



Nombre del alumno: Joshua Daniel Mazariegos Perez

**Nombre del profesor: Dr. Dario Cristiaderit Gutiérrez
López**

Nombre del trabajo: Actividad primera unidad

Materia: Microanatomía

Grado: 1

Grupo: C°

PASIÓN POR EDUCAR

Comitán de Domínguez Chiapas a 12 de septiembre de 2018.

Preparación de muestras biológicas

Tejido Blando

Obtención de muestra

Para poder tener el tejido en óptimas condiciones para su observación con microscopía electrónica, se debe obtener una porción de tejido blando de aproximadamente $0.3-0.6 \text{ mm}^3$ para ser preparada el mismo día.

Procesamiento de muestra

Una vez obtenida la muestra de tejido blando, se lava tres veces por 5 min con solución amortiguadora de fosfatos (PBS) a 0.1 M con pH 7.4, posteriormente fíjalo con glutaraldehído al 2.5 o 3% o en paraformaldehído al 2.5% en PBS a 0.1 M por 4 hrs.

Después se enjuaga la muestra con PBS a 0.1 M tres veces por 10 min. La post-fijación tarda entre 1 y 2 h, y se realiza con tetróxido de osmio al 1% en PBS a 0.1 M . Nuevamente se lava con PBS a 0.1 M .

El tejido se deshidrata con acetona en dos ocasiones durante 10 min y alcohol, específicamente etanol al 30%, 50%, 70%, 80%, 90% cada uno por 10 min; Por último, se realizan tres enjuagues por 10 min con etanol al 100%.

Posteriormente, se lava con ardo de parafina tres veces por 10 min. Se preindure por 16 h, y se endurecen las muestras sumergidas para después inducir las a temperatura de 60°C por 24 h por último, formar las pirámides.

Los cortes para ME son muchas más delgados (gresor óptimo de 30-40 nm) para los corte para microscopía óptica. Están deben ser recortadas en un ultramicrotomo por medio de cuchillas de diamantes. Primero se preparan cortes semifinos con un gresor de 100-150 nm y se construye por un cátodo de tungsteno para a través de una columna en la que se ha hecho un vacío al rededor.

Para permitir el paso de electrones, es necesario el empleo de rejillas de oro o cobre para el montaje de las cortes ultrafinos. Las rejillas se recubren con una fina película de carbono o una película plástica delgada de Formvar que sirve de soporte de tal forma que la rejilla sostiene la película y la película a la muestra. Una vez montada la muestra, la rejilla debe ser manipulada con suma delicadeza para evitar dañar la preparación.

Tejido Duro

Obtención de muestra

A diferencia de tejido blando, en el tejido duro el proceso no se tiene una dimensión espacial, si se emplea MET al final de su procesamiento la muestra debe ser de 50-100 μm ; una vez obtenida la muestra de tejido duro, debe de estar hidratada para evitar fracturas, las superficies deben estar limpias de todo tejido blando que se encuentre a su alrededor, y se lava con detergente para eliminar sangre u otro producto orgánico. La muestra se recubierta hasta ser procesada.

Procesamiento de muestra

Una vez que la muestra de tejido duro se encuentra limpia, se prepara un trozo de acetato para formar una columna de aproximadamente $10 \times 10 \times 5 \text{ mm}$ para usar el poliacrilato de metilo. El bloque de acetato con la muestra se coloca en la secionadora.

La muestra se recorta por medio de una secionadora con disco de diamante. El bloque de acetato con la muestra posicionado según el sitio de estudio se fija en el portamuestras de la secionadora. La profundidad de los cortes oscila a los 2.0 mm.

Polido de la muestra

Se realiza el desgaste de la muestra de 20 mm obtener un gresor de 100-120 μm . Se monta el espécimen en un porta muestra se fija con resina termoplástica BUE que debe extenderse de forma homogénea; se coloca la muestra y se deja enfriar. El porta muestra se cubre en una pulidora orbital y se pulen sucesivos sistemas de lijas diferentes grados de gresor. Finalmente la muestra debe estar lisa y brillante con un "terminado de espejo".

La muestra se coloca por medio de resina en un porta muestra de acero inoxidable del sistema de preparación de muestra digital. Una vez colocada la muestra en el equipo y posicionado el disco de acero inoxidable sobre la muestra, se coloca sobre una solución dispersa en Dialab. El desgaste debe dejar un gresor en la parte central de la muestra de $1.8 \pm 2 \text{ nm}$.

Montaje

Se desmonta de porta muestra del dimple y se monta en una rejilla de cobre con perforación central mediante resina epoxi colorable. Se limpia la muestra y se pinta su periferia con pintura plata para ME.

La muestra debe ser ensionada para adelgazar la parte central, que es el sitio de observación con MET. La ensión se realiza en un equipo denominado ion mill 10 nva.

Recubrimiento de conducción

Tanto para MET como para MEB, se debe realizar un sombreado de la muestra con un material conductor, el cual puede ser de oro, platino u otro metal; sin embargo, se usa más el carbono. Se coloca la muestra en la base de evaporación de carbono aplicándole filamentos impregnados con carbón.