

COMUNICACIONES

Aplicación del método de coagulación de plasma al estudio ultraestructural de especímenes biológicos.

Francisco Hernández y Erika Coto

Departamento de Microbiología, Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica.

Alirio Colmenares y Lisela Moreira

Unidad de Microscopía Electrónica, Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica.

(Rec. 5-VII-1990. Acep. 8-XI-1990)

Abstract: Biological particulate specimens, including *Saccharomyces cerevisiae* yeast, bovine spermatozoa and human blood cells (normal erythrocytes and leukemic cells) were processed for scanning and transmission electron microscopy using the coagulated plasma technique. The specimens were suspended in frozen and thawed plasma; later, coagulation was induced by adding CaCl_2 . The clot was cut into small pieces and processed as tissue fragments. The technique is an useful tool when processing biological particulate specimens for electron microscopy.

Key words: Electron microscopy technique, ultrastructure

El procesamiento de materiales biológicos en partículas para microscopía, como células aisladas, protozoos, levaduras y bacterias, es engorroso y consume más tiempo que el requerido para muestras tisulares. Parte del problema estriba en la necesidad de centrifugar las suspensiones de especímenes cada vez que se cambia un reactivo (fijadores, amortiguadores, alcoholes y medios de inclusión), con pérdida frecuente de material (Hernández *et al.* 1986). Los problemas son más evidentes cuando se requiere hacer cortes para microscopía, especialmente electrónica, ya que la centrifugación de las partículas se dificulta por la alta densidad de las resinas de inclusión empleadas. Además, este proceso puede inducir un empaquetamiento excesivo de los especímenes.

Al menos para microscopía de luz estos problemas han sido solucionados con el método de plasma-trombina (De Girolami 1972, De Girolami & De Girolami 1988). El método fue descrito inicialmente para el análisis citológico endometrial (De Girolami *et al.* 1966) y posteriormente adaptado a otros especímenes en suspensión, como líquidos de derrame, sedimentos urinarios, lavados bronquiales, gástricos y suspensiones de parásitos (De Girolami 1988)

En última instancia el método del coágulo de plasma constituye la transformación del análisis de un frotis, en un proceso histológico con seccionamiento y tinción del material. Esta técnica podría utilizarse en el estudio ultraestructural de especímenes biológicos en partículas, tanto al microscopio electrónico de transmisión (MET), como al de rastreo (MER).

En el método de plasma-trombina (De Girolami 1972, De Girolami & De Girolami 1988) la muestra en partículas se resuspende en una alícuota de plasma y se coagula con trombina. Aunque la duración de la trombina es relativamente corta, cuando ésta se emplea en pruebas cuantitativas de coagulación (24 a 48 horas a 4°C o 15 días a -20 °C), su actividad coagulante puede mantenerse por periodos aún mayores de un mes (De Girolami 1972) lo que es útil para fines cualitativos, como en el método que se describe. No obstante, su precio obliga a buscar otras opciones de menor costo. Una alternativa es el uso de CaCl_2 para formar un coágulo de plasma, cuyos resultados presentamos en este informe.

Los materiales en partículas utilizados fueron suspensiones de células sanguíneas humanas (eritrocitos normales y leucocitos leucémicos),

Saccharomyces cerevisiae y espermatozoides bovinos. Esas suspensiones se fijaron con glutaraldehído al 2.5% en amortiguador de fosfatos (GA) o con solución fijadora de Karnovsky (Karnovsky 1965), durante 45 minutos a temperatura ambiente. Luego se lavaron tres veces en el amortiguador de fosfatos, centrifugando a 1000 g durante 10 minutos cada vez y se resuspendieron en dos o tres gotas de plasma.

El plasma empleado se obtuvo de una muestra de sangre venosa citratada, centrifugada a 1000 rpm durante 5 minutos. Luego se congeló y descongeló sucesivamente cinco veces a fin de romper las plaquetas. Posteriormente, se centrifugó a 5000 rpm por 10 minutos para eliminar los restos plaquetarios.

Para formar el coágulo con la muestra resuspendida en plasma, se adicionó un volumen de CaCl_2 (0.025 M) semejante al de plasma, se agitó manualmente y se incubó a 37°C durante 3 minutos para obtener un coágulo. Si éste no se formó, se agregó más CaCl_2 y se incubó nuevamente hasta obtenerlo. El plasma debe ser fresco y tanto éste como el CaCl_2 deben estar a 37°C para favorecer la coagulación; este procedimiento se basa en la prueba hematológica conocida como tiempo de recalcificación (Sáenz, Altmella & Jiménez 1973). Los coágulos con la muestra se fijaron con GA o solución de Karnovsky por un mínimo de 30 minutos, se lavaron en el amortiguador y se cortaron en fragmentos de ca 1mm³ o de aproximadamente 2 x 3 x 5 mm y se fijaron nuevamente con OsO_4 . Los fragmentos pequeños se procesaron para ultramicrotomía y se analizaron al MET; los otros fragmentos se sometieron a criofractura (Bullivant 1970), secado por sublimación en alcohol terbutílico (Inoué & Osatake 1988) y se analizaron al MER.

Los coágulos de plasma, con las muestras incluídas, brindan un soporte a los especímenes, el cual permite procesarlas fácilmente para MER o MET (Figs. 1 a 4). Además, facilita la criofractura de los especímenes (Figs. 1a y 2a), permiti-

tiendo observar detalles internos, como se aprecia en la fig. 2a, en la cual aparecen eritrocitos fracturados en diferentes planos, mostrando superficies de fractura con apariencia similar a la observada en las secciones analizadas al MET (Fig. 2b). No obstante, en la superficie externa de los eritrocitos se observan irregularidades, que podrían deberse a depósitos de fibrina, fenómeno que no se presenta con las otras células (Figs. 3 y 4).

Entre las ventajas del método, pueden citarse: economía de tiempo, facilidad de trabajo, reducción en las pérdidas de especímenes y distribución homogénea de éstos en la preparación. Esto último se logra diluyendo la muestra, lo cual es beneficioso cuando se tienen volúmenes escasos, por ejemplo en la búsqueda de células malignas en sangre periférica o el análisis de alícuotas de esperma bovino provenientes de un banco de semen.

La observación de superficies externas de especímenes biológicos en partículas, se obvió con el uso de membranas policationicas de poli-L-lisina (DeMaiza *et al.* 1975, Hernández *et al.* 1986). Sin embargo, su análisis mediante criofractura-importante para estudiar estructuras intracelulares- no puede hacerse mediante ese método, pero resulta relativamente simple incluyendo el espécimen en un coágulo de plasma como se muestra en este informe. Obviamente, los especímenes deben ser ultraestructuralmente estables a 37° C, lo cual no ocurre con algunas células malignas (De Girolami 1990 com. pers.). Además, si el plasma que se utiliza presenta plaquetas se favorece la coagulación; pero en el análisis ultraestructural éstas representan un problema, por lo que se rompen mediante congelación y descongelación, para liberar sus fosfolípidos y se eliminan sus restos centrifugando a mayor velocidad.

Se concluye que el método del coágulo de plasma puede utilizarse para la preparación de materiales biológicos en partículas para análisis al MET o MER.

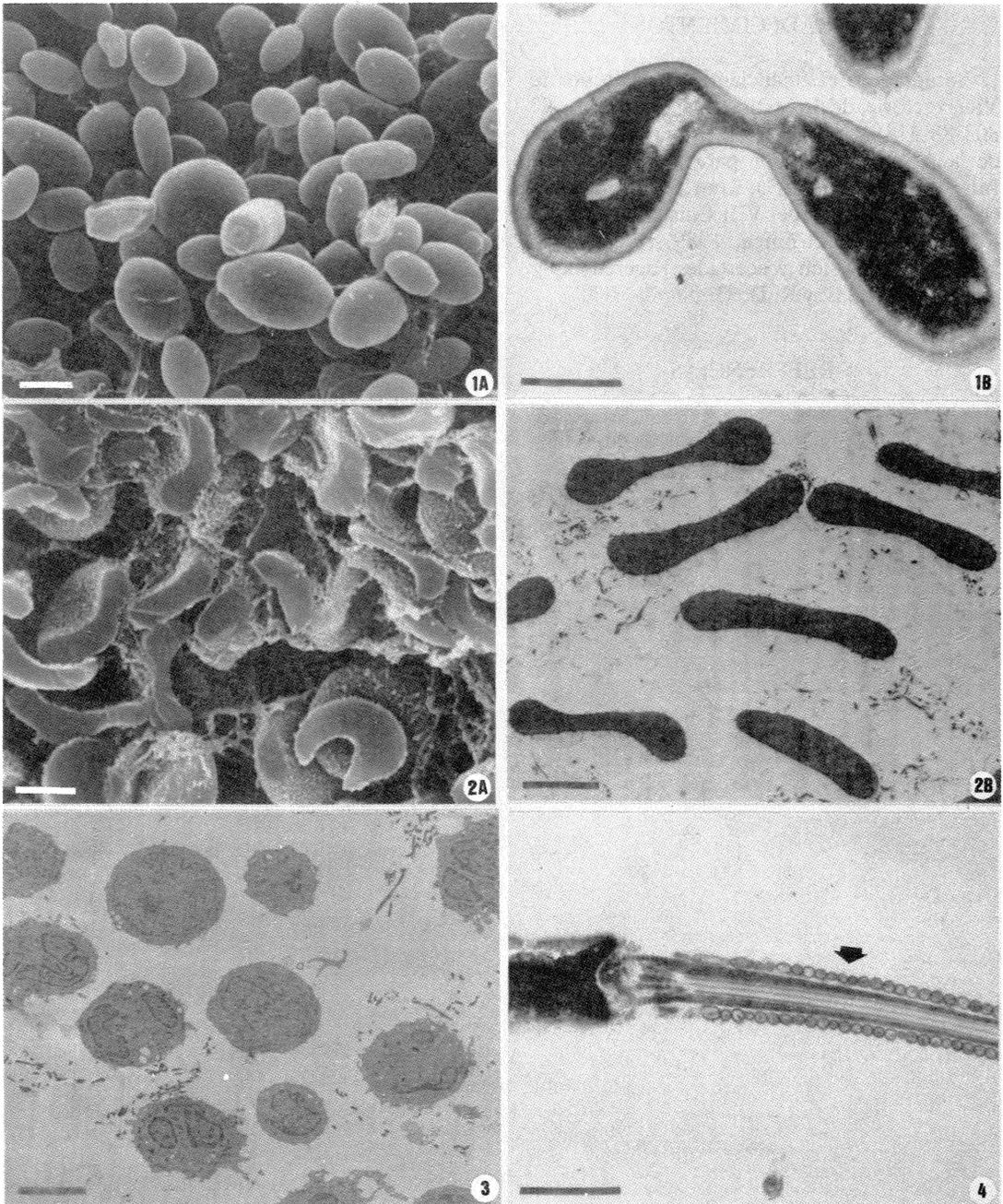


Fig. 1: Levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*). 1a. Grupo de levaduras observadas al MER (Barra = $3\mu\text{m}$). 1b. Una levadura en división, cortada longitudinalmente, MET (Barra = $1\mu\text{m}$). Fig. 2. Eritrocitos normales de origen humano. 2a. Especimen procesado mediante criofractura y analizado al MER (Barra = $3\mu\text{m}$). 2b. Cortes ultrafinos mostrando secciones transversales de los eritrocitos, MET (Barra = $3\mu\text{m}$). Fig. 3. Células leucémicas humanas, MET (Barra = $3\mu\text{m}$). Fig. 4. Espermatozoide bovino, la flecha señala la vaina mitocondrial, MET (Barra = $1\mu\text{m}$).

AGRADECIMIENTOS

Se agradece el financiamiento dado por la Vicerrectoría de Investigación (Proyecto N° 803 88 418) y del gobierno de Japón, a través de la Agencia del Japón para la Cooperación Internacional ("JICA"). Uno de los autores (AC) fue estudiante del VIII Curso Regional de Microscopia Electrónica, 1989. Además, se agradece la revisión y acertadas sugerencias y correcciones de E. y R. De Girolami.

REFERENCIAS

- Bullivant, S. 1970. Present status of freezing techniques, p.101-106 *In* D. F. Parson (ed.). *Techniques in electron microscopy*. Academic Press, Londres.
- De Girolami, E., E. E. Gahres & R. B. Nelson. 1966. Histo-brush technic for endometrial tissue study. *Obst. Gynecol.* 28: 861-866.
- De Girolami, E. 1972. Plasma thrombin technique for cell block. *Cancer Cyt.* 12: 25-30.
- De Girolami, E. & R. De Girolami. 1988. Aplicación del método de plasma-trombina al diagnóstico de enfermedades parasitarias. *Rev. Biol. Trop.* 36: 485-498.
- Hernández, F., H. Akahori & F. Brenes. 1986. Soportes de vidrio recubiertos con poli-L-lisina para analizar materiales biológicos en partículas tanto al microscopio electrónico de rastreo como al de transmisión. *Rev. Biol. Trop.* 34: 105-110.
- Inoué, T. & H. Osatake. 1988. A new drying method of biological specimens for scanning electron microscopy: The t-Butyl alcohol freeze-drying method. *Arch. Histol. Cytol.* 51:53-59.
- Karnovsky, M. H. 1965. A formaldehyde glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. *J. Cell. Biol.* 27: 137.
- Mazia, D., G. Schatten & W. Sale. 1975. Adhesion of cells surfaces coated with polylysine: applications to electron microscopy. *J. Cell Biol.* 66: 198-200.
- Sáenz, G. F., F. Altmella & R. Jiménez. 1973. Coagulación sanguínea, teoría, técnicas e interpretación. Universidad de Costa Rica: Serie de Ciencias Médicas N° 57, San José, Costa Rica. 144 p.