



**INSTITUTO POTOSINO DE INVESTIGACIÓN
CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA, A.C.**

POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

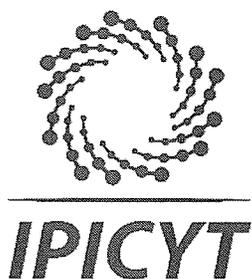
**OPTIMIZACIÓN DE MÉTODOS DE ANÁLISIS MOLECULAR
IN SITU PARA SU APLICACIÓN EN HOJAS DE PLANTAS**

Tesis que presenta
Ivan Takeshi Cerritos Castro

Para obtener el grado de
Maestro en Ciencias en Biología Molecular

Director de la Tesis:
Dra. Ana Paulina Barba de la Rosa

San Luis Potosí, S.L.P., Julio de 2018



Constancia de aprobación de la tesis

La tesis "**Optimización de métodos de análisis molecular in situ para su aplicación en hojas de plantas**" presentada para obtener el Grado de Maestro en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por **Ivan Takeshi Cerritos Castro** y aprobada el nueve de julio del dos mil dieciocho por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Dra. Ana Paulina Barba de la Rosa
Directora de la tesis

Dra. Olga Araceli Patrón Soberano
Miembro del Comité Tutorial

Dra. Martha Leticia Santos Martínez
Miembro del Comité Tutorial

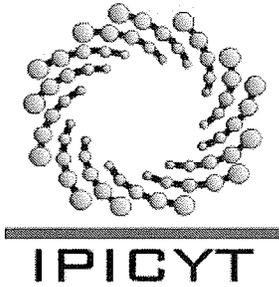
Dra. Erandi Vargas Ortiz
Miembro del Comité Tutorial



Créditos Institucionales

Esta tesis fue elaborada en el Laboratorio de Proteómica y Biomedicina Molecular de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., bajo la dirección de la Dra. Ana Paulina Barba de la Rosa.

Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología No. 611466 y del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C.



Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Acta de Examen de Grado

El Secretario Académico del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., certifica que en el Acta 181 del Libro Primero de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Maestría en Ciencias en Biología Molecular está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 9 días del mes de julio del año 2018, se reunió a las 12:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

Dra. Olga Araceli Patrón Soberano	Presidenta	IPICYT
Dra. Erandi Vargas Ortiz	Secretaria	IPICYT
Dra. Ana Paulina Barba de la Rosa	Sinodal	IPICYT

a fin de efectuar el examen, que para obtener el Grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

sustentó el C.

Ivan Takeshi Cerritos Castro

sobre la Tesis intitulada:

Optimización de métodos de análisis molecular in situ para su aplicación en hojas de plantas

que se desarrolló bajo la dirección de

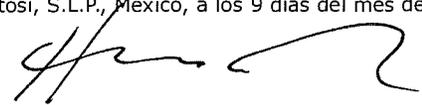
Dra. Ana Paulina Barba de la Rosa

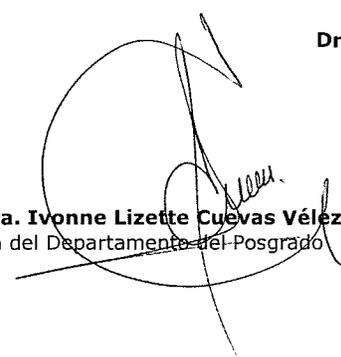
El Jurado, después de deliberar, determinó

APROBARLO

Dándose por terminado el acto a las 14:18 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fe el Secretario Académico del Instituto.

A petición del interesado y para los fines que al mismo convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 9 días del mes de julio de 2018.


Dr. Horacio Flores Zúñiga
Secretario Académico


Mtra. Ivonne Lizette Cuevas Vélez
Jefa del Departamento del Posgrado



Agradecimientos

A la Dra. Ana Paulina Barba de la Rosa, por la oportunidad y apoyo para desarrollar el presente trabajo.

A la Dra. Araceli Patrón Soberano, por el apoyo y tutoría en la obtención de cortes histológicos y microscopía.

A la Dra. Erandi Vargas Ortiz, por el apoyo constante en el estudio de las plantas.

A mis compañeros de laboratorio, por su apoyo y excelente trabajo en equipo.

A Dalia Pichardo Ortega, por su invaluable apoyo y cariño.

A mi familia, por la formación y cariño que han hecho posible que llegue aquí.

A mis compañeros de generación, por su amistad y buenos tiempos compartidos.

A mis compañeros de casa, por su apoyo y compañía en el transcurso de la maestría.

A Edgar Báez y Dalia Pichardo, por la fuerza que nos dio haber emprendido juntos la maestría.

A todo el personal del IPICYT que hace posible que el instituto funcione día a día.

Al CONACYT e IPICYT por la beca otorgada (611466) y formación académica recibida.

Contenido

Constancia de aprobación de la tesis	ii
Créditos institucionales	iii
Acta de examen	iv
Agradecimientos	v
Lista de tablas	viii
Lista de figuras	ix
Resumen	xii
Abstract	xiii
CAPÍTULO I: OPTIMIZACIÓN DE MÉTODOS DE ANÁLISIS MOLECULAR <i>IN SITU</i> PARA SU APLICACIÓN EN HOJAS DE PLANTAS	1
1. INTRODUCCIÓN	1
2. MATERIALES Y MÉTODOS	16
2.1 IS-RT-PCR	16
2.1.1 IS-RT-PCR en corte paradermal de hoja	16
2.1.2 IS-RT-PCR en fragmento de hoja	19
2.1.3 IS-RT-PCR en fragmento permeabilizado de hoja	21
2.1.4 Optimización de la permeabilización de fragmento de hoja	22
2.2 MALDI MSI	23
2.2.1 Estabilización de hojas	23
2.2.2 Corte histológico de hojas	26
2.2.3 Secado del corte	28
2.2.4 Pre tratamientos <i>in situ</i>	29

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	31
3.1 IS-RT-PCR	31
3.1.1 IS-RT-PCR en corte paradermal de hoja	31
3.1.2 IS-RT-PCR en fragmento de hoja	36
3.1.3 IS-RT-PCR en fragmento permeabilizado de hoja	41
3.1.4 Optimización de la permeabilización de fragmento de hoja	45
3.2 MALDI MSI	49
3.2.1 Estabilización de hojas	49
3.2.2 Corte histológico de hojas	51
3.2.3 Secado del corte	55
3.2.4 Pre tratamientos <i>in situ</i>	64
4. CONCLUSIONES	71
CAPÍTULO II: CARACTERIZACIÓN DE CRISTALES DE OXALATO DE CALCIO EN HOJAS DE AMARANTO	73
5. INTRODUCCIÓN	73
6. MATERIALES Y MÉTODOS	75
6.1 Plantas	75
6.2 Observación de cristales de CaOx <i>in situ</i>	75
6.3 Aislamiento y análisis de cristales de CaOx de hojas de amaranto	76
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	78
7.1 Observación de cristales de CaOx <i>in situ</i>	78
7.2 Aislamiento y análisis de cristales de CaOx de hojas de amaranto	85
8. CONCLUSIONES	88
9. REFERENCIAS	89

Lista de tablas

Tabla 1. Primers utilizados en IS-RT-PCR	16
Tabla 2. Composición del gel para R-SDS-PAGE	24
Tabla 3. Composición del gel para zimograma de proteasas	25
Tabla 4. Composición del gel para zimograma de amilasas	25

Lista de figuras

Figura 1	Gráficas de tendencias de publicaciones relacionadas con la IS-RT-PCR.	3
Figura 2	Diagrama de flujo del proceso de IS-RT-PCR ejecutado en corte histológico sobre laminilla.	4
Figura 3	Gráficas de tendencias de publicaciones relacionadas con MALDI-MSI.	6
Figura 4	Proceso de análisis por MALDI-MSI.	7
Figura 5	Etapas en la preparación y análisis de una muestra por MALDI-MSI.	8
Figura 6	Representación gráfica de la relación del pretratamiento <i>in situ</i> y el diámetro del láser con la resolución del análisis.	12
Figura 7	Representación gráfica de un corte transversal de una hoja C3 y C4.	13
Figura 8	Metabolismo C3 y C4 para la fijación de carbono.	15
Figura 9	Fotomicrografía por DIC de un corte paradermal de hoja de <i>A. hypochondriacus</i> en el que se analizó el RNAm del gen <i>RbcL</i> por IS-RT-PCR.	33
Figura 10	Variación de los canales RGB en el color de cloroplastos en función de su contenido de RNAm de <i>RbcL</i> .	34
Figura 11	Fotomicrografías por DIC de un fragmento de hoja de <i>A. hypochondriacus</i> en el que se analizó el RNAm del gen <i>RbcL</i> por IS-RT-PCR, muestra positiva.	37
Figura 12	Fotomicrografías por DIC de un fragmento de hoja de <i>A. hypochondriacus</i> en el que se analizó el RNAm del gen <i>RbcL</i> por IS-RT-PCR, muestra negativa.	38
Figura 13	Análisis en gel de electroforesis de las mezclas de reacción de PCR <i>in situ</i> residuales. Muestra: Fragmento de hoja de <i>A. hypochondriacus</i> .	40
Figura 14	Fotomicrografías por DIC de fragmentos permeabilizados de hoja de <i>A. hypochondriacus</i> en los que se analizó el RNAm del gen <i>RbcL</i> y actina por IS-RT-PCR, muestras positivas.	42
Figura 15	Diagrama de flujo del proceso de IS-RT-PCR y análisis en gel de electroforesis de las mezclas de reacción <i>in situ</i> residuales. Muestra: Fragmento permeabilizado de hoja de <i>A. hypochondriacus</i> .	44
Figura 16	Fotomicrografías en campo claro de ensayos de permeabilización de fragmentos de hoja de <i>A. hypochondriacus</i> .	46

Figura 17	Fotomicrografías por DIC en dos planos focales de la misma área de un fragmento permeabilizado y analizado por IS-RT-PCR.	48
Figura 18	Zimogramas de actividad proteasa y amilasa en extractos de hojas de diferentes especies.	50
Figura 19	Desempeño de medios de inclusión formulados para MALDI-MSI durante su corte en criostato a -20 °C.	53
Figura 20	Gráficas de desempeño global de los medios de inclusión analizados.	54
Figura 21	Fotomicrografías por DIC que muestran el deterioro de un corte de hoja de trigo conforme se seca.	57
Figura 22	Fotomicrografías por DIC de cortes transversales de hoja de trigo en los que se muestra un corte bien conservado y uno mal conservado tras el proceso de secado.	58
Figura 23	Fotomicrografías por DIC de cortes transversales de hoja de trigo en las que se compara el efecto sobre el la estructura del tejido y MDI, del secado en frío y en vacío.	60
Figura 24	Fotomicrografías por DIC en negativo de un corte transversal de hoja de trigo – ampliación del área del recuadro guinda de la Figura 23 A.	61
Figura 25	Fotomicrografías por DIC de cortes transversales de hoja de trigo en las que se compara el efecto del grosor del corte sobre el la estructura del tejido y MDI, al secarse en vacío.	63
Figura 26	Fotomicrografías por DIC del corte transversal de hoja de trigo sometido a simulación de tratamiento <i>in situ</i> con tinta cian y magenta.	66
Figura 27	Fotomicrografías por DIC del corte transversal de hoja de trigo sometido a simulación de tratamiento <i>in situ</i> con tinta amarilla y negra.	67
Figura 28	Fotomicrografías por DIC de mezclas matriz MALDI-tinta depositadas en laminilla con la impresora EPSON T50.	70
Figura 29	Localización <i>in situ</i> de cristales de CaOX en hoja de amaranto.	79
Figura 30	Localización <i>in situ</i> de cristales de CaOx en hoja de amaranto 2.	80
Figura 31	Microscopía electrónica de barrido de drusas y análisis elemental.	82
Figura 32	Asociación entre la pared celular de idioblastos y células de vaina del haz.	84
Figura 33	Microscopía electrónica de barrido de drusas del interior de una drusa fracturada.	84

Figura 34	Análisis de los extractos proteínicos de sedimentos generados en la purificación de drusas por R-SDS-PAGE.	86
Figura 35	Análisis de los sedimentos generados en la purificación de drusas.	87

Resumen

OPTIMIZACIÓN DE MÉTODOS DE ANÁLISIS MOLECULAR *IN SITU* PARA SU APLICACIÓN EN HOJAS DE PLANTAS

La Reacción en Cadena de la Polimerasa de Transcripción Inversa *in situ* (IS-RT-PCR por sus siglas en inglés) permite conocer la ubicación espacial de RNAm en un tejido. El Mapeo por Espectrometría de Masas con Desorción/Ionización Láser Asistida por Matriz (MALDI-MSI por sus siglas en inglés), permite conocer la ubicación espacial en un tejido, de una gran cantidad de analitos como: proteínas, lípidos, carbohidratos, ácidos nucleicos y metabolitos. Ambas técnicas son relativamente recientes y requieren de un laborioso proceso para ejecutar un análisis. Sin embargo, la cantidad de información que pueden proveer justifica el tiempo requerido. Los protocolos de preparación de muestras publicados para estos análisis tienen puntos susceptibles de mejora que harían más fácil o mejor la ejecución. En el presente trabajo se indagó en estos protocolos y se y se mejoraron algunos pasos. El principal inconveniente con el protocolo de IS-RT-PCR es la dificultad de manipular un corte histológico en laminilla. Así, en el presente trabajo se investigó la posibilidad de ejecutar el análisis en un fragmento de hoja que se conserve de epidermis a epidermis. Se logró una reacción parcial en este fragmento. En MALDI-MSI el principal punto de mejora fue mantener la integridad del corte al secarlo estando en un medio de inclusión, así como aplicar de manera homogénea la matriz. El mejor medio de inclusión fue carboximetilcelulosa al 2% en sacarosa al 9.25%. Para la aplicación de la matriz, se utilizó la impresora EPSON T50 y se encontró que el cabezal negro es capaz de despachar gotas de hasta 35 μm de diámetro de manera muy precisa. Con este resultado concluimos que el uso de la impresora T50 es adecuado y económico. En el segundo capítulo, nos enfocamos a caracterizar los cristales de oxalato de calcio presentes en hojas de amaranto.

PALABRAS CLAVE: RT-PCR *in situ*, mapeo MALDI, Mapeo por Espectrometría de Masas, amaranto, metabolismo $\text{C}_3\text{-C}_4$.

Abstract

OPTIMIZATION OF *IN SITU* MOLECULAR ANALYSIS METHODS FOR ITS APPLICATION IN PLANT LEAVES

In situ Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (IS-RT-PCR), allows to know spatial location of mRNA in a tissue. Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry Imaging (MALDI-MSI) permits to know spatial publication in a tissue of a variety of analytes as: proteins, lipids, carbohydrates, nuclei acids and metabolites. Both techniques are relative recent and require a laborious process to perform one analysis. Nevertheless, the amount of information that can be obtained justifies the time required for it. Published protocols of sample preparation for these analyses have steps that can be improved in order to be easier or better performing. In this work we inquired these protocols and improve some steps. The main inconvenient with the IS-RT-PCR protocol is the difficulty of handling a histological cut on a glass slide. So in this work we investigated the performing of protocol in a leaf fragment that is preserved from epidermis to epidermis. We achieve a partial reaction in the leaf fragment. In MALDI-MSI the main improving points were keeping cut integrity while it is dried in an embedding media, and applying matrix solution in a homogenous manner. The best embedding media was 2% carboxymethylcellulose in 9.25% sucrose. For matrix application, we used an EPSON T50 inkjet printer, we found that black nozzle can dispatch drops of until 35 μm of diameter in a very precise manner. With this result we conclude that T50 printer is suitable and cheaper than commercial options. In the second chapter, we focused in characterizing calcium oxalate crystals of amaranth leaves.

Keywords: *In situ* RT-PCR, MALDI-imaging, Mass Spectrometry Imaging, amaranth, C₃-C₄ metabolism.

CAPÍTULO I: OPTIMIZACIÓN DE MÉTODOS DE ANÁLISIS MOLECULAR *IN SITU* PARA SU APLICACIÓN EN HOJAS DE PLANTAS

1. INTRODUCCIÓN

Las técnicas de análisis molecular *in situ* son herramientas analíticas que añaden una nueva dimensión a los métodos analíticos tradicionales. Mientras las técnicas analíticas tradicionales responden a las preguntas ¿qué hay? y ¿cuánto hay?, con los métodos *in situ* ahora se busca responder además la pregunta ¿dónde está exactamente? Esta última pregunta es de particular interés en la biología molecular, debido a la importancia en la discriminación de proteínas, ácidos nucleicos, metabolitos, etc. que sean específicas de un tejido. Estas técnicas de análisis molecular *in situ* se denominan en conjunto técnicas de mapeo.

Dos técnicas de mapeo molecular *in situ* de especial interés son la Reacción en Cadena de la Polimerasa de Transcripción Inversa *in situ* (IS-RT-PCR por sus siglas en inglés) y el Mapeo por Espectrometría de Masas con Desorción/Ionización Láser Asistida por Matriz (MALDI-MSI por sus siglas en inglés). En la IS-RT-PCR se hace un mapeo en tejidos de los RNAm de un determinado gen, pudiendo ver su nivel de expresión en células individuales por medio de intensidad de color. Por su parte MALDI-MSI es una técnica con mucho potencial, ya que se puede analizar un abanico muy grande de moléculas en tejidos, como proteínas, lípidos, carbohidratos, ácidos nucleicos y metabolitos, por medio de espectrometría de masas.^{1,2}

IS-RT-PCR

El entendimiento de la función de los genes involucra estudiar en qué condiciones se expresan, y en qué lugar anatómico lo hacen. Para estudiar estas variables existen tres técnicas principales: las fusiones promotor-gen reportero, los métodos de impresión de tejidos y la hibridación *in situ* (ISH por sus siglas en inglés).³ Sin embargo, las técnicas de fusiones promotor-gen reportero requieren múltiples

pasos para llevarse a cabo y no todas las plantas pueden ser transformadas. Los métodos de impresión de tejidos no generan una imagen clara de la distribución celular de RNA.⁴ Y la hibridación *in situ* posee una sensibilidad baja, requiriendo de 10 a 20 copias por célula para generar una señal detectable. Una cuarta técnica, que es relativamente reciente y mitiga algunas de estas desventajas es la PCR *in situ*.

La PCR *in situ* posee dos variantes, la PCR *in situ* (IS-PCR) que analiza DNA y la IS-RT-PCR que analiza RNA. Ambas poseen ventajas sobre los tres métodos anteriores: no requieren la generación de plantas transgénicas, se obtiene una clara ubicación celular del RNA/DNA, y poseen una mejor sensibilidad ya que pueden detectar hasta una copia de RNA/DNA.^{5,6} A pesar de ello son técnicas que no han sido explotadas como la hibridación *in situ*. Si se compara en la base de datos de Scopus®⁷ el número de publicaciones que poseen el término “In-Situ-PCR”, “In-Situ-PCR” & “Plant” o “*In situ* hybridization” en su título, abstract o palabras clave; el número de publicaciones con el término “*in situ* hybridization” asciende a 146,164, mientras que con el término “In-Situ-PCR” sólo se reportan 660. De estas 660, sólo 24 tiene asociado también la palabra “planta”, y de los 24 sólo 17 presentan análisis de PCR *in situ* en plantas (Figura 1). La mayor cantidad de publicaciones que usan la IS-RT-PCR o IS-PCR son aplicaciones al área de medicina. Por otro lado, mientras la aplicación de ISH se ha mantenido a lo largo de los años, el uso de IS-PCR ha ido disminuyendo (Figura 1 A). Quizá una de las razones es que, a pesar de que IS-RT-PCR es superior en sensibilidad a ISH, el protocolo de IS-RT-PCR es más laborioso y demandante de tiempo y reactivos.^{1,8}

Bagasra Omar es uno de los pioneros en la técnica de IS-PCR y su enfoque ha sido en células animales.⁵ No obstante se han publicado ya métodos aplicados a tejidos vegetales.^{1,3} El método propuesto por Pesquet et al.³ implica fluorescencia y el propuesto por Athman et al.¹ la generación de un sustrato colorido para la detección de amplicones. Dado que las estructuras de las plantas poseen una gran cantidad de autofluorescencia, el método de Athman et al.¹ es más adecuado para generar una detección con bajo ruido de fondo.

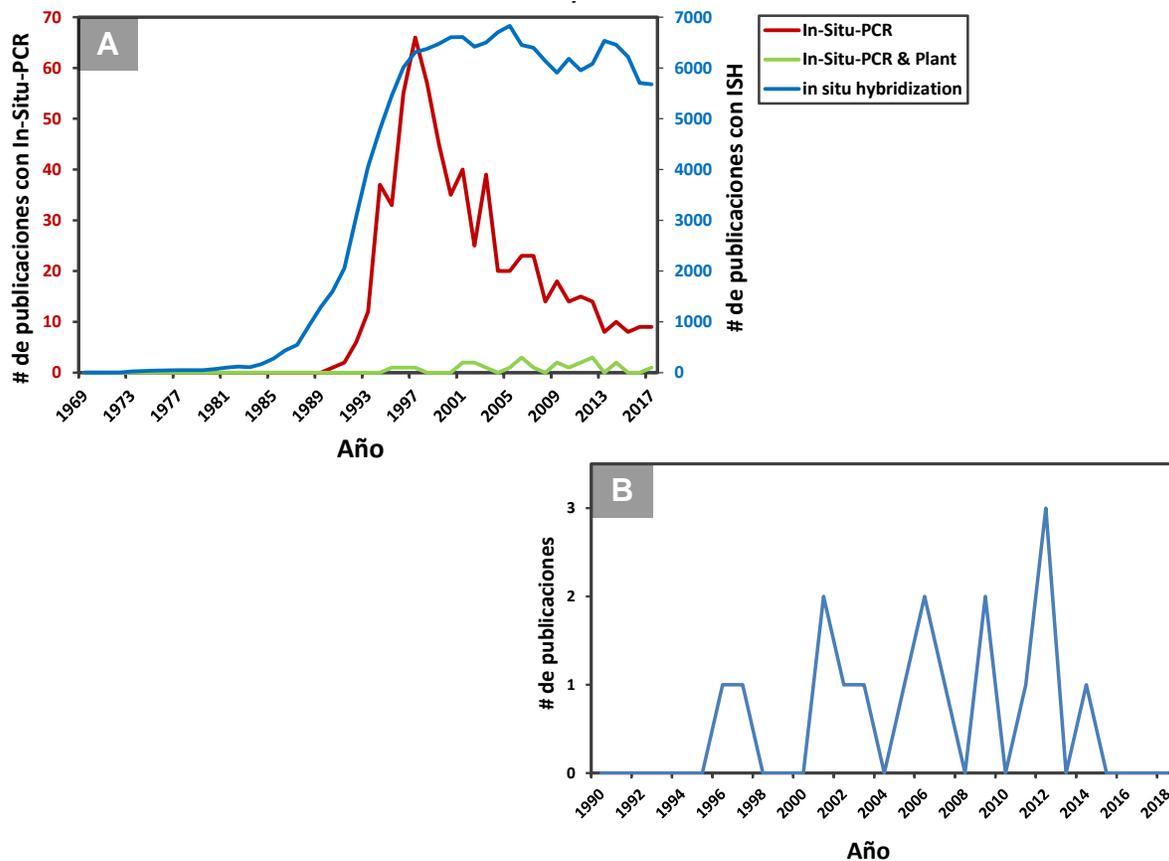


Figura 1. Gráficas de tendencias de publicaciones relacionadas con la IS-RT-PCR. A) Publicaciones con los términos “In-Situ-PCR”, “In-Situ-PCR” & “Plant” o “*In situ* hybridization” en su título, abstract o palabras clave. B) Publicaciones que poseen los términos “In-Situ-PCR” & “Plant”, y que realizaron este análisis en plantas. Datos obtenidos de Scopus⁷

El método propuesto por Athman et al.¹ consiste de tres etapas. La primera es fijar el tejido durante 3 a 4 h en fijador FAA (Formaldehído, Ácido acético y Alcohol etílico). Una vez fijado, el tejido se lava, se incluye en agarosa 5% y se hacen cortes de entre 50 a 70 μm de grosor en un vibratomo. La segunda etapa es transferir los cortes a una laminilla y colocar encima una cámara de incubación para laminillas. Estas cámaras consisten de un marco cuadrado de goma con adhesivo en sus caras, una de ellas se une a la laminilla y la segunda a una película de celofán que funciona como tapadera. El marco de goma posee un determinado grosor para contener cierto volumen, dentro del cual se coloca el corte del tejido a analizar. Después, en estas cámaras se lleva a cabo el tratamiento con DNAsa, transcripción inversa y PCR, ocupando volúmenes de hasta 100 μL . En la PCR se utiliza un nucleótido marcado con digoxigenina. Y la tercera etapa es aplicar un anticuerpo anti-digoxigenina conjugado con fosfatasa

alcalina, y por último se revela con algún sustrato para esta enzima que genere un producto colorido (Figura 2).¹

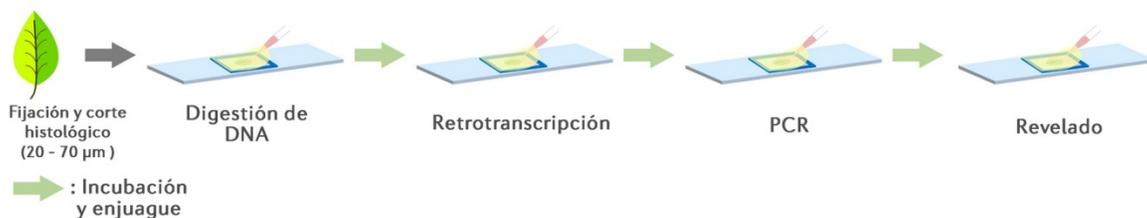


Figura 2. Diagrama de flujo del proceso de IS-RT-PCR ejecutado en corte histológico sobre laminilla. El corte histológico se coloca cuidadosamente en una laminilla silanizada, y después se cubre con una cámara de incubación para laminillas. Esta cámara posee una película de celofán que actúa como tapadera, misma que ha de ser levantada en cada etapa del proceso para agregar y eliminar reactivos de digestión de DNA, retrotranscripción, PCR y revelado.

Este método aunque es relativamente sencillo posee tres desventajas. Primero, es muy laborioso el llevar a cabo el tratamiento con DNAsa, la transcripción inversa y la PCR en un corte de tejido. El corte de tejido es delgado y se puede desbaratar o fracturar si no se maneja con cuidado, y si este no se adhiere bien a la laminilla fácilmente se puede pegar en la cámara o ser succionado con la micropipeta. Por otro lado, un corte de 50 a 70 μm es muy grueso para observar detalles en un microscopio en campo claro o en contraste por interferencia diferencial (DIC por sus siglas en inglés), ya que hay varias capas celulares en el mismo. Segundo, los volúmenes de reacción son de 100 μL, esto resulta costoso considerando las enzimas que se utilizan en la retrotranscripción y PCR. Tercero, se necesita un aditamento especial para que el termociclador pueda procesar laminillas. Este aditamento es también costoso y tiene capacidad para un máximo de tres laminillas.⁹ Estas quizá sean algunas de las razones por las que IS-PCR no ha tenido éxito como ISH.

Es por ello que en el presente trabajo buscamos algunas alternativas para eliminar o disminuir las desventajas de IS-RT-PCR. Esta técnica tiene el potencial para ser medianamente laboriosa entre ISH y el uso de un gen reportero, y con una sensibilidad mayor que ISH.

Una forma particularmente útil sería poder hacer el análisis *in situ* en el fragmento de hoja antes del corte en vibratomo. Un fragmento de este tamaño podría ser procesado en un tubo para PCR y ser cubierto con volúmenes inferiores a los 100 μ L. Esto disminuiría las desventajas de la fragilidad del corte, los altos volúmenes de reacción y la necesidad de un aditamento para el termociclador. Sin embargo, para que esto suceda, los reactivos implicados en cada etapa del análisis debe ser capaz de llegar de manera uniforme a todos los espacios del fragmento de hoja.

El tejido vegetal posee una serie de barreras que podrían impedir la difusión de moléculas grandes como enzimas o anticuerpos: la cutícula, la pared celular y la membrana plasmática. Afortunadamente, se han desarrollado métodos para el análisis molecular de órganos completos de plantas.^{10,11} Estos métodos fueron desarrollados para el análisis de proteínas por medio de anticuerpos en órganos aclarados de plantas. Además, pueden prescindir de la obtención de cortes histológicos, ya que al tratarse de un tejido aclarado con marcaje fluorescente, se pueden hacer cortes ópticos por medio de microscopía confocal. Gracias a ello, se han podido hacer increíbles reconstrucciones 3D de algunos tejidos. Aunque estos métodos están diseñados para análisis inmunohistoquímicos, el proceso de permeabilización utilizado se puede adaptar al análisis por IS-RT-PCR.

El método de IS-RT-PCR propuesto por Athman et al.¹ no contempla ningún paso de permeabilización, y aunque la fijación podría tener este efecto, no es su intención primordial. Pasternak et al.¹⁰, contemplan tres etapas de permeabilización antes de llevar a cabo la inmunodetección: una fijación-solubilización de la cutícula con metanol caliente (MeOH), una digestión de la pared celular por medio de los preparados enzimáticos comerciales macerozima y driselasa, y una permeabilización de la membrana plasmática con IGEPAL C630 y dimetil sulfóxido (DMSO). Si estos procesos de permeabilización permiten la distribución homogénea de anticuerpos, muy probablemente permita lo mismo con proteínas más chicas. Estas etapas se podrían aplicar a un fragmento de hoja, y ejecutar en el la IS-RT-PCR.

MALDI-MSI

El Mapeo por Espectrometría de Masas con Desorción/Ionización Láser Asistida por Matriz (MALDI-MSI por sus siglas del inglés Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry Imaging), es una variante del mapeo por espectrometría de masas. En ella, la fuente de ionización es la unidad MALDI.¹² Los primeros experimentos de mapeo por espectrometría de masas datan del año de 1984 usando la espectrometría de masas de iones secundarios.¹³ Posteriormente en 1997 Caprioli et al.¹⁴ emplearon por primera vez un equipo MALDI-TOF MS (Matrix-assisted laser desorption/ionization Time of Flight Mass Spectrometry) para hacer mapeos en tejidos animales. Desde entonces, se ha ido desarrollando la tecnología necesaria para la automatización de este análisis en los equipos de espectrometría de masas modernos.

En la Figura 3 se muestra una comparación hecha con la herramienta de análisis de datos de la base de datos Scopus®.⁷ El número de publicaciones que poseen el término “MALDI-MSI, “MALDI-imaging” o “Mass Spectrometry Imaging” en su título, abstract y/o palabras clave es de 1928. Mientras que el número de publicaciones que poseen estos términos y “planta” en tales descriptores es solamente 208. A pesar de ser una técnica laboriosa y que requiere instrumentación altamente especializada, su uso ha ido en aumento en los últimos años.

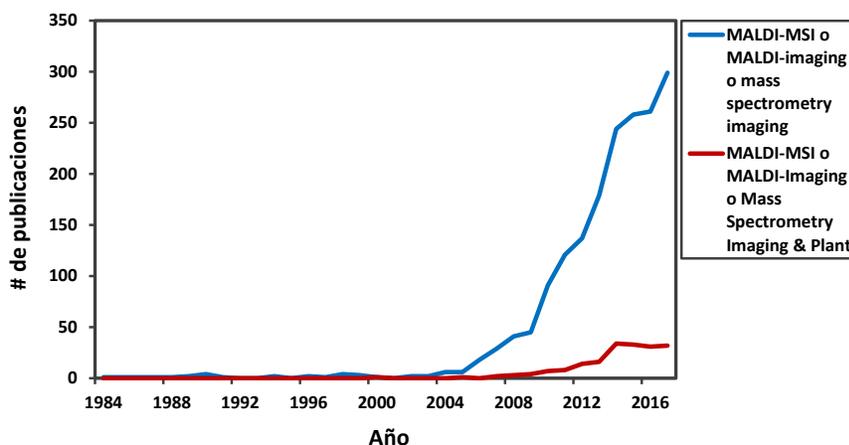


Figura 3. Gráficas de tendencias de publicaciones relacionadas con MALDI-MSI. Se muestra el histórico de las publicaciones que en su título, abstract o palabras clave posean los términos MALDI-MSI, MALDI-imaging o Mass spectrometry imaging. Datos obtenidos de Scopus⁷

En el análisis por MALDI-MSI se realiza en un corte histológico de algún tejido que es colocado sobre una laminilla. Este corte es entonces cubierto con pequeñas gotas discretas de una solución de un compuesto denominado matriz. Al depositarse las pequeñas gotas disuelven los analitos que se encuentran debajo de ella en el tejido, y al secarse co-cristalizan con los mismos. Luego, la laminilla se introduce en el equipo donde un rayo láser incide sobre el tejido. La matriz tiene la capacidad de absorber la radiación ultravioleta de este láser y convertirla en calor. Así el láser genera una serie de pulsos de radiación que la matriz rápidamente convierte en calor, promoviendo su desorción del tejido. La matriz desorbida arrastra consigo los analitos con que co-cristalizó y los ioniza. Los analitos ionizados y la matriz son entonces conducidos a un espectrómetro de masas (típicamente un TOF-MS) por medio de vacío. Ahí, el espectrómetro de masas obtiene datos de carga/masa (m/z) que pueden ser relacionados con analitos específico. La bandeja del equipo que sostiene la laminilla con el tejido es móvil, así permite que el láser haga un barrido sobre todo el tejido recolectando información m/z de cada punto (Figura 4).¹⁵

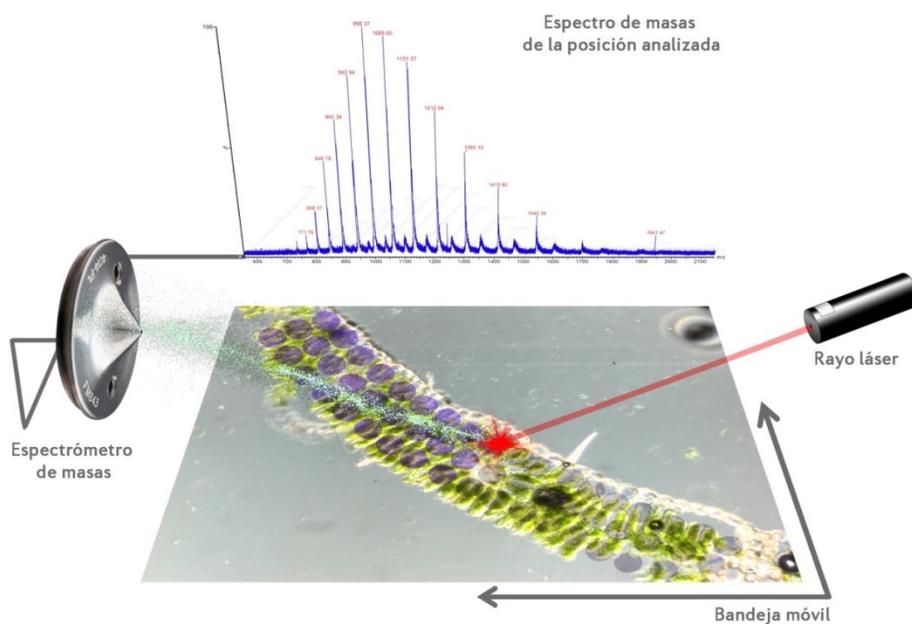


Figura 4. Proceso de análisis por MALDI-MSI. Se colocan sobre un tejido pequeñas gotas discretas de una solución de matriz (puntos morados) que al secarse co-cristaliza con los analitos del tejido. En el equipo, un rayo láser incide sobre el tejido, la matriz absorbe la energía y es desorbida del tejido. La matriz desorbida arrastra los analitos co-cristalizados y luego los ioniza. Después, estos son conducidos al espectrómetro de masas por medio de vacío, y ahí son analizados. La laminilla se coloca sobre una bandeja móvil de tal suerte que el láser puede hacer un barrido en todo el tejido, recolectando información m/z en cada punto donde el láser dispara.

El resultado del análisis por MALDI-MSI es análogo a una fotografía. Cada resultado es una imagen compuesta por una matriz de puntos análogos a píxeles, y cada punto representa una zona donde el láser disparó. Cada píxel posee tres valores, los valores RGB, y en MALDI-MSI cada punto también posee valores, pero posee una gran cantidad de valores m/z en función de la complejidad de la muestra. Así, el resultado típico de MALDI es una imagen monocromática que representa la distribución de una determinada señal m/z que puede ser adjudicada a un analito en particular.¹⁴ También, dos o más de estas imágenes se puede fusionar para mostrar la distribución de dos o más analitos.

En la Figura 5 se muestran las cinco etapas generales para el análisis de una muestra por MALDI-MSI. Las etapas más laboriosas están relacionadas con la preparación de la muestra.¹⁵

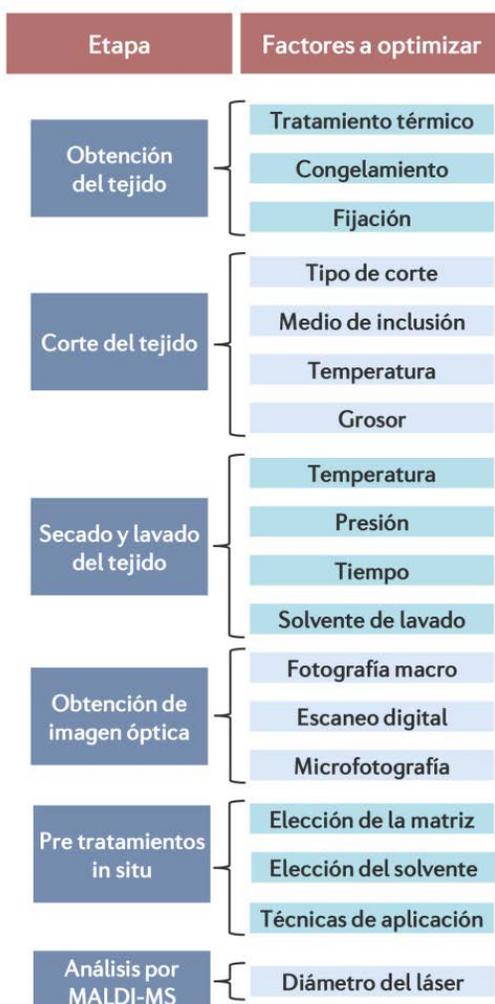


Figura 5. Etapas en la preparación y análisis de una muestra por MALDI-MSI. Existen cinco etapas para el análisis de una muestra por MALDI-MSI y en cada una de ellas hay factores que se deben optimizar en función de la muestra y analito.

Obtención del tejido. Una vez escindido un tejido u órgano, debe estabilizarse con el fin de detener o ralentizar la autodegradación del mismo. La forma más común de ralentizar es el congelamiento con nitrógeno líquido.¹⁶ Sin embargo en etapas posteriores el tejido se expone de nuevo a temperatura ambiente. La fijación química es otro método usual que puede servir para análisis de proteínas o péptidos, aunque los fijadores químicos pueden alterar los metabolitos. Sin embargo, ya hay trabajos publicados en los que se analizan metabolitos en tejidos fijados con formaldehído.¹⁷ Una propuesta novedosa es el tratamiento térmico del tejido, que se puede llevar a cabo con el equipo de estabilización térmica Denator AB.¹⁸ Goodwin et al.¹⁹ han reportado el beneficio de la estabilización térmica aplicada al análisis de cerebro de ratón. En su estudio muestran como en tan solo 5 min de exposición de un tejido a temperatura ambiente, determinadas señales *m/z* se ven drásticamente abatidas.

Corte del tejido. La técnica más empleada para hacer cortes histológicos para MALDI-MSI es el corte en criostato.^{16,20,21} El compuesto empleado normalmente en criostato para la inclusión de tejidos (crio-pegamento) no es compatible con MALDI ya que inhibe la ionización.¹⁶ Para ello se han propuesto otros medios de inclusión (MDI's) compatibles con MALDI-MSI. Entre ellos figuran formulaciones con caboximetilcelulosa (CMC), gelatina, sacarosa, hielo y agarosa.^{20,22-25} Particularmente, Nelson et al.²⁰ analizaron una serie de formulaciones con estos compuestos puros en agua, y mezclas de estos compuestos en agua. Ellos encontraron que una formulación acuosa con 5% de CMC y 10% de gelatina, presentaba óptimas propiedades físicas para su uso en criostato, y que es compatible con MALDI.

Kawamoto²⁶ sostuvo que la temperatura de corte ideal es -20 °C, ya que a -15 °C se forman cristales que dañan el tejido y a temperaturas menores a -20 °C la muestra se endurece mucho.

El grosor ideal del corte es entre 10 y 20 µm, ya que un corte de mayor grosor tarda más en secar y puede impedir la conducción eléctrica en el equipo, un requisito para el análisis por MALDI-MSI.¹⁶ Además, cortes gruesos poseen varias capas celulares, lo cual hace difícil la observación el microscopio.

Los cortes realizados a una hoja pueden ser transversal (perpendicular a la vena principal), longitudinal (paralelo a la vena principal) o paradermal (paralelo a la superficie de la hoja). En función de la información que se busque y las nervaduras de la hoja, puede resultar útil uno u otro tipo de corte.

Secado y lavado del tejido. Después de obtener el corte se deben de eliminar detritus celulares, sales y lípidos del corte. Las sales pueden formar aductos con proteínas, haciendo complejos sus espectros de masas. Por su lado, los lípidos pueden inhibir la ionización. Los lavados se hace usualmente con etanol al 70% seguido de etanol al 90%, aunque hay autores que ha reportado mejores resultados con isopropanol.²⁷ Antes y después del lavado, hay que secar el corte. Hay dos formas reportadas de secar el tejido, con vacío o en frío.^{15,28} Debido al alto contenido de agua, la preparación de tejidos vegetales es más desafiante que tejidos animales, y un secado cuidadoso es de particular importancia.²¹

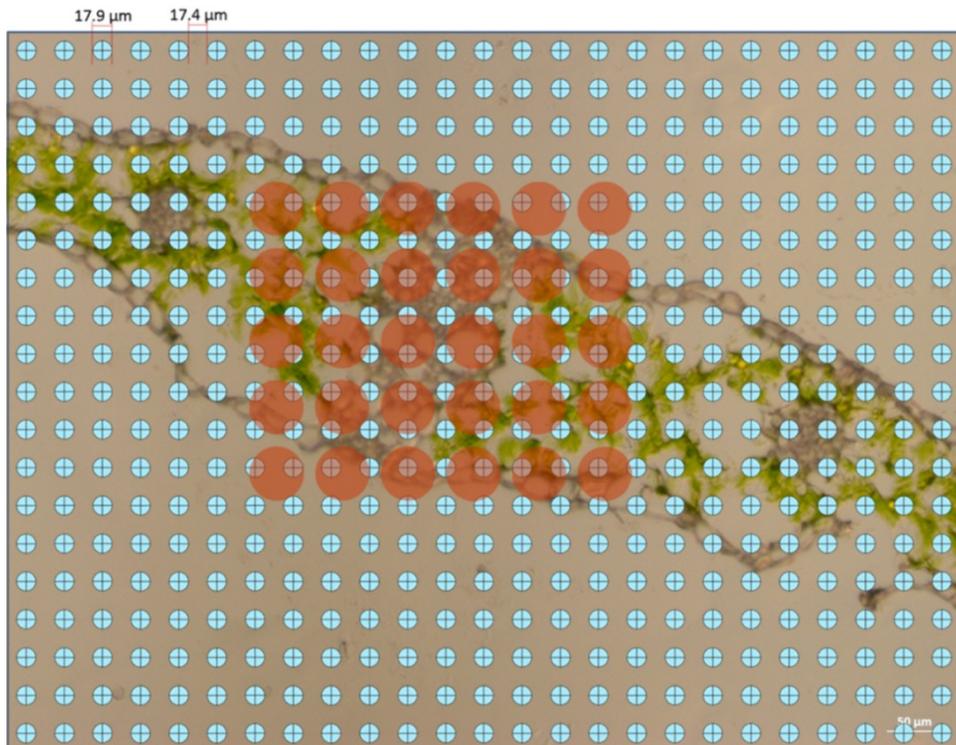
Obtención de la imagen óptica. Una vez seco el corte, se debe obtener una fotografía del mismo para poder correlacionarla con la imagen obtenida en MALDI, y así determinar la ubicación espacial de analitos. Se han reportado tres métodos para este fin: la fotografía macro, el escaneo digital y la microfotografía.²⁹⁻
³¹ La fotografía macro ofrece un acercamiento cuando se analizan áreas grandes de tejido, y la localización diferencial es a esta escala. El escaneo digital es muy útil al proveer una imagen de un área grande de tejido con gran resolución, pero requiere de un escáner especial. La fotomicrografía es la que ofrece mayor poder de amplificación y técnicas de contraste óptico como contraste de fases o Contraste por Diferencia Interferencial (DIC por sus siglas en inglés). Normalmente resulta más útil la fotomicrografía, aunque para abarcar áreas grandes de tejido se tiene que recurrir a la captura y fusión de varias de ellas.

Pretratamientos *in situ* y diámetro del láser. Antes de poder analizar el tejido se tienen que hacer dos procesos, una digestión si se van a analizar proteínas, y la aplicación de la matriz. Ambos procesos se llevan a cabo mediante la aplicación de una solución sobre el tejido. Debido a que la solución aplicada

puede disolver analitos en el tejido, no se puede aplicar una capa continua sobre el tejido. Esto llevaría a la migración por difusión de analitos sobre el tejido húmedo, perdiendo su ubicación espacial original (deslocalización de analitos). Es por ello que tanto la solución de enzima y matriz se deben de aplicar en forma de pequeñas gotas discretas.¹⁶ Para lograr esto se han empleado diferentes tecnologías como deposición manual de gotas, aerógrafos, impresoras químicas, electrospray, sublimación, el equipo ImagePrep de Bruker©, impresoras de inyección de tinta (inkjet) de escritorio, entre otros.³² ImagePrep es un equipo de Bruker© especialmente diseñado para esta tarea, sin embargo es costoso y consume una cantidad importante de solución (10 mL). Baluya et al.³³ reportaron el uso de una impresora inkjet de la compañía EPSON© para aplicar matriz a cortes de cerebro de rata. Compararon este método con electrospray y aerógrafo resultando superior el resultado con la impresora.

Esta etapa es crucial ya que determina la resolución del análisis. En la Figura 6 se muestra una representación gráfica de la relación que hay entre el diámetro del láser, de las gotas de matriz y la resolución final del análisis. Las impresoras candidatas para ser usadas de esta manera deben tener bandeja para imprimir CD/DVD, ya que en ella se puede colocar una laminilla. Una de ellas es la EPSON T50, y en la Figura 6 se ha representado también la distribución teórica de solución que puede ofrecer. El láser asignará la ubicación final de analitos. Se puede observar en la Figura 6 que algunos disparos del láser analizarían hasta cuatro gotas, asignando a esa área analitos representativos de cuatro puntos separados. Si las gotas fueran más grandes, el láser podría analizar dos veces la misma gota y asignar la misma composición para dos áreas que quizá tenían distintos analitos.

Es por ello que hay que tener cierto control en la forma en que se aplica las soluciones al tejido. Quizá no se pueda tener un control exacto, pero debería afinarse lo más posible.



Arreglo de puntos, láser y células

Impresora:	EPSON T50	Puntos de matriz MALDI:	 1 mm ² : =
Modo de impresión :	Texto (T)	Láser MALDI-MSI:	
Resolución:	720 X 720 PPI, 28.3 X28.3 PPM	Célula vegetal:	
Tamaño de gota:	3 pL		
Diámetro de gota:	17.9 μm		
Espacio interpunto:	17.4 μm		
Diámetro de láser MALDI-MSI:	50 μm		
Tamaño de célula vegetal:	30 μm		

Figura 6. Representación gráfica de la relación del pretratamiento *in situ* y el diámetro del láser con la resolución del análisis. La matriz o enzima se aplica al tejido en forma de pequeñas y discretas gotas (azul). Después el láser hará disparos que en función de su diámetro abarcará una o más zonas cubiertas por matriz, o espacios vacíos. Se ha ejemplificado a escala la distribución teórica que ofrece la impresora EPSON T50 sobre un corte transversal de hoja de trigo.

Se ha propuesto el tamaño del cristal formado por la matriz sobre el tejido como el factor limitante de la resolución.^{21,34–38} Esta propuesta tiene sentido por el hecho de que un cristal grande puede ser analizado dos o más veces por un láser pequeño. Sin embargo, hasta nuestro conocimiento, ningún autor ha considerado el diámetro de gota como verdadera área de muestreo de analitos.

Modelo de estudio para IS-RT-PCR y MALDI-MSI

Para estudiar y estandarizar los métodos de análisis IS-RT-PCR y MALDI-MSI, se empleará como modelo plantas con diferentes tipos de fotosíntesis. Para ello se utilizará trigo (*Triticum aestivum*) como modelo C_3 y amaranto (*Amaranthus hypochondriacus*) como modelo de planta C_4 .

En una planta C_3 el tejido fotosintético de la hoja está compuesto por un único tipo celular denominado células de mesófilo, como el caso del trigo. En una planta C_4 las hojas poseen además otro tipo celular que está íntimamente unido a los haces vasculares, la células de la vaina del haz, como el caso del amaranto. Estas diferencias tisulares generan en una hoja C_4 la denominada anatomía de Kranz (Figura 7), la cual está ausente en hojas C_3 .^{39,40}

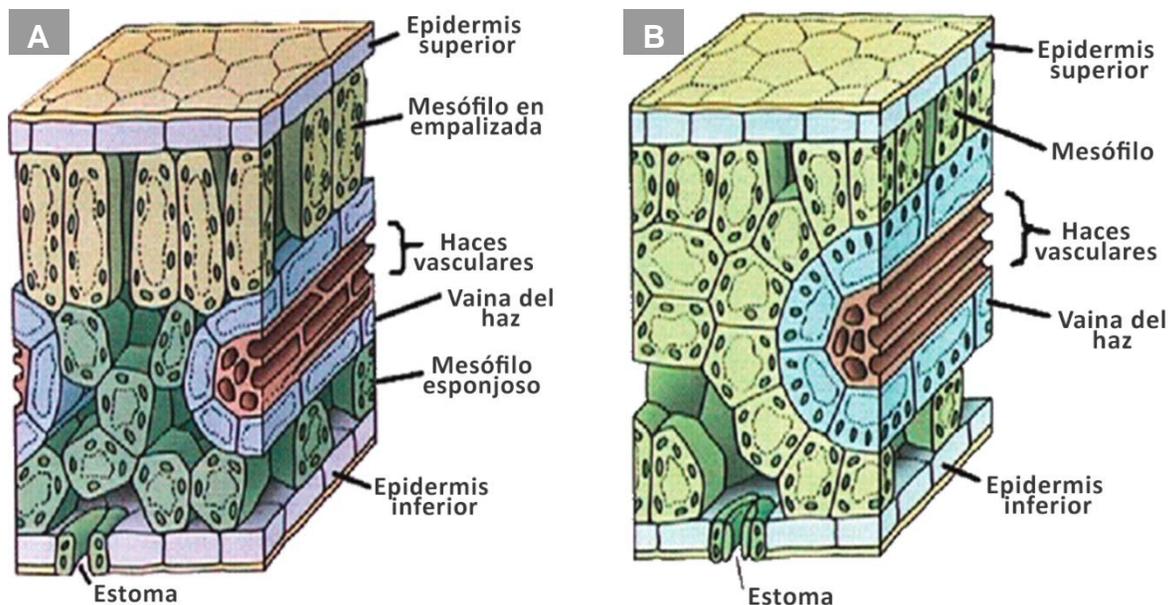


Figura 7. Representación gráfica de un corte transversal de una hoja C_3 y C_4 . En una hoja C_3 (A) solo las células de mesófilo poseen cloroplastos y no están unidas fuertemente al haz vascular. En una hoja C_4 (B) las células del mesófilo y de la vaina del haz poseen cloroplastos. Además, las células de la vaina del haz están unidas herméticamente al haz vascular “en forma de doná”, dando lugar a la anatomía de Kranz. Modificado de referencia 40.

En las plantas C₃ la fotosíntesis y fijación de carbono se da en las células de mesófilo, mientras que en las hojas C₄ el proceso de fijación de carbono está dividido entre las células del mesófilo y las de vaina del haz.^{39,41} En la Figura 8 se muestra la división del ciclo bioquímico de la fijación de carbono que ocurre en una hoja C₄ respecto a una hoja C₃. Este ciclo genera un ambiente rico en CO₂ y pobre en oxígeno en las células de la vaina del haz donde se expresa selectivamente la ribulosa 1,5-bifosfato carboxilasa/oxidasa (RuBisCO). Esta enzima también es capaz de fijar O₂ generando fosfoglicolato, cuya ruta de recuperación es costosa energéticamente para la planta. Por ello, las plantas C₄ han generado este microambiente en las células de la vaina del haz, para hacer más eficiente la actividad de la enzima encargada de la fijación del CO₂ RuBisCO.⁴¹

Así, en plantas C₄ como el amaranto se puede encontrar diferencialmente expresada RuBisCO entre las células de mesófilo y vaina del haz, que son también morfológicamente distintas (Figura 7).⁴²

La RuBisCO (EC 4.1.1.39) es una enzima heterómera compuesta por ocho subunidades grandes codificadas por el gen de cloroplasto *RbcL*, y ocho subunidades pequeñas codificadas por el gen nuclear *RbcS*. Cada subunidad grande posee un sitio catalítico.⁴¹

La diferencia morfológica entre células de la vaina del haz y células de mesófilo, así como la expresión/acumulación diferencial de *RbcL* en estas células, puede ser aprovechada para la estandarización de protocolos de análisis por IS-RT-PCR y MALDI-MSI.

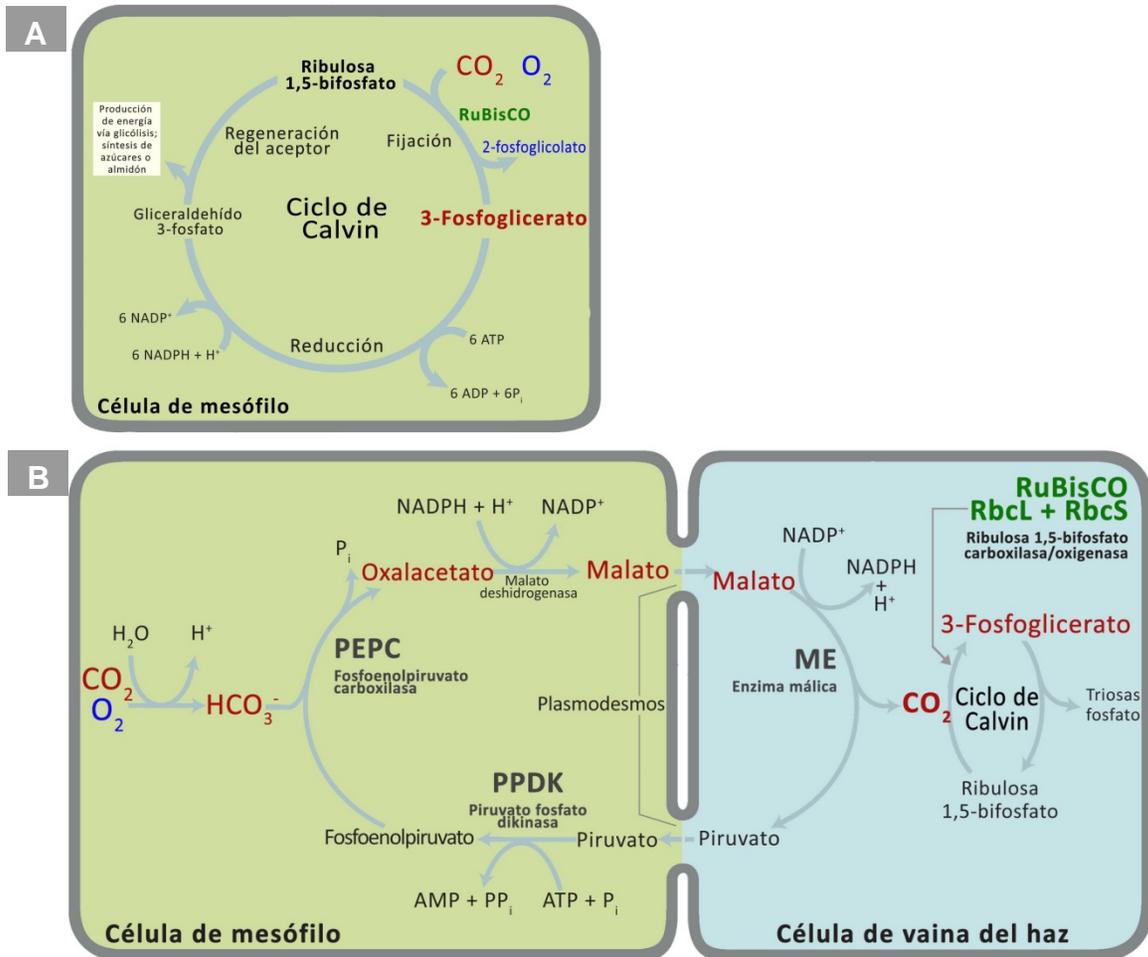


Figura 8. Metabolismo C_3 y C_4 para la fijación de carbono. A) En una hoja C_3 el CO_2 y O_2 del aire que entra por los estomas penetra en las células del mesófilo. Aquí RuBisCO toma el CO_2 para generar 3-fosfoglicerato y continuar con el ciclo de Calvin; o toma O_2 para generar 2-fosfoglicolato y ser enviado a una costosa ruta metabólica de recuperación de la ribulosa 1,5-bifosfato. B) En una hoja C_4 , en el mesófilo el dióxido de carbono es convertido a bicarbonato por la enzima anhidrasa carbónica. Después, el bicarbonato reacciona con fosfoenolpiruvato para generar oxalacetato por medio de la enzima fosfoenolpiruvato carboxilasa. Después, el oxalacetato es convertido a malato por la malato deshidrogenasa. Entonces el malato viaja selectivamente a las células de la vaina del haz por medio de plasmodesmos, y es descarboxilado por la enzima málica para generar piruvato y CO_2 . El CO_2 es fijado por RuBisCO a 3-fosfoglicerto que continúa con el ciclo de Calvin. El piruvato regresa a la célula de mesófilo y por medio de la piruvato fosfato dikinasa se regenera el fosfoenolpiruvato. Modificado de referencia 41.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 IS-RT-PCR

2.1.1 IS-RT-PCR en corte paradermal de hoja

Se cortaron fragmentos rectangulares de aproximadamente 4 x 5 mm a partir de una hoja fresca de *A. hypochondriacus*, y se analizó uno de ellos según el protocolo descrito por Athman et al.¹ con algunas variaciones.

Primers: Se diseñaron y mandaron a sintetizar primers específicos para el gen de la subunidad grande de RuBisCO (*RbcL*) de *Amaranthus hypochondriacus* y para el gen de actina de la misma planta. Se ajustó la temperatura de alineamiento a 55 °C y un tamaño de amplicón de 196 pb y 183 pb, lo cual se confirmó por medio de PCR punto final. En la Tabla 1 se muestran las secuencias de los primers.

Tabla 1. Primers utilizados en IS-RT-PCR				
Gen	Clave de acceso (NCBI)	Primer	Secuencia (5' - 3')	Tamaño de amplicón (pb)
<i>RbcL</i>	X51964.1	Forward	ACCTGGTGTTCTTCCTGTTG	196
		Reverse	GTCACGTCCCTCATTACGAG	
<i>Actin</i>	-----	Forward	ATGTTCCCAGGCATTGCTGACC	183
		Reverse	GGATTCATCGTATTCACCCTTGAG	

Fijación: Cinco fragmentos de hojas de 4 X 5 mm mencionadas fueron fijados en tubos para micro centrífuga de 2 mL, con 1.8 mL de fijador fresco FAA (formaldehído 2%, ácido acético 5% y etanol 63%) durante 3 h en hielo. Al inicio y cada h se colocó fijador fresco y se permeó durante 5 min con un vacío de 500 mmHg (en adelante cuando se refiera a vacío será esta magnitud de vacío). Al término, se lavaron los fragmentos tres veces durante 10 min con buffer de lavado 1 fresco (ácido acético 5% y etanol 63%), permeando al vacío 90 s cada vez. Después, se lavaron tres veces durante 3 min con buffer PBS (Na₂HPO₄ 10 mM y NaCl 130 mM pH 7.5), permeando 90 s cada vez.

Corte histológico: Se montaron los fragmentos en soportes para criostato, y se hicieron cortes paradermales de 20 μm hasta obtener una monocapa celular continua. Dos cortes paradermales se colocaron en sendos laminillas silanizadas, y se les adicionó 50.2 μL de agua y 2.5 μL de RNase OUT™ (Thermo Fisher Rockford, IL, USA) a cada una. A continuación se colocó una cámara para incubación en laminilla “Frame-Seal™ *in situ* PCR and Hybridization Slide Chambers” (Bio-Rad Hercules, CA, USA.) a cada corte.

Digestión del DNA: A cada laminilla se adicionó 7 μL de Buffer 10X y 2.5 μL de DNAsa del kit RQ1 RNase-Free DNase (Promega Madison, WI, USA), se mezcló y se incubaron a 37°C durante 45 min (T100™ Thermal Cycler Bio-Rad), después, se añadió 7.8 μL de la solución RQ1 DNase stop (Promega) y se incubó a 65°C por 10 min. Se removió por completo la solución y se lavó dos veces durante 1min con agua tratada con pirocarbonato de dietilo (agua DEPC en adelante), por último con una micropipeta de 10 μL se eliminó tanta agua como se pudo.

Retrotranscripción: Se añadió a cada laminilla la mezcla de 42.4 μL de agua DEPC, 7.0 μL de dNTP's y 1.75 μL del primer reverso, se mezcló y se incubó a 65 °C por 5 min y después a 4 °C durante 1min. Después, se añadió la mezcla de 14.0 μL de Buffer 5X First-Strand, 3.5 μL de DTT 0.1 M, 0.7 μL de RNase OUT y 0.7 μL de transcriptasa reversa SuperScript™ II (Thermo Fisher). En una de las laminillas, se reemplazó la transcriptasa reversa por agua DEPC como control (-). Se incubó a 50 °C durante 1 h, después a 85 °C durante 5 min, y finalmente a 4 °C. Se retiró la mezcla de reacción y se lavó dos veces con agua DEPC por 1min. El control negativo se perdió al pegarse en el adhesivo de la cámara “Frame-Seal™ *in situ* PCR and Hybridization Slide Chambers”, la muestra positiva se transfirió a un tubo para microcentrífuga de 0.2 mL y se continuó el protocolo en él.

PCR: Se adicionó al tubo la mezcla de 16.65 μL de agua DEPC, 2.5 μL de mezcla de primers para RbcL 5 mM c/u, 0.5 μL de dNTP's 10 mM, 5 μL de buffer 5X Phusion HF, 0.25 μL de polimerasa Phusion High-Fidelity (Thermo Fisher) y 0.1 μL de DIG-11-dUTP 1 mM (Hoffmann-La Roche Ltd., Mannheim, Alemania) y se mezcló. Se colocó en termociclador y se utilizó el siguiente programa: desnaturalización inicial 98 °C por 30 s, desnaturalización 98 °C por 10 s, alineamiento 55 °C por 25 s, elongación 72 °C por 10 s, elongación final 72 °C 10 min, por último la reacción se llevó a 10 °C. Se realizaron 30 ciclos de amplificación. Al finalizar se eliminó la mezcla de reacción y se lavó dos veces con buffer PBS por 5 min.

Inmunodetección de amplicones: Se eliminó tanto buffer PBS como fue posible, y se añadieron 100 μL de solución de bloqueo (BSA 1% m/v en PBS) y la mezcla se incubó por 30 min en hielo. Después, se eliminó la solución de bloqueo y se añadieron 50 μL de Anti-Digoxigenin-AP Fab fragments (Hoffmann-La Roche) 1.75×10^{-3} U/ μL , y se incubó por una hora a temperatura ambiente. Después, se eliminó la solución y se lavó dos veces durante 15 min con buffer de lavado 2 (Tris-Cl 100 mM y NaCl 150 mM pH 9.5).

Revelado: Se eliminó el buffer de lavado 2, y se adicionó una mezcla fresca y de 1.65 μL de BCIP (sal de 5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato, 4-toluidina) 50 mg/mL, 5.5 μL de NBT (cloruro de nitro-azul de tetrazolio) 30 mg/mL y 500 μL de buffer para fosfatasa alcalina (Tris-Cl 100 mM, NaCl 100 mM y MgCl_2 10 mM pH 9.5). Se guardó en la oscuridad a temperatura ambiente 10 min, y luego se monitoreo a simple vista y en microscopio hasta el desarrollo de una coloración morada. Una vez desarrollado el color, se eliminó la solución, se lavó tres veces con buffer de lavado 2 por 5 min, y una vez con agua DEPC. Se transfirió el corte a una laminilla, se eliminó el agua, se le adicionó 10 μL de glicerol al 40%, se cubrió con un cubreobjetos, y se selló con esmalte para uñas comercial. Por último, se obtuvieron fotomicrografías del corte (Axio imager M2 Carl-Zeiss,

Oberkochen, Alemania) con la técnica de Contraste por Interferencia Diferencial (DIC por sus siglas en Inglés).

2.1.2 IS-RT-PCR en fragmento de hoja

Se cortaron fragmentos rectangulares de aproximadamente 4 x 5 mm a partir de una hoja fresca de *A. hypochondriacus*, se fijaron como se describió en el numeral 2.1.1 y se procedió a la digestión del DNA.

Digestión de DNA: Se colocaron dos fragmentos de hoja en un tubo para microcentrífuga de 0.2 mL, y se les se adicionó la solución de 50.2 μ L de agua, 2.5 μ L de RNase OUT™ (Thermo Fisher), 7 μ L de Buffer 10X y 2.5 μ L de DNase del kit RQ1 RNase-Free DNase (Promega), se mezcló, se permeó dos veces al vacío durante 5´ y se incubaron a 37°C durante 45´ (T100™ Thermal Cycler Bio-Rad), después, se añadió 7.8 μ L de la solución RQ1 DNase stop (Promega), se mezcló, se permeó al vacío dos veces por 5 min y se incubó a 65 °C por 10 min. Se removió por completo la solución y se lavó dos veces permeando al vacío durante 5 min con agua DEPC, por último con una micropipeta de 10 μ L se eliminó tanta agua como se pudo.

Retrotranscripción: Se separaron los fragmentos de hoja en tubos distintos y a cada uno se le añadió la mezcla de 25 μ L de agua DEPC, 5.0 μ L de dNTP´s y 2.5 μ L del primer reverso, se mezcló, se permeó al vacío durante 5 min y se incubó a 65 °C por 5 min y después a 4 °C durante 1 min. Después, se añadió la mezcla de 10 μ L de Buffer 5X First-Strand, 2.5 μ L de DTT 0.1 M, 2.5 μ L de RNase OUT y 2.5 μ L de transcriptasa reversa SuperScript™ II (Thermo Fisher). En uno de los tubos, se reemplazó la transcriptasa reversa por agua DEPC como control (-). Se mezcló, se permeó dos veces al vacío durante 5 min y se incubó a 50 °C durante 1 h, después a 85 °C durante 5 min, y finalmente a 4 °C. Se retiró la mezcla de reacción y se lavó dos veces con agua DEPC permeando al vacío durante 5 min.

PCR: Se adicionó a cada tubo 50 μL de la mezcla de 66.6 μL de agua DEPC, 10 μL de mezcla de primers para RbcL 5 mM cada uno, 2 μL de dNTP's 10 mM, 20 μL de buffer 5X Phusion HF, 1 μL de polimerasa Phusion High-Fidelity (Thermo Fisher) y 0.4 μL de DIG-11-dUTP 1 mM (Hoffmann-La Roche), se mezcló y se permeó dos veces al vacío durante 5 min. Se colocó en termociclador y se utilizó el siguiente programa: desnaturalización inicial 98 °C por 30 s, desnaturalización 98 °C por 10 s, alineamiento 55 °C por 25 s, elongación 72 °C por 10 s, elongación final 72 °C por 7 min, por último la reacción se llevó a 10 °C. Se realizaron 30 ciclos de amplificación. Al finalizar se reservó cada mezcla de reacción en tubos separados y se hicieron tres lavados ambas muestras. En el primero, se adicionaron 100 μL de buffer PBS, se agitó suavemente con vortex, se dejó reposar 5 min y se reservó la solución de lavado. El segundo lavado fue idéntico al primero. En el tercer lavado, se adicionaron 100 μL de buffer PBS, se permeó al vacío dos veces durante 5 min y se reservó la solución de lavado. Las mezclas de reacción de PCR y las soluciones de los tres lavados se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 2%.

Inmunodetección de amplicones: En cada tubo, se eliminó tanto buffer PBS como se pudo y se añadieron 150 μL de solución de bloqueo (BSA 1% m/v en PBS), se permeó al vacío dos veces durante 5 min y se incubó por 30 min en hielo. Después, se eliminó la solución de bloqueo y se añadieron 100 μL de Anti-Digoxigenin-AP Fab fragments (Hoffmann-La Roche) 1.75×10^{-3} U/ μL , se permeó al vacío dos veces durante 5 min y se incubó por una hora a temperatura ambiente. Después, se eliminó la solución y se lavó dos veces durante 15 min con 200 μL de buffer de lavado 2 (Tris-Cl 100 mM y NaCl 150 mM pH 9.5), permeando al vacío durante 5 min en cada lavado.

Revelado: Se eliminó el buffer de lavado 2, y se adicionó una mezcla fresca y de 1.65 μL de BCIP 50 mg/mL, 5.5 μL de NBT 30 mg/mL y 500 μL de buffer para fosfatasa alcalina (Tris-Cl 100 mM, NaCl 100 mM y MgCl_2 10 mM pH 9.5). Se permeó al vacío durante 5 min y se guardó en la oscuridad a temperatura

ambiente 10 min, y luego se monitoreo a simple vista y en microscopio hasta el desarrollo de una coloración morada. Una vez desarrollado el color, se eliminó la solución, se lavó tres veces con buffer de lavado 2 permeando al vacío por 5 min, y una vez con agua DEPC. Se transfirió cada fragmento a una laminilla, y se obtuvieron fotomicrografías (Axio imager M2 Carl-Zeiss) con la técnica DIC.

2.1.3 IS-RT-PCR en fragmento permeabilizado de hoja

Se cortaron fragmentos rectangulares de aproximadamente 4 x 5 mm a partir de una hoja fresca de *A. hypochondriacus*, se fijaron y permeabilizaron según el protocolo de Pasternak et al.¹⁰

Fijación y permeabilización: Dos fragmentos de las medidas mencionadas se colocaron en un tubo para microcentrifuga de 1.5 mL y se les adicionó 1 mL de metanol puro (MeOH), se permeó al vacío durante 3 min y luego se incubó a 37 °C por 20 min con agitación a 700 rpm. (Thermomixer compact, Eppendorf, Hamburgo, Alemania). Se eliminó el MeOH, se agregaron 0.8 mL de MeOH nuevo, se permeó al vacío durante 3 min y luego se incubó a 60 °C por 3 min con agitación a 700 rpm. Después, se transfirieron los fragmentos con el etanol a un tubo de ensayo, y se adicionó lentamente 3.2 mL de agua de alta pureza tipo I según la ASTM D1193 (agua tipo I en adelante). Se lavaron con agua dos veces permeando al vacío por 5 min y se añadieron 60 µL de agua tipo I y 60 µL de una solución de macerozima 0.15% (Karlán, Cottonwood, AZ, USA), driselasa 0.2% (Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, USA) y MES 2 mM (Sigma Aldrich). Se mezcló, se permeó al vacío durante 5 min y se incubó a 37 °C durante 40 min con una agitación de 600 rpm. Al término de la incubación, se eliminó la mezcla de reacción y se lavó con buffer MTSB (Microtubule-stabilization buffer, PIPES 50 mM, EGTA 5 mM, MgSO₄ 5mM pH 7.0). Después, se eliminó el buffer MTSB y se adicionaron 100 µL de buffer de permeabilización (Triton X-100 3%, DMSO 10% en MTSB), se mezcló, se permeó al vacío durante 5 min y se incubó a 37 °C durante 20 min con agitación de 500 rpm. Por último, se eliminó el buffer de

permeabilización y se lavó cuatro veces con 300 μ L de MTSB permeando al vacío durante 1 min entre cada lavado.

Después de este tratamiento, los fragmentos se analizaron por IS-RT-PCR como se describe en el numeral 2.1.2 a partir de la digestión de DNA, analizando los genes *RbcL* y de actina.

2.1.4 Optimización de la permeabilización de fragmento de hoja

Con una perforadora de papel de un orificio (MAE) se cortaron cinco fragmentos circulares de aproximadamente 3 mm de diámetro a partir de una hoja fresca de *A. hypochondriacus*. Un fragmento se conservó sin ningún tratamiento, otro se tiñó con safranina para tinción de Gram (hycel) y tres se fijaron con MeOH según el protocolo de Pasternak et al.¹⁰ De los tres que se fijaron, uno se conservó sin teñir, otro se tiñó con safranina y otro con tinta china azul (Pelikan).

Fijación: Los fragmentos de las medidas mencionadas se colocaron en un tubo para microcentrífuga de 1.5 mL y se les adicionó 1 mL de metanol puro (MeOH), se permeó al vacío durante 3 min y luego se incubó a 37 °C por 20 min con agitación a 700 rpm.

Tinción: La tinta china azul se diluyó 1:10 en agua tipo I, y la safranina se usó al 0.5% en agua (Hycel Zapopan, Jalisco, México). El fragmento a teñir se colocó en un tubo para microcentrífuga de 1.5 mL, se le agregó 500 μ L del colorante respectivo y se permeó a vacío por 5 min. Después, se eliminó el colorante y se enjuagó el fragmento con agua tipo I en agitación, dos veces.

Por último se tomaron fotomicrografías de campo claro de los fragmentos (Discovery.V8 Carl Zeiss).

2.2 MALDI-MSI

2.2.1 Estabilización de hojas

Obtención de extractos proteínicos de hojas:

Se pesó 1 g de hojas frescas de amaranto (*A. hypochondriacus*), maíz (*Zea mays*), papaya (*Carica papaya*) y trigo (*Triticum aestivum*). Cada muestra se molió en mortero con 5 mL de solución de extracción (Tween 20 0.1%, glicerol 10% en PBS). Después se centrifugó a 17 000 g por 15 min a 4 °C, y se midió el contenido de proteína del sobrenadante con el método de Bradford (Bio-Rad Hercules, CA, USA).

Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio en condiciones reductoras (R-SDS-PAGE):

Se preparó en un tubo para centrífuga la mezcla del gel separador como se indica en la Tabla 2. Se agitó y se vertió entre dos vidrios colocados en su bastidor, con espacio de 1.5 mm entre ellos. Una vez vertida la totalidad de la mezcla, se agregó etanol al 70% con ayuda de un atomizador. Se dejó reposar entre 10 a 15 min hasta la solidificación de la mezcla, y posteriormente se eliminó el etanol. Después, en otro tubo se preparó la mezcla del gel concentrador y se agitó. Con cuidado, se agregó la mezcla entre los vidrios sobre el gel separador y se colocó un peine de 1.5 mm de grosor con 15 dientes. Se dejó reposar 10 a 15 min hasta solidificación completa.

Tabla 2. Composición del gel para R-SDS-PAGE	
Compuesto	Cantidad (μL)
Gel concentrador	
Acrilamida/Bis-acrilamida 30%	334
Tris HCl pH 6.8	625
SDS 10%	25
Persulfato de amonio (PSA) 10%	25
Tetrametiletilendiamina (TEMED)	2.5
Agua tipo I	1489
Gel separador	
Acrilamida/Bis-acrilamida 30%	3600
Tris HCl pH 8.8	2000
SDS 10%	80
Persulfato de amonio (PSA) 10%	80
Tetrametiletilendiamina (TEMED)	8
Agua tipo I	2232

Se analizaron por medio de electroforesis en condiciones reductoras y desnaturalizantes 30 μg de proteína proveniente de los extractos de hojas y 5 μg de las enzimas pancreatina y amilasa.

Zimograma de proteasas:

Se preparó un gel de poliacrilamida como se indicó en R-SDS-PAGE, con las mezclas indicadas en la Tabla 3. Después, se analizaron por medio de electroforesis en condiciones reductoras y desnaturalizantes 30 μg de proteína proveniente de los extractos de hojas y 5 μg de las enzimas pancreatina y amilasa como control de actividad enzimática.

Zimograma de amilasas:

Se preparó un gel de poliacrilamida como se indicó en R-SDS-PAGE, con las mezclas indicadas en la Tabla 4. Después, se analizaron por medio de electroforesis en condiciones reductoras y desnaturalizantes 30 μg de proteína proveniente de los extractos de hojas y 5 μg de las enzimas pancreatina y amilasa como control de actividad enzimática.

Tabla 3. Composición del gel para zimograma de proteasas	
Compuesto	Cantidad (µL)
Gel concentrador	
Acrilamida/Bis-acrilamida 30%	334
Tris HCl pH 6.8	625
SDS 10%	25
Persulfato de amonio (PSA) 10%	25
Tetrametiletilendiamina (TEMED)	2.5
BSA 5%	50
Agua tipo I	1439
Gel separador	
Acrilamida/Bis-acrilamida 30%	3600
Tris HCl pH 8.8	2000
SDS 10%	80
Persulfato de amonio (PSA) 10%	80
Tetrametiletilendiamina (TEMED)	8
BSA 5%	160
Agua tipo I	2072

Tabla 4. Composición del gel para zimograma de amilasas	
Compuesto	Cantidad (µL)
Gel concentrador	
Acrilamida/Bis-acrilamida 30%	312.5
Tris HCl pH 6.8	625
SDS 10%	25
Persulfato de amonio (PSA) 10%	25
Tetrametiletilendiamina (TEMED)	2.5
Almidón 0.091 %	390
Agua tipo I	1120
Gel separador	
Acrilamida/Bis-acrilamida 30%	3600
Tris HCl pH 8.8	2000
SDS 10%	80
Persulfato de amonio (PSA) 10%	80
Tetrametiletilendiamina (TEMED)	8
Almidón 0.091 %	1250
Glicerol 50%	982

Después de la electroforesis, los geles para los zimogramas se incubaron a 25 °C en buffer de renaturalización (Tris 50 mM, CaCl₂ 5 mM, MgCl₂ 5mM y triton X-100 2.5 %). El gel con BSA se incubó 20 min y el gel con almidón por 2 h. Enseguida, el gel con BSA se incubó en buffer de desarrollo (Tris 50 mM, CaCl₂ 5 mM, MgCl₂ 5mM y triton X-100 1 %; pH 7.5) por 24 h a 37 °C. Después de las incubaciones, se enjuagaron los geles con agua tipo I, y el gel de almidón se tiñó con lugol hasta coloración azul. El gel con BSA se tiñó con azul de coomassie hasta coloración azul. Después, el gel con almidón se decoloró 10 min en agua tipo I y el gel con BSA en metanol 20% ácido acético 5% durante 3 h.

2.2.2 Corte histológico de hojas

Preparación de Medios de inclusión (MDI's): Se prepararon cinco medios de inclusión: Gelatina al 2% y 10%, carboximetilcelulosa (CMC) 2 y 4%, y gelatina 10% CMC 5%. Gelatina 2 y 10%. Se pesaron 1 y 5 g de gelatina tipo B de piel de bovino (Sigma Aldrich) y se adicionó a cada uno 50 mL de sacarosa 9.25% en sendos tubos para centrífuga de 50 mL. Se calentaron en horno de microondas en intervalos de 10 s seguido de mezcla con espátula, hasta disolución completa. CMC 2 y 4%. Se pesaron 1 y 2 g de CMC (Farmacia y droguería La Piedad) y se adición a cada uno 10 mL de solución de sacarosa al 9.25%. Con una espátula se homogenizó hasta humectación total de la CMC, y luego se adicionó a cada tubo 40 mL sacarosa 9.25%. Se calentaron en horno de microondas en intervalos de 10 s seguido de mezcla con espátula, hasta disolución completa. Gelatina 10% CMC 5%. Se pesaron 5 g de gelatina y 2.5 g de CMC y se colocaron en un tubo para centrífuga de 50 mL. Se adicionaron 10 mL de solución de sacarosa al 9.25%, y con una espátula se homogenizó hasta humectación total. Se adicionaron 40 mL de solución de sacarosa al 9.25% y se calentó en horno de microondas en intervalos de 10 s seguido de mezcla con espátula, hasta disolución completa.

Ensayos de desempeño en criostato: Se cortaron cinco fragmentos de hoja fresca de *A. hypochondriacus* de aproximadamente 3 x 6 mm. En soportes separados, se incluyeron los fragmentos con cada MDI preparado, manteniendo la

vena principal perpendicular a la base del soporte. Se enfriaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ en criostato (SLEE Medical No. 10150000) durante 1 h. Posteriormente, se hicieron cortes de 20 y 50 μm evaluando en cada uno de ellos los siguientes cinco parámetros:

Eficiencia de corte: Describe la facilidad de corte del MDI a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Esta propiedad se midió haciendo un corte manual, desactivando el motor de corte y usando la manivela del criostato. Se describió la sensación de resistencia del MDI al corte como flexible, suave, semiduro y duro, y se les asignó el valor de 4, 3, 2 y 1 respectivamente. El valor más deseable es el 4 que representa un corte flexible, como si se tratase de helado, y el más indeseable es 1, como si se tratase de hielo.

Integridad estructural: Capacidad de sujetar el corte sin que se desintegre. Esta propiedad se midió tomando el corte con pinzas frías a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ por una de sus orillas, y se observó en qué grado el corte se desintegraba. Se describió el grado de fragmentación del corte como la escala gradual: estable, integridad parcial, sin integridad y desintegrado, y se les asignó el valor de 4, 3, 2 y 1 respectivamente. El valor más deseable es el 4, que representa un corte que se puede tomar de la orilla sin que se rompa, como si se tratase de un disco hecho de papel. El más indeseable es 1, como si se tratase de un disco hecho de aguanieve.

Continuidad: Grado en que el área del corte permanece ininterrumpida. Esta propiedad se midió observando la totalidad del área del corte, observando si hay poros o fisuras. Se evaluó visualmente si el 100, 95, 90 o 85% del área era continua y se les asignó el valor de 4, 3, 2 y 1 respectivamente. El valor más deseable es 4, siendo un corte que no posee orificios y es poco poroso, y el menos es 1, siendo un corte muy poroso y con orificios.

Maleabilidad: Capacidad del corte a deformarse sin llegar a romperse. Esta propiedad se midió tomando el corte con dos pinzas enfriadas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ y doblando el corte por el centro hasta que sus medias caras casi hagan contacto. Luego se dobló por el contrario el corte, y se repitió esta acción cinco veces. Se evaluó en una escala del 4 al 1 en función de la resistencia. El valor más deseable fue 4 y se representa un corte que puede regresar a su estado plano sin daño aparente, y 1

(el menos deseable) representa un corte que al doblarlo se haya roto en tres o más pedazos.

Torsión: Capacidad del corte de permanecer plano. Esta propiedad se midió obteniendo un corte, retirando la placa antienrollamiento y dejando expuesto el corte durante dos minutos sobre el portacuchilla. Después de este tiempo, se observó el grado en que el corte se enrolló sobre sí mismo. Se evaluó en una escala del 4 al 1, donde 4 es el valor más deseable y representa un corte que permaneció plano (como se obtuvo). El valor menos deseable fue 1 y representa un corte que se haya enrollado sobre sí mismo por completo.

2.2.3 Secado del corte

Análisis del deterioro del corte por secado: Se obtuvo un fragmento de aproximadamente 3 X 6 mm de hoja fresca de trigo (*Triticum aestivum*) y se incluyó en agarosa 5% en agua tipo I. Se enfrió en criostato a -20 °C durante 1 h. Se obtuvo un corte de 50 µm y se transfirió a una laminilla fría (-20 °C) presionando el mismo contra el corte. Se transfirió rápidamente al microscopio, se enfocó con el objetivo 5X y se tomó una fotomicrografía (tiempo 0 s). Se tomaron fotomicrografías 15, 30, 45 y 80 s después, mientras la laminilla permanecía en el microscopio con la luz incidente de la lámpara.

Análisis del efecto del solvente usado para el MDI: Se pesaron dos veces 2.5 g de agarosa y se disolvieron en sendos volúmenes de 50 mL PBS 1X y sacarosa 9.25%, calentando en horno de microondas. Se obtuvieron fragmentos de aproximadamente 3 X 6 mm de hoja fresca de trigo (*Triticum aestivum*) y se incluyeron en cada uno de estos MDI. Se enfriaron en criostato a -20 °C durante una hora. Se obtuvieron cortes de 50 µm y se transfirieron a una laminilla fría (-20 °C) presionando el mismo contra el corte. Se dejaron secando a -20 °C durante toda la noche, al día siguiente se observaron al microscopio y se tomaron fotomicrografías.

Análisis del efecto del método de secado: Se obtuvieron fragmentos de aproximadamente 3 X 6 mm de hoja fresca de trigo (*Triticum aestivum*) y se incluyeron en solución de CMC 4% en sacarosa 9.25%. Se enfriaron en criostato a -20 °C durante 1 h. Se obtuvieron dos cortes de 15 µm y se transfirieron a sendos laminillas frías (-20 °C) presionando el mismo contra el corte. Uno de ellos se guardó a -20 °C a presión atmosférica y el segundo a temperatura ambiente en un desecador con un vacío de 500 mmHg. Se dejaron secar toda la noche y al día siguiente se observaron al microscopio y se obtuvieron fotomicrografías.

Análisis del efecto del grosor del corte tras el secado: Se obtuvieron fragmentos de aproximadamente 3 X 6 mm de hoja fresca de trigo (*Triticum aestivum*) y se incluyeron en gelatina 10% CMC 2% en sacarosa 9.25%. Se enfriaron en criostato a -20 °C durante 1 h. Se obtuvieron dos cortes, uno de 15 µm y uno 50 µm, y se transfirieron a sendos laminillas frías (-20 °C) presionando el mismo contra el corte. Se secaron a temperatura ambiente en un desecador con un vacío de 500 mmHg durante toda la noche. Al día siguiente se observaron al microscopio y tomaron fotomicrografías.

2.2.4 Pre tratamientos *in situ*

Análisis de la distribución de gotas de tinta de la impresora EPSON T50: Se hizo un orificio rectangular de 25 X 75 mm a un CD. Se colocó una laminilla de las preparadas en el numeral anterior con cortes de trigo (análisis del efecto del grosor del corte tras el secado) en el orificio del CD y se colocó en la bandeja para CD de una impresora EPSON T50 (Epson Suwa, Nagano, Japón). Se elaboró una plantilla para imprimir sobre CD/DVD en Adobe Photoshop CS6®. La plantilla constó de una hoja de 12 X 12 cm con un círculo inscrito, con una resolución de 5760 PPI y espacio de color CMYK (C: cian, M: magenta, Y: amarillo y K: negro). En él se trazó un rectángulo del tamaño de una laminilla (75 X 25 mm) ubicado en la misma posición que en el CD. Dentro del rectángulo, se trazaron cuatro rectángulos más pequeños de sendos colores CMYK y se imprimieron sobre la laminilla. Se observó la muestra al microscopio y se tomaron fotomicrografías. Se

regresó la laminilla a la impresora y se reimprimió la plantilla sobre el mismo. Se tomaron nuevas fotomicrografías. Los cuatro rectángulos de color CMYK se movieron dos píxeles hacía el lado izquierdo de la plantilla y se reimprimió sobre la laminilla. Se volvieron a tomar fotomicrografías.

Análisis de la aplicación de matrices MALDI con la impresora EPSON

T50: Se retiraron los cartuchos de tinta de la impresora EPSON T50 y se lavó el cabezal con agua tipo I y acetonitrilo (ACN, Tedia company, Inc. Boston, MA, USA). Se prepararon tres soluciones de las matrices MALDI más recurridas: Ácido sinapínico (SA), ácido α -ciano-4-hidroxicinámico (CHCA) y ácido 2,5-dihidroxibenzoico (DHB). El SA se preparó a 20 mg/mL: Se pesaron 0.4 g de ácido sinapínico (Sigma Aldrich) y se agregaron 10 mL de ACN. Se agregaron 10 mL de una solución de acetato de sodio 20 mM y ácido fórmico 0.1% y se agitó hasta disolución. El CHCA se preparó a 10mg/mL: Se pesaron 0.2 g de ácido sinapínico (Sigma Aldrich) y se le agregaron 10 mL de ACN. Se agregaron 10 mL de una solución de acetato de sodio 20 mM y ácido fórmico 0.1% y se agitó hasta disolución. El DHB se preparó a 30 mg/mL: Se pesaron 0.6 g de ácido sinapínico (Sigma Aldrich) y se le agregaron 10 mL de ACN. Se agregaron 10 mL de una solución de acetato de sodio 20 mM y ácido fórmico 0.1% y se agitó hasta disolución. Se mezcló 4.5 mL de solución de matriz CHCA con 0.5 mL de tinta cian (CHCA-C), de igual manera se mezcló ácido sinapínico con tinta magenta (SA-M) y ácido dihidroxibenzoico con tinta negra (DHB-K). Se cargaron 10 mL de esta mezcla en cartuchos reutilizables para EPSON T50 y se colocaron en la impresora EPSON T50 en su respectivo color. Se imprimió la plantilla con recuadros de colores CMYK sobre una laminilla limpia, y se tomaron fotomicrografías.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 IS-RT-PCR

3.1.1 IS-RT-PCR en corte paradermal de hoja

Para poder hacer propuestas de mejora al protocolo de IS-RT-PCR, primero se ejecutó el protocolo propuesto por Athman et al.,¹ en una muestra de hoja de *A. hypochondriacus*, en el cual se encontraron diversas dificultades.

Se tuvieron dos problemas importantes en la ejecución del protocolo. El primero fue que el corte paradermal no permaneció adherido a la laminilla pese a que estaba silanizado. Esto provocó que el mismo flotara y se moviera con el flujo de las soluciones que se añadían a la cámara, provocando que uno de ellos se aproximara demasiado al borde del marco de goma y se pegara en el adhesivo. Así fue que se perdió la muestra control negativo. El segundo problema aconteció cuando el adhesivo del marco de la cámara se adhirió fuertemente a la película de celofán, dificultando así la manipulación y el pipeteo la intentar destapar la cámara. Este hecho promovió la pérdida de reactivos por salpicaduras. Pese a las dificultades, se concluyó el análisis de uno de los cortes paradermales, la muestra positiva. En la Figura 9 se muestra una fotomicrografía de esta muestra tras el análisis completo.

Tras las dificultades para llevar a cabo las reacciones en laminilla, la muestra positiva se transfirió a un tubo para microcentrífuga en el que se llevó a cabo la PCR y procesos subsecuentes. Ahí, la delgada muestra (20 μm) sufrió daño mecánico debido al flujo de reactivos. Esto se puede evidenciar en la Figura 9 por la presencia de espacios vacíos donde debería haber células de mesófilo e idioblastos con prominentes drusas. Así mismo, se observa que algunas células de la vaina del haz han perdido sus cloroplastos. Sin embargo, los haces

vasculares proporcionaron un importante soporte estructural y evitaron que la muestra se fragmentara.

El gen *RbcL* se encuentra en el genoma del cloroplasto, por lo que su detección se dio en este organelo (Figura 9). La coloración esperada para una reacción positiva es morada, sin embargo en el corte se observan tonos predominantemente marrones, quizá como consecuencia de la interferencia con el color de la clorofila. A pesar de ello, se observa una tendencia a tonos más oscuros (indicativos de la presencia de mensajeros de *RbcL*) en las células de la vaina del haz que en las células de mesófilo. Esto es acorde a lo que sucede normalmente en una hoja C_4 como la de *A. hypochondriacus*.

La variación de tonos en los cloroplastos podría dar una idea semicuantitativa de la presencia del RNAm de un determinado gen analizado. En la Figura 9 se observan cloroplastos que poseen una coloración desde negativa, como el caso de un cloroplasto de vaina del haz (CVH -), hasta una coloración acentuadamente positiva con un tono morado evidente (CVH +++).

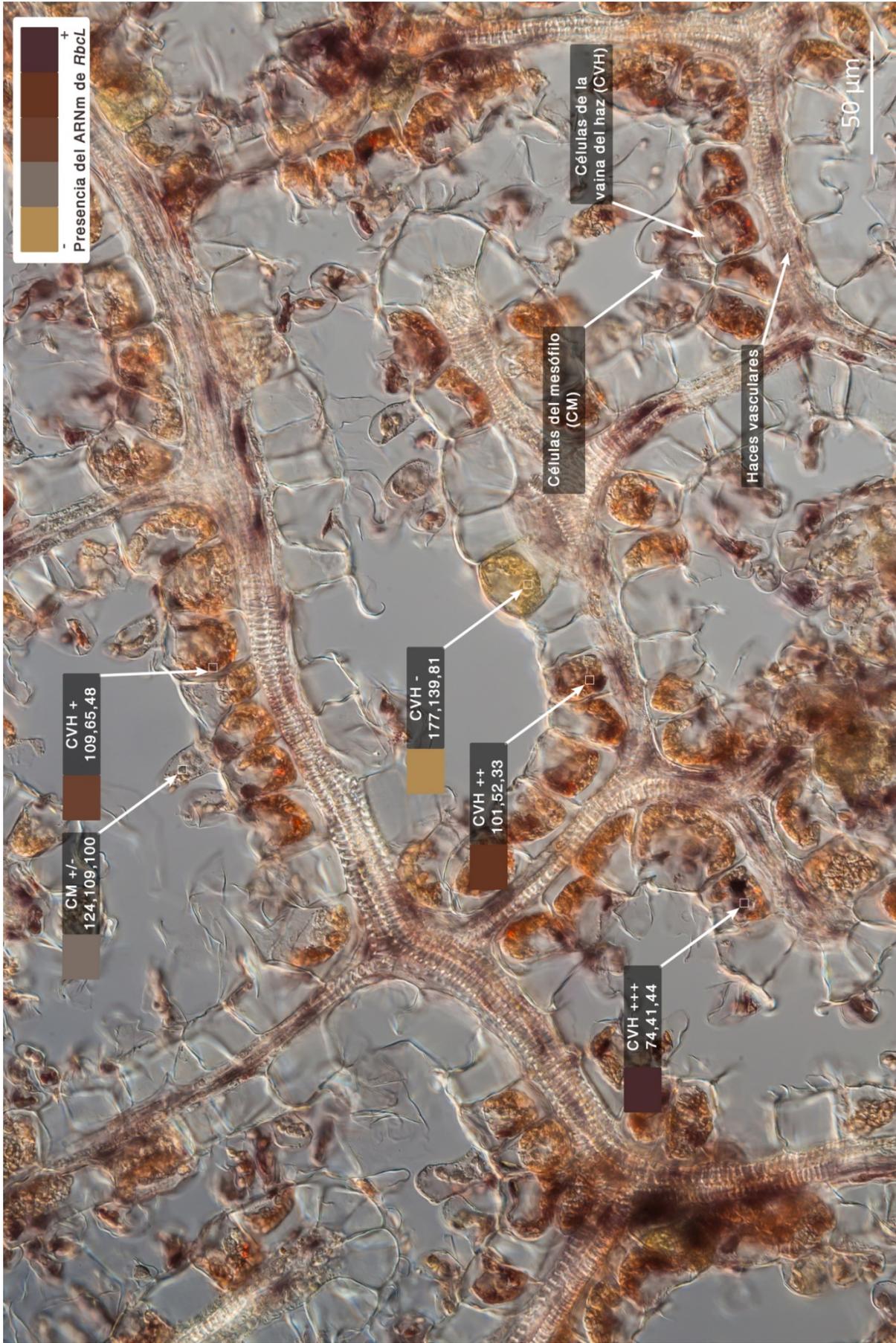


Figura 9. Fotomicrografía por DIC de un corte paradermal de hoja de *A. hypochondriacus* en el que se analizó el RNAm del gen *Rbcl* por IS-RT-PCR. CVH: Células de la Vaina del Haz, CM: Células del mesófilo. Las flechas apuntan a un recuadro que abarca un área de 3.4 X 3.4 μ m en la que se midió el color promedio. Se muestra la combinación RGB en el recuadro negro y a la izquierda de este, un parche con una muestra de tal color. En función del cambio en el color, se propone un análisis semicuantitativo de la presencia del RNAm del gen *Rbcl*.

Con estas acotaciones, se asignó un valor de “positividad” a otros cloroplastos con colores representativos a los del resto de la imagen, y se les asignó la escala creciente en “positividad” -, +/-, +, ++ y +++. En estos cloroplastos se midió el color promedio de un área de 3.4 X 3.4 μm (11.6 μm^2) (acotada por un cuadrado) en la escala RGB. Los valores obtenidos se muestran en la Figura 10 como valor R, valor G, y valor B, y a la izquierda de ellos se muestra un parche con la mezcla de color obtenida por esta combinación. Si ordenamos estos parches de color en orden creciente de positividad se genera una escala tonal que da una guía visual de la concentración de RNAm del gen *RbcL*. Más aún, si los valores RGB de estos tonos se grafican, se observa una tendencia a la disminución del valor del canal rojo y verde conforme la muestra se vuelve más positiva (Figura 10).

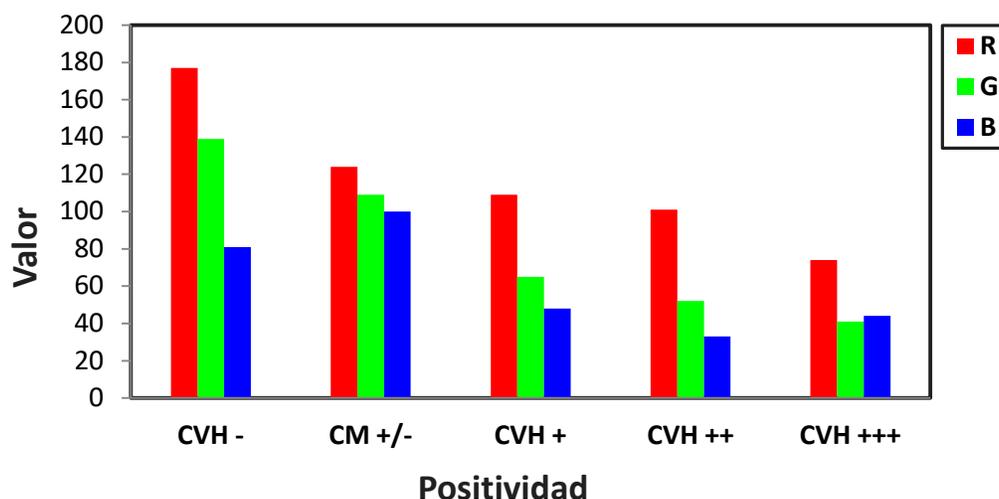


Figura 10. Variación de los canales RGB en el color de cloroplastos en función de su contenido de RNAm de *RbcL*. CVH: Célula de la vaina del haz, CM: célula de mesófilo. -, +/-, +, ++ y +++ designa una escala creciente de “positividad” (presencia de RNAm). Conforme aumenta el contenido de RNAm en cloroplasto, el color del cloroplasto disminuye en los valores del canal R (rojo) y G (verde).

Este análisis es una propuesta para en un futuro poder hacer del análisis de IS-RT-PCR, un análisis con cuantificación relativa. Sin embargo, falta aún estandarizar parámetros digitales y de gestión de color para hacer estudios repetibles.

La muestra analizada generó una gran cantidad de información visual, que eventualmente (teniendo un control -) se podría traducir en interpretaciones metabólicas de la planta. Sin embargo, el protocolo propuesto por Athman et al.¹ es complicado debido a las manipulaciones que se deben hacer en la laminilla. Además, es también costoso dados los volúmenes de mezcla de reacción necesarios para la cámara de incubación en laminilla (70 μ L), las cámaras para laminilla per se, y el uso de dos kit para tratamiento con DNAsa que el autor propone. Es por ello que en el presente trabajo se abordó el desarrollo de un método más sencillo y económico, que evitara en lo posible el uso de volúmenes grandes de reacción y el manejo de cortes frágiles.

3.1.2 IS-RT-PCR en fragmento de hoja

En comparación con un corte histológico, es más fácil manipular un pequeño fragmento de una hoja que conserve su estructura de epidermis a epidermis. Esto se observó al fijar los fragmentos que posteriormente iban a ser cortados en criostato. Además, estos fragmentos caben en tubos para microcentrífuga de 0.2 mL, pudiéndose cubrir con un volumen de hasta 30 μ L. Por ello, se decidió optimizar el protocolo de IS-RT-PCR en fragmentos de hoja.

Hasta nuestro conocimiento, este trabajo es el primero en hacer la reacción de IS-RT-PCR en un fragmento de hoja y no en un corte histológico. Una vez hecha la IS-RT-PCR en un fragmento de hoja, lo ideal sería obtener cortes histológicos del fragmento para analizar los resultados en capas celulares menos densas. En este experimento no se hizo así porque la reacción no fue homogénea en todo el fragmento, solo los bordes del mismo presentaron coloración positiva. Por ello, una microscopía del fragmento completo proporcionó información más útil.

En las Figuras 11 y 12 se exponen la muestra positiva y negativa de este experimento. Para facilitar la apreciación de la coloración positiva (tonos rojos, morados y magentas), se ha eliminado selectivamente el color de las fotomicrografías. En las imágenes A de las Figuras 11 y 12 se muestra la imagen en color original, y en B las fotomicrografías decoloradas selectivamente, para mostrar que esta edición digital no altera el resultado final. Se puede apreciar que la reacción de IS-RT-PCR solo se da en los bordes del fragmento de hoja. Esto se pudo deber a que alguno o varios de los reactivos no penetraron en el interior del fragmento de hoja, a pesar de la permeación al vacío que se llevó a cabo en cada etapa del proceso. Se esperaba que, al ser un fragmento de hoja, los reactivos pudieran ingresar a través de las zonas expuestas como resultado del corte, y difundieran al interior a través del mesófilo, como lo hace el aire. Sin embargo, la penetración de los reactivos fue limitada.

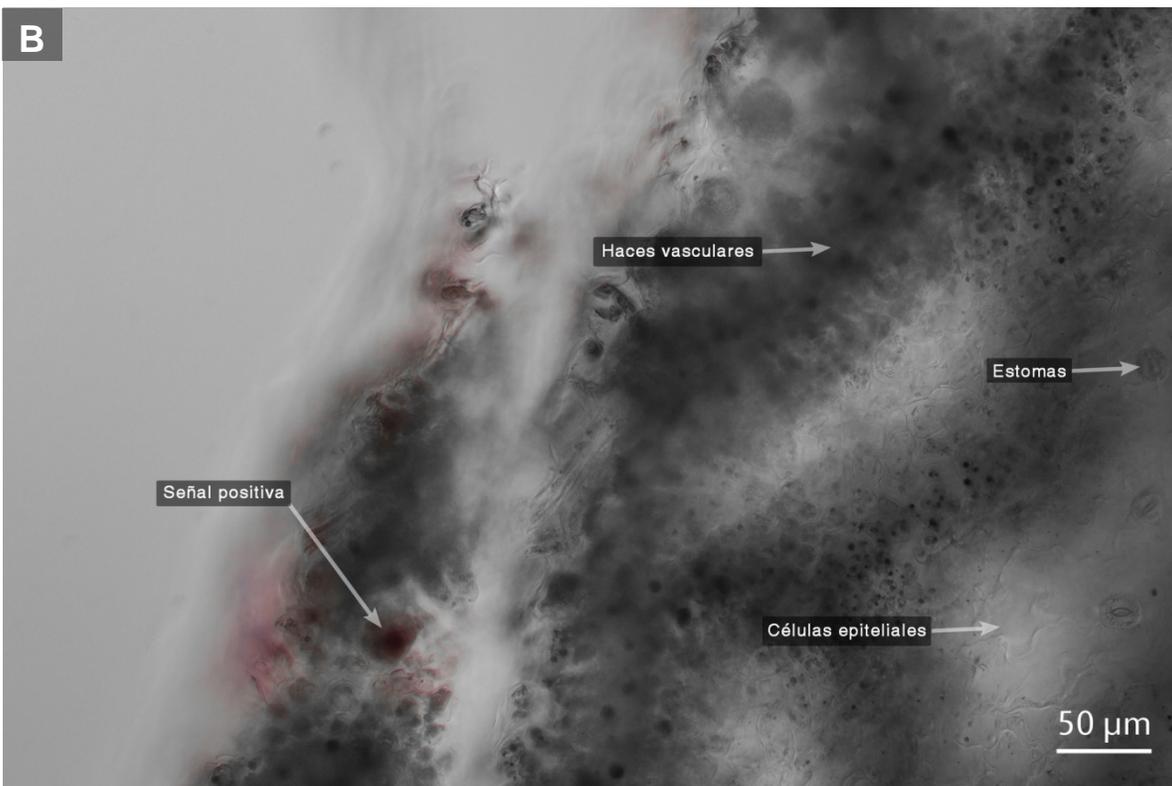
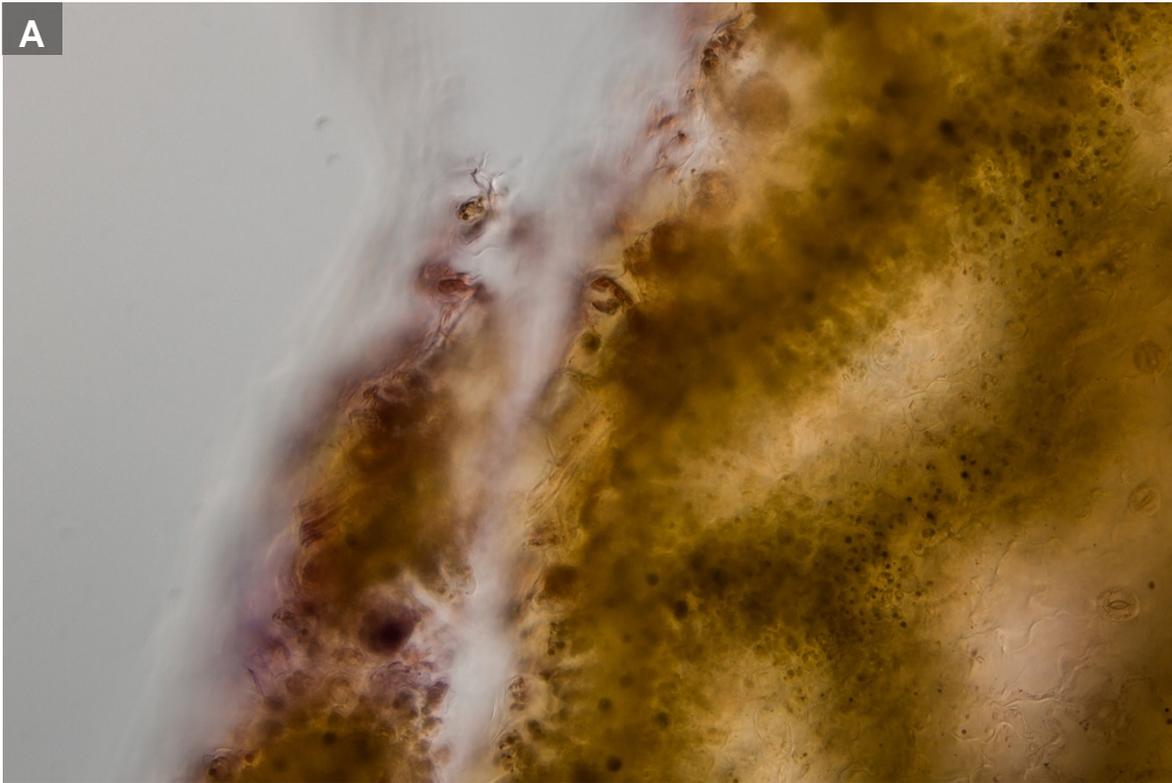


Figura 11. Fotomicrografías por DIC de un fragmento de hoja de *A. hypochondriacus* en el que se analizó el RNAm del gen *RbcL* por IS-RT-PCR, muestra positiva. A) Fotomicrografía original en color y B) fotomicrografía en la que se ha eliminado selectivamente el color de la imagen, exceptuando tonos morados, rojos y magentas, indicativos de reacción positiva. Las partes anatómicas del interior de la hoja se aprecian con menor detalle debido al grosor de la misma. Sin embargo, se puede apreciar la coloración positiva solamente en las orillas del fragmento.

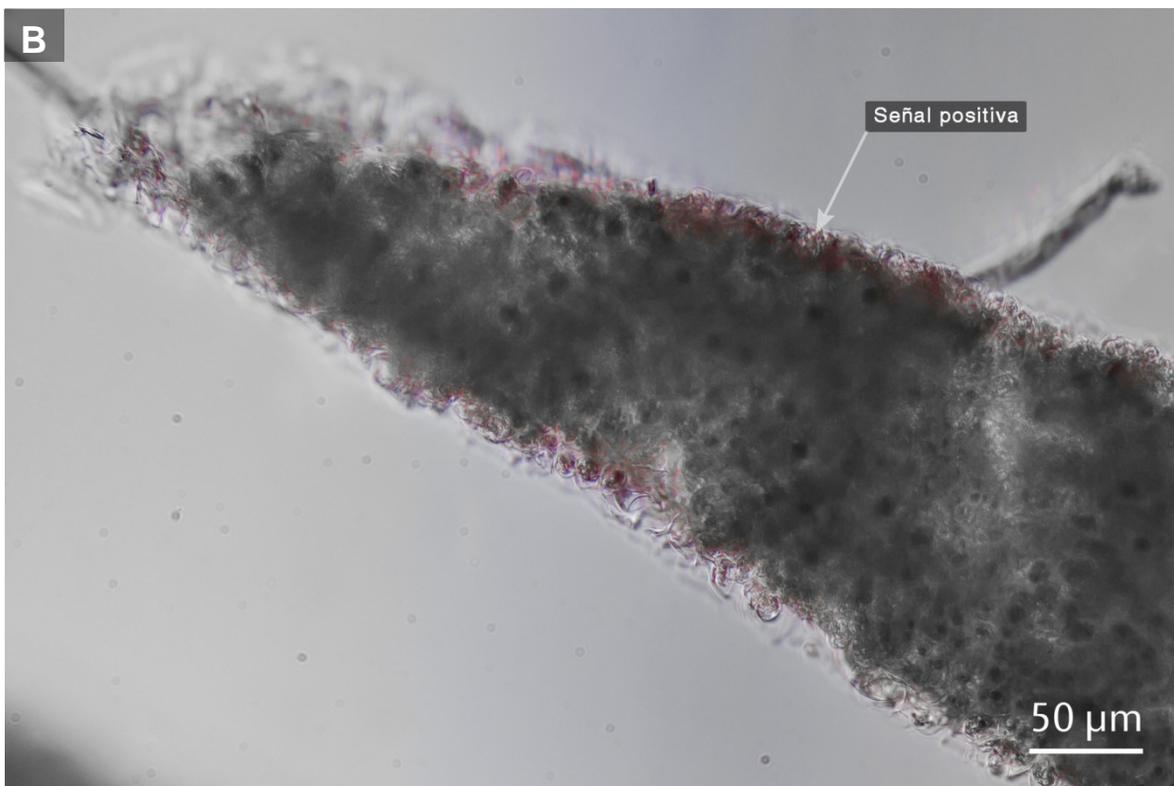
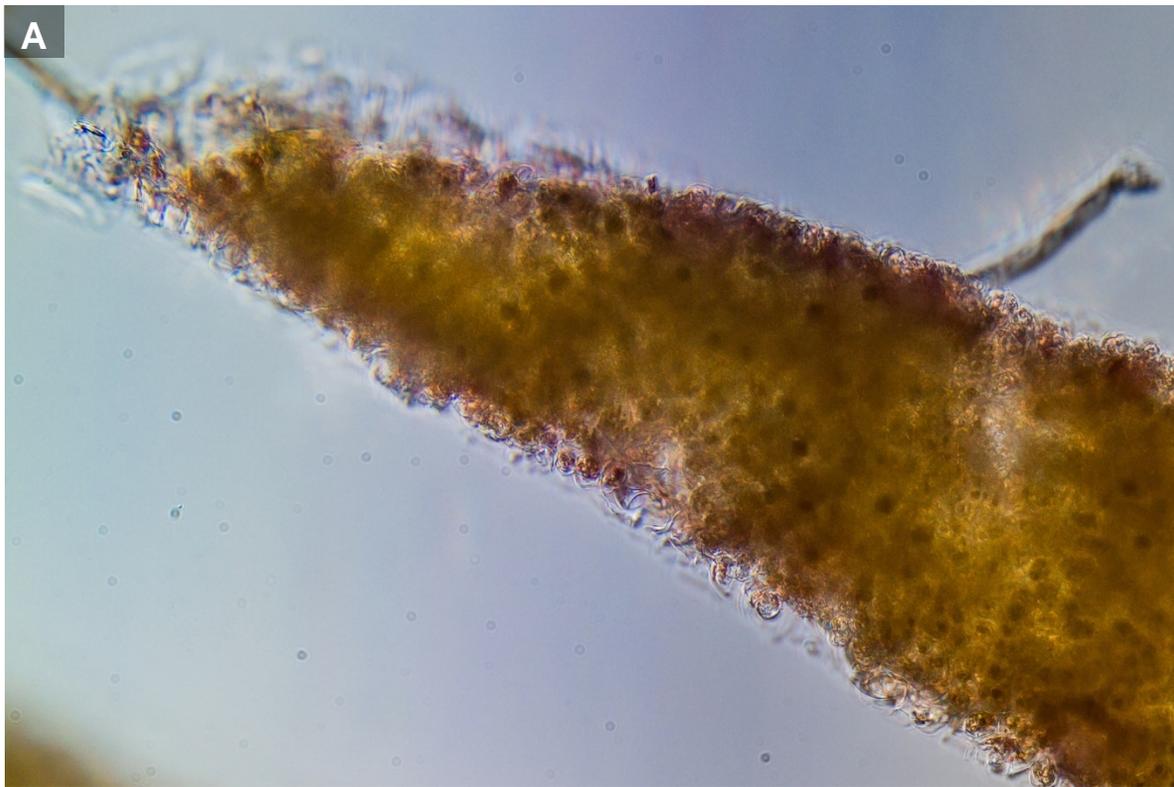


Figura 12. Fotomicrografías por DIC de un fragmento de hoja de *A. hypochondriacus* en el que se analizó el RNAm del gen *RbcL* por IS-RT-PCR, muestra negativa. A) Fotomicrografía original en color y B) fotomicrografía en la que se ha eliminado selectivamente el color de la imagen, exceptuando tonos morados, rojos y magentas, indicativos de reacción positiva. En este fragmento en que se omitió la adición de la transcriptasa inversa durante la retrotranscripción, arrojó también un resultado positivo. Esto quiere decir que en esta muestra se amplificó el cpDNA.

Por otro lado, en ambas muestras hay reacción positiva, como se puede evidenciar por la coloración morada en las Figuras 11 y 12, y por las bandas de amplificación en el gel de electroforesis de la Figura 13. En esta última figura se puede observar además que el proceso de lavado del fragmento es eficiente, ya que desde el primer lavado no hay una cantidad detectable de amplicón. Este último resultado descarta la posibilidad de detección deslocalizada de amplicones.

Athman et al.¹ y Pesquet et al.³ han reportado dificultades en la degradación de DNA genómico, lo que pueda dar origen a una reacción falsa positiva. *RbcL* es un gen de cloroplasto que no posee intrones, por lo que no se puede discriminar en el gel de la Figura 13 si se amplificó cDNA o cpDNA. El origen del falso positivo puede ser la suma de una serie de barreras como la pared celular y la membrana citoplasmática, que podrían impedir el acceso de la DNAsa. Athman¹ et al. solucionaron el problema de falsos positivos en cortes histológicos usando DNAsa y buffer de diferentes kit comerciales. Pesquet et al.³ lo hicieron usando una enzima de restricción. Sin embargo, merece atención trabajar en un método universal que permita degradar el gDNA y cpDNA independientemente de la enzima o kit comercial que se use.

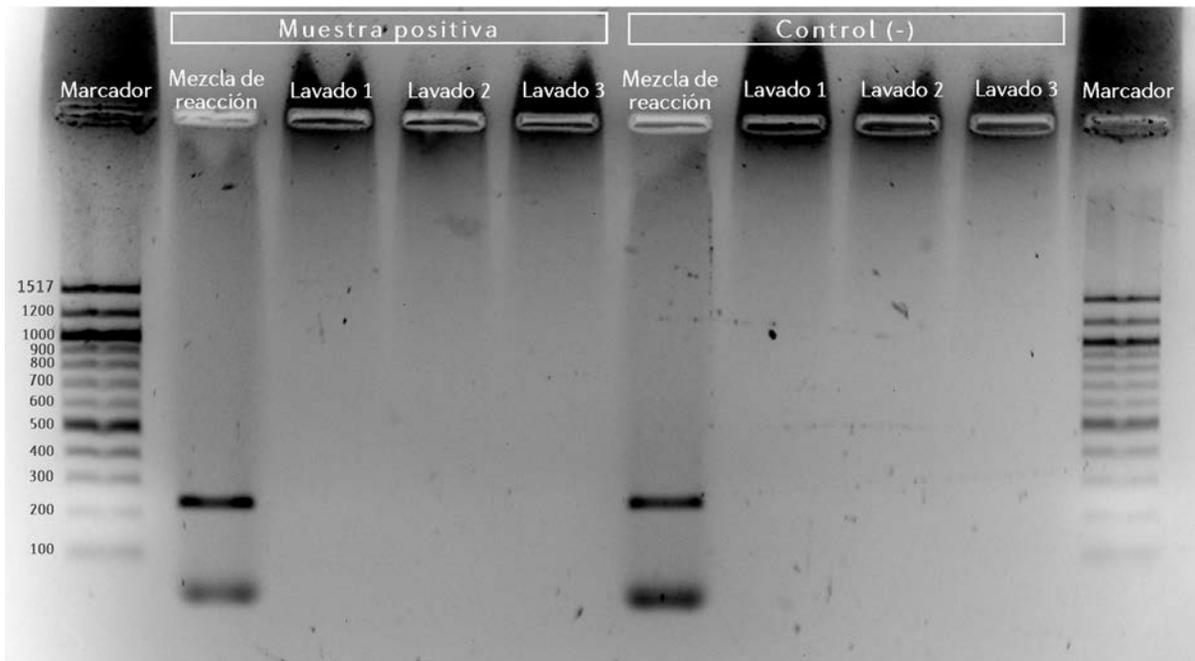


Figura 13. Análisis en gel de electroforesis de las mezclas de reacción de PCR *in situ* residuales. Muestra: Fragmento de hoja de *A. hypochondriacus*. Se muestra el análisis de la mezcla de reacción residual del fragmento, así como el agua residual de los sucesivos lavados del fragmento tras la PCR *in situ*, para la muestra positiva y negativa. Se observa la banda del amplicón de *RbcL* cercana a 200 pb, y una banda de primers por debajo de 100 pb. Tras el primer lavado, ya no hay una cantidad de amplicón detectable, por lo que es poco probable detectar un amplicón deslocalizado.

Una de las ventajas de la técnica IS-RT-PCR con respecto a ISH (*in situ* hybridization) es la amplificación de la señal. Es decir, mientras ISH detecta los RNAm existentes, en IS-RT-PCR estos son convertidos a cDNA y luego amplificados por PCR.¹ Esto en principio aumenta la sensibilidad del análisis. Sin embargo, las bandas observadas en la Figura 13 indican que una porción de los amplicones no se está quedando en el tejido. Esto tiene como ventaja la posibilidad de dar seguimiento a las etapas de IS-RT-PCR por métodos tradicionales como electroforesis en gel. Sin embargo, pone en duda el aumento en la sensibilidad si una parte de los amplicones son lavados. Probablemente solo los DIG-DNA unido a DNA o RNA que está enlazado al tejido tras la fijación, sean responsable de la detección *in situ*. O quizá este DIG-DNA más algún otro que haya quedado confinado en partes del tejido. Estas son algunas posibilidades, sin embargo vale la pena investigar que tan significativo es el aumento de sensibilidad entre ISH e IS-RT-PCR.

3.1.3 IS-RT-PCR en fragmento permeabilizado de hoja

Para eliminar las posibles barreras que hayan dado origen a fasos positivos y a reacciones incompletas en toda el área del fragmento, se llevaron a cabo tres procesos de permeabilización. El primero fue la eliminación de la cutícula, por medio de la fijación con MeOH. El segundo fue la eliminación de la pared celular por medio de la digestión con macerozima y driselasa. El tercero fue la eliminación de la membrana plasmática por medio del tratamiento con detergentes. Estas etapas de permeabilización mejoraron el proceso aumentando el área de reacción en el fragmento. Sin embargo no es su totalidad y el falso positivo persistió.

En la Figura 14 A se puede apreciar un incremento notable en las células que dieron reacción positiva en el fragmento de hoja, abarcando en promedio hasta 7 capas celulares y una distancia de 84.8 μm desde el borde del fragmento a su interior, en comparación una capa celular con reacción positiva obtenida sin la etapa de permeabilización (Figura 12). El fragmento de la Figura 14 A se obtuvo por corte de uno más grande en el que se realizó el protocolo de IS-RT-PCR, se ha marcado con una línea punteada y tijeras la zona de corte. Debido a ello, en ese borde hay una zona sin coloración ya que originalmente no estuvo expuesta a la serie de reacciones.

En la Figura 14 se observan las muestras positivas para el análisis del gen *RbcL* (Figura 14 A), y de actina (Figura 14 B). Los controles negativos respectivos no se muestran ya que dieron los mismos resultados que sus contrapartes positivas, en ambos casos el análisis de *RbcL* dio positivo y el de actina negativo.

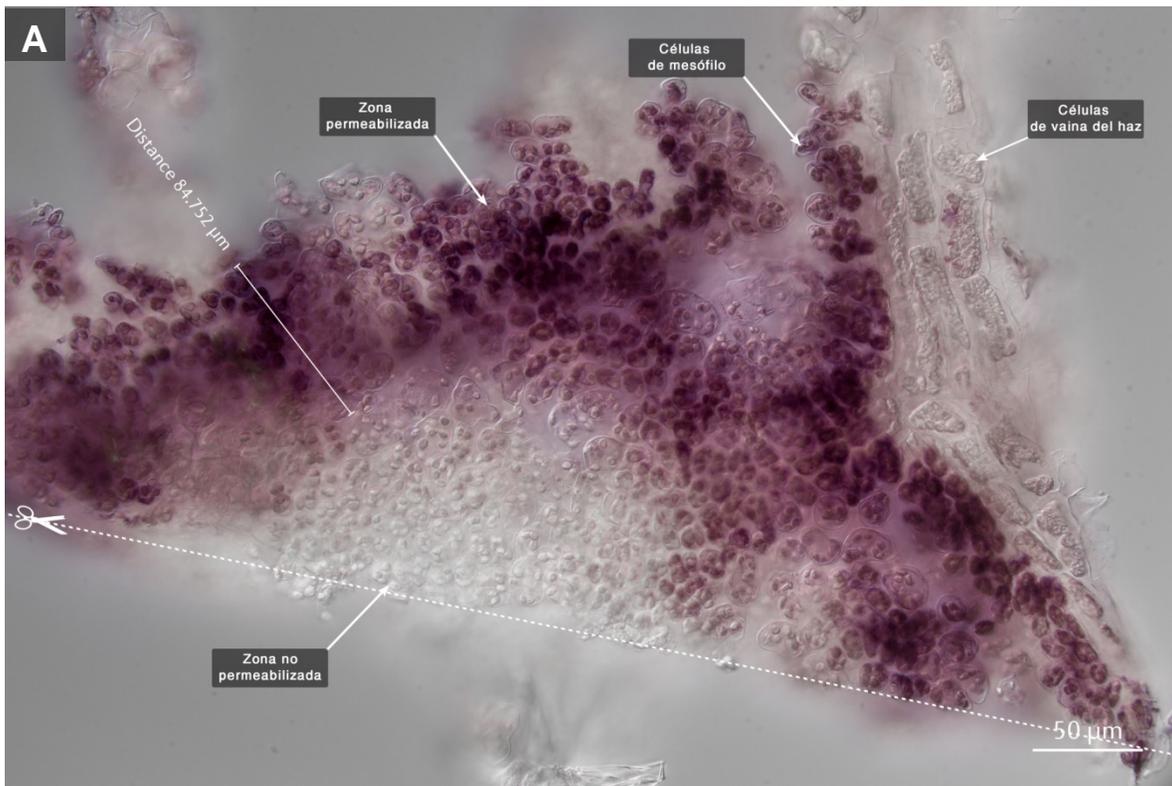


Figura 14. Fotomicrografías por DIC de fragmentos permeabilizados de hoja de *A. hypochondriacus* en los que se analizó el RNAm del gen *RbcL* y actina por IS-RT-PCR, muestras positivas. A) Análisis del gen *RbcL* y B) análisis del gen de actina. En A se observa un aumento en el área del fragmento con reacción positiva respecto a uno sin permeabilización (Figura 12 B). En ambas muestras (positiva y negativa) el análisis de *RbcL* dio positivo y el de actina negativo. En el análisis de *RbcL*, los cloroplastos de mesófilo dieron reacción positiva mientras que los de vaina del haz negativa.

Aún no se pueden hacer inferencias metabólicas de estos resultados, sin embargo, algo interesante a notar es la aparente expresión diferencial que se obtuvo del gen *RbcL* en función del tipo celular. Más interesante aún, es que la expresión de *RbcL* está “al revés” de cómo debería de ser en una planta C_4 como *A. hypochondriacus*, presente en la vaina del haz y ausente en mesófilo (Figura 8). Este tipo de resultado diferencial es el que se persigue con esta técnica, sin embargo, insisto en que aún no se pueden hacer inferencias hasta que se estandarice el método de análisis en fragmento.

En la Figura 15 se muestra un diagrama de flujo del proceso de IS-RT-PCR en fragmento de hoja, incluyendo las etapas de permeabilización. Se analizaron las mezclas residuales de reacción de Retrotranscripción y de PCR. La mezcla de Retrotranscripción se sometió a PCR punto final, y el producto se analizó mediante electroforesis en gel, y la mezcla de reacción residual de PCR se analizó directamente.

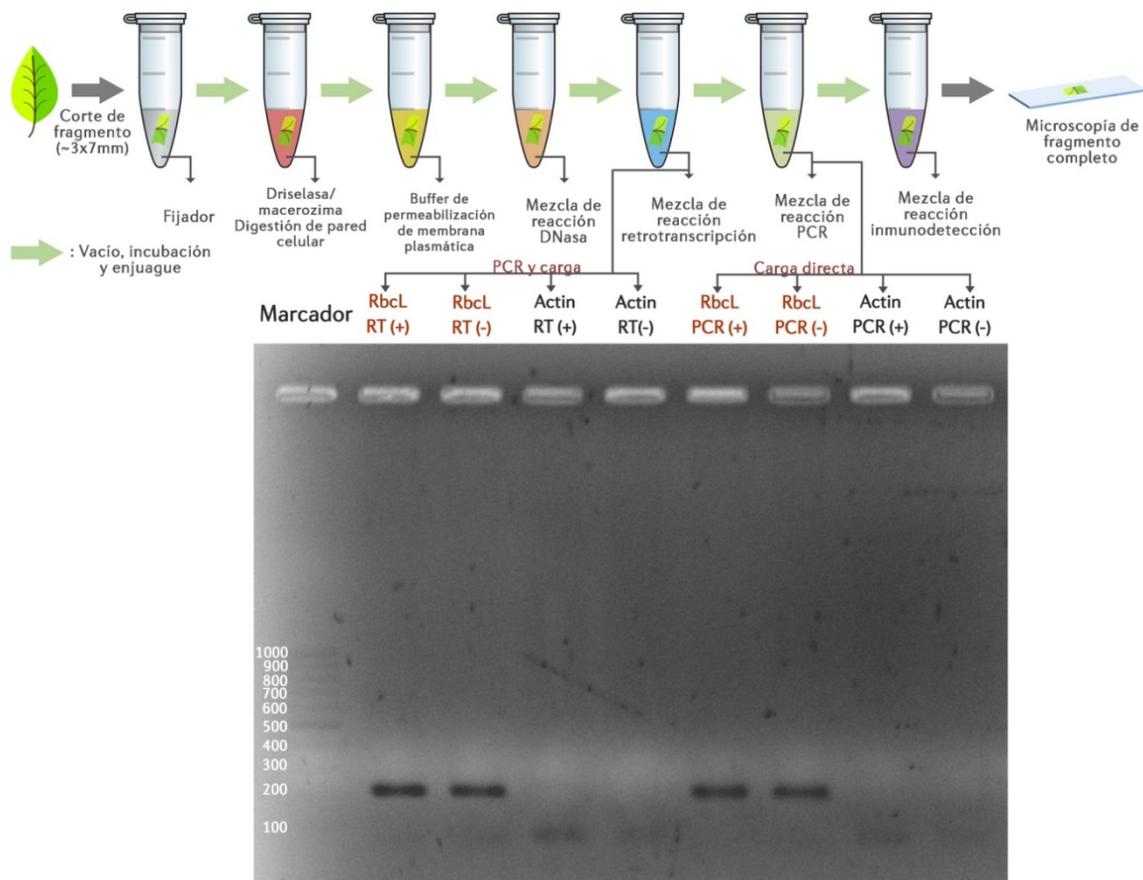


Figura 15. Diagrama de flujo del proceso de IS-RT-PCR y análisis en gel de electroforesis de las mezclas de reacción *in situ* residuales. Muestra: Fragmento permeabilizado de hoja de *A. hypochondriacus*. RT designa los carriles en que se analizó la mezcla de reacción residual de retrotranscripción *in situ*, tras someterlo a PCR. PCR en los que se analizó la mezcla residual de reacción de PCR *in situ*. Se corrobora el resultado positivo de *RbcL* para ambas muestras (positiva y negativa) desde la retrotranscripción, y negativo para actina.

A pesar de la permeabilización del tejido se sigue observando un falso positivo para el gen *RbcL*, al parecer la DNasa no alcanzó a entrar en el cloroplasto. Por otro lado, el gen de la actina es nuclear y constitutivo, sin embargo no fue detectado en el análisis de electroforesis en gel ni *in situ*.

Con estos resultados, observamos que hace falta trabajar de manera detallada en la permeabilización de un fragmento de hoja para que puedan ingresar todas las enzimas y hacer su actividad. Quizá después de estandarizar esta etapa, no resulte difícil llevar a cabo la IS-RT-PCR.

3.1.4 Optimización de la permeabilización de fragmento de hoja

Como se comentó antes, hace falta un estudio detallado de la permeabilización del fragmento de hoja. Debido a que en el proceso completo de IS-RT-PCR se invierte una cantidad considerable de tiempo y reactivos, se buscó otra manera de analizar el grado de permeabilización. Una tinción simple es una buena opción, sin embargo los colorantes usuales son moléculas pequeñas que pueden ingresar fácilmente a las células permeabilizadas.

La tinta china es un colorante en suspensión que posee una distribución de tamaño de partícula entre 160 y 250 nm.⁴³ Por su lado, la safranina es un colorante que en agua forma una solución verdadera, por lo tanto posee tamaño de partícula menor a 1 nm. Debido a sus propiedades colorantes y tamaño de partícula, estos se utilizaron para analizar el grado de permeabilización de fragmentos de hoja.

En la Figura 16 se puede ver que un fragmento de hoja sin ningún tratamiento (A) no es permeable ni siquiera a moléculas pequeñas (safranina) a pesar de que el mesófilo de la hoja esté expuesto en sus bordes (B). Sin embargo, en un fragmento fijado con MeOH (C) la safranina puede ingresar a la totalidad del mismo (D). En contraparte, la tinta china no puede ingresar en la totalidad de un fragmento fijado con MeOH (E). Estos resultados coinciden con las diferencias de tamaño de partícula de ambos colorantes. La safranina al ser una molécula pequeña puede ingresar a todo el tejido que el MeOH además de fijar, lo ha permeabilizado, mientras que la tinta china al poseer tamaños de partícula muchas veces mayor no puede. Las zonas que se tiñeron en B y E son debido en cierta medida al daño mecánico que hizo la perforadora al momento de obtener el fragmento.

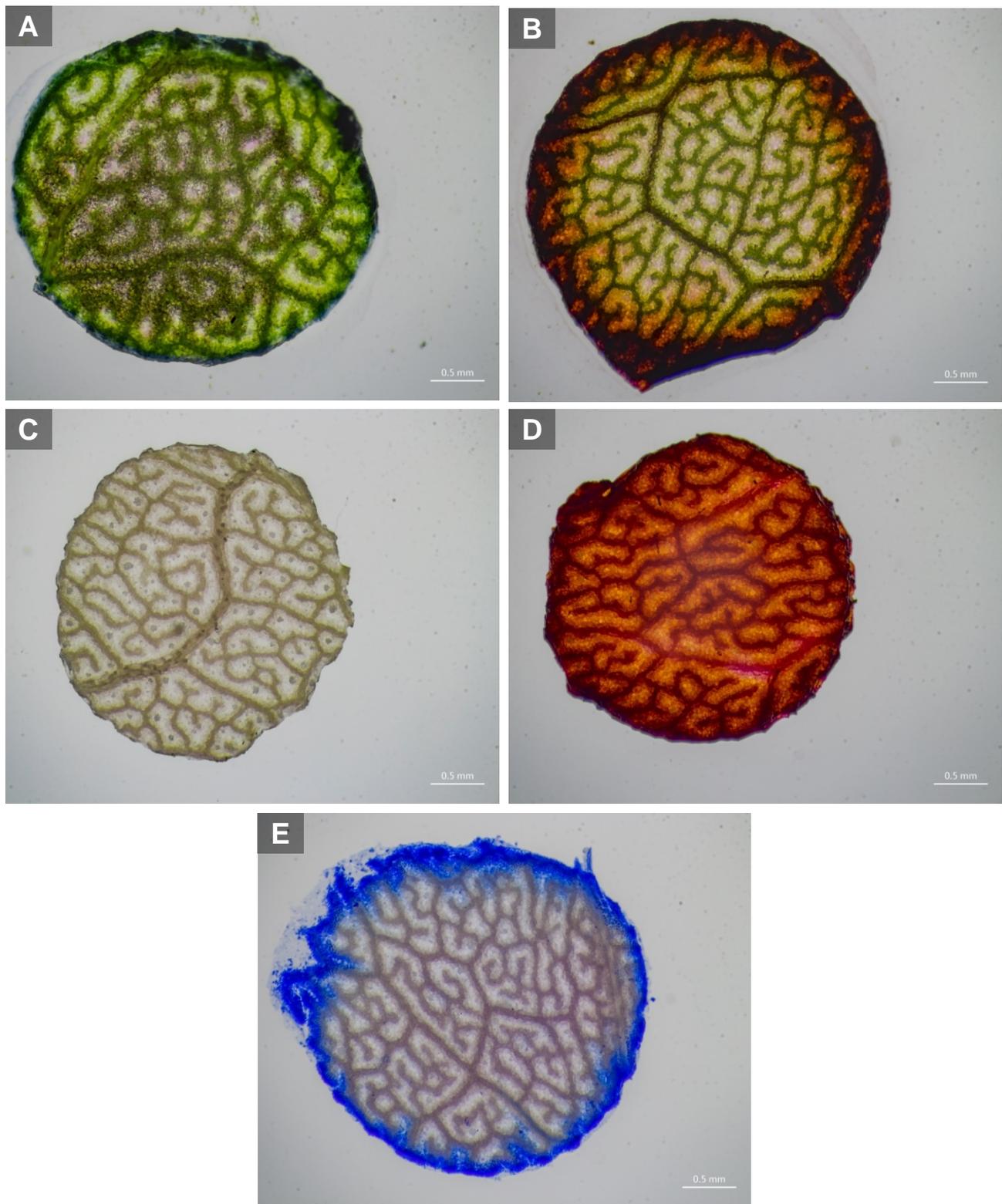


Figura 16. Fotomicrografías en campo claro de ensayos de permeabilización de fragmentos de hoja de *A. hypochondriacus*. Fragmento de hoja A) sin tratamiento ni tinción, B) sin tratamiento y teñido con safranina, C) fijado con MeOH y sin tinción, D) fijado con MeOH y teñido con safranina y E) fijado con MeOH y teñido con tinta china. La safranina es una molécula pequeña que pueda penetrar fácilmente en una hoja permeabilizada con MeOH, sin embargo no en una hoja sin permeabilización. Esta diferencia puede ser debida a que el MeOH elimina la cutícula. Por su lado, la tinta china es una suspensión que no puede penetrar al interior de la hoja, aunque esta haya sido permeabilizada con MeOH, hacen falta tratamientos más agresivos para que ingresen partículas grandes a la hoja.

El tratamiento con MeOH fija el tejido, elimina la clorofila y, según Pasternak et al.¹⁰ también elimina la cutícula. La eliminación de la cutícula con el MeOH podría ser parcialmente cierta, pues la safranina penetra muy bien después de este tratamiento. Sin embargo, en el análisis de los fragmentos del experimento de la Figura 14 A se encontraron zonas en el interior del fragmento (donde no se observa reacción), que presentaban la coloración morada positiva. Al observar de cerca dichas zonas se encontró que la superficie del fragmento tenía cierto daño (Figura 17). Pareciera que en esa zona hubiera una fina capa por encima de la epidermis que fue dañada, y esto dio lugar a que los reactivos de IS-RT-PCR ingresaran a planos inferiores del fragmento pudiendo así llevarse a cabo la reacción ahí. Esta fina capa pareciera ser la cutícula, que en principio se había eliminado con el MeOH.

Estos resultados reiteran la necesidad de hacer un estudio en detalle respecto al proceso de permeabilización del fragmento de hoja, para poder estandarizar un método de IS-RT-PCR en fragmento de hoja. Para continuar estos estudios, se puede utilizar la tinta china como indicador de permeabilización y así ahorrar tiempo y reactivos. Una vez estandarizado un proceso de permeabilización, creemos que será fácil llevar a cabo la IS-RT-PCR en fragmento, y obtener de él cortes histológicos que provean de una vasta información anatómica y metabólica.

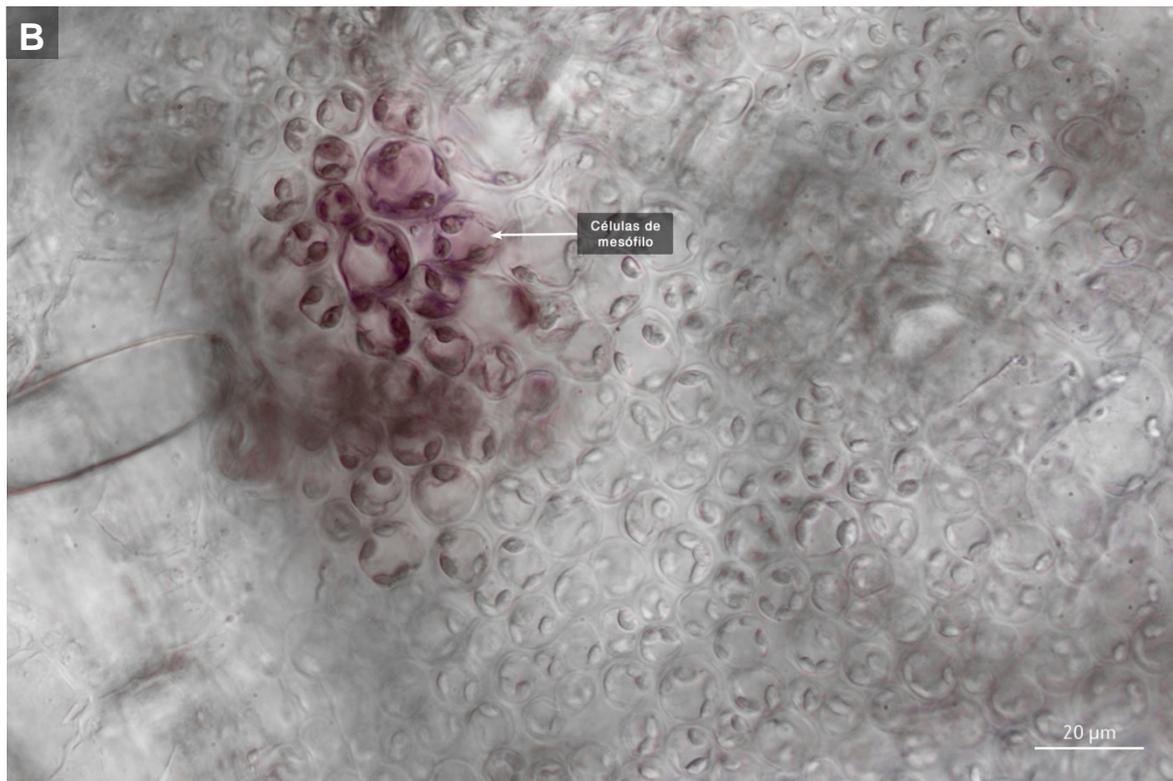


Figura 17. Fotomicrografías por DIC en dos planos focales de la misma área de un fragmento permeabilizado y analizado por IS-RT-PCR. Hoja de *A. hypochondriacus* en los que se analizó el RNAm del gen *RbcL*, muestra positiva. A) Plano focal superior y B) plano focal inferior. En A se observa la ruptura de una fina capa de alrededor de 0.18 μm de espesor. La ruptura de esta capa dio lugar a la reacción de IS-RT-PCR en las células que estaban debajo (B). Esta capa podría ser la cutícula, sin embargo la fijación con MeOH en principio la debió haber eliminado.

3.2 MALDI MSI

3.2.1 Estabilización de hojas

Mediante zimogramas se analizó la actividad enzimática de proteasas y amilasas en extractos de hojas de diferentes especies, para identificar una que por su evidente actividad enzimática pueda servir como modelo de estudio para la estabilización por calor.

Amilasa y pancreatina se usaron como control positivo (Figura 18 A y B). La pancreatina es una mezcla de enzimas por lo que no resulta extraño encontrar ambas actividades. Sin embargo la amilasa utilizada al parecer está contaminada con alguna proteasa, puesto que en el zimograma de proteasas de la Figura 18 B se observan bandas de degradación.

El extracto de hoja de maíz es el único en que se detectó actividad amilasa, y fue muy débil (Figura 18 A). Esto pudo ser debido a que se utilizaron hojas que estaban ya en el periodo de luz de su fotoperiodo. El extracto de hoja de papaya posee una fuerte actividad de proteasa (Figura 18 B), al grado de que también degradó en gran medida sus propias proteínas (Figura 18 C). En los demás extractos no se detectó alguna actividad.

Es importante repetir este el análisis de amilasas con extractos de hojas que estén en periodo de obscuridad, ya que en este periodo hay más actividad de amilasas en las plantas. Por otro lado, el extracto de hoja de *A. hypochondriacus* no presenta actividad proteasa. Por ello, probablemente se pueda prescindir de la etapa de estabilización de la hoja al preparar muestras para análisis proteómico por MALDI-MSI de esta planta. No obstante, la inactivación enzimática por calor tiene la finalidad general de detener la degradación del tejido. Esto es importante si se pretende estandarizar un método para análisis no solo de proteínas, sino de otros analitos como metabolitos, ácidos grasos, carbohidratos, etc.

La hoja de papaya podría ser un buen modelo para estudiar la inactivación de proteasas por calor, al presentar una fuerte actividad de la misma. Sin embargo, se tendría que encontrar una temperatura y tiempo que inactive esta enzima, y no dañe estructuralmente a la hoja.

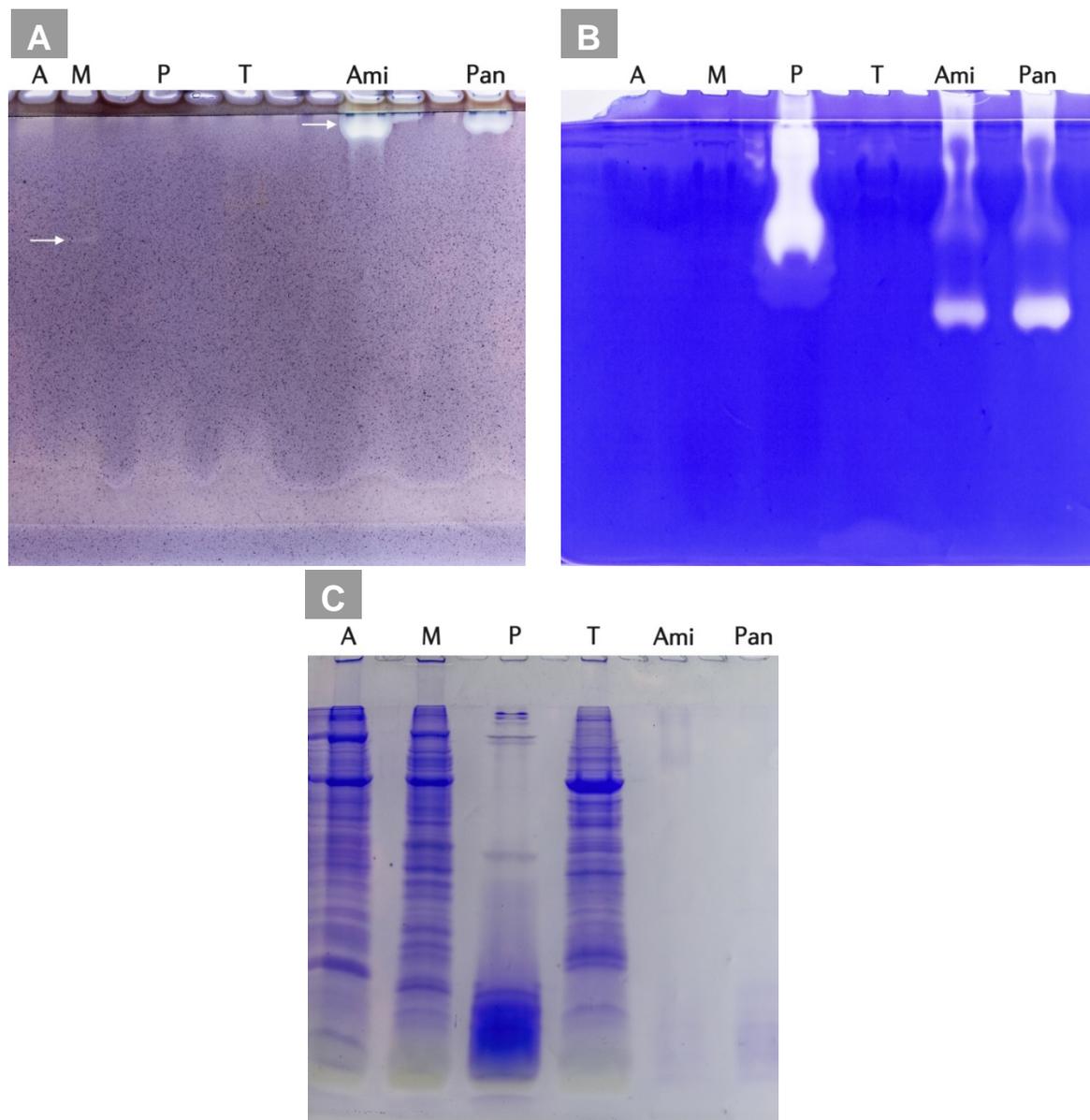


Figura 18. Zimogramas de actividad proteasa y amilasa en extractos de hojas de diferentes especies. Leyenda en carriles: Extractos de hoja de (A) amaranto, (M) maíz, (P) papaya y (T) trigo, y enzimas comerciales Ami: amilasa y Pan: pancreatina. Geles: A) Zimograma de actividad amilasa, B) zimograma de actividad proteasa y C) SDS-PAGE. La amilasa y pancreatina poseen actividad proteasa y de amilasa (A y B). El extracto de hoja maíz posee una banda con ligera actividad de amilasa (flecha). El extracto de hoja de papaya posee una fuerte actividad de proteasa (B), que incluso degradó sus propias proteínas (C). Los extractos de las demás hojas no presentaron actividad detectable.

3.2.2 Corte histológico de hojas

Las idea de medición de las propiedades “eficiencia de corte” e “integridad estructural” fueron basadas en las mediciones de “propiedad física” y “estabilidad” respectivamente, hechas por Nelson et al.²⁰ Sin embargo pueden no ser totalmente comparables.

En la Figura 19 se muestra y describe el aspecto de algunos medios de inclusión (MDI) durante su uso en criostato. Los MDI que contienen gelatina poseen buenas propiedades mecánicas, sin embargo tienden mucho a enrollarse sobre si mismos. Por su lado, los medios con CMC poseen menos virtudes mecánicas, pero tienden menos a enrollarse sobre sí mismo. En una mezcla gelatina-CMC, las propiedades resultantes son las observadas en gelatina sola, y la torsión aumenta. Los MDI se prepararon en sacarosa 9.25% en lugar de agua para mantener la isotonicidad de los MDI, ya que es el equivalente osmótico a una solución de NaCl isotónica (NaCl 0.9%).⁴⁴

Como lo describieron Nelson et al.²⁰, la mezcla gelatina 10% CMC 5%, posee excelente eficiencia de corte e integridad estructural. Sin embargo, no se describió que este MDI tiende a enrollarse. Aunque se trata solo de una de las cinco propiedades medidas, es particularmente importante debido a que si un corte se enrolla sobre sí mismo es muy difícil recuperar el tejido. Una alternativa de recuperación hecha fue desenrollar el corte con pinzas frías, sin embargo este se enrolla de nuevo rápidamente dando poco tiempo para transferirlo a una laminilla. Además, con el tiempo las manos comienzan a calentar las pinzas, llevando a la fundición del MDI, tornándose pegajoso. MALDI-MSI es un análisis de superficie, por lo que no puede haber restos del MDI sobre el corte que pudieran enmascarar analitos, ahí radica la importancia de evitar el enrollamiento.

En la Figura 19 A se puede observar que el corte de hoja se ha separado del MDI, como resultado de la contracción del MDI. Esto es también problemático ya que al contraerse, el MDI tira de las epidermis del corte deformándolo. Este

fenómeno sucede en todos los MDI analizados, aunque se observó una tendencia a ser más frecuente en MDI con gelatina.

En cuanto a la eficiencia de corte, un MDI con buen valor puede alargar la vida útil de la navaja y generar cortes más homogéneos. En cuanto a la continuidad, se verá más adelante que una buena continuidad puede favorecer la resolución del análisis por MALDI-MSI, al absorber la matriz y/o enzimas que se aplican al corte.

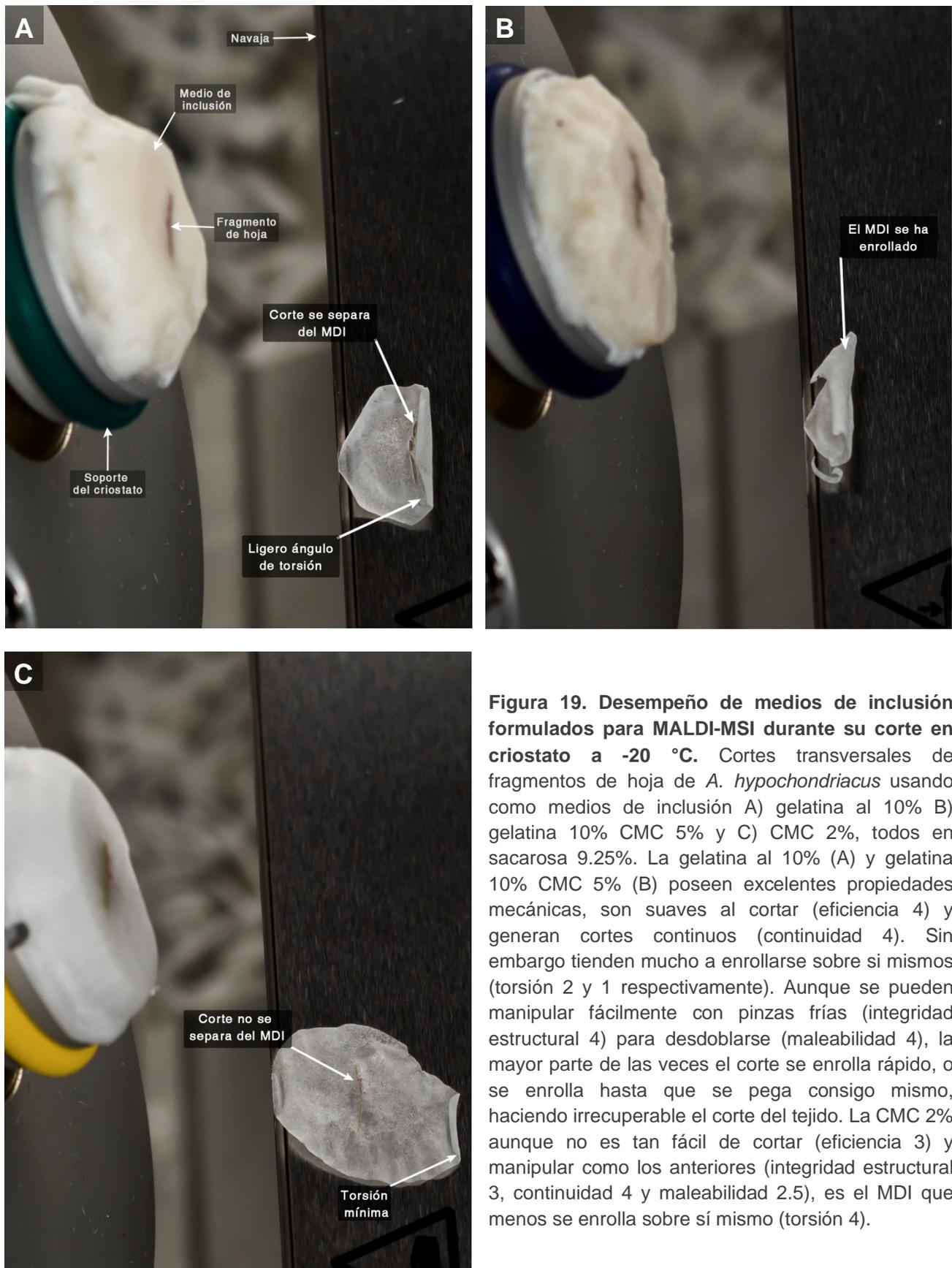


Figura 19. Desempeño de medios de inclusión formulados para MALDI-MSI durante su corte en criostato a -20 °C. Cortes transversales de fragmentos de hoja de *A. hypochondriacus* usando como medios de inclusión A) gelatina al 10% B) gelatina 10% CMC 5% y C) CMC 2%, todos en sacarosa 9.25%. La gelatina al 10% (A) y gelatina 10% CMC 5% (B) poseen excelentes propiedades mecánicas, son suaves al cortar (eficiencia 4) y generan cortes continuos (continuidad 4). Sin embargo tienden mucho a enrollarse sobre sí mismos (torsión 2 y 1 respectivamente). Aunque se pueden manipular fácilmente con pinzas frías (integridad estructural 4) para desdoblarse (maleabilidad 4), la mayor parte de las veces el corte se enrolla rápido, o se enrolla hasta que se pega consigo mismo, haciendo irrecuperable el corte del tejido. La CMC 2% aunque no es tan fácil de cortar (eficiencia 3) y manipular como los anteriores (integridad estructural 3, continuidad 4 y maleabilidad 2.5), es el MDI que menos se enrolla sobre sí mismo (torsión 4).

En la Figura 20 se muestra un par de gráficas que resume las observaciones del desempeño de los MDI's, analizados en cortes de 20 y 50 μm a $-20\text{ }^\circ\text{C}$. Como se puede ver, no hay un MDI ideal. La CMC 2% presenta propiedades intermedias y no se enrolla, esto hace que sea una buena opción. Aunque en cortes delgados ($20\text{ }\mu\text{m}$) no posee una buena integridad estructural ni es maleable, se puede prescindir de estas propiedades. Los cortes que no se enrollan pueden ser recolectados directamente sobre una laminilla fría ($-20\text{ }^\circ\text{C}$), por lo que se puede prescindir de una buena integridad estructural al no necesitar ser sujetado. De igual manera, los cortes que no se enrollan no tienen necesidad de ser desdoblados por lo que también se puede prescindir de una buena maleabilidad.

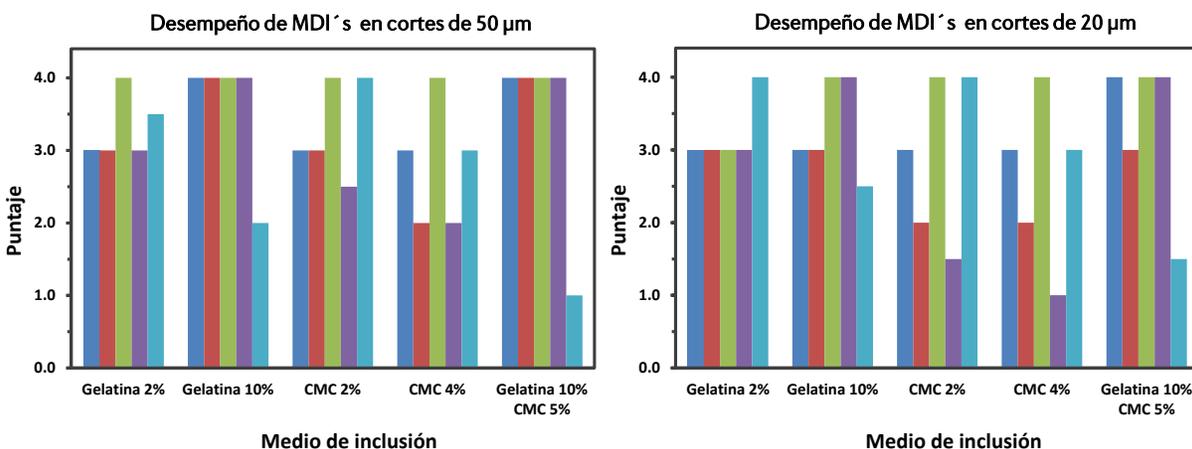


Figura 20. Gráficas de desempeño global de los medios de inclusión

analizados. Se analizaron cinco propiedades de diferentes MDI al ser utilizados para obtener cortes transversales de hoja de *A. hypochondriacus*. Se hicieron cortes de 20 y 50 μm de grosor en criostato a $-20\text{ }^\circ\text{C}$ y se evaluaron dichas propiedades asignando un valor numérico entre 1 y 4, donde 4 es el resultado más deseable y 1 el menos deseable. Eficiencia: facilidad de corte, integridad estructural: capacidad de sujetar el corte sin que se desintegre, continuidad: área del corte que permanece ininterrumpida, maleabilidad: capacidad del corte de deformarse sin romperse y torsión: capacidad del corte de permanecer plano. Cada barra representa el resultado de un corte.



Además, la CMC al 2% resulta relativamente fácil de preparar, se puede guardar a 4 °C, no requiere fundirse antes de usarse, y a temperatura ambiente ó 4 °C posee una viscosidad que permite aplicarla al igual que el crio-pegamento (con un bote dosificador) sin que se derrame fácilmente. En contraparte, las gelatinas 2 y 10% recién fundidas y a temperatura ambiente son menos viscosas, por lo que se debe aplicar en pasos de aplicación-enfriamiento para que no se derrame. La gelatina 10%-CMC 5% es muy difícil de preparar, pues se torna muy viscosa incluso en caliente, lo que lleva a tener que aplicarla muy caliente al tejido, utilizando espátula o jeringa.

3.2.3 Secado del corte

Una vez obtenido el corte histológico en criostato este comienza a secarse. El secado es un proceso necesario para MALDI-MSI e importante de controlar. El agua da soporte estructural a la hoja y su pérdida conlleva a la posible pérdida de integridad estructural. Además, el agua es un componente del MDI, y su pérdida también genera cambios estructurales en el mismo, que pueden a su vez causar daño al tejido. Este daño sucede cuando el MDI interacciona fuertemente con la epidermis del tejido vegetal, ya que al secarse el MDI se puede contraer y encorvar, halando con él al tejido por medio de la epidermis.

En la Figura 21 se muestra lo que le sucede a un corte de hoja de trigo que se seca rápidamente. Al tiempo cero la epidermis se separa ligeramente del mesófilo debido a que es arrastrado por el MDI en proceso de secado. A los 15 s el MDI se ha separado de la epidermis volviendo ésta a su posición original, y el mesófilo luce turgente. A los 30 s el MDI comienza a secarse mientras el mesófilo casi no muestra cambios. A los 45 s es notoria la pérdida de agua en el MDI y el tejido, ya que los haces vasculares lucen huecos. A los 80 s la muestra se ha secado, el MDI se ha contraído aún más, el mesófilo ha perdido totalmente la turgencia y la epidermis se ha volcado sobre este último. Un corte de tejido como el obtenido a los 80 s en la Figura 21 no es adecuado para MALDI-MSI, pues no es plano. Si el láser pasara por esta muestra la epidermis enmascararía algunas

zonas donde hay mesófilo. Esto generaría un resultado no representativo de la posición original de analitos en la hoja.

Se atribuyó a dos factores el hecho de que la epidermis se vuelque y el mesófilo se contraiga: la descongelación y la tonicidad del MDI. Por ello, se preparó un MDI (agarosa 5%) con PBS 1X, otro con sacarosa 9.25% (equivalente osmótico a NaCl 0.9%) y se secaron en frío. El buffer PBS no es una propuesta a largo plazo, pues las sales inhiben la ionización en MALDI, este buffer se usó para fines comparativos.

En la Figura 22 se puede ver que aunque se trate de la misma goma (agarosa 5%), su comportamiento al secado varía en función de la composición del solvente. Ambos MDI generan filamentos al secarse, sin embargo los que se forman en agarosa-PBS interactúan más fuerte con la epidermis que los formados en agarosa-sacarosa. El MDI agarosa-PBS desprendió la epidermis e hizo girar al tejido, desbaratándolo. Por su parte el MDI agarosa-sacarosa no interactuó con la epidermis lo suficiente como para desprenderla y dañar al tejido.

En lo que respecta al mesófilo, el secado en frío y el MDI con PBS o sacarosa tuvieron un efecto positivo, ya que no se observa una pérdida de turgencia como la observada en la Figura 21. Sin embargo, el MDI con agarosa 9.25% mantiene mejor la tonicidad que el PBS. Esto se pudo distinguir al observar la epidermis, en el tejido incluido en agarosa-PBS ésta es ondulante, mientras que en agarosa-sacarosa permanece más recta. Las ondulaciones son consecuencia de la pérdida de volumen en el mesófilo que está entre haces vasculares.

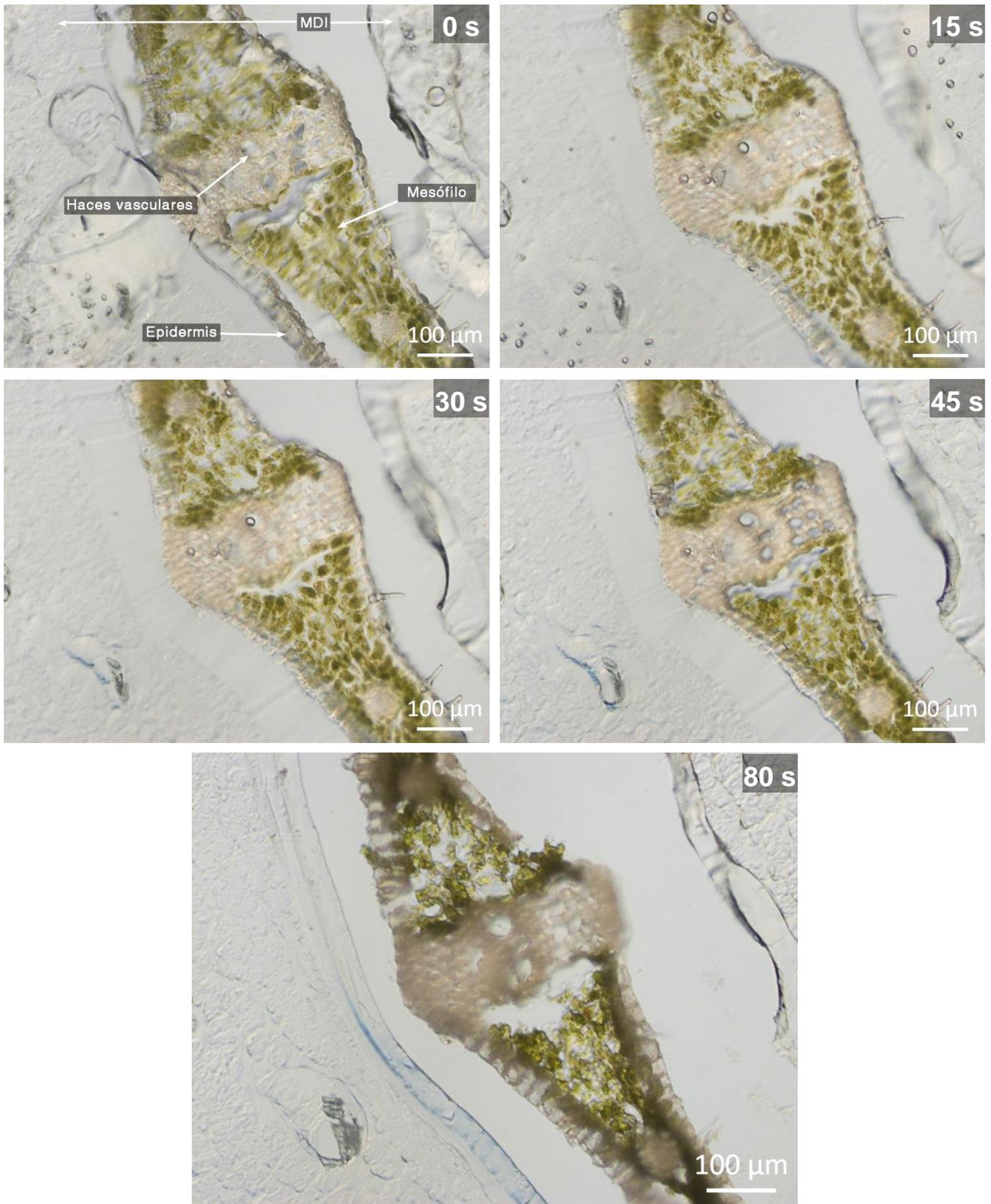


Figura 21. Fotomicrografías por DIC que muestran el deterioro de un corte de hoja de trigo conforme se seca. Corte transversal de 50 μm de hoja de trigo fotografiado diferentes tiempos mientras permanecía en el microscopio. El calor generado por la luz del microscopio descongeló el corte, y con el tiempo lo fue secando. Esto generó que el mesófilo se contraiga y posteriormente la epidermis se incline hacia el mismo.

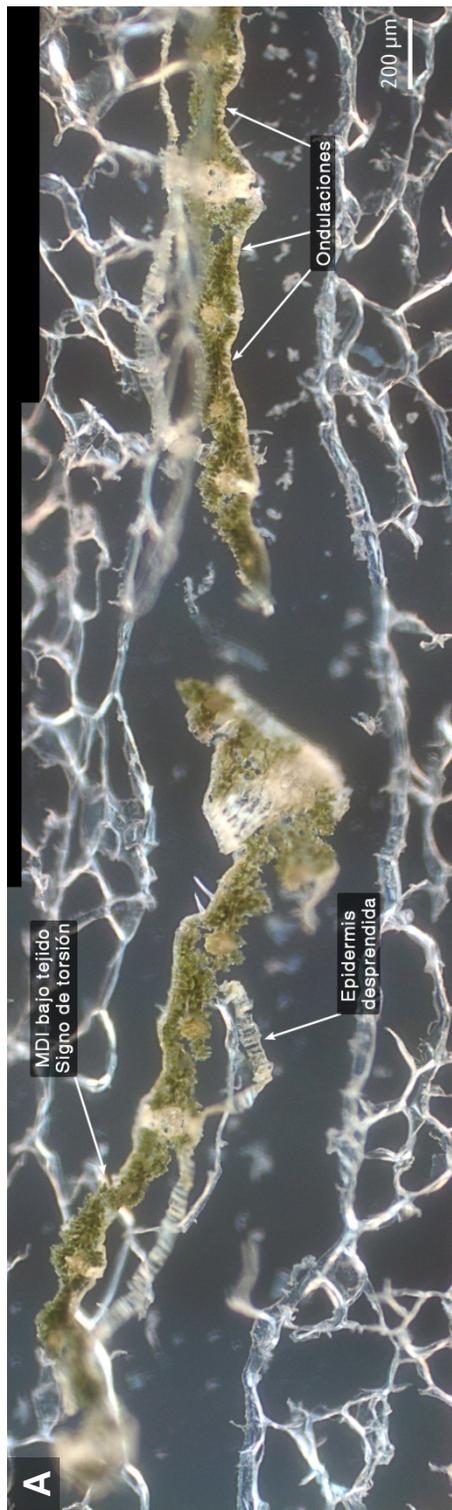


Figura 22. Fotomicrografías por DIC de cortes transversales de hoja de trigo en los que se muestra un corte bien conservado y uno mal conservado tras el proceso de secado. Cortes de 50 µm de hoja de trigo incluida en A) agarosa 5% en PBS 1X, B) agarosa 5% en sacarosa 9.25%. Ambos cortes fueron secados a -20 °C y presión ambiental durante una noche. El corte de agarosa-PBS se ha desbaratado mientras que el otro ha mantenido su estructura anatómica. La agarosa preparada en PBS al secarse forma filamentos retorcidos, responsables de la deformidad final del tejido. La agarosa preparada en sacarosa también ha formado filamentos, sin embargo no han dañado al tejido como la agarosa-PBS.

Otra forma reportada de secar el corte es con vacío. En la Figura 23 se muestran dos cortes transversales de 15 μm hoja de trigo que se han secado de manera diferente, al vacío y en frío. El corte que ha sido secado en frío ha formado filamentos que han deformado el tejido como sucedió en el corte de la Figura 22 A. El corte secado al vacío no ha formado estos filamentos y ha mantenido la estructura del tejido más intacta. La epidermis conserva mejor su posición que en el tejido secado en frío. Así mismo, el mesófilo luce más turgente en el corte secado al vacío que en el secado en frío. Esto se puede distinguir, además de las ondulaciones, por la mayor cantidad de espacios vacío entre las células de mesófilo, en comparación con el tejido secado al vacío. Sin embargo, el corte de 50 μm (Figura 22 B) es capaz de mantener mejor la turgencia del mesófilo.

Analizando con detalle las interacciones MDI-tejido, en la Figura 24 se puede observar que el MDI agarosa-sacarosa interactúa fuertemente con la epidermis. Hay zonas donde está unida como si se tratara de pegamento. En esta fotomicrografía, es más evidente que estas zonas que se unen fuertemente a la epidermis son las que catalizan la deformación del tejido al secarse el MDI. También se puede notar que el mesófilo es un tejido frágil que depende estructuralmente de la epidermis, haces vasculares y colénquima. Además, las zonas donde hay haces vasculares asociados a epidermis por medio de colénquima, presentan una mayor resistencia mecánica a la ruptura. Esta fotomicrografía representa además, la diferencia entre hojas de plantas C_3 y C_4 . A diferencia de las hojas C_3 , las hojas C_4 poseen las células de la vaina del haz que están unidas herméticamente a haces vasculares, y proveen un soporte estructural adicional.

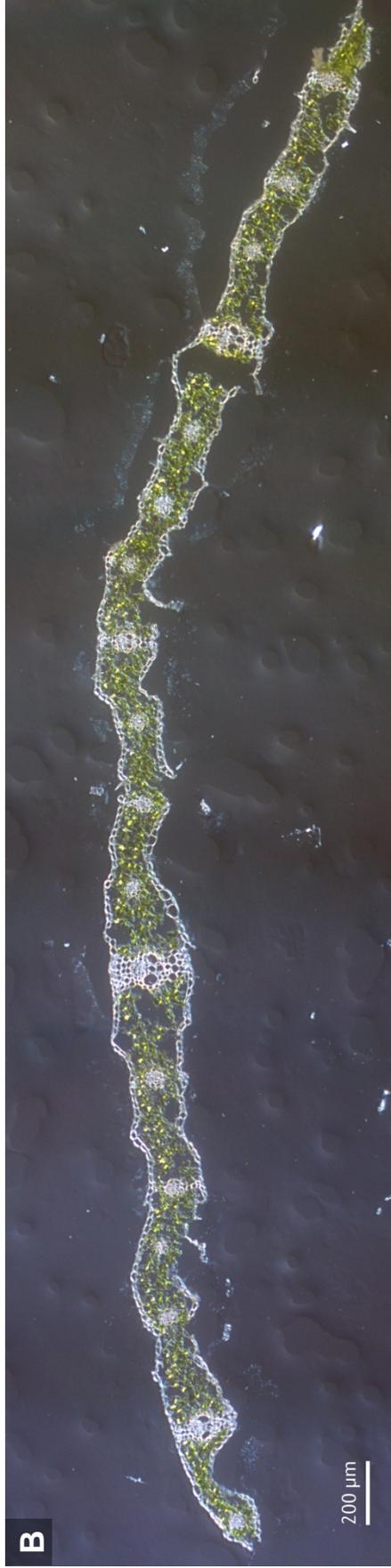
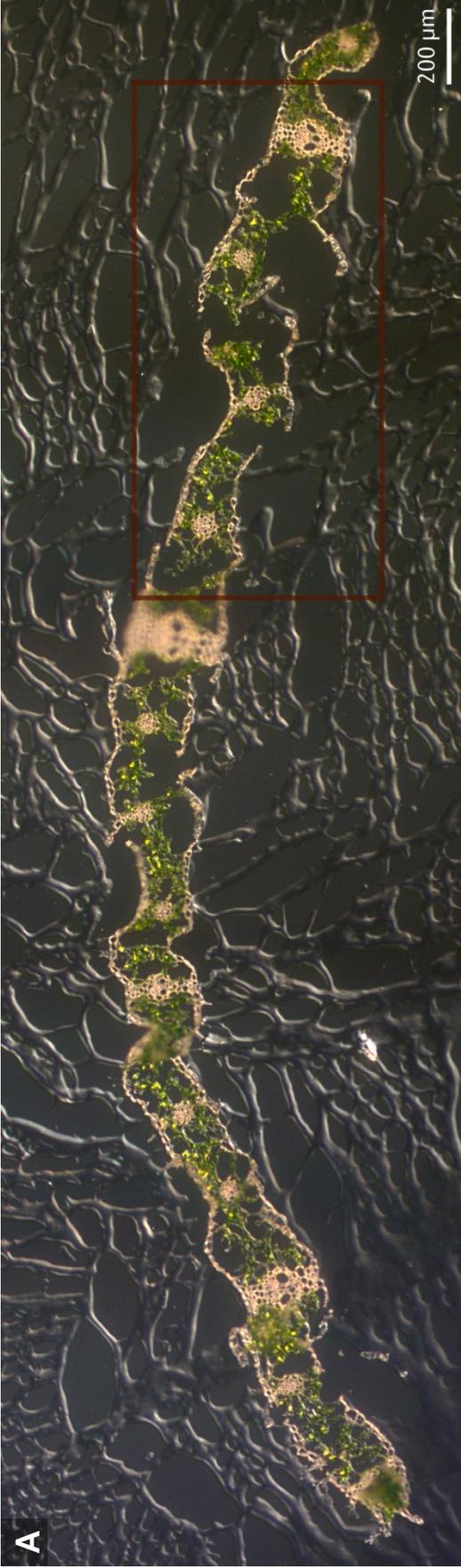


Figura 23. Fotomicrografías por DIC de cortes transversales de hoja de trigo en las que se compara el efecto sobre la estructura del tejido y MDI, del secado en frío y en vacío. Cortes de 15 µm incluidos en CMC 4% sacarosa 9.25% secados A) a -20 °C y presión ambiente durante una noche y B) a temperatura ambiente y vacío de 500 mmHg durante una noche. El secado en frío hace que el MDI forme filamentos que eventualmente deforman el tejido, mientras que el secado en vacío genera una capa continua de MDI y menor daño al tejido. El mesófilo secado al vacío posee un aspecto más turgente que el secado en frío, pues en él hay menos espacios vacíos.

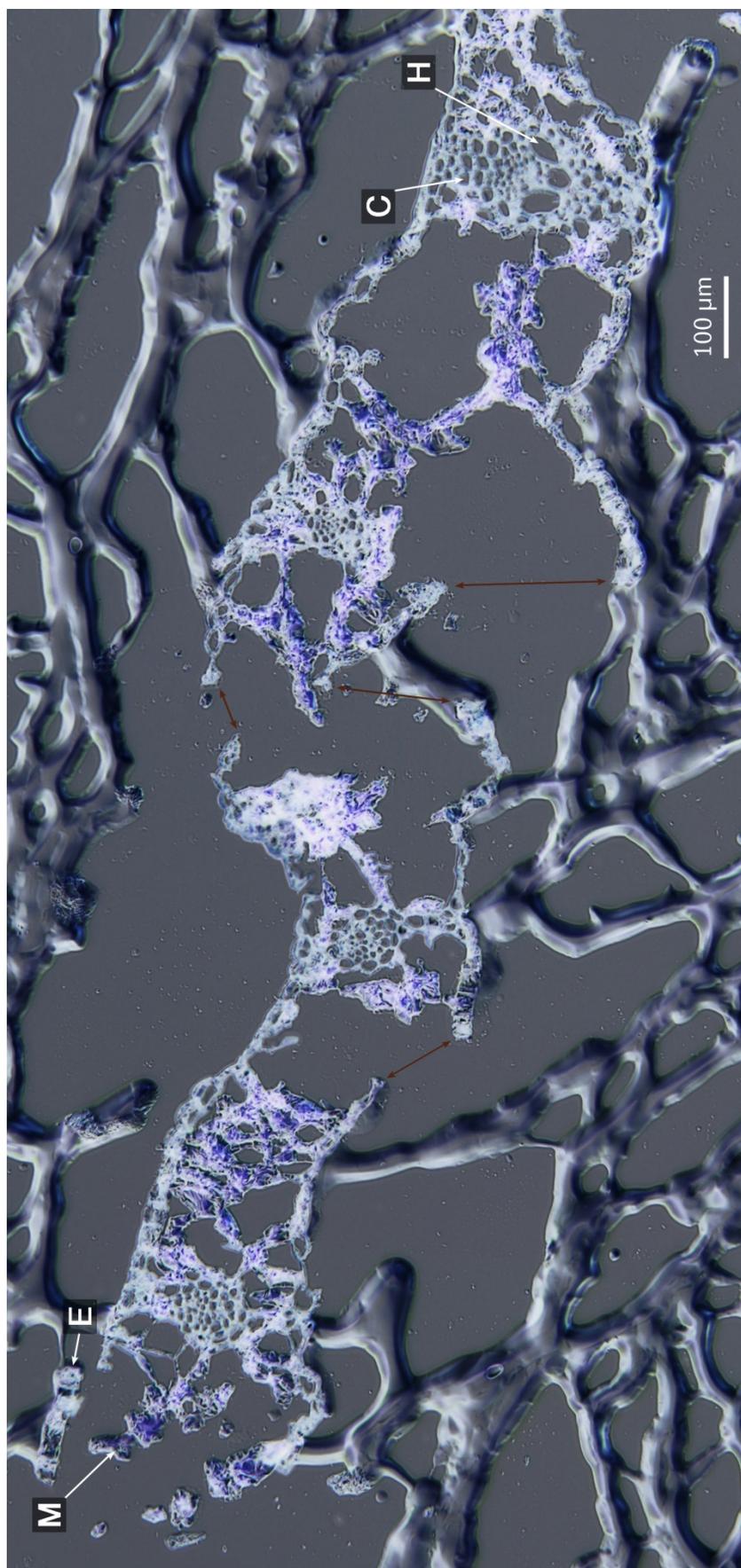


Figura 24. Fotomicrografías por DIC en negativo de un corte transversal de hoja de trigo – ampliación del área del recuadro guiada de la Figura 23 A. M: mesófilo, E: epidermis, C: colénquima, H: haces vasculares. Algunas partes del MDI están unidas a la epidermis cual pegamento, de tal suerte que al contraerse por sequedad, el MDI arrastra la epidermis. Se han señalado con flechas marrón de doble cabeza las rupturas en la epidermis que generó este fenómeno. Las zonas donde hay haces vasculares unidos a epidermis por medio de colénquima son más resistentes que en aquellas zonas donde no lo hay. Nótese que el único tipo celular fotosintético son las células de mesófilo, y están asociadas por dos o tres uniones a epidermis, haces vasculares y otras células de mesófilo. A diferencia de las plantas C_4 , el mesófilo de esta planta C_3 no está unida herméticamente a los haces vasculares con en *A. hypochondriacus* (Figura 9).

El colénquima juega un papel importante en el mantenimiento de la estructura de la hoja, sin embargo no asegura la integridad del corte de tejido si el MDI no es el adecuado. Como se comentó en el numeral 3.2.2, los MDI con gelatina tienden a unirse fuertemente a la epidermis del tejido. Esta unión puede incluso romper el colénquima cuando el MDI se contrae por sequedad, aunque se aplique secado al vacío. En la Figura 25 A se observa que al usar un MDI formulado con gelatina, este se une fuertemente a la epidermis del tejido. Posteriormente, al secarse hala de ella lo suficientemente fuerte para romper el colénquima que une la epidermis abaxial y adaxial en el corte de 15 μm . Sin embargo, si se obtiene un corte de 50 μm (Figura 25 B) el colénquima es capaz de soportar la tensión ejercida por el MDI, aunque el resultado es en un tejido torcido que ya no es adecuado para MALDI-MSI.

El resultado final de MALDI-MSI es una imagen de un tejido sobre el cual se representa la ubicación espacial de analitos. Es por ello que debe de procurarse mantener la estructura anatómica del corte de hoja, para que los resultados sean representativos de la distribución anatómica original de los analitos.

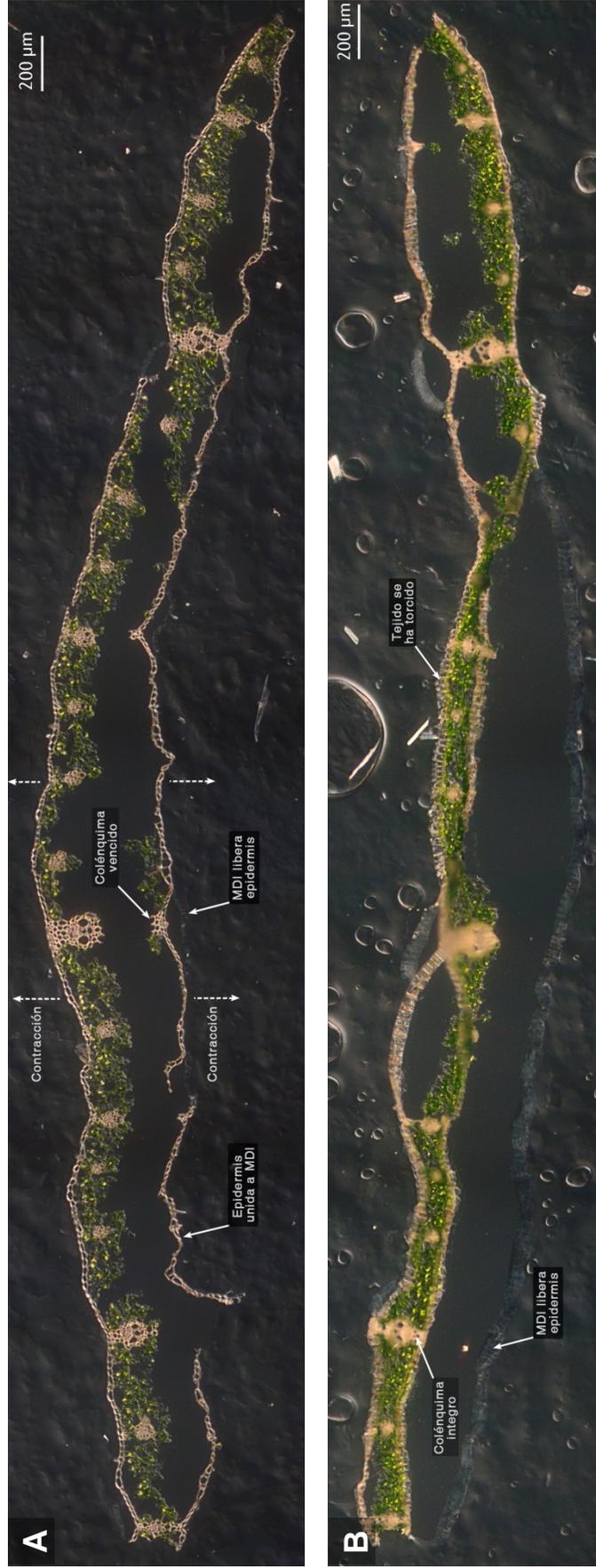


Figura 25. Fotomicrografías por DIC de cortes transversales de hoja de trigo en las que se compara el efecto del grosor del corte sobre el la estructura del tejido y MDI, al secarse en vacío. Cortes incluidos en gelatina 10% CMC 2% sacarosa 9.25%, con un grosor de A) 15 µm y B) 50 µm. Pese al grosor del corte, el secado por vacío no genera filamentos de MDI. A) El MDI con gelatina se ha unido fuertemente a la epidermis, y al secarse ha tirado de ella logrando romper incluso el colénquima. B) El colénquima de mayor grosor ha soportado la tensión ejercida por la contracción del MDI, liberando una de sus epidermis del mismo. Sin embargo, la serie de fuerzas ejercidas ha torcido el corte, haciéndolo no adecuado para MALDI-MSI.

3.2.4 Pretratamientos *in situ*

Los pretratamientos *in situ* son dos, la digestión *in situ* y la aplicación de la matriz MALDI. El éxito de ellos depende de la aplicación de las soluciones implicadas en forma de pequeñas gotas sobre el tejido. Una gota depositada en el tejido disolverá los analitos que estén debajo de ella, por lo que su área determinará la resolución del análisis. Estas gotas deberían tener un diámetro igual o menor al diámetro del láser de la fuente MALDI que se vaya a emplear. Una forma de aplicar soluciones en forma de pequeñas gotas es por medio de la tecnología piezo eléctrico, como la que poseen las impresoras de inyección de tinta.

Según la información de EPSON, la impresora T50 puede despachar gotas de tamaño variable, siendo la más chica de hasta 1.5 pL.⁴⁵ Si una gota de este volumen fuera esférica tendría un diámetro de 14.2 μm . La fuente MALDI con que se cuenta para el análisis posee un diámetro de láser de 50 μm . Este tamaño de gota es suficiente para explotar la resolución del láser. Se analizó la distribución y tamaño de gotas de la impresora EPSON T50, imprimiendo patrones de color sobre un corte de hoja de trigo. Se utilizó tinta en lugar de matrices MALDI, para conocer el comportamiento original del equipo, y por la facilidad de identificar el producto de cada cabezal (por color).

En la Figura 26 A se puede ver que los cabezales dedicados a la tinta cian (C) y magenta (M) generan una distribución de gotas con tamaños que van desde los 19 hasta 62 μm . 19 μm es un valor cercano al estimado teórico de 14.2 μm para una gota de 1.5 pL. Tras la primera capa de tinta hay zonas que aún no han sido cubiertas por la tinta, por lo cual se reimprimió sobre la laminilla el mismo patrón de color. En la Figura 26 B se observa que tras la segunda capa de tinta el área de cobertura ha aumentado, sin embargo en zonas donde no hay tejido o MDI ocurre coalescencia de las gotas. Estas zona sin tejido o MDI es el espacio entre mesófilo y la epidermis desprendida, que dejó expuesta la superficie de la laminilla. Tras la tercera capa de tinta, que fue desplazada dos píxeles hacia arriba, el tejido y MDI están cubiertos casi por completo, sin embargo no se

percibe ningún patrón que evidencie este desplazamiento en la aplicación de tinta (Figura 26 C).

En cuanto al comportamiento de los cabezales de tinta amarilla (Y) y negra (K), en la Figura 27 A se puede observar que la tinta amarilla sigue un comportamiento similar a las tintas cian y magenta. Presenta una distribución de gotas al azar que van desde 21 hasta 51 μm . A diferencia de las tintas CMY, la tinta negra (K) presenta una distribución uniforme de tétradas de gotas de una tamaño entre 35 a 48 μm .

La segunda y tercera aplicación de la tinta Y tuvo un comportamiento similar a C y M, aumentó la densidad de puntos conforme las capas de tinta. Sin embargo, la tinta amarilla tiende menos a la coalescencia. En las sucesivas aplicaciones de tinta K sucede algo muy interesante. La primera capa de tinta K generó un patrón de puntos equidistantes, donde cada punto era la unión de cuatro gotas de tinta (Figura 27 A). Tras la segunda capa de tinta K, los espacios horizontales entre puntos fueron cubiertos por gotas de tinta K. Esto generó ahora un patrón de líneas continuas equidistantes (Figura 27 B). Tras la tercera aplicación de tinta K, en la que se recorrió el patrón de colores dos píxeles hacia arriba, se generó de nuevo un patrón de puntos equidistantes intercalado entre el patrón de líneas continuas (Figura 27 C).

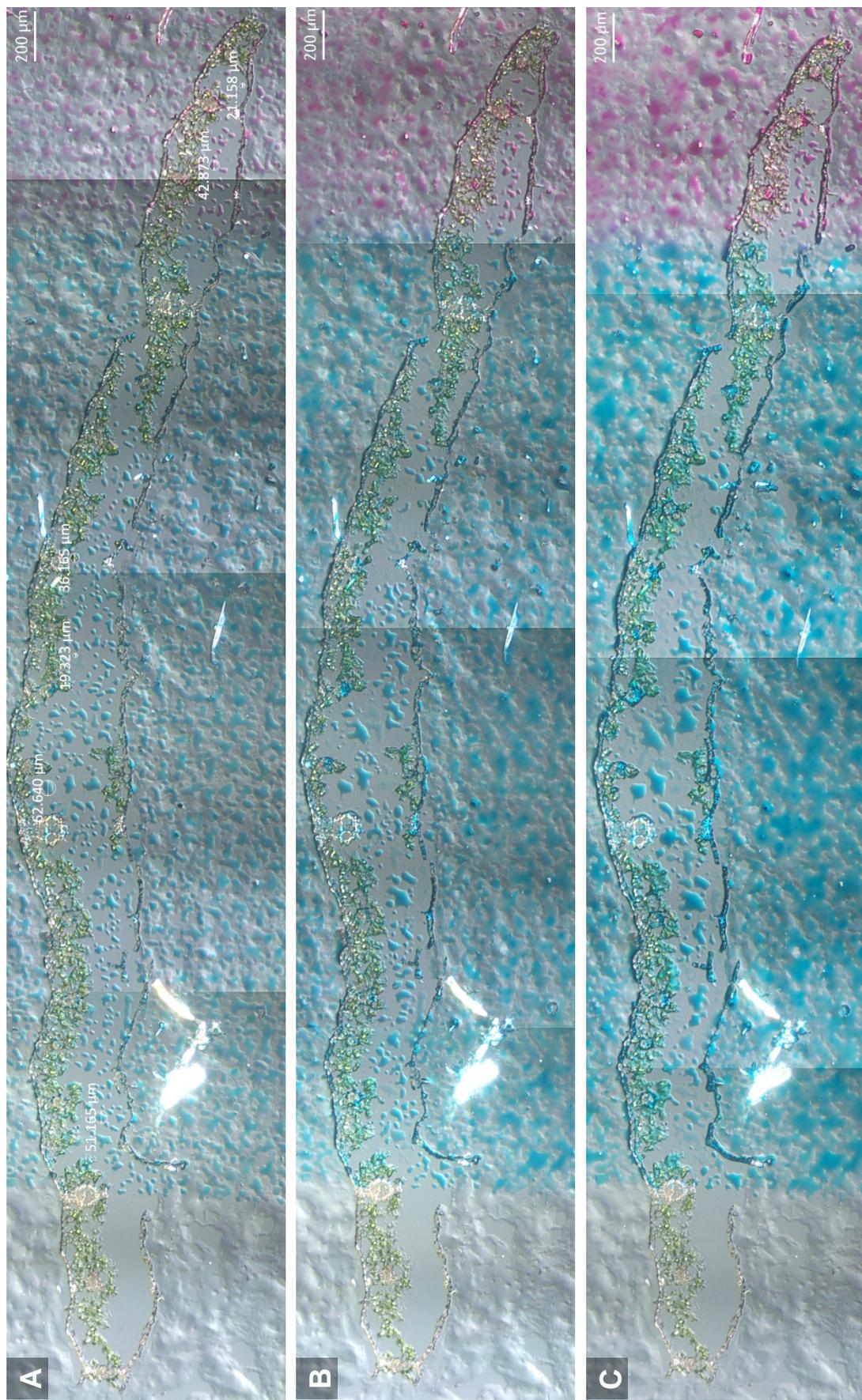


Figura 26. Fotomicrografías por DIC del corte transversal de hoja de trigo sometido a simulación de tratamiento *in situ* con tinta cian y magenta. El corte mostrado es el mismo que el de la Figura 25 A. Se han depositado pequeñas gotas de tinta cian y magenta sobre el tejido por medio de la impresora EPSON T50, para analizar la distribución de gotas que genera este equipo con los cabezales dedicados a estos colores. Eventualmente, se sustituirá la tinta por soluciones para tratamiento *in situ*. Tras la primera aplicación de tinta (A), se han medido el tamaño de algunas gotas. Se puede ver que oscilan entre los 19 a 63 μm de diámetro para ambos colores, mientras una célula del mesófilo de este tejido ronda los 36 μm de diámetro. Tras la segunda aplicación de tinta (B) es evidente un incremento en el área cubierta con tinta y comienza a ocurrir coalescencia de las gotas. Tras la tercera aplicación de tinta, en la que se ha desplazado el patrón de aplicación dos píxeles hacia arriba, se percibe una cobertura casi completa del tejido.

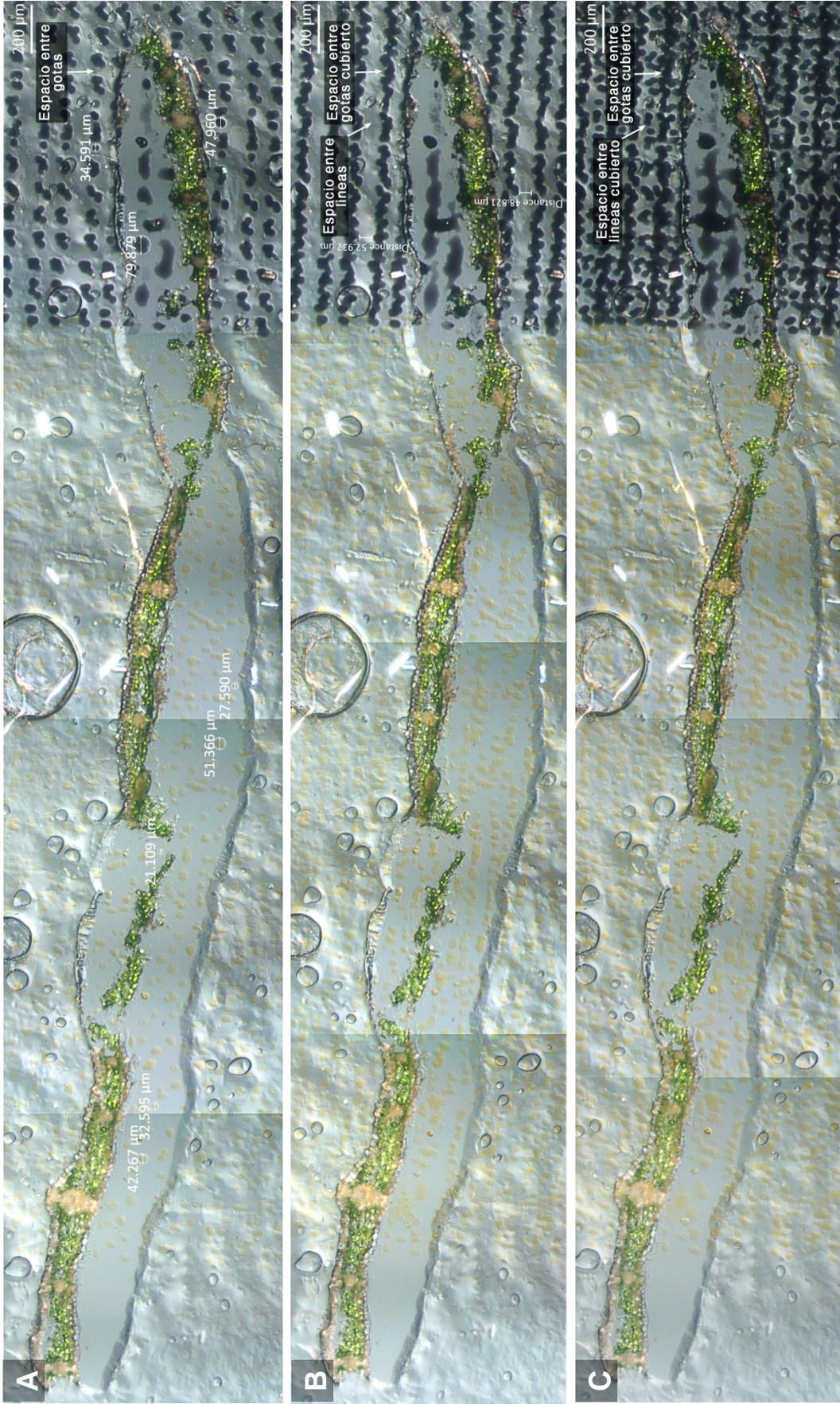


Figura 27. Fotomicrografías por DIC del corte transversal de hoja de trigo sometido a simulación de tratamiento *in situ* con tinta amarilla y negra. El corte mostrado es el mismo que el de la Figura 25 B. Se han depositado pequeñas gotas de tinta amarilla y negra sobre el tejido por medio de la impresora EPSON T50, para analizar la distribución de gotas que genera este equipo con los cabezales dedicados a estos colores. Eventualmente, se sustituirá la tinta por soluciones para tratamiento *in situ*. Tras la primera aplicación de tinta (A), se han medido el tamaño de algunas gotas. Se puede ver que oscilan entre los 21 a 31 μm para el amarillo, y entre 35 a 80 μm para el color negro. Tras la segunda aplicación de tinta (B) en el color amarillo se puede observar el mismo comportamiento a aumentar la saturación de manera aleatoria como en la Figura 26. Sin embargo, la tinta negra se distribuye de una manera muy ordenada. En la primera aplicación, se forman “líneas punteadas” horizontales que tras la segunda aplicación se convierten en líneas continuas, al depositarse gotas entre los espacios vacíos de la línea punteada inicial. De manera muy exacta, al desplazar la plantilla de color dos píxeles hacia arriba en la computadora y reimprimir, se genera una nueva línea punteada entre la línea continua. Hay una distancia de alrededor de 50 μm entre las líneas continuas de (B), por lo que el desplazamiento de dos píxeles representó aproximadamente 25 μm .

Estos resultados nos indican que se puede tener un control preciso en la aplicación de soluciones sobre el tejido para los tratamientos *in situ* mediante dos parámetros: color (reactivo) y ubicación en tejido. Color (reactivo): se pueden cargar diferentes matrices o enzimas en cada color de la impresora, y aplicar selectivamente sobre el tejido. Esto es claro al notar que en las zonas de cada color CMYK, no hay contaminación con otros colores. Por otro lado, los recuadros de color en la plantilla de photoshop®, estaba unidos pero no mezclados. A excepción de las zonas de coalescencia de gotas, esta división de mantuvo íntegra sobre el tejido. Ubicación: el cabezal que despacha tinta negra posee una precisión micrométrica como se pudo ver en la Figura 27 C. Teniendo en cuenta el espacio de aproximadamente 50 μm entre el patrón de líneas continuas (Figura 27 B), se podría pensar que cada píxel de la plantilla hecha representa 25 μm .

Respecto a al parámetro de ubicación cabe destacar algunas cosas más. Al CD perforado para la laminilla se le hicieron marcas junto con la bandeja de la impresora para asegurarse de colocarlo siempre en la misma posición. Esto parece efectivo al notar el resultado de los patrones de tinta K en la Figura 27 C. Sin embargo, en los patrones de la Figura 27 B, al no haber movido la plantilla en photoshop® antes de imprimir, se esperaba que se mantuviera el patrón de puntos. Esta imprecisión pudo ser consecuencia de la falta de precisión en la colocación de la laminilla de nuevo en la impresora, o imprecisión del motor del cabezal. Dados los resultados de la Figura 27 C se piensa que fue el motor del cabezal. Otros datos que apoyan esta idea es que hay dos movimientos involucrados en la generación de la impresión, el del cabezal y el de la bandeja. El movimiento de la bandeja es en pasos y es el responsable de la impresión horizontal en la Figura 27. El movimiento del cabezal es continuo y es el responsable de la impresión vertical. El movimiento por pasos de la bandeja puede no ser tan preciso como el movimiento continuo del cabezal.

Una vez analizada la distribución de tinta se analizó lo que sucedería al utiliza tres matrices diferentes. En la Figura 28 A se puede ver unas gotas de tinta cian en las que iba disuelta la matriz CHCA. Se puede observar que tras el secado

se forman cristales de este compuesto que al parecer no arrastran el colorante cian al cristalizar. En la Figura 28 B se puede ver que la matriz DHB forma cristales más pequeños que CHCA y que no salen más allá del área de la gota. En la Figura 28 C se observa que la matriz ácido sinapínico forma cristales birrefringentes grandes, que van más allá del área de las gotas magenta.

En este experimento se mezclaron matrices con tinta para tener un registro de la gota original (tinta) y comparar con los cristales que se forman. Esto es de particular importancia ya que muchos o todos los autores que trabajan con MALDI MSI califican la calidad de los métodos de aplicación de matriz con base en el tamaño de los cristales generados, esto me parece erróneo.^{21,34-38} La gota de solución de matriz es la que va a disolver analitos que al secarse van a co-cristalizar con la matriz. El área que abarque la gota será la representativa de los analitos que hay en determinado lugar, y no el tamaño de los cristales generados. Por ejemplo, en la Figura 28 B, hay una gran cantidad de pequeños cristales de DHB, pero todos ellos provienen una gota de solución un tamaño varias veces mayor.

Tras algunos experimentos con la impresora EPSON T50 y soluciones de matrices y ACN 50% el cabezal se dañó. Baluya et al.³³ ya habían reportado el uso de una impresora inkjet para la aplicación de la matriz, obteniendo resultados superiores que los obtenidos con un electro spray y un aerógrafo. Sin embargo, no se comenta nada al respecto de la compatibilidad del cabezal con solventes.

La aplicación de la matriz con la impresora EPSON T50 dio resultados prometedores, sin embargo se estudiará el uso de otros solventes compatibles con el cabezal de impresión. Un corte como el obtenido en la Figura 23 B, al cual se aplique la matriz con una distribución como la obtenida en la tinta K o Y en la Figura 27, podría estar listo para el análisis por MALDI-MSI.

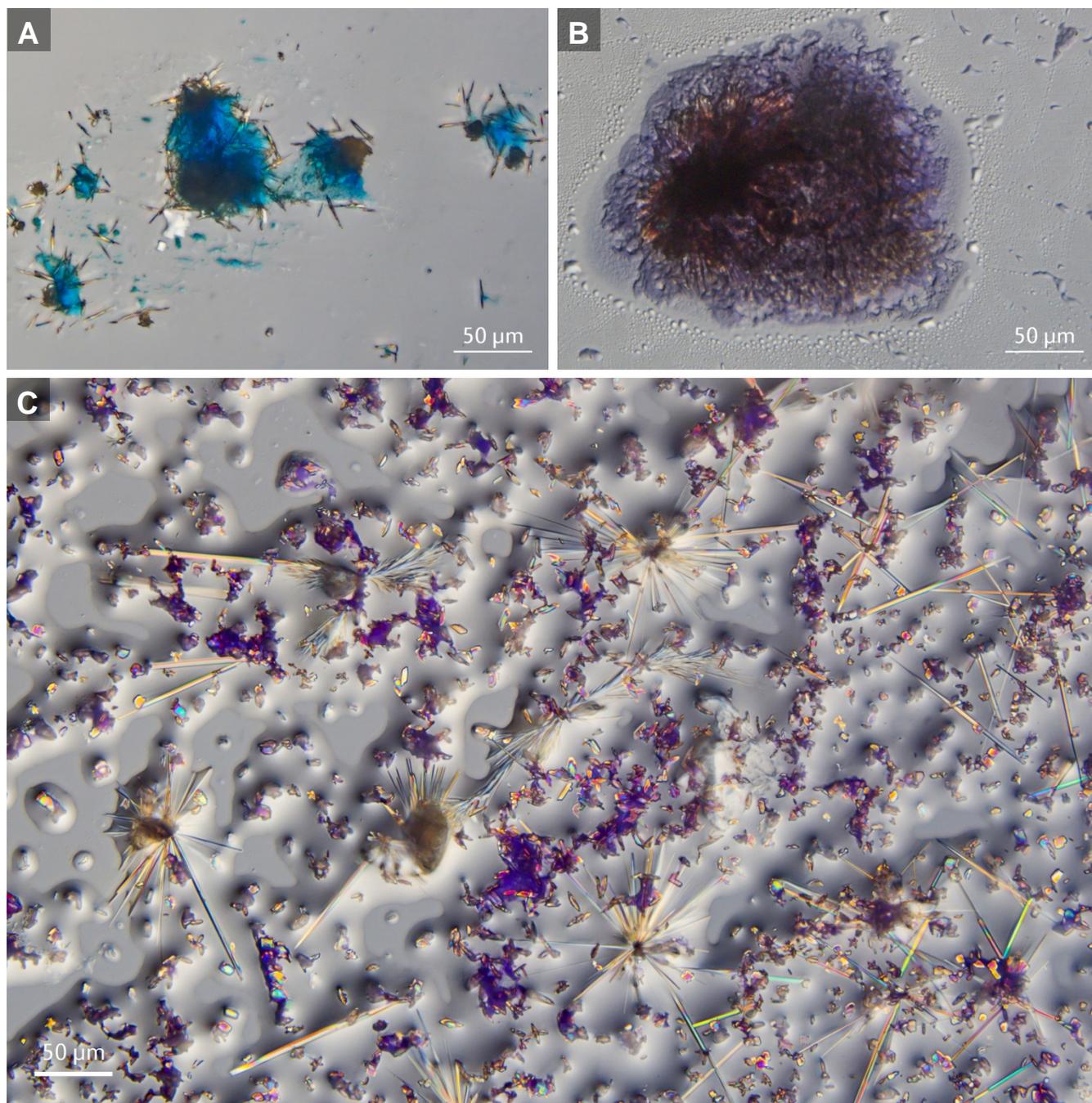


Figura 28. Fotomicrografías por DIC de mezclas matriz MALDI-tinta depositadas en laminilla con la impresora EPSON T50. A) Mezcla CHCA-tinta cian, B) mezcla DHB-tinta negra y C) mezcla ácido sinapínico-tinta magenta. En (A) se observa unas gotas secas de tinta azul dentro de las cuales se han formado cristales de CHCA, que rebasan un poco los bordes de la gota. En (B) sucede algo similar, sin embargo los cristales de DHB no rebasan el diámetro de la gota de tinta negra ya que son más chicos que en CHCA. En (C), los cristales de SA formados rebasan por mucho el diámetro de las gotas magenta depositadas, mostrando incluso birrefringencia en algunas de sus caras.

4. CONCLUSIONES

IS-RT-PCR

- La técnica de IS-RT-PCR puede ser semicuantitativa si se estandarizan las condiciones de visualización del tejido en el microscopio.
- El mesófilo expuesto de un fragmento de hoja tras ser cortado, no permite la difusión de moléculas grandes como enzimas a pesar de haber espacios para el flujo de aire.
- La técnica de IS-RT-PCR posee mayor sensibilidad que ISH dada la etapa de amplificación, sin embargo no se había descrito en la bibliografía que una parte de los amplicones es perdida por los lavados.
- Las etapas de permeabilización descritas en la bibliografía para el análisis inmunohistoquímico de órganos completos de plantas, también son útiles para el análisis por IS-RT-PCR de fragmentos de hojas.
- Las etapas de permeabilización empleadas no son suficientes para lograr la degradación del cpDNA o gDNA en un fragmento de hoja.
- La tinta china es un colorante en suspensión que sirve para analizar el grado de permeabilización de un fragmento de hoja.
- El tratamiento con MeOH caliente parece no eliminar por completo la cutícula de hojas de *A. hypochondriacus*.

MALDI-MSI

- La hoja de papaya (*Carica papaya*) posee una (s) proteasa (s) con mucha actividad, y que no es desnaturalizada por las condiciones reductoras, SDS o pH durante el análisis en gel de poliacrilamida. Por ello, podría ser un buen modelo para estudios estabilización de hojas por calor.
- Una mezcla de carboximetilcelulosa al 2% en sacarosa 9.25% genera un medio de inclusión bastante bueno para cortes en criostato a -20 °C.

- El secado al vacío y temperatura ambiente de los cortes provenientes del criostato, mantiene mejor la integridad del corte que el secado en frío y a presión ambiente.
- El cabezal de tinta negra de la impresora EPSON T50 es capaz de aplicar pequeñas gotas discretas de tinta de manera muy precisa. Esto le da un gran potencial para usarse en los tratamientos *in situ*.
- El tamaño de los cristales de matriz formados tras su aplicación es independiente del tamaño de la gota de la que provienen. En ese sentido se tiene que analizar la resolución del análisis en términos del área muestreada por la gota de matriz, el tamaño del cristal y el diámetro del láser.

Generales

- La técnica IS-RT-PCR no ha sido tan explotada como ISH, quizá debido a su laboriosidad. Sin embargo, si se desarrolla un protocolo más sencillo y semicuantitativo, se podría aumentar el interés en esta técnica.
- MALDI-MSI es una técnica relativamente novedosa que está siendo apenas explorada y explotada. En ese sentido hay mucho potencial de innovación y descubrimiento con esta herramienta.
- El presente trabajo comprende solo una parte de los aspectos a optimizar en las técnicas IS-RT-PCR y MALDI-MSI en hojas de plantas. Aún falta indagar en las posibles variables de cada etapa de estos experimentos para determinar las condiciones óptimas.

CAPÍTULO II: CARACTERIZACIÓN DE CRISTALES DE OXALATO DE CALCIO EN HOJAS DE AMARANTO

5. INTRODUCCIÓN

El calcio es un nutriente esencial para las plantas, que lleva a cabo muchas funciones fundamentales en el metabolismo celular.⁴⁶ Como una molécula señalizadora, las concentraciones citoplasmáticas de Ca^{2+} deben estar por debajo de 1 mM,^{46,47} cuando estas concentraciones son excedidas, ocurre un daño celular o tisular.⁴⁸ Las plantas tienen diversos mecanismos para controlar el exceso de Ca^{2+} , uno de ellos es su secuestro en la forma de sales de oxalato, carbonato, sulfato, silicato y malato.⁴⁹ Los cristales de oxalato de calcio (CaOx) ocurren en la mayoría de plantas fotosintéticas, representando 10% o más del Ca^{2+} total. Ellos pueden ser encontrados como depósitos intra- y extra-celulares en varios tejidos y órganos tales como raíces, súber, tallos, flores, frutos y semillas.^{50,51} La morfología de los cristales de CaOx es especie-específica indicando es regulada genéticamente, análogo a la biomineralización en animales.^{52,53} La biomineralización en plantas es una combinación de procesos bioquímicos y fisiológicos en el que organismos vivos forman cristales inorgánicos o agregados cristalinos, la mayoría del tiempo regulado por macromoléculas biológicas.⁵⁴⁻⁵⁶ Los cristales de CaOx son formados dentro de vacuolas de células especializadas llamadas idioblastos cristalinos.⁵⁷⁻⁵⁹ Las morfologías de los cristales de CaOX incluyen romboédrico en forma de bloque o cristales prismáticos presentes como cristales únicos o múltiples por célula, grandes y elongados estiloides rectangulares que aparecen como cristales únicos por célula, haces de cristales de rafidios con forma de aguja (aciculares), masas de pequeños cristales angulares llamados cristales de arena, y cristales conglomerados multifacéticos llamados drusas, a menudo únicos pero también múltiples por célula.⁵¹

Aunque los cristales de CaOx han intrigado a los científicos de plantas por un largo tiempo, sus roles funcionales son aun pobremente entendidos. Actualmente

se considera que los cristales de CaOx están involucrados en el endurecimiento de tejidos, en la homeostasis de calcio, como un balance de iones, detoxificación de metales pesados y/u oxalato, recolección y reflexión de luz, y protección de la planta contra herbívoros.^{51,60-63} La mayoría de estas hipótesis se enfocan en los iones de calcio, mientras el oxalato es considerado como un contra ión para unir calcio, sin embargo el oxalato representa un rica fuente de carbono que pudiera ser utilizada en la forma de CO₂ en la fotosíntesis, convirtiéndose así en un almacén de CO₂.^{64,65}

Los cristales de CaOX de amaranto no han sido aislados ni caracterizados, por lo tanto, el objetivo del presente estudio fue caracterizar la morfología y composición de los cristales de CaOx en hojas de amaranto.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Plantas

Semillas de *Amaranthus hypochondriacus* cv Nutrisol fueron germinadas en substrato para germinación de semillas mezcla BM2 (Berger). Las plántulas de 8 días fueron trasplantadas a 500 g del mismo substrato y fueron crecidas en una cámara climática a 25 °C con 12 h de luz/oscuridad.

6.2 Observación de cristales de CaOx *in situ*

Se usaron dos muestras de hoja de amaranto, una fresca y una aclarada. Para el aclaramiento, una hoja de amaranto fue cosechada y aclarada de acuerdo al protocolo de Warner et al.⁶⁶ Una hoja fresca y una aclarada fueron cortadas en fragmentos cuadrados, montadas en sendos soportes para criostato y enfriadas a – 20°C durante 1 h. Para obtener cortes paradermales, la superficie de la hoja se mantuvo horizontal respecto a la superficie del soporte, y se obtuvieron cortes de 20 µm. Para obtener cortes transversales, la superficie de la hoja se mantuvo perpendicular al soporte y se obtuvieron cortes de 50 µm. Los cortes se observaron al microscopio (Axio imager M2 Carl-Zeiss) con la técnica DIC, y se tomaron fotomicrografías. Para la observación de la vena media, se cortó un fragmento de 2.0 X 2.5 cm de una hoja aclarada y fue montado en una laminilla. Se tomaron fotomicrografías de campo claro en esteromicroscopio (Zeiss Discovery V8). Un corte paradermal fue secado, cubierto con oro y analizado por microscopía electrónica de barrido de alta resolución (FEI XL30-SFEG). Se llevó a cabo un análisis elemental con espectroscopia de rayos X de energía dispersiva (EDX), que permitió conocer la composición elemental *in situ* de las drusas.

6.3 Aislamiento y análisis de cristales de CaOx de hojas de amaranto

Se cosecharon 20 g de hojas frescas de amaranto, se enjuagaron con agua de la llave, con agua desionizada y se desinfectaron en hipoclorito de sodio 1% durante 30 min. Se enjuagaron de nuevo con agua desionizada y se molieron en licuadora (Oster Wisconsin, MI, USA) durante 2 min a máxima velocidad con 250 mL de agua tipo I. Se filtró con ocho capas de gasa para retirar los remanentes más grandes, y luego se centrifugó a 2000 g durante 10 min. Se descartó el sobrenadante y el sedimento se lavó dos veces con agua desionizada, centrifugando a 2000 g durante 10 min en cada lavado. Se resuspendió el sedimento en 3 mL de agua tipo I, se colocó sobre 30 mL de percoll (GE Healthcare Cd. Juárez, BC, México) cuidando que no se mezclaran las fases y se centrifugó a 30000 g durante 30 min. Se descartó el sobrenadante y el sedimento se lavó con 15 mL de agua tipo I, se centrifugó a 2000 g durante 10 min. Se resuspendió el sedimento en una solución de driselasa 0.2 % (Sigma Aldrich), 0.15% de macerozima (Karlan) en MES 2mM (Sigma Aldrich) pH 5.0. Se incubó durante 5 h con agitación a 200 rpm (Lab companion Shelburne, VT, USA). Después, se centrifugó a 2000 g durante 10 min, se descartó el sobrenadante y el sedimento se lavó con agua tipo I y se centrifugó a 2000g durante 10 min. Se descartó el sobrenadante, el sedimento se resuspendió en 3 mL de agua tipo I, se vertió sobre 25 mL de percoll (GE Healthcare) cuidando que no se mezclaran las fases y se centrifugó a 30000 g durante 30 min. Se descartó el sobrenadante, se resuspendió el sedimento en 10 mL de SDS 1%, y se incubó a temperatura ambiente con agitación a 200 rpm durante 30 min. Se centrifugó a 5000 g durante 10 min, se recolectó el sobrenadante (fracción SDS) y una porción del sedimento (sedimento SDS) para ser analizados posteriormente. El resto del sedimento se lavó con 10 mL de agua tipo I y se centrifugó a 2000 g durante 10 min. El sobrenadante se descartó, el sedimento se resuspendió en 4 mL de buffer de extracción (urea 7 M, tiourea 2 M y triton X-100 2%) y se agitó durante 1 min en vortex. Se centrifugó a 10000 g durante 10 minutos. Se formaron tres fases, una superior límpida, una media viscosa y el sedimento, se recolectaron la fase límpida (fracción límpida), la viscosa (fracción viscosa) y una porción del

sedimento (sedimento en buffer de extracción) para ser analizadas. El resto del sedimento se resuspendió en 4 mL de buffer de extracción y se sometió a ultrasonido durante 20 min. Se centrifugó a 10000 g durante 10 min, se recolectó el sobrenadante (fracción de sedimento) y el sedimento (sedimento tras proceso completo) para ser analizados.

Análisis de las fracciones extraídas: Se precipitaron las proteínas extraídas agregando 40 mL de acetona (Sigma, Saint Louis, MO, USA) a cada fracción y enfriando durante 90 min a -20 °C. Se centrifugó a 17000 g durante 10 min, se descartó el sobrenadante y se dejó secar 10 min el precipitado. Se pesaron aproximadamente 10 mg de cada precipitado y se solubilizaron en 100 µL de buffer de carga en condiciones reductoras y desnaturalizantes. Se calentó a 90 °C con agitación de 1400 rpm (Thermomixer compact, Eppendorf) durante 10 min. Se analizaron 10 µL de esta solución mediante R-SDS-PAGE como se indicó en el numeral 2.2.1.

Análisis de los sedimentos: Se lavaron 20 µL de cada sedimento con 100 µL de agua, y se centrifugó a 17000 g durante 1 min. Se descartó el sobrenadante, los sedimentos se resuspendieron en 100 µL de colorante de coomassie normal y se dejó incubar 1 min a temperatura ambiente. Se centrifugó a 17000 g durante 1 min, se descartó el sobrenadante, el sedimento se resuspendió en 100 µL de solución de desteñido y se dejó incubar durante 1 min. Se centrifugó a 17000 g durante 1 min, se descartó el sobrenadante y el sedimento se lavó con agua tipo I. El sedimento SDS se tiñó de la misma manera con yodo lugol, y se destiño con agua tipo I. Se centrifugó a 17000 g durante 1 min, el sobrenadante se descartó y el sedimento se resuspendió en 20 µL de glicerol al 40%. Se observaron 10 µL de cada suspensión al microscopio mediante la técnica DIC (Axio imager M2 Carl-Zeiss).

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Observación de cristales de CaOx *in situ*

Se observó la presencia de dos morfologías de cristales de oxalato de calcio en hojas de amaranto, los cristales en forma de arena y las drusas. Las drusas se observan como grandes núcleos circulares café oscuro en microscopía de campo claro, que se intercalan entre las células de vaina del haz (Figura 29 A). Poseen un diámetro entre 20 y 56 μm en función de su desarrollo. Por ejemplo, en la figura 29 B se puede observar una drusa en formación con un diámetro de apenas 20 μm , mientras que las más grandes poseen un diámetro de hasta 56 μm . Cuando se observan en microscopía por DIC se puede observar birrefringencia (Figura 29 B y 29 C). En general, las drusas se encuentran en idioblastos intercalados entre las células de mesófilo y vaina del haz, estando siempre más cercanas a las células de la vaina del haz. Inclusive, la pared celular de los idioblastos está asociada a la pared de las células de la vaina del haz, algo que no sucede con las células de mesófilo, como se verá más adelante. Por su lado, el CaOx en forma de cristales de arena se detectó solamente en venas principales de la hoja que poseen colénquima. Se encuentra en cúmulos que toman la forma alargada de estas células que dan la impresión de ser un cristal sólido cilíndrico al ser observados directamente en las venas (Figura 29 D). Sin embargo, al hacer un corte transversal de la vena principal de la hoja, se puede apreciar que son cúmulos de cristales con forma de pirámide que poseen una longitud de 3.2 a 4.2 μm de largo de uno de sus lados (Figura 30). Además, en la Figura 30 A se puede observar que la formación de drusas y cristales de arena son tejido-específico, ya que las drusas solo se pueden observar en el limbo, los cristales de arena en la vena media de la hoja.

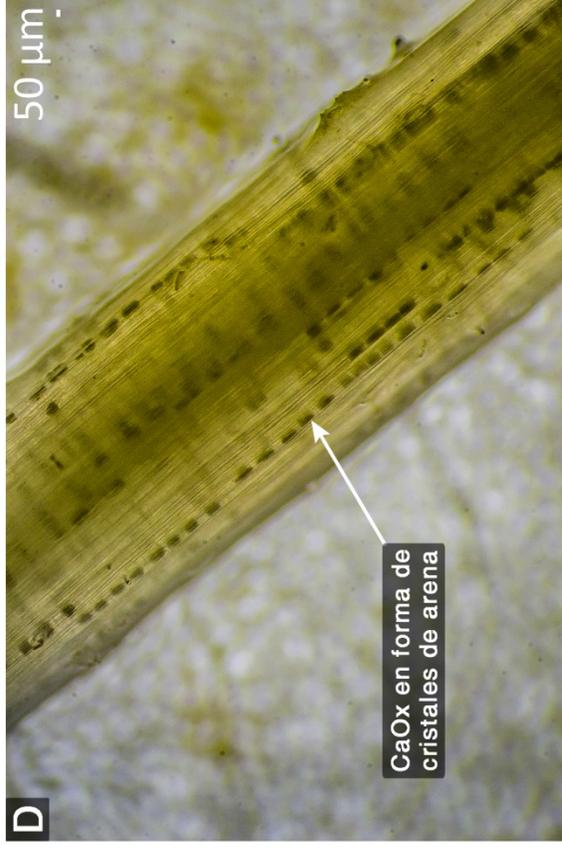
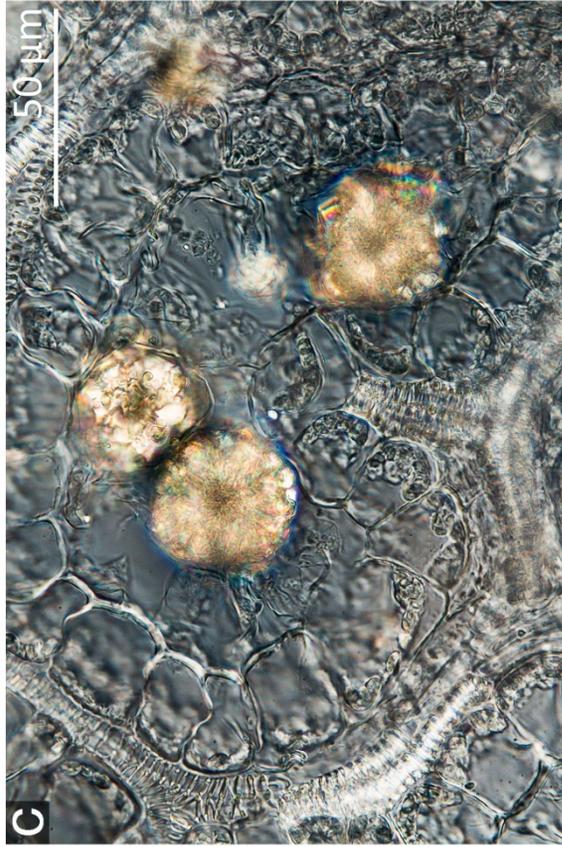
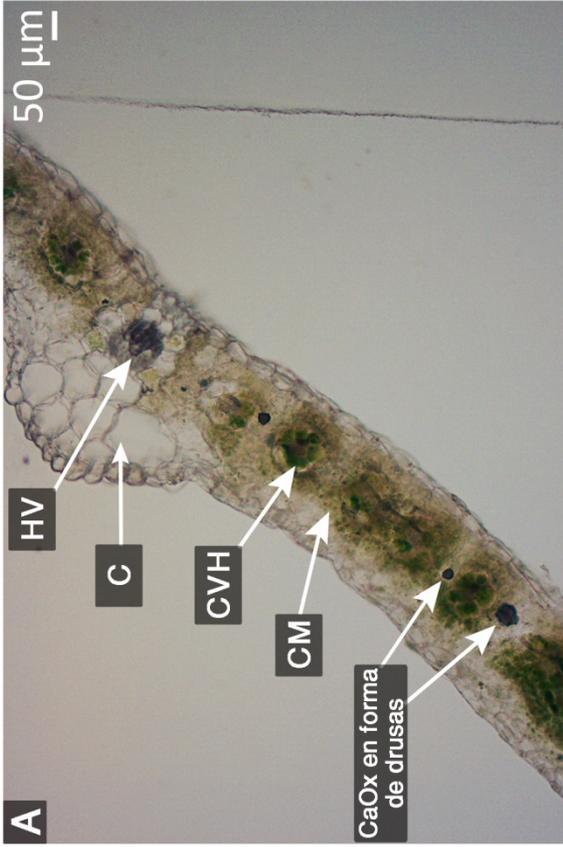


Figura 29. Localización *in situ* de cristales de CaOx en hoja de amaranto. A) Microscopía de campo claro de un corte transversal de 50 µm de hoja fresca. B) Microscopía DIC de un corte paradermal de 20 µm de hoja fresca. C) Microscopía DIC de un corte paradermal de 20 µm de hoja aclarada. D) Microscopía de campo claro de vena media en un fragmento de hoja aclarada. HV: Haces vasculares, C: Colénquima, CVH: Células de la Vaina del Haz, CM: Células de Mesófilo.

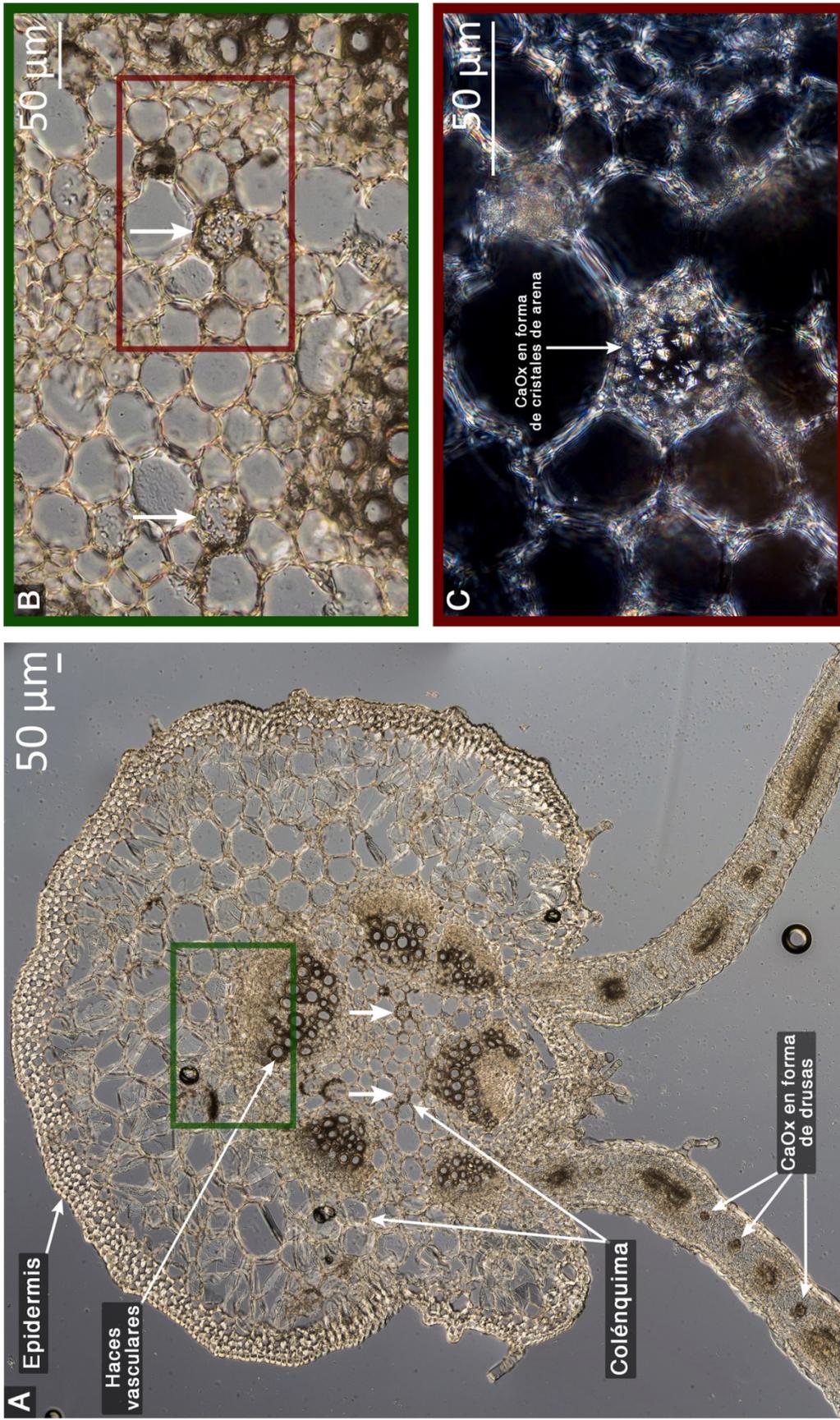


Figura 30. Localización *in situ* de cristales de CaOx en hoja de amaranto 2. A) Corte transversal de vena media en hoja de amaranto aclarada. B) Ampliación del área enmarcada en verde en A). C) Microscopía DIC del área enmarcada en rojo en B). Las flechas libres apuntan hacia la misma ubicación en las tres fotomicrografías.

Las drusas son un conglomerado de cristales, a diferencia de los cristales únicos presentes en los cristales de arena. Para analizar con más detalle la morfología de las drusas y su composición, se observaron con microscopía electrónica de barrido. En la Figura 31 A se observa que una drusa está compuesta por un cúmulo de cristales de diferentes tamaños con bordes afilados. Al hacer un análisis elemental por medio de EDX sobre la drusa, se observan predominantemente los elementos Ca, O, y C, constituyentes del oxalato de calcio (Figura 31 B). Si se realiza el mismo análisis en una zona donde no hay drusas, por ejemplo la pared celular de una célula de la vaina del haz (Figura 31 C), la señal de calcio disminuye drásticamente (Figura 31 D). Esto comprueba que en las drusas hay una gran acumulación de calcio, muy probablemente en la forma de oxalato de calcio. Una señal particularmente intensa en el espectro de la Figura 31 D es la del Si, esta señal se debe a que el haz de electrones tocó parte de la laminilla de vidrio.

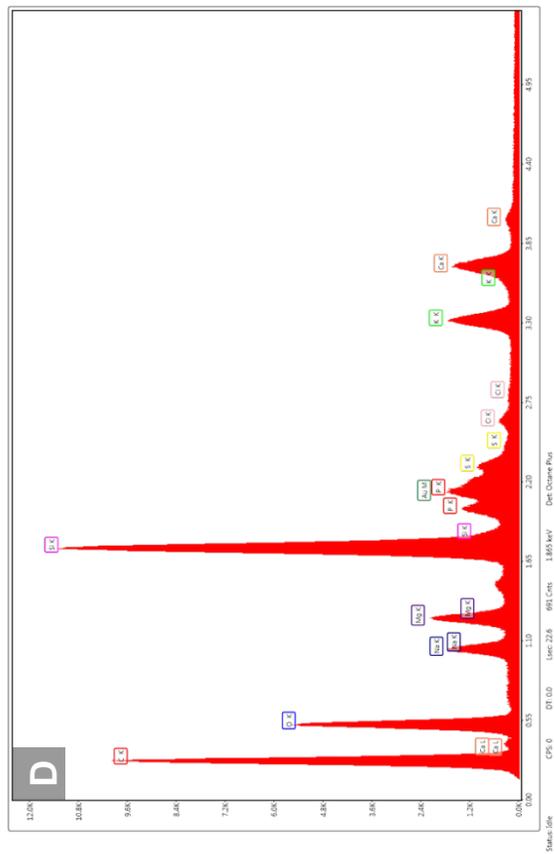
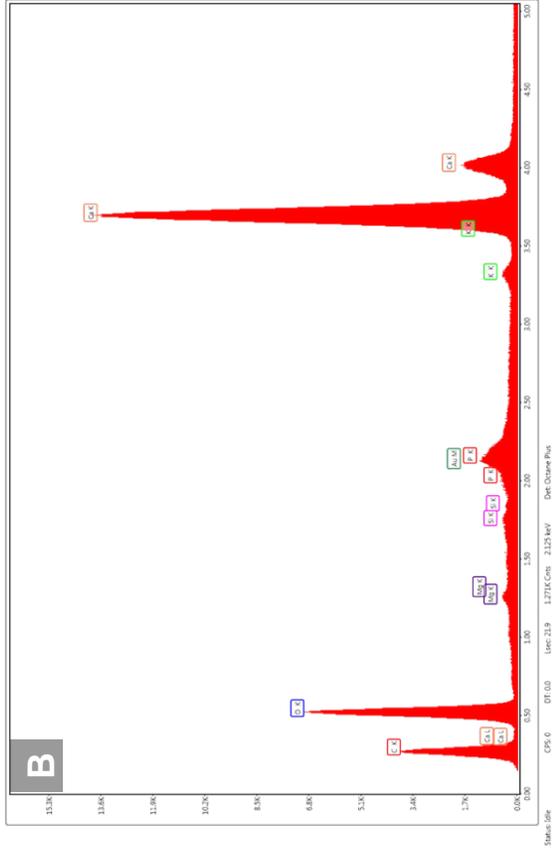
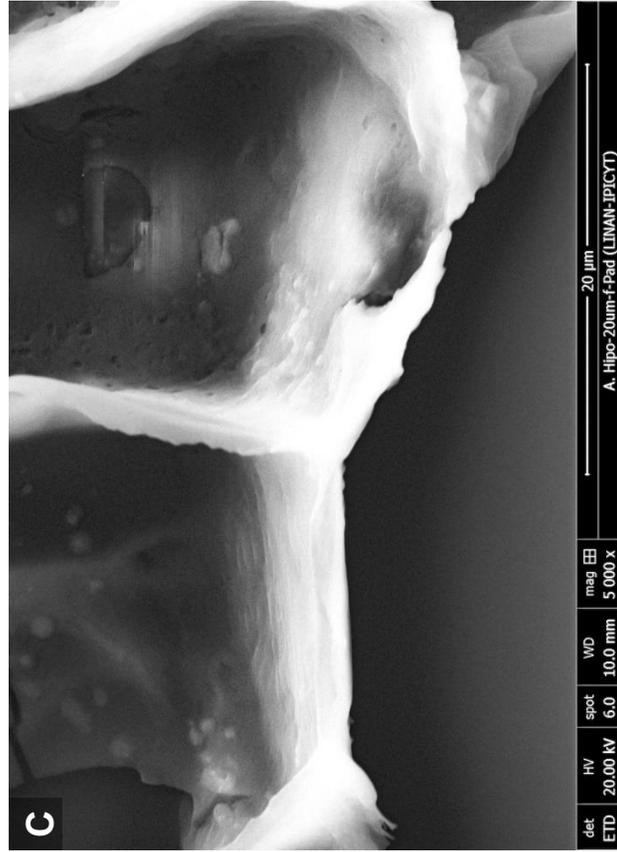
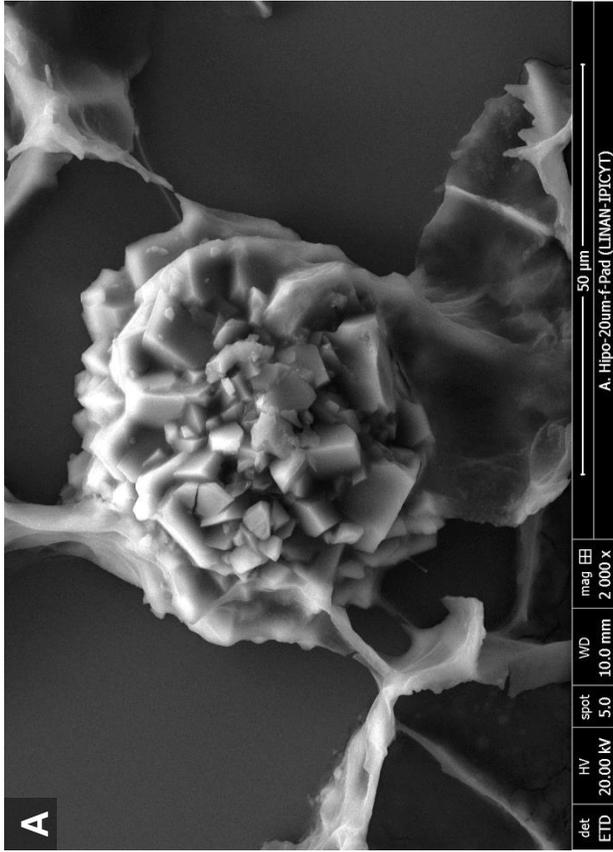


Figura 31. Microscopía electrónica de barrido de drusas y análisis elemental. A) Drusa dentro de su idioblasto. B) Análisis elemental de la drusa. C) Pared celular de una célula de vaina del haz. D) Análisis elemental de la célula de vaina del haz.

Como se mencionó anteriormente, la pared celular del idioblasto está asociada a la pared celular de las células de la vaina del haz, esto se puede observar en la Figura 32. Esta observación es interesante, ya que el idioblasto puede aportar soporte estructural a la hoja al estar unido a las células de la vaina del haz. Por otro lado, en esta misma Figura se puede observar cómo las células de la vaina del haz están herméticamente unidas a los haces vasculares; no hay algún espacio de haz vascular sin cubrir por células de vaina del haz. Esta imagen contrasta con lo que sucede en el trigo (Figura 24), donde el mesófilo al secarse se contrae y deja descubierto casi por completo los haces vasculares. Es decir, se pueden apreciar con más detalle las diferencias entre una hoja C₃ (trigo) y C₄ (amaranto). Por último, en la Figura 32 se puede observar también que se ha perdido por completo las células de mesófilo, similar a como se observa en la Figura 9, producto de los tratamientos a la muestra. Con esta observación, es claro que se debe tener un cuidado particular con las hojas de amaranto al ser analizadas, ya que pierden fácilmente las células de mesófilo.

Las morfologías observadas (cristales de arena y drusas) son controladas por procesos biológicos en los que se cree están asociado macromoléculas como las proteínas.^{51,55} Así mismo se ha reportado que algunas proteínas aisladas de drusas sirven como centro de nucleación de oxalato de calcio.^{50,67}

En la Figura 33 se muestran una drusa fracturada. En ella se puede observar que el exterior es cristalino, con ángulos afilados mientras en el interior se observa una masa continua amorfa. Esta masa pareciera unir a los cristales en el conjunto drusa y quizá se trate de proteínas como las descritas en estudios previos, responsables de la nucleación.

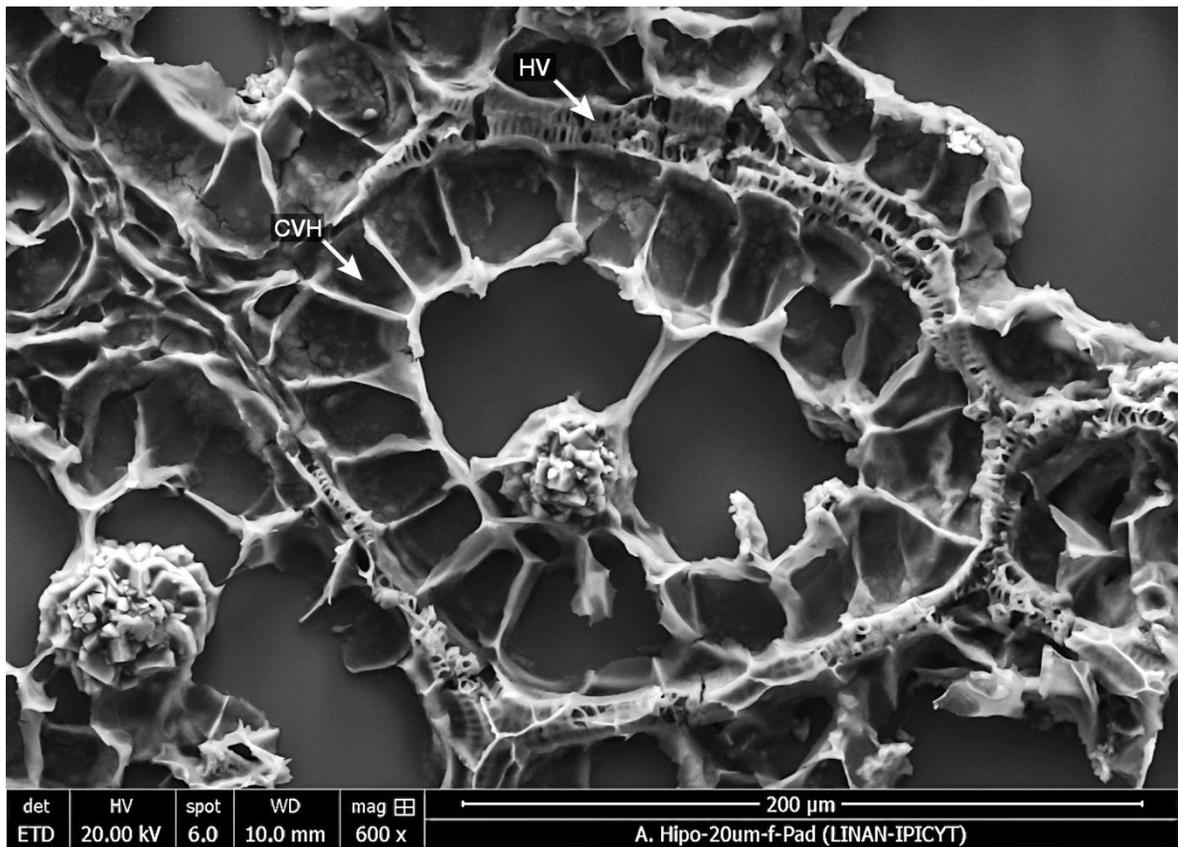


Figura 32. Asociación entre la pared celular de idioblastos y células de vaina del haz. HV: Haces vasculares. CVH: Células de la vaina del haz.

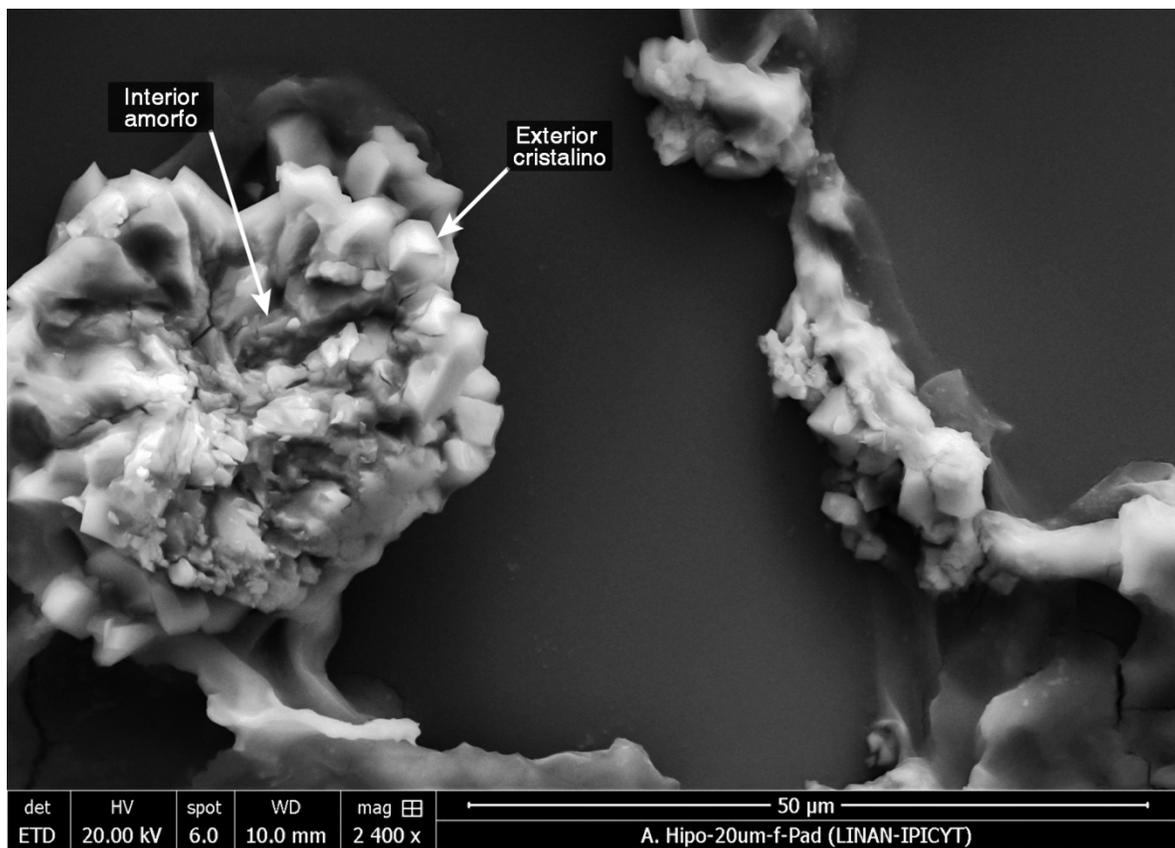


Figura 33. Microscopía electrónica de barrido de drusas del interior de una drusa fracturada.

7.2 Aislamiento y análisis de cristales de CaOx de hojas de amaranto

Para determinar si hay proteínas asociadas a las drusas, estas se aislaron y se analizaron mediante microscopía y R-SDS-PAGE. Al sedimento de un molido de hojas de amaranto se le dio una serie de tratamientos con el fin de aislar y enriquecer los cristales de CaOx. Después de separar con percoll el sedimento crudo, se logró eliminar una gran cantidad de detritus de hoja, obteniendo un sedimento blanco en su mayoría con algunos residuos verdes. Se le dio un tratamiento con driselasa y macerozima esperando que la pared celular de los detritus remanentes se degradara, disgregándolos en partículas pequeñas de baja densidad. Así podrían ser separados de los cristales de CaOx por diferencia de densidad. Después de centrifugar en percoll el sedimento tratado con driselasa y macerozima, se eliminó otra fracción de detritus consiguiendo un sedimento más blanco, pero aún con pequeños indicios de detritus.

Con el lavado en SDS 1% se pretendía solubilizar las proteínas que pudieran estar unidas débilmente a los cristales, como producto de la mezcla de cristales y detritus celulares al moler. Sin embargo, en la fracción SDS analizada por R-SDS-PAGE no se detectaron proteínas (Figura 34). Por otro lado, el sedimento SDS contiene cristales de CaOx en forma de drusas y cristales de arena, pero también una gran cantidad de almidón (Figura 35 A). Después, con el lavado en buffer de extracción se pretendían solubilizar proteínas fuertemente unidas a los cristales, y por tanto con mayor probabilidad de participar en la creación de los mismos. Se obtuvieron tres fases después de centrifugar: una límpida superior, una viscosa media y el sedimento inferior. En la fracción límpida se observan tres bandas en el gel y en la fracción viscosa ninguna (Figura 34). En el sedimento, el almidón observado anteriormente ya no está, fue eliminado por el buffer de extracción, sin embargo se observan detritus celulares aún (Figura 35 B). En este detritus se observa una coloración azul, indicativa de la presencia de proteínas.

Por último, tras someter el sedimento anterior a sonicación con buffer de extracción, no se detectaron proteínas en el sobrenadante obtenido (Figura 34). Sin embargo, en el sedimento la cantidad de detritus disminuyó, se observan enriquecidos los cristales, y se encontraron algunas drusas fracturadas con coloración azul en el interior, indicativo de proteínas (Figura 35 C).

Las proteínas detectadas en la fracción límpida se analizaron por espectrometría de masas y se encontró similitudes con sintasa de almidón acoplada a gránulo (datos no mostrados). Este resultado tiene sentido al observar que tras el lavado con buffer de extracción desaparecen los gránulos de almidón y aparecen estas bandas. No se pudieron extraer proteínas asociadas a las drusas. Sin embargo en las microscopías de la Figura 35 C se tiene evidencia de su posible presencia, ya que se encontraron varias drusas como la que se muestra en la imagen, fracturadas y que su interior se ha teñido con el colorante de coomassie.

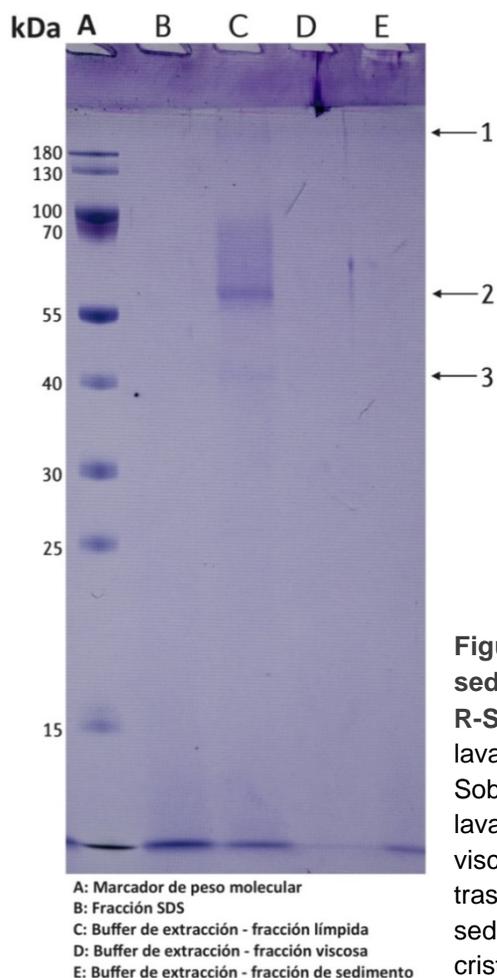


Figura 34. Análisis de los extractos proteínicos de sedimentos generados en la purificación de drusas por R-SDS-PAGE. Fracción SDS: sobrenadante obtenido tras lavar los cristales con SDS 1%. Fracción límpida: Sobrenadante obtenido en la parte superior del tubo tras lavar los cristales con buffer de extracción. Fracción viscosa: Sobrenadante obtenido en la parte media del tubo tras lavar los cristales con buffer de extracción. Fracción de sedimento: sobrenadante obtenido tras someter los cristales a ultrasonido con buffer de extracción.

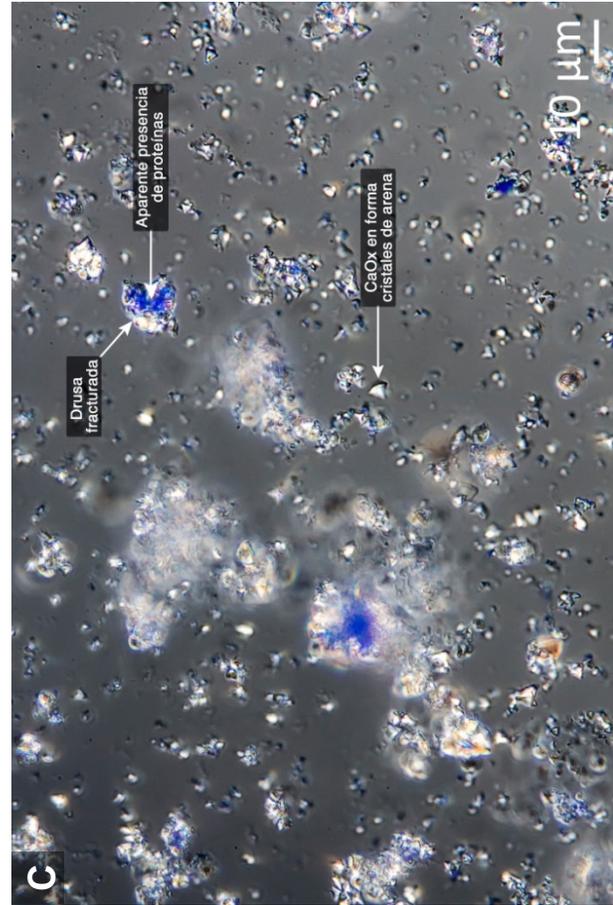
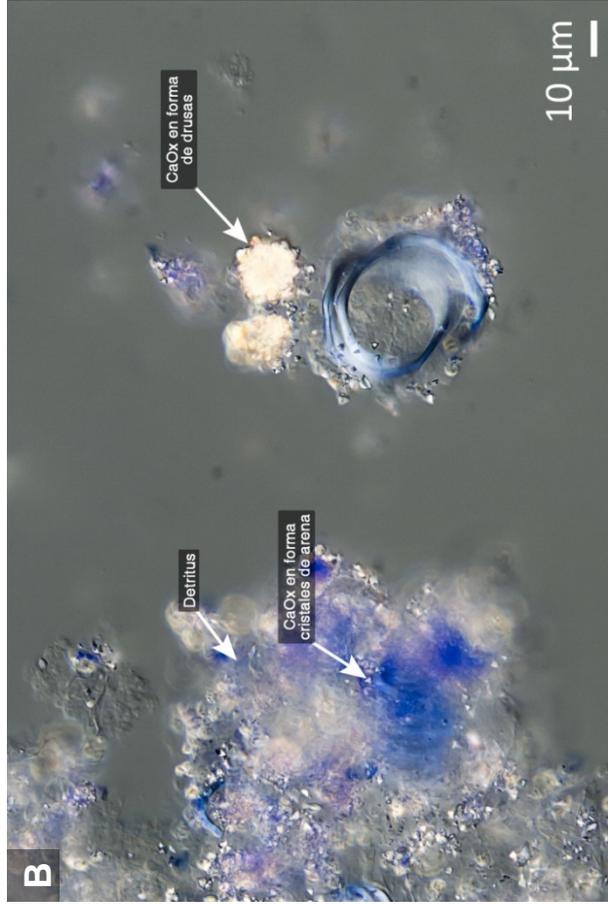
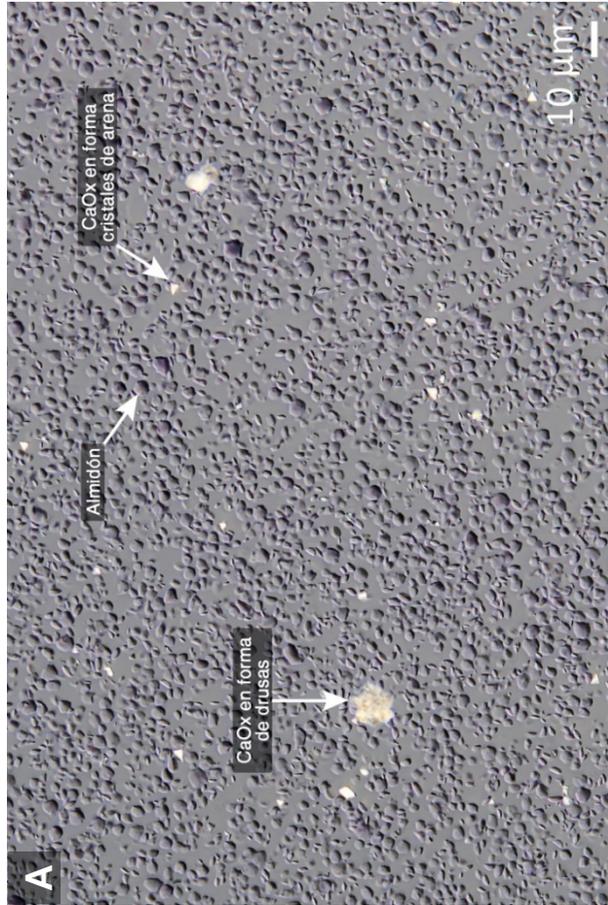


Figura 35. Análisis de los sedimentos generados en la purificación de drusas. Microscopía por DIC de sedimentos obtenidos tras el teñido con colorante de coomassie y luego de A) sedimentos obtenidos tras el tratamiento con buffer de extracción y SDS 1%, B) sedimentos obtenidos tras el tratamiento con buffer de extracción y agitación, y C) sedimentos obtenidos tras el tratamiento con buffer de extracción y sonicación.

8. CONCLUSIONES

- *Amaranthus hypochondriacus* acumula cristales de CaOx en sus hojas en forma de drusas en el limbo, y en forma de cristales de arena en el colénquima de venas principales.
- Las drusas de *A. hypochondriacus* son agregados de cristales de diferentes tamaños que muestran birrefringencia, y llegan a medir hasta 56 μm de diámetro.
- El CaOx en forma de cristales de arena de *A. hypochondriacus* son pequeños cristales piramidales separados y birrefringentes, que poseen un tamaño de 3.2 a 4.2 μm de largo de uno de sus lados.
- Las drusas se encuentran dentro de idioblastos que están a su vez inmersos entre las células de mesófilo y vaina del haz.
- La pared celular de los idioblastos está asociada a la pared celular de las células de la vaina del haz, esto no sucede con las células de mesófilo.
- Los cúmulos de cristales de arena forman líneas discontinuas en las venas principales de la hoja de *A. hypochondriacus*.
- Las drusas poseen un exterior con aspecto cristalino y con ángulos afilados, mientras en el interior tienen un aspecto amorfo y continuo.
- Los gránulos de almidón poseen una densidad cercana a los cristales de CaOx, por lo que sedimentan juntos en una separación con percoll.
- Los núcleos de drusas fracturadas se pueden teñir con colorante de coomassie, por lo que es probable que contengan proteínas en su interior. Esta proteína podría funcionar como un adhesivo.
- Para solubilizar y purificar las probables proteínas asociadas a drusas hace falta un tratamiento que elimine el almidón, y después otro que disuelva las drusas.

9. REFERENCIAS

1. Athman, A. *et al.* Protocol: a fast and simple in situ PCR method for localising gene expression in plant tissue. *Plant Methods* **10**, 29 (2014).
2. Dong, Y. *et al.* Sample Preparation for Mass Spectrometry Imaging of Plant Tissues: A Review. *Front. Plant Sci.* **7**, 60 (2016).
3. Pesquet, E., Barbier, O., Ranocha, P., Jauneau, A. & Goffner, D. Multiple gene detection by *in situ* RT-PCR in isolated plant cells and tissues. *Plant J.* **39**, 947–959 (2004).
4. Pluskota, W. E., Bradford, K. J. & Nonogaki, H. Tissue-Printing Methods for Localization of RNA and Proteins that Control Seed Dormancy and Germination. in *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* **773**, 329–339 (2011).
5. Bagasra, O., Seshamma, T. & Pomerantz, R. J. Polymerase chain reaction in situ: Intracellular amplification and detection of HIV-1 proviral DNA and other specific genes. *J. Immunol. Methods* **158**, 131–145 (1993).
6. Nuovo, G. J. In situ localization of PCR-amplified DNA and cDNA. *Mol. Biotechnol.* **10**, 49–62 (1998).
7. Scopus preview - Scopus - Welcome to Scopus. Available at: <https://www.scopus.com/>. (Accessed: 10th June 2018)
8. Javelle, M., Marco, C. F. & Timmermans, M. In situ hybridization for the precise localization of transcripts in plants. *J. Vis. Exp.* e3328 (2011). doi:10.3791/3328
9. Prime in situ hybridisation adapter. Available at: <http://www.techne.com/product.asp?dsl=4060#>. (Accessed: 10th June 2018)
10. Pasternak, T. *et al.* Protocol: an improved and universal procedure for whole-mount immunolocalization in plants. *Plant Methods* **11**, 50 (2015).
11. Palmer, W. M. *et al.* PEA-CLARITY: 3D molecular imaging of whole plant organs. *Sci. Rep.* **5**, 13492 (2015).
12. Boughton, B. A., Thinakaran, D., Sarabia, D., Bacic, A. & Roessner, U. Mass spectrometry imaging for plant biology: a review. *Phytochem. Rev.* **15**, 445–

- 488 (2016).
13. Levi-Setti, R., La Marche, P. H., Lam, K. & Wang, Y. L. Initial Operation Of A New High-Resolution Scanning Ion Microscope. in (ed. Wagner, A.) 75 (1984). doi:10.1117/12.942327
 14. Richard M. Caprioli, *, Terry B. Farmer, A. & Gile, J. Molecular Imaging of Biological Samples: Localization of Peptides and Proteins Using MALDI-TOF MS. (1997). doi:10.1021/AC970888I
 15. Goodwin, R. J. A., Pennington, S. R. & Pitt, A. R. Protein and peptides in pictures: Imaging with MALDI mass spectrometry. *Proteomics* **8**, 3785–3800 (2008).
 16. Schwartz, S. A., Reyzer, M. L. & Caprioli, R. M. Direct tissue analysis using matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry: practical aspects of sample preparation. *J. Mass Spectrom.* **38**, 699–708 (2003).
 17. Ly, A. *et al.* High-mass-resolution MALDI mass spectrometry imaging of metabolites from formalin-fixed paraffin-embedded tissue. *Nat. Protoc.* **11**, 1428–1443 (2016).
 18. What is heat stabilization? | Denator. Available at: <http://www.denator.com/heat-stabilization>. (Accessed: 11th June 2018)
 19. Goodwin, R. J. A., Lang, A. M., Allingham, H., Borén, M. & Pitt, A. R. Stopping the clock on proteomic degradation by heat treatment at the point of tissue excision. *Proteomics* **10**, 1751–1761 (2010).
 20. Nelson, K. A., Daniels, G. J., Fournie, J. W. & Hemmer, M. J. Optimization of Whole-Body Zebrafish Sectioning Methods for Mass Spectrometry Imaging. *J. Biomol. Tech.* **24**, 119–127 (2013).
 21. Dong, Y. *et al.* Sample Preparation for Mass Spectrometry Imaging of Plant Tissues: A Review. *Front. Plant Sci.* **7**, 60 (2016).
 22. Chen, R., Hui, L., Sturm, R. M. & Li, L. Three dimensional mapping of neuropeptides and lipids in crustacean brain by mass spectral imaging. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **20**, 1068–77 (2009).
 23. Gemperline, E., Jayaraman, D., Maeda, J., Ané, J.-M. & Li, L. Multifaceted Investigation of Metabolites During Nitrogen Fixation in Medicago via High Resolution MALDI-MS Imaging and ESI-MS. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*

- 26**, 149–158 (2015).
24. Sheerin Khatib-Shahidi, †, Malin Andersson, †, Jennifer L. Herman, ‡, Todd A. Gillespie, ‡ and & Richard M. Caprioli*, †. Direct Molecular Analysis of Whole-Body Animal Tissue Sections by Imaging MALDI Mass Spectrometry. (2006). doi:10.1021/AC060788P
 25. Gorzolka, K., Bednarz, H. & Niehaus, K. Detection and localization of novel hordatine-like compounds and glycosylated derivatives of hordatines by imaging mass spectrometry of barley seeds. *Planta* **239**, 1321–1335 (2014).
 26. Kawamoto, T. Use of a new adhesive film for the preparation of multi-purpose fresh-frozen sections from hard tissues, whole-animals, insects and plants. *Arch. Histol. Cytol.* **66**, 123–43 (2003).
 27. Seeley, E. H., Oppenheimer, S. R., Mi, D., Chaurand, P. & Caprioli, R. M. Enhancement of protein sensitivity for MALDI imaging mass spectrometry after chemical treatment of tissue sections. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **19**, 1069–1077 (2008).
 28. Bjarnholt, N., Li, B., D'Alvise, J. & Janfelt, C. Mass spectrometry imaging of plant metabolites--principles and possibilities. *Nat. Prod. Rep.* **31**, 818–37 (2014).
 29. Poth, A. G. *et al.* Cyclotides Associate with Leaf Vasculature and Are the Products of a Novel Precursor in Petunia (Solanaceae). *J. Biol. Chem.* **287**, 27033–27046 (2012).
 30. Korte, A. R., Yandea-Nelson, M. D., Nikolau, B. J. & Lee, Y. J. Subcellular-level resolution MALDI-MS imaging of maize leaf metabolites by MALDI-linear ion trap-Orbitrap mass spectrometer. *Anal. Bioanal. Chem.* **407**, 2301–2309 (2015).
 31. Bruker. Virtual Microscopy MALDI Imaging - YouTube. (2013). Available at: <https://www.youtube.com/watch?v=YV2wzVXEvg&t=87s>. (Accessed: 20th September 2017)
 32. Kaletas, B. K. *et al.* Sample preparation issues for tissue imaging by imaging MS. *Proteomics* **9**, 2622–2633 (2009).
 33. Baluya, D. L., Garrett, T. J. & Yost, R. A. Automated MALDI Matrix Deposition Method with Inkjet Printing for Imaging Mass Spectrometry. *Anal.*

- Chem.* **79**, 6862–6867 (2007).
34. Hankin, J. A., Barkley, R. M. & Murphy, R. C. Sublimation as a method of matrix application for mass spectrometric imaging. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **18**, 1646–52 (2007).
 35. Li, B., Bhandari, D. R., Römpf, A. & Spengler, B. High-resolution MALDI mass spectrometry imaging of gallotannins and monoterpene glucosides in the root of *Paeonia lactiflora*. *Sci. Rep.* **6**, 36074 (2016).
 36. Yang, J. & Caprioli, R. M. Matrix Sublimation/Recrystallization for Imaging Proteins by Mass Spectrometry at High Spatial Resolution. *Anal. Chem.* **83**, 5728–5734 (2011).
 37. Fujimura, Y. & Miura, D. MALDI Mass Spectrometry Imaging for Visualizing In Situ Metabolism of Endogenous Metabolites and Dietary Phytochemicals. *Metabolites* **4**, 319–46 (2014).
 38. Lee, Y. J., Perdian, D. C., Song, Z., Yeung, E. S. & Nikolau, B. J. Use of mass spectrometry for imaging metabolites in plants. *Plant J.* **70**, 81–95 (2012).
 39. Evert, R. F. & Eichhorn, S. E. Raven Biology of Plants. *Biology of Plants* (2013). doi:10.1006/mben.2001.0210
 40. FotosíntesisVI - Otras Vías de fijación del CO₂. Available at: <https://fotosintesisvi.wikispaces.com/Otras+Vías+de+fijación+del+CO2>. (Accessed: 18th June 2018)
 41. Nelson, D. L. & Cox, M. M. *LEHNINGER PRINCIPLES OF BIOCHEMISTRY*. W. H. Freeman and Company (2008). doi:10.1017/CBO9781107415324.004
 42. Wang, J., Klessig, D. & Berry, J. Regulation of C₄ Gene Expression in Developing Amaranth Leaves. *Plant Cell* **4**, 173 (1992).
 43. Swider, J. R., Hackley, V. A. & Winter, J. Characterization of Chinese ink in size and surface. *J. Cult. Herit.* **4**, 175–186 (2003).
 44. Gennaro, A. R., Remington, J. P. (Joseph P. & Belluci, S. *Remington farmacia*- 'Dclndj kL ddica Panamericana, 2003).
 45. Impresora Epson Stylus Photo T50 | Fotos | Impresoras | Para el hogar | Epson México. Available at: <https://epson.com.mx/Para-el->

hogar/Impresoras/Fotos/Impresora-Epson-Stylus-Photo-T50/p/C11CA45212.
(Accessed: 9th June 2018)

46. WHITE, P. J. & Broadley, M. R. Calcium in Plants. *Ann. Bot.* **92**, 487–511 (2003).
47. Hawkesford, M. *et al.* Functions of Macronutrients. in *Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants* 135–189 (Elsevier, 2012). doi:10.1016/B978-0-12-384905-2.00006-6
48. Nakata, P. A. Advances in our understanding of calcium oxalate crystal formation and function in plants. *Plant Sci.* **164**, 901–909 (2003).
49. Weiner, S. & Dove, P. M. An Overview of Biomineralization Processes and the Problem of the Vital Effect. *Rev. Mineral. Geochemistry* **54**, 1–29 (2003).
50. Bouropoulos, N., Weiner, S. & Addadi, L. Calcium oxalate crystals in tomato and tobacco plants: Morphology and in vitro interactions of crystal-associated macromolecules. *Chem. - A Eur. J.* **7**, 1881–1888 (2001).
51. Franceschi, V. R. & Nakata, P. A. CALCIUM OXALATE IN PLANTS: Formation and Function. *Annu. Rev. Plant Biol.* **56**, 41–71 (2005).
52. Prychid, C. J. & Rudall, P. J. Calcium Oxalate Crystals in Monocotyledons : A Review of their Structure and Systematics. *Ann. Bot.* **84**, 725–739 (1999).
53. Nakata, P. A. & McConn, M. M. Isolation of *Medicago truncatula* mutants defective in calcium oxalate crystal formation. *Plant Physiol.* **124**, 1097–104 (2000).
54. Addadi, L. & Weiner, S. Interactions between acidic proteins and crystals: stereochemical requirements in biomineralization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **82**, 4110–4 (1985).
55. Webb, M. A. Cell-mediated crystallization of calcium oxalate in plants. *Plant Cell* **11**, 751–61 (1999).
56. Medakovi, D. & Popovi, S. Unusual Crystal Formation in Organisms - Exceptions that Confirm Biomineralization Rules. in *Crystallization and Materials Science of Modern Artificial and Natural Crystals* (InTech, 2012). doi:10.5772/28849
57. Foster, A. S. Plant idioblasts: Remarkable examples of cell specialization.

- Protoplasma* **46**, 184–193 (1956).
58. Kostman, T. A. & Franceschi, V. R. Cell and calcium oxalate crystal growth is coordinated to achieve high-capacity calcium regulation in plants. *Protoplasma* **214**, 166–179 (2000).
 59. Hudgins, J. W., Krekling, T. & Franceschi, V. R. Distribution of calcium oxalate crystals in the secondary phloem of conifers: a constitutive defense mechanism? *New Phytol.* **159**, 677–690 (2003).
 60. Mazen, A. M. A. & El Maghraby, O. M. O. Accumulation of cadmium, lead and strontium, and a role of calcium oxalate in water hyacinth tolerance. *Biol. Plant.* **40**, 411–417 (1997).
 61. Franceschi, V. R. & Schueren, A. M. Incorporation of strontium into plant calcium oxalate crystals. *Protoplasma* **130**, 199–205 (1986).
 62. van Balen, E., van de Geijn, S. C. & Desmet, G. M. Autoradiographic Evidence for the Incorporation of Cadmium into Calcium Oxalate Crystals. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie* **97**, 123–133 (1980).
 63. Jáuregui-Zúñiga, D., Ferrer, M. A., Calderón, A. A., Muñoz, R. & Moreno, A. Heavy metal stress reduces the deposition of calcium oxalate crystals in leaves of *Phaseolus vulgaris*. *J. Plant Physiol.* **162**, 1183–7 (2005).
 64. Garvie, L. A. J. Decay of cacti and carbon cycling. *Naturwissenschaften* **93**, 114–118 (2006).
 65. Tooulakou, G. *et al.* Alarm Photosynthesis: Calcium Oxalate Crystals as an Internal CO₂ Source in Plants. *Plant Physiol.* **171**, 2577–85 (2016).
 66. Warner, C. A. *et al.* An optical clearing technique for plant tissues allowing deep imaging and compatible with fluorescence microscopy. *Plant Physiol.* **166**, 1684–7 (2014).
 67. Li, X., Zhang, D., Lynch-Holm, V. J., Okita, T. W. & Franceschi, V. R. Isolation of a crystal matrix protein associated with calcium oxalate precipitation in vacuoles of specialized cells. *Plant Physiol.* **133**, 549–59 (2003).