

MÉTODO ALTERNATIVO PARA OBTENER Y TRANSPORTAR

BLOQUES DE TEJIDO PARA MICROSCOPIA

Jorge Calvo, Elba R. Morriconi y Claudia C. Boy

RESUMEN

Se describe un método simple y económico para congelar material biológico destinado a la obtención de cortes histológicos en crióstato. Se propone la utilización de CO₂ para producir una mezcla refrigerante en reemplazo del nitrógeno líquido como criogénico. Esta mezcla (compuesta por hielo seco y acetona) enfría el isopentano utilizado como medio de congelación hasta -76°C

y lo mantiene por ~1,5h permitiendo la congelación de más de 20 bloques de tejido. La calidad de las secciones obtenidas en crióstato es similar a aquellas obtenidas mediante la utilización de nitrógeno líquido. Este método resulta especialmente práctico durante los muestreos a bordo de embarcaciones y/o en sitios alejados de los centros urbanos.

AN ALTERNATIVE METHOD TO FREEZE AND TRANSPORT BIOLOGICAL TISSUE BLOCKS FOR MICROSCOPY

Jorge Calvo, Elba R. Morriconi and Claudia C. Boy

SUMMARY

A cheap and simple method for freezing raw biological material destined to obtain histological sections through a cryostat is described. We propose the utilization of solid CO₂ (dry ice) to make a cooling mixture, instead of liquid nitrogen. The temperature of the refrigerating mixture (composed by acetone and dry

ice) reaches isopentane to -76°C which is maintained for ~1.5h allowing the freezing of more than 20 tissue blocks. The quality of cryostat sections obtained is similar to the ones obtained by using liquid nitrogen. This method is particularly suitable during sampling on board, and/or far away from urban centers.

Introducción

El nitrógeno líquido es utilizado para enfriar líquidos intermediarios que mejoran la eficiencia de la transferencia térmica, como el isopentano (2-metilbutano), y así congelar material biológico conservando la estructura morfológica y las características bioquímicas de los tejidos. No obstante, durante las campañas de muestreo en regiones alejadas de centros urbanos, el acceso al N₂ líquido resulta dificultoso. Las estrictas normas de seguridad para el transporte aéreo y la alta tasa de evaporación del N₂ líquido son otros problemas relacionados con su utilización. Una técnica alternativa que salve las limitaciones mencionadas, evitando la utilización del N₂ líquido, puede resultar de

interés para quienes trabajan en investigación biológica.

El objetivo del presente trabajo es describir un método sencillo y económico que permite congelar material biológico y obtener bloques adecuados para ser cortados en crióstato. La calidad de las secciones que se obtengan dependerá de la correcta aplicación del procedimiento de congelación.

Método

Para producir hielo seco se necesitan los siguientes elementos: un cilindro de CO₂ con una manguera de ½ pulgada de diámetro y 1,5m de largo, una caja de madera o material plástico de 35×15×10cm (largo×ancho×alto) con una tapa superior removible y con un orificio del diámetro de

la manguera en uno de sus lados, varias piezas de tela gruesa de algodón (como toallas o trapos de piso) y un litro de acetona.

Se introducen en la caja 10cm del extremo libre de la manguera por el orificio de uno de sus lados, y se recubre el interior de la caja con las telas formando una "bolsa" que retiene parcialmente el CO₂ gaseoso (Figura 1). Se apoya la tapa y se la sostiene firmemente con la ayuda de un objeto pesado o con una banda elástica. Se abre y cierra periódicamente la válvula del cilindro de CO₂ durante intervalos cortos (10-20seg) por 2-4min. El CO₂ gaseoso se expande en la "bolsa", disminuyendo la temperatura por el efecto de Joule-Thompson. Cuando las telas detienen la expansión libre del gas, éste comienza a depositarse

primero como "nieve seca" y luego como "hielo seco". El proceso debe repetirse hasta obtener la masa de hielo seco sólido del tamaño requerido. El tiempo necesario para obtener una determinada cantidad de hielo depende de la temperatura ambiente y de la presión de CO₂ del cilindro. Un cilindro con 20kg de CO₂ alcanza para producir alrededor de 4 a 6 masas de hielo de aproximadamente 15cm de diámetro.

El hielo seco se recoge con una cuchara o espátula de mango largo y se carga en un cilindro metálico de 20×12cm hasta llenarlo completamente (Figura 2, cilindro externo). Luego se agrega un volumen equivalente de acetona, mezclando cuidadosamente. La mezcla alcanzará -76°C inmediatamente. Se llena ¾ partes de

PALABRAS CLAVE / Histología / CO₂ / Método de Congelamiento / Secciones de Crióstato /

Recibido: 04/04/2007. Aceptado: 11/02/2008.

Jorge Calvo. Doctor en Ciencias Naturales, Universidad Nacional de La Plata (UNLP), Argentina. Profesor, Universidad Nacional de la Patagonia San Juan

Bosco, Ushuaia, Argentina. Dirección: Laboratorio de Ecofisiología, Centro Austral de Investigaciones Científicas (CADIC-CONICET) B. Houssay 200 (9410) Ushuaia,

Tierra del Fuego, Argentina. e-mail: calvouch@gmail.com
Elba R. Morriconi. Doctora en Ciencias Naturales, UNLP, Argentina. Investigadora, CADIC-CONICET, Argentina.

Claudia C. Boy. Licenciada en Ciencias Biológicas, Universidad de Buenos Aires, Argentina. Becaria Doctoral, CONICET, Argentina.

MÉTODO ALTERNATIVO PARA A OBTENÇÃO E TRANSPORTE DE BLOCOS DE TECIDO PARA MICROSCOPIA

Jorge Calvo, Elba R. Morriconi e Claudia C. Boy

RESUMO

Descreve-se um método simple e económico para o congelamento do material biológico destinado à obtenção de cortes histológicos em crióstato. Propõe-se a utilização de dióxido de carbono (CO₂) em substituição do azoto líquido, para a produção da mistura refrigerante (ou criogénica). Esta mistura (composta por gelo seco e acetona) desce a temperatura do isopentano, usado

como meio de congelação, até -76°C durante ~1,5h permitindo o congelamento de mais de 20 blocos de tecido. A qualidade dos cortes obtidos utilizando este novo método é semelhante à dos cortes obtidos mediante o uso de azoto líquido. O método apresentado é especialmente práctico na colheita de amostras a bordo de embarcações e/ou em locais longe de centros urbanos.

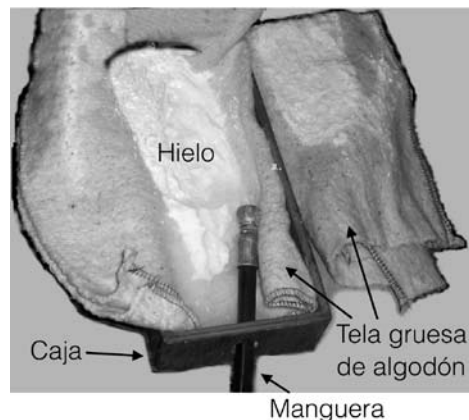


Figura 1. Dispositivo utilizado para la fabricación de hielo seco.

un cilindro provisto de un asa (Figura 2, cilindro interior) con isopentano (2-metilbutano) y se introduce este cilindro lentamente en la mezcla refrigerante, utilizando el asa (Figura 2). El isopentano debe ser agitado en forma circular para igualar la temperatura, que en pocos minutos alcanza la de la mezcla refrigerante (-76°C), manteniéndose esta temperatura durante ~1,5h. Para optimizar el aislamiento térmico y prolongar el tiempo

de mantenimiento de la mezcla refrigerante el cilindro externo debe ser envuelto con espuma de goma o styrofoam.

Con el objeto de obtener secciones en un crióstato, el material fresco es cortado en bloques y adherido a una pequeña pieza de corcho rotulada utilizando un medio de montaje (OCT compound,

Crio-Tec o similar). La plancha de corcho con la muestra adherida es sumergida, mediante pinzas, durante 1-3min en el isopentano enfriado, prolongando el tiempo para piezas de tamaño mayor a 1cm³. Luego el bloque congelado debe ser almacenado en un termo previamente enfriado con la mezcla refrigerante. La utilización de la pieza de corcho en lugar del soporte metálico para muestra comúnmente utilizado en el crióstato (*chuck*) tiene la

ventaja de reducir el volumen a ser congelado.

Según la experiencia acumulada, los mejores resultados se obtienen con bloques de ≤1cm³. En caso de tener que transportar o conservar los bloques congelados por un tiempo prolongado, cada bloque debe ser envuelto en una lámina de aluminio y almacenado en una bolsa plástica cerrada, para evitar la desecación, en un termo conteniendo hielo seco.

Las secciones histológicas obtenidas con este procedimiento son similares a las obtenidas congelando los bloques a -170°C utilizando isopentano y N₂ líquido (Figura 3).

Respecto del uso de N₂ líquido el método propuesto presenta las siguientes ventajas: el CO₂ es relativamente económico, los cilindros que lo contienen pueden ser transportados fácilmente sin sufrir pérdidas por evaporación y toleran condiciones muy difíciles de transporte por caminos irregulares o en embarcaciones en movimien-

to, posibilitando la obtención de bloques para histoenzimología en lugares distantes del laboratorio.

Precauciones

– Algunos cilindros de CO₂ deben ser orientados en posición vertical con la válvula hacia arriba, mientras que otros cilindros deben ser dispuestos en la posición inversa, con la válvula hacia abajo. La posición depende de la presencia o ausencia de un tubo “pescador” interno. Si el cilindro tiene tubo pescador, este debe alcanzar el CO₂ líquido en la parte inferior del cilindro, por lo que convendrá colocarlo con la válvula hacia arriba. Se recomienda consultar al proveedor de CO₂.

Ante el riesgo de proyecciones de la acetona debe ser vertida lentamente sobre el hielo seco.

– El contenedor utilizado para el transporte de los bloques congelados debe tener un pequeño orificio para evitar el aumento de presión de gas en su interior.

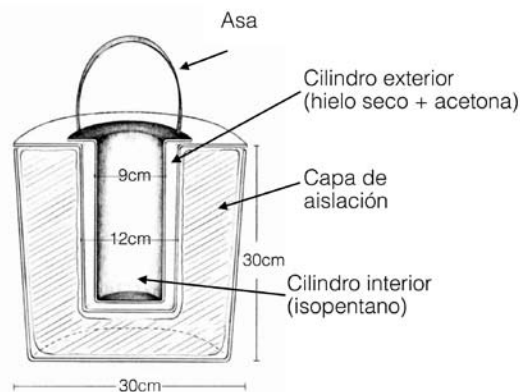


Figura 2. Corte del dispositivo utilizado para almacenar la mezcla refrigerante y el isopentano.

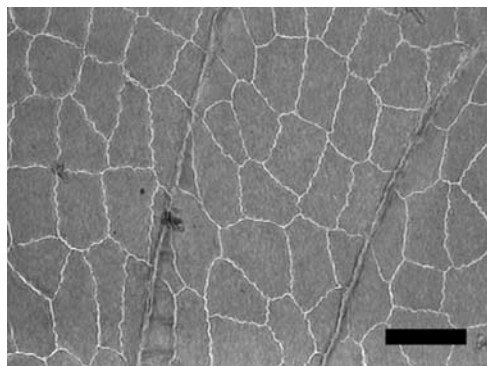


Figura 3. Sección de músculo blanco de *Galaxias maculatus* Jenyns a 1/3 de su longitud total, obtenida mediante congelamiento con hielo seco y corte en crióstato. Coloración: tricrómico de Masson. Barra= 100µm.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a Miguel Barbagallo por sus dibujos, a Carlos A. Lomovasky por la fabricación de los cilindros de metal, a Maria Gabriela Rivas y Sofia Pauleta por la traducción al portugués, y a Natalie Goodall y Patricia Pérez Barros por la corrección del inglés. El trabajo fue financiado por un subsidio de CONICET, argentina (PIP 6187).