



ZTF-FCT
Zientzia eta Teknologia Fakultatea
Facultad de Ciencia y Tecnología

GRADO DE BIOLOGÍA

TRABAJO DE FIN DE GRADO

**DESARROLLO DE NUEVAS TÉCNICAS
HISTOLÓGICAS PARA EL MARCAJE DE
CÉLULAS BASÓFILAS EN GLÁNDULA
DIGESTIVA DE MEJILLÓN**

Gabriela González Iglesias

Leioa, Septiembre de 2014

eman ta zabal zazu



Universidad
del País Vasco

Euskal Herriko
Unibertsitatea

ÍNDICE

1. RESUMEN/ABSTRACT.....	3
2. INTRODUCCIÓN.....	4
3. HIPÓTESIS.....	8
4. OBJETIVO.....	9
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	9
5.1 Diseño experimental.....	9
5.2 Procesamiento del tejido.....	9
5.3 Tinciones para la identificación de células basófilas.....	11
5.4 Observación al microscopio.....	14
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	14
6.1 Influencia del grosor de los cortes realizados en el microtomo.....	14
6.2 Tinciones.....	17
7. CONCLUSIONES.....	21
8. BIBLIOGRAFÍA.....	21

1. RESUMEN

El aumento relativo de células basófilas en el epitelio de la glándula digestiva de mejillón se utiliza como un biomarcador a nivel de estrés general para analizar los efectos biológicos de la contaminación ambiental. Aunque las técnicas que se utilizan para identificar las células basófilas están aceptadas, existe un margen de mejora, por esta razón se ha realizado este trabajo, para contribuir a la mejora de las técnicas de tinción y corte, con el fin de facilitar la visualización y la medición de las células basófilas de la glándula digestiva en *Mytilus galloprovincialis*. Sería de gran ayuda obtener una técnica histológica específica para marcar y medir el número de células basófilas y para ello se han utilizado las siguientes tinciones: Hematoxilina Eosina, Tricrómico de Masson, Histoquímica de Lectinas (HRP Conjugated Dolichos biflorus Lectin), Inmunohistoquímica de una proteína ribosómica y Azul de Toluidina con contraste de Eosina. A parte de las tinciones, se ha analizado la influencia del grosor del corte y de la fijación con nitrógeno líquido, formalina y Carnoy. Tras los resultados obtenidos, se concluye que el grosor más apropiado es a 3 μm y la técnica más adecuada es la tinción con Azul de Toluidina con contraste de Eosina.

ABSTRACT

The relative increase of basophilic cells in the epithelium of the digestive gland of mussels is used as a biomarker to overall stress level, to analyze the biological effects of environmental pollution. Although the techniques that are used to identify basophilic cells are accepted, but they can improve, therefore it has done this work, to contribute to the improvement of staining and cut techniques, in order to facilitate visualization and measuring basophilic cells of the digestive gland in *Mytilus galloprovincialis*. It would help a histological specific technique to mark and measure the number of basophilic cells and for that we have used the following stains: Hematoxylin Eosin, Masson's Trichrome, Histochemistry of Lectins (HRP Conjugated Dolichos biflorus Lectin), Immunohistochemistry for a ribosomal protein and Toluidine Blue with Eosin contrast. A part from staining, we analyzed the influence of slice thickness and fixation with liquid nitrogen, formalin and Carnoy. Following the results obtained, it is concluded that the most appropriate thickness is 3 μm and most suitable technique is Toluidine Blue with eosin contrast staining.

2. INTRODUCCIÓN

En los últimos años, los niveles de contaminantes en el medio marino se han incrementado como consecuencia de las actividades antropogénicas. La contaminación marina se podría definir como "la introducción por el hombre, directa o indirectamente, de sustancias o de energía en la zona marina que resulten o pueda suponer un riesgo para la salud humana, perjudicar los recursos vivos y los ecosistemas marinos y el deterioro de instalaciones o la interferencia con otros usos legítimos del mar" (OSPAR Comisión 2000).

Los bivalvos y peces son los animales más utilizados para la evaluación de la salud del medioambiente marino. A estos se les denomina organismos centinelas. Principalmente, los mejillones han sido ampliamente utilizados en el monitoreo de la contaminación marina (OSPAR Comisión 2000). Las características de los mejillones son excepcionales para su uso en este tipo de estudios, porque:

- Son organismos comunes en las comunidades costeras y estuarios y tienen una amplia distribución geográfica a lo largo de la mayoría de las zonas costeras del mundo.
- Son sedentarios y, por lo tanto, son mejores que las especies móviles como integradores de la contaminación en un área determinada.
- Son relativamente tolerantes (pero no insensibles) a una amplia gama de condiciones ambientales, incluyendo niveles moderadamente altos de la mayoría de los tipos de contaminantes.
- Son filtradores, capaces de acumular contaminantes en sus tejidos.
- En comparación con los peces y crustáceos, los bivalvos tienen una actividad metabólica muy baja, y por lo tanto, las concentraciones de contaminantes en los tejidos de los bivalvos reflejan más exactamente la magnitud de la contaminación del medio ambiente.
- Son una especie de importancia comercial de mariscos a nivel mundial y, por tanto, hay un problema de salud pública y económica.
- Demuestran ser los organismos adecuados, no sólo para evaluar la biodisponibilidad de contaminantes, sino también los efectos de los contaminantes.
- Son fáciles de mantener en condiciones aceptables en el laboratorio, lo que permite su experimentación.

Por estas razones, a menudo se utilizan como organismos centinelas en los se han aplicado biomarcadores.

El análisis químico del agua y de los sedimentos puede revelar la presencia de contaminantes, pero no hacen reflejar los efectos de la contaminación en la biota. Por esta razón, la monitorización de los efectos biológicos de los contaminantes en el medio ambiente se ha convertido un tema importante en los últimos años (Holdway et al., 1995). Para ello, se han desarrollado metodologías que incluyen técnicas para la cuantificación de los efectos biológicos causados por contaminantes, como los biomarcadores. Varias organizaciones internacionales y agencias gubernamentales han recomendado que el uso de biomarcadores en la evaluación de la contaminación del medio ambiente (ICES 2012; OSPAR Comision 2000). Estos se están aplicando a gran escala en los programas de vigilancia de la salud de los ecosistemas (Marigómez et al., 2013). Según la definición que le dan McCarthy y Shugart (1990): "*Los biomarcadores son mediciones de fluidos corporales, células o tejidos que indican en términos de bioquímica o células, términos de la presencia de contaminantes (biomarcadores de exposición) o la magnitud del anfitrión respuesta (biomarcadores de efectos)*". Según Peakall (1992) el término biomarcador sirve para discutir los efectos relacionados con los organismos individuales y el termino "bioindicador" en relación con los efectos medidos en los niveles de población o de la comunidad. La inclusión de biomarcadores se ha propuesto como una adición al proceso de evaluación en el campo, ya que ofrecen la posibilidad de evaluar la salud general de organismos que habitan en ecosistemas afectados, y por lo tanto, para proporcionar una medida de la salud del medio ambiente (Galloway et al., 2006). Debido al corto tiempo que se necesita entre la exposición a una sustancia química y las respuestas biológicas, los biomarcadores son utilizados como señales de alerta temprana de los efectos biológicos causados por contaminantes en el medio ambiente, que pueden predecir los cambios en los niveles más complejos de organización biológica, es decir, poblaciones, comunidades o ecosistemas (Cajaraville et al., 1998).

La glándula digestiva de los moluscos es un órgano diana para la evaluación en toxicológica ambiental. Se acumulan muchos tipos de contaminantes y participa activamente en procesos de desintoxicación y eliminación de xenobióticos (Marigómez et al., 2002). La glándula digestiva se organiza en grupos de unidades alveolo-tubulares vinculados con el estómago por conductos primarios y secundarios (Fig. 1). Las unidades alveolo-tubulares están constituidas por el epitelio digestivo.

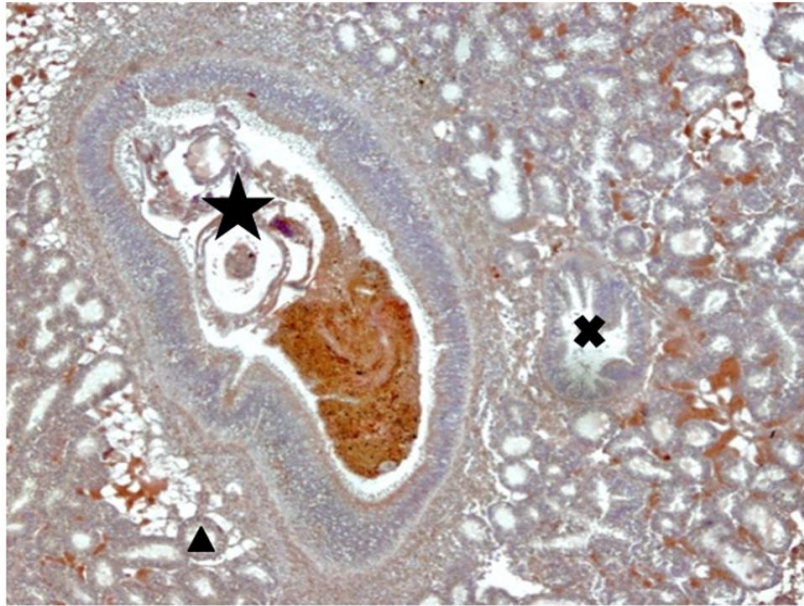


Fig. 1: Micrografía de la glándula digestiva de mejillón, estómago (representado mediante una estrella) y unidades alveolo-tubulares vinculados con el estómago por conductos primarios (representado mediante una cruz) y secundarios (representado mediante un triangulo). Dentro de las unidades alveolo-tubulares se encuentran las células digestivas y las células basófilas. (Aumento 4X).

Este epitelio está compuesto por dos tipos de células, células digestivas y células basófilas (Fig. 2). Las células digestivas, que son acidófilas y tienen forma alargada, se caracterizan por tener un sistema endo-lisosomal bien desarrollado y están involucradas principalmente en la digestión intracelular de los alimentos (Cajaraville et al., 1995a) y la desintoxicación de xenobióticos (Robledo et al., 1997), mientras que las células basófilas, que se caracterizan por tener una forma piramidal, se cree que son células secretoras que contribuyen a la digestión extracelular y a la regulación metabólica (Marigómez et al., 1995b), además poseen abundante retículo endoplásmico rugoso que las hace basófilas (Robledo et al., 1997). En condiciones normales, las células digestivas son mucho más abundantes que las células basófilas, pero ante la exposición de un contaminante puede provocar alteraciones de tipo celular, con un aumento evidente en el número relativo de células basófilas. Esta alteración parece ser la consecuencia de una pérdida neta de células digestivas en los moluscos. El aumento relativo de células basófilas se ha utilizado como un biomarcador a nivel de estrés general (Zaldibar et al., 2007) y puede ser indicativo de alteraciones en la digestión y el metabolismo (Marigómez et al., 2004).

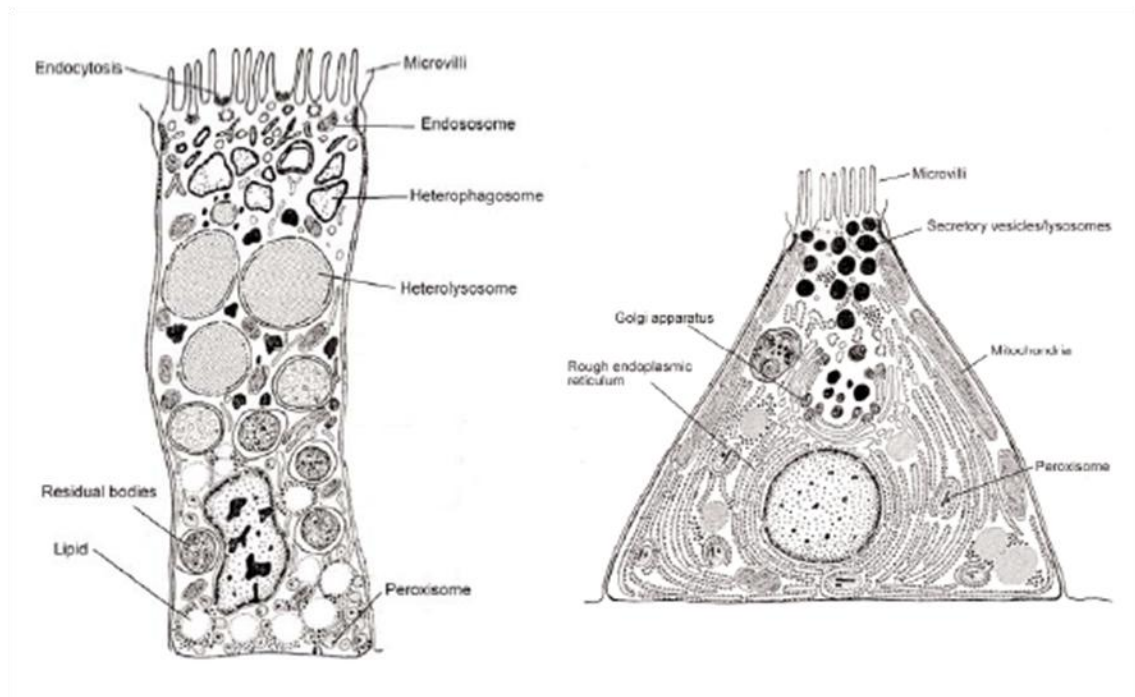


Fig. 2: Vista esquemática de la ultraestructura de los dos tipos de células del epitelio digestivo de los bivalvos. (Modificado de Owen 1973). A) Célula digestiva con un sistema de endo-lisosómico desarrollado. B) Célula basófila con un aparato de Golgi bien desarrollado y abundante retículo endoplasmático rugoso.

La altura del epitelio de la glándula digestiva del mejillón puede cambiar según las condiciones ambientales o las fases de la digestión (Fig. 3). La altura del epitelio varía en individuos que están expuestos a la contaminación y en condiciones de estrés (Marigómez et al., 2006). En general, los moluscos que están expuestos a contaminantes, presentan una pérdida de la masa neta en el epitelio de la glándula digestiva, que se convierte en más delgado (Lowe et al., 1981). En estos casos, las células basófilas son más difíciles de identificar. Las células basófilas, independientemente de las diferentes condiciones ambientales, y fases de digestión, se deberían de identificar igualmente para poder interpretar correctamente los cambios producidos por la contaminación.

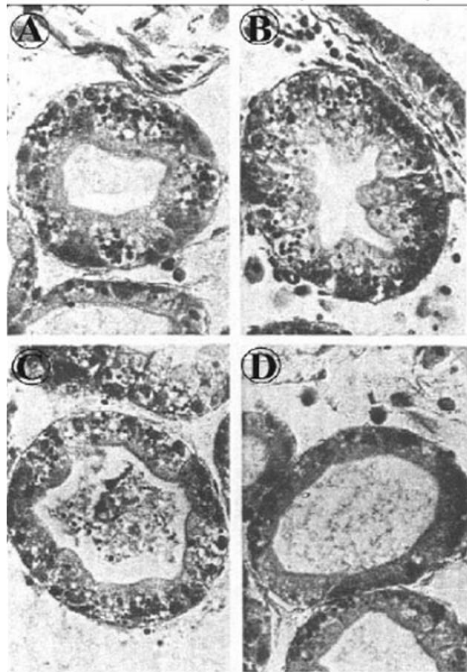


Fig. 3: Diferente morfología del epitelio digestivo a través del proceso de la digestión (Izaguirre 2007).

A) Mantenimiento o fase I.

B) Absorción o fase II.

C) Desintegración o fase III.

D) Reconstrucción o fase IV.

Aunque las técnicas que se utilizan para identificar las células basófilas están ampliamente aceptadas, debido a que la identificación de células basófilas resulta en ocasiones compleja, existe un margen de mejora, y por esta razón se ha realizado este trabajo, para optimizar las técnicas de tinción y corte, con el fin de facilitar el marcaje y la identificación de las células basófilas. Conseguir una técnica histológica específica para el marcaje de células basófilas de la glándula digestiva de mejillón es de gran importancia y de gran ayuda, para poder cuantificar con mayor fiabilidad este tipo de células, lo que aumentará la precisión de las mediciones y en consecuencia, de la evaluación de la salud de los ecosistemas. Además, si la tinción específica lograda ofrece un buen contraste, sería posible automatizar la medición de células basófilas, posibilitando realizar las mediciones de forma más rápida.

3. HIPÓTESIS

El desarrollo de nuevas técnicas histológicas específicas o la adaptación de alguna existente, resulta necesario para realizar una adecuada identificación de las células basófilas presentes en el epitelio digestivo de la glándula digestiva de mejillón. De esta forma, se logrará realizar una cuantificación automatizada mediante análisis de imagen de la densidad volumétrica de las células basófilas que permitirá reducir costes y tiempo de análisis, además de aumentar la calidad de los resultados para la evaluación del estado general de salud de zonas costeras y estuarinas.

4. OBJETIVO

El objetivo principal de éste trabajo es contribuir a la mejora del procesamiento de las muestras histológicas (fijación, corte y tinción), para facilitar la identificación de las células basófilas en la glándula digestiva de mejillón *Mytilus galloprovincialis* y así poder interpretar con mayor fiabilidad el efecto biológico de la contaminación para evaluar el estado de salud del medio ambiente.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Diseño experimental

Mejillones *Mytilus galloprovincialis* (3,5 - 4,5 cm de longitud de concha) fueron recogidos en la ría de Plentzia (46° 26'N, 2° 55'W), y en el puerto deportivo de Arriluze (43°19'N, 3°05'W) (que es una zona que está considerada como punto de la contaminación local crónica (Marigómez et al., 2013)), en el Golfo de Vizcaya al NE de la Península Ibérica (España).

Para conseguir condiciones diferentes y obtener diversidad en la muestra, unos mejillones se mantuvieron en la Estación Marina de Plentzia (PiE) durante un largo periodo de tiempo forzando una situación límite de salud, estas condiciones hacen que el epitelio no se vea siempre igual, porque se producen cambios en la glándula digestiva. Otros se recogieron en Plentzia y en Arriluze, en marea baja y se diseccionaron directamente en el campo.

5.2 Procesamiento del tejido

De cada mejillón se cogió la glándula digestiva, se metieron en los cassettes y fueron fijadas con diferentes fijadores:

Tejido fijado en formalina

Siguiendo un protocolo establecido, para la fijación de 20 glándulas digestivas de mejillón, (una glándula digestiva en cada cassette) fue necesario preparar un litro de formalina, para ello se necesitaron 100 ml de Formaldehido, 28,92 g de tampón fosfato $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ y 2,56 g de

tampón fosfato $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, se neutralizó hasta lograr un $\text{pH} = 7,2$, y se enrasó con H_2O hasta un litro. Las muestras, según el protocolo establecido, se mantuvieron 24 horas en la cámara fría a 5°C en formalina y después se pasaron a alcohol de 70° .

Tejido fijado en Carnoy

El Carnoy es una disolución fijadora compuesta por alcohol absoluto (60%), cloroformo (30%) y ácido acético glacial (10%). Siguiendo las recomendaciones de los investigadores del PiE y según el protocolo establecido, para preparar un litro de disolución fijadora de Carnoy, hay que mezclar 60 cl de alcohol absoluto, 30 cl de cloroformo y 10 cl de ácido acético glacial.

Tejido congelado en nitrógeno líquido

Se metieron las glándulas digestivas en crioviales, se congelaron con nitrógeno líquido a -196°C y se conservaron en un frigorífico a -40°C . El tejido congelado se cortó en un criostato Leica CM3000 a $8 \mu\text{m}$ y a temperatura de -26°C , conservando así, la estructura de la proteína y la actividad histoquímica, para poder realizar las técnicas de Inmunohistoquímica de proteína ribosómica y Histoquímica de Lectinas.

Después el tejido fijado mediante formalina y Carnoy se procesó de manera rutinaria en el *Tissue Processor* (LEICA ASP 300S) y los pasos de procedimiento son los siguientes: 1. Sumergir en alcohol de 70° durante 1 hora, 2. Sumergir en alcohol de 96° durante 1 hora, 3. Sumergir en alcohol de 96° durante 1 hora, 4. Sumergir en alcohol absoluto durante 1 hora, 5. Sumergir en alcohol absoluto durante 1 hora, 6. Sumergir en IMS (1/2 alcohol absoluto 1/2 xilol) durante 1 hora, 7. Sumergir en xilol durante 1 hora, 8. Sumergir en xilol durante 1 hora, y 9. Sumergir en parafina durante 6 horas (dividido en tres pasos de dos horas cada uno), en total 14 horas y posteriormente se incluyeron en parafina y se dejaron enfriar durante una hora según el protocolo establecido.

Se usaron bloques de parafina para hacer sets de 10 cortes seriados de 1 a $10 \mu\text{m}$. Sabiendo que la tinción de Hematoxilina Eosina es la tinción más utilizada para el marcaje de basófilas, las muestras se tiñeron con Hematoxilina Eosina siguiendo el protocolo estándar llevado a cabo en el laboratorio, y para ello se usó LEICA AUTOSTAINER XL. Unas muestras fueron teñidas con la primera variante de Hematoxilina Eosina y otras con la segunda variante de Hematoxilina Eosina. Después de observar en el microscopio los resultados de los cortes, se decidió cortar todas las muestras a $3 \mu\text{m}$ para realizar el resto de las tinciones, ya que es el grosor más apropiado para el marcaje de basófilas. Todas estas muestras fueron cortadas en el microtomo LEICA RM 2125RTS.

5.3 Tinciones para la identificación de células basófilas

Para este trabajo se usaron estas tinciones para la visión y el marcaje de células basófilas: Hematoxilina Eosina, Tricrómico de Masson, Histoquímica de Lectinas (HRP Conjugated Dolichos biflorus Lectin), Inmunohistoquímica de proteína ribosómica y Azul de Toluidina con contraste de Eosina.

Hematoxilina Eosina o Tinción de Harris

Las muestras se tiñeron mediante la máquina automática *Autostainer* (LEICA AUTOSTAINER XL), siguiendo el siguiente protocolo; xilol durante 10 minutos dos veces, alcohol absoluto durante 2 minutos dos veces, alcohol de 96° durante 2 minutos, alcohol de 70° 2 minutos, agua destilada durante 5 minutos, Hematoxilina durante 4 minutos, agua destilada durante 4 minutos, lavado de alcohol ácido durante 10 segundos para quitar la Hematoxilina sobrante de la muestra y agua durante 5 minutos, con el alcohol ácido el pH de la muestra baja mucho, por lo tanto, se neutralizó con Li_2CO_3 durante 10 segundos, para estabilizar y neutralizar las muestras y se lavó con agua 1 minuto, Eosina durante un 1 minuto y 30 segundos, lavado durante 1 minuto y 30 segundos y alcohol de 70° durante 5 segundos, alcohol de 96° durante diez segundos, alcohol absoluto durante 15 segundos dos veces y por último xilol durante 1 minuto dos veces. Finalmente las secciones se montaron con DPX (Distyrene Plasticizer Xylene).

Se realizó una variación de la anterior tinción de Hematoxilina Eosina, suprimiendo los pasos de lavado de alcohol ácido y el de estabilización con Li_2CO_3 , con el objetivo de obtener una mayor intensidad de la Hematoxilina, para marcar de forma más clara las células basófilas de la glándula digestiva del mejillón. Estas 2 tinciones se realizaron con tejido fijado en formalina.

Primera variante de la tinción de Tricrómico de Masson-Goldner

La glándula digestiva de mejillón incluida en parafina fue cortada a 3 μm . Las secciones se desparafinaron sumergiendo en xilol durante 10 minutos 2 veces, se hidrataron en alcohol absoluto 5 minutos, en alcohol de 96° durante 5 minutos, en alcohol de 70° durante 5 minutos y se lavaron con agua destilada 5 minutos. Seguidamente las secciones se tiñeron con Hematoxilina Groat (0,5 g de Hematoxilina disuelto en 50 ml de etanol 96° + 0,8 ml de ácido sulfúrico + 1 g de alumbre férrico + 50 ml de agua) durante 3 minutos, se lavaron en agua durante 5 minutos, y se sumergieron en fucsina acida de Ponceau durante 5 minutos (0,1 g de fucsina acida + 0,2 g de Ponceau + 300 ml de agua destilada + 0,6 ml de ácido acético glacial 1%). A continuación las secciones se sumergieron en ácido acético glacial 1% durante 20 segundos y fueron transferidas a ácido molíbdico naranja-G durante 5 minutos (2 g de naranja-G y 4 g de ácido fosfomolíbdico disueltos en 100 ml de agua). Posteriormente las secciones se lavaron en ácido acético glacial 1% durante 20 segundos, se

sumergieron en Fast Green (0,1 g de Fast Green en 100 ml de agua destilada) durante 1 minuto y se lavaron en ácido acético glacial 1% durante 20 segundos. Finalmente las secciones se deshidrataron y se montaron con DPX.

Esta tinción se realizó con tejido fijado en formalina.

Segunda variante de la tinción de Tricrómico de Masson-Goldner

Se realizó una segunda tinción de Tricrómico, variando algunos pasos del anterior protocolo. Las secciones de glándula digestiva de mejillón de 3 μm se desparafinaron, hidrataron y lavaron como se ha explicado anteriormente. A continuación las secciones se tiñeron con Hematoxilina de Harris durante 5 minutos, se lavaron con agua corriente durante 10 minutos, se sumergieron en fucsina de Ponceau durante 5 minutos y en ácido fosfomolibdico durante 5 minutos 2 veces. Seguidamente las secciones se contrastaron con Fast Green durante 5-7 minutos y por último se deshidrataron en alcohol de 70° durante 5 segundos, en alcohol de 96° durante 10 segundos y en xilol durante 1 minuto. Las secciones teñidas se montaron con DPX.

Esta tinción se realizó con tejido fijado en formalina.

Histoquímica de Lectinas (HRP Conjugated Dolichos biflorus Lectin)

La glándula digestiva de mejillón incluida en parafina fue cortada a 3 μm . Las muestras se desparafinaron sumergiendo en xilol durante 10 minutos 2 veces, se hidrataron en alcohol absoluto 5 minutos, en alcohol de 96° durante 5 minutos, en alcohol de 70° durante 5 minutos y se lavaron con agua destilada 5 minutos. Se bloqueó la peroxidasa endógena durante 30 minutos con H_2O_2 diluido al 0,3% en PBS (10 μl H_2O_2 + 990 μl PBS) (para hacer un litro de fosfato buffer salino (PBS): 8 g de NaCl + 200 mg de KCL + 230 mg de de tampón fosfato $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ + 3,4 g de tampón fosfato $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ + 1L H_2O destilada). Las secciones se lavaron durante 5 minutos 3 veces con PBS. Con el objetivo de optimizar el uso de la lectina (HRP Conjugated Dolichos biflorus Lectin (Horse Gram) –DBA) en la tinción, las secciones se incubaron durante 2 horas en la cámara húmeda y a temperatura ambiente, utilizando tres diluciones diferentes de lectinas 60 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (30 ml lectina + 470 μl PBS + 1% BSA (suero de albumina bovina)), 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (250 μl lectina + 250 μl PBS + 1% BSA), y 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (250 μl lectina + 250 μl PBS + 1% BSA), y el control negativo (PBS + 1% BSA). Las secciones se lavaron 5 minutos 3 veces con PBS. Para visualizar la reacción de la peroxidasa, las secciones se incubaron con AEC durante 10 minutos (200 μl de AEC en solución + 3,8 ml de sodio acetato (0,05 M pH 5,0) + 2 μl de H_2O_2 (%30 directamente de la botella)). Las secciones se lavaron con agua corriente durante 10 minutos. Para el contraste de las secciones se utilizaron Eosina y Fast Green, para optimizar la tinción final de las secciones. Por último se montó con glicerina.

Aparte de realizar la técnica de Histoquímica de Lectinas en tejido fijado en formalina, se hizo también en nitrógeno líquido, pero para contrastar se usó Hematoxilina de Mayer en vez de Eosina.

Inmunohistoquímica de Ribosomas

La glándula digestiva de mejillón incluida en parafina fue cortada a 3 μ m. Las secciones se desparafinaron sumergiendo en xilol durante 10 minutos 2 veces, se hidrataron en alcohol absoluto 5 minutos, en alcohol de 96° durante 5 minutos, en alcohol de 70° durante 5 minutos y se lavaron con agua destilada 5 minutos. Las secciones se sumergieron en PBS durante 2 minutos. Se bloqueó la peroxidasa endógena durante 5 minutos con H₂O₂ diluido al 3% (7,5 ml de H₂O₂ + 67,5 ml H₂O destilada). Las secciones se lavaron en PBS 2 minutos. A continuación, las secciones se incubaron con el anticuerpo primario previamente hidratado con agua ultra pura y diluido en PBS + 1% BSA durante 1 hora. En este estudio se utilizaron dos anticuerpos primarios producidos en conejo que se unen a ribosomas: SIGMA-ALDRICH AV33535-100UG, Anti-RPS16 (ab1) y SIGMA-ALDRICH AV40215-100UG, Anti-RPL8 (ab1). Las secciones se lavaron en PBS durante 5 minutos. Después las secciones se incubaron con el anticuerpo secundario (A9169 Biotinylated Goat anti-Rabbit IgG) diluido en 1/400 μ l con 1:20 PBS + 1% BSA en la cámara húmeda durante 30 minutos. Las secciones se lavaron con PBS durante 5 minutos. Las secciones se incubaron con la mezcla de AEC (200 μ l de AEC en solución (20 mg AEC disueltos en 2,5 ml de dimetilformamida) + 3,8 ml de sodio acetato (0,05 M pH 5,0) + 2 μ l de H₂O₂) durante 10 minutos en la cámara húmeda. Se detuvo la reacción sumergiendo las secciones en agua. Las secciones se contrastaron con Eosina o Fast Green. Por último se montó con glicerina.

Esta tinción se realizó con tejido fijado en formalina, Carnoy y nitrógeno líquido.

Azul de Toluidina con contraste de Eosina

La glándula digestiva de mejillón incluida en parafina fue cortada a 3 μ m. Las secciones se desparafinaron sumergiendo en xilol durante 10 minutos 2 veces, se hidrataron en alcohol absoluto durante 5 minutos, en alcohol de 96° durante 5 minutos, en alcohol de 70° durante 5 minutos y se lavaron con agua destilada durante 5 minutos. Se añadieron unas gotas de Azul de Toluidina encima del tejido se calentó en una placa térmica a 200°C, hasta que el borde de la gota de Azul de Toluidina adoptase un color dorado verdoso. Las secciones se lavaron en agua corriente para quitar el sobrante de Azul de Toluidina. Para lograr un buen contraste, se determinó que sumergiendo las secciones en Eosina durante 15 segundos la intensidad de Eosina lograda era la deseada. Y por último se montó con glicerina.

Esta tinción se realizó con tejido fijado en formalina.

5.4 Observación al microscopio

Para la observación de las diferentes muestras histológicas teñidas y cortadas a diferentes grosores, se hicieron las correspondientes micrografías mediante un microscopio óptico *Nikon Eclipse Ni*, usando una lente de objetivo de magnificación (40X). Para realizar y editar las imágenes se usó un programa especial llamado *NIS Elements F 3.2*.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Debido a que la identificación de células basófilas resulta en ocasiones compleja, existe un margen de mejora para optimizar las técnicas de tinción y corte, con el fin de facilitar el marcaje y la identificación de las células basófilas. Conseguir una técnica histológica específica para el marcaje de células basófilas de la glándula digestiva de mejillón es de gran importancia, para aumentar la precisión de las mediciones. Además, si la tinción específica lograda ofrece un buen contraste, sería posible automatizar la medición de células basófilas, posibilitando realizar las mediciones de forma más rápida. A continuación se analizarán todas técnicas realizadas evaluando su resultado.

6.1 Influencia del grosor de los cortes realizados en el microtomo

La primera evaluación fue la de la influencia del corte, los cortes de diferente grosor se teñieron con Hematoxilina Eosina que es la técnica que más se usa para la medición de células basófilas (Fig. 4). Los grosores de cortes anteriormente mencionados tienen mayor importancia de lo que se cree a la hora de observar en el microscopio las células basófilas, los grosores con los que mejor se visualizan las basófilas son 3 μm , 4 μm y 5 μm . Los cortes tales como 6, 7, 8, 9 y 10 μm , adquieren mucha saturación de color y no se pueden ver claramente las células basófilas, entonces cuanto más grosor tenga la muestra peor será la identificación, por lo tanto, los cortes más gruesos no se consideran válidos. Los cortes que son muy finos tales como 1 y 2 μm , no adquieren mucha coloración, porque no hay suficiente tejido, y esto hace que la visualización de las células basófilas sea confusa.

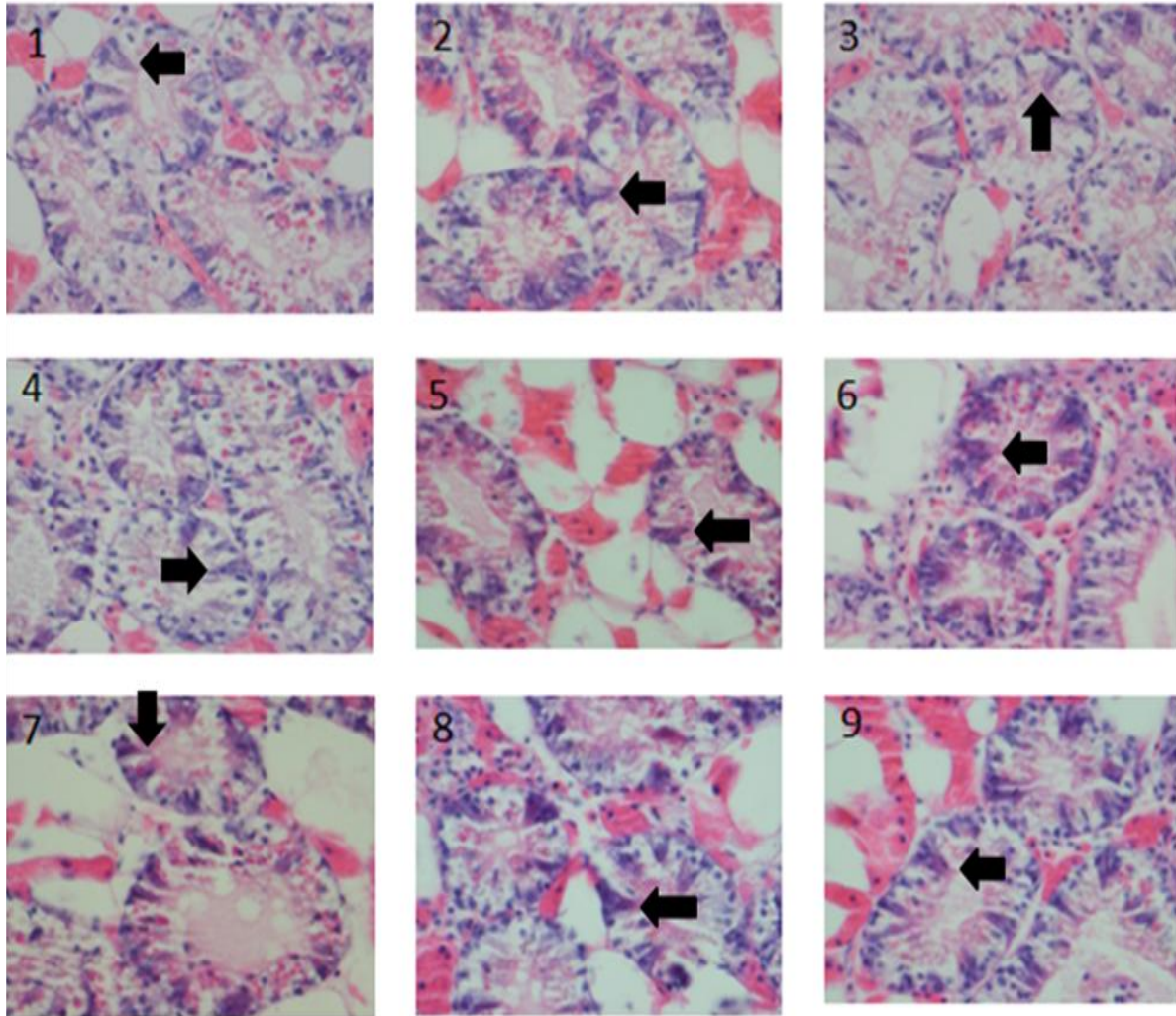


Fig. 4: 10 cortes seriados de 1 a 9 μm en orden, teñidos con la primera variante de Hematoxilina Eosina. (Aumento: 40X).

Por otra parte se ha detectado que a la hora de cortar en el microtomo hay un inconveniente a tener en cuenta. Cuando se va a cortar en el micrótopo las muestras se mantienen en una placa fría, para que estén más sólidas y el corte sea más eficaz, pero cuando se corta, al quitarlo del frío y ponerlo en temperatura ambiente, con el contraste la muestra enfriada se empieza a dilatar. Previamente se pone en el microtomo la medida exacta en la que se quiere cortar, pero como al tardar más de 20 segundos entre corte y corte, el segundo corte que se haga ya no va a ser el que marca el microtomo, el corte va a ser más grueso. Es una situación a tener en cuenta en la realización de cortes seriados. En la imagen (Fig. 5) se observan dos cortes diferentes de una misma muestra con el mismo grosor, la imagen de la derecha (B) adquiere bastante más coloración que la de la izquierda (A), y esto se debe al error que cometemos en el microtomo al tardar demasiado entre corte y corte. La solución al inconveniente de los cambios producidos en el grosor de los cortes hechos en el microtomo, por el cambio de temperatura, puede ser no poner tan frías las muestras para que el

contraste provocado sea menor. Sería conveniente añadir esta consideración a los protocolos estandarizados de laboratorio.

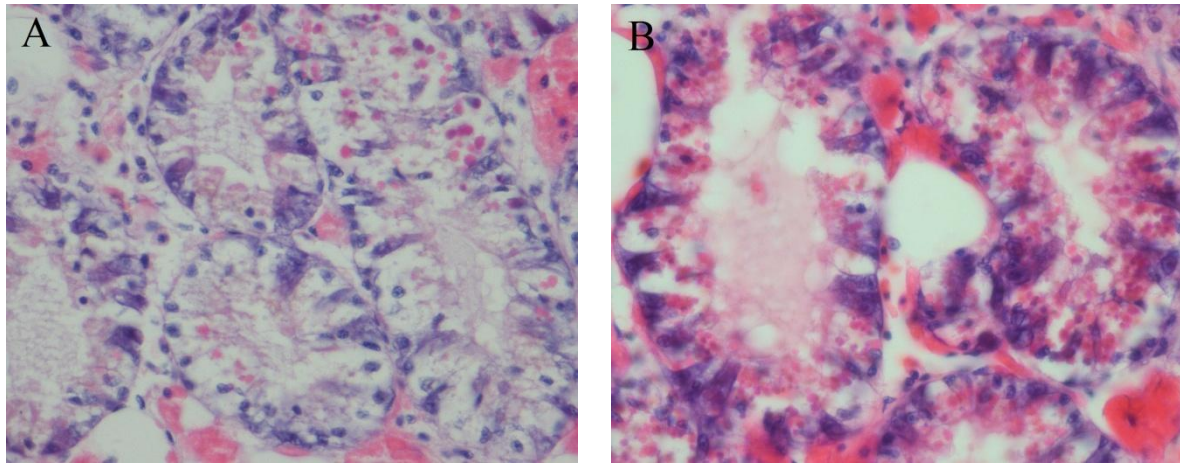


Fig. 5: Las micrografías muestran dos cortes de la misma muestra de mejillón a 4 μm , teñidos con Hematoxilina Eosina. La imagen de la izquierda (A) es el corte real y la de la derecha (B), es la imagen del corte que supuestamente es a 4 μm , pero se demuestra que ha habido una dilatación del tejido, por la saturación que adquiere la imagen, que es más gordo de lo normal. (Aumento: 40X).

Con la tinción de Hematoxilina Eosina sin lavado de alcohol ácido y carbonato de Litio (Fig. 6). Las células digestivas se visualizan correctamente con un grosor de 1 μm (Fig. 7). Con esta tinción tampoco se ven diferencias significativas respecto a la tinción convencional de Hematoxilina Eosina, por lo tanto también podría ser usada.

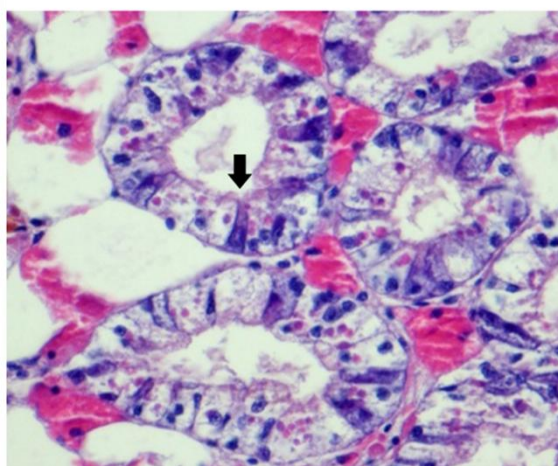


Fig. 6: Segunda variante de la tinción de Hematoxilina Eosina. La flecha representa la presencia de células basófilas. (Aumento 40X).

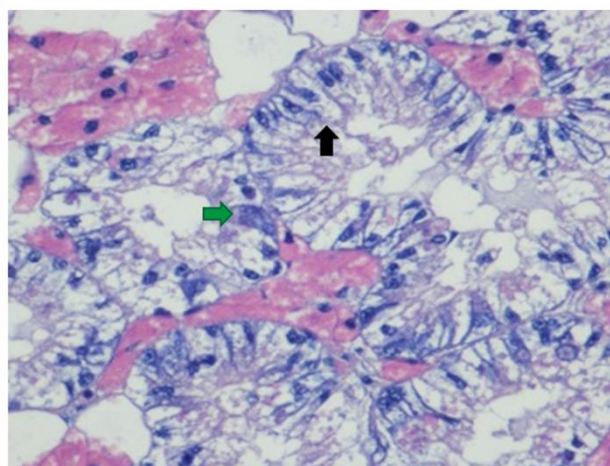


Fig. 7: Segunda variante de la tinción de Hematoxilina Eosina. La flecha negra representa las células digestivas (grosor 1 μm). La flecha verde representa la presencia de células basófilas (Aumento 40X).

6.2 Tinciones

En el caso de las muestras teñidas con los dos protocolos de Tricrómico, la coloración obtenida no era la esperada; según el protocolo de la primera variante de la tinción Tricrómico de Masson (Fig. 8), los núcleos de las células teóricamente se tenían que ver de color negro, el citoplasma acidófilo y los nucléolos de color rosa, las fibras musculares de color rojo y las fibras de colágeno de verde. En el resultado de la segunda variante de la tinción de Tricrómico de Masson (Fig. 9), el tejido conjuntivo se debía ver de color verde, tejido muscular de color pardo y tejido epitelial de color rojizo, así que no se considera válida para el marcaje de células basófilas. Esto puede ser debido a que los productos no estaban en buen estado, podrían estar foto-oxidados y por lo tanto, no resultaron efectivos.

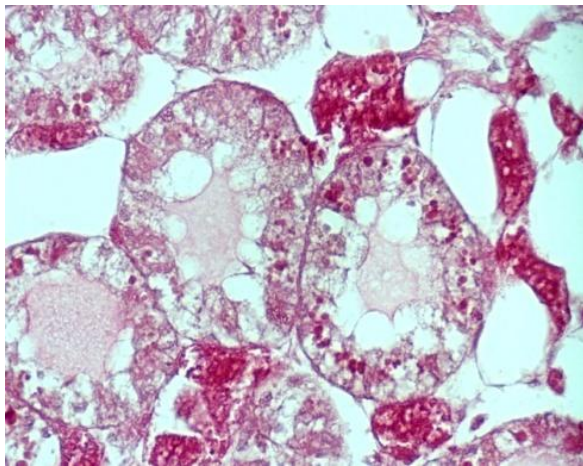


Fig. 8: Tinción de Tricrómico de Masson, primera variante. (Aumento: 40X).

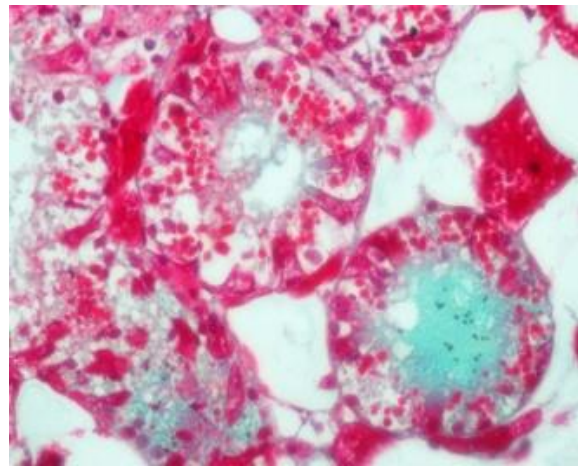


Fig. 9: Tinción de Tricrómico de Masson, segunda variante. (Aumento: 40X).

Ninguna de las tinciones de Histoquímicas de Lectinas ha dado un resultado satisfactorio, no se han mostrado diferencias significativas entre las diluciones de la lectina, ni en formalina (Fig. 10 y 11), ni en Nitrógeno Líquido. La técnica se basa en que la Lectina se une a un carbohidrato específico que es el *N-acetyl-D-galactosamina* (Jeanette & Marilyn 1987; Robledo et al., 1997), y parece ser, que ese carbohidrato se halla por toda la glándula digestiva del mejillón, por lo tanto hace que pierda especificidad y no se una con nada en concreto, viendo así el resultado no esperado, observando todo el tejido ligeramente teñido de color marrón-rojizo.

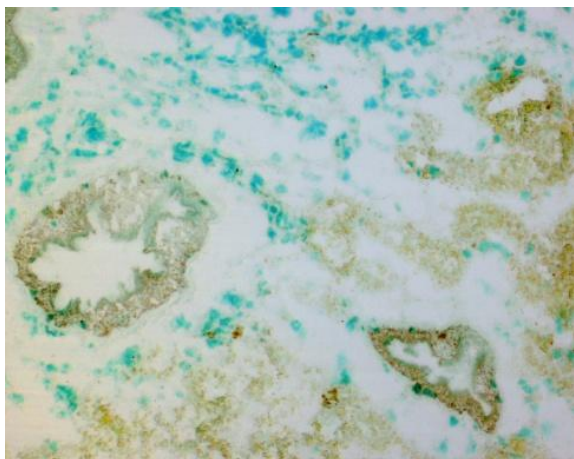


Fig. 10: Histoquímica de Lectinas contrastado con Fast Green en tejido fijado con formalina. (Aumento: 10X).

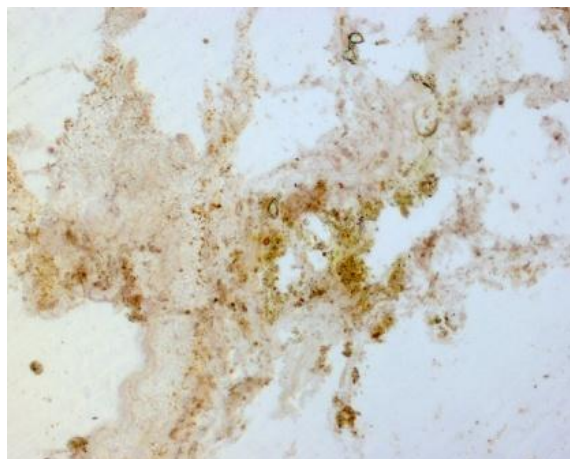


Fig. 11: Histoquímica de Lectinas contrastado con Eosina en tejido fijado con formalina. (Aumento: 10X).

Las Inmunohistoquímicas realizadas debieran marcar las células basófilas, tanto con el contraste de Fast Green (Fig. 12) como con el contraste de Hematoxilina de Mayer (Fig. 13). No se han observado diferencias entre los dos anticuerpos por eso solo hay una única fotografía de cada contraste, que es de un único anticuerpo que es el Anti-RPS 16 (ab1) AV33535 – 100UG. Se deduce que el anticuerpo no es específico para la secuencia de la proteína con la que se tenía que unir, aunque esa proteína está muy conservada, por falta de especificidad, no se considera válida para el marcaje de células basófilas. Las técnicas de Inmunohistoquímica realizadas con tejido fijado en Carnoy y en nitrógeno líquido tampoco han demostrado un marcaje adecuado.

Las Inmunohistoquímicas realizadas con tejido fijado en Carnoy tanto con el contraste de Hematoxilina de Mayer, como con el contraste de Fast Green y en nitrógeno líquido, tampoco han dado resultado. Las células basófilas también se tenían que ver de color rojizo. La muestra que se obtenía con la técnica de Inmunohistoquímica fijada en tejido congelado y contrastada con Hematoxilina de Mayer se destruyó, solo obtenemos la fotografía de la muestra contrastada con Fast Green. Tampoco se han observado diferencias entre los dos anticuerpos por eso solo hay una única fotografía de cada contraste.

En consecuencia, por falta de especificidad, no se considera válida la Inmunohistoquímica realizada con los anticuerpos Anti-RPS 16 y Anti-RPL8 para el marcaje de células basófilas en la glándula digestiva de mejillón.

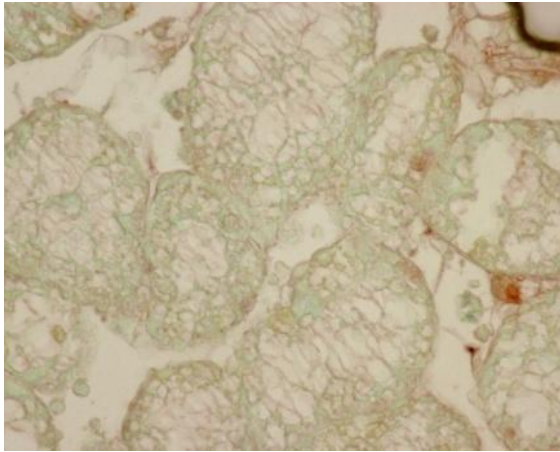


Fig. 12: Técnica de Inmunohistoquímica contrastada con Fast Green. Tejido fijado en formalina. (Aumento: 40X).

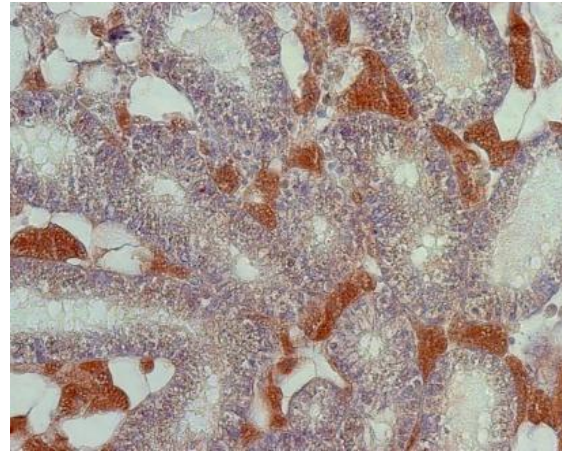


Fig. 13: Técnica de Inmunohistoquímica contrastada con Hematoxilina de Mayer. Tejido fijado en formalina. (Aumento: 20X).

De todas las técnicas que hemos utilizado en este estudio la tinción de Azul de Toluidina con contraste de Eosina es con la que mejor se han identificado las células basófilas (Fig. 14 y 15). Las células basófilas que están teñidas de color azul intenso, tienen una forma piramidal evidente y se encuentran dentro de los alveolos que tienen forma ovalada o circular. Las células basófilas se identifican muy bien incluso con menos aumento (20X) (Fig. 14). Se observan de color azul intenso y contrastan perfectamente con el color rojizo de la Eosina. Se muestran bastantes imágenes de esta técnica, para poder apreciar adecuadamente las células basófilas. Abajo se muestran diferentes imágenes con un aumento de 40X para verlas con más exactitud.

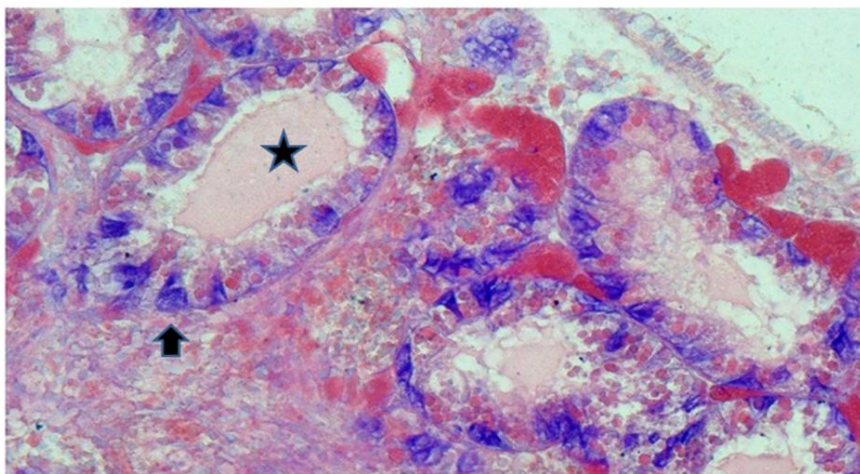


Fig. 14: Micrografía de la glándula digestiva no tan ampliada, con tinción de Azul de Toluidina con contraste de Eosina. La flecha representa la presencia de células basófilas y la estrella el lumen del alveolo. (Aumento: 20X).

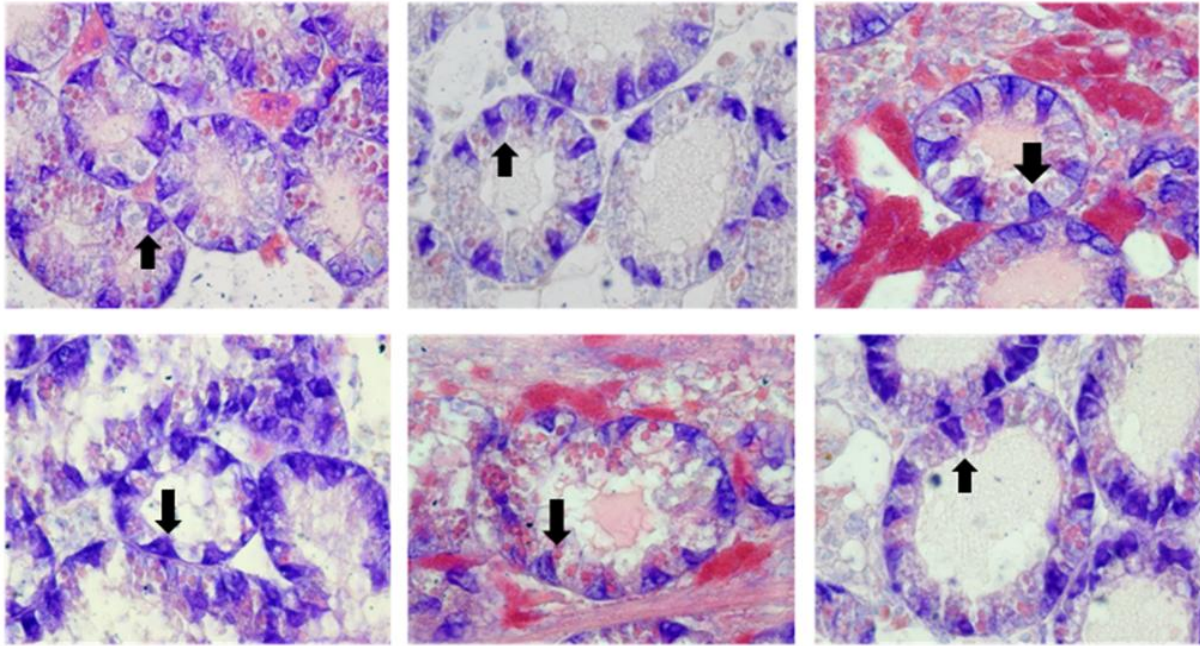


Fig. 15: Diferentes micrografías de glándula digestiva, con la tinción de Azul de Toluidina con contraste de Eosina. Las flechas representan la presencia de células basófilas. (Aumento: 40X).

La técnica que más apropiada para la detección, marcaje y medición de células basófilas es la tinción de Azul de Toluidina con contraste de Eosina y el grosor del corte ideal es a 3 μ m. De todas las técnicas que hemos utilizado en este experimento es con la que mejor se han identificado las células basófilas, también se observa que hay una buena definición del límite del epitelio a nivel histológico, por lo tanto, nos vamos acercando a una técnica íntegra, aunque ésta no sea la definitiva, porque, se deberían de hacer más pruebas con Azul de Toluidina y con diferentes contrastes, pero de momento es la más adecuada. Sería conveniente combinar otros protocolos de Azul de Toluidina, para así encontrar la técnica perfecta, para una medición más exacta de células basófilas. Aunque en este estudio no se ha conseguido el marcaje de células basófilas en técnicas de Inmunohistoquímica, se espera que estas técnicas sean las más específicas para el marcaje y la visualización de células basófilas y se consiga el mejor resultado, porque los anticuerpos actúan de manera muy específica. No obstante y para una mayor fiabilidad sería conveniente reincidir en este trabajo mejorando las técnicas existentes y buscando nuevas técnicas.

7. CONCLUSIONES

- El grosor del corte ideal para el marcaje y medición de células basófilas es a 3 μm .
- Entre todas las tinciones analizadas en este estudio se muestra como la más adecuada para para el marcaje y medición de células basófilas parece ser la tinción de Azul de Toluidina con contraste de Eosina.
- No se han detectado diferencias entre los fijadores de Carnoy, formalina y las muestras congeladas en nitrógeno líquido en las tinciones de Inmunohistoquímicas realizadas.
- Los marcadores empleados en las técnicas de Inmunohistoquímica e Histoquímica de Lectinas no han dado el resultado esperado, por la falta de especificidad. No obstante si se consiguen unos anticuerpos efectivos para marcar las células basófilas, las inmunotécnicas son las técnicas más prometedoras.
- La tinción de Hematoxilina Eosina sigue siendo válida para la medición de células basófilas, aunque utilizando la técnica de Azul de Toluidina con contraste de Eosina las células basófilas se identifican con mayor facilidad.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Cajaraville MP, Abascal I, Etxeberria M, Marigómez I (1995a) Lysosomes as cellular markers of environmental pollution: time- and dose dependent responses of the digestive lysosomal system of mussels after petroleum hydrocarbon exposure. *Environ Toxicol Water Qual*, 10: 1-8.
- Cajaraville MP, Cancio I, Orbea A, Lekube X, Marigómez I (1998) Detection, control and monitoring of pollution using early warning cellular biomarkers: conventional and innovative approaches based on biotechnology. *Cuad Invest Biol*, 20: 545-548.
- Galloway TS, Brown RJ, Browne MA, Dissanayake A, Lowe D, Depledge MH, Jones MB (2006) The ECOMAN project: A novel approach to defining sustainable ecosystem function. *Mar Pollut Bull*, 53: 186-194.

- Holdway DA, Brennan SE, Ahokas JT (1995) Short review of selected fish biomarkers of xenobiotic exposure with an example using fish hepatic mixed-function oxidase. *Aust J Ecology*, 20: 34-44.
- ICES (2012) Report of the Working Group on Biological Effects of Contaminants (WGBEC), 18-22 April 2005, Reykjavik, Iceland. ICES CM 2005/E:08. 94 pp.
- Izagirre U, (2007) Contribution to the interpretation of lysosomal biomarkers in marine organisms based on the mechanistic understanding of the lysosomal responses to pollutants. Ph. D Thesis. 306 pp.
- Jeanette M, Marilyn E (1987) Isolation and characterization of a lectin from the roots of *Dolichos biflorus*. Original Research Article Archives of Biochemistry and Biophysics, Volume 258, Issue 2, 1 535-544 pp.
- Lowe DM, Moore MN, Clarke KR (1981) Effects of oil on digestive cells in mussels: quantitative alterations in cellular and lysosomal structure. *Aquat Toxicol*, 1: 213-226.
- Marigómez I, Soto M, Cajaraville MP (1995b) Morphofunctional patterns of cell and tissue system involved in metal handling and metabolism. In: Cajaraville MP (Eds). *Cell biology in environmental toxicology*. University of the Basque Country, Press Service Bilbao, 89-134 pp.
- Marigómez I, Soto M, Cajaraville MP, Angulo E, Giamberini L (2002) Cellular and subcellular distribution of metals in molluscs. *Micros Res Technol*, 56: 358-392.
- Marigómez I, Soto M, Cancio I, Orbea A, Garmendia L, Cajaraville MP (2006) Cell and tissue biomarkers in mussel, and histopathology in hake and anchovy from Bay of Biscay after the Prestige oil spill (Monitoring Campaign 2003). *Mar Pollut Bull*, 53: 287-304.
- Marigómez I, Soto M, Orbea A, Cancio I, Cajaraville MP (2004) Chapter 14: Biomonitoring of environmental pollution along the Basque coast, using molecular, cellular and tissue-level biomarkers: an integrative approach. In: Borja A, Collins M (Eds.). *Oceanography and Marine Environment of the Basque Country*, Elsevier Oceanography series nº 70, Elsevier, Amsterdam, 335-364 pp.
- Marigómez I, Zorita I, Izagirre U, Ortiz-Zarragoitia M, Navarro P, Etxebarria N, Orbea A, Soto M, Cajaraville M. P (2013) Combined use of native and caged mussels to assess biological effects of pollution through the integrative biomarker approach. *Aquatic Toxicology*, 136–137: 32–48.

- McCarthy JF, Shugart LR (1990) Biological markers of environmental contamination. In: McCarthy JF, Shugart LR, (Eds.) Biomarkers of environmental contamination. Boca Raton, FL: Lewis Publishers, 3-14 pp.
- OSPAR Commission (2000) Quality Status Report 2000: Region IV - Bay of Biscay and Iberian Coast. OSPAR Commission, London, UK, 134 pp.
- Owen G (1973) The fine structure and histochemistry of the digestive diverticula of the protobranchiate bivalve *Nucula sulcata*. Proc R Soc London B, 183: 249-264.
- Peakall D (1992) Animal biomarkers as pollution indicators. Animal biomarkers as pollution indicators. 291 pp.
- Robledo Y, Madrid JF, Leis O, Cajaraville MP (1997) Analysis of the distribution of glycoconjugates in the digestive gland of the bivalve mollusc *Mytilus galloprovincialis* by conventional and lectin histochemistry. Cell Tissue Res, 288: 591–602.
- Zaldibar B, Cancio I, Marigómez I (2007) Reversible alterations in epithelial cell turnover in digestive gland of winkles (*Littorina littorea*) exposed to cadmium and their implications for biomarker measurements. Aquat Toxicol, 81: 183- 196.

