

Soportes del vidrio recubiertos con poli-L-lisina para analizar materiales biológicos en partículas tanto al microscopio electrónico de rastreo como al de transmisión

Francisco Hernández

Unidad de Microscopia Electrónica, Universidad de Costa Rica.

Hiroshi Akahori

Naka Works, Hitachi Ltd., Japón

Fernando Brenes

Servicio de Patología, Hospital México y Unidad de Microscopia Electrónica, Universidad de Costa Rica.

(Recibido: 18 de junio de 1985)

Abstract: The use of poly-L-lisine solutions to form polycationic membranes on micro cover glass, acting as an adhesive medium for biological particulate specimens (e.i. bacteria, yeast and isolated cells) is described. Adhered specimens to cover glass were fixed, dehydrated, dried to critical point and covered again with platinum-carbon or gold, and then, they were placed under a scanning electron microscope. Later, a sample was digested in sodium hypochlorite, separating the metal layer representing the replica of sample. It was collected on a copper grid and it was analyzed by transmission electron microscope.

Usualmente los métodos de preparación de especímenes biológicos para microscopia electrónica de rastreo (MER) requieren de fijación, deshidratación, secado en punto crítico y de recubrimiento con una película metálica para hacerlos electroconductores (Cohen, 1974). El secado en punto crítico se hace colocando las maestras, ya sean tejidos animales o vegetales, en canastas de cedazo, que son introducidas en la cámara del secador. Este proceso resulta relativamente simple cuando se trata de especímenes macroscópicos; pero en los casos de microorganismos o células aisladas, que para efectos de este informe denominaremos "material en partículas", el proceso se complica pues se requieren medios de soporte para llevar esos materiales al secador, ya que no pueden colocarse directamente en las canastas, pues debido a su pequeño tamaño se perderían fácilmente. Como medios de soporte se han utilizado: cápsulas de agar, membranas de acetato de celulosa tipo "millipore" e incluso se han recurrido a incluir material en partículas dentro de excrecencias glandulares de cítricos. Algunos de esos métodos resultan engorrosos y en otros casos no impiden la pérdida de material, lo cual es crítico cuando se trata de

microorganismos no cultivables *in vitro*, o bien que se encuentran en bajas proporciones en las muestras estudiadas.

Tal vez el método más simple y práctico para secar material en partículas es adsorbiéndolo sobre membranas de acetato de celulosa, tipo "millipore". El proceso consiste simplemente en colocar una gota de la suspensión de partículas en alcohol de 100%, sobre una membrana filtrante, cuya porosidad debe ser menor que el diámetro de las partículas e incluirla en una canasta de secado en punto crítico, o bien secarlos al aire, corriendo el riesgo de alterar la estructura del espécimen (Nickerson *et al.*, 1974).

Por otra parte, recientemente el doctor Hiroshi Akahori ideó un método de preparación de réplicas metálicas a temperatura ambiente, para analizarlas al microscopio electrónico de transmisión (MET). Estos moldes o réplicas son obtenidos a partir de especímenes preparados e incluso analizados al MER. El método se describe en la figura 1; como se ilustra, consiste en separar la película metálica que recubre la muestra y recogerla sobre una rejilla para MET. Uno de los pasos fundamentales de este proceso consiste en cubrir la película metálica con una

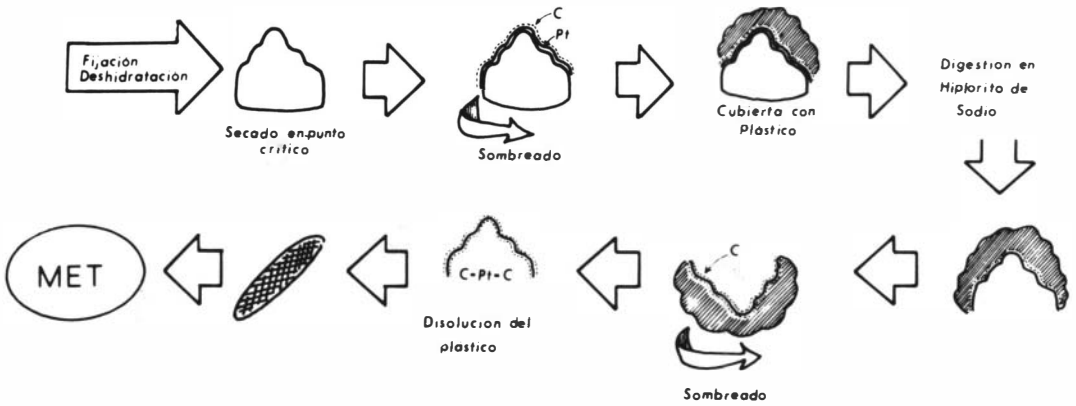


Fig. 1: Esquema del método para preparación de réplicas tisulares metálicas a temperatura ambiente.

gota de cemento plástico, que la protegerá durante la digestión de la muestra, la cual se realiza sumergiéndola en hipoclorito de sodio. Pero, tal tratamiento no puede aplicarse a especímenes adsorbidos sobre membranas de acetato de celulosa, pues éstas son solubles en el cemento plástico, por lo que no es posible extraer la réplica.

Una buena alternativa es el empleo de soluciones de poli-L-lisina, capaces de formar membranas policationicas sobre sustratos de vidrio, como cubreobjetos, los que se tornan adherentes, sirviendo como medios de soporte para los materiales biológicos en partículas, tal como había sido descrito previamente (Sanders *et al.*, 1975; Mazia *et al.*, 1975; Kaneshima *et al.*, 1978).

En este informe se describe el método de formación de membranas policationicas, sobre cubreobjetos recubiertos de agarosa, adaptándolo a la técnica de réplicas; así, se logra el análisis del material en partículas tanto al MER, como al MET.

MATERIAL Y METODOS

En el método original (Sanders *et al.* 1975) las membranas policationicas se formaron directamente sobre cubreobjetos. En nuestro caso los cubreobjetos fueron previamente cubiertos con una delgada película de agarosa, sobre la cual se depositó la solución de poli-L-lisina, de manera que los especímenes se pueden desprender fácilmente del vidrio, arrastrando la capa de agarosa; lo que resulta prácticamente imposible

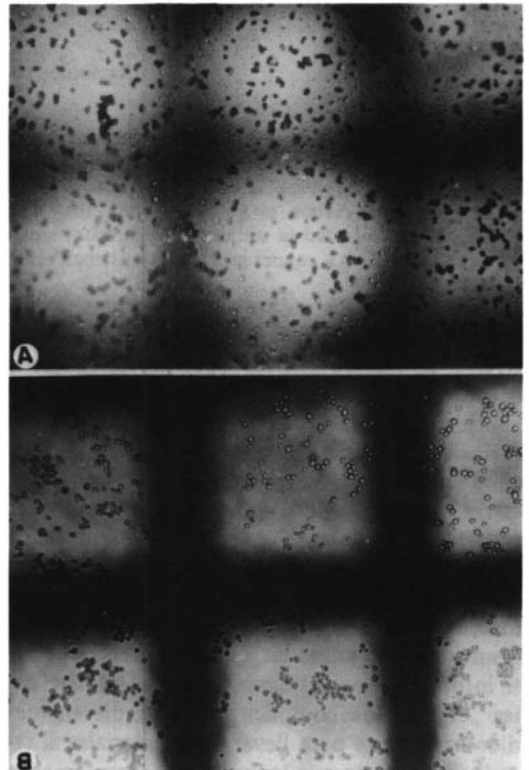


Fig. 2: Preparación de levaduras colocadas sobre un cubreobjetos con poli-L-lisina. A. Muestra colocada al inicio del proceso. B. La misma muestra deshidratada y seca en punto crítico. Las bandas oscuras corresponden a una rejilla de malla 400 colocada bajo el cubreobjetos como referencia del área fotografiada.

cuando la membrana policationica se ha formado directamente sobre el vidrio.

La metodología empleada fue la siguiente:

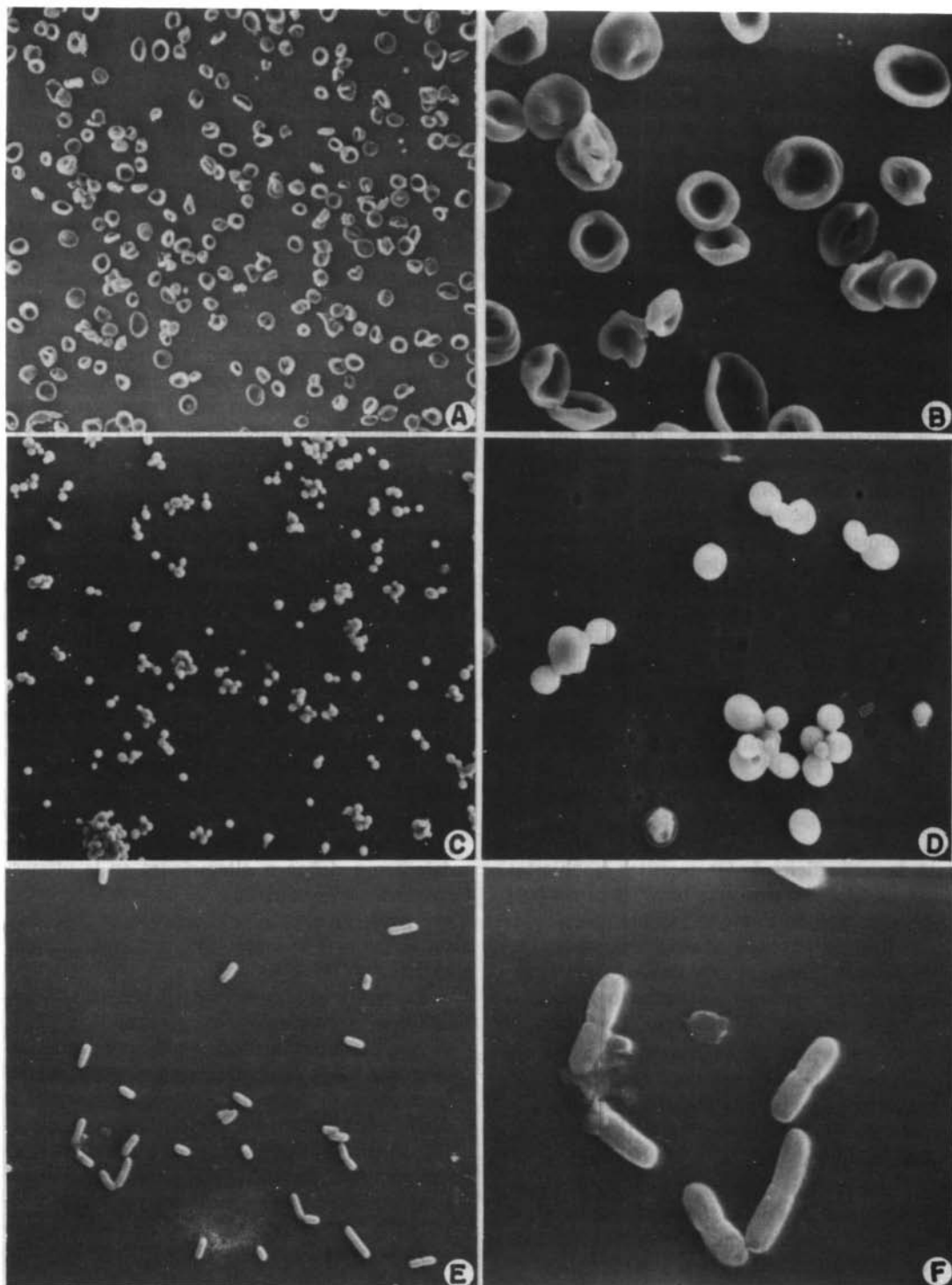


Fig. 3: Preparaciones de materiales en partículas observados al microscopio electrónico de rastreo. A-B. Sangre periférica de un paciente con una severa hemoglobinopatía (muestra suministrada por el doctor Emer Alfaro del Hospital Nacional de Niños). C-D. *Candida albicans*. E-F. *Escherichia coli*.

- a. Se sumergieron los cubreobjetos de 12 mm de diámetro en una solución de agarosa al 3% a 50°C, se drenó el exceso de líquido y se dejaron secar a temperatura ambiente.
- b. Sobre esos cubreobjetos se depositó una alícuota de 20 μ l de poli-L-lisina (1 mg/ml) en solución amortiguadora de fosfato salina a pH 7,2 y se dejó a temperatura ambiente en cámara húmeda durante una hora, para que se formara la membrana policatiónica.
- c. Se lavó el exceso de poli-L-lisina con el amortiguador de fosfatos y se drenó sobre papel filtro.
- d. Sobre esas preparaciones se colocaron alícuotas de 25 μ l de las muestras a estudiar, las cuales previamente habían sido fijadas en glutaraldehído al 2,5%, durante dos horas. Los especímenes se dejaron en contacto con la membrana policatiónica durante una hora, a temperatura ambiente en cámara húmeda. Luego se lavaron, se fijaron de nuevo en tetraóxido de osmio, se deshidrataron y secaron en punto crítico.
- e. Las muestras que sólo se iban a analizar al MER se cubrieron con oro en un cobertor iónico (Eico 1B 3). Las que además, se analizarían al MET, se cubrieron con platino-carbón en un evaporador de metales (Hitachi HU S5), sublimando ambos elementos a una presión de 1×10^{-6} Torr. El ángulo de incidencia de las partículas metálicas sobre la muestra fue de 15 a 20 grados.
- f. A las superficies de las muestras recubiertas de metal se les hizo una serie de cortes perpendiculares entre sí, de manera que quedara dividida en cuadros de aproximadamente 4 mm². Luego el área cuadrículada se recubrió con una gota de cemento y se dejó secar a temperatura ambiente (1 a 2 horas).
- g. Se cortó la película de agarosa alrededor del casquete plástico, el cual se desprendió arrastrando consigo la muestra adherida a la película de agarosa mediante la membrana policatiónica.
- h. La preparación se sumergió en hipoclorito de sodio para digerir la muestra, quedando el casquete plástico con la impronta metálica del espécimen, que se lavó sumergiéndole en agua destilada.
- i. La impronta se recubrió de nuevo con carbón, de manera que quedó integrada por una capa de carbón-platino-carbón (Fig. 1).
- j. El casquete plástico se disolvió en acetona, liberando la réplica que fue recogida sobre una rejilla para MET.
Además, se evaluó la efectividad del método, contando el número de partículas colocadas sobre el cubreobjetos al inicio del proceso y luego, contando las que permanecieron después del secado en punto crítico. Para facilitar el conteo se fijó una rejilla al reverso del cubreobjetos como indicador del área evaluada (Sanders *et al.* 1975). Esta evaluación se hizo con eritrocitos, *Candida albicans* y *Escherichia coli*. Las réplicas estudiadas fueron de bacterias como *Aeromonas hydrophyla* y *Salmonella typhi*. También se observaron trofozoitos de *Enteromonas muris* obtenidos de contenido intestinal de ratones.

RESULTADOS

El método tuvo una efectividad que osciló entre el 80 y el 95%; de manera, que del número inicial de partículas colocadas sobre el cubreobjetos con poli-L-lisina sólo se perdió del 5 al 20%. Las figuras 2a y b corresponden a una preparación de levaduras fotografiadas en un microscopio de contraste de fases al inicio del proceso y luego de secado por punto crítico, observándose como la mayoría de las partículas permanecieron adheridas al sustrato.

En las preparaciones analizadas al MER se pudieron localizar fácilmente los especímenes, dada la alta proporción de partículas que había por áreas de muestra estudiada. Además, no se detectaron daños o alteraciones en la ultraestructura de la superficie de esos especímenes, que pudieron achacarse al proceso de adhesión. En la figura 3 se muestran eritrocitos, *Escherichia coli* y *Candida*.

La mayor validez de este método, es su adaptación a la preparación de réplicas para MET, ya que permite visualizar detalles ultraestructurales que no es posible detectar al MER; así, en las réplicas de bacterias aparece una superficie surcada irregularmente, que les brinda un aspecto rugoso (Fig. 4); en tanto al MER esas bacterias aparecen lisas. También el método permite observar especímenes relativamente grandes como es el caso de protozoarios, tal como se indica en la figura 5.

CONCLUSIONES

El empleo de sustratos recubiertos con poli-L-lisina como medio de soporte para procesar ma-

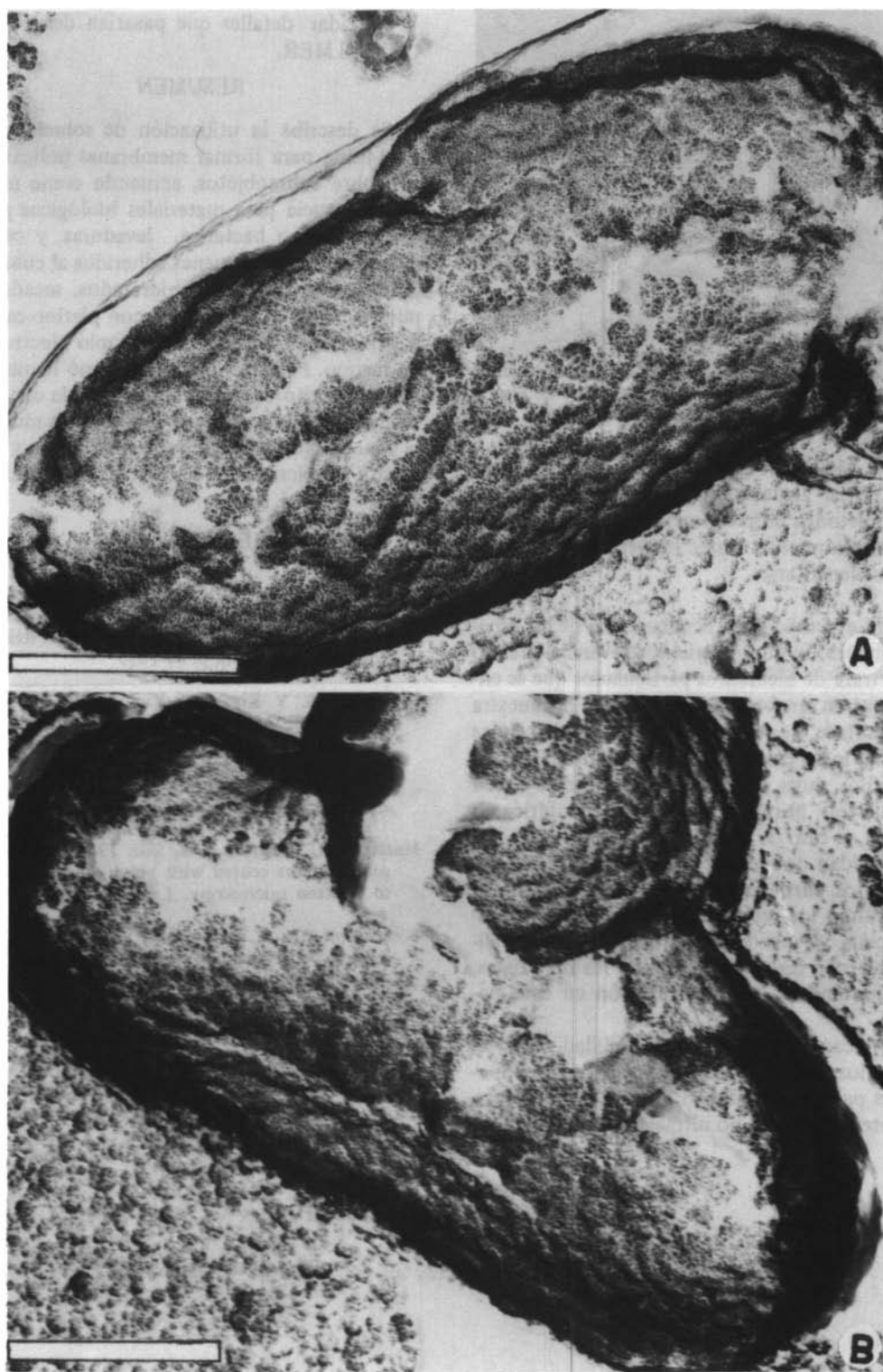


Fig. 4: Réplicas de platino-carbón de bacterias A. *Aeromonas* sp B. *Salmonella* sp (Barra 0.5 μ m)

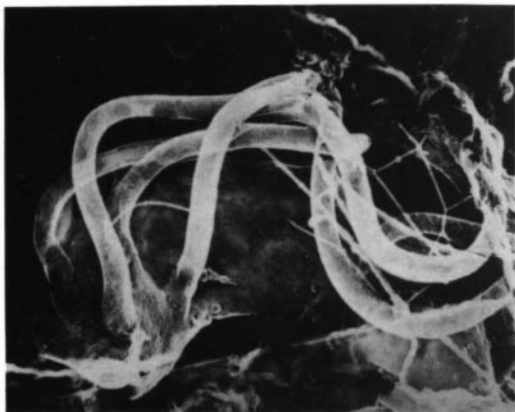


Fig. 5: Réplicas de platino de un trofozoito de *Enteroforma* obtenido de intestino murino.

teriales biológicos particulados para MER, permite obviar algunos problemas afrontados con otros métodos de preparación, como los indicados anteriormente. Entre las ventajas encontradas pueden citarse:

- a. Alta efectividad en la adherencia de los especímenes; lo cual adquiere relevancia cuando se trata de elementos particulados que se encuentran en baja proporción en la muestra estudiada, como podría ser el caso de células sanguíneas como leucocitos basófilos o eosinófilos, cuya proporción es menor de 3% en muestras normales de sangre periférica; o bien, el caso de algunos coproparásitos.
- b. Facilidad de trabajo: al lograr adherir los elementos particulados al soporte de vidrio, se facilitan los procesos de fijación y deshidratación, ya que de lo contrario deberían realizarse con las suspensiones de los materiales, ameritándose de centrifugación en cada paso.
- c. Réplicas de platino: la posibilidad de obtener los moldes o improntas de los especímenes para analizarlos al MET, brinda un gran potencial al estudio ultraestructural, al poder

dilucidar detalles que pasarían desapercibidos al MER.

RESUMEN

Se describe la utilización de soluciones de pol-L-lisina para formar membranas policationicas sobre cubreobjetos, actuando como medio de adherencia para materiales biológicos particulados, como bacterias, levaduras, y células aisladas. Los especímenes adheridos al cubreobjetos fueron fijados, deshidratados, secados en punto crítico y recubiertos con platino-carbón u oro y analizados al microscopio electrónico de rastreo. Posteriormente se digirió la muestra en hipoclorito de sodio, liberándose la capa metálica, que representa una réplica de la muestra, la cual se recogió sobre rejillas de cobre y se analizó al microscopio electrónico de transmisión.

REFERENCIAS

- Cohen, A.L. 1974. Critical point drying. *In: Principles and techniques of scanning electron microscopy.* Hayat M.A. (Ed.) Vol. 1. Van Nostrand Reinhold Company. New York p. 44-105.
- Kaneshima, S.; Y. Kiyasu; H. Kudo; S. Koga & K. Tanaka. 1978. An application of scanning electron microscopy to cytodagnosis of pleural and peritoneal fluids. Comparative observations of the same cells by light microscopy and scanning electron microscopy. *Acta Citol.* 22: 490-499.
- Mazia, D.; G. Schatten & W. Sale. 1975. Adhesion of cells surfaces coated with polylysine: applications to electron microscopy. *J. Cell. Biol.* 66: 198-200.
- Nickerson, A.W.; L.A. Bulla & E.C. Kurtzman. 1974. Spores. *In: Principles and techniques of scanning electron microscopy.* Hayat, M.A. (ed.) Vol. I. Van Nostrand Reinhold Company, New York p. 159-180.
- Sanders, S.K.; E.L. Alexander & R.C. Braylan. 1975. A high-yield technique for preparing cells fixed in suspension for scanning electron microscopy. *J. Cell. Biol.* 67: 480-484.