

TECNICAS RADIOAUTOGRAFICAS
(Parte Práctica)

Angela M. Ubios - Rómulo L. Cabrini

RADIOAUTOGRAFIA

Preparación del animal

Se le administrará una determinada cantidad de isótopo radiactivo, teniendo en cuenta: el peso del animal (o su edad), el tiempo medio biológico y el período de semidesintegración del nucleído. Esto contribuye a determinar el momento adecuado para el sacrificio del animal, para obtener una buena imagen radioautográfica.

La cantidad de nucleído a inyectar deberá ser lo suficientemente baja como para no dañar al animal y no alterar su metabolismo.

Una vez cumplido el tiempo previsto se sacrifica el animal. En este momento comienza el procesado.

Procesado

1) Fijación: Es fundamental para el éxito de las radioautografías que durante la fijación quede inmovilizado el isótopo utilizado. Esta deberá ser inmediata y se utilizará una cantidad de fijador suficiente como para permitir una penetración adecuada en los tejidos a estudiar. No debe olvidarse que la fijación persigue la conservación de los elementos en la misma forma en que estaban "in vivo".

El fijador más recomendable es el formol neutro (Formol 20% - carbonato de calcio a saturación) y el Carnoy.

Pueden emplearse otros fijadores, como el Bouin o el Rossman, pero tienen el inconveniente de que por tener ácido pícrico producen un velamiento del material sensible, aumentando de ese modo el "background" de la radioautografía.

En el caso de isótopos solubles es necesario utilizar técnicas especiales, como ser cortes por criostato o el método de Altmann - Gorsh, siguiendo luego un procedimiento especial.

Para microscopía electrónica, se utilizan los fijadores habituales en estas técnicas, no habiendo contraindicaciones precisas al respecto.

2) Inclusión: Puede hacerse la inclusión en parafina, siguiendo los pasos tradicionales, cuidando que los tiempos a emplearse en cada uno de ellos no sean exagerados para impedir la solución del nucleído, o su decaimiento.

Una vez pasado el tiempo necesario para obtener una buena fijación de la pieza, se procede a la deshidratación de la misma, lo que se obtiene por medio de alcoholes en grado creciente (alcohol 80°, 96°, 96°, 100°, y 100°) cuando la pieza

está totalmente deshidratada se sumerge en un líquido intermediario de la parafina, este puede ser xilol o benzol. Luego se pasa a la parafina. Para que la inclusión sea realmente tal, la parafina debe penetrar profundamente en la pieza. Para ello se la coloca en la parafina fundida, en la estufa, y se hacen dos pasajes hasta que puede hacerse el taco, momento en el cual se deja enfriar la pieza en la parafina a temperatura ambiente.

3) Cortes: Se harán en un micrótopo adecuado y deberán tener el mismo espesor, para obtener una imagen radioautográfica comparable.

Debe cuidarse especialmente que los portas esten bien desengrasados, para ello puede utilizarse una mezcla de ferrocianuro de potasio 5% y bromuro de potasio 1%; previo al montaje, para favorecer la adhesión de los cortes a los mismos y evitar el desprendimiento en los sucesivos pasos de la técnica radioautográfica, sumergirlos en una solución de gelatina cromada: 5 gr. de gelatina y 0,5 gr. de alumbre de cromo por litro de agua destilada.

Estos cortes se desparafinan con xilol, y luego se procede a la hidratación de los mismos lo que se consigue siguiendo el camino inverso al anterior, es decir, pasándolos por alcoholes sucesivos en grado decreciente luego de lo cual se los llevará a agua destilada.

En estos momentos se elegirá si se sigue con la técnica radioautográfica o se colorea. Esta elección será fundamental para algunos colorantes, no así para otros. Lo habitual es colocarlos luego de efectuado el revelado. Para la coloración de Feulgen se recomienda hacerlo antes.

Una vez efectuados estos pasos se puede proceder a la preparación de la radioautografía. Para ello pueden elegirse varios métodos de los cuales los que más se utilizan actualmente son los métodos del "dipping" y del "stripping film". Ambas técnicas se desarrollarán en el transcurso de la práctica.

Método del "dipping"

Es actualmente el más difundido. Su técnica es de fácil realización, lleva muy poco tiempo en la misma y es de mayor sensibilidad que el "stripping film", lo cual hace que los tiempos de exposición sean menores. Para este método se utilizan emulsiones radioautográficas, que comercialmente vienen en forma de gel. Hay varios tipos de ellas. Una vez elegido el tipo adecuado, se deben seguir los siguientes pasos:

La emulsión debe ser retirada de la heladera varias horas antes de ser utilizada, para que vaya adquiriendo gradualmente la temperatura ambiente. El alma

cenaje de la emulsión en la heladera a alrededor de 4°C debe observarse siempre para evitar el envejecimiento prematuro de la misma.

Para que el gel pase al estado líquido, se coloca la gelatina en un baño térmico de aproximadamente 45°C . Para obtener una distribución uniforme en la misma, se dejará por lo menos durante 30 minutos antes de ser utilizada. Esta emulsión puede ser utilizada directamente o diluida 1:1 ó 1:2 en agua destilada.

El portaobjetos con el corte se sumerge lentamente dentro de la emulsión, dejándolo dentro de ella durante algunos segundos, para luego retirarlo también lentamente; de esta forma se evita la formación de burbujas y se hace un contacto con la emulsión lo más parejo posible.

Los cortes, se colocan en soportes especiales y se procede al secado de los preparados, el que debe ser muy cuidadoso.

El secado también se hace en el cuarto oscuro frente a un ventilador, aproximadamente 4 horas. Una vez que las radioautografías han completado su secado se colocan los preparados en cajas herméticas a prueba de luz donde se completará la exposición. El tiempo de exposición dependerá del nucleído empleado y de la actividad de los cortes; se prefiere hacerla a 4°C (en heladera).

Este tiempo depende de varios factores: energía y tipo de emisión del nucleído, actividad específica en el área del corte donde se localiza el isótopo, tipo de material sensible.

Método de "stripping Film"

El "stripping film" consiste en una capa de emulsión sensible de pocos micrones de espesor que tiene un soporte de gelatina, y ésta a su vez un soporte que consiste en una placa de vidrio; la emulsión sensible queda en la superficie de la placa radioautográfica. Hay diferentes tipos de emulsión para "stripping" con cualidades de sensibilidad y resolución diferentes.

Las placas deben desecarse cuidadosamente antes de ser usadas ya sea sometiénolas a la acción de un disecante durante algunas horas, o sumergir la placa en alcohol de 70° y luego en alcohol de 100° durante algunos minutos.

Para este método, una vez seguidos los pasos anteriormente citados, y colocados los preparados en agua destilada durante algún tiempo, se seguirán los siguientes pasos:

Con un bisturí afilado se procederá a cortar la emulsión en porciones que cubren totalmente el porta-objetos. Primeramente se hace un corte en los cuatro costados de la placa a 1 cm del borde, luego un corte longitudinal central y cortes transversales.

Con la extremidad del bisturí se levanta una de las puntas de la emulsión y luego con una pinza de puntas finas se procede al desprendimiento de la misma, de la placa de vidrio. Este debe ser lento, porque si es rápido se produce una formación de luz que velará la placa.

La emulsión desprendida se colocará en un recipiente de vidrio que contenga agua destilada a 10°C, cuidando que la parte sensible quede hacia abajo, el recipiente no deberá haber sido usado con drogas para revelar o fijar, porque podrían quedar restos de ellas con los consiguientes inconvenientes.

Se esperan aproximadamente 3 minutos para que el film se extienda en forma pareja en el agua.

Luego el portaobjetos se introduce en el recipiente con el corte hacia arriba y se coloca por debajo del film de manera que queden en contacto el corte con la emulsión. El portaobjetos con el film se retira lentamente para evitar la formación de burbujas y cuidando que el film cubra totalmente el porta.

Se procederá al secado, que se hace de la misma manera que en el método del "dipping".

Se colocan los cortes en cajas herméticas a prueba de luz sellando los bordes de la misma, con cinta aisladora negra, y se lleva a la heladera hasta completar el tiempo de exposición.

Con este método el tiempo de exposición suele ser más prolongado que con el método del "dipping". Sus ventajas respecto del método del "dipping" consisten en que la emulsión está distribuida en forma más pareja y uniforme. Por otra parte el material sensible del "stripping film" puede almacenarse durante un tiempo mucho mayor que las emulsiones para "dipping".

Revelado

No ofrece diferencias entre ambos métodos. Hay varios tipos de reveladores, el más usado es el tipo D 19 (Kodak). Los fijadores pueden también variar y, el más generalmente usado es el tipo F5 Kodak.

Para efectuar el revelado los portaobjetos expuestos se introducen en el revelador (18 ó 19°C) durante aproximadamente 5 minutos. Luego se los deja por unos segundos en agua destilada, para pasar inmediatamente al fijador, en el cual se los dejará el doble del tiempo en que la emulsión tarda en ponerse transparente.

Una vez realizados estos pasos, se lavarán las radiografías en agua destilada, aproximadamente 30 minutos.

Tanto el fijador como el agua destilada deben estar a 7° C para evitar la pérdida de la emulsión o el desprendimiento del "stripping".

Coloración

Se podrá hacer, como dijimos, antes o después de efectuada la técnica descrita. Las coloraciones que pueden hacerse son numerosas y dependerán del objetivo que se persigue.

También podrán observarse los preparados sin colorear, si esto fuera conveniente, como por ejemplo para la medición microdensitométrica.

Observaciones microscópicas

Una vez efectuadas estas técnicas, durante la práctica, se procederá a la observación microscópica de preparados revelados, en los cuales se estudiarán los sectores en donde se han acumulado los granos de plata de la emulsión.