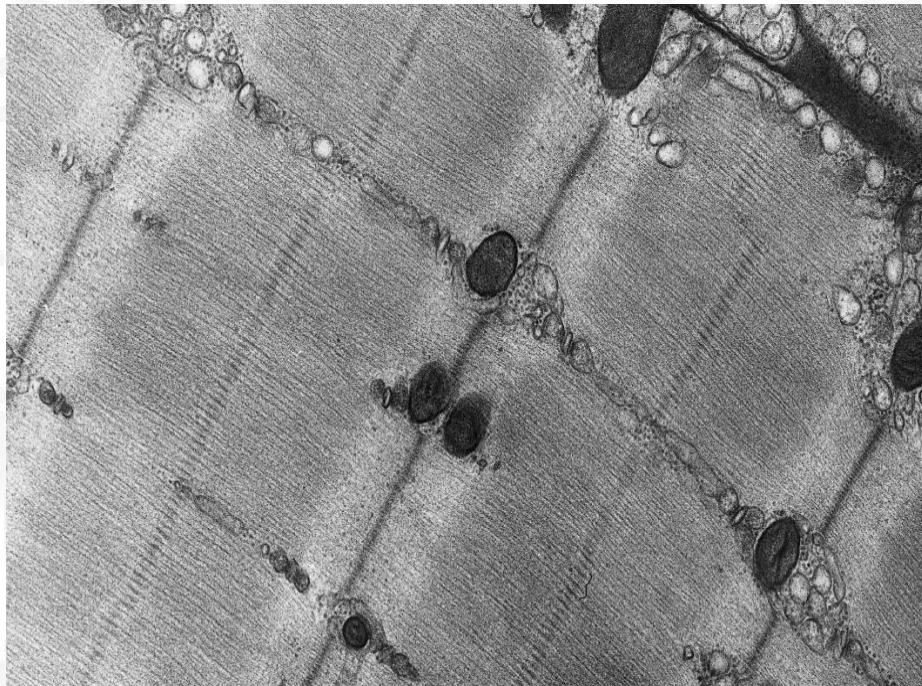


# **TRABAJO FIN DE GRADO**

## **BIOLOGÍA**

**Técnicas de inmunomarcaje a nivel ultraestructural**

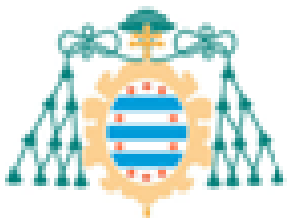
**Immunolabeling techniques at the ultrastructural level**



**Judith García Cabrero**

Departamento de Morfología y Biología Celular

Julio 2015



**UNIVERSIDAD DE OVIEDO**  
**FACULTAD DE BIOLOGÍA**



## Resumen

La necesidad de los investigadores por encontrar el método más adecuado para observar la estructura celular y tisular no ha dejado de aumentar desde la invención del primer microscopio óptico a principios del siglo XVII. Además, el interés por marcar una zona concreta de la muestra ha sido el origen de las técnicas actuales de inmunomarcaje. Por otro lado, las limitaciones del microscopio óptico condujeron a la invención de la microscopía electrónica.

En este trabajo se recogen las características, ventajas e inconvenientes de un conjunto de técnicas que son compatibles con el inmunomarcaje y permiten la observación ultraestructural de las muestras biológicas con el microscopio electrónico. Aunque el orden de las etapas es distinto en cada uno de los métodos, todos ellos incluyen la fijación, el marcaje, el seccionamiento y la visualización del tejido.

Por un lado, los principales métodos convencionales son preinclusión y postinclusión, mientras que por el otro, se comentan un conjunto de alternativas basadas en la congelación de la muestra. Entre estas últimas estrategias existe una gran variedad de combinaciones en las que se relacionan diferentes técnicas. Así, en algunas se lleva a cabo la criofijación de la muestra, mientras que en otras se incluye la misma en resina.

Para el inmunomarcaje a nivel ultraestructural es aconsejable utilizar partículas de oro como marcador, ya que son muy electrodensas y pueden adaptarse a diferentes condiciones según el tipo de estudio. El inmunomarcaje con oro también puede ser aplicado a microscopía óptica, de manera que se pueden aprovechar las ventajas de ambos tipos de microscopios para facilitar el estudio de las muestras.

## Abstract

The need of researchers to find out the better method to examine the tissue and cellular structure has not stopped growing since the first light microscope discovery in the early 17<sup>th</sup> century. Furthermore, the interest to stain a specific region of the specimen has been the origin of current immunolabeling techniques. Light microscope limitations led to the invention of electron microscopy.

This work collects the features, advantages and pitfalls of several techniques that are compatible with immunolabeling and allow observing the sample at ultrastructural level under the electron microscope. Although the order of steps varies with each method, all of them include tissue fixation, labeling, sectioning and analysis. Nevertheless, embedding in resin is only performed in basic methods due to artefacts generated by this step, which will affect the quality of the final image.

On one hand, the main basic techniques are pre-embedding and post-embedding, while on the other hand, there are a group of alternatives methods based on freezing of the sample. Among these strategies there is a broad variety of combinations that related different techniques. In this way, some of them involve the cryofixation of the sample, while in others the sample is included in resin.

It is recommended to use gold particles as markers for immunolabeling at ultrastructural level because they are sufficiently electron-dense and can adapt to different requirements according to the type of study. Immunogold labeling can also use for light microscopy. In this way, researchers can take advantage of both type of microscopes to make easier the study of samples.

## Índice

|   |    |
|---|----|
| 1. Introducción.....  | 4  |
| 2. Objetivos.....   | 5  |
| 3. Fijación química.....  | 6  |
| 4. Medio de inclusión.....  | 8  |
| 5. Soluciones de bloqueo.....   | 9  |
| 6. Método de postinclusión.....   | 9  |
| 7. Método de preinclusión.....  | 9  |
| 8. Alternativas a las técnicas básicas.....                               | 10 |
| 8.1. Criofijación.....  | 11 |
| 8.1.1. Congelación por inmersión.....                                     | 11 |
| 8.1.2. Congelación a alta presión.....                                    | 12 |
| 8.1.3. Congelación rápida autopresurizada.....                            | 12 |
| 8.2. Criosustitución.....   | 13 |
| 8.3. Método de Tokuyasu.....  | 13 |
| 8.4. Técnicas híbridas.....   | 14 |
| 8.4.1. Método de rehidratación.....                                       | 14 |
| 8.4.2. Secciones congeladas vitrificadas.....                             | 15 |
| 8.4.3. Fijación química de secciones vitrificadas.....                    | 15 |
| 8.4.4. Inmunomarcaje mejorado para microscopía electrónica integrada..... | 16 |
| 8.5. Criofractura.....  | 16 |
| 9. Inmunomarcaje con partículas de oro.....                               | 17 |
| 9.1. Oro coloidal.....  | 17 |
| 9.2. “Clústeres” de oro.....  | 19 |
| 9.3. Intensificación con sales de plata.....                              | 20 |
| 9.4. Marcaje doble.....   | 21 |
| 10. Observación a microscopía electrónica.....                            | 21 |
| 11. Microscopía óptica y electrónica.....                                 | 22 |
| 12. Discusión.....  | 23 |
| 12.1. Métodos básicos y alternativas.....                                 | 24 |
| 12.2. Inmunomarcaje.....  | 26 |

|                                     |    |
|-------------------------------------|----|
| 12.3. Conclusiones.....             | 26 |
| 13. Referencias bibliográficas..... | 27 |

### **Abreviaturas de uso frecuente**

|      |   |
|------|---|
| Ac   | Anticuerpo (s)  |
| Ag   | Antígeno (s)  |
| Ig   | Inmunoglobulina   |
| CLEM | Microscopía óptico-electrónica                                      |
| EM   | Microscopía electrónica   |
| FM   | Microscopio de fluorescencia  |
| FRIL | Inmunomarcaje con oro para réplicas de superficies crio fracturadas |
| FS   | Criosustitución   |
| HPF  | Congelación a alta presión  |
| IEM  | Inmunomarcaje a microscopía electrónica                             |
| iLEM | Microscopía electrónica integrada                                   |
| LM   | Microscopía óptica  |
| PBS  | Tampón fosfato salino   |
| PF   | Congelación por inmersión   |
| ROI  | Región de interés   |
| SPRF | Congelación rápida autopresurizada                                  |
| TEM  | Microscopía electrónica de transmisión                              |

## 1. Introducción

La inmunocitoquímica es una técnica cuyo principio se centra en la identificación de un constituyente celular o tisular por medio de reacciones antígeno-anticuerpo (Ag-Ac), que pueden visualizarse tanto a LM (del inglés *light microscopy*, microscopía óptica) como a EM (del inglés *electron microscopy*, microscopía electrónica). Para ello, esos Ac se conjugan, directa o indirectamente, con uno o varios marcadores con el fin de localizar con la mayor precisión posible el epítipo diana. El éxito de esta técnica depende del mantenimiento de la antigenicidad, la capacidad de los Ac de penetrar en la célula y, finalmente, del reconocimiento específico entre los Ag y los Ac primarios. Además, se requiere una adecuada manipulación de las muestras, la cual incluye la fijación, la selección apropiada de una resina de inclusión y la disponibilidad de los Ac específicos para las moléculas que se quieren localizar. Finalmente, se debe tener en cuenta que es necesario conseguir un equilibrio entre la preservación antigénica y la observación morfológica adecuada (Griffiths, 1993).

La introducción de la EM en los años 70 ha facilitado el estudio, tanto estructural como funcional, de las células y tejidos a un nivel de resolución totalmente novedoso. Así, se presentan dos estrategias generales compatibles con el inmunomarcaje a nivel ultraestructural (Fig. 1). En primer lugar, para buscar Ag intracelulares se pueden aplicar tres protocolos distintos: postinclusión tras la inclusión en resinas acrílicas, crioultramicrotomía y, por último, preinclusión. En segundo lugar, para localizar proteínas de superficie celular, el protocolo de marcate más conveniente se basa en la preinclusión, ya que los Ag y la ultraestructura se preservan correctamente (De Paul et ál., 2012).

La preparación básica del material biológico para su observación a EM implica, independientemente del orden, la fijación química, la deshidratación, la inclusión en resinas, el inmunomarcaje, el seccionamiento, el montaje en un soporte adecuado y la observación (Hurbain y Sachse, 2011). Algunas de etapas pueden introducir diferentes artefactos que afecten a la ultraestructura de la muestra y limiten su resolución (Studer et ál., 2008). Por esta razón, se han desarrollado diferentes alternativas basadas en la congelación de la muestra.

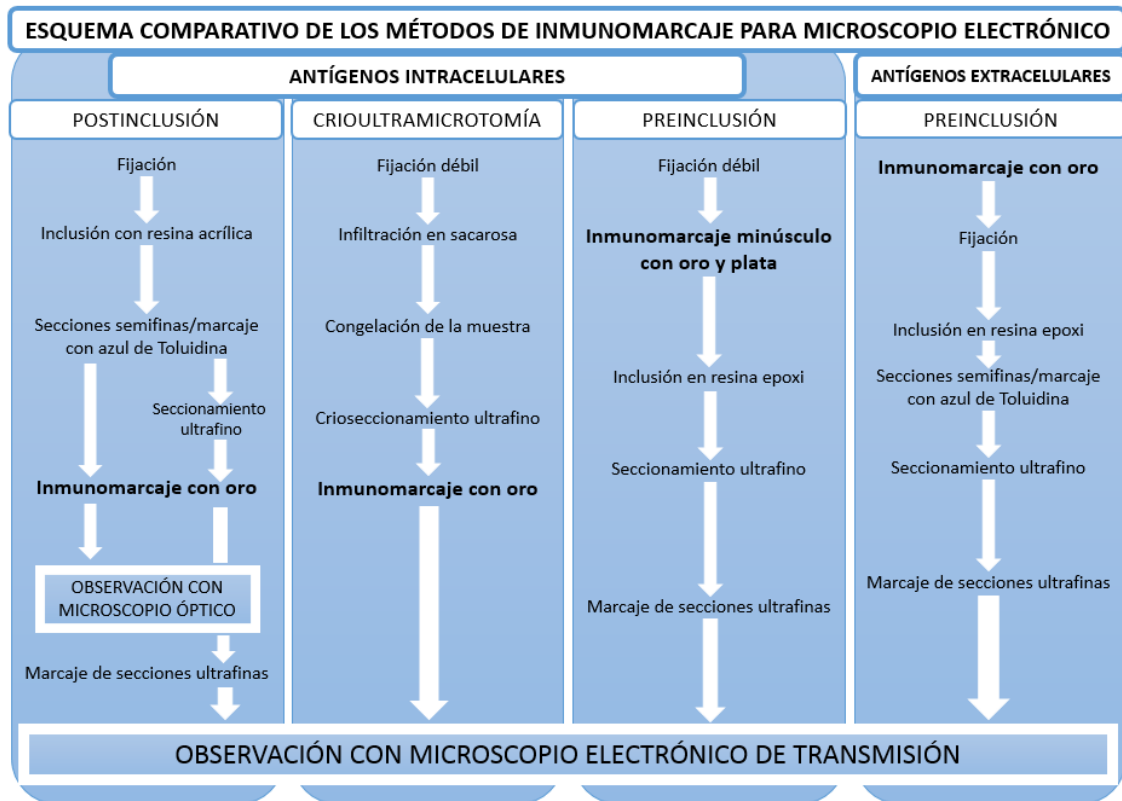


Fig. 1. Diferentes métodos de inmunomarcaje para detectar Ag intracelulares y superficiales (modificado de De Paul et ál., 2012).

Para el marcaje a EM se requieren partículas electrodensas, tales como ferritina, hierro-dextrano, uranio y oro. De entre todas las opciones disponibles, el inmunomarcaje con oro ha sido la elección más extendida (Amiry-Moghaddam y Ottersen, 2013) debido a que, mientras que la EM convencional no aporta información sobre moléculas concretas, el uso del primero proporciona una estructura visible con una localización y distribución *in situ* de las partículas en estudio a alta resolución. El oro en estado coloidal ha sido el marcador de preferencia durante mucho tiempo, pero actualmente se han desarrollado agrupaciones de átomos de oro más pequeñas llamadas “clústeres” (Hainfeld y Furuya, 1992). Además, se han diseñado varios métodos para intensificar la señal de oro, siendo las sales de plata las más utilizadas. Esa intensificación es necesaria sobre todo en el caso de usar partículas de oro de tamaños muy pequeños, ya que sin esta mejora serían indistinguibles a EM (Chen et ál., 2008).

## 2. Objetivos

Los objetivos del presente Trabajo Fin de Grado son los siguientes:

- 1) Llevar a cabo una búsqueda exhaustiva en la literatura científica sobre las técnicas existentes en cuanto a marcaje con Ac en microscopía electrónica.
- 2) Presentar las características generales de las técnicas, así como los fundamentos y las utilidades de las mismas.
- 3) Analizar y comparar los protocolos existentes con el fin de aportar una visión crítica de estas técnicas.
- 4) Finalmente, analizar y comentar detalladamente las ventajas y limitaciones de cada una de ellas en el contexto del análisis ultraestructural y también con respecto a las técnicas de inmunomarcaje a microscopía óptica.

### **3. Fijación química**

La fijación es un tratamiento que induce el cese de la actividad biológica, así como la inmovilización de las estructuras celulares y tisulares causando la mínima alteración posible, ya que se busca el máximo parecido con el estado vivo. Para llevar a cabo los estudios posteriores de inmunomarcaje, la fijación debe cumplir varios objetivos: la conservación y retención del Ag, la preservación tanto de la morfología tisular como de la inmunorreactividad del primero y el mantenimiento de una permeabilidad tisular apropiada tras la actuación de los reactivos. Por tanto, hay que tener en cuenta varios factores determinantes en el éxito de este procedimiento (Del Brío León y Riera Rovira, 1995):

- La rapidez de penetración del fijador.
- La inmunorreactividad en el tejido depende del mantenimiento de la estructura proteica, por lo que cualquier alteración en esta hará que disminuya la primera.
- La reactividad antigénica será mayor cuanto menos tiempo tarde el fijador en actuar.
- La temperatura de fijación.
- La preservación será mejor cuanto más próximo esté el pH del fijador al punto isoeléctrico de la molécula.
- Puede haber Ag secuestrados en compartimentos, los cuales son más resistentes que los citosólicos, ya que estos difunden fácilmente.
- Si la osmolaridad del fijador es baja, los enzimas lisosomales difunden provocando el hinchamiento del tejido, mientras que si es alta se produce su recogimiento.

Aunque hay muchos tipos de fijadores, la combinación más aceptada para microscopía inmunoelectrónica se basa en el uso de formaldehído y una baja concentración de glutaraldehído (Fig. 2). Las moléculas pequeñas, como el formaldehído, penetran con mayor rapidez que las grandes, como el glutaraldehído, pero concretamente este último tiene un mayor número de sitios de reacción. Así, el glutaraldehído produce más enlaces cruzados y estabiliza mejor los componentes celulares, aunque da lugar a una gran pérdida de inmunorreactividad. (Eldred et ál., 1983).

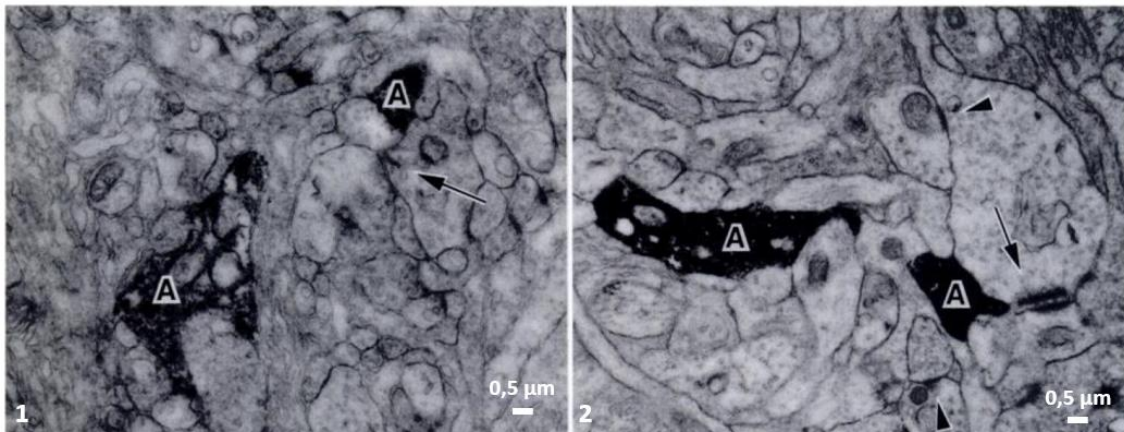


Fig. 2. Micrografías electrónicas de la capa plexiforme interna de la retina de tortuga preparada para la localización de la inmunorreactividad del péptido encefalina. En estas figuras el tejido fue tratado con una técnica de congelación-descongelación para mejorar la penetración, y ninguna fue teñida con metales pesados para permitir una correcta evaluación del mantenimiento de la inmunorreactividad en los dos tipos de fijación. Procesos de células amacrinias marcados (A). Contacto sináptico (flecha). (1) Retina fijada en 4% de paraformaldehído a pH 7,4 durante 24 h. Las membranas celulares están pobremente preservadas y se observan vacuolas u orgánulos dañados. (2) Retina fijada en 0,1% de glutaraldehído y 4% de paraformaldehído durante 60 min a pH 7,4 seguido de paraformaldehído al 4% pH 7,4 durante 24 h. Después de la fijación la muestra fue tratada con 1% NaBH<sub>4</sub> durante 30 min. El tejido está bien preservado con membranas y estructuras sinápticas claramente definidas. La inmunorreactividad es excelente y está bien localizada (modificado de Eldred et ál., 1983).

El tetróxido de osmio (Fig. 3) es un fijador muy fuerte que puede desnaturalizar y enmascarar los epítomos, por lo que al evitar su uso se mantiene la preservación antigénica. Sin embargo, si se desea obtener un buen contraste en la muestra es esencial el uso de este compuesto y, además, se aconseja emplearlo cuando la cantidad de Ag es grande. Si se desea usar el osmio, primero se deben desenmascarar las moléculas antigénicas mediante la incubación con un oxidante fuerte, como peróxido de hidrógeno, ácido peryódico y metaperyodato de sodio, para disolver el depósito de ese metal pesado (Hayat, 1991).



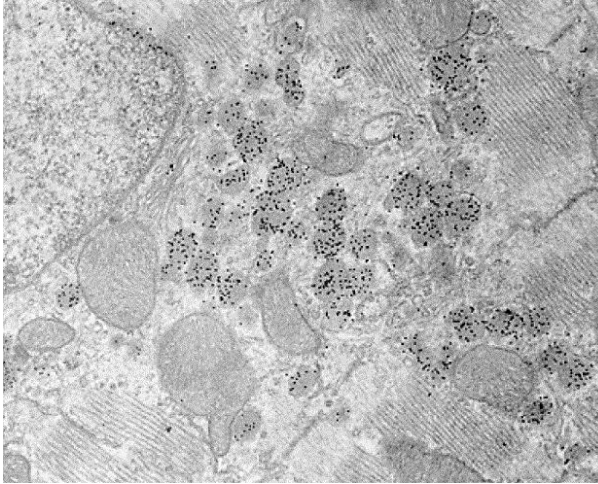


Fig. 3. Sección fina de la aurícula de rata preparada según el método de postinclusión: fijada con formaldehído y glutaraldehído, postfijada con tetróxido de osmio, incluida en resina *LR-White*, y grabada con peróxido de hidrógeno. Finalmente, inmunomarcaje del tejido con oro para identificar el ANP (del inglés *atrial natriuretic peptide*, péptido natriurético atrial) en los gránulos de secreción de los miocardiocitos (extraído de Maldonado et ál., 1986).

#### 4. Medio de inclusión

Las resinas epoxi se utilizan como medio de inclusión en la EM convencional, pero no son apropiadas para el inmunomarcaje a nivel ultraestructural porque son hidrofóbicas y para polimerizar necesitan altas temperaturas y una deshidratación extrema. Por esta razón, se desarrollaron las resinas acrílicas, más hidrofílicas y que reaccionan más rápido con la tinción acuosa básica, lo que las hace más adecuadas para esta técnica. Actualmente, las resinas acrílicas *LR-White* (Fig. 3) y *Lowicryl* son las más frecuentes porque conservan la reactividad bioquímica en las muestras aunque la estructura final es más pobre que la producida por la técnica de las resinas epoxi (Zuber et ál., 2005).

En primer lugar, *Lowicryl* polimeriza a bajas temperaturas, una ventaja ya que favorece la preservación antigénica, aunque para ello se necesita una cámara especial bajo luz ultravioleta a  $-30^{\circ}\text{C}$ , condición que es muy tóxica. Por ello, se aconseja emplear esta resina cuando la concentración de Ag es baja (Maldonado y Aoki, 1986). En segundo lugar, *LR-White* también mantiene una buena antigenicidad, pero polimeriza a  $50^{\circ}\text{C}$ , no necesita equipamiento adicional y es mucho menos tóxica que la primera. Además, la resina *LR-White* es estable a los rayos, fácil de seccionar y tolera la deshidratación parcial aceptando tejidos hasta con un 70% de etanol (De Paul et ál., 2012).

Por un lado, las resinas acrílicas son más estables y se tiñen con mayor rapidez que las epoxi. Por otro lado, no van a polimerizar adecuadamente si se contaminan con acetona o son expuestas al aire. Por esta razón, se aconseja llevar a cabo la deshidratación en concentraciones crecientes de etanol, la infiltración posterior y la polimerización en cápsulas de gelatina (en condiciones anaeróbicas) (De Paul et ál., 2012).

## 5. Soluciones de bloqueo

A la hora de interpretar las inmunorreacciones a EM, el hecho de controlar los diferentes sitios que pueden dar lugar a una reacción inespecífica pasa a ser decisivo. Una tinción inespecífica o de fondo consiste en el resultado positivo de una muestra que no se debe a la unión Ag-Ac (Del Brío León y Riera Rovira, 1995).

Para evitar este problema, se debe emplear una solución de bloqueo justo antes de la incubación con el Ac primario. Una solución adecuada es capaz de unirse a todos los sitios con posibilidad de producir interacciones inespecíficas, de eliminar totalmente el fondo sin alterar el Ag para la posterior unión del Ac y, además, tiene que interactuar con propiedades tanto hidrofílicas como hidrofóbicas. Generalmente, se utiliza la combinación de tres proteínas para obtener un bloqueante apropiado: albúmina de suero bovino (BSA), suero normal de la misma especie que el Ac secundario y gelatina de pescado al 0,1% (De Paul et ál., 2012).

## 6. Método de postinclusión

En la técnica de postinclusión (*véase protocolo I en Anexos*), los Ac primario y secundario se aplican a las secciones ultrafinas del tejido a estudiar (Fig. 3). Por tanto, solo se pueden detectar las moléculas antigénicas expuestas en la superficie de la sección porque la resina restringe su difusión. Esto limita la proporción de Ag disponibles para el marcaje, inconveniente que se ve compensado por las ventajas del método: conservación de la ultraestructura y oportunidades de cuantificación excelentes (Amiry-Moghaddam y Ottersen, 2013).

## 7. Método de preinclusión

Puede ocurrir que las técnicas utilizadas para la inclusión de los tejidos alteren la antigenicidad de los mismos, por lo que en estos casos se recurre al procedimiento de preinclusión (*véase protocolo II en Anexos*) (Del Brío León y Riera Rovira, 1995).

Por un lado, el método permite la inmunodetección de Ag tanto de superficie celular como de extensiones de membrana, en cuyo caso el inmunomarcaje con oro se realiza antes de la fijación, lo que proporciona una buena preservación antigénica. Por otro lado, también permite detectar Ag intracelulares, para lo que es necesario realizar una fijación débil antes del marcaje. Este último debe llevarse a cabo con partículas de oro ultrapequeñas para que los Ac puedan penetrar al interior celular. Además, para detectar esas partículas minúsculas al EM, se

puede realizar una intensificación con plata. El paso siguiente es la inmersión de la muestra en resinas epoxi, ya que el inmunomarcaje se ha realizado previamente a la inclusión y esta no lo afecta, independientemente de que lo que se quiera detectar sean Ag celulares externos o internos (De Paul et ál., 2012).

Se debe tener en cuenta que en todos los procedimientos de preinclusión cuyo fin es observar Ag intracelulares, el uso de oro como marcador requiere una permeabilización adecuada que suele reducir la calidad de la ultraestructura. Sin embargo, este método también tiene ventajas, ya que ofrece una sensibilidad muy alta (Amiry-Moghaddam y Ottersen, 2013) como se observa en la Fig. 4.

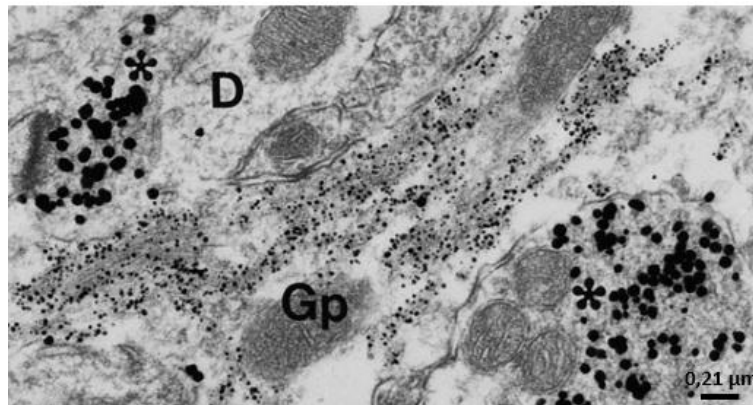


Fig. 4. Micrografía electrónica en la que se observa una preinclusión en el estrato dorsal de un ratón. Se ha realizado un doble inmunomarcaje con oro para marcar GFAP (del inglés *glial fibrillary acidic protein*, proteína fibrilar ácida de la glia) y sinaptofisina y, posteriormente, una intensificación con plata en ambos conjugados. GFAP es marcado con partículas pequeñas observándose en las células gliales (Gp). Los contornos de las dendritas adyacentes (D) no presentan partículas inmunomarcadas con oro y plata. Las partículas grandes, que marcan sinaptofisina, se encuentran entre las vesículas sinápticas de los terminales axónicos (asterisco) (extraído de Yi et ál., 2001).

## 8. Alternativas a las técnicas básicas

Dentro de este apartado se recogen un conjunto de técnicas en las que la preparación de la muestra es distinta a los métodos convencionales comentados. Así, en algunas de ellas se lleva a cabo la reacción inmune sobre cortes que no fueron sometidos a ningún tipo de inclusión, lo que permite evitar las alteraciones antigénicas generadas durante esta etapa, mientras que en otras la muestra es fijada (químicamente o por criofijación). Un paso común a todas es la congelación del tejido, lo que permite endurecerlo sin extraer el agua y obtener cortes ultrafinos. El inmunomarcaje se realiza en las criosecciones resultantes del uso del crioultramicrotomo sobre la muestra. Finalmente, se lleva a cabo el contraste y la observación en el microscopio correspondiente (Martín-Lacave y García-Caballero, 2012).

En el caso de las muestras que son criofijadas, estas son tratadas según la técnica FS (del inglés *freeze substitution*, criosustitución) antes de ser observadas a EM. Por otro lado, el material biológico puede someterse al método de Tokuyasu o a la criofractura.

## **8.1. Criofijación**

Una alternativa a la fijación química es la criofijación, una técnica de preservación física cuyo objetivo es vitrificar las células y tejidos mediante una congelación rápida. La vitrificación es el proceso de transformación de un líquido a su estado amorfo con el fin de evitar la nucleación y cristalización del agua. Para ello, la muestra se infiltra en sacarosa y, a continuación, se solidifica en presencia de nitrógeno líquido, cuya temperatura de ebullición es de  $-196^{\circ}\text{C}$ . El hielo vítreo ocupa el mismo espacio que el agua y tiene un impacto mínimo sobre la ultraestructura celular (Van Weering et ál., 2010).

El proceso de vitrificación depende de la tasa de refrigeración, la crioprotección y la presión. La probabilidad de que tenga lugar una vitrificación adecuada aumenta en presencia de crioprotectores, ya que inmovilizan las moléculas de agua. Aunque las muestras biológicas están formadas por un 80% de este líquido, las células pueden vitrificarse directamente porque los componentes intracelulares (proteínas, lípidos, etc.) actúan como crioprotectores naturales que reducen la tasa de enfriamiento (Mielanczyk et ál., 2014).

Tres tipos de técnicas de este tipo son PF (del inglés *plunge freezing*, congelación por inmersión), HPF (del inglés *high pressure freezing*, congelación a alta presión) y SPRF (del inglés *self-pressurized rapid freezing*, congelación rápida autopresurizada).

### **8.1.1. Congelación por inmersión**

Es un método simple que puede utilizarse con muestras de un rango de grosor amplio: desde macromoléculas y complejos hasta células completas de  $10\ \mu\text{m}$ . La PF trabaja bajo condiciones atmosféricas y permite obtener tasas de enfriamiento suficientemente altas. La muestra preparada se introduce en un líquido criogénico, como etano, propano o una mezcla de ambos (Gan y Jensen, 2012). Cualquiera de estos líquidos solidifica cuando entra en contacto con el nitrógeno líquido, mientras que la mezcla presenta un punto de congelación muy bajo que la hace más conveniente (Tivol et ál., 2008). Tras la vitrificación, la muestra puede observarse a  $-180^{\circ}\text{C}$  bajo el crio-EM.

La evaporación es un factor importante durante la preparación de la muestra, ya que si no se controla puede modificar la presión osmótica y consecuentemente debilitar la muestra (Dubochet et ál., 1988).

### 8.1.2. Congelación a alta presión

El método HPF (Fig. 5) se aprovecha de que la nucleación de los cristales de hielo depende de la presión y la temperatura (Studer et ál., 2008). Durante el proceso de cristalización, el volumen de agua se expande. Este aumento del volumen de hielo se puede evitar aplicando una presión elevada que actúe como crioprotector en contra de la expansión. La presión alta reduce considerablemente el crecimiento de los cristales y la tasa de nucleación del hielo, por lo que esta técnica se puede aplicar para congelar por vitrificación muestras de hasta 250  $\mu\text{m}$  de grosor. Posteriormente, se debe llevar a cabo un enfriamiento utilizando nitrógeno líquido (Gilkey y Staehelin, 1986).

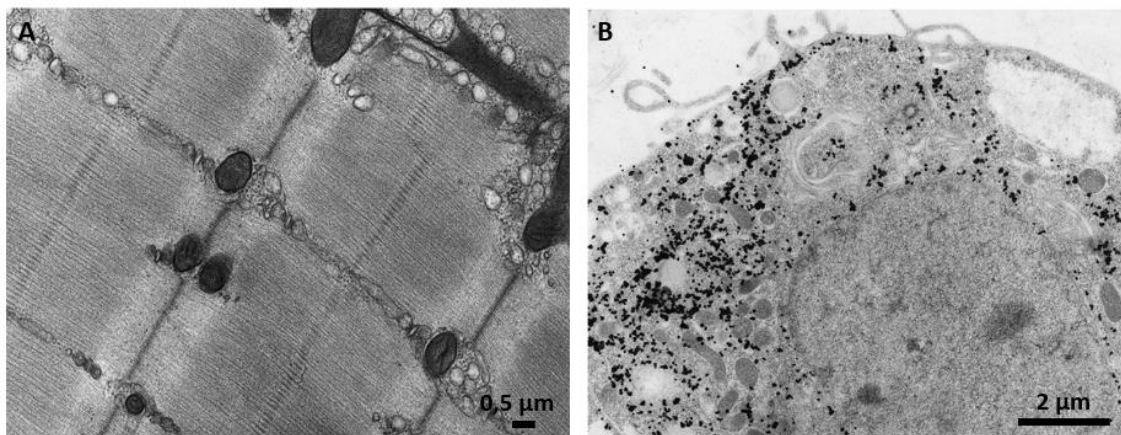


Fig. 5. Micrografías electrónicas. (A) Músculo esquelético de ratón tras HPF y FS en acetona/tetróxido de osmio e introducido en resina epoxi. Las características de los filamentos musculares y la mitocondria están claramente definidos por el uso de alto contraste. (B) Célula de cáncer de mama de la línea PMC42. Tras HPF, las células fueron FS durante 18 h en metanol e incluidas en *Lowicryl* HM20. La sección se marcó con un Ac que reconoce la proteína vimentina del filamento intermedio. El conjugado de oro coloidal fue mejorado con plata durante 12 min (modificado de Monaghan et ál., 1998).

### 8.1.3. Congelación rápida autopresurizada

La SPRF es un método nuevo en el que el material es cargado en capilares estándar de cobre, los cuales se sellan por ambos extremos y son introducidos en nitrógeno, propano o etano líquidos. Por tanto, este proceso se produce a volumen constante y se basa en el aumento de la presión cuando el volumen de agua también se eleva durante la solidificación dentro del capilar cerrado (Leunissen y Yi, 2009).

## 8.2. Criosustitución

En la FS (Fig. 5), tras la criofijación del material biológico, se llevan a cabo dos procesos de manera rápida: congelación y deshidratación a temperaturas bajas (-80°C). Posteriormente, la muestra es incluida con fijadores químicos que son inactivos en las condiciones a las que se encuentra. Tras la difusión de la solución fijadora a lo largo de la muestra, se eleva la temperatura de manera controlada. Mientras que la temperatura aumenta, los fijadores pasan a ser químicamente activos y estabilizan los componentes celulares con los que reaccionan (Dykstra y Reuss, 2003). Finalmente, tras la FS las muestras son incluidas en resina.

## 8.3. Método de Tokuyasu

El método de Tokuyasu (véase *protocolo III en Anexos*) permite prevenir la formación de cristales de hielo infundiendo una fijación química de las células en presencia de sacarosa (Tokuyasu, 1973), una molécula altamente hidrofílica que a altas concentraciones se une a suficientes moléculas de agua para evitar que esta adopte su organización cristalina. Por tanto, como en el caso de la criofijación, también se produce vitrificación (Van Weering et ál., 2010). En la figura 6 se observan algunos resultados de Loussert Fonta et ál. (2015), quienes aplican este método en el estudio de las sinapsis asimétricas cerebrales, utilizando para localizarlas el Ag anti-VGLUT1 (Fig. 6B y 6C) (del inglés *vesicular glutamate transporter 1*, transportador vesicular de glutamato 1).

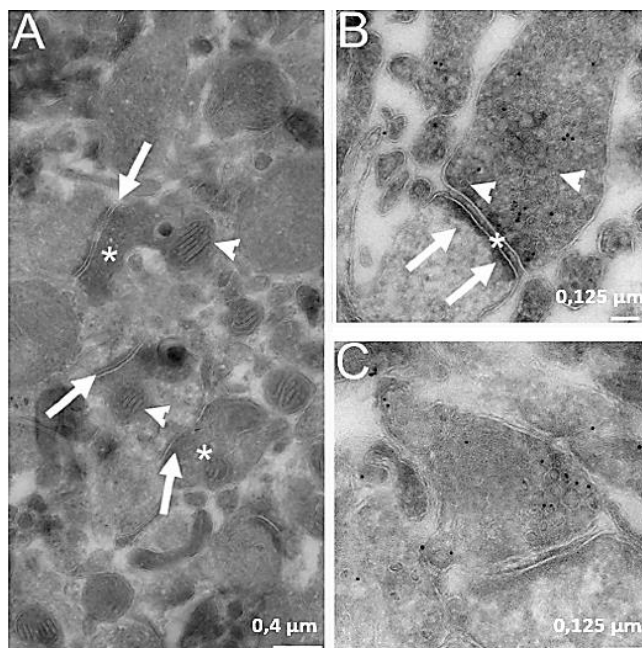


Fig. 6. Micrografías de TEM de cerebro preparadas con el método de Tokuyasu. (A) Resumen de tres sinapsis asimétricas (flechas) en el tejido cerebral. Todas las células presentan un citoplasma denso y varios orgánulos, como mitocondrias (cabeza de flecha) y vesículas (asterisco). (B) El botón presináptico, enriquecido con vesículas sinápticas (cabezas de flecha), está separado de la célula postsináptica por el espacio sináptico (asterisco). Además, se distingue claramente la densidad postsináptica (flechas). (C) Micrografía inclinada 0° (espesor de la sección 100 nm) (modificado de Loussert Fonta et ál., 2015).

Esta técnica de congelación favorece la localización de la zona de interés a una resolución alta. Sus ventajas principales son que los Ag permanecen en un ambiente hidratado antes del inmunomarcaje y que la accesibilidad antigénica es mejor que en los métodos de pre y postinclusión, en los que la muestra es incluida en resina (Tokuyasu, 1973).

Por supuesto, también presenta desventajas, considerándose como la más importante la necesidad de fijar químicamente el material biológico a temperatura ambiente. La fijación química introduce varios artefactos, lo cual puede afectar a los resultados (Brown et ál., 2009).

### 8.4. Técnicas híbridas

Las técnicas híbridas han sido desarrolladas en respuesta a las dificultades que se presentan durante el proceso de preparación de la muestra. Por esta razón, incluyen las ventajas de dos o más criotécnicas, proporcionando nuevos métodos de gran potencial en investigación (Mielanczyk et ál., 2014).

A continuación, se detallan un conjunto de técnicas híbridas (Fig. 7) que pueden combinarse con el inmunomarcaje: RHM (del inglés *rehydration method*, método de rehidratación), VFS (del inglés *vitrified frozen sections*, secciones congeladas vitrificadas), VIS2FIX (del inglés *chemical fixation of vitreous sections*, fijación química de secciones vitrificadas) y AOIL (del inglés *an optimized immuno-labeling for integrated laser and electron microscopy*, inmunomarcaje mejorado para microscopía electrónica integrada). El método SFM (del inglés *section fixation method*, método de fijación sección) también puede emplearse para este fin, pero no se comentará por su escasa aplicación.

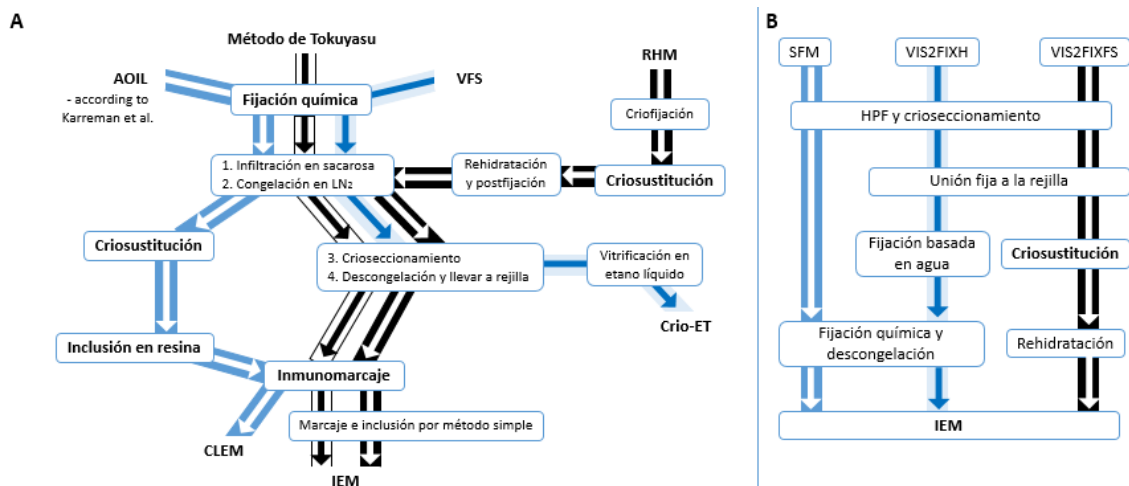


Fig. 7. Diagrama que muestra los pasos correspondientes a las distintas técnicas híbridas (modificado de Mielanczyk et ál., 2014).

#### 8.4.1. Método de rehidratación

El RHM permite la aplicación de diferentes fijadores así como sus combinaciones. Tras la criofijación, la muestra es sometida a FS y rehidratación. Posteriormente, es crioseccionada según el método de Tokuyasu e inmunomarcada con oro (Mielanczyk et ál., 2014).

#### 8.4.2. Secciones congeladas vitrificadas

La técnica basada en VFS combina el método de Tokuyasu junto con la revitrificación en etano líquido de las secciones montadas en las rejillas para EM. El inmunomarcaje se desarrolla tras aclarar las secciones y previamente a su inclusión en hielo. Esta técnica evita los artefactos asociados con otros métodos debidos al espesor y descongelamiento de las secciones en la rejilla antes del proceso de vitrificación (Sabanay et ál., 1991).

#### 8.4.3. Fijación química de secciones vitrificadas

El método VIS2FIX (Fig. 8) incluye dos técnicas de fijación a alta velocidad que ofrecen nuevas posibilidades tanto para IEM (del inglés *immuno-electron microscopy*, inmunomarcaje a microscopía electrónica) como para iLEM (del inglés *integrated laser and electron microscopy*, microscopía electrónica integrada). Una vez que las secciones están organizadas en la rejilla, se van a fijar de mediante dos técnicas: VIS2FIXFS y VIS2FIXH. Por un lado, VIS2FIXFS se basa en la criosustitución y posterior rehidratación de las secciones. Por el otro lado, en la técnica VIS2FIXH, las rejillas que contienen las secciones se colocan en un fijador congelado, el cual es descongelado y fijado en líquido fijador. VIS2FIX reduce el tiempo requerido para la preparación de las muestras y permite el uso de una amplia variedad de fijadores que amplían las posibilidades en investigación (Karreman et ál., 2011).

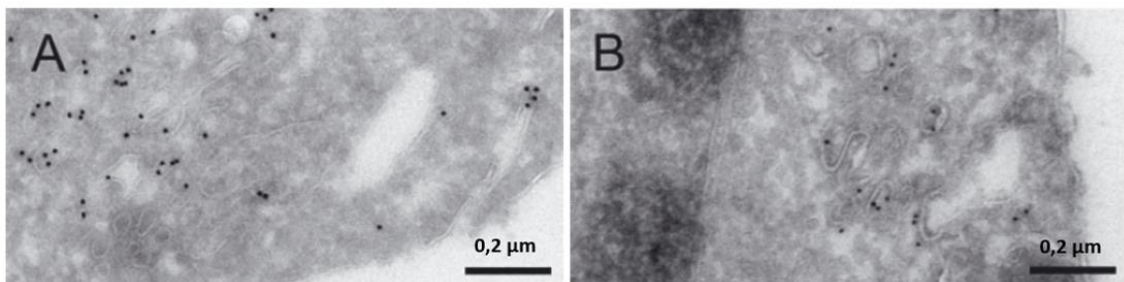


Fig. 8. Inmunomarcaje con oro de la proteína caveolina en secciones VIS2FIX de HUVECs (del inglés *Human Umbilical Vein Endothelial Cells*, células endoteliales de la vena umbilical humana). Las secciones HUVECs de HPF fueron fijadas de acuerdo a los métodos VIS2FIXH (A) y VIS2FIXFS (B) y, a continuación, inmunomarcadas con oro de 10 nm para que la caveolina localice las caveolas. Las caveolas son invaginaciones de la membrana plasmática y también se producen en la célula pareciéndose a pequeñas vesículas (50-100 nm) (modificado de Karreman et ál., 2011).



La iLEM es un tipo de CLEM (del inglés *correlative light and electron microscopy*, microscopía óptico-electrónica) que combina la FM (del inglés *fluorescence microscopy*, microscopía de fluorescencia) y la EM en un solo equipo. La captación de imágenes a nivel óptico se utiliza para identificar los marcadores fluorescentes, y entonces se observa la ROI (del inglés *region of interest*, región de interés) a TEM (del inglés *transmission electron microscopy*, microscopía electrónica de transmisión). De esta manera, se evita el tiempo de recolocación de la ROI en los microscopios como ocurre al utilizar dos equipos convencionales, así como los procedimientos que se requerirían para relacionar los resultados de ambos (Jahn et ál., 2012).

#### 8.4.4. Inmunomarcaje mejorado para microscopía electrónica integrada

El método AOIL ofrece, antes de la inclusión en resina, un marcaje en bloque del material biológico con el fin de prevenir el debilitamiento de la fluorescencia. La muestra puede analizarse tanto a IEM como a iLEM (Karreman et ál., 2012).

### 8.5. Criofractura

La técnica FRIL (del inglés *freeze-fracture replica immunogold labeling*, inmunomarcaje con oro para réplicas de superficies criofracturadas) se utiliza principalmente para detectar proteínas de membrana. Este método está basado en cuatro pasos básicos (Fig. 9) previos al inmunomarcaje con oro de la réplica resultante, que se coloca en una rejilla para visualizar la ultraestructura celular a TEM (Robenek y Severs, 2008). En la Fig. 10 se observa el resultado del proceso de criofractura realizado por Hoge et ál. (2011) para estudiar la extensión y fuerza del acoplamiento eléctrico entre las neuronas de la oliva inferior (del inglés *inferior olive*, oliva inferior).

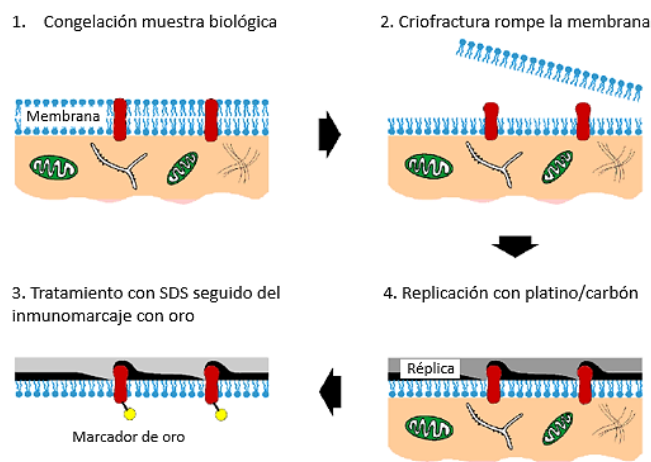


Fig. 9. Pasos clave en FRIL. La muestra es rápidamente congelada (1) y criofracturada, proceso que rompe la bicapa lipídica quedando expuesta la cara fragmentada (2). Se realiza una réplica de esa muestra fracturada con platino y carbón (3). Finalmente, la réplica se trata con SDS para eliminar el material biológico excesivo (4). El inmunomarcaje con oro se lleva a cabo sobre las proteínas que se mantengan unidas a la réplica (modificado de Robenek y Severs, 2008).

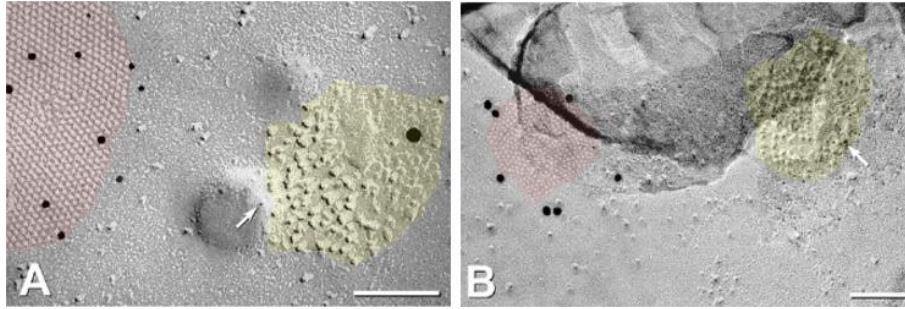


Fig. 10. Sistema nervioso central. Proximidad del NMDAR (del inglés *N-methyl-D-aspartate receptor*, receptor N-metil-D-aspartato) contenido en las PSDs (del inglés *postsynaptic densities*, densidades postsinápticas) a la proteína Cx36 (del inglés *connexin 36*, conexina 36) contenida en las uniones de hendidura de los glomérulos de la IO. (A) FRIL muestra la presencia de Cx35 y NMDARs en una sinapsis mixta en el pez dorado. Cx35 en una unión de hendidura (zona rosa) es marcada con partículas de oro de 10 nm. Un agregado de partículas de la cara E (amarillo), representando una membrana subsináptica PSD de una sinapsis glutamatérgica, tiene una partícula de oro de 6 nm (flecha) y una de 18 nm, e independientemente ambas indican la presencia de las subunidades NR1 de los NMDARs. (B) FRIL muestra una sinapsis doblemente marcada en una rata, con las subunidades NR1 en la PSD por una partícula de oro de 10 nm (flecha) y una unión de hendidura marcada para Cx36 por partículas de oro de 20 nm (modificado de Hoge et ál., 2011).

## 9. Inmunomarcaje con partículas de oro

Con el fin de encontrar la mayor resolución posible a nivel subcelular, las partículas de oro han sustituido de forma definitiva a los marcadores enzimáticos. El oro coloidal ha sido el marcador de elección para EM durante mucho tiempo, aunque actualmente, también los “clústeres” de oro se utilizan para determinadas aplicaciones (Hainfeld y Powell, 2000).

### 9.1. Oro coloidal

El oro en estado coloidal es una partícula electrodensa que se puede unir a diferentes tipos de proteínas empleadas como detectores de Ag en las reacciones inmunocitoquímicas, como la proteína A o la inmunoglobulina G (IgG) (Del Brío León y Riera Rovira, 1995). En el caso de que los Ag se expongan en la superficie de secciones ultrafinas, el diámetro más común de las partículas de oro se encuentra entre 5 y 25 nm. Más recientemente, se han desarrollado partículas menores de 1 nm (ultrapequeñas), las cuales tienen un poder de penetración mayor y proporcionan un sistema de marcadores con una sensibilidad más alta (Hainfeld y Furuya, 1992).

La capacidad de producir partículas de oro coloidal con diferentes tamaños permite llevar a cabo un marcaje múltiple de los Ag en la misma sección. Esta aplicación mejora

significativamente la validez del método (Griffiths, 1993). Además, tienen facilidad para adherirse a diferentes proteínas, presentan un color rojo intenso al depositarse en los tejidos y no interfieren con pigmentos o enzimas endógenos (Kharazia y Weinberg, 1999).

Una de las ventajas principales del oro coloidal es la precisión de localización que proporciona, ya que se puede unir a Ac primarios o secundarios con el fin de detectar la posición del epítipo con una exactitud definida solamente por el tamaño de las moléculas de Ac (Griffiths, 1993). En la mayoría de los procedimientos en los que se utiliza el oro coloidal, este se une a una IgG secundaria, de forma que la distancia entre el epítipo y el centro de la molécula de oro coloidal equivale a dos veces el diámetro de la IgG (8 nm) más el radio de la partícula de oro (Fig. 11). Esta distancia puede reducirse con el uso de Ac más pequeños, como los fragmentos Fab' de Ac, cuyo diámetro es de 4 nm (Amiry-Moghaddam y Ottersen, 2013).

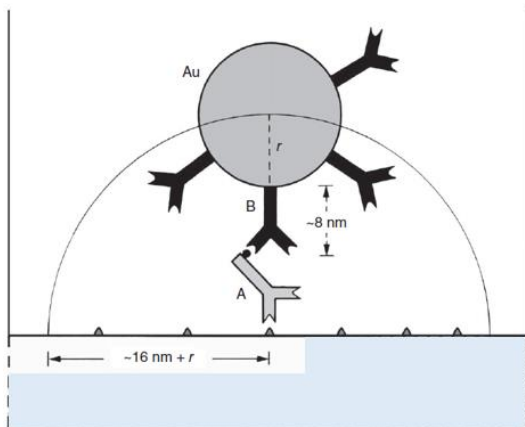


Fig. 11. Procedimiento de inmunomarcaje. Los triángulos sobre la superficie ultrafina (azul) representan el Ag contra el que se une el Ac primario (A). El Ac secundario se asocia con una partícula de oro coloidal (Au), que en este caso tiene un radio ( $r$ ) de 7,5 nm. Como el diámetro de la IgG es de 8 nm, la máxima distancia entre el epítipo y la partícula de oro será de unos 23 nm (modificado de Amiry-Moghaddam y Ottersen, 2013).

En segundo lugar, el oro coloidal es un marcador de fácil cuantificación. Las partículas presentan una electrodensidad suficientemente elevada como para que sean identificadas de forma inequívoca con a EM, contadas fácilmente y analizadas mediante un programa específico (Blackstad et ál., 1990).

Finalmente, la técnica de inmunomarcaje con oro se caracteriza por la alta especificidad de la molécula de Ac. Ya que comprobar la especificidad es prácticamente imposible, para minimizar el riesgo de confusión entre las partículas se deben emplear controles positivos y negativos apropiados. Además, esa especificidad se debe confirmar bajo condiciones de inmunocitoquímica, las cuales no se suelen tener en cuenta (Lorincz y Nusser, 2008).

## 9.2. “Clústeres” de oro

Los “clústeres” de oro constituyen una tecnología novedosa y están basados en un núcleo formado por múltiples átomos de este elemento. Tienen propiedades tipo molécula y un tamaño más pequeño que las partículas de oro coloidal. De entre todos los “clústeres” que se comercializan, *Nanogold* es el elegido para inmunocitoquímica porque presenta un tamaño medio y una mejor visibilidad frente a otras agrupaciones menores, como *Undecagold*, lo que permite que se pueda observar directamente a TEM. Además, tiene un diámetro de 1,4 nm y los átomos de su superficie pueden unirse covalentemente a grupos orgánicos (Hainfeld y Furuya, 1992).

*Nanogold* se puede unir covalentemente al fragmento Fab' de los Ac con el fin de conseguir las inmunosondas más pequeñas para una mejor penetración y electrodensidad. Además, preserva muy bien la inmunorreactividad porque esta fracción del Ac se corresponde con un tercio del tamaño de una molécula de IgG completa, y el “clúster” de oro se puede colocar unido específicamente al extremo opuesto a la región que combina con el Ag. Los “clústeres” presentan ciertas ventajas sobre las partículas de oro coloidal:

- Se unen covalentemente al Ac, por lo que son más estables que el oro coloidal, el cual simplemente adsorbe la proteína. Además, estos “clústeres” no disminuyen su actividad con el paso del tiempo mientras que el oro coloidal sufre una separación de los Ac (Kramarcy y Sealock, 1991).
- El “clúster” *Nanogold* de 1,4 nm unido a fragmentos Fab' (4 nm) es más pequeño que una IgG (8 nm), por lo que penetra de manera excelente en los tejidos (Takizawa y Robinson, 1994).
- Proporcionan un mejor marcaje antigénico porque cuanto más pequeñas sean las partículas de oro, difunden mejor y más sitios marcan. Además, una partícula pequeña no obstaculiza los Ag adyacentes (Takizawa y Robinson, 1994).
- Presentan mejor resolución, de manera que se han utilizado para marcar sitios específicos en biomoléculas únicas (Luo et ál., 1999).
- Gracias a su tamaño se pueden unir covalentemente a casi cualquier molécula pequeña, incluyendo péptidos, ATP, ácidos nucleicos, lípidos y carbohidratos. Muchos de estos conjugados no son posibles con el oro coloidal, ya que no los adsorbe de manera estable (Hainfeld y Powell, 2000).

- Los “clústeres” tienen un tamaño uniforme y específico, mientras que las partículas de oro coloidal menores de 3 nm o ultrapequeñas son muy irregulares (Hainfeld, 1990).
- No se agregan con el tiempo, mientras que el oro coloidal tiende a ser pegajoso y a adsorber múltiples moléculas, sobre todo en el caso de las partículas ultrapequeñas (Hainfeld, 1990).
- Se pueden purificar cromatográficamente utilizando la filtración por gel. Es posible separar un solo fragmento Fab’ conjugado con *Nanogold* y eliminar tanto el exceso de este átomo como de otros (Hainfeld y Powell, 2000).

### 9.3. Intensificación con sales de plata

La autometalografía, o intensificación con sales de plata, es un proceso mediante el cual este metal es depositado en la superficie de una molécula de oro pequeña (Danscher et ál., 1995). Además, la envoltura es específica ya que la plata actúa como catalizador. La combinación con plata, tanto de las partículas de oro coloidal ultrapequeñas como de los “clústeres”, ha aumentado la capacidad de detección ultraestructural de los Ag intracelulares (De Paul et ál., 2012). Una molécula de oro pequeña puede aumentar de tamaño hasta ser visible a EM (10-20 nm), incluso a LM (Fig. 12) o directamente a la vista (Hainfeld y Powell, 2000).

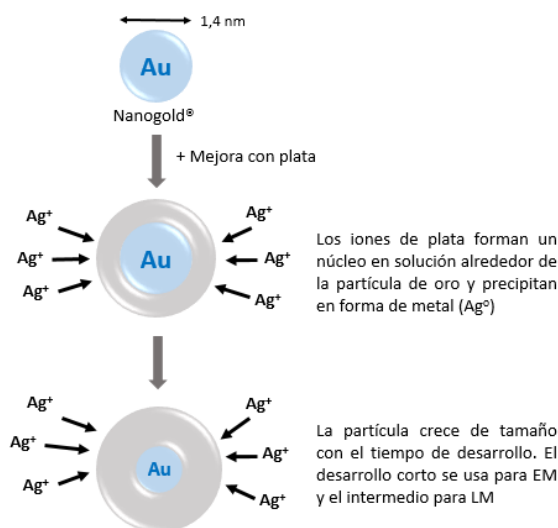


Fig. 12. Esquema del proceso de autometalografía (modificado de Hainfeld y Powell, 2000).

En la Fig. 13 se puede evaluar el resultado del marcaje con oro coloidal (Fig. 13A) y con *Nanogold* (Fig. 13B).

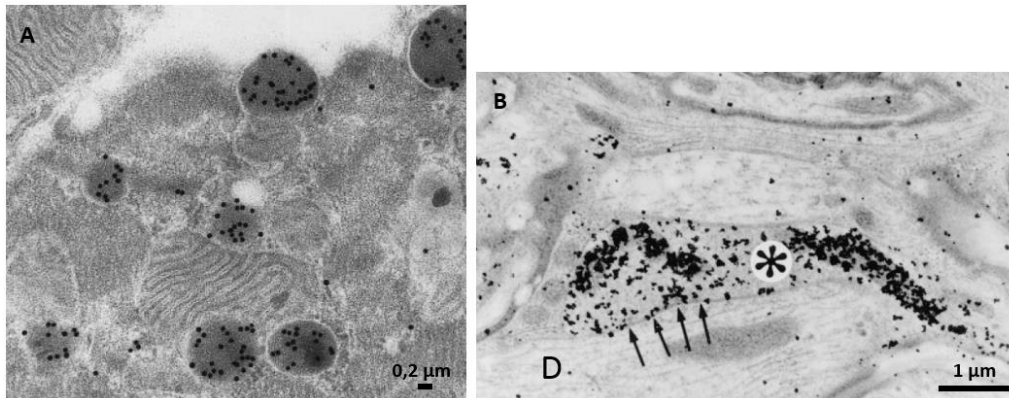


Fig. 13. Micrografías electrónicas. (A) Sección del miocardio atrial de rata donde los Ac secundarios se conjugan con partículas de oro coloidal de 15 nm para localizar el ANP-28 (extraído de Skepper, 2000). (B) Marcaje con *Nanogold-Fab'* mejorado con plata, alcanzando partículas de 10 nm. Se observan terminales que contienen GABA (del inglés *γ-aminobutyric acid*, ácido  $\gamma$ -aminobutírico) (asterisco) formando especializaciones sinápticas simétricas (flechas) con las dendritas (D) en la médula espinal torácica de la rata (extraído de Hainfeld y Powell, 2000).

#### 9.4. Marcaje doble

El método de postinclusión permite la localización simultánea de dos Ag en la rejilla con dos complejos de partículas de oro de diferentes tamaños (Fig. 14). Cada Ag puede ser detectado por dos marcadores independientes en cada lado de esa rejilla, sobre todo si los Ac disponibles son preparados en la misma especie. Sino, los Ac se pueden mezclar y la reacción ocurrirá en un solo paso en un lado de la superficie (De Paul et ál., 2012).

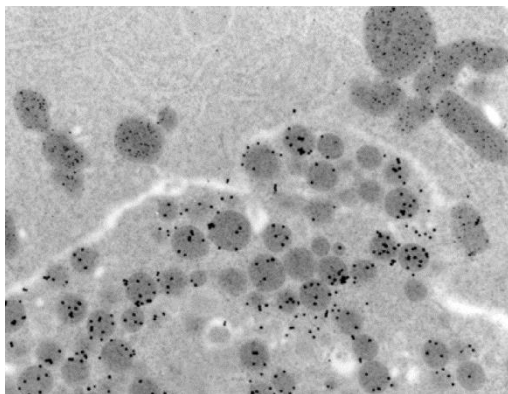


Fig. 14. Micrografía electrónica de la glándula pituitaria en la que se observa un doble marcaje para reconocer dos células de diferente tipo en la misma sección: células somatotropas conteniendo la hormona de crecimiento (partículas de oro de 15 nm) y células lactotropas expresando prolactina (partículas de oro de 5 nm) (extraído de Orgnero de Gaisán et ál., 1997).

### 10. Observación a microscopía electrónica

Tras la obtención de cortes mediante ultramicrotomía, ya sea con un equipo básico o especializado para seccionar muestras congeladas, se lleva a cabo la preparación del material biológico para su observación al microscopio. En el caso de la SEM (del inglés *scanning electron*

*microscopy*, microscopía electrónica de barrido) las muestras se montan sobre portaobjetos y los cortes suelen ser algo más gruesos que los ultrafinos utilizados a TEM.

Por tanto, para ser observadas a TEM, las muestras se montan sobre rejillas (Fig. 15A), unos soportes especiales que pueden ser de distintos materiales, pero solamente las de oro y níquel son aptas para el inmunomarcaje. Todas tienen un tamaño standard y un borde sólido para poder cogerlas con las pinzas adecuadas. Además, las rejillas pueden utilizarse directamente o con una película fina, ya sea de carbón o de formvar. Monaghan et ál. (1998) llevan a cabo un estudio sobre HPF para inmunocitoquímica en el que las secciones son inmunomarcadas, introducidas en gotas con una solución de bloqueo (Fig. 15B), incubadas con Ac y contrastadas con acetato de uranilo y acetato de plomo.

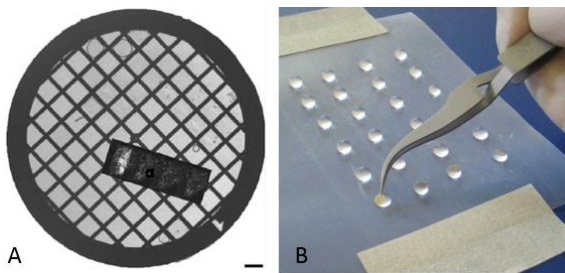


Fig. 15. (A) Rejilla de TEM vista a LM (modificado de Loussert Fonta et ál. 2015). (B) Procedimiento llevado a cabo en las rejillas, que se encuentran flotando en las cuatro primeras gotas, para marcar secciones ultrafinas con Ac (extraído de Wilson y Bacic, 2012).

## 11. Microscopía óptica y electrónica

Durante el siglo XIX, el uso de la LM estaba muy extendido entre los científicos para la observación celular. Sin embargo, rápidamente se dieron cuenta de las limitaciones que este presentaba debido a su bajo poder de resolución. Por ello, se buscó un microscopio con una longitud de onda menor que el óptico y que, por tanto, permitiera alcanzar una resolución mayor. En el siglo XX se desarrolló la EM, un microscopio basado en el uso de lentes electromagnéticas que cumplía los objetivos buscados (Toole y Toole, 2004).

Una de las principales ventajas que aporta la EM es que permite detectar la localización subcelular de un Ag, esto es, en qué parte de la célula se encuentra: el núcleo, la membrana plasmática o el retículo endoplásmico, entre otras zonas. Sin embargo, cuando solo se requiere conocer qué células presentan un Ag determinado, es adecuado el uso de la LM, ya que para ello no es necesaria toda la resolución que ofrece la EM y, además, la preparación de la muestra es más sencilla y rápida.

Las muestras seccionadas para EM se preparan de manera similar a las utilizadas a LM, pero en el primer caso se requieren secciones ultrafinas en las que solo se observa una pequeña zona de la célula. Con el fin de facilitar la búsqueda de esa zona en una muestra, es posible

utilizar las ventajas que ofrecen ambas técnicas. Para ello, se lleva a cabo el inmunomarcaje con partículas de oro, ya que puede realizarse tanto en secciones que serán observadas a EM, como en semifinas a nivel de LM.

En primer lugar, se puede utilizar la LM para examinar la muestra y localizar la ROI, donde se encuentran los Ac marcados con oro (Van Weering et ál., 2010). Para el marcaje, se aconseja utilizar partículas de oro de 1 nm de diámetro intensificadas con plata para su correcta visualización a LM. Posteriormente, se prepara la muestra para EM y se observa solamente la ROI a mayor resolución (De Paul et ál., 2012). Watanabe et ál. (2014) han llevado a cabo un estudio de este tipo sobre muestras del íleon distal del pollo. Como se observa en la Fig. 16, se ha realizado un proceso de preinclusión sobre cortes de 5  $\mu\text{m}$  de espesor de una muestra que previamente ha sido incluida en parafina e inmunomarcada con oro. Esto permite observarla tanto a LM como a EM.

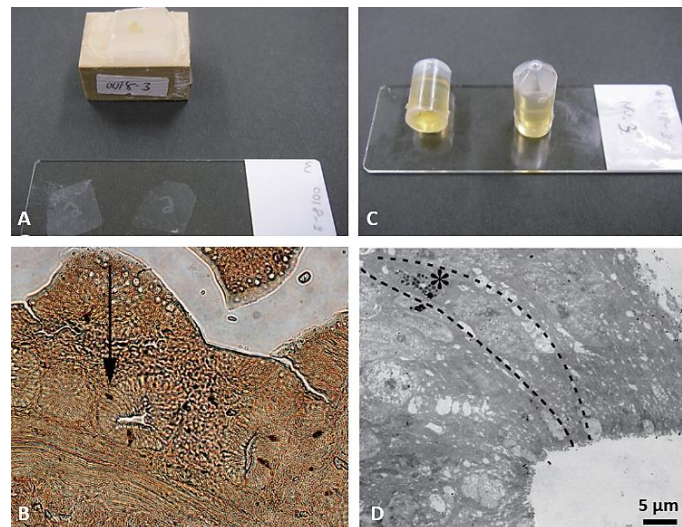


Fig. 16. Resumen del procedimiento: desde un bloque de parafina hasta la observación a EM. (A) La muestra es embebida en parafina y las secciones correspondientes colocadas en un portaobjetos de cristal. (B) Una sección teñida con inmunomarcaje se examina a LM sin el cubreobjetos. La flecha señala una célula marcada y observada en la imagen D. (C) Las secciones diseccionadas que incluyen las células marcadas son incluidas en una resina epoxi. (D) Micrografía electrónica de una célula marcada. La célula rodeada por una línea discontinua es la misma que se indica en la imagen B con una flecha. Se observan los gránulos secretores en el citoplasma basal (asterisco) (modificado de Watanabe et ál., 2014).

## 12. Discusión

El inmunomarcaje a nivel ultraestructural abarca una serie de herramientas de gran utilidad en el campo de la Biología Celular, ya que pueden revelar detalles y caracterizar muchos



de los procesos que tienen lugar en las células. Estas técnicas permiten evaluar, por ejemplo, cambios en el citoesqueleto, productos de secreción o localización de receptores. No obstante, no tiene sentido utilizar la EM para observar una muestra que puedes resolver suficientemente a LM. Por otro lado, en muchas ocasiones se puede utilizar ambas estrategias cuando se quiere obtener información concreta sobre una célula marcada o un Ag subcelular.

### **12.1. Métodos básicos y alternativas**

En primer lugar, el proceso de fijación introduce varios artefactos que afectan a la ultraestructura de la muestra. El problema es que no existe ningún fijador ideal para inmunohistoquímica. Por tanto, la elección dependerá de lo que se desee preservar mejor: la morfología o la inmunorreactividad, aunque lo ideal es buscar un equilibrio (Watanabe et ál., 2014).

En segundo lugar, los medios de inclusión más utilizados son las resinas epoxi y las acrílicas. Por un lado, las resinas epoxi están destinadas a preservar una buena ultraestructura celular, aportan gran estabilidad bajo el haz de electrones y facilitan el seccionamiento. Por otro lado, las resinas acrílicas se usan para inmunocitoquímica por sus propiedades como impregnación y polimerización con luz ultravioleta a bajas temperaturas, que no generan enlaces cruzados en la muestra y favorecen una rugosidad alta en la superficie de la sección (Monaghan et ál., 1998).

En el caso del procedimiento de preinclusión, aunque el inmunomarcaje se lleva a cabo antes de la inclusión de la muestra, es una técnica que requiere procedimientos de permeabilización que suelen desmejorar la calidad de la ultraestructura (Griffiths, 1993). La técnica de postinclusión combinada con el inmunomarcaje con oro proporciona una cuantificación y preservación ultraestructural excelentes, características que hacen que sea un método de aplicación muy amplio (Del Brío León y Riera Rovira, 1995). Es más, ha llegado a ser conocida, literalmente, como el “modelo de referencia” para la localización precisa y semicuantitativa de Ag unidos a la membrana o al citosol en el sistema nervioso central. Sin embargo, la técnica de preinclusión ofrece una sensibilidad muy alta (Amiry-Moghaddam y Ottersen, 2013) y, además, permite marcar células vivas antes de la fijación, ventaja que proporciona una mejor preservación y no es posible en el método de postinclusión (De Paul et ál., 2012).

Las alternativas a los métodos convencionales incluyen varias criotécnicas aptas para cuando la preservación de la antigenicidad se considera más importante que el mantenimiento de los detalles ultraestructurales (Griffiths, 1993). Además, el hecho de que la muestra tenga que ser incluida en resina limita mucho la accesibilidad antigénica en los métodos de pre y postinclusión. Por esta razón, la criotécnica de Tokuyasu (Fig. 5) es considerada el método de localización más eficiente para llevar a cabo el inmunomarcaje a nivel ultraestructural, ya que combina la fijación química con la vitrificación de la muestra, evitando su inclusión (Mielanczyk et ál., 2014). Sin embargo, su principal desventaja es la fijación química, ya que introduce varios artefactos que pueden afectar a la ultraestructura de la muestra (Brown et ál., 2009).

Ante el problema que acarrea la fijación química, se desarrolló la criofijación, un proceso que generalmente se reserva para muestras de tamaño más pequeño que las que se emplean en la primera (Dykstra y Reuss, 2003). En el caso de la criofijación PF, las muestras mayores de 10  $\mu\text{m}$  son muy gruesas como para asegurar una vitrificación adecuada sin que cristalice el hielo, por lo que no pueden ser observadas directamente con el crio-EM. Este problema se solucionó con una nueva técnica: HPF. Actualmente, varios estudios en los que se combina la criofijación HPF con FS y la inclusión en resinas (Fig. 4), demuestran que se ha encontrado un método con gran potencial en investigación, ya que se mantienen significativamente la ultraestructura y la antigenicidad (Stradalova et ál., 2008).

La penetración y calidad de las muestras vitrificadas con el método SPRF se pueden comparar con las muestras preparadas por HPF. Sin embargo, durante el proceso de vitrificación de la primera criotécnica, alrededor del 50% de la masa original de agua sufre un cambio a hielo cristalino, por lo que parte de la muestra es dañada por la formación de ese hielo (Mielanczyk et ál., 2014).

Finalmente, las criotécnicas híbridas comentadas incluyen las ventajas de dos o más métodos basados en la vitrificación del tejido. En general, las aplicaciones de estas estrategias se pueden resumir en:

- Pueden actuar sobre materiales diferentes, así como sobre los que son difíciles de fijar.
- Permiten utilizarse cuando el resultado de la fijación convencional a temperatura ambiente no es bueno o no sirve debido a la inactivación de los Ag y la presencia de artefactos causados por la difusión lenta del fijador.
- Se pueden aplicar cuando se requiere la criofijación y accesibilidad de los Ag.

La técnica de tipo híbrido más utilizada es VIS2FIX, ya que es poco propensa a la aparición de artefactos y reduce el tiempo de preparación de la muestra, el cual es muy amplio en las criotécnicas comentadas, como la HPF, la FS o el método de Tokuyasu (Karreman et ál., 2011).

## **12.2. Inmunomarcaje**

Los Ac conjugados tienen muchas utilidades actualmente, son aplicados en inmunocitoquímica, inmunoensayos, así como para usos médicos como inmunoterapia. Los marcadores con los que se obtienen mejores resultados están basados en partículas de oro. Por un lado, la IgG combinada con oro coloidal es la inmunosonda que más se utiliza hoy en día a EM gracias a todas las ventajas que favorecen que sea una molécula con alta precisión, especificidad y de fácil cuantificación (Hainfeld y Furuya, 1992).

Sin embargo, con la intención de construir la inmunosonda más pequeña visible a TEM, se desarrollaron los “clústeres”. De entre todos ellos, *Nanogold* combinado con el fragmento Fab’ de los Ac es la partícula de oro más pequeña que puede ser observada directamente a EM convencional. Es más, incluso las partículas de oro coloidal ultrapequeñas presentan desventajas en comparación con los “clústeres” debido a que las primeras son de mayor tamaño, menos estables y se agregan a los Ac (Hainfeld, 1990).

A pesar de que los “clústeres” presentan mayores ventajas que el oro coloidal, se ha podido comprobar que este último sigue siendo el marcador más utilizado. Así, la evaluación de 100 artículos publicados entre los años 2008 y 2015 conduce a la conclusión de que en un 60% se llevan a cabo estudios con partículas de oro coloidal de entre 10 y 15 nm conjugadas con IgG. En el resto de artículos, los estudios se realizan con partículas de oro coloidal ultrapequeñas o con *Nanogold*, siendo mayor el porcentaje de las primeras. Esto puede deberse a que los “clústeres” constituyen todavía una tecnología muy novedosa.

En cuanto a la intensificación con plata de las partículas de oro de menor tamaño con el fin de que se visualicen mejor al microscopio, está comprobado que la distribución de los tamaños de esas moléculas después de la intensificación es peor que la que se origina de una buena preparación de oro coloidal de unos 10 nm (Hainfeld y Powell, 2000).

## **12.3. Conclusiones**

Actualmente, el enorme potencial del inmunomarcaje es una herramienta indispensable tanto para el estudio de la ultraestructura celular, de las distintas moléculas implicadas en los

procesos que tienen lugar en las células, como de las relaciones entre la estructura y la función de las mismas. Sin embargo, a partir de la valoración de las diferentes técnicas comentadas, se puede concluir que todas ellas tienen sus ventajas e inconvenientes, los cuales deben ser analizados para elegir el método que mejor se adapte a las condiciones requeridas para el estudio.

### 13. Referencias bibliográficas

Amiry-Moghaddam, M.; Ottersen, O. P. (2013). Immunogold cytochemistry in neuroscience. *Nat Neurosci*, 16: 798-803.

Blackstad, T. W.; Karagulle, T.; Ottersen, O. P. (1990). MORFOREL, a computer program for two-dimensional analysis of micrographs of biological specimens, with emphasis on immunogold preparations. *Comput Biol Med*, 20: 15-34.

Brown, E.; Mantell, J.; Carter, D. A.; Tilly, G.; Verkade, P. (2009). Studying intracellular transport using high-pressure freezing and Correlative Light Electron Microscopy. *Semin Cell Dev Biol*, 20: 910-919.

Chen, X.; Winters, C.; Azzam, R.; Li, X.; Galbraith, J. A.; Leapman, R. D.; Reese, T. S. (2008). Organization of the core structure of the postsynaptic density. *Proc Natl Acad Sci USA*, 105: 4453-4458.

Danscher, G.; Hacker, G. W.; Hauser-Kronberger, C.; Grimelius, L. (1995). Trends in autometallographic silver amplification of colloidal gold particles. En: Hayat, M. A., ed. *Immunogold Silver Staining: Principles, Methods and Applications*. New York: CRC Press, 11-18.

De Paul, A. L.; Mukdsi, J. H.; Petiti, J. P.; Gutiérrez, S.; Quintar, A. A.; Maldonado, C. A.; Torres, A. I. (2012). Immunoelectron Microscopy: A Reliable Tool for the Analysis of Cellular Processes. En: Dehghani, H., ed. *Applications of Immunocytochemistry*. Rijeka, Croatia: InTech, 66-96.

Del Brío León, M. A.; Riera Rovira, P. (1995). *Manual de Bases Teórico-Prácticas de Inmunocitoquímica*. Oviedo: Servicio de publicaciones de la Universidad de Oviedo.

Dubochet, J.; Adrian, M.; Chang, J. J.; Homo, J. C.; Lepault, J.; McDowell, A. W.; Schultz, P. (1988). Cryoelectron microscopy of vitrified specimens. *Q Rev Biophys*, 21: 129-228.

Dykstra, M. J.; Reuss, L. E. (2003). *Biological Electron Microscopy. Theory, Techniques and Troubleshooting*. Nueva York: Springer.

- Eldred, W. D.; Zucker, C.; Karten, H. J.; Yazulla, S. (1983). Comparison of fixation and penetration enhancement techniques for use in ultrastructural immunocytochemistry. *J Histochem Cytochem*, 31: 285-292.
- Gan, L.; Jensen, G. J. (2012). Electron tomography of cells. *Q Rev Biophys*, 45: 27-56.
- Gilkey, J. C.; Staehelin, L. A. (1986). Advances in ultrarapid freezing for the preservation of cellular ultrastructure. *J Electron Microsc Tech*, 3: 177-210.
- Griffiths, G. (1993). *Fine Structure Immunocytochemistry*. Springer.
- Hainfeld, J. (1990). TSEM analysis of Janssen Auroprobe One. En G. Bailey, ed. *Proc XIIth Int Congr Electron Microsc*. San Francisco: San Francisco Press, 954-955.
- Hainfeld, J.; Furuya, F. (1992). A 1.4-nm gold cluster covalently attached to antibodies improves immunolabeling. *J Histochem Cytochem*, 40: 177-184.
- Hainfeld, J.; Powell, R. D. (2000). New Frontiers in Gold Labeling. *J Histochem Cytochem*, 48: 471-480.
- Hayat, M. A. (1991). *Colloidal Gold. Principles, Methods, and Applications*. 3. San Diego, California: Academic Press.
- Hoge, G. J.; Davidson, K. G.; Yasumura, T.; Castillo, P. E.; Rash, J. E.; Pereda, A. E. (2011). The extent and strength of electrical coupling between inferior olivary neurons is heterogeneous. *J Neurophysiol*, 105: 1089-1101.
- Hurbain, I.; Sachse, M. (2011). The future is cold: cryopreparation methods for transmission electron microscopy of cells. *Biol Cell*, 103: 405-420.
- Jahn, K. A.; Barton, D. A.; Kobayashi, K.; Ratinac, K. R.; Overall, R. L.; Braet, F. (2012). Correlative microscopy: providing new understanding in the biomedical and plant science. *Micron*, 43: 565-582.
- Karreman, M. A.; Agronskaia, A. V.; van Donselaar, E. G.; Vocking, K.; Fereidouni, F.; Humbel, B. M.; Verrips, C. T.; Verkleij, A. J.; Gerritsen, H. C. (2012). Optimizing immuno-labeling for correlative fluorescence and electron microscopy on a single specimen. *J Struct Biol*, 180: 382-6.
- Karreman, M. A.; Van Donselaar, E. G.; Gerritsen, H. C.; Verrips, C. T.; Verkleij, A. J. (2011). VIS2FIX: a high-speed fixation method for immuno-electron microscopy. *Traffic*, 12: 806-814.

Kharazia, V. N.; Weinberg, R. J. (1999). Immunogold localization of AMPA and NMDA receptors in somatic sensory cortex of albino rat. *J. Comp. Neurol*, 412: 292-302.

Kramarcy, N. R.; Sealock, R. (1991). Commercial preparations of colloidal gold-antibody complexes frequently contain free active antibody. *J Histochem Cytochem*, 39: 37-39.

Leunissen, J. L.; Yi, H. (2009). Self-pressurized rapid freezing (SPRF): a novel cryofixation method for specimen preparation in electron microscopy. *J Microsc*, 235: 25-35.

Lorincz, A.; Nusser, Z. (2008). Specificity of Immunoreactions: The Importance of Testing. *J Neurosci*, 28: 9083-9086.

Loussert Fonta, C.; Leis, A.; Mathisen, C.; Bouvier, D. S.; Blanchard, W.; Volterra, A.; Lich, B.; Humbel, B. M. (2015). Analysis of acute brain slices by electron microscopy: a correlative light-electron microscopy workflow based on Tokuyasu cryosectioning. *J Struct Biol*, 189: 53-61.

Luo, R. Z.; Beniac, D. R.; Fernandes, A.; Yip, C. C.; Ottensmeyer, F. P. (1999). Quaternary structure of the insulin-insulin receptor complex. *Science*, 285: 1077-1080.

Maldonado, C.; Aoki, A. (1986). Influence of embedding media in prolactin labelling with immunogold techniques. *Histochem J*, 18: 429-433.

Maldonado, C.; Saggau, W.; Forssmann, W. (1986). Cardiodilatin-immunoreactivity in specific atrial granules of human heart revealed by the immunogold stain. *Anat. Anat Embryol (Berl)*, 173: 295-298.

Martín-Lacave, I.; García-Caballero, T. (2012). *Atlas de Inmunohistoquímica. Caracterización de células, tejidos y órganos normales*. Díaz Santos.

Mielanczyk, L.; Matysiak, N.; Michalski, M.; Buldak, R.; Wojnicz, R. (2014). Closer to the native state. Critical evaluation of cryotechniques for Transmission Electron Microscopy: preparation of biological samples. *Folia Histochem Cytobiol*, 52: 1-17.

Monaghan, P.; Perusinghe, N.; Müller, M. (1998). High-pressure freezing for immunocytochemistry. *J Microsc*, 192: 248-258.

Orgnero de Gaisán, E.; Maldonado, C.; Díaz Gavier, M.; Aoki, A. (1997). Diversity of pituitary cells in primary cell culture. An immunocytochemical study. *Ann Anat*, 179: 453-460.

Robenek, H.; Severs, N. J. (2008). Recent advances in freeze-fracture electron microscopy: the replica immunolabeling technique. *Biological Procedures Online*, 10: 9-19.

- Sabanay, I.; Arad, T.; Weiner, S.; Geiger, B. (1991). Study of vitrified, unstained frozen tissue sections by cryoimmunoelectron microscopy. *J Cell Sci*, 100: 227-236.
- Skepper, J. N. (2000). Immunocytochemical strategies for electron microscopy: choice or compromise. *J Microsc*, 199: 1-36.
- Stradalova, V.; Gaplovska-Kysela, K.; Hozak, P. (2008). Ultrastructural and nuclear antigen preservation after High Pressure freezing/freeze-substitution and low-temperature LR White embedding of HeLa cells. *Histochem Cell Biol*, 130: 1047-1052.
- Studer, D.; Humbel, B. M.; Chiquet, M. (2008). Electron microscopy of high pressure frozen samples: bridging the gap between cellular ultrastructure and atomic resolution. *Histochem Cell Biol*, 130: 877-889.
- Takizawa, T.; Robinson, J. M. (1994). Use of 1.4-nm immunogold particles for immunocytochemistry on ultra-thin cryosections. *J Histochem Cytochem*, 42: 1615-1623.
- Tivol, W. F.; Briegel, A.; Jensen, G. J. (2008). An Improved Cryogen for Plunge Freezing. *Microsc Microanal*, 14: 375-379.
- Tokuyasu, K. (1973). A technique for ultracryotomy of cell suspensions and tissues. *J Cell Biol*, 57: 551-565.
- Toole, G.; Toole, S. (2004). *Essential AS Biology for OCR*. Croatia: Nelson Thornes.
- Van Weering, J. R.; Brown, E.; Sharp, T. R.; Mantell, J.; Cullen, P. J.; Verkade, P. (2010). Intracellular membrane traffic at high resolution. *Methods Cell Biol*, 96: 619-648.
- Watanabe, T.; Nishimura, K.; Monir, M. M.; Takemoto, C.; Hiramatsu, K. (2014). Immunoelectron Microscopic Observation of Chicken Glucagon-Like Peptide (GLP)-1-Containing Cells in Tissues Derived from Thin Section, Paraffin Block and Conventional Method. *J Vet Med Sci*, 76: 389-394.
- Wilson, S. M.; Bacic, A. (2012). Preparation of plant cells for transmission electron microscopy to optimize immunogold labeling of carbohydrate and protein epitopes. *Nat Protoc*, 7: 1716-1727.
- Yi, H.; Leunissen, J. L.; Shi, G.; Gutekunst, C.; Hersch, S. M. (2001). A Novel Procedure for Pre-embedding Double Immunogold–Silver Labeling at the Ultrastructural Level. *J Histochem Cytochem*, 49: 279–283.
- Zuber, C.; Fan, J.; Guhl, B.; Roth, J. (2005). Applications of Immunogold Labeling in Ultrastructural Pathology. *Ultrastructural Pathology*, 29: 319–330.

## Anexos

### Protocolo I. Método de postinclusión (De Paul et ál., 2012)

#### 1. Fijación.

- Sumergir las muestras en una mezcla de glutaraldehído 1,5% (v/v) y formaldehído 4% (w/v) en tampón cacodilato 0,1 M, pH 7,3, a temperatura ambiente durante 5-6 horas. Se debe omitir la postfijación con osmio.
- Eliminar el fijador y lavar tres veces en tampón de lavado fosfato de sodio 0,1 M, PBS (tampón fosfato salino) y pH 7,4.

#### 2. Deshidratación e inclusión.

- Deshidratar los trozos de tejido o los precipitados celulares en una sucesión de concentraciones crecientes de etanol: 50%, 70% y 90%, durante 15 min cada una.
- Eliminar el 90% de etanol e impregnar con una mezcla de *LR-White* y etanol al 90% (1:1). Agitar suavemente en un rotor durante 2 h.
- Eliminar la mezcla y reemplazar por una inclusión 100% en *LR-White*, dejar toda la noche a 4°C. Garantizar que las piezas de tejido permanecen completamente cubiertas en la resina de inclusión.
- Transferir las muestras a cápsulas de gelatina rellenas con *LR-White*, tapar y polimerizar en un horno a 55°C durante 24 h.

#### 3. Seccionamiento con el vibratomo.

- Cortar los bloques de *LR-White* para formar una pirámide y obtener secciones semifinas (150-200 nm) que pueden ser examinadas a LM después de ser teñidas con una solución de azul de toluidina (30 s es suficiente).
- Cortar los bloques para el inmunomarcaje a EM, formando una pirámide pequeña con la región que contiene la muestra seleccionada de las secciones semifinas.
- Obtener secciones ultrafinas (60-90 nm) con un cuchillo de diamante y montar las secciones en una rejilla de níquel (250 aperturas). Guárdala en un estuche para rejillas a temperatura ambiente.
- Para inactivar los grupos aldehído residuales, incubar las rejillas en gotas de glicina 0,05 M en tampón PBS durante 10-20 min.

#### 4. Procedimiento de inmunomarcaje.



- Transferir las rejillas a gotas de PBS-BSA al 1% (tampón de bloqueo) localizadas en un trozo de Parafilm, e incubar dentro de una cámara húmeda en una placa Petri durante 30 min a temperatura ambiente con el fin de bloquear sitios inespecíficos.
- Incubar las rejillas en 50  $\mu$ L de Ac primario específico diluido con tampón de bloqueo, seguido por una incubación durante toda la noche en una cámara húmeda a 4°C.
- Lavar las rejillas con PBS bajo un chorro utilizando un bote de lavado durante 2 min.
- Incubar las rejillas en una gota de 50  $\mu$ L de proteína A/complejo de oro coloidal (16 nm) o complejo oro coloidal-IgG (disponible en 6, 10 o 15 nm) diluido en tampón de bloqueo (1:20), durante 30 min a 37°C.
- Lavar las rejillas con PBS bajo un chorro utilizando un bote de lavado y entonces con agua destilada.

#### 5. Marcaje de contraste para EM.

- Incubar las rejillas con una gota de solución acuosa saturada de acetato de uranilo durante 1 min, y entonces lavar con agua destilada.
- Utilizar citrato de plomo si se necesita mayor contraste.
- Examinar las secciones ultrafinas inmunomarcadas a TEM.

### **Protocolo II. Método de preinclusión (De Paul et ál., 2012)**

El inmunomarcaje con oro correspondiente a este protocolo se realiza en células de la pituitaria, vivas e intactas, para localizar Ag en las superficies celulares.

#### 1. Procedimiento de inmunomarcaje.

- Eliminar el medio de cultivo de una placa de 35 mm con una confluencia celular del 70-80% y aclarar ligeramente con una solución salina tamponada de Hank, pH 7,0 (HBSS).
- Bloquear los Ag inespecíficos utilizando PBS-BSA al 1% (tampón de bloqueo), pH 7,4, durante 15 min a 37°C.
- Incubar las monocapas celulares con Ac primarios adecuados diluidos en HBSS, pH 7,0 durante 1 h a 37°C.
- Lavar tres veces con HBSS.
- Bloquear los sitios inespecíficos incubando con tampón de bloqueo durante 15 min a 37°C.
- Incubar las monocapas celulares con un Ac secundario adecuado conjugado con partículas de oro (16 nm) diluido en tampón de bloqueo (1:20), durante 60 min a 37°C.

- Lavar tres veces con HBSS.
- Elevar las células aplicando una rozadura suave con el fin de minimizar el golpe.
- Centrifugar la suspensión celular a 1.000 rpm (revoluciones por minuto) durante 5 min para precipitar.

## 2. Fijación.

- Fijar el precipitado celular con una mezcla de formaldehído al 4%, 1,5% de glutaraldehído en 0,1 M de tampón cacodilato, pH 7,0 más 7% de sacarosa durante 2 h a temperatura ambiente.
- Lavar tres veces en tampón cacodilato 0,1 M, pH 7,4 conteniendo 7% de sacarosa, 5 min cada lavado.
- Postfijar con tetróxido de osmio al 1% en tampón cacodilato durante 1 h, en un rotor a temperatura ambiente.
- Aclarar el precipitado celular dos veces en tampón acetato 0,1 M, pH 5,2.
- Teñir con 1% de acetato de uranilo en tampón acetato 0,1 M, pH 5,2, durante 20 min (tinción de bloqueo).

## 3. Deshidratación y seccionamiento por inclusión.

- Deshidratar con una serie graduada de acetonas frías (4°C): 50%, 70%, 90%, 10 min cada una; seguido por acetona al 100% (tres veces, 15 min cada paso).
- Llevar a cabo la preinclusión en araldita pura/acetona al 100% (1:1), dejar toda la noche cubierto en un rotor.
- Realizar la preinclusión en 100% araldita fresca, 60 min en un rotor.
- Incrustar en 100% araldita fresca utilizando moldes planos para inclusión (poner etiquetas escritas a máquina o con lápiz con el fin de identificar la muestra). Colocar en un horno a 60°C durante 24-48 h.
- Obtener secciones ultrafinas (60-90 nm) con un cuchillo de diamante y montar las secciones en una rejilla de níquel (250 aperturas). Guárdala en un estuche para rejillas a temperatura ambiente.

## 4. Marcaje de contraste para EM.

- Teñir las secciones ultrafinas con acetato de uranilo alcohólico/citrato de plomo.
- Examinar las secciones ultrafinas inmunomarcadas a TEM.

## **Protocolo III. Método de Tokuyasu (Van Weering et ál., 2010)**

1. Fijación química.
  - Combinaciones de paraformaldehído y glutaraldehído en tampón fosfato de Sorensen (más fuerte que el PBS). Se aconseja probar con diferentes concentraciones de ambos compuestos.
2. Inclusión en gelatina para estabilizar la muestra.
3. Corte de los bloques.
4. Inclusión de la muestra en una solución de sacarosa 2,3 M.
5. Montaje en chinchetas para muestras biológicas.
6. Congelación en nitrógeno líquido (LN<sub>2</sub>).
7. Recorte de la superficie de la sección.
8. Crioseccionamiento con un crioultramicrotomo.
  - Las secciones ultrafinas son mantenidas a temperaturas bajas, generalmente de entre -100°C a -120°C.
9. Recoger las secciones ultrafinas de la solución de sacarosa.
  - Normalmente, se sustituye solución por metilcelulosa para aportar soporte adicional.
10. Descongelación.
11. Almacenamiento de las secciones en rejillas revestidas con una película de carbón/Formvar, a 4°C.
12. Eliminación de la gelatina.
13. Inmunomarcaje.
  - Uso de Ac unidos a marcadores electrodensos, como el oro coloidal.
14. Colorante de contraste.
  - Uso de acetato de uranilo para mejorar el contraste a TEM.
15. Análisis a TEM.