



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

EL CRIOSTATO COMO HERRAMIENTA EN EL
PROCESAMIENTO DE ESTRUCTURAS AÉREAS, PARA
ESTUDIOS ANATÓMICOS DE CUATRO ESPECIES ARBÓREAS

T E S I S

que para obtener el título de

B I Ó L O G O

p r e s e n t a:

MARTÍNEZ MONDRAGÓN GABRIEL ALEJANDRO

ÉSTE PROYECTO FUE FINANCIADO POR SECITI

DIRECTORA DE TESIS: DRA. ESTELA SANDOVAL ZAPOTITLA

ASESOR INTERNO: M. EN C. GERMÁN CALVA VÁSQUEZ

CIUDAD DE MÉXICO, ABRIL DEL 2022





Universidad Nacional
Autónoma de México



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.



Agradecimientos institucionales

Como primer punto agradezco a las instituciones que hicieron posible la realización de este estudio financiado por la Secretaría de educación, ciencia y tecnología (SECITI), por el laboratorio de contaminación atmosférica presente en (FES Zaragoza) y especialmente al laboratorio de anatomía vegetal en el Instituto de Biología. (IB-UNAM).

Por medio de estas líneas quiero comunicar mi agradecimiento a todas las personas que me apoyaron en este recorrido con sus consejos, enseñanzas y el haberme brindado esa ayuda cuando la necesite.

A mi directora de tesis, Dra. Estela Sandoval por su orientación, enseñanza, el otorgarme un poco de su tiempo y paciencia, por esos consejos valiosos que me compartió enriqueciendo esta tesis y la oportunidad de conocer a un gran equipo dentro del laboratorio.

Muy especialmente a mi asesor y profesor al final de mi camino como estudiante. German Calva Vázquez, por esa confianza depositada en mí, seguir al pendiente de mi lento, pero provechoso término de esta tesis. El apoyo tanto en materia académica cómo las risas impartidas en ese laboratorio que sabe transmitir y aseguro no ser el único que lo comentara.

A mi maestra Vero, quien me guio en tierras nuevas para mí, porque siempre tuvo un espacio para ayudarme, pero principalmente por su amistad y consejos muy útiles.

Agradezco al gran equipo que envuelve al laboratorio de Anatomía Vegetal, me refiero a Cony, Barbarita, Gabriel. Por su valioso soporte, el haberme compartido sus conocimientos, su dedicación, apoyo incondicional y amistad.

Por ultimo a mis compañeras de laboratorio, quienes me hicieron los días más fáciles, compartiendo risas e historias, por su ayuda en temas que desconocía. Montse, Alba, Vania, Beca, Dany. Muchas gracias.

En memoria del Dr. Eloy Solano Camacho quien me asesoro con su dirección, conocimiento y enseñanza permitió el desarrollo de este trabajo.

A la Dra. Ana María Soriano por aportar valiosas observaciones, así como su tiempo prestado.

Al M. en C. Faustino por revisar este trabajo, por las correcciones hechas para mejorarlo

A la M. en C. Sonia Rojas por sus opiniones, recomendaciones y el apoyo otorgado.



Dedicatoria

Este trabajo está dedicado:

A mis padres...

A mi padre quien pidió a la puerta de la escuela ayudar a su hijo a cargar su mochila pesada cual rocas. Un paso a la vez y ahora te pediré esa ayuda a llevar el título a casa, a quien me enseñó que el mundo se lo come el que lucha.

A mi madre por ser pilar de este hogar, por dar siempre un cachito más del que puede dar, por remendar desde nuestros pantalones rotos, hasta heridas que no sanan tan fácil.

Les agradezco a ambos por el apoyo constante e incondicional, por el amor y educación que nos enseñaron ser alguien en la vida.

A mi hermano Bubu quien a veces es una molestia, pero que soy consciente que, al jugar en el mismo equipo, no nos paran.

A mi familia: tíos y tías, primos y primas que cuento con todos ustedes, agradezco su infinito apoyo. Desearía tener más líneas para expresarles mis agradecimientos a todos ustedes, pero mejor les invito a tener más vivencias.

Por último y no menos importante.

A doña Mireyita, quien nos vio y quiso desde pequeños, con quien convivimos desde que expresaba todo su sentir, hasta que dejó de comunicarse con palabras.

Una gran señora quien sobrevivió muchos pesares para regalar sonrisas sin dientes,

Ya no hay abuelita con quien jugar.

Contenido

Págs.

Resumen.....	1
I. Introducción	3
II Antecedentes	5
2.1 Contribuciones de Wilhelm Hiss Senior en la Histología.....	5
2.2 Propiedades y tipos de micrótomos.....	5
2.2.1 Micrótomo de Rotación.....	6
2.2.2 Micrótomo de deslizamiento	6
2.2.3 Micrótomo de Congelamiento	7
2.2.4 Criostato	7
2.3 Características de los diferentes micrótomos.....	8
2.4 Diferencias entre células animales y vegetales.....	10
2.5 Pared celular como soporte estructural del cuerpo de la planta.....	11
2.5.1 Pared primaria.....	14
2.5.2 Pared secundaria.....	14
2.6 Elongación de las células vegetales a través de la pérdida de rigidez en la pared celular	15
2.7 Aplicación del criostato como herramienta para obtener secciones de tejidos.....	16
2.7.1 Diferencias al seccionar tejidos vegetales y animales con el criostato	24
2.8 Procesamiento histológico convencional en tejidos vegetales.....	25
2.8.1 Desventaja en el procesamiento histológico convencional por medio de fijación y medios de infiltración comparando con secciones por congelación	28
2.9 Procesamiento histológico con el criostato	28
III Justificación	30
IV Hipótesis.....	31
V OBJETIVOS	32
5.1 Objetivo general.....	32
5.2 Objetivos particulares	32
VI MATERIAL Y MÉTODOS.....	33

6.1	Procesamiento generado en criostato para tejidos vegetales.....	33
6.2	Selección de especies	34
6.3	Descripción del hábito, morfología de los órganos estudiados y ubicación taxonómica de las especies	34
	<i>Acacia retinodes</i> Schlecht.....	34
	<i>Casuarina equisetifolia</i> Lingelsh	35
	<i>Fraxinus uhdei</i> Lingelsh	37
	<i>Pinus patula</i> Schltld. & Cham.	39
6.4	Recolecta de muestras y preparación de secciones para cortes anatómicos.....	40
6.5	Procesamiento histológico de muestras frescas y fijadas.....	42
	6.5.1 Muestras frescas	43
	6.5.2 Muestras Fijadas.....	45
6.6	Tinción diferencial, safranina-verde rápido	49
6.7	Montaje	49
6.8	Fase de gabinete.....	50
VII	Resultados	51
	7.1 Comparación entre material fresco y fijado en función de la tinción.....	53
VIII	Discusión	70
IX	Conclusiones.....	77
X	Literatura citada	79
XI	ANEXO 1. Preparación de reactivos	82
XII	ANEXO 2 Protocolo para obtener secciones vegetales en criostato	84

Figuras

Págs.

Figura 1. Micrótopo de rotación HistoCore BIOCUT (tomada de "LEICA").	6
Figura 2. Micrótopo deslizamiento (tomada de "Arcano" HC 400).	6
Figura 3. Micrótopo de Congelación (tomada de KD-3358-III "KEDEE").	7
Figura 4 . Criostato CM1860 UV (tomada de "Leica").	7
Figura 5. Pared celular de <i>Allium cepa</i> (tomada de Raven, 2005).	12
Figura 6. Esquema de procesamiento convencional, en parafina .	27
Figura 7. Gel Tissue-tek Leica.	28
Figura 8. Esquema en procesamiento de muestras en criostato.	33
Figura 11. <i>Casuarina equisetifolia</i>	36
Figura 12. tallo modificado de <i>Casuarina equisetifolia</i>	36
Figura 15. <i>Pinus patula</i>	40
Figura 16. Acículas de <i>Pinus Patula</i>	40
Figura 17. Cortes del foliolo de la hoja en <i>Fraxinus uhdei</i> .	41
Figura 18. Cortes de la acícula en <i>Pinus patula</i> .	42
Figura 19. Tablero digital de criostato Leica	43
Figura 20. Montaje y orientación de la muestra en gel tissue-tek (OCT) sobre la platina porta muestras.	43
Figura 22. Bloques de PEG para realizar el montaje.	45
Figura 23. Bloque de PEG.	46
Figura 24. Cámara criostatica	47
Figura 25. Corte transversal de una hoja de <i>Fraxinus uhdei</i>	48
Figura 26. <i>Pinus patula</i> . Secciones transversales de hojas sin teñir. A. Muestra fresca. B. Muestra fijada.	53
Figura 28. <i>Pinus patula</i> . Secciones transversales de hojas teñidas. A. Muestra fresca. B. Muestra fijada	54
Figura 29. <i>Casuarina equisetifolia</i> . Secciones transversales de tallo fotosintético. A. Muestra fresca. B. Muestra fijada.	55
Figura 30. <i>Casuarina equisetifolia</i> . Sección transversal de tallo fotosintético. A. Muestra fresca teñida. B. Muestra fijada teñida.	56

Figura 31. <i>Acacia retinodes</i> . Secciones transversales del filodio sin teñir. A. Muestra fresca. B. Muestra fijada.	57
Figura 32. <i>Acacia retinodes</i> . Secciones transversales del filodio teñidas. A. Muestra fresca. B. Muestra fijada.	58
Figura 33. <i>Acacia retinodes</i> . Secciones transversales de la zona intercostal del filodio. A. Muestra fresca. B. Muestra fijada.....	59
Figura 34. <i>Acacia retinodes</i> . Secciones transversales de la zona intercostal del filodio. A. Muestra fresca. B. Muestra fijada.....	60
Figura 35. <i>Acacia retinodes</i> . Secciones transversales, margen del filodio. A. Muestra fresca. B. Muestra fijada.	61
Figura 36. <i>Acacia retinodes</i> . Secciones transversales, margen del filodio. A. muestra fresca, B. muestra fijada.	62
Figura 37. <i>Fraxinus udehi</i> . Secciones transversales en vena media de lámina foliar . A. Muestra fresca, B. Muestra fijada	63
Figura 38. <i>Fraxinus udehi</i> . Secciones transversales en vena media de lámina foliar. A. Muestra fresca, B. Muestra fijada.	64
Figura 39. <i>Fraxinus udehi</i> . Secciones transversales de la zona intercostal de la lámina foliar, A. tejido fresco, B. tejido fijado	65
Figura 40 <i>Fraxinus udehi</i> . secciones transversales de zona intercosatal de la lámina foliar, A. Muestra fresca, B Muestra fijada.....	66
Figura 41. <i>Fraxinus udehi</i> . Secciones transversales del margen foliar, A. Muestra fresca, B. Muestra fijada.....	67
Figura 42. <i>Fraxinus udehi</i> Secciones transversales de margen foliar, A. Muestra fresca, B. Muestra fijada.....	68

Cuadros

Págs.

1. Diferencias anatómicas entre células animales y vegetales	11
2. Antecedentes de trabajos en tejidos animales con Criostato.....	17
3. Contraste entre cortes realizados a tejidos fijados y frescos.....	52

Resumen

En la actualidad hay protocolos para la obtención de secciones histológicas con el criostato. Sin embargo, estos protocolos están enfocados en su mayoría hacia la obtención de tejidos animales, mientras que, para los vegetales son escasos, Por lo tanto, es importante establecer un protocolo orientado a la obtención de secciones vegetales contrastando materiales frescos y fijados por medio del criostato.

El objetivo de este estudio fue desarrollar un protocolo para obtener secciones de tejido foliar y de tallo en árboles ubicados en la Ciudad de México. Se recolectaron hojas maduras de *Fraxinus uhdei* y *Pinus patula*, además de los filodios de: *Acacia retinodes*, y el tallo modificado de *Casuarina equisetifolia*. Para realizar los cortes en el criostato se utilizó material fresco o fijado, además, se consideró el grosor, rigidez y suavidad, de los tejidos. Con el propósito de contrastar la respuesta de tinción en materiales frescos y fijados, se aplicó la técnica safranina-verde rápido en cada una de las muestras.

En general el medio de soporte y la temperatura de la cámara criostática fueron adecuadas para obtener secciones completas. Para los tejidos sin fijar se determinó que el uso de gel tissue-tek como medio de soporte y una temperatura de -15°C en la cámara criostática es la mejor opción y para los tejidos fijados, el polietilenglicol fue un adecuado medio de inclusión, así como una temperatura de -17°C . Estas dos

condiciones facilitaron el traslado y el montaje de las secciones. Ambos medios de soporte empleados, son solubles en agua, por lo tanto, el proceso de tinción se realizó con un colorante acuoso, la safranina y después de un proceso de deshidratación se contra tiño con verde rápido. Sin embargo, los tiempos de tinción variaron en función con la especie y si los tejidos fueron frescos o fijados.

I. Introducción

Existen protocolos para la obtención de secciones histológicas en tejidos animales con la herramienta criostato. Estos se enfocan en obtener biopsias por congelación de una manera más rápida en contraste con las técnicas histológicas convencionales que requieren de una fijación y deshidratación previa para obtener resultados en el transcurso de días a semanas. Sin embargo, para los tejidos vegetales son escasos o limitados, por lo que, es importante establecer un protocolo que permita obtener secciones de estos tejidos, sin que se provoquen las alteraciones químicas, ni los tiempos de procesamiento comparativamente más largos utilizados con las técnicas histológicas convencionales.

El primer registro que se tiene sobre la aplicación de la técnica de criostato para seccionar tejido vegetal fresco (meristemo apical, hojas, tallo y raíces) fue descrito por Läubli en 1966. Los tejidos vegetales se incrustaron en un trozo de cerebro de pez, no fijado, congelados con CO₂ a temperaturas que oscilan entre -120° y -180° C. La incrustación evita la alteración del tejido vegetal durante congelación y el seccionamiento. Las evaluaciones histológicas se realizaron con procedimientos rápidos de fijación y tinción, quedando clara la confiabilidad de la técnica para diferentes tejidos de plantas superiores.

Un segundo registro (Conley & Maureen, 1997) correspondió al estudio “impresión de tejidos blandos” congelados y seccionados en un criostato. Lo describe

como una técnica económica de incrustación que permite una orientación precisa de las muestras antes del montaje, y el material montado se puede almacenar fácilmente después del corte inicial para un estudio futuro. Además, con técnicas convencionales en muestras blandas, se exhibe distorsión del tejido y hay una entrega desigual del material.

El presente estudio tiene como objeto desarrollar un protocolo a partir del uso del criostato, para obtener secciones de los tejidos aéreos de árboles de la Ciudad de México. Debido a las diferencias entre células animales y vegetales, el proceso de corte en criostato para muestras de tejidos vegetales es diferente, por lo que hay que considerar varios criterios, como: si el material es fijado o no, diferencias en grosor, superficie, rigidez o suavidad, temperatura adecuada al corte, disposición de los tejidos fundamental y vascular, además del número de estratos celulares.

II Antecedentes

2.1 Contribuciones de Wilhelm Hiss Senior en la Histología

Anatomista y embriólogo suizo, uno de sus principales aportes fue la invención del micrótopo a mano en 1866. Innovó en los métodos de conservación del material colectado, así como también la forma de ser transportados al laboratorio. En primer lugar fijó la muestra en alcohol para evitar los cambios celulares, lo que permitió preservar en términos generales la morfología y la composición química de las células y tejidos (1880-1885) (Guzmán, 2013).

2.2 Propiedades y tipos de micrótopos

Los cortes histológicos se obtienen con aparatos especiales denominados **micrótopos** (de *micro*, pequeño y *topos*, cortar), aunque en los primeros tiempos de la histología los cortes se hacían a mano usando cuchillas. La calidad en la obtención de cortes histológicos depende en gran medida al tipo de micrótopo empleado, diferencias estructurales en los tejidos, tipo de cuchillas. En los siguientes párrafos se describen los más comunes.

2.2.1 Micrótopo de Rotación

En este micrótopo la cuchilla se encuentra fija, mientras que la muestra se dirige hacia la cuchilla mediante el giro de una manivela para realizar los cortes. Este puede realizar cortes a la mayoría de los órganos vegetales como:

- Hojas
- Flores
- Semillas
- Raíces
- Tallos



Figura 1. Micrótopo de rotación HistoCore BIOCUT (tomada de "LEICA").

2.2.2 Micrótopo de deslizamiento

En este micrótopo el tejido es fijado a un soporte y la cuchilla se mueve sobre una corredera hasta llegar a la muestra para seccionar el tejido. En el caso de muestras vegetales por lo general este micrótopo es utilizado para realizar cortes de estructuras rígidas o engrosadas como:

- Maderas
- Tallos secundarios
- Raíces y semillas.



Figura 2. Micrótopo deslizamiento (tomada de "Arcano" HC 400).

2.2.3 Micrótopo de Congelamiento

En este equipo la cuchilla es móvil, sin embargo, hace una rotación sobre su propio eje cortando la muestra que se encuentra suspendida en una platina, con un sistema de congelación por debajo de esta. Este tipo de procesamiento se emplea en muestras no fijadas particularmente para poder realizar histoquímica, estudios enzimáticos o de inmunofluorescencia.



Figura 3. Micrótopo de Congelación (tomada de KD-3358-III "KEDEE").

2.2.4 Criostato

Consiste en un micrótopo tipo minot, dentro de una cámara de refrigeración, que permite mantener bajas temperaturas constantes dentro de ella. Los tejidos frescos se mantienen congelados sin previa fijación y sin ser sometidos a solventes. Por lo tanto, la integridad bioquímica de las células no está comprometida.



Figura 4 . Criostato CM1860 UV (tomada de "Leica").

2.3 Características de los diferentes micrótomos: congelación, convencionales y deslizamiento

Los micrótomos congelación constan de una platina alimentada por un agente congelante, como CO₂ o nitrógeno líquido que se acerca de manera horizontal al material a cortar, este mecanismo está regulado por un calibrador ajustable al tamaño de corte en micras que se requiera. Se puede adaptar para enfriar solamente la platina o esta y la cuchilla a la vez. El espécimen por lo general se monta en una platina con una solución apropiada, que puede ser sacarosa al 50% o simplemente agua destilada. El agente congelante se hace circular desde el cilindro que lo contiene hasta la platina, congelando el espécimen y la solución que le rodea, formando un bloque de hielo (Sandoval *et al.*, 2005).

Mediante este método los tejidos se endurecen por congelación y una vez congelados se pueden realizar cortes. Los materiales pueden cortarse en fresco, es decir, sin previa fijación y sin someterlos a la acción de disolventes que se utilizan habitualmente como deshidratantes u otros líquidos. Por todo esto, la integridad bioquímica de las células queda casi totalmente inalterada.

El criostato se utiliza para obtener secciones por congelación de 0.5 a 30 μm de grosor, aproximadamente. En este aparato, todo el sistema de corte se encuentra encerrado en una cámara de refrigeración cuya temperatura se puede regular normalmente entre -20 y -35 °C, dependiendo del contenido de agua y lípidos presentes en la muestra. La congelación se suele hacer en una plataforma dentro de

la propia cámara de refrigeración que se encuentra a una temperatura cercana a -30 °C (Sandoval et al., 2005).

Antes de la congelación la muestra se embebe en un medio líquido a temperatura ambiente y sólido a la temperatura de corte. La sustancia en que se embeben los tejidos en casi todas publicaciones se realiza en la solución OCTC (*Optimal cutting temperature compound*), “compuesto de corte a temperatura óptima”. El cual posee una serie de ventajas:

- a) La preservación molecular es máxima, lo cual es muy importante si el procesamiento posterior requiere el reconocimiento molecular.
- b) Las muestras congeladas pueden cortarse en secciones finas, del orden de 5-15 μm .

Sin embargo, los tejidos frágiles deben ser inhibidos antes de su congelación en sacarosa (10% acuosa) o agarosa (2% acuosa), para después incluir la muestra en la solución OCT (Megías *et al.*, 2017). También se puede congelar el tejido por ejemplo con nitrógeno líquido, el cual ayuda a preservar la estructura y detener los procesos celulares, pero es conveniente colocar la muestra en la cámara del criostato, hasta que consiga igualar su temperatura con la de ésta para obtener secciones homogéneas (Megías *et al.*, 2017).

La investigación de Megías *et al.* (2017), señala que las secciones que se obtienen son adheridas por contacto a un portaobjetos con superficies adhesivas. Cabe señalar, que las secciones se descongelan rápidamente en este proceso de pegado puesto que los portaobjetos están a temperatura ambiente y una vez que las muestras están secas y adheridas pueden procesarse por técnicas histológicas que deseemos.

2.4 Diferencias entre células animales y vegetales

Los animales y vegetales comparten como unidad básica de la vida a la célula, y poseen organelos en común como: el núcleo, aparato de Golgi y la mitocondria, entre otros. Sin embargo, tienen diferentes procesos para obtener energía. Las células vegetales tienen organelos exclusivos derivados de los procesos evolutivos: los cloroplastos encargados de la elaboración de fotosíntesis y la pared celular que delimita a la célula del entorno y evita que sea flexible (Rodés *et al.*, 2006).

Por otro lado, las plantas poseen la capacidad de un crecimiento ilimitado; esto se debe a que poseen meristemos apicales y axilares. Un meristemo está compuesto por células indiferenciadas que se perpetúan así mismas por divisiones celulares y dan origen a células derivadas o iniciales, a partir de las cuales se originan nuevas líneas celulares, que forman diversos tejidos (Barrios, 2006).

Estas divisiones celulares generan que los organismos vegetales presenten diferentes planos de división; existen dos planos de división: los planos de división anticlinal son el crecimiento en superficie, dando por resultado un órgano laminar.

En cambio, la división periclinal es un crecimiento que da como resultado el aumento en volumen del órgano, que ocurre por el predominio de divisiones paralelas. Como consecuencia de la presencia de meristemas y las divisiones celulares, un organismo vegetal como un árbol de pino, puede formar un número indeterminado de ramas, acículas o ápices de raíz; sin embargo, el desarrollo vegetal y crecimiento es muy flexible y capaz de responder a las influencias del ambiente (Barrios, 2006).

Diferencias anatómicas entre células animales y vegetales

Características	Célula animal	Célula vegetal
Forma	Circulares e irregulares	Rectangulares o prismáticas
Rigidez o flexibilidad en la célula	Membrana celular	Pared celular y membrana celular
Tipos de crecimiento	Determinado	Indeterminado
Obtención de energía	Mitocondrias	Mitocondrias y cloroplastos

2.5 Pared celular como soporte estructural del cuerpo de la planta

La rigidez de las células vegetales se debe a la cementación de su pared celular, por lo que no tienen la capacidad de moverse como ocurre en las células animales. Lo anterior se explica, porque la pared celular se sitúa externamente a la membrana plasmática (Figura 5), es sintetizada por la propia célula y está formada

fundamentalmente por celulosa, además de otros polisacáridos y glicoproteínas. (Rodés *et al.*, 2006).

Además, la pared celular restringe la expansión del protoplasto y previene la ruptura de la membrana plasmática. Cuando el protoplasto se expande tras la captación de agua por la célula, la pared celular determina en gran medida el tamaño y la forma de la célula, así como la textura del tejido, y contribuye al transporte, absorción y secreción de sustancias; así como su defensa contra patógenos como hongos o bacterias (Raven, 2005). Sin considerar el peso seco, la pared celular primaria está compuesta por 25-30 % de celulosa, 30 % de hemicelulosa, 35 % de pectinas y del 1 al 5 % de glicoproteínas. La proporción y tipos de componentes que forman las paredes celulares primarias varían entre tipos celulares, que forman los distintos órganos de las plantas (Megías *et al.*, 2017).

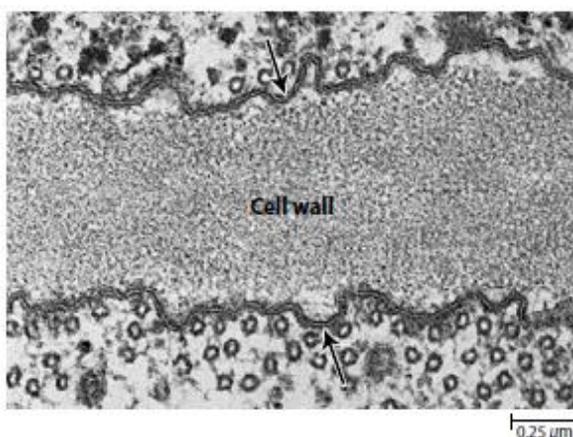


Figura 5. Pared celular de *Allium cepa* (tomada de Raven, 2005).

El soporte estructural de la planta es posible por la presencia de paredes celulares, la presencia de estas es una necesidad mecánica, debido a que proporciona rigidez y fuerza, mientras que permite cierta flexibilidad (Raven, 2005). La pared celular vegetal, es un laminado de fibrillas de celulosa en una matriz de glucoproteínas, esta se

compone de un polisacárido, conocido como celulosa, es alrededor de $0.2 \mu\text{m}$ de espesor, recubriendo por completo el exterior de la membrana plasmática.

Cumple algunas funciones de la matriz extracelular producida por las células animales, a pesar de que están compuestas de macromoléculas totalmente diferentes y de organización distinta.

La pared celular define de la misma forma las células para formar tejidos, indica a la célula que crezca y se divida, además de delimitar la forma de los organelos que se encuentran suspendidos en el citoplasma y forma celular (Lodish *et al.*, 2006).

Tiene la importante función dinámica de controlar la diferenciación celular durante la embriogénesis y el crecimiento.

Debido a que las células vegetales generalmente se encuentran fijas, cementadas por la pared celular, de manera que no tienen la capacidad de moverse (como ocurre durante el desarrollo de algunas células animales). La morfogénesis en las plantas constituye esencialmente una función de los planos de división celular y dirección del crecimiento celular.

2.5.1 Pared primaria

La pared celular primaria normalmente es delgada y por lo general tiene 0.1 μm de espesor. Las células que desarrollan pared celular secundaria también suelen tener pared celular primaria delgada. Sólo algunas células consiguen paredes celulares primarias gruesas, como algunas células del endospermo y células de colénquima.

En cualquier caso, el grosor puede cambiar según las condiciones en las que se encuentre la célula. En la pared celular primaria hay poros con diámetro que van de 4 a 8 nm, por lo que permiten el paso de agua, iones y pequeñas moléculas como: azúcares, aminoácidos y hormonas (Mejías *et al.*, 2017).

También se produce un reblandecimiento en la pared celular mediante secreción de sustancias en determinadas zonas de la pared. Se ha observado que ésta se hace más blanda en determinados lugares mediante la modificación química de las pectinas y por acidificación, y es en estos lugares donde se encuentra menos resistencia y por tanto por donde crece la célula (Mejías *et al.*, 2017).

2.5.2 Pared secundaria

Está presente en las células que sirven de soporte y conducción, formando parte del xilema, desarrollando una capa de pared adicional denominada pared celular secundaria. Esta capa se deposita entre la membrana plasmática y la pared celular primaria, el proceso supone la síntesis de numerosas capas de fibras de celulosa que se van añadiendo una detrás de otra, mediante un mecanismo

denominado “aposición”. La síntesis de la pared celular secundaria comienza durante la fase final del crecimiento y extensión de la pared celular primaria. Una vez sintetizada la pared celular, las células mueren por apoptosis.

Su función se realiza cuando mueren, otorgando tanto resistencia mecánica como transporte de solutos. Las plantas que crecen en grosor y altura necesitan un gran soporte y desarrollan lo que denominamos madera. La pared secundaria es el principal componente de la madera, domina la fase fibrilar (celulosa, 60%) y la matriz extracelular está formada por hemicelulosas y lignina (30%) (Raven, 2005).

2.6 Elongación de las células vegetales a través de la pérdida de rigidez en la pared celular

Debido a que la pared celular evita la expansión de la célula, esta debe ser más blanda al momento de permitir el crecimiento, esta regulación se encuentra regulada por hormonas de; “ácido indolacético”, denominadas auxinas. El debilitamiento inducido por las auxinas permite la expansión de la vacuola intracelular por incorporación de agua y conduce a la elongación de la célula. Como un ejemplo, podemos apreciar la magnitud de este fenómeno en un árbol secuoya, si todas las células de este árbol fueran reducidas al tamaño típico de las células hepáticas, el árbol tendría aproximadamente la altura máxima de un metro (Lodish & Berk, 2006).

2.7 Aplicación del criostato como herramienta para obtener secciones de tejidos

El principal tipo de tejido animal utilizado en criostato para su estudio son biopsias de órganos humanos en la búsqueda de algún sarcoma en tejidos blandos, mientras que en tejidos vegetales se ha empleado en hojas, raíces y embriones de plantas monocotiledóneas. En el cuadro 2 se muestra un listado de estudios donde se utiliza el criostato para seccionar tejidos animales y vegetales, donde se observa que la mayoría de ellos se realizaron en tejidos animales.

Estudios realizados en tejidos animales seccionados con el criostato.

Tema	Tejido/ órgano
<p>Immunocytochemistry of Frozen and of Paraffin Tissue Sections (Osborn & Brandfass, 2006)</p>	<p>Carcinoma en pecho humano <i>Rhabdomyosarcoma</i> humano Útero humano</p>
<p>Proyecciones centrales de los nervios laríngeos en un modelo experimental de degeneración-regeneración de rata adulta. (Pascual <i>et al.</i>, 2007)</p>	<p>Tronco del encéfalo en ratas Sprague-Dawley a 50 µm</p>
<p>PNT Obtención y Procesamiento de Muestras de Tejidos Neurológicos para un Biobanco. (Rivas <i>et al.</i>, 2011)</p>	<p>Cerebro humano</p>
<p>Atlas de Inmunohistoquímica: Caracterización de células, tejidos y órganos normales. (Martín <i>et al.</i>, 2013)</p>	<p>Anatomía Patológica, tejidos, órganos, aparatos y sistemas del cuerpo humano</p>
<p>Implementación de la técnica inmunohistoquímica para identificar la expresión de la p53 en muestras de endometrio de pacientes que acuden al laboratorio de anatomía patológica del centro médico dg diagnóstica de la ciudad de Latacunga (Martínez <i>et al.</i>, 2015)</p>	<p>Muestras endometriales humanas</p>
<p>Comparison of different methodologies and cryostat versus paraffin sections for chromogenic immunohistochemistry (Vashendriya <i>et al.</i>, 2019)</p>	<p>Secciones de amígdalas humanas</p>



Estudios realizados en tejidos vegetales seccionados con el criostato



Tema	Tejido/ órgano	
<p>The plasma membrane H⁺-ATPase of maize embryos localizes in regions that are critical during the onset of germination (Enríquez <i>et al.</i>, 2005)</p>	<i>Zea mays</i> L.	
	Estructura procesada:	Embriones, raíz y hoja
<p>Advantages and pitfalls of using free-hand sections of frozen needles for three-dimensional analysis of mesophyll by stereology and confocal microscopy (Lhotáková <i>et al.</i>, 2008)</p>	<i>Picea abies</i> L. H.Karst	
	Estructura procesada:	Hojas
<p>Anatomía, índices físicos e hidráulicos de la madera de <i>Gliricidia sepium</i> (Jacq.) Steud. (Quintanar <i>et al.</i>, 2009)</p>	<i>Gliricidia sepium</i> (Jacq.) Kunth ex Walp.	
	Estructura procesada:	Hojas
<p>Morfoanatomía foliar de <i>Alvaradoa amorphoides</i> Liebm. del estado de Morelos, México (Jaramillo <i>et al.</i>, 2015)</p>	<i>Alvaradoa amorphoides</i> Liebm	
	Estructura procesada	Foliolo
<p>Xylem Water Distribution in Woody Plants Visualized with a Cryo-scanning Electron Microscope. (Yazaki <i>et al.</i>, 2019)</p>	<i>Cryptomeria japonica</i> D. Don <i>Carpinus tschonoskii</i> Maxim.	
	Estructura procesada	Tallo

2.7.1 Diferencias al seccionar tejidos vegetales y animales con el criostato

El Criostato ha sido empleado en el procesamiento de biopsias por congelación aplicado en órganos animales como; estómago, pulmón, riñón, etc., este tipo de tejidos se caracterizan por presentar células únicas, dando como resultado una homogeneidad en los cortes histológicos usando la herramienta del criostato,

Según Carlosama *et al.* (2014), entre las ventajas de la biopsia por congelación está la obtención de resultados rápidos, ya que los cortes por congelación permiten un diagnóstico en un tiempo de 15 a 20 minutos, mientras que los preparados convencionales como la inclusión en parafina y posterior corte en micrótopo de rotación, realizan diagnósticos en un lapso de 24 a 48 horas. Otra ventaja del criostato es que; al tomar una pequeña porción de muestra y congelarla al momento, se logra una preservación incluso en tejidos que presentan daños, dando mejores resultados. Por último, hay un mejor aprovechamiento de los recursos médicos. Por ejemplo, la finalidad de visualizar metástasis condicionaría el carácter incurable de algunos tumores y haría innecesario realizar resecciones amplias.

Sin embargo, dicha técnica no ha sido desarrollada en tejidos vegetales, dadas las características celulares de éstas, podemos encontrar desde células parenquimáticas, hasta células lignificadas o suberizadas que les dan a las células vegetales una naturaleza rígida, mientras que las células de los tejidos animales son homogéneas, lo que facilita su corte al momento de la congelación.

Evitar la alteración química en los tejidos vegetales es difícil por medio de técnicas convencionales, pues el uso de fijadores puede lavar algunas sustancias importantes, por lo que al realizar cortes histológicos en un congelamiento rápido se evita la degradación celular y se podrían determinar con mayor precisión la respuesta de las plantas a los factores de estrés a los que esté sometida. (Sandoval *et al.*, 2005).

2.8 Procesamiento histológico convencional en tejidos vegetales

Sandoval *et al.* (2005) señalan que al seccionar un tejido o estructura hay que considerar la naturaleza de las mismas, el uso que se dará a las preparaciones, facilidades para conseguir equipo y reactivos, además del tiempo. Algunas de las técnicas básicas para el procesamiento, observación y registro del material vegetal principalmente de estructuras vegetativas, tales como hojas, tallos y raíces, se muestran en la figura 6.

Este procedimiento inicia con la fijación de los tejidos, en la cual se usa **FAA** (Anexo 1), un fijador que desnaturaliza proteínas, la acción de estos fijadores aditivos produce la liberación de moléculas de agua a partir de las proteínas que constituyen los tejidos, originando grupos químicos de carga catiónica y aniónica en los aminoácidos laterales para establecer de manera anárquica, estructuras fibrilares, brindando rigidez al tejido y a su vez soporte al momento de realizar los cortes.

Se trata de un fijador muy difundido entre los histólogos vegetales, ya que da buenos resultados en tallos, raíces y hojas, cuando los tejidos se observan con microscopio óptico, además, sirve como conservador, sin embargo, el ácido acético puede reaccionar con sustancias salinas que contienen cristales de oxalato cálcico y otros compuestos, que modifican la forma y la estructura de células y tejidos. También es conveniente no almacenar las muestras demasiado tiempo dentro del fijador, es recomendable no sobrepasar las 48 h, y después de este tiempo mantenerlas en alcohol al 70%, aunque es preferible incluir las muestras en bloques de parafina cuanto antes y almacenarlos de esta forma por tiempo indefinido (Mejías *et al.*, 2017).

Esquema de procesamiento convencional de tejidos fijados e infiltrados con parafina.

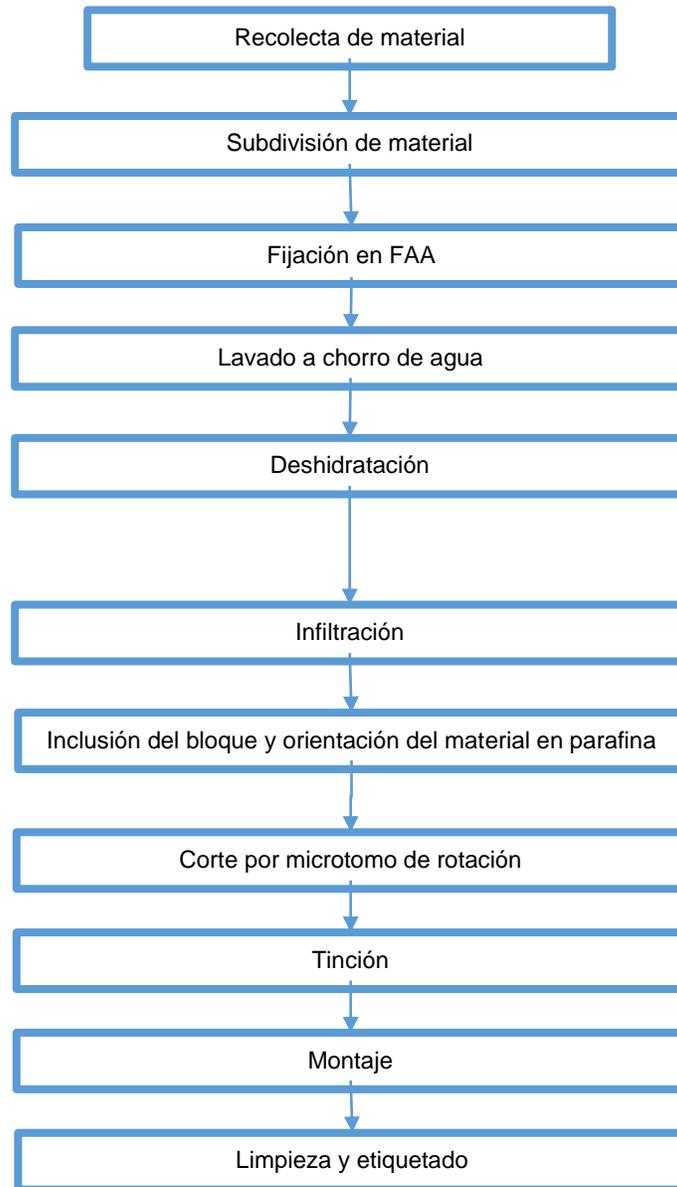


Figura 6. Esquema de procesamiento convencional, en parafina (Tomado de Sandoval *et al.*, 2005).

2.8.1 Desventaja en el procesamiento histológico convencional por medio de fijación y medios de infiltración comparando con secciones por congelación

Por medio de métodos convencionales como la infiltración o inclusión en parafina, el material solidificante penetra a un tejido deshidratado y brinda firmeza para facilitar los cortes y obtener secciones delgadas y uniformes (Sandoval *et al.*, 2005).

Una desventaja en este proceso es el tiempo, puesto que, desde la fijación y deshidratación de los tejidos, pasando por la infiltración y corte, hasta la desparafinación transcurren aproximadamente 25 días para obtener cortes histológicos de calidad; cabe señalar que durante este tiempo son empleados algunos reactivos que son dañinos para la salud y el ambiente.

2.9 Procesamiento histológico con el criostato

Este trabajo plantea la alternativa de evitar la fijación e infiltración dentro de las células y obtener cortes histológicos en un menor tiempo posible, por medio del criostato, embebiendo los tejidos en un medio OCT (*Optimal cutting temperature*), como el gel *tissue-tek* de Leica (Figura 7). El cual brinda soporte a los tejidos para realizar cortes a baja temperatura, debido a su rápida congelación volviéndolos homogéneos al corte, es soluble



Figura 7. Gel Tissue-tek Leica.



en agua a diferencia de la parafina, esto se debe a sus componentes como el polietilenglicol (PEG) y la sacarosa.

Este procesamiento puede ser de importancia dentro de la Bioquímica, ya que al no usar fijadores o materiales que se infiltren en las células del tejido; estas puedan mantener su integridad morfológica y fisiología celular al detener los procesos celulares congelando de manera rápida el tejido. La principal diferencia entre con el método convencional, es el medio de congelamiento, también llamado gel OCT.

III Justificación

Los protocolos existentes para usar el criostato describen las técnicas para seccionar tejidos animales que son blandos y los cortes son homogéneos a diferencia de los tejidos vegetales que pueden contener fibras y producir secciones heterogéneas.

Además, son escasos los estudios donde se ha utilizado el criostato para procesar tejidos foliares, sin alterar los mismos y sus contenidos celulares, con el fin de realizar su descripción anatómica en el tejido fresco. Esta técnica puede ser útil en estudios donde los contaminantes ambientales alteren estructuras que dependan de dichas alteraciones de los contenidos celulares, evitando la fijación y su posible alteración de las estructuras.

IV Hipótesis

El proceso de fijación en las muestras vegetales detiene los procesos, mantiene su estructura, pero se alteran los contenidos, mientras que la congelación, detiene los procesos, pero se conservan los contenidos celulares. Por lo tanto, esta herramienta permite estudiar los tejidos sin que estos se alteren en un tiempo más corto.

V OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Establecer un protocolo del uso de criostato Leica CM1860 UV. que permita obtener preparaciones histológicas de tejidos aéreos de cuatro especies arbóreas (*Pinus patula* Schltld., *Fraxinus uhdei* Lingelsh., *Acacia retinodes* Schltld. y *Casuarina equisetifolia* Lingelsh. con diferencias estructurales.

5.2 Objetivos particulares

Determinar si la fijación es necesaria previa al corte.

Analizar un medio de soporte para realizar un corte óptimo en los tejidos, sin alterar las estructuras celulares y sus contenidos químicos. Además de un adhesivo que facilite la tinción.

Investigar a que temperatura y grosor se obtienen cortes adecuados para cada tipo de órgano.

Estudiar los tiempos adecuados para la tinción diferencial (safranina- verde rápido) de los tejidos de cada órgano de las especies arbóreas seleccionadas.

Analizar la anatomía foliar de las especies arbóreas seleccionadas.

VI MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Procesamiento generado en criostato para tejidos vegetales

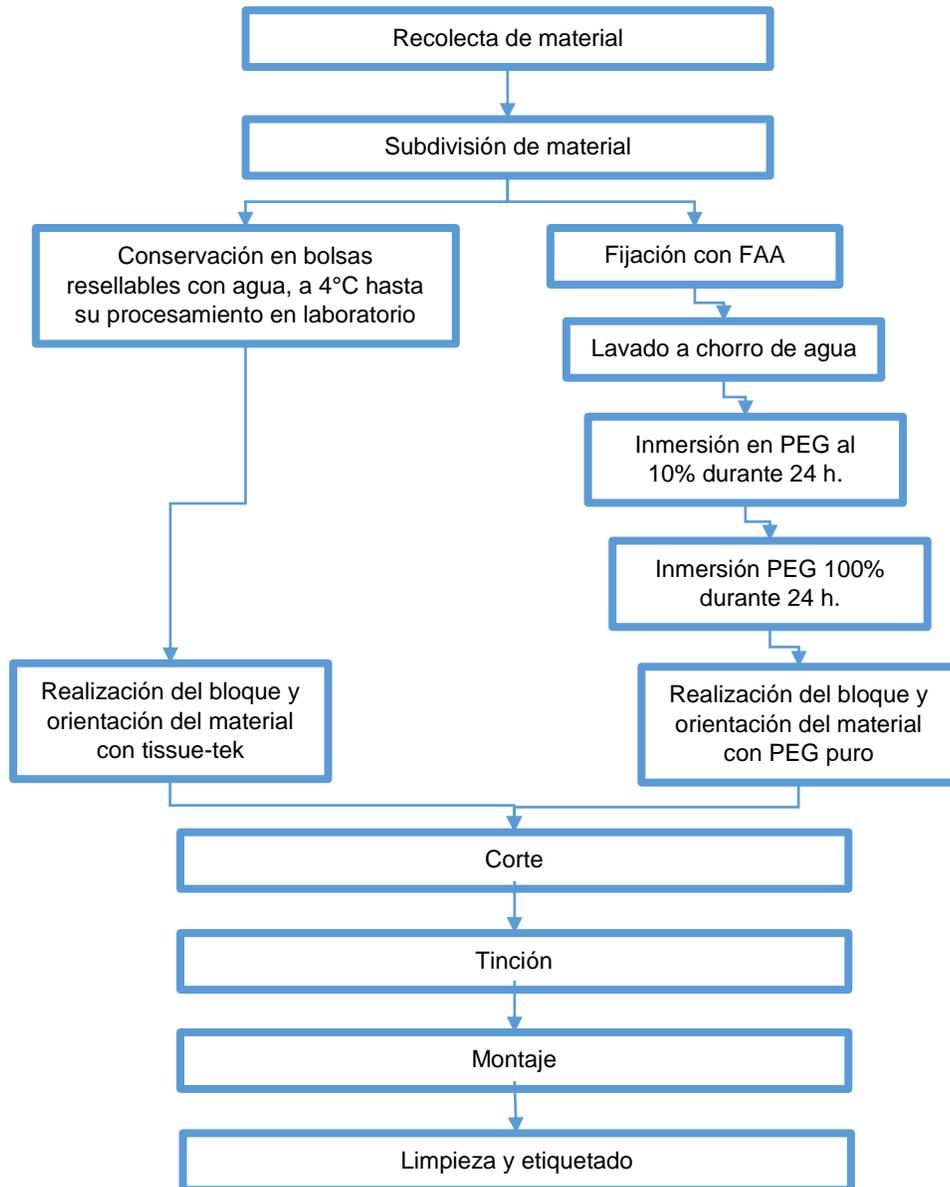


Figura 8. Esquema en procesamiento de muestras en criostato.

6.2 Selección de especies

A continuación, se presenta una descripción morfológica y ubicación taxonómica de cada especie, las cuales fueron tomadas del portal web (Tropicos.org. Missouri Botanical Garden, 1982). y (Stevens *et al.*, 2017).

6.3 Descripción del hábito, morfología de los órganos estudiados y ubicación taxonómica de las especies

Acacia retinodes Schlecht

Árbol o arbusto, monoico, perennifolio, de hasta 8 m de alto, copa extendida redondeada, crecimiento rápido, longevidad de hasta 30 años. Hojas compuestas, prontamente caedizas, filodios persistentes, 3-20x0.2- 1.5 cm, linear lanceolados a oblanceolados, más anchos en la parte superior, generalmente mucronados, base atenuada, nervadura media prominente, glabros, glaucos, con una glándula marginal pequeña por arriba de la base en la cara abaxial y por arriba de la base (<http://www.floraibérica.es> Aedo *et al.*, 1993) (Fig. 9).

Clase: Equisetopsida C. Agardh

Subclase: Magnoliidae Novák ex Takht.

Super orden: Rosanae Takht.

Orden: Fabales Bromhead

Familia: Fabaceae Lindl.

Género: Acacia Mill.



Figura 9. *Acacia retinodes*



Figura 10. Filodio y hojas de *Acacia retinodes*

***Casuarina equisetifolia* Lingelsh**

Árbol, perenifolio, de hasta 40 m de alto, copa globosa o piramidal, crecimiento rápido y longevidad de más de 50 años. Ramillas delgadas, colgantes, verde grisáceas, con nudos y entrenudos conspicuos. (<https://www.arbolappcanarias.es>) (Fig.11).

Ubicación Taxonómica de *Casuarina equisetifolia* Lingelsh.

Clase: Equisetopsida C. Agardh

Subclase: Magnoliidae Novák ex Takht.

Super orden: Rosanae Takht.

Orden: Fagales Engl.

Familia: Casuarinaceae R. Br.

Género: *Casuarina* L.



Figura 11. *Casuarina equisetifolia*



Figura 12. tallo modificado de *Casuarina equisetifolia*

***Fraxinus uhdei* Lingelsh**

Árbol dioico, hasta de 25 m de alto, copa compacta, redondeada hacia el ápice, sombra densa, crecimiento rápido, vigoroso, longevidad de 80 a 100 años. Hojas compuestas, pinnadas, imparipinnadas, 5-9 foliolos, casi sésiles, a finamente peciolulados, lanceolados, oblongo-lanceolados o elípticos, 5-15 × 1.5-5 cm, largamente atenuados, menudamente dentados o serrulados, base obtusa, redondeada o aguda, membranáceos o algo engrosados, haz glabro, envés verde claro, generalmene algo pubérulo a lo largo de la nervadura media, glabro caducifolio que alcanza hasta 30 m de altura (Rzedowski, 2010), (Fig.13).

Ubicación Taxonómica de *Fraxinus uhdei* Lingelsh.

- Clase: Equisetopsida C. Agardh
- Subclase: Magnoliidae Novák ex Takht.
- Super orden: Asteranae Takht.
- Orden: Lamiales Bromhead
- Familia: Oleaceae Hoffmanns. & Link
- Género: *Fraxinus* L.
- Especie: *Fraxinus uhdei* (Wenz.) Lingelsh.



Figura 13. *Fraxinus uhdei*



Figura 14. Hojas de *Fraxinus uhdei*



***Pinus patula* Schltl. & Cham.**

Árbol de 10-25 m de alto, copa piramidal. El crecimiento se detiene entre los 30 y 35 años. Hojas aciculares, fasciculadas, 3 en cada fascículo, a veces 4, rara vez 5, de 15-30 cm de largo, colgantes, verde claro, brillantes, vaina persistente (Fig.5) (Espinoza-Garduño, 2010), (<http://www.floraibérica.es> Aedo *et al.*, 1993).

Ubicación Taxonómica de *Pinus patula* Schltl. et Cham.

- Clase: Equisetopsida C. Agardh
- Subclase: Pinidae Cronquist, Takht. & W. Zimm.
- Orden: Pinales Gorozh.
- Familia: Pinaceae Spreng. ex Rudolphi
- Género: *Pinus* L.
- Especie: *Pinus patula* Schltl. & Cham.



Figura 15. *Pinus patula*



Figura 16. Acículas de *Pinus Patula*

6.4 Recolecta de muestras y preparación de secciones para cortes anatómicos

Se recolectaron en número de 12 hojas, ramillas y folíolos de cada una de las especies estudiadas, en los bosques de Tlalpan, Chapultepec y San Juan de Aragón, Ciudad de México. Los criterios de selección de los órganos estudiados fueron las diferencias en superficie y textura, características que pudieran relacionarse con cambios en los contenidos químicos y estructura celular. Todas las muestras se recolectaron en la porción media de la copa de los árboles, en la parte orientada hacia el sur, ya que los vientos en la cuenca endorreica del Valle de México, corren en una dirección norte-sur, por lo tanto, el área de la copa menos impactada por los contaminantes se localiza hacia el sur. La mitad de las muestras

se mantuvieron hidratadas en bolsas resellables (ziploc), a una temperatura promedio de 4°C durante cuatro días, la otra mitad se preservó en FAA (porciones).

Después de este tiempo, en la parte media de cada órgano se hicieron secciones de un cm² (Figuras 17,18).



Figura 17. Cortes del foliolo de la hoja en *Fraxinus uhdei*.



Figura 18. Cortes de la acícula en *Pinus patula*.

6.5 Procesamiento histológico de muestras frescas y fijadas

Antes de establecer el protocolo del procesamiento de las muestras frescas, se leyó detenidamente el manual de operación del criostato Leica CM1860 UV (Wetzlar Alemania). A continuación, se describe el funcionamiento de este equipo. Se enciende el equipo y se selecciona el grosor en micras de cada sección (a) y la temperatura (b) en el tablero digital (Fig. 19) y se deja enfriar el criostato por lo menos dos horas antes de montar las muestras.

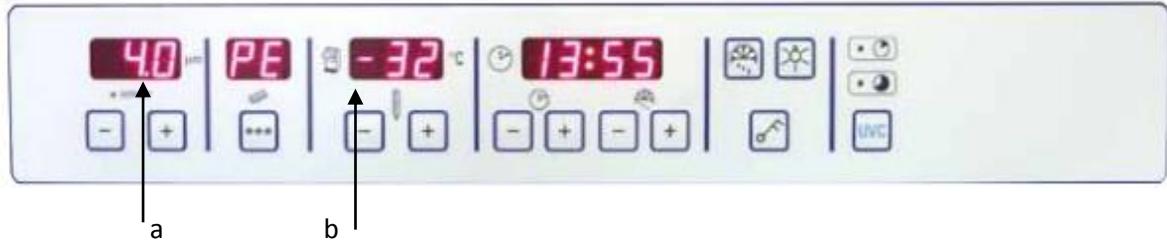


Figura 19. Tablero digital de criostato Leica

6.5.1 Muestras frescas

Después de subdividir las muestras sin fijar hidratadas en bolsas resellables a 4°C, se colocó una gota del gel tissue-tek en el centro de la platina porta muestras para su posterior manipulación y orientación en función del tipo de corte, enseguida, se introdujo sobre la plataforma de congelación del criostato Leica CM1860 UV (Wetzlar, Alemania) (Fig. 20).



Figura 20. Montaje y orientación de la muestra en gel tissue-tek (OCT) sobre la platina porta muestras.

Más adelante, se introdujo dicha platina porta muestras en la unidad Peltier por diez minutos, la cual congela rápidamente la muestra (Fig. 21). En el minuto cuatro se agregó más gel tissue-tek y se corrigió la orientación de la muestra con unas pinzas y agujas de disección. Se tuvo cuidado que el gel OCT cubriera completamente el tejido para ser seccionado.



Figura 21. Plataforma de congelación y en azul se muestra la unidad Peltier.

6.5.2 Muestras Fijadas

Las muestras fueron almacenadas en frascos de vidrio transparente que contenían FAA (Formaldehído-Alcohol-Ácido acético); fijador que endurece y preserva los tejidos. El tiempo transcurrido en FAA fue de 24 horas. Enseguida las muestras se lavaron a chorro de agua hasta eliminar el olor del fijador.

Para la preparación de los bloques las secciones fueron embebidas en una solución de Polietilenglicol (PEG) al 10% durante 24 horas, este compuesto tiene un peso de 4000 g/mol. Para continuar con PEG al 100% por 24 horas más, después de este tiempo se eliminó el PEG, se montaron y orientaron las muestras dentro de moldes de plástico con ayuda de agujas de disección en PEG 100% nuevo, enseguida se introdujeron en la cámara criostática y se colocaron sobre la unidad Peltier para acelerar la formación del bloque (Fig. 22).



Figura 22. Bloques de PEG para realizar el montaje.

En los bloques se realizaron pirámides de corte de 1cm^2 que se montaron dentro de las platinas porta muestras en el criostato con la ayuda del gel tissue-tek (Fig. 23).



Figura 23. Bloque de PEG.

Se señalan las partes del criostato Fig. 24

1. Tornillo de apriete a cabezal portamuestras
2. Palanca de sujeción del cabezal portamuestras
3. Palanca de articulación esférica
4. Placa antiroll
5. Platina porta muestras
6. Palanca de sujeción de la cuchilla
7. Cuchilla desechable
8. Cubre cuchillas

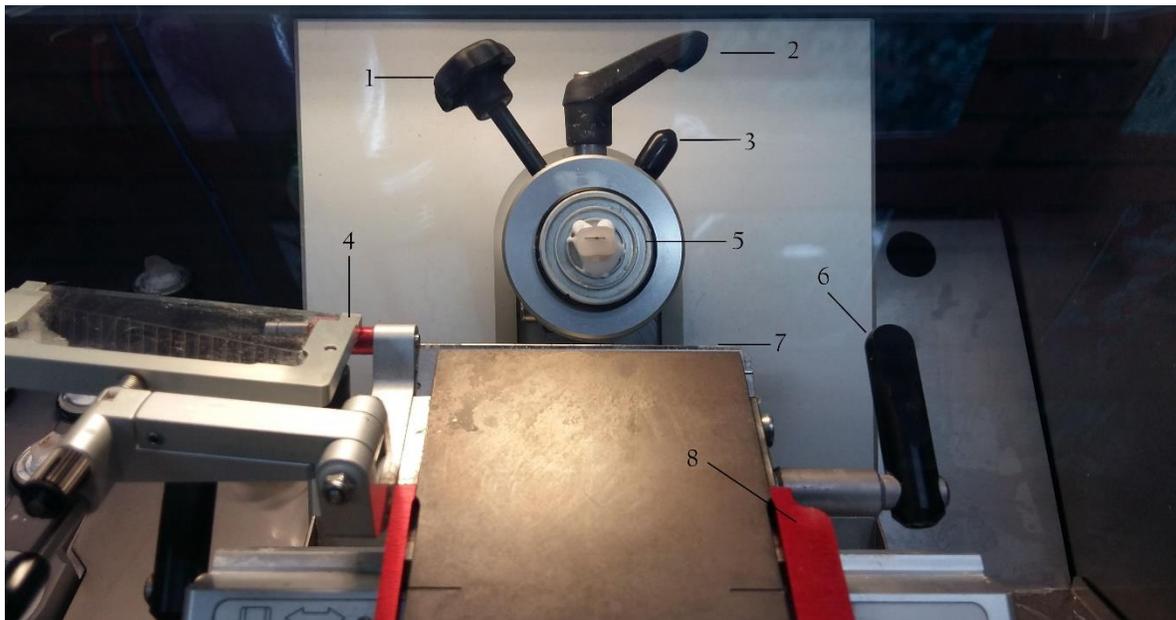


Figura 24. Cámara criostática

Las partes del criostato que se relacionan con la sección de las muestras se señalan con números arábigos en la (Fig. 24) Primero se insertó la platina porta muestras (5) con el bloque de PEG o la sección fresca adherida en el soporte y se orientó con la manija (3), con la palanca de sujeción (2) se inmovilizó el bloque y con el “antiroll” (4) se evitó el enrollamiento de las secciones, de tal manera que este estuviera paralelo a la cuchilla (7), enseguida se cerró la cámara de congelación para proceder a realizar las secciones.

Se aproximó el brazo del criostato con la muestra y las muestras fueron seccionadas (Fig. 25) hasta obtener secciones uniformes extendidas sobre la plataforma de corte, después se abrió la cámara para retirar las secciones. Debido a que los tejidos seccionados fueron incluidos en un medio de soporte soluble en

agua (PEG en tejidos fijados, Tissue-tek para cortes frescos) se decidió usar el adhesivo Haupt (Anexo 1) para evitar la pérdida de los tejidos durante el proceso de tinción. Se colocó una gota de este adhesivo sobre el portaobjetos y con la ayuda de agujas de disección se extendió el tejido y se dejaron secar cuando menos por 5 min. Cada portaobjeto fue rotulado con una pluma de punta diamante para indicar el nombre de la especie y tipo de corte.

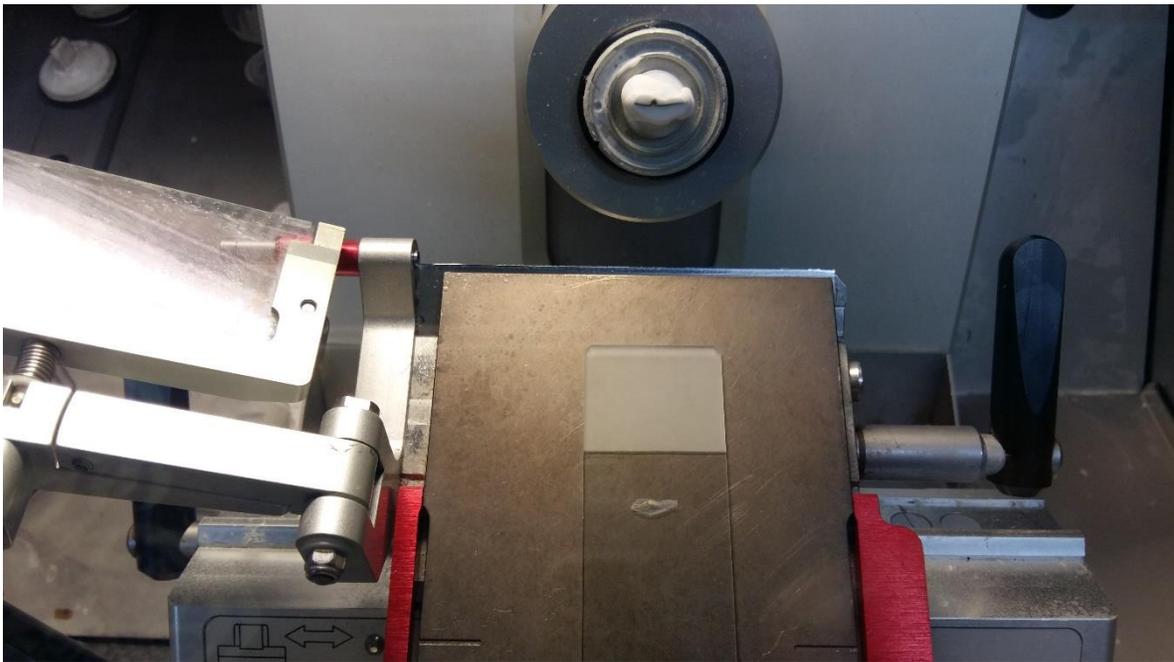


Figura 25. Corte transversal de una hoja de *Fraxinus uhdei*

6.6 Tinción diferencial, safranina-verde rápido

Para la tinción se utilizó safranina en medio acuoso (Anexo 1) contenida en cajas Koplín, donde se introdujeron las laminillas durante 24 horas. Después de este tiempo se removió el excedente de colorante con una pipeta Pasteur, sin tocar las secciones para evitar la pérdida de este colorante y de los tejidos. Se deshidrataron las muestras con etanol al 30%, 50%, 70% y 95% en un tiempo de 1 a 2 minutos en cada cambio. Enseguida se tiñó con verde rápido base alcohólica durante 12 segundos, se retiró el excedente de este colorante con etanol absoluto por medio de un gotero, donde también se evitó el contacto con las secciones. Las muestras fueron introducidas en aceite de clavo mínimo por 10 min y en Citrisol V por otros 10 minutos y se procedió al montaje.

6.7 Montaje

Se removió el exceso de Citrisol V del portaobjetos, se agregaron gotas de resina sintética sobre la muestra y se colocó el cubreobjetos, evitando la formación de burbujas. Las preparaciones se sacaron en una estufa a 60°C durante 24 horas. A las preparaciones histológicas obtenidas se les removió el excedente de resina con una navaja de afeitar y etanol al 70%. Cada laminilla se etiquetó con papel adhesivo donde se incluyeron los siguientes datos: familia, nombre de la especie, órgano de la planta, tipo de corte, tinción, nombre del técnico y fecha de elaboración.

6.8 Fase de gabinete

Las preparaciones se observaron con un microscopio óptico modelo CV18, Primo Star HAL/LED, marca Carl Zeiss para establecer las diferencias en las células y los tejidos procedentes de muestras frescas y fijadas en FAA procesadas en el criostato. Además de indicar los tipos de soporte y tinción que conservan mejor las estructuras el tipo de tinción que permite mediante y realizar la descripción anatómica de las diferentes especies y realizar comparaciones en los tejidos foliares de las distintas especies por las diferencias en el procesamiento del material (muestras *in vivo*, así como las sometidas a fijación).

VII Resultados

Después de realizar las pruebas con tejidos fijados y no fijados, se puede decir que, el criostato ofrece ciertas ventajas al procesar tejidos vegetales, tales como; la obtención de secciones de manera casi inmediata, posterior al montaje en gel tissue-tek, además de reducir la cantidad de reactivos o solventes, que pudieran alterar la estructura o la composición de los tejidos celulares. Aun que se pueden obtener secciones en un tiempo corto, se presentaron algunos inconvenientes.

Las secciones obtenidas de tejidos frescos sin fijación previa son demasiado frágiles, debido a que al ser cortadas sufren un cambio drástico de temperatura al retirarse de la cámara refrigerante y adherirse al portaobjetos. Por lo tanto, se recomienda realizar los cortes uno por uno. Además, manipularlos, con ayuda de una aguja fina durante la adherencia del corte al portaobjetos con adhesivo Haupt. La inclusión en gel OCT debe realizarse de manera rápida, con la finalidad de evitar la formación de cristales de agua que puedan dañar a las células. La temperatura adecuada de corte para los tejidos incluidos en gel OCT es de -15°C , sin embargo, para tejidos fibrosos la temperatura debe ser menor. Por otro lado, los tejidos fijados que fueron incluidos y colocados en bloques de PEG, dan mayor soporte al tejido y permite un corte homogéneo, este es más regular y se facilita su manipulación. Estos cortes se deben realizar de la siguiente manera: Se recomienda mantener una temperatura de -20°C , ya que de esta manera el GEL tissue-tek funciona como

adhesivo entre el bloque y la platina porta muestras, el corte debe realizarse de una manera suave con un movimiento uniforme, si se desliza rápidamente ocasiona un desgarre en el tejido. En el cuadro 3 se resumen las diferencias entre el procesamiento de tejidos fijados y no fijados.

Cuadro 3. Contraste entre cortes realizados a tejidos frescos y fijados.

	Frescos	Fijados
Montaje y corte	Incluidos en gel (tissue-tek) y seccionados a una temperatura de -15 a -18°C.	Incluidos en PEG (4000) y seccionados a una temperatura de -20 a -22°C.
	El gel tissue-tek brinda soporte y facilita el seccionado, debido a que la sacarosa forma un enlace con el PEG.	No es recomendable el uso de gel tissue-tek como medio de soporte, aunque se puede usar como agente de montaje entre el bloque de PEG y la platina portamuestras.
	Al incluir en PEG (4000), se requiere mantenerlo a una temperatura de -20°C para evitar que los tejidos se colapsen.	Al incluir en PEG (4000), se logró un mayor soporte facilitando el corte y manipulación de las secciones.
Tinción diferencial (safranina- verde rápido).	La safranina no se retiene adecuadamente en los tejidos, por lo tanto, las muestras se enjuagaron y escurrieron después de 24h para eliminar el sobrante.	La safranina se retiene adecuadamente en los tejidos después de 24 h.
	Durante la deshidratación se utilizaron concentraciones de etanol al 30%, 70% y 95%	Durante la deshidratación se utilizaron concentraciones de etanol al 30%, 50%, 70%, 95% y 100%.
	El tiempo de tinción con verde rápido fue de 12".	El tiempo de tinción con verde rápido fue de 15".
	Para el lavado del verde rápido se hizo un cambio de alcohol etílico absoluto.	Para el lavado del verde rápido se hicieron dos cambios de alcohol etílico absoluto.

7.1 Comparación entre material fresco y fijado en función de la tinción

Se realizó una comparación entre las preparaciones obtenidas en tejidos frescos y fijados de tejidos de las especies arbóreas antes mencionadas.

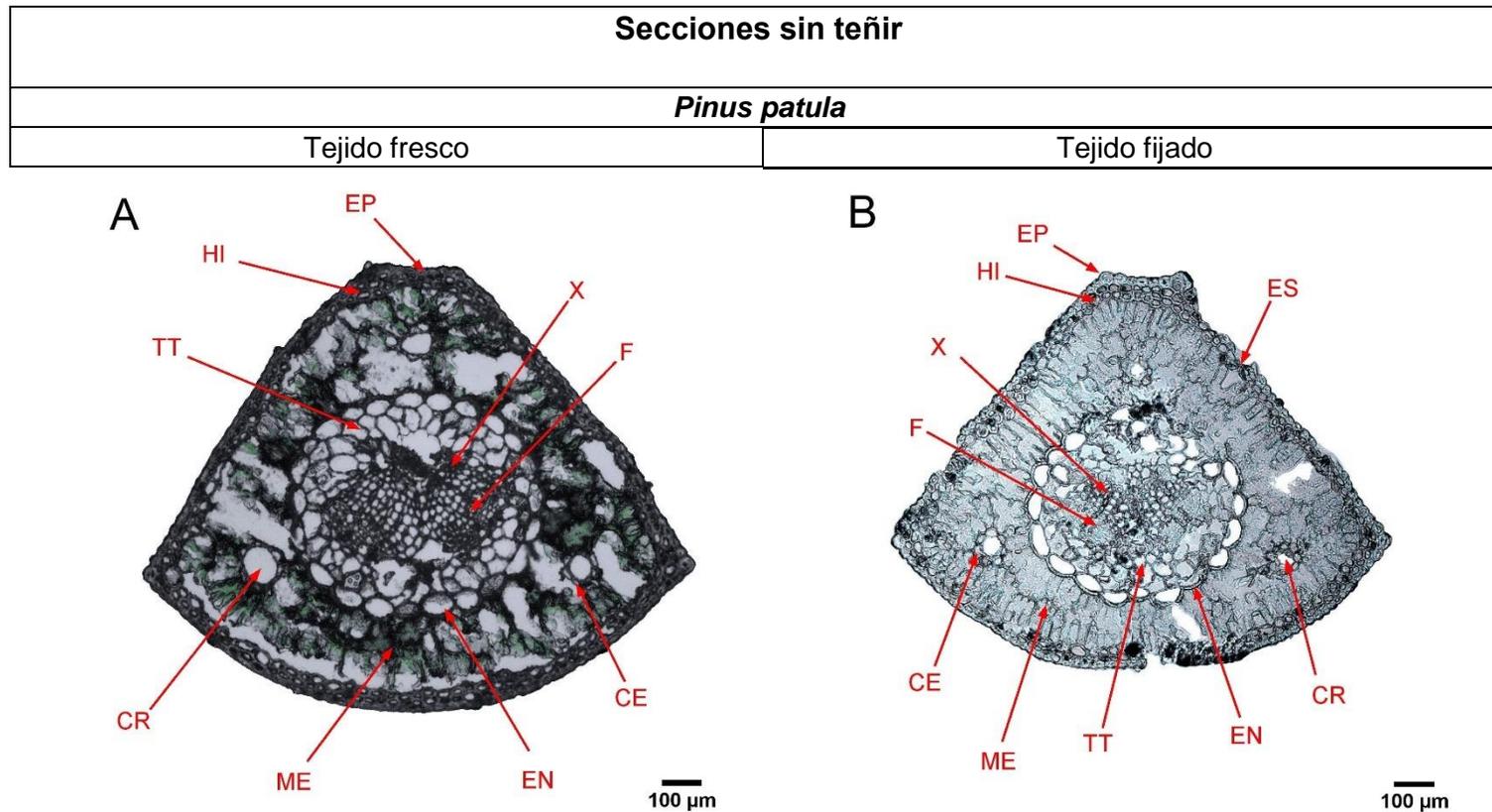


Figura 26. *Pinus patula*. Secciones transversales de hojas sin teñir. A. Muestra fresca. B. Muestra fijada.

EP= Epidermis, EST=Estoma, HI=Hipodermis, ME=Mesófilo, CE=Células epiteliales, CR=Canal resinífero, EN=Endodermis, TT=Tejido de transfusión, X=Xilema, F=Floema.

Secciones teñidas	
<i>Pinus patula</i>	
Tejido fresco	Tejido fijado

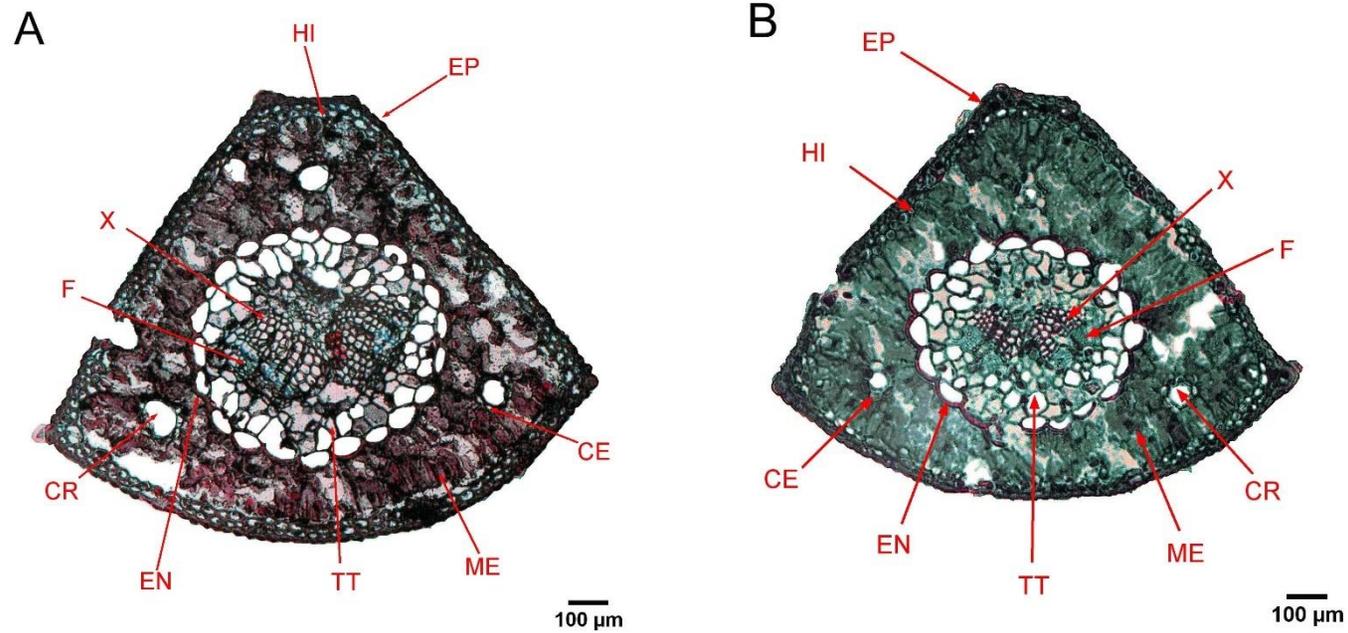


Figura 28. *Pinus patula*. Secciones transversales de hojas teñidas. A. Muestra fresca. B. Muestra fijada.

EP= Epidermis, HI= Hipodermis, ME= Mesófilo, CE = células epiteliales, CR= canal resinífero, EN= Endodermis, TT=Tejido de transfusión, X= Xilema, F=Floema.

Secciones sin teñir	
<i>Casuarina equisetifolia</i>	
Tejido fresco	Tejidos fijados

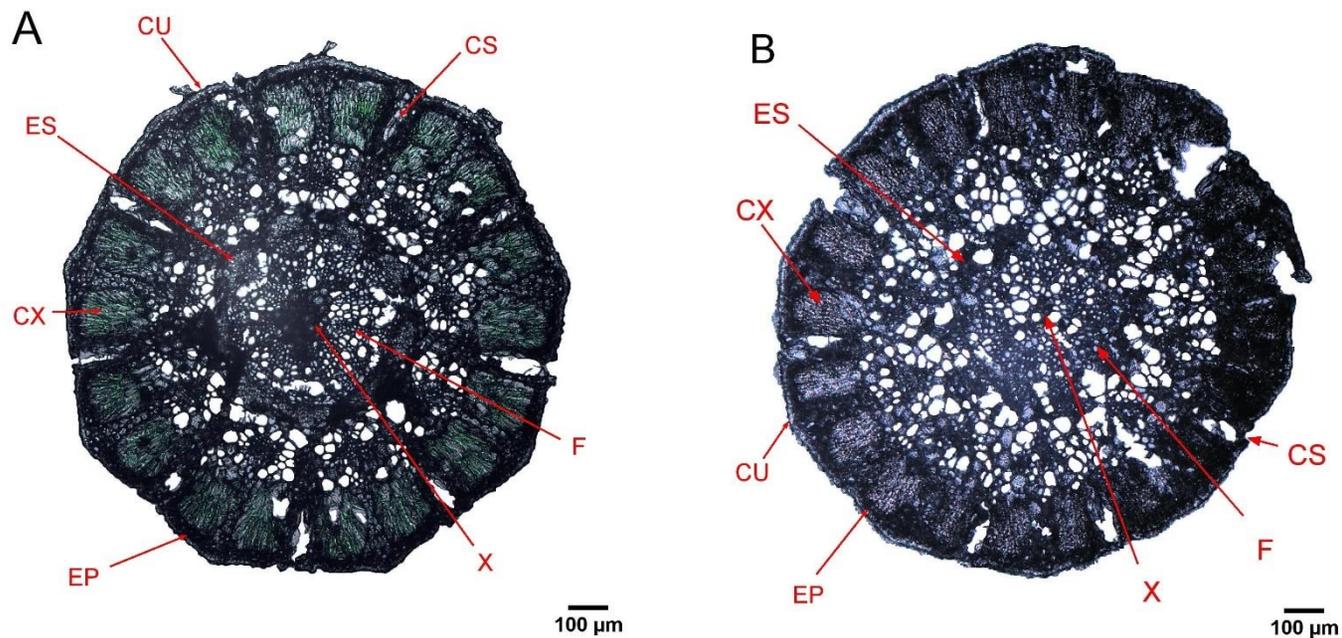


Figura 29. *Casuarina equisetifolia*. Secciones transversales de tallo fotosintético. A. Muestra fresca. B. Muestra fijada.

CU= cutícula, EP= Epidermis, CS= Cámara subestomática, CX= Córtex, ES= Esclerénquima (fibras), X= Xilema, F= Floema.

Secciones teñidas	
<i>Casuarina equisetifolia</i>	
Tejido fresco	Tejido fijado

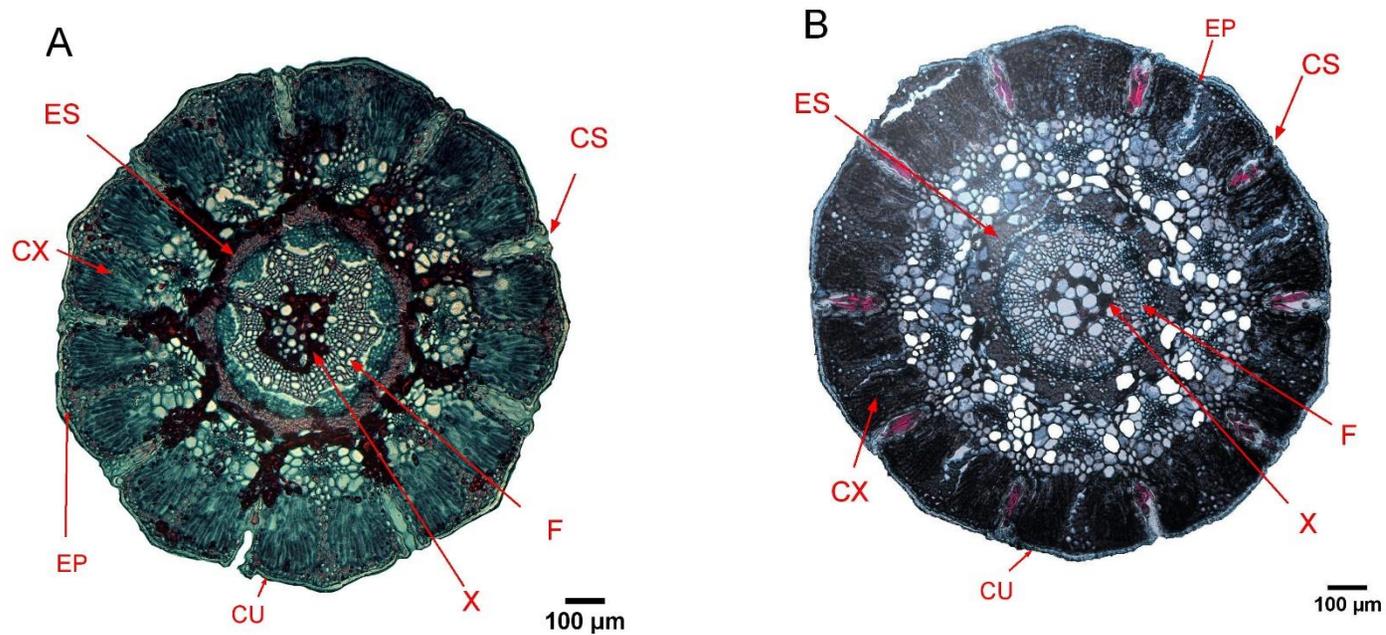


Figura 30. *Casuarina equisetifolia*. Sección transversal de tallo fotosintético. A. Muestra fresca teñida. B. Muestra fijada teñida.

EP= Epidermis, CS= Cámara subestomática, CX= Córtex, ES= Esclerénquima (anillo de fibras), X= Xilema, F= Floema.

Secciones sin teñir	
<i>Acacia retinodes</i>	
Tejido fresco	Tejido fijado

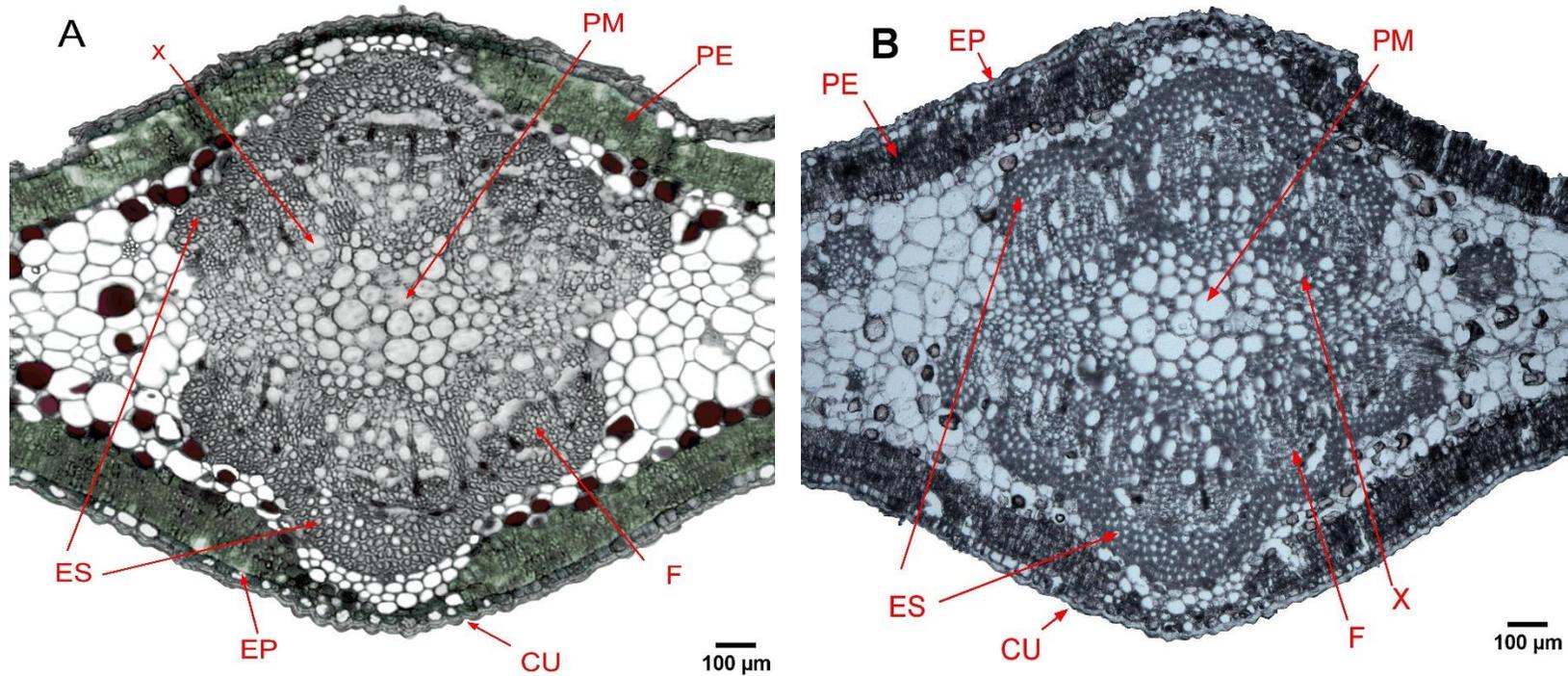


Figura 31. *Acacia retinodes*. Secciones transversales del filodio sin teñir. A. Muestra fresca. B. Muestra fijada.

CU=Cutícula, EP= epidermis, PE=Parénquima en empalizada, ES= Esclerénquima (anillo de fibras interno del córtex), F= Floema, X= Xilema, PM= Parénquima medular, PS=Parénquima esponjoso.

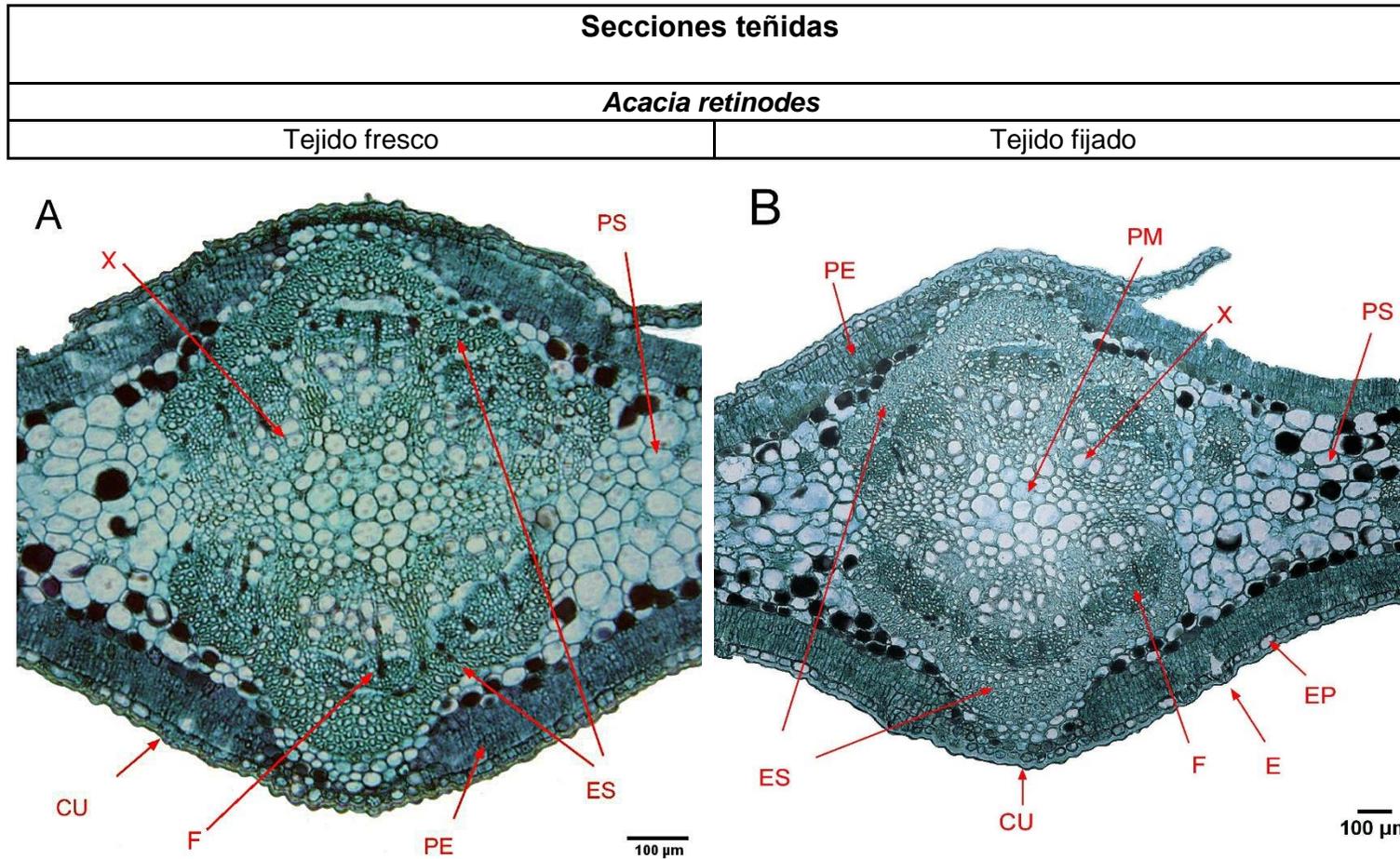


Figura 32. *Acacia retinodes*. Secciones transversales del filodio teñidas. A. Muestra fresca. B. Muestra fijada.

CU=Cutícula, EP= epidermis, E= Estoma, PE=Parénquima en empalizada, ES= Esclerénquima, F= Floema, X= Xilema, PM= Parénquima medular, PS=Parénquima esponjoso, CC= Contenidos celulares.

Secciones sin teñir	
<i>Acacia retinodes</i>	
Tejido fresco	Tejido fijado

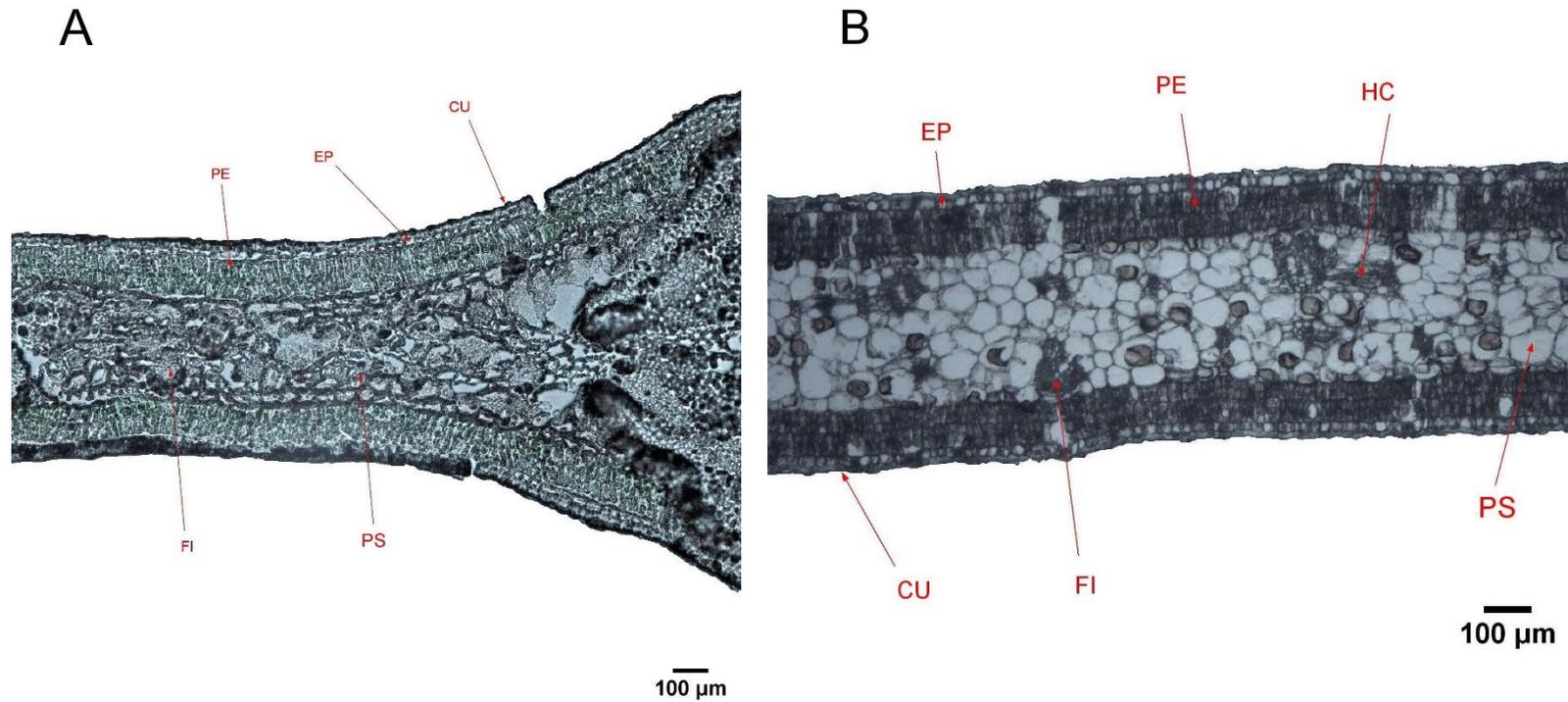


Figura 33. *Acacia retinodes*. Secciones transversales de la zona intercostal del filodio. A. Muestra fresca. B. Muestra fijada.

EP= epidermis, PE=Parénquima en empalizada, HV= Haz vascular, CU=Cutícula, PS=Parénquima esponjoso.

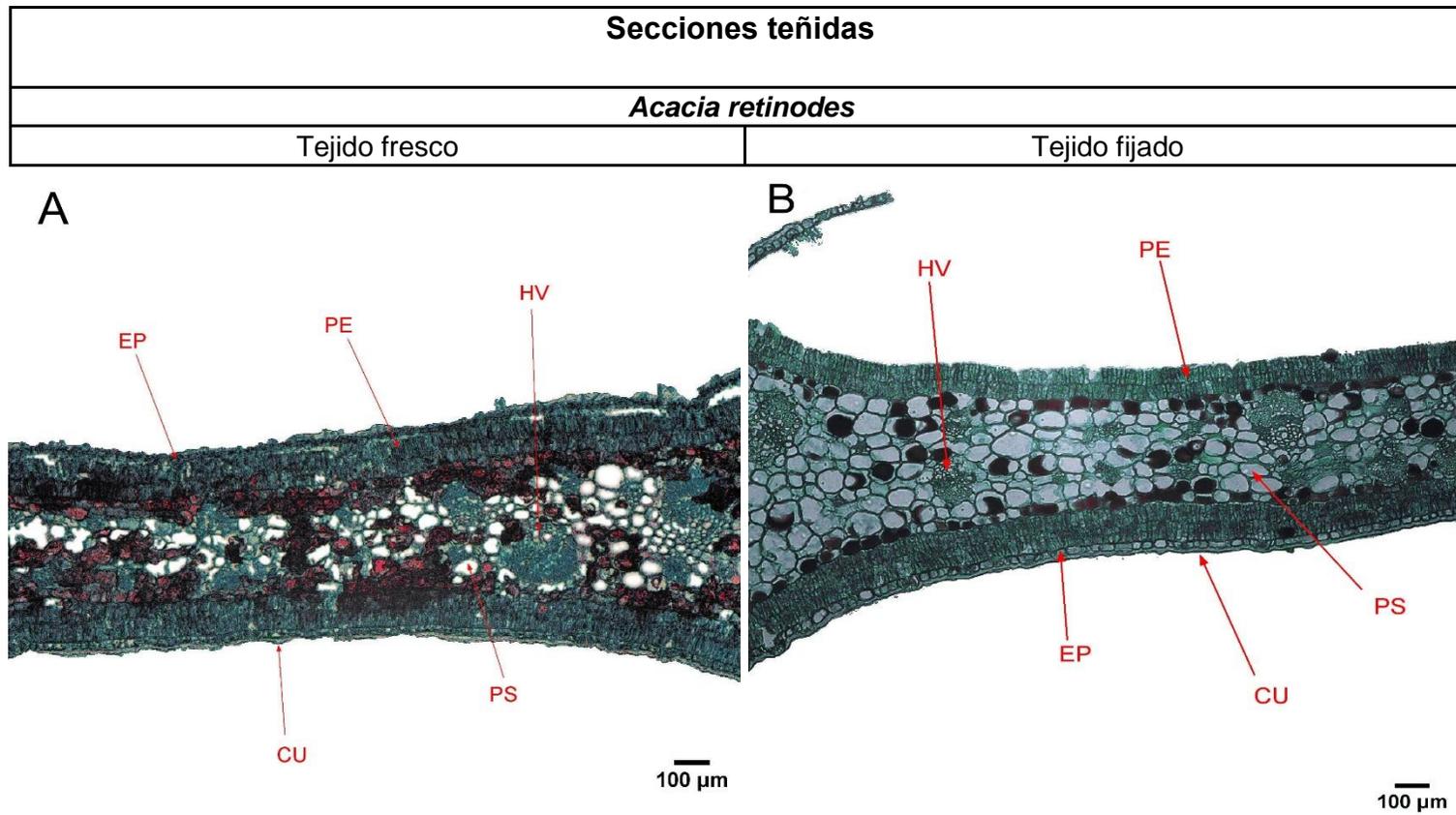


Figura 34. *Acacia retinodes*. Secciones transversales de la zona intercostal del filodio. A. Muestra fresca. B. Muestra fijada.

CU=Cutícula, EP= epidermis, PE=Parénquima en empalizada, PS=Parénquima esponjoso, HV= Haz vascular.

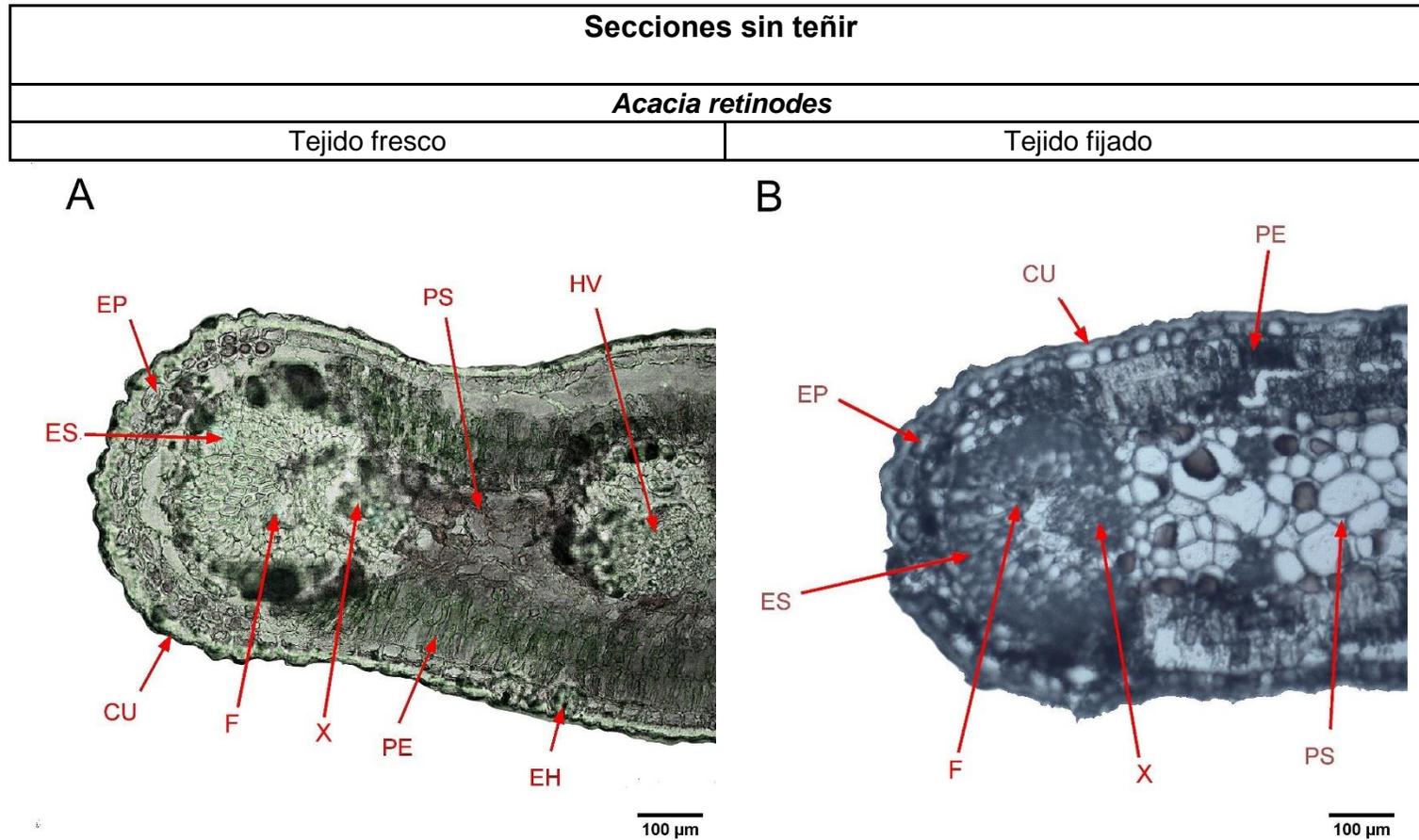


Figura 35. *Acacia retinodes*. Secciones transversales, margen del filodio. A. Muestra fresca. B. Muestra fijada.

CU=Cutícula, EP= epidermis, EH= Estoma hundido, PE=Parénquima en empalizada, PS=Parénquima esponjoso, HV= Haz vascular, ES= Esclerenquima, X= Xilema, F= Floema.

Secciones teñidas	
<i>Acacia retinodes</i>	
Tejido fresco	Tejido fijado

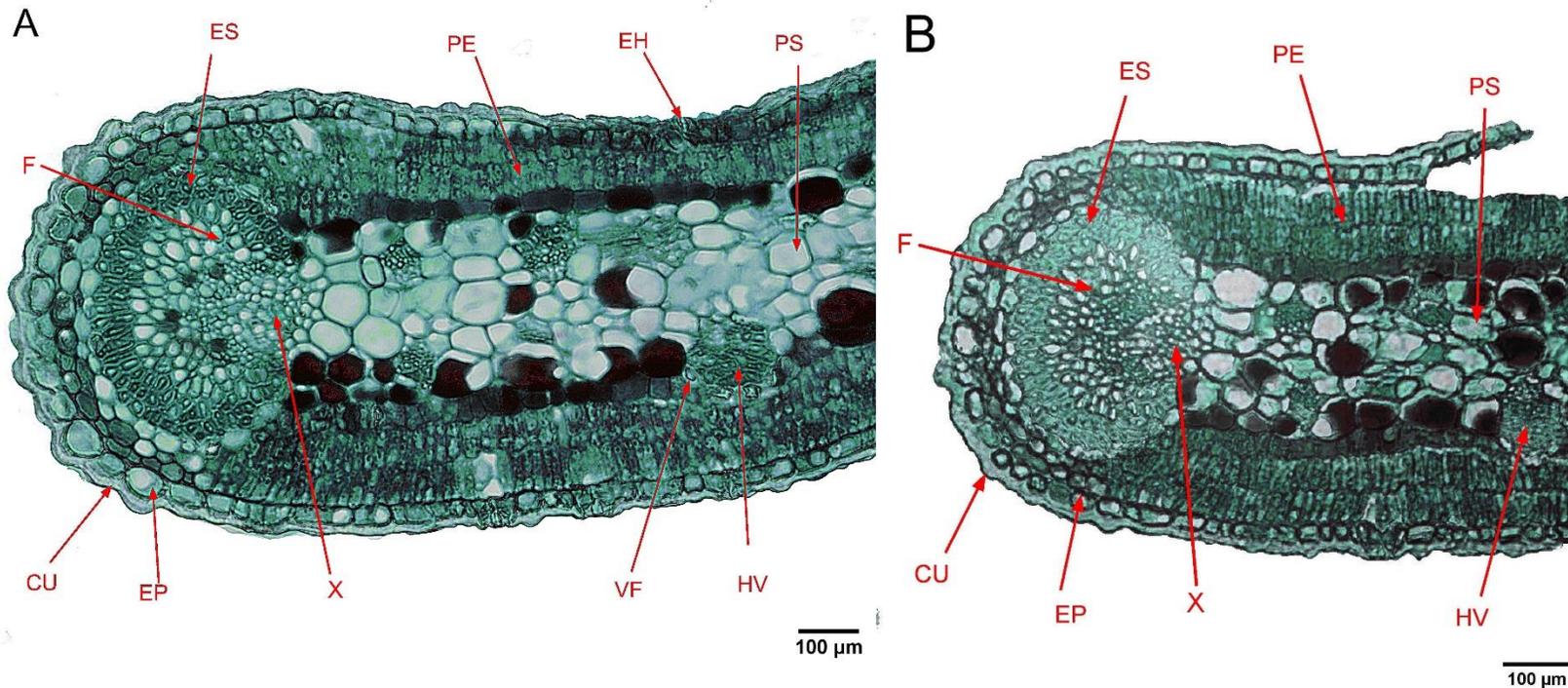


Figura 36. *Acacia retinodes*. Secciones transversales, margen del filodio. A. muestra fresca, B. muestra fijada.

CU=Cutícula, EP= epidermis, EH= Estoma hundido, PE=Parénquima en empalizada, PS=Parénquima esponjoso, VF= Vaina fascicular, HV= Haz vascular, ES= Esclerenquima, X= Xilema, F= Floema

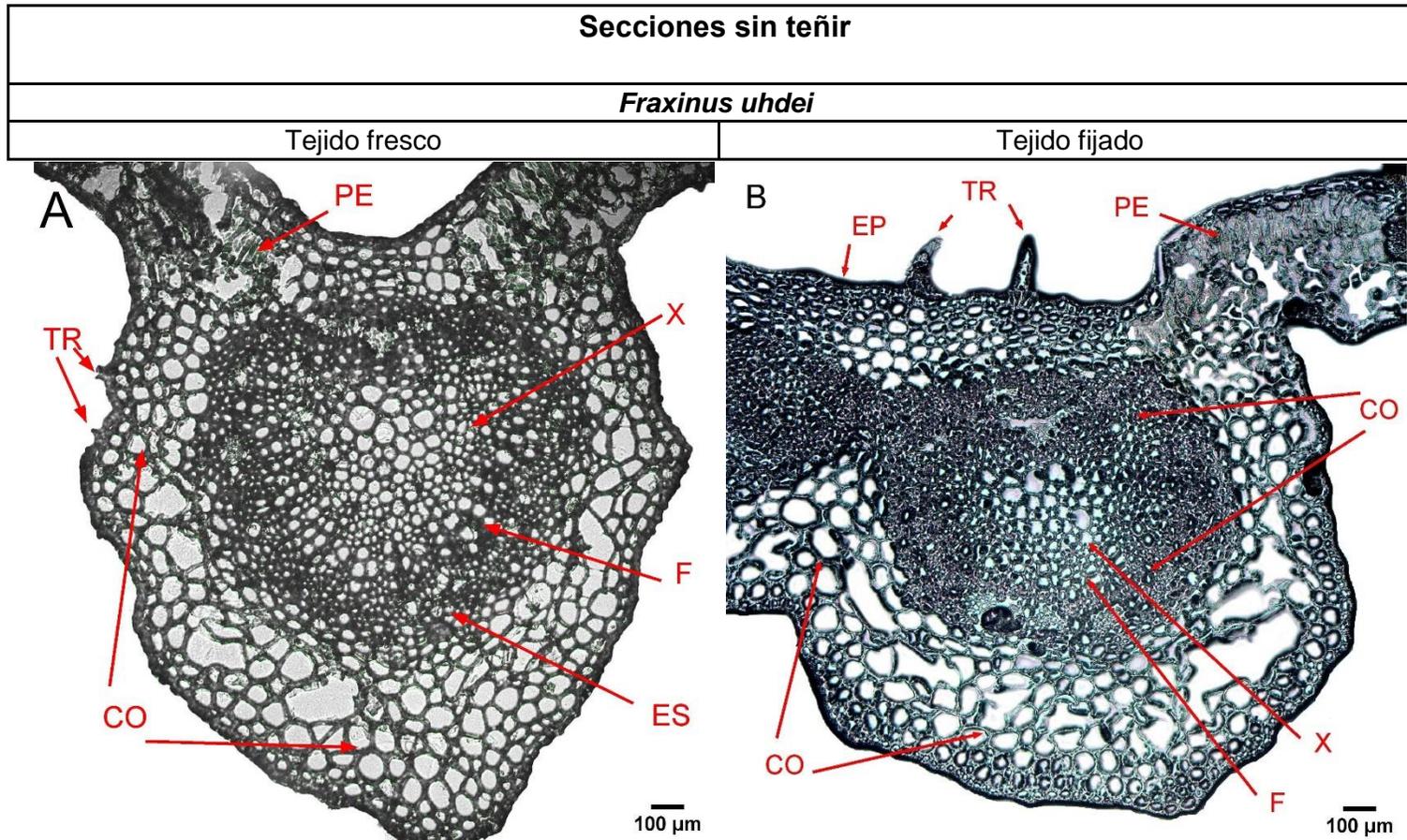


Figura 37. *Fraxinus udehi*. Secciones transversales en vena media de lámina foliar . A. Muestra fresca, B. Muestra fijada

CU= Cutícula, TR= Trícomas simples pluricelulares, EP= Epidermis, PE=Parénquima en empalizada, CO=Colénquima, X=Xilema, F=Floema.

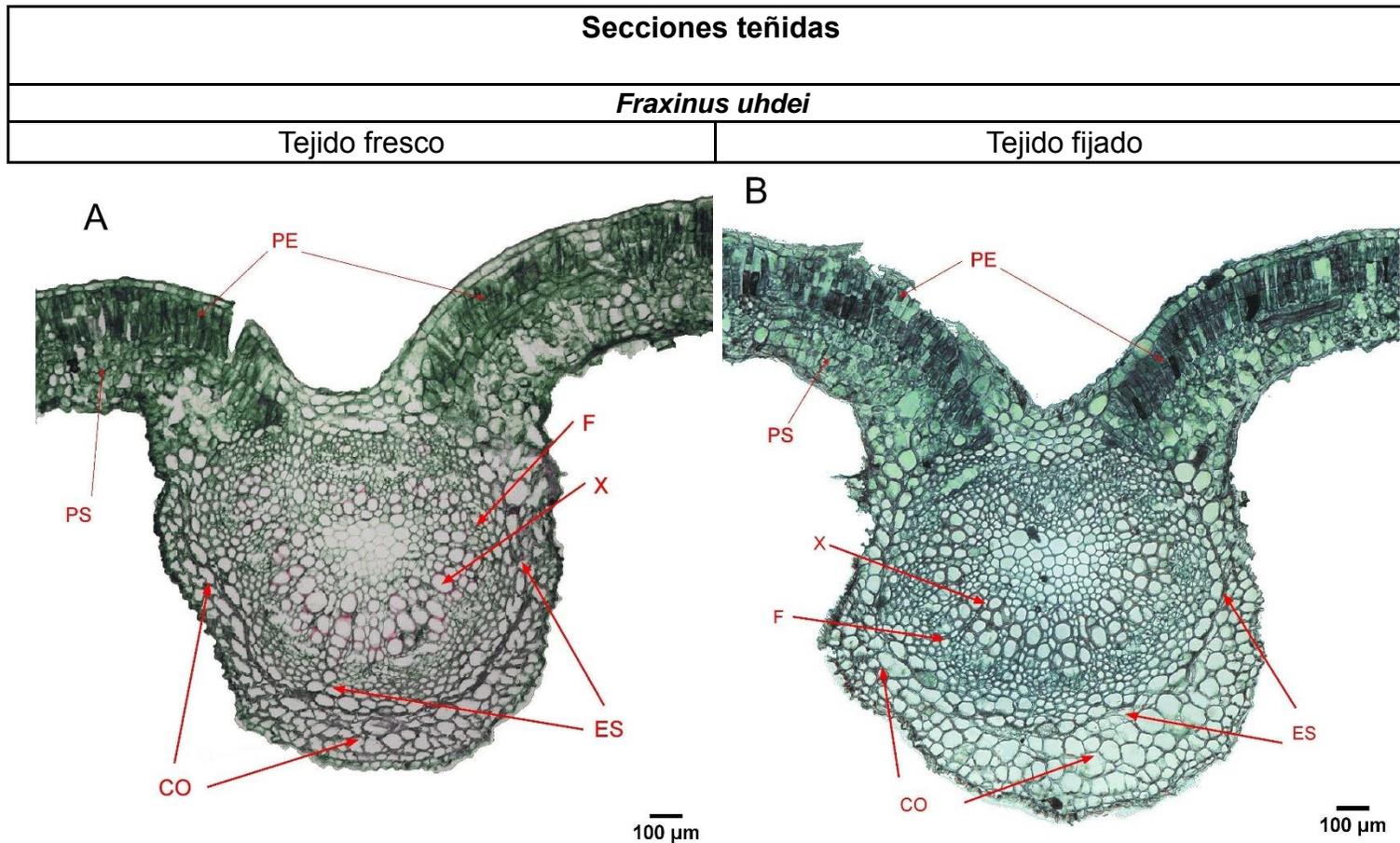


Figura 38. *Fraxinus udehi*. Secciones transversales en vena media de lámina foliar. A. Muestra fresca, B. Muestra fijada.

CU=Cutícula, TR= Tricomas simples pluricelulares, CO=Colénquima, PE=Parénquima en empalizada X=Xilema, F=Floema.

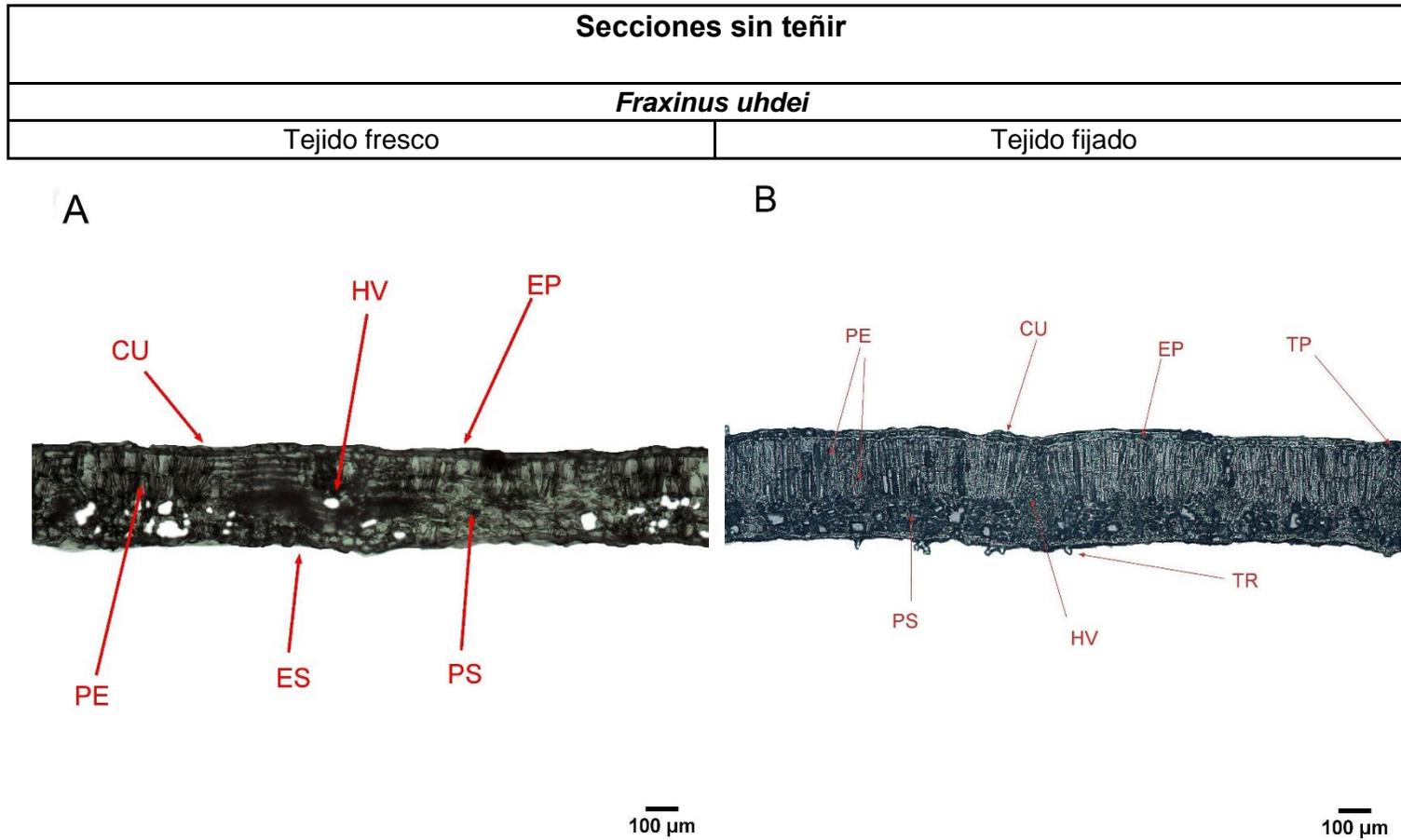


Figura 39. *Fraxinus udehi*. Secciones transversales de la zona intercostal de la lámina foliar, A. tejido fresco, B. tejido fijado

CU= Cutícula, TR= Trícoma, EP= Epidermis, PE= Parénquima en empalizada, PS= Parénquima esponjoso, HV= Haz vascular.

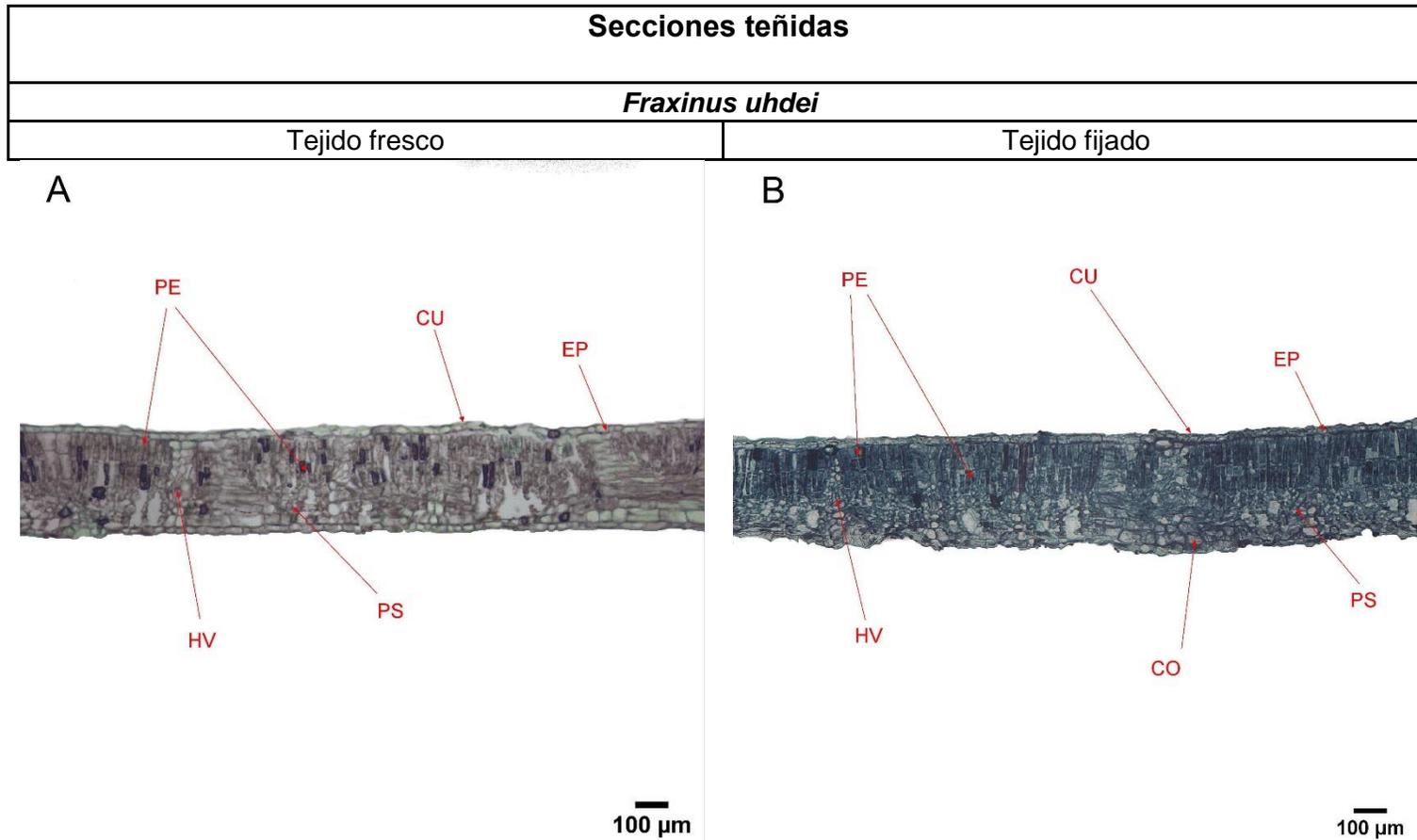


Figura 40 *Fraxinus udehi*. secciones transversales de zona intercosatal de la lámina foliar, A. Muestra fresca, B Muestra fijada

TR= Tricoma, CU= Cutícula, EP= Epidermis, PE= Parénquima en empalizada, HV= Haz vascular, PS= Parénquima esponjoso.

Secciones sin teñir	
<i>Fraxinus uhdei</i>	
Tejido fresco	Tejido fijado

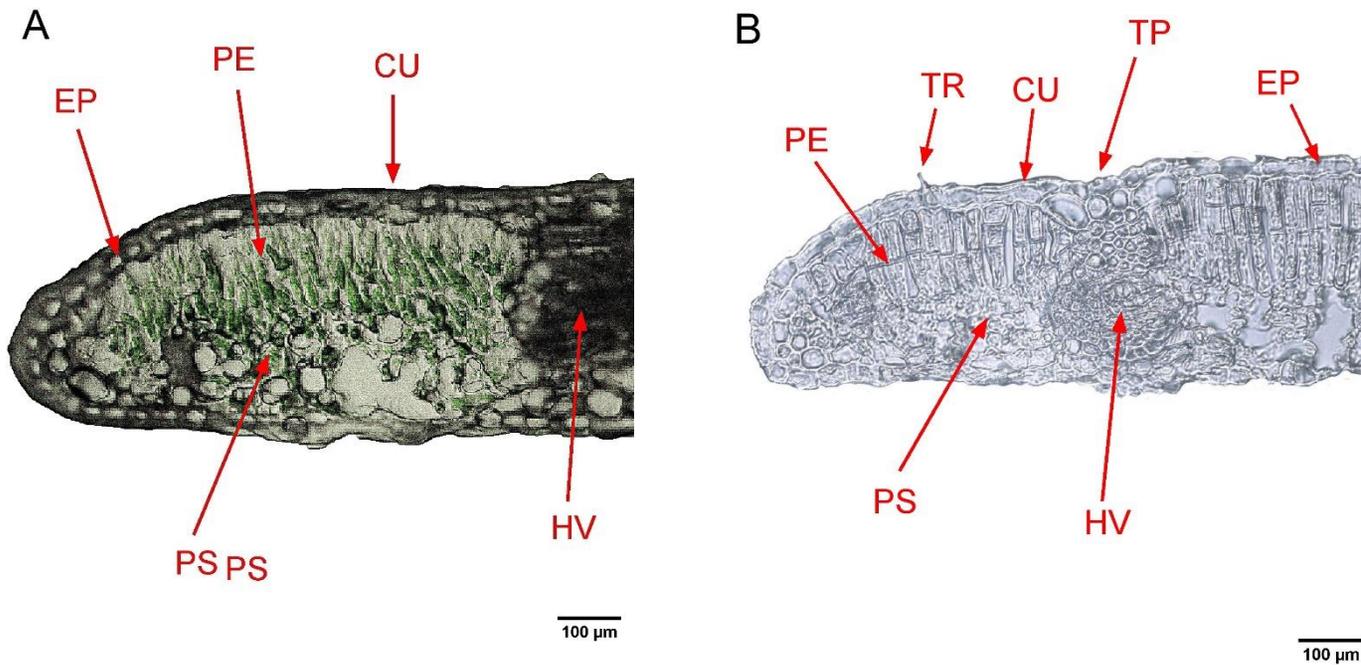


Figura 41. *Fraxinus udehi*. Secciones transversales del margen foliar, A. Muestra fresca, B. Muestra fijada.

CU= Cutícula, TR= Trícoma peltado, EP= Epidermis, PE= Parénquima en empalizada, PS= Parénquima esponjoso, HV= Haz vascular.

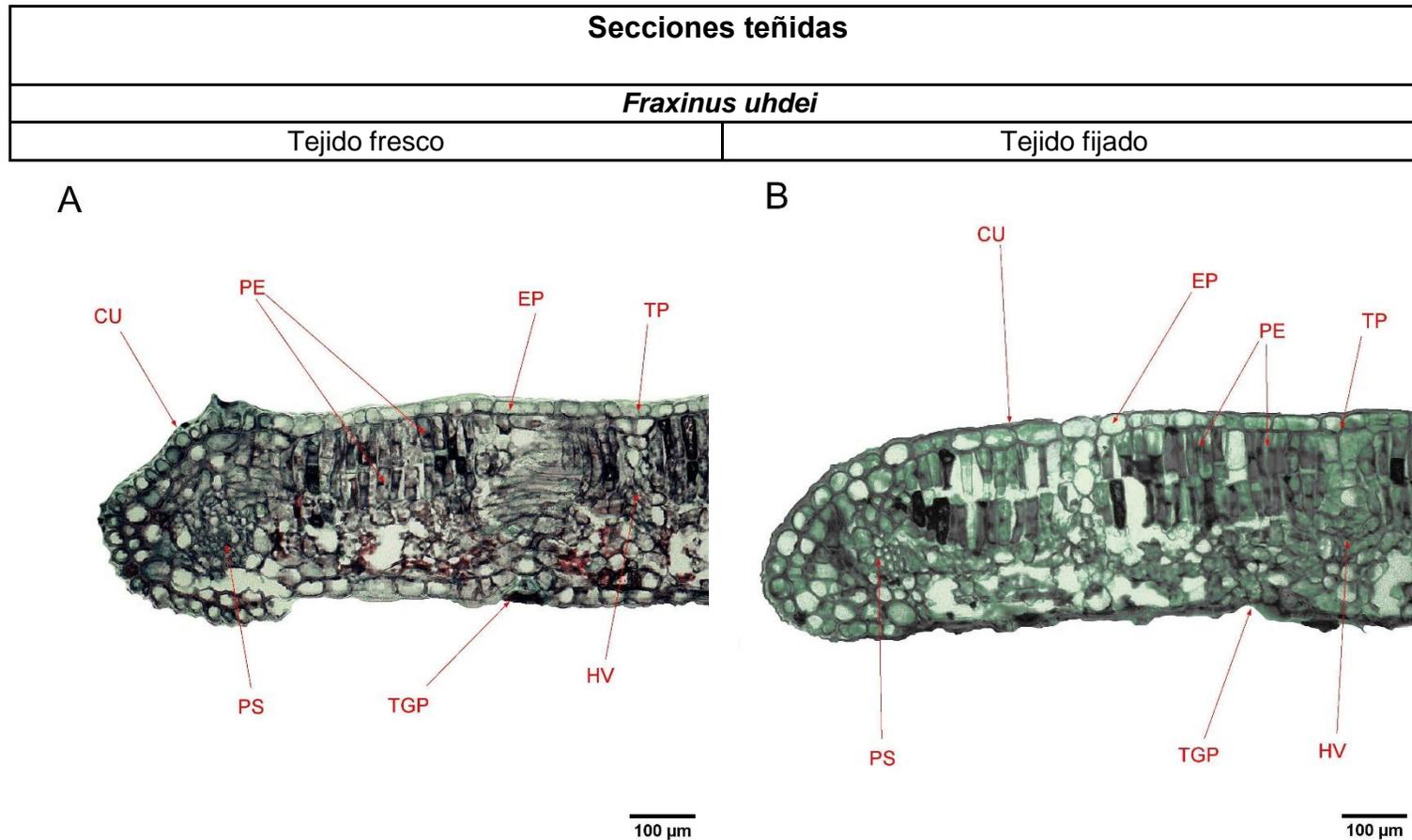


Figura 42. *Fraxinus udehi* Secciones transversales de margen foliar, A. Muestra fresca, B. Muestra fijada.

CU= Cutícula, TR= Tricoma peltado, EP= Epidermis, PE= Parénquima en empalizada, PS= Parénquima esponjoso, HV= Haz vascular.



VIII Discusión

Se ha demostrado que el uso del criostato para seccionar tejidos vegetales los fragmenta por efecto de la congelación (Megías & Pombal, 2017). Tanto las muestras frescas como las fijadas en FAA permitieron seccionar los tejidos de manera satisfactoria. La aplicación de tissue-tek y PEG como medios de soporte correspondientemente, evitaron la fragmentación de las muestras por congelación.

Se ha señalado que, durante la congelación de los tejidos vegetales, el agua intercelular migra hacia la parte extracelular en forma de solida causando deshidratación y colapso celular (Levitt, 1980). Sin embargo, este mismo autor plantea que muchos tejidos con paredes celulares no sufren un colapso durante la congelación hasta una exposición por debajo de -40°C , además, indica que, durante la descongelación del corte, estas células vuelven a su estado inicial. No obstante, Malone y Ashworth (1991) sugieren que puede haber una contracción a nivel del protoplasma, además advierten que al trabajar especies con tejidos con menos fibras podría usarse una cubierta de aceite vegetal antes de la congelación del material. Ristic y Ashworth (1994) observaron que el alto contenido de lignina en las paredes celulares evita el colapso de las células durante la congelación. Por lo tanto, es posible que los espacios intracelulares en el mesófilo de las hojas frescas de *Pinus patula*, no lleguen a colapsar, a pesar de tener paredes delgadas y células más largas.

Enríquez *et al.* (2005) estudiaron embriones de semillas de *Zea mays* L., y registraron que el uso del fijador ParaFormaldehido (PFA) al 4% e infiltrado en sacarosa a 320 mM, además de evitar la fragmentación celular a partir de la fijación de los tejidos, propicia una osmolaridad similar a la del tejido, asegurando la homeostasis celular de los embriones sin provocar ningún cambio estructural o

químico. En este sentido, al utilizar FAA como fijador foliar y PEG como medio de inclusión, en esta investigación se evitó la alteración de las estructuras celulares de los tejidos.

Al trabajar con PEG en materiales fijados, se impidió la formación de cristales durante la congelación del tejido, debido a que la inclusión se hizo de forma gradual dentro del bloque y libre de agua y no alteró las estructuras, ya que actuó únicamente como soporte, rodeando el tejido a seccionar y de esta forma brinda sostén al momento de realizar el corte. Enríquez *et al.* (2005) también evitó la formación de cristales al fijar embriones de *Zea mays* en ParaFormaldehído al 4% por una hora, enseguida adicionaron una solución de sacarosa al 10% por una hora y después otra al 30% por el mismo tiempo para incluir las muestras en tissue-tek (gel OCT).

Brown-Gómez *et al.* (2007) plantearon que el adicionar sacarosa al PEG proporciona mayor rigidez a los bloques; sin embargo, el PEG de peso molecular bajo (600 g/mol) se torna quebradizo, por esta razón estos autores sugieren utilizar PEG de peso molecular elevado (1000 g/mol). Por otra parte, Quintanar-Isaías *et al.* (2009) y Jaramillo *et al.* (2015), al trabajar con muestras fijadas y con el propósito de evitar la formación de cristales y proporcionar soporte a los tejidos, emplearon el siguiente procedimiento, primero infiltraron las muestras en una solución de alcohol-glicerol-agua (AGA) durante una semana.

Enseguida esta solución se removió infiltrando las muestras en una solución de PEG con peso molecular de 4000 g/mol al 5%, manteniéndolas al vacío, durante varios días. Con base en esta investigación, se puede afirmar que el PEG con peso molecular de 4000 g/mol, funciona como un medio eficiente para evitar la formación de cristales, además, actúa como un medio de soporte, en particular para tejidos fibrosos que previamente fueron fijados, como en el caso de los filodios de *Acacia retinodes*. Cabe aclarar que el peso molecular del PEG debe ser mayor a 4000

g/mol, pues si se utiliza un peso molecular menor, los tejidos se separan del medio de soporte y se fraccionan impiden obtener secciones completas.

En el presente estudio se evitó la formación de cristales en las muestras frescas, por medio de un secado previo a su inclusión en gel tissue-tek, el cual resultó conveniente para *Fraxinus udehi* que tiene tejidos poco fibrosos y para los tejidos rígidos como los filodios de *Acacia retinodes*, tallo de *Casuarina equisetifolia* y hojas de *Pinus patula*. No obstante, los filodios de *Acacia retinodes* presentaron cierto nivel de resistencia al corte por la presencia de fibras presentes en la vaina floemática de los haces vasculares de la lámina y de la vena media. Además, en las especies con tejidos rígidos o presencia de más fibras, aun cuando se trabajó con material fresco, el uso de gel tissue-tek como medio de soporte también permitió obtener secciones completas. ya que estas especies tienen cutícula gruesa, epidermis con células de paredes engrosadas y fibras que confieren cierto grado de rigidez a los mismos.

Cabe señalar que en el caso de las muestras de *Casuarina equisetifolia* y *Pinus patula*, la fijación en FAA y su posterior inclusión en tissue-tek, resultaron convenientes para ambos propósitos, primero para evitar la formación de cristales y segundo para obtener bloques consistentes que permitieran obtener secciones completas.

El control de la temperatura en la cámara criostática fue determinante al momento la conformación de los bloques, la orientación de los tejidos, y el corte de los mismos. Enríquez *et al.* (2005) comprobaron que mantener el criostato durante 24 h., previas al corte a una temperatura de -4°C y al momento de realizar los cortes disminuyeron la temperatura de la cámara criostática a -10°C , esto permitió facilitar la realización de los bloques y el corte de los tejidos. Si bien, estas condiciones fueron favorables para estos autores, en el presente estudio, no se requirió mantener la cámara criostática a una temperatura de -4°C durante 24 h. Sin embargo, se observó que la temperatura de la cámara debía ser ajustada en función

de la temperatura ambiental, de este modo, durante los meses cálidos, se ajustó a -10°C durante 2 h., previas al corte de las muestras, y en los meses fríos a 0°C durante 2 h.

Yazaki *et al.* (2019) seccionaron muestras de tallos de *Cryptomeria japonica* D. Don y *Carpinus tschonoskii* Maxim., sin usar sacarosa, antes de incluirlos en tissue-tek y mencionaron que fue importante mantener una temperatura de -30°C en la cámara criostática, que permitió una congelación eficaz de los tejidos caulinares sin la formación de cristales, para obtener secciones completas. No obstante, Enríquez *et al.* (2005) quienes trabajaron con embriones de maíz, tratando los tejidos caulinares con una solución de sacarosa, no requirieron ajustar la temperatura antes de realizar los cortes.

En esta investigación independientemente de la especie y la naturaleza de sus tejidos, todas las secciones se realizaron a $12\ \mu\text{m}$ de grosor. Sin embargo, fue necesario ajustar la temperatura de la cámara criostática dependiendo si los tejidos estaban frescos o fijados y del material de soporte utilizado. Los tejidos frescos de las cuatro especies se incluyeron en gel tissue-tek y fue necesario ajustar la temperatura de la cámara criostática a -15°C al momento de realizar los cortes. En el caso de los tejidos fijados fue conveniente incluirlos en PEG de peso molecular $4000\ \text{g/mol}$, y ajustar la temperatura a -20°C . Este es el primer registro donde se ajusta la temperatura de la cámara criostática con base en el tipo de tejido, fresco o fijado y el material utilizado como soporte, en este caso tissue-tek o PEG.

Con respecto al medio de adhesión de las secciones al portaobjetos, podemos mencionar que son importantes porque permiten mantener las secciones sujetas al portaobjetos para continuar con su posterior tinción; sin embargo, se ha visto que los medios utilizados para dicho fin son diferentes. Por ejemplo, Enríquez *et al.* (2005) utilizaron grenetina sobre el portaobjeto secado a temperatura ambiente como medio de adhesión. En el presente estudio se utilizó el adhesivo de Haupt el cual además de grenetina, contiene glicerol y cristales de fenol en un medio acuoso

(Anexo 1). Este adhesivo resultó ser eficiente para todo tipo de tejidos independientemente de si estos estaban frescos o fijados, de consistencia suave o rígida y del medio de soporte utilizado. Un aspecto relevante a considerar es el hecho de que, en el momento de rescatar las secciones cortadas, al transferirlas de la cámara criostática ajustada a temperaturas bajas (-15°C a -20°C) al portaobjetos fuera de la cámara donde la temperatura es de -22°C , los tejidos contenidos en estas secciones suelen contraerse, por lo tanto, el uso de este adhesivo permitió que estos tejidos se mantuvieran extendidos de forma inmediata ya que la adhesión de estos al portaobjetos fue rápida. Además, este adhesivo aseguró la adhesión de las secciones, facilitó la eliminación de los medios de inclusión utilizados (PEG o tissue-tek) y permitió una completa tinción.

En la literatura existe poca información que establezca las diferencias entre tejidos frescos y fijados, teñidos y sin teñir, la mayoría los describen como en el último caso (Enríquez *et al.* 2005, Lhotáková *et al.* 2008, Quintanar *et al.* 2009, Yazaki *et al.* 2019) o se enfocan a estudios histoquímicos (Enríquez *et al.* 2005, Quintanar *et al.* 2009). Los únicos autores que realizaron una tinción en material fijado, con el propósito de contrastar los tejidos de muestras foliares de *Alvaradoa amorphoides* fueron Jaramillo *et al.* (2015). Estos autores aplicaron una técnica dicrómica a partir de safranina-azul alcian y azul de toluidina y observaron que las células y los tejidos contrastaban. Sin embargo, no mencionan aspectos relacionados con el tiempo de aplicación de cada uno de los colorantes, su capacidad de retención y la deshidratación posterior a su aplicación.

En el presente estudio al trabajar con materiales frescos hay una inadecuada retención de safranina, esta se separa de las células con forme se mantiene en estufa a 60°C durante 24 horas. posterior al montaje en resina, por lo que se sugiere disminuir la temperatura en la estufa para las muestras frescas durante este tiempo mientras que, en los tejidos fijados se esta es más eficiente; no obstante, en ambas condiciones la safranina permaneció durante 24h. En relación con la posterior deshidratación de los tejidos frescos, solo se requirieron concentraciones de etanol

al 30%, 70% y 95%, pero para los tejidos fijados fue necesario utilizar una deshidratación gradual a través con alcohol etílico al 30%, 50%, 70%, 95% y hasta el 100%. Por otro lado, en relación con el tiempo de tinción del verde rápido, también se observaron diferencias, en tejidos frescos fue suficiente con 12" y para tejidos fijados de 15". Otra diferencia se registró durante los lavados posteriores a la tinción. para los tejidos frescos se realizó un solo lavado con alcohol absoluto, mientras que, para los fijados se realizaron dos lavados.

Con respecto a la consistencia de los tejidos, también se observaron diferencias en cuanto a la tinción. En los tejidos rígidos la safranina tuvo una mayor retención, y permaneció más tiempo que en los tejidos suaves, aun cuando para ambos casos se aplicaron los mismos tiempos y la deshidratación fue similar. En relación con el tiempo de tinción del verde rápido, los tejidos suaves requirieron de menor tiempo (15" o menos), a su vez los rígidos demandaron de mayor tiempo (18" a 20") por las condiciones que presentan en grosor las paredes celulares de colénquima y esclerénquima. Aspectos como la relación de la tinción con la condición y consistencia de los materiales no han sido mencionados en estudios previos.

El criostato disminuye los tiempos y el costo durante el procesamiento de los tejidos vegetativos (hojas y tallos) o, independientemente de su condición (frescos o fijados), en comparación con el uso del micrótopo de rotación y el xilotómo, entre otros. Aunado a esto, se evita el uso de reactivos como; alcoholes, parafinas o paraplast, indispensables para deshidratar y proporcionar soporte interno y externo a los tejidos antes del corte. Por lo tanto, el uso del criostato para la obtención de secciones en tejidos vegetativos es más conveniente.

Sugerencias para la obtención de secciones de material vegetativo de las especies estudiadas

Pinus patula. Acículas.

Se recomienda que para material fresco se haga un ajuste de temperatura en la cámara criostática de -14°C . En el momento de realizar el corte, hacer que el movimiento en la manivela sea de forma rápida, así mismo adherir las muestras seccionadas al portaobjetos cada tres cortes. Para muestras fijadas la temperatura será de -16°C , los movimientos de la manivela deben ser lentos y uniformes. Al igual que para las muestras frescas, se sugiere adherirlas cada tres repeticiones.

Casuarina equisetifolia. Tallo modificado

En los tejidos frescos se sugiere un ajuste de temperatura de -14°C para obtener secciones completas, mientras que, para tejidos fijados la temperatura fue ajustada a -16°C .

Acacia retinodes. Filodio

A diferencia de los otros materiales, los filodios de esta especie fueron considerados como “tejido rígido”, por lo que, cuando el tejido es fresco se recomienda una temperatura de -18°C mientras que para los tejidos fijados el ajuste de temperatura será de -19°C . Así mismo, para ambos casos el movimiento de manivela al momento de corte debe ser de forma lenta y uniforme. Por otro lado, en relación a la tinción se sugiere que el tiempo del lavado con agua del exceso de safranina, debe ser mínimo (reducido a uno o dos minutos), mientras que la tinción con verde rápido debe ser prolongada a 1 min. o más.

Fraxinus uhdei. Hoja

Al seccionar tejidos frescos se sugiere realizar un ajuste de temperatura a -16°C , mientras que en tejidos fijados a una temperatura de -22°C . Al igual que para otras especies también se recomienda realizar movimientos lentos y uniformes de la manivela al momento de corte, ya que la hoja de esta especie posee la cutícula más gruesa en relación a las especies estudiadas. Para la tinción se recomienda alargar los tiempos con safranina (de 24 a 48h) o reducir al máximo el tiempo de lavado de este colorante, indistintamente si el tejido es fresco o fijado.

IX Conclusiones

Se logró establecer un protocolo conveniente para seccionar tejidos vegetales frescos o fijados y con diferentes texturas a partir del uso del criostato.

El gel tissue-tek es el medio de soporte más conveniente cuando los tejidos son frescos y el Polietilenglicol (PEG) de peso molecular de 4000 g/mol para los tejidos fijados.

Existe una relación entre la textura de los materiales (suave o rígida) y el ajuste de temperatura de la cámara criostática previo al corte, así como el grosor de las secciones.

Existe relación entre los materiales frescos y fijados, el tiempo de tinción y el lavado.

La deshidratación previa a la tinción en verde rápido en tejidos frescos, sólo se realizó en etanol al 30%, 70% y 95%, con el objetivo de disminuir la pérdida de

safranina. El tiempo de tinción con verde rápido varía en función de la especie, desde 12" hasta 15" segundos.



El uso del adhesivo Haupt es recomendable para fijar los cortes al portaobjetos, cuando se utiliza el criostato, además, disuelve el medio de soporte en el que fue incluido el tejido.

X Literatura citada

- Aedo, C. 1. (1993). *Flora Iberica* . Madrid, España.
- Ashworth, E. N., & Ristic, Z. (1994). Response of Xylem Ray Parenchyma Cells of Red Osier Dogwood (*Cornus sericea* L.) to Freezing Stress: Microscopic Evidence of Protoplasm Contraction. *Plant Physiology*, 737-746.
- Azcárraga Ma. R. R., M. P. (2010). *Atlas de Anatomía Vegetal. FES- Cuautitlán, UNAM.* . Ciudad de México: Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán.
- Barrios Pimienta Eulogio, A. M. (2006). *Desarrollo Vegetal*. Guadalajara, Jalisco. México: Universidad de Guadalajara.
- Carlosama R. Yeison, R. G. (2014). Bipopsia por congelación: recomendaciones en la páctica clínica y dermatológica. *Revista Colombiana de Cancerología*, 88-91.
- Dawes, C. J. (1971). *Biological techniques in electron microscopy* . Nueva York: Barnes y Noble.
- Enríquez Arredondo, C., & Sobeida Sánchez Nieto, E. R. (2005). The plasma membrane H⁺-ATPase of maize embryos localizes in regions that are critical during the onset of germination. *Plant science*, 11-19.
- Esau, K. R. (1976). *Anatomía Vegetal. Meristemas, células y tejidos de las plantas:su estructura, función y desarrollo*. Barcelona, España: Omega.
- Espinosa-Garduño, J. (2010). *Gymnospermae. In Flora fanerogámica del Valle de México*. Pátzcuaro, Michoacan: Instituto de Ecología.
- Gonzalez Ana Maria, M. M. (1998). *Hipertextos del área de Biología* . Obtenido de Morfología de Plantas Vasculares, tema 21: Anatomía Foliar: <http://www.biologia.edu.ar/botanica/print/Tema21.pdf>
- Guzmán, C. G. (2013). Contribuciones de Wilhelm His a la Embriología Humana. *International Journal of Morphology*, 70-74. Obtenido de <https://dx.doi.org/10.4067/S0717-95022013000100010>
- Herrera, F. T. (2005). Anathomy of the pod of three species of the genus *Phaseolus*. *Agrociencia*, 595-602.
- Jaramillo Pérez, A. T., Quintanar Isaías, A., Fraile Ortega, M. E., Martínez Bernal, A., & Sepúlveda Sánchez, J. D. (2015). Morfoanatomía Foliar de *Alvaradoa Amorphoides* Liebm. *Polibotánica*, 79-98.



- Johansen, D. A. (1940.). *Plant microtechnique*. Londres, Inglaterra: Mc Graw Hill.
- Kiernan, J. A. (1990). *Histological and Histochemical Methods*. Ontario, Canada: Scion Publishing Ltd.
- Lacave Martín, I. / . (2012). *Atlas De Inmunohistoquímica. Caracterización De Celulas Tejidos Y Organos Normales*. Ediciones Diaz De Santos.
- Läuchli, A. (1966). Cryostat Technique for fresh plant tissues and its application in enzyme histochemistry. *Botanical Institute of the University of Basle*, 13-25.
- Levitt., J. (1980). *Responses of Plant to Environmental Stress: Water, Radiation, Salt and Other Stresses*. Nueva York: Academic Press.
- Lodish, H., & Arnold Berk, P. M. (2006). *Biología celular y molecular 5a edición*. Argentina: Médica Panamericana.
- Malone, S., & Ashworth, E. (1990). Freezing Stress Response in Woody Tissues Observed Using Low-Temperature Scanning Electron Microscopy and Freeze Substitution Techniques. *Plant Physiology*, 871-881.
- Martinez Eliana, A. B. (2015). *Implementación de la técnica inmunohistoquímica para identificar la expresión de la p53 en muestras de endometrio de pacientes que acuden al laboratorio de anatomía patológica del centro médico dg diagnostica de la ciudad de Iatacunga durante el periodo m*. Chimborazo, Ecuador: Riobamba: Universidad Nacional de Chimborazo, 2015.
- Megías Pacheco, M., Molist García, P., & Pombal Diego, M. Á. (09 de Septiembre de 2017). *Atlas de histología vegetal y animal*. Obtenido de Atlas de histología vegetal y animal: <https://mmegias.webs.uvigo.es/inicio.html>
- Osborn, M. &. (2006). *Immunocytochemistry of Frozen and of Paraffin Tissue Sections* . Amsterdam: Cell biology: A laboratory handbook.
- Pascual, F. A. (2007). *Proyecciones centrales de los nervios laríngeos en un modelo experimental de degeneración-regeneración de rata adulta*. Madrid, España: Universidad Complutense de Madrid.
- Quintanar-Isaías, A., & G. Ángeles, y. J. (2009). Anatomía, índices físicos e hidráulicos de la madera de *Gliricidia sepium* (Jacq.) Steud. *Madera y bosques vol.15 no.2* , 71-91.
- Raven, P. H. (2005). *Biology of Plants, 7th edition*. Nueva York, USA.: Freeman and Co.
- Rivas Eloy, C. G. (2011). *PNT Obtención y Procesamiento de Muestras de Tejidos Neurológicos para un Biobanco*. Madrid, España: Red Biobancos.
- Rodés García, R., & Collazo Ortega, M. (2006). *Manual de Practicas de Fotosíntesis 1ra edición*. México: Prensas de Ciencias.



- Rzedowski Calderón Graciela, R. J. (2010). *Flora Fanerógama del Valle de México*. Pátzcuaro, Mich.: Instituto de Ecología.
- Sandoval Zapotitla, E., Leal, A. R., Carmona Jiménez, L., Ponce Salazar, R. M., León Gómez, C., Loyola Blanco, C., . . . Medina Ávila, A. (2005). *Técnicas Aplicadas al Estudio de la Anatomía Vegetal*. Ciudad de México: Instituto de Biología, UNAM.
- Silva H., A. E. (2001). *Anatomía del tejido fotosintético de diez taxa de Opuntia establecidos en el secano árido mediterráneo de Chile*. Santiago, Chile: Universidad de Chile.
- Vashendriya V.V.Hiraa, A. L. (2019). Comparison of different methodologies and cryostat versus paraffin sections for chromogenic immunohistochemistry. *Acta Histochemica*, 125-134.
- Verdín Terán, S. L., Moreno Fierros, L., Rojo Botello, N. R., García Hernández, A. L., Omaña Molina, M., Meneses Aguirre, A., & Nieto Yáñez, O. d. (2013). *Histología e Inmunohistoquímica, Manual de Métodos*. Ciudad de México, México: FES Iztacala, UNAM.
- Yazaki, K., Ogasa, M., Kuroda, K., Utsumi, Y., Kitin, P., & Sano, y. (2019). Xylem Water Distribution in Woody Plants Visualized with a Cryo-scanning. *Journal of Visualized Experiments*, 1-11.
- Z. Lhotáková, J. .. (2008). Advantages and pitfalls of using free-hand sections of frozen needles for three-dimensional analysis of mesophyll by stereology and confocal microscopy. *Journal of Microscopy*, Vol. 232, Pt 1, 56-63.

XI ANEXO 1. Preparación de reactivos

Preparación de reactivos

Fijadores

FAA

Etanol (96%)	50%.
Ácido acético glacial	5%.
Formaldehido (37-40%)	10%.
Agua	35%.

GAA porciones 1:1:1

Glicerina
Alcohol Absoluto
Agua destilada

Adhesivos

Adhesivo Haupt

Gelatina 1g.
Fenol en cristales 2g.
Glicerol 15 ml.
Agua destilada 100 ml.

Procedimiento:

Se disuelve la gelatina en agua destilada a una temperatura de entre 30-35°C. Una vez disuelta, se añadirán el resto de ingredientes para posteriormente ser untada una

pequeña capa en los portaobjetos, que se dejará secar.

Glicerogelatina

Gelatina 7g.
Agua destilada 42 ml.
Glicerina 50 ml.
Fenol 1g.

Procedimiento:

Se disuelve la gelatina en agua destilada a una temperatura de entre 30-35°C. Asimismo 1g. de cristal fenol. Una vez disuelta, se añadirá glicerina

Tinción

Safranina

Safranina (C.I. 75100) 1g
Metilcelosolve 50 ml
Etanol 96° 25 ml
Agua destilada 25 ml
Acetato de sodio 1g
Formaldehido al 37% 2ml.

Disolver la safranina en el metilcelosolve y agregar los reactivos en el orden marcado. Mezclar y filtrar la solución.



Verde Rápido FCF

Solución A

Verde rápido (C.I. 42053) 4g

Alcohol etílico absoluto 75ml.

Metilcelosolve 25ml.



Solución B

Alcohol etílico absoluto 25ml.

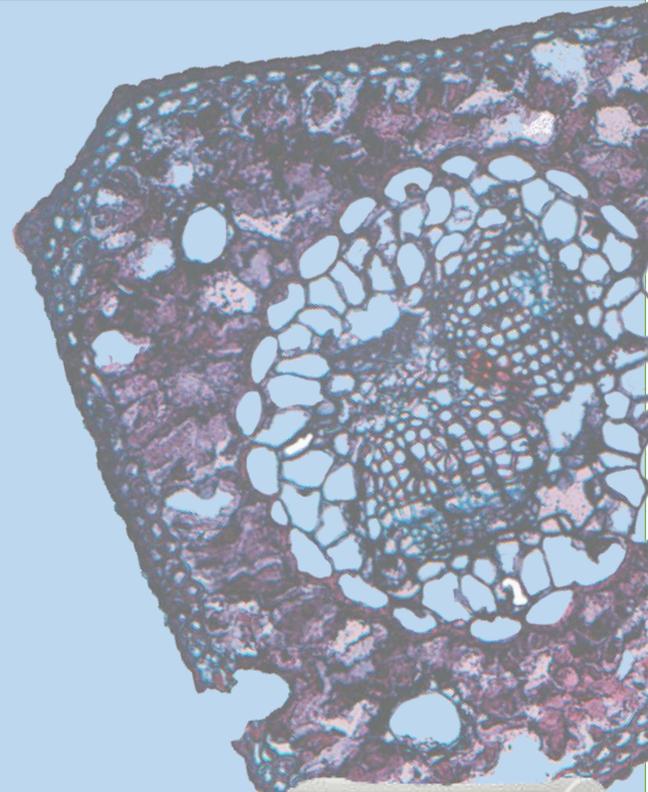
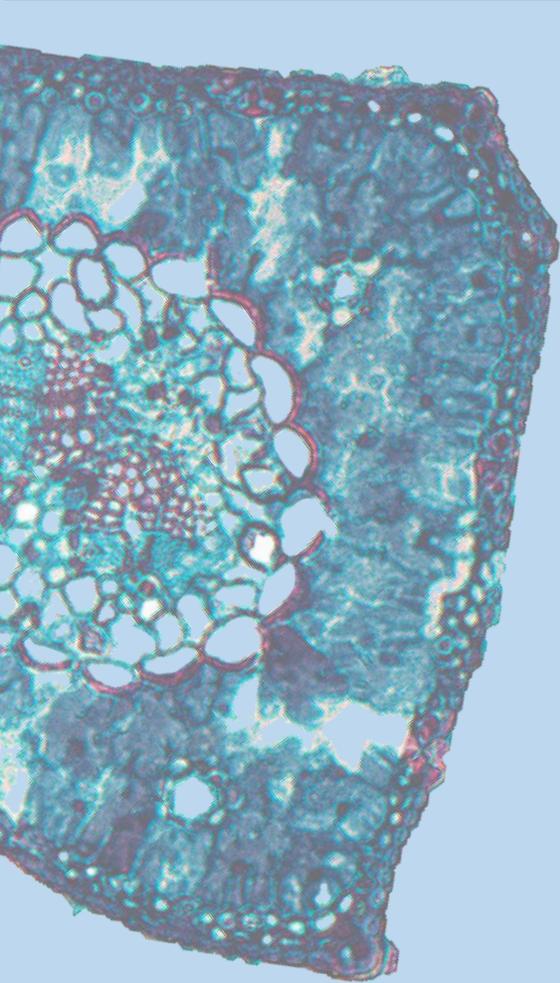
Aceite de clavo 75ml.

Mezclar ambas soluciones y posteriormente filtrar la solución final.



XII ANEXO 2 Protocolo para obtener secciones vegetales en criostato

Protocolo para el uso de Criostato en el procesamiento de estructuras aéreas, de especies arbóreas.



En tejidos fijados y no fijados
Septiembre, 2018.

Subdivisión de material foliar y fijación

- Los tejidos son subdivididos por secciones, se sugiere que el tamaño de estos sea de 1 cm².



Figura 1. seccionado de la muestra

- Posteriormente son fijados durante 24h. en fijador FAA y lavados en chorro de agua al término de este periodo para retirar el fijador. Al finalizar se suspenden en alcohol al 70%.

Fijador FAA

Etanol (96%)	50%.
Ácido acético glacial	5%.
Formaldehido (37-40%)	10%

Montaje de muestras en PEG

- El material no fijado, se conserva en bolsas resellables a una temperatura de 4°C.
- Los tejidos son subdivididos por secciones, se sugiere que el tamaño de estos sea de 1 cm².
- Se embeben las muestras en PEG al 10% en agua durante 24h. a temperatura ambiente y al término son colocadas en PEG al 100% dentro de un horno a 50°C durante 24h.
- Se vierte PEG al 100% limpio dentro de un molde plástico, se orienta la muestra con ayuda de unas pinzas de disección y con ayuda de la herramienta congelamiento rápido o también llamada “unidad de Peltier” esto congelara la parte externa del bloque al término de 1 minuto.
- Se retira la muestra de la cámara refrigerante para dejar que se solidifique el bloque a temperatura ambiente.

- Una vez endurecido, se retira el bloque del molde plástico y se talla a modo de dejar un bloque cubico que será montado en el micrótopo del criostato.



Figura 2. montaje en bloques de PEG

- Se colocan unas gotas de gel Tissue-Tek en la platina porta muestras y sobre de esta, el bloque con la muestra.

Montaje de muestras en GEL Tissue-Tek

- Se comienza colocando unas gotas de dicho gel en el centro de la platina portamuestras y se ingresa en la cámara refrigerante, se enciende la unidad de Peltier, en la cual se inserta la platina y se orienta la muestra hasta que el gel solidifique y sujete la muestra.
- Se continúan agregando gotas de gel sobre la muestra hasta que esta quede completamente inmersa, para finalizar congelando dentro de la cámara criostática.



Figura 3. montaje en gel tissue-tek

- Se coloca en la unidad Peltier alrededor de 2 min. Posterior a esto, puede ser procesada.

Partes internas en la cámara criostática

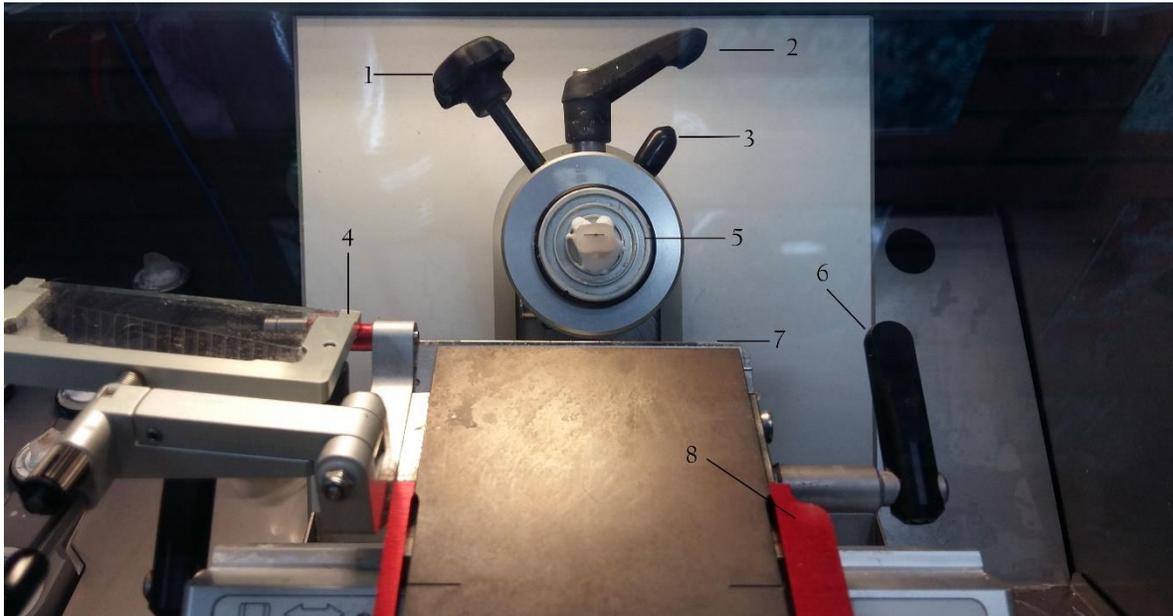


Figura 4. montaje en gel tissue-tek

9. Tornillo de apriete a cabezal portamuestras
10. Palanca de sujeción del cabezal portamuestras
11. Palanca de articulación esférica
12. Placa antiroll
13. Platina portamuestras
14. Palanca de sujeción de la cuchilla
15. Cuchilla desechable
16. Cubre cuchillas

Selección de temperatura de corte óptima

Esta es seleccionada en función al tipo de tejido;

Temperatura adecuada con Montaje en GEL tissue-tek (para tejidos sin fijar)

- Cuando el tipo de tejido es más homogéneo, como ejemplo (monocotiledoneas) el corte puede realizarse sin problemas a partir de los -17°C
- Cuando esta se encuentra en cierto estado de rigidez o heterogeneidad entre sus tejidos. Como una cutícula gruesa, presencia de fibras.

Estos requieren de una menor temperatura para proporcionar un corte uniforme. Esta temperatura se puede encontrar debajo de los -27°C . (-27°C a -35°C)

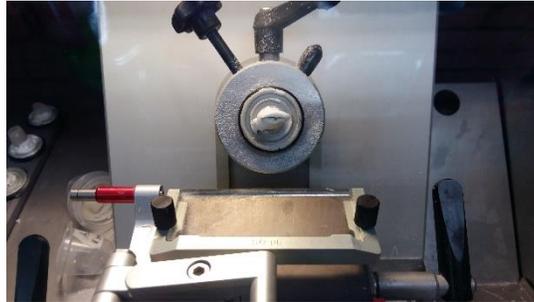


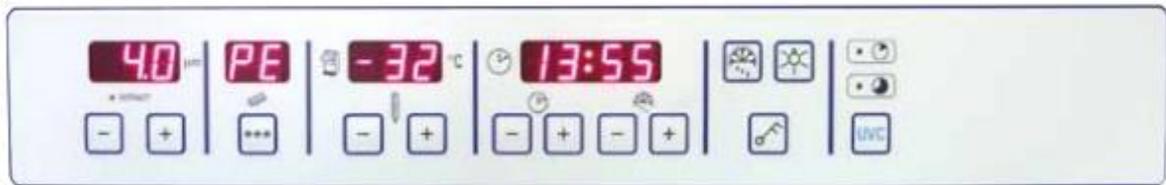
Figura 5. montaje con gel tissue-tek

Temperatura adecuada con Montaje en Polietilenglicol (PEG) (para tejidos fijados)

- Los tejidos montados en PEG obtienen un mayor soporte al realizar el corte y requieren de una temperatura inicial de -27 grados, debido a que el gel Tissue-Tek sirve de sujeción del bloque con PEG, al porta muestras colocada en el micrótopo.
- De igual forma los tejidos siguen las mismas características descritas arriba, al ser más heterogéneo o mostrar mayor rigidez al corte por parte del tejido, este requiere de una menor temperatura.
- Cabe destacar, que los tejidos solo son envueltos en PEG brindando soporte, mas no llegando a infiltrarse en los tejidos, sin embargo, se sugiere que estos hayan sido fijados previamente.



Figura 6. montaje con PEG



Selección de temperatura en tablero

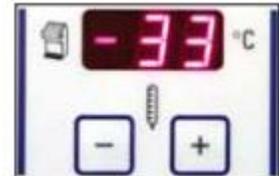
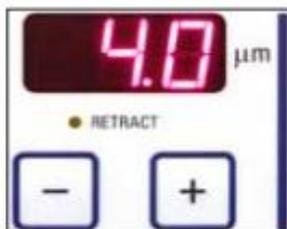


Figura 7. Tablero de programación.

Selección de espesor en secciones y montaje de muestras

- La selección en el espesor del corte dependerá del tipo de estudio a realizar, el criostato Leica CMI860 ofrece un espesor de (1 μm – 100 μm).
- Se recomienda que;
 - Se realice un desbaste al principio con 20 μm hasta llegar al punto requerido
 - Al cambiar de espesor, se deben descartar los primeros 5 cortes para tener la certeza de que se están cortando en el espesor deseado, y no habrá rupturas en el corte.



En el panel digital se mostrará el tipo de espesor seleccionado, ajustando con las teclas $\boxed{-}$ o $\boxed{+}$.

Figura 8. selección de micras

Movimiento en cabezal portamuestras del micrótomos tipo Minut.

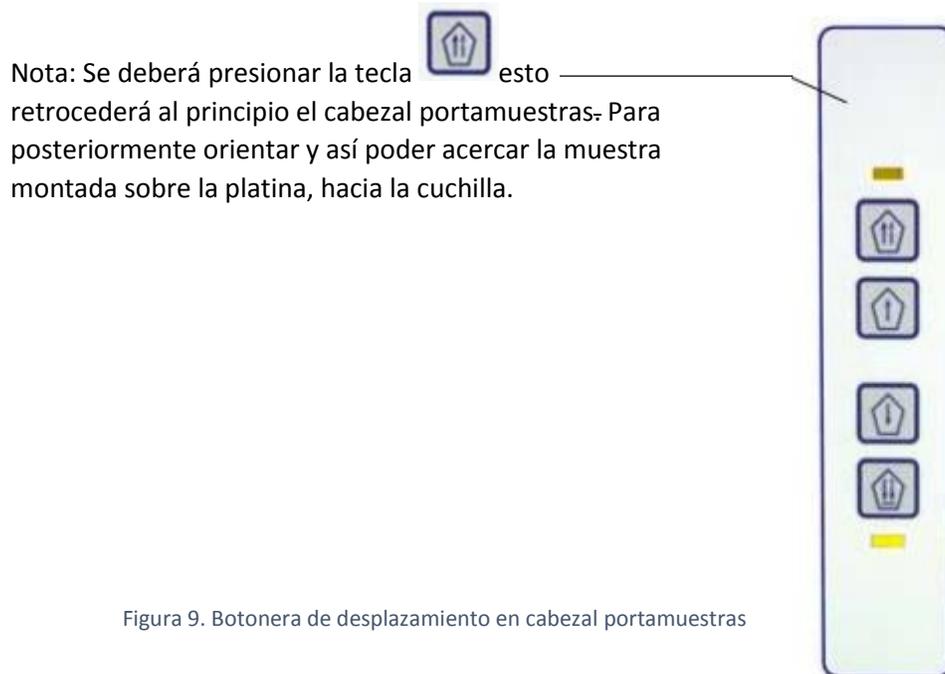


Figura 9. Botonera de desplazamiento en cabezal portamuestras

Movimiento de la manivela

Bloqueo de manivela y orientación de muestras en microtomo



- La posición de bloqueo del volante se encuentra a las doce y seis, esto es de utilidad al momento de montar la platina en el microtomo. De esta forma es posible orientar la muestra en el cabezal (no.5), mediante la palanca de articulación (no. 3). Finalmente se sujeta firmemente por medio de la palanca que sujeta el cabezal (no. 2). **Por seguridad:** El cubrecuchillas debe ser colocado siempre que sea modificada la orientación de la muestra.

Figura 10. Bloqueo del cabezal mediante manivela

Procesamiento

- Al haber devastado hasta la zona del tejido, la cual se desea seccionar, se coloca la placa antiroll, esta debe mantenerse en margen paralelo a la cuchilla, para que la muestra pase entre ambas.
- El giro de la manivela se realiza lentamente, pero uniforme para no realizar un desgarre en este.
- La obtención de cortes se limita a unos cuantos, ya que no pueden obtenerse listones, debido a que en medida que se van obteniendo secciones, estas son aplastadas por las siguientes.

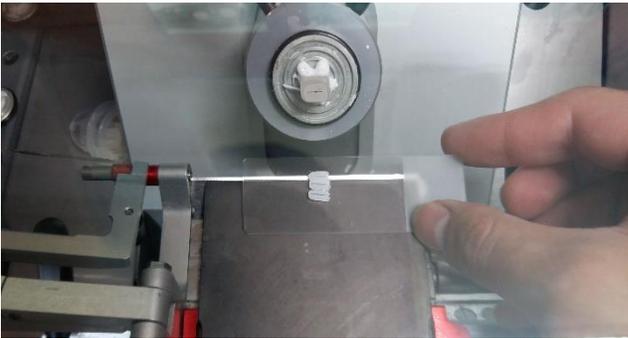


Figura 11. Adherencia de secciones al porta objetos.

- Al obtener las secciones, estas son adheridas al portaobjetos por diferencia de temperaturas.
- Puede agregarse adhesivo Haupt para evitar que la muestra se pierda, además de retmover restos de PEG o Gel Tissue-tek adheridos en el porta objetos.

- Puede ser útil el uso de una aguja o pincel para recuperar las secciones o asimismo orientarlas en el portaobjetos.
- Se debe evitar el abrir muchas veces la ventana en la cámara criostática. Ya que esto aumenta la temperatura dentro de la cámara y puede dificultar la obtención de secciones o que la muestra pierda soporte.

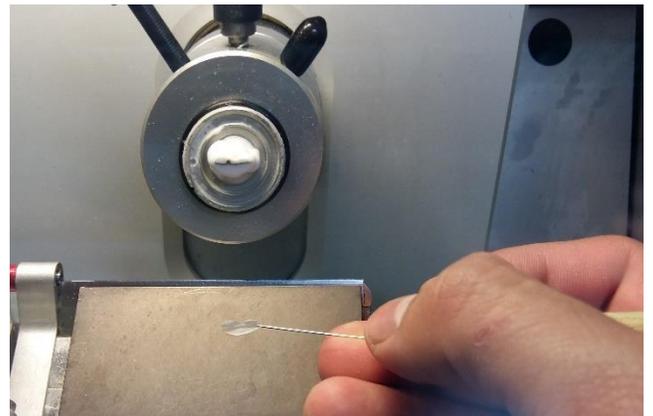


Figura 12. Toma de secciones en gel tissue tek.

