

ALGUNAS OBSERVACIONES SOBRE LA INCLUSION DE TEJIDOS  
EN EPON EN UNA ZONA CALIDA Y HUMEDA

— **Dr. Orlando J. Castejón.**

Instituto de Investigación Clínica,  
Apartado 1151.  
Universidad del Zulia.  
Maracaibo, Venezuela.

## INTRODUCCION

El Epon ha sido ampliamente utilizado como un medio de inclusión en microscopía electrónica, desde su introducción por Kushida<sup>3</sup> y Finck<sup>1</sup>. Esta resina ha demostrado ser, en la mayoría de los laboratorios de microscopía electrónica, un medio de inclusión que proporciona una preservación adecuada de la estructura fina del tejido, estabilidad al flujo de electrones, buena tinción con las sales de uranilo y plomo, buenas características de corte al ultramicrotomo y mayor contraste de las imágenes.

En un medio tropical, de alta temperatura (84° F) y humedad atmosférica (50-70%), como lo es la zona de Maracaibo, fue necesario modificar las técnicas originales del Epon, debido a las propiedades higroscópicas de esta resina. El presente trabajo muestra algunas modificaciones realizadas al procedimiento de inclusión en Epon y ciertas observaciones ultraestructurales sobre el grado de preservación de diferentes tejidos.

## MATERIAL Y METCDO

Durante tres años se incluyeron diferentes tejidos blandos, tales como el sistema nervioso central de ratón, hígado de rata, mucosa oral humana y algunas células libres, tales como leucocitos de ratón y humanos, células cultivadas de riñón de hámster recién nacido (BHK-21), y leucocitos del líquido sinovial. El material se fijó primariamente, en soluciones al 1% ó al 4% de glutaraldehído en solución reguladora 0,1M de fosfato de sodio a pH 7,4 y osmolaridad de 320 a 760 mOsm/litro. Se hizo fijación secundaria en soluciones al 1% de tetraóxido de

osmio, en solución reguladora 0,1M de fosfato de sodio, a pH 7,4 y osmolaridad de 280 mOsm/litro.

Se practicó la deshidratación de acuerdo al siguiente esquema:

Etanol al 50 %	15 minutos
Etanol al 70 %	15 minutos
Etanol al 80 %	15 minutos
Etanol al 90 %	15 minutos
Etanol al 100 % más sílica-gel	½ hora (en desecador)
Etanol al 100 % más sílica-gel	½ hora (en desecador)
Etanol al 100 % más sílica-gel	½ hora (en desecador)

Se usó el óxido de propileno como solvente transicional; dos cambios de 15 minutos cada uno. Se prolongó el tiempo de infiltración de la siguiente manera: **1. Óxido de propileno-Epon (1:1)**, por 2 a 12 horas, en desecador a temperatura de 70° F. **2. Óxido de propileno-Epon (1:3)**, por 2 a 12 horas, en desecador bajo refrigeración (4° C). **3. Epon puro**, de 24 a 48 horas, en desecador bajo refrigeración (4° C).

Se hizo inclusión en cápsulas de gelatina y de polietileno, previamente desecadas al vacío de  $10^{-2}$  a  $10^{-4}$  mm. Hg, durante media a una hora. Las cápsulas se polimerizaron en la estufa, por períodos de 2 a 5 días, a 60° C, hasta obtener la dureza adecuada para realizar las secciones ultrafinas. Estas últimas se obtuvieron con ultramicrotomo LKB, provisto de cuchilla de vidrio, y se tiñeron con acetato de uranilo<sup>5</sup> o citrato de plomo<sup>8</sup>.

La preparación del Epon se hizo de acuerdo al siguiente esquema de Luft<sup>4</sup>:

Mezcla A		Mezcla B	
Epon 812	62 ml	Epon 812	100 ml
DDSA (anhídrido dodecínil succínico)	100 ml	MNA (anhídrido de metil nadic)	89 ml

Se ensayaron los siguientes tipos de mezclas:

	<b>Mezcla A</b>	<b>Mezcla B</b>
1.	3 partes	7 partes
2.	2 partes	8 partes
3.	1,5 partes	8,5 partes

Se agregó DMP-30 (2, 4, 6-dimetil aminometil fenol) en concentraciones que variaron desde el 1,5 hasta el 2%. La mezcla que permitió obtener los mejores cortes fue la proporción 2:8, con adición de 2% de DMP-30.

La preparación del Epon, deshidratación, infiltración e inclusión de los tejidos, se hacen en un laboratorio con corrección de temperatura y humedad relativa, mediante aire acondicionado y deshumidificador; obteniéndose temperaturas de 70° F y humedad relativa del 40%.

Es frecuente observar, que varias horas después que el material se extrae de la estufa, empieza a reblandecerse; siendo necesario recalentar nuevamente, por  $\frac{1}{2}$  a 1 hora, antes de seccionarlos.

## RESULTADOS

Las microfotografías electrónicas Nos. 1, 2 y 3, muestran la preservación uniforme de los organelos celulares, así como un mayor contraste de las imágenes electronomicroscópicas. Se observa preservación homogénea de la matriz del hialoplasma y del nucléoplasma; indicativos de una polimerización uniforme de la resina. En algunas inclusiones de tejidos, especialmente en aquellos en que fue necesario practicar recalentamiento en la estufa, como paso previo a la obtención de secciones ultrafinas, se observaron daños de polimerización; evidenciables por hinchamiento y vacuolización de las mitocondrias y ligera dilatación de los canalículos del retículo endoplasmático y de la cisterna perinuclear (Fig. 4). En algunos casos, la infiltración del tejido por el plástico, no fue buena; presumiblemente debido a la existencia de residuos de agua en el tejido por una deshidratación ineficaz o a una penetración imperfecta de la resina (Fig. 5).

Es frecuente obtener compresión de los cortes de tejido, probablemente causado por el rebote del plástico durante su pasaje a través de la cuchilla del ultramicrotomo (Figs. 6 y 7).



Fig. 1. Microfotografía electrónica de una célula granulosa de la corteza cerebelosa del ratón, mostrando buena preservación del núcleo (N), de las mitocondrias (M), y de los ribosomas libres, los cuales aparecen esparcidos en todo el citoplasma. Magnificación: 48.000 X.



**Fig. 2.** Microfotografía electrónica de dos células cultivadas de riñón de hamster recién nacido (BHK21). Se observa una preservación uniforme del citoplasma y núcleoplasma. Los canaliculos del retículo endoplasmático muestran un material grisáceo, de densidad mayor que el de la matriz del hialoplasma. Se observan numerosos ribosomas libres y adheridos a las membranas del retículo endoplasmático. La flecha señala una unión superficial, semejante a un desmosoma. Magnificación: 24.000 X.

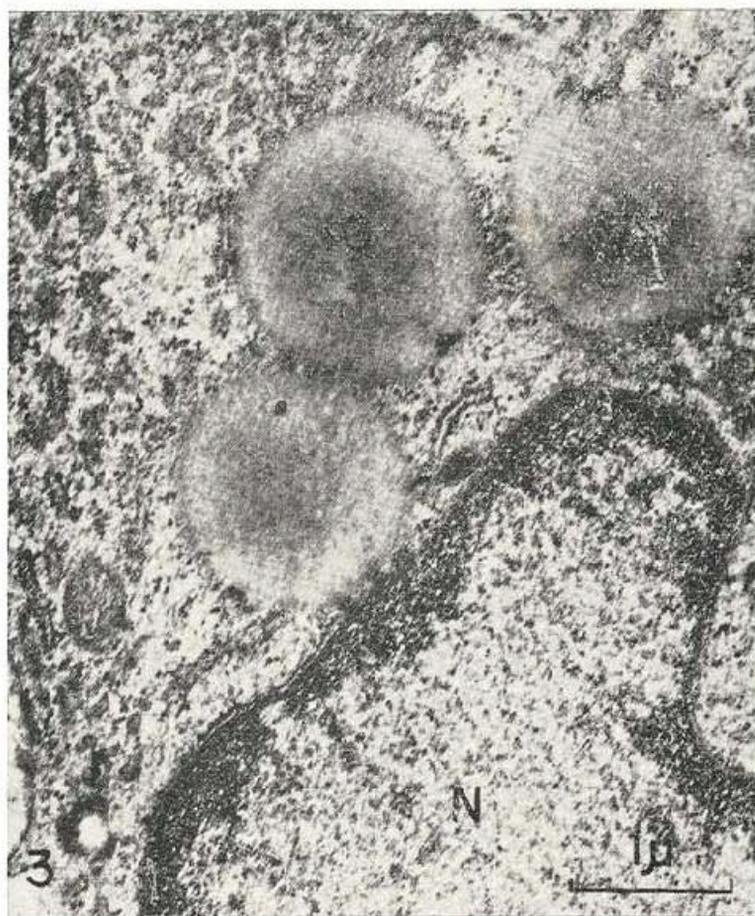


Fig. 3. Microfotografía electrónica de un polimorfonuclear del líquido sinovial de un paciente con artritis reumatoidea. Obsérvese la buena preservación del núcleo (N), de las inclusiones globulares (IG) y la distribución de los gránulos de glucógeno en el citoplasma. Magnificación: 24.000 X.

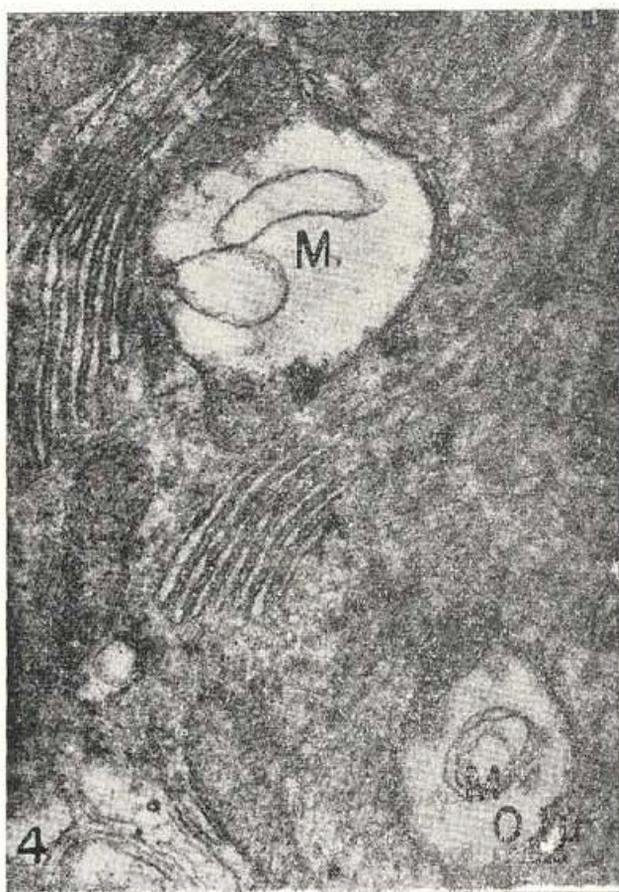


Fig. 4. Microfotografía electrónica de una dendrita de Purkinje de la corteza cerebelosa del ratón, mostrando una vacuolización marcada de las mitocondrias (M), debido, aparentemente, a un daño de polimerización. Magnificación: 54.000 X.



Fig. 5. Microfotografía electrónica de dos células granulosas del cerebelo mostrando dehiscencias o agrietamientos (flechas) a nivel del citoplasma y de la cisterna perinuclear, debido a una infiltración imperfecta de las células por la resina o a la presencia de residuos de agua. Magnificación: 22.500 X.



Fig. 6. Microfotografía electrónica de las células espinosas de la mucosa oral. Se observa compresión del corte bajo la forma de pliegues gruesos. Magnificación: 6.000 X.



Fig. 7. Microfotografía electrónica de la capa granulosa de la corteza cerebelosa del ratón. El citoplasma y el núcleo aparecen comprimidos, mostrando pliegues verticales finos y paralelos, los cuales se observan como trayectos de mayor densidad electrónica alternando con espacios de menor densidad (flechas). Magnificación: 27.000 X.

## DISCUSION

La técnica del Epon fue practicada inicialmente en nuestro laboratorio, de acuerdo al esquema original de Luft<sup>4</sup>, a temperatura ambiente (84° F y humedad relativa del 56%); no obteniéndose bloques con la dureza, elasticidad y homogeneidad necesarias para la obtención de secciones ultrafinas. Se obtuvieron mejores resultados, cuando se corrigieron la temperatura y humedad relativa ambiental del laboratorio, y cuando se prolongaron los tiempos de infiltración y polimerización. En otras latitudes no parece ser indispensable hacer estas modificaciones<sup>2, 5, 6</sup>.

La mezcla que proporcionó las mejores secciones ultrafinas, fue la combinación de los componentes A y B en la proporción 2:8; la cual tiene una dureza equivalente del 30-40% de la mezcla de metil metacrilato en n-butil metacrilato.

Durante el curso de nuestra experiencia hemos observado que el Epon tiene las siguientes **ventajas**: 1. Buena conservación de las mezclas A y B en refrigeración (4° C) bajo desecador, por varios meses. Se utilizaron botellas plásticas, de acuerdo a la recomendación de Price<sup>7</sup>. 2. Estabilidad al bombardeo de los electrones cuando se observan secciones de tejido sin las membranas de soporte de formvar o de colodión. 3. Buena tinción con las sales de uranio y plomo. 4. Mejor contraste en las imágenes.

Hemos notado las siguientes **desventajas**: 1. Dificultades para la obtención de las secciones ultrafinas, siendo frecuente la compresión de los cortes debido a la excesiva elasticidad del Epon. 2. Por sus propiedades higroscópicas es necesario exagerar los cuidados de conservación de los constituyentes y de preparación de la resina, en ambientes relativamente secos (humedad relativa del 40%) y frescos (70° F). 3. Aspecto moteado del tejido. 4. Necesidad de recalentarlo en la estufa, como paso previo a la obtención de las secciones ultrafinas, debido a la captación de agua después de la polimerización.

## RESUMEN

Se fijaron en glutaraldehído diferentes tejidos blandos y células libres en suspensión, tales como cerebelo de ratón, hígado

de rata, mucosa oral humana, leucocitos de la sangre y del líquido sinovial, y células cultivadas BHK-21. Se fijaron secundariamente en tetraóxido de osmio y se incluyeron en Epon. Se hicieron modificaciones en el esquema de aplicación de la técnica original del Epon, para su utilización en un medio húmedo y de alta temperatura, debido a las propiedades higroscópicas de esta resina epóxica. La inclusión se hizo en ambiente con temperatura de 70° F y humedad relativa del 40%. Se prolongó el tiempo de infiltración y de polimerización. Se obtuvieron buenos resultados con la combinación de las mezclas A y B en la proporción de 2:8. Fue frecuente observar compresión del tejido durante la obtención de las secciones ultrafinas. En algunas inclusiones se observó hinchamiento y vacuolización de las mitocondrias y dilatación de los canaliculos y cisternas del retículo endoplasmático; lo cual se interpretó como daño de polimerización.

#### SUMMARY

Different soft tissues and free cells in suspension such as mouse cerebellum, rat liver, oral human mucosa, blood and synovial fluid leukocytes and BHK21 cultured cells were primarily fixed in glutaraldehyde, post-fixed in osmium tetroxide and embedded in Epon. Due to the hygroscopic properties of this epoxy resin, the embedding procedure was modified in order to be applied in a warm and humid region. Tissue embedding was performed at 70°F and at a relative humidity of 40%. The infiltration and polymerization time was prolonged. Satisfactory blocks were obtained with A and B mixtures blended in the proportion of 2:8. Chattered sections were frequently obtained. In some cases, the mitochondria appeared swollen and vacuolated. The cisterns and canaliculi of the endoplasmic reticulum appear moderately distended. These findings were interpreted as polymerization damage.

#### AGRADECIMIENTO

Nuestra gratitud a la Srta. Zoila González y al Sr. José Espinoza, por su asistencia técnica; y al Sr. Eduardo Añez, por su trabajo fotográfico.

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 1 — FINCK, H. "Epoxy resins in electron microscopy". J. Biophys. Biochem. Cytol. 7: 27-30. 1960.
- 2 — GLAUERT, A. M. "The fixation and embedding of biological specimens". Kay, D. H. Techniques for electron microscopy. Pág. 559. Blackwell Scientific Publication. Oxford. 1965.
- 3 — KUSHIDA, H. "On a epoxy resin embedding methods for ultrathin sectioning". J. Electron Microscopy 8: 72-75. 1959.
- 4 — LUFT, J. H. "Improvement in epoxy resin embedding method". J. Biophys. Biochem. Cytol. 9: 409-414. 1961.
- 5 — PEASE, D. C. "Histological techniques for electron microscopy". Pág. 381. Academic Press. New York. 1964.
- 6 — PORTER, K. R. "Ultramicrotomy". Siegel, B. M. Modern developments in electron microscopy. Pág. 432. Academic Press. New York. 1964.
- 7 — PRICE, Z. H. "Polyethylene bottles as containers and dispensers of thin sectioning resins". Stain Tech. 39: 121-122. 1964.
- 8 — REYNOLDS, E. S. "The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy". J. Cell Biol. 17: 208-212. 1963.
- 9 — WATSON, M. L. "Staining tissue sections for electron microscopy with heavy metals". J. Biophys. Biochem. Cytol. 4: 475-478. 1958.

---

"Hay casi tantas interpretaciones de la palabra investigación, como personas que pueden pronunciarla. Para el hombre de la calle, la investigación puede ser tan sólo un sinónimo de progreso, de algo bueno. Para el agente de bolsa de Wall Street, puede ser un sistema de ventas. Para el que se dedica a la ciencia pura, significa la exploración de lo desconocido, porque va en busca de la verdad, o si preferimos un lenguaje menos elevado, en busca de informaciones o relaciones — por el saber mismo, y no para resolver algún problema especial".

Leonard S. Silk

*"Investigación científica: clave del progreso"*

“La creación de un clima científico implica participar efectivamente en la organización científica y en las actividades conducentes al progreso general de la investigación. En este sentido la seguridad que anima al investigador de que la revolución científica y tecnológica es indispensable para impulsar plenamente el desarrollo, debe ser transmitida permanentemente a la comunidad. El concepto de que no hay límites precisos entre la investigación pura y la aplicada y de que ambas se complementan y fertilizan mutuamente, bien asimilado ya por los cultivadores de estas disciplinas, debe orientar esta tarea”.

Francisco de Venanzi