

Prov. + 13/64

T  
14  
126

UNIVERSIDAD DE GRANADA  
Facultad de Ciencias

TESIS DOCTORAL

ESTUDIO A NIVEL CELULAR DE LA MICROSPOROGENESIS EN EL OLIVO  
(*Olea europaea* L.)

(Ultraestructura, Citoquímica, Inmunocitoquímica e Hibridación *in situ*)

<b>BIBLIOTECA UNIVERSITARIA</b>
<b>GRANADA</b>
Nº Documento <u>010676396</u>
Nº Copia <u>12123051</u>

Juan de Dios Alché Ramírez

1991

UNIVERSIDAD DE GRANADA

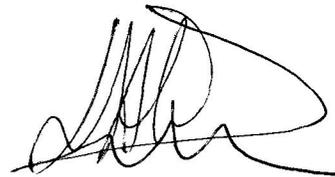
Departamento de Biología Vegetal

1991

ESTUDIO A NIVEL CELULAR DE LA MICROSPOROGENESIS EN EL OLIVO  
(*Olea europaea* L.)

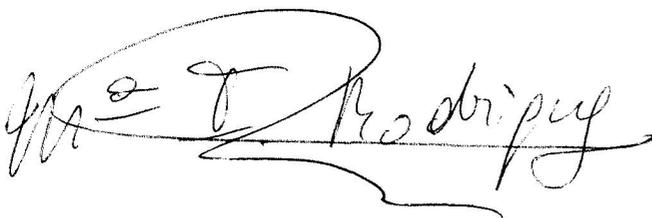
(Ultraestructura, Citoquímica, Inmunocitoquímica e Hibridación *in situ*)

Memoria que presenta el Licenciado  
en Ciencias Biológicas D. Juan de  
Dios Alché Ramírez para aspirar al  
grado de Doctor.

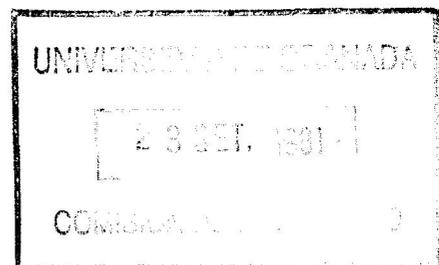


Fdo.: Juan de Dios Alché Ramírez

Vº Bº  
EL DIRECTOR DEL TRABAJO



Fdo. Dra. M<sup>a</sup> Isabel Rodríguez García  
Investigador Científico del C.S.I.C.



Este trabajo ha sido realizado en el Laboratorio de Citología Vegetal (Unidad Estructural de Investigación de Bioquímica Vegetal) de la Estación Experimental del Zaidín de Granada (C.S.I.C.), con ayuda de una beca del Subprograma General del P.F.P.I. del Ministerio de Educación y Ciencia. Ha sido financiado por la D.G.I.C.Y.T. Proyecto Nº PB87-0332-CO2-02.

INDICE GENERAL.

I.	<u>INTRODUCCION</u> . . . . .	pag.	3
II.	<u>JUSTIFICACION Y</u> <u>OBJETIVOS DEL ESTUDIO.</u> . . . . .	pag.	14
III.	<u>MATERIALES Y METODOS</u> . . . . .	pag.	17
IV.	<u>RESULTADOS</u> . . . . .	pag.	68
V.	<u>DISCUSION</u> . . . . .	pag.	126
VI.	<u>CONCLUSIONES</u> . . . . .	pag.	166
VII.	<u>BIBLIOGRAFIA</u> . . . . .	pag.	169
VIII.	<u>APENDICES</u> . . . . .	pag.	196

I. INTRODUCCION.

I. INTRODUCCION .

I.1. GENERAL . . . . . pag. 5

I.2. CUERPOS PROTEICOS . . . pag. 7

I.3. VACUOLAS NUCLEARES . . pag. 9

I.4. CALOSA . . . . . pag. 10

I.5. NUCLEOLOIDES . . . . . pag. 12

## I . 1 . GENERAL .

La reproducción sexual tiene una trascendencia fundamental dentro del ciclo vital de las plantas superiores. El ciclo sexual de las plantas aparte de ser el sistema natural de propagación de las mismas, constituye en sí un sistema con capacidad para reorganizar y seleccionar material genético. Si las diferentes partes del ciclo sexual de las plantas pudiera llegar un día a ser controlado y manipulado es claro que se obtendría un avance espectacular en la mejora de plantas y su reproducción. El potencial del sistema sexual sólo podrá ser rentable a medida que se profundice y se conozcan las bases celulares y moleculares de estos fenómenos.

Los procesos de reproducción sexual incluyen meiosis, diferenciación en gametos, su liberación y transporte por el tubo polínico y finalmente reconocimiento y fusión.

La gametogénesis masculina en Angiospermas está constituida por dos procesos consecutivos: la meiosis y la maduración de las microsporas resultantes para dar lugar a los gametos. Durante este periodo la célula sufre grandes cambios metabólicos, sometidos a una fina regulación génica, que no son del todo conocidos; y donde se sintetizan todas las moléculas que permiten a la célula controlar su ciclo celular y diferenciarse de sus células progenitoras para dar lugar a las células espermáticas pero sin perder su totipotencia génica, ya que mediante variaciones en el medio de cultivo el gametofito inmaduro puede desviarse de su vía normal de desarrollo y seguir la vía del esporofito. El conocimiento de la respuesta estructural en los diferentes dominios funcionales del núcleo a estos cambios de la actividad celular, contribuiría indudablemente al conocimiento de los mecanismos de regulación que controlan estos procesos.

La meiosis es una división celular crucial propia de los seres vivos superiores en donde hay una alternancia de generaciones. Gracias a esta doble división reductora en el número de cromosomas se pasa de la fase esporofítica diploide a la fase gametofítica haploide. Acompañando a esta división meiótica, corren paralelas una serie de transformaciones citológicas a

nivel de núcleo, citoplasma y pared cuyos mecanismos no son bien conocidos y necesitan de estudios más profundos. En los siguientes apartados exponemos los antecedentes relacionando los puntos más significativos que han sido objeto de estudio en este trabajo.

## I.2. CUERPOS PROTEICOS.

La presencia de inclusiones intranucleares ha sido descrita en las células de muy diversos tejidos en plantas superiores, como por ejemplo en floema, tricomas, tejido perenquimático, estilo, cotiledones, pared del ovario, etc, (ver una revisión extensiva en Bigazzi, 1984). Sin embargo, entre todas ellas, la localización más frecuente en la que han sido descritas estas inclusiones es en células del mesófilo de la hoja de muchas especies de Angiospermas.

Las observaciones ultraestructurales permiten distinguir cinco tipos fundamentales de inclusiones intranucleares caracterizadas por su estructura tubular (Ciampolini y col. 1980; Dudek y Hesse, 1980), lamelar (Thomas y Gouranton, 1979; Morassi Bonzi y Bigazzi, 1980), fibrilar (Thales y Gailhofer-Dengg, 1972), cristalina (Fabbri y Morassi Bonzi, 1982; Bigazzi, 1984) y amorfa (Bigazzi, 1984). Esta diferente morfología, así como su constante presencia en algunas familias de Angiospermas (por ej. en las Campanuláceas, Labiadas, Verbenáceas y Scrofulariáceas) ha inducido a algunos autores a proponer este carácter como utilizable en la taxonomía de estas Familias (Speta 1979, Bigazzi 1984, 1986).

La composición de este tipo de estructuras ha sido documentada como mayoritariamente proteica utilizando diversas técnicas. (Karasaki, 1965; Fabri y Menicanti, 1970; Perrin, 1970; Weintraub y col., 1971; Unzelman y Healey, 1972; Arsanto, 1973; Caldepon, 1977; Speta, 1977; Thomas y Gouranton, 1979; Vintejou, 1984; Bigazzi, 1986; Mesquita y Santos Dias, 1988), pero según nuestro conocimiento, aún no han sido aislados e identificados en ningún caso.

En relación a su función, se han propuesto varias hipótesis: Vintejou (1984), propone que pueden representar una forma de almacenaje de proteínas, y Weintraub y col. (1973) indican que podrían ser consecuencia de una infección virásica. Según otros autores, las inclusiones intranucleares serían síntomas de casos

patológicos debidos a tratamientos terapéuticos de las plantas (Ree, 1983), a estrés metabólico causado por pérdida de agua (Esan, 1975), a nutrición mineral deficiente o temperaturas inadecuadas de crecimiento (Diaz-Ruiz, 1975). Sin embargo, se desconocen todavía numerosos detalles de la estructura, composición, localización en diferentes tejidos, etc. de estas estructuras que ayuden a conocer de forma inequívoca su significado biológico en la planta.

### I.3. VACUOLAS NUCLEARES.

La presencia de vacuolas nucleares fue descrita por primera vez durante la profase meiótica de *Bombyx mori* (Rasmussen, 1976). Como expansiones del espacio perinuclear hacia el carioplasma. Posteriormente, también se han observado espacios limitados por membranas dentro del núcleo durante la profase meiótica de diferentes plantas (Sheffield y col. 1979; Karasawa y Ueda, 1983a y 1983b; Sangwan, 1986; Rowley y Waller, 1985; Rodríguez-García y col., 1988; Majewska-Sawka y col., 1990).

La naturaleza y función de estos compartimentos dentro del núcleo son desconocidas, lo cual ha hecho que estas estructuras sean consideradas por algunos autores con cierta reserva, o como artefactos. Sin embargo, su presencia en numerosas especies en estadios similares, parece estar relacionado con procesos de reorganización nuclear durante la profase meiótica (Rodríguez-García y col., 1990).

### I.3. CALOSA.

Durante la microsporogénesis de las Angiospermas, se deposita alrededor de las células madres de microsporas una pared especial formada por un material de carácter birrefringente, cuando se observa con microscopía óptica, denominado calosa (ver revisión de Bhandari, 1982).

La calosa es un polímero de glucosa con enlace  $\beta(1-3)$  (Kessler, 1958), característico y exclusivo del reino vegetal, y que ha sido localizado en diversos tejidos de las plantas como tejidos conductores que ha sido identificado en diversas localizaciones en plantas, por ejemplo en los tejidos conductores, en microsporocitos, megasporocitos, grano de polen bicelular, y en el tubo polínico. También se sabe que se forma en tejidos que sufren cualquier tipo de daño o infección (Currier y Strugger, 1956; Nettancourt y col., 1973).

El método clásico utilizado por la mayoría de los autores por su gran especificidad para detectar calosa es el azul de anilina, introducido por Arens (1949) y popularizado por Currier y Strugger (1956)

El modelo de deposición de la calosa durante la microsporogénesis es bastante similar en todas las especies donde ha sido estudiado (Waterkeyn, 1962; Skvarla y Larson, 1966) salvo algunas excepciones ilustradas en la literatura (Dunbar, 1973; Vijayaraghavan y Shukla, 1977). En general, durante la microsporogénesis, cada CMP segrega una envuelta especial constituida por dicho material, que se continúa a través de todo el proceso meiótico hasta el estadio de tetradas. Una vez terminada la meiosis, la calosa comienza a sufrir un proceso de degradación que culmina con la liberación de las microsporas en el lóculo de la antera, donde se convertirán en granos de polen maduros (Stanley y Linskens, 1974).

En diferentes especies se ha descrito una apariencia de esta pared de calosa en forma de varias capas, que incluso han sido correlacionadas con el estadio meiótico de la célula (Waterkeyn,

1962; Skavaria y Larson, 1966). Sin embargo, algunos autores indican la posibilidad de que esta apariencia puede deberse a artefactos en los procesos de fijación (Christensen y col., 1972). Igualmente, los distintos autores no coinciden en qué organelas toman parte de la formación de la calosa. Heslop-Harrison (1966) propone la implicación del aparato de Golgi en la producción de calosa, basándose en que en el citoplanna del meiocito de algunas especies se han observado gran cantidad de dictiosomas y vesículas de Golgi, mientras que Angoli (1967) por otra parte, atribuye la formación de la calosa al retículo endoplasmático.

Son muchas las interpretaciones dadas acerca del posible papel fisiológico de la calosa: Heslop-Harrison y Mackenzie (1967) indican que la calosa actúa a modo de un "filtro molecular" o interfase más o menos impermeable entre células que son genéticamente diferentes, siendo considerada como un requisito para el desarrollo de los meiocitos hasta microsporas (Heslop-Harrison, 1964). Sin embargo, la impermeabilidad de la pared de calosa ha sido cuestionada (Mascarenhas, 1975), y en diversos trabajos se muestran inclusiones densas inmersas en la pared de calosa (Rodríguez-García, 1978; Testillano y col., 1988; Rodríguez-García y Fernández, 1988; Fernández y Rodríguez-García 1989) en *Scilla* y *Olea*. Otra teoría es la que propone que la calosa puede ser una barrera protectora frente a un balance hídrico inadecuado, gracias a su naturaleza altamente higroscópica (Barskaya y Balina, 1971). Otra posibilidad propuesta (Larson y Lewis, 1962; Heslop-Harrison, 1968; Rodríguez-García y Fernández, 1988) es la de que la calosa puede constituir un acúmulo de material de reserva que puede ser utilizado para la formación de la exina y/o para ser acumulado en forma de almidón en el grano de polen, ya que al degradarse libera gran cantidad de glucosa. Waterkeyn y Bienfait (1970) indican por otra parte que la calosa puede servir como un molde negativo que determina el patrón de estructuración de la exina

## I. 4. NUCLEOLOIDES.

El término "nucleoloides citoplásmicos" o solamente "nucleoloides", fue empleado inicialmente por Dickinson y Heslop-Harrison (1970), para designar inclusiones de morfología similar al nucleolo, detectadas en el citoplasma de meiocitos de *Lilium*. Esta denominación se ha utilizado de forma extensiva con posterioridad, incluso para otras especies donde han sido descritas estas estructuras (Kusanagi y Kawano, 1975; Porter y col., 1984; Dickinson y Willson, 1985; Sato y Sato, 1984; Sato y col., 1989; Rodríguez-García y Fernández, 1987; Sato y col., 1991). La presencia de estas estructuras durante la meiosis de plantas, había sido ya indicada con anterioridad en numerosas especies (Later, 1926; Frankel, 1937; Hakansson y Levan, 1942; Gavaudan, 1948; Lindemann, 1956), sin que se les hubiese dado ninguna denominación especial.

Aunque la composición química de los nucleoloides no ha sido investigada extensivamente (Bell y Pennell, 1987), hay evidencias de que pueden estar compuestos de RNA, (Dickinson y Heslop-Harrison, 1970, 1977; Dickinson y Willson, 1985; Williams y col., 1973; Porter y col., 1984; Sato y col., 1989), concretamente RNA ribosómico, como se demuestra mediante hibridación "in situ" por Sato y col. (1991). Sin embargo, los resultados de experiencias de autoradiografía tras la incorporación de uridina tritiada, y de marcado con RNasa-oro en los pseudonucleoloides de las células madres de esporas del helecho *Pteridium* (Bell y Pennell, 1987) indican que estos cuerpos no contienen moléculas de RNA.

Por lo tanto, y de acuerdo con Sato y col. 1989, es de importancia fundamental establecer si estas estructuras contienen RNA, y si es así, en qué cantidad. Dickinson y Heslop-Harrison, 1970 y Williams y col. 1973, indican por otra parte, la ausencia de DNA detectable citoquímicamente.

Con respecto a su procedencia, Williams y col. (1973) indican que los nucleoloides citoplásmicos de *Lilium* o sus precursores se formarían en la región organizadora nucleolar

(NOR: Nucleolar Organising Region) de los cromosomas nucleolares durante paquitene y diplotene, a partir de nucleolos accesorios que se forman mientras el nucleolo de la célula parental comienza a sufrir su disgregación. Estos nucleolos accesorios se liberarían del NOR, y el material del cual están compuestos se distribuiría por el núcleo durante la profase tardía, integrándose en la llamada camiseta metafásica de los cromosomas hasta la finalización de la primera división meiótica, tras la cual se reestructurarían en forma de glóbulos, apareciendo eventualmente en el citoplasma.

Prácticamente, nada se conoce sobre la función de los nucleoloides y de su relación con el ciclo nucleolar y ribosómico durante la meiosis. Dickinson y Heslop-Harrison propusieron en 1970 que estas estructuras podrían representar el mecanismo fundamental a través del cual es restaurada la población ribosómica del citoplasma tras la eliminación sufrida durante la profase.

El bajo contenido en RNA de estas estructuras en *Lilium* en comparación con el nucleolo demostrado por Sato y col. (1989), y la ausencia de RNA en *Pteridium aquilinum* (Bell y Pennell, 1987) podría considerarse en contra de esta teoría, pero en general, la ignorancia actual sobre la composición de estos cuerpos no permite cerrar esa posibilidad, más aún cuando ha sido detectada la presencia de transcritos de rRNA en ellos (Sato y col. 1991).

La presencia de nucleoloides en el citoplasma de microsporas de *Olea europaea* fue descrita por Rodríguez-García y Fernández (1987), desde el final de telofase II hasta el estadio de microspora vacuolada. Estos autores confirmaron la naturaleza ribonucleoproteica de estos cuerpos citoplásmicos mediante la técnica regresiva de tinción con EDTA (Bernhard, 1969), y establecieron una relación directa entre la presencia y el comportamiento de los nucleoloides y la población ribosómica, de acuerdo con el significado fisiológico atribuido previamente a los nucleoloides por Dickinson y Heslop-Harrison (1970). Asimismo, indicaron una relación definida entre nucleoloides y ciertas estructuras citoplásmicas (denominadas masas fibrilares) que aparecen en estadios particulares de la microsporogénesis.

II. JUSTIFICACION Y  
OBJETIVOS DEL ESTUDIO.

La gametogénesis masculina en Angiospermas constituye el área fundamental de estudio del grupo de Citología Vegetal dentro de la Unidad Estructural de Bioquímica Vegetal de la Estación Experimental del Zaidín de Granada desde su creación.

Dicho estudio se ha centrado hasta ahora básicamente en el "desarrollo del grano de polen", que comprende desde la formación de la tetrada hasta la dehiscencia de la antera, por lo que la microsporogénesis (formación de las microsporas de la tetrada mediante división meiótica a partir de una CMP) no se conocía exhaustivamente a nivel celular, al menos en el material vegetal usualmente utilizado en este laboratorio.

Nuestro objetivo fundamental para la realización de esta Tesis Doctoral fue realizar una contribución al conocimiento de la Microsporogénesis y de los fenómenos citológicos asociados a ella y aún poco conocidos como la formación de vacuolas nucleares, la deposición de calosa, la aparición de nucleoloides, y la presencia de inclusiones intranucleares.

Con esta finalidad se han intentado utilizar los métodos que a primera vista pueden aportar mayor información, como son las técnicas citoquímicas, inmunocitoquímicas y de hibridación *in situ*, sin olvidar el estudio ultraestructural básico para el cual se pretendió optimizar el proceso de preparación de las muestras.

En el caso de las inclusiones intranucleares, uno de los objetivos prioritarios era poner a punto los métodos de aislamiento y purificación de éstas, como paso preliminar de gran utilidad para posteriores estudios, además de su caracterización citoquímica. Para el estudio de la calosa, hemos intentado utilizar nuevos métodos en su detección, que puedan aportar más datos acerca de los procesos de su formación y su deposición alrededor de los meiocitos, mientras que para los nucleoloides, nuestro propósito fundamental lo constituyó el conocer el grado de similitud que presentan con el nucleolo a nivel de composición y funcionalidad.

Finalmente, el material utilizado ha sido el olivo en base a que, aparte del conocimiento previo por parte del Grupo de Citología Vegetal de la microgametogénesis en esta planta, se trata de un cultivo de enorme interés económico, y además muestra

condiciones particularmente interesantes para los estudios indicados. Como ejemplo cabe citar la presencia de nucleoloides en un número elevado y perfectamente estructurados, frente a otras plantas en las que no han sido observados, o presentan características menos estructuradas, menor tamaño, etc.

III. MATERIALES Y METODOS.

# III. MATERIALES Y METODOS

## III.1. MATERIALES..... pag. 23

III.1.A. ANTERAS DE OLIVO..... pag. 23

III.1.B. OTROS MATERIALES..... pag. 23

- \* Hojas de olivo.
- \* Hojas de acebuche.
- \* Frutos de olivo.
- \* Raíces de olivo joven.

## III.2. METODOS..... pag. 25

III.2.A. TECNICAS DE OBSERVACION DE MATERIAL EN FRESCO.. pag. 25

III.2.A.a. METODOS GENERALES..... pag. 25

III.2.A.b. TINCION CON CARMIN ACETICO..... pag. 25

III.2.A.c. TINCION CON ORCEINA ACETICA..... pag. 25

III.2.A.d. UTILIZACION DE DAPI..... pag. 26

III.2.A.e. UTILIZACION CONJUNTA DE DAPI Y SIROFLUOR.. pag. 26

III.2.B. <u>PROCESAMIENTO DE MUESTRAS PARA MICROSCOPIA OPTICA/MICROSCOPIA ELECTRONICA DE TRANSMISION.</u>	pag.	26
III.2.B.a. PROCESAMIENTO PARA ESTUDIO ULTRAESTRUCTURAL.....	pag.	26
III.2.B.b. PROCESAMIENTO A BAJA TEMPERATURA Y UTILIZACION DE CRIOTECNICAS.....	pag.	31
* <u>Fijación química previa.</u>		
* <u>Procesamiento de muestras a baja temperatura.</u>		
* <u>Criofijación, Criosustitución e inclusión a baja temperatura).</u>		
III.2.B.c. PROCESAMIENTO DE MUESTRAS PARA HIBRIDACION "IN SITU" DE ACIDOS NUCLEICOS.....	pag.	34
III.2.B.d. PROCESAMIENTO DE FRACCIONES LIQUIDAS PROCEDENTES DE AISLAMIENTOS BIOQUIMICOS.	pag.	36
III.2.C. <u>TRATAMIENTOS CITOQUIMICOS "EN BLOQUE"</u> .....	pag.	36
III.2.C.a. DETECCION CITOQUIMICA DE DNA.....	pag.	36
III.2.C.b. DETECCION CITOQUIMICA DE PROTEINAS ARGENTAFINES.....	pag.	37
III.2.C.c. DETECCION DE CATIONES CON PIROANTIMONIATO POTASICO.....	pag.	38
III.2.D. <u>CITOQUIMICA SOBRE CORTES SEMIFINOS PARA MICROSCOPIA OPTICA CONVENCIONAL.</u> .....	pag.	38
III.2.D.a. METODOS GENERALES DE TINCION.....	pag.	38

III.2.D.b. TECNICAS PARA DETECTAR PROTEINAS.....	pag.	39
<ul style="list-style-type: none"> <li>* <u>Método de la ninhidrina-reactivo de Schiff.</u></li> <li>* <u>Método de la cloramina T-reactivo de Schiff.</u></li> <li>* <u>Método de Hartig-Zacharias.</u></li> </ul>		
III.2.E. <u>CITOQUIMICA SOBRE CORTES ULTRAFINOS PARA</u> <u>MICROSCOPIA ELECTRONICA DE TRANSMISION.....</u>	pag.	42
III.2.E.a. METODOS GENERALES DE TINCION.....	pag.	42
III.2.E.b. TINCION DE DNA CON LA TECNICA NAMA-Ur.....	pag.	43
III.2.E.c. TINCION REGRESIVA DEL EDTA, PREFERENCIAL PARA RNA.....	pag.	44
III.2.E.d. TECNICAS PARA DETECCION DE PROTEINAS.....	pag.	44
<ul style="list-style-type: none"> <li>* <u>Detección de proteínas argirófilas mediante</u> <u>impregnación argéntica.</u></li> <li>* <u>Detección de proteínas altamente fosforiladas</u> <u>mediante oxinitrato de bismuto.</u></li> <li>* <u>Digestión enzimática con proteinasa K.</u></li> </ul>		
III.2.F. <u>UTILIZACION DE FLUOROCROMOS Y MICROSCOPIA DE</u> <u>FLUORESCENCIA SOBRE SECCIONES SEMIFINAS.....</u>	pag.	47
III.2.F.a. METODOS GENERALES DE UTILIZACION.....	pag.	47
III.2.F.b. DETERMINACION DE LOS ESPECTROS DE ABSOR- CION Y EMISION DE LOS FLUOROCROMOS.....	pag.	48
III.2.F.c. UTILIZACION DE ANARANJADO DE ACRIDINA.....	pag.	49
III.2.F.d. UTILIZACION DE DAPI.....	pag.	49
III.2.F.e. UTILIZACION DE CURCUMINA.....	pag.	50

III.2.F.f. UTILIZACION DE SIROFLUOR.....	pag. 50
III.2.F.g. UTILIZACION DE AZUL DE ANILINA.....	pag. 51
III.2.G. <u>UTILIZACION DE LECTINAS</u> .....	pag. 51
III.2.G.a. UTILIZACION DE LA LECTINA VVL CONJUGADA A FLUORESCENCIA.....	pag. 51
III.2.G.b. UTILIZACION DE LA LECTINA WGA CONJUGADA CON BIOTINA.....	pag. 52
* <u>Sistema biotina-avidina-peroxidasa a microscopía óptica.</u>	
* <u>Sistema biotina-avidina-peroxidasa a microscopía electrónica de transmisión.</u>	
* <u>Sistema de anticuerpos anti-biotina a microscopía electrónica de transmisión.</u>	
III.2.H. <u>TECNICAS INMUNOCITOQUIMICAS</u> .....	pag. 55
III.2.H.a. METODOS GENERALES DE UTILIZACION.....	pag. 55
III.2.H.b. DETECCION INMUNOCITOQUIMICA DE DNA.....	pag. 56
* <u>Sobre secciones semifinas.</u>	
* <u>Sobre secciones ultrafinas.</u>	
III.2.I. <u>HIBRIDACION "IN SITU" DE ACIDOS NUCLEICOS</u> .....	pag. 59
III.2.I.a. HIBRIDACION DE SONDA rRNA MARCADA CON BIOTINA SOBRE SECCIONES ULTRAFINAS.....	pag. 59
III.2.J. <u>MICROSCOPIA ELECTRONICA DE BARRIDO</u> .....	pag. 62
III.2.J.a. PREPARACION DE MEIOCITOS PARA SU ESTUDIO AL M.E.B. CON RUPTURA DE CUBIERTAS.....	pag. 62

III.2.K. <u>MORFOMETRIA</u> .....	pag.	62
III.2.K.a. DETERMINACION DE DENSIDAD DE PARTICULAS...	pag.	62
III.2.L. <u>DIFRACTOMETRIA OPTICA</u> .....	pag.	63
III.2.L.a. DIFRACTOMETRIA OPTICA EN CRISTALES INTRANUCLEARES.....	pag.	63
III.2.M. <u>TECNICAS BIOQUIMICAS</u> .....	pag.	63
III.2.M.a. AISLAMIENTO DE CUERPOS PROTEICOS A PARTIR DE HOJAS Y ANTERAS DE OLIVO.....	pag.	63
III.2.M.b. DETERMINACION CUANTITATIVA DE PROTEINAS...	pag.	64
III.2.M.c. DETERMINACION DE LA DENSIDAD POR REFRAC- TOMETRIA OPTICA.....	pag.	65
III.2.M.d. ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA...	pag.	65
III.2.N. <u>TECNICAS FOTOGRAFICAS</u> .....	pag.	66
III.2.N.a. FOTOMICROGRAFIA EN MICROSCOPIA OPTICA Y DE FLUORESCENCIA .....	pag.	66
III.2.N.b. FOTOMICROGRAFIA EN MICROSCOPIA ELECTRO- NICA .....	pag.	67

## III.1. MATERIALES

### III.1.A. ANTERAS DE OLIVO

La mayor parte de los estudios se realizaron sobre anteras jóvenes de flores de olivo (*Olea europaea* L.) en diversos estadios de desarrollo, colectadas en las siguientes zonas durante las épocas de floración que se indican:

- Costa de Málaga: Velez Málaga, Canillas del Aceituno (Málaga, España). Años 1985 a 1989. Epoca de floración: Marzo y Abril.
- Estación Experimental del Zaidín (Granada, España). Años 1985 a 1991. Epoca de floración: Abril y Mayo.
- Gúejar-Sierra (Granada, España). Años 1985 y 1989. Epoca de floración: Mayo y Junio.

### III.1.B. OTROS MATERIALES

Algunas experiencias se desarrollaron sobre muestras de los siguientes materiales:

\* Hojas de olivo (*Olea europaea* L) procedentes de:

- Estación Experimental del Zaidín (Granada, España). Años 1988 a 1990.
- Córdoba (España). Año 1988.
- Región del Algarve (Portugal). Año 1989.
- Cáceres y Badajoz (España). Año 1989.

\* Hojas de acebuche (*Olea europaea* var. *sylvestris*)  
procedentes de Gúejar-Sierra (Granada, España). Año 1989.

\* Frutos de olivo procedentes de Estación Experimental del  
Zaidín. Año 1983.

\* Raíces de olivo joven en maceta procedentes de Málaga  
(España). Año 1991.

## III.2. METODOS

### III.2.A. TECNICAS DE OBSERVACION DE MATERIAL EN FRESCO.

Se utilizan fundamentalmente con objeto de estudiar las diferentes fases de desarrollo de las CMP en anteras.

#### III.2.A.a. TINCION CON CARMIN ACETICO.

Las anteras, una vez diseccionadas, se colocan en un pocillo con colorante durante un tiempo variable, de 10 minutos a tres horas. El colorante (carmin acético) se prepara a partir de:

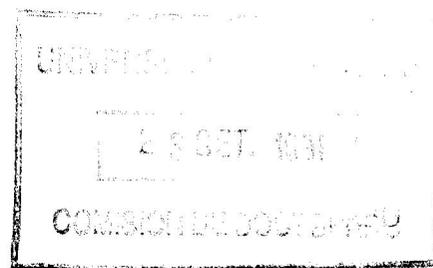
carmin ..... 4.5 gr.  
ácido acético 45 % (v/v).... 100 ml.

Esta solución se hierve durante una hora, se deja enfriar y se filtra.

La preparación de las anteras una vez teñidas se realiza por aplastamiento. Para ello se corta el ápice de la antera con una cuchilla, y se empuja suavemente sobre ella con una aguja enmangada hasta que se vierta su contenido sobre una gota de glicerina colocada sobre el portaobjetos. A continuación se coloca un cubreobjetos y se observa en un microscopio ZEISS Axioplan equipado con un sistema de contraste interferencial diferencial (DIC), (óptica Nomarsky).

#### III.2.A.b. TINCION CON ORCEINA ACETICA.

El procedimiento es idéntico al descrito para la tinción con carmin acético. El colorante en este caso se prepara a partir de una solución madre al 2 % (p/v) de orceína por dilución en ácido acético 45 % (v/v) en proporción 1:1.



### III.2.A.c. UTILIZACION DE DAPI

Se realiza una preparación por aplastamiento según el procedimiento descrito anteriormente sobre una gota de la solución de trabajo de DAPI (4',6-DiAmidino-2-PhenilIndole) (10 µgr./ml.), preparada a partir de una solución madre de 1 mgr./ml., por dilución 1:1000 en tampón McIlvaine (0.1 M de citrato, 0.2 M fosfato disódico, 1 % (v/v) Tritón X-100, pH 4.0).

En este caso es conveniente incubar la preparación unos 10-15 minutos antes de observar en un microscopio ZEISS Axioplan equipado con un sistema de epifluorescencia, utilizando un sistema de filtros con excitación ultravioleta. En todos los pasos de preparación y observación se siguen las normas generales indicadas para el uso de fluorocromos que se indican más adelante (apartado II.2.F.a.).

### III.2.A.d. UTILIZACION CONJUNTA DE DAPI Y SIROFLUOR

El procedimiento es idéntico al descrito para la utilización de DAPI. En este caso la preparación se realiza sobre una gota de solución de trabajo de DAPI (10 µgr./ml.) y otra gota de solución de trabajo de sirofluor (0.025 mgr./ml.). La observación se realiza igualmente bajo excitación ultravioleta.

### III.2.B. PROCESAMIENTO DE MUESTRAS PARA MICROSCOPIA OPTICA / MICROSCOPIA ELECTRONICA DE TRANSMISION.

#### III.2.B.a. PROCESAMIENTO PARA ESTUDIO ULTRAESTRUCTURAL

Con objeto de optimizar las condiciones de procesamiento de las muestras (especialmente en el caso de anteras de olivo), y a fin de obtener la mejor preservación ultraestructural posible se han ensayado diferentes condiciones de procesamiento:

#### FIJACION

Las muestras fueron recolectadas y colocadas inmediatamente en frío (4° C). Posteriormente fueron diseccionadas sobre una

placa de Petri conteniendo fijador frío (sobre un recipiente con hielo picado) y se cortaron en fragmentos pequeños para facilitar la penetración de los reactivos.

La fijación química en el caso de las anteras se realizó en glutaraldehído 3% (v/v) ó en una mezcla de glutaraldehído 5% (v/v) y paraformaldehído 4% (p/v) diluidos en tampón cacodilato sódico o tampón fosfato disódico-monopotásico a varias concentraciones (6.35 mM, 25 mM, 0.1 M y 0.4 M) y pHs (6.85, 7.0, 7.2, y 7.5). Para el resto de los materiales se empleó exclusivamente glutaraldehído 3 % (v/v) en tampón cacodilato sódico 25 mM pH 6.85.

Al comienzo del periodo de fijación se aplicó en todos los casos un ligero vacío durante 10-15 minutos. Dicho periodo de fijación se prolongó durante 1h. y 30 minutos, 2h., 5h., 8h., 12h., ó 22 h. a temperatura ambiente para el tratamiento de las anteras (1h.30 minutos a 2h. para los otros materiales). Al final de dicho periodo las muestras se lavaron en tres pases de 20 minutos cada uno en el mismo tampón con que fue preparado el fijador.

En algunas de las muestras de anteras se estudió el efecto de las adición de  $\text{CaCl}_2$  2 mM (sólo en mezclas fijadoras vehiculizadas en tampón cacodilato), y sacarosa 2 %, 3% ó 10% (p/v) así como PVP-40 (Poli-Vinil-Pirrolidona con Pm. aproximado de 40.000) al 10 % (p/v) (tanto en mezclas fijadoras con tampón cacodilato como fosfato) como protectores frente a cambios osmóticos durante la fijación.

Las diferentes condiciones empleadas se sumarizan en la tabla que aparece en la siguiente página.

Las muestras se postfijaron en tetróxido de osmio 2 % (p/v) en el mismo tampón de fijación durante 2h. a temperatura ambiente, y posteriormente se lavaron en tres pases de 20 minutos cada uno del mismo tampón.

Algunas muestras de anteras se trataron con ácido tánico 3 % (p/v) en tampón de fijación durante 1h. después de la postfijación con osmio.

FIJADOR	TAMPON	CONCENTRACION	pH	TIEMPO	ADITIVOS
GA 3%	cacodilato sódico	6.35 mM	6.85	1h. 30 m.	*CaCl <sub>2</sub> 2 mM
GA 5% + PF 4%	fosfato disódico- monopotásico	25 mM	7.0	2h.	sacarosa 2%
		0.1 M	7.2	5h.	sacarosa 3%
		0.4 M	7.5	8h.	sacarosa 10%
				12h.	PVP40 10%

\*Sólo en fijadores con tampón cacodilato

### DESHIDRATACION

Tras la fijación, el material fue deshidratado a través de una serie gradual de etanol o acetona al 30 %, 50 %, 70 % y 90 % (v/v) (1 h. en cada paso) y finalmente tres pasos de etanol o acetona puro de 1 h. cada uno. En algunos casos, se realizó una deshidratación más suave de las anteras, utilizando una serie de etanol o acetona con incrementos de 5 % (v/v) por hora.

Posteriormente el disolvente empleado se cambió gradualmente por óxido de propileno a través de los siguientes pasos:

Mezcla	Relación	Tiempo
etanol o acetona/óxido de propileno	(1:1)	5 min.
óxido de propileno	puro	3x10 min.

## INFILTRACION

La infiltración se realizó gradualmente a través de varios pasos de mezclas de concentración creciente de resina (EPON o SPURR) y óxido de propileno:

Mezcla	Relación	Tiempo
óxido de propileno/resina	(3:1)	2 h.
óxido de propileno/resina	(1:1)	2 h.
óxido de propileno/resina	(1:3)	2 h.
resina	pura	48 h.

La infiltración se facilita mediante agitación continua de las muestras.

## POLIMERIZACION

Las muestras se colocaron debidamente orientadas y etiquetadas en el fondo de cápsulas de gelatina rellenas con resina y se polimerizaron a 65° C durante 48 h.

## MICROTOMIA

De cada bloque se obtuvieron secciones semifinas de 1 µm de espesor en un ultramicrotomo "Ultracut E" de REICHERT-JUNG, usando cuchillas de vidrio.

A su vez se obtuvieron secciones ultrafinas de unos 70 nm. de espesor que se recogieron por contacto sobre rejillas de cobre de 200, 300 ó 400 agujeros.

## TINCION DE PREPARACIONES

Para una mejor visualización de las estructuras celulares, las secciones semifinas se tiñeron inespecíficamente según el

método de Humprey y Pittman (1974), utilizando las siguientes soluciones:

- Solución A: Azul de Metileno-Azul II

- Azul de metileno..... 0.130 gr.
- Azul II..... 0.020 gr.
- Glicerol..... 10 ml.
- Metanol..... 10 ml.
- Agua destilada..... 50 ml.
- Tampón fosfato 0.1 M pH 6.9..... 30 ml.

- Solución B: Fucsina básica 0.05 % (p/v) en etanol 2.5 % (v/v)

- Fucsina básica..... 0.10 gr.
- Etanol 50 % (v/v)..... 10 ml.
- Se toman 6 ml. de esta solución y se completa hasta 120 ml. con agua destilada.

Las preparaciones se trataron con la solución A durante 20 minutos a 65° C, se lavaron con agua destilada y se trataron con la solución B a temperatura ambiente durante 5 minutos. En algunos casos sólo se trataron con la solución A. Posteriormente, y tras lavar con agua destilada, las preparaciones se secaron sobre una placa caliente y se montaron con medio DPX.

#### CONTRASTADO DE REJILLAS

Las secciones ultrafinas se contrastaron según Reynold (1963), flotando las rejillas sobre gotas de:

- Acetato de uranilo 5 % (p/v) en agua bidestilada durante 30 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad.
- Lavado en agua bidestilada.
- Citrato de plomo en medio alcalino durante 10 minutos a temperatura ambiente, limitando la concentración de CO<sub>2</sub> ambiental mediante lentejas de NaOH y bajo una placa de Petri invertida

para reducir la aparición de precipitados. Esta solución se prepara a partir de:

- Nitrato de plomo ..... 1.33 gr.
- Citrato trisódico dihidratado ..... 1.67 gr.

La solución se agita durante un minuto, se deja reposar 30 minutos y se le añaden 8 ml. de una solución de NaOH 1 N, completando hasta 50 ml. con agua bidestilada.

- Lavado intensivo en agua bidestilada.

### III.2.B.b. PROCESAMIENTO A BAJA TEMPERATURA Y UTILIZACION DE CRIOTECNICAS.

Este tipo de técnicas se utilizan como alternativa a las descritas en el apartado III.2.B.a. fundamentalmente para preservar las características antigénicas de las muestras, con vistas a la utilización posterior de técnicas inmunocitoquímicas, o para producir una inmovilización de los componentes celulares para su estudio mediante la utilización de técnicas como el microanálisis de rayos X. Sin embargo, en muchos casos también se consigue una magnífica preservación ultraestructural.

#### \* Fijación química previa.

El procedimiento de fijación es similar al utilizado para el procesamiento de muestras para microscopía óptica/electrónica de transmisión (III.2.B.a.), con algunas particularidades:

- a) La solución fijadora empleada en este caso es una mezcla de paraformaldehído 2% (p/v) y glutaraldehído 0.1 % (v/v), o bien una solución de paraformaldehído 4 % (p/v) ambas en tampón fosfato 0.1 M pH 7.2
- b) El tiempo de fijación es de media hora, a 4° C.
- c) Después de lavar en el correspondiente tampón, las muestras se tratan con una solución de (NH<sub>4</sub>)Cl 50 mM en tampón fosfato 0.1 M pH 7.2 para bloquear los aldehídos libres durante 30 minutos, y

posteriormente se vuelven a lavar en tampón.

\* Procesamiento de muestras a baja temperatura.

Las muestras, fijadas según el procedimiento descrito anteriormente se colocan en viales de plástico de 1.5 ml. en una unidad de criosustitución FSU de BALZER previamente programada y preenfriada para seguir el esquema de deshidratación, imbibición y polimerización siguiente:

La deshidratación se realiza colocando las muestras en una serie de soluciones de metanol de concentración creciente a temperatura progresivamente menor:

[metanol] (v/v)	Tiempo	Temperatura
30 %	1 hora	0° C.
50 %	1 hora	-10° C.
70 %	1 hora	-25° C.
90 %	1 hora	-35° C.
100 %	3 x 1 hora	-35° C.

La infiltración se realiza colocando las muestras en mezclas de metanol y Lowicryl K4M (Lw) progresivamente más concentradas en éste último dentro de la unidad FSU colocada a -35° C.

Mezcla	Relación	Tiempo	Temperatura
metanol/Lw	3:1	1 noche	-35° C.
metanol/Lw	1:1	5 horas	-35° C.
metanol/Lw	1:3	5 horas	-35° C.
Lowicryl	puro	1 noche	-35° C.
Lowicryl	puro	5 horas	-35° C.

La polimerización se realiza en la unidad FSU una vez

rellenos los viales al máximo con Lowicryl, con las muestras en el fondo y cerrados herméticamente durante dos días con irradiación ultravioleta reflejada desde la cara superior a  $-35^{\circ}$ .

Transcurrido ese periodo, los viales se giran  $180^{\circ}$  y se mantienen polimerizando con luz ultravioleta durante otros dos días, ya a temperatura ambiente.

\* Criofijación, criosustitución e inclusión a baja temperatura.

Las muestras, fijadas como se ha indicado previamente en este apartado, y en algunos casos sin ningún tipo de fijación química se someten al proceso de crioprotección que se detalla a continuación:

[sacarosa]*	Tiempo	Temperatura
0.1 M	3 h.	$4^{\circ}$ C.
1 M	3 h.	$4^{\circ}$ C.
2.3 M	noche	$4^{\circ}$ C.

\* en tampón fosfato 0.1 M pH 7.2

Las muestras así preparadas se someten a criofijación por inmersión en propano líquido sobreenfriado en nitrógeno líquido a  $-160^{\circ}$  C. en un aparato de criofijación KF-80 de REICHERT y posteriormente son transferidas a nitrógeno líquido donde pueden mantenerse durante tiempo considerable sin alteración aparente.

La criosustitución se realiza en la unidad FSU de BALZER ya mencionada en este apartado. Las muestras se introducen en viales de plástico de 0.1 ml. de capacidad rellenos con metanol puro o con una solución de tetróxido de osmio 2 % (p/v) en metanol absoluto (en el caso de muestras dedicadas a estudio ultraestructural). Dichos viales habrán sido preenfriados previamente a  $-90^{\circ}$  C., y la unidad FSU previamente programada a

ese efecto y para seguir el siguiente esquema de criosustitución:

Temperatura	Tiempo
-90° C.	8 h.
-60° C.	8 h.
-35° C.	8 h.

Durante el tiempo de criosustitución las muestras se agitan frecuentemente, y la solución de los viales se renueva varias veces para facilitar el proceso. Una vez finalizado éste, la infiltración de resina en las muestras y la polimerización de ésta se realiza de forma idéntica a la descrita anteriormente para el procesamiento de las muestras a baja temperatura. En el caso de las muestras criosustituídas en una solución de tetróxido de osmio para estudios ultraestructurales, la infiltración puede realizarse en una resina tipo epóxido, tras un paso gradual a temperatura ambiente (ver apartado III.2.B.a.).

### III.2.B.c. PROCESAMIENTO DE MUESTRAS PARA HIBRIDACION "IN SITU" DE ACIDOS NUCLEICOS. (Procedimiento original de McFADDEN y col. 1988)

El fijador utilizado en este caso es una mezcla de paraformaldehído 4 % (p/v) y glutaraldehído 0.25 % (v/v) en tampón PIPES (1,4-PIPERazinediethaneSulphonic acid) 50 mM, pH 7.3.

A partir de este fijador se prepara una partición de fase, colocando en un vial de vidrio y bajo campana extractora un volumen determinado de fijador, e igual volumen de n-heptano. Después de agitar durante un minuto, se deja reposar el vial hasta que se separen las dos fases, tomando entonces la superior de ambas.

Las muestras, cortadas en trozos muy pequeños, se fijan en dicha fase durante 10 minutos a temperatura ambiente, y a

continuación se fijan en el fijador restante durante 2 horas a temperatura ambiente. A lo largo de esas dos horas, se aplica un ligero vacío durante unos 10 minutos. Posteriormente, las muestras se lavan 2 x 10 minutos en PIPES 50 mM.

La deshidratación e infiltración se ajusta a los siguientes esquemas:

#### DESHIDRATACION

[etanol] (v/v)	Tiempo
10 %	15 min.
30 %	15 min.
50 %	15 min.
70 %	15 min.

#### INFILTRACION

Mezcla	Relación	Tiempo
etanol/resina LR-GOLD	(3:1)	noche
etanol/resina LR-GOLD	(1:1)	3 h.
resina LR-GOLD	puro	noche
resina LR-GOLD	puro	1 h.

La polimerización se realiza tras la adición de un 1 % (p/v) de peróxido de benzoílo a la resina LR-GOLD y en cápsulas de gelatina. Dichas cápsulas se rellenan parcialmente con la resina + acelerador, y, una vez colocadas y orientadas las muestras, terminan de rellenarse hasta el máximo y se tapan, dejando polimerizar durante un mínimo de unos tres días en oscuridad y a temperatura ambiente.

### III.2.B.d. PROCESAMIENTO DE FRACCIONES LIQUIDAS PROCEDENTES DE AISLAMIENTOS BIOQUIMICOS.

El paso previo necesario para el procesamiento de una fracción bioquímica para microscopía electrónica de transmisión es su inclusión en un medio que permita su manejo. Para ello, se coloca en un vial de plástico de 1.5 ml., una cantidad determinada de la muestra a procesar, e igual cantidad de agar al 4 % (p/v) en sobrefusión.

A continuación el vial se agita fuertemente para mezclar antes de que solidifique el agar, y, una vez solidificado éste, se corta el ápice del vial de plástico, y con la ayuda de una aguja enmangada, se hace salir la muestra solidificada. Esta muestra puede entonces cortarse en pequeños fragmentos y tratarse según los procesos de fijación, (postfijación opcional), deshidratación, infiltración y polimerización descritos en el apartado II.2.B.a.

### III.2.C. TRATAMIENTOS CITOQUIMICOS "EN BLOQUE".

III.2.C.a. DETECCION CITOQUIMICA DE DNA. (Risueño, M.C. y col. 1990).

Este procedimiento, diseñado para teñir preferencialmente estructuras que contienen DNA. Esta técnica puede realizarse igualmente sobre secciones (apartado III.2.E.b.).

La recolección de las muestras, su disección, fijación con GA y lavado se realiza según el procedimiento descrito en el apartado III.2.B.a. (sin postfijación). Una vez lavadas las muestras en tampón, se tratan de la siguiente forma:

	Tratamiento	Tiempo	Condiciones
Paso 1	NaOH en PF 4% (p/v)	24 horas	
Paso 2	Lavado en agua destilada	30 min.	
Paso 3	Acético 0.5% (v/v)	30 min.	
Paso 4	Deshidratación según apartado II.2.B.a.		series de metanol en lugar de etanol
Paso 5	Mezcla metanol/anhidrido acético (5:1)	24 horas	25° C. y en oscuridad
Paso 6	Metanol absoluto	20 min.	

Los restantes pasos (cambio gradual del disolvente por óxido de propileno, infiltración, polimerización...) son idénticos a los indicados en II.2.B.a.

Pueden utilizarse como controles anteriores en las que se omiten los tratamientos con hidróxido sódico o con metanol/anhidrido acético.

### III.2.C.b. DETECCION CITOQUIMICA DE PROTEINAS ARGENTAFINES. (Tandler, C.J. y Pellegrino de Iraldi, A. 1989).

Una vez que las muestras han sido fijadas en GA se someten a los siguientes tratamientos:

	Tratamiento	Tiempo	Condiciones
Paso 1	Lavado en agua destilada	2 x 20 minutos	En frío
Paso 2*	Reactivo acetato de mercurio	Entre 6 y 24 h.	
Paso 3	Acido acético 1 %	3 x 20 minutos	
Paso 4	Agua destilada	3 x 10 minutos	
Paso 5*	Solución de nitrato de plata amoniacal (2 pasos):	a)15 minutos... T <sub>a</sub> ambiente y oscuridad b)12-24 horas ... 43° C. y oscuridad	
Paso 6	Pasar a T <sub>a</sub> ambiente		Oscuridad
Paso 7	Lavar rápidamente en sulfito sódico 10 % (p/v)		
Paso 8	Sulfito sódico 10 % nuevo	3 x 20 minutos	
Paso 9	Agua destilada	3 x 20 minutos	

\*Paso 2: el reactivo acetato de mercurio es una solución 5 % (p/v) de acetato de mercurio en ácido acético 1 % (v/v) disuelto con calor suave y filtrada.

\*Paso 5: la solución de nitrato de plata amoniacal es una solución extemporánea del 60 % (p/v) de nitrato de plata en agua destilada a 0° C. a la que se añade poco a poco hidróxido amónico concentrado (25-27 % v/v) hasta casi disolver completamente el óxido de plata insoluble que se va formando. (En ningún caso debe quedar amonio libre, aunque sí puede quedar alguna pequeña cantidad de óxido de plata).

Las etapas siguientes de deshidratación, cambio de disolvente, infiltración etc. son los descritos en el apartado II.2.B.a.

### III.2.C.c. DETECCION DE CATIONES CON PIROANTIMONIATO POTASICO.

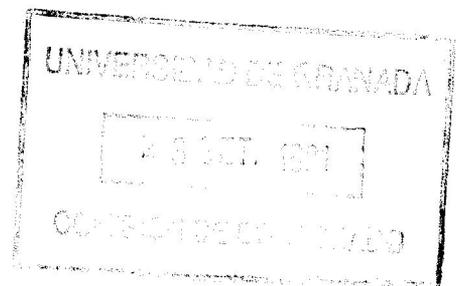
En este caso se utiliza como fijador una mezcla en proporción 1:1 (v/v) de tetróxido de osmio al 2% y de piroantimoniato potásico al 5%, (ambos en agua destilada) que ha sido ajustada a pH 7.5 con ácido acético.

El piroantimoniato potásico se disuelve mal, por lo que la solución debe calentarse hasta ebullición y una vez disuelto éste, debe reponerse el volúmen perdido con agua destilada.

Las muestras se mantienen en este fijador durante dos horas, y posteriormente se lavan (3 x 20 minutos) con sacarosa 6.5% (p/v). El tratamiento posterior de las muestras se corresponde con el descrito en el apartado III.2.B.a..

### III.2.D. CITOQUIMICA SOBRE CORTES SEMIFINOS PARA MICROSCOPIA OPTICA CONVENCIONAL

#### III.2.D.a. METODOS GENERALES DE TINCION.



Para la realización de técnicas citoquímicas a microscopia óptica se utilizaron secciones semifinas (aproximadamente de 1  $\mu\text{m}$ . de espesor) de material incluido en resina tipo epóxido, LR-Gold o Lowicryl (apartados III.2.B.a., III.2.B.c., y III.2.B.b respectivamente)

Las secciones se disponen en 2-3 zonas del portaobjetos limitadas por un trazo de rotulador o con un lápiz de diamante, cada una de ellas con 3-4 secciones. Los tratamientos citoquímicos se realizan colocando gotas de los reactivos sobre cada zona marcada, o bien sumergiendo los portaobjetos en un frasco Coplin lleno con el reactivo.

Generalmente las reacciones se facilitan con la utilización de secciones de material incluido en LR-Gold o Lowicryl, dado el menor grado de entrecruzamiento de estas resinas, y por tanto su mayor permeabilidad a los diferentes reactivos. Para secciones de material incluido en resinas tipo epóxido (menos permeables), los tiempos de incubación de los reactivos deben ser más largos, así como generalmente su concentración. En ocasiones es conveniente para este tipo de preparaciones utilizar soluciones hidroalcohólicas o alcohólicas de los reactivos en lugar de acuosas, incrementar su pH, y/o dar un pretratamiento de disolución parcial de la resina con una solución de etóxido sódico (o metóxido sódico) durante tiempo variable (de 10 minutos a varias horas). Esta solución disolvente se prepara disolviendo NaOH hasta saturación en etanol (metanol) caliente, y dejando reposar una noche hasta que la solución tome un color ligeramente marrón.

Tras este tratamiento las preparaciones se lavan con etanol (metanol) absoluto y se dejan secar. Una vez finalizados los tratamientos, las preparaciones bien secas se montan en medio de montaje DPX.

III.2.D.b. TECNICAS PARA DETECTAR PROTEINAS. (Martoja, R y Martoja, M. 1970)

\* Método de la ninhidrina-reactivo de Schiff.

Las preparaciones se tratan según el siguiente esquema:

	Tratamiento	Tiempo	Condiciones
Paso 1	Ninhidrina 0.5 % (p/v) en etanol	24 horas	40° C.
Paso 2	Lavado en etanol absoluto		
Paso 3	Lavado en agua destilada		
Paso 4*	Reactivo de Schiff	2 horas	40° C. y oscuridad
Paso 5	Lavado en agua destilada		
Paso 6*	Lavado en agua sulfurosa	3 x 5 minutos	
Paso 7	Lavado en agua destilada		
Paso 8	Dejar secar	15 minutos	
Paso 9	Montar en medio DPX		
Paso 10	Observar		

\*Paso 4: El reactivo de Schiff se prepara como se describe a continuación:

Fucsina básica ..... 0.7 gr.  
 Metabisulfito sódico ..... 3.8 gr.  
 HCl 0.15 N ..... hasta 200 ml.

Una vez agitada esta solución durante 2 horas, se le añade 1 gr. de carbón activo decolorante, se agita nuevamente durante 1 hora, y se filtra varias veces a través de un papel de filtro empapado en HCl 0.15 N.

\*Paso 6: El agua sulfurosa es una solución 0.5 % (p/v) de metabisulfito sódico en agua destilada.

Se realiza un control de la reacción sobre una preparación omitiendo el Paso 1.

\* Método de la cloramina T-reactivo de Schiff.

Las preparaciones se tratan de acuerdo al siguiente esquema:

	Tratamiento	Tiempo	Condiciones
Paso 1	Cloramina T 2 % (p/v) en tampón fosfato 0.1 M pH 7.2	4 horas	40° C.
Paso 2	Lavado en agua destilada		
Paso 3	Lavado en tiosulfato sódico 5 % (p/v)	10 minutos	
Paso 4*	Reactivo de Schiff	2 horas	40° C. y oscuridad
Paso 5	Lavado en agua destilada		
Paso 6*	Lavado en agua sulfurosa	3 x 5 minutos	
Paso 7	Lavado en agua destilada		
Paso 8	Dejar secar	15 minutos	
Paso 9	Montar en medio DPX		
Paso 10	Observar		

\*Pasos 4 y 6: ver preparación en el apartado anterior.

Debe utilizarse una preparación control en la que se omite el Paso 1

\* Método de Hartig-Zacharias

El esquema de tratamiento de las preparaciones se detalla a continuación:

	Tratamiento	Tiempo	Condiciones
Paso 1	Ferrocianuro potásico 2 % (p/v) en HCl 1 % (v/v)	1 hora	
Paso 2	Lavado en agua destilada		
Paso 3	Cloruro férrico 1 % (p/v)	10 minutos	
Paso 4	Lavado en agua destilada		
Paso 5	Contrastar ligeramente con safranina/etanol 50 % (1:1).	10 minutos	
Paso 6	Lavar en agua destilada		
Paso 7	Dejar secar	15 minutos	
Paso 8	Montar en DPX		
Paso 9	Observar		

Como control, se omite el Paso 1 en una de las preparaciones.

### III.2.E. CITOQUIMICA SOBRE CORTES ULTRAFINOS PARA MICROSCOPIA ELECTRONICA DE TRANSMISION.

#### III.2.E.a. METODOS GENERALES DE TINCION

Para la realización de técnicas citoquímicas a Microscopía Electrónica de Transmisión se utilizan secciones ultrafinas (de unos 60 a 90 nm. de espesor), de material incluido en resina tipo epóxido, LR-Gold o Lowicryl.

Las secciones se recogen sobre rejillas de cobre de 200 agujeros, en la mayoría de los casos con película de formvar o pioloformo. En algunas reacciones citoquímicas es necesario usar rejillas de aluminio, níquel u oro, como se menciona en cada caso.

Los tratamientos citoquímicos se realizan colocando previamente, y cada una en su orden, gotas de los reactivos sobre un trozo de Parafilm. Las rejillas se hacen flotar en las gotas, con la cara donde se encuentran las secciones hacia abajo, y se pasan de una gota a la siguiente mediante pinzas, y sacudiéndolas con un golpe seco entre gota y gota, a fin de evitar mezclar parcialmente los reactivos.

Al igual que en los tratamientos sobre secciones semifinas, muchas de las reacciones se facilitan con la utilización de secciones ultrafinas de material incluido en LR-Gold o Lowicryl, debiéndose incrementar el tiempo de tratamiento y la concentración de los reactivos para secciones de material incluido en resinas epóxido.

Las rejillas se contrastan con acetato de uranilo y/o citrato de plomo (ver preparación en III.2.B.a.) durante tiempo variable, cuando se hace necesario incrementar el contraste de las estructuras a estudiar.

III.2.E.b. TINCION DE DNA CON LA TECNICA NAMA-Ur. (Risueño, M.C. y col., 1990)

Las rejillas (de oro, con película de formvar o pioloformo), y con secciones de Lowicryl se tratan según el siguiente esquema:

	Tratamiento	Tiempo	Condiciones
Paso 1	Lavado en agua bidestilada	3 x 1 minuto	
Paso 2*	Solución NaOH-formaldehído	3 h. a 1 noche	
Paso 3	Lavado en agua bidestilada	3 x 1 minuto	
Paso 4	Dejar secar	15 minutos	
Paso 5	Metanol 70 % (v/v)	15 minutos	
Paso 6	Metanol puro	3 x 15 min.	Secciones hacia arriba (no flotan en metanol)
Paso 7	Metanol-anhidrido acético (5:1)	1 noche	25° C. Secciones hacia arriba.
Paso 8	Lavado en agua bidestilada	3 x 1 minuto	
Paso 9	Dejar secar	15 minutos	
Paso 10	Acetato de uranilo	60 minutos	60°
Paso 11	Lavado en agua bidestilada		Intensivo
Paso 12	Citrato de plomo (opcional)	30 seg. (resinas base metacrilato) 60 seg. (resinas tipo epóxido)	
Paso 13	Lavado en agua bidestilada		Intensivo
Paso 14	Dejar secar	15 minutos	
Paso 15	Observar		

\*Paso 2: La solución NaOH-formaldehído (0.5 N de NaOH en formaldehído 4 % p/v) se prepara inmediatamente antes de su uso a partir de:

Solución de NaOH 2 % (p/v)..... 10 volúmenes  
Formaldehído comercial (37 % p/v)  
estabilizado con metanol ..... 1 volúmen

En esta técnica se han realizado dos tipos de controles:

- Supresión del tratamiento con solución NaOH-formaldehído.
- Supresión del tratamiento con metanol-anhidrido acético.

### III.2.E.c. TINCION REGRESIVA DEL EDTA, PREFERENCIAL PARA RNA. (Bernhard, 1969).

Las rejillas (de cobre, con 200 agujeros) se tratan según el siguiente esquema:

Tratamiento	Tiempo	Condiciones
Paso 0* H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> de 110 vol. al 10 % (v/v) ó Ácido periodico 10 % (v/v) ó Solución saturada de periodato potásico.	15 minutos 30 minutos 60 minutos	
Paso 1 Tinción con acetato de uranilo	20 minutos	
Paso 2 Lavado con agua bidestilada		Intensivo
Paso 3 Dejar secar	15 minutos	
Paso 4* Solución de EDTA 0.2 M	5 seg. (resinas base metacrilato) 15-30 min. (tipo epóxido).	
Paso 5 Lavado en agua bidestilada		Intensivo
Paso 6 Dejar secar	15 minutos	
Paso 7 Citrato de plomo	15 seg. (resinas base metacrilato) 1 min. (resinas tipo epóxido).	
Paso 8 Lavado en agua bidestilada		Intensivo
Paso 9 Dejar secar	15 minutos	
Paso 10 Observar		

\* Paso 0: Este tratamiento es necesario en el caso de que las muestras hayan sido post fijadas con tetróxido de osmio.

\* Paso 4: La solución de EDTA (EthyleneDiamineTetraacetic Acid) 0.2 M se prepara poniendo 44 gr. de EDTA en unos 50 ml. de agua y añadiendo muy lentamente NaOH 2 N hasta llegar a pH 7.0. Entonces se ajusta el volumen hasta 100 ml.

### III.2.E.d. TECNICAS PARA DETECCION DE PROTEINAS.

\* Detección de proteínas argirófilas mediante impregnación argéntica. (Moreno, F.J. y col. 1985)

Las rejillas (de oro, con 300 agujeros y sin película soporte) se tratan según el siguiente esquema:

	Tratamiento	Tiempo	Condiciones
Paso 1*	Solución de trabajo	5 minutos	Oscuridad
Paso 2	Lavado en agua bidestilada		Intensivo
Paso 3	Solución tiosulfato sódico 5 % (p/v)	10 minutos	
Paso 4	Lavado en agua bidestilada		Intensivo
Paso 5	Dejar secar	15 minutos	
Paso 6	Observar		

\*Paso 1: La solución de trabajo se prepara mezclando 0.5 ml. de la solución A con 1 ml. de la solución B que se describen a continuación.

Solución A:

Acido fórmico ..... 1 ml.  
 Gelatina ..... 2 gr.  
 Agua bidestilada ..... hasta 100 ml.

Solución B:

Nitrato de plata ..... 0.5 gr.  
 Agua bidestilada ..... hasta 1 ml.

\* Detección de proteínas altamente fosforiladas mediante oxinitrato de Bismuto (Locke, M., and Huie, P. 1977)

Las rejillas (preferiblemente de oro o níquel, con película soporte de formwar o pioloformo) se tratan según el siguiente esquema:

	Tratamiento	Tiempo	Condiciones
Paso 1*	Solución de trabajo	1 hora	
Paso 2	Lavado en agua bidestilada		Intensivo
Paso 3	Dejar secar	15 minutos	
Paso 4	Observar		

\*Paso 1: La solución de trabajo se prepara mezclando 2 ml. de la Solución A con 4 ml. de la solución B (cuyas composiciones se detallan a continuación), ajustando el pH a 7.4 con papel indicador. Debe usarse en las dos horas siguientes a su preparación.

Solución A (solución concentrada de bismuto):

Tartrato sódico..... 0.08 gr.  
 NaOH 1 N ..... 2 ml.  
 Subnitrate de bismuto, o  
 nitrato básico de bismuto .... 0.04 gr.

Esta solución queda lechosa en principio, pero luego se disuelve. Si no es así, se agita magnéticamente y se deja hasta el día siguiente.

Solución B (tampón trietanolamina 0.2 M - HCl)

Trietanolamina..... 1.85 gr.  
 Agua bidestilada ..... 50 ml.

Se ajusta el pH a 7.0 con NaOH recién preparada.

\* Digestión enzimática con proteinasa K

Las rejillas reciben los siguientes tratamientos:

	TRATAMIENTO	TIEMPO	CONDICIONES
Paso 1*	Solución enzimática	2-4 horas	Cámara húmeda. 37° C
Paso 2	Lavado en agua bidestilada		
Paso 3	Dejar secar	15 minutos	
Paso 4	Acetato de uranilo	15 minutos	
Paso 5	Lavado en agua bidestilada		Intensivo
Paso 6	Citrato de plomo	5 segundos	
Paso 7	Lavado en agua bidestilada		Intensivo
Paso 8	Dejar secar	15 minutos	
Paso 9	Observar		

\*Paso 1: La solución enzimática está compuesta de:

EDTA 0.5 M ..... 1 ml.  
 Tampón Tris-HCl 1 M pH8.0 ..... 1 ml.  
 Solución stock (20 mgr./ml.)  
 de proteinasa K de *Tritirachium*  
*album* (Sigma)..... 10 µl.  
 Agua bidestilada ..... 8 ml.

Antes de su uso, esta solución enzimática debe ser preincubada durante 2 horas a 37° C.

La cámara húmeda está formada por una placa de Petri con varias capas de papel de filtro empapadas de tampón en su interior. Dentro de ella se coloca una base de placa de Petri de menor tamaño en posición invertida, que contiene las gotas de los reactivos donde se incubarán las rejillas.

### III.2.F. UTILIZACION DE FLUOROCROMOS Y MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA SOBRE SECCIONES SEMIFINAS.

#### III.2.F.a. METODOS GENERALES DE UTILIZACION.

El procedimiento de utilización de fluorocromos es muy similar al descrito para la citoquímica sobre cortes semifinos (apartado III.2.D.a.), y pueden usarse igualmente el mismo tipo de preparaciones, aunque en el caso de preparaciones con secciones de material incluido en resina tipo epóxido es aconsejable el pretratamiento con (m)etóxido sódico varias horas. Hay, sin embargo, algunos detalles particulares a tener en cuenta:

- La preparación de las soluciones de fluorocromos, así como la manipulación de las preparaciones tratadas debe realizarse siempre al abrigo de la luz, utilizando frascos topacio para las soluciones y cajas herméticas a la luz para las preparaciones (cajas de papel fotográfico).

- Las preparaciones, una vez tratadas, se montan en citifluór/glicerol-PBS, que contiene un agente "antifading", capaz de retrasar la pérdida de fluorescencia de los fluorocromos al ser expuestos a la luz. Estas preparaciones pueden observarse con un cubreobjetos, o directamente sobre la gota de agente "antifading".

- La observación se realiza en una habitación oscura o con luz atenuada en un microscopio ZEISS Standar o ZEISS Axioplan equipados con un sistema de epifluorescencia HBO 50, juego de objetivos NEOFLUAR, y con las siguientes combinaciones de filtros:

Tipo de Excitación	Filtro de Excitación	Espejo dicróico	Filtro de barrera
Verde	BP 510-560	FT 580	LP 590
Azul	BP 436/8	FT 460	LP 470
Azul-violeta	BP 450-490	FT 510	LP 520
Ultravioleta	BP 365/11	FT 395	LP 397

- Las preparaciones pueden almacenarse en cajas oscuras a 4° C hasta varios meses.

### III.2.F.b. DETERMINACION DE LOS ESPECTROS DE ABSORCION Y EMISION.

El estudio de ambos tipos de espectros permite una elección racional de los juegos de filtros de fluorescencia más adecuados en cada caso, así como estudiar la posibilidad de utilización conjunta de varios fluorocromos.

Para el estudio de los espectros de absorción se utiliza un espectrofotómetro BECKMAN DU-7. Los fluorocromos se diluyen previamente hasta un nivel adecuado para el rango de lectura de dicho aparato:

Fluorocromo	Dilución
Anaranjado de Acridina	1 µgr./ml.
DAPI	2 µgr./ml.
Curcumina	0.1 mgr./ml. en etanol 5 %
Siroflúor	0.03 mgr./ml.
Azul de Anilina	10 µgr./ml.

Los espectros de emisión se determinan en un espectrofluorímetro SHIMADZU Recording Spectrofluorophotometer modelo RF-540, a partir de las soluciones de fluorocromo anteriores, bajo excitación en cada una de ellas con las longitudes de onda para las cuales se observan picos máximos de absorción.

### III.2.F.c. UTILIZACION DE ANARANJADO DE ACRIDINA.

El esquema de tratamiento de las preparaciones es el siguiente:

	Tratamiento	Tiempo	Condiciones
Paso 1*	Solución de anaranjado de acridina	15 minutos	Oscuridad
Paso 2	Lavado en agua destilada		Intensivo
Paso 3	Dejar secar	15 minutos	Oscuridad
Paso 4	Montar en "antifading"		
Paso 5	Observar		Irradiación azul-violeta.

\*Paso 1: La solución de anaranjado de acridina tiene una concentración de 0.1 % (p/v) en tampón PBS (ver composición en el apartado II.2.G.a.).

### III.2.F.d. UTILIZACION DE DAPI.

Las preparaciones reciben el siguiente tratamiento:

	Tratamiento	Tiempo	Condiciones
Paso 1*	Solución de DAPI	30 minutos	Oscuridad
Paso 2	Lavado en agua destilada		Intensivo
Paso 3	Dejar secar	15 minutos	Oscuridad
Paso 4	Montar en "antifading"		
Paso 5	Observar		Irradiación ultravioleta.

\*Paso 1: La solución de DAPI es de una concentración 10µgr./ml. en agua destilada

III.2.F.e. UTILIZACION DE CURCUMINA. (Stockert, J.C. y col. 1989).

	Tratamiento	Tiempo	Condiciones
Paso 1*	Solución de curcumina	30 minutos	Oscuridad
Paso 2	Lavado en agua bidestilada		Intensivo
Paso 3	Dejar secar	15 minutos	Oscuridad
Paso 4	Montar en "antifading"		
Paso 5	Observar		Excitación azul-violeta

III.2.F.f. UTILIZACION DE SIROFLUOR,

	Tratamiento	Tiempo	Condiciones
Paso 1*	Solución de siroflúor	30 minutos	Oscuridad
Paso 2	Lavado en agua destilada		Intensivo
Paso 3	Dejar secar	15 minutos	Oscuridad
Paso 4	Montar en "antifading"		
Paso 5	Observar		Excitación azul-violeta

\*Paso 1: La solución de siroflúor es de 0.025 mgr./ml. en agua destilada.

### III.2.F.g. UTILIZACION DE AZUL DE ANILINA. (Arens, K. 1949)

Aunque no se trata propiamente de un fluorocromo, el azul de anilina contiene varios de este tipo de componentes, y su utilización se atiene a las normas reseñadas anteriormente (III.2.F.a.).:

	Tratamiento	Tiempo	Condiciones
Paso 1*	Solución de Azul de Anilina	30 minutos	Oscuridad
Paso 2	Lavado en agua destilada		Intensivo
Paso 3	Dejar secar	15 minutos	Oscuridad
Paso 4	Montar en "antifading"		
Paso 5	Observar		Excitación azul-violeta

\*Paso 1: la solución de azul de anilina es al 0.01 % (p/v) en fosfato dipotásico 1.5 % (p/v), pH 8.6

### III.2.G. UTILIZACION DE LECTINAS.

#### III.2.G.a. UTILIZACION DE LECTINA VVL CONJUGADA CON FITC.

Secciones semifinas, preferiblemente de Lowicryl o LR-Gold se tratan según el siguiente esquema:

	Tratamiento	Tiempo	Condiciones
Paso 1	Incubación en solución de trabajo	1 hora	Oscuridad
Paso 2	Lavado en tampón		Intensivo y en oscuridad
Paso 3	Dejar secar	15 minutos	Oscuridad
Paso 4	Montar en "antifading"		Oscuridad
Paso 5	Observar		Excitación azul o azul-violeta

\*Paso 1: La solución de trabajo de la lectina VVL (*Vicia villosa* Lectin)(concentración final de 10 µgr./ml.) se prepara a partir de la lectina comercializada por Vector Laboratories en concentración de 1 mg/ml. pH 7.5, dilución 1/100 en tampón HEPES

## III.2.G.b. UTILIZACION DE LECTINA WGA CONJUGADA CON BIOTINA.

\* Sistema biotina-avidina-peroxidasa a microscopía óptica.

Las secciones semifinas, preferiblemente de Lowicryl o LR-Gold se tratan como se indica a continuación:

	Tratamiento	Tiempo	Condiciones
Paso 1*	Incubación de bloqueo de actividad peroxidasa interna	30 minutos	
Paso 2	Lavado en PBS	2 x 5 minutos	
Paso 3*	Avidina (kit de bloqueo)	15 minutos	Cámara húmeda
Paso 4	Lavado en agua destilada	2 x 5 minutos	
Paso 5*	Biotina (kit de bloqueo)	15 minutos	Cámara húmeda
Paso 6*	Incubación con solución de lectina	noche	4 <sup>o</sup> C. y en cámara húmeda
Paso 7	Lavado en PBS	2 x 5 minutos	
Paso 8*	Incubación kit Vectastain Elite A+B+C.	4 horas	Cámara húmeda
Paso 9	Lavado en PBS	2 x 5 minutos	
Paso 10*	Solución de revelado	Variable	Bajo control microscópico
Paso 11	Dejar secar	15 minutos	
Paso 12	Montar en medio DPX		
Paso 13	Observar		

\*Paso 1: La solución de bloqueo de actividad peroxidasa interna es una solución preparada recientemente de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de 110 vol. 0.3 % (v/v) en metanol absoluto.

\*Pasos 3 y 5: Estos pasos corresponden a la utilización de un kit de Vector Laboratories que asegura que toda la biotina endógena, los receptores de biotina o lugares de unión a avidina presentes en el tejido queden bloqueados previamente a la adición de la lectina marcada con biotina. Este kit está compuesto de una solución de Avidina D (paso 3), y una solución de biotina (paso 5).

\*Paso 6: Para esta incubación se utiliza una solución de la lectina WGA (Wheat Germ Agglutinin) marcada con biotina (comercializada por Boehringer Mannheim) a una concentración de 50 µgr./ml. en PBS pH 7.4.

\*Paso 8: El kit Vectastain Elite A+B+C (Vector Laboratories) es un sistema de amplificación de la señal, que permite reconocer la presencia de cantidades muy pequeñas de lectina biotinilada unida a la muestra, lo cual es de gran utilidad en muestras con poca cantidad de receptores, a la vez que permite una reducción sustancial de la concentración de lectina usada y de los tiempos de incubación. Consta de dos reactivos A: (avidina) y B (biotina marcada con peroxidasa) que se mezclan en proporción determinada (2 gotas de A + 2 gotas de B en 10 ml. de PBS) y se preincuban 30 minutos antes de su utilización.

\*Paso 9: La solución de revelado es DAB tetrahidroclórica 0.05 % (p/v), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.01 M en tampón PBS pH 7.4. La reacción positiva se obtiene generalmente entre los 5 y 10 minutos de revelado y aparece como una coloración marrón oscura en los lugares marcados. Una vez aparecida dicha coloración la reacción debe detenerse por lavado intensivo con PBS pH 7.4, para evitar la aparición de fondo inespecífico.

\* Sistema biotina-avidina-peroxidasa a MET

El tratamiento secuencial de las rejillas con secciones de Lowicryl o LR-Gold es prácticamente idéntico al indicado anteriormente para secciones semifinas. En general los tiempos de incubación con las soluciones de bloqueo de actividad peroxidasa interna, la solución de lectina WGA y el kit A+B+C son menores (10 minutos, 2 horas, y 60 minutos respectivamente).

El tratamiento con la solución de revelado no puede, por razones obvias, ser monitorizado con microscopía electrónica. En lugar de esta monitorización, el tiempo óptimo de revelado ha de ser determinado empíricamente, tratando diversas rejillas con dicha solución durante 1, 2, 5, 10 minutos etc.. Generalmente en

este caso, unos 5 minutos de tratamiento dan los mejores resultados.

Una vez finalizado el revelado y secas las rejillas, éstas se contrastan con acetato de uranilo durante 15 minutos, se lavan intensivamente en agua bidestilada, y se examinan una vez secas.

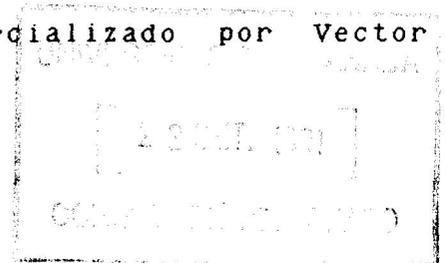
\* Sistema de anticuerpos anti-biotina a microscopía electrónica de transmisión.

Se realiza sobre secciones de Lowicryl o LR-Gold en rejillas de cobre de 200 agujeros, con formwar o pioloformo, y consta de los siguientes pasos:

	Tratamiento	Tiempo	Condiciones
Paso 1	Lavado en PBS	2 x 5 minutos	
Paso 2*	Incubación con solución de lectina	2 horas	Cámara húmeda
Paso 3	Lavado en PBS	2 x 5 minutos	
Paso 4*	Incubación con anticuerpo primario	1 hora	37° C. y en cámara húmeda
Paso 5	Lavado en PBS	2 x 5 minutos	
Paso 6*	Incubación con anticuerpo secundario	1 hora	37° C. y en cámara húmeda
Paso 7	Lavado en PBS	5 minutos	
Paso 8	Lavado en agua bidestilada	5 minutos	
Paso 9	Acetato de uranilo	5 minutos	
Paso 10	Lavado en agua bidestilada		Intensivo
Paso 11	Dejar secar	15 minutos	
Paso 12	Observar		

\*Paso 2: Para esta incubación se utiliza la misma solución de la lectina WGA marcada con biotina ya descrita (comercializada por Boehringer Mannheim) a una concentración de 50 µgr./ml. en PBS pH 7.4.

\*Paso 4: El primer suero es un suero policlonal anti-biotina (IgG), desarrollado en cabra, y comercializado por Vector Laboratories, diluido 1/25 en tampón SC.



Paso 6: El segundo suero es un suero policlonal anti IgG de cabra, desarrollado en ratón, marcado con oro coloidal de 10 nm., y comercializado por Biocell, en dilución 1/10 en tampón SC.

### III.2.H. TECNICAS INMUNOCITOQUIMICAS.

#### III.2.H.a. METODOS GENERALES.

Las técnicas básicas de tratamiento de secciones ultrafinas y semifinas se corresponden en líneas generales a las descritas en los apartados correspondientes a citoquímica (II.2.E y II.2.D. respectivamente) con las siguientes características propias:

- El tratamiento clásico de preparación de muestras para ultraestructura, con la utilización de resinas tipo epóxido que polimerizan a 60-70° C., modifica o destruye totalmente en muchos casos las características antigénicas de las muestras, por lo que su uso está muy limitado para inmunocitoquímica. Por el contrario, en este tipo de técnicas se emplean muestras procesadas a baja temperatura según los procedimientos descritos en el apartado III.2.B.b.
- Las preparaciones de secciones semifinas para inmunocitoquímica se realizan sobre portaobjetos que previamente han sido tratados con poli-L-lisina 0.1 % (p/v) durante 10 minutos y secados posteriormente durante una hora a 60° C. para lograr una perfecta adherencia de las secciones a los portaobjetos.
- El empleo de anticuerpos secundarios conjugados a fluoresceína (FITC: Fluorescein Iso Thyo Cyanate) o rodamina (TRITC) obliga a seguir las normas generales de utilización de fluorocromos (III.2.F.a.) en estos casos.
- Las condiciones de conservación de los reactivos inmunocitoquímicos son muy importantes. En todos los casos los anticuerpos primarios concentrados se mantienen en alícuotas a -20° C., evitando su congelación y descongelación repetida. De igual modo se mantienen los anticuerpos secundarios marcados con oro coloidal cuando están muy concentrados.

Los anticuerpos secundarios conjugados a fluoresceína se mantienen a 4° C., así como todos los anticuerpos, una vez

diluidos para su uso.

- Las diluciones de los anticuerpos se realizan siempre inmediatamente antes de usarlas. Para ello se descongela parcialmente la alícuota de suero (si se mantenía a  $-20^{\circ}$  C.), y se toma la cantidad adecuada mediante una micropipeta. El suero se diluye en la cantidad determinada de tampón (tampón PBS pH 7.4 generalmente) colocado en un vial de plástico tomando y soltando con la micropipeta varias veces.

- El tampón PBS (Phosphate Buffered Saline) pH 7.4 se prepara del siguiente modo:

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ .....	1.85 gr.
$\text{KH}_2\text{PO}_4$ .....	0.43 gr.
$\text{NaCl}$ .....	7.2 gr.
Agua bidestilada .....	hasta 1000 ml.

- Antes de la incubación con anticuerpos, las preparaciones de cortes semifinos deben secarse con papel de filtro en las zonas donde no hay secciones. Con ello se consiguen dos efectos: primero un menor consumo de suero, ya que éste no se reparte uniformemente por todo el portaobjetos, y segundo, la posibilidad de hacer incubaciones diferentes en una misma preparación.

- En ningún caso deben llegar a secarse las secciones sobre los portaobjetos o las rejillas en los pasos intermedios del tratamiento. Para ello, las incubaciones prolongadas suelen realizarse en el interior de una cámara húmeda. Esta cámara consiste en una placa Petri con varias capas de papel de filtro en el fondo, que se empapan con tampón. Sobre ellas se colocan las preparaciones, o una placa Petri de menor tamaño donde se coloca un trozo de Parafilm con las gotas donde se incubarán las rejillas.

### III.2.H.b. DETECCIÓN INMUNOCITOQUIMICA DE DNA.

#### \* Sobre secciones semifinas.

Las preparaciones, con secciones de Lowicryl o LR-Gold se tratan según el siguiente esquema:

Tratamiento	Tiempo	Condiciones
Paso 1 PBS	45 minutos	
Paso 2* Bloqueo de marcado inespecífico	5 minutos	
Paso 3 PBS	5 minutos	
Paso 4* Incubación anticuerpo primario	1 hora	37° C. y en cámara húmeda
Paso 5 Lavado en PBS		Ligero
Paso 6 PBS	45 minutos	
Paso 7* Incubación anticuerpo secundario	45 minutos	37° C. en oscuridad y en cámara húmeda
Paso 8 PBS	45 minutos	Oscuridad
Paso 9 Dejar secar	15 minutos	Oscuridad
Paso 10 Montar en "antifading"		
Paso 11 Observar		Excitación azul

\*Paso 2: Las preparaciones se bloquean con BSA (Bovine Serum Albumin) 5 % (p/v) disuelta a baja temperatura en PBS, con agitación mínima para evitar la formación de espuma.

\*Paso 4: El primer anticuerpo es un monoclonal anti-DNA (IgM), comercializado por Boehringer Mannheim, diluido en PBS en proporción 1/5.

\*Paso 7: El anticuerpo secundario es un anticuerpo monoclonal anti-inmunoglobulina de ratón (IgG e IgM), conjugado con FITC, comercializado por Boehringer Mannheim, en dilución 1/30 en PBS.

El control utilizado para esta determinación inmunocitoquímica es una incubación en PBS en el paso 4 en lugar de la incubación con el anticuerpo primario.

\* Sobre secciones ultrafinas. (Modificado de Hansmann, P. y Falk, H. 1986)

Las rejillas de cobre, con película de formwar o pioloformo, y secciones Lowicryl o LR-Gold reciben el siguiente tratamiento:

Tratamiento	Tiempo	Condiciones
Paso 1 Lavado en agua bidestilada	1 minuto	
Paso 2 Lavado con PBS	1 minuto	
Paso 3* Bloqueo de marcado inespecífico con PBSFT	10 minutos	
Paso 4* Incubación anticuerpo primario	1 hora	37° C. y en cámara húmeda
Paso 5 Lavado en PBSFT	2 x 10 minutos	
Paso 6* Lavado en PBSBT (bloqueante de marcado inespecífico)	2 x 10 minutos	
Paso 7* Incubación anticuerpo secundario	45 minutos	37° C. y en cámara húmeda
Paso 8 Lavado en PBSBT	4 x 10 minutos	
Paso 9 Lavado en agua bidestilada	3 x 5 minutos	
Paso 10 Lavado en agua bidestilada		Intensivo
Paso 11 Dejar secar	15 minutos	
Paso 12 Acetato de uranilo	15 minutos	
Paso 13 Lavado en agua bidestilada		Intensivo
Paso 14 Dejar secar	15 minutos	
Paso 15 Observar		

\*Paso 3: El PBSBT se prepara como se describe a continuación:

CFS (Calf Foetal Serum)  
 (Suero Fetal de Ternera) ..... 0.25 ml.  
 PBS pH 7.4 + 0.1 % (v/v) Tween 20 ... 5 ml.

La disolución se realiza en frío, y agitando mínimamente para evitar la formación de espuma.

\*Paso 4: El anticuerpo primario es el monoclonal ya descrito anteriormente en este apartado (sobre secciones semifinas), en este caso disuelto en PBSFT en igual proporción (1/5).

\*Paso 6: La solución PBSBT se prepara como se describe a continuación:

BSA ..... 0.05 gr,  
 PBS pH 7.4 + 0.1 % (v/v) Tween 20 ... 5 ml.

Al igual que el PBSFT, la disolución se realiza en frío y sin agitación.

\*Paso 7: La segunda incubación se realiza con un suero policlonal anti-IgM de ratón, desarrollado en cabra, marcado con partículas de oro coloidal de 10 nm. y comercializado por Biocell. Este suero se diluye 1/30 en PBSFT.

El control utilizado en este caso ha sido el descrito anteriormente sobre secciones semifinas.

### III.2.I. HIBRIDACION "IN SITU" DE ACIDOS NUCLEICOS.

#### III.2.I.a. HIBRIDACION DE SONDA rRNA MARCADA CON BIOTINA SOBRE SECCIONES ULTRAFINAS. (Modificado de McFadden, G. I. y col. 1988)

Esta técnica se realiza sobre secciones ultrafinas de material especialmente tratado para hibridación "in situ" e incluido en LR-Gold (apartado III.2.B. c.) en rejillas de níquel u oro de 200 agujeros con película de formvar o pioloformo.

El procedimiento es similar al descrito para inmunocitoquímica sobre secciones ultrafinas, con los siguientes pasos:

Tratamiento	Tiempo	Condiciones
Paso 1* Digestión con proteinasa K	2 horas	37° C, y en cámara húmeda
Paso 2 Lavado en agua bidestilada	3 x 1 minuto	
Paso 3* Hibridación con la sonda rRNA	12 horas	50° C. en cámara de hibridación
Paso 4* 4xSSC	5 x 1 minuto	
Paso 5* 2xSSC	5 x 1 minuto	
Paso 6* 1xSSC	2 horas	37° C. y en cámara húmeda
Paso 7* Tampón SC	15 minutos	

Tratamiento	Tiempo	Condiciones
Paso 8* Tampón de bloqueo	15 minutos	
Paso 9* Incubación anticuerpo primario	1 hora	37° C. y en cámara húmeda
Paso 10 Lavado en tampón SC	5 x 1 minuto	
Paso 11* Incubación anticuerpo secundario	1 hora	37° C. y en cámara húmeda
Paso 12 Lavado en tampón SC	5 x 1 minuto	
Paso 13 Lavado en agua bidestilada	5 x 1 minuto	
Paso 14 Dejar secar	15 minutos	
Paso 15 Acetato de uranilo	10 minutos	
Paso 16 Lavado en agua bidestilada		Intensivo
Paso 17 Dejar secar	15 minutos	
Paso 18 Observar		

Todos los tratamientos hasta el inmunomarcado han de realizarse en condiciones de semisterilidad, utilizando pipetas, viales, etc. estériles, y manipulando todo con guantes de látex para evitar la acción de RNAsas bacterianas, ubicuas y muy activas. Todas las soluciones además deben pretratarse con un inhibidor de RNAsas (DEPC: Di-Ethyl Piro Carbonate) que se añade al 0.1 % (v/v) a todas las soluciones. Posteriormente éstas se agitan durante 10 minutos, se mantienen 4 horas a 68° C. y se dejan en reposo 24 horas antes de ser usadas.

\*Paso 1: La preparación de la solución enzimática de proteinasa K se describe en el apartado II.2.E.d.

\*Paso 3: La sonda de rRNA ha sido donada por G.I. Mc Fadden del Plant Cell Biology Research Centre, University of Melbourne, Australia. Se trata de una sonda transcrita en un sistema "in vitro" a partir de un fragmento EcoRI/BamHI de 1 Kb del gen de rRNA 18S de *Pisum sativum* incluido en un plásmido pBluescript KS(+/-). Dicho plásmido posee dos lugares de restricción BamHI/EcoRI y su transcripción con T3 produce un RNA complementario (usado como sonda en hibridación "in situ") a la vez que su transcripción con T7 produce un RNA homólogo (usado como control de la hibridación). La sonda se marca introduciendo

un nucleótido marcado con biotina (bio-11-UTP, Sigma) en el sistema de transcripción "in vitro" (McFadden, G.I., 1989).

La concentración de sonda utilizada ha sido de aproximadamente 1 µgr./ml. en tampón de hibridación. El tampón de hibridación tiene la composición siguiente:

formamida.....	50	%	(v/v)
cloruro sódico.....	0.75	M	
citrate trisódico.....	0.3	M	
pirofosfato sódico.....	1	mM	
EDTA.....	5	mM	
Ficoll 400.....	0.1	%	(p/v)
PVP 40.....	0.1	%	(p/v)
BSA.....	0.1	%	(p/v)
DNA desnaturalizado de esperma de pez.....	10	mgr./ml.	

todo ello en tampón fosfato 50 mM pH 7.2.

La hibridación se lleva a cabo en una pequeña cámara con cierre hermético, que contiene dos bases de placa de Petri. En una de ellas se ponen unos 5 ml. de tampón de hibridación, y sobre la otra se colocan directamente gotas de 3 µl. de sonda, sobre las que se colocan las rejillas a hibridar. Como control se utilizan rejillas que se ponen a hibridar con RNA homólogo, o se incuban en tampón de hibridación únicamente.

\*Pasos 4,5 y 6: Las soluciones 4xSSC, 2xSSC y 1xSSC (SSC: Standar Saline Citrate) se preparan por dilución 1/5, 1/10 y 1/20 respectivamente de una solución 20xSSC (cloruro sódico 3M, citrate trisódico 0.3 M en tampón fosfato 0.5 M pH 7.2).

\*Paso 7: El tampón SC es PIPES 50 mM pH 7.2, cloruro sódico 0.5 M, Tween 20 0.5 % (v/v).

\*Paso 8: El tampón de bloqueo es BSA 1 % (p/v) disuelta a baja temperatura y sin agitación en tampón SC.

\*Paso 9: El primer suero es un suero policlonal anti-biotina (IgG), desarrollado en cabra, y comercializado por Vector Laboratories, diluido 1/20 en tampón SC.

\*Paso 11: El segundo suero es un suero policlonal anti IgG de cabra, desarrollado en ratón, marcado con oro coloidal de 10 nm., y comercializado por Biocell, en dilución 1/25 en tampón SC.

### III.2.J. MICROSCOPIA ELECTRONICA DE BARRIDO.

#### III.2.J.a. PREPARACION DE MEIOCITOS PARA SU ESTUDIO AL M.E.B. CON RUPTURA DE CUBIERTAS.

Las anteras se fijaron en glutaraldehído 3 % en tampón cacodilato sódico 0.025 M, y se postfijaron en tetróxido de osmio 2 % según el procedimiento descrito para preparación de muestras para estudio ultraestructural (III.2.B.a).

Posteriormente las muestras se sometieron a punto crítico y se introdujeron en nitrógeno líquido, donde fueron fracturadas usando una cuchilla para poder observar el interior de la antera.

Por último, los fragmentos de las anteras se cubrieron con una película de oro-paladio y se observaron en un microscopio ZEISS mod. DSM 950.

### III.2.K. MORFOMETRIA.

#### III.2.K.a. DETERMINACION DE DENSIDAD DE PARTICULAS.

El recuento de partículas se realizó manualmente, contando las partículas presentes en un determinado compartimento, sobre fotomicrografías electrónicas siempre de los mismos aumentos (generalmente 10.000 x). Posteriormente, la superficie de dicho compartimento se determinó mediante un analizador semiautomático M.O.P. de KONTRON, para obtener la densidad de partículas en relación a superficie.

En el caso del análisis de densidad de partículas de oro en el marcado con lectina WGA (apartado II.2.G.b.) se utilizaron tres fotos de las características indicadas, elegidas al azar de

cada una de las tres rejillas sobre las que se realizó el marcado en una de las experiencias. A partir de ellas se determinó la densidad media de partículas en cada uno de los compartimentos a estudiar así como la desviación estándar, y se realizó el estudio estadístico que se indica en el apartado correspondiente.

### III.2.L. DIFRACTOMETRIA OPTICA

#### III.2.L.a. DIFRACTOMETRIA OPTICA EN CRISTALES INTRANUCLEARES.

Se utilizaron varios negativos de micrografías a MET bajo elevados aumentos, que fueron observados usando un difractómetro óptico para discriminar el grado de ordenación de los cristales. Este grado de ordenación se hace patente según el número de puntos o manchas de difracción que aparecen en el plano focal posterior de una lente positiva colocada en frente o detrás del negativo.

### III.2.M. TECNICAS BIOQUIMICAS.

#### III.2.M.a. AISLAMIENTO DE CUERPOS PROTEICOS A PARTIR DE HOJAS Y ANTERAS DE OLIVO. (Modificado de Huang, A.H.C., 1985).

##### PREPARACION DE HOMOGENADOS

El proceso se realizó en frío, a una temperatura entre 0 y 4° C. Las hojas de olivo se recolectaron y lavaron repetidas veces en agua y finalmente en agua destilada. Tras secarlas, se les eliminó el nervio central y fueron troceadas hasta completar un peso total de 5 gr. Los fragmentos de hojas se mantuvieron macerando a 4° C. durante una noche en 10 ml. (relación 1:2 p/v) de medio de extracción que contenía tricina KOH 0.15 M, sacarosa 0.4 M y EDTA 1 mM, pH 7.5

A continuación se homogeneizaron usando un mortero de vidrio, añadiendo una pequeña cantidad de arena de cuarzo. El homogenado se filtró a través de dos capas de entretela previamente a su centrifugación.

Mediante el mismo procedimiento se preparó otro homogenado de anteras de olivo en la misma proporción (5 gr. de anteras + 10

ml. de medio de extracción). Dichas anteras se obtuvieron por disección de flores de olivo en diversos estadios, mantenidas a  $-20^{\circ}$  C. desde su recolección, varios meses atrás.

#### ULTRACENTRIFUGACION EN GRADIENTE DE SACAROSA

Cinco mililitros de los homogenados se depositaron independientemente sobre dos tubos de centrifuga que contenían un gradiente discontinuo de sacarosa con la siguiente composición:

65	%	(v/v)	.....	5	ml.
60	%	(v/v)	.....	7	ml.
51	%	(v/v)	.....	6	ml.
42	%	(v/v)	.....	6	ml.
35	%	(v/v)	.....	3	ml.
20	%	(v/v)	.....	3	ml.

Las soluciones de sacarosa se preparan en tampón MB (...).

Los gradientes se centrifugaron a 21.000 r.p.m. durante 4 horas a  $4^{\circ}$  C. en una ultracentrifuga BECKMAN mod. L 70 usando un rotor basculante mod. SW-28.

#### FRACCIONAMIENTO DEL GRADIENTE DE SACAROSA

Tras la ultracentrifugación, el gradiente fue eluido desde la parte superior mediante arrastre con una solución de sacarosa del 66 % (p/p) utilizando un fraccionador de gradientes ISCO mod. 185.

La muestra se eluyó en volúmenes de 1.5 ml. de cada uno de los cuales se registró su transmitancia a 280 nm. en una unidad óptica ISCO mod. UA-S.

#### III.2.M.b. DETERMINACION CUANTITATIVA DE PROTEINAS.

La determinación cuantitativa del nivel de proteínas presente en cada fracción obtenida se realizó según el método de Bradford, M. (1976). Para ello se elaboró una solución madre de

BSA (600  $\mu\text{gr./ml.}$  en agua destilada), de la que se tomaron 2, 5, 10, 20 y 40  $\mu\text{l.}$  y se mezclaron con 5 ml. de reactivo azul Coomassie G preparado previamente (Sandalo, L.M., 1987) para elaborar una curva patrón.

De igual modo se mezclaron (con 5 ml. de reactivo azul Coomassie) 20  $\mu\text{l.}$  de cada una de las fracciones a determinar, y se realizó una medida de densidad óptica a 595 nm. Dicha medida se efectuó en un espectrofotómetro BECKMAN mod. DU-7 en el intervalo de tiempo entre 5 minutos y 1 hora después de la adición del reactivo.

Con los datos de concentraciones de BSA de la curva patrón y sus correspondientes valores medidos de densidad óptica se estableció una recta de regresión, en la cual se interpolaron los valores de concentración de proteínas presentes en cada una de las fracciones, a partir de sus valores medidos de densidad óptica.

### III.2.M.c. DETERMINACION DE LA DENSIDAD POR REFRACTOMETRIA OPTICA.

La densidad de las fracciones procedentes del aislamiento en gradiente de sacarosa se determinó a partir de medidas de refractometría a temperatura ambiente, utilizando un refractómetro de mano ATAGO modelo 500, con capacidad para medir concentraciones en el rango 0-90 % (p/p). En soluciones de sacarosa, los porcentajes obtenidos por refractometría se transforman en densidad ( $\text{gr./cm}^3$ ) utilizando las "International Critical Tables" (Griffith, O.M. 1983).

### III.2.M.d. ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA

Las muestras para electroforesis se prepararon del siguiente modo:

Tampón fosfato	50 mM	pH 7.8	.....	50 $\mu\text{l.}$
Fracción del aislamiento			.....	100 $\mu\text{l.}$
Azul de bromofenol	2 %		.....	10 $\mu\text{l.}$
Sacarosa			.....	50 mgr. aprox.

La electroforesis se realizó en geles cilindricos de acrilamida 6.86 % (p/v), bis-acrilamida 0.36 % (p/v), DAP (Dimetil Amino Propionitrilo) 0.8 % (v/v) y persulfato amónico 0.26 % (p/v) en tampón Tris-ClH 377 mM, pH 8.9.

El desarrollo de la electroforesis (100 µl. de muestra en cada gel), se realizó en una cubeta HAACKEBUCHLER mod. "Polyanalyst", a 25° C. En primer lugar se aplicó un prerecorrido de 30 minutos con una intensidad de 3 mAmp./gel (500 V.) y posteriormente se incrementó dicha intensidad hasta 4.5 mAmp./gel (500 V.) durante el recorrido, el cual se prolongó hasta que el frente se localizó próximo al extremo anódico. Como tampón de electrodos se utilizó una solución...

Los geles se revelaron durante una hora y 30 minutos en una solución de azul Coomassie G 250 al 0.04 % (p/v) en HClO<sub>4</sub> 3.5 % (v/v) agitando frecuentemente, y finalmente se lavaron en ácido acético 5 % hasta la desaparición del color azulado de fondo.

### III.2.N. TECNICAS FOTOGRAFICAS.

#### III.2.N.a. FOTOMICROGRAFIA EN MICROSCOPIA OPTICA Y DE FLUORES-CENCIA.

Para realizar las fotografías se utilizó indistintamente un microscopio ZEISS Standard equipado con una cámara mod. M35, y un exposímetro MC-63, o un microscopio ZEISS Axioplan equipado con un sistema de fotografía MC-100.

La película utilizada en ambos casos ha sido Kodak Ektachrome 160, diapositivas para tomas en color, equilibrada para luz de tungsteno, y Kodak Technical pan film 2415 para tomas en blanco y negro.

La primera película se expuso en modo automático fijando 160 ASA en el exposímetro bajo un índice de reciprocidad 5, con saturación máxima del filamento, y la segunda película se expuso a 100 ASA, con índice de reciprocidad 3, y no necesariamente con saturación máxima del filamento. El revelado de esta última película se realizó manualmente así como el positivado, éste último sobre papel fotográfico Ilford de varias gradaciones.

Para las tomas de fotografías de fluorescencia, la lectura del exposímetro se modificó generalmente subexponiendo en un factor +1 ó +2 según criterio personal.

### III.2.N.b. FOTOMICROGRAFIA EN MICROSCOPIA ELECTRONICA

Para la obtención de fotografías se utilizaron placas "Dupont" o Kodak Electron Microscope Film 4489, para M.E.T. e Ilford FP4 para M.E.B., que se revelaron manualmente. El positivado (manual igualmente) se realizó sobre papel Ilford de diversas gradaciones.

IV. RESULTADOS.

