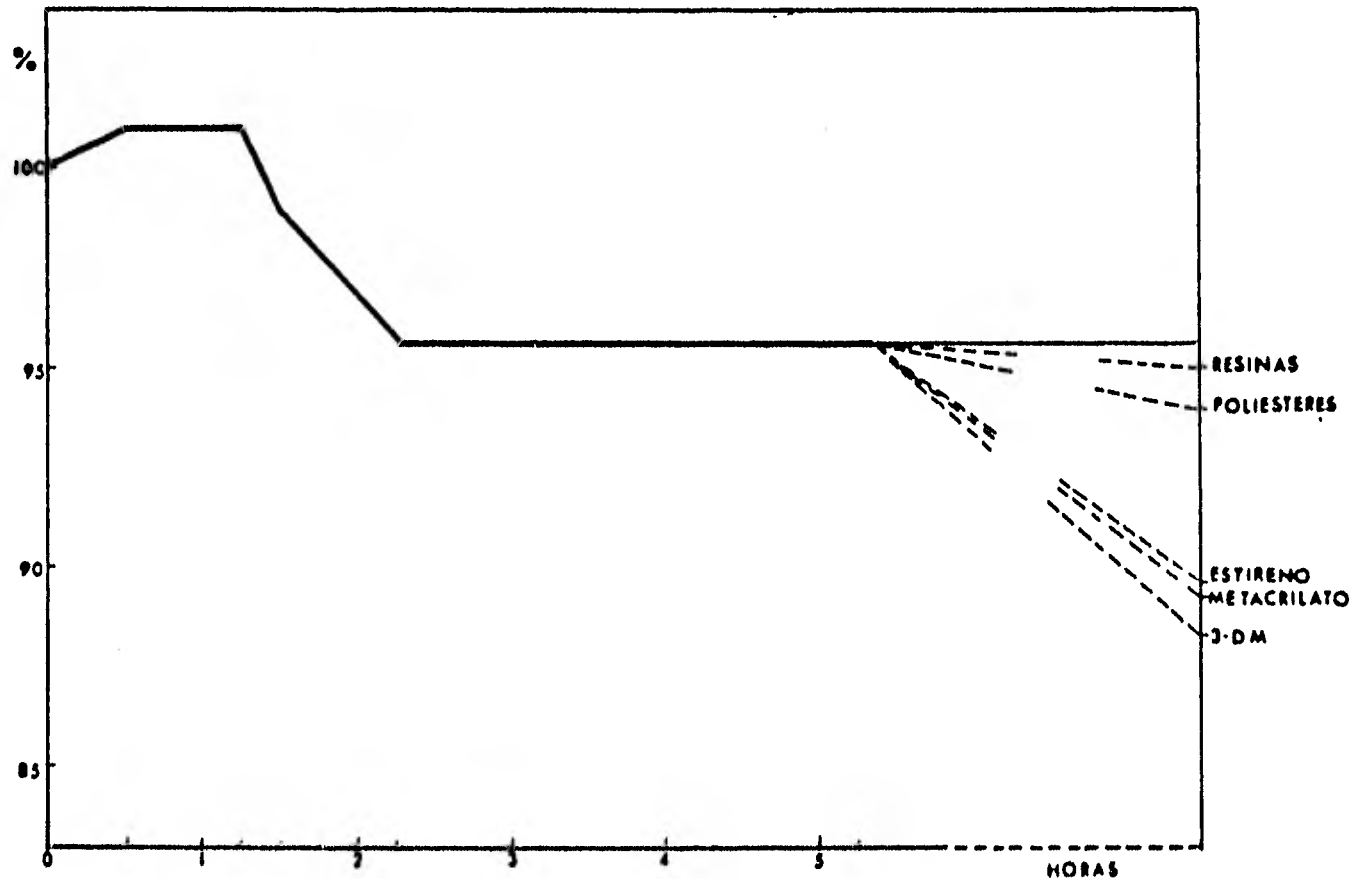


Fig. No. 1- Esquema que muestra los cambios de volumen (retracción)- en las muestras biológicas por efecto de la polimerización en cinco- diferentes tipos de medios de inclusión. (Esquema modificado tomado- de Kushida 1962).

-terilizados con luz ultravioleta (2), (15) o en pequeños recipientes de vinilo, material que se utiliza como aislante e impide la adherencia del medio de inclusión. Sin embargo todas éstas recomendaciones en nuestra experiencia no fueron enteramente satisfactorias, algunas de ellas por la dificultad de obtener el revestimiento indicado, como es en el caso particular del Mellinex "0" o de los recipientes de vinilo.

En el presente método, aprovechando que las características de corte del poliestireno, (material con el que son fabricadas las botellas Falcon), son muy semejantes a las características de corte de las resinas epóxicas, se intentó realizar dentro de las mismas botellas (una vez logrado el crecimiento celular), todo el manejo de rutina del procesamiento del material biológico para microscopía electrónica, incluyendo el corte fino sin la necesidad de separar el cultivo celular del sustrato.

MATERIAL Y METODOS:

Botellas de Plástico Falcon (poliestireno).

Fijadores: Glutaraldehido ($\text{CHO}-(\text{CH}_2)_3-\text{CHO}$) al 3% amortiguado con fosfatos a un pH de 7.4 y molaridad de 0.2. Tetroxido de Osmio (OsO_4) al 1% en el mismo amortiguador (figura N°2).

Deshidratantes: alcohol metílico (CH_3OH) a diferentes concentraciones.

Medio de Inclusión: Epón 812 (resina epóxica) conteniendo como catalizador al 2,4,6,tri(dimetil-aminometil)phenol (D.M.P.30).

Como factor de plasticidad al dadocenisuccínico anhídrido (D.D.S.A.) y como endurecedor al metil nádico anhídrido (M.N.A.) figura N°3.

Solución Lavadora: amortiguador de fosfatos con sacarosa.

Contrastantes: Acetato de uranilo al 8%.

Citrato de plomo alcalino (figura N°4).

Ceguetas de acero para cortar la botella de Falcon en pequeños bloques, rejillas de cobre, algunas de éstas - cubiertas con formvard (figura N°5).

Cultivo de células pK15: procedentes de la clona 373 de células - de cerdo del laboratorio de Virología de la F.M.V.Z. - de la U.N.A.M.

Ultramicrotomo Porter Blum MT-2; para la obtención de cortes semi - finos ($1\ \mu\text{m}$) y finos (600 a $900\ \text{Å}$) (figura N°6).

Microscopio Electrónico; C. Zeiss EM-9-S II (figura N°7).

TECNICA PARA LA OBSERVACION DE CULTIVO DE TEJIDOS



Fig. N°2 Fijadores utilizados en el proceso.

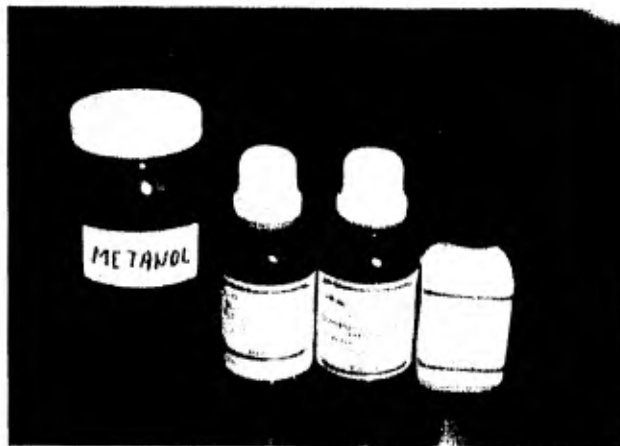


Fig. N°3 Medios de inclusión.

TECNICA PARA LA OBSERVACION DE CULTIVO DE TEJIDOS



Fig. N°4 Contrastantes.



Fig. N°5 Materiales utilizados.

TECNICA PARA LA OBSERVACION DE CULTIVO DE TEJIDOS

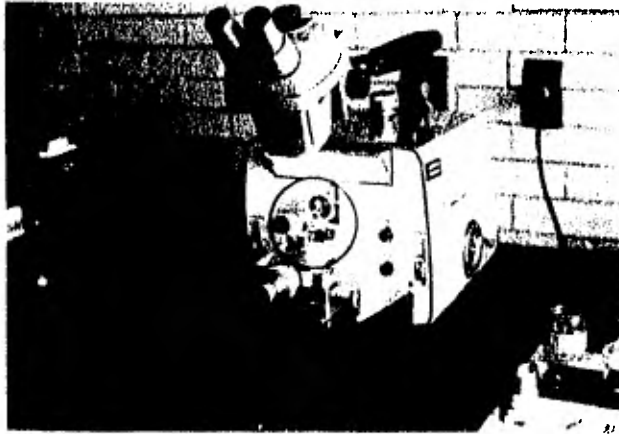
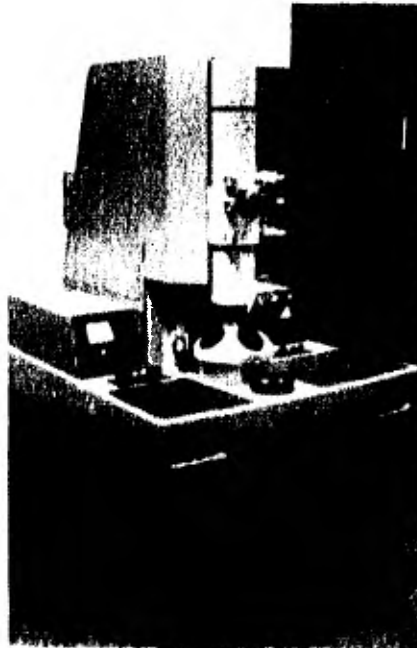


Fig. N°6 Ultramicrotomo Porter Blum MT-2 utilizado para la obtención de cortes semifinos y finos.

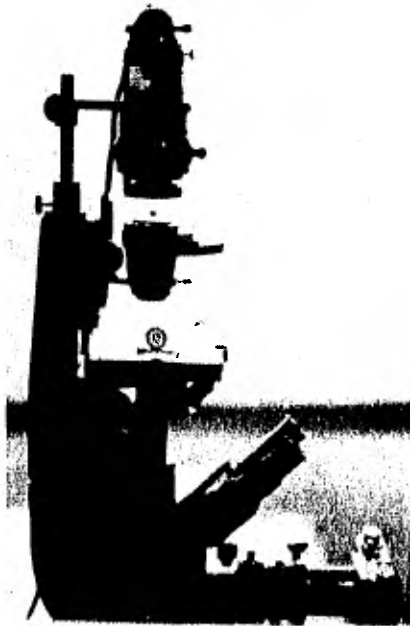
Fig. N°7 Microscopio electrónico C. Zeiss EM-9-S II.



M E T O D O :

Se utilizarón células pK15 originarias de riñon de cerdo clona 373, las cuales fueron cultivadas durante un período de cuatro días en botellas de plástico Falcon estériles. El cultivo celular fue preparado de acuerdo con el proceso establecido en el laboratorio de Virología de la F.M.V.Z., conteniendo medio Eagle. El desarrollo y condiciones del cultivo se observaron - utilizando un microscopio de invertido (figura N°8).

Figura N°8 Microscopio de luz invertido.



El cultivo celular de 90 horas se fijó en glutaraldehído al 3% amortiguado en fosfatos durante un período de dos horas y media a una temperatura de 4°C, transcurrido éste lapso se retiró el fijador lavándose el cultivo tres veces en solución - lavadora (solución de fosfatos más sacarosa); se post-fijó en tetróxido de osmio por una hora, también a 4°C repitiéndose la operación de lavado como en el paso anterior.



Fig. N°9 Observación con microscopio de luz invertido, del cultivo de células pK15.

La deshidratación se llevó a cabo con metanol en solución acuosa de diferentes concentraciones (60%, 70%, 80%, 90% y absoluto), por tiempo de cinco minutos en cada uno y tres períodos de diez minutos en alcohol absoluto. Para la infiltración se utilizó mezcla final de epón 812 preparada de acuerdo al método de Luft (14) y alcohol absoluto en una proporción de 1:2

-respectivamente, permaneciendo en ésta solución durante una hora - con la botella cerrada; posteriormente con una varilla de vidrio - calentada al rojo vivo se hicieron perforaciones en la botella de - de Falcon en el lado opuesto de donde se encuentra el cultivo (fi- gura N°5).

Se retiró el tapon de la botella y se de- jó volatilizar el solvente por 24 horas dentro de una campana con- sultica a temperatura ambiente. Se incluyó el cultivo en una mezcla final de epón 812, teniendo cuidado que el medio de inclusión cu- brierá perfectamente la superficie del cultivo sin rebasar una al- tura máxima de 2 mm. (figura N°10).

Se polimerizó durante un período de 24 hrs a 65°C, después la botella se cortó con una cegueta obteniéndose - pequeños bloques de aproximadamente 1 cm. de ancho por 2 cm de - largo y 4 mm. de espesor. De ésta manera quedó un lado de plástico Falcon y otro se resina epóxica encontrándose entre ambos el culti- vo celular.

A éstos bloques en uno de sus extremos se les dió la forma de piramide truncada, con una superficie de corte de aproximadamente 2 mm. por lado, eliminándose de los lados la ma- yor cantidad posible de epón y de plástico; se colocó el bloque en un ultramicrotomo de tal modo que el corte incidió al mismo tiempo epón y plástico (figura N°11) y se procedió a cortar utilizando cu

TECNICA PARA LA OBSERVACION DE CULTIVO DE TEJIDOS

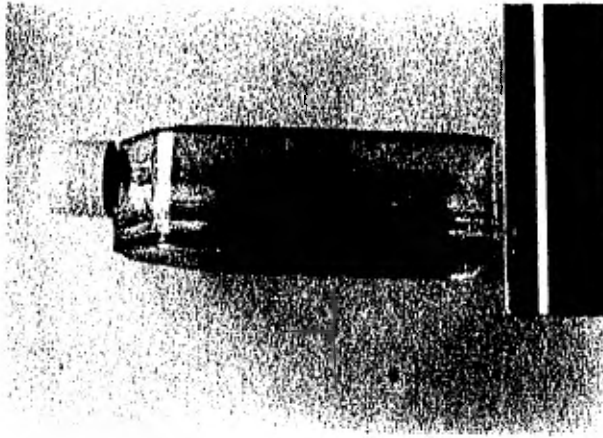


Fig N°10 Muestra la superficie cubierta por el medio de inclusión, no mayor de 2 mm.

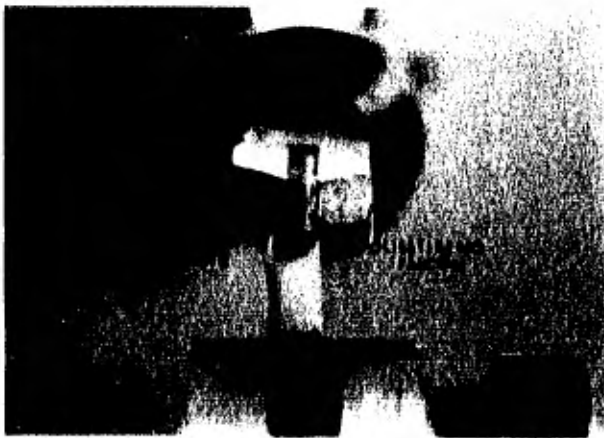


Fig N°11 ...el corte incidió al mismo tiempo epón y plástico...

-chilla de diamante o de vidrio.

Los cortes semifinos de aproximadamente -
1 μm . de grosor, se montaron en portaobjetos para observarse al m
icroscopio optico (figura N°12) pudiendose seleccionar las zonas o
ptimas o las células de mayor interes para corte fino. Para efec---
tuar el corte fino se reduce el área a una extensión no mayor de -
1 mm. Los cortes obtenidos fueron montados en rejillas de 200 a -
400 "mesh" cubiertas con membrana de formvard (figura 13a y 13b).

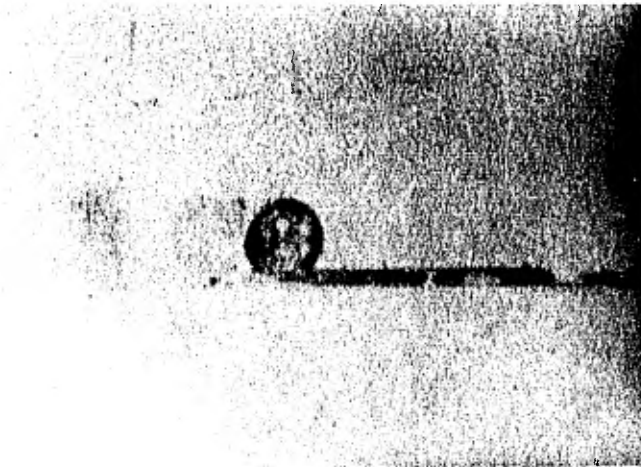


Fig. N°12 Corte de 1 μm . de grosor, teñido con azul de toluidina, -
visto a través del microscopio óptico. Células con efec-
to citopático, notese el aumento del volumen de la célula y la vacuolización intracitoplásmica.

TECNICA PARA LA OBSERVACION DE CULTIVO DE TEJIDOS

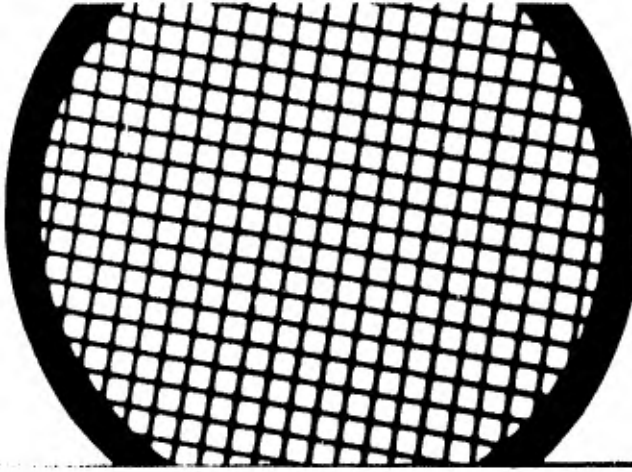
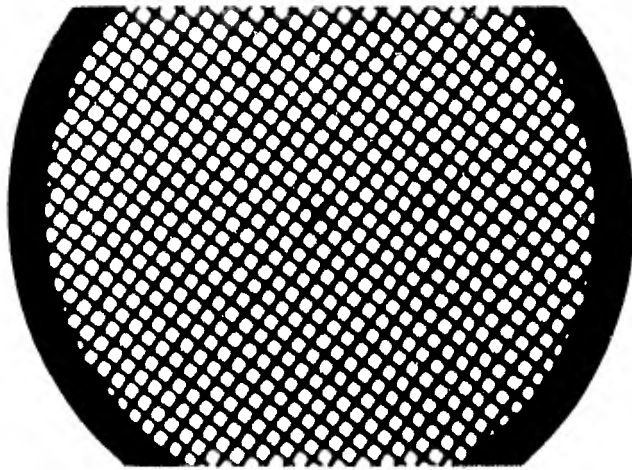
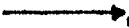



Fig. N°13a Rejilla de 200 "mesh"



F4g. N°13b Rejilla de 400 "mesh"

- .ABREVIACIONES UTILIZADAS.-

- C.- cromatina.
- cp.- cisterna perinuclear
- d.- desmosomas
- ei.- espacio intercélular
- L.- lisosomas
- M.- mitocondrias
- m.- microvellosidades
- N,- nucleo
- S.- sustrato
- n.- nucleolo
- pn.- poro nuclear
- pr.- polirribosomas
- rer.- retfculo endoplásmico rugoso
- ,- espacios c6elulares carentes de estructura
- ,- linea electrondensa entre el cultivo y el sustrato

RESULTADOS Y DISCUSION:

Con ésta técnica se detecto que el cultivo de células pK15 se organizó en dos y tres estratos (figura N°14) y solamente en zonas pequeñas constituyó una verdadera monocapa (figura N°18). Las células se encontrarón unidas unas con otras por estructuras de tipo desmosómico (figuras N°16 y 17).

La conservación intracélular que se logró con ésta técnica fue adecuada en la mayoría de las áreas, de tal modo que permitió identificar la arquitectura del polo apical de la células, cisternas perinucleares, abundantes polirribosomas, retículo rugoso, mitocondrias, espacios intercélulares, etc., (figuras Nos. 14, 15, 16 y 17),

Sin embargo a pesar de tratarse de muestras sumamente delgadas y de haber infiltrado en una solución 2:1 a favor del solvente; se observó en el citoplasma de algunas células áreas irregulares carentes de estructura (figuras Nos. 14, 15 y 16)

Como los solventes de las resinas epóxicas; acetona y oxido de propileno que se utilizan ordinariamente en éste proceso atacan al plástico de las botellas, se sustituyeron por alcohol metílico; aun cuando la mayoría de las resinas no son misibles en alcohol (etílico o metílico), éstos constituyen solventes adecuados unicamente para el epón 812.

TECNICA PARA LA OBSERVACION DE CULTIVO DE TEJIDOS



Figura N°14 Micrograffa electrónica que muestra el cultivo celular adherido al sustrato; en la zona apical de las células se observan numerosas microvellosidades, así como espacios intracitoplásmicos carentes de estructura (flecha)

A pesar de que algunos autores mencionan que la infiltración de ésta resina disuelta en alcohol tiene el inconveniente de presentar una velocidad de difusión baja, provocando que la infiltración del tejido no se efectue de manera uniforme (10), como se trató de células en monocapa, se consideró que éste inconveniente no se presentaría, sin embargo la presencia en el material, de algunas zonas intracélulares carentes de estructura, pudieron ser producidas por la falta de una impregnación adecuada. Esto debe ser tomado en consideración en la interpretación de las micrografías.

Se identificó la integridad morfológica real de cada célula (figuras Nos. 14 y 15), situación que se pierde al separar el cultivo del sustrato, debido a que la forma de las células se altera.

Con la técnica, se mantuvieron intactas las proyecciones citoplásmicas a manera de microvellosidades del polo apical celular; microvellosidades que cuando se maneja el cultivo separado del sustrato se deforman, pudiéndose interpretar erróneamente como extrusión de partículas virales, en algunos casos en donde existe efecto citopático por virus.

Esta técnica permitió estudiar también, la interacción de las células del cultivo con el material sobre el cual crecen. En el cultivo de células pK15 en particular, la zona-

-de adherencia, muestra unicamente una linea electrodensa de aproximadamente 50 a 75 Å de grosor, evidente en todas las fotografias presentadas, no se observó ningun material entre las células y el sustrato, ni tampoco estructuras similares a hemidesmosomas señaladas por Flaxman y colaboradores (5), en cultivos de células epidérmicas y fibroblastos de pollo.

En nuestro material existen zonas similares (figura N°16) a las mostradas en las fotografias de Flaxman (5), se consideró que no se trata de material extracélular depositado entre el cultivo y el sustrato, sino solamente de prolongaciones citoplásmicas muy delgadas de células basales.

Durante la inclusión, cuando la mezcla final de epón rebaza los 2 mm. de altura, la polimerización del medio de inclusión se lleva a cabo en forma defectuosa, alteración, que no logra corregirse aun cuando el bloque ya cortado y expuesto el tejido se introduzca nuevamente a la estufa a 65°C por 24 hrs. Para evitarse ésto, debe tenerse especial cuidado que en la inclusión, el epón sin diluir no alcance una altura mayor de 2 mm. (figura N°10).

Durante la obtención, tanto de cortes semifinos como finos, se observó la tendencia a la formación de numerosas arrugas hacia el lado donde se encuentra el tejido, lo que daña zonas que pudieran ser importantes (figura N°19); éste proble

-ma se resolvió en la mayoría de los casos al exponer los cortes a vapores de xilol por 5 a 7 minutos cuando éstos se encontraban flotando en el depósito de agua, tiempo suficiente para que parte del poliestireno de la botella se disuelva, provocando ésto la extención del tejido.

La tinción y contraste de los cortes semifinos y finos respectivamente, se llevo a cabo sin dificultad.

TECNICA PARA LA OBSERVACION DE CULTIVO DE TEJIDOS

Figura N°15 Detalle del cultivo celular en donde se aprecia la es tratificación del mismo, uniones desmosomicas entre - las células y los espacios intracitoplásmicos caren-- tes de estructura (flecha).



TECNICA PARA LA OBSERVACION DE CULTIVO DE TEJIDOS

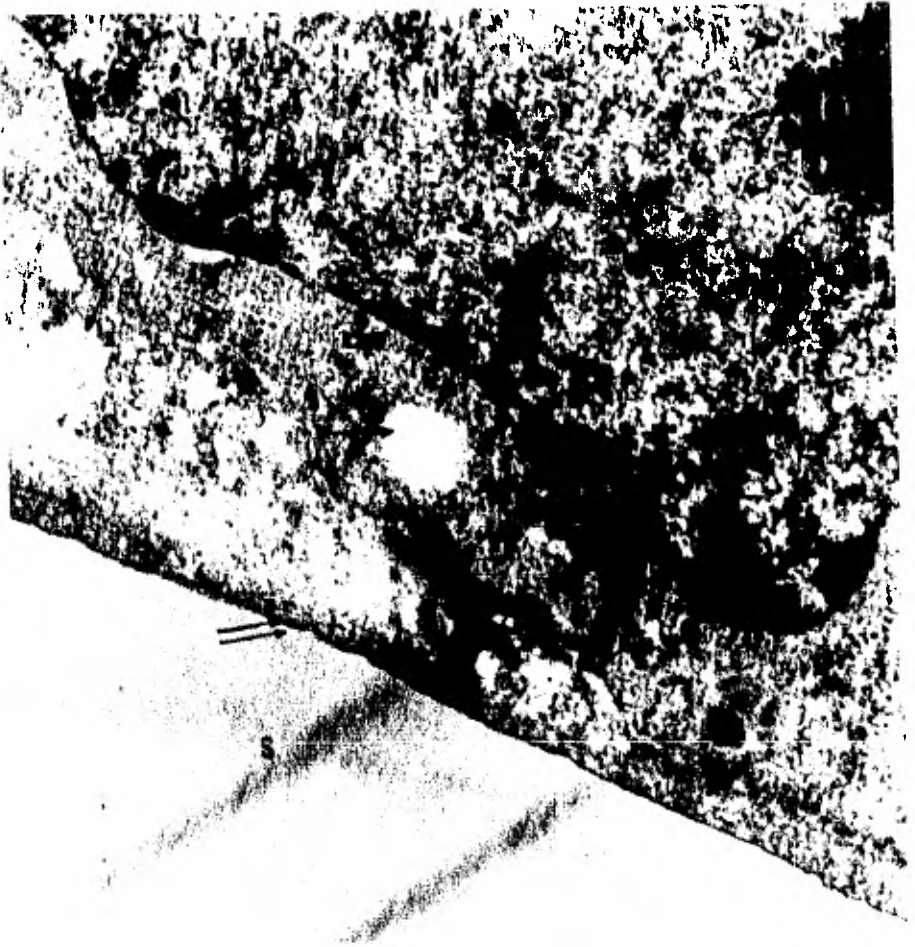


Figura N°16 Micrograffa electrónica que muestra detalle del complejo de unión (d), y la línea electrondensa entre el sustrato y el cultivo celular (dos flechas).

TECNICA PARA LA OBSERVACION DE CULTIVO DE TEJIDOS

Figura N°17 Detalle de la conservación intracelular en una célula del cultivo.



TECNICA PARA LA OBSERVACION DE CULTIVO DE TEJIDOS

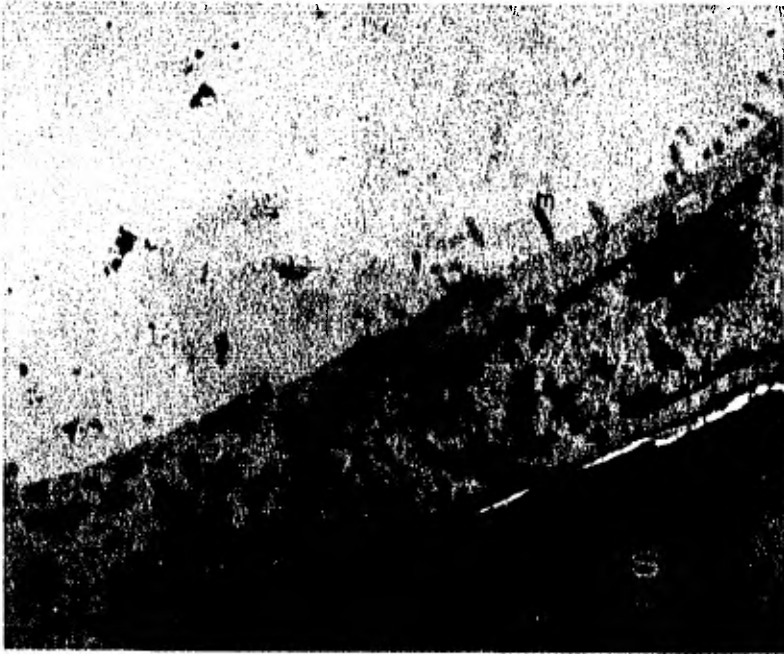


Figura N°18 Micrograffa electrónica de una área del cultivo en monocapa.

TECNICA PARA LA OBSERVACION DE CULTIVO DE TEJIDOS

Figura N°19 Micrograffa que muestra el pliegue formado durante la obtención del corte fino.



CONCLUSIONES:

1).- Se demostró que las propiedades de corte del poliestireno de la botella Falcon no son idénticas, pero si muy similares a las propiedades de corte de las resinas epóxicas.

2).- Que el plástico de las botellas (poliestireno) resiste en forma adecuada el bombardeo de electrones ya que no sufre sublimación cuando el espécimen es observado en el microscopio electrónico.

3).- Permite estudiar cultivos celulares sin perderse las relaciones que guarda con el sustrato sobre el cual crece.

4).- Se demostró la adecuada conservación de proyecciones cutiplásmicas a manera de microvellosidades en el borde libre de las células (figuras Nos. 14, 15 y 17).

5).- Elimina la dificultad de separar previamente el cultivo del sustrato que lo sostiene.

6).- Evita la utilización de sustratos de diferentes materiales, tales como la colágena, polivinilos, membranas de carbono, etc., con los cuales se corre el riesgo, que al no ser tratados adecuadamente (para que sobre ellos se realice el crecimiento celular), éstos sustratos contaminen a los cultivos de materiales indeseables; o de ejercer sobre ellos efectos tóxicos.

Sin embargo aun cuando ésta técnica soluciona los problemas ya mencionados, no es absolutamente satisfactoria debido a la necesidad de emplear alcohol como solvente del epón; con la desventaja ya descrita, por lo que recomendamos tratar de seguir implementando nuevas metodologías hasta conquistar una técnica 100% satisfactoria.

PABLO GARCIA ALBA

- B I B L I O G R A F I A . -

- 1.- Anderson, N., Doane, W. Epoxy embedding of thin-layer material in commercially available vinyl cups for light and electron microscopy. *Stain Technology*. (1967) 42 (4) 169-173.
- 2.- Dalen, H., Nevalain, T. Direct epoxy embedding for vertical sectioning of cells grown as monolayer on millipore filter. *Stain Technology*. (1968) 43 (4) 217-220.
- 3.- Egeberg, J. Sandwich embedding of monolayer of cell in epoxy-resin for ultrathining sectioning. *Stain Technology*. (1965) 40 (6) 343-346.
- 4.- Firket, H. Polyester sheeting (mellinex 0), a tissue culture support easily separable from epoxy resins. *Stain Technology*. (1966) 41 (3) 189-191.
- 5.- Flaxman, B., Litzner, M. Ultrastructure of cell attachment to substratum in vitro. *J. of cell biology*. (1968) 36 406-410.
- 6.- Freeman, J.A., Spurlock, R.O. A new epoxy embedment for electron microscopy. *J. Cell Biology* (1962) 13 437-440.
- 7.- Gibson, I.R. An embedding resin miscible with water for electron microscopy. *Nature, London* (1959) 184:375.
- 8.- Glauert, A.N., Glauert, R.H. Araldite as an embedding medium for electron microscopy. *J.ophysical and Biochemical Cytology*. (1958) 4:191.
- 9.- Goryckij, M. Oriented embedding of biological material and accurate localization for ultrathining. *Stain Technology*. (1966) 41 (1) 37-42.
- 10.- Hayat, M.A. Principles and techniques of electron microscopy. Biological applications. (1970) 1:116 Van Nostrand Reinhold Company.
- 11.- Heyner, S. In situ embedding of cultured cells or tissue, grown on glass, in epoxy resins for electron microscopy. *Stain Technology*. (1963) 38 335.
- 12.- Howatson, A., Almeida, J. A method for the study of cultured cells by thin sectioning and electron microscopy. *J. Biophysical and Biochemistry Cytology*. (1958) 4 (1) 115-118.
- 13.- Leduc, E.H. Marinozzi, V., Bernhard, W. The use of water soluble glycol metacrylate in ultrastructural cytochemistry. *J. of Research Microscopy Soc.* (1963) 81:119.
- 14.- Luft, J. Improvements in epoxy resins embedding methods. *J. of Biophysical and Biochemical Cytology*. (1969) 9 409-414.

- 15.- McCombs, R., Beneysh-melnick, M. The use of millipore filters-
in ultrastructural studies of cells cultured sand viruses. J.-
of cell Biology (1968) 36 231-243.
- 16.- Nelson, B., Flaxman, A. In situ embedding and vertical section
ing for electron microscopy of cultures grown on plastic pe--
tri dishes. Stain Technology. (1972) 47 (5) 261-265.
- 17.- Newman, S.B., Borysko, E., Swerdlow, M. New sectioning techniqu
es for light and electron microscopy. Science. (1949) 110:66.
- 18.- Nishiura, M., Rangan, S. A device for embedding tissue culture-
preparations grown on coverslips. J. of Biophysical and Bioche
mical Cytology. (1960) 7 (2) 411-412.
- 19.- Porter, K.R., Claude, A., Fullam, E.F.
Journal Experimental Medicin. (1945) 81:233.
- 20.- Porter, K.R. Electron microscopy of basophilic components of cy
toplasm. J. Histochemical and Cytochemical (1954) 2: 346.
- 21.- Reynolds, E.S. The use of lead citrate at haigh pH as an elec-
tron opaque stain in electron microscopy. J. of Cell Biology -
(1963) 17 208-212.
- 22.- Robins, E., Gonatas, N. In vitro selection of the mitotic cell
for subsequnt electron microscopy. J. of Cell Biology. (1964)
20 356-359
- 23.- Rosen, S. I. Cover glass embedding in open-end capsules for ele
ctron microscopy Stain Technology. (1962) 37 195-197.
- 24.- Ryeter, A., Kellenberger, E. L'inclusion au polyester pour l'u
ltramicrotomie. J. ultrastructural research. (1958) (b) 2:200.
- 25.- Smith, W., Gray, E. A. Sandwich-embedding technique for monola-
yer of cells cultured on araldite. J. of microscope. (1969) -
89 359-363
- 26 - Sparvoli, E., Gay, Helen, Kautman, B.P. Open-face epoxy embed-
ding of cells for ultrathin sections. Stain Technology'
(1965) 40 83-88
- 27 - Staubli, w Nouvelle matière d'inclusion hydrosoluble pour la-
cytologie electronique. Comptes rendu Seanc. Biology
(1960) 250:1137
- 28 - Sykes, K. A., Basrur, K.P. A melinex coverslips method for ultr
astructural studies of monolayer cultured. In vitro (1971) -
7 (2) 68-73.
- 29 - Watson, M.L. Staining of tissues section for electron microscop
y with heavy metals. J. Biophysical and Biochemistry Cytology
(1958) 4 475.