

Las resinas más utilizadas son:

- * Resinas Epoxídicas: Araldita, Epón, Durcupán y L.R.White.
- * Resinas Poliéster: Vestopal W y Rigolac.
- * Metacrilatos: Hidroxipropil-metacrilato.

Tras la deshidratación, las muestras se colocan en una mezcla de acetona y araldita en partes iguales durante 1 - 2 horas. Luego, utilizando moldes de plástico (polietano, gelatina, silicona elastomérica, etc.), se sumergen en araldita nueva, orientándolas como corresponde. Después, llevamos a Estufa de Inclusión hasta que endurezca. Los mejores bloques se obtienen si se trabaja en ausencia total de oxígeno y al vacío.

Preparación de la Araldita

Mezclar en el siguiente orden:

Araldita 502	5,4 ml
Anhídrido Dodecenilsuccínico	4,6 ml
(catalizador)	
DMP-30 (acelerador)	0,2 ml

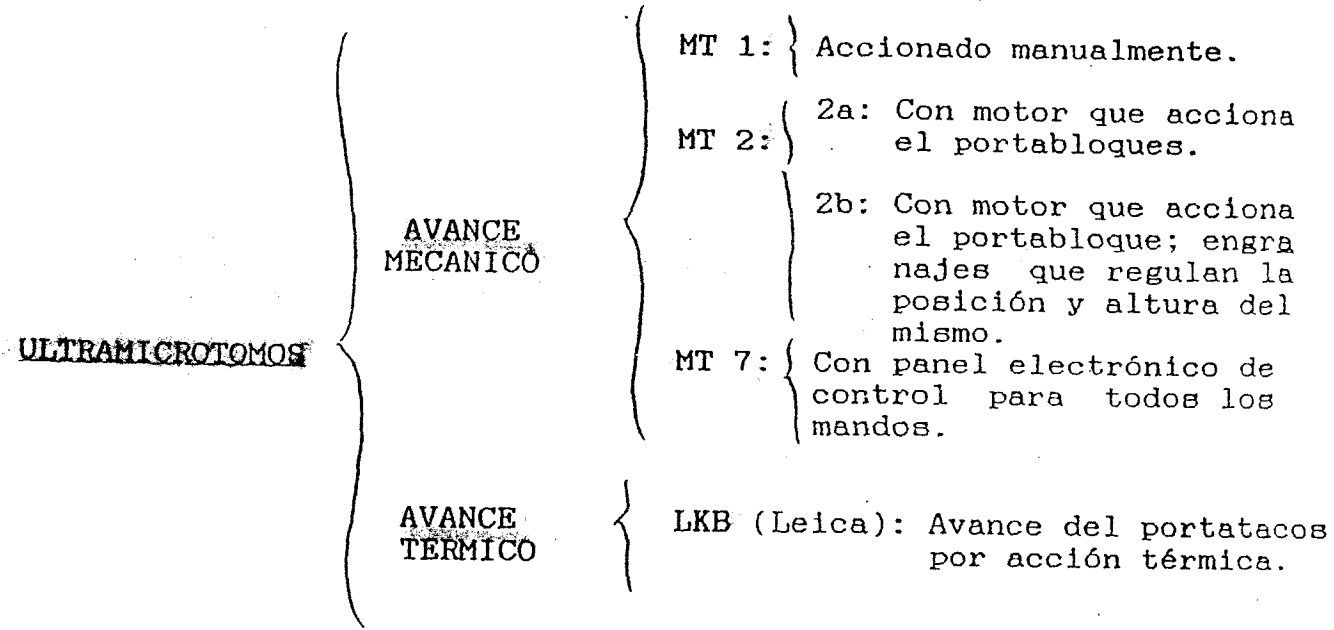
Agitar suavemente para evitar la formación de burbujas de aire. La mezcla debe quedar homogénea presentando una sola fase.

Ejecución de los Cortes: la observación mediante microscopía electrónica exige un espesor de corte del orden de algunas decenas de nanómetros debido a la baja capacidad de penetración del haz de electrones. Por ello, se deben obtener secciones de grosor inferior a una micra.

a) **Tallado del Bloque:** el bloque se talla para reducir la "superficie de corte" hasta lograr que en las secciones aparezcan sólo las estructuras histológicas deseadas (Fig. 17). La amplitud de la misma, no debe ser mayor que 1 mm si empleamos metacrilatos y menor que 0.5 mm si se trata de resinas epoxídicas. El tallado se realiza bajo lupa estereoscópica, y con la ayuda de una hoja de afeitado nueva transformamos el bloque en una pirámide truncada y cuya superficie superior represente una figura trapezoidal.

b) **Ultramicrotómicos:** quedó claro que son aparatos de alta precisión que permiten la obtención de cortes ultrafinos. Este, debe estar en una mesada que no tenga vibraciones, la temperatura debe ser constante y en el lugar de trabajo hay que evitar las corrientes de aire. A continuación, se enumeran los ultramicrotómicos, en orden cronológico, que fueron apareciendo según las necesidades laborales a

fin de simplificar la tarea del profesional técnico, como así también, asegurar la mayor preservación de los componentes ultraestructurales de la muestra en estudio:



Crioultramicrotomo

- A) ~~Dispositivos para adaptar en ultramicrotomos~~ MT 2 y LKB de "KIT CHRISTENSEN" o "RMC" de RMC, Inc.
- B) ~~Instrumento completo: crioultramicrotomo~~ Reichert-Jung SUPER NOVA LKB: "LKB CryoNova".

Estos instrumentos, si bien presentan un mecanismo de funcionamiento similar, se diferencian uno del otro por la distribución de sus partes constitutivas y el objetivo por el cual fue construido.

c) Cuchillas: * de Diamante: se obtienen por pulimentación del diamante (estado alotrópico del carbono), son duras y resistentes. Esto, hace que su vida útil sea prolongada y favorezca la realización de secciones de tejidos calcificados, previamente impregnados con metales pesados o de tejidos vegetales duros. Los cortes obtenidos son de excelente calidad a pesar que el filo de la cuchilla se realiza por pulimentación.

* de Vidrio: ya que las navajas de diamante son sumamente costosas es necesario recurrir a las de vidrio que, obviamente, son de menor calidad. Para confeccionarlas se parte de una barra de vidrio perfectamente lavada, enjuagada con agua destilada y seca (en el comercio, el vidrio se adquiere en forma de barras de 40 a 50 cm de longitud por 4 ó 5 cm de ancho y 0,4 ó 0,5 cm de alto).

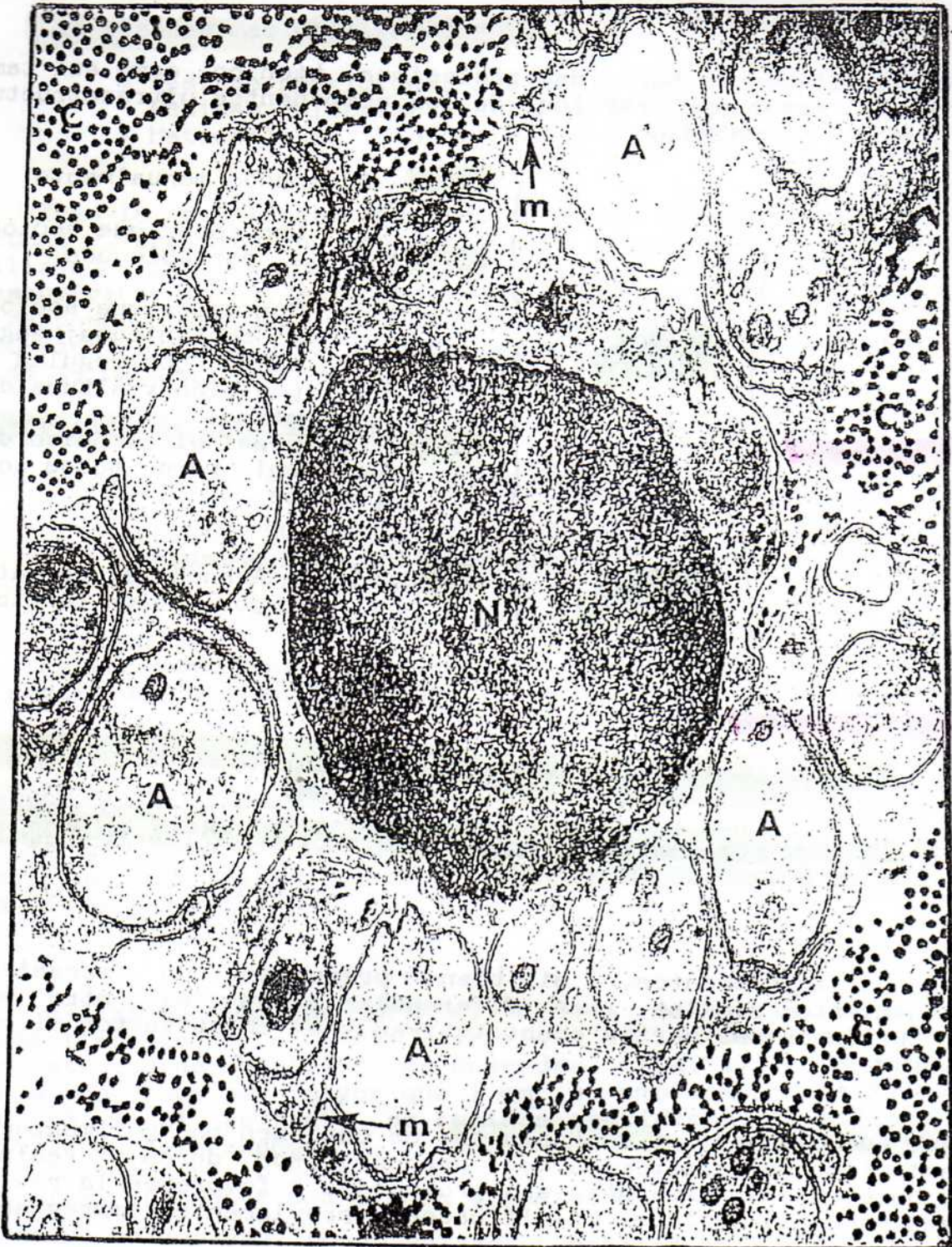
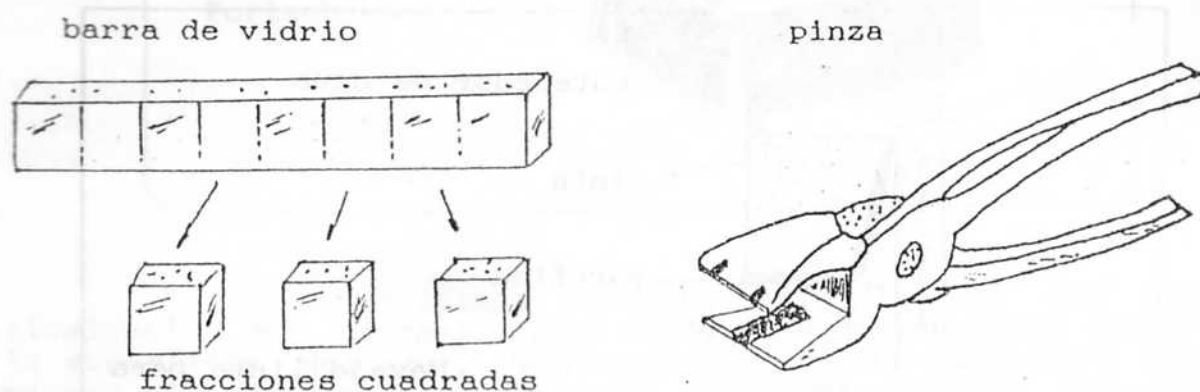


Fig. 17: Fotomicrografía de fibras nerviosas amielínicas en el nervio esplénico de gato, obtenida con un Microscopio Electrónico de Transmisión. Aumento aproximado 25.000. En la imagen se observa además, que varias fibras comparten la misma célula de Schwann. A: axón, m: mesaxón, N: núcleo de la célula de Schwann; C: colágeno. (Cortesía de L. G. Elfvin, *J. Ultrastruct. Res.*, 7:5, 1962).

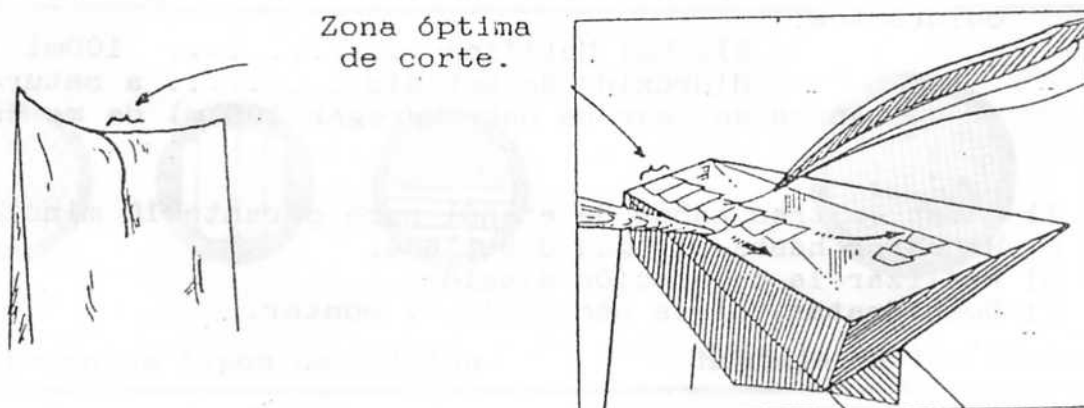
La barra se marca con un lápiz de diamante para luego cortarla, con la ayuda de una pinza especial, en fracciones cuadradas (actualmente, todas estas maniobras se pueden realizar con aparatos de alta precisión denominados "KNIFE-MAKER", que facilitan la confección de las navajas de vidrio además de ahorrar tiempo y material):



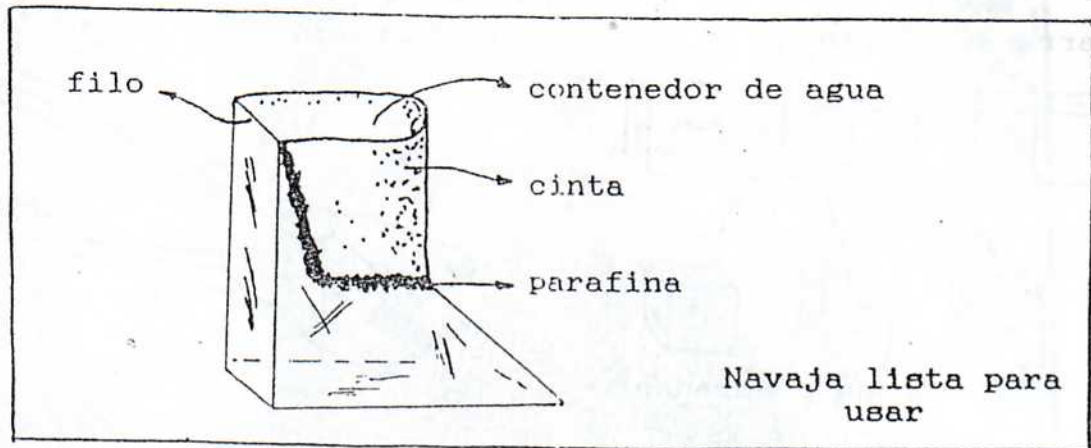
A continuación, marcamos en cada fracción una línea diagonal incompleta desde uno de sus vértices. Tras la partición, se obtienen dos cuchillas útiles:



Durante la fractura de la cuchilla se produce en el filo, borde superior vista de frente, una línea curva descendente. A partir de ella, ubicamos la zona óptima del filo para realizar los cortes:



Antes de adaptar la navaja en el portacuchillas del ultramicrotomo, construimos en ella una cubeta que más tarde llenaremos con agua destilada para recibir, en su superficie, los cortes ultrafinos. La misma se realiza con una cinta adhesiva que pegamos sobre la cara de fractura de la navaja dejando a la vez, la cavidad que contendrá el agua. Además, para que esta no se escurra, untamos los bordes de la cinta con parafina fundida:



d) **Cortes:** * **Semifinos:** denominados también cortes de control, ya que sirven para seleccionar la zona que preferentemente se desea observar en el corte ultrafino. Estos cortes tienen entre 0,5 y 1 micra de espesor y se colorean con Azul de toluidina al 0,5% en solución Bórax al 1% sobre platina a 60°C. Tras la coloración se puede montar directamente con Poly-mount.

Además, estos cortes presentan una gran definición, razón por la cual, es una excelente alternativa para la realización de preparados destinados al estudio bajo el microscopio óptico común (en realidad son técnicas delicadas y costosas y por ello, no se emplean en métodos de rutina). Sin embargo, si nuestro objeto de estudio así lo requiere, se pueden desarrollar distintas técnicas de coloración siguiendo el método que se describe a continuación:

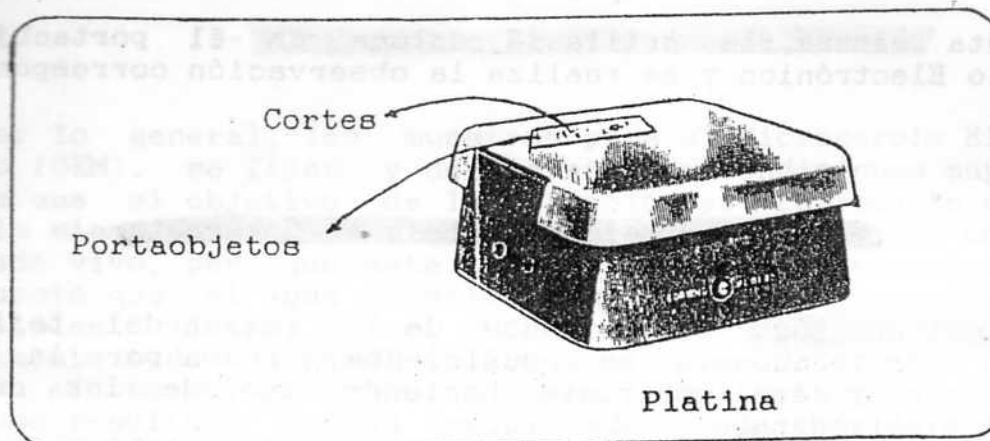
- 1) Realizar cortes con ultramicrotomo de 1 micra de espesor.
- 2) Colocarlos sobre una gota de agua destilada en portaobjetos limpio y dejar secar sobre platina a 60°C.
- 3) Tratar los cortes durante 15 minutos con una solución de Metanolato de potasio para hacer más fácil la difusión de los colorantes:

Alcohol Metílico..... 100ml

Hidróxido de potasio..... a saturación

Antes de usar se debe agregar 100 ml de metanol puro.

- 4) Lavar en tres baños de etanol puro durante 10 minutos.
- 5) Hidratar hasta el agua destilada.
- 6) Realizar la coloración elegida.
- 7) Deshidratar, si es necesario, y montar.



* **Finos:** al interferir la luz del sistema de iluminación del ultramicrotomo sobre los cortes finos depositados en la superficie del agua, se descompone en sus distintos colores que marcan el espesor de los mismos. Para microscopía electrónica se seleccionan los grises, plateados y dorados:

Colores que se obtienen	Espesor del Corte
Amarillo.....	280 a 320 nm
Verde.....	240 a 280 nm
Azul.....	190 a 240 nm
Púrpura.....	150 a 190 nm
Dorado intenso.....	120 a 150 nm
Dorado pálido.....	90 a 120 nm
Plateados.....	60 a 90 nm
Grises.....	menor a 60 nm

La cinta de cortes se estiran con vapores de xilol o cloroformo y luego se recogen con **grillas**. Generalmente se utilizan grillas de cobre de 3 mm de diámetro. En ciertas ocasiones, es necesario recubrir la grilla con película adhesiva "Formvar" para evitar que los cortes se desprendan por acción del bombardeo electrónico que se produce durante la observación microscópica:

