



Nombre de alumno: Jeferson Enrique Ogaldes Norio

Nombre del profesor: DARIO CRISTIADERIT GUTIERREZ GOMEZ

Nombre del trabajo: Mapa de la secuencia para la Preparación de muestras Biológicas de tejidos blandos y duros

Materia: Microanatomía

Grado: 1

Grupo: C

Comitan, Chiapas a 10 de septiembre de 2021.

PREPARACION DE MUESTRAS BIOLÓGICAS

TEJIDOS BLANDOS

TEJIDOS DUROS

1 OBTENCIÓN

Obtener una porción de tejido blando de aproximadamente $0,3-0,6 \text{ mm}^2$

2 PROCESAMIENTO

Esta muestra se lava tres veces por 5 min con solución amortiguadora de fosfatos (PBS), a $0,1 \text{ M}$ con pH 7,4 para posteriormente fijarlo con glutaraldehído al 2,5 o 3%, o en paraformaldehído al 2,5%. PBS a $0,1 \text{ M}$ por 4 h. Después se enjuaga la muestra con PBS a $0,1 \text{ M}$ tres veces por 10 min.

2 PROCESAMIENTO

Una vez la muestra de tejido se encuentra limpia, se prepara un cofín para formar una columna de aproximadamente $10 \times 10 \times 20 \text{ mm}$ para vaciar el poliacrilato de metilo.

1 OBTENCIÓN

Al inicio no se tiene una dimensión específica. Una vez obtenida la muestra, esta debe encontrarse hidratada para evitar fracturas, si se emplea MET la muestra al final debe de ser de $50-100 \text{ nm}$; en el caso de la MEB el tamaño puede ser hasta $0,5 \text{ cm}^2$

3 CORTE

La muestra se recorta por medio de una recortadora con disco de diamante (sin dientes). La muestra debe estar paralela al disco de diamante. La profundidad de los cortes es cercana a los 20 nm .

4 PULIDO DE LA MUESTRA

Se realiza el desgaste de la muestra de 20 mm hasta obtener un grosor de $100-120 \mu\text{m}$. Para ello se monta el espécimen en un portamuestra y se fija con resina termoplástica (300c), que debe extenderse de forma homogénea; se coloca y se deja enfriar. Es importante evitar mayor desgaste que cause la pérdida de la muestra.

4 INCLUSION

En esta se realiza la preinclusion que se hace con óxido de propileno (epon) en una relación de 1:1, las muestras se dejan por 16 hrs. Se conserva a una temperatura de 60°C y se deja enfriar formando la pirámide.

3 FIJACION

Una vez que las muestras de tejido blando están lavadas se fijan con paraformaldehído al 2,5 o 3% y con glutaraldehído al 2,5 o 3%.

6 MONTAJE

Una vez lista la muestra se desmonta el portamuestras y se monta en una rejilla de cobre con perforación central, mediante resina epóxica catalizable.

5 DESGASTE DE LA MUESTRA

Para este paso, la muestra se coloca por medio de resina en un portamuestras de acero inoxidable del sistema de preparación de muestra digital. Este proceso debe ser controlado con la observación en el microscopio fotónico. El desgaste debe dejar un grosor en la parte central de la muestra de $18 \pm 2 \text{ nm}$.

6 MONTAJE

Para permitir el paso de electrones, es necesario el empleo de rejillas de oro o cobre para el montaje de los cortes ultrafinos. Una vez montada la muestra, la rejilla debe ser manipulada con suma delicadeza para evitar dañar la preparación.

7 EROSION IONICA DE LA MUESTRA

Este paso es de gran importancia y cuidado, debido a que la muestra debe ser erosionada para adelgazar la parte central que es el sitio de observación con el MET. Una vez colocada la muestra, se cierra el equipo para obtener el vacío 10^{-6} Torr . La erosión en una muestra de diente es cercana a $0,83 \text{ mm/h}$.

8 RECUBRIMIENTO

Tanto para el MEB como para el MET, se debe realizar un sombreado de la muestra con un material conductor, el cual puede ser de oro, platino u otro material. Sin embargo se usa más el carbono. Se crea un vacío de 50 militorr y se hace pasar una corriente eléctrica por el filamento, lo que desprende al carbono por sublimación depositándose sobre la muestra. La fina película de carbono que cubre la muestra permite el paso de electrones durante su observación mediante el MET.

5 CORTE

Los cortes de ME son de un grosor óptimo de nm y para microscopio óptico debe ser un corte con cuchillas de diamante o de vidrio, el corte debe ser de $100-150 \text{ nm}$.