

La microscòpia electrònica de transmissió en biologia cel·lular: valoració de les tècniques i informació de les imatges

Núria Cortadellas¹ i Mercè Durfort²

¹ Unitat de Microscòpia Electrònica, Centres Científics i Tecnològics de la Universitat de Barcelona, Facultat de Medicina, Universitat de Barcelona

² Departament de Biologia Cel·lular, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona

Correspondència: Mercè Durfort. Departament de Biologia Cel·lular, Universitat de Barcelona.

Avinguda de la Diagonal, 645. 08028 Barcelona. Adreça electrònica: mdurfort@ub.edu.

DOI: 10.2436/20.1501.02.155

ISSN (ed. impresa): 0212-3037

ISSN (ed. digital): 2013-9802

<http://revistes.iec.cat/index.php/TSCB>

Rebut: 25/02/2015

Acceptat: 05/04/2015

Resum

La microscòpia electrònica de transmissió dins l'àmbit de la biologia cel·lular és una tècnica consolidada i una eina molt útil en la recerca biomèdica. Dins de les microscòpies és la que té un límit de resolució més alt i, per tant, la fa una tècnica molt eficient per interpretar l'arquitectura cel·lular i poder relacionar aquesta estructura amb la seva funció. La innovació i la millora d'equipaments, juntament amb el desenvolupament de noves tecnologies, permeten assolir un millor coneixement del teixit biològic, una millor visualització de les estructures i la identificació i localització de molècules. Es defineixen processos i conceptes, valorant els avantatges i desavantatges de cada tècnica, la imatge i la informació final que podem obtenir utilitzant cadascuna.

Paraules clau: microscòpia electrònica de transmissió, fixació química, criofixació, noves tecnologies, informació de la imatge.

Introducció

La preparació de la mostra biològica (teixits i cèl·lules en cultiu) per a microscòpia electrònica de transmissió comporta diferents etapes. Hi ha un ampli ventall de possibilitats de tècniques i processos i la utilització d'un procés o un altre dependrà de la mostra (del tipus de teixits, cèl·lules, biofilms...), de la mida de l'espècimen en estudi, de com puguem obtenir la mostra (laboratori, quiròfan, vaixell...), de l'equipament que tinguem i finalment, i molt important, quin tipus d'informació volem obtenir de la mostra que estem estudiant (ultraestructural, localització molecular, immunolocalització, electrotomografia...). Per tant, basant-nos en la informació que es vol obtenir de la mostra, hem de definir quina és la millor via o vies que podem utilitzar.

La primera etapa per a la preparació d'una mostra biològica és la fixació. La fixació és una de les etapes més importants i més crítiques de tot el procés que es portarà a terme amb la mostra. L'objectiu de la fixació és aturar l'activitat cel·lular sense alterar-ne les característiques cel·lulars ni els components que la conformen ni la distribució i preservar l'organització tridimensional interna, la mida i la forma de la mostra.

El procés de fixació es pot portar a terme per vies diferents: fixació química, criofixació i combinació de les dues anteriors. La fixa-

Transmission electron microscopy in cell biology: assessment of techniques and image information

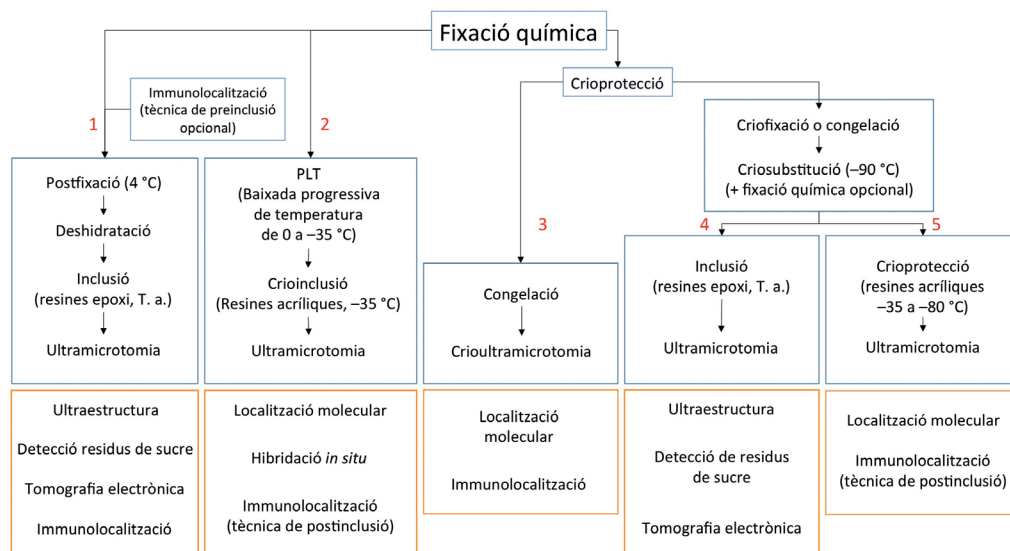
Summary

Transmission electron microscopy is a proven technique in the field of cell biology and a very useful tool in biomedical research. Of all the types of microscopy used to date, transmission electron microscopy is the one with the best resolution limit and therefore it is a very efficient technique for deciphering cell architecture and relating it to function. Innovation and improvements in equipment together with the introduction of new technology have allowed us to improve our knowledge of biological tissues, to visualize structures better, and to identify and locate molecules. In this paper, processes and concepts are defined, and the advantages and disadvantages of each technique are assessed, describing the image and information that can be obtained with each one.

Keywords: transmission electron microscopy, chemical fixation, cryofixation, new technologies, image information.

ció química consisteix en l'ús d'un conjunt de components químics (glutaraldehyd, paraformaldehid, acroleïna, tetraòxid d'osmi, acetat d'uranil...), que utilitzats individualment o en una barreja de dos o més, a diferents proporcions i dissolts en una solució tampó que actua com a vehicle, faran de fixador, i es combinaran amb els components de la cèl·lula, i n'aturaran l'activitat. La fixació química pot comportar artefactes estructurals i també causar la redistribució d'ions i petites proteïnes solubles (Hayat, 2000).

La millor manera, però, per immobilitzar i preservar l'arquitectura cel·lular és probablement la criofixació. La criofixació consisteix en la congelació de la mostra a velocitats molt elevades. Hi ha diferents sistemes i equips per fer aquest procés: per immersió en un agent líquid, per impacte sobre un bloc metàl·lic prèviament refredat, per alta pressió... Un ús o un altre dependran del tipus de mostra i també de les possibilitats d'equipament del laboratori. L'únic sistema, però, que permet una profunditat de criofixació òptima del voltant de 200 µm és el sistema anomenat per alta pressió (HPF). Aquest consisteix a aturar l'activitat cel·lular congelant la mostra a velocitats de més de 10.000 °C/s i a 2.100 bars de pressió. A aquesta velocitat de congelació i a aquesta pressió, les molècules d'aigua no tenen la mateixa mobilitat i no es formen cristalls (fenomen de nucleació), i aconseguim el que s'anomena aigua en estat vítri. En molts casos, depenent del ti-



.....
 ↑ **Esquema 1. Fixació química.** Principals vies de processament d'una mostra biològica partint d'una fixació química. Els números 2, 3, 4 i 5 corresponen a les diferents tècniques (Ta: temperatura ambient).

pus de mostra, es necessita l'ús de crioprotectors abans del procés de criofixació.

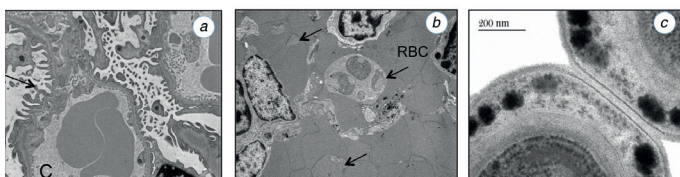
La criofixació és el sistema més modern de fixació per preservar la ultraestructura, però hem de tenir present la inestabilitat i la sensibilitat d'anòxia dels teixits previs a la criofixació, i això fa que en alguns casos, i en determinats tipus de mostra, la combinació d'una fixació química amb criofixació per HPF pugui ser un procés de compromís molt valuós (Möbius, 2009; Cortadellas *et al.*, 2012).

Metodologia

Després de l'etapa de la fixació, la mostra seguirà diferents vies de processament fins a poder ser observada al microscopi electrònic. Les principals vies després d'utilitzar una fixació química estan indicades en l'esquema 1.

Tècnica 1. Fixació química, mètode convencional (esquema 1)

Si la mostra ha estat fixada químicament seguirà un procés de postfixació, generalment amb tetraòxid d'osmi, i aquesta etapa millora la



.....
 ↑ **Figura 1. Fixació química, deshidratació, inclusió.** a) Capillar de ronyó i barrera de filtració. Barra: 2 µm. (Cortesia de Fausto Pardo i Ramon Gomis, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer, IDIBAPS). b) Melsa infectada de malària, *Plasmodium yoelii* (→). Barra: 5 µm. (Cortesia d'Hernando del Portillo, Lorena Martin i Mireia Ferrer, Centre de Recerca en Salut Internacional de Barcelona, CRESIB). c) Detall del bacteri *Clostridium bifementans*. Barra: 200 nm. (Cortesia de Ricard Guerrero i Laura Villanueva, Universitat de Barcelona en col·laboració amb la Unitat de Microscòpia Electrònica, Campus Casanova, Universitat de Barcelona).

qualitat de la fixació, atès que fa preservar principalment la part lipídica de la mostra. Seguidament la mostra s'ha de deshidratar amb un solvent orgànic (alcohol, acetona, òxid de propilè...) per tal d'eliminar el contingut aquós de la mostra i poder-la incloure en una resina (generalment no miscibles en aigua) de tipus epoxy (Epon 812, Spurr, Araldita...). Posteriorment cal fer el seccionament de la mostra, el que s'anomena ultramicrotomia, i finalment es porta a terme el contrast amb metalls pesants i l'observació al microscopi de transmissió (vegeu la figura 1 —Mascorro *et al.*, 2007; Bozzola, 2014).

Valoració de la tècnica. Avantatges.

La major part de mostres biològiques poden ser fixades i processades per aquest mètode. La fixació química no necessita cap tipus d'equipament especial i es pot fer en qualsevol entorn (laboratori, quiròfan...). El bloc amb la mostra es manté durant molts anys.

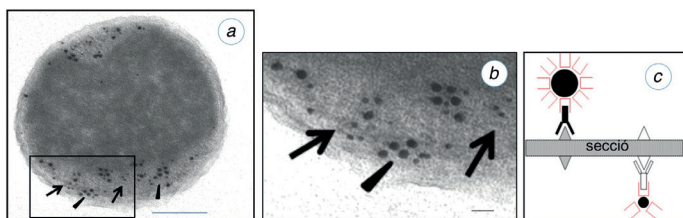
Desavantatges. Pot comportar artefactes estructurals (Durfort, 1993). Es poden produir modificacions en el volum cel·lular per canvis osmòtics. Pot causar la redistribució d'ions i petites proteïnes solubles.

Imatge i informació. La imatge que obtenim és una imatge contrastada, amb membranes ben definides i fàcil de focalitzar al TEM. Podem treballar amb una bona àrea de l'espècimen i la fixació és homogènia. Aquesta via de processament ens permet fer estudis previs a l'òptic, estudis ultraestructurals, detecció i localització de residus de sucres amb l'ús de lectines i or col·loidal, tècniques citoquímiques, digestions enzimàtiques, electrotomografia i tècniques de localització molecular amb *nanogold* (nanopartícules d'or) o *quantum-dots* (mètode de preinclusió) (vegeu l'esquema 1). Permet fer tècniques correlatives de microscòpia òptica amb microscòpia electrònica.

Tècnica 2. Fixació química, mètode PLT de crioinclusió (esquema 1)

A partir d'una fixació química podem també fer el que s'anomena procés PLT (*progressive lowering temperature*). Aquest tipus de procés és específic per a tècniques d'immunolocalització i d'hibridació *in situ*. S'utilitza generalment una fixació aldehídica suau. La deshidratació es fa baixant progressivament la temperatura des de 4 °C fins a -35 °C. Aquest mètode, treballant a temperatures per sota de 0 °C, redueix l'extracció dels components de la mostra i minimitza la desnaturalització de les proteïnes. Seguidament la mostra s'inclou a -35 °C en resines acríliques (Lowicryls, LRWhite, LRGold...). Aquestes resines acríliques es caracteritzen per una baixa viscositat, són miscibles en aigua, són majoritàriament hidrofíliques quan polimeritzen i tenen bona estabilitat al feix electrònic, i a més polimeritzen amb llum ultraviolada, cosa que fa que es preservi l'antigenicitat del teixit (vegeu la figura 2) (Hobot, 1989; Carleman *et al.*, 1982).

Valoració de la tècnica. Avantatges. Mètode ràpid i fàcil per a la



↑ **Figura 2.** Fixació química, PLT, crioinclusió. Immunolocalització. a) Doble localització de xaperones DnaK (▶) (15 nm or) i GroEl (→) (5 nm or) en *Escherichia coli* amb cossos d'inclusió i utilitzant anticossos de la mateixa espècie (barra: 200 nm). b) Detall ampliat de la imatge a (barra: 50 nm). c) Detall esquemàtic de la tècnica. (Cortesia de Marta Carrió i Antoni Villaverde, Universitat Autònoma de Barcelona amb la col·laboració de la Unitat de Microscòpia Electrònica, Campus Casanova.)

localització de proteïnes o per a la localització d'una seqüència gènica mitjançant hibridació *in situ*. Es poden fer marcatges o colocalitzacions utilitzant or col·loïdal de diferents mides. Aquest mètode permet la colocalització amb anticossos provinents de la mateixa espècie incubant per les dues cares del tall ultrafí. La utilització de resines acríliques permet un 5 % del contingut aquós de la mostra. El bloc amb la mostra es conserva durant anys.

Desavantatges. Si la quantitat de proteïna per localitzar o la seqüència gènica és baixa, serà difícil obtenir senyal per aquest mètode i serà millor utilitzar el mètode de Tokuyasu, que és més sensible. Cal un equip comercial per fer la tècnica o bé un sistema *home-made*.

Imatge i informació. La imatge permet identificar bé les estructures. Les membranes són molt poc electrodenses i en general la mostra té un contrast suau, cosa que fa que el marcatge amb or destaquï fàcilment sobre l'estructura que estem marcant. És una tècnica bona per a tècniques d'immunolocalització i d'hibridació *in situ*. Per a tècniques correlatives, cal visualitzar la mostra per microscòpia òptica i la mateixa zona que hem valorat observar-la després per microscòpia electrònica.

Tècnica 3. Fixació química, tècnica de Tokuyasu (esquema 1)

La tècnica de Tokuyasu està basada en el crioseccionament de la mostra i dirigida a utilitzar posteriorment les tècniques d'immunolocalització. En aquest cas la fixació química que es portarà a terme serà a baixes concentracions d'aldehids per tal de preservar l'antigenicitat de la mostra. La mostra s'ha d'englobar en gelatina i posteriorment infiltrar amb sacarosa; posteriorment s'ha de muntar sobre un portamostres específic (*pin*) i s'ha de congelar immediatament en nitrogen líquid. Finalment s'ha de crioseccionar en un crioultramicrotòmetre a temperatures entre $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ i $-140\text{ }^{\circ}\text{C}$. Sobre les seccions ultrafines (80-100 nm) s'ha de fer la immunolocalització i finalment aquests talls s'han de contrastar i incloure en metilcel·lulosa (una fina capa que engloba el tall i que permet la inclusió i l'asseccament sense que es produeixi retracció de la mostra) (Tokuyasu, 1973; Liou *et al.*, 1996).

Valoració de la tècnica. Avantatges. Les proteïnes es mantenen en l'estat aquós (sense deshidratació de la mostra ni inclusió en resina). Alta eficiència en la immunolocalització, molt útil per a antigens presents en baixes quantitats. Molt bona definició dels sistemes

membranosos intracel·lulars. El mètode permet obtenir resultats en dos dies.

Desavantatges. La crioprotecció en sacarosa pot comportar problemes de reducció del volum cel·lular i algunes proteïnes solubles es poden perdre, ja que la fixació que normalment es fa és suau. El contrast és baix i dificulta l'observació en el microscopi. Hi ha dificultat en el crioseccionament de determinades mostres. La mostra s'ha de mantenir congelada en nitrogen líquid.

Imatge i informació. La mostra té un contrast suau, però les membranes i els compartiments cel·lulars s'observen molt bé. És una tècnica específica i molt útil per a tècniques de localització molecular.

Tècnica 4. Fixació química, criofixació, mètode híbrid, inclusió (esquema 1)

Hi ha proves que assenyalen que la fixació química per si mateixa produeix menys alteracions o artefactes significatius que els que produeixen les etapes posteriors a la fixació, com són la postfixació i el procés de deshidratació. El mètode híbrid consisteix a fixar la mostra químicament i posteriorment crioprotegir-la (generalment en sacarosa) i criofixar-la (per exemple, per HPF) o congelar-la en nitrogen líquid (si la mostra és de mida gran, més d' 1 mm^2). A continuació la mostra segueix el procés de criosubstitució, que consisteix en l'eliminació de l'aigua de la mostra a temperatures al voltant de $-90\text{ }^{\circ}\text{C}$ mitjançant l'ús de solvents orgànics, i en aquest cas utilitzarem com a solvent orgànic el metanol, ja que aquest és miscible amb la sacarosa. Aquest medi de criosubstitució contindrà, a més del solvent orgànic, diferents tipus de fixadors químics que es determinen en funció de la mostra i tipus d'estudi que vulguem fer, i que ens permetran una millor preservació ultraestructural i contrast (vegeu la figura 3) (Möbius, 2009; Sosinsky *et al.*, 2008).

Valoració de la tècnica. Avantatges. Es pot evitar l'anòxia en alguns teixits si es fixen primer químicament (per exemple: sistema nerviós, amb temps de dissecció llarg abans de criofixar la mostra). Substituïm el procés de deshidratació pel de la criosubstitució, ja que aquest és menys agressiu, ja que es fa a molt baixes temperatures ($-90\text{ }^{\circ}\text{C}$). Possibilitat de treballar amb una mostra gran i tenir una fixació homogènia.

Desavantatges. Partim d'una fixació química que pot comportar canvis estructurals de la mostra. Necessitem un equipament comercial o un sistema *home-made*.

Imatge i informació. Mostra una bona preservació de la ultraestructura amb una imatge semblant a la d'una criofixació. Serveix per fer estudis ultraestructurals, detecció de residus de sucre (tècniques amb lectines i or col·loïdal), tècniques citoquímiques, digestions enzimàtiques, tècniques correlatives (òptiques i electròniques i electrotomografia per TEM).

Tècnica 5. Fixació química, mètode híbrid, crioinclusió (esquema 1)

Aquest procés s'utilitza per fer tècniques d'immunolocalització. La fixació química ha de ser suau per tal de mantenir l'antigenicitat de la mostra, i tot seguit hem de crioprotegir la mostra en sacarosa; posteriorment hem de fer la criosubstitució (FS) a $-90\text{ }^{\circ}\text{C}$. Al medi de criosubstitució

substitució podem afegir també diferents tipus de fixadors químics. Un cop feta la criosubstitució es comença a pujar la temperatura per fer la inclusió de la mostra en resines acríliques. La pujada de temperatura dependrà del tipus de resina en què vulguem incloure finalment la mostra; així, arribarem a $-35\text{ }^{\circ}\text{C}$ per a Lowicryl K4M o a $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$ per a Lowicryl K11M. Finalment cal polimeritzar amb llum ultraviolada. (Möbius, 2009; Sosinsky *et al.*, 2008).

Valoració de la tècnica. Avantatges. El procés de criosubstitució permet preservar millor les estructures cel·lulars. El mètode permet incloure en diferents tipus de resines acríliques i a diferents temperatures.

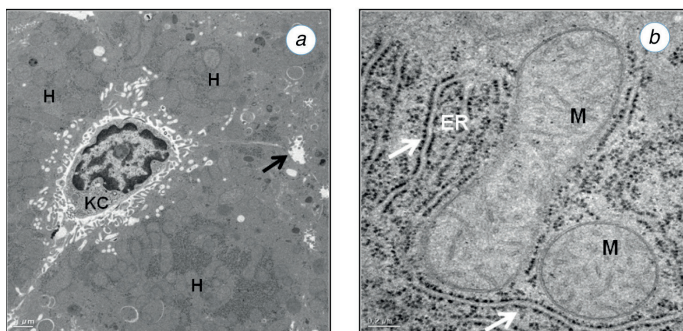
Desavantatges. Requereix un equipament comercial o un sistema *home-made*. Hi ha dificultat en el seccionament depenent del tipus de resina acrílica utilitzada.

Imatge i informació. El contrast és suau, el marcatge amb or destaca fàcilment sobre l'estructura que estem marcant. És una tècnica bona per a tècniques d'immunolocalització i d'hibridació *in situ*. Es pot fer tant per a microscòpia òptica (semifins, marcatge amb or col·loïdal i intensificació en plata) o per a microscòpia electrònica (ultrafins, marcatge amb or col·loïdal).

Tècnica 6. Criofixació, FS, inclusió (esquema 2)

La mostra provinent d'una criofixació, per alta pressió (*high pressure freezing*, HPF), pot seguir diferents vies de processament, i una seria fer el procés de criosubstitució (FS) amb l'ús de diferents solvents orgànics (acetona, alcohol, metanol...) per tal de substituir el contingut aquós de la mostra per un solvent orgànic que ens permeti incloure posteriorment la mostra. En el medi de criosubstitució podem afegir-hi diferents tipus de fixadors químics (glutaraldehyd, tetraòxid d'osmi, acetat d'uranil...) i a diferents proporcions (en funció de la mostra i el tipus d'estudi) per tal de preservar millor les estructures i intensificar-ne el contrast. Durant el procés d'escalfament els fixadors químics comencen a actuar: l'acetat d'uranil actua en el moment en què les càrregues negatives dels àcids nucleics i grups fosfat són accessibles, el tetraòxid d'osmi a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ i el glutaraldehyd entre $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ i $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$. Tenint en compte que el procés de criosubstitució es fa generalment entorn de $-90\text{ }^{\circ}\text{C}$, després s'anirà incrementant gradualment la temperatura de la mostra fins arribar a temperatura ambient i posteriorment cal fer la inclusió

.....
 † **Figura 3.** Fixació química, criofixació, mètode híbrid. a) Visió general del fetge. Hepatòcits (H), canalicles biliars (→), cèl·lules de Kupffer (KC) en un sinusoides. Barra: 1 μm . b) Detall del citoplasma. Mitochondri (M), reticle endoplasmàtic (ER) i ribosomes (→). Barra: 0,2 μm . (Unitat de Microscòpia Electrònica, Campus Casanova.)



en resina *epoxy*, i després el seccionament de la mostra i l'observació (vegeu la figura 4) (Giddings, 2003; Hurbain *et al.*, 2011; Mielanczyk *et al.*, 2014)

Valoració de la tècnica. Avantatges. És la millor manera de preservar l'arquitectura cel·lular. El temps de processament de mostres criomobilitzades no és superior a la de mètodes químics. La qualitat de la fixació depèn de la mida de l'espècimen i de la composició, com és el cas que la mostra contingui agents anticongelants de manera natural o que tingui poc contingut aquós.

Desavantatges. Tot i que hi ha protocols de rutina, sovint cal modificar les condicions de treball experimentalment, per a cada mostra, per tal d'evitar la formació de cristalls (canvi del crioprotector, del portamostres mateix...). La mida de la mostra ha de ser entorn de 2 mm de diàmetre i 200 μm de gruix.

Imatge i informació. Molt bona preservació ultraestructural, les imatges donen sensació de turgència, es mantenen els microtúbuls, li manca, però, la definició de membrana a la qual estem acostumats amb la fixació química. Aquesta via de processament ens permet fer estudis abans de l'òptic, estudis ultraestructurals, detecció i localització de residus de sucres amb l'ús de lectines i or col·loïdal, tècniques citoquímiques, digestions enzimàtiques, electrotomografia, anàlisi elemental per EFTEM (*energy filtered electron microscopy*) o per SIMS (*secondary ion mass spectrometry*).

Tècnica 7. Criofixació, FS, crioinclusió (esquema 2)

A partir d'una criofixació també podem fer tècniques d'immunolocalització i hibridació *in situ*. El procés seria com l'anterior, tot i que generalment s'utilitza acetona com a solvent orgànic i sempre cal tenir cura dels tipus de fixadors químics que utilitzem i les proporcions (opcionalment podem no utilitzar cap fixador químic), ja que cal mantenir l'antigenicitat de la mostra. Després de la criosubstitució, i igual com amb el mètode 5, podem incloure en diferents tipus de resines acríliques a diferents temperatures i polimeritzar finalment amb llum ultraviolada (McDonald, 2009; Hurbain *et al.*, 2011; Mielanczyk *et al.*, 2014).

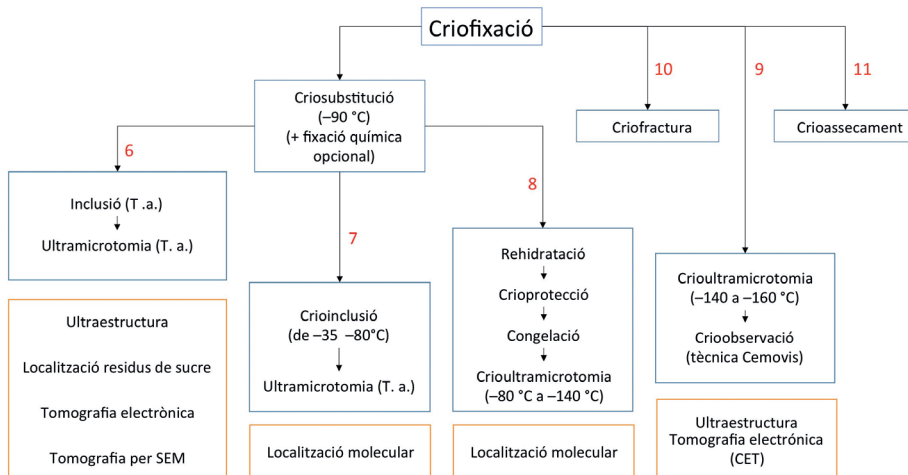
Valoració de la tècnica. Avantatges. La criosubstitució, juntament amb la criofixació, aconsegueix una molt bona preservació de les estructures cel·lulars i a la vegada manté l'antigenicitat de la mostra. El mètode ens permet incloure en diferents tipus de resines acríliques i a diferents temperatures i el bloc es manté durant anys.

Desavantatges. Els mateixos que en el procés anterior de criofixació-FS-crioinclusió. La visualització de la mostra durant el procés, la realització dels blocs i l'orientació de la mostra, té certa dificultat.

Imatge i informació. Bona preservació per a la localització molecular (immunolocalització, hibridació *in situ*...). Aquesta via de processament ens permet fer estudis previs amb el microscopi òptic de la immunolocalització amb or col·loïdal i intensificació amb plata, i també d'immunolocalització amb or col·loïdal en sobreseccions ultrafines.

Tècnica 8. Criofixació, FS, rehidratació, tècnica de Tokuyasu

La mostra criofixada per HPF i criosubstituída es pot tornar a hidratar,



↑ Esquema 2. Fixació per criofixació. Principals vies de processament d'una mostra biològica partint d'una criofixació. Els números 6, 7, 8, 9, 10 i 11 corresponen a les diferents tècniques. (Ta: temperatura ambient).

i seguir a continuació la tècnica de Tokuyasu per crioseccionar-la. Després de la criosubstitució es fa una rehidratació de la mostra, procés que es porta a terme entre 0 i 4 °C, i durant aquest procés les mostres són fixades amb glutaraldehid, ja que la fixació química durant la criosubstitució és insuficient. Posteriorment les mostres segueixen la tècnica de Tokuyasu, són crioprotegides amb sacarosa, muntades en un *pin*, congelades en nitrogen líquid i crioseccionades entre -120 °C i -140 °C. Tot seguit es fa la immunolocalització i la inclusió en metilcel·lulosa per a microscòpia electrònica o en Moviol per a microscòpia òptica (Ripper *et al.*, 2008).

Valoració de la tècnica. Avantatges. És una tècnica que combina la preservació ultraestructural de la criofixació amb un sistema d'immunolocalització molt eficient. És interessant per a mostres de fixació química difícil, com llevats, bacteris, plantes, insectes...

Desavantatges. La mida petita de la mostra, ja que partim d'una criofixació. Possibles artefactes durant la rehidratació. Requereix un equipament de criofixació.

Imatge i informació. Contrast suau, però les membranes i els compartiments cel·lulars s'observen molt bé. És una tècnica específica i útil per a tècniques de localització molecular de mostres que puguin tenir dificultats per ser fixades químicament.

A partir de la mostra criofixada, però, podem dur a terme altres tècniques, com:

Criofractura (freeze-fracturing). Consisteix a congelar la mostra i fracturar-la de manera que obtinguem dues cares de fractura, i de les cares es fa una rèplica amb carboni-platí a diferents angles i s'observa al microscopi.

Criosecament (freeze-drying). Aquesta tècnica consisteix a criofixar la mostra i extreure l'aigua de la mostra per sublimació a baixa

temperatura i sota buit, i la mostra un cop assecada pot ser inclosa en qualsevol tipus de resina i seccionada (Edelmann, 2002).

Tècnica Cemovis. Consisteix a congelar la mostra per alta pressió, crioseccionar-la i criobservar-la directament al microscopi electrònic; aquesta tècnica ens permet veure el teixit en el seu estat hidratat, sense haver tret l'aigua de la mostra i, per tant, en el seu estat més natural (Dubochet *et al.*, 1987; Al-Amoudi *et al.*, 2004).

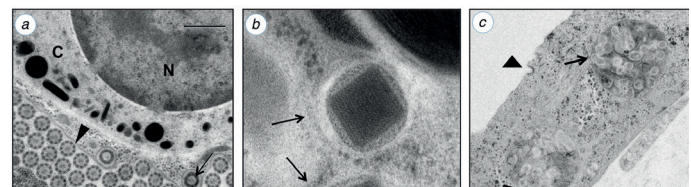
Aplicacions. Totes aquestes tècniques es poden aplicar a diferents tipus de teixits animals (per exemple: fetge, melsa, cervell...), cèl·lules en cultiu (en monocapa, sobre substrats, en medi líquid...) i en teixits vegetals (per exemple: fulles, llavors, pol·len...).

Com a exemples podem esmentar els estudis ultraestructurals de la incorporació de nanopartícules en teixits vius, les immunolocalitzacions (com la proteïna del factor de creixement fibroblàstic 8B (FGF-8b) (*fibroblast growth factor*) en els estudis de la malària, en les biòpsies clíniques (renals, epitelí nasal...), per a l'estudi de les anomalies espermàtiques, així com en els estudis de fongs patògens en plantes, entre altres.

Conclusions

La microscòpia electrònica de transmissió és essencial per entendre el funcionament de cèl·lules i teixits, ens permet visualitzar les estructures a un alt nivell resolutiu i relacionar la funció del seus components, i a més ens permet detectar i localitzar molècules *in situ*. És, però, molt important determinar, conèixer i evitar artefactes que poden donar lloc a interpretacions errònies de la ultraestructura cel·lular. És molt important, doncs, considerar les diferents microscòpies i tècniques, poder treballar-hi, valorar els resultats i comparar-los, per tal d'arribar a una bona conclusió final.

↑ Figura 4. Tècnica 6. Criofixació, FS, inclusió. a) Estructura embrionària (miracidi) de *Mediogonimus jourdanei* (trematode), centriol (→), cilis (▶), nucli (N) i citoplasma (C) (barra: 0.5µm) (cortesia de Jordi Miquel, Universitat de Barcelona). b) Tricocist (→) de dinoflagelat (cortesia d'Esther Garces, Institut de Ciències del Mar, CSIC). c) Cèl·lules Caco-2 directament criofixades sense crioprotecció, *coated-pit* (punta de fletxa) i autofagosomes (→) (cortesia de Carles Enrich, Universitat de Barcelona, en col·laboració amb la Unitat de Microscòpia Electrònica, Campus Casanova, Universitat de Barcelona).



Bibliografia

- AL-AMUDI, A. [et al.] (2004). «Cryo-electron microscopy of vitreous sections of native biological cells and tissues». *J. Struct. Biol.*, 148: 131.
- BOZZOLA, J. J. (2014). «Conventional specimen preparation. Techniques for transmission electron microscopy». *Methods in Molecular Biology*, 1117: 1-19.
- CARLEMALM, E. (1982). «Resin development for electron microscopy and an analysis of embedding at low temperature». *J. Microsc.*, 126: 123.
- CORTADELLAS, N. [et al.] (2012). *Transmission electron microscopy in cell biology: sample preparation techniques and image information. Handbook of instrumental techniques for materials, chemical and biosciences research. Part III. Biosciences technologies*. Barcelona: Centres Científics i Tecnològics, Universitat de Barcelona.
- DUBOCHET, J. [et al.] (1987). «Cryo-electron microscopy of vitrified specimens». A: R. A. Steinbrecht; K. Zierold (ed.). *Cryotechniques in biological electron microscopy*. Berlin: Springer, p. 114.
- DURFORT, M. (1993). «Reflexions sobre l'observació i la interpretació de les imatges microscòpiques en biologia cel·lular (els artefactes metodològics)». *Memorias de la Real Academia de Ciencias y Artes de Barcelona (RACAB)*. Discurs d'ingrés, 915.
- EDELMANN, L. (2002). «Freeze-dried and resin-embedded biological material is well suited for ultrastructure research». *J. Microsc.*, 207: 5.
- GIDDINGS, T. H. (2003). «Freeze-substitution protocols for improved visualization of membranes in high-pressure frozen samples». *J. Microscopy*, 212: 53-61.
- HAYAT, M. A. (2000). *Principles and techniques of electron microscopy, biological applications*. 4a ed. Cambridge: Cambridge University Press.
- HOBOT, J. A. (1989). «Lowicryls and low temperature embedding for colloidal gold methods». A: M. A. Hayat (ed.). *Colloidal gold: principles, methods and Applications*. San Diego: Academic Press, 75.
- HURBAIN, I. [et al.] (2011). «The future is cold: cryo-preparation methods for transmission electron microscopy of cells». *Biol. Cell*, 103: 405-420.
- LIU, W. [et al.] (1996). «Improving structural integrity of cryosections for immunogold labelling». *Histochem. Cell Biol.*, 106: 41.
- MASCORRO, J. A. [et al.] (2007). «Processing biological tissues for ultrastructural study». A: J. Kuo (ed.). *Electron microscopy. Methods and protocols. Methods in molecular biology*. Human Press.
- MCDONALD, K. L. (2009). «A review of high-pressure freezing preparation techniques for correlative light and electron microscopy of the same cells and tissues». *J. Microscopy*, 235: 273-281.
- MIELANCZYK, L. [et al.] (2014). «Closer to the native state. Critical evaluation of cryotechniques for transmission electron microscopy: preparation of biological samples». *Folia Histochemica et Cytobiologica*, 52 (1): 1-17.
- MÖBIUS, W. (2009). «Cryopreparation of biological specimens for immunoelectron microscopy». *Annals of anatomy*, 191: 231-247.
- RIPPER, D. [et al.] (2008). «Cryo-section immunolabelling of difficult to preserve specimens: advantages of cryofixation, freeze-substitution and rehydration». *Biol. Cell*, 100: 109.
- SOSINSKY, G. E. [et al.] (2008). «The combination of chemical fixation procedures with high pressure freezing and freeze substitution preserves highly labile tissue ultrastructure for electron tomography applications». *J. Structural Biology*, 161: 359-371.
- TOKUYASU, K. T. (1973). «A technique for ultracryotomy of cell suspensions and tissues». *J. Cell Biol.*, 57: 551.