UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Facultad de Ciencias

ESTUDIO EXPERIMENTAL SOBRE LOS METODOS DE FIJACION DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL PARA SU ESTUDIO ULTRAESTRUCTURAL

T E S I S

Que para obtener el Título de

B I O L O G O

P r e s e n t a

ERNESTINA UBALDO PEREZ

México, D. F. 1977

Universidad Nacional Autónoma de México
UNAM
Biblioteca Central
Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

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.

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Microscopía Electrónica, de la División de Investigación de la Facultad de Medicina

U N A M

MI AGRADECIMIENTO

Agradezco al Dr. Gerardo H. Vázquez Nin
su valiosa dirección y entusiasmo dedicado al desarrollo de
este trabajo, impulsandome con sus atinados consejos.

A la Dra. Olga M. Echeverría M.
mi reconocimiento sincero por
la ayuda prestada en la realiz
ación de éste trabajo.

También hago patente mi agradecimiento a todas las personas que amablemente cooperaron en muy diversas formas.

Con cariño y respeto a
mis queridos padres
y hermanos.

A mi tío Epitacio quien
con su cariño y sacrificios
hizo posible este logro en
mi vida.

A mis compañeros
y amigos.

INTRODUCCION

Nociones de fijación de tejidos para microscopía electrónica.

El estudio de las células vivas ofrece pocos detalles morfológicos y si los tejidos son cortados sin tratamiento previo, se dañan algunas células produciendose hinchazón ó retracción osmótica y autólisis; por lo que el interés de los investigadores se desplazó hacia las células muertas , tratadas en formas particulares.

La fijación es esencialmente un método para preservar la morfología y la química de la célula, que consiste en la muerte de ésta, de manera que las estructuras que poseían en estado viviente se conserven con el mínimo agregado de artificios. Para preservar un mayor número de estructuras celulares para la observación tanto en el microscopio óptico como en el electrónico, los microscopistas recurren normalmente a los fijadores. Los fijadores conservan las células preparándolas para la coloración , inclusión y microtomía.

La fijación se realiza por medio de agentes físicos y químicos. Los agentes físicos son : el calor (húmedo o seco) y el frío (congelación). Los agentes químicos son sustancias que reaccionan con los componentes celulares , estos son llamados líquidos fijadores que pueden estar formados por uno o más agentes acticos.

Un ejemplo de fijación física es el método de congelación y desecación. Esta técnica fue ideada a fines del siglo pasado por Altman en 1894 . El método consiste en esencia , en congelar bruscamente el tejido sumergiéndolo en un medio a temperatura muy baja(ej. aire líquido a -195°C) y luego en desecarlo al vacío a baja temperatura (-30 °C ó

menos). La desecación tiene lugar cuando la tensión parcial de vapor en la atmósfera que rodea al tejido, congelado es menor que la tensión de vapor de agua contenida en el tejido a la temperatura de desecación. Esto se consigue con el vacío y el agua contenida en el tejido pasa directamente al estado gaseoso(sublimación) sin que se interponga una fase líquida que pueda producir distorsión en la célula. De esta manera se produce una deshidratación progresiva que lleva prácticamente a la extracción de todo el agua contenida en el tejido, con excepción de un residuo que está fijado fuertemente. La rapidez de la fijación permite sorprender a las células en momentos críticos de su función. La técnica debe ser considerada como intermedia entre el examen de los tejidos fijados y frescos.No se trata de una verdadera fijación en sentido estricto porque le falta el carácter de la irreversibilidad. Muchos de los componentes celulares se conservan en la misma forma soluble que al estado viviente.

La fijación química del material biológico, con soluciones acuosas o no acuosas producen una precipitación de proteínas y una detención de la actividad enzimática de la célula viva, induciendo muy pocos cambios estructurales post mortem en el tejido.

Los líquidos fijadores interrumpen las funciones de las células evitando su deformación y proveen a los tejidos de una determinada resistencia a las manipulaciones, mediante su acción indurante . La acción coagulante realiza el endurecimiento del tejido, por formar en presencia del reactivo compuestos sólidos, cuya consistencia se añade a la del tejido. Cuándo se sumerge un trozo de tejido en un líquido fijador , la muerte de las células no ocurre en forma instantanea. El fijador penetra en el tejido por difusion desde la periferia hacia el centro , de manera que las células más externas se fijan más rápido y mejor que las centrales. Por este motivo, en todo tejido fijado hay siempre un gradiente de fijación que depende de la penetrabilidad del fijador ,

su dilución progresiva con los líquidos celulares y las alteraciones post mortem que ocurren en las células : por anoxia, cambios en la concentración de hidrogeniones, de presión osmótica y por acción enzimática (autólisis). La rapidez de penetración del fijador no depende tanto de su coeficiente de difusibilidad, como de la barrera proteica de precipitación que se produce en la parte periférica del tejido, por lo que es necesario trabajar con trozos de tejido de poco espesor. los fijadores al difundir en las células producen en éstas, corrientes que frecuentemente desplazan a los componentes solubles y los extraen con mayor o menor intensidad. Así los electrolitos,glúcidos solubles y hasta algunos lípidos pueden salir de las células por acción de los fijadores.

Una importante característica de los fijadores, es el cambio que producen en la apariencia y naturaleza de las proteínas celulares. Este cambio en la configuración física de moléculas proteicas se llama desnaturalización. La proteína desnaturalizada es menos soluble en soluciones acuosas. En algunos casos la desnaturalización depende del tipo y concentración de los fijadores usados, así como la duración del tejido tratado. En el caso de desnaturalización temporal o parcial las proteínas pueden regresar a su estado original o quedarse inestables. El estado inestable de las proteínas, es un obstáculo para la realización de una buena preservación. Por otro lado las proteínas desnaturalizadas se convierten en coágulos que involucran cambios irreversibles . Los reactivos que coagulan las proteínas en mezclas opacas de gránulos o retículos sólidos que permanecen suspendidos en el fluido, son llamados fijadores coagulantes. Estos floculan las moléculas proteicas protoplásmicas, causando cambios en las estructuras proteicas por lo que no se usan en microscopía electrónica. Por el contrario los fijadores no coagulantes (tetraóxido de osmio, glutaraldehído, etc.) transforman las proteínas en un gel muy fino

por su estabilización causando muy poca desnaturalización de estas, que retienen algunos de sus grupos activos.

La extracción de las proteínas es variable con el agente fijador y el amortiguador usado, así como la temperatura y el tiempo de permanencia de la muestra en dichos líquidos. La fijación en tetraóxido de osmio de 2 a 4% disuelto en veronal acetato que se usó clasicamente en microscopía electrónica extrae en 4 horas casi el 50 % del peso seco del tejido (Bahr, 1955). Luft y Wood (1963) demostraron que el hígado de rata fijado con tetraóxido de osmio al 3.33 % amortiguado con S- collidina, pierde un 15 % de su contenido - proteico en la fijación y un 15 % durante la deshidratación. Al usar estos autores otros amortiguadores como el de fosfatos, arsenatos, de bicarbonatos HCl, veronal - acetato HCl, y el dicromato- cromato de Dalton, encontraron que se pierde un 8 % del contenido proteico durante la fijación y un 4 % en la deshidratación.

La fijación de tejidos para microscopía electrónica es un problema crítico, puesto que el fijador debe preservar no solamente la forma y tamaño de los componentes celulares, sino también su organización molecular, para que la estructura molecular se haga insoluble a los solventes utilizados en la inclusión y lo suficientemente fuertes para resistir las fuerzas mecánicas implicadas en el corte ultrafino y en la acción del haz electrónico por lo que el fijador utilizado debe reemplazar las uniones débiles, como los puentes de hidrógeno, uniones iónicas, fuerzas de van der Waals, que - se alteran con los cambios de temperatura y los solventes orgánicos por uniones covalentes. Ciertos fijadores espe - ciales tienden a mantener intactas determinadas macromolé - culas y se utilizan en citoquímica.

Un fijador ideal para microscopía electrónica debe cumplir estos requisitos :

a).- Desnaturalizar las proteínas, deteniendo las reacciones enzimáticas sin alterar la ultraestructura celular.

b).- Evitar la alteración por los solventes de la ulterior inclusión.
c).- Aumentar la resistencia a la acción del fuerte bombardeo del haz de electrones, al introducir los cortes en el microscopio electrónico.

La preservación del sistema nervioso, para su estudio antiguamente era un problema ya que este tejido es muy delicado y se altera rápidamente después de la muerte, merced a la producción precoz de fenómenos de autólisis ,y a que se altera notablemente a consecuencia de las variaciones de presión osmótica. El fijador ideal sería el que, además de coagular y hacer insoluble en agua y alcohol la trama nerviosa, conservara exquisitamente la arquitectura íntima de las células y fibras y evitará en absoluto el retraimiento, coalescencia y vacuolizaciones. Desafortunadamente no existe éste fijador ideal aplicable a todos los casos, por lo que es necesario mencionar varios fijadores :

FORMOL.- Es una solución acuosa de aldehído fórmico al 4 % fue empleado por primera vez en microscopía óptica para fijar sistema nervioso central por inmersión, conservando bastante bien la glia de la sustancia gris y blanca, pero altera sensiblemente la mielina y en cierta medida, los organoides ricos en membranas. Ramón y Cajal et al (1972) agrega una variante al fijador de formol, añade bromuro de amonio que actúa como mordiente y colorea la glia. Más tarde nuevamente Ramón y Cajal (Ramón y Cajal et al, 1972) propone otro fijador de formol con nitrato de urano para colorear el aparato reticular de Golgi de todos los tejidos, posee el inconveniente de penetrar poco sobre todo en la sustancia gris.

ALCOHOL.- Utilizado como fijador del sistema nervioso, es uno de los más inofensivos para ésta, pero altera profundamente, y aun disuelve a la larga, los lipoides mielínicos. Asi mismo es un excelente indurante para las neurofibrillas y plexos nerviosos e histogénesis del sistema nervioso -

(método de Cajal). Siendo un buen fijädor para su empleo ulterior del tejido con los colorantes básicos de anilina. También tiene acción deshidratante de los cortes, gracias a la cual se obtienen preparaciones conservables.

LIQUIDO DE MULLER.- Se compone de bicromato potásico, sulfato sódico y agua destilada, es uno de los fijadores más antiguamente usado en la fijación del tejido nervioso, tiene acción selectiva para la mielina, la fija y endurece, no retrae, ni deforma las piezas del tejido. También se puede utilizar para la demostración de la morfología dè las neuronas en el método de Golgi.

LIQUIDO DE REGAUD.- Compuesto de bicromato de potasio al 3% acido acético glacial y formol, es un excelente fijador de las mitocondrias de las células nerviosas de neuroglia.

TETRAOXIDO DE OSMIO. - Fue introducido en la técnica histológica por Schültze y Dudneff en 1865(Ramón y Cajal, et al 1972), como uno de los fijadores más importantes del tejido nervioso, la principal ventaja de éste reactivo, sólo o asociado a otras sustancias, consiste en mantener fielmente la forma de las fibras nerviosas, fijando perfectamente la mielina y demás lipoides. Las piezas fijadas en tetraóxido de osmio pueden someterse a la disociación (nervios) o incluirse para efectuar cortes. Permite coloraciones complementarias (fucsina , hematoxilina, safranina, etc.). La circunstancia de emitir vapores irritantes sobre todo para la conjuntiva y la facilidad con que se reduce a la luz en contacto de impurezas y singularmente de sustancias grasas. impone para su conservación algunas precauciones. Su principal inconveniente es la extrema lentitud de su penetración en el tejido lo que obliga el uso de piezas muy pequeñas, lo que a veces es muy inconveniente en los estudios de vías de conexión.

Camilo Golgi, 1880 (citado por Ramón y Cajal, et al 1972) descubrió el empleo del cromato de plata para destacar las células nerviosas con exclusión completa de las otras. Ramón y Cajal adoptó ésta técnica en 1888 y 1889(citado por el mismo autor y de Castro 1972) con objeto de perfeccionarla eventualmente y a medida que aplicaba la nueva técnica a diferentes zonas del sistema nervioso, descubría una desconcertante diversidad de tipos de células nerviosas provistas de las más distintas formas de expanciones celulares. El mismo diseñó otros métodos para colorear los cortes histológicos logrando un gran adelanto en el estudio del sistema nervioso.

PIRIDINA.- Introducida por Donaggio (citado por Ramón y Cajal, et al 1972) para técnica neurológica, permite la impregnación de las neurofibrillas pero modifica profundamente los demás componentes del protoplasma, cuando se le emplea pura, produce vacuolas en la sustancia gris pudiendo suscitar coalescencias intercelulares.

Fischer (1899), trabajó sobre métodos coloidales y llegó a la conclusión de que los fijadores actúan esencialmente sobre la porción proteica de las células produciendo una separación de la fase sólida (dispersa) del coloide, de la líquida (dispersante) y que la primera precipita en la forma de gránulos, redes, grumos, etc. Señaló que los mejores fijadores son los que provocan las más mínimas alteraciones en las células y que precipitan las proteínas en la forma más fina, llegando a ser agregados ultraestructurales que no cambien el aspecto de la célula y tiendan a reemplazar las débiles asociaciones intermoleculares por otras más estables, dándoles mayor unidad.

La investigación biológica ha visto incrementada extraordinariamente sus posibilidades con el empleo del microscopio electrónico. Los primeros investigadores de la ultra-

estructura celular utilizaron para fijar sus tejidos fundamentalmente el tetraóxido de osmio que durante el siglo pasado se usaba para microscopía óptica.

Palade en 1952, introdujó algunas características que debe reunir el líquido fijador, como son su concentración , pH y el uso de amortiguadores como el acetado de veronal . En este trabajo demostró que la concentración de hidrogeniones del líquido fijador es muy importante para una buena - preservación del tejido y demostró lo benefico que es usar amortiguador en el líquido fijador ligeramente alcalino, ya que un fijador ácido produce hinchamiento mitocondrial, vacuolizaciones y precipitaciones del protoplasma.

Dalton en 1955, agrega otra variante al fijador de tetraóxido de osmio, el dicromato de potasio, que aunque fijaban bien los tejidos, producía menos contraste en las células.

Rhodin (1954) y Zetterqvist (1956), se dieron cuenta que el líquido fijador de Palade resultaba algo hipotónico para algunos tejidos y los hematíes de la sangre de los mamíferos, por lo que no era recomendable como fijador para los tejidos de los mamíferos y propusieron un fijador isotónico para evitar la hinchazón de algunos organoides celulares como las mitocondrias y vesículas del retículo endo - plásmico.

Luft en 1956, introduce un líquido fijador con aldehído acrílico o acroleina que penetra rápidamente al tejido evitando la contracción del mismo pero no retiene los lípidos. El inconveniente de éste fijador es que destruye la actividad enzimática por completo.

Kellemberger, Ryter y Sechaud (1958) proponen algunas modificaciones a las propiedades del fijador. En un estudio sistemático de la respuesta del material genético de las bacterias emplearon distintos líquidos fijadores, llegando

a la conclusión de que se debe añadir iones de calcio o de magnesio y hacer un lavado con acetato de uranilo o con nitrato de lantano, después de la fijación.

Bennett y Luft en 1959, agregan una inovación al fijador de tetraóxido de osmio que es la S- collidina (2,4,6, trimetil piridina) que es una base que actúa como amortiguador. La onda de acidificación que produce el tetraóxido de osmio al reaccionar rápidamente con las aminas terciarias del tejido, es aminorada por el amortiguador de S- collidina, pues sus componentes ionizados , que son bases débiles penetran rápidamente en las células y reemplazan la capacidad de los grupos aminos para mantener el pH , intracelular más o menos constante.

Como la fijación por inmersión no dió muy buenos resultados, debido a que las distancias que debe penetrar el fijador son relativamente grandes ya que las muestras más pequeñas de tejidos miden de 1 a 3 milímetros de lado. Fue necesaria la introducción de los agentes fijadores por la corriente sanguínea para obtener una rápida distribución del fijador por todo el tejido, siendo necesario que el fijador recorra por difusión distancias de unas pocas micras para ponerse en contacto con las células a fijar.

Pease (1962) y Palay (1962), experimentaron ésta técnica de fijación por perfusión con tetraóxido de osmio, para preservar todos los componentes celulares del sistema nervioso central.

González Aguilar y De Robertis (1963), desarrollaron una técnica de fijación mediante perfusión vascular con formalina seguida de otra fijación con tetraóxido de osmio, para el estudio del sistema nervioso central de ratas, obteniendo buenos resultados, pero cuando usaron unicamente formalina , no consiguieron una preservación completa, sino sólo de pequeñas porciones .

Sabatini, Bensch y Barrnett (1962, 1964), introdujeron

el uso de aldehídos como fijadores (glutaraldehído, glioxal, hidroxiadipaldehido, crotonaldehído, aldehído pirúvico, acetaldehído y metacroleína), a diferentes concentraciones por perfusión vascular para preservar la ultraestructura celular y actividad enzimática de varios tejidos animales, por doble fijación y demostraron que de todos los aldehídos que estudiaron, el glutaraldehído fué el más efectivo, para preservar la estructura fina.

Karlsson y Schultz (1965) estudiaron los factores que afectan la fijación del sistema nervioso central, para su estudio en el microscopio electrónico. Compararon los resultados obtenidos por perfusión de aldehídos con los de conseguidos mediante la de tetraóxido de osmio y estudiaron las diversas concentraciones del agente fijador, así como la osmolaridad y pH del vehículo del fijador. Los mencionados autores encontraron que la hipertonicidad causa alteraciones celulares como contracciones , hinchamientos y formación de espacios extracelulares, que los pH elevados o muy bajos del vehículo del fijador son perjudiciales para la preservación ultraestructural y que cuando se aumenta la concentración del fijador se reduce la formación de espacios extracelulares,sin embargo no se obtuvo una buena fijación ultraestructural en forma constante.Posteriormente Schultz y Karlsson(1965), en sus estudios de perfusión vascular con aldehídos y con tetraóxido de osmio encontraron que la asimetría de las membranas celulares producida por la fijación con tetraóxido de osmio, desaparecía con la previa fijación en aldehídos y disminuía la frecuencia del espacio extracelular.En 1966 Karlsson y Schultz encontraron nuevas experiencias sobre la fijación del sistema nervioso central de rata, estudiado en el microscopio electronico, el tejido cerebral fue perfundido con glutaraldehído y concluyeron que la calidad de la fijación estructural fue pobre al ser retrasada la perfusión del líquido fijador después del lavado sanguíneo, observaron la formación de muchos espacios extracelulares y mala preservación de los organelos intracelulares, algunas mitocondrias presentaron autólisis interna y otras

presentaron hinchazón, sólo la mielina se fijo bien.

Torack (1965), observó aumento de espacios extracelulares en el tejido nervioso, fijado con hidroxiadipaldehído, por la acción química que éste ejerce sobre la membrana plasmática y sobre las proteínas intracelulares. Sin embargo observó que con glutaraldehído ésto no ocurrió, confirmando a este respecto que el glutaraldehído es el mejor fijador.

Después de la introducción del glutaraldehído como un fijador de uso general para microscopía electrónica e histoquímica por Sabatini, et al (1963), fue necesario estudiar su pureza, estabilidad y composición química. Fahimi y Drochmans (1965b), para purificarlo diseñaron 2 métodos : 1).- Lo trataron con carbón activado y 2) por destilación fraccionada al vacío. Espectrofotométricamente determinaron su concentración, utilizando el pico de absorción a 280 nm. (nanometros) del producto destilado disuelto en agua. En los productos comerciales determinaron dos picos de absorbancia uno a 235 nm, y otro a 280 nm. El primero es debido a un polímero del glutaraldehído y a otras impurezas y el segundo a el glutaraldehído monómero, y concluyeron que los productos destilados puros, tienen un sólo pico de absorbancia a 280 nm. Más tarde en 1968, los mismos autores publicaron sus estudios sobre la inhibición de la actividad de la fosfatasa acida en hígado de rata, usando glutaraldehído comercial como fijador.y encontraron que la inhibición era alta pero que cuando usaron glutaraldehído destilado al vacío ésta disminuía.

Westrum y Lund (1966), estudiaron el sistema nervioso (cerebro) de rata y carpa dorada, fijados por perfusión con formalina, en el microscopio óptico y electrónico encontraron cambios drásticos en los organelos citoplásmicos, como : retículo endoplásmico hinchado y formación de espacios extracelulares . Concluyendo que la prolongada fijación con formalina sola, da una pobre fijación ultraestructural. Pero

se puede mejorar si se perfunde rápidamente, sin hacer previo lavado, y seguida de una postfijación con tetraóxido de osmio.

Webster y Ames (1969), aislaron retina de conejo y la fijaron con glutaraldehído al 3 % con amortiguador de fosfatos hipertónico, también la fijaron con tetraóxido de osmio al 1 %, en solución amortiguadora isotónica. Al observarse los cortes en el microscopio electrónico, encontraron regular fijación de algunos componentes celulares, pero hubo contracciones celulares, hinchamientos mitocondriales y dilatación del retículo endoplásmico y de algunas sisternas del aparato de Golgi.

Rodríguez (1969), perfundiendo por el ventrículo cerebral, con una combinación de aldehídos (glutaraldehído, formaldehído y acroleína), logró muy buenas fijaciones de todas las áreas del sistema nervioso central del sapo y de otros animales pequeños, e introdujó un dispositivo para controlar la presión del fijador dentro de las cavidades.

Schultz y Case (1970), modificaron la técnica de perfusión vascular para el sistema nervioso central, haciendo un lavado antes de la fijación, con solución Tyrode conteniendo goma arábiga que es un polisacárido que no se combina con el fijador y no difunde a través del endotelio vascular creando así una cierta tensión oncótica en el interior de los capilares que se asemeja a la que normalmente tiene la sangre. Para la fijación usaron aldehídos concentrados (glutaraldehído, formaldehído y acroleína) y observaron alteraciones en los organoides celulares.

Factores que afectan la calidad de la fijación.

El pH, la fuerza iónica total, la composición iónica específica, la constante dieléctrica, la osmolaridad, la temperatura, el tiempo de fijación y el método de aplicación de la solución fijadora, son factores críticos en la deter-

minación de la calidad de fijación del tejido. El agente fijador puede tener un efecto perjudicial en la estructura de un organelo, aunque puede no ser la causa principal del daño.

Tanto el aumento como la disminución del pH altera a las proteínas, porque su punto isoeléctrico depende del número de ácido o de bases presentes en las moléculas y de la constante de disociación de ácidos y bases. Las proteínas son eléctricamente neutral a un pH igual al punto isoeléctrico, muestran solubilidad y viscosidad mínima y producen poco aumento de presión osmótica. Cualquier cambio en el pH afecta las propiedades físicoquimicas de una proteína. Las proteínas son capaces de combinarse con cationes en el lado alcalino del punto isoeléctrico y con aniones del lado ácido. Bajo condiciones normales el pH de las células está en el lado alcalino. Un cambio de pH del lado alcalino, aumenta la ionización y la presión osmótica de las proteínas, esto causa la atracción osmótica de los líquidos fijadores a las células. Los cambios de pH en un fijador, causan grandes alteraciones dentro de la célula, incluyendo la consistencia del protoplasma, selectividad de la membrana celular y actividad de las enzimas. Se sabe que el tetraóxido de osmio disminuye el punto isoeléctrico de las proteínas, debido a la destrucción de aminoácidos básicos. La reducción del tetraóxido de osmio a un residuo ácido puede causar también acidificación del tejido. En eritrocitos de amfibio y en proteínas en general, Tooze (1964) indicó que el pH isoeléctrico disminuyó de un rango de 6.9 a 7.2 a un valor entre 5.0 y 5.2. Los tejidos fijados en solución de tetraóxido de osmio no amortiguado puede formar artefactos, después de que la acidificación de los tejidos precede su fijación. La amortiguación de la solución fijadora, puede neutralizar la probable acidificación y de este modo el daño al tejido es mínimo. Algunos investigadores sin embargo, han reportado preservaciones satisfactorias de la estructura fina con -

soluciones fijadoras de tetraóxido de osmio no amortiguado (Drochmans, 1960a, y b ; Claude, 1961a, y b ; Malhotra,1962; Backer, 1965 ; Chuang, 1968).

Recientemente Wrigglesworth y Parcker(1969), demostraron que el pH , permite modificaciones estructurales de las proteínas, en membranas mitocondriales, las cuales conducen a alteraciones en la ultraestructura de la membrana. La combinación de las proteínas con aniones o cationes para formar componentes insolubles, esta estrechamente relacionada a el pH del líquido fijador. Ya que las proteínas son responsables de las características estructurales de una célula y el peso molecular de las proteínas depende fuertemente del pH . También es importante conocer la concentración de iones hidrógeno del interior de la célula para controlar la calidad de fijación. El pH promedio de muchos tejidos animales es de 7.4. La mejor preservación de la estructura fina se obtiene a un pH de 7.2 a 7.4. Algunos investigadores sin embargo han encontrado el mismo resultado con pH altos como de 8.0 (Mercer y Birbeck, 1966). Los pH más alcalinos (8.0 a 8.4) se prefieren cuando se trabaja con tejidos altamente hidratados, como los protozoarios, invertebrados y tejidos embrionarios. Helander(1962), indicó que la mucosa gástrica se preserva mejor a pH 8.5 . La preservación mejora cuando se obtiene bajo condiciones alcalinas debido a la inhibición de la acción proteolítica de la pepsina. Un fijador con alta osmolaridad es útil para fijar los tejidos mencionados anteriormente ya que se caracterizan por tener un plasma con alta presión osmótica. Los pH bajos son recomendados para estabilizar los constituyentes nucleolares y las delicadas fibrillas del huso mitótico (Claude,1962;Roth, et al,1963). Waddell y Bates (1969), usaron varios métodos para determinar el pH intracelular de una gran variedad de células y tejidos.

Las soluciones amortiguadoras contienen un ácido débil y su sal con una base fuerte, o una base débil y su sal con

un ácido fuerte que resisten cambios en la concentración de iones de hidrógeno, cuando se agregan pequeñas cantidades de un ácido o base fuerte. En esta forma , durante la fijación, los cambios del pH del amortiguador son muy pocos, ya que si aumenta la concentración de protones, la fracción del ácido que se encuentra disociada los acepta. El efecto de los cambios de pH , en la estructura fina durante la fijación se reportaron como insignificantes(Rhodin, 1954; Zetterqvist, 1956). Sin embargo estos estudios demostraron algunos cambios, incluyendo vacuolización de las sustancias del citoplasma como resultado de los cambios de pH . La relativa tolerancia del tejido cerebral a variaciones en pH reportados por Schultz y Karlsson (1965) es en parte relacionado a las condiciones óptimas bajo el cual el tejido fue fijado.

La preservación inadecuada de capas de tejido profundas puede deberse no sólo a la autólisis y a la lenta penetración del fijador , sino a que se esta usando un amortiguador inadecuado. La temperatura del amortiguador también es importante, puede variar si se prepara en un cuarto frío y se pasa a uno de temperatura ambiente (Good, et al, 1966).

La calidad de la fijación depende no unicamente del pH, sino también del tipo de iones presentes en el amortiguador, ya que los amortiguadores reaccionan en los procesos de fijación. Se ha demostrado que la cantidad de proteínas extraídas durante la fijación en presencia de iones de calcio, es diferente que en presencia de iones de sodio, aún cuando en algunos casos la tonicidad es parecida (Wood y Luft, 1965). Se demostró que al agregar iones de calcio al amortiguador acetato de veronal, usando como fijador el tetraóxido de osmio, se suspendió la extracción de la hemoglobina de las células sanguíneas (tooze, 1964). Carstensen, et al, 1969 también demostraron que el agregado de calcio a la solución de tetraóxido de osmio, ayuda a la estabilidad de las membranas de las células sanguíneas . Luft y Wood (1965), de-

mostraron que el tetraóxido de osmio amortiguado con S-collidina, extrae proteínas del hígado de rata, durante y después de la fijación. Otros investigadores sin embargo, encontraron que la S-collidina mejora en el tejido pulmonar después de probar 6 diferentes tipos de amortiguadores (Gil y Weibel, 1968).

Los diferentes tejidos difieren en sus reacciones al usar un mismo fijador. En estudios comparativos usando diferentes tipos de amortiguadores se demostró que la variación en la constitución específica del amortiguador produce diferencias significativas en la tinción y apariencia morfológica de células y organelos (Wood y Luft, 1965). Los efectos de diferentes sistemas amortiguadores en la estructura fina son menos aparentes, si el tejido es fijado en *in situ*, con glutaraldehído (Ericsson, *et al*, 1965 ; Maunsbach, 1966a). Esta estabilidad probablemente sea debida a los efectos de las uniones fuertes cruzadas que el glutaraldehído produce entre las cadenas de proteínas. Debe tenerse en cuenta que algunos organelos celulares son más sensibles a un determinado amortiguador que con otros. Desde que Palade(1952) introdujo el amortiguador de acetato de veronal para el fijador se han empleado un gran número de diferentes amortiguadores. Sin embargo los comunmente usados en microscopía electrónica tienen una moderada disociación y fuerza iónica.

No existe un amortiguador ideal para todos los tejidos, ni tampoco existe un acuerdo entre los investigadores, en cual es el mejor amortiguador, ya que cada sistema amortiguador tiene sus ventajas y desventajas. La eficiencia de un amortiguador varía en diferentes pH , y debe determinarse si es útil al rango de pH, al que se le pretende utilizar.

La tonicidad del fijador tiene un efecto directo en la apariencia del tejido fijado. Sin embargo, los diferentes tejidos difieren en su capacidad para intercambiar iones , entre la solución fijadora y la sustancia intercelular. Esta diferencia probablemente está en parte relacionada con la densidad del tejido pues la osmolaridad del fijador ejerce

un marcado efecto en los tejidos menos compactos. Fahimi y Drochmans (1965a) estudiaron los efectos que causan en músculo de rata, los cambios de osmolaridad de un fijador y Gil y Weibel (1968) lo hicieron con tejido pulmonar. Stoner y Sirak (1968) observaron en mitocondrias cambios en densidad óptica, volumen y ultraestructura inducidos osmoticamente por los cambios en osmolaridad del fijador.

Las soluciones hipotónicas en general causan hinchamientos de los tejidos, esto se observa fácilmente. como ya dijimos en las mitocondrias, mientras que las hipertónicas producen retracciones. Por lo que se ha probado equilibrar el fijador osmóticamente con el interior de la célula. Al agregar un amortiguador al fijador, la tonicidad se puede ajustar apropiadamente agregando no electrolitos (sucrosa). o electrolitos (cloruro de sodio) que no penetren al interior de las células con facilidad. Las sustancias más comúnmente usadas para equilibrar la tonicidad son el cloruro de sodio (Rhodin, 1964), sucrosa (Caulfield, 1957), polivinil pirrolidona (Trujillo - Cenoz, 1957), dextran (Bahr, et al, 1957) y glucosa para células vegetales (McLean, 1960). Se han propuesto diferentes métodos para ajustar la tonicidad de un fijador. Uno de los métodos más efectivos es el de agregar una solución salina para hacer isotónico al fijador. Este método fue primero propuesto por Sjöstrand y colaboradores, 1953,1956a, 1956b; Rhodin, 1954; Zetterqvist, 1956. Cuando realizaron exitosas fijaciones en tejidos de mamíferos con tetraóxido de osmio amortiguado y equilibrado isotónicamente con el suero sanguíneo. El equilibrio iónico se realizó agregando sales de sodio y potasio (cloruro de sodio) en la proporción establecida para tejidos de mamíferos . La utilidad de las soluciones isotónicas indirectamente fue demostrado por Maunsbach. et al, (1962), cuando reportaron los efectos indeseables en la estructura fina al fijar células tubulares proximales del riñón con tetraóxido de osmio, conteniendo cloruro de sodio hipertónico. Rhodin (1954) reportó cambios

en el diámetro de las mitocondrias de epitelio intestinal fijado a diferentes osmolaridades. Bahr. et al (1958) y Wood y Luft (1965), opinan que la ventaja de usar tetra - óxido de osmio isotónico es exagerada y que la presión osmótica total que ejercen las partículas del soluto de a fijador no siempre esta relacionada con la hinchazón o encogimiento de las células. No habría un valor correcto para la isotonicidad por la considerable variación en la osmolaridad intracelular, lo que produce que en algunos casos la tonicidad intracelular sea diferente a la del plasma así - mismo, varios estudios han indicado que el líquido fijador isotónico no impide los hinchamientos (Bahr et al. 1957; Miloning y Marinozzi,1968).

Se ha demostrado que las membranas pierden su relativa impermeabilidad a los iones sodio cuando se fijan en tetraóxido de osmio (Wood y Luft, 1965; Elbers, 1966). La fijación con glutaraldehído no dió estos resultados . Por lo que conviene cuidar la tonicidad de los líquidos con que se tratan las muestras después de la fijación aldehídica, hasta completar su postfijación en tetraóxido de osmio.

El hinchamiento que, como dijimos más arriba, se pro - duce en ciertos tejidos fijados en soluciones isotónicas, se ha relacionado con la inactivación del transporte de sodio en la membrana celular (Robinson,1960). Sin embargo se ha mostrado que un fijador isotónico, disminuye el daño a la capa superficial de un espécimen, causado por desequilibrio osmótico. Además en el caso de tejidos delicados como pulmón y embriones o células cultivadas, en los cuales la penetración no es un problema, la fijación bajo condiciones isotónicas es adecuada porque proporciona las concentraciones apropiadas de iones a la mezcla fijadora. Bahr et al (1957). controlaron los hinchamientos al agregar dextran al glutaraldehído, evitando el aumento de espacios extravasculares., especialmente en páncreas. Esta forma de controlar los hinchamientos fue explicada por Wood y Luft (1965), hipoteti -

zando que después de estar en contacto con el tetraóxido de osmio, las membranas celulares pierden su relativa impermeabilidad a las pequeñas moléculas y iones de la solución fijadora, por el contrario las grandes moléculas de dextran son incapaces de pasar a través de membranas y así ejercen su presión osmótica que impide hinchamientos celulares. Milloning y Marinozzi (1968), sugirieron que el agregar calcio a sustancias no ionizables controla los hinchamientos y que los eritrocitos humanos se conservan correctamente al agregar cloruro de sodio al 0.05 % al fijador, sin embargo la presencia de sucrosa no inhibió el aumento de volumen. Se sabe que la ausencia de calcio en la solución de tetraóxido de osmio causa hinchamientos cromosomales y nucleares. El papel exacto del calcio en prevenir estos cambios no está completamente claro.

Cuando se usan concentraciones bajas de fijadores se requiere mucho tiempo de fijación, que causa difusión de enzimas , extracción de material celular y contracciones o hinchamientos del tejido. También las altas concentraciones destruyen la actividad enzimática y dañar la estructura fina de las células. Los diferentes componentes celulares difieren en su respuesta a las variaciones en la concentración de un fijador dependen del fijador empleado. Generalmente las altas temperaturas aumentan la velocidad de reacciones químicas entre el fijador y los constituyentes celulares, incluyendo las enzimas, también aumentan la difusión de un fijador dentro del tejido, pero cuando se prolonga por mucho tiempo causa excesiva extracción de material celular. Los fijadores que penetran y fijan rápidamente (acroleína) comunmente no requieren temperaturas altas o mucho tiempo de fijación, los fijadores que penetran lentamente y fijan moderadamente (tetraóxido de osmio), requieren mucho tiempo de fijación y bajas temperaturas para reducir al mínimo la extracción de los constituyentes celulares. Los fijadores que penetran lentamente pero fijan rápidamente (glutaraldehído

y permanganato de potasio) se pueden usar a temperaturas - altas reduciendo el tiempo de fijación. Los fijadores que penetran rápidamente pero fijan lentamente (formaldehído) no son preferidos para preservar la estructura fina excepto cuando se mezclan con otros fijadores.

OBJETIVOS.

La gran cantidad de trabajos realizados sobre la fijación del sistema nervioso central, para su estudio bajo el microscopio electrónico y la gran variedad de líquidos fijadores propuestos como aceptables ó excelentes, para fijar una estructura determinada ó un corto número de estructuras de la célula nerviosa, así como las contradicciones entre las conclusiones de los autores usando una misma técnica de fijación, originó éste estudio experimental, en busca de las causas de dichas dificultades y del método más adecuado para la fijación de todos los organelos celulares. Se emplearon los líquidos fijadores y técnicas de fijación por perfusión más comunes para el sistema nervioso central para su estudio en el microscopio electrónico, tratando de obtener un método de fijación confiable y fácil de aplicar en los laboratorios de microscopía elactrónica, sin necesidad de equipos especiales.

Dadas las irregularidades de fijación obtenidas con diversas marcas comerciales de glutaraldehído, que se obtienen en nuestro país, se planeó la evaluación de su pureza y eficacia en la conservación de la ultraestructura celular, para colaborar en el mejoramiento de la técnica de preparaciones de tejidos para su estudio con el microscopio electrónico en México.

MATERIAL Y METODO.

Se utilizó núcleo caudado de gato, corteza cerebelosa de rata, medúla espinal de renacuajo y muestras quirúrgicas de tumores cerebrales humanos. Las fijaciones fueron realizadas por inmersión ó perfusión. Los gatos se anestesiaron con una inyección intraperitoneal de nembutal, a una dósis de 30mg/kg de peso corporal y las ratas con éter. La anestesia debe ser superficial para evitar la anoxia. Se abrió por planos toráxico-abdominal. Se hizó una insición mediana de la piel y el plano osteomuscular se cortó con una insición paramediana derecha en un sólo colgajo. Se cortó el diafragma junto a las costillas y se voltearon los colgajos, sosteniendose con separadores en gato y con pinzas en rata. En ésta forma se expusó el corazón cortandose también el pericardio. La aurícula derecha se abrió ampliamente, para permitir la salida de la sangre y líquidos de perfusión, introduciendose la aguja de perfusión en el ventrículo izquierdo. Esta se seleccionóde acuerdo al tamaño del ventrículo de la especie con que se trabajó, pero en general debe ser corta, gruesa y con el bisel'ligeramente acortado. Si se acorta exageradamente, la introducción de la aguja a través del miocardio es difícil y ésta tiende a taparse. La perfusión se realizó con jeringas cuyo émbolo fue empujado manualmente ó más a menudo por caida libre, utilizando un desnivel máximo de 180 cm. Se perfundió en primera instancia una solución lavadora y luego el fijador. Las manipulaciones se realizaron con rapidez, de manera que no pasaran más de 3 a 10 minutos, entre la apertura del tórax con colapso pulmonar y el comienzo de la perfusión de la solución fijadora. Este tiempo es una medida subestimada de anoxia tisular. Se dejó pasar la solución fijadora de 20 minutos a media hora, tomando como síntoma de buena perfusión , no tanto la rigidez muscular como el aclaramiento del rojo re-

tiniano, que puede observarse desde los primeros momentos de lavado. El animal en general queda duro y puede dejarse sin abrir el cráneo de 10 a 15 minutos, después de terminada la perfusión. Se comprueba posteriormente si la masa encefálica está endurecida y blanca ó si por el contrario está con sangre y blanda. En éste último caso el animal se descarta. Se extrajo la muestra del tejido, la que, después de los tratamientos que se detallan en el capítulo de resultados, se deshidrató e incluyó en resinas epóxicas. Los bloques se cortaron con ultramicrotómos MK1 de Sorval y Ultratomo 1 de LKB provistos de navajas de vidrio. Los cortes se montaron en rejillas provistas de una lámina de formvar de soporte y se contrastaron con acetato de uranilo y/o con citrato de plomo. Dichas preparaciones se observaron y fotografiaron en un microscopio electrónico EM9S de la casa Carl Zeiss.

RESULTADOS.

Se investigaron los aspectos fundamentales de la preparación del sistema nervioso para su estudio con el microscopio electrónico. Los resultados se agrupan de acuerdo a la clasificación clásica de las manipulaciones de preparación de material biológico en microscopía de la siguiente forma ; 1) estudios sobre la fijación; 2) estudios sobre la postfijación; 3) estudios sobre el contraste y 4) estudios sobre la inclusión.

1.-Estudios sobre la fijación

La mayor parte de los experimentos se dirigieron a estudiar los siguientes factores: a) método de administración del fijador ;b) composición del líquido de lavado; c) composición del vehículo en el que se disuelven las sustancias fijadoras; d) composición y pureza de las sustancias fijadoras.

a).- Método de administración del fijador.

Dado que para los núcleos profundos como el caudado,hay que descartar la posibilidad de gotear directamente el fijador sobre el tejido en estudio. Se utilizaron solamente dos procedimientos: la inmersión y la perfusión, en el primer caso se diseca la zona en estudio en un animal anestesiado, cuya circulación se mantiene hasta el instante de la extracción de la muestra. Este procedimiento ha dado regularmente resultados inaceptables apareciendo hinchamientos gliales , retracciones, roturas de membranas, y mala conservación de los organoides de las neuronas.La única excepción han sido los tumores humanos, Como se aprecia en la fotografía de la figura 1, la mayor parte de las células tumorales estan bien fijadas, no hay roturas de membranas, ni hinchamientos acompañados de retracciones como se observa en todas las otras muestras del sistema nervioso. Sin embargo la fijación no es del todo homogénea en las diversas muestras de un mis

mo tumor, ni es constante en todos los tumores. La alteración más frecuente es el hinchamiento extremo de algunas células que presentan su citoplasma muy diluido.

La perfusión se realizó como se mencionó en el capítulo de Material y Método. Este procedimiento presenta algunas dificultades prácticas pues debe ser rápido para evitar las alteraciones anóxicas, la inyección del fijador debe ir precedida de la administración de un líquido isotónico amortiguado, que lave parcialmente de sangre el árbol vascular para evitar su coagulación con el fijador y obstrucción de vasos. Manteniendo la rapidez y flujo alto y deben evitarse las altas presiones que pueden producir roturas de capilares, por lo que el uso de aparatos automáticos de perfusión que empujan mecánicamente el émbolo de jeringas estan formalmente contraindicado. Tampoco se han obtenido buenos resultados con perfusores a presión de aire aunque ésta se controle manométricamente. El mejor sistema es el de caída libre utilizando equipos similares a los empleados en medicina para venoclisis. En mamíferos la máxima presión arterial varía poco entre las diversas especies a pesar de las grandes diferencias de talla, de manera que se usaron presiones de perfusión que variaron entre 120 a 180 cm., de agua. También dió buenos resultados la perfusión con jeringas de 100 cc., cuyo émbolo fue empujado manualmente cuidando de no exagerar la presión. Para evitar la sobrepresión se comprueba constantemente que el diámetro de la aorta no se dilate demasiado. Esto suministra una indicación práctica y confiable de que la presión del líquido de perfusión se encuentra en los límites normales.

Para la buena fijación del sistema nervioso se prefiere perfundir por ventrículo izquierdo del corazón a todo el organismo y no el área cefálica por las carótidas, lo que ahorraría fijador, debido a que el encéfalo se irriga a partir del polígono arterial de Willis (Círculo arterial del cerebro) que recibe aportes de las arterias vertebrales. Este

aporte es variable en las diferentes especies, en el gato por ejemplo, es muy difícil obtener buenas fijaciones perfundiendo por las carótidas, pero si se obtienen inyectando por el ventrículo, pues hay muchas ramas de la aorta que irrigan el sistema nerviosa anastomosándose con las vertebrales.

b).- Composición del líquido de lavado

Siempre es recomendable hacer un lavado del sistema arteriovenoso antes de la fijación con una solución lavadora, acompañada de un anticoagulante y de un vasodilatador. El anticoagulante (heparina) evita la coagulación de la sangre impidiendo que se formen trombos que obstaculicen el progreso del líquido de perfusión. El vasodilatador que se empleó fue la xilocaina que aunque en aplicación local es un anestésico de conducción, por vía sistemica actúa evitando radicalmente la vasoconstricción. El líquido lavador usado fue a veces la solución de Ringer y en otras ocasiones el amortiguador de cacodilato de sodio. El Ringer es una solución salina usada para mantener tejidos en sobrevida, se utilizó para mamíferos la siguiente mezcla:

Cloruro de sodio ($NaCl$) - - - - - - - - - - - - - 9.00 gr.
Cloruro de potasio (KCl) - - - - - - - - - - - - 0.42 "
Cloruro de calcio ($CaCl_2$) - - - - - - - - - - - 0.24 "
Bicarbonato de sodio ($NaHCO_3$) - - - - - - - - - - 0.30 "

Todas estas sustancias se disolvieron en un litro de agua destilada y se ajustó el pH a 7.2, usando papel indicador de pH marca Merck (pH 6.4 - 8.0, art., 9557). Si se prepara de esta forma el líquido será isotónico con un rango de osmolaridad de 310 a 320 mOsm/kg. Se utilizó también el amortiguador de cacodilato de sodio a diferentes osmolaridades; 0.15 M, 0.19 M, y 0.20 M., siendo la más adecuada la de 0.19 M. Este amortiguador se prepara disolviendo 4.0 gr. de cacodilato de sodio en una cantidad de agua destilada su

ficiente para completar 100 cc., y ajustando el pH a 7.2 - 7.3 de la forma indicada anteriormente. De estas soluciones por cada 100 cc., se le agrega 3 ml., de Xilocaina al 2 % sin vasoconstrictor y 500 unidades de Heparina marca Abbott, que contiene 1000 unidades por mililitro. Se agita para mezclar. Por cada gato utiliza un litro de solución y por cada rata 500 ml. Para llevar a cabo el lavado sólo se necesita la mitad del líquido, el cual debe estar a la temperatura del cuerpo del animal. Para esto, el líquido lavador se calentó a 40 C en baño María y la tubuladura del aparato de perfusión por donde pasa el líquido lavador y fijador se puso en un recipiente de 5 - 10 litros conteniendo agua de la llave calentada a una temperatura de 60 C que se mantuvo constante por medio de un calefactor y controlando con un termómetro cada 3 a 5 minutos. De este modo al pasar el líquido lavador por la tuberia se calentaba a una temperatura de 37 a 40 C.

c).- Composición del vehículo en el que se disuelven las sustancias fijadoras.

El vehículo que se usó para disolver las sustancias fijadoras fue el Ringer y el amortiguador de cacodilato de sodio de 310 - 320 mOsm/kg. pH 7.2 a 7.3. La osmolaridad del líquido que se utilizó como vehículo es de considerable importancia ya que ejerce una influencia significativa en la calidad de preservación de la estructura fina del tejido, por lo que siempre se controló este factor. La concentración del fijador ejerce poco efecto osmótico, porque difunde rápidamente a través de las membranas y sólo fugazmente actúa como carga osmótica. Es por eso que se estudiaron los resultados en función de la osmolaridad del vehículo sin el aldehído. Sin embargo, concentraciones desmedidamente altas del fijador producen retracciones que son más marcadas fuera del sistema nervioso.

El pH del vehículo del fijador es otro factor importan

te para la determinación de una buena fijación del tejido. Puesto que las proteinas actúan como mecanismos homeostá i-ticos en el mantenimiento constante del pH, del líquido extracelular, al agregarse grandes cantidades de ácidos ó de bases, la protección amortiguadora sería insuficiente , entonces el pH cambiaría produciendo grandes alteraciones físicas y químicas dentro de la membrana celular causando cambios estructurales e inactivación de las enzimas. De acuerdo con esto, se mantuvo constante el pH del vehículo del fijador, que ésta cercano al pH promedio de 7.4 de mu - chos tejidos animales. Se usó pH de 7.2 a 7.3.

El usar también el amortiguador de cacodilato de sodio 0.19 M.,pH 7.3 , 310 mOsm/kg., como vehículo del fijador mejoró considerablemente la calidad de la fijación de la escala ultraestructural de la célula nerviosa en comparación con los tejidos que tuvieron como vehículo del fijador, el cacodilato de sodio 0.15 M., y 0.20 M.

d)._ Composición y pureza de las sustancias fijadoras.

Las sustancias fijadoras usadas para la fijación del tejido nervioso fueron: paraformaldehído, glioxal, glutaraldehído y tetraóxido de osmio (OsO_4). Se usó paraformaldehído en polvo para evitar los contaminantes. Se preparó disolviendo paraformaldehído en polvo (marca Merck, Art., 4005) en líquido amortiguador de cacodilato de sodio 0.19 M., calentado a 55 - 60 C en baño María y en agitación constante durante 30 a 35 minutos, tiempo en que se transparenta. En caso de quedar ligeramente turbia la solución, se le agrega unas gotas de hidróxido de sodio (NaOH) concentrado hasta que la solución aclare y se deja enfriar a temperatura ambiente.

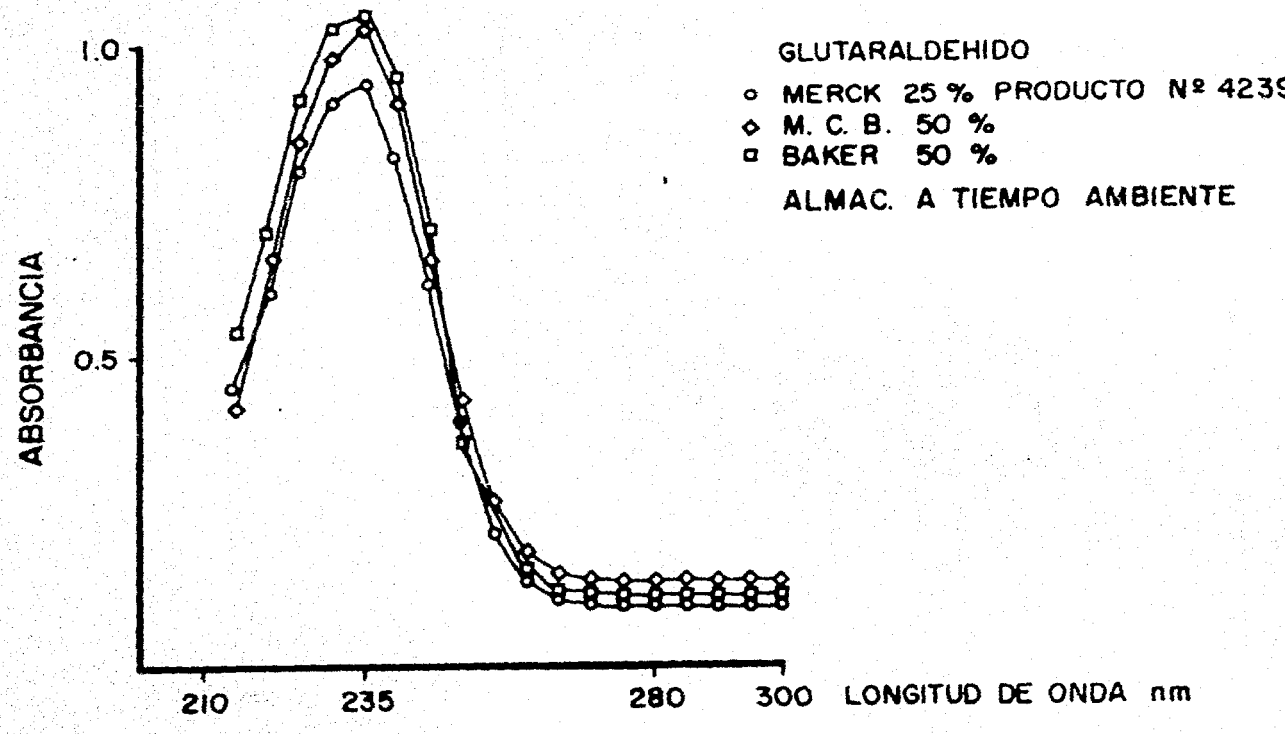
Se fijó corteza cerebelosa de rata en paraformaldehído disuelto al 5 % en cacodilato de sodio 0.19 M., pH 7.3 , 310 mOsm/kg., seguida de dos postfijaciones, una con glutaral - dehído (marca Electron Microscopy Science) al 5 % y la otra

con tetraóxido de osmio al 2 %, ambos disueltos en amortiguador de cacodilato de sodio 0.19 M. Al observarse el tejido en el microscopio electrónico, presentó la membrana nuclear y las mitocondrias conservadas pero en general todo el tejido estaba muy vacuolizado.

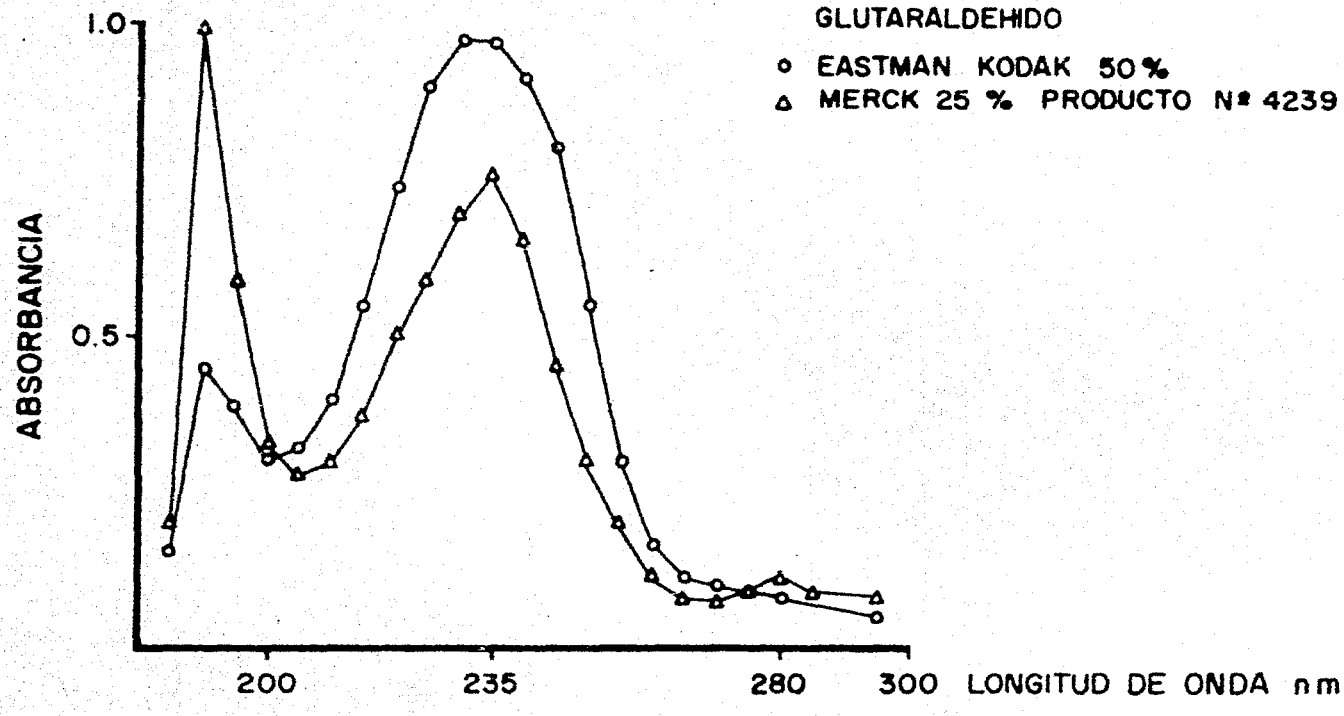
También la corteza cerebelosa de otra rata se fijó con glioxal disuelto al 6 % en cacodilato de sodio 0.19 M., pH 7.3 , 310 mOsm/kg., seguida también de las dos postfijaciones ya mencionadas anteriormente, la observación del tejido nervioso en el microscopio electrónico demostró mala preservación de todas las estructuras en general y falta de contraste.

Los glutaraldehídos usados fueron de las siguientes marcas: Merck al 25 %, producto No. 4239; Baker al 50 %; Mathieson Coleman y Bell (M. C. B.) al 50 %; Electron Microscopy Science (E.M.S.) al 70 %; y Ladd al 70 %. Se fijaron seis gatos de 1 a 2 kg., de peso por perfusión con glutaraldehído de la marca Merck y Baker, diluidos al 2.5, 3.0 y 6.0 % en Ringer con 3 % de goma arábiga que presentaba una osmolaridad de 310 - 320 mOsm/kg. y un pH de 7.2 a 7.3. La postfijación se realizó con OsO_4 al 2 % . Al ser observado los núcleos caudados de estos gatos en el microscopio electrónico, presentaron muchas membranas rotas, extracción e hinchamientos de la mayoría de los organelos celulares, sólo el núcleo y la mielina se conservaron bien fijados. Como los resultados obtenidos, fueron los mismos al hacer nuevas fijaciones de núcleo caudado de otros gatos, aun controlando la mayoría de los factores externos e internos que pudieran afectar la fijación del tejido, como la osmolaridad, el pH, la presión, la temperatura del líquido y todos los pasos posteriores de la técnica a seguir nos indujó a efectuar el estudio del grado de pureza de los glutaraldehídos usados. Se controló la pureza por medio de las curvas de absorbancia leídas en un espectrofotómetro PMQ III de la casa Carl Zeiss. Se utilizó luz ultravioleta entre 185 - 325 nm. (nanometros) haciendo

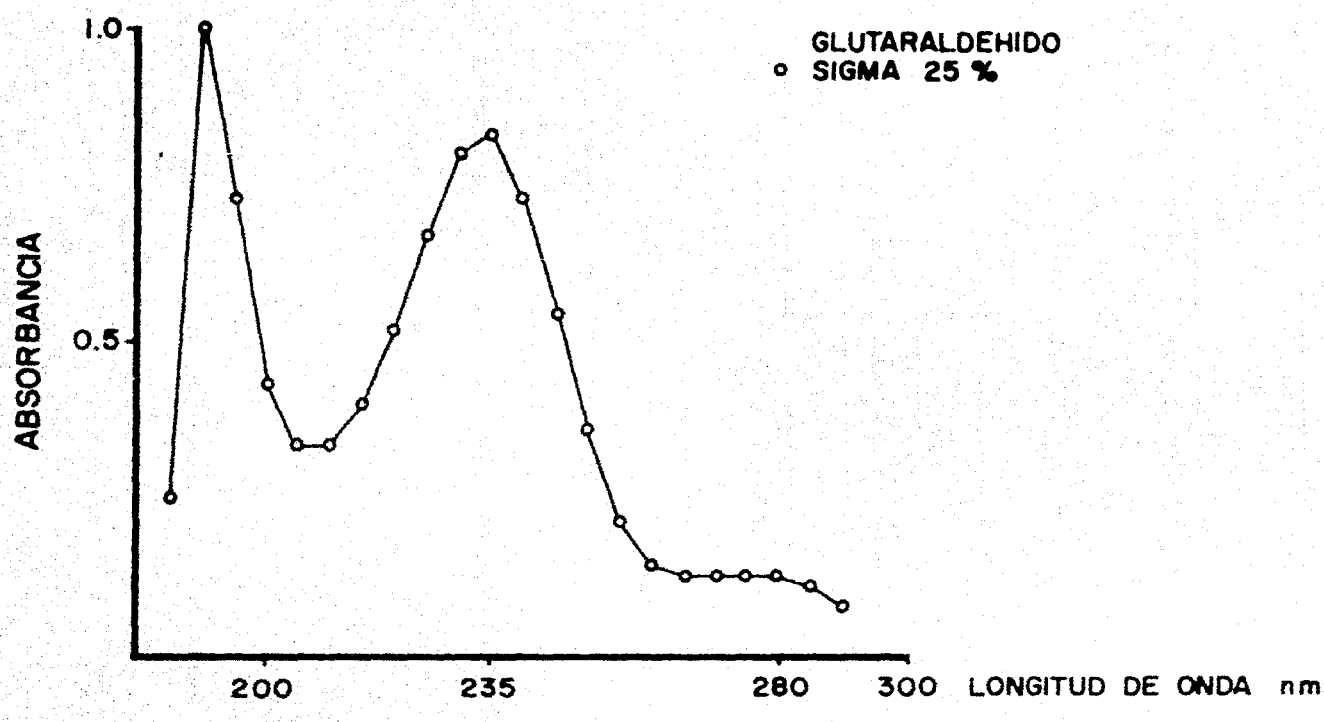
una medida cada 5 nm. El glutaraldehído monomérico puro presenta un máximo de absorción a 280 nm., mientras que los contaminantes más comunes lo tienen a 235 nm., como se puede apreciar en las gráficas. En la gráfica No. 1 , se observa que el glutaraldehído de las marcas: Baker, M.C.B. y Merck, tal como se consiguen en plaza no presentan una transición a 280 nm., lo que evidencia su bajísimo o nulo contenido en glutaraldehído monómero que es útil para la fijación. Otras mediciones de un glutaraldehído recién comprado marca Merck, y de la marca Eastman Kodak (ver la gráfica No. 2), muestran un elevado pico de contaminante en las dos marcas , diferenciándose sólo en que en la de Merck, se forma un pequeño pico de absorbancia a 280 nm. En la gráfica No. 3 y 4 se presenta los espectros de absorción de las marcas Sigma y E.M.S. en las que hay también un alto contenido de contaminante, la marca E.M.S. presenta un pequeño pico de absorbancia a 280 nm. En la gráfica No. 5 se hace una comparación de las marcas Sigma, Merck y Ladd, concluyendo de ellas que la marca Ladd es la única que presenta más alto el pico de absorbancia a 280 nm., que el de 235 nm.; por lo que se deduce, que tiene poco contaminante y resulta muy adecuado para la fijación. La casa Merck produce un glutaraldehído llamado "Según Anderson", producto No. 12179, que se presenta en ampollas de vidrio selladas, cuyó análisis espectral puede verse en la gráfica No. 6 en la cual se presentan dos curvas de absorbancia de la misma marca pero son remesas adquiridas en diferente tiempo, en la primera (A) se aprecia no obstante la existencia de una abundante contaminación y una marcada absorbancia a 280 nm., lo que indica la presencia de glutaraldehído monómero utilizable en una concentración menor que la indicada en el rótulo, como veremos más adelante. En la gráfica (B) se muestra el espectro de absorción del glutaraldehído adquirido un año después, que muestra una supresión casi total del contaminante y un gran pico de absorción a 280 nm., lo que nos indica que mejoró la calidad de


GLUTARALDEHIDO
MERCK 25 % PRODUCTO Nº 4239
M. C. B. 50 %
BAKER 50 %
ALMAC. A TIEMPO AMBIENTE
ABSORBANCIA
1.0
0.5
210
235
280
300
LONGITUD DE ONDA nm

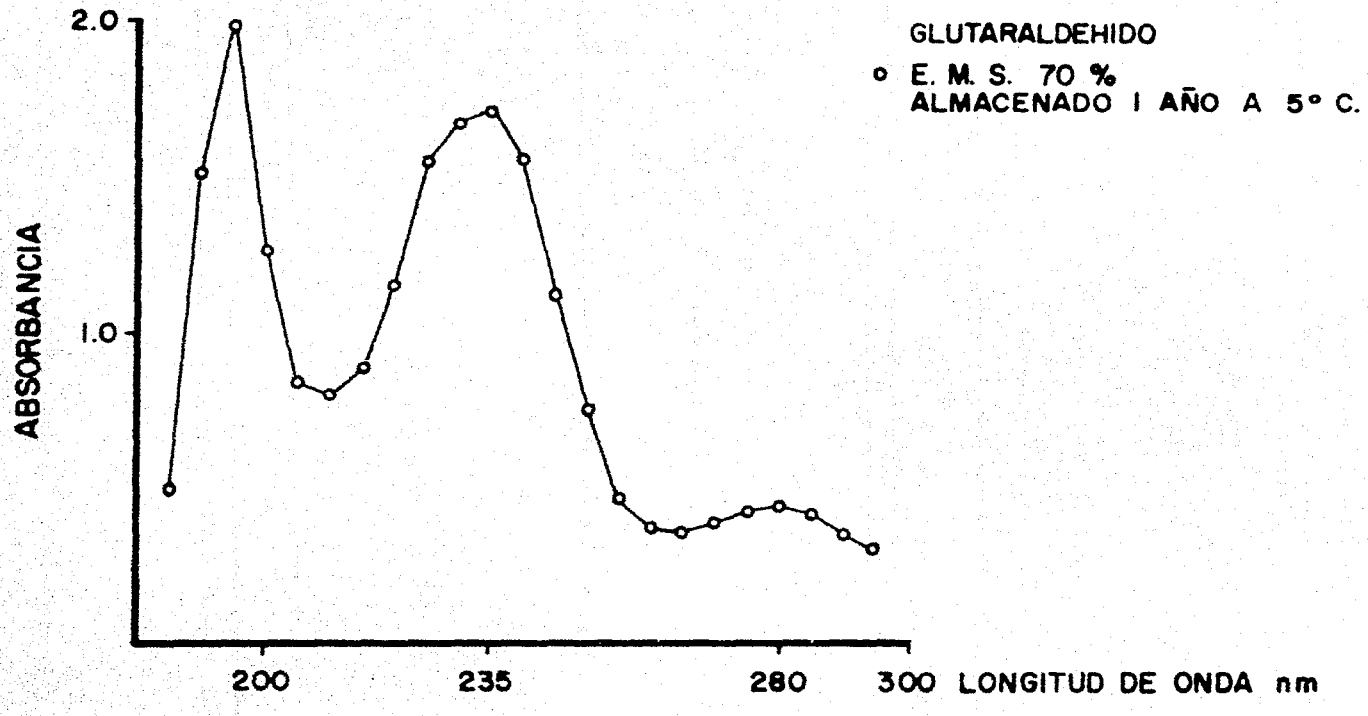
GRAFICA Nº I


GLUTARALDEHIDO
o EASTMAN KODAK 50 %
Δ MERCK 25 % PRODUCTO Nº 4239
1.0
0.5
ABSORBANCIA
200
235
280
300
LONGITUD DE ONDA nm

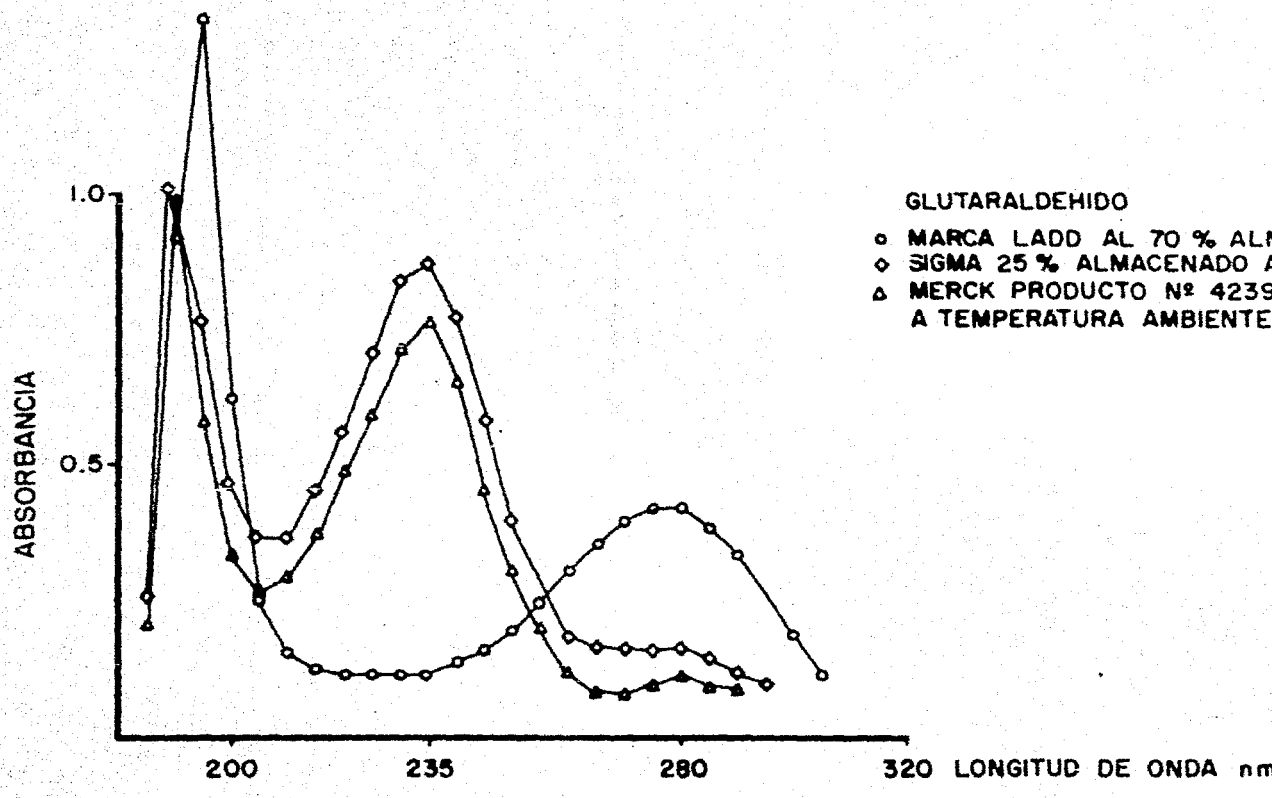
GRAFICA Nº 2


GLUTARALDEHIDO
SIGMA 25 %
ABSORBANCIA
1.0
0.5
200
235
280
300
LONGITUD DE ONDA nm

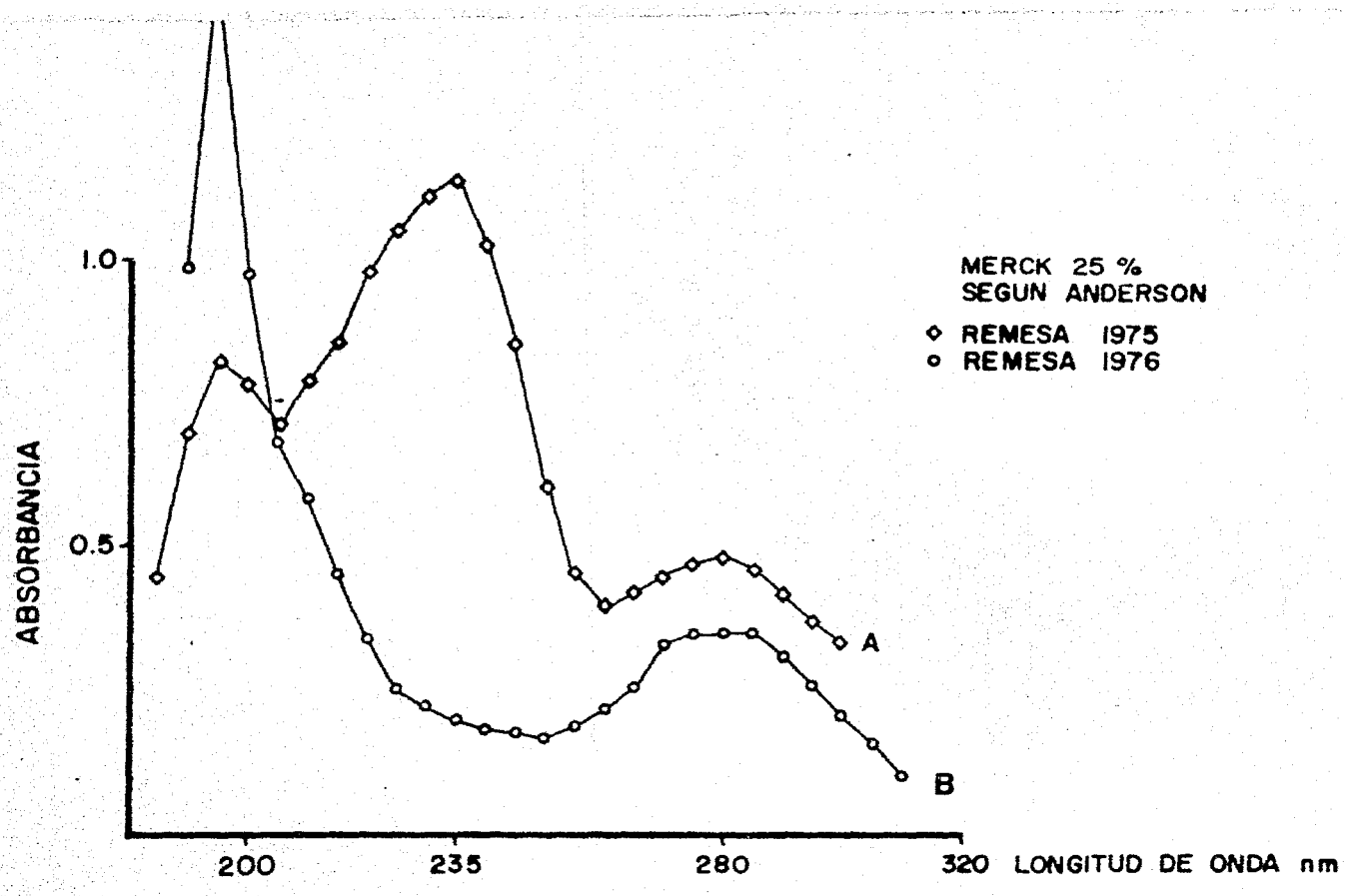
GRAFICA Nº 3


GLUTARALDEHIDO
o E. M. S. 70 %
ALMACENADO 1 AÑO A 5° C.
ABSORBANCIA
2.0
1.0
200
235
280
300
LONGITUD DE ONDA nm

GRAFICA Nº 4


GLUTARALDEHIDO
o MARCA LADD AL 70 % ALMACENADO A-20° C.
◇ SIGMA 25 % ALMACENADO A 4° C.
△ MERCK PRODUCTO Nº 4239 ALMACENADO A TEMPERATURA AMBIENTE
ABSORBANCIA
1.0
0.5
200
235
280
320
LONGITUD DE ONDA nm

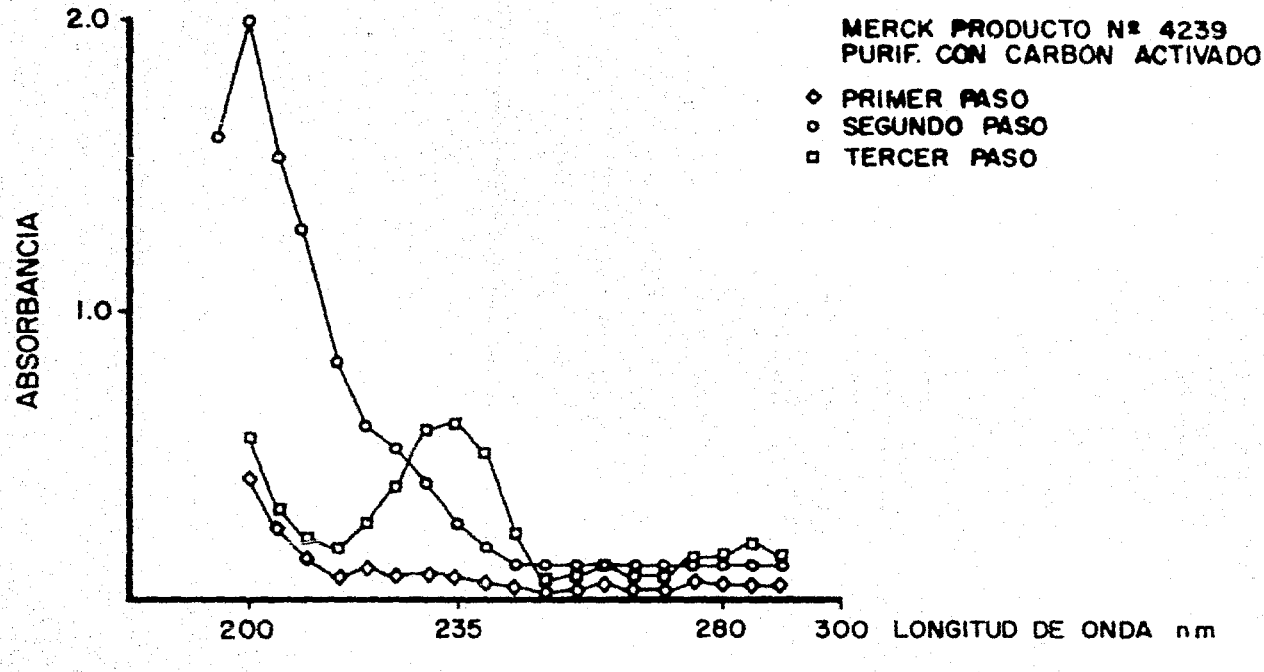
GRAFICA Nº 5


MERCK 25 %
SEGUN ANDERSON
REMESA 1975
REMESA 1976
ABSORBANCIA
1.0
0.5
A
B
200
235
280
320
LONGITUD DE ONDA nm

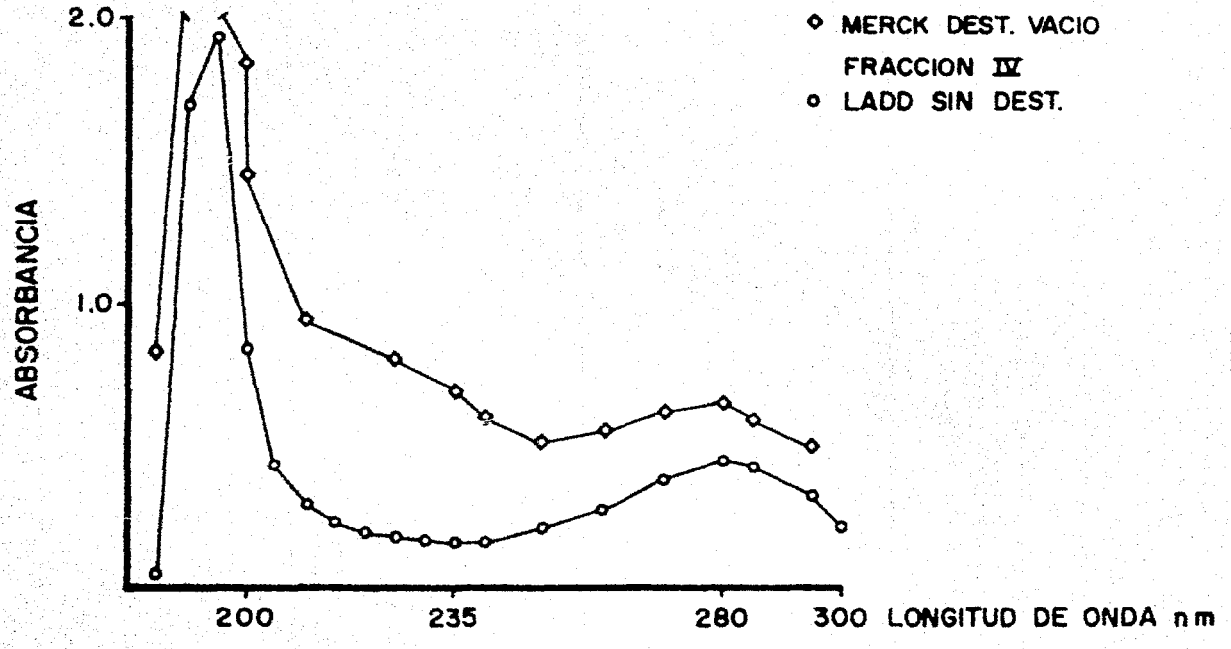
GRAFICA Nº 6

éste producto y puede ser usado para las fijaciones.

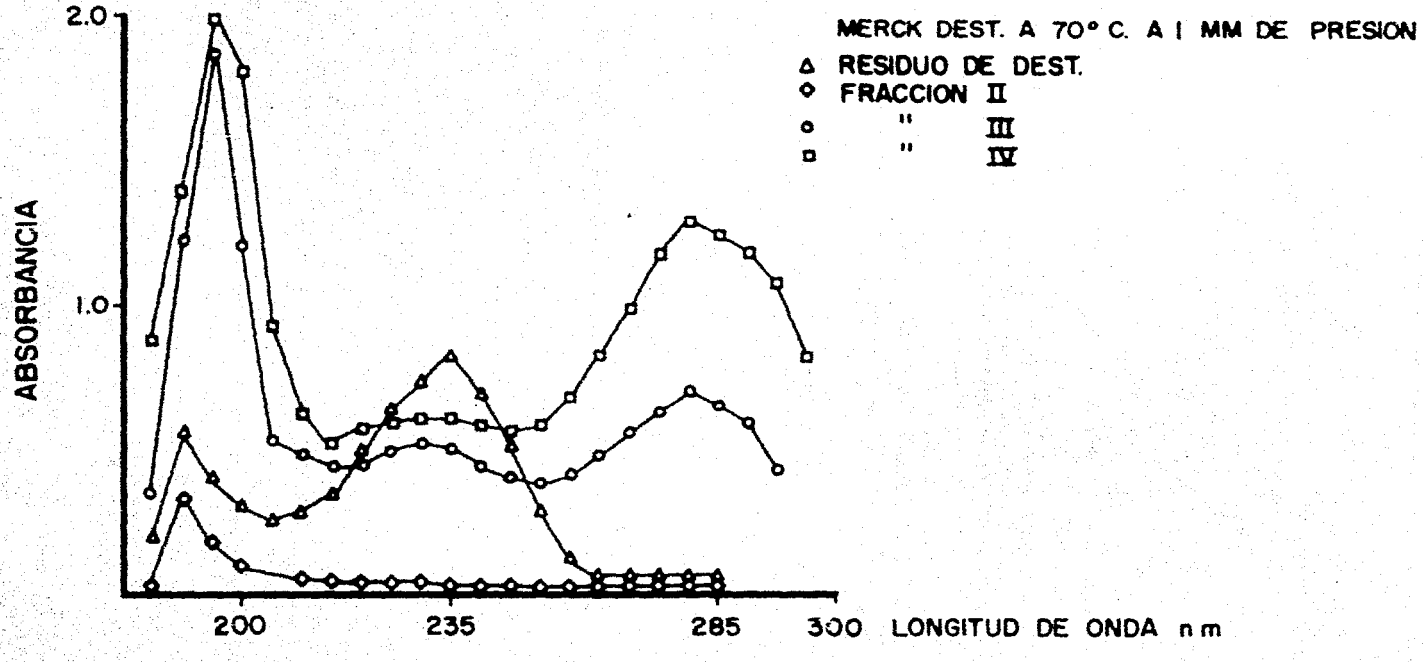
Se intentaron purificaciones de glutaraldehído marca Merck (producto No. 4239) por los métodos del carbón activado y el de destilación fraccionada al vacío (Anderson,1967a; Fahimi y Drochmans, 1965b; Robertson y Schultz, 1970). El método del carbón activado consiste en agregar por cada 100 cc., 10 gramos de carbón activado y se agita continuamente durante una hora en un recipiente que contenga hielo ya que debe estar a 4 °C . Después del tiempo de agitación se filtra varias veces, luego se separa una alicuota diluyéndola al 0.5% en agua destilada para ver su espectro de absorbancia. Los resultados indican que no se logró purificar la sustancia y sólo se obtuvo contaminante. Esto se debe, como se puede ver en la gráfica No. 7 a que la solución original no contenía cantidades apreciables de glutaraldehído monómero y no a fallas inherentes al método, pues en la tercer purificación se obtuvo un pico algo más alto de absorbancia a 280 nm. La destilación fraccionada al vacío se condujo a 70 °C y a 1 mm., de Hg de presión y dió cuatro fracciones dejando un residuo amarillo viscoso como una melaza que no destilaba a esa temperatura. El análisis espectrofotométrico indicó que en la fracción IV se concentra la mayor parte del monómero. Esta fracción tiene una curva de absorbancia con un gran pico a 280 nm., similar a la del glutaraldehído marca Ladd pero a diferencia de éste presenta algo de contaminante (ver la gráfica No. 8). La gráfica No. 9 muestra que las fracciones más livianas, que destilan antes como la II no contienen cantidades apreciables ni de glutaraldehído ni de sus contaminantes, la III presenta ya apreciables cantidades de glutaraldehído y el residuo de destilación contiene casi todo el contaminante y poco glutaraldehído. Si bien es cierto que éste procedimiento produce fracciones bien caracterizables y que una de ellas, la IV es rica en el monómero, el rendimiento es tan bajo cuando se comienza con un líquido tan impuro como el de Merck producto No. 4239, tal como se


MERCK PRODUCTO Nº 4239
PURIF. CON CARBON ACTIVADO
PRIMER PASO
SEGUNDO PASO
TERCER PASO
2.0
1.0
ABSORBANCIA
200
235
280
300
LONGITUD DE ONDA nm

GRAFICA Nº 7


2.0
1.0
ABSORBANCIA
200
235
280
300
LONGITUD DE ONDA nm
◇ MERCK DEST. VACIO
FRACCION IV
○ LADD SIN DEST.

GRAFICA Nº 8


MERCK DEST. A 70° C. A 1 MM DE PRESION
RESIDUO DE DEST.
FRACCION II
" III
" IV
ABSORBANCIA
2.0
1.0
200
235
285
300
LONGITUD DE ONDA nm

GRAFICA Nº 9

ofrece en plaza, que se tuvo que abandonar.

Es de hacer notar que el método antes descrito sólo separa el glutaraldehído de sus impurezas pero no es capaz de producirlo a partir de los contaminantes poliméricos.

Las condiciones de almacenamiento del glutaraldehído durante meses o años influyen en la riqueza de la solución en el monómero, pues éste se va transformando en presencia del oxígeno del aire , a temperatura ambiente, en polímeros que difunden con gran dificultad en el material biológico y no intervienen practicamente en el proceso de fijación. Estas transformaciones se impiden o retardan mucho si se almacena por debajo de 4 ^{o}C en ampollas cerradas en atmósfera de nitrógeno.

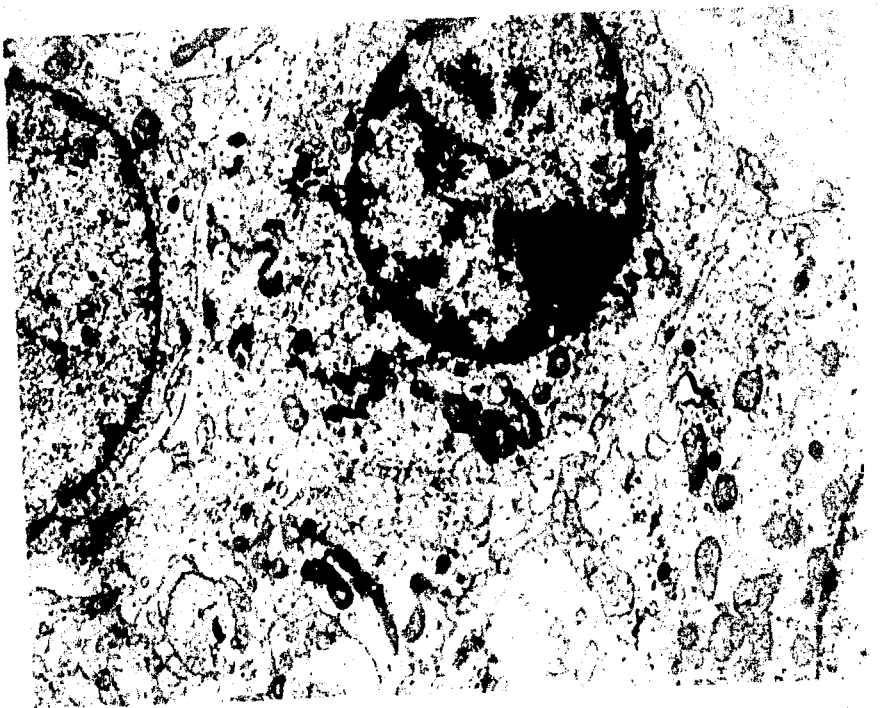
Se fijó corteza cerebelosa de rata usando el glutaraldehído de las marcas que presentaron el glutaraldehído monómero en cantidades apreciables y al ser observados los tejidos en el microscopio electrónico se obtuvo los siguientes resultados : con glutaraldehído (E.M.S.) diluido al 1.5 % en cacodilato de sodio 0.19 M., pH 7.3 , 310 mOsm/kg. más paraformaldehído al 5 % y postfijación con OsO_4 al 2 % , la mayoría de los organelos celulares estaban bien fijados (ver fig. 2). Con la fracción IV del glutaraldehído (Merck) producto de la destilación fraccionada al vacío, diluido al 2.5 % de la forma indicada anteriormente, también se obtuvo una buena fijación de todos los organelos celulares. Al usar el glutaraldehído de la marca Merck "Según Anderson" (prod. No. 12179) al cual se le agregó goma arábiga al 3% en cacodilato de sodio 0.19 M, pH 7.3, 310 mOsm/kg., presentó buena fijación por la tensión oncótica producida por la goma arábiga que impidió que el agua penetrara a través de las membranas celulares evitando que salieran las proteínas durante el proceso de fijación, comparados estos resultados con los obtenidos fijados de la misma forma y con el mismo fijador de la marca Merck "Según Anderson" pero sin goma arábiga , se obtuvieron buenas fijaciones pero estos fueron de menor

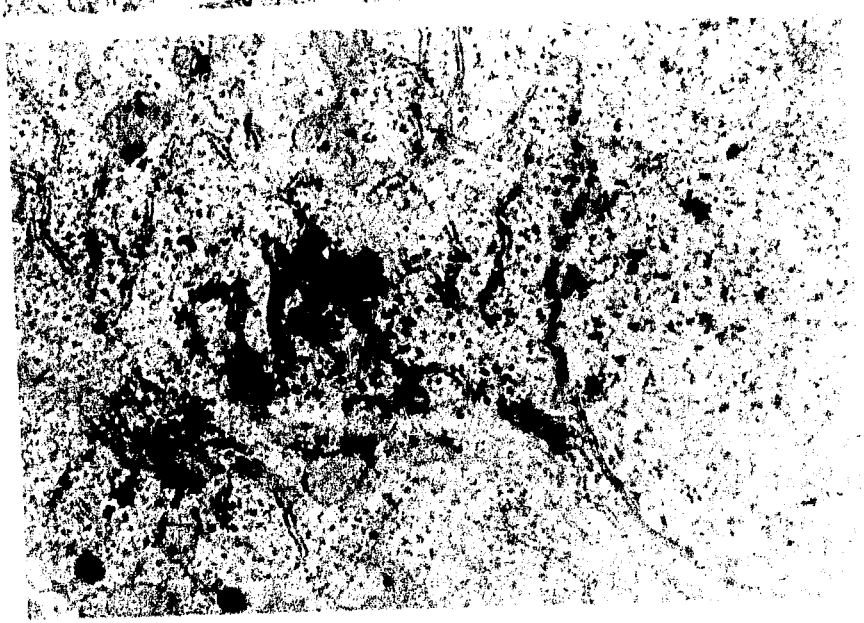
Figura 1

Corte de tumor cerebral humano, fijado con glutaraldehído (Merck) al 2.5% en cacodilato de sodio 0.19M. 13,000X.

Figura 2

Corteza cerebelosa de rata fijada con glutaraldehído (E.M.S.)al 1.5 % en cacodilato de sodio 0.19 M., más paraformaldehído al 5 %. 21,000 X.





FIGURAS 1 Y 2

calidad que los que llevaron goma arábiga (fig.3).

Al usar el glutaraldehído de la marca Ladd al 2.5 % diluido igual que los anteriores con cacodilato de sodio 0.19 M., también se obtuvieron buenos resultados en la preservación del tejido, eliminándose por completo la destrucción de las membranas celulares, hinchamientos y extracción del material celular (fig. 4).

2.- Estudios sobre la postfijación.

Después de la perfusión y de extraída la zona a estudiar se hicieron cortes pequeños de 1 mm., como máximo de espesor, los cuales se pasaron a cuatro recipientes, cada uno conteniendo líquido fijador con el que se perfundió. Uno se dejó en dicho líquido como control y a los otros tres se les hizó los siguientes tratamientos: a uno de los restantes se le agregó NaOH 1N, una gota cada media hora hasta obtener un pH mayor de 8, otro se calentó a 45 °C durante 15 minutos y al último se le agregó peróxido de hidrógeno(agua oxígenada) al 30 % aproximadamente 15 gotas en 50 mililitros de la solución fijadora. Los tejidos permanecieron en estos tratamientos aproximadamente una hora . Luego se les hizó dos lavados con solución Ringer o con solución de cacodilato de sodio. Posteriormente se postfijaron todos, incluyendo el control, con OsO_4 al 2 % , disuelto en Ringer o en cacodilato de sodio, durante dos horas y de cada recipiente se sacarón tres trozos pequeños de tejido, los cuales se lavaron y se pasaron a otros recipientes conteniendo acetato de uranilo disuelto al 5 % en agua y se calentaron a 45 °C en baño María durante 30 minutos, luego se dejaron enfriar 30 minutos a temperatura ambiente, nuevamente se lavaron con agua bidestilada y se pasaron a alcohol al 70 % durante 10 minutos , estos junto con los anteriores se deshidrataron en alcoholes de concentración creciente y al llegar al alcohol absoluto, nuevamente de los cuatro primeros recipientes, es decir de los no tratados con uranilo se sacaron otros trozos

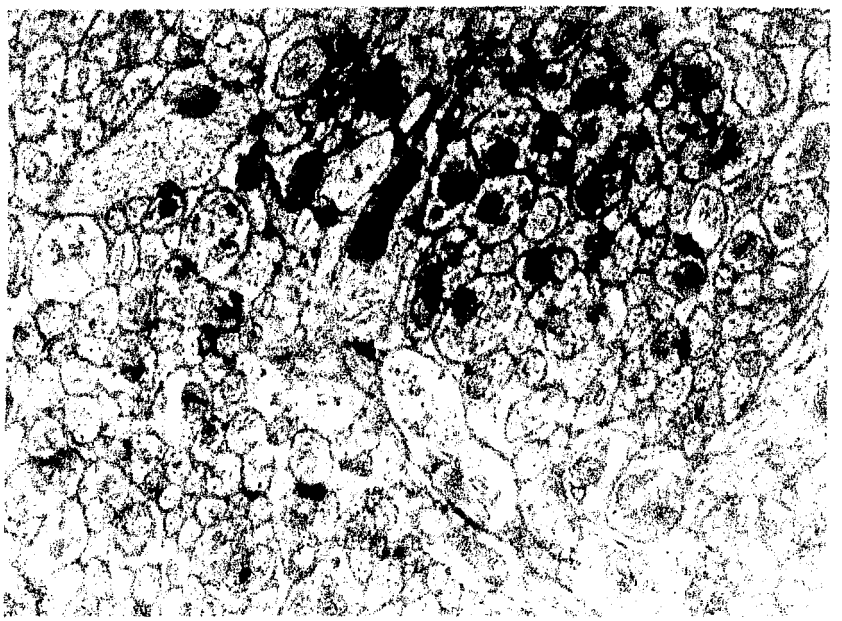
Figura 3

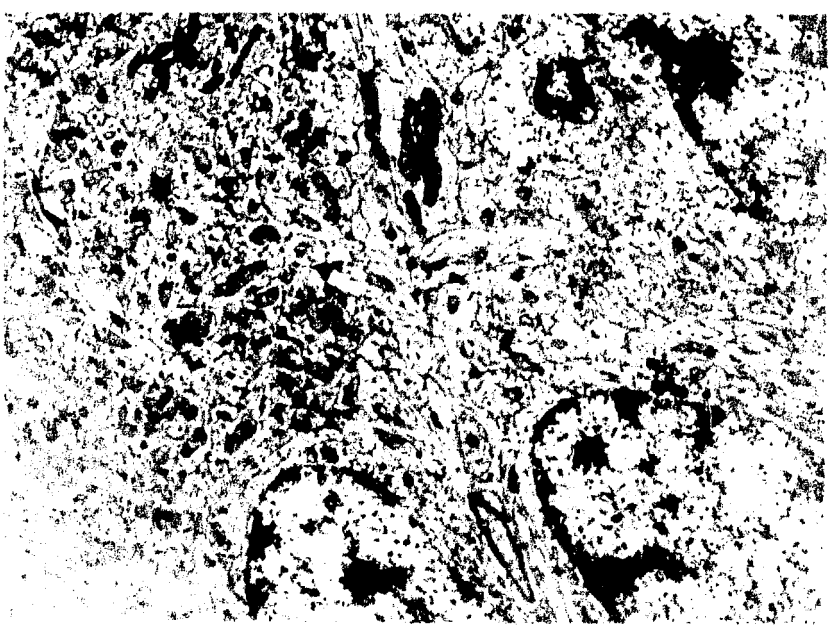
Corteza cerebelosa de rata fijada con glutaraldehído(Merck"Según Anderson") al 2.5 % en cacodilato de sodio 0.19 M.

61,000X

Figura 4

Corteza cerebelosa de rata, fijada con glutaraldehído (Ladd) al 2.5 % en cacodilato de sodio 0.19 M. 86,000X.





FIGURAS 3 Y 4

para contrastarlos con acetato de uranilo alcoholico al 5 % durante 20 minutos en la obscuridad. Después todos se pasaron a óxido de propileno durante 20 minutos, haciendo dos cambios, y por último se procedió a incluir en resinas ya sea en Epon, en Araldita M, o en Araldita XB.

Las observaciones en el microscopio electrónico de los tejidos fijados con glutaraldehído (Merck y Sigma) al 2.5% y 3 % en Ringer más goma arábiga , 310 a 322 mOsm/kg , pH 7.2, demostró que los controles tanto como los que se trataron con NaOH 1N, con peróxido de hidrógeno y por calentamiento, presentaron mala fijación de los organelos en general como rotura de membranas, mitocondrias vesículosas, hinchamientos, lavado citoplásmico, y espacios de retracción. no obstante estaba bien conservada. Los tejidos fijados con glutaraldehído(Merck) al 3 % en cacodilato de sodio 0.2 M., pH 7.2, más goma arábiga al 3% , 320 mOsm/kg., con los tratamientos mencionados anteriormente, también tanto el control como los tratados con NaOH 1N y por calentamiento, la fijación no mejoró, las membranas estaban totalmente destruidas, hubo muchos espacios de retracción, algunas mitocondrias muy vesiculosas, pero los microtúbulos y la mielina se fijaron bien. No obstante los tejidos que se trataron con peróxido de hidrógeno y se contrastaron con acetato de uranilo alcoholico al 5 %, presentaron regular fijación de la ultraestructura celular en comparación con los que se obtuvieron con NaOH 1N y por calentamiento aun asi resultaron inaceptables. Los tejidos que se fijaron con glutaraldehído de la marca Merck "Según Anderson" al 2.5 % en cacodilato de sodio 0.19 M., pH 7.3 más goma arábiga al 3 % presentaron buena preservación ultraestructural y los tejidos tratados posteriormente con peróxido de hidrógeno fueron tambien aceptables (fig. 5).

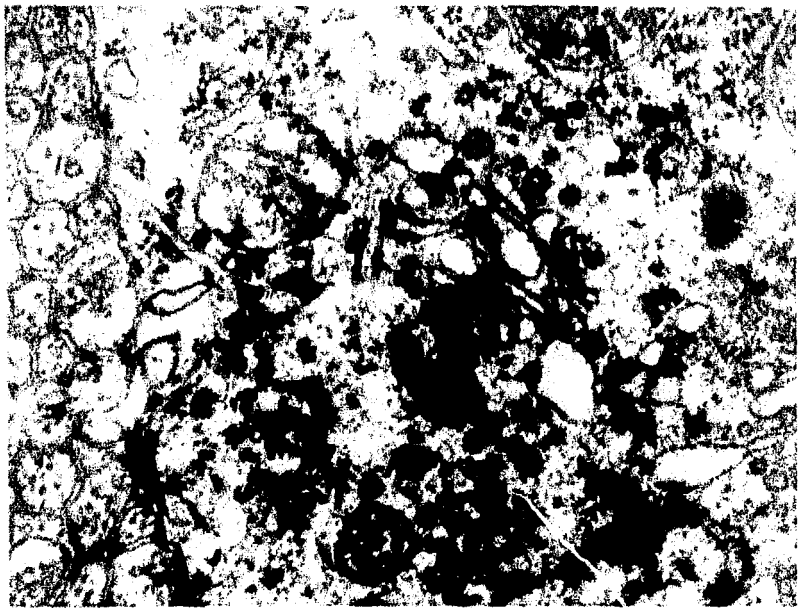
Las fijaciones del tejido nervioso fueron excelentes cuando se fijaron con glutaraldehído de la marca Ladd. Las muestras tratadas con agua oxígenada superaron en calidad a el control (fig. 6).

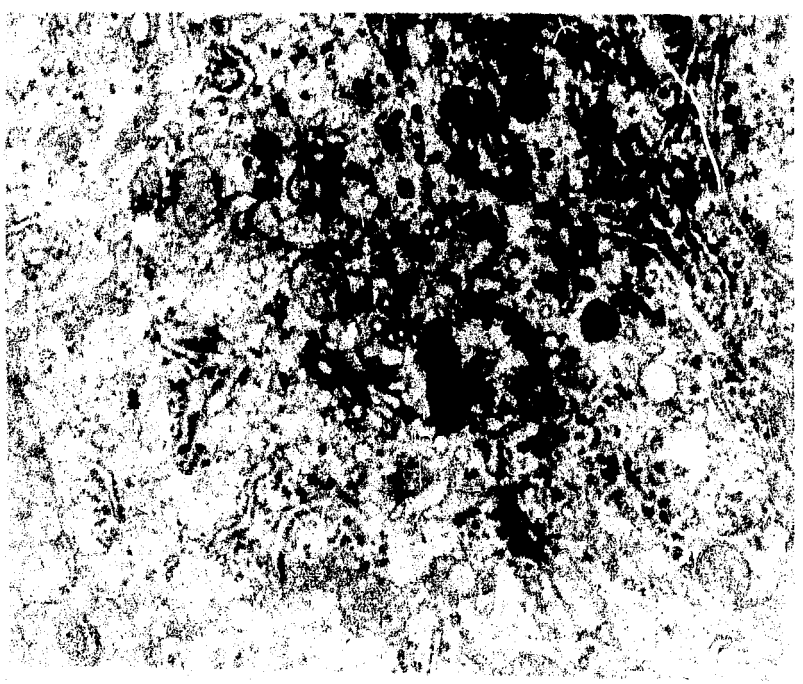
Figura 5

Corteza cerebelosa de rata, fijada con glutaraldehído (Merck"Según Anderson") al 2.5 % en cacodilato de sodio 0.19 M., más goma arábiga al 3 %. 81,000X

Figura 6

Corteza cerebelosa de rata, fijada con glutaraldehído (Ladd) al 2.5 % en cacodilato de sodio 0.19 M., postratamiento con peróxido de hidrógeno. 23,000X.





FIGURAS 5 Y 6

3.- Estudios sobre el contraste.

El contraste del material biológico para su estudio en el microscopio electrónico, con iones metálicos pesados como uranilo y plomo es muy importante para la determinación de la morfología celular. La depositación de iones metálicos pesados ayuda a obtener un mejor contraste, aumentando también la resistencia del tejido al bombardeo de electrones.

Se utilizó acetato de uranilo y citrato de plomo para contrastar los cortes del tejido nervioso, pero en algunas ocasiones se formaban precipitados de estos metales, dificultando su observación y su fotografía. Entonces se procedió a efectuar la tinción de los tejidos con acetato de uranilo al 5 % disuelto en agua y otros con acetato de uranilo al 5 % disuelto en alcohol absoluto en obscuridad durante la deshidratación de los tejidos, como se menciona en el inciso anterior. Al ser observados los cortes del tejido nervioso en el microscopio electrónico, los que se trataron con acetato de uranilo al 5 % disuelto en agua, hubo un aumento del contraste, pero un notable detrimento de la conservación de la ultraestructura celular, en cambio los tratados con acetato de uranilo al 5 % disuelto en alcohol absoluto presentaron mayor contraste y estabilización de la estructura fina.

4.- Estudios sobre la inclusión.

Como el tejido fijado no es lo suficientemente duro como para ser cortado en secciones delgadas, es necesario incluirlo en un material apropiado. Este material debe penetrar en el tejido proporcionándole dureza, plasticidad, elasticidad y resistencia al calor generado al cortarse, no debe reaccionar con los constituyentes celulares, no debe actuar como un obstáculo en las tinciones con metales pesados y debe polimerizar uniformemente. Los materiales más usados como medios de inclusión en microscopía electrónica son las resinas epóxicas seguidas por las poliestéricas y las acrílicas.

La inclusión de los tejidos en estudio se efectúo en las siguientes resinas : Araldita M, Araldita XB. Vestopal W, Spurr y Epon. Encontrando que el Epon 812 era el más adecuado. Las mezclas recomendadas por Luft (1961) resultaron muy duras cuando se utilizaron los reactivos marca Merck y por lo que se probaron tres tipos de mezclas de diferente dureza variando las cantidades de las sustancias de DDSA, y de MNA. como se muestra en la tabla I. La mezcla No. 2 fue la que presentó la consistencia más adecuada al tallado y al corte ultrafino de secciones grandes como es necesario en el estudio del sistema nervioso.

TABLA I

Mezcla Epon 812	Mezcla 1	Mezcla 2	Mezcla 3	Mezcla de Luft A	Mezcla de Luft B
EPON 10.13g	10.13 g.	10.13 g.	10.13 g.	6.2 g.	10.0 g.
DDSA 6.25g	7.4 g.	9.3 g.	10.10 g.	10.0 g.	
MNA 5.56g	4.7 g.	3.8 g.	2.9 g.		8.9 g.
DMP 0.33ml	0.33ml.	0.33 ml	0.33 ml	1.5 %	

DDSA = Dodecenylbernstein- säureanhydrid.
MNA = Methylnorbornen 2,3- dicarbonsäure- anhydrid.
DMP30= 2,4,6-Tris (dimethyl amino methyl)- phenol

DISCUSION.

El empleo del glutaraldehído como agente fijador para estudios biológicos de microscopía electrónica se debe a Sabatini et al (1963), al hacer pruebas con diferentes tipos de aldehídos, para encontrar un fijador único para la ultra estructura celular, llegando a la conclusión de que el glutaraldehído es el más adecuado. No obstante el glutaraldehído no puede, de hecho preservar la ultraestructura celular y la función completamente y al mismo tiempo, sólo se obtiene mediante una postfijación con tetraóxido de osmio. Karlsson y Schultz (1965), encontraron que la fijación del sistema nervioso central con glutaraldehído dió mejores resultados en la preservación de la estructura fina que los obtenidos con fijación directa con tetraóxido de osmio o con formaldehído. Los mismos autores también encontraron que la calidad de la fijación es debida a los efectos causados por la osmolaridad y pH del vehículo del fijador. En esta investigación al utilizar el glutaraldehído comercial para fijar sistema nervioso central se encontró que no era el adecuado para obtener una buena fijación de la ultraestructura celular como ya se mencionó en el capítulo de resultados y que el vehículo del fijador debe ser isotónico con el plasma del animal o ligeramente hipertónico, la hipotonía produce pésimos resultados, lo mismo sucede con el pH, al aumentarlo o disminuirlo resulta perjudicial para la preservación de la estructura fina. Evidencias poderosas de la importancia del pH y la osmolaridad del vehículo del fijador han sido mostradas (Rhodin, 1954; Zeterqvist, 1956; Tooze, 1964 ; Hopwood, 1967b; etc.).

Los tejidos fijados con soluciones fijadoras no amortiguadas , pueden formar artefactos que obstaculizan la investigación del tejido, por lo que también se consideró de gran importancia la presencia de un amortiguador como vehículo del fijador para mantener un pH constante, ya que se ha seleccionado el amortiguador adecuado. se debe controlar la

concentración del amortiguador pues este determina la capacidad del tejido para absorber ácidos o bases a cualquier pH (Schultz y Karlsson, 1965). También se ha visto que las mitocondrias son muy sensibles a los cambios en pH y osmolaridad de un sistema amortiguador (Wrigglesworth y Packer, 1969).

En cuanto al método de purificación del glutaraldehído comercial por los métodos del carbón activado y el de destilación fraccionada al vacío no son recomendables en cuanto al rendimiento por ser muy bajo, aunque el procedimiento sirve para separar las impurezas, no se produce monómero a partir de contaminantes poliméricos, siendo estos procedimientos incosteables además de minuciosos. Fahimi y Drochmans (1968), al estudiar los efectos sobre la fijación al utilizar glutaraldehído comercial y productos destilados de glutaraldehído, encontraron resultados satisfactorios al utilizar productos destilados no asi en los productos comerciales. Esto no quiere decir que los productos comerciales sean malos lo que pasa es que las condiciones de almacenamiento de estos reactivos no son adecuadas, permitiendo que la temperatura ambiente y el tiempo de almacenamiento formen contaminantes poliméricos , sumado a las impurezas que ya tiene, como son los aldehídos insaturados derivados de la condensación aldol (Richards y Knowles, 1968) junto con acroleína, ácido glutárico y glutaraldoxima mencionados por Anderson (1967a). En este trabajo se utilizó como liquidos fijadores, productos acuosos comerciales, productos destilados y productos químicamente puros, encontrando excelentes resultados en la fijación al utilizar productos destilados y productos químicamente puros, los cuales se almacenaron en un refrigerador a temperatura de 4 °C , los envases perfectamente cerrados o sellados con parafilm o guardados en ampollas de vidrio selladas en atmósfera de nitrógeno.

El uso de mezclas fijadoras para microscopía electrónica para fijar sistema nervioso central también dió resul-

tados excelentes , en la preservación de la ultraestructura celular . Los buenos efectos de la mezcla fijadora del glutaraldehído y formaldehído es debido probablemente a la combinación de fijadores de rápida y lenta penetración al tejido. Otros investigadores también encontraron buenas fijaciones al utilizar una combinación de aldehídos (Rodríguez, 1969 ; Bone y Ryan, 1972).

Peraccha y Mittler (1972), llevaron a cabo tratamientos posteriores a la fijación inicial encontrando que las muestras tratadas con glutaraldehído más NaOH 1N, y con glutaraldehído calentado a 45 °C mejoraron la calidad de la fijación de los tejidos comparados con el control, en cambio las muestras tratadas con glutaraldehído más peróxido de hidrógeno superaron la calidad de fijación del control y de los otros tratamientos. Los resultados de las muestras de tejido del sistema nervioso central que recibieron tratamientos posteriores a la fijación inicial, no fueron del todo adecuados si el glutaraldehído no era de buena calidad como ya se mencionó en el capítulo de resultados . Aun con buenos glutaraldehídos los tejidos con postratamiento con glutaraldehído más hidróxido de sodio (NaOH) y los tratados con glutaraldehído calentado a 45 °C mostraron que la calidad de la fijación empeoro en comparación con el tejido control que presentó buena fijación. Pero el tejido que se postrató con glutaraldehído más agua oxígenada (H_2O_2) y contrastado con acetato de uranilo alcohólico durante el proceso de deshidratación presentó excelente fijación. No obstante estos resultados no son constantes pero sí pueden ser reproducibles ya que el éxito de la fijación consiste en la habilidad para manejar el método de perfusión así como la rapidez de la fijación y la utilización de un glutaraldehído puro, controlando también como ya se dijó anteriormente los demás factores que influyen en la calidad de la fijación.

CONCLUSIONES.

1.- El procedimiento de la fijación debe ser rápido para evitar alteraciones anóxicas de la estructura celular.

2.-La inyección del fijador debe ir precedida de un líquido isotónico amortiguado con una osmolaridad de 0.19 M., pH 7.2 a 7.4 , 310 a 330 mOsm/kg.

3.- El mejor sistema de perfusión es el de caída libre con equipos empleados en medicina para venoclisis.

4.- Perfundir por ventrículo izquierdo del corazón a todo el organismo.

5.- Lavar el sistema arteriovenoso antes de la fijación con una solución amortiguadora acompañada de un anticoagulante y de un vasodilatador.

6.- Utilizar glutaraldehído con la pureza adecuada y libre de contaminantes.

7.- El glutaraldehído debe almacenarse a temperaturas debajo de 4 °C en ampollas cerradas en atmósfera de nitrógeno.

8.- Se obtienen excelentes fijaciones con mezclas de paraformaldehído al 4 % y glutaraldehído a concentraciones más bajas.

9.- El agregar al fijador goma arábiga da estabilidad a la estructura fina obteniéndose excelentes fijaciones.

10.- El postratamiento con glutaraldehído más agua oxígenada da excelentes fijaciones de la ultraestructura celular.

11.- Se obtienen muy buenos contrastes y preparaciones limpias con acetato de uranilo alcohólico.

12.- Incluir el tejido en Epon para mejor consistencia durante el tallado, el corte semifino y ultrafino de caras relativamente grandes.

BIBLIOGRAFIA.

Anderson J. P. (1967a) Purification and quantitation of glutaraldehyde and its effects on several enzime activities in skeletal muscle. J. Histochem. Cytochem. 15, No. 11. 652 - 661

Altmann, R. (1894) "Die Elementarorganismen und ihre Beziehungen zuden Zellen, 2nd ed Leeipzig.

Bahr G. F. (1955) Continued studies about the fixation with osmium tetroxide. Electron Stains IV. Esptl. Cell. Res. 9,277.

Bahr, G. F., Bloom G., and Friberg, U. (1957) Volume changes of tissues in physiological fluids during fixa in osmium tetroxide or formaldehyde and during subsequent treatment. Exptl. Cell. Res.12,342.

Bahr, G. F.,Bloom. G., and Johannisson, E. (1958) Fur ther studies on fixation with osmium tetroxide.Histochemie, 1,113.

Baker, J.R. (1965) The fine structure produced in cell by 4 fixatives. J. Roy. Micros. Soc.,84,115.

Bennett, H.S., and Luft. J.H. (1959) S- collidine as a basic for buffering fixatives. J.Biophys. Biochem. Cytol., 6,113.

Bone, Q., and K.P. Ryan (1972) Osmolarity of osmium tetroxide and glutaraldehyde fixatives. J. Histo - chemical, 4,331 - 347.

Carstensen, E. L., Coopersmith, A., Ingram, M., and Child, S. Z. (1969) Stability of erithrocytes fixed in osmium tetroxide solutions.J.Cell. Biol.,42,562.

Caulfield, J.B.(1957) Effects of varying the vehicle for - osmium tetroxide in tissue fixation.J. Biophys Biochem. Cytol., 3,827.

Chuang, S.H.(1968) Sea water and Osmium Tetroxide Fixation of Marine Animals. In: Cell structure And Its Interpretation (Mc Gee Russell.S.M. and Ross, K.F.A. eds)St. Martin's Press., New York.

Claude. A. (1961a) Problems of fixation for Electron Microscopy. Results of fixation with osmium tetroxide in acid and alkaline media.Pathol. Biol. , 9, 933.

Claude, A. (1961b) Morpholgie et organization de constituans nucléaires dans le eas d'un carcinome renal de la sauris. C.R. Acad. Sci., 252,4186.

Claude , A. (1962) Fixation of nuclear structures by unbuffered solutions of osmium tetroxide in slightly acid distilled water. Proc. 5th Inter. Cng. Electron Micros. (Philadelphia).2. L 14 Academic - Press. New York.

Dalton. A.J..(1955) Achrome - osmium fixative for electron microscopy Anat. Rec. 121,281.

Drochmans, P. (1960a) Electron microscope studies of epidermal melanocytes, and the fine structure of melanin granules . J. Biophys. Biochem. Cytol.,8,165.

Drochmans, P. (1960b) Mise en évidence du glycogene dans la cellule hépatique par microscopie électronique. J. Biophys. Biochem. Cytol.,8, 553.

Elbers, P.F.(1966) Ion permeability of the egg Limnaea stagnalis L. on fixation for electron microscopy. Biochem. Biophys. Acta, 112, 318.

Ericsson, J.L.E, Saldino, A.J., and Trump, B.F. (1965)Electron microscopic observations of the influence of different fixatives on the appearance of cellular ultrastructure. F.Z. Zellforsch.66,161.

Fahimi, H.D., and Drochmans, P. (1965a) Essais de standardisation de la fixation au glutaraldéyde. II. Influence des concentrations en aldehyde et de l' osmolalite. J. Microscopie, 4, 737.

Fahimi, H.D. and Drochmans, P. (1965b) Essais de standardisation de la fixation au glutaraldéhyde.I. Purification et determination de la concentration du glutaraldéhyde.J. Microscopie, 4,725.

Fahimi, H.D., and Drochmans, P. (1968) Purification of glutaraldehyde its significance for preservation of acid phosphatase activity. J. Histochem. Cytochem. , 16, 199 - 204.

Fischer, A. (1899) Fixierung, Färbung und Bau des Protoplasmas. Jena, F. Fisher.

Gil, J., and Weibel, E.R. (1968) The role of buffers in lung fixation with glutaraldehyde and osmium tetroxide . J. Ultrastruct.Res., 25, 33.

González Aguilar, F. and E. De Robertis,(1963) A formalin perfusion fixation method for histophysiological study of the Central Nervous System with the Electron Microscope.Neurology Minneap.13, 758 - 771-

Good, N. E., Winget, G.D., Winter, W., Connolly, T.N.,Isawa, S. and Singh R.M.M.(1966) Hidrogen ion buffer for biological research. Biochem.,5,467.

Helander, H.F. (1962) On the preservation of gastric mucosa Proc. 5th Inter. Cong. Electron Micros.(Philadelphia) 2, p -7 Academic Press. New York.

Hoopwood , D. (1967b) The effect of formaldehyde fixation and dehydration on ox adrenal medulla with respect to the chromaffin reaction and post- chroming. Histochemie. 10, 98-106.

Karlsson, U., and Schultz, R.L. (1965) Fixation of the central nervous system for electron microscopy by aldehyde perfusion.I. Preservation with aldehyde perfusates versus direct perfusion with osmium tetroxide with special reference to membranes and the extracellular space. J. Ultrastruct. Res., 12, 160- 186.

Karlsson, U., and Schultz, R.L. (1966) Fixation of the Central Nervous System for Electron Microscopy by Aldehyde Perfusion. III. Structural Changes after Exsanguination and Delayed Perfusion. J. Ultrastructure. Res., 14, 47 - 63.

Kellenberger, E., Ryter, A. , and Sechaud, J.(1958) Electron microscope study od DNA- containing plasm.LL. Vegetatives and nature phage DNA as compared - with normalbacterial nucleous different physio logical states.J. Biophys. Biochem. Cytol.4,671.

Luft, J.H. (1961) Inprovements in epoxy resin embedding methods. J. Biophys. Biochem. Cytol.,9, 409- 414.

Luft, J. H. (1956) Permanganate- a new fixative for electron microscopy.J. Biophys. Biochem. Cytol.2, 799.

Luft, J.H., and Wood , R.L.(1963) The extraction of tissue ptotein during and after fixation with osmium tetroxide in various buffer system. J. Cell Biol. 19, 46A.

Malhotra, S.K. (1962) Experiments of fixation for electron microscopy. I. Unbuffered osmium tetroxide.Quart. J. Micros. Sci., 103, 5.

Maunsbach, A.B. (1966a) The influence of different fixatives and fixation methods on the ultrastructure of rat kidney proximal tubule cells.II. Effects of varying osmolality ionic strength, buffer system and fixative concentration of glutaraldehyde so lutions. J. Ultraestruct. Res., 15, 283.

Maunsbach, A.B., Madden, S.C., and Latta H.(1962) Variations in fine structure of renal tubular epithelium - under different conditions of fixation,J. Ultras truct. Res., 6, 511.

McLean, J.D. (1960) Fixation of plant tissue. Proc. 4th Intern. Cong. Electron Micros. (Berlin),2,27. Springer-Verlag, Berlin.

Mercer, E.H., and Birbeck, M.S.C.(1966) Electron Microscopy. A Hand-book For Biologists. Blackwell Scientific Publications. F. A. Daves Company. Philadelphia.

Milloning, G., and Marinozzi, V. (1968) Fixation and Embedding In Electron Microscopy. In: Advances In Optical And Electron Microscopy(Borer, R.and Cosslett, V.E. eds.). 2, 251.Academic Press.

Palade , G. E. (1952) A study of fixation for electron microscopy . J. Exptl. Med. 95, 285.

Palay , S.L., Mc Gee- Russell,S.M., Gordon, S., and Grillo, M.A. (1962) Fixation of neural tissues for electron microscopy by perfusion with solutions of osmium tetroxide. J. Cell Biol.12,385-410.

Pease, D.C. (1962) Buffered formaldehyde as a killing agent and primary fixative for electron microscopy. Anat. Rec., 142, 342.

Peraccha, C., and Mittler B. (1972) Fixation by means of glutaraldehyde hydrogen peroxide reaction products. J. Cell Biol.,53, 234.

Peraccha, C., and Mittler, B.S.(1972) New Glutaraldehyde - Fixation Procedures. J. Ultrastructure Res. 39, 57 - 64.

Ramón y Cajal S., y F. de Castro (1972) Elementos de Técnica Micrográfica del Sistema Nervioso. 2a., ed. Salvat. S.A. Barcelona.

Rhodin, J. (1954) Correlation of ultraestructural organization and funtion in normal and experimentally changed proximal convoluted tubule cell of the mouse kidney. Thesis, Karolinska Instituted., Stockolm.

Richards, F.M.,and Knowles, J.R.(1968) Glutaraldehyde as a Protein Cross- linking Reagent. J. Mol. Biol. 37,231-233.

Robertson, E.A., and Schultz,R.(1970) The Impurities in Comercial Glutaraldehyde and their Effects on the Fixation on Brain. J. Ultrastructure Res., 30, 275-287.

Robinson, J.R.(1960) Metabolism of intracellular water. Physiol. Rev. 40,112.

Rodríguez, E.M. (1969) Fixation of the central nervous system by perfusion on the cerebral ventricles with a threefold aldehyde mixture. Brain Research.15, 395- 412.

Roth, H.J.Wilson, and C. C. Bowen (1963) Glutaraldehyde-Osmium tetroxide fixation for Electron Microscopy of the Mitotic Apparatus in Plant and Insect Cell. J. Cell Biol. 19,91A - 92A.

Sabatini, D.D., Bensch, K., and Barrnett, R.J.(1962) New means of fixation for electron microscopy and histochemistry. Anac. Rec. 142, 279.

Sabatini, D.D., Bensch, K., and Barrnett, R.J. (1963) Cytochemistry and electron microscopy the preservation of cellular structure and enzimatic activity by aldehyde fixation. J. Cell Biol.17,19.

Sabatini, D.D., Miller, F., and Barrnett, R.J. (1964) Aldehyde fixation for morphological and enzime histochemical studies with the electron microscope. J. Histochem. Cytochem. 12, 57.

Schultz, R.L., and Karlsson,U. (1965) Fixation of Central Nervous System for Electron Microscopy by Perfusion.II. Effect of Osmolarity ,pH of Perfusate, and Fixative Concentration. J. Ultrastruct. Res. 12, 187- 206.

Schultz, R.L., and Case, N.M.(1970) A modified aldehyde perfusion technique for preventing certain artifacts in electron microscopy of the central nervous system. J. Microscopy. 92, 69.

Sjöstrand , F.S. (1953) The ultrastructure of the auter segments of rods and cones of the eye as revealed by the electron microscope. J. Cell Comp. Physiol. 42,15.

Sjöstrans, F.S.(1956a) Electron Microscopy of Cells and - Tissues. In: Physical Techniques In Biological Research.3, 241 (Oster, G. and Pollister, A. W. eds.). Academic. Press New York.

Sjöstrans, F.S.(1956b) The ultrastructure of cells as revealed by electron microscope. Intern. Rev. Cytol., 5, 456.

Stoner, C.D., and Sirak, H.D.(1969) Osmotically induced alterations in volume and ultrastructure of mito - condria isolated from rat liver and bovine heart. J. Cell Biol., 43, 521.

Tooze, J. (1964) Measurement of some cellular changes during fixation of amphibian erythrocytes with osmium tetroxide solutions. J. Cell Biol. 22, 551.

Torack,R.M.(1965) The extracellular space of rat membrane following perfusion fixation with glutaraldehyde and hydroxiadipaldehyde. Z. Zellforsch. 66,352.

Trujillo - Cenoz, O. (1957) Electron microscope study of the rabbit gustatory bud. Z. Zellforsch.46,272.

Waddell, W. J., Bates, R.G.(1969) Intracellular pH. Physiol. Rev. 49, 285.

Webster, H., de F., and Ames, A. (1969) Glutaraldehyde fixation of central nervous tissue: and electron microscopy evaluation in the isolated rabbit retina. Tissue Et Cell. I,53 - 62.

Westrum, L.E., and Lund, R.B.(1966) Formalin perfusion for correlative light and electron microscopical studies of the nervous system. J. Cell Sci. 1,229.

Wrigglesworth, J. M., and Packer, L.(1969)pH- dependent conformational change in submitochondrial particles. Arch. Biochem. Biophys. 133, 194.

Wood, R.L., and Luft, J.H.(1963) The influence of the buffer system on fixation with osmium tetroxide. J.Cell Biol. 19, 83A.

Wood, R.L., and Luft, J.H. (1965) The influence of the buffer system on fixation with osmium tetroxide. J. Ultrastruct. Res. 12, 22.

Zetterqvist, H. (1956) The untraestructural organization of the columnar absorbing cell of the mouse jejunum. An electron microscopic study including some experiments regarding the problem of fixation and an investigation of vitamin A defi — ciency.p 83. Diss. Karol. Inst., Stockolm.

INDICE PAGINA

INTRODUCCION

Nociones de fijación para Microscopía Electrónica 1

Factores que afectan la calidad de la fijación 12

OBJETIVOS 21

MATERIAL Y METODO 22

RESULTADOS

1.-Estudios sobre la fijación

a) Método de administración del fijador 24

b) Composición del líquido de lavado 26

c) Composición del vehículo en el que se disuelven las sustancias fijadoras 27

d) Composición y pureza de las sustancias fijadoras 28

2.-Estudios sobre la postfijación 33

3.-Estudios sobre el contraste 35

4.-Estudios sobre la inclusión 35

DISCUSION 37

CONCLUSIONES 40

BIBLIOGRAFIA 41

ESTA TESIS SE IMPRIMIO POR COMPUTADORA EN LOS
TALLERES DE TESIS DE GUADALAJARA, S. A.
FRENTE A LA FACULTAD DE MEDICINA
MEDICINA # 25, CIUDAD UNIVERSITARIA.
TELEFONOS: 550-72-57
548-62-15
550-87-43
548-62-29
548-33-44
548-87-46