

El uso de la Histología en los sistemas de Cultivo in Vitro de tejidos

Dra. Ana Maria Gonzalez – ana@unne.edu.ar
2006

Microtécnica vegetal

Uno de los principales objetivos o propósitos de una investigación anatómica es realizar el estudio de los eventos ontogenéticos y los cambios estructurales que se suceden durante el crecimiento desde el explante hasta el material adulto.

Citaremos a continuación algunos procedimientos básicos que deben tenerse en cuenta para la preparación de tejidos cultivados in Vitro para llevar a cabo un estudio histológico. Partimos de la base que se pueden realizar dos tipos de análisis, con microscopía óptica y electrónica de barrido. Por razones obvias son se describen aquí las técnicas de microscopía electrónica de transmisión.

Las técnicas de rutina empleadas en anatomía vegetal incluyen tres actividades básicas:

- Preparación de los tejidos vegetales para su estudio microscópico
- Observación y registro de las imágenes
- Aprendizaje del uso correcto de los equipos necesarios para ello: micrótomos, microscopio, cámaras fotográficas, etc.

Microscopía Óptica

Toma de muestras

Es necesario realizar observaciones cuidadosas de los cambios en el explante para conocer con exactitud el material a trabajar. Esta información permite identificar el área de actividad donde el anatomista debe enfocarse para la preparación de la muestra y su posterior análisis.

En la planificación del estudio anatómico del material cultivado in Vitro es importante estimar el número de explantes necesarios, lo que depende del número de ejemplos puntuales a analizar. Los cambios pueden ocurrir inmediatamente de colocar el explante en el medio de inducción. Si no se conoce el timing de los procesos, lo más conveniente es realizar el muestreo a medida que se observan los cambios. Por cada cambio detectado se deben extraer un mínimo de 5 muestras, según algunos autores el mínimo es 10. Debe incluirse el tratamiento control.

Fijación

Consiste en detener los procesos metabólicos y estabilizar los componentes celulares. Es tal vez el paso más importante de todo el proceso. El material debe ser sacado del medio de cultivo o de la planta y fijado al mismo tiempo.

Un procedimiento a tener en cuenta durante la fijación es un correcto seccionamiento del explante, en especial si éste es de tamaño considerable. La reducción del material permite acelerar la penetración del fijador, a la vez que permite orientar el material para el tipo de corte deseado. Tener un exceso de tejidos alarga el procedimiento, tanto en tiempo como en recursos.

El volumen del fijador elegido debe ser de 10 veces el del material. La elección del fijador está en relación directa al tipo de procesamiento posterior: microscopía óptica o electrónica. Para microscopía óptica, utilizando inclusión en parafina, el fijador más usual es:

FAA: Formol - Alcohol - Ac. Acético	
Alcohol 70% (ó 50%)	90 ml
Formol	5 ml
Ac. Acético	5 ml

Inclusión

Este procedimiento le confiere al material la resistencia al impacto de la navaja del micrótopo, a la vez que mantiene las diversas partes del material siempre en la misma posición entre sí. El método más usual es la inclusión en parafina o sustitutos comerciales (Paraplast R, Parawax R, etc.)

Este medio de inclusión permite la obtención de cortes seriados, esenciales para este tipo de estudios histológicos, mediante éste tipo de cortes se puede reconstruir tridimensionalmente la forma del explante cortado. Su costo es relativamente bajo, tanto en recursos como en equipamiento. Es el método más conveniente para grandes explantes. En la literatura hay numerosos protocolos disponibles.

El proceso de inclusión en parafina involucra tres etapas:

I. Deshidratación

La parafina es insoluble en agua, por lo que ésta debe ser removida de los tejidos antes de su inclusión. El proceso consiste en el pasaje del material por una serie gradual y ascendente del agente deshidratante. La serie puede ser en base a alcohol butílico (Johansen, 1940) o con deshidratantes de uso comercial (González & Cristóbal, 1997), los cuales son de menor costo y evitan el endurecimiento de los tejidos. El tiempo de permanencia de cada muestra depende del tamaño de la misma y su grado de cutinización. Como orientación se sugieren los siguientes tiempos:

	Meristemas/ tejidos adultos	Callos jóvenes
Deshidratante BIOPUR R I	15 m	30
Deshidratante BIOPUR R I	15 m	30
Deshidratante BIOPUR R III	15 m	30
Deshidratante BIOPUR R IV	15 m	30
Deshidratante BIOPUR R V	15 m	30
Alcohol absoluto terciario I	1 hs.	2 hs.
Alcohol absoluto terciario II	8 hs.	8 hs.
1:1 de ABT y Aceite de parafina	12 hs.	

II. Infiltración

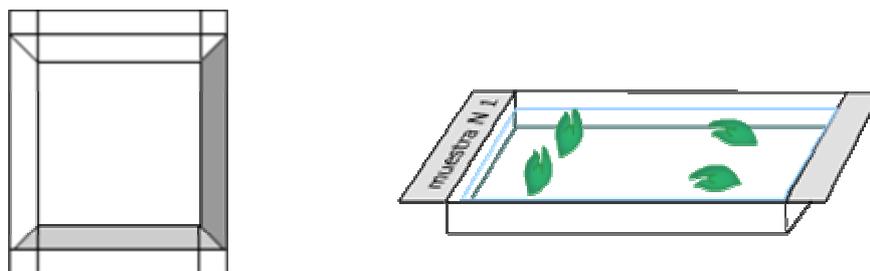
El material se pasa a parafina fundida, cambiándose la misma dos veces a fin de eliminar toda traza de los deshidratantes. Esta etapa del proceso se realiza en estufa a 60° a fin de mantener la parafina fundida. El tiempo de inclusión debe ser suficiente como para que la parafina penetre en todo el tejido, y depende del tamaño del material procesado. En general son suficientes dos pasos de 8-10 hs cada uno.

	Meristemas/ Callos jóvenes	tejidos leñosos
PARAFINA I	10 hs	12-16 hs
PARAFINA II	10 hs	12-16 hs

III. Inclusión

El material es ubicado en cajas confeccionadas de papel encerado, de metal o plásticas especiales para este fin. Se realiza sobre placa caliente a fin de trabajar en parafina fundida. La ubicación correcta del material es el punto clave para el tipo de corte a realizar, la obtención de un corte longitudinal medio perfecto o de un corte transversal que no esté inclinado depende de la habilidad en este procedimiento. Las pinzas o agujas que se usan para manipular el material dentro de la parafina fundida deben ser calentadas con un mechero para que estén a la misma temperatura de la parafina.

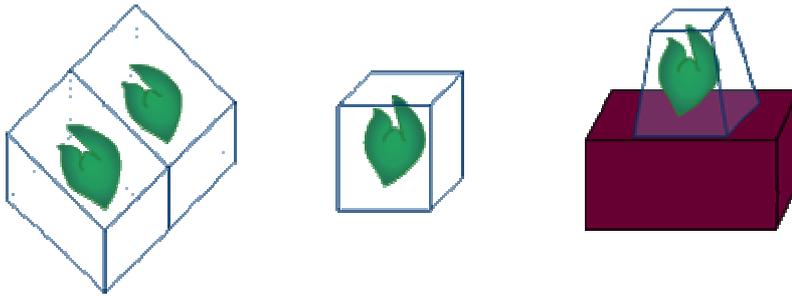
El material debe colocarse en las cajas en líneas rectas, que permitan su posterior separación. Debe estar correctamente rotulado.



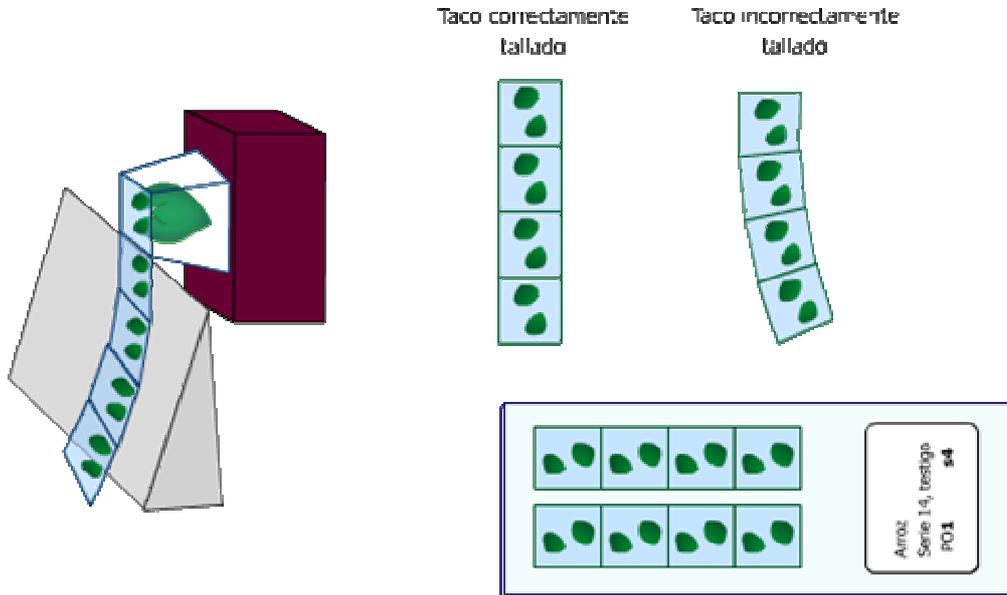
Plantilla para la confección de cajas para inclusión

Corte y Montaje

Los materiales incluidos en parafina pueden permanecer en este medio casi indefinidamente, siendo una buena forma de almacenamiento. Las muestras se deben separar, usando para ello un bisturí al cual se le calienta la hoja. Cada material debe ser preparado antes de fijarse al soporte del micrótom, para ello los lados del cubo de parafina deben ser lo mas paralelos posibles, de ello dependerá que las tiras de parafina salgan derechas.



Los micrótomos más usuales son los rotativos, donde el taco de material permanece fijo y es la cuchilla la que sube y baja. Los micrótomos actuales trabajan con cuchillas descartables que no precisan ser reafiladas. Este tipo de micrótomos es graduable entre 3 y 30 μm para el espesor de los cortes, el tejido vegetal se corta bien a 8-10 μm . La ventaja de este equipo es que cada corte se pega al anterior formándose una cinta.



La cinta se corta $\frac{1}{2}$ cm más pequeña que el cubreobjetos a usar, los más recomendables son de 24 x 60 mm. El portaobjetos se cubre con una delgada capa de adhesivo (Haupt, adhesivo comercial, etc.) luego se coloca solución de formaldehído al 2% en la cual se acomodan las cintas, las que deben flotar. Con extremo cuidado de que el agua no caiga del portaobjetos se coloca sobre una plancha caliente a 50° a fin de estirar las arrugas de las cintas producidas por la cuchilla del micrótomos. Se elimina del exceso de agua, se rotulan con una punta para escribir en vidrio (no usar fibras para escribir sobre vidrio, ya que esta tinta se

diluye con el alcohol) y se dejan secar como mínimo 24 hs antes de colorear.

Coloración

La elección de/del colorante depende del tipo de estudio a realizar. Siempre es preferible una doble coloración, lo que permite la diferenciación de las células de acuerdo a su afinidad por los distintos colorantes. El procedimiento involucra la remoción de la parafina y su rehidratación hasta alcohol 50°, solución en la que usualmente están los colorantes y una nueva deshidratación hasta xilol, que es el paso previo a la adhesión del cubreobjetos con bálsamo de Canadá sintético.

Existen numerosas combinaciones de colorantes, a continuación se detalla la planilla de coloración con SAFRANINA - ASTRA BLUE (Luque et. Al, 1996) la cual ha dado excelentes resultados.

	Tiempo
XIOL I	10
XIOL II	10
ALCOHOL ABSOLUTO: XILIOI (1:1)	5
ALCOHOL ABSOLUTO	5
ALCOHOL 96	5
ALCOHOL 70	5
ALCOHOL 50	5
SAFRANINA	30 m-12 hs
Lavar con agua hasta que salga limpia	
ASTRA BLUE	30 s-1 m
Lavar con agua hasta que salga limpia	
ALCOHOL 50	5
ALCOHOL 70	5
ALCOHOL 96	5
ALCOHOL ABSOLUTO	5
ALCOHOL ABSOLUTO: XILOL (1:1)	5
XIOL I	10
XIOL II	10
Montar en bálsamo de Canadá sintético	

Safranina: colorea de rojo las paredes lignificadas y cutinizadas, cromosomas y nucleolo.

El **azul de astra** tiñe paredes celulósicas y citoplasma.

MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO

La utilidad de este equipo es similar a la de un microscopio estereoscópico (lupa) en el sentido que permite la observación de la superficie y permite una visión tridimensional de los objetos, pero su poder de resolución, profundidad de campo y capacidad de magnificación hasta 300.000 aumentos lo hacen una herramienta incomparable. El material cultivado in Vitro requiere una preparación muy cuidadosa para su observación en el MEB. Este material preparado debe cumplir con tres requisitos:

- tener estabilidad mecánica: la resolución del MEB esta entre 25-10 mm, por lo que pequeños movimientos dañarán la imagen. El material debe estar firmemente unido al porta muestras.
- estar completamente deshidratados
- tener una conductividad efectiva a tierra de los electrones absorbidos, a fin de evitar fenómenos de carga.

Fijación

Si bien algunos materiales funcionan bien fijados en FAA, lo más recomendable es la fijación en glutaraldehído al 3 % en solución buffer (cacodilato de sodio, fofato buffer, etc.) a pH 7,2. La fijación debe realizarse a 4° C, por 4-6 hs. Si debe detenerse el proceso se puede conservar una semana en la solución buffer en la heladera.

Deshidratación

El material a observarse en el MEB debe estar completamente deshidratado, ya que la cámara del MEB se encuentra en alto vacío. Si el material contiene agua, ésta se evaporará y causaría graves daños tanto a la columna del microscopio como a los tejidos por su rápida evaporación.

Luego de la fijación, el material debe lavarse un par de veces en la solución buffer y deshidratarse en serie ascendente de acetona. Lo más recomendable es comenzar en acetona 30% y pasar por soluciones al 40, 50, 60, 70, 80, 90% hasta llegar a acetona pura. En cada solución el material debe permanecer 15 minutos. Al menos dos cambios sucesivos deben hacerse en acetona 100%. Estos solventes no pueden volver a ser utilizados.

Secado a Punto Crítico

Mediante este procedimiento, el técnico operador del MEB, reemplaza la acetona gradualmente por CO₂, el material se coloca dentro de una cámara especial donde al subir la temperatura, gradualmente se eleva la presión del CO₂. Cuando la presión supera las 1200-1400 lb/"², es decir supera la presión crítica del CO₂ (1100 lb/"²) el CO₂ pasa a fase gaseosa y el material se seca con una mínima distorsión.

Montaje y Metalización (Sputtering)

El material seco debe acondicionarse en el porta muestras del MEB y cubrirse con una delgada capa de metal pesado (oro, oro/paladio, platino) a fin de que el material sea conductivo a la corriente de electrones del MEB. La capa usualmente tiene un espesor de 100-300 Å.

BIBLIOGRAFÍA

- Feder, N & T.P. O'Brien. 1968. Plant micrtechnique: some principles and new methods. Amer. J.Bot 55:123-142.
- Foster, A.S. 1934. The use of tannic acid and iron chloride for staining cells walls in meristematic tissue. Stain. Technol. 9:91-92.
- González A.M. & Cristóbal C.L. 1997, Anatomía y ontogenia de semillas de *Helicteres Lhotzkyana* (Sterculiaceae). Bonplandia 9:287-294
- Johansen, D.A. 1940. Plant Microtechnique. McGraw Hill Book Co. New York. 511 págs.
- Luque, R.; Sousa, H.C. & Kraus, J.E. 1996. Métodos de coloracao de Roesse (1972) – modificado – e Kropop (1972) visando a substituzo do azul de astra por azul de alcito 8 GS ou 8 GX. Acta bot. Bras. 10(2): 199-212.
- Yeung, E. 1999. The use of histology in the study of plant tissue culture systems –some practical comments. In vitro Cell. Dev. Biol. Plan 35: 117-143.

FORMULACIONES

Safranina (Johansen, 1940)

Safranina.....	1 gr
Metil cellosolve	50 ml
Etanol 96°	25 ml
Formol (37%)	2 ml
Acetato de sodio	1 gr

Astra blue (Luque et al, 1996)

Astra blue	0,5 gr
Etanol 50%	100 ml

Adhesivo de Haupt (Johansen, 1940)

Gelatina.....	1 gr
Fenol	2 gr
Glicerina	15 ml
Agua destilada.....	100 ml

Disolver la gelatina en agua a 30°, agregar los restantes componentes, agitar y filtrar en caliente.