



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

**ESPECIALIZACIÓN EN MICROSCOPIA ELECTRÓNICA EN CIENCIAS
BIOLÓGICAS
DESARROLLO METODOLÓGICO DE LA PREPARACIÓN DE MUESTRAS
PARA LA OBSERVACIÓN ULTRAESTRUCTURAL DE LA MIELINA EN STEM Y
APROXIMACIÓN PARA LA TÉCNICA DE FIB-SEM**

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

**QUE PARA OBTENER POR EL TÍTULO DE:
ESPECIALISTA EN MICROSCOPIA ELECTRÓNICA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

P R E S E N T A

DRA. MHAR YOVAVYN PAMELA PENÉLOPE ÁLVAREZ GONZÁLEZ

TUTORA

DRA. MARTHA MARÍA DE LA SALUD LEÓN OLEA
Instituto Nacional de Psiquiatría "Ramón de la Fuente Muñiz", UNAM

Ciudad Universitaria, Cd. de México, 2023



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISIÓN ACADÉMICO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

OFICIO FCIE/DAIP/364/23

ASUNTO: Asignación de sinodales.

M. EN C. IVONNE RAMÍREZ WENCE
DIRECTORA DE CERTIFICACIÓN Y CONTROL DOCUMENTAL
DIRECCIÓN GENERAL DE LA ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
P R E S E N T E.

Por este conducto comunico a usted que la alumna **MHAR YOVAVYN PAMELA PENÉLOPE ÁLVAREZ GONZÁLEZ**, quien cumplió con los requisitos académicos señalados en el plan de estudios por la modalidad de tesina, se le ha asignado jurado para obtener el Diploma de **ESPECIALISTA EN MICROSCOPIA ELECTRÓNICA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**:

CARGO	GRADO	NOMBRE COMPLETO
PRESIDENTE	DRA.	MARTHA MARÍA DE LA SALUD LEÓN OLEA
VOCAL	DR.	LUIS FELIPE JIMÉNEZ GARCÍA
SECRETARIO	DRA.	EDITH FLORELY DEL TORO RANGEL

Comunico a usted lo anterior, para los fines a que haya lugar.

A T E N T A M E N T E
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"
Ciudad Universitaria Cd. Mx., 19 junio de 2023
JEFE DE LA DIVISIÓN ACADÉMICA DE
INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

DR. ADOLFO ANDRADE CETTO

AAC/GEMF/ipp

El presente trabajo se llevó a cabo en el Departamento de Neuromorfología Funcional de la Dirección de Investigaciones en Neurociencias del Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz (INPRFM), bajo la dirección de la Dra. Martha León Olea. El proyecto fue evaluado por el comité de ética de la Institución y aprobado (NC.143290.0.)

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), por la oportunidad que permitió mi desarrollo profesional y académico a través de la Especialidad en Microscopía Electrónica en Ciencias Biológicas.

A la Especialidad en Microscopía Electrónica y Facultad de Ciencias por haberme brindado la oportunidad de engrandecer mi conocimiento en el campo de la Microscopía Electrónica

Al INPRFM por el tiempo dado para realizar la Especialidad, por sus instalaciones, infraestructura y los instrumentos para realizar este proyecto.

Al Dr. Francisco Pellicer por el tiempo para realizar la Especialidad.

A la Dra. Martha León por el tiempo para realizar la Especialidad y su paciencia.

A mi papá, por su inagotable apoyo y amor.
A mi mamá, tu recuerdo siempre me acompaña y nunca te
olvido.

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS	III
ABREVIATURAS	V
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 El sistema nervioso	1
1.1.1 Las fibras nerviosas periféricas	1
1.1.2 La mielina	2
1.2 Microscopía electrónica de transmisión	6
1.2.1 Estudio de la mielina por TEM	7
1.3 Microscopía electrónica de barrido	11
1.3.1 Estudio de la mielina por SEM	11
1.3.2 Microscopía electrónica de transmisión-barrido	13
1.4 Microscopía electrónica con FIB-SEM	13
1.4.1 Estudio de la mielina por FIB-SEM	16
2. RAZONAMIENTO CIENTÍFICO	19
2.1 Planteamiento del problema	19
2.2 Objetivos	20
2.2.1 Objetivo general	20
2.2.2 Objetivos específicos	20
3. MATERIAL Y MÉTODOS	21
3.1 Animales de experimentación	21

3.2 Protocolo base para la preparación de muestras	21
3.3 Microscopios utilizados para este proyecto	23
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	25
4.1 Primer procesamiento de muestras	25
4.2 Segundo procesamiento de muestras	31
4.3 Tercer procesamiento de muestras	34
4.4 Protocolo final para la preparación de muestras	43
4.5 Protocolo de trabajo para la técnica FIB-SEM	45
4.5.1 Descripción del protocolo	46
5. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	54
6. REFERENCIAS	56

LISTA DE FIGURAS

1. Capas del nervio periférico	2
2. Tipos de fibras nerviosas	3
3. Representación esquemática de la mielina compacta	5
4. Vista longitudinal de la ultraestructura de las fibras nerviosas periféricas	7
5. Vista transversal de la ultraestructura de las fibras nerviosas periféricas	8
6. Ultraestructura de la mielina	9
7. Ultraestructura de un nodo de Ranvier	10
8. Ultraestructura del perineuro	10
9. Fibras mielinizadas con SEM	12
10. Capas del nervio periférico con SEM	12
11. Flujo de trabajo del FIB-SEM	15
12. Reconstrucción 3D de nervio óptico por FIB-SEM	17
13. Reconstrucción 3D de una parte del volumen obtenido con FIB-SEM	17
14. Reconstrucción 3D y segmentación del volumen obtenido con FIB-SEM	18
15. Microscopio electrónico Crossbeam 550 de Zeiss	24
16. TEM - nervio ciático del bloque R1	26
17. STEM - nervio ciático del bloque R2	27
18. FIB-SEM baja resolución - nervio ciático del bloque R2	28
19. FIB-SEM - nervio ciático del bloque R2	29
20. STEM - nervio ciático del bloque R3	32

21. STEM - magnificación de nervio ciático del bloque R3	33
22. STEM - mielina del bloque R4-1	36
23. STEM - nervio amielínico del bloque R4-2	37
24. STEM - mielina del bloque R5-1	38
25. STEM - mitocondria en nervio amielínico del bloque R5-3	39
26. FIB-SEM - nervio ciático del bloque R4-2	40
27. FIB-SEM - mielina del bloque R4-2	41
28. Preparado de bloques para el Crossbeam 550	46
29. Vista del interior de la cámara del Crossbeam 550	47
30. Vista de la superficie del bloque en SmartSEM	48
31. Elección del área de interés en Atlas Engine	50
32. ROI específico en la pared del área de interés general	51
33. Seriación de ROI de nervio ciático	53

ABREVIATURAS

*Todas las abreviaturas son por sus siglas en inglés.

3D	tridimensional
BL	Lámina basal
ESEM	Microscopio electrónico de barrido “ambiental”
FIB-SEM	Microscopía electrónica de barrido con haz de iones enfocado (la técnica) / Microscopio electrónico de barrido con haz de iones enfocado (el equipo)
IPL	Líneas intraperiodo
MDL	Líneas densas mayores
n	Núcleo
Pe	Células perineurales
ROI	Área de interés
SBF-SEM	Microscopio electrónico de barrido con escaneo serial de la cara del bloque
STEM	Microscopía electrónica de transmisión-barrido
SCs	Células de Schwann
SEM	Microscopía electrónica de barrido (la técnica) / microscopio electrónico de barrido (el equipo)
TEM	Microscopía electrónica de transmisión (la técnica) / microscopio electrónico de transmisión (el equipo)
VP-SEM	Microscopio electrónico de barrido con presión variable
WD	Distancia de trabajo

1. INTRODUCCIÓN

1.1 El sistema nervioso

El sistema nervioso recibe información sensorial del entorno, evalúa la importancia de la información y genera respuestas conductuales apropiadas. Se divide en sistema nervioso central, que es una estructura bilateral y esencialmente simétrica con dos partes principales, la médula espinal y el encéfalo; y el sistema nervioso periférico, que está formado por grupos especializados de neuronas (ganglios) y por los nervios que salen del sistema nervioso central que se extienden a todas las partes del cuerpo (los nervios periféricos). El sistema nervioso periférico proporciona al sistema nervioso central la información sobre el entorno externo e interno del cuerpo, y ejecuta comandos motores generados en el encéfalo y médula espinal (Kandel et al., 2013).

1.1.1 Las fibras nerviosas periféricas

Los nervios periféricos están sometidos a gran estrés mecánico por lo que contienen grandes cantidades de tejido conectivo denso distribuido en tres capas llamadas endoneuro, perineuro y epineuro (**Fig. 1**). El epineuro es la capa más gruesa y externa formada de colágeno, recubre todo el nervio periférico y une en un solo haz a los troncos nerviosos uni o multifasciculares. El perineuro protege a las fibras nerviosas de células y moléculas indeseables y rodea a los axones que se agrupan en fascículos y al endoneuro o tejido conjuntivo intrafascicular. El endoneuro es una matriz rica en colágeno que contiene

fibroblastos, vasos sanguíneos y algunos macrófagos (Belin et al., 2017; Geuna et al., 2009; Pavelka and Roth, 2015).

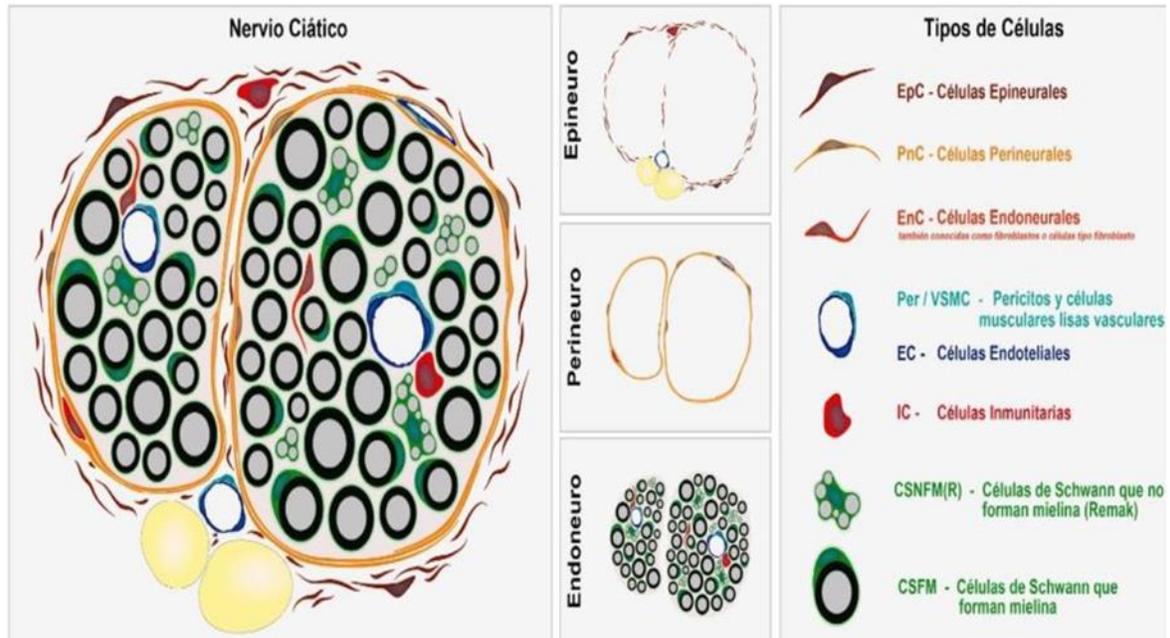


Figura 1. Capas del nervio periférico. Capas del nervio periférico epineuro, perineuro y endoneuro (adaptado de Gerber et al., 2021 en Segura-Anaya, 2022).

1.1.2 La mielina

Las fibras nerviosas son prolongaciones largas y delgadas de las neuronas (cilindro axónico, axón) con una membrana circundante. Los axones consisten en el neuroplasma o axoplasma que está envuelto por el axolema o plasmalema. El axoplasma está constituido por neurotúbulos, neurofilamentos, mitocondrias y retículo endoplásmico liso cuyas membranas se orientan longitudinalmente. Las células de Schwann (SCs; células gliales periféricas) envuelven el axón y forman una cubierta aislante conocida como vaina de Schwann, también llamado neurilema, que incluye a la mielina (Kühnel, 2003). En el sistema nervioso central, que comprende el cerebro y la médula espinal, las células gliales llamadas

oligodendrocitos, forman la mielina alrededor de los axones, por lo que no existe una vaina de Schwann ni neurilema.

Los nervios periféricos se componen de fibras nerviosas que, anatómicamente, se dividen en fibras mielinizadas y amielínicas (**Fig. 2**). Las fibras nerviosas que carecen de mielina presentan impulsos nerviosos continuos que son más lentos que los de los nervios mielinizados. La estructura de la fibra amielínica está compuesta por varios axones envueltos, como grupo, por una SC que no forma mielina, llamada, también, célula Remak. Los axones no mielinizados incluyen la mayoría de los axones posganglionares de los ganglios autónomos (Geuna et al., 2009; Pavelka and Roth, 2015). Las fibras mielinizadas están diseñadas para la conducción de potenciales de acción más rápidos y eficientes. La estructura de la fibra mielínica consiste en un solo axón que es envuelto individualmente por la SC, la cual forma una vaina de mielina con su membrana celular alrededor del axón (Geuna et al., 2009).

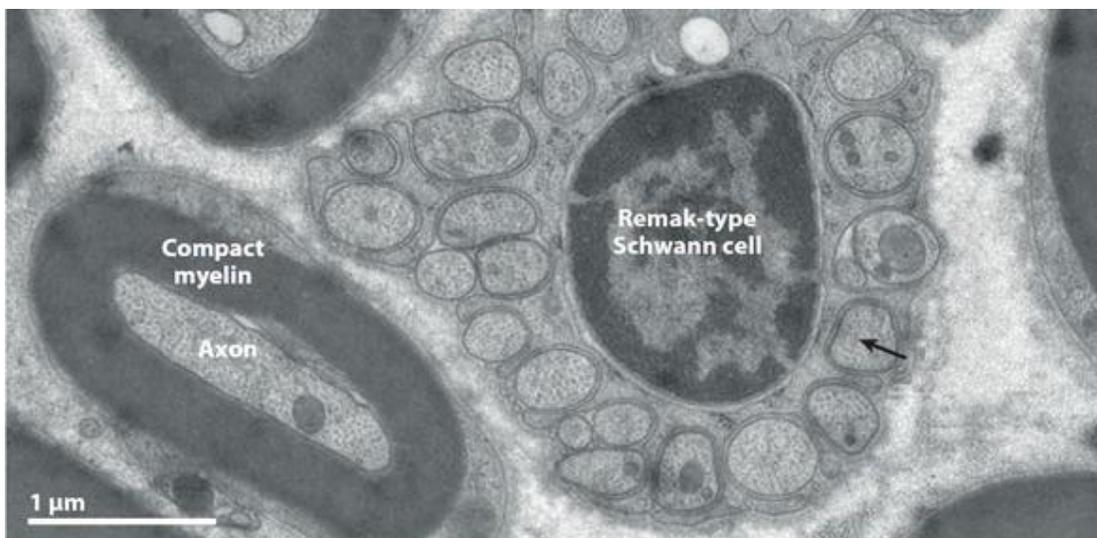


Figura 2. Tipos de fibras nerviosas. Micrografía electrónica de transmisión del nervio ciático que muestra un axón mielinizado y un grupo de axones amielínicos (flecha negra) rodeados por una célula Remak (Nave and Werner, 2014).

La mielina está compuesta de una sustancia grasa especializada que envuelve los axones y actúa como un aislante eléctrico, facilitando la conducción rápida de los impulsos nerviosos. Forma una estructura membranosa multilaminar producida a través de modificaciones estructurales y bioquímicas de la membrana plasmática de las SCs (Nave and Werner, 2014; Thetiot et al., 2018). Existen espacios sin mielina a intervalos regulares a lo largo de los axones periféricos mielinizados llamados nodos o nódulos de Ranvier. Estos nodos permiten la conducción saltatoria de impulsos, que significa el salto de los impulsos de nodo a nodo, resultando más rápido y energéticamente más beneficioso que la conducción continua. Además de ayudar a la correcta propagación del impulso nervioso, la mielina brinda una barrera impermeable a ciertos iones y biomoléculas en determinadas regiones celulares, donde esta se encuentra más compacta (Hartline, 2008; Pavelka and Roth, 2015).

La mielina puede ser compacta o no compacta. La mielina no compacta proporciona continuidad citoplásmica entre las SCs y varias regiones del internodo. Mientras que la mayoría de la mielina internodo es mielina compacta, la cual aparece como una estructura laminar de líneas claras (líneas intraperiodo) alternadas con oscuras (líneas densas mayores), que se disponen en espiral alrededor del axón. La mejor visualización de esta ultraestructura se obtiene con el microscopio electrónico. La mielina compacta es un proceso o vaina celular espiralada que contiene dos membranas plasmáticas en ausencia de citoplasma (Nave and Werner, 2014; Trapp and Kidd, 2004).

El proceso de la formación de la espiral alrededor del axón se esquematiza en la **Fig. 3B**, y la compactación en la **Fig. 3C**. En la representación de la compactación las membranas

extracelulares (líneas rojas) llamadas líneas intraperiodo (IPL) son separadas por 2.5 nm en el sistema nervioso periférico, y las regiones citoplasmáticas aparecen fusionadas formando las líneas densas mayores (MDL; **Fig. 3D**). La mayor función de la mielina compacta es el aislamiento y la función principal de sus moléculas parece ser la adhesión (Trapp and Kidd, 2004).

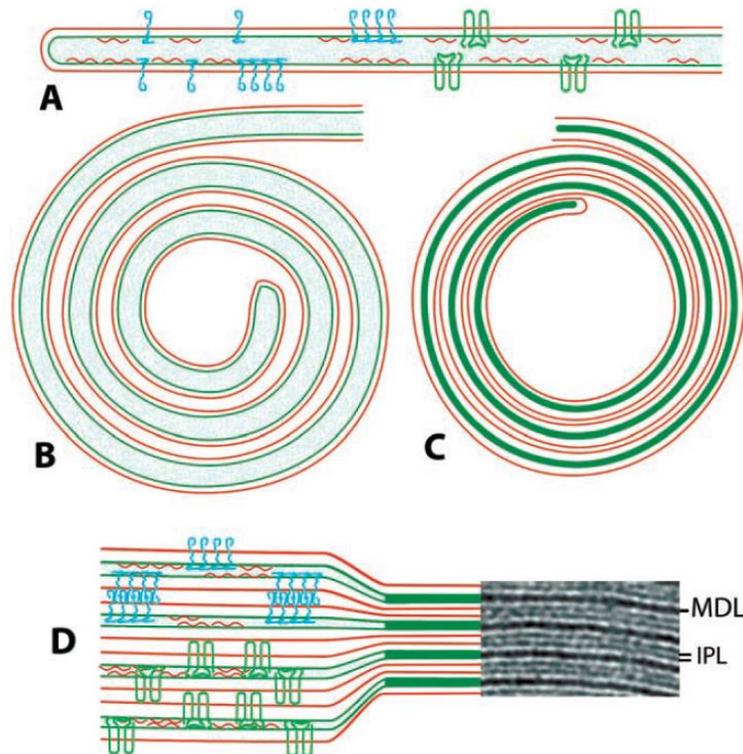


Figura 3. Representación esquemática de la mielina compacta. A) Mielina compacta vista como un proceso celular con proteínas específicas. **B)** Este proceso crece de forma espiralada alrededor del axón. **C)** Durante la compactación, el citoplasma (verde) es excluido. **D)** Las membranas citoplasmáticas (verde oscuro) se fusionan para formar las líneas densas mayores (MDL), mientras que las extracelulares (rojo) se disponen una cerca de otra para formar las líneas intraperiodo (IPL; modificado de Trapp and Kidd, 2004)

La mielina se ha estudiado ampliamente por microscopía fotónica y electrónica, donde cada técnica aporta diferente información para obtener una descripción detallada acerca de su estructura, función y composición.

1.2 Microscopía electrónica de transmisión

La microscopía electrónica de transmisión (TEM) se basa en los principios de la microscopía fotónica, con la diferencia de que usa haces de electrones en vez de energía luminosa y lentes electromagnéticas en vez de lentes ópticas. El haz de electrones interactúa con la muestra y aquellos electrones que incidan con estructuras con mayor densidad (dada por el contraste con metales pesados) se reflejan o absorben sin llegar a una pantalla fluorescente observándose como puntos oscuros. Mientras que los electrones que interactúan con estructuras de escasa o nula densidad atraviesan la muestra llegando a estimular las partículas de la pantalla fluorescente observándose como lugares luminosos. Con lo anterior se forma la imagen, que consta de zonas electrón lúcidas (iluminadas) o electrón densas (oscuras; Montalvo-Arenas, 2010).

La TEM es una técnica indispensable en el análisis de la estructura de cualquier tipo de material. Esta técnica ha evolucionado el conocimiento de la ultraestructura de las células y los tejidos, la determinación de procesos e interacciones como la relación función-estructura, entre otros. Para la observación de las muestras biológicas por TEM convencional es necesario que las muestras se fijen, para preservar la ultraestructura; se deshidraten, pues las moléculas de agua interfieren con el haz de electrones y con el vacío de la cámara donde se encuentra la muestra; se incluyen en resinas, para tener la estabilidad suficiente para la observación al microscopio; y se contrasten, pues la mayor composición de las muestras biológicas son elementos de menor densidad y los electrones no interactúan con estos átomos. Estas muestras se analizan por medio de secciones planas ultrafinas que son atravesadas por el haz de electrones (Cortadellas et al., 2010; Mielańczyk et al., 2015).

1.2.1 Estudio de la mielina por TEM

El estudio de la mielina por TEM se ha enfocado, en general, en el análisis de la descripción de la ultraestructura de los nervios. Dicho conocimiento se ha aplicado al análisis de la función con relación a la estructura fisiológica y patológica. Se describió la ultraestructura de las fibras nerviosas periféricas en cortes longitudinales, donde se observan diferentes componentes microscópicos, se enfatizan los nodos de Ranvier y la zona paranodal, que es el área lateral a los nodos donde las membranas apiladas de la SC se ensanchan y extienden, en esta área los extremos de los procesos del plasmalema de las SCs se unen al axolema (**Fig. 4**; Kühnel, 2003).

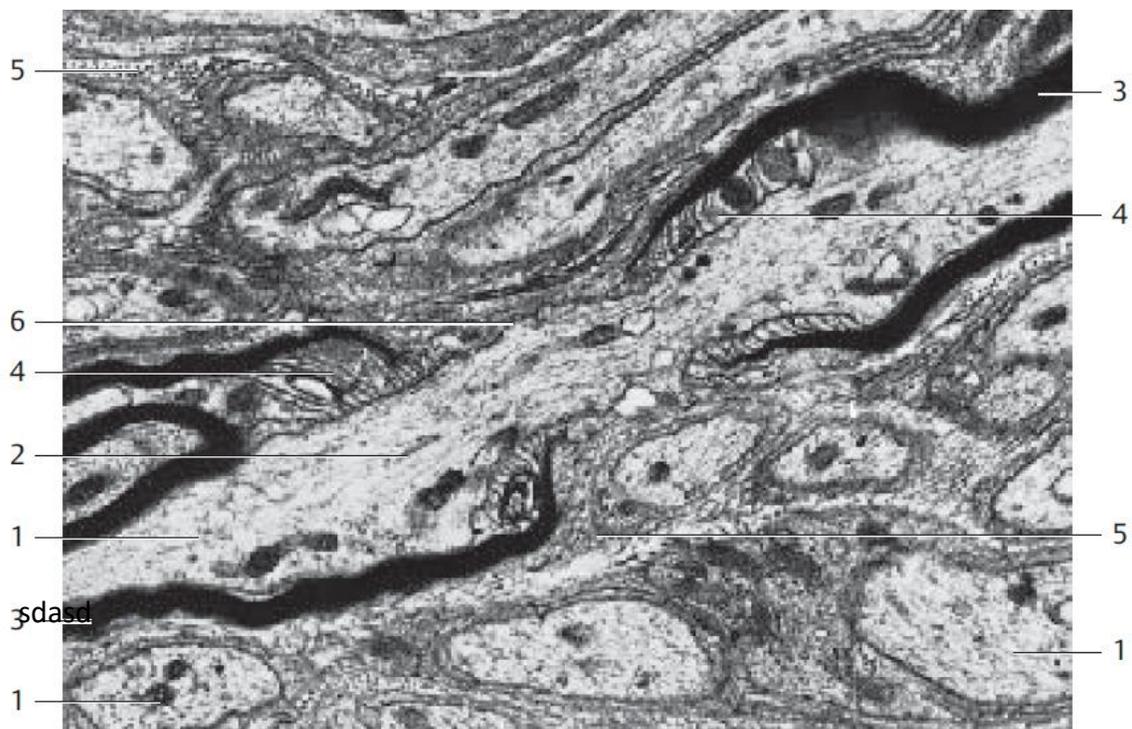


Figura 4. Vista longitudinal de la ultraestructura de las fibras nerviosas periféricas. Micrografía electrónica de transmisión de corte longitudinal donde se observan la ultraestructura característica de las fibras nerviosas. (1) Axón (axoplasma); (2) Neurofilamentos; (3) Mielina; (4) Plasmalema (pilas de membrana de SCs); (5) Fibrillas de colágeno; (6) Axolema. x23,000. (modificado de Kühnel, 2003).

Mientras que en la ultraestructura de las fibras nerviosas periféricas en corte transversal observamos que las fibras no mielinizadas se encuentran envueltas por una SC, que forma pliegues que contienen a los axones. En algunas áreas, la parte plegada del plasmalema de células de Schwann está conectada a otras partes del plasmalema a través de mesaxones. En el axolema encontramos retículo endoplásmico liso, mitocondrias, neurotúbulos y neurofilamentos, pero no hay complejos de Golgi ni retículo endoplásmico rugoso. Entre las fibras nerviosas encontramos fibrilla de colágeno del endoneuro (**Fig. 5**; Kühnel, 2003).

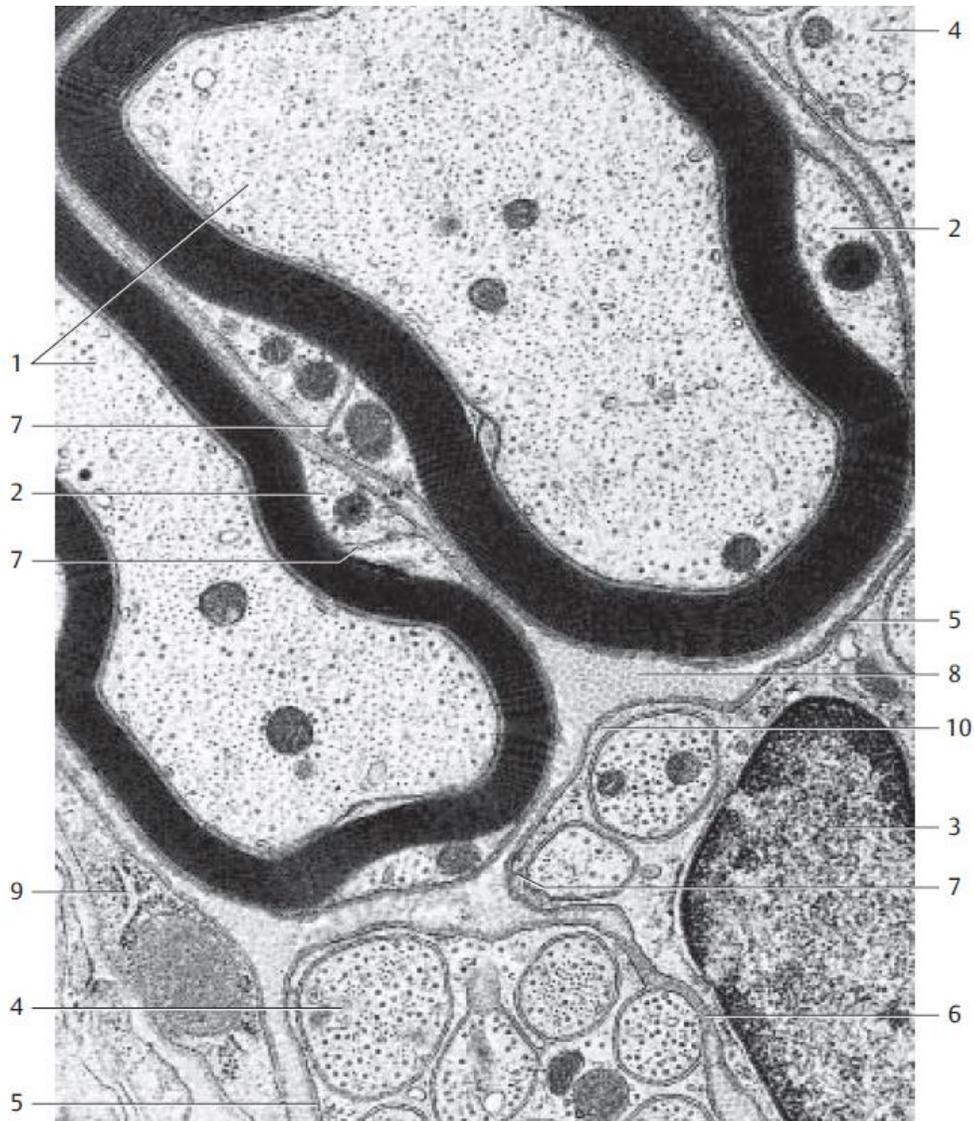


Figura 5. Vista transversal de la ultraestructura de fibras nerviosas. Micrografía electrónica con TEM de corte transversal donde se observan la ultraestructura característica de las fibras nerviosas. (1) Axón mielinizado (axoplasma) con neurotúbulos, neurofilamentos y mitocondrias; (2) citoplasma de la SC; (3) Núcleo de la SC; (4) axón amielínico con neurotúbulos, neurofilamentos y mitocondrias; (5) membrana basal; (6) axón invaginado incompletamente; (7) mesaxón; (8) fibrillas de colágeno (endoneuro); (9) proceso citoplasmático de una célula endoneural; (10) plasmalema de la SC. X19,000. (modificado de Kühnel, 2003).

La TEM también se ha enfocado en el análisis de la ultraestructura de la mielina que consiste en capas envueltas en espiral de la membrana plasmática de las SCs (**Fig. 6**).

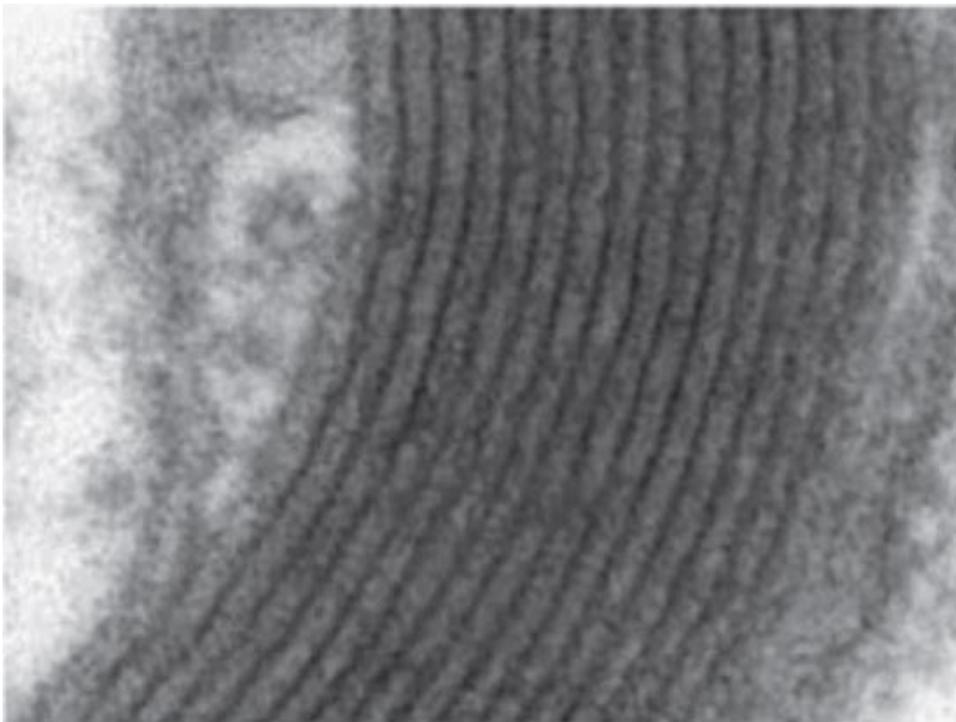


Figura 6. Ultraestructura de la mielina. Micrografía electrónica de transmisión donde se observa la ultraestructura característica de las superficies externas compactadas de mielina que se ven como líneas densas intraperíodo alternadas con las superficies citoplasmáticas internas compactadas correspondientes a las líneas densas principales (modificado de Geuna et al., 2009).

Además, estudios en TEM mostraron detalles como que las células perineurales están interconectadas por uniones estrechas y forman un tubo celular alrededor de los fascículos

nerviosos; también mostraron la relación de las SCs con los nervios, la ultraestructura de los nodos de Ranvier (**Fig. 7**), de las cisuras de Schmidt Lanterman y de las capas del nervio periférico, entre otras estructuras (**Fig. 8**; Alvarez-Leefmans et al., 2021; Inokuchi et al., 1991).

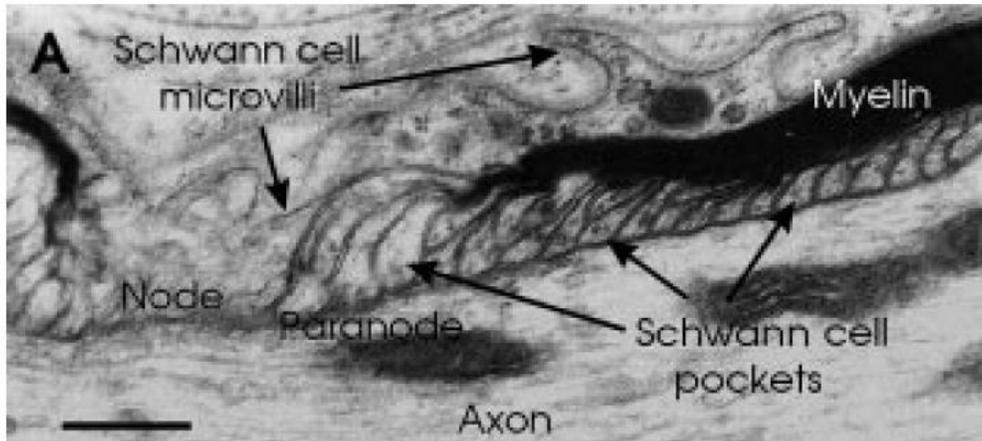


Figura 7. Ultraestructura de un nodo de Ranvier. Micrografía electrónica de transmisión donde se observan las características ultraestructurales del nodo de Ranvier de un nervio del ganglio de la raíz dorsal. En el nodo, el axón está cubierto por protuberancias citoplásmicas similares a microvellosidades de la célula de Schwann. En la región paranodal, bolsas de citoplasma de células de Schwann que surgen de la abertura de la línea densa principal rodean el axón. Barra = 1 μ m. (Alvarez-Leefmans et al., 2021).

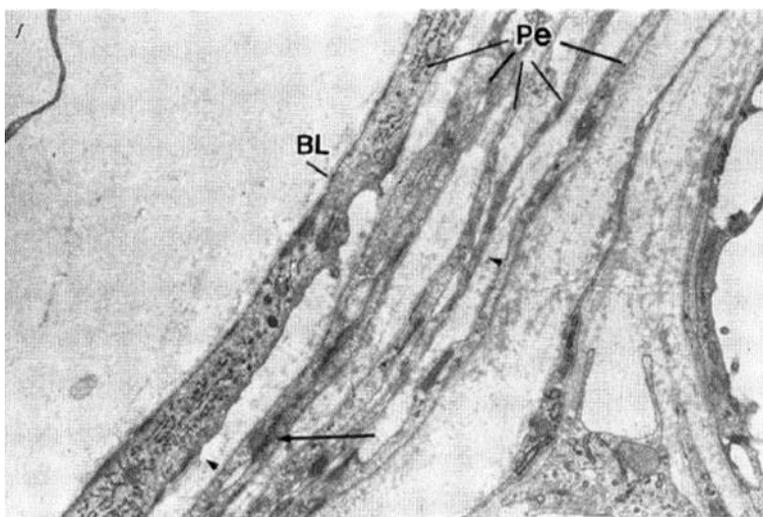


Figura 8. Ultraestructura del perineuro. Micrografía electrónica de transmisión donde se observan los procesos citoplásmicos delgados de las células perineurales (Pe) que están interconectados con uniones estrechas (flechas). BL: Lámina basal. x12,000. (modificado de Inokuchi et al., 1991).

1.3 Microscopía electrónica de barrido

La microscopía electrónica de barrido (SEM) usa una fuente de electrones y lentes electromagnéticas, como la técnica de TEM, pero los electrones “barren o escanean” la superficie de la muestra con la que interactúan. De esta interacción los electrones son reflejados o se generan otro tipo de electrones que salen de la muestra, ambos tipos se dirigen a los detectores que interpretan esta señal formando una imagen (Montalvo-Arenas, 2010).

La SEM utiliza un haz de electrones para, principalmente, obtener información estructural y química punto por punto de una región de interés de la muestra. Por lo anterior, las muestras, como para TEM, deben estar preparadas con el procesamiento específico para la conservación de las características morfológicas lo más cercano a como se encontraba en estado vivo y con las condiciones específicas para poder ser observadas en el microscopio electrónico (Mehdizadeh et al., 2014).

1.3.1 Estudio de la mielina por SEM

Con SEM se ha estudiado, por ejemplo, la estructura superficial y tridimensional de las fibras mielinizadas y la estructura de los nodos de Ranvier (**Fig. 9**). Además, estudios mostraron la estructura tridimensional de las capas que componen a los nervios periféricos (**Fig. 10**), entre otras estructuras específicas (Geuna et al., 2009; Inokuchi et al., 1991; Ushiki and Ide, 1987).

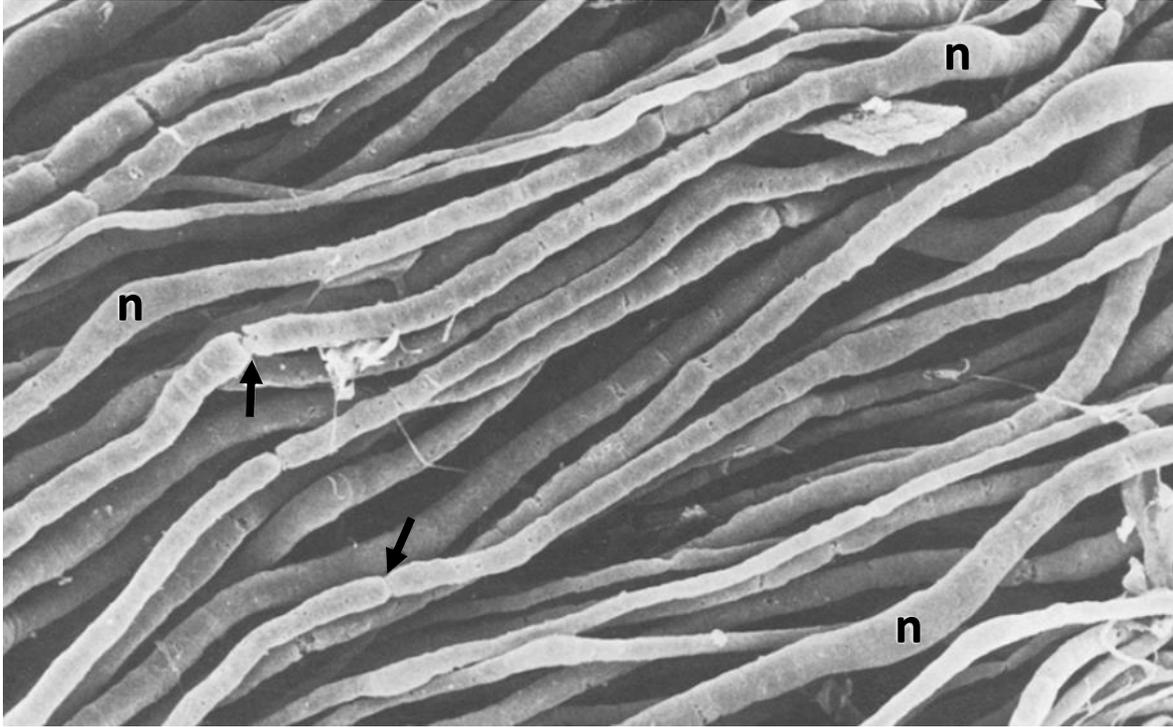


Figura 9. Fibras mielinizadas con SEM. Micrografía electrónica de barrido donde se observan fibras nerviosas con mielina. Se observa la presencia de constricciones anulares periódicas (flechas) que corresponden a nodos de Ranvier. La protuberancia nuclear de la célula de Schwann (n) está presente cerca de la mitad de cada internodo. 720 x. (modificado de Ushiki and Ide, 1987).

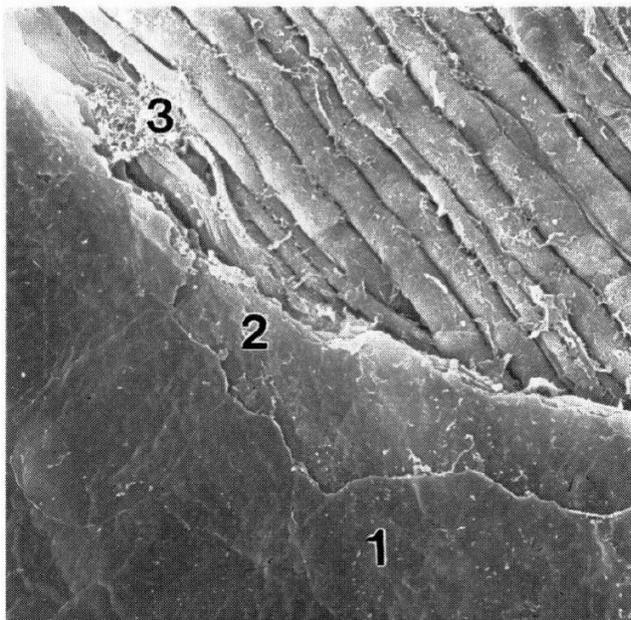


Figura 10. Capas del nervio periférico con SEM. Micrografía electrónica de barrido donde se observan tres porciones de los fascículos nerviosos: 1) lámina de células perineurales más externa, 2) lámina de células perineurales interna y 3) endoneuro y fibras nerviosas. 550x (Inokuchi et al., 1991)

1.3.2 Microscopía electrónica de transmisión-barrido

La Microscopía electrónica de transmisión-barrido (STEM) combina los principios de TEM y SEM. Como en TEM, requiere muestras muy delgadas (ultrafinas) y detecta principalmente los electrones transmitidos a través del espécimen. La ventaja respecto al TEM convencional es que permite el uso de otras señales que no puede ser espacialmente correlacionados en TEM (como electrones secundarios, retrodispersados, rayos X, entre otros). Como en SEM, se desliza el haz de electrones a lo largo de la muestra. La principal ventaja respecto al SEM convencional es la mejora en la resolución espacial. Entonces, obtenemos imágenes por STEM cuando el haz de electrones se enfoca con precisión en el plano de la muestra y se traza a lo largo de la muestra, punto por punto, por lo que los electrones transmitidos se cuentan para cada punto mediante una serie de detectores que recogen los electrones en diferentes ángulos de dispersión (Wolf et al., 2018).

1.4 Microscopía electrónica con FIB-SEM

En biología, la microscopía electrónica de transmisión se basaba en obtener información ultraestructural mediante la observación de secciones planas ultrafinas bidimensionales con lo que se infería la estructura tridimensional a partir ellas. Cada sección proporciona solo una imagen instantánea de una parte extremadamente pequeña de la celda, por lo que se pasan por alto muchas cosas y se pueden hacer interpretaciones incorrectas. Para obtener datos tridimensionales se utilizaba el seccionamiento serial por TEM, que tiene como limitante la complejidad de la técnica para la obtención de imágenes y del largo tiempo que se tarda en obtenerlas, pues requiere cortar un gran número de secciones ultrafinas en serie

que se llevan al TEM como una serie completa e intacta, para, posteriormente, tomar una imagen individual de cada sección y la consiguiente realineación manual de las imágenes (Leis, 2018; Webb and Schieber, 2018).

La tecnología ha avanzado en términos de rendimiento y automatización con la microscopía electrónica de barrido de volumen de una manera rápida y eficiente. Las nuevas técnicas para obtener imágenes tridimensionales (3D) permiten obtener información sobre la estructura a nivel subcelular de muestras más gruesas. Se utilizan técnicas de nanotomografía por SEM que consiguen un barrido serial de la cara del bloque (estas técnicas se realizan en muestras embebidas en resinas plásticas con preparación similar a la de TEM). Estas técnicas utilizan un microscopio electrónico de barrido con un dispositivo para seccionar que corresponde a: 1) una cuchilla de diamante en un microtomo integrado (microtome based Serial Block-Face SEM; SBF-SEM), que requiere de un SEM con presión variable o SEM "ambiental" (VP-SEM o ESEM, respectivamente), para hacer frente a la desgasificación de cada superficie de resina recién expuesta; o 2) un haz de iones enfocado (focused ion beam; FIB-SEM) que se encuentra integrado a la cámara donde se pone la muestra. La ablación con un haz de iones enfocado requiere un instrumento FIB-SEM de "doble haz" o "haz transversal". Este es un microscopio electrónico de barrido (SEM) con una columna de haz de iones instalada en un ángulo fijo con respecto al cañón de electrones y una plataforma que, generalmente, se puede inclinar y girar para proporcionar la máxima libertad de mover la muestra (que también se puede usar para la nanofabricación). Con ambas técnicas se obtienen imágenes secuenciales de la superficie de la muestra mediante

SEM, después de eliminar el material mediante corte, con la cuchilla; o desbaste (milling), con el haz de iones (Webb and Schieber, 2018).

Los microscopios FIB-SEM son microscopios electrónicos de barrido (SEM) capaces de tomar imágenes de alta resolución. Con el FIB se puede eliminar rebanadas finas de material del bloque después de tomar la imagen con el haz de electrones (**Fig. 11**), por lo que pueden recopilar eficientemente grandes cantidades de imágenes consecutivas de un solo espécimen con mínima intervención humana. Esta tecnología es llamada microscopía electrónica de barrido de volumen, pues consigue la visualización 3D de sistemas biológicos, lo que permite una mejor comprensión tanto de su estructura como de su función (Leis, 2018; O'Toole et al., 2018; Webb and Schieber, 2018).

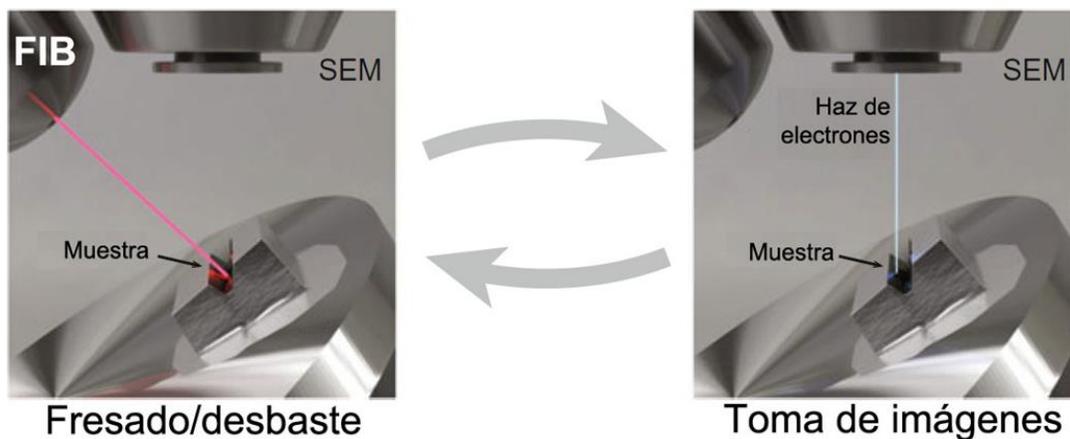


Figura 11. Flujo de trabajo del FIB-SEM. Alterna entre el desbaste de una capa ultrafina de la muestra y la toma de imágenes consecutivas (modificado de Webb and Schieber, 2018).

Hay varios factores a considerar para las técnicas microscopía electrónica de barrido de volumen. La interacción entre el haz de electrones y la muestra lleva a una acumulación de cargas en la superficie de la muestra, que son perjudiciales para la calidad de la imagen. Con

SEM, la muestra, siempre ha sufrido problemas de carga y se deben obtener imágenes con voltajes bajos. Lo anterior es un factor que rara vez se considera al trabajar con TEM, donde las secciones ultrafinas con poca masa se mantienen en una rejilla metálica altamente conductora. Este problema se resuelve al recubrir la superficie de la muestra con algún metal o aleación de metales (oro, paladio, platino, entre otros). En el caso específico del FIB-SEM, el daño del haz puede provocar carga, distorsiones de imagen que forman líneas o imágenes cambiantes, espesor de sección desigual o sección deficiente que da como resultado una superficie dañada. Por otro lado, con el desbaste, el haz de iones introduce iones de galio en la muestra y destruye su superficie. Estos iones de galio positivos reducen el efecto de carga de las muestras biológicas y tienen un efecto similar al del gas en SEM de presión variable para neutralizar la carga en la superficie de la muestra (Drobne et al., 2005; Robertson et al., 2005; Webb and Schieber, 2018).

1.4.1 Estudio de la mielina por FIB-SEM

La literatura relacionada con el estudio de la mielina por medio FIB-SEM es escasa, se ha usado, principalmente, para estudiar la organización estructural de los complejos glía-axón y mielina-axón, y en la relación espacial de las células y sus componentes en 3D para estudiar grandes secciones de tejido en alta resolución, lo que permite el análisis morfológico y cuantitativo de secciones de nervios completos y de características específicas de la mielina en estos (**Fig. 12, 13 y 14**; Erwig et al., 2019; Steyer et al., 2020).

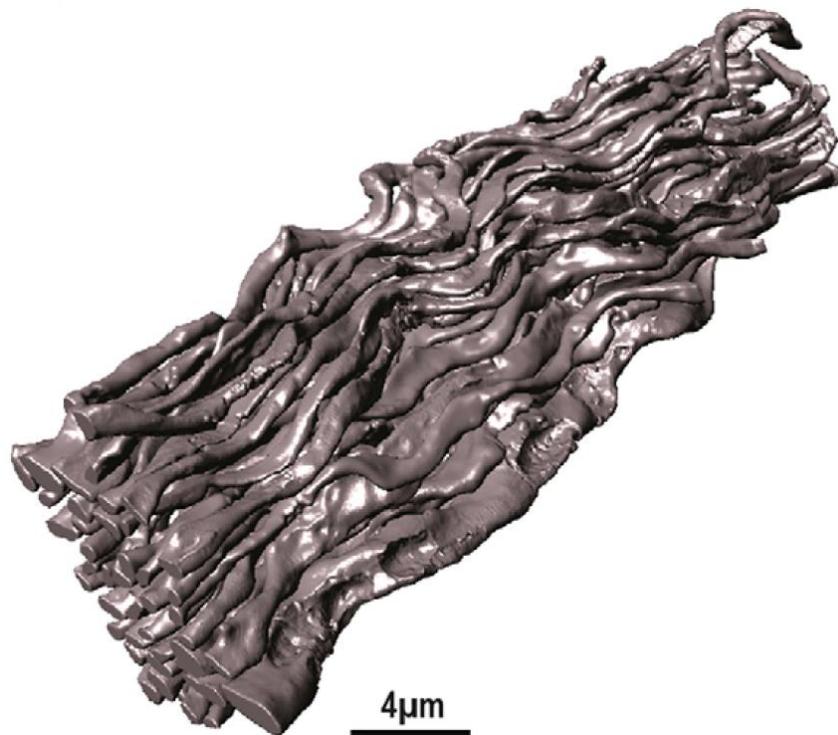


Figura 12. Reconstrucción 3D de nervio óptico por FIB-SEM. Reconstrucción de volumen de tejido de nervio óptico de ratones control (modificado de Steyer et al., 2022).

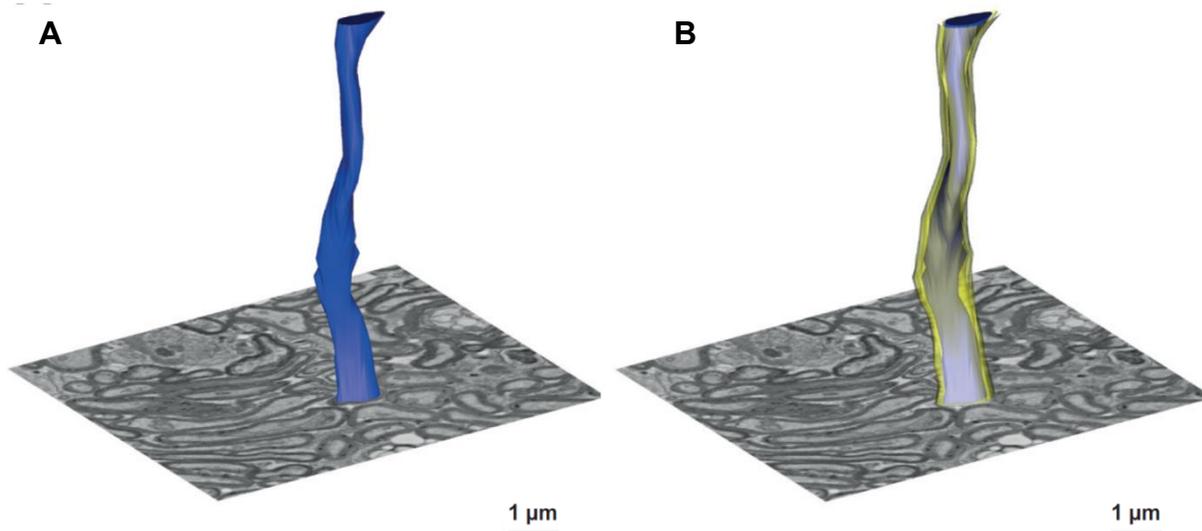


Figura 13. Reconstrucción 3D de una parte del volumen obtenido con FIB-SEM. Micrografías de FIB-SEM y reconstrucción 3D de la membrana plasmática de los segmentos axonales mielinizados (A; azul) y las respectivas vainas de mielina (B; amarillo) del nervio óptico de ratones control (Erwig et al., 2019).

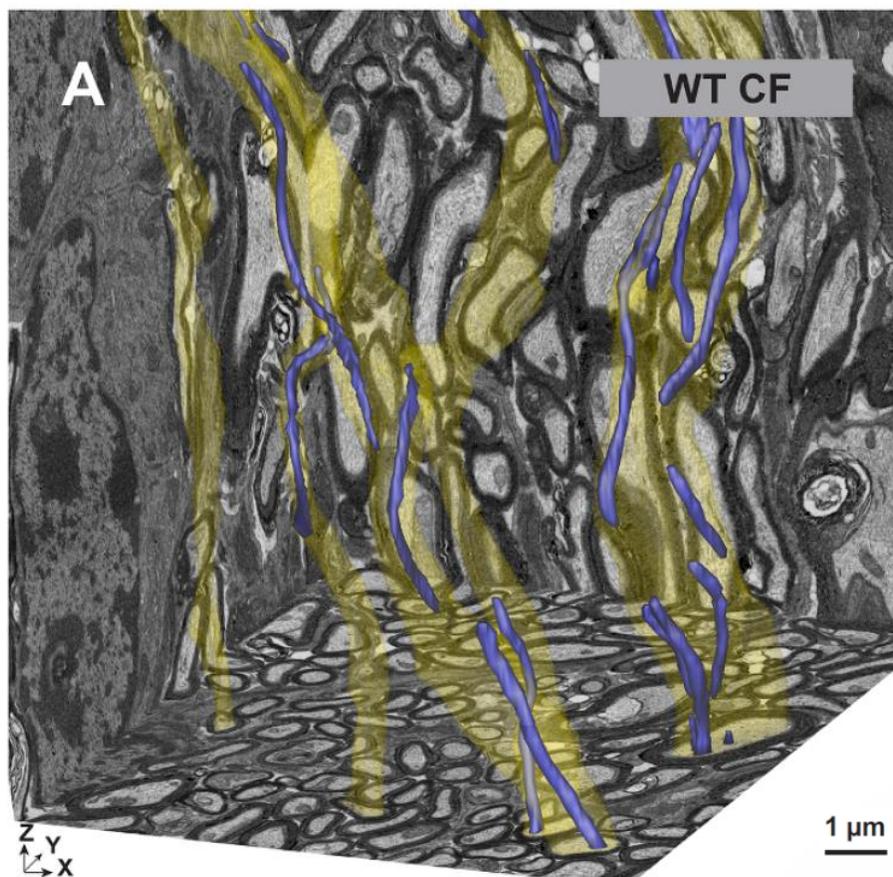


Figura 14. Reconstrucción 3D y segmentación del volumen obtenido con FIB-SEM. Reconstrucción 3D de datos adquiridos con FIB-SEM de axones (amarillo) y mitocondrias axonales (azul) en nervio óptico de ratones control (modificado de Steyer et al., 2020).

2. RAZONAMIENTO CIENTÍFICO

2.1 Planteamiento del problema

Las anomalías en la mielina pueden ser provocadas por diferentes medicamentos, lesiones mecánicas o por una variedad de patologías neurológicas, como la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Pelizaeus-Merzbacher, la esclerosis múltiple, la encefalomiелitis alérgica experimental, dolor neuropático patológico, entre otras (Cavaletti et al., 1995; Duncan and Radcliff, 2016; Dyck et al., 1990; Fitzgerald et al., 1984; Liu et al., 2019; McMurrán et al., 2016). Por lo anterior, la mielina es una estructura importante en la investigación y es vital utilizar las distintas técnicas existentes en su estudio para obtener diferente información.

La mielina se ha estudiado extensivamente con microscopía electrónica por las técnicas de TEM y SEM para ver características ultraestructurales y superficiales. Sin embargo, la información con la técnica FIB-SEM aún es limitada.

Se han estandarizado protocolos específicos para cada técnica, lo que limita el uso de una sola muestra dando como resultado mayor tiempo para obtener los resultados. Este estudio desarrolla un protocolo simplificado de preparación de muestras para que una sola muestra pueda ser usada con la técnica de transmisión y con la de FIB-SEM, obteniendo, comparando y complementando la información de ambas técnicas con menos tiempo y menos recursos.

2.2 Objetivos

2.2.1 Objetivo general

El desarrollo metodológico de una técnica simplificada de procesamiento de nervio ciático de rata que se pueda utilizar para TEM/STEM y para FIB-SEM.

2.2.1 Objetivos específicos

- Estandarizar un protocolo de inclusión en el que la mielina se preserve adecuadamente para observar la ultraestructura de ese tejido por TEM/STEM.
- Desarrollar un protocolo de trabajo para la técnica FIB-SEM en el microscopio Crossbeam 550 de Zeiss.
- Determinar la eficacia del uso de la técnica FIB-SEM para el estudio del nervio ciático.
- Determinar la eficiencia de obtener una muestra que se pueda usar para las 2 técnicas de microscopía electrónica.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 Animales de experimentación

Se utilizaron ratas macho (350 a 450 g de peso) de la cepa Wistar procedentes del bioterio del Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz (INPRFM), Ciudad de México. Todos los animales estuvieron en cajas de plástico y se mantuvieron bajo condiciones controladas de laboratorio en un ciclo de luz:oscuridad (12:12 horas), temperatura controlada y con libre acceso a agua y alimento (rat chow estándar).

Todos los experimentos se hicieron de acuerdo con las guías de los Institutos Nacionales de Salud para el cuidado y uso de animales de laboratorio y con la aprobación del Comité de Ética y el Comité de Investigación del INPRFM (proyecto NC.143290.0).

3.2 Protocolo base para la preparación de muestras

Las muestras biológicas para transmisión y para FIB-SEM tienen una preparación similar y se encuentran embebidas en resinas, es por esto que se proponemos utilizar una sola muestra para ambas técnicas.

Para la técnica de FIB-SEM entra el bloque completo al microscopio electrónico, por lo que los contrastes necesarios deben estar en la muestra previo a la inclusión (contrastos en bloc). Además, con la técnica FIB-SEM se pierde parte de la muestra por el desbaste (milling), por lo que se deben obtener cortes ultrafinos primero y posteriormente obtener las imágenes con FIB-SEM.

El protocolo base usado para esta técnica está basado en el que describen Merchant-Larios et al. (2023) realizado en el Departamento de Biología Celular y Fisiología en el Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), a cargo del Dr. Horacio Merchant Larios.

Se utilizó el siguiente protocolo base:

- Todos los animales se sacrificaron previa anestesia con pentobarbital sódico (63 mg/kg peso).
- Perfusión con solución salina (NaCl 0.9%), seguida por el fijador de Karnovsky (glutaraldehído 2.5%, paraformaldehído 2% en buffer de cacodilatos 0.1 M, pH 7.2).
- Disección del tejido.
- Lavados con buffer de cacodilato de sodio 0.1M pH7.3 3 x 15 min
- Postfijación con OsO4 al 1% en agua MilliQ 2 horas
- Lavados con buffer de cacodilato de sodio 2 x 15 min
- Deshidratación con acetona:
 - Al 25 % 1 x 15 min
 - Al 50 % 1 x 15 min
 - Al 75 % 1 x 15 min
 - Al 95 % 1 x 15 min
- Baños en Acetona al 100% 3 x 15 min c/u.
- Sol. saturada de Acetato de Uranilo en acetona overnight
- Baños en Acetona al 100% 2 x 15 min
- Sol. saturada de acetato de plomo en acetona x 2 horas

- Baños en Acetona al 100% 2 x 15 min
- Preparación de resina EMBED-812

Mezcla A: 50 ml (DDSA=30ml/Epon 812=20ml).

Mezcla B: 50ml (NMA=23ml/Epon 812=27ml).

Proporción para preparar el Epon Puro para la inclusión:	
	Hard
<u>Mezcla A.</u>	3 ml
Mezcla B.	7 ml
DMP30	0.2 ml

- Infiltración gradual con resina
 - EPON +acetona 100% 1:2 durante x 1 hora
 - EPON +acetona 100% 1:1 durante x 1 hora
 - EPON +acetona 100% 2:1 durante Overnight
 - EPON Overnight
- Incluir en moldes con EPON y polimerizar x 24 horas a 60°C
- Se obtienen los bloques polimerizados
- Tallado de la pirámide, obtención de cortes semifinos, que se tiñen con azul de toluidina; y de cortes ultrafinos, que se montan en rejillas con formvar para observar con TEM o STEM
- Recubrimiento metálico del bloque para procesar por FIB-SEM (oro, platino, paladio, entre otros).

3.3 Microscopios utilizados para este proyecto

Las primeras 2 imágenes de transmisión se obtuvieron en un microscopio electrónico de transmisión Jeol 1010 (que se encuentra en el Departamento de Biología Celular y Fisiología

en el Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM). El resto del estudio se llevó a cabo con un microscopio Zeiss Crossbeam 550 que se encuentra en el Departamento de Neuromorfología Funcional de la Dirección de Investigaciones en Neurociencias del INPRFM.

El microscopio FIB-SEM ZEISS Crossbeam 550 instrument (Zeiss Group, Oberkochen, Germany) es un microscopio electrónico de barrido de emisión de campo de alta resolución (columna SEM Gemini II), que cuenta con una fuente de iones (FIB) de galio, un detector de electrones transmitidos (para STEM) y un sistema de inyección de gas para deposiciones de platino (GIS; Fig. 15).

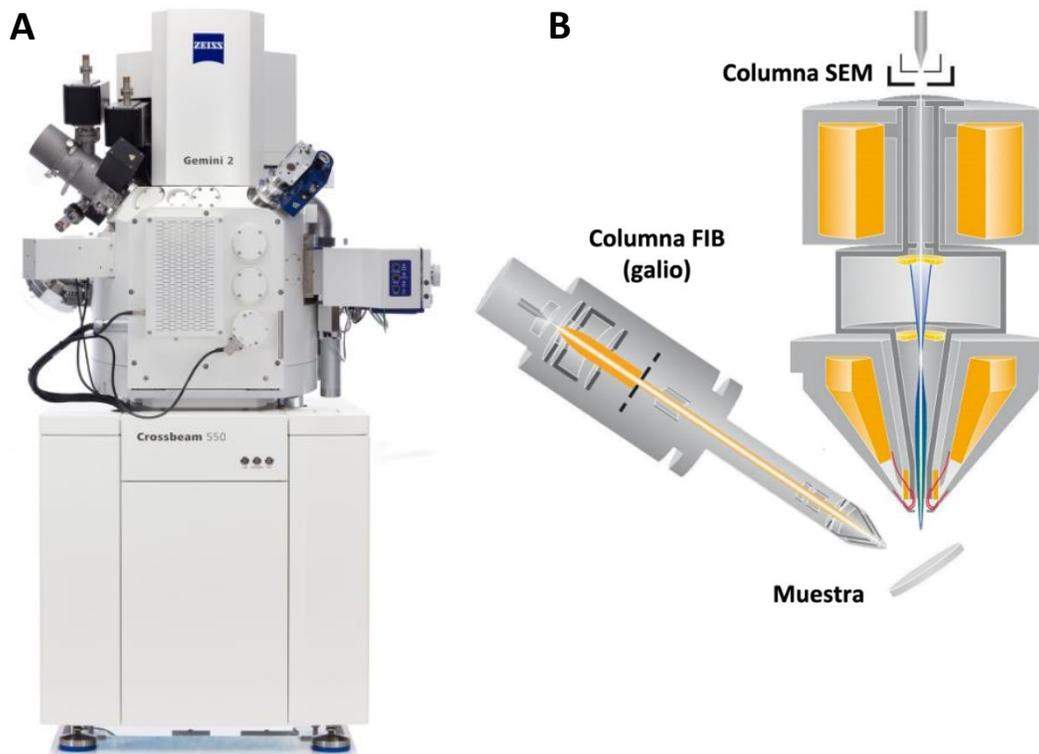


Figura 15. Microscopio electrónico Crossbeam 550 de Zeiss. A) imagen del microscopio Crossbeam 550 de la marca Zeiss. **B)** Esquema de la cámara del microscopio con la columna del haz de electrones para la microscopía de barrido (SEM) y la del haz de iones de galio (FIB) en relación con la muestra, que debe estar inclinada a 54° permitiendo que la superficie de interés sea paralela al plano del haz de iones y en ángulo (54°) con respecto al haz de electrones.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Primer procesamiento de muestras

Inicialmente se procesan 2 ratas (R1 y R2) con el protocolo base descrito en el punto **3.2 Protocolo de preparación de muestras**. La fijación de los animales se hace por perfusión, se hace un lavado previo con solución salina por 3 a 5 min (hasta que queda totalmente limpia de sangre) y se procede a pasar el fijador por el tiempo necesario hasta que el animal quede totalmente fijado. Posteriormente, se disecan los nervios ciáticos de cada animal (se obtienen otros tejidos como cerebro y riñones) y se cortan en pedazos menores de 1 mm^3 que son los que se procesan. El resto de la técnica se siguió de la manera descrita en el protocolo base. Las soluciones para la perfusión y las resinas se prepararon el día de uso y las soluciones de los contrastes se prepararon un día previo. Finalmente se obtienen 3 bloques de cada animal, de los cuales se utilizan uno de R1 y uno de R2.

Del bloque R1 obtuve cortes ultrafinos de 60 nm e imágenes de estos por TEM (**Fig. 16**; obtenidos en el Dpto. de Biología Celular y Fisiología en el Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM, con un equipo TEM Jeol 1010). Del bloque R2 obtuve cortes ultrafinos (60-70 nm de grosor) e imágenes de estos por STEM (**Fig. 17**; obtenidas en el Dpto. de Neuromorfología Funcional del INPRFM con un Crossbeam 550 de Zeiss).

Posteriormente, el bloque R2 se recubrió con oro (en la Unidad de Microscopía de la Facultad de Medicina de la UNAM) y se obtuvieron imágenes con FIB-SEM (**Fig. 18 y 19**; obtenidas con el Crossbeam 550 de Zeiss).

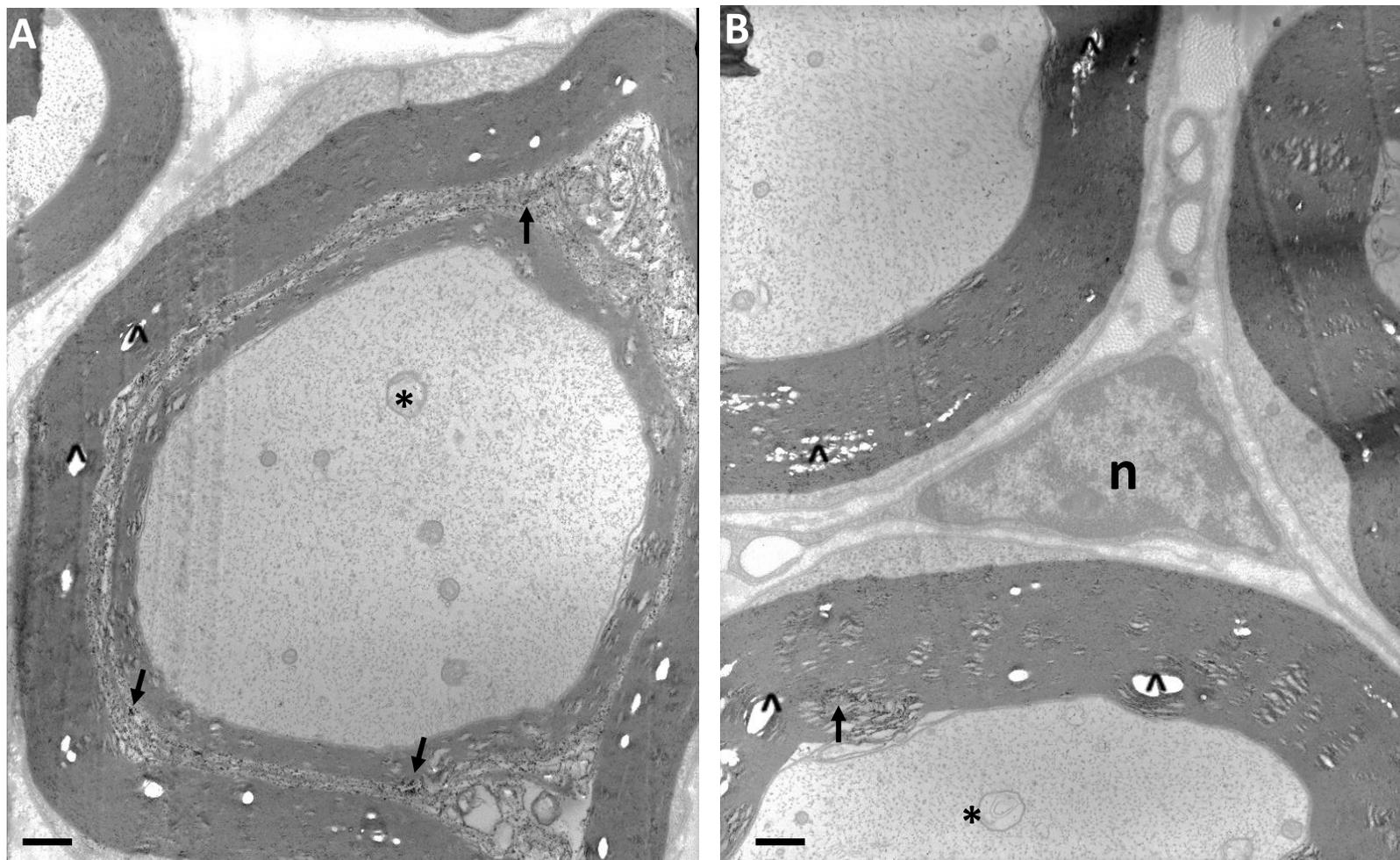


Figura 16. TEM - nervio ciático del bloque R1. Micrografías electrónicas de transmisión de un corte transversal de nervio ciático que muestran (A y B) axones mielínicos con un patrón de puntillado (flechas), probablemente por sedimentos de contraste; mitocondrias hinchadas (* negro); dentro de la mielina se observan áreas multifocales de contenido pálido, probablemente, porque no penetró bien la resina (^); no se diferencian las láminas de mielina, se ve como una sola estructura; núcleo de una célula de Schwann (n; en B). Barras = 500 nm.

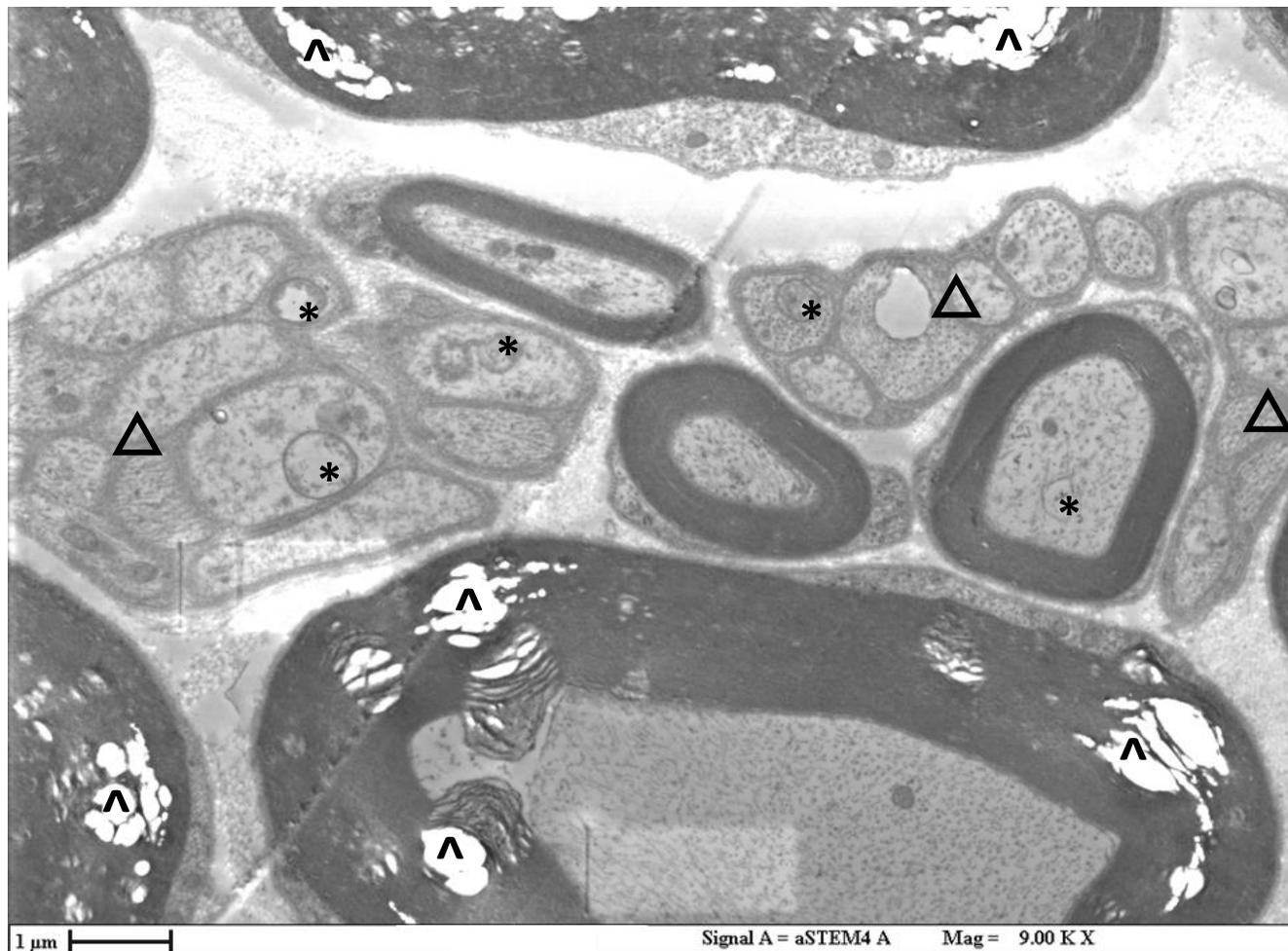


Figura 17. STEM - nervio ciático del bloque R2. Micrografía electrónica de transmisión de un corte transversal de nervio ciático que muestran axones mielínicos y grupos de axones amielínicos (Δ). Se observan mitocondrias hinchadas (*); dentro de la mielina se observan áreas multifocales de contenido pálido, probablemente, porque no penetró bien la resina (^). Tampoco se diferencian las láminas de mielina, se ve como una sola

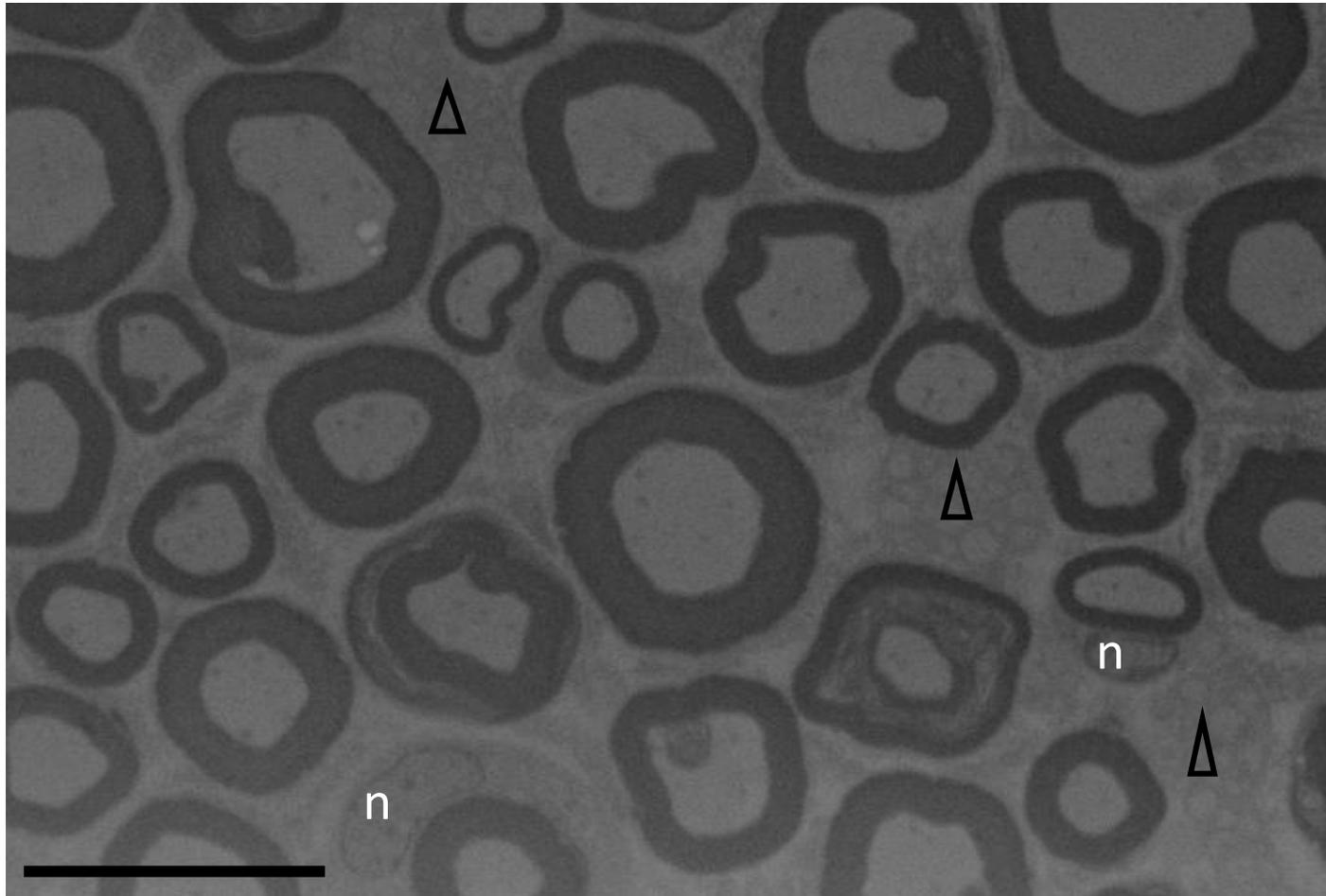


Figura 18. FIB-SEM baja resolución - nervio ciático del bloque R2. Micrografía electrónica de baja resolución de corte transversal de nervio ciático obtenida con SEM después de un desbaste con FIB. Se observan axones mielinizados y grupos de axones amielínicos (Δ) con poco contraste; no se diferencian las láminas de mielina, pues se observa como una sola estructura; también se observan algunos núcleos de células de Schwann n). Barra = 10 μm .

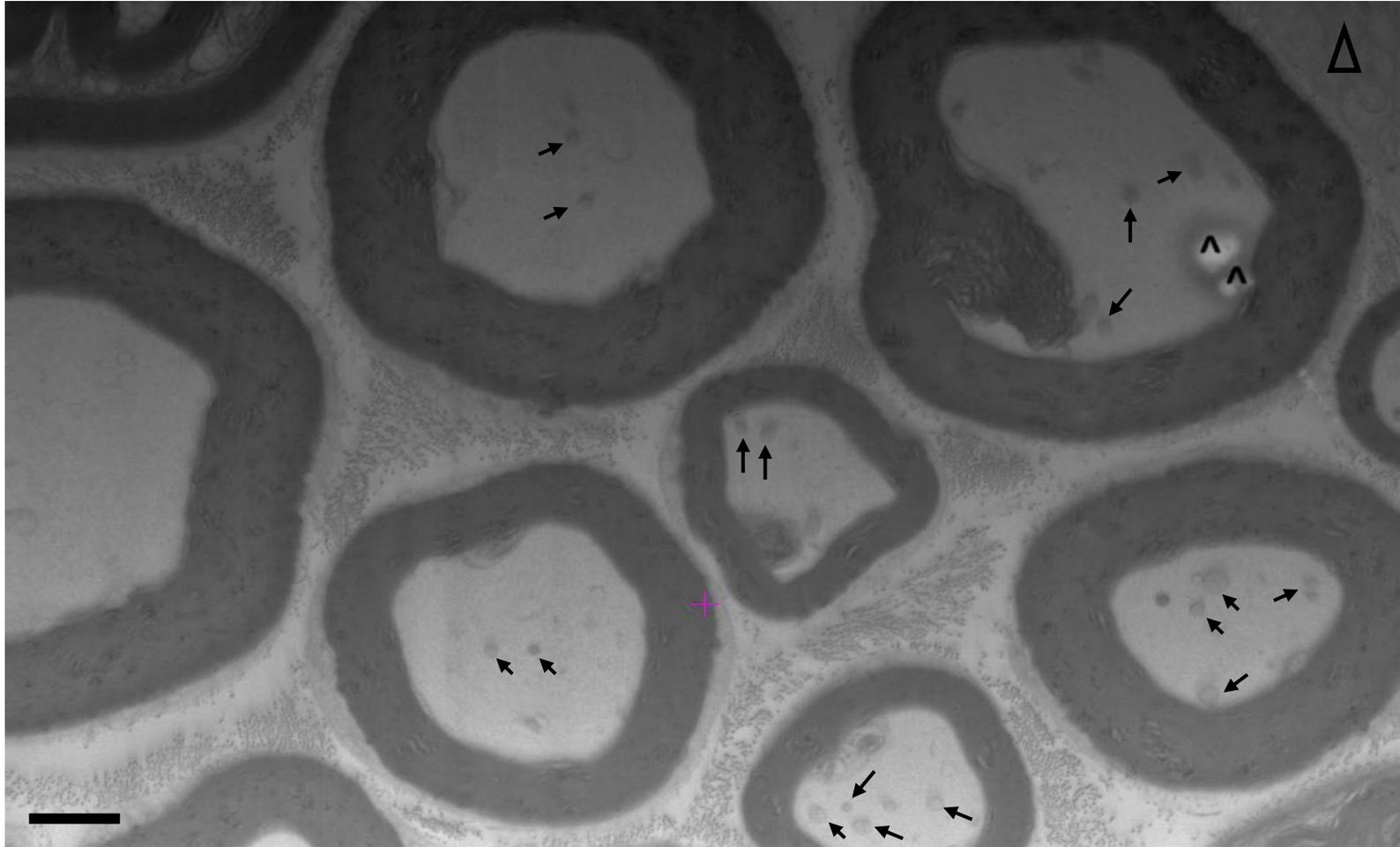


Figura 19. FIB-SEM - nervio ciático del bloque R2. Micrografía electrónica de corte transversal de nervio ciático obtenida con SEM después de un desbaste con FIB. Se observan axones mielínicos con mitocondrias que no están bien definidas (flechas); agujeros en uno de los axones, probablemente, porque no penetró bien la resina (^); no se diferencian las láminas de mielina, se ve como una sola estructura; se observa un grupo de axones amielínicos (Δ); no se ven los límites de las células de Schwann probablemente por el pobre contraste. Barra = 1.5 μ m.

En las imágenes representativas de transmisión (TEM y STEM) y de FIB-SEM se observa que no se encuentra preservada la mielina, ya que no se observa la estructura multilaminar característica, en cambio se ve como una estructura completa.

En TEM/STEM se observa la interrupción no fisiológica de la mielina que se presenta como áreas multifocales de punteado irregular y pálido dentro de las vainas de mielina por una mala penetración de la resina, probablemente, por una fijación inadecuada (Pardo et al., 2019). La fijación por perfusión puede retrasarse por el tiempo de limpieza con la solución salina, lo que provoca una alteración en la estructura por autólisis. Por otro lado, la fijación química produce entrecruzamiento (cross-linking) de proteínas, que es la conexión de cadenas macromoleculares mediante la creación de puentes o enlaces químicos con un compuesto exógeno (el fijador), proceso que por sí mismo produce artefactos pero es indispensable para llevar a cabo la deshidratación, por lo que si la fijación es inadecuada, la deshidratación puede dañar estructuras lipídicas (que son más sensibles a sustancias como la acetona). En el caso de la mielina, que consiste en una serie de membranas ricas en lípidos, puede provocar una discontinuidad de la estructura. Lo anterior termina por afectar todo el procesamiento de la muestra y concluir en una mala penetración de la resina en la estructura dañada (Ayache et al., 2010).

También observamos un patrón de puntillado negro que puede corresponder a residuos, que son depósitos de materia extrínseca a la muestra, normalmente se producen por adiciones químicas durante la preparación de la muestra, como por las soluciones de metales usadas para el contraste. Otra posibilidad es que sean residuos provocados por

contaminación de las soluciones y/o de la muestra, que resulta en depósitos de suciedad (Ayache et al., 2010).

Los problemas comentados en los párrafos anteriores están directamente relacionados con el tener problemas al enfocar y a la dificultad para obtener imágenes con aumentos mayores a 9,000 X, a pesar de que los cortes ultrafinos son del orden de 60 nm.

4.2 Segundo procesamiento de muestras

Se hacen modificaciones al protocolo base en el procesamiento de una nueva rata (R3). Primero me enfoco en un fijación más rápida y efectiva. El lavado con solución salina se hace en menor tiempo (el animal sí queda limpio de sangre). Posteriormente, se hace la perfusión con fijador hasta que la rata queda totalmente fijada. Además, se preparan nuevas soluciones para todo el proceso, cuidando, principalmente, la limpieza. El resto de la técnica se siguió de la manera descrita en el punto **3.2 Protocolo de preparación de muestras**, resultando en 2 bloques de resina.

Obtengo cortes ultrafinos (60-70 nm de espesor) de uno de los bloques de la R3 y obtengo imágenes de estos por STEM (**Fig. 20 y 21**).



Figura 20. STEM - nervio ciático del bloque R3. Micrografía electrónica de transmisión de un corte transversal de nervio ciático que muestran axones mielinizados y amielínicos (Δ). Se observan mitocondrias mejor conservadas (* negro); dentro de la mielina aún se observan áreas multifocales de contenido pálido porque no penetró bien la resina (^). No se diferencia claramente la estructura multilaminar de la mielina. El contraste se observa mejor en general, pues se aprecian con más detalle los límites de las membranas de las SCs y estructuras como neurofilamentos y neurotúbulos en todos los axones.

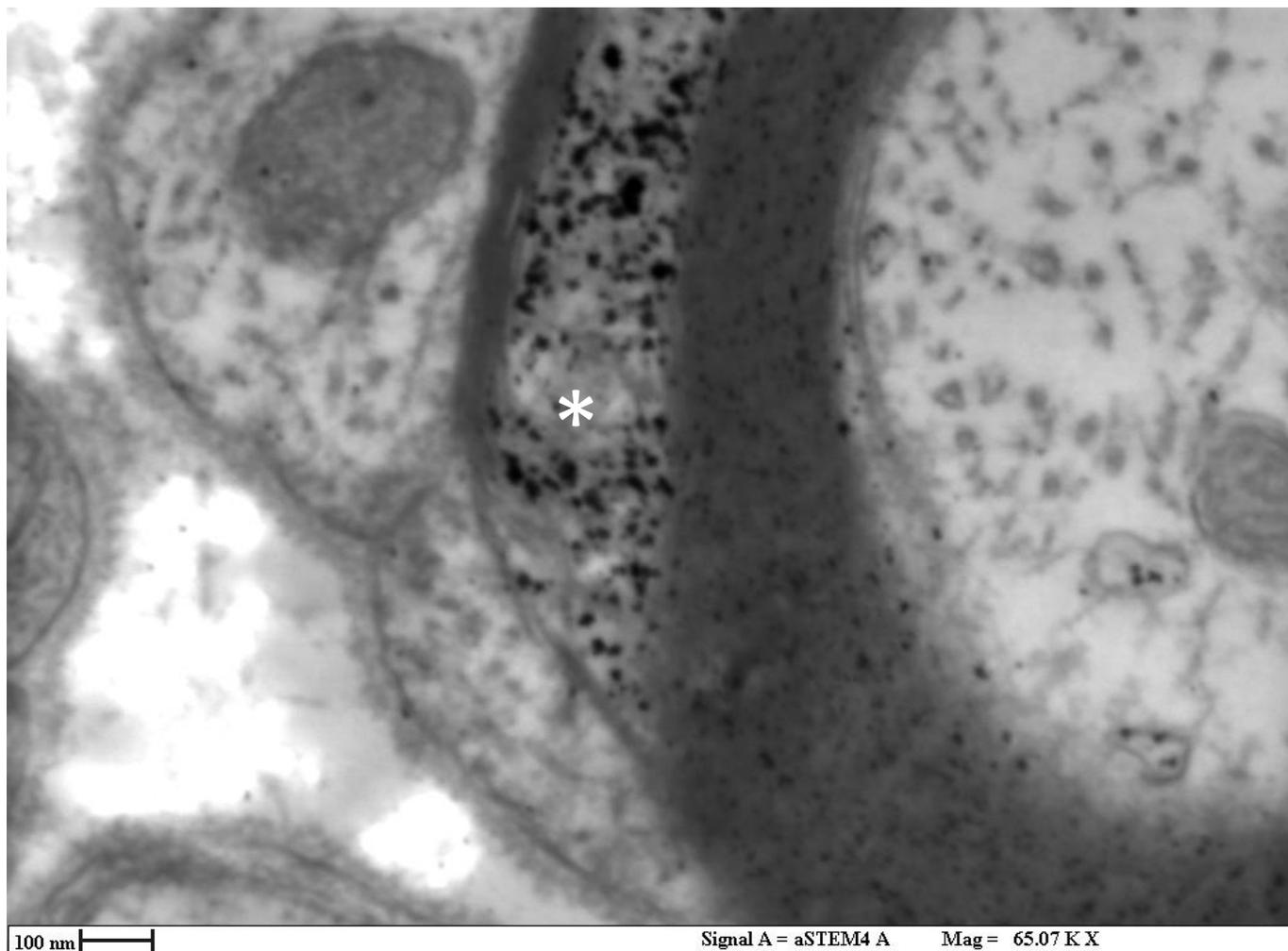


Figura 21. STEM - magnificación de nervio ciático del bloque R3. Micrografía electrónica de transmisión de un corte transversal de nervio ciático que muestra la magnificación de un axón mielinizado, donde se observa un área con puntillado oscuro (* blanco), que parecen ser sedimentos por el contraste o suciedad acumulada por un mal procesamiento. El contraste se observa mejor en general.

Las imágenes representativas de STEM del bloque de R3 se observan con mejor contraste en general. Además, se observa mejoría en la conservación de la mielina, pero sigue sin observarse su ultraestructura multilaminar característica. También se logra llegar a mayores aumentos (65,000 X) con una buena resolución.

Con lo anterior concluimos que los cambios realizados para mejorar la fijación funcionaron, pero no es suficiente. El patrón de puntilleo persiste en algunas áreas, por lo que se harán nuevas soluciones de contraste, donde se utilizarán reactivos nuevos y se aumentarán las medidas de limpieza. Se tendrá más cuidado con la limpieza del procesamiento en general.

Ninguno de estos bloques se recubre con metales, pues se prefiere esperar a que los resultados con transmisión sean mejores para procesar para FIB-SEM.

4.3 Tercer procesamiento de muestras

Se hacen nuevas modificaciones al protocolo base al procesar 2 ratas más (R4 y R5). Para perfeccionar la fijación se hace aún más rápida la primera perfusión con solución salina, con 2 min como máximo (garantizando que la solución salina ha pasado por todo el cuerpo del animal y este se encuentra suficientemente limpio de sangre), inmediatamente después se pasa el fijador (que logra la fijación del animal completo). Con lo anterior se busca la reducción del tiempo de cese de la vida del animal y la fijación química.

Se obtienen los nervios ciáticos bilaterales de los animales (se obtienen otros tejidos como cerebro y riñones), se cortan los nervios ciáticos en pedazos menores de 1 mm³ que se dejan en el fijador por una noche (al siguiente día se continúa la técnica).

Para evitar los posibles sedimentos por el contraste, se preparan nuevas soluciones de uranilo y plomo (un día previo a su uso) con nuevos reactivos y con mayor cuidado en la limpieza durante su elaboración, además, el día de uso se centrifugan a 12,000 rpm por 10 min. Se agrega 1 baño extra con acetona al 100% posterior a cada contraste. Las soluciones de perfusión y las resinas se preparan el día de uso. El resto del protocolo se sigue como se encuentra descrito en el protocolo base extremando la limpieza de todo el proceso.

Se obtuvieron 3 nuevos bloques de nervio ciático de cada rata (los bloques se nombran R4-1, R4-2, R4-3 y R5-1, R5-2, R5-3). Obtengo cortes ultrafinos de 60 nm de espesor, e imágenes de STEM de los bloques R4-1 (**Fig. 22**), R4-2 (**Fig. 23**), R5-1(**Fig. 24**) y R5-3 (**Fig. 25**).

Posteriormente, el bloque R4-2 se recubre con una capa fina de la mezcla paladio/platino en el Laboratorio de Microscopía Electrónica del Departamento de Biología Celular y Tisular de la Facultad de Medicina, UNAM, por el profesor Armando Zepeda. El bloque recubierto se utiliza para la técnica FIB-SEM, con la que obtengo imágenes (**Fig. 26 y 27**) con el detector de electrones secundarios SE2.



Figura 22. STEM - mielina del bloque R4-1. Micrografía electrónica de transmisión de un corte transversal de nervio ciático obtenida con STEM. Se observa la ultraestructura característica de la mielina compactada que recubre a un axón donde se aprecian las líneas densas mayores. Se observan las partículas de anclaje como un patrón de puntillado electrodenso sobre la mielina (flechas blancas). Además, se observan claramente las demás membranas limitando los diferentes espacios celulares.

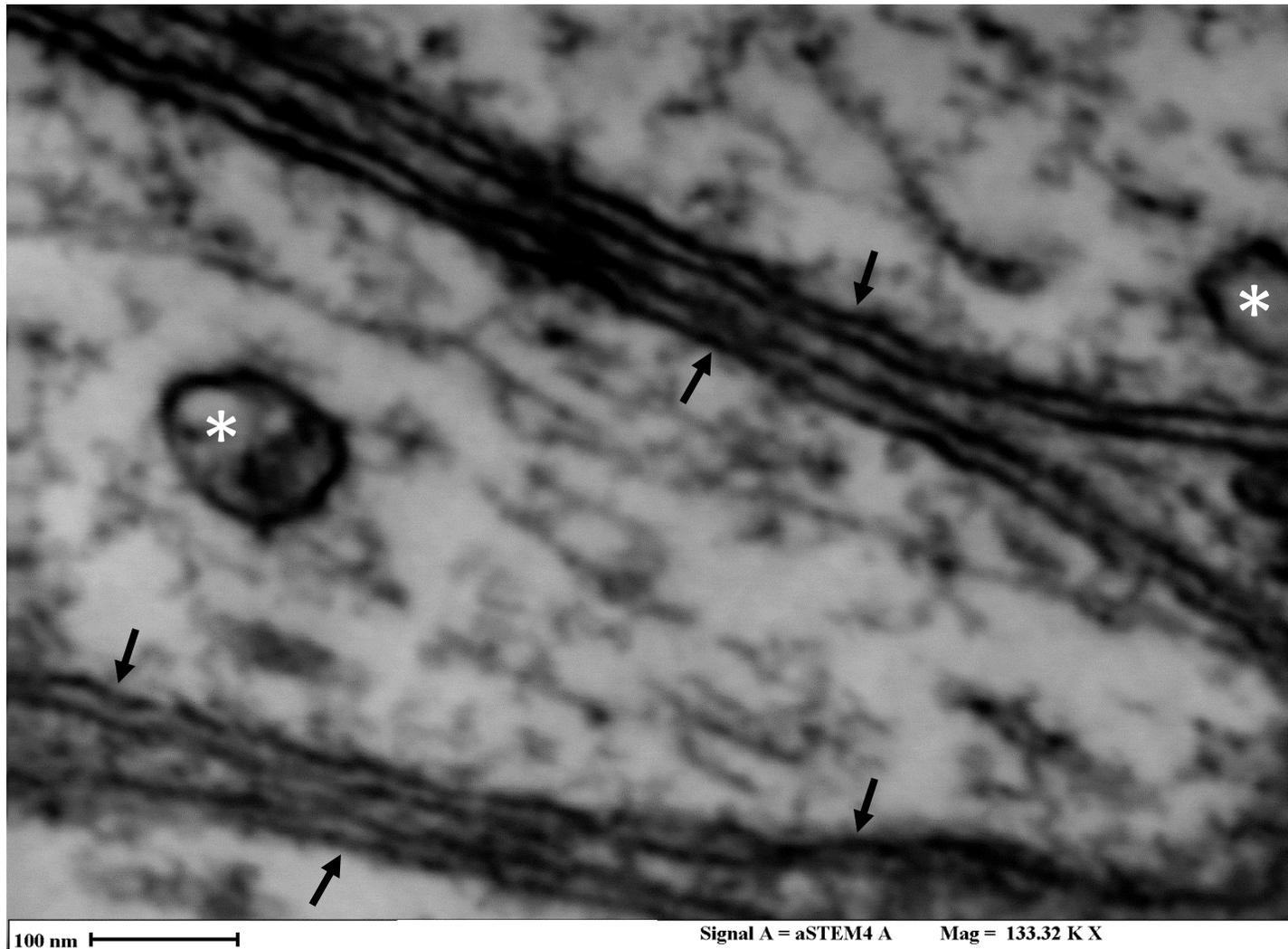


Figura 23. STEM – nervio amielínico del bloque R4-2. Micrografía electrónica de transmisión de un corte transversal de nervio ciático obtenida con STEM. Se observa un contraste adecuado de las membranas de los nervios amielínicos (flechas negras), de los neurotúbulos y neurofilamentos (que se encuentran ampliamente distribuidos dentro de los nervios) y de la membrana de las mitocondrias (* blanco).

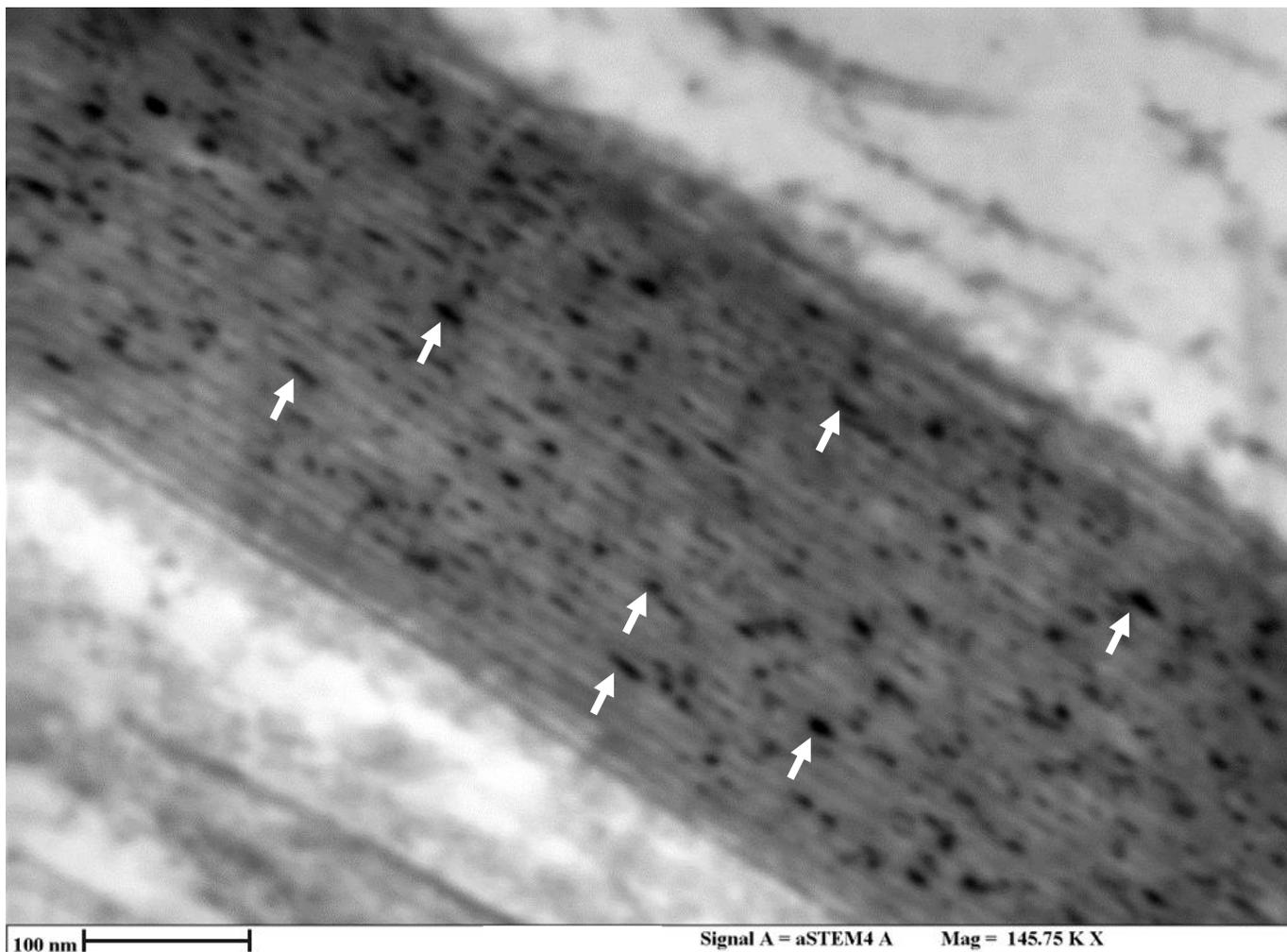


Figura 24. STEM - mielina del bloque R5-1. Micrografía electrónica de transmisión de un corte transversal de nervio ciático obtenida con STEM a una magnificación de 145,750 X. Se observa la ultraestructura normal de la mielina: compactada, con líneas densas mayores y partículas de anclaje (flechas blancas).



Figura 25. STEM - mitocondria en nervio amielínico del bloque R5-3. Micrografía electrónica de transmisión de un corte transversal de nervio ciático obtenida con STEM. Se observa un contraste adecuado de las membranas de los nervios amielínicos (flecha), de los neurotúbulos y neurofilamentos, y de las membranas externa e interna de la mitocondria (*).



Figura 26. FIB-SEM - nervio ciático del bloque R4-2. Micrografía electrónica de corte transversal de nervio ciático obtenida con FIB-SEM. Se observan las partículas de anclaje de la mielina (flechas blancas), pero no se distingue claramente la ultraestructura multilaminar de la misma. En general se ve bajo el contraste, por lo que no se ven claramente las mitocondrias (*), los neurotúbulos y neurofilamentos dentro del nervios, ni las membranas de las SCs que rodean a los nervios mielínicos. Área dañada por la carga de los electrones (cuadro rojo).



Figura 27. FIB-SEM - mielina del bloque R4-2. Micrografía electrónica de corte transversal de nervio ciático obtenida con FIB-SEM. Se observan las partículas de anclaje de la mielina, pero no se observa claramente la estructura multilaminar. En el área externa del borde de la mielina se observa un puntilleo (flechas), podría ser porque la imagen es de barrido y son imágenes de planos más profundos o porque los sedimentos persisten. Se observan las crestas de una mitocondria (*) y los neurotúbulos y neurofilamentos dentro del nervios.

En las últimas imágenes representativas de STEM se observa el tejido mejor conservado, pues se ve claramente la ultraestructura característica de la mielina: compactada, con líneas densas mayores intercaladas con las intraperiodo y partículas de anclaje (Liu et al., 2019). El contraste es adecuado, pues se ven claramente las membranas de los nervios y mitocondrias, y los neurotúbulos y neurofilamentos. No se observan sedimentos, el tejido se encuentra limpio. Además, se logró obtener una resolución suficiente a mayores aumentos, llegando hasta 145,750 X.

Durante la obtención de cortes ultrafinos para STEM encontramos que, al tener el contraste (metales pesados) en bloc se dañan con mayor facilidad las cuchillas de vidrio y de diamante. Por lo anterior, una limitación de este protocolo es la cantidad y costo de las cuchillas. Asimismo, el uso del contraste en bloc hace que se gasten más reactivos al tener que poner en inmersión las muestras. Sin embargo, hace que sea más rápido cuando se procesan más muestras al mismo tiempo y se pueden procesar diferentes tipos de tejidos en la misma solución de contraste.

En las imágenes representativas de FIB-SEM observamos más detalles en el tejido en general, con la posibilidad de llegar a mayores aumentos también, obteniendo una buena resolución a 21,740 X en barrido. Observamos que el contraste no se ve tan bien como con microscopía electrónica de transmisión, pero es suficiente para distinguir membranas (tanto de SCs como de mitocondrias), así como neurotúbulos y neurofilamentos.

En cuanto a la ultraestructura de la mielina observamos las partículas de anclaje y que está compactada, pero no se observan claramente las líneas densas mayores intercaladas con las intraperiodo. Esto último puede ser porque la técnica aún necesita mejoras o por ser

imágenes de barrido. Por la escasa cantidad de estudios sobre mielina con FIB-SEM no es posible comparar estos resultados, pues los estudios se enfocan a la estructura 3D (nanotomografía) de la fibra nerviosa y no utilizan mayores aumentos para detalles de la ultraestructura.

El uso del microscopio electrónico implica la interacción del haz de electrones con la muestra. Esta interacción irradia la muestra lo que produce calor por acúmulo de cargas. Si la irradiación es continua, puede resultar en cambios físicos, químicos o en la destrucción de la muestra (Ayache et al., 2010). Lo anterior explica el área dañada que se observa en la **Fig. 26** (cuadro rojo), donde dicha área se usó, durante un momento, exclusivamente para enfocar, produciendo un daño en la superficie. Quedando como aprendizaje que, para enfocar sin cambiar la dosis de electrones recibidos o el voltaje de aceleración, se debe usar un área cercana pero fuera del área de interés (ROI) donde se tomará la imagen.

4.4 Protocolo final para la preparación de muestras

El protocolo base queda de la siguiente manera con los últimos cambios:

- Perfusión con solución salina (NaCl 0.9%) durante máximo 2 min. (que la solución pase por todo el animal y limpie la mayoría de la sangre), seguida por el fijador de Karnovsky (glutaraldehído 2.5%, paraformaldehído 2% en buffer de cacodilatos 0.1 M, pH 7.2) hasta que el animal quede completamente fijado.

*Ambas soluciones de perfusión se preparan el día de uso.

- Se obtiene el tejido, se corta del tamaño en el que será procesado (1 mm³) y se deja en el fijador Karnovsky por una noche.

- Lavados con buffer de cacodilato de sodio 0.1M pH7.3 3 x 15 min
- Postfijación con OsO4 1% en agua MilliQ 2 horas
- Lavados con buffer de cacodilato de sodio 2 x 15 min
- Deshidratación con acetona:
 - Al 25 % 1 x 15 min
 - Al 50 % 1 x 15 min
 - Al 75 % 1 x 15 min
 - Al 95 % 1 x 15 min
- Baños en Acetona al 100% 3 x 15 min c/u.
- Sol. saturada de Acetato de Uranilo en acetona overnight

*Solución reparada 1 día previo y justo antes a su uso se centrifuga a 12,000 rpm por 10 min.

- Baños en Acetona al 100% 3 x 15 min
- Sol. saturada de acetato de plomo en acetona x 2 horas / TA

* Solución reparada 1 día previo y justo antes a su uso se centrifuga a 12,000 rpm por 10 min.

- Baños en Acetona al 100% 3 x 15 min
- Preparación de resina EMBED-812

Mezcla A: 50 ml (DDSA=30ml/Epon 812=20ml).

Mezcla B: 50ml (NMA=23ml/Epon 812=27ml).

Proporción para preparar el Epon Puro para la inclusión:	
	Hard
Mezcla A.	3 ml
Mezcla B.	7 ml
DMP30	0.2 ml

- Infiltración gradual con resina
 - EPON : acetona 100% (1:2) x 1 hora
 - EPON : acetona 100% (1:1) x 1 hora
 - EPON : acetona 100% (2:1) Overnight
 - EPON Overnight
- Incluir en moldes con EPON y polimerizar x 24 horas a 60°C
- Obtenemos los bloques polimerizados
- Tallado de la pirámide, obtención de cortes semifinos, que se tiñen con azul de toluidina; y de cortes ultrafinos, que se montan en rejillas con formvar para observar con STEM
- Preparación del bloque para la técnica de FIB-SEM

4.5 Protocolo de trabajo para la técnica FIB-SEM

Para la técnica de FIB-SEM se siguieron las recomendaciones dadas por la compañía Zeiss, el día de la instalación, sobre los programas con los que cuenta el microscopio. Posteriormente se hicieron diversas pruebas con las muestras para este protocolo.

El protocolo que se usó para la obtención de imágenes con la técnica FIB-SEM es para el microscopio Crossbeam 550 de Zeiss que se encuentra en el Departamento de Neuromorfología Funcional de la Dirección de Investigaciones en Neurociencias del INPRFM. En este protocolo se usan los programas SmartSEM (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Oberkochen, Germany; nativo del microscopio Zeiss) para la alineación del bloque y para la toma de imágenes con SEM, y el programa Atlas Engine (Fibics incorporated, Ottawa,

Canada; compra de la licencia con Zeiss) para el procesamiento con FIB-SEM y la toma de imágenes de SEM.

4.5.1 Descripción del protocolo

Posterior a la obtención de cortes semifinos y ultrafinos para transmisión, el bloque se corta (ej. con un alicate para cortar o una navaja) para obtener un bloque con una altura máxima de 5 mm. El tamaño máximo de 5 mm facilita obtener la distancia de trabajo y ángulo de inclinación ideal para trabajar con el doble haz sobre la muestra, ya que con este tamaño logramos que la superficie del bloque esté eucétrica. Después, se lima la base lo más recta posible para pegarse a un soporte portamuestras (stub) de aluminio con plata coloidal. Una vez que el bloque está firmemente pegado al stub se recubre con una fina capa de metal por medio de deposición por pulverización catódica (**Fig. 28**).

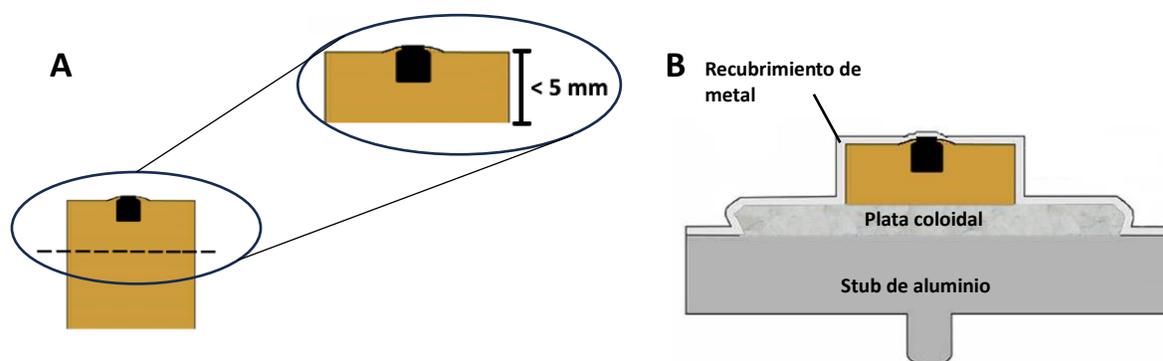


Figura 28. Preparado de bloques para el Crossbeam 550. A) Corte del bloque hasta obtener una altura menor o igual a 5mm. **B)** Montaje y pegado del bloque en el stub con plata coloidal y recubierto por una fina capa de metal.

El recubrimiento de metal le da estabilidad al bloque cuando recibe el haz de electrones y el haz de iones. Posteriormente se introduce el bloque a la cámara del microscopio, donde se utiliza el programa SmartSEM para encontrar el punto de eucentricidad y coincidencia de los dos haces a una inclinación de 54° (la disposición que tienen la fuente de iones y la fuente de electrones) y a una distancia de trabajo (WD) de aproximadamente 5 mm. Esta posición permite que el haz de iones elimine material de la superficie de la muestra y que el barrido del haz de electrones pueda generar una imagen (Fig. 29).

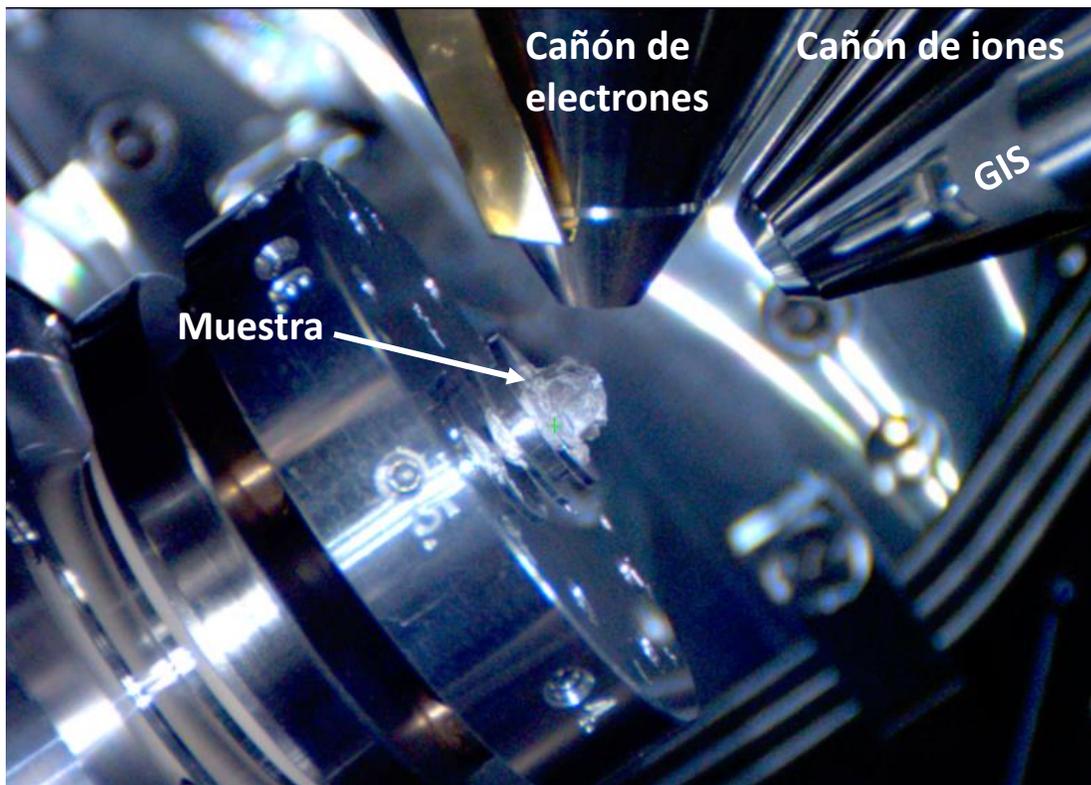


Figura 29. Vista del interior de la cámara del Crossbeam 550. Se observa la muestra inclinada a 54° y su relación con los cañones de electrones y de iones y con el sistema de inyección de gas (GIS).

Con la inclinación de 54° de la muestra es posible tener una vista panorámica de la superficie del bloque (si el recubrimiento metálico es suficientemente fino) y tener una idea más precisa del lugar donde se encuentra nuestra área de interés (ROI; **Fig. 30**). En caso de que el recubrimiento metálico sea más grueso nos guiaremos con las imágenes de los cortes semifinos por microscopía fotónica.

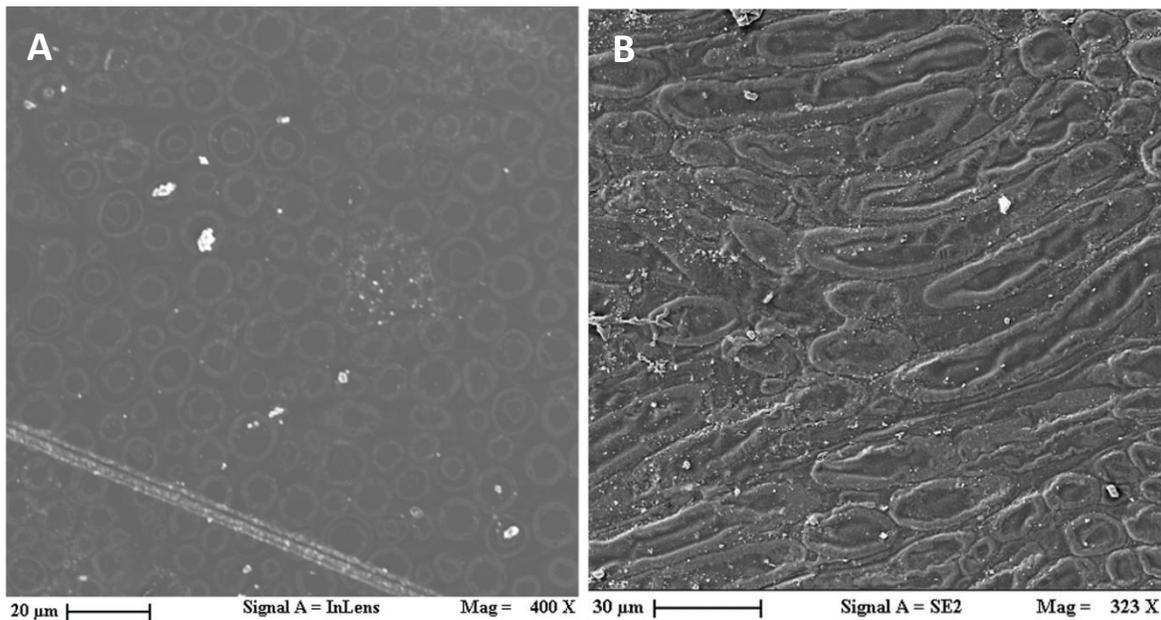


Figura 30. Vista de la superficie del bloque en SmartSEM. Micrografías electrónicas de la superficie de 2 bloques obtenidas con diferentes detectores: **A)** InLens y **B)** SE2. Ambos bloques tienen recubrimiento de platino/paladio.

Para los siguientes pasos se utiliza el programa SmartFIB (nativo del microscopio) o, como en nuestro caso, el programa Atlas Engine. Este último tiene como ventaja una interface más sencilla e intuitiva. Además, cuenta con un área de nanotomografía donde tiene la secuencia de pasos para realizar una serie de imágenes por medio de la secuencia desbaste - toma de

imágenes, lo que hace que sea un proceso más automatizado, ahorrando tiempo y marcando la secuencia de cada paso.

A continuación, se procede a elegir el ROI en la superficie del bloque, que marcamos con una capa de platino (por medio del sistema de inyección de gas del microscopio) para dar aún mayor estabilidad a esta parte de la muestra. Además, es necesario exponer la cara lateral del ROI (la cara que será fotografiada) por medio de dos trincheras: una gruesa que nos abrirá espacio (el tamaño va con relación a la profundidad que queremos obtener del ROI) para el acceso a los dos haces y para el retorno de los electrones procedentes de la muestra hacia los detectores; y una fina que pulirá la superficie del ROI dejándola lista para la toma de imágenes. La trinchera gruesa puede ir acompañada de unas trincheras laterales al ROI (con las mismas características que la trinchera gruesa) y se realiza desde que se hacen las trincheras o hasta que se van tomando imágenes se van desbastando estas áreas. Las trincheras laterales tienen como fin evitar perder electrones al tener una pared de muestra tan cerca del ROI (**Fig. 31**).

La trinchera gruesa se realiza con una aceleración del haz de iones de 30 kV y una corriente de 30 nA; la trinchera fina y el desbaste de la muestra se hacen con una aceleración de 30 kV y una corriente de 700 pA; y la deposición de platino se realiza con condiciones del haz de 30 kV y 1.5 nA.

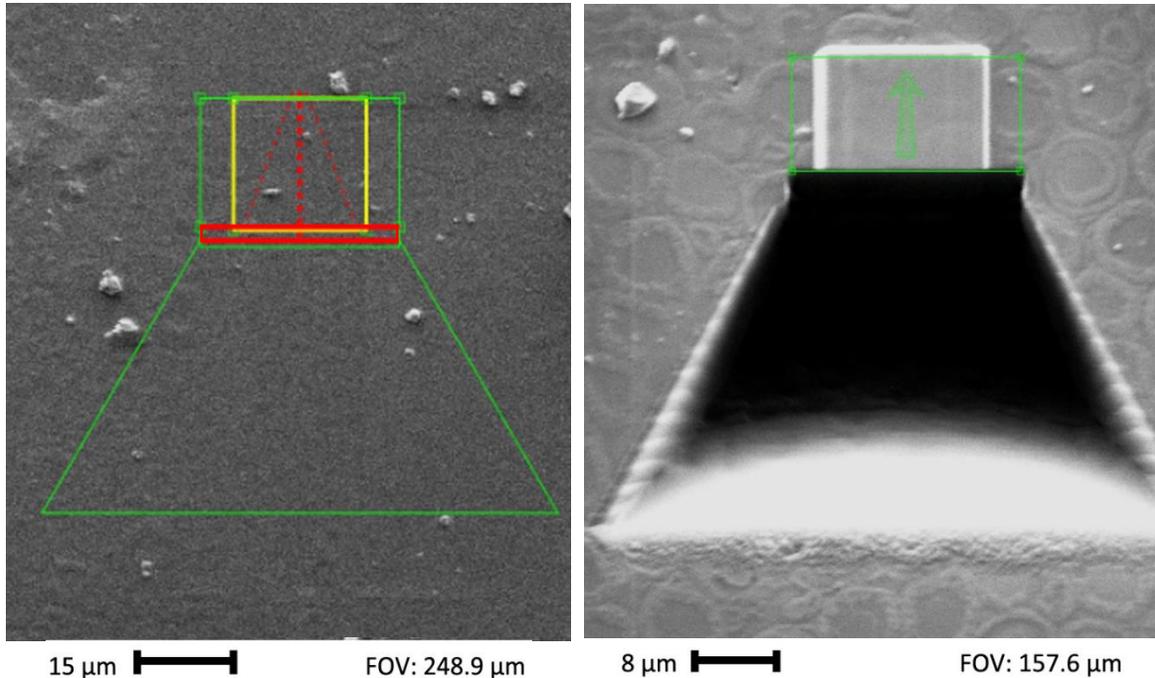


Figura 31. Elección del área de interés en Atlas Engine. Micrografías electrónicas que ejemplifican: **A)** Interfase de Atlas Engine donde se marca desde un inicio el área de interés (cuadro amarillo) y el área de dos trincheras: una gruesa (cuadro verde) y una fina (cuadro rojo). **B)** Se muestra el ROI con la capa de platino y las trincheras ya hechas; se marca con un cuadro verde el área a la que se desbastará, que, en este caso, incluye al ROI general y a las trincheras laterales.

Cuando tenemos el ROI general listo para iniciar con la secuencia desbaste - toma de imágenes, vamos a seleccionar el o los detectores con los que se tomarán las imágenes (en el programa Atlas Engine se pueden generar imágenes de 2 detectores al mismo tiempo) y un nuevo ROI (específico) en la pared que será fotografiada (**Fig. 32**). Es recomendable que el nuevo ROI sea lo más específico y limitado posible para que la seriación sea más estable, pues áreas grandes (sin sacrificar resolución) tardarán más en ser fotografiadas y esto aumentará el tiempo de permanencia de los haces sobre la muestra (dwell time) lo que hace más probable el daño a la muestra y en consecuencia la disminución de la calidad de las imágenes o, en el peor de los casos, que el ROI general sea inservible.

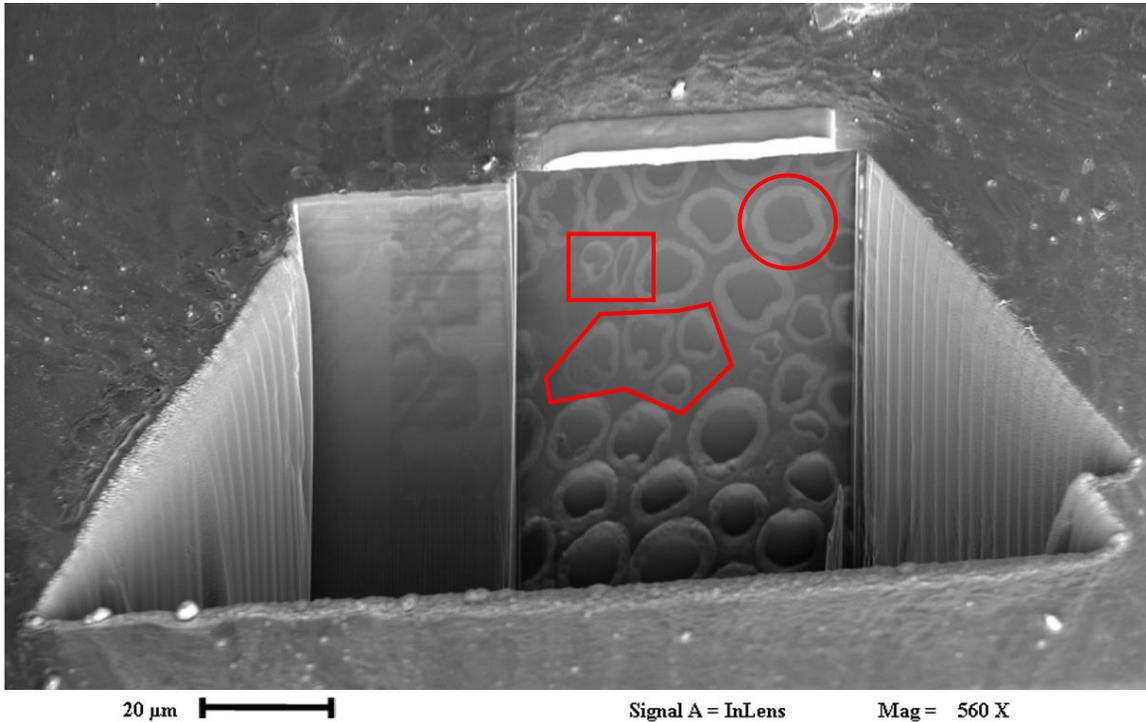


Figura 32. ROI específico en la pared del área de interés general. Micrografía electrónica con ejemplos de ROI específico (fugas de línea roja) sobre la pared del área de interés general, que puede ser con figuras pregeneradas (cuadro/rectángulo, círculo) o libre.

Posteriormente estableceremos el foco, brillo y contraste para cada detector (determinado por cada muestra), el tamaño de pixel y el grosor de la rebanada a desbastar. Además, podemos seleccionar y establecer otras indicaciones que se le pueden dar al proceso automatizado como determinar que el equipo revise y corrija foco y astigmatismo, el tiempo de calibración previo al inicio de la seriación, que al avanzar de anterioridad revise el avance efectivo de la seriación (se determina en nm), realización de marcas de seguimiento para disminuir la posibilidad de desajuste en el seguimiento del ROI general, entre otros.

Finalmente se puede iniciar la seriación, donde el programa primero realizará una secuencia de desbaste - toma de imágenes de calibración con parámetros de resolución mínimos (esta calibración también puede omitirse). Posteriormente iniciará la seriación con los parámetros elegidos y el equipo dará un tiempo aproximado de terminación del trabajo, que depende del tamaño del ROI general, del ROI específico, grosor de la rebanada a desbastar y del dwell time (con relación a la resolución de la imagen). Las imágenes que se van obteniendo se exportan automáticamente al programa Atlas 5 (Fibics incorporated, Ottawa, Canada), donde se puede hacer una edición inicial de las imágenes, como alineado de la serie, ajuste de brillo/contraste, invertir colores, selección del detector (o mezcla de ambos), entre otros.

El número de imágenes obtenidas con la seriación depende del tamaño del ROI general y del grosor de la rebanada a desbastar (entre más delgada sea la rebanada obtenemos más información, pero aumenta el tiempo de la seriación). El procesamiento adicional y análisis de las imágenes finales se puede hacer con otros programas de edición como Image J FIJI, donde se puede obtener la reconstrucción 3D del ROI general, segmentar elementos específicos, etc.

En la **Fig. 33** se muestra parte de una pequeña seriación (200 imágenes en total) de imágenes de nervio ciático obtenidas con FIB-SEM, realizadas con la señal de electrones secundarios (SE2). Se seleccionó un tamaño del pixel de 10 nm y grosor de rebanada a desbastar de 50 nm. En el programa Atlas 5 se hace la alineación de todas las imágenes, se invierte el color y se ajustan los parámetros de brillo/contraste.

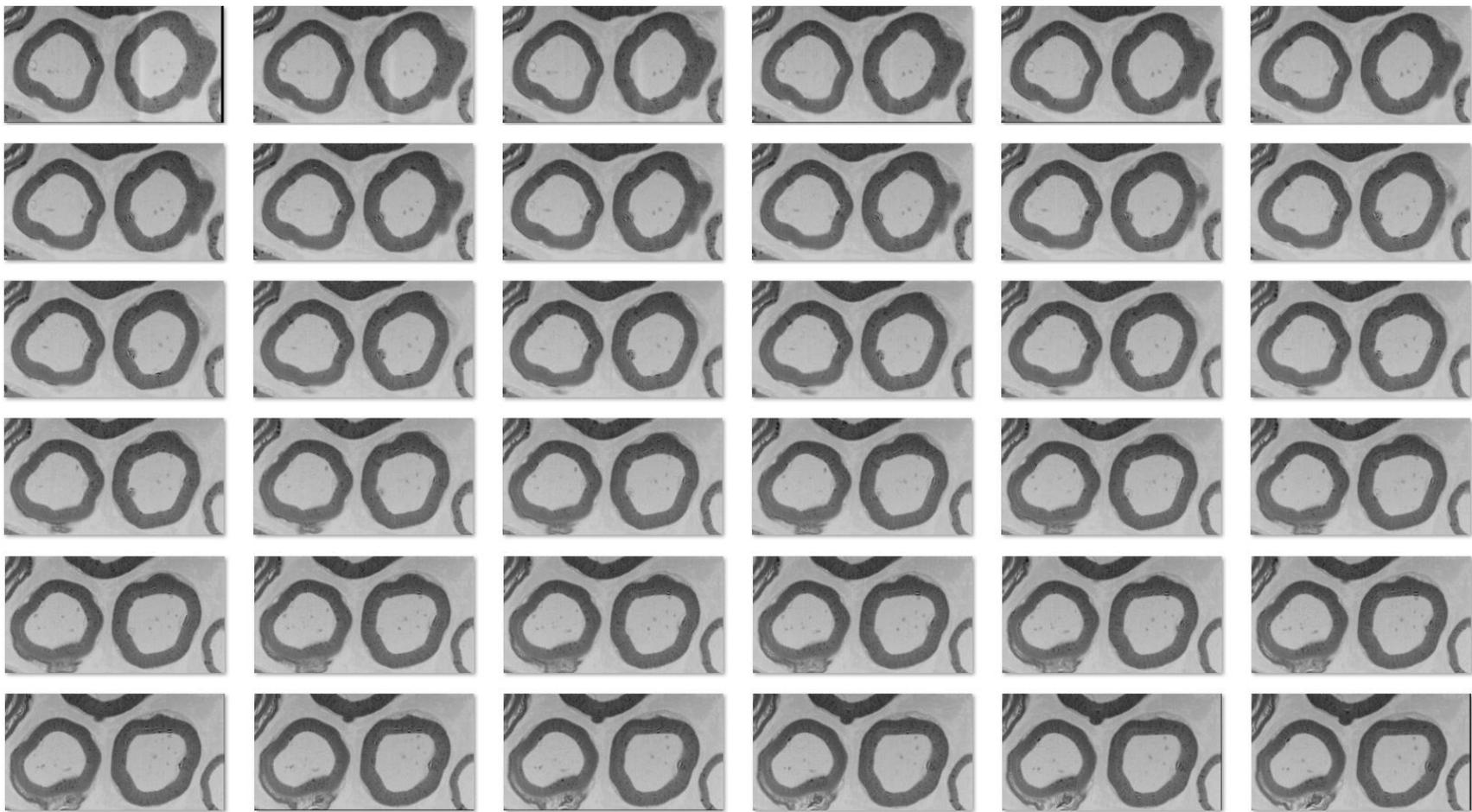


Figura 33. Seriación de ROI de nervio ciático. Micrografías electrónicas que son parte de una seriación de 200 imágenes de nervio ciático en plano transversal.

5. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

En este proyecto se estandarizó un protocolo para STEM y FIB-SEM en el que, con ambas técnicas, se preserva la mielina. Además, concluimos que con la suficiente experiencia se puede usar 1 sola muestra para ambas técnicas. También se desarrolló satisfactoriamente un protocolo de trabajo para obtener una seriación de imágenes de un área de interés con la técnica FIB-SEM, específicamente, para el microscopio Crossbeam 550 de Zeiss.

Los resultados con STEM y FIB-SEM se complementan y, con este protocolo, se ahorra tiempo de preparación pues se obtiene el doble de información con 1 sola muestra, ya que, además de la nanotomografía, por la forma en que se acomoda la muestra para FIB-SEM (54°), se pueden obtener imágenes en otro plano anatómico. Dicho lo anterior, encontramos que la técnica FIB-SEM es una ventaja importante para el estudio de la mielina y de los nervios en general. Además, dado que los equipos FIB-SEM son microscopios electrónicos de barrido de emisión de campo de alta resolución nos dan más información que los equipos SEM, por lo que podemos aprovechar esta ventaja para obtener más información del tejido cuando tenemos muestras con una adecuada preparación.

Con los resultados obtenidos concluimos que este protocolo puede mejorarse, por lo que se continuarán haciendo pruebas para evidenciar si se pueden obtener más datos ultraestructurales con la técnica FIB-SEM, tanto en la mielina como en otros tejidos. En la serie de imágenes por FIB-SEM observamos que el proceso de FIB-SEM fue bastante estable, por lo que concluimos que la dureza de la resina es la adecuada para resistir ambos haces y la capa de platino fue suficiente para dar la conducción necesaria a la muestra.

Este protocolo tiene como ventajas que puede ser modificado fácilmente para satisfacer las limitaciones de tiempo y/o reactivos de cada laboratorio, así como ser adecuado a otros tejidos biológico. Es importante tener en cuenta que parte de la muestra será destruida con la técnica de FIB-SEM, por lo que es necesario obtener suficiente material para ser analizado con TEM primero.

6. REFERENCIAS

- Alvarez-Leefmans, F.J., León-Olea, M., Mendoza-Sotelo, J., Alvarez, F.J., Antón, B., Garduño, R. 2021. Immunolocalization of the Na(+)-K(+)-2Cl(-) cotransporter in peripheral nervous tissue of vertebrates. *Neuroscience*. 104(2):569-82. doi: 10.1016/s0306-4522(01)00091-4.
- Ayache, J., Beaunier, L., Boumendil, J., Ehret, G., Laub, D., 2010. *Sample Preparation Handbook for Transmission Electron Microscopy, Methodology*. Springer New York. doi: 10.1007/978-0-387-98182-6
- Belin, S., Zuloaga, K.L., Poitelon, Y. 2017. Influence of mechanical stimuli on Schwann cell biology. *Front Cell Neurosci* 11:347. doi: 10.3389/fncel.2017.00347
- Cavaletti, G., Tredici, G., Braga, M., & Tazzari, S. 1995. Experimental Peripheral Neuropathy Induced in Adult Rats by Repeated Intraperitoneal Administration of Taxol. *Experimental Neurology*, 133(1), 64–72. doi: 10.1006/exnr.1995.1008
- Cortadellas, N., Garcia, A., Fernández, E., 2010. Transmission Electron Microscopy in Cell Biology: sample preparation techniques and image information. In: Seoane, J.R. (Ed.), *Handbook of instrumental techniques from CCiTUB*, Barcelona.
- Drobne, D., Milani, M., Zrimec, A., Leser, V., Berden Zrimec, M. 2005. Electron and ion imaging of gland cells using the FIB/SEM system. *J Microsc*. 219(Pt 1):29-35. doi: 10.1111/j.1365-2818.2005.01490.x.
- Duncan, I.D., Radcliff, A.B. 2016. Inherited and acquired disorders of myelin: The underlying myelin pathology. *Exp Neurol*. 283(Pt B):452-75. doi: 10.1016/j.expneurol.2016.04.002.
- Dyck, P.J., Lais, A.C., Giannini, C., Engelstad, J.K. 1990. Structural alterations of nerve during cuff compression. *Proc Natl Acad Sci U S A*.87(24):9828-32. doi: 10.1073/pnas.87.24.9828.
- Erwig, M.S., Patzig, J., Steyer, A.M., Dibaj, P., Heilmann, M., Heilmann, I., Jung, R.B., Kusch, K., Möbius, W., Jahn, O., Nave, K.A., Werner, H.B., 2019. Anillin facilitates septin assembly to prevent pathological outfoldings of central nervous system myelin. *eLife*, 8, e43888. doi: 10.7554/eLife.43888
- Fitzgerald, M., Woolf, C., Gibson, S., & Mallaburn, P. 1984. Alterations in the structure, function, and chemistry of C fibers following local application of vinblastine to the sciatic

nerve of the rat. *The Journal of Neuroscience*, 4(2), 430–441. doi: 10.1523/jneurosci.04-02-00430.1984

Gerber, D., Pereira, J.A., Gerber, J., Tan, G., Dimitrieva, S., Yángüez, E., Suter, U. 2021. Transcriptional profiling of mouse peripheral nerves to the single-cell level to build a sciatic nerve Atlas (SNAT). *Elife*. 10:e58591. doi: 10.7554/eLife.58591.

Geuna, S., Raimondo, S., Ronchi, G., Di Scipio, F., Tos, P., Czaja, K., Fornaro, M. 2009. Chapter 3: Histology of the Peripheral Nerve and Changes Occurring During Nerve Regeneration. *International Review of Neurobiology*, 27–46. doi:10.1016/s0074-7742(09)87003-7

Hartline, D.K., 2008. What is myelin? *Neuron Glia Biology*, 4(02), 153. doi:10.1017/s1740925x09990263

Inokuchi, T., Yokoyama, R., Higashi, R., Takahashi, Y., Miyajima, S. 1991. Ultrastructure of the perineurial cell of the sciatic nerve in rats--a transmission and scanning electron microscopic study. *Kurume Med J.* 38(4):221-32. doi: 10.2739/kurumemedj.38.221.

Kandel, E.R., Schwartz, J.H., Jessell, T.M., Siegelbaum, S.A., Hudspeth, A.J., Mack, S. (Eds.), 2013. *Principles of Neural Science*, Fifth Edition. McGraw Hill.

Kühnel, W., 2003. *Color atlas of cytology, histology and microscopic anatomy* (4th edition). Thieme, Stuttgart-New York.

Leis, A., 2018. Electron Tomography: A Primer. In: Hanssen, E. (eds) *Cellular Imaging, Electron Tomography and Related Techniques*. Springer, Cham., pp. 1-32. doi: 10.1007/978-3-319-68997-5_1

Liu, B., Xin, W., Tan, J.-R., Zhu, R.-P., Li, T., Wang, D., Kana, S.-S., Xiong, D.-K., Lia, H.-H., Zhanga, M.-M., Suna, H.-H., Wagstaff, W., Zhou, C., Wang, Z.-J., Zhang, Y.-G., He, T.-C., 2019. Myelin sheath structure and regeneration in peripheral nerve injury repair. *Proc Natl Acad Sci USA.*, 116(44), 22347-22352. doi: 10.1073/pnas.1910292116

McMurrin, C.E., Jones, C.A., Fitzgerald, D.C., Franklin, R.J. 2016. CNS Remyelination and the Innate Immune System. *Front Cell Dev Biol.* 3;4:38. doi: 10.3389/fcell.2016.00038.

Merchant-Larios, H., Giraldo-Gomez, D.M., Castro-Dominguez, A., Marmolejo-Valencia, A., 2023. Light and focused ion beam microscopy workflow for resin-embedded tissues. *Front Cell Dev Biol.* 11, 1076736. doi: 10.3389/fcell.2023.1076736

- Mehdizadeh Kashi, A., Tahemanesh, K., Chaichian, S., Joghataei, M.T., Moradi, F., Tavangar, S.M., Mousavi Najafabadi, A.S., Lotfibakhshaiesh, N., Pour Beyranvand, S., Fazel Anvari-Yazdi, A., Abed, S.M., 2014. How to Prepare Biological Samples and Live Tissues for Scanning Electron Microscopy (SEM). *Galen Medical Journal*, 3(2), 63-80. doi: 10.31661/gmj.v3i2.267
- Mielańczyk Ł, Matysiak N, Klymenko O, et al. (2015) Transmission Electron Microscopy of Biological Samples. *The Transmission Electron Microscope - Theory and Applications*. InTech. doi: 10.5772/60680.
- Montalvo Arenas, C.E., 2010. Microscopía, en: *Temas de Histología del Departamento de Biología Celular y Tisular, Facultad de Medicina, UNAM*. Disponible en: https://bct.facmed.unam.mx/wp-content/uploads/2018/08/2_microscopia.pdf (último acceso el 20 de mayo 2023)
- Nave, K.A., Werner, H.B. 2014. Myelination of the nervous system: mechanisms and functions. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2014;30:503-33. doi: 10.1146/annurev-cellbio-100913-013101.
- O'Toole, E., van der Heide, P., Richard McIntosh, J., Mastronarde, D. 2018. Large-Scale Electron Tomography of Cells Using SerialEM and IMOD. In: Hanssen, E. (eds) *Cellular Imaging, Electron Tomography and Related Techniques*. Springer, Cham. doi: 10.1007/978-3-319-68997-5_4
- Pardo, I.D., Weber, K., Cramer, S., Krinke, G.J., Butt, M.T., Sharma, A.K., Bolon, B., 2019. Atlas of Normal Microanatomy, Procedural and Processing Artifacts, Common Background Findings, and Neurotoxic Lesions in the Peripheral Nervous System of Laboratory Animals. *Toxicologic Pathology*, 48(1):105-131. doi: 10.1177/0192623319867322
- Pavelka, M., Roth, J., 2015. Nerve Tissue and Disorders. In: *Functional Ultrastructure*. Springer, Vienna, pp. 356-379. doi: 10.1007/978-3-7091-1830-6_29
- Robertson, K., Gauvin, R., Finch, J. 2005. Application of charge contrast imaging in mineral characterization. *Minerals Engineering*, 18(3), 343–352. doi:10.1016/j.mineng.2004.06.004
- Segura-Anaya, E. 2022. Localización de la AQP1 en el nervio ciático normal y lesionado de la rata y diferencias entre rata y ratón en la localización de AQP1 y en los patrones de expresión de las isoformas de AQP del nervio ciático [Tesis doctoral]. Universidad Nacional Autónoma de México

- Steyer, A.M., Buscham, T.J., Lorenz, C., Hümmert, S., Eichel-Vogel, M.A., Schadt, L.C., Edgar, J.M., Köster, S., Möbius, W., Nave, K.A., Werner, H.B., 2022. Focused ion beam-scanning electron microscopy links pathological myelin outfoldings to axonal changes in mice lacking Plp1 or Mag. *Glia*. 71(3), 509-523. doi: 10.1002/glia.24290
- Steyer, A.M., Ruhwedel, T., Nardis, C., Werner, H.B., Nave, K.-A., Möbius, W., 2020. Pathology of myelinated axons in the PLP-deficient mouse model of spastic paraplegia type 2 revealed by volume imaging using focused ion beam-scanning electron microscopy. *Journal of Structural Biology*, 107492. doi: 10.1016/j.jsb.2020.107492
- Thetiot, M., Freeman, S.A., Desmazières, A. 2018. Immunohistochemical Analysis of Myelin Structures. In: Woodhoo, A. (eds) *Myelin. Methods in Molecular Biology*, vol 1791. Humana Press, New York, NY. doi: 10.1007/978-1-4939-7862-5_2
- Trapp, B.D., Kidd, G.J., 2004. Chapter 1: Structure of the Myelinated Axon. In: *Myelin Biology and Disorders*. Academic Press, pp. 3-27. doi: 10.1016/B978-012439510-7/50054-1.
- Ushiki, T., Ide, C. 1987. Scanning electron microscopic studies of the myelinated nerve fibres of the mouse sciatic nerve with special reference to the Schwann cell cytoplasmic network external to the myelin sheath. *J Neurocytol.* 16(6):737-47. doi: 10.1007/BF01611982. PMID: 3450786.
- Webb, R.I., Schieber, N.L. 2018. Volume Scanning Electron Microscopy: Serial Block-Face Scanning Electron Microscopy Focussed Ion Beam Scanning Electron Microscopy. In: Hanssen, E. (eds) *Cellular Imaging, Electron Tomography and Related Techniques*. Springer, Cham., pp. 117-148. doi: 10.1007/978-3-319-68997-5_5
- Wolf, S.G., Shimoni, E., Elbaum, M., Houben, L., 2018. STEM Tomography in Biology. In: Hanssen, E. (eds) *Cellular Imaging, Electron Tomography and Related Techniques*. Springer, Cham. doi: 10.1007/978-3-319-68997-5_2
- Zeiss, sitio web en español. <https://www.zeiss.com/microscopy/es/productos/sem-fib-sem/fib-sem/crossbeam.html> (último acceso el 20 de junio 2023)