

UNIDAD DE SOPORTE AL DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO
SUB-UNIDAD DE SOPORTE AL DIAGNÓSTICO - ANATOMÍA PATOLÓGICA

GUÍA DE PROCEDIMIENTO: PREPARACIÓN DE REACTIVOS
PARA ESTUDIOS POR MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE
TRANSMISIÓN



<p>Elaborado por:</p> <p>Sub Unidad de Soporte al Diagnóstico - Anatomía Patológica</p>	<p>Revisado por:</p> <p>Unidad de Soporte al Diagnóstico y Tratamiento Sub Unidad de Soporte al Diagnóstico Unidad de Gestión de la Calidad</p>	<p>Aprobado por:</p> <p>Dra. Elizabeth Zulema Tomas Gonzáles de Palomino Directora General del Instituto Nacional de Salud del Niño San Borja</p>
--	--	--



GUIA DE PROCEDIMIENTO: PREPARACIÓN DE REACTIVOS PARA ESTUDIOS POR MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN

INDICE

I.	Título	3
II.	Finalidad	3
III.	Objetivos	3
	a. Objetivos Generales.....	3
	b. Objetivos Específicos	3
IV.	Ámbito de aplicación	3
V.	Nombre del Procedimiento a Estandarizar y Código CPMS	4
VI.	Consideraciones Generales	4
	a. Definiciones Operativas	4
	1. Definición del Procedimiento	4
	2. Aspectos Epidemiológicos importantes.....	4
	3. Consentimiento Informado	4
	b. Conceptos Básicos	4
	c. Requerimientos Básicos.....	5
VII.	Consideraciones Específicas	6
	a. Descripción detallada del Proceso o Procedimiento:.....	6
	1. Preparación de reactivos/soluciones para estudio de MET	6
	b. Indicaciones	12
	c. Riesgos o Complicaciones Frecuentes:.....	12
	d. Riesgos o Complicaciones poco Frecuentes:.....	12
	e. Contraindicaciones.....	13
VIII.	Recomendaciones	13
IX.	Autores, Fecha y Lugar.....	13
X.	Anexos	14
XI.	Bibliografía.....	15



PERÚ

Ministerio
de Salud

Instituto Nacional de
Salud del Niño San Borja



I. TÍTULO

Guía de Procedimiento: Preparación de Reactivos para Estudios de Microscopía Electrónica de Transmisión.

II. FINALIDAD

Contribuir a la organización y gestión adecuada de la Sub-Unidad de Soporte al Diagnóstico-Anatomía Patológica, en el marco de la mejora continua de la calidad en el Instituto Nacional de Salud del Niño San Borja.

III. OBJETIVOS

a. Objetivos Generales

Proporcionar un instrumento de apoyo estandarizado a fin de lograr un procesamiento óptimo y de calidad de las muestras que requieran estudios Microscopía Electrónica de Transmisión (MET), proporcionados por la Sub-Unidad de Soporte al Diagnóstico- Anatomía Patológica.

b. Objetivos Específicos

- Definir conceptualmente la nomenclatura, simbología, datos técnicos y procedimientos de preparación de reactivos competentes al área de Microscopía Electrónica de Transmisión.
- Estandarizar los procedimientos ejecutados en la preparación de reactivos empleados en el Laboratorio de Procesamiento de Muestras de Microscopía Electrónica de Transmisión.

IV. ÁMBITO DE APLICACIÓN

La presente Guía de Procedimiento es de aplicación en el ámbito del laboratorio de procesamiento de muestras de microscopía electrónica de transmisión, ubicado en la Sub-Unidad de Soporte al Diagnóstico- Anatomía Patológica del Instituto Nacional de Salud del Niño San Borja.

Los usuarios de la guía son los tecnólogos del Laboratorio de Procesamiento de Muestras de Microscopía Electrónica de Transmisión, así como también puede servir de consulta para profesionales de la salud de la Sub-Unidad de Soporte al Diagnóstico- Anatomía Patológica.

**V. NOMBRE DEL PROCEDIMIENTO A ESTANDARIZAR Y CÓDIGO CPMS**

Procedimiento: Preparación de Reactivos para Estudios por Microscopía Electrónica de Transmisión

Código CPMS: No Aplica

VI. CONSIDERACIONES GENERALES**a. Definiciones Operativas****1. Definición del Procedimiento**

Es el conjunto de técnicas a las que son sometidos los tejidos o materiales biológicos para poder ser observados al Microscopio Electrónico de Transmisión (MET), el principal objetivo es conservar la morfología tisular de la muestra, preservando de forma similar a su estado “in vivo” la estructura intra y extracelular del tejido, hasta obtener cortes ultrafinos de la muestra que resistan el alto vacío y sean estables al haz de electrones, durante la observación microscópica. Los microscopios electrónicos son muy útiles porque permiten ver objetos mucho más pequeños y texturas más finas que los microscopios ópticos. Esto se debe a que tienen mayor poder de resolución¹.

2. Aspectos Epidemiológicos importantes

No aplica

3. Consentimiento Informado

No aplica

b. Conceptos Básicos

- **Reactivo:** Es toda sustancia pura que se emplea tal y como es o que se encuentra siendo componente en una solución. Es todo compuesto químico que puesto en contacto con una o varias sustancias producen fenómenos característicos, capaces de permitir el reconocimiento o valoración de la sustancia en examen.



GUÍA DE PROCEDIMIENTO: PREPARACIÓN DE REACTIVOS PARA ESTUDIOS POR MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN

- **Solución:** Es una mezcla homogénea de sustancias que pueden ser separadas variando el estado físico que se encuentra alguna de ellas, teniendo propiedades que varían de acuerdo a la relación o proporción en que se encuentren sus componentes. Es una fase líquida o sólida que contiene diversas sustancias, una de las cuales llamada disolvente; se considera que realiza una función diferente a la de las otras, llamadas solutos.
- **Solución Buffer:** Es una solución que tiende a resistir los cambios en los pH como consecuencia de una disolución al añadir pequeñas cantidades de ácidos o base débiles.
- **Solución Molar:** Representada por M, es aquella que contiene el número de moles de soluto por litro de solución; o también es, aquella que contiene un peso fórmula-gramo o un peso molécula-gramo de una sustancia disuelto en un litro de solución. Una solución tiene la misma normalidad y molaridad si sus pesos equivalentes y moleculares son divisibles entre uno.
- **Solución Normal:** representada por N, es el número de equivalente gramos de soluto que hay en un litro de solución. Es importante observar que se hace referencia a peso de sustancia por litro de solución y no peso de sustancia por litro de disolvente.
- **Solución Saturada:** es una solución que contiene la máxima cantidad de sustancia que puede disolverse en condiciones normales de operación (a una temperatura de 25° C y a una atmósfera de presión).

c. Requerimientos Básicos**Equipos Biomédicos.**

- Balanza Analítica marca A&D, FX300
- Potenciómetro marca Thermo Scientific, Orion Dual Star (pHmetro)
- Esterilizador a calor seco marca Memmert, SNE 200 (capacidad 22 litros)
- Campana extractora de gases marca ESCO modelo ADC-4C3
- Agitador magnético térmico marca VWR
- Agitador de tubos (Vortex) marca Velp Scientific

**Materiales Médicos no Fungibles.**

- Cronómetro 3 tiempos.
- Lápices permanentes
- Pipetas automáticas marca Eppendorf (10,100,200,1000 uL)
- Recipientes para pesar reactivos
- Tijeras
- Embudo de vidrio
- Gradillas para tubos
- Probeta de 100, 250, 1000 mL
- Vaso precipitado de vidrio de 100, 200, 1000 mL
- Dispensador agua destilada
- Mechero de alcohol
- Varillas de agitación

Materiales Médicos Fungibles.

- Papel filtro
- Papel aluminio
- Parafilm
- Papel absorbente
- Tubos cónicos (Falcon) de 15 y 50 mL
- Pipetas de transferencia desechables 3 mL
- Puntas de pipeta (10,100,200,1000 uL)

VII. CONSIDERACIONES ESPECÍFICAS**a. Descripción detallada del Proceso o Procedimiento:****a.1. Preparación de reactivos/soluciones para estudio de MET****1.1. Solución tampón Veronal Sódico 7 M:**

También conocida en la rutina como buffer Veronal, es una solución amortiguadora, reguladora o tampón compuesto por una mezcla de un ácido débil con su base conjugada. Su principal característica es que mantiene estable el pH de una disolución ante la adición de cierta cantidad de ácido o base fuerte.

GUÍA DE PROCEDIMIENTO: PREPARACIÓN DE REACTIVOS PARA ESTUDIOS POR MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN

El tampón Veronal se usa para diluir el glutaraldehído utilizado para la fijación de muestras histológicas, y además como solución de lavado para el procesamiento. Una vez preparado, el tampón Veronal es estable durante 2 meses a 2 - 8 ° C sin pérdida de actividad.

Preparación:**Paso 1:** Preparación de la solución básica.

- Pesar los siguientes reactivos en la balanza analítica (Imagen 1):

Barbital sódico (Nro CAS 57-44-3)2.940 gr.

Acetato de Sodio (Nro CAS 127-09-3)..... 1.173 gr



Imagen 1: Balanza Analítica marca A&D, FX300 laboratorio MET.

- Con ayuda del agitador magnético térmico (Imagen 2), disolver el Acetato de Sodio en primer lugar y luego el Barbital Sódico en 100 mL de agua bidestilada caliente.



Imagen 2: Agitador magnético térmico marca VWR laboratorio MET.

Paso 2: Preparación de la solución ácida

- La preparación se debe realizar bajo campana de extracción de gases.
- En un matraz de aforo de 100 cc que contenga un volumen menor de agua bidestilada, agregar un volumen de 0.82cc de HCl al 37%, y enrasar con agua bidestilada. Para obtener una solución de HCl 0.1 N, a partir de HCl concentrado para análisis al 37% (P.M.= 36.45 y D= 1.184 Kg/L a 20°C).

Paso 3: Mezclar la solución básica y ácida en la siguiente proporción:

Solución básica 50cc

Solución ácida 55cc

Agua bidestilada 35cc

- Ajustar el pH a 7.25 con una solución de HCl 0,1 N, utilizando el potenciómetro (Imagen 3).
- Guardar todas las soluciones a 4°C.



Imagen 3: Potenciómetro marca Thermo Scientific, Orion Dual Star (pHmetro), laboratorio MET.

1.2. Solución de Glutaraldehído al 2,5%:

El glutaraldehído es un dialdehído y para microscopía electrónica se necesita un reactivo limpio y nuevo. Se obtiene comercialmente en concentraciones de 8%, 25%, 50% y 70%, especialmente preparado para su uso en microscopía electrónica¹. El glutaraldehído tiene poca velocidad de penetración. Forma puentes entre las moléculas de los tejidos. Tiene una

**GUÍA DE PROCEDIMIENTO: PREPARACIÓN DE REACTIVOS PARA ESTUDIOS POR MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN**

alta capacidad para preservar la estructura celular puesto que es capaz de entrelazar el tejido más fuertemente que otros aldehídos, por lo que es el fijador de referencia para la observación ultraestructural de las células con el microscopio electrónico.

Preparación

- La preparación se debe realizar bajo campana de extracción de gases.
- Para preparar 3 mL de una solución de Glutaraldehído al 2,5%, se mide un volumen de 0.95 mL (950 uL) de Glutaraldehído comercial al 8% (Nro CAS 11-30-8), y se disuelve con 2.05 mL (2050 uL) con buffer Veronal Sódico a pH 7.25. Conservar a 4°C, se recomienda que estas soluciones no sean usadas después de 7 días de preparación.

1.3. Tetróxido de Osmio al 2%:

La solución de Tetróxido de Osmio al 2% se emplea como postfijador en el procesamiento de muestras de microscopía electrónica. Este excelente fijador para microscopía electrónica se consigue en forma de cristales amarillos protegidos en tubos de vidrio o también en solución acuosa al 4%, bajo nitrógeno contenido en la misma ampolla². Para la fijación se emplean soluciones al 1% o al 2%. Forma puentes entre los enlaces insaturados de las cadenas de ácidos grasos de los lípidos de las membranas celulares, a las que hace insolubles, oscuras y opacas a los electrones. Por eso se emplea habitualmente para las observaciones con el microscopio electrónico, ya que preserva y oscurece las membranas celulares.

Preparación:

- La preparación se debe realizar bajo campana de extracción de gases.
- Para preparar 50 mL de una solución de Tetróxido de Osmio al 2%, se debe romper una ampolla de vidrio de 1 gr de cristales de Tetróxido de Osmio (Nro CAS 20816-12-0), y se debe disolver con 50 mL de Buffer Veronal.
- Se debe preparar 24 horas antes de su uso, ya que los cristales de Tetróxido de Osmio demoran en disolverse. Mantener a 4°C.

1.4. Solución de Acetato Uranilo al 2% acuoso:

Se emplea para favorecer el contraste de las células en microscopía electrónica; El Acetato de Uranilo es un sólido amarillento formado por cristales tetraédricos con un olor levemente acético. El reactivo comercialmente disponible se prepara empleando Uranio

GUÍA DE PROCEDIMIENTO: PREPARACIÓN DE REACTIVOS PARA ESTUDIOS POR MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN

empobrecido que posee una radiactividad típica de 0,51 $\mu\text{Ci/g}$. Por ello, su efecto no es peligroso para la salud humana mientras se encuentre fuera del cuerpo; por ingestión, inhalación y contacto en piel herida de su polvo sí lo es, así como por exposición prolongada. Cuando el Acetato de Uranilo se utiliza en bloque también tiene efecto fijador.

Preparación:

- La preparación se debe realizar bajo campana de extracción de gases.
- Para preparar 100 mL de solución, se debe pesar 2 gr de Acetato de Uranilo, (Nro CAS 541-09-03), y se debe disolver con 100 mL de agua bidestilada.
- Se debe preparar 24 horas antes de su uso, ya que los cristales de Acetato de Uranilo demoran en disolverse. Mantener a 4°C.

1.5. Solución de Acetato Uranilo al 4% en metanol:

Se emplea para favorecer el contraste de las grillas en microscopía electrónica, ya que permite un excelente contraste para trabajar a alta resolución.

Preparación:

- La preparación se debe realizar bajo campana de extracción de gases.
- Para preparar 25 mL de solución, se debe pesar 1 gr de Acetato de Uranilo, (Nro CAS 541-09-03), y se debe disolver con 25 mL de Metanol.
- Se debe preparar 24 hrs antes de su uso, ya que los cristales de Acetato de Uranilo demoran en disolverse. Mantener a temperatura ambiente.

1.6. Mezcla de resina (Epon duro):

Para la observación de la ultraestructura celular es necesario hacer cortes de tejido muy delgadas. La obtención de secciones ultrafinas implica que tenemos que endurecer el tejido. Esto se puede infiltrando el tejido en un material como son las resinas de tipo epon, que a temperatura ambiente se encuentran en forma líquida y posteriormente polimerizan a 70°C sin afectar la ultraestructura celular y forman bloques de alta dureza³.

Preparación:

Fecha: Setiembre 2020	Código: GP- 015/INSN- SB/USDT/SUSD-AP-V.01	Página 10 de 15
-----------------------	--	-----------------

GUÍA DE PROCEDIMIENTO: PREPARACIÓN DE REACTIVOS PARA ESTUDIOS POR MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN

Los volúmenes de cada reactivo que se indican a continuación pueden variar dependiendo la consistencia que se requiera para la resina (ver anexo: Tabla1):

- La preparación se debe realizar bajo campana de extracción de gases.
- En un tubo cónico tipo Falcon de 50 mL, agregar 20 mL Epon 812, luego agregar 9 mL de DDSA (Dodenyl Succinico Anhídrido). Mezclar, evitando la formación de burbujas.
- Agregar a la mezcla 12 mL de NMA (Nadic Metil Anhídrido). Mezclar, evitando la formación de burbujas.
- Por último, agregar 0,7 mL de DMP-30 (2,4,6-Tris(dimethylaminomethyl) phenol 95%). Continuar mezclando hasta obtener una mezcla homogénea.
- Forrar el tubo de la mezcla con papel metálico, para proteger de la luz.
- Mantener en congelación (-20°C).

1.7. Solución Reynolds:

El citrato de plomo también conocida como solución de Reynolds, es una sal formada por la reacción del ácido cítrico en óxido de plomo. Es un compuesto pesado y muy tóxico, algo soluble en agua y no suele corroer otros metales en bajas concentraciones². Su principal uso es como medio de contraste en la microscopía electrónica, en solución del 0.4 % de agua. Se combina muy fácilmente con el dióxido de carbono para formar carbonato de plomo, por lo que es importante evitar exponer las soluciones al aire.

Preparación:

- La preparación se debe realizar bajo campana de extracción de gases.
- Para preparar la solución, en un tubo cónico tipo Falcon de 50 mL colocar 16 ml de agua bidestilada hervida y fría y agregar lentamente 3 ml de citrato de sodio 1M, seguidamente se agrega 2 ml de nitrato de plomo 1 M, en este momento se forma un precipitado blanco. Este se agita hasta obtener una solución lechosa a la que se le agrega 4 ml de la solución de Hidróxido de Sodio 1 N, lentamente y agitando hasta que la solución quede límpida (casi transparente).
- Finalmente, sobre la solución se agrega vaselina líquida para sellarla (para evitar el contacto con el CO₂ atmosférico), si es necesario se centrifuga antes de usar.
- Forrar el tubo de la mezcla con papel metálico, para proteger de la luz.
- Mantener a temperatura ambiente.

1.8. Azul de Toluidina al 1%:

Fecha: Setiembre 2020	Código: GP- 015/INSN- SB/USDT/SUSD-AP-V.01	Página 11 de 15
-----------------------	--	-----------------

**GUÍA DE PROCEDIMIENTO: PREPARACIÓN DE REACTIVOS PARA ESTUDIOS POR MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN**

El azul de toluidina o cloruro de tolonio, a veces abreviado como TBO es un colorante catiónico metacromático de color azul, utilizado en histología y algunas veces en el ambiente clínico. El compuesto es un derivado del aminotoluol, compuesto homólogo de la anilina derivada del toluol⁴.

Preparación:

- Disolver 1 gr de Borato de Sodio (Borax) en 100 mL de agua destilada caliente hasta diluir completamente, agregar 1g de Azul de Toluidina y agitar.
- Enfriar y filtrar.

b. Indicaciones**1. Indicaciones Absolutas**

La preparación de reactivos para estudios por microscopia electrónica está indicada en los casos que se requiera reponer el stock a causa del agotamiento o caducidad de soluciones o reactivos empleados en los procedimientos que realiza el laboratorio.

2. Indicaciones relativas

No aplica

c. Riesgos o Complicaciones frecuentes:

- Exposición a productos químicos tóxicos e irritantes
Para minimizar los riesgos, se requiere:
 - Manipular el Tetróxido de Osmio y el Acetato de Uranilo con los implementos de bioseguridad recomendados, ya que son productos químicos con alta toxicidad.
 - Trabajar bajo campana extractora de gases.

d. Riesgos o Complicaciones poco frecuentes:

No aplica

**e. Contraindicaciones:**

No aplica

VIII. RECOMENDACIONES

- Antes de preparar o manipular una solución leer las hojas de seguridad del reactivo.
- Los reactivos o soluciones químicas en general deben ser manejados cuidadosamente con los elementos de protección personal (E.P.P.) apropiados y evitar en lo posible el contacto con el cuerpo ya sea por: inhalación, contacto con nuestra piel o ingestión
- Los reactivos o soluciones químicas deben ser guardados en un orden conveniente de acuerdo a sus características químicas.
- Los reactivos o soluciones químicas deben ser envasados en recipientes adecuados, herméticamente cerrados, perfectamente rotuladas y en el caso de que sean peligrosas contar con una anotación al respecto en la etiqueta.
- Para diluir un ácido SIEMPRE AÑADIR EL ÁCIDO AL AGUA.
- En caso de preparar una solución o un reactivo, etiquetar inmediatamente el frasco.

IX. AUTORES, FECHA Y LUGAR

- Ejecutor Responsable:
Licenciado en Tecnología Médica de la Sub-Unidad de Soporte al Diagnóstico- Anatomía Patológica
- Fecha y Lugar del Procedimiento.
Agosto 2020, Instituto Nacional Del Niño San Borja/ Sub-Unidad de Soporte al Diagnóstico- Anatomía Patológica
- Vigencia: 2 años a partir de su aprobación con Resolución Directoral.
- Lista de Autores y correos electrónicos:
Lic. Eduardo Rafael Álvarez Rivera
ealvarez@insnsb.gob.pe

**X. ANEXOS****ANEXO 1: VOLUMENES REQUERIDOS PARA PREPARAR RESINA Embed 812
CON DISTINTOS GRADOS DE DUREZA**

	Suave	Mediana	Dura
EMbed 812	20 ml	20 ml	20 ml
DDSA	22 ml	16 ml	9 ml
NMA	5 ml	8 ml	12 ml
DMP-30	70-.94 ml	.66-.88 ml	.62-.82 ml
	o 1.18-1.4 ml (BDMA)	o 1.1-1.3 ml (BDMA)	o 1.0-1.2 ml (BDMA)

* Para una mejor penetración y estabilidad, se recomienda BDMA en lugar del DMP-30. La cantidad de BDMA que se requiere es 2.5-3% mientras que DMP-30 es 1.5-2%.

Fuente: <https://www.emsdiasum.com/microscopy/technical/datasheet/14120.aspx>



XI. BIBLIOGRAFÍA

1. Vásquez G, Echevarría O, Introducción a la Microscopía Electrónica Aplicada a las Ciencias Biológicas. 1ra edición, Universidad Nacional Autónoma de México, editorial Fondo de Cultura Económica, 2000.
2. Amano Y, Cevallos L, Introducción a la Microscopía Electrónica Principios-Aplicaciones. 3ra edición, Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública, 2015.
3. Electron Microscopy Sciences. EMS [Internet]. [Consultado 9 Abril 2020]. Disponible en: <https://www.emsdiasum.com/microscopy/technical/datasheet/14120.aspx>
4. https://es.wikipedia.org/wiki/Azul_de_toluidina#:~:text=El%20azul%20de%20toluidina%20o,la%20anilina%20derivada%20del%20toluol.