

FIJACION QUIMICA DE TEJIDOS
PARA MICROSCOPIA ELECTRONICA

Revisión

— **Dr. Orlando J. Castejón Sandoval.**

Sección de Microscopía Electrónica.
Instituto de Investigación Clínica.
Facultad de Medicina.
Universidad del Zulia.

I. Introducción.

II. Modos de aplicación de la solución fijadora.

Fijación por inmersión.

Fijación de tejidos in situ.

Tratamiento previo con hialuronidasa.

Fijación por perfusión vascular.

Fijación de tejidos humanos.

Fijación de cultivos celulares y de suspensiones celulares.

III. Fijación por el tetraóxido de osmio.

Concentración, pH y osmolaridad de las soluciones de tetraóxido de osmio.

Variantes de las soluciones de tetraóxido de osmio.

Soluciones de tetraóxido de osmio para fines específicos.

Control de la temperatura en la fijación con el tetraóxido de osmio.

Duración de la fijación con el tetraóxido de osmio.

Efecto de algunos iones sobre la fijación.

Química de la fijación por el tetraóxido de osmio.

Criterios de fijación satisfactoria con el tetraóxido de osmio.

IV. Fijación por aldehídos.

Química de la fijación por aldehídos.

Características ultraestructurales de la fijación por aldehídos.

V. Uso del permanganato como fijador.

Características ultraestructurales de la fijación por permanganato.

I. INTRODUCCION

Uno de los primeros objetivos que debe ser alcanzado para realizar estudios con el microscopio electrónico, es la preservación adecuada de las células y tejidos, mediante el proceso de fijación. La calidad de la preservación del tejido depende, fundamentalmente, del fijador utilizado y de su forma de aplicación. En la actualidad se dispone de dos tipos de fijadores excelentes para microscopía electrónica: el tetraóxido de osmio y ciertos aldehídos. Desde que Claude y Fullam, en 1946, publicaron sus observaciones con material fijado en tetraóxido de osmio, este fijador ha sido utilizado universalmente por los microscopistas electrónicos. Una de sus desventajas es el escaso poder de penetración. Recientemente Sabatini y colaboradores (1962) pusieron en boga el uso de ciertos aldehídos, los cuales preservan la estructura fina de los tejidos y la actividad enzimática, y poseen un gran poder de penetración en comparación con las soluciones de tetraóxido de osmio²⁴. La combinación aldehído-osmio ha abierto nuevas perspectivas en la preservación óptima de los tejidos. La forma de hacer llegar el fijador a los tejidos, ha sido otro problema parcialmente solucionado con el uso de la técnica de perfusión vascular, popularizada por Palay y colaboradores (1962); lo que determinó además una preservación más fisiológica de células y tejidos²⁵. En el presente trabajo revisaremos el uso, en microscopía electrónica, de tres tipos de fijadores químicos: tetraóxido de osmio, aldehídos y permanganato. Las microfotografías electrónicas que acompañan el presente estudio y la preparación del material respectivo, fueron realizadas por el autor en el Instituto de Investigación Clínica de la Facultad de Medicina de la Universidad del Zulia y en el Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas.

II. MODOS DE APLICACION DE LA SOLUCION FIJADORA

Fijación por inmersión.

Se recomienda la fijación del tejido dentro de los escasos segundos o minutos que siguen a la muerte del animal, o después del cese de la circulación, para evitar los cambios postmortem a nivel celular y obtener una preservación lo más perfecta posible. Sin embargo, debemos tener presente que de acuerdo a estudios realizados con cultivos celulares, la muerte de la célula ocurre posteriormente a la muerte del animal. En 1962, Ito¹⁵ estudió los cambios postmortem, a nivel submicroscópico, en hígado de ratas, por un período de 48 horas. Según Ito, después de dos horas, no había cambios con relación al tejido fijado de inmediato. En el tejido fijado después de 6 a 12 horas, observó redondeamiento de las mitocondrias y distorsión de sus crestas.

A las 24 horas, observó mayor distorsión mitocondrial, y a las 48 horas era difícil su identificación. El complejo de Golgi mostró vesiculización en pocas horas. Según este trabajo parece que no es tan importante, como se creía al principio, la fijación inmediata; pero, sin embargo, es deseable.

El tejido debe ser cortado en pequeños fragmentos, usando una hojilla de afeitar nueva, para evitar al mínimo la distorsión durante el seccionamiento. Se recomienda colocar el tejido en una cápsula de Petri con una capa de cera dental o de parafina, y observar el seccionamiento mediante un microscopio estereoscópico, provisto de luz incidente. Se debe evitar en lo posible el trauma mecánico (aplastamiento, tironeamiento), durante la reducción a trozos finos. Deben obtenerse bloques pequeños de tejido, de un 1 mm. de grosor y 2-3 mm. de largo; este tamaño está en relación con el escaso poder de penetración del tetraóxido de osmio. Recuérdese que el coeficiente de difusión para el tetraóxido de osmio es 1.0, y para el formaldehído es 3.6³. Los bloques de tejidos se trasladan mediante un palillo o un gotero, al frasco que contiene el fijador. Cuando los fragmentos de tejido van acompañados de líquido tisular o sangre, los cuales rápidamente toman el fijador (especialmente el tetraóxido de osmio), debe descartarse la solución fijadora después de varios minutos y restituirla por una solución fresca. Cuando se usa fijación primaria con aldehídos y secundaria con tetraóxido de osmio, los

bloques de tejido pueden ser un poco más grandes, debido a la mayor penetración de los aldehídos. Después de la fijación por aldehídos, el tejido puede ser seccionado en fragmentos más finos para su ulterior fijación en osmio.

Fijación de tejidos in situ.

Los órganos o tejidos de localización superficial (piel, músculos) pueden ser fijados en el animal vivo, mientras la sangre continúa circulando a través de ellos. Es conveniente remover previamente la cápsula de tejido conjuntivo que los rodea, la cual constituye una barrera para el fijador. Schultz, Maynard y Pease³⁸ remueven la pi madre para obtener mejor preservación de la corteza cerebral. Para fijar in situ estructuras localizadas en el interior de los órganos (mucosa intestinal, vejiga urinaria, retina), puede hacerse la inyección del fijador mediante una cánula o directamente con una jeringa. Debe establecerse, a cierta distancia del sitio de inyección, un drenaje para el fijador. El contenido de órganos, tales como el intestino y la vejiga, tiende a tomar el fijador. En estos casos es aconsejable un enjuague vigoroso con suficiente cantidad de fijador. Puede hacerse también, fijación del interior de órganos previamente seccionados. La sangre debe removerse mediante enjuagues con el fijador.

Tratamiento previo con hialuronidasa.

Este procedimiento²⁶ se utiliza cuando se desea fijar tejidos cubiertos por tejido conjuntivo denso, que constituye una barrera para la fijación por tetraóxido de osmio. Se diluye una ampolla de hialuronidasa liofilizada en 2-10 ml. de solución salina. Esta solución se aplica tópicamente sobre el tejido; o pequeños trozos de éste se sumergen durante unos cinco minutos en la solución. La hialuronidasa actúa despolimerizando los mucopolisacáridos del tejido conjuntivo; pero es inactivada rápidamente por los líquidos biológicos, especialmente por la sangre, por lo que deben hacerse enjuagues repetidos en las soluciones de la enzima. Según Pallie y Pease, el tratamiento previo con hialuronidasa mejora considerablemente la preservación in situ de los tejidos, facilitando la penetración del tetraóxido de osmio. Los autores no observaron efectos citológicos adversos, provocados por la acción de la hialuronidasa²⁶.

Fijación por perfusión vascular.

Esta técnica, ampliamente utilizada en microcopía de luz¹⁹, está indicada cuando se trata de fijar tejidos o zonas de tejidos de localización profunda; para endurecer tejidos blandos de los cuales se deseen obtener trozos pequeños sin provocar daño mecánico; o para fijar tejidos sensibles a la anoxia y al trauma mecánico, como el sistema nervioso central. La perfusión se practica con éxito, especialmente cuando se utilizan aldehídos como fijadores primarios (Pease 1964, Schultz y Karlsson, 1956), y se hace la fijación secundaria por inmersión en tetraóxido de osmio.

El equipo de perfusión es similar al equipo de venoclisis. Está formado por un frasco que contiene el fijador (Palay y colaboradores utilizan un frasco tipo Dewar), provisto de un sistema de drenaje (tubos de goma o de plástico) que termina en una aguja de inyección o en una pipeta de vidrio. Al animal, previamente anestesiado, se le introduce una cánula en la tráquea y se le suministra respiración artificial con carbógeno (mezcla de 96% de oxígeno y 4% de dióxido de carbono). Rápidamente se abre el tórax, se introduce la micropipeta en el ventrículo izquierdo del corazón y se hace pasar el fijador. Simultáneamente se abre un ojal en la vena cava superior o en la aurícula derecha, para establecer un sistema de drenaje y evitar la hiperpresión en el árbol vascular. La perfusión se realiza hasta que el líquido fijador salga claro; lo cual indica que la sangre ha sido totalmente desplazada por el líquido perfusor. Una descripción más detallada de la técnica de perfusión vascular será dada en un próximo trabajo⁷. La utilización de la técnica de perfusión vascular fue puesta en boga por Palay y colaboradores (1962), quienes utilizaron tetraóxido de osmio para perfundir el sistema nervioso central de la rata²⁵. Los autores realizan un lavado previo del lecho vascular mediante una solución salina balanceada a pH 7.2 - 7.3, seguido por perfusión con solución de tetraóxido de osmio al 1% en solución tampón de acetato de veronal (pH 7.3 - 7.4); con la adición de 0.5% de CaCl₂ para tratar de obtener una mejor preservación de la membrana celular. La fijación del sistema nervioso central lograda por Palay y colaboradores, cumple los requisitos exigidos para una preservación satisfactoria, de acuerdo con los criterios de fijación considerados por Palade^{23, 24}. Un estudio detallado sobre la fijación

del sistema nervioso central por perfusión con aldehidos, ha sido recientemente publicado por Karlsson y Schultz^{18, 39}. Estos autores comparan el patrón ultraestructural observado en la fijación con aldehidos con los resultados obtenidos por la perfusión directa con tetraóxido de osmio. Las membranas celulares que aparecen asimétricas en la fijación con tetraóxido de osmio, son simétricas cuando se fijan previamente con aldehidos. El espacio extracelular, observado siempre en la fijación directa con tetraóxido de osmio, no se ve frecuentemente cuando se hace fijación previa con aldehidos. Los autores destacan también diferencias en la metodología de la técnica de perfusión en ambos casos. Torack (1965), realiza la perfusión del sistema nervioso central de ratas albinas con glutaraldehido e hidroxidipaldehido⁴², encontrando un aumento del espacio extracelular en el tejido nervioso fijado con hidroxidipaldehido. El autor atribuye el hallazgo a un efecto químico del hidroxidipaldehido sobre la membrana celular o sobre las proteínas intracelulares.

Fijación de tejidos humanos.

El tejido humano, obtenido de material quirúrgico o por biopsia, puede ser excelentemente fijado por dialdehidos (especialmente glutaraldehido); y, secundariamente, por tetraóxido de osmio. Si el tejido está hemorrágico, es necesario remover el exceso de sangre por lavados repetidos con fijador fresco. Posteriormente se procede a una disección cuidadosa y a reducir el material a trozos pequeños para su fijación con tetraóxido de osmio. La figura 7 muestra la preservación de una célula neuroglial de la corteza cerebral humana (material patológico), utilizando la doble fijación glutaraldehido-osmio.

Fijación de cultivos celulares y de suspensiones celulares.

Los medios de los cultivos celulares, al igual que el suero y los líquidos del organismo, tienden a tomar el fijador. Por ello, cuando se fijan suspensiones celulares, deben enjuagarse repetidamente con fijador fresco y diluir en un gran volumen de fijador. Es necesario centrifugar la suspensión celular para tratar de reducirla a un bloque sólido y facilitar su fijación. Cuando se estudian leucocitos, es preferible separarlos previamente por centrifugación, para luego fijarlos.

III. FIJACION POR EL TETRAOXIDO DE OSMIO

Palade en 1952, empezó a utilizar²³ una solución tamporada ligeramente alcalina, de tetraóxido de osmio, que ha sido utilizada casi unánimemente por los más experimentados microscopistas electrónicos. Utiliza OsO_4 al 2% en la solución tampón de acetato de veronal de Michaelis. El fijador se prepara así: **Solución tampón:** Veronal sódico: 14.7 grs.; acetato de sodio: 9.7 grs.; agua destilada, para completar 500 c.c. **Solución de tetraóxido de osmio:** 2%. **Fijador:** Solución tampón: 5 ml.; HCl (0.1 N): 5 ml.; agua destilada: 2.5 ml.; tetraóxido de osmio al 2%: 12.5 ml. El fijador debe tener un pH de 7.4. Para preparar la solución de tetraóxido de osmio deben tomarse las siguientes precauciones: Quitar la etiqueta de la ampolla, sumergiéndola en agua caliente; hacer surcos en la ampolla, mediante una sierra para ampollas de vidrio; introducirlas en un frasco ámbar que contenga el agua destilada, y tapar (debe usarse tapa de vidrio). Agitar fuertemente hasta romper las ampollas. El tetraóxido de osmio se disuelve lentamente. Por ello se recomienda hacer la solución un día antes de usarla, o acelerar su disolución, utilizando baño de María. El operador debe hacer todas las manipulaciones bajo una campana provista de extractor de aire, y utilizar gafas protectoras.

Concentración, pH y osmolaridad de las soluciones de tetraóxido de osmio.

Concentración: Palade²³ sugirió las soluciones de tetraóxido de osmio al 2%. Posteriormente, Palay y Palade (1955) consideraron²⁴ que se obtenían mejores resultados con mezclas al 3 y al 4%; especialmente para aquellos tejidos ricos en sustancias reductoras, como el sistema nervioso central. Las soluciones más fuertes son preferibles, porque permiten obtener un mayor contraste en la imagen.

pH: Se recomienda usar un pH similar al del medio interno del animal; o sea, 7.2 - 7.4, para tejidos de vertebrados. Palade (1952), experimentando²³ con soluciones ácidas de tetraóxido de osmio (pH 5.0) y alcalinas (pH 9.0), encontró que la fijación ácida provoca daño celular consistente en vacuolización y precipitación del citoplasma, e hinchamiento de las mitocondrias. Observó menor daño celular con el fijador alcalino. Demostró

que, a medida que el tetraóxido de osmio se difunde, existe una onda de acidificación que mortifica el tejido antes de su fijación. Por ello se empezó a mezclar el tetraóxido de osmio con soluciones tamponadas a un pH ligeramente alcalino (acetato de veronal, fosfato de sodio). Este hallazgo ha sido discutido por Rhodin (1954), quien³³ no encontró este tipo de lesiones. Sjöstrand (1956) expresa, que el control del pH es deseable; pero considera que no es un factor crítico y que puede variar de 5.1 a 9.5 sin cambio notable en las características submicroscópicas de la célula⁴⁰.

Osmolaridad: Se considera que la isotonía del fijador es una condición necesaria para una preservación satisfactoria de las células. La preservación celular obtenida con fijadores hipotónicos, es escasa. La fijación hipertónica provoca retracción de la célula con aparición de espacios extracelulares. El fijador de Palade, hipotónico, fue modificado por Caulfield⁹, quien agrega sacarosa (0.045 gm. por ml. de solución) para aumentar su tonicidad. Rhodin³³ detectó cambios en las mitocondrias fijadas en un medio hipotónico e hipertónico.

Variantes de las soluciones de tetraóxido de osmio.

Para el mantenimiento de la estructura y la función de la célula, es necesario que exista en el medio que rodea a la célula, un balance adecuado de los iones sodio, potasio, calcio y magnesio. Una alteración en la concentración de estos iones, provoca alteraciones estructurales celulares, aunque la tonicidad del medio se mantenga constante. Por ello, algunos investigadores han postulado el uso de iones, para mejorar la calidad de la fijación.

Fijador de Zetterqvist: No es más que el fijador de Palade, al cual se le ha hecho adición de sales²⁸. **Solución tampón:** Veronal sódico: 14.7 grs.; acetato de sodio: 9.7 grs.; agua destilada: para completar 500 c.c. **Solución salina:** Cloruro de sodio: 40 grs.; cloruro de potasio: 2 grs.; cloruro de calcio: 1 gr.; agua destilada: para completar 500 c.c. **Fijador.** Solución tampón: 10 ml.; solución salina 3.4 ml.; HCl (0.1 N): 11 ml.; agua destilada: para completar 50 ml.; tetraóxido de osmio (seco): 0.5 grs. El pH debe ser 7,2-7,4 y su tonicidad 0,34 M.

Fijador de Millonig. Utiliza tetraóxido de osmio en solución tamponada de fosfato de sodio²¹. Su pH se puede ajustar entre

5.4 y 8.0, sin cambiar la tonicidad del medio. Esta solución tampón tiene una presión osmótica similar a la de la sangre de mamíferos (depresión del punto de congelación -56°C). **Solución tampón:** Fosfato monosódico: 2.26 %. **Solución alcalina:** Hidróxido de sodio: 2.52 %. **Fijador.** Solución de fosfato monosódico: 83 ml.; solución de hidróxido de sodio: 17 ml.; agua: 19 ml.; glucosa: 0.54 grs.; tetraóxido de osmio: 1 gr. Si se desea usar iones bivalentes, Millonig sugiere agregar 1 ml. de solución de cloruro de calcio al 1 % a cada c.c. de fijador.

Soluciones de tetraóxido de osmio para fines específicos.

Se han realizado gran cantidad de variantes de las soluciones de tetraóxido de osmio. Dalton (1955) hizo una mezcla de tetraóxido de osmio con dicromato de potasio como vehículo, a un pH de 7.2, para fijar aquellas estructuras celulares no preservadas por el tetraóxido de osmio y, especialmente, para fijar complejos lipídicos¹¹. La fórmula de Dalton es: **Solución tampón:** Dicromato de potasio al 4 % llevado a pH 7.2 con KOH. **Solución salina:** ClNa: 3.4 %. **Solución de tetraóxido de osmio:** 2 %. **Fijador:** Solución tampón: una parte; solución salina: una parte; solución de OsO_4 : dos partes.

Según Pease²⁰, la fijación obtenida con el fijador de Dalton es inferior a la obtenida con el osmio en acetato de veronal, debido a que los iones pequeños de dicromato penetran más rápidamente que el osmio; alcanzando más rápidamente los organelos celulares, antes de la formación de los complejos de osmio. Hay la posibilidad, de que los átomos de cromo se unan a las estructuras celulares actuando como una tinción electrónica. Helander, en 1962¹⁴, usó un fijador para preservar mucosa gástrica de mamíferos. Es isotónico y tiene un pH de 8.5. **Fijador:** Veronal sódico: 1.394 grs.; acetato de sodio: 0.890 grs.; cloruro de sodio: 0.009 grs.; cloruro de calcio: 0.111 grs.; HCl (0.1N): 11.5 ml.; tetraóxido de osmio: 1 gr.; agua destilada: para completar 100 ml.

Claude en 1962⁸ usó un fijador, ligeramente ácido (pH 6), no tamponado, de tetraóxido de osmio en agua destilada, logrando mejor preservación del núcleo y de los componentes fibrilares del citoplasma. Afzelius (1959) disuelve¹ tetraóxido de osmio en tetracloruro de carbono (solución al 40 %), para fijar células libres (protozoarios, espermatozoides, huevos marinos). El autor

del presente trabajo⁶, ha utilizado una solución de tetraóxido de osmio al 2% en acetato de veronal, con adición de agua de mar artificial, para fijar tejido nervioso de invertebrados marinos. El pH se ajusta a 8.1 - 8.2 y la osmolaridad es de 1.010 mOs/litro. Los resultados obtenidos son satisfactorios. Las figuras 1 y 2 ilustran la preservación del tejido nervioso de un invertebrado (el calamar) obtenido con este fijador.

Control de temperatura en la fijación con el tetraóxido de osmio.

Se considera generalmente que el uso de la solución de tetraóxido de osmio enfriado a 0°C, produce una mejor preservación del tejido y disminuye la actividad citolítica. Algunos investigadores como Millonig (1962), consideran que la temperatura del fijador no es de gran importancia²¹.

Duración de la fijación con el tetraóxido de osmio.

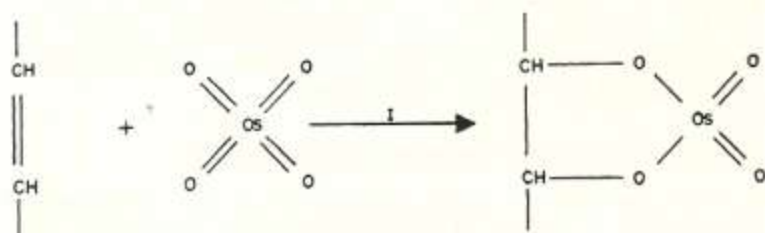
Se considera que 30-60 minutos es un tiempo prudencial para una buena fijación. Millonig (1962) sugiere de 2 a 4 horas²¹. Parece ser que durante el procedimiento de fijación hay dos procesos: a) Combinación química de los óxidos de osmio con los componentes del tejido. b) Extracción de los componentes celulares por el vehículo del fijador (por ej: acetato de veronal). Por ello, el tiempo de fijación debe ser el necesario para que se cumpla el primer proceso, que conduce a la preservación del tejido. Debe evitarse el segundo, que puede producir alteraciones morfológicas. Se ha observado que en los tejidos sometidos a fijación prolongada, los constituyentes proteicos (miofibrillas, gránulos de zimógeno) tienden a ser alterados en mayor grado que las membranas celulares; las cuales son predominantemente de naturaleza lipídica.

Efecto de algunos iones sobre la fijación.

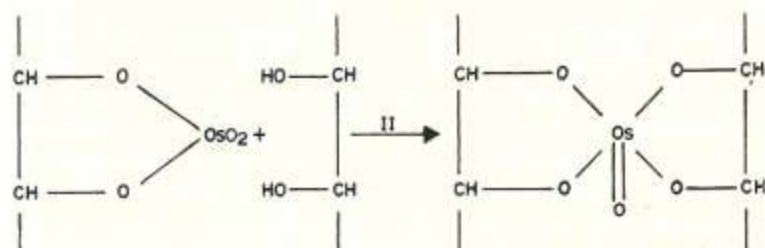
Porter y Pappas (1955) sugieren²⁸ que la adición del ion calcio al fijador, disminuye la extracción de las sustancias de cemento y de los tejidos embrionarios. Geren y Smith (1954) reportan una buena preservación de fibras nerviosas de invertebrados, con la adición de Ca^{++} o Mg^{++} ²⁸. Palade (1956) afirma²⁴ que el ion amonio destruye las membranas del retículo endoplásmico e interfiere con la fijación.

Química de la fijación por tetraóxido de osmio.

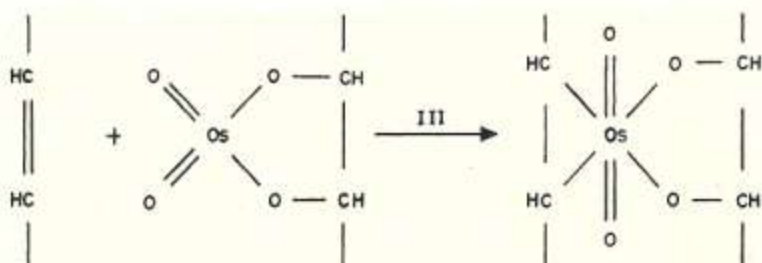
El tetraóxido de osmio se emplea en histología en la tinción de las grasas. El mecanismo de acción del tetraóxido de osmio como fijador no se conoce aún en forma satisfactoria. Estudiando el comportamiento del osmio frente a las grasas, se sabe que²⁷ las uniones etilénicas presentes en las grasas insaturadas, reducen el OsO_4 formando un compuesto negro de dióxido de osmio. Criegee (1936), sugirió²⁷ que esto era debido a la oxidación del doble enlace existente entre dos carbonos adyacentes resultando en la formación de un monoéster.



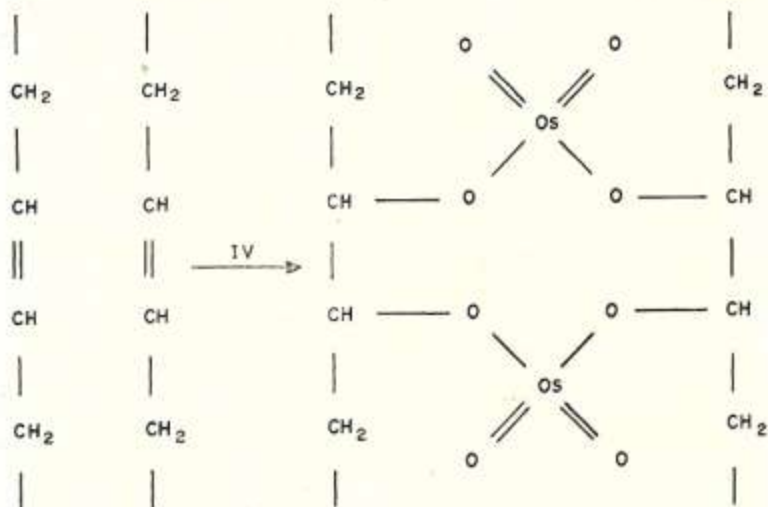
En presencia de grupos etilénicos oxidados, el otro extremo de la molécula reacciona formando un diéster.



Hay, sin embargo, muchas dudas acerca de la certeza de estas reacciones en los tejidos, y por ello el tetraóxido de osmio no ha sido ampliamente utilizado en histoquímica. Wigglesworth (1957) considera²⁷ que en lugar de la segunda reacción, el OsO_4 puede formar uniones dobles directamente con el carbono del doble enlace.



Si en cadenas adyacentes, dos enlaces insaturados están en oposición, Wigglesworth sugiere que puede formarse un monoéster doble con la consiguiente unión de las cadenas de ácidos grasos.



Cualquiera que sea la naturaleza de la reacción del OsO_4 con las grasas insaturadas, de acuerdo con Wigglesworth, la polimerización de los lípidos bajo la acción del OsO_4 , ocurrirá en aquellas moléculas con varias cadenas insaturadas, como en la trioleína; o cuando existen enlaces insaturados en una sola cadena, como en el ácido linoleico. Porter y Kallman (1953) observaron²⁹ que el tetraóxido de osmio al 2% forma geles con la albúmina, la globulina y el fibrinógeno. La aparición de geles claros al reaccionar el tetraóxido de osmio con la albúmina, la atribuyen los autores a un arreglo micelar fino o a uniones unimoleculares. Los geles oscuros, formados en contacto con la globulina y el

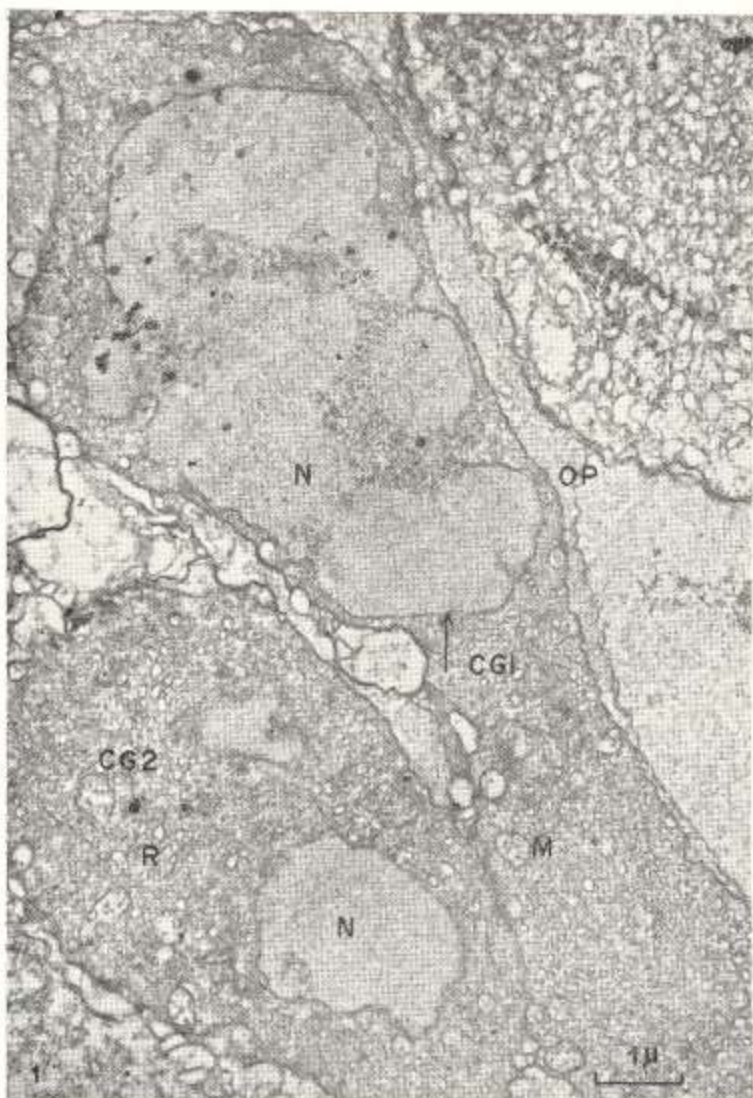


Fig. 1. Microfotografía electrónica a nivel de la zona cortical del ganglio estrellado del calamar. Fijación con solución de tetraóxido de osmio al 1%, en solución reguladora de acetato de veronal y con adición de agua de mar artificial. Esta solución fijadora, a pH 7.4 y osmolaridad de 1010 mOs/litro, (isotónica con la sangre del calamar) se dejó actuar durante una hora. Se observan dos células ganglionares (CG1 y CG2), y un oligodendrocito perineuronal (OP). En el núcleo (N) de estas células, la cromatina muestra una apariencia finamente granulada. La cisterna perinuclear (flecha) es de un ancho uniforme, las membranas del retículo endoplásmico (R) muestran un ordenamiento regular. Las mitocondrias (M) muestran un aspecto claro. Tejido incluido en Araldita. 16.800 X.

fibrinógeno, fueron considerados como indicio de un arreglo micelar grueso. Bahr (1954) estudió⁴ la reacción del tetraóxido de osmio, disuelto en agua y en tetracloruro de carbono, con diferentes compuestos biológicos. El experimento, realizado in vitro, mostró positividad para las siguientes sustancias: cisteína, trietanolamina, ácido oleico, metionina, arginina, lisina y ácido ascórbico. Los resultados fueron generalizados por Bahr en la siguiente forma: Los hidrocarbonados saturados reaccionan lentamente o no reaccionan; los derivados halogenados no reaccionan; los alcoholes y éteres, reaccionan rápidamente; los grupos SH y SS reaccionan inmediatamente; las aminas reaccionan rápidamente y tanto mayor cuanto más larga es su cadena; los aldehídos y cetonas únicamente reaccionan cuando están presentes en cadenas largas; los ácidos nucleicos y carbohidratos, eran inertes.

Wolman (1957) demostró²⁷ que, bajo ciertas condiciones, el tetraóxido de osmio es reducido por aminoazúcares. Wolman describe tres tipos de reacciones: La formación de un precipitado negro con soluciones acuosas de tetraóxido de osmio (lípidos insaturados, grupos SH); la formación de un precipitado negro con soluciones de tetraóxido de osmio, disuelto en solventes no polares (compuestos con grupos NH_2); la no formación de un precipitado visible (polisacáridos que contienen grupo 1:2 glicoles).

Dallam en 1957 reporta¹⁰ una pérdida del 22,6% del contenido de proteína de las mitocondrias del hígado de rata, durante la fijación por tetraóxido de osmio.

Criterios de fijación satisfactoria con el tetraóxido de osmio.

1. El núcleo celular exhibe generalmente una apariencia finamente granular (Fig. 2). La presencia de masas cromatínicas agregadas es indicio de una fijación defectuosa. 2. Como las mitocondrias son sensibles a la fijación (Fig. 4), la presencia de mitocondrias hinchadas y vacías, indica escasa preservación. 3. El arreglo del retículo endoplásmico es generalmente regular en las células bien fijadas⁴¹. Las cisternas del retículo endoplásmico, muestran un arreglo uniforme. En caso de fijación defectuosa, aparecen hinchadas y dispuestas irregularmente. 4. La cisterna perinuclear debe ser de un ancho uniforme. Las membranas de Golgi y las vacuolas, deben mostrar también un arreglo ordenado. 5. In vivo, las proteínas de la matriz citoplasmática y del núcleo, se hallan en solución, formando una dispersión fina; con

el pH y a la concentración de electrólitos, usuales dentro de las células. La observación de células vivas, realizada en microscopio de campo oscuro, corrobora esta afirmación. Por ello, la ausencia de precipitados en el citoplasma y en el núcleoplasma, es un criterio de fijación satisfactoria. Se sabe también que las membranas celulares son continuas, y que existe una íntima oposición de fases en la célula viva. Por ello se considera que la aparición de membranas discontinuas y espacios "vacíos", son el resultado de agrupación y retracción durante los procesos de fijación y deshidratación. 6. Los resultados obtenidos mediante la fijación con tetraóxido de osmio, pueden ser controlados usan-

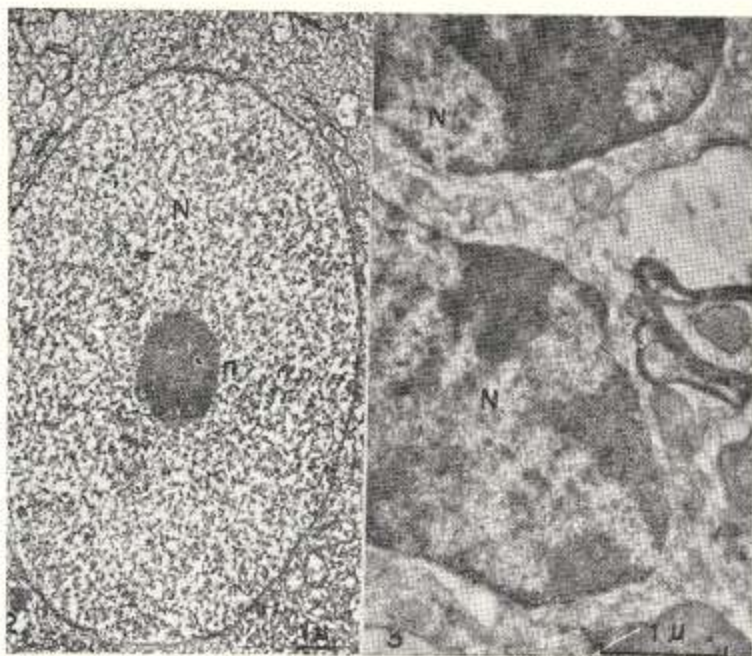


Fig. 2. Microfotografía electrónica del núcleo (N) de una célula ganglionar del ganglio estrellado del calamar. Fijación similar a la descrita en la figura 1. Obsérvese la distribución uniforme de la cromatina en gránulos finos. El nucléolo (n) aparece como una compactación de partículas finas. Obsérvese el aspecto claro del núcleoplasma. Tejido incluido en metil-butil metacrilato. 7.500 X.

Fig. 3. Microfotografía electrónica de dos células granulosas de la corteza cerebelosa de ratón. Obsérvese la apariencia del núcleo (N) en la fijación primaria con glutaraldehído. La forma de agrupación de la cromatina, en masas densas, parece ser característica de la fijación por dialdehídos. Tejido incluido en Epón. 44.000 X.

do otros fijadores (aldehidos, permanganatos) o métodos físicos de fijación, como el de congelación-desecación⁴². 7. Cuando se incluye material biológico en metil-butil metacrilato, es necesario distinguir entre una fijación defectuosa y un daño de polimeriza-

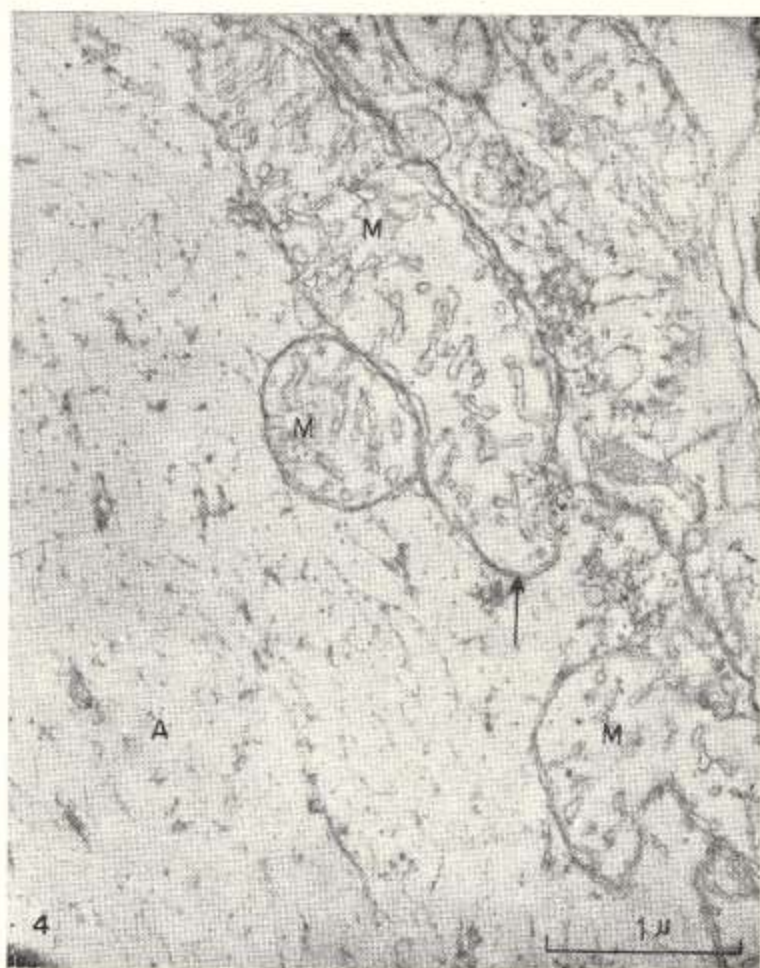


Fig. 4. Microfotografía electrónica de las mitocondrias (m) de un axón gigante (A) de calamar (fijación similar a la descrita en la figura 1). Las crestas y la matriz de la mitocondria, muestran un aspecto claro, vacío; lo cual sugiere extracción de material proteico por la acción del fijador. Las mitocondrias de invertebrados, parecen ser muy sensibles a la acción de los fijadores químicos. La flecha señala la doble membrana mitocondrial. Tejido incluido en Araldita. 37.200 X.

ción. Este último, se caracteriza por la apariencia hinchada de la célula, aspecto grumoso del citoplasma y del núcleo, ruptura de las membranas celulares y vacuolización de las mitocondrias. 8. En algunos casos, la imagen obtenida al microscopio electrónico puede ser comparada con la imagen in vivo, en un microscopio de polarización. Este microscopio puede detectar, mediante birrefringencia, el ordenamiento molecular en estructuras celulares. Por tanto, la imagen submicroscópica obtenida en ciertos tejidos: músculos estriados, sistema nervioso (capa de mielina, axoplasma, receptores retinianos), puede ser correlacionada con la imagen del microscopio de polarización. La semejanza entre ambos tipos de imágenes es un criterio útil para juzgar la calidad de la fijación en microscopía electrónica. Una correlación similar puede hacerse con los estudios de difracción por rayos X (Finean 1961) aplicables a los componentes tisulares que muestran un alto grado de regularidad en su estructura, como es el caso de la capa de mielina de los nervios periféricos¹². El patrón de difracción de la mielina en estado fresco y fijado, y las imágenes microscópico-electrónicas, son comparables. En estos casos, la calidad de la fijación puede ser juzgada a nivel molecular. 9. En líneas generales, debe existir una correlación estrecha entre las estructuras observadas en las microfotografías electrónicas y la información suministrada por los estudios realizados en biología celular, citoquímica y fisiología celular.

IV. FIJACION POR ALDEHIDOS

Pease, en 1962²⁸, propuso el uso de formalina al 10% (formaldehído al 4%) en solución tamponada de fosfato de sodio, según la siguiente fórmula: **Solución tampón:** Fosfato monosódico, 2.26%; **Solución alcalina:** Hidróxido de sodio, 2.52%. **Fijador:** Solución de fosfato monosódico, 83 ml.; solución de hidróxido de sodio, 17 ml.; formalina (formaldehído al 4% libre de metanol), 11 ml.; paraformaldehído en polvo (disolviendo a 60°C), 4 grs. Ajustar a pH 7.2 - 7.4. Este fijador es hipertónico. Pease advierte que habitualmente la formalina vendida en Estados Unidos de Norteamérica contiene alcohol metílico, el cual es adicionado como preservativo. El alcohol metílico es un fijador de propiedades indeseables.

La formalina, libre de metanol, puede descomponerse y dar ácido fórmico. Por ello deben usarse soluciones frescas. El para-

formaldehído es un polímero del formaldehído, que se disuelve fácilmente en agua. Para preparar soluciones concentradas, deben calentarse a 60°C, y hacerse ligeramente alcalinas, añadiendo gotas de hidróxido de sodio, mientras se agita. La solución, de apariencia lechosa, se tornará luego clara; especialmente cuando se acerca a un pH de 7.2.

Holt y Hicks (1961) experimentaron²⁵ con formalina al 10% en diferentes soluciones reguladoras: Veronal, fosfato de sodio, collidina, trietanolamina y acetato. Concluyen, que el formaldehído al 4%, a pH 7.2, en solución tampón de fosfato de sodio 0.067M y con adición de sacarosa al 7.5%, es el más efectivo.

Pease²⁶ ha utilizado, mediante la técnica de perfusión vascular, el formaldehído como fijador primario; seguido de fijación en tetraóxido de osmio. La molécula de formaldehído es más pequeña que la de los otros aldehídos; por ello penetra rápidamente en el tejido y bloquea la autólisis. Pease muestra microfotografías electrónicas en donde puede observarse una buena preservación del tejido.

Un estudio comparativo sobre el uso de varios aldehídos para preservar la ultraestructura celular y la actividad enzimática, ha sido hecha por Sabatini, Bensch y Barnett (1963, 1964). Estos autores²⁶ ensayaron el uso de los siguientes aldehídos: glutaraldehído (4 al 6.5%), glioxal (4%), hidroxidipalaldehído (12.5%), crotonaldehído (10%), aldehído pirúvico (5%), acetaldehído (10%) y metacroleína (5%). Los autores, en un primer paso, preservan la estructura fina y la actividad enzimática por medio de los aldehídos; y en un segundo paso, hacen fijación en tetraóxido de osmio para correlacionar los hallazgos histoquímicos y la estructura submicroscópica. Las reacciones para la localización de la actividad enzimática son realizadas entre las dos fijaciones. Consideran al glutaraldehído y a la acroleína como los fijadores más efectivos. El glutaraldehído posee una molécula formada por una cadena de cinco carbonos con grupos aldehídicos en ambos extremos. Se considera que este aldehído puede formar compuestos de uniones cruzadas, lo cual le permite ser un excelente fijador de proteínas. Sabatini y colaboradores recomiendan el uso de glutaraldehído al 4 — 6.5% en solución reguladora 0.1M de fosfato o cacodilato. El tiempo de fijación recomendado

es de 30 minutos a 2 horas. Después de la fijación, el tejido puede ser lavado en la solución tamponada de fosfato o cacodilato, de composición similar a la utilizada en el fijador. El tejido puede dejarse en esta solución durante días, semanas y aún meses, para ser posteriormente estudiado desde el punto de vista histoquímico o fijado secundariamente en tetraóxido de osmio, para su estudio al microscopio electrónico.

Es importante destacar el hecho de que la preservación estructural de los tejidos, obtenida con los aldehídos, no es paralela a la preservación de los sistemas enzimáticos. Sabatini y colaboradores, demuestran que hay más bien una relación inversa. El hidroxipalaldehído es efectivo para mantener la actividad enzimática de la citocromo-oxidasa, deshidrogenasa succínica, y la glucosa-6-fosfatasa; sin embargo, sus propiedades como fijador morfológico o estructural, no son buenas. El glutaraldehído no preserva la actividad enzimática en la forma como lo hace el hidroxipalaldehído; pero proporciona una excelente preservación morfológica.

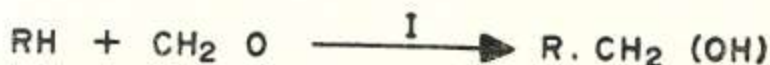
Desde el estudio realizado por Sabatini y colaboradores, los aldehídos han sido ampliamente utilizados por un gran número de investigadores. Roth y colaboradores (1963) utilizan la doble fijación glutaraldehído-osmio para preservar estructuras celulares delicadas, como el aparato mitótico³⁵. Trump y Ericsson (1965) utilizan acroleína, formaldehído y glutaraldehído en soluciones reguladoras de fosfato, cacodilato, y s-collidina, para fijar el túbulo contorneado proximal del riñón de rata. Trump y Ericsson⁴⁴, muestran excelentes microfotografías electrónicas, y realizan una revisión extensa y bien documentada de los efectos de las soluciones fijadoras sobre la ultraestructura de células y tejidos. Torack⁴³ estudia el espacio extracelular del cerebro fijado, mediante perfusión vascular, con glutaraldehído e hidroxipalaldehído, en soluciones isotónicas e hipertónicas. Wood y Callas (1966) reportan diferente preservación del tejido adrenomedular por osmio y glutaraldehído⁴⁶. Los autores hacen énfasis sobre la importancia de la osmolaridad del fijador, logrando mejor preservación tisular con el uso de glutaraldehído hiperosmolar, seguido de fijación en tetraóxido de osmio. Recientemente Trump y Bulger (1966) utilizan⁴⁵ una mezcla de glutaraldehído-osmio en un intento por disminuir las desventajas de la fijación primaria con glutaraldehi-

do y la fijación secundaria en tetraóxido de osmio. La **fórmula de Trump y Bulger** es: Solución de tetraóxido de osmio, 1%; solución de glutaraldehído, 6.25%; solución reguladora de s-collidina, 0.063 M. **Fijador:** Solución de tetraóxido de osmio al 4%: 2 volúmenes; glutaraldehído al 50%: 1 volumen; solución reguladora de s-collidina 0.1 M: 5 volúmenes. La mezcla tiene una osmolaridad de 875-925 mOs/litro y un pH de 6.6-6.8.

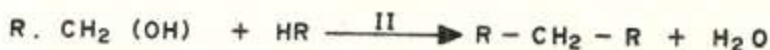
El autor del presente trabajo utiliza la doble fijación glutaraldehído-osmio⁷ para fijar, mediante la técnica de perfusión vascular, el sistema nervioso central del ratón albino suizo. La fórmula utilizada por nosotros es: **Líquido perfusor:** Solución de glutaraldehído 25%: 4 c.c.; solución reguladora 0.2M de fosfato de sodio pH 1.4: 96 c.c. La mezcla fijadora tiene una osmolaridad promedio de 420 mOs/litro y un pH de 7.4. Posteriormente, el tejido nervioso es fijado en solución al 1% de tetraóxido de osmio, en solución tampón similar a la utilizada en el líquido perfusor. Las figuras 3, 5 y 6, ilustran los resultados obtenidos con la doble fijación.

Química de la fijación por aldehídos.

La reacción de la formalina con las proteínas tisulares ha sido cuidadosamente estudiada^{3, 27}. French y Edsal (1945) estudiaron la combinación de la formalina con los diferentes grupos funcionales de las proteínas: aminas, iminas, amidos, peptídicos, guanidílicos, hidroxílicos, carboxílicos, grupos SH y los anillos aromáticos. De acuerdo con estos autores¹³, la formalina reacciona frecuentemente con compuestos que poseen átomos reactivos de hidrógeno, formando compuestos hidroximetílicos.



Este compuesto puede condensarse con otro átomo de hidrógeno para formar un puente metilénico (-CH₂-)



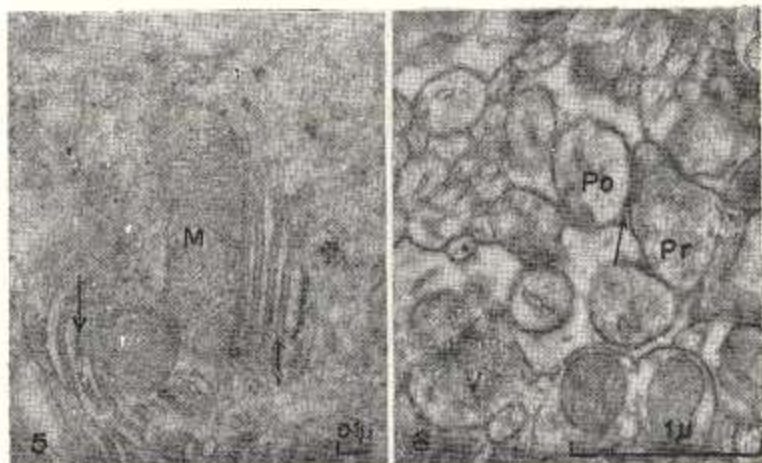


Fig. 5. Microfotografía electrónica de una mitocondria (M) localizada en una dendrita de la célula de Purkinje del cerebelo de ratón. Fijación por perfusión vascular con glutaraldehído al 1% en solución tamponada de fosfato de sodio (pH 7.4) y osmolaridad de 420 mOs/litro. Fijación secundaria por inmersión en solución al 1% de tetraóxido de osmio en fosfato de sodio. Las crestas y la matriz de la mitocondria, muestran mayor densidad que en la fijación primaria con tetraóxido de osmio. En la vecindad puede observarse un sistema de membranas (flechas) paralelas, separadas por espacios claros. Las membranas muestran la estructura triple característica de la unidad de membrana. Tejido incluido en Epón. 54.000 X.

Fig. 6. Microfotografía electrónica a nivel de la capa molecular de la corteza cerebelosa de ratón, mostrando una región sináptica. Obsérvese la preservación obtenida del contacto sináptico (flecha) con la doble fijación glutaraldehído-osmio, utilizando la técnica de perfusión vascular. Pr: terminal presináptico; Po: terminal postsináptico; V: vesículas sinápticas. 36.000 X.

Por hidrólisis pueden romperse estos puentes metilénicos. De allí que, por lavado, pueden hacerse reversibles muchas de las reacciones de la formalina con las proteínas tisulares. Los puentes metilénicos pueden formarse entre grupos similares; por ejemplo, entre grupos amina (NH_2) o entre grupos amino y peptídicos (CONH). Saidel y colaboradores (1965) han demostrado³⁷, mediante cambios en el espectro ultravioleta, que los aminoácidos y los enlaces peptídicos reaccionan con el formaldehído.

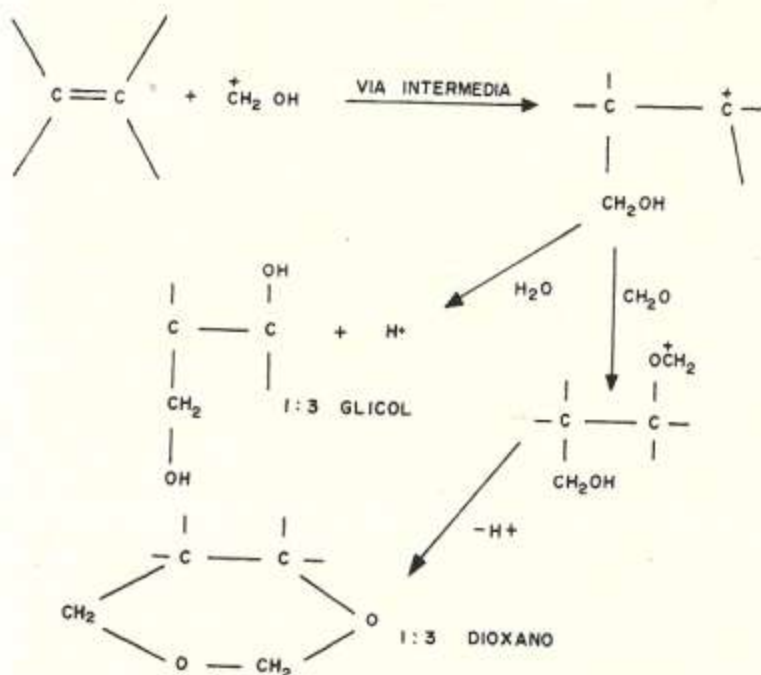
Recientemente Jones y Grescham (1966) han demostrado la reacción del formaldehído con ácidos grasos no saturados, du-

rante el proceso de fijación. Según Jones y Grescham ¹⁶ el formaldehído reacciona con enlaces etilénicos dobles, en presencia de un catalizador ácido, originando 1:3 glicoles y 1:3 dioxanos (reacción de Prins). La reacción sería:

a) Formación de especies electrofílicas:



b) Reacción con doble enlace:



En relación con los dialdehídos: el glioxal, glutaraldehído e hidroxidipaldehído forman uniones cruzadas con hidrógenos activos, grupos amino e imino de las proteínas, y los grupos hidroxilo de los polialcoholes. La reacción de cada grupo carbonilo de los dialdehídos puede ser equivalente a los puentes metilénicos formados por la formalina.

Características ultraestructurales de la fijación por aldehídos.

Las microfotografías electrónicas de tejidos fijados por formaldehído, como ha sido demostrado por Pease²⁸, exhiben una apariencia similar a la obtenida por el método de congelación-desecación, que parece ser la imagen negativa de un tejido fijado en tetraóxido de osmio. Los lípidos son extraídos; pero las proteínas, inclusive las núcleoproteínas, son preservadas. Las proteínas se ven teñidas más intensamente que en la fijación por tetraóxido de osmio. Cuando el tejido ha sido preservado por la doble fijación glutaraldehído-osmio, el patrón ultraestructural difiere del obtenido cuando se usa únicamente el tetraóxido de osmio. Muy probablemente se debe a la combinación de los aldehídos con las proteínas, mediante uniones cruzadas. Este tipo de unión, presumiblemente, evita la extracción de las proteínas por la solución reguladora usada como vehículo del fijador, o por el proceso de inclusión en plásticos.

Como ha sido observado por Sabatini y colaboradores³⁶, la cromatina nuclear muestra dos formas de agrupación: (a) en masas gruesas compactas, con tendencia a localizarse hacia la membrana nuclear; (b) dispuesta en partículas finas, situadas entre las masas densas. Las figuras 3 y 4, muestran la apariencia del núcleo en la fijación primaria por glutaraldehído. La matriz mitocondrial, la sustancia fundamental del hialoplasma y el contenido de las cisternas del retículo endoplásmico, aparecen más densos (Fig. 7) que en la fijación por tetraóxido de osmio.

V. USO DEL PERMANGANATO COMO FIJADOR

En 1956, Luft demostró³⁰ que el permanganato de potasio puede ser utilizado como fijador. Las propiedades oxidativas de este compuesto permiten preservar los complejos lipoproteínicos presentes en la membrana celular. El permanganato de potasio es esencialmente un fijador para membranas celulares. **Fórmula de Luft. Solución de permanganato:** Permanganato de potasio: 1.2 %. **Solución tampón:** Veronal sódico: 14.7 grs.; acetato de sodio: 9.7 grs.; agua destilada: para completar 500 c.c. **Fijador:** Solución de permanganato: 1 parte; solución tampón: 1 parte. Ajustar pH 7.4 - 7.6. El tiempo de fijación con permanganato de potasio, debe ser establecido por método de ensayo y error. La mayoría de las membranas se fijan entre quince minutos y dos

horas. Robertson (1961) lo ha utilizado para el estudio de las membranas celulares y de la capa de mielina en el sistema nervioso ^{30, 31}.



Fig. 7. Microfotografía electrónica de una célula estrellada de la capa molecular del cerebelo de ratón. Se hizo fijación, mediante perfusión vascular, con glutaraldehído al 1% en solución tampón de fosfato de sodio, pH 7.4, y osmolaridad de 420 mOs/litro. El núcleo (N) muestra compactación de la cromatina en masas densas, las cuales tienden a agruparse cerca de la membrana nuclear. Entre las masas densas, la cromatina se dispone en agregados pequeños de partículas finas. El nucleoplasma muestra aspecto más denso que el observado en la fijación por tetraóxido de osmio. En el citoplasma se observan túbulos del retículo endoplásmico (R), mitocondrias (M) y gránulos de ribonúcleoproteínas. En la vecindad de la célula estrellada, se observa una compleja red formada por la íntima aposición de prolongaciones de células nerviosas y de las fibras aferentes. Obsérvese que no existen espacios extracelulares visibles. Tejido incluido en Epón. 24.000 X.

Tahmisian (1964) ha utilizado el permanganato de potasio como fijador isotónico en solución tamponada y en solución no tamponada²⁸. **Fijador Tamponado:** Solución de Michaelis: 12 ml.; KMnO_4 : 1.3 grs.; agua destilada: para completar 100 ml. **Fijador no tamponado:** KMnO_4 : 1.3 grs.; ClNa : 4.5 grs.; agua destilada: para completar 100 ml.

Bradbury y Meeck (1960) consideran que el permanganato de potasio no actúa completamente como fijador⁵. Tahmisian usa además²⁸, una combinación de tetraóxido de osmio con permanganato de potasio, según el siguiente esquema: **Fijador osmio-permanganato tamponado:** Solución salina tamponada (partes iguales de ClNa 9%, Na_2HPO_4 0.1M y KH_2PO_4 0.1M): 8 ml.; KMnO_4 : 1.3 grs.; solución de osmio 2%: 50 ml.; agua destilada: para completar 100 ml. (pH 6.8).

Fijador osmio-permanganato no tamponado: KMnO_4 : 1.3 grs.; solución de osmio 2%: 50 ml.; NaCl 9%: 2.7 ml.; agua destilada: para completar 100 ml.

Wetzel (1961) hizo un estudio comparativo entre la fijación por permanganato de potasio y permanganato de sodio⁴⁶. Considera, que la fijación por permanganato de sodio mejora la preservación de las membranas celulares. De acuerdo con Pease²⁸, el tejido fijado con permanganato parece ser sensible al lavado y a la deshidratación. Este autor observa hinchamiento del tejido cuando se lava y cuando se deshidrata con los primeros alcoholes.

Rosenbluth¹⁴, observa vesículas que considera resultantes de la desintegración de la membrana celular por la acción del fijador.

Características ultraestructurales de la fijación por permanganato.

Las características ultraestructurales de los tejidos fijados por permanganato, dependen del tiempo de fijación y de la sal de permanganato utilizada. Las características de las membranas celulares son diferentes a las observadas en la fijación por tetraóxido de osmio. La capa externa de la unidad de membrana aparece más densa³⁰, debido probablemente a retención de polisacáridos. Afzelius² encuentra que después de la fijación por permanganato de calcio, las membranas celulares presentan un

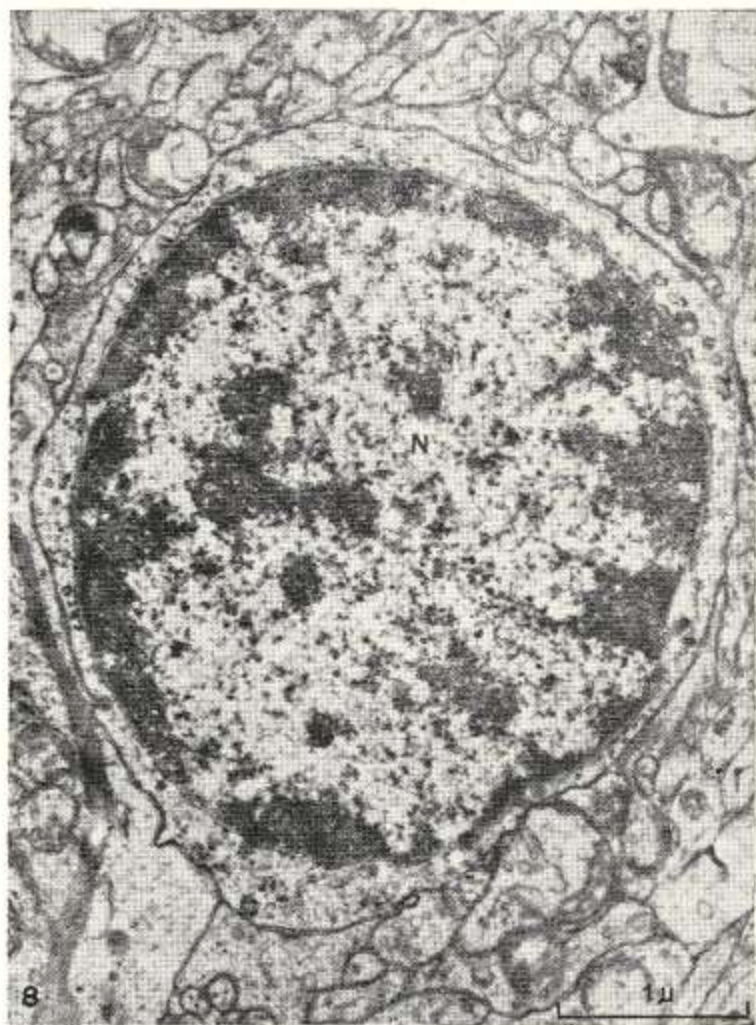


Fig. 8. Microfotografía electrónica de un oligodendrocito de la corteza cerebral (obtenida por biopsia quirúrgica) de un paciente con síndrome hipertensivo por tumor del ángulo pontocerebeloso. Se hizo fijación primaria con glutaraldehído al 1% en solución tampón de fosfato de sodio, (pH 7.4 y osmolaridad 290 mOs./litro), seguido de fijación en tetraóxido de osmio al 1% en solución tampón similar a la utilizada en la fijación primaria. La doble fijación glutaraldehído-osmio se recomienda para la preservación de tejido delicado, como lo es el tejido patológico del sistema nervioso central. Tejido incluido en Epón. 36.000 X.

doble contorno y son de mayor grosor: 100 Å; en comparación con los 75 Å de grosor observados en la fijación por permanganato de potasio. Los gránulos de ácido ribonucleico no son visibles. Las membranas mitocondriales aparecen hinchadas, con evidencia de extracción de los componentes de la matriz mitocondrial. En ciertos casos² se ha observado fusión de la doble membrana mitocondrial. Los lípidos y el nucleoplasma son escasamente preservados y ofrecen una apariencia como de haber sido lavados (Trump y Ericsson, 1965). En los tejidos fijados por permanganato, es importante destacar la escasa visibilidad de las estructuras que contienen ácido ribonucleico, la extracción en general de las proteínas, y la preservación de ciertas sustancias como fosfolípidos, polisacáridos y ácido desoxirribonucleico^{20, 44}.

RESUMEN

1. Se hicieron consideraciones sobre el uso de tres tipos de fijadores químicos para microscopía electrónica: el tetraóxido de osmio, los aldehídos y el permanganato.

2. Se hace una revisión de la literatura sobre los modos de aplicación, mecanismo de acción y características ultraestructurales de la fijación por estos compuestos.

3. El tetraóxido de osmio forma compuestos negros al combinarse con las uniones etilénicas de las grasas no saturadas. Se utiliza como fijador primario, o como fijador secundario a la fijación primaria por aldehídos. Se caracteriza por su escaso poder de penetración. Las características ultraestructurales de la fijación por tetraóxido de osmio, parecen depender de la solución tampón, la concentración, el pH, la osmolaridad, y de los iones específicos utilizados.

4. Los aldehídos forman, probablemente, uniones cruzadas con las proteínas, mediante enlaces metilénicos. Se utilizan como fijadores primarios para preservar la estructura fina y la actividad enzimática de los tejidos. Cuando se emplean como fijadores primarios para microscopía electrónica, se hace fijación secundaria con el tetraóxido de osmio. Se caracterizan por su gran poder de penetración. Se recomiendan cuando se emplea la técnica de perfusión vascular. Las características ultraestructurales de

la fijación por aldehídos, difieren ligeramente de las de la fijación por tetraóxido de osmio; especialmente en la mayor densidad de las estructuras celulares, y en la agrupación en masas de la cromatina nuclear.

5. El permanganato se utiliza especialmente como un fijador de membranas celulares. Se desconoce su mecanismo de acción. Las características ultraestructurales de la fijación por permanganato, dependen del tiempo de fijación y de la sal utilizada.

AGRADECIMIENTO

Nuestra gratitud al Dr. Américo Negrette por las correcciones de estilo del manuscrito, a la Srta. Zoila González y al Sr. José Espinoza por la asistencia técnica, al Sr. Eduardo Añez por el trabajo fotográfico y al Sr. Aurelio Bohórquez por la realización de los dibujos esquemáticos.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. — AFZELIUS, B. A. "Electron microscopy of the sperm tail; results obtained with a new fixative". *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 5: 269. 1959.
2. — AFZELIUS, B. A. "Chemical fixatives for electron microscopy". *The Interpretation of Ultrastructure*. Edited by Harris, R. J. C. Vol. 1. New York. Academic Press, Inc. 1962.
3. — BAKER, J. R. "Principles of Biological Microtechnique. A Study of Fixation and Dying". p. 116. John Wiley and Sons, Inc. New York. 1958.
4. — BAHR, G. F. "Osmium tetroxide and ruthenium tetroxide and their reactions with biologically important substances". *Exptl. Cell Research*. 12: 342. 1957.
5. — BRADBURY, S.; MEEK, G. A. "A study of potassium permanganate "fixation" for electron microscopy". *Quart. J. Micr. Sc.* 101: 141. 1960.
6. — CASTEJON, O.; VILLEGAS, G. M. "Fine structure of the synaptic contacts in the stellate ganglion of the squid". *J. Ultrastruct. Res.* 10: 585. 1964.
7. — CASTEJON, O. J.; VILORIA DE CASTEJON, H. "Fijación del sistema nervioso central para microscopía electrónica e histoquímica por perfusión vascular con glutaraldehído". *Investigación Clínica*. (En preparación).

8. — CLAUDE, A. "Fixation of nuclear structures by unbuffered solutions of osmium tetroxide in slightly acid distilled water". Proceedings of the Fifth International Congress for Electron Microscopy. Edited by Breese, S. S. Jr. Vol. 2. p. L-14. New York. Academic Press, Inc. 1962.
9. — CAUFIELD, J. B. "Effects of varying the vehicle for OsO₄ solution in fixation". J. Appl. Phys. 32: 1637. 1951.
10. — DALLAM, R. D. "Determinations of protein and lipid lost during osmic acid fixation of tissues and cellular particulates". J. Histochem. Cytochem. 5: 178. 1957.
11. — DALTON, A. J. "A chrome-osmium fixative for electron microscopy". Anat. Record. 121: 281. 1955.
12. — FINEAN, J. B. "The molecular structure of myelin". World Neurology. 2: 466. 1961.
13. — FRENCH, D.; EDSALL, J.T. "The reactions of formaldehyde with amino acids and proteins". Advances in Protein Chem. 2: 277. 1945.
14. — HELANDER, H. F. "On the preservation of gastric mucosa". Proceedings of the Fifth International Congress for Electron Microscopy. Edited by Breese, S. S. Jr. Vol. 2. p. P-7. New York. Academic Press, Inc. 1962.
15. — ITO, S. "Light and electron microscopic study of membranous cytoplasmic organelles". The Interpretation of Ultrastructure. Edited by Harris R. J. C. Vol. 1. pp. 438. New York. Academic Press, Inc. 1962.
16. — JONES, D.; GRESCHAM, G. A. "Reaction of formaldehyde with unsaturated fatty acids during histological fixation". Nature. 210: 1386. 1966.
17. — KARLSSON, V.; SCHULTZ, R. L. "Plasma membrane apposition in the central nervous system after aldehyde perfusion". Nature. 201: 1230. 1964.
18. — KARLSSON, V.; SCHULTZ, R. L. "Fixation of the central nervous system for electron microscopy by aldehyde perfusion. I. Preservation with aldehyde perfusates versus direct perfusion with osmium tetroxide with special reference to membranes and the extracellular space". Ultrastruc. Res. 12: 160. 1965.
19. — KOENIG, H.; GROAT, R. A.; WINDLE, W.F. "A physiological approach to perfusion-fixation of tissue with formalin". Stain Technol. 20: 13. 1945.
20. — LUFT, J. H. "Permanganate-a new fixative for electron microscopy". J. Biophys and Biochem. Cytol. 2: 799. 1956.
21. — MILLONIG, G. "Advantages of a phosphate buffer for OsO₄ solution in fixation". J. Appl. Phys. 32: 1637. 1961.
22. — MILLONIG, G. "Further observation on a phosphate buffer for osmium solutions in fixation". Proceedings of the Fifth International Congress for Electron Microscopy.

Edited by Breese, S. S. Jr. Vol. 2, p. P-8. New York. Academic Press, Inc. 1962.

23. — PALADE, G. E. "A study of fixation for electron microscopy". *J. Exp. Med.* 95: 285. 1952.
24. — PALADE, G. E. "The fixation of tissue for electron microscopy". *Proceedings of the Third International Conference on Electron Microscopy (London)*. Royal Microscopical Society. 1956.
25. — PALAY, S. L.; MCGEE-RUSSELL, S. M.; GORDON, S.; GRILLO, M. A. "Fixation of neural tissue for electron microscopy by perfusion with solutions of osmium tetroxide". *J. of Cell Biol.* 12: 385. 1962.
26. — PALLIE, W.; PEASE, D. C. "Prefixation use of hyaluronidase to improve in situ preservation for electron microscopy". *J. Ultrastruct. Res.* 2: 1-7. 1958.
27. — PEARSE, A. G. E. "Histochemistry Theoretical and Applied" P. 998. Second Edition. Little, Brown and Co. Boston. 1961.
28. — PEASE, D. C. "Histological Techniques for Electron Microscopy". P. 381. Second Edition. Academic Press. New York. 1964.
29. — PORTER, K. R.; KALLMAN, F. "The properties and effects of osmium tetroxide as a tissue fixative with special reference of its use for electron microscopy". *Exptl. Cell Research* 4: 127. 1953.
30. — ROBERTSON, J. D. "The ultrastructure of cell membranes and their derivatives". *Symposium Biochem. Society.* 16: 3. 1959.
31. — ROBERTSON, J. D. "Ultrastructure of excitable membranes and the crayfish median giant synapse". *Ann. New York. Acad. Sc.* 94:339. 1961.
32. — ROCKLICH, P. "Sensitivity of regenerating and degenerating planarian photoreceptors to osmium fixation". *Zeitschrift für Zellforschung.* 7: 165. 1966.
33. — RHODIN, J. "Correlation of ultrastructural organization and function in normal and experimentally changed proximal convoluted tubule cells of mouse kidney". Thesis. Karolinska Institutet, Stockholm, pp. 1-76. 1954.
34. — ROSENBLUTH, J. "Contrast between osmium fixed and permanganate-fixed toad spinal ganglia". *J. Cell Biol.* 16: 143. 1963.
35. — ROTH, J. E.; WILSON, H. J.; BOWEN, C.C. "Glutaraldehyde-osmium tetroxide fixation for electron microscopy of the mitotic apparatus in plant and insect cells". *J. Cell Biol.* 19: 91. 1963.
36. — SABATINI, D. D.; BENSCH, K.; BARNETT, R. J. "Cytochemistry and electron microscopy. The preservation of cellular ultrastructure and enzymatic activity by aldehyde fixation". *J. Cell Biol.* 17: 19. 1963.

37. — SAIDEL, L. F.; SATZMAN, J. S.; ELFRING, W. H. "Reaction of amino-acids and peptide bonds with formaldehyde as measured by changes in the ultra-violet spectra". *Nature*. 207: 169. 1965.
 38. — SCHULTZ, R. L.; MAYNARD, E. A.; PEASE, D. C. "Electron microscopy of neurons and neuroglia of cerebral cortex and corpus callosum". *Am. J. Anat.* 100: 369. 1957.
 39. — SCHULTZ, R. L.; KARLSSON, U. "Fixation of the central nervous system for electron microscopy by aldehyde perfusion. II. Effect of osmolarity, pH of perfusate, and fixation concentration". *J. Ultrastruct. Res.* 12: 187. 1965.
 40. — SJOSTRAND, F. S. "Physical techniques in biological research". Oster, G. and Pollister, A. W. editors. Vol. 3, p. 241. Academic Press. New York. 1956.
 41. — SJOSTRAND, F. S. "Critical evaluation of ultrastructural pattern with respect to fixation". *The Interpretation of Ultrastructure*. p. 438. Vol. 1. Edited By R. J. C. Harris. Academic Press. New York. 1962.
 42. — SJOSTRAND, F. S.; BAKER, R. F. "Fixation by freezing-drying for electron microscopy of tissue cell". *J. Ultrastruct. Res.* 1: 239-246. 1958.
 43. — TORACK, M. R. "The extracellular space of rat brain following perfusion fixation with glutaraldehyde and hydroxyadipaldehyde". *Zeitschrift für Zellforschung*. 66: 352-364. 1965.
 44. — TRUMP, B. F.; ERICSSON, J. L. E. "The effect of the fixative solution on the ultrastructure of cells and tissues. A comparative analysis with particular attention to the proximal convoluted tubule of the rat kidney". *Laboratory Investigation* 14: 507. 1965.
 45. — TRUMP, B. F.; BULGER, R. E. "New ultrastructural characteristics of cell fixed in a glutaraldehyde-osmium tetroxide mixture". *Laboratory Investigation* 15: 368. 1966.
 46. — WETZEL, B. K. "Sodium permanganate fixation for electron microscopy". *J. Biophysic and Biochem. Cytol.* 9: 711. 1961.
 47. — WIGGLESWORTH, V. B. "The use of osmium in the fixation and staining of tissues". *Proc. Roy. Soc. Lond. (Ser. B.)* 147: 185-199. 1957.
 48. — WOOD, J. G.; CALLAS, G. "Osmium tetroxide versus glutaraldehyde fixation in adrenomedullary tissue". *Zeitschrift für Zellforschung*. 71: 261. 1966.
-