

00524
110



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

"INMUNOLocalización de una Tiorredoxina-
H en órganos reproductivos de *Nicotina glauca*."

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA
P R E S E N T A :
ADRIANA DEL ROCIO MINAYA MARTINEZ



MEXICO, D.F.



EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUIMICA

2003



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

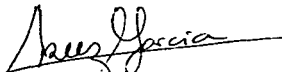
JURADO ASIGNADO:

Presidente **Profesor. Jesús Fernando Montiel Aguirre**
Vocal **Profesora. Luz del Carmen Castellanos Román**
Secretario **Profesor. Felipe Cruz García**
1^{er} Suplente **Profesora. Patricia Elvira Berrón Ruíz**
2^{do} Suplente **Profesora. Leda Carolina Torres Maldonado**

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:

**Laboratorio 104 del Departamento de Bioquímica, Conjunto "E",
Facultad de Química, UNAM**

Asesor



Dr. Felipe Cruz García

Supervisor técnico



Dra. Sonia Vázquez Santana

Sustentante


Adriana del Rocío Minaya Martínez

Agradecimientos

- A la Dra. Sonia Vázquez Santana del Laboratorio de Desarrollo en Plantas de la Facultad de Ciencias (UNAM) por el apoyo, entusiasmo y empeño mostrados durante la realización de este proyecto.
- A mi director de tesis, el Dr. Felipe Cruz García, por brindarme la oportunidad de formar parte de su equipo de investigación y permitirme descubrir lo interesante de la biología molecular en plantas.
- Al M. en C. Alejandro Martínez Mena y a la M. en C. Anabel Bieler Antolin, por su gran disposición de trabajo y profesionalismo.
- A todas las personas, tanto estudiantes como trabajadores, del Departamento de Bioquímica del conjunto "E" de la Facultad de Química por su importante ayuda.
- Al PAIP 6290-15, a la DGPA IN211702 y al CONACYT J31752-N por el apoyo económico para la realización de este proyecto.
- Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (proyecto 4794) por la beca otorgada en el período de Enero 2002–Diciembre 2002.

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo de tesis.

NOMBRE: Adriano del Rocio
Miagoya Martínez

FECHA: 19 Noviembre 2005

FIRMA: Adriano del Rocio Miagoya Martínez
3

DEDICATORIAS

A pesar de tu carácter fuerte y actitud severa, sé que siempre guardas en tu corazón un gran amor para mí.

El empeño y dedicación que pones a todo lo que haces y tu lucha constante sin demostrar cansancio, me impulsó a mostrarte que yo también soy capaz de lograr grandes cosas como tú, muchas gracias papá.

A la mujer más valiosa e importante en mi vida, que siempre creyó y creará en mí. La que me brinda el amor más fuerte y extraordinario que existe...

el amor de madre.

Este es uno de tantos logros que también se debe a ti.

Royer y Jessi, sin sus locuras, sonrisas y la forma tan maravillosa con la que ustedes disfrutaban la vida, me hubiera resultado muy difícil reconocer que uno de los más grandes tesoros es la "sencillez". Puedo decir que ustedes me han enseñado más... de lo que yo a ustedes. Esto también se lo dedico con mucho cariño.

Tu odiosísima mujer, a la que quiero tanto y, a quien durante varios años no aprecié como se merecía, también formas parte importante de éste logro. Recuerdas esas noches...

de desvelo y trabajo.

Por todo ese amor y esfuerzo, mil gracias hermana.

A toda mi familia que siempre me apoyó y comprendió mi ausencia. Que siempre estuvieron al pendiente de mi desempeño y se alegran con lo que me hace feliz. Los quiero mucho y también son responsables de esto.

Muchas gracias a ustedes, mis queridos amigos de la facultad de Química, del conjunto "E" y del laboratorio de Desarrollo en Plantas, que siempre me ayudaron con cariño y paciencia. Nunca los olvidaré.

Y, a ti, que compartiste y viviste junto a mí toda esta etapa universitaria. Que sabías de mis desvelos y preocupaciones. Quien me ayudó a ser mejor cada día y nunca se rindió...

te amo y quiero agradecerte por todo Francisco S. R.

A

**“ Nunca te envanezcas de los frutos de tu
inteligencia pues sólo eres dueño del
esfuerzo que pusiste en su cultivo, de lo
que logra, nada más eres un espectador.
La inteligencia es como una flecha, una vez
que se aleja del arco, ya no la gobierna
nadie. Su vuelo depende de tu fuerza, pero
también del viento y...
¿Por qué no decirlo?
del destino que camina detrás de ella. ”**

Canek.

INDICE GENERAL

Página

1. Resumen	1
2. Antecedentes	3
2.1 Reproducción sexual en Angiospermas	3
2.2 Órganos reproductores	5
2.2.1 Estambre	5
2.2.2 Pistilo	7
(i) Desarrollo del pistilo	7
(ii) Formación del estilo	7
(iii) Estigma	8
(iii.a) Exudado estigmático	9
(iv) Estilo	10
(iv.a) Tejido de transmisión	11
(iv.b) Matriz extracelular del tejido de transmisión	12
2.3 Polinización (interacciones polen-pistilo)	13
2.3.1 Adhesión del grano de polen	13
2.3.2 Hidratación del grano de polen	13
2.3.3 Activación del grano de polen	14
(i) Crecimiento del tubo polínico	15
(ii) Pared del tubo polínico	16
2.4 Glicoproteínas ricas en hidroxiprolinas (HRGPs) en tejidos reproductivos	16
2.5 Sistemas de autoincompatibilidad (AI) en Angiospermas	20
2.6 El sistema de autoincompatibilidad (AI) en Solanáceas y los genes modificadores	22
2.7 Glicoproteínas ricas en hidroxiprolinas (HRGPs) en la MEC del tejido de transmisión	23
2.8 Estructura y función de las tiorredoxinas en las células vegetales	27
3. Antecedentes inmediatos	36
Hipótesis	37
Objetivo general	38
Objetivos particulares	38

Indice general

	Página
4. Material y métodos-----	39
4.1 Obtención de extractos de proteínas totales de diferentes órganos de <i>Nicotiana alata</i> -----	39
4.2 Cuantificación de proteínas-----	40
4.3 Inmunodetección por western-blot de la NaTrxh en extractos de proteínas totales de diferentes órganos de <i>N. alata</i> -----	41
4.4 Diseño de un péptido tomando como patrón la región amino terminal de la NaTrxh inferida a partir del cDNA-NaTrxh-----	43
4.5 Obtención de anticuerpos contra el péptido diseñado acoplado a hemocianina-----	44
4.6 Sobreexpresión del cDNA-NaTrxh en <i>E. coli</i> -----	46
4.7 Purificación de la proteína de fusión obtenida después de la sobreexpresión-----	48
4.8 Montaje de la columna Affigel-10/NaTrxh para la purificación de los anticuerpos anti-NaTrxh y anti-péptido por cromatografía de afinidad-----	49
4.9 Purificación de IgG's con la columna de proteína A-agarosa -----	50
4.10 Purificación de los anticuerpos anti-NaTrxh y anti-péptido con la columna de Affigel-10/NaTrxh-----	51
4.11 Obtención de cortes histológicos de diferentes órganos de <i>N. alata</i> -----	52
4.12 Inmunolocalización de la NaTrxh en diferentes órganos de <i>N. alata</i> con el sistema DAKO LSAB-peroxidasa-----	53
4.13 Inmunolocalización de la NaTrxh en diferentes tejidos del estilo de <i>N. alata</i> con el sistema DAKO FITC-anticonejo-----	55
4.14 Pruebas histoquímicas-----	57
5. Resultados y discusión-----	59
6. Discusión general-----	79
7. Conclusiones-----	81
Perspectivas-----	81
8. Bibliografía-----	82
Apéndice-----	89

INDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Flores de <i>N. alata</i> donde se observan los cuatro verticilos Florales-----	3
Figura 2. Órganos reproductivos de la flor de <i>N. alata</i> -----	3
Figura 3. Corte transversal de una antera típica de <i>N. alata</i> -----	5
Figura 4. Tejidos que forman la pared de una antera de <i>N. alata</i> -----	6
Figura 5. Vista en planta y corte longitudinal del estigma de <i>N. alata</i> -----	8
Figura 6. Corte transversal del estilo de <i>N. alata</i> -----	11
Figura 7. Región del tubo polínico en crecimiento-----	15
Figura 8. Sistemas de Autoincompatibilidad homomórficos en Solanáceas-----	21
Figura 9. Características de la estructura primaria de las glicoproteínas ricas en hidroxiprolinas (HRGPs) presentes en la matriz extracelular del estilo de <i>N. alata</i> y <i>N. tabacum</i> -----	25
Figura 10. Secuencia de nucleótidos del cDNA PELP-1 y su secuencia aminoacídica deducida-----	26
Figura 11. Regulación del estado redox de proteínas por el sistema de la Tiorredoxina -----	28
Figura 12. Esquema de la actividad redox en el sistema de la Tiorredoxina -----	29
Figura 13. Mecanismo de reducción de proteínas blanco por la Tiorredoxina-----	30
Figura 14. Estructura tridimensional de la Tiorredoxina de <i>E. coli</i> -----	31
Figura 15. Separación electroforética por SDS-PAGE al 12.5% de los extractos proteínas totales de diferentes órganos de <i>N. alata</i> -----	59
Figura 16. Inmunodetección por western-blot de la NaTrxh en extractos de proteínas totales de diferentes órganos de <i>N. alata</i> con los anticuerpos anti-NaTrxh sin purificar-----	60

Índice de figuras

Página

Figura 17. Perfil de hidrofiliidad de la NaTrxh inferida del cDNA–NaTrxh-----	61
Figura 18. Alineamiento múltiple a nivel de aminoácidos de diferentes secuencias de tiorredoxinas con la NaTrxh inferida a partir del cDNA–NaTrxh (programa Vector NTI Suite 5.5)-----	62
Figura 19. Inmunodetección por western-blot de la NaTrxh con suero preimmune y los anticuerpos anti-péptido en extractos de proteínas totales de estilo y antera de <i>N. alata</i> y con la NaTrxh recombinante para determinar su título-----	63
Figura 20. Mapa del vector de expresión pGEX donde se muestra el sitio múltiple de clonación con los diferentes sitios de restricción, el sitio de restricción con trombina y el gen marcador de resistencia a ampicilina-----	46
Figura 21. Análisis electroforético por SDS-PAGE al 12.5% de las fracciones de purificación de la proteína de fusión (GST–NaTrxh) después de la sobreexpresión del cDNA–NaTrxh-----	64
Figura 22. Comparación de los perfiles de elusión de los anticuerpos anti-NaTrxh purificados con dos columnas (proteína A–agarosa + Affigel-10/NaTrxh) y los anticuerpos anti-NaTrxh y anti-péptido purificados sólo con Affigel-10/NaTrxh-----	67
Figura 23. Inmunodetección por western-blot de la NaTrxh en extractos proteínas totales de diferentes órganos de <i>N. alata</i> con los anticuerpos anti-NaTrxh sin purificar y con los anticuerpos anti-NaTrxh purificados por dos columnas-----	69
Figura 24. Inmunodetección por western-blot de la NaTrxh en extractos de proteínas totales de diferentes órganos de <i>N. alata</i> con los anticuerpos anti-péptido y anti-NaTrxh, ambos purificados sólo con la columna de Affigel-10/NaTrxh-----	69
Figura 25. Inmunodetección por western-blot de la NaTrxh con diferentes cantidades de la NaTrxh recombinante (de 25ng hasta 2 µg) utilizando los anticuerpos anti-NaTrxh y anti-péptido, ambos purificados con la columna de Affigel-10/NaTrxh-----	70
Figura 26. Inmunolocalización (DAKO–LSAB) de la NaTrxh en cortes longitudinales de pistilo de <i>N. alata</i> con los anticuerpos anti-NaTrxh sin purificar y con suero preimmune-----	71

Indice de figuras

Página

Figura 27. Inmunolocalización (DAKO—LSAB) de la NaTrxh en cortes transversales y longitudinales de diferentes órganos de <i>N. alata</i> con los anticuerpos anti-NaTrxh sin purificar-----	72
Figura 28. Inmunolocalización (DAKO—LSAB) de la NaTrxh en cortes longitudinales del estilo de <i>N. alata</i> con los anticuerpos anti-NaTrxh purificados con una y dos columnas-----	73
Figura 29. Inmunolocalización (DAKO—FITC) de la S ₁₀₅ -RNasa en cortes longitudinales del estilo de <i>N. alata</i> con anticuerpos anti- S ₁₀₅ RNasa-----	75
Figura 30. Inmunolocalización (DAKO—FITC) de la proteína NaTTS en cortes longitudinales del estilo de <i>N. alata</i> con anticuerpos anti-NaTTS-----	76
Figura 31. Inmunolocalización (DAKO—FITC) de la NaTrxh en cortes longitudinales del estilo de <i>N. alata</i> con anticuerpos anti-NaTrxh purificados con la columna de Affigel-10/NaTrxh y con suero preinmune-----	76
Figura 32. Inmunolocalización (DAKO—FITC) de la NaTrxh con los anticuerpos anti-NaTrxh purificados con la columna de Affigel-10/NaTrxh. Acercamientos hacia el cortex y el tejido de transmisión del estilo de <i>N. alata</i> -----	77
Figura 33. Pruebas histoquímicas (técnica APS y azul-negro de naftol) en cortes longitudinales del estilo y en tejido estilar disecado (técnica con lugol) de <i>N. alata</i> -----	78

INDICE DE TABLAS

Página

Tabla 1. Funciones de las células y tejidos de la antera de <i>N. tabacum</i> -----	6
Tabla 2. Clasificación de los tipos de estigma en Angiospermas (Heslop-Harrison y Shivanna, 1977) -----	9
Tabla 3. Características de las glicoproteínas ricas en Hidroxiprolinas (HRGPs) -----	19
Tabla 4. Curva patrón con Albúmina Sérica Bovina (ASB) -----	40
Tabla 5. Cuantificación, por el método de Bradford, de los extractos de proteínas totales de diferentes órganos de <i>N. alata</i> -----	41
Tabla 6. Purificación de los anticuerpos anti-NaTrxh con la columna de proteína A–agarosa -----	65
Tabla 7. Purificación de los anticuerpos anti-NaTrxh con dos columnas (columna de proteína A–agarosa y Affigel-10/NaTrxh) y sólo con la columna de Affigel-10/NaTrxh -----	66
Tabla 8. Purificación de los anticuerpos anti-péptido (extraídos de la segunda muestra sanguínea y de la punción cardiaca) con la columna de Affigel-10/NaTrxh -----	68

Abreviaturas

ASB -----	Albúmina sérica bovina
A_{595nm} -----	Absorbencia a una longitud de onda de 595 nm
A_{280nm} o D.O._{280nm} ---	Absorbencia o densidad óptica a una longitud de onda de 280 nm
SDS-PAGE -----	Electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizante
NaTrxh -----	Tiorredoxina de tipo h de <i>Nicotiana alata</i>
AFLP -----	Amplificación de fragmentos polimórficos en longitud
GST -----	Glutación-S-transferasa
DAKO -----	Marca del equipo para Inmunolocalización
LSAB -----	Reactivos marcados con estreptavidina y biotina
FITC -----	Isotiocianato de fluoresceína
PRP4 o NaTTS ----	Proteína rica en prolina 4 o proteína específica del tejido transmisión del estilo de <i>N. alata</i>
APS -----	Acido peryódico—reactivo de Schiff
PBS 1X -----	Buffer o amortiguador de fosfatos una vez concentrado
MBS -----	Ester de m-maleimidobenzoil-N-hidroxisuccinimida
KLH -----	Hemocianina de la lapa "ojo de cerradura" (molusco marino)
i.m. -----	Intra muscular
M1 -----	Primera muestra sanguínea
M2 -----	Segunda muestra sanguínea
IgG's -----	Inmunoglobulinas tipo G
2xYTA -----	Nombre del medio para cultivo de bacterias con triptona y extracto de levadura

Abreviaturas

IPTG -----	Isopropiltiogalactósido
Affigel-10/NaTrxh --	Columna de agarosa con brazo espaciador de 10 átomos de carbono que tiene como ligando a la NaTrxh recombinante
HRP -----	Horseradish peroxidase (peroxidasa de rábano)
SP -----	Suero preinmune
DAB -----	Cromógeno 3, 3'- diaminobenzidina
AI -----	Auto-incompatibilidad
AC -----	Auto-compatibilidad
KDa -----	Kilo Daltones
CELP -----	Proteínas tipo-extensina ricas en cisteínas
PELP III -----	Proteínas tipo-extensina del pistilo III
p120 -----	Glicoproteína rica en hidroxiprolinas de 120 KDa
FS -----	Fase soluble del sonicado bacteriano
ET -----	Eluato con trombina
EGR -----	Eluato con glutatión reducido
Fc -----	Fragmento cristalizante
MEC -----	Matriz extracelular
HRGP -----	Glicoproteínas ricas en hidroxiprolinas
AGP -----	Glicoproteínas ricas en arabinogalactanos
RE -----	Reticulo endoplasmático
ME -----	Microscopía electrónica

PAGINACIÓN DISCONTINUA

1. Resumen

En las Angiospermas, específicamente en las Solanáceas, existe un sistema genético de reconocimiento específico del polen conocido como sistema de **Autoincompatibilidad (AI)**, el cual, ayuda a promover la polinización cruzada. Este mecanismo es importante para que las plantas descendientes tengan un mayor grado de adaptación y se logre conservar o mejorar su especie.

La autoincompatibilidad se define como "la incapacidad, de una planta fértil hermafrodita, para producir cigotos después de la autofecundación" (de Nettancourt, 1977) y está controlada por un locus multialélico denominado *locus S*, que determina la especificidad de la reacción entre el grano de polen y el pistilo.

El producto del *locus S*, en el estilo de las Solanáceas, es una glicoproteína de alrededor de 30 KDa con actividad de ribonucleasa, la cual, es conocida como S-RNasa (McClure *et al.*, 1989). En general, las S-RNasas poseen de 8 a 10 residuos de cisteína, de los cuales, 8 están involucrados en la formación de cuatro puentes disulfuro (Oxley y Bacic, 1996).

Las S-RNasas se secretan hacia la matriz extracelular del tejido de transmisión (TT) del estilo, sitio por el cual el tubo polínico crece en dirección al ovario.

En el estilo, las S-RNasas tienen un efecto citotóxico sobre los tubos polínicos producto de granos de polen de la misma planta.

En la matriz extracelular del tejido de transmisión del estilo, además de las S-RNasas, existen otras glicoproteínas ricas en residuos de cisteína que son importantes para el desarrollo del tubo polínico; ejemplos de estas son: CELP, PELP III, NaTTS y p120 (Cheung *et al.*, 2001).

Aunque se sabe que, las S-RNasas son las determinantes genéticas femeninas que controlan el rechazo del polen alelo S específico, se requiere de otros factores conocidos como **genes modificadores** para que desencadenen el rechazo del polen propio (McClure *et al.*, 2000).

Buscando estos factores, en nuestro laboratorio se clonó un gen que se expresa mayormente en plantas AI de *Nicotiana glauca* que en plantas AC (*N. plumbaginifolia*). Este gen codifica un marco de lectura abierto para una proteína de 16.8 KDa, el cual, incluye un dominio de tiorredoxina.

Sabemos que esta **tiorredoxina** de *Nicotiana glauca* es de tipo h (**NaTrxh**) y se expresa en toda la planta. Además, existe evidencia bioquímica, de que la NaTrxh se encuentra en la fracción soluble de la matriz extracelular del tejido del estilo donde también se encuentran las proteínas NaTTS, p120, PELP III, CELP y las S-RNasas, todas proteínas ricas en cisteínas.

Dado que el gen de la NaTrxh fue clonado del estilo y, aquí podría ser el producto de un gen modificador, un aspecto importante a conocer es si esta proteína se localiza en el TT del estilo, el sitio donde se lleva a cabo la discriminación del tubo polínico.

El objetivo de este trabajo fue conocer la distribución tisular de la NaTrxh en el estilo de *N. alata*.

Para cubrir este objetivo se produjeron y purificaron anticuerpos policlonales contra esta proteína.

Los anticuerpos obtenidos fueron purificados por cromatografía de afinidad a través de una columna de Affigel donde el ligando fue la NaTrxh recombinante y, la calidad de los mismos, fue evaluada por western-blot.

Los anticuerpos anti-NaTrxh purificados fueron utilizados para los estudios de inmunolocalización que se realizaron en cortes longitudinales (6 μ m) de estilos de *N. alata* y la inmunodetección se realizó utilizando microscopía de fluorescencia.

Los resultados obtenidos señalan que la NaTrxh se localiza mayoritariamente en el tejido de transmisión del estilo, junto con la S₁₀₅-RNasa y la proteína NaTTS.

2. Antecedentes

2.1 Reproducción sexual en Angiospermas

Las Angiospermas son con mucho las más extendidas y diversas de todas las plantas; constituyen la vegetación dominante de la tierra y son, junto con las Gimnospermas, las de mayor importancia para el ser humano.

Entre las características atribuidas a su extensión ecológica están su capacidad para reproducirse sexualmente y que poseen una estructura de reproducción sexual única, la flor (Raghavan *et al.*, 1997).

Numerosas adaptaciones se necesitaron para lograr el actual dominio de las angiospermas y no es de sorprender que varias de éstas estén relacionadas específicamente con la parte femenina de la flor (Gasser Charles y Robinson-Beers, 1993).

Los cuatro verticilos producidos por el meristemo floral son: los sépalos (más externos), pétalos, estambres y carpelos (pistilo) (figura 1), todos determinados de acuerdo a las características genéticas de cada especie (Goldberg Robert *et al.*, 1993).

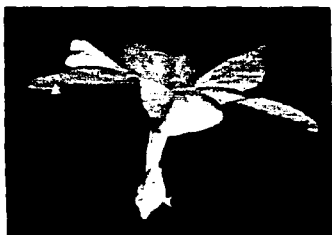


Figura 1. Flores de *N. alata* donde se observan los cuatro verticilos florales.

Las partes estériles de la flor son: los sépalos generalmente de color verde que cubren el botón antes de que este abra y los pétalos de colores brillantes que sirven para atraer insectos y otros polinizadores.

Los órganos que participan en la reproducción sexual son: a) los estambres que a su vez están constituidos por antera y filamento, representando la parte masculina y, b) el carpelo o pistilo, formado por estigma, estilo y ovario que constituyen la parte femenina. Estos órganos pueden observarse en la figura 2.

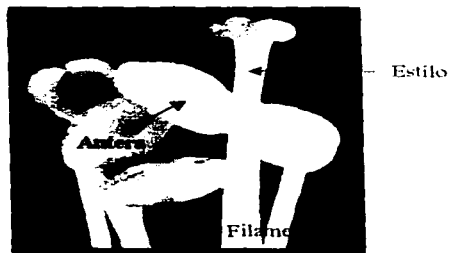


Figura 2. Órganos reproductivos de *N. alata*.

En la antera, las microsporas o granos de polen se forman en el esporangio por una división meiótica a partir de los microsporocitos diploides (célula madre). El siguiente paso en la diferenciación del grano de polen es la formación de una célula vegetativa grande y una célula generativa pequeña. Al tiempo que estos cambios ocurren dentro del grano de polen, se forman dos capas de pared en éste, la capa externa (exina) y la entina. El paso final de esta diferenciación es la división de la célula generativa para formar dos células espermáticas. El grano de polen maduro, que contiene los dos espermatozoides, constituye el gametofito masculino; el complejo de la célula vegetativa y las dos espermáticas es conocido como la unidad germinativa masculina (Raghavan *et al.*, 1997).

De manera paralela al desarrollo del gametofito masculino, se lleva a cabo, la formación del gametofito femenino en el óvulo (contenido en el ovario). Dentro de cada óvulo, la célula madre de la megaspora se diferencia por una primera división nuclear (meiosis) para formar cuatro megasporas haploides. Tres de estas células se desintegran y la que sobrevive forma el saco embrionario. Como resultado de tres divisiones mitóticas del núcleo de la megaspora que sobrevivió seguida de la formación de pared, el saco embrionario maduro comienza a englobar seis células haploides que son: un huevo, dos sinérgidas y tres antipodales. Todas estas células presentan dos núcleos haploides libres dentro del saco embrionario, que se fusionan para formar un núcleo diploide polar, ahora confinado a la parte remanente del saco embrionario denominada como célula central. El saco embrionario maduro está formado por siete células que representan el gametofito femenino. El huevo y el núcleo polar fusionado persisten en el saco embrionario, mientras que las sinérgidas y antipodales tienen una existencia transitoria. En analogía con la unidad germinativa masculina, el huevo, sinérgidas y la célula central se designan colectivamente como la unidad germinativa femenina (Raghavan *et al.*, 1997).

La fecundación del huevo es precedida por la transferencia de los granos de polen de las anteras de una flor a la superficie estigmática de otra flor, ya sea en la misma planta o una diferente y, la subsecuente germinación de los granos de polen.

Durante la germinación, el grano de polen desarrolla el tubo polínico, el cual, crece a través del estigma, estilo y tejido del ovario hasta el saco embrionario donde descarga las células espermáticas quedando el óvulo fecundado.

La "Doble Fecundación" en las Angiospermas es un proceso único que no se presenta en otras divisiones del reino vegetal.

Esta ocurre cuando un espermatozoides se fusiona con un huevo y un segundo espermatozoides se fusiona con el núcleo polar. Los dos eventos de fusión dan como resultado la formación de un cigoto diploide y un núcleo endospermico primario triploide, respectivamente (Raghavan *et al.*, 1997).

El cigoto es la primera célula de generación esporofítica. Este despliega un estallido de actividad mitótica dentro del saco embrionario, en donde el núcleo endospermico primario se diferencia en un tejido nutritivo conocido como endospermo.

A nivel celular, durante el crecimiento del endospermo y las partes del embrión, se almacenan grandes cantidades de nutrientes como carbohidratos, proteínas y grasas. El óvulo, que contiene el embrión en desarrollo y el endospermo, se transforma en semilla contenida en el ovario.

La semilla madura es el enlace entre la generación gametofítica y la futura generación esporofítica de la planta. El embrión tiene la capacidad de mantenerse inactivo metabólicamente en momentos desfavorables y de reactivarse para la formación de una planta que en la madurez dará flores y semillas, con lo que se conserva el ciclo de vida.

2.1 Órganos Reproductores

2. 2.1) Estambre

El proceso reproductivo masculino en las Angiospermas se lleva a cabo en el estambre, el cual, está constituido morfológicamente por la antera y el filamento (figura 2). El filamento es un tubo de tejido vascular que ancla el estambre a la flor y sirve como conducto de agua y nutrientes. En cambio la antera, contiene los tejidos reproductivos y no reproductivos responsables de la producción y liberación del grano de polen (Goldberg Robert *et al.*, 1993).

Una antera típica es un órgano con dos lóbulos dentro de los cuales están dos lóculos o microesporangios. En el centro de los lóbulos se encuentra el tejido conectivo en el que está embebido el tejido vascular, como se observa en la figura 3.

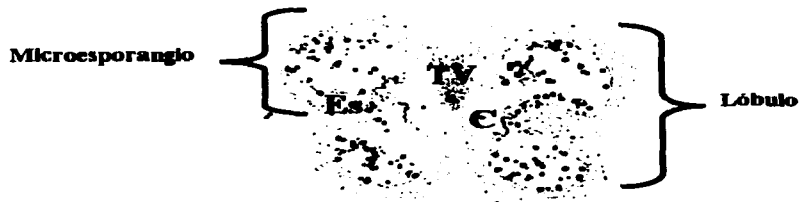


Figura 3. Corte transversal de una antera típica de *N. alata*. (C) tejido conectivo, (TV) tejido vascular, (Es) estomio.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

El desarrollo de la antera se divide en dos fases generales: durante la primera se establece su morfología, ocurre la diferenciación de células y tejidos y la célula madre de la microspora sufre una división meiótica. Al final de esta fase, la antera posee células y tejidos especializados (figura 4) y las tétradas de las microsporas están presentes en cada saco polínico. Estos tejidos son responsables de funciones reproductivas (formación de la microspora y el grano de polen) y no reproductivas (soporte y ruptura de la pared de la antera) (tabla 1).

Tabla 1. Funciones de las células y tejidos de la antera de *Nicotiana tabacum*

Tipo de célula o tejido	Función principal
Tejido conectivo	Estructura, soporte y morfología; unir las tecas de la antera y unir la antera al filamento
Grupo de células circulares	Dehiscencia = Ruptura de la antera
Endotecio	Estructura y soporte; ruptura de la antera
Epidermis	Estructura y soporte; previene la pérdida de agua; intercambio de gases y ruptura de la antera
Microspora	Desarrollo del grano de polen y las células espermáticas
Capa media	Estructura y soporte; ruptura de la antera
Estomio	Ruptura de la antera
Tapete	Da lugar a los componentes de la pared del grano de polen; proporciona nutrientes para el desarrollo del polen; enzimas para la liberación de la microspora de las tétradas
Tejido vascular	Comunica la antera y el filamento con la flor; suministro de agua y nutrientes

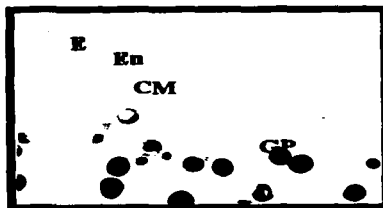


Figura 4. Tejidos que forman la pared de una antera de *N. glauca*. (E) epidermis, (En) endotecio, (CM) capas medias y (GP) grano de polen.

En la fase dos, el grano de polen se diferencia, la antera se alarga por la elongación del filamento; después degeneran los tejidos y la antera se rompe (dehiscencia) liberando los granos de polen (Goldberg Robert *et al.*, 1993).

Después de las fases de desarrollo de la antera y un programa complejo de histodiferenciación, sigue la degradación celular y el programa de dehiscencia que lleva a la liberación de los granos de polen. El programa de deceso comienza después de la formación de las tétradas y da como resultado la destrucción secuencial de tipos específicos de células; está coordinado temporalmente con el proceso de diferenciación del grano de polen. En las plantas de tabaco, la degradación de tejidos y la dehiscencia involucra tres tipos principales de células, éstas incluyen las del estomio, endotecio y el grupo de células circulares (figura 3).

2.2.2) Pistilo

(i) Desarrollo del pistilo

Las partes femeninas de la flor en conjunto se denominan gineceo, el cual consiste de una o más unidades conocidas como carpelos y a las que se anclan los óvulos.

El término pistilo se utiliza para describir la parte femenina de la flor. Este se refiere a un solo carpelo, cuando los carpelos individuales del gineceo están separados (pistilos simples), o a una estructura formada por la fusión de múltiples carpelos (pistilo compuesto). Así, el gineceo puede estar compuesto por uno o más pistilos (Gasser y Robinson-Beers, 1993).

Los pistilos muestran características estructurales en común, por ejemplo en la antesis están formados por: (a) el ovario en la base que contiene los óvulos, (b) el estilo que se extiende a partir del ovario y a través del cual crece el tubo polínico hacia el ovario y (c) el estigma en la parte superior del estilo, sitio donde los granos de polen se adhieren y germinan (Esaú, 1965).

(ii) Formación del estilo

Casi en el momento en el que el ovario se cierra, el tejido de la parte superior del ovario comienza a extenderse verticalmente para formar el estilo, esto se lleva a cabo por la combinación de división y elongación celular. El tamaño y estructura del estilo son muy variables. En algunas especies se forma un solo estilo, mientras que en otras, cada carpelo puede formar un estilo si aún no se han fusionado formando un solo ovario. El propósito de la extensión estilar es el facilitar una polinización apropiada. La gran variedad de formas y tamaños del estilo reflejan las estrategias de polinización que poseen las Angiospermas (Gasser y Robinson-Beers, 1993).

(i) Estigma

Se define operacionalmente como la parte del carpelo o pistilo que capta el grano de polen y cuyas células responden al arribo de éste (Raghavan *et al.*, 1997).

Está compuesto por dos lóbulos estigmáticos; asociado a cada lóbulo hay un haz de tejido vascular y un tejido especializado análogo al tejido de transmisión del estilo, por el cual, crece el tubo polínico (figura 5) (Heslop-Harrison y Reger, 1984).

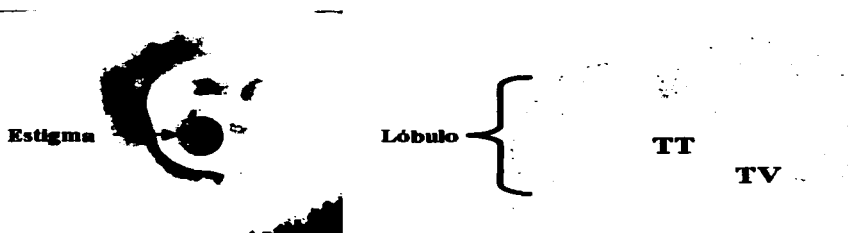


Figura 5. Vista en planta y corte longitudinal del estigma de *N. alata*. (TV) tejido vascular, (TT) tejido de transmisión.

Las células en la superficie del estigma tienen una naturaleza glandular y son frecuentemente elongadas en forma de papilas uni o multicelulares (Raghavan *et al.*, 1997).

Existen algunas diferencias en la cantidad de secreción glandular que cubre la superficie de las células receptoras maduras. Así, se han separado especies en las que la superficie receptiva está libre de secreciones, designadas como estigma seco, de aquellas en las que su superficie está llena de secreción, las cuales, se dice que poseen un estigma húmedo (tabla 2) (Heslop-Harrison y Shivanna, 1977).

La superficie estigmática posee una capa de carácter proteico y lipóide denominada película (los autores se refieren a ésta como "pellicle"), que tiene funciones importantes como: soporte, para facilitar la captura e hidratación de los granos de polen y una función dinámica como sitio de reconocimiento durante las interacciones polen-estigma (Mattsson *et al.*, 1974). La naturaleza química de éste es compleja pues está constituida por proteínas, glicoproteínas y glicolípidos (Clarke *et al.*, 1979). Los dos últimos son los constituyentes mayoritarios en la matriz superficial y contienen monosacáridos como galactosa, arabinosa, glucosa, manosa y ramnosa.

La organización química de esta película determina el por qué sirve para interaccionar con sustancias complementarias en el grano de polen durante los eventos de reconocimiento.

Tabla 2. Clasificación de los tipos de estigma en angiospermas (Heslop-Harrison y Shivanna, 1977).

Tipo de estigma	Grupo	Descripción	Familia representativa
Seco	I	Con células receptoras dispersas en ramificaciones	Poaceae
	II	Células receptoras concentradas en distintas áreas	Poaceae
			Liliaceae
	A. Sin papilas B. Con papilas i. Papila unicelular ii. Papila multicelular (a) Uniseriada (b) Multiseriada		Agavaceae
			Amarilidaceae
			Bromeliaceae
Húmedo	III	Superficie receptiva con pocas papilas; secreción en el espacio intersticial	Apocianaceae
	IV	Superficie receptiva sin papilas; mayor secreción que el grupo III	Rubiaceae

En resumen, las células estigmáticas constituyen una superficie especializada para la captura del grano de polen y para facilitar su germinación.

La naturaleza de las células estigmáticas, que pueden ser papilares o no, la disposición de las papilas que puede ser dispersa o concentrada, la características de la papila que puede ser uni o multicelular, la textura de la pared de las células estigmáticas, incluida la cutícula y la presencia de la película ("pellicle"), contribuyen de varias formas a la adhesión de los granos de polen y proveen el medio para su germinación (Raghavan *et al.*, 1997).

(iii. a) Exudado estigmático

Es un exudado formado sobre la papila estigmática que constituye el medio, en el cual, el grano de polen germina. Es secretado por células subepidérmicas modificadas del estigma. La secreción generalmente comienza antes de la anthesis y aumenta notablemente después de la polinización (Kandasamy y Kristen, 1987). Inicialmente, el exudado se acumula en el espacio intercelular, que después se transformará en largas y continuas cavidades llenas de éste.

Los productos de secreción son inicialmente depositados como pequeñas gotas en el espacio intercelular formando una eficiente centro de comunicación entre la papila estigmática con el exterior y el interior del estilo, esto es, con el tejido de transmisión (Dumas *et al.*, 1978).

El proceso de secreción involucra los siguientes pasos: a) una fase de síntesis por parte de organelos específicos de las células papilares, b) su transporte a la vecindad de la membrana plasmática y c) la salida de los productos terminados (Raghavan *et al.*, 1997). Los lípidos, compuestos fenólicos, carbohidratos, aminoácidos y proteínas están generalmente presentes en el exudado (Weber, 1994).

En el estigma de *Nicotiana glauca* los arabinogalactanos representan el 65% de los carbohidratos de alto peso molecular del exudado (Gell, Bacic y Clarke, 1986).

El exudado estigmático resulta esencial prácticamente para todos los eventos durante la polinización. Existe una gran evidencia que indica que después de la polinización las moléculas del exudado se unen complementariamente con moléculas del grano de polen en reacciones de reconocimiento.

Los carbohidratos probablemente ayudan en la germinación del polen; los lípidos facilitan la captura del grano de polen, funcionando esencialmente como una goma que los adhiere y une a la superficie del estigma, también protegen la superficie estigmática de la desecación. Los compuestos fenólicos tienen el poder de proteger al estigma de microbios y promueven o inhiben selectivamente la germinación del polen (Raghavan *et al.*, 1997).

(iv) Estilo

Este comunica al estigma con el ovario y representa la parte floral que facilita el crecimiento dirigido del tubo polínico hacia el ovario y el óvulo (Raghavan *et al.*, 1997).

El estilo debe su función especializada a la presencia de células que proveen nutrientes al tubo polínico.

Las modificaciones estructurales durante su ontogenia dan como resultado dos tipos de estilos: I) el sólido o cerrado y II) el hueco o abierto. La zona esencial del estilo a través, de la cual, el tubo polínico crece es un centro nutritivo de células glandulares conocido como tejido de transmisión.

En el estilo hueco el tejido de transmisión forma un canal con una o más capas de células que lo delimitan. Este canal está lleno de secreción mucilaginoso que sirve como medio por el que crece el tubo polínico (Raghavan *et al.*, 1997).

Topográficamente el estilo es un sistema de tejidos comprendidos por: la epidermis, el cortex, el tejido de transmisión y el tejido vascular (figura 6) (Raghavan *et al.*, 1997).

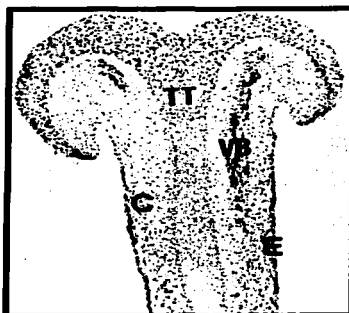


Figura 6. Corte transversal del estilo de *N. glauca*. (TT) tejido de transmisión, (VB) tejido vascular, (C) cortex, (E) epidermis.

(iv. a) Tejido de transmisión

Las células del tejido de transmisión son generalmente elongadas y fusiformes en dirección axial en las Solanáceas (Sedgley y Clarke, 1986).

Estudios químicos demuestran que la pared de estas células en *Nicotiana glauca*, tiene la estructura primaria de la pared de las células de los dicotiledones conteniendo: celulosa, xiloglucanos y polisacáridos pectídicos, pero con la presencia de porciones elevadas e inusuales de arabinogalactanos que la apartan de las paredes primarias típicas (Gane *et al.*, 1994).

Estas células tienen una función dual ya que pueden dividirse para generar nuevas células y también separarse para formar espacios intercelulares conspicuos que posteriormente se llenan con productos de secreción estilar.

Las células del tejido de transmisión son metabólicamente activas y están ampliamente dotadas con ribosomas, mitocondrias, RE rugoso, dictiosomas activos y amiloplastos (Sedgley y Clarke, 1986).

Los productos de secreción que ocupan el espacio intercelular en el tejido de transmisión en conjunto se conocen como matriz extracelular (MEC). Estos generalmente son: carbohidratos, proteínas, lípidos, polisacáridos, pectinas, compuestos fenólicos, taninos y, algunas veces, hay enzimas como las esterasas, fosfatasa ácida, peroxidasa y glucosa-6-fosfatasa.

La mayoría de los carbohidratos identificados en extractos estilares son los arabinogalactanos asociados con proteínas que presentan dominios ricos en residuos de cisteína e hidroxiprolina (Anderson, Sandrin y Clarke, 1984; Hoggart y Clarke, 1984).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

La primera función presuntiva de estas proteínas con arabinogalactanos, que puede ser importante enfatizar, es la nutrición del tubo polínico durante su crecimiento en el estilo (Lind *et al.*, 1996).

Otro componente mayoritario de la matriz extracelular del tejido de transmisión de *N. alata* es una glicoproteína básica de 120 KDa (p120) rica en hidroxiprolinas. La especificidad estilar de esta proteína se estableció por la ausencia de reacciones inmunológicas cruzadas en otros órganos reproductivos o partes vegetativas de la planta. Esta propiedad de conservación de una glicoproteína en el estilo de otros miembros de la familia Solanaceae y la presencia de esta proteína en la matriz extracelular del tejido de transmisión del estilo, en el citoplasma y la pared de las células del tubo polínico, sugiere funciones estilares importantes como: la nutrición, elongación y guía del tubo polínico (Lind *et al.*, 1994, 1996).

Los estilos de una gran cantidad de especies poseen actividad de RNAsas, incluidas las de estilo sólido y hueco, pues ambos pueden presentar autocompatibilidad (AC) y autoincompatibilidad (AI). Generalmente, las especies con un estilo sólido muestran altas concentraciones de RNAsas (Schrauwen y Linskens, 1972) y, claramente, en las situaciones en las que se encuentran células con un alto contenido en este tipo de enzimas es difícil asignarles un papel de nutrición.

Se conoció entonces que las RNAsas están encargadas de detener el crecimiento del tubo polínico en las reacciones de autoincompatibilidad gametofítica, pero aún no puede asignárseles una función en las plantas autocompatibles (Roiz, Goren y Shoseyov, 1995), aunque este conflicto puede ser resuelto si se asume que las RNAsas tienen una función indirecta en la selección gametofítica en el estigma.

(iv. b) Matriz extracelular del tejido de transmisión

La matriz extracelular (MEC) se define como el continuo de superficie celular que se extiende del lado extracelular de la membrana y pared (primaria y secundaria) celulares, además del espacio entre células vecinas del tejido de transmisión.

Esta es dinámica y tiene funciones estructurales y biológicas importantes para el crecimiento y desarrollo de la flor como el proveer soporte e integridad estructural y protección. Además está involucrada en interacciones celulares (Cheung *et al.*, 2001).

Se piensa que las interacciones entre las moléculas que forman la matriz extracelular (tanto las presentes en la pared celular como las que son secretadas hacia el espacio extracelular) regulan el crecimiento del tubo polínico para que se logre con éxito la liberación de las células espermáticas en el saco embrionario y se lleve a cabo la fecundación (Cheung *et al.*, 2001).

2.3 Polinización (interacciones polen–pistilo)

En las Angiospermas el proceso reproductivo de polinización involucra una serie de interacciones entre el gameto masculino (grano de polen o tubo polínico) y la matriz extracelular (MEC) que está a lo largo del camino que recorre el tubo polínico por el órgano femenino (pistilo). Se piensa que estas interacciones regulan el crecimiento del tubo polínico para que se logre con éxito la liberación de las células espermáticas en los óvulos y se lleve a cabo la fecundación (Cheung *et al.*, 2001).

Así, el proceso de polinización no sólo se refiere a la adhesión del grano de polen a la superficie estigmática y su germinación en ese sitio, sino que también involucra una serie de interacciones entre el tubo polínico y la matriz extracelular (MEC) del tejido de transmisión a través de la cual éste crece (Cheung *et al.*, 2001).

2.3.1 Adhesión del grano de polen

Debido al hecho de que una gran variedad de granos de polen son atrapados en la superficie estigmática de la flor, el sistema sólo favorece la selección de los granos de polen compatibles. Los cambios ocurridos en los componentes del grano de polen y en la papila estigmática después de la polinización se han documentado, con lo cual, se proponen modelos para explicar, a nivel molecular, el fenómeno de reconocimiento del grano de polen (Dumas y Gaude, 1981).

En varias especies, se ha visto que la unión del grano de polen al estigma se lleva a cabo a través de una compleja mezcla de proteínas, glicoproteínas y glicolípidos. De esta forma, las moléculas en la superficie del grano de polen aparentemente son complementarias a los componentes de la superficie estigmática con lo que se produce una adhesión correcta (Clarke *et al.*, 1977, 1979).

2.3.2 Hidratación del grano de polen

La hidratación es el primer cambio observado en los granos de polen compatibles (Raghavan *et al.*, 1997).

Después del contacto con la superficie estigmática, la mayor evidencia de que el reconocimiento se ha llevado a cabo es la circulación de agua de las células estigmáticas a un grano de polen y, aunque se hayan anclado granos de polen en cadena, sólo uno de éstos es preferentemente hidratado (Sarker, Elleman y Dickinson, 1988).

Además de la gran variedad de cambios en la actividad citoplasmática (propiedades osmóticas normales) del grano de polen, la hidratación juega un papel importante en la restitución de la estructura de la membrana plasmática en la célula vegetativa (Shivanna y Heslop-Harrison, 1981).

Debido a que la hidratación es un requisito para la germinación, los cambios ocurridos durante ésta se estudian cuidadosamente.

Este interés se debe a que la absorción de agua no sólo provoca un aumento en el volumen del grano de polen, sino que además, se presentan cambios críticos en la membrana plasmática pues existen varios grados de imperfecciones en ésta cuando el grano de polen está sin hidratar, lo cual, la convierte en una barrera osmótica inadecuada. Así, la membrana plasmática de la célula vegetativa, por ejemplo, está muy colapsada hasta que comienza la hidratación con lo que paulatinamente recobra su estructura y organización (Shivanna y Heslop-Harrison, 1981).

Pueden reconocerse tres fases en la hidrodinámica del grano de polen: la primera es el paso de agua desde la papila estigmática hacia el grano de polen; este flujo incrementa el contenido de agua primeramente en la célula vegetativa. Algunos cambios sutiles se presenta en la membrana plasmática de esta célula hasta que es reformada. Al continuar el flujo de agua el grano de polen entra a su segunda fase que comienza cuando la membrana plasmática se convierte en una barrera osmótica efectiva; durante esta fase raramente el grano de polen crece hasta su tamaño límite pues comienza a perder agua y solutos por exudación a través de los poros de germinación y a través de los microporos de la capa exina. Las proteínas y otros constituyentes móviles en la pared del grano de polen son probablemente expulsados a la superficie estigmática. La tercera fase es en la que se lleva a cabo la reconstitución completa de la membrana plasmática, esto resulta crítico, pues el subsecuente flujo de agua lo determinará la osmolaridad del citoplasma de las células y, para completar esta secuencia, el grano de polen adquiere una presión hidrostática considerable, con lo cual, podrá emerger el tubo polínico.

Estos eventos no toman más de dos minutos desde el contacto del grano de polen con la papila estigmática (Vithanage y Heslop-Harrison, 1979).

2.3.3 Activación del grano de polen

La activación del polen ocurre entre la hidratación y desarrollo del tubo polínico. Esta puede ser estudiada desde diferentes perspectivas, por ejemplo durante muchos años se analizó el metabolismo respiratorio, pero en los últimos 30 años la investigación se ha centrado en los cambios citológicos (Raghavan *et al.*, 1997). A través de investigaciones con microscopía electrónica, se conoció el papel de la actina en la activación del grano de polen. Cresti y colaboradores (1986) descubrieron la presencia de numerosos cuerpos cristalinos de material fibrilar en la célula vegetativa madura y granos de polen activos de *Nicotiana tabacum*. Encontraron que durante la activación estos cuerpos fibrilares se dispersaban gradualmente. En muchas especies de plantas se ha observado un aumento selectivo en las fibras de actina hacia los sitios específicos, por los que emergerá el tubo polínico a los que se les denomina sitios de apertura o poros de germinación (Heslop-Harrison J., 1992).

Directa o indirectamente, los filamentos de actina pueden ejercer su influencia en la migración de organelos (RE, ribosomas, mitocondrias, etc.) a la vecindad del poro de germinación (sitio de apertura). Esta migración puede estar acoplada a un sistema de transporte actina-miosina, como se demostró en ensayos de inmunolocalizaciones en el poro de germinación de granos de polen hidratados de *N. tabacum* (Tirlapur *et al.*, 1995).

(i) Crecimiento del tubo polínico

Después de que el grano de polen se ha hidratado y activado comienza la etapa de germinación en la que emerge, a través del sitio de apertura, una punta semiesférica que después dará lugar al tubo polínico (figura 7). En breve, se presentan cambios como la migración de algunas mitocondrias y cuerpos lipídicos desde el grano de polen hacia el sitio donde emergerá el tubo polínico, seguido de un movimiento polarizado y rápido del citoplasma de la célula vegetativa y, finalmente, el crecimiento continua con la consecuente formación de tapones de calosa, característica típica del tubo polínico en elongación (Heslop-Harrison *Y.*, 1992).

La elongación del tubo polínico se debe al rápido crecimiento de las células de la punta y la formación de tapones de calosa, lo cual, asegura que a pesar del enorme espacio que existe, el citoplasma quede confinado en una pequeña parte del tubo, esto es, en la zona apical. Así, puede observarse en la parte distal del tubo polínico el protoplasma que fluye continuamente y la parte proximal vacía que se corta en intervalos por los tapones de calosa (Raghavan *et al.*, 1997).

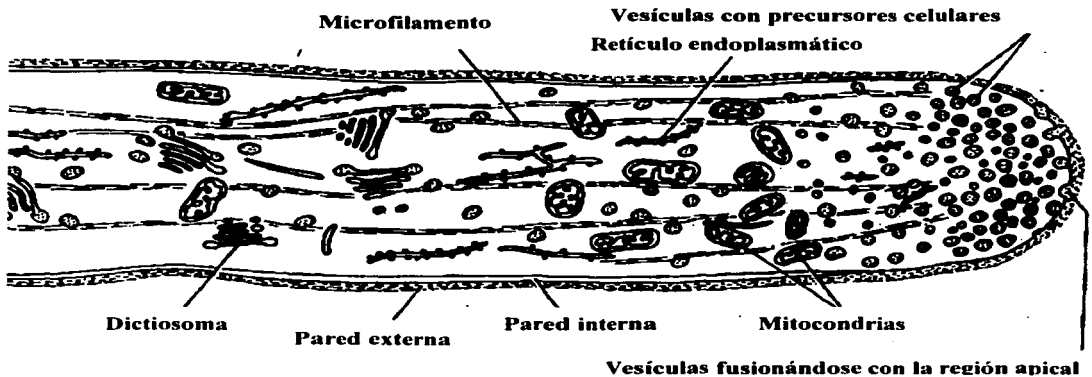


Figura 7. Región del tubo polínico en crecimiento.

El modelo de Cresti y colaboradores (1977) reconoce cuatro diferentes zonas en el tubo polínico de *Lycopersicon peruvianum*, comenzando por la parte distal se tiene: (a) una zona apical o de crecimiento enriquecida con vesículas, (b) la zona subapical poblada por organelos especialmente, (c) la zona nuclear, denominada así por la presencia de los núcleos de las células vegetativa y generativa y, (d) la zona de vacuolas separada por tapones de calosa.

El tubo polínico entra en la papila estigmática después de la lisis de la cutícula y no puede penetrarla sin la presencia de las proteínas del exudado estigmático, de hecho, se ha propuesto que el grano de polen contribuye con precursores de enzimas y que éstas se activan por factores presentes en la superficie estigmática (Heslop-Harrison, 1981).

(ii) Pared del tubo polínico

La estructura definitiva de la pared del tubo polínico puede observarse en la parte proximal y en las capas de la zona distal en crecimiento. Así, la pared de la zona proximal está constituida por una capa externa de pectina, una capa intermedia de celulosa y la capa interna de calosa, en cambio, la zona distal está libre de calosa (Anderson *et al.*, 1987).

Anderson y colaboradores (1987) localizaron, con técnicas inmunoquímicas, residuos de α -L-arabinofuranosil en la capa externa y (1,3)- β -glicano en la capa interna de la pared del tubo polínico de *Nicotiana glauca*, esto resulta consistente con la presencia de pectina y calosa en las capas externa e interna respectivamente.

El papel de la pectina es el de proveer un estado en el que se favorezca el libre paso del tubo polínico a través del estilo; esta función puede ser llevada a cabo por eventos de adhesión entre la pared del tubo polínico y las células del tejido de transmisión por interacciones específicas que involucran a las pectinas y moléculas de secreción como los arabinogalactanos (Jauh y Lord, 1996). Esto también sirve para enfatizar el hecho de que, durante el crecimiento del tubo polínico a través del estilo, se presentan una gran variedad de interacciones celulares.

También, hay evidencias sobre la presencia de proteínas con arabinogalactanos en la capa de calosa en la vecindad con la membrana plasmática del tubo polínico de *N. tabacum* (Reynolds y Dashek, 1976) y, además, se han encontrado glicoproteínas ricas en hidroxiprolinas (HRGPs) (Li *et al.*, 1983).

2.4 Glicoproteínas ricas en hidroxiprolinas (HRGPs) en tejidos reproductivos

Tanto en la pared de las células del tejido de transmisión como en sus productos de secreción, existen componentes proteicos diversos, de los cuales, los más caracterizados son las glicoproteínas ricas en hidroxiprolinas o HRGPs (tabla 3) (Showalter, 1993).

Estas se han clasificado en cuatro grandes grupos:

- I. Proteínas ricas en prolina (PRP)
- II. Lectinas de Solanáceas (LS)
- III. Proteínas tipo extensina
 - del pistilo (PELP)
 - ricas en cisteínas (CELP)
- IV. Proteínas ricas en arabinogalactanos (AGP)
 - específicas del tejido de transmisión estilar (TTS)

I. Proteínas ricas en prolina (PRP)

Estas proteínas se caracterizan por tener unidades repetidas de prolina, por ejemplo, muchas presentan pentapéptidos repetidos con la siguiente secuencia: Pro-Pro-X-Y-Lys, donde X y Y pueden ser valina, tirosina, histidina y ácido glutámico. Algunas PRP están escasamente glicosiladas y contienen cantidades equimolares de residuos de prolina e hidroxiprolina. Además, los análisis de su secuencia de aminoácidos muestran que la hidroxiprolina sólo se presenta en la segunda posición del pentapéptido Pro-Hyp-X-Y-Lys o en la segunda y tercera posición (Pro-Hyp-Hyp-X-Y-Lys) y (Pro-Pro-Hyp-X-Y-Lys).

Al igual que las extensinas, las PRP son insolubles, este proceso de insolubilización puede ocurrir rápidamente en respuesta al estrés mediado por la liberación de peróxido de hidrógeno. Son proteínas básicas por su alto contenido en lisina y, por lo tanto, pueden solubilizarse un poco en presencia de sales (Showalter, 1993).

En 1992 se caracterizó el primer gen de una PRP en monocotiledóneas. Este gen del maíz codifica para una proteína con un dominio rico en prolina hacia el extremo amino, mostrando también una serie de motivos como (Pro-Pro-Tyr-Val) y (Pro-Pro-Arg-Pro-Ser); mientras que en la región carboxilo terminal se ubica un dominio hidrofóbico rico en residuos de cisteína.

II. Lectinas de Solanáceas (LS)

Las lectinas son carbohidratos unidos a proteínas o glicoproteínas de origen diverso. Las lectinas de Solanáceas representan una clase única de lectinas que se distinguen por: su habilidad de aglutinarse formando oligómeros con N-acetilglucosamina, su predominancia extracelular y su inusual composición de aminoácidos y carbohidratos en, la cual, la hidroxiprolina y arabinosa son los mayores constituyentes. La lectina de papa es la más estudiada, ésta es una glicoproteína monomérica con un peso molecular de 50 KDa, del cual, el 50% se debe a sus carbohidratos.

El motivo de carbohidratos está principalmente compuesto por arabinosa que se une a los residuos de hidroxiprolina y adicionalmente, se presentan residuos de galactosa unidos a las serinas. El motivo proteico es rico en cuatro aminoácidos: hidroxiprolina, serina, glicina y cisteína. En su forma nativa esta lectina muestra un extenso número de puentes disulfuro y posee dos dominios proteicos distintos: uno de estos es rico en serina e hidroxiprolina y tiene unido el motivo de carbohidratos, el otro es rico en glicina y cisteína; este último dominio es el que le confiere la capacidad de unirse con oligómeros de N-acetilglucosamina.

El dominio serina-hidroxiprolina glicosilado de las lectinas lleva a relacionarlas con las extensinas; también se relacionan con otro tipo de glicoproteínas ricas en hidroxiprolina por su localización extracelular. Debido a su habilidad para unir azúcares y localizarse extracelularmente, se sugiere que su función esté involucrada en las interacciones célula-célula, transporte de azúcares y control de la división celular (Showalter, 1993).

III. Proteínas tipo extensina

Las extensinas son una familia de las HRGPs que se encuentran en la pared celular. Son particularmente abundantes en las dicotiledóneas y están caracterizadas por ser ricas en hidroxiprolina, serina y alguna combinación de aminoácidos como valina, tirosina, lisina, histidina y cisteína; presentan el pentapéptido característico de Ser-Hyp₄. Muchos de sus residuos de hidroxiprolina se encuentran glicosilados hasta con cuatro residuos de arabinosa y algunos de sus residuos de serina unen una molécula de galactosa. También, son proteínas básicas con un punto isoelectrico alrededor de 10 esto debido a su alto contenido de lisina (Showalter, 1993).

IV. Proteínas ricas en arabinogalactanos (AGP)

Estas proteínas, a diferencia de las extensinas, son muy solubles y altamente glicosiladas. Están ampliamente distribuidas en la planta y representan del 2 al 10% del peso proteico. Sus pesos moleculares son extremadamente heterogéneos reflejando, con ello, su extensa glicosilación.

Pueden solubilizarse fácilmente, durante su extracción del tejido, con soluciones acuosas bajas en sales, de hecho, varias son solubles en soluciones saturadas de sulfato de amonio; estas características han facilitado su aislamiento y caracterización.

El motivo proteico de las AGP es rico en hidroxiprolina, serina, treonina y glicina, resistiendo a la proteólisis en su estado nativo; esta propiedad probablemente se debe su alta glicosilación. Tienen puntos isoelectricos en el intervalo de pH de 2 a 5 y sus carbohidratos, que representan el mayor porcentaje de su peso, son la D-galactosa y la L-arabinosa.

Análisis estructurales muestran que el motivo de carbohidratos de algunas AGP consiste en cadenas de polisacáridos con enlaces (1 → 3) β-D-galactopiranosido y ramificaciones con cadenas de enlaces (1 → 6) β-D-galactopiranosido. Además, algunos motivos aparecen unidos regularmente al núcleo proteico vía enlaces β-D-galactopiranosida-hidroxiprolina.

La localización celular de estas proteínas no es muy clara debido a su alta solubilidad, aunque es muy claro que su ubicación natural es la matriz extracelular de los tejidos. Ciertas células especializadas como las del tejido de transmisión, de carácter secretor, producen exudados en los que se secretan grandes cantidades de estas proteínas hacia el espacio extracelular (Clarke *et al.*, 1979) y otras se encuentran asociadas con la membrana plasmática (Showalter, 1993).

Tabla 3. Características de las glicoproteínas ricas en hidroxiprolina (HRGPs)

Tipo:	PRP	SL	PELP y CELP	AGP-TTS
Características:				
Motivos proteicos	Pro-Hyp-X*-Y*-Lys	Hyp-Ser-Gly-Cys	X ^Φ -(Pro) ₃₋₅	Ala-Hyp-X ^Ψ
Glicosilación:				
%L-arabinosa	Baja	30	40	52 –70
% D-galactosa	glicosilación	10	10	30 – 48
Reacción de Yariv	-	+	+	+
Punto isoelectrico (pI)	Básico	Básico	Básico	7.5 a 9
Región rica en cisteínas (C_{terminal})	Sí	Sí	Sí	Sí
Péptido señal	-	Sí	Sí	Sí
Localización tisular	Xilema y floema	Cortex y floema	Tejido de transmisión estilar	Tejido de transmisión estilar (MEC)
Función	Promover el desarrollo celular	Interacciones celulares y transporte de azúcares	Interacción con el tubo polínico en crecimiento	Nutrición y guía del tubo polínico

* donde X = Y = valina, tirosina, histidina y ácido glutámico

Φ donde X = cisteína, triptofano y serina

Ψ donde X = serina, treonina y glicina

El reactivo de Yariv, un carbohidrato artificial (β -D-glucosilo), precipita específicamente a la mayoría de las AGP como un precipitado rojizo; este reactivo se ha utilizado ampliamente para estudiar la ubicación celular de las AGP. Basados en su localización predominantemente extracelular y sus propiedades físicas y bioquímicas, se propone que las AGP tienen funciones como gomas, lubricantes y humectantes (Fincher *et al.*, 1983). Por su abundancia en el estilo de las Angiospermas, se les involucra en las interacciones celulares de reconocimiento durante la polinización (Showalter, 1993).

Dentro de este grupo de proteínas podemos encontrar una subclase muy especial debido a su localización tisular, éstas son las proteínas específicas del tejido de transmisión (**AGP-TTS**,) que han sido ampliamente estudiadas en cuanto a estructura, función y niveles de regulación en *Nicotiana tabacum* (Cheung *et al.*, 1995).

También se han caracterizado proteínas idénticas en *N. silvestris* (Cheung *et al.*, 1999) y en *N. alata* (Cheung *et al.*, 2001).

2.5 Sistemas de auto-incompatibilidad (AI) en Angiospermas

Los principales eventos de la polinización son el reconocimiento del grano de polen y la subsecuente aceptación o rechazo de éste por el estigma o, del tubo polínico, por el estilo. Existen mecanismos celulares que operan para discriminar entre los diferentes tipos de granos de polen que quedan atrapados en la superficie estigmática que deben germinar y crecer por todo el estilo.

Estos mecanismos aseguran que únicamente las polinizaciones intraespecíficas sean exitosas, excepto, cuando los genes de autoincompatibilidad actúan para prevenir la fecundación (Raghavan *et al.*, 1997).

Muchas especies de plantas son capaces de excluir el polen no deseado, ya sea porque pertenece a otras especies (rechazo inter-específico) o por provenir de la misma planta (rechazo intra-específico), esto mediante un sistema genético de reconocimiento específico del polen conocido como sistema de autoincompatibilidad (AI), el cual, ayuda a promover la polinización cruzada (McClure *et al.*, 2000). La autoincompatibilidad se define como "la incapacidad, de una planta fértil hermafrodita, para producir cigotos después de la autofecundación" (de Nettancourt, 1977).

Este sistema está controlado por un locus multialélico denominado *locus S* que determina la especificidad de la reacción entre el grano de polen y el pistilo (McClure *et al.*, 1989).

Los sistemas de AI pueden clasificarse como esporofítico y gametofítico (figura 8).

- (a) La AI esporofítica está determinada por los alelos S de la planta que da origen al polen; aquí la reacción de reconocimiento involucra factores del polen que fueron originados por los tejidos diploides de la planta madre.

Entonces, el fenotipo de reconocimiento lo determina el genotipo de la madre y la reacción de autoincompatibilidad se desarrolla en la superficie estigmática donde el grano de polen no germina o, si germina, el tubo polínico no puede penetrar la cutícula del estigma. Este sistema es característico en plantas con polen tricelular y estigmas secos.

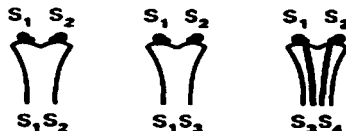
- (b) En la AI gametofítica, el rechazo del polen se lleva a cabo cuando el alelo S de éste es igual a uno de los dos alelos S presentes en el pistilo diploide de la planta receptora, provocando que el crecimiento del tubo polínico se detenga. Aquí, el fenotipo de reconocimiento está determinando por el genotipo haploide del polen y el sitio, donde se lleva a cabo la respuesta de AI, es el tejido de transmisión estilar, manifestándose con la inhibición del crecimiento del tubo polínico. Este sistema es característico de plantas con polen bicelular y estigmas húmedos.

Incompatibilidad Esporofítica

Genotipo del polen determinado por la planta progenitora

S_1S_2 S_1S_2 S_1S_2 S_1S_2 S_1S_2 S_1S_2

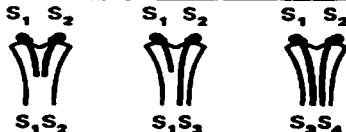
Genotipo individual del polen (haploide)



Genotipo del pistilo (Diploide)

Incompatibilidad Gametofítica

Genotipo haploide individual del polen



Genotipo del pistilo

Figura 8. Sistemas de autoincompatibilidad homomórficos en Solanáceas (Bernatzky R., Anderson M. A. y Clarke A. E., 1988).

En la familia Solanaceae se ha demostrado que los productos génicos del *locus* S son RNasas. Estas proteínas se conocen como S-RNasas; estas son glicoproteínas de alrededor de 30 KDa que se secretan hacia la matriz extracelular del tejido de transmisión del estilo, sitio por el cual el tubo polínico crece en dirección al ovario.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Experimentos realizados con plantas transgénicas demostraron que, las S–RNasas, son las determinantes genéticas del rechazo del polen alelo S específico y se propuso un modelo citotóxico de rechazo de polen en el que, al presentarse la reacción de incompatibilidad, se degrada principalmente el RNA ribosomal (RNAr) del polen (McClure *et al.*, 1989; Gary *et al.*, 1991).

Lo anterior puede comprobarse debido al hecho de que cuando las S–RNasas pierden su actividad las plantas no presentan el fenotipo de rechazo del polen, ni se observa degradación del RNAr (Huang *et al.*, 1994).

2.6 El sistema de autoincompatibilidad (AI) en Solanáceas y los genes modificadores

En los sistemas de AI dependientes de S–RNasas se ha reportado que otros genes o factores, diferentes a las determinantes genéticas de la AI, son requeridos para que se desencadene el rechazo del polen alelo S–específico. Estos factores genéticos son conocidos como genes modificadores y se han clasificado en tres grupos: el grupo I está integrado por factores que afectan directamente la expresión de los genes que determinan la especificidad de la reacción de reconocimiento.

El grupo II está compuesto por factores que interactúan genética o bioquímicamente con las determinantes de especificidad y, por lo tanto, son factores que se requieren específicamente para el rechazo del polen. El grupo III incluye genes que funcionan en la respuesta de AI y también están involucrados en otros eventos de la interacción polen–estigma (McClure *et al.*, 2000).

En *Nicotiana* se ha reportado que se requieren factores del grupo II, por ejemplo en *N. plumbaginifolia*, que es una especie autocompatible (AC) que no expresa S–RNasas, se generaron plantas transgénicas que expresaron niveles normales de la SA₂ o la SC₁₀–RNasa, esperando que con ello rechazaran el polen alelo S–específico, pero éstas plantas fueron incapaces de rechazar el polen con el alelo SA₂ o SC₁₀. Sin embargo, cuando éstas fueron cruzadas con plantas AC de *N. alata* cultivar BT, que son plantas que no expresan ninguna S–RNasa pero que poseen factores diferentes a éstas importantes para el rechazo del polen, los híbridos resultantes adquirieron la capacidad de rechazar el polen SA₂ o SC₁₀ (Murfett *et al.*, 1996). Con lo anterior se demostró que la respuesta de AI de los híbridos [*N. plumbaginifolia* transgénica (con S–RNasas pero AC) X *N. alata* BT (sin S–RNasas AC)], depende de factores diferentes a las S–RNasas heredados por *N. alata* BT.

Una hipótesis de cómo pudieran participar los productos de los genes modificadores en la respuesta de AI gametofítica, es que estos productos interactúen con las S–RNasas para formar complejos moleculares en el estilo que funcionen en el reconocimiento y/o transporte de éstas el citoplasma del tubo polínico, sitio donde actúan (Cruz García *et al.*, no publicado).

Al respecto, se ha encontrado que existen tres proteínas estilares que se unen mayoritariamente a dos S–RNasas (SC₁₀ y la SA₂).

La primera de éstas es una glicoproteína con alta homología a la proteína específica del tejido de transmisión estilar de *N. tabacum* (NaTTS), que parece estar involucrada en la nutrición del tubo polínico (Cheung *et al.*, 1995). La segunda, es una proteína rica en hidroxiprolinas denominada p120 (Lind *et al.*, 1996) y, la tercera, es una metaloproteína de 11 KDa (p11) con un dominio de unión a cobre que también se localiza en la MEC del tejido de transmisión estilar (Cruz García *et al.*, en preparación). Si el complejo de las S-RNasas con las proteínas TTS y p120 es funcional *in vivo*, éste podría ser el mecanismo a través del cual las S-RNasas interactúan con el tubo polínico para ser transportadas de la MEC del tejido de transmisión del estilo hasta el citoplasma del tubo polínico (McClure *et al.*, 2000).

2.7 Glicoproteínas ricas en hidroxiprolinas (HRGPs) en la matriz extracelular del tejido de transmisión estilar

Los análisis de las proteínas y genes estilares muestran que las glicoproteínas, especialmente las ricas en hidroxiprolina, son componentes predominantes de la MEC y algunas juegan un papel fundamental en el crecimiento del tubo polínico (Cheung *et al.*, 1999).

Como ejemplos de este tipo de proteínas están:

1) La NaAGP1, aislada del estilo de *N. alata*; tiene un peso superior a los 90 KDa, sus carbohidratos representan el 90% de su peso siendo los más abundantes la galactosa y arabinosa (60 y 30% respectivamente). La secuencia de aminoácidos, que se predice a partir de su cDNA, revela un dominio rico en prolina en el extremo amino, seguido de una secuencia hidrofóbica en la región carboxilo terminal (figura 9). La proteína NaAGP1 madura carece de esta región hidrofóbica, en cambio, se encuentra una molécula de glucosil-fosfatidil-inositol (GPI) unida a un residuo de asparagina del extremo carboxilo. El GPI anclado a las AGPs es una característica común en algunas de estas glicoproteínas ricas en prolina y tiene una función importante en la interfase de la MEC y la membrana plasmática (Cheung *et al.*, 2001).

2) Las proteínas AGP-TTS de *N. tabacum* han sido ampliamente estudiadas con respecto a su estructura, función y nivel de regulación, e incluso, se han encontrado y caracterizado proteínas similares a éstas en *N. alata* y *N. silvestris*. Estas proteínas presentan un amplio intervalo de peso molecular que va de 45 hasta 105 KDa, poseen O- y N- glicosilaciones y el 70% de sus residuos de azúcar son la galactosa y arabinosa; son moléculas que reaccionan fuertemente con el reactivo de Yariv (Cheung *et al.*, 1995). La estructura primaria de las TTS muestra en la región amino terminal un dominio rico en prolina y en la región carboxilo terminal un dominio rico en cisteínas con 6 residuos de estas (figura 9) (Cheung *et al.*, 2001).

La columna polipeptídica de las TTS tiene carácter básico con un punto isoeléctrico (pI) alrededor de 10, mientras que la TTS nativa tiene un intervalo de puntos isoeléctricos que va desde 7.5 hasta aproximadamente 9; las proteínas con un peso molecular mayor presentan puntos isoeléctricos más ácidos. El que su pI disminuya conforme aumenta el contenido de azúcares es consistente con la acidificación de la columna polipeptídica por la modificación de azúcares en la mitad del dominio rico en prolina hacia el extremo amino (Cheung *et al.*, 2001). Las proteínas TTS se localizan predominantemente en la matriz extracelular del tejido de transmisión del estilo a través, de la cual, el tubo polínico crece. En estudios *in vitro* de cultivo de tubos polínicos, se descubrió que estas promovían su elongación, ya que cuando están presentes en el cultivo a cierta distancia del tubo polínico, éste es atraído por ellas (Cheung *et al.*, 1995). Además, en plantas de tabaco transgénicas, en las que se redujo la producción de este tipo de proteínas por debajo de los niveles normales, disminuyó el crecimiento del tubo polínico y la fertilidad de la planta (Cheung *et al.*, 1995).

Las proteínas TTS se adhieren a la punta y superficie del tubo polínico y son incorporadas en las paredes de éste; el tubo polínico las deglicosila por su asociación a la pared celular o con enzimas membranales muy probablemente galactosidasas. Las interacciones físicas y bioquímicas entre las TTS y el tubo polínico sugiere una capacidad dual de éstas para promover su crecimiento, tanto por servir como una fuente de nutrientes como por proveer una superficie adhesiva para dirigir su elongación hacia el ovario.

3) La proteína p120, abundante en la MEC del tejido de transmisión del estilo en *N. alata* (Lind *et al.*, 1994); es una glicoproteína de 120 KDa cuyos monosacáridos predominantes son la arabinosa y la galactosa (55 y 45% respectivamente). Tiene propiedades de las AGPs y las proteínas tipo extensina, es decir, posee un pI básico y la proporción proteína:carbohidrato es de 65:35 como en las extensinas, también es muy soluble en soluciones amortiguadoras como las AGPs (Cheung *et al.*, 2001).

Presenta además, los dominios ricos en prolina y cisteína (extremo amino y carboxilo respectivamente) (figura 9) y el péptido deglicosilado tiene un peso de 78KDa.

El RNA mensajero de esta proteína se acumula principalmente en el estilo; sus niveles de expresión comienzan a la mitad de la madurez de la flor y se mantienen sin cambio durante todo el periodo de maduración. Esta proteína entra al citosol de tubo polínico en crecimiento, característica única de las proteínas de la MEC del estilo (Lind *et al.*, 1996).

4) Las PELP III, que son proteínas tipo extensina del pistilo muy abundantes en la MEC del tejido de transmisión estilar de *N. tabacum* (de Goldman *et al.*, 1992). Tienen los mismos dominios ricos en cisteínas y prolina de las AGPs y las TTS (figura 9) y pueden ser detectadas con el reactivo de Yariv (Bosch *et al.*, 2001). Después de la polinización, las PELP III son transportadas directamente de la MEC del tejido de transmisión hacia el interior de la pared celular del tubo polínico

en crecimiento de *N. tabacum*; este transporte parece ser muy eficiente ya que 40 h después de la polinización estas proteínas no pueden ser detectadas en la MEC, en cambio, son muy abundantes en la pared y tapones de calosa en el tubo polínico (Bosch *et al.*, 2001).

También se encuentran altos niveles de RNA PELP III en *N. alata*, *N. silvestris* y *N. xsandarea* (de Graaf *et al.*, 2000).

5) las CELPs, o proteínas tipo extensina ricas en cisteínas, también están presentes en la MEC del estilo de *N. tabacum* (Wu *et al.*, 1993).

Los RNA mensajeros de estas proteínas se acumulan de manera predominante en la unión entre las células del cortex y las del tejido de transmisión. Esta región celular delimita el paso del tubo polínico en elongación para que no invada el tejido cortical u otros tejidos estilares (Cheung *et al.*, 2001). Los ovarios de *N. alata* también están enriquecidos con AGPs y CELPs, por lo tanto, no es de sorprender que estas proteínas formen parte de la maquinaria que contribuye a la entrada del tubo polínico en el ovario (Cheung *et al.*, 1999) y, por ende, estén involucradas en los procesos de polinización y fecundación (Wang *et al.*, 1993).

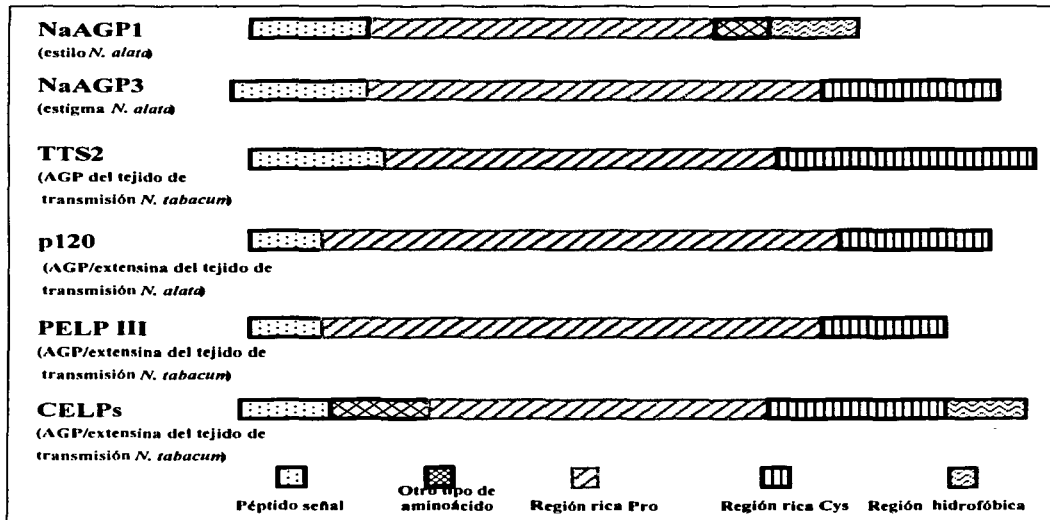


Figura 9. Características de la estructura primaria de las glicoproteínas ricas en hidroxiprolinas (HRGPs) de la matriz extracelular del estilo de *N. alata* y *N. tabacum*.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Wu y colaboradores (1993) caracterizaron cinco genes que codifican para glicoproteínas ricas en cisteínas (CELP-1, -2, -3, -4 y -5) en flores de *N. tabacum*; todas varían significativamente en su peso (entre 159 y 209 KDa) y presentan la misma estructura primaria con un dominio rico en prolina seguido de una región rica en cisteínas y residuos de aminoácidos altamente cargados en la región carboxilo terminal (figura 9). En su región amino terminal se encuentra el dominio tipo extensina con múltiples motivos X-prolina₃₋₅. En su región carboxilo terminal presentan una región con ocho residuos de cisteína (figura 10), seguido por un pequeño dominio altamente cargado (Cheung *et al.*, 2001).

Los residuos de prolina están distribuidos en siete motivos X-Pro₃₋₅ (figura 10) donde X puede ser triptofano, fenilalanina, cisteína o serina y 18 dobletes X-Pro donde X puede ser triptofano, fenilalanina, cisteína, arginina o glicina. Todos los residuos de prolina representan el 26.3% de la proteína completa y el 66.2% del dominio rico en prolina y los residuos de cisteína representan el 10% de la región rica en cisteínas.

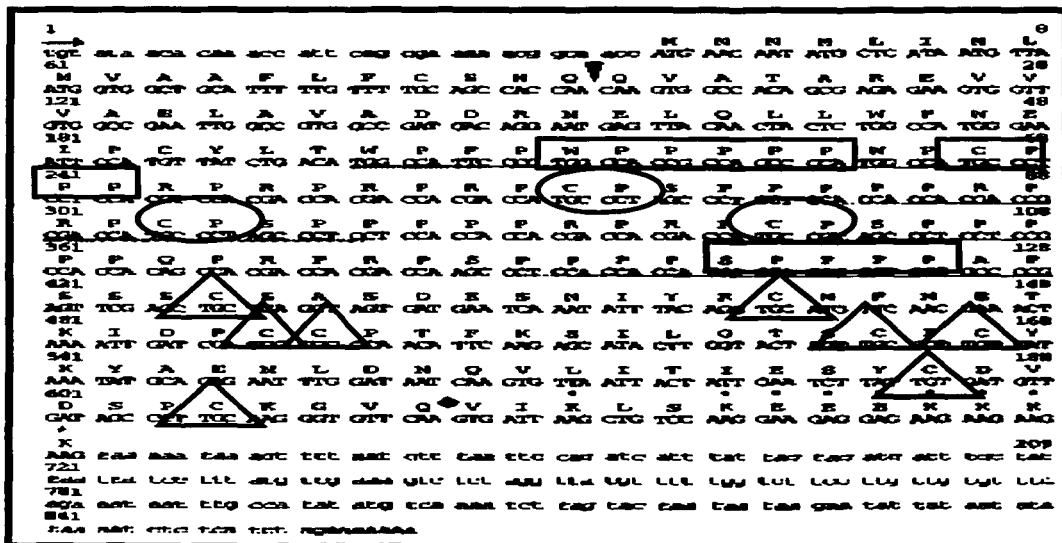


Figura 10. Secuencia de nucleótidos del cDNA CELP-1 y su secuencia aminoacídica deducida. Los rectángulos muestran la distribución de los residuos de prolina en diferentes motivos X-Pro₃₋₅, los círculos muestran los dobletes Pro-Cys y los triángulos muestran los sitios altamente conservados de sus 8 residuos de cisteína.

La región amino terminal de las CELPs es hidrofóbica y tiene las características comunes de un péptido señal. El residuo de glicina 22 (Gly²²) altamente conservado, es un sitio potencial para la N-glicosilación; además todas las prolínas pueden estar como hidroxiprolinas, con lo cual, se provee de otros sitios para ser glicosilados.

Aunque las CELPs constituyan un grupo de proteínas del tipo extensina son diferentes a éstas; su más notable diferencia es la ausencia de residuos de histidina y el bajo contenido de tirosinas de las CELPs, en cambio, los residuos de tirosina en las extensinas están ampliamente relacionados con los motivos de Ser-Pro₄ y pueden formar enlaces intramoleculares de isoditrosina, con lo cual, se vuelven insolubles al unirse fuertemente a la pared celular.

Además, las CELPs son más ricas en cisteínas que las extensinas y su composición amonoacídica difiere al igual que su solubilidad; estas se parecen más a las lectinas de solanáceas y pueden, al igual que éstas, participar en interacciones célula-célula. La presencia de la región rica en cisteínas en las CELPs es una característica que se piensa juega un papel importante en las interacciones celulares ya que es altamente conservada en todas las proteínas de este tipo y, lo más notable, es que los 8 residuos de cisteína de esta región también están en posiciones conservadas (figura 10); este fenómeno sugiere que la región rica en cisteínas de las CELPs es importante a nivel funcional. De hecho, las cisteínas de los motivos Cys-Pro₃, los dobletes Cys-Pro y de la de la región rica en cisteínas, pueden formar puentes disulfuro en condiciones de óxido-reducción adecuadas permitiéndoles interactuar con: otras CELPs, proteínas que tengan residuos de cisteína y compuestos sulfatados no proteicos en la pared celular; así, pueden participar en las interacciones intermoleculares e intramoleculares con la matriz extracelular (Wu *et al.*, 1993). Los enlaces o puentes disulfuro de estas proteínas son reversibles y las interacciones mediadas por sus residuos de cisteína son lábiles, por lo tanto, pueden estar reguladas por enzimas como las tioredoxinas y cambiar tanto como cambien las demandas funcionales y de desarrollo en la planta.

2.8 Estructura y función de las tioredoxinas en las células vegetales

Las proteínas en el ambiente extracelular o en la superficie celular son ricas en puentes disulfuro que las estabilizan, reflejando con esto las condiciones oxidantes en estas regiones. En contraste, en el interior de la célula hay condiciones reductoras y, por lo tanto, las proteínas poseen numerosos grupos sulfhidrilo libres y los puentes disulfuro son raros (Gilbert, 1990). La más ubicua de todas las proteínas disulfuro reductasa, responsable de mantener a otras proteínas en su estado reducido, es la tioredoxina que es reducida, a su vez, por los electrones provenientes del NADPH vía la tioredoxina-reductasa (TrxR) (Holmgren, 1985) (figura 11).

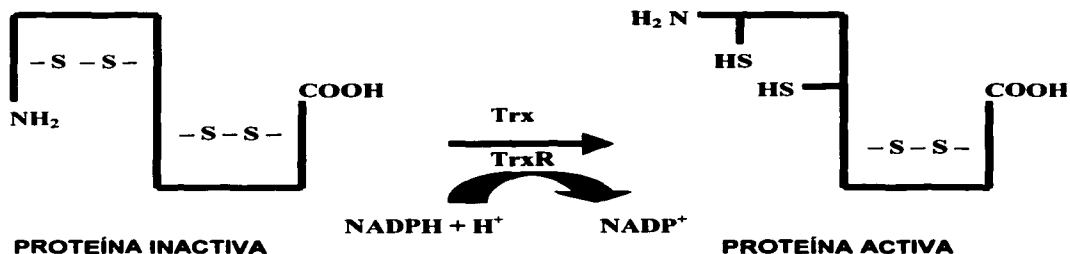


Figura 11. Regulación del estado redox de proteínas por el sistema de la Tiorredoxina.

Las investigaciones sobre las tiorredoxinas en diversos organismos revelan una sorprendente variedad de funciones, esto refleja la importancia de los grupos sulfhidrilo y los enlaces disulfuro en los mecanismos bioquímicos y de regulación a nivel celular (Holmgren, 1989).

El sistema de tiorredoxina es ubicuo desde las arqueobacterias hasta el hombre, por lo tanto, las tiorredoxinas son las más abundantes de las proteínas celulares que reducen a los puentes disulfuro (reductasas disulfuro), donando sus electrones a enzimas como la ribonucleótido-reductasa, la tiorredoxina peroxidasa (peroxidoredoxina) y la metionin-sulfóxido reductasa (Elias y Holmgren, 2000).

Las tiorredoxinas son proteínas ubicuas de bajo peso molecular (generalmente entre 100 y 120 residuos de aminoácidos) que poseen un enlace o puente disulfuro extremadamente reactivo con una secuencia altamente conservada Trp-Cys-Gly-(Ala/Pro)-Pro-Cys-.

Estas proteínas participan en múltiples reacciones en las que se necesita reducir los enlaces disulfuro de proteínas blanco o enzimas (Jacquot *et al.*, 1996). Al poseer en su sitio activo un enlace disulfuro con actividad redox, las tiorredoxinas participan en la transferencia de electrones a través de un mecanismo aparentemente sencillo, esto es, la reducción reversible del enlace disulfuro (S-S) a grupos sulfhidrilos (-SH) de dos proteínas vecinas (Holmgren, 1989).

Así, el sistema de la tiorredoxina está compuesto por NADPH, la flavoproteína tiorredoxina-reductasa (TrxR) y la tiorredoxina (Trx) misma. El transporte de electrones en este sistema se lleva a cabo como se muestra en la figura 12.

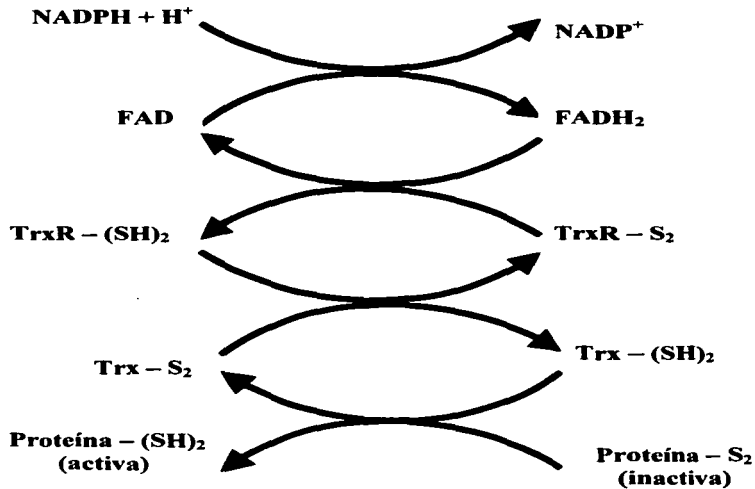


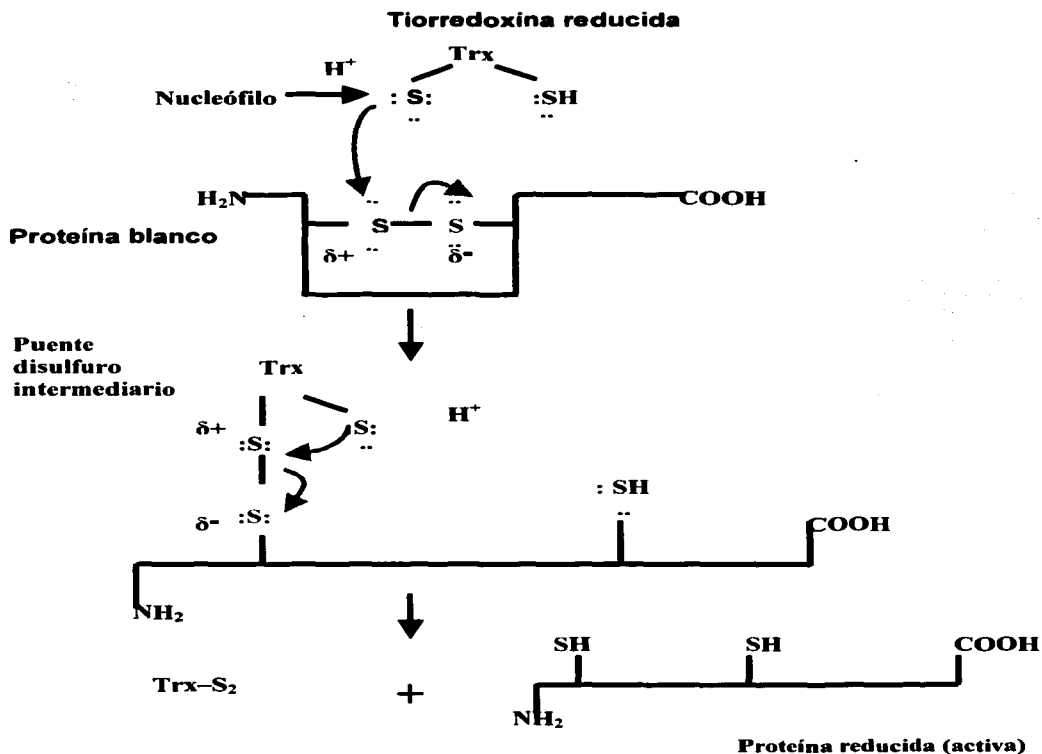
Figura 12. Esquema de la actividad redox en el sistema de la Tiorredoxina.

Con la tiorredoxina de *E. coli* se pudo estudiar el mecanismo de reacción (figura 13); en ésta cada cisteína del sitio activo juega un papel diferente.

La primera reacción la lleva a cabo la Cys32 que rompe el enlace disulfuro de la proteína blanco, reduciendo en ésta una cisteína y formando un puente disulfuro con la segunda cisteína; el puente disulfuro entre la tiorredoxina y la proteína blanco se rompe por la acción de la Cys35, liberándose así la proteína blanco reducida [Proteína-(SH)₂] y la tiorredoxina oxidada (Trx-S₂) (Jacquot *et al.*, 1996).

La cisteína hacia el extremo amino de la tiorredoxina, tiene un valor de pka bajo y funciona como un nucleófilo atractor en la reducción de los puentes disulfuro presentes en las proteínas blanco (figura 13).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



13. Mecanismo de reducción de proteínas blanco por la Tiorredoxina

Este mecanismo involucra una mezcla de disulfuros intermediarios transitorios y un rápido intercambio tiol-disulfuro en una región hidrofóbica; la reacción es reversible y la tiorredoxina puede tanto romper como formar disulfuros de acuerdo al potencial redox de sus sustratos (Holmgren, 1985).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

El bajo potencial redox de la tioredoxina (*E. coli* Trx1 = -270 mV) asegura que esta proteína en su estado reducido [Trx-(SH)₂] sea el mejor ditiol reductor en el citosol (Holmgren Arne, 1985).

La reactividad del puente disulfuro está obviamente relacionada con la estructura tridimensional de la tioredoxina. Esta proteína tiene un estructura particular, su región central está compuesta por cinco hojas β -plegada rodeadas por cuatro hélices- α y, la secuencia arquetipo del sitio activo -Cys-Gly-Pro-Cys-, localizada al final de la hoja β_2 -plegada y al principio de la hélice α_2 ; éste tipo de organización se denominó como pliegue tioredoxina, un motivo encontrado en varias moléculas catalíticas (figura 14).

El sitio activo de la tioredoxina está ubicado en una región relativamente hidrofóbica que provoca su arreglo en forma de una protuberancia, razón por la que a ésta proteína se le denomina también como proteína macho (Jacquot *et al.*, 1996).

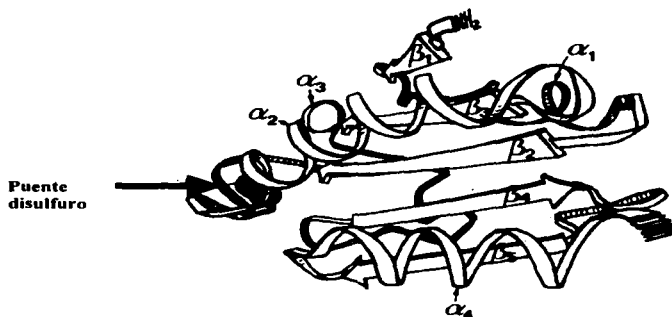


Figura 14. Estructura tridimensional de la tioredoxina de *E. coli* (Holmgren, 1985).

En las algas verdes y plantas superiores se han caracterizado tres sistemas de tioredoxina: el primero se localiza en los cloroplastos y posee dos tipos de tioredoxinas, la *f* y *m* que juegan un papel importante en el proceso de fotosíntesis.

La tioredoxina *f* es la única capaz de activar eficientemente a la fructosa-1,6-bifosfatasa y, la tioredoxina *m*, activa a la NADP-malato deshidrogenasa.

El segundo sistema de tioredoxina es el mitocondrial y el tercero, fue descubierto en las semillas de trigo, la raíz de zanahoria y las hojas de espinaca con una tioredoxina presente en células heterotróficas (no fotosintéticas) denominada tioredoxina *h*. Se considera que estas tioredoxinas extra cloroplásticas (*h*) son citosólicas.

También, dos genes de tioredoxina citoplasmática se aislaron del genoma de *N. tabacum*. Las tioredoxinas de tabaco h₁ y h₂ poseen el sitio activo característico (–Cys–Gly–Pro–Cys–), un peso de 14 kDa y no muestran un péptido señal, con lo cual, se sabe que son citoplasmáticas. Estos son los primeros genes clonados, que codifican para este tipo de tioredoxinas, en plantas superiores (Brugidou *et al.*, 1993).

Basados en su reactividad bioquímica, se han propuesto varias funciones para este tipo de proteínas. Algunas investigaciones muestran que están involucradas en los procesos de movilización de reservas energéticas en las semillas y, se han aislado sus cDNAs de los tejidos del pistilo (*Ricinus communis*) y otros tejidos reproductivos en *N. tabacum* y *A. thaliana*; esto sugiere que las tioredoxinas-h pueden estar involucradas con los procesos reproductivos (Jacquot *et al.*, 1996). Debido a que las tioredoxinas-h carecen de un péptido señal o de transporte, se asume que son proteínas citoplasmáticas; sin embargo, se ha demostrado en arroz y otras plantas que este tipo de tioredoxinas también se encuentran en el floema y, al no haber una señal de secreción, se piensa que las tioredoxinas son transportadas a través de los plasmodesmos debido a su tamaño (Meyer *et al.*, 1999).

En *Arabidopsis thaliana* cada tipo de tioredoxina está representado por una pequeña familia de genes; 5 tioredoxinas-h se han detectado en esta planta, de las cuales, 3 presentan el sitio activo característico (WCGPC). Experimentos de complementación en levadura, para conocer las funciones de las tioredoxinas vegetales, señalan que la presencia de varias tioredoxinas en el mismo compartimiento acarrea el problema de la redundancia funcional o en especificidad. *Sacharomyces cerevisiae* posee 2 genes que codifican para tioredoxinas-h con funciones redundantes; si sólo se muta uno de estos genes la levadura conserva las características del tipo silvestre, pero con la mutación de ambos genes (*yTRX1* e *yTRX2*) se provocan cambios fenotípicos como: la modificación del ciclo celular, la incapacidad de la planta para asimilar sulfatos y el incremento de la sensibilidad al peróxido de hidrógeno (H₂O₂). La expresión de cada una de las tioredoxinas-h de *Arabidopsis* en la levadura, doblemente mutada, permite la restauración del ciclo celular, pero si sólo se expresa el gen *AfTRX2* la mutante puede crecer en ausencia de azúcar, mientras que la expresión del gen *AfTRX3* o *AfTRX4* induce la tolerancia al H₂O₂. Esta especificidad en la complementación de funciones, sugiere que los dominios estructurales de las tioredoxinas son responsables de la interacción con varios blancos. Esta especificidad no puede ser explicada en la estructura conservada de las tioredoxinas y, con base en sus secuencias, una hipótesis sencilla consiste en sospechar que la región poco conservada, en su región amino terminal, juega un papel importante en ésta. Pero, también se ha visto que los dominios necesarios para la interacción de las tioredoxinas con sus diferentes proteínas blanco, no están localizados en el mismo lugar dentro de la molécula (Bréhélin *et al.*, 2000).

La particularidad de las tiorredoxinas-h de *Arabidopsis* es el que poseen un sitio activo atípico (WCPPC), esto puede ser demostrado por la actividad redox que muestra él mismo; su actividad depende del residuo de aminoácido situado entre las dos cisteínas, por ejemplo: la enzima disulfuro isomerasa (DsbA) de *E. coli* (que también pertenece a la familia de las tiorredoxinas) tiene una estructura similar a la de las tiorredoxinas pero su sitio activo es oxidante (CPHC), mientras que el de las tiorredoxinas es reductor (CGPC). También, en la *AfTRX3* la mutación G-P₃₃ no permite que la molécula soporte la asimilación de sulfato, esto sugiere que la prolina impide la interacción con las proteínas blanco involucradas en la asimilación de sulfato. La vecindad de la Cys₃₂ activa, menos hidrofóbica y relativamente menos accesible en WCPPC que en el tipo silvestre WCGPC, cambia significativamente la reactividad de la cisteína, esto aparentemente en su pKa y posiblemente en su potencial redox (Bréhélin *et al.*, 2000).

También, en estudios bioquímicos con trigo, se ha dado evidencia sobre las funciones de las tiorredoxinas-h en los procesos de germinación y desarrollo de semillas. Los análisis de esos resultados sugieren que la tiorredoxina-h, reducida vía NADP-TR con el NADPH generado metabólicamente, actúa en etapas tempranas del crecimiento de semillas al iniciar la movilización de nitrógeno y carbono en el endospermo, el mayor receptáculo de almacenamiento de proteínas y carbohidratos en los cereales. A través de la reducción de los puentes disulfuro intramoleculares de sus proteínas blanco, la tiorredoxina-h puede promover la degradación de las fuentes de reserva proteicas con: la inactivación de proteínas pequeñas que inhiben, a su vez, proteínas amilolíticas y la activación de una proteasa sustrato-específica dependiente de calcio (Cho *et al.*, 1999). La transformación de cebada, utilizando las tiorredoxinas-h de trigo (*Wtrxh*), muestra que las plantas homocigas que sobreexpresan la *Wtrxh* bioquímicamente activa, también aumentan en su actividad de enzimas que rompen almidón del endospermo, por ejemplo: la pullulanasa, que hidroliza específicamente uniones α -1,6- en el almidón (amilopectinasa), durante la germinación y desarrollo de la semilla. Se encontró también que las tiorredoxinas-h aumentan la actividad de esta enzima *in vitro* por la inactivación de un pequeño inhibidor proteico a través de la reducción de sus puentes disulfuro (Cho *et al.*, 1999). Con esta investigación se abre otra dimensión sobre la función de las tiorredoxinas-h en la germinación y el desarrollo de las semillas y, resulta interesante estudiar, cómo esta actividad se relaciona con las otras funciones de las tiorredoxinas-h como son: su participación en la división celular, la replicación de DNA (*E. coli*), el estrés oxidativo y el proceso de AI.

Por otro lado, en la familia Brassicaceae existe un sistema de AI que previene la autofecundación que está controlado, al igual que en las solanáceas, por el *locus S* (Bower *et al.*, 1996).

Cuando la planta progenitora (que determina el genotipo del grano de polen), porta el mismo alelo que el pistilo en el que el grano de polen se ancla, las papilas estigmáticas lo reconocen y no permiten que germine, sólo el polen de una planta con un alelo diferente puede germinar y fecundar el óvulo.

Se conocen dos genes que están estrechamente relacionados con este *locus S* y son necesarios para que se desencadene la reacción de AI: el que codifica para una glicoproteína (SLG) y el que codifica para el receptor de cinasa (SRK). La SLG es una proteína de secreción que está presente en toda la pared celular de las papilas estigmáticas, mientras que el receptor SRK también es una proteína glicosilada de membrana presente en el estigma. El dominio putativo extracelular de la proteína SRK muestra un alto grado de similitud con el de la SLG; así, una molécula incompatible del polen actúa como ligando y activa al receptor SRK, éste activa a su vez una cascada de señales en el estigma que provocan el rechazo del polen (Bower *et al.*, 1996). Al estudiar esa cascada de señales en *Brassica* se identificaron 2 proteínas que interactúan con el dominio de cinasa del receptor denominado SRK-910 (gen aislado del *locus S* de la planta AI *Brassica napus* ssp. *Oleifera*), éstas son miembros de la familia de las tiorredoxinas-h y están codificadas en los genes THL-1 y THL-2 (tipo tiorredoxina-h); los genes muestran un alto grado de identidad con los genes de tiorredoxinas de *Arabidopsis* y presentan un sitio activo diferente al consenso (WCGPC) pero que es igual (WCPPC) al de tres de los cinco miembros de las tiorredoxinas-h de *Arabidopsis* (TRX3, TRX4 y TRX5), siendo éste menos reductor. El mRNA de la proteína THL-2 se expresa en todos los órganos florales, mientras que el de THL-1 se distribuye en toda la planta y, ambos, son muy abundantes en el pistilo de flores maduras. También THL-1 posee actividad de tiorredoxina reduciendo eficazmente a la insulina en presencia de DTT. *In vitro*, THL-1 es fosforilada por el dominio de proteína-cinasa del receptor SRK-910 y es capaz de unirse a éste aunque la unión depende más de su conformación que de la fosforilación. Al ser estos genes ubíquos se puede pensar en una función importante de éstos en la planta, fuera de su posible participación en la AI de *Brassica*. Aunque se sabe que la función de las tiorredoxinas es modular la actividad enzimática por la reducción de puentes disulfuro, la gran diversidad de fenómenos en los que participan, sugiere que existen varias posibilidades para la naturaleza de la interacción entre éstas (THL-1 y THL-2) y el dominio de cinasa del receptor SRK-910. Así, durante a respuesta de AI las proteínas THL-1 y THL-2 puedan regular al receptor SRK con su actividad reductora disminuyendo o aumentando su actividad catalítica (Bower *et al.*, 1996).

En *Brassica oleracea* se ha demostrado que la autofosforilación del receptor SRK, durante una autopolinización, se previene por la tiorredoxina de tipo h del estigma (THL-1) cuando su ligando, la proteína S del polen rica en cisteínas (determinante masculina en la respuesta AI), no está presente (Cabrillac *et al.*, 2001). Los datos obtenidos muestran que el receptor SRK es inhibido por la THL-1 y activado por las proteínas que cubren el grano de polen (PCP's). La proteína THL-1 inhibe este receptor porque puede unirse a su dominio citosólico de forma estequiométrica e independiente de la fosforilación; de hecho, si se elimina la THL-1 o se utilizan tiorredoxinas en las que se reemplazaron una o las dos cisteínas de su sitio activo por residuos de serina (THL-1^{C45-S} y THL-1^{C45-S/C48-S}), se activa nuevamente la fosforilación.

También se descubrió que la actividad de la proteína THL-1 depende su estado redox, pues sólo la forma reducida impide la fosforilación del receptor SRK y, si en presencia de este inhibidor, se adicionan proteínas de la cubierta del polen (PCP's), éste se activa nuevamente y es fosforilado de forma alelo-específica.

Se sugiere que al igual que en células animales, los ligandos activan a su receptor al inducir su oligomerización; esto también ocurre con el receptor SRK en presencia de su ligando (SCR's), por lo tanto, la THL-1 inhibe al fosforilación al impedir la dimerización del receptor SRK (Cabrillac *et al.*, 2001).

3. Antecedentes inmediatos

Debido al hecho de que la autoincompatibilidad (AI) en Solanáceas involucra tanto a las S-RNAsas (determinantes genéticas femeninas del rechazo de polen alelo S específico), como a los genes modificadores (McClure *et al.*, 2000), en nuestro laboratorio la investigación se ha centrado en la clonación y estudio de estos genes.

El gen clonado por la técnica de cDNA-AFLP (denominado inicialmente cDNA-AFLP25), contiene un marco de lectura abierto para una proteína de 16.8 KDa que incluye un dominio de tiorredoxina. Un análisis de similitud muestra que esta tiorredoxina es de tipo h o citoplasmática, por lo que, el cDNA inicialmente conocido como cDNA-AFLP25 fue denominado cDNA-NaTrxh.

El producto del cDNA-NaTrxh es una proteína con actividad de reductasa por su capacidad de reducir los puentes disulfuro de la insulina *in vitro*.

Se conoce que la NaTrxh se expresa en toda la planta de *N. alata*.

Además, tenemos evidencia bioquímica que muestra que esta proteína se encuentra en la fase soluble de la matriz extracelular (MEC) del estilo.

Finalmente, sabemos que la S-RNasa es reducida por la NaTrxh.

Hipótesis

La evidencia bioquímica sugiere que NaTrxh es una proteína soluble de la matriz extracelular del estilo que es capaz de reducir proteínas como las S-RNasas, por lo que, es muy probable que su localización tisular sea en el tejido de transmisión del estilo donde ocurren los eventos de polinización.

Objetivo general

- Conocer la localización tisular de la NaTrxh en el estilo de *N. alata*.

Objetivos particulares

- Producir y purificar anticuerpos contra la tiorredoxina-h de *Nicotiana alata* (NaTrxh)
- Evaluar la pureza de los anticuerpos obtenidos contra la NaTrxh
- Inmunolocalizar a la NaTrxh en diferentes tejidos del estilo de *N. alata*

4. Material y métodos

En el laboratorio se tenía suero de un conejo inmunizado con la NaTrxh (expresada del cDNA–NaTrxh aislado por la técnica de AFLP en un trabajo previo) y se habían precipitado anticuerpos de éste con una solución de sulfato de amonio. Era necesario conocer la pureza de esos anticuerpos, es decir, conocer si en extractos de proteínas totales de diferentes órganos de *N. alata*, éstos reconocían a la tiorredoxina nativa y no presentaban reacciones cruzadas con proteínas diferentes a ésta. Así, se decidió evaluar su pureza a través de un análisis por western-blot.

4.1 Obtención de extractos de proteínas totales de diferentes órganos de *Nicotiana alata*.

Para llevar a cabo la técnica de western-blot se prepararon extractos de proteínas totales de estilo, antera, ovario, pétalos y sépalos todos de etapa madura, es decir, cuando la flor está abierta y tiene una longitud aproximada entre 3.5 y 5 cm. También se prepararon extractos de hoja y tallo.

Los extractos se hicieron como se describe a continuación:

- a) Colectar el tejido, pesarlo y después colocarlo en un mortero¹
- b) Adicionar nitrógeno líquido para facilitar la ruptura de las células y moler hasta obtener un polvo fino
- c) Por cada 15 mg de tejido adicionar 200 µL de buffer de extracción (ver apéndice). El buffer de extracción debe estar recién preparado y conservarse a 4°C
- d) Mezclar el buffer de extracción con el tejido molido hasta que se observe un extracto homogéneo
- e) Recuperar el extracto del mortero con una pipeta o con una espátula ya que el extracto se congela formando un sólido que puede manipularse con ésta
- f) Colocar el extracto en un tubo de microfuga de volumen adecuado y mantenerlo a una temperatura de 4°C
- g) Centrifugar a 14, 000 rpm durante 10 minutos a 4°C para separar los restos celulares de los elementos solubles (proteínas)
- h) Recuperar el sobrenadante y cuantificar las proteínas totales con el reactivo de Bradford.

¹ Es muy importante que durante la preparación de los extractos todo el material ha utilizar se mantenga frío (4°C), pues así se evita que se activen proteasas celulares.

4.2 Cuantificación de proteínas

La cuantificación de proteínas en los extractos obtenidos se realizó de acuerdo al método de Bradford (Dabre, 1986). Como curva patrón se utilizaron diluciones de albúmina sérica bovina desde 0.2 mg/mL hasta 1 mg/mL. El ensayo se llevó a cabo de la siguiente forma:

- Colocar en tubos para microfuga de 1.5 mL la cantidad de agua desionizada, albúmina (solución patrón de 1mg/mL) y reactivo de Bradford necesarias para llegar a un volumen final de 1 mL, conservando una dilución de la muestra de 1: 100
- Adicionar la cantidad de cada reactivo y extracto a cada tubo eppendorf como se muestra en la siguiente tabla:

Curva patrón (concentración de ASB mg/mL)	Muestra (Extracto de proteínas totales de estilo, antera,etc.)	ASB (solución patrón de 1mg/mL)	Agua desionizada (μ L)	Reactivo de Bradford (μ L)
Blanco	---	---	10	990
0.2	---	2 μ L	8	990
0.4	---	4 μ L	6	990
0.6	---	6 μ L	4	990
0.8	---	8 μ L	2	990
1.0	---	10 μ L	---	990
---	2 μ L	---	8	990

- Una vez que se adicionaron todos los reactivos y la muestra, mezclar con ayuda de un vortex (Genie2)
- Colocar el contenido del tubo en una celda de plástico y leer la absorbencia a 595 nm en un espectrofotómetro (UV/visible ULTROSPEC II)
- Interpolar los valores de absorbancia a 595 nm (D.O. $_{595nm}$) de cada extracto en la curva patrón de albúmina sérica bovina (tabla 4).

Tabla 4. Curva patrón con Albúmina Sérica Bovina (ASB)

Concentración de ASB (mg/mL)	A_{595nm}	Coefficiente de correlación:
Blanco	0.000	r = 0.9982
0.2	0.055	
0.4	0.147	Pendiente y ordenada:
0.6	0.225	
0.8	0.318	m = 0.4053; b = -0.0128
1.0	0.394	

Para mantener la relación lineal entre la absorbencia de la muestra (extracto de proteínas totales) y su concentración esta curva debe tener, por lo menos, un coeficiente de correlación (r) de 0.9900, lo cual, asegura que se determina la concentración real de proteínas totales en éstos (tabla 5). En este caso, la curva patrón elaborada tiene un coeficiente de correlación de 0.9982 (tabla 4), que resulta confiable para realizar los cálculos de concentración de proteínas.

Tabla 5. Cuantificación, por el método de Bradford, de los extractos de proteínas totales de diferentes órganos de *N. alata*

Extracto de:	A _{595 nm}	Concentración (µg/ µL) dilución 1:5	Concentración final (µg/ µL)
Antera	0.330	0.8458	4.23
Estilo	0.229	0.5966	2.98
Ovario	0.203	0.5325	2.66
Pétalos	0.059	0.1772	0.89
Sépalos	0.123	0.3351	1.68
Hoja	0.134	0.3622	1.81
Tallo	0.064	0.1895	0.95

- f) Si la concentración de proteínas es menor a 0.9 mg/mL, es necesario concentrar los extractos por liofilización, esto para poder cargar de 25 a 30 µg de proteínas totales en cada pozo del gel de poliacrilamida.

4.3 Inmunodetección por western-blot de la NaTrxh en extractos de proteínas totales de diferentes órganos de *N. alata*

Las proteínas en cada extracto se separaron por electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE) (ver apéndice); este gel consta de dos fases: un gel apilador o concentrador con acrilamida al 4% pH 6.8 y un gel separador con acrilamida al 12.5% pH 8.8. Las condiciones de la separación electroforética fueron 120V durante 2 horas.

Por cada ensayo de inmunodetección se preparon dos geles, uno para la transferencia a la membrana de nitrocelulosa (Millipore) y, el otro como duplicado para teñirlo con azul de Coomassie (ver apéndice) (figura 15) o nitrato de plata (ver apéndice).

La transferencia de proteínas del gel a la membrana se realizó con un sistema semi-seco que utiliza tres soluciones conductoras de acuerdo al siguiente protocolo:

- a) Instalar el equipo de transferencia (LKB Bromma MULTIPHOR II) colocando la placa de grafito inferior y conectándola al polo positivo (electrodo positivo)

- b) Humedecer esta placa con agua desionizada y colocar 2 papeles filtro (Wattmann 3MM), de las mismas dimensiones del gel, impregnados con la solución I (ver apéndice), seguidos de un papel filtro impregnado de la solución II (ver apéndice)
- c) Sobre este papel filtro colocar una membrana de nitrocelulosa (Immobilon-NC Millipore) de las mismas dimensiones del gel, que previamente se lavó durante 5 minutos con la solución II y, sobre ésta, colocar el gel de poliacrilamida, también lavado previamente durante 5 minutos pero con la solución III (ver apéndice), teniendo cuidado de cubrirlo completamente con la membrana y de no dejar burbujas entre éstos para que la transferencia de proteínas sea adecuada
- d) Poner sobre el gel tres papeles filtro impregnados con la solución III
- e) Colocar la segunda placa de grafito sobre todo (gel, membrana y filtros) teniendo cuidado de no moverla excesivamente y desplazar fuera de lugar los filtros, la membrana o incluso el gel
- f) Conectar esta placa al polo negativo y cubrir el equipo con su tapa de plástico
- g) Ajustar la corriente a 75 mA y llevar a cabo la transferencia durante 45 minutos
- h) Teñir las proteínas en la membrana con rojo de Ponceau (ver apéndice) para saber si la transferencia fue correcta
- i) Lavarla con agua desionizada y comenzar el ensayo de inmunodetección
- j) Dejar la membrana durante toda la noche (12 horas) en solución de bloqueo recién preparada [leche descremada al 5% + Tween 20 al 0.1% en PBS 1X (ver apéndice)] con agitación constante (agitador rotatorio LabQuake o Hofer)
- k) Ponerla en contacto con el primer anticuerpo (anti-NaTrxh sin purificar, título 1:100 en solución de bloqueo), esto durante 2 horas a temperatura ambiente con agitación suave y constante²
- l) Lavar la membrana dos veces durante 10 y 5 minutos con la solución de lavado (Tween 20 al 0.1% en PBS 1X)
- m) Hibridar con el segundo anticuerpo (anti-conejo marcado con peroxidasa, título 1:5,000 en solución de bloqueo) durante 1 hora, también a temperatura ambiente y con agitación constante
- n) Concluido el tiempo, realizar tres lavados de 10 minutos cada uno con solución de lavado
- o) Realizar un último lavado de 5 minutos con PBS 1X
- p) Por último, revelar la membrana con reactivos para detección de anticuerpos marcados con peroxidasa (RPN 2109 ECL, Amersham Pharmacia Biotech) y película fotográfica sensible (Hiperfilm ECL o Kodak) (figuras 16A y 16B).

² Tanto la solución de bloqueo como el primer anticuerpo deben estar en un volumen adecuado para cubrir por completo la membrana.

4.4 Diseño de un péptido tomando como patrón la región amino terminal de la NaTrxh inferida del cDNA–NaTrxh

Con los ensayos de western-blot se observó que los anticuerpos anti-NaTrxh crudos (sin purificar) reconocen una proteína de aproximadamente 16 KDa, la tiorredoxina-h de *N. alata* (NaTrxh), pero también presentan reacciones cruzadas tanto con proteínas de alto peso molecular (sobre todo en el extracto de estilos), como con proteínas de peso muy cercano a la NaTrxh.

Por lo anterior, además de pensar en la purificación de los anticuerpos por cromatografía de afinidad, se diseñó un péptido (**Multiple Peptide Systems**[®]) tomando como patrón la región amino terminal de la secuencia aminoacídica deducida del cDNA–NaTrxh.

4.4a) Perfil de hidrofiliidad

Para seleccionar la secuencia del péptido se realizó un análisis de hidrofiliidad (Hoop y Woods, 1981). Este análisis permitió seleccionar la región de la NaTrxh cuyos aminoácidos constituyeran un buen sitio antigénico, es decir, los que es muy probable estén expuestos por su carácter hidrofílico (figura 17).

4.4b) Alineamiento múltiple

La secuencia primaria deducida del cDNA–NaTrxh se comparó con otras secuencias aminoacídicas de diferentes tiorredoxinas por un alineamiento múltiple (**Vector NTI Suite 5.5**[®]) (figura 18).

4.4c) Síntesis y acoplamiento del péptido

La secuencia del péptido diseñado es la siguiente:



Debido a que un péptido tan pequeño no es un buen inmunógeno, éste se conjugó con una molécula transportadora para que pudiera funcionar como un hapteno. El residuo de cisteína hacia el extremo carboxilo del péptido es necesario para su acoplamiento con la proteína de transporte utilizando el método MBS (Ester de Maleimido-Benzoil-N-hidroxisuccinimida).

Este método de conjugación se utiliza para acoplar los grupos sulfhidrilo libres de la cisteína del péptido a la hemocianina de la “lapa ojo de cerradura” (molusco de concha) o KLH, vía enlaces cruzados bifuncionales (Frederick, 1997).

4.5 Obtención de anticuerpos contra el péptido diseñado acoplado a hemocianina

4.5a) Inmunización

- Preparar el inmunógeno tomando 91 μL de la solución de péptido acoplado a KLH (220 μg de péptido) + 909 μL de adyuvante de Freund (Gibco BRL) completo o incompleto según sea el caso
- Mezclar con vortex durante 30 minutos (se debe formar una suspensión homogénea)
- Antes de inmunizar, tomar una muestra de 5 mL de sangre (de la vena marginal de la oreja del conejo) para obtener el suero preinmune (SP)
- Inmunizar por vía intramuscular (i.m.)
- Continuar con el esquema de inmunización que se muestra en la siguiente tabla:

Semana:	Adyuvante de Freund:	Cantidad de inmunógeno (μg)	Inmunización:	Vía de administración:	Observaciones
Día 1	Completo	220	1	Intramuscular	Muestra de sangre para extraer suero preinmune
2	Completo	220	2	Intramuscular	---
4	Incompleto	220	3	Intramuscular	---
7	Incompleto	220	4	Intramuscular	---
8	Completo	220	5	Intramuscular	Sangría de prueba (3 mL) para conocer el título de anticuerpos (M1)
10	Completo	220	6	Intramuscular	Además del refuerzo se extrajo sangre (M2)
12	---	---	---	---	Si el título de anticuerpos es adecuado hacer la Punción cardiaca

4.5b) Extracción y diálisis de los anticuerpos anti-péptido

- Concluido el esquema de inmunización, extraer sangre de la vena marginal del conejo para determinar el título de anticuerpos (M1)
- Dejar coagular la sangre en un recipiente de vidrio cerrado durante 2 horas a 4°C
- Centrifugar a 4,000 rpm durante 10 minutos a 4°C

- d) Recuperar el sobrenadante (suero) en un tubo falcon limpio y medir su volumen
- e) Hacer la primera precipitación adicionando, por goteo y con agitación continua, la solución de sulfato de amonio saturada $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$ al 77.7 % pH 7.5] al suero. **El volumen de la solución de sulfato de amonio que se adiciona corresponde a la mitad del volumen de suero obtenido**³
- f) Dejar precipitando toda la noche (aproximadamente de 10 a 12 horas) con rotación continua a 4°C
- g) Centrifugar a 4,000 rpm durante 30 minutos a 4°C
- h) Recuperar el sobrenadante y colocarlo en un tubo falcon limpio
- i) Recuperar también el botón y resuspenderlo en 1/3 del volumen inicial de suero con PBS 1X (1^{er} precipitado)
- j) Hacer la segunda precipitación adicionando, un volumen igual de la solución de sulfato de amonio que el utilizado en la primera precipitación, por goteo y con agitación continua
- k) Dejar precipitando durante 4 a 6 horas con rotación continua a 4°C
- l) Centrifugar a 4,000 rpm durante 30 minutos a 4°C
- m) Recuperar el botón y resuspenderlo en 1/3 del volumen original de suero con PBS 1X (2^{do} precipitado donde se encuentran las IgG's). También conservar el sobrenadante en un tubo limpio
- n) Dializar el 1^{er} y 2^{do} precipitados y el sobrenadante final, haciendo 3 cambios de PBS 1X de 2 L cada uno (bolsa de diálisis SPECTRA/POR)
- o) Liofilizar los anticuerpos del segundo precipitado (IgG's) y reconstituirlos con 500 µL de PBS 1X. Conservar los anticuerpos a -70°C hasta su uso

4.5c) Inmunodetección por western-blot de la NaTrxh con los anticuerpos anti-péptido

- a) Probar los anticuerpos dializados y liofilizados del primer y segundo precipitados, el sobrenadante final de la primera muestra sanguínea (M1) y el suero preinmune en membranas de nitrocelulosa con 2 µg de la NaTrxh recombinante (resultados no mostrados pues no hubo reconocimiento)
- b) Inmunizar por quinta vez y, 14 días después, que es cuando se presenta el pico de IgG's, extraer sangre nuevamente (M2). Tratarla como a la primera muestra (M1)
- c) Probar los anticuerpos del segundo precipitado de la muestra 2 (M2), dializados y liofilizados, en una membrana de nitrocelulosa con 2 µg de NaTrxh recombinante para determinar su título (figura 19A)
- d) Realizar la punción cardiaca si el título de anticuerpos ya es el adecuado
- e) Tratar la sangre obtenida de la punción (aproximadamente 60 mL) para la separación de los anticuerpos anti-péptido como se describió anteriormente

³ Para precipitar del suero sólo IgG's se requiere una concentración de 40 a 50% de sulfato de amonio, de no ser así, pueden precipitar contaminantes como la albúmina o hemoglobina.

- f) Probar los anticuerpos anti-péptido en membranas de nitrocelulosa con proteínas de antera y estilo de etapa madura, utilizando el título determinado en el paso (c) (figura 19B).

4.6 Sobreexpresión del cDNA- NaTrxh en *E. coli*

Observando los análisis por western-blot se supo que los anticuerpos anti-NaTrxh y anti-péptido cruzaban con proteínas de alto peso molecular y, como se requieren anticuerpos que reconozcan específicamente a la tiorredoxina-h de *N. alata*, fue necesario purificarlos. Para montar la columna de purificación se requirieron 35 mg de la NaTrxh recombinante como ligando. Para obtener tal cantidad de tiorredoxina fue necesario sobreexpresar su cDNA.

En el laboratorio se cuenta con la cepa de *E. coli* BL21(DE3)pLysS, que posee un gen de polimerasa controlado por el promotor *lac* UV5, por lo tanto, puede inducirse la expresión de esta enzima con isopropiltiogalactósido (IPTG), un análogo de la lactosa no hidrolizable. Estas bacterias fueron transformadas con el vector pGEX cuyo mapa se presenta en la figura 20.

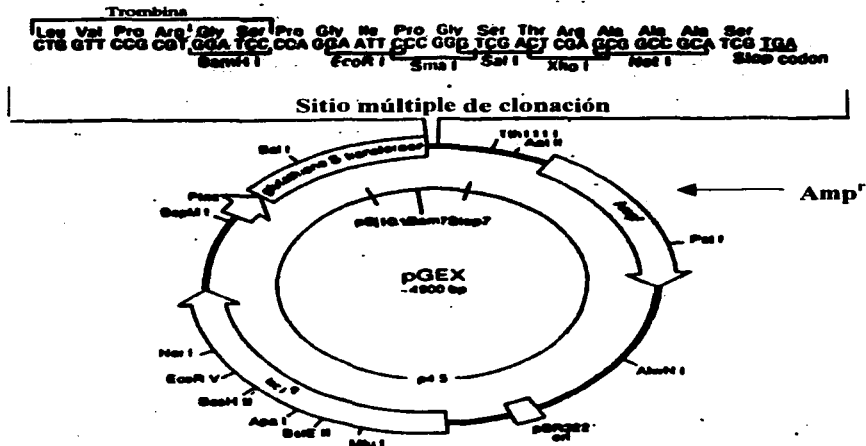


Figura 20. Mapa del vector pGEX donde se muestra el sitio múltiple de clonación con los diferentes sitios de restricción, el sitio de restricción de la trombina y el gen marcador de resistencia a ampicilina (Amp^r).

Este vector (donde ya se tenía clonado el cDNA–NaTrxh), es muy útil porque los polipéptidos expresados, en este caso la NaTrxh, están unidos al extremo carboxilo de la glutatión-S-transferasa (GST), una proteína citoplasmática de 29 KDa y, pueden separarse de esta con la proteasa trombina (figura 20). Además, este vector de expresión le confiere a las bacterias transformantes la capacidad de crecer en presencia del antibiótico ampicilina.

La sobreexpresión del cDNA–NaTrxh se realizó como se describe a continuación:

- a) Preparar un precultivo tomando una alícuota de 15 μL de células bacterianas de *E. coli* cepa BL21(DE3)pLysS (ver apéndice)
- b) Inocular en 12 mL de medio 2xYTA⁴ (ver apéndice)
- c) Incubar toda la noche a 37°C con agitación constante (aproximadamente 200 rpm)
- d) Quitar 500 μL de los 500 mL de medio 2xYTA contenidos en un matraz erlenmeyer de 2L
- e) Adicionar 500 μL de ampicilina (solución madre 100 mg/mL) y mezclar
- f) Quitar 5 mL de medio 2xYTA del matraz y adicionar 5 mL del precultivo
- g) Agitar el matraz durante la adición de la alícuota del precultivo para homogeneizar el medio
- h) Tomar una alícuota de 1 mL que se utilizará como blanco para las lecturas de absorbancia
- i) Incubar nuevamente a 37°C con agitación constante hasta que se alcance una lectura de absorbancia a 600 nm entre 0.5 y 0.7 ($A_{600\text{nm}} = 0.5-0.7$)
- j) Adicionar IPTG (solución patrón 100 mM) a una concentración final de 0.1mM y continuar con la incubación durante 3 horas más
- k) Centrifugar a 8, 000 rpm durante 10 minutos a 4°C
- l) Desechar el sobrenadante y colocar el tubo con el botón celular en hielo
- m) Resuspender el botón celular con 50 μL de PBS 1X por cada mL de cultivo
- n) Centrifugar a 8, 000 rpm durante 10 minutos a 4°C, desechar nuevamente el sobrenadante y resuspender el botón celular⁵
- o) Lisar las células con un sonicador por períodos de 15 a 30 segundos, con intervalos de reposo de 1 minuto, a una frecuencia de 30 MHz hasta que la solución se observe ligeramente transparente (las muestras deben estar sobre hielo todo el tiempo)
- p) Agregar tritón X-100 al 20% y después centrifugar a 10, 000 rpm durante 10 minutos a 4°C
- q) Transferir el sobrenadante a un tubo limpio y guardar una alícuota de 20 μL (fase soluble) para tenerla como control.

⁴ Todo el material y los medios de cultivo deben esterilizarse antes de utilizarlos, también debe trabajarse en una campana de flujo laminar para evitar la contaminación de los cultivos bacterianos.

⁵ Este procedimiento [del paso a) hasta el n)] se repite 4 veces trabajando con 1.5 L de medio 2xYTA cada vez. En total se requirieron 6L de medio de cultivo y se obtuvieron 600 mL de células resuspendidas.

4.7 Purificación de la proteína de fusión obtenida después de la sobreexpresión

Para separar la proteína de fusión (GST–NaTrxh), del resto de las proteínas presentes en la fase soluble, se cuenta en el laboratorio con la resina de agarosa Glutación Sepharosa 4B (Amersham Pharmacia Biotech AB).

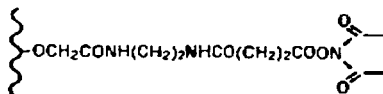
La purificación se llevó a cabo por cromatografía de afinidad en solución. La resina tiene como ligando glutación oxidado ya que la GST es muy afin a éste. Una vez unida la proteína de fusión a la matriz de agarosa, se separó la NaTrxh de la GST con la proteasa trombina, que hace un corte entre ambas proteínas, entre el extremo carboxilo de la GST y el extremo amino de la NaTrxh. La GST, libre de la NaTrxh, se separó entonces de la resina por la adición de glutación reducido. La purificación de la NaTrxh recombinante se realizó de acuerdo con el siguiente protocolo:

- a) Tomar el volumen necesario de resina Glutación Sepharosa para la purificación (por cada 100 mL de sonificado se requieren 2 mL de resina al 50%)
- b) Centrifugar a 600 rpm durante 5 minutos
- c) Decantar cuidadosamente el sobrenadante y lavar con 7.52 mL de PBS 1X
- d) Centrifugar nuevamente a 600 rpm durante 5 minutos y decantar
- e) Adicionar 752 μ L de PBS 1X
- f) Incubar a temperatura ambiente durante 1 hora la fase soluble del sonificado con la resina manteniendo la mezcla con rotación continua
- g) Centrifugar a 600 rpm durante 5 minutos
- h) Tomar una alícuota de 20 μ L del sobrenadante (Fase no unida o UB) y el resto desecharlo
- i) Lavar el botón de resina con 10 volúmenes de cama con PBS 1X
- j) Centrifugar a 600 rpm durante 5 minutos y desechar el sobrenadante
- k) Repetir 2 veces más el lavado
- l) Preparar la mezcla para la reacción de proteólisis con trombina (Amersham Pharmacia Biotech) (25 μ L de la proteasa + 475 μ L de PBS 1X)
- m) Adicionar al botón de resina la mezcla de reacción e incubarla a temperatura ambiente con rotación constante de 12 a 16 horas
- n) Concluido el tiempo, centrifugar a 600 rpm durante 5 minutos
- o) Recuperar el sobrenadante en un tubo limpio
- p) Hacer 3 lavados con 500 μ L de PBS 1X centrifugando (600 rpm) entre cada uno. Juntar los sobrenadantes y guardar una alícuota de 20 μ L (Eluato con trombina)
- q) Por último, adicionar a la resina sedimentada el buffer de elusión (Glutación reducido) en una relación 1:1
- r) Mezclar suavemente para resuspender la resina e incubar durante 10 minutos a temperatura ambiente para que eluya la GST de la matriz
- s) Centrifugar a 600 rpm durante 5 minutos
- t) Recuperar el sobrenadante en un tubo limpio

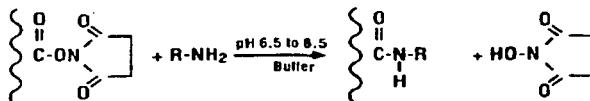
- u) Repetir la elución dos veces más
- v) Mezclar los tres eluatos y guardar una alícuota de 20 μL (eluato con glutatión reducido)
- w) Cuantificar todas las alícuotas por el método de Bradford y analizarlas por SDS-PAGE
- x) Finalmente, teñir con nitrato de plata (ver apéndice) el gel obtenido (figura 21).

4.8 Montaje de la columna Affigel-10/NaTrxh para la purificación de los anticuerpos anti-NaTrxh y anti-peptido por cromatografía de afinidad

Con la NaTrxh recombinante obtenida se preparó la columna para la purificación cromatográfica, lo cual, permite obtener anticuerpos que la reconozcan específicamente y se evitan reacciones cruzadas con otras proteínas. La columna utilizada tiene una matriz de agarosa denominada Affigel-10 (BioRad). Unido a este soporte de agarosa se encuentra un brazo espaciador de 10 átomos de carbono, al final del cual hay un éster de hidroxisuccinimida:



El éster de hidroxisuccinimida representa el centro reactivo, es decir, el sitio donde se une covalentemente con el ligando, en este caso, la NaTrxh recombinante. La reacción de acoplamiento del ligando se lleva a cabo a través de sus grupos amino libres que forman un enlace amida con el brazo espaciador, la reacción de acoplamiento se muestra a continuación:



El acoplamiento del ligando se realizó de la siguiente forma:

- a) Agitar el vial que contiene el gel hasta formar una suspensión uniforme
- b) Transferir 1 mL de la suspensión a un embudo Buchner
- c) Dejar que el sobrenadante (solvente en el que se encuentra el gel) escurra

- d) Lavar el gel con tres volúmenes de cama de agua desionizada fría (4°C), el lavado puede facilitarse aplicando vacío pero debe cuidarse que el gel no se seque por completo
- e) Transferir el gel húmedo a un tubo limpio y con tapa
- f) Adicionar la solución de ligando fría. Por cada mL de gel se adicionan al menos 0.5 mL de esta solución. Agitar suficientemente durante la adición para formar una suspensión uniforme
- g) Incubar durante toda la noche (aproximadamente 12 horas) a 4°C
- h) Bloquear ésteres activos con 100 µL de etanolamina 1M pH 8.0 por mL de gel. Dejar durante una hora para que la reacción de bloqueo sea completa
- i) Concluido el tiempo, transferir el gel a una columna de volumen adecuado (10 mL)
- j) Lavar con agua desionizada hasta que la columna esté libre de reactivos (de cada fracción de lavado se lee su densidad óptica a 280 nm, hasta que sea igual a cero la columna está limpia)
- k) Lavar nuevamente la columna pero con el buffer de elusión: Glicina 50 mM, NaCl 50 mM pH 2.6 (filtrado)
- l) Equilibrar la columna con buffer de inicio (PBS 1X)
- m) Guardarla hasta su uso a 4°C con PBS 1X + azida de sodio al 0.05%

4.9 Purificación de IgG's con la columna de Proteína A–agarosa

Debido a que las inmunoglobulinas G (IgG) son los anticuerpos más abundantes en el suero (aproximadamente 12 mg de IgG's/ mL de suero) y, poseen todas las especificidades, son los que se extraen de éste precipitándolos con una solución de sulfato de amonio. Un paso de purificación adicional es la cromatografía de afinidad. En el laboratorio se cuenta con la resina de Proteína A–agarosa que tiene unida proteína A al soporte de agarosa por medio de enlaces amida. La proteína A, del *Estafilococo aureus*, tiene la propiedad de unirse con gran especificidad a la región Fc de las IgG de mamíferos, por lo tanto, es muy útil para purificar IgG's.

Antes de llevar a cabo la purificación de los anticuerpos anti-NaTrxh con la columna de Affigel-10/NaTrxh, se purificaron las IgG's como se describe a continuación:

- a) Se requiere 1 mL de gel en la columna para unir 16 mg de IgG's
- b) Equilibrar la columna con 10 volúmenes de cama de PBS 1X
- c) Colocar la muestra en la columna e incubar con rotación continua a 4°C durante 1 hora
- d) Permitir que la fracción no unida eluya por gravedad
- e) Lavar la columna con 10 volúmenes de cama o hasta que la absorbencia a 280 nm de las fracciones de lavado sea igual a cero ($D.O_{280nm} = 0.000$)
- f) Eluir la fracción de IgG's con citrato de sodio 0.1M pH 3.0 (filtrado). Generalmente se requieren de 2 a 5 volúmenes de cama para la elusión completa

- g) Colectar fracciones de elusión de 1mL en tubos eppendorf a los que previamente se les han colocado 200 μ L de Tris 1M
- h) Leer la absorbancia de todas las fracciones a 280 nm y mezclar aquellas fracciones en las que la lectura de absorbancia haya sido alta (tres o cuatro fracciones nada más) (Tabla 6)
- i) Lavar la columna con tres volúmenes de cama de tiocianato de sodio 0.1M
- j) Lavar nuevamente con tres volúmenes de cama pero de PBS 1X
- k) Guardar la columna a 4°C con PBS 1x + azida de sodio al 0.05%

4.10 Purificación de los anticuerpos anti-NaTrxh y anti-péptido con la columna de Affigel-10/NaTrxh

Las fracciones enriquecidas con IgG's se mezclaron y se pasaron a través de la columna Affigel-10/NaTrxh para separar sólo los anticuerpos que se unen específicamente a la NaTrxh recombinante unida, a su vez, al soporte de la columna. También se purificaron con esta columna los anticuerpos anti-péptido. La purificación se realizó de la siguiente forma:

- a) Lavar la columna con 10 volúmenes de cama de PBS 1X o hasta que la absorbancia a 280 nm sea igual a cero
- b) Adicionar la muestra (anticuerpos anti-NaTrxh o anti-péptido uno a la vez) e incubar durante 1 hora con rotación continua⁶ y a temperatura ambiente
- c) Permitir que la fracción no unida eluya por gravedad
- d) Lavar la columna con PBS 1X hasta que la absorbancia a 280 nm de las fracciones de lavado sea igual a cero
- e) Eluir los anticuerpos específicos contra la NaTrxh con 5 volúmenes de cama de buffer de elusión (Glicina 50 mM, NaCl 50 mM pH 2.6)
- f) Colectar fracciones de elusión de 1 mL en tubos eppendorf a los que previamente se les adicionaron 200 μ L de Tris 1M
- g) Medir la absorbancia de cada fracción a una longitud de onda de 280 nm (Tablas 7 y 8). La comparación de los perfiles de elusión se muestra en la figura 22
- h) Lavar la columna con 10 volúmenes de cama de PBS 1X o hasta que la absorbancia a 280 nm sea igual a cero
- i) Guardarla con solución de azida de sodio al 0.05% en PBS 1 X a 4°C
- j) Mezclar las fracciones de elusión con mayor lectura de absorbancia y liofilizarlas
- k) Reconstituir los anticuerpos liofilizados con PBS 1X
- l) Comprobar la especificidad de los anticuerpos, anti-NaTrxh y anti-péptido obtenidos, con ensayos de inmunodetección por western-blot como el descrito previamente (figuras 23 y 24)

⁶ La agitación rotatoria permite que el gel de agarosa no permanezca sedimentado sino en movimiento, promovándose así, la interacción de la solución con anticuerpos y la NaTrxh unida a la matriz de agarosa.

- m) Hacer otro ensayo de inmunodetección por western-blot para conocer qué cantidad de NaTrxh recombinante pueden reconocer los dos tipos de anticuerpos purificados sólo con la columna de Affigel-10/NaTrxh (figura 25).

4.11 Obtención de cortes histológicos de diferentes órganos de *N. alata*

Con los anticuerpos específicos anti-NaTrxh se llevó a cabo la inmunolocalización de la NaTrxh. Para esto se requirieron cortes de diferentes tejidos de *N. alata*.

Primero se fijó el tejido para prevenir cambios o daño en su estructura celular y poder obtener un equivalente del estado vivo. Aunque se sabe que es imposible que este equivalente sea absoluto, el fijador utilizado debe provocar cambios mínimos en la composición química y en la estructura celular.

Después de que el tejido se fijó, fue deshidratado para facilitar su posterior infiltración e inclusión con parafina. La parafina proporciona un medio de inclusión solidificable que sirve de soporte a los tejidos sin reaccionar químicamente con estos, con lo cual, les confiere firmeza y facilita la obtención de cortes uniformes. Para realizar los ensayos de inmunolocalización y, su examen microscópico, se hicieron cortes de un grosor no mayor a 6 μm de las muestras incluidas en parafina como se describe a continuación:

- a) Fijar el material vegetal con paraformaldehído al 4% en PBS 1X durante 2 horas a 4°C
- b) Enjuagar 3 veces con PBS 1X durante 10 minutos
- c) Deshidratar el tejido con alcohol etílico (etanol) en diferentes concentraciones 50, 70, 85, 96, 100 y 100%, comenzando con alcohol al 50% (deshidratación gradual). El tejido debe permanecer 15 minutos en cada etanol⁷
- d) Colocar el tejido en xilol durante 15 minutos
- e) Preincluir con una mezcla 1:1 de xilol – parafina (nombre comercial paraplast) a 60°C⁸ durante 12 horas
- f) Remover la mezcla de xilol : parafina e incluir el tejido durante 24 horas con parafina pura a 60°C
- g) Acomodar el tejido infiltrado, con ayuda de una aguja de disección, en un recipiente de tamaño adecuado conteniendo parafina líquida
- h) Dejar que la parafina solidifique para que forme un bloque, con el tejido en el centro de éste, del tamaño y forma del recipiente utilizado
- i) Cortar el área del bloque adyacente al tejido en forma de pirámide para poder realizar la microtomía

⁷ La metodología original marcaba una hora de deshidratación en cada alcohol, pero el tejido de *N. alata* comenzaba a tornarse oscuro si se mantenía ese tiempo, por lo tanto, se ajustó la deshidratación a 15 minutos. El tiempo de deshidratación depende del tipo de tejido.

⁸ Es muy importante no exceder esta temperatura para no dañar el tejido.

- j) Acoplar el bloque de parafina a una base de madera que se sujetará en el porta muestras del microtomo de rotación
- k) Realizar cortes de 6 μm y colocarlos en un baño de flotación (agua desionizada a 40°C) para extender la parafina
- l) Capturar los cortes con un portaobjetos limpio y tratado con algún adhesivo que permita mantener el tejido unido firmemente a éste
- m) Dejar secar los portaobjetos con cortes y protegerlos del polvo
- n) Teñir el tejido desparafinado e hidratado con safranina-verde rápido (ver apéndice) para estudiar la estructura vegetal.

4.12 Inmunolocalización de la NaTrxh en diferentes órganos de *N. alata* con el sistema DAKO LSAB–peroxidasa

El objetivo de los ensayos de tinción inmuno-histoquímica (IHQ) es permitir la observación de antígenos celulares en algún tejido. Originalmente, se utilizaban técnicas en dos pasos en las que el primer anticuerpo se unía a su antígeno celular y el segundo anticuerpo (que se une al primero) estaba marcado con la peroxidasa de rábano (HRP). Este equipo (DAKO LSAB–peroxidasa) aprovecha el sistema **avidina–biotina**, en el cual, el segundo anticuerpo está biotinilizado y se une a la peroxidasa conjugada con moléculas de estreptavidina. Los reactivos marcados con estreptavidina y biotina (LSAB) de este equipo aumentan la señal que genera el sistema para la detección de antígenos presentes en baja concentración. La detección se llevó a cabo por una reacción colorida que se presenta cuando la peroxidasa rompe su sustrato provocando que el cromógeno 3, 3'-diaminobenzidina (DAB) precipite (precipitado de color café) en el sitio donde se encuentra el antígeno.

En estos ensayos se probó el suero preinmune (SP) y los anticuerpos anti-NaTrxh sin purificar, los anti-NaTrxh purificados por dos columnas (proteína A-agarosa y Affigel-10/NaTrxh) y, los anti-NaTrxh purificados sólo con la columna de Affigel-10/NaTrxh. Además, se utilizaron como controles negativos la hibridación de cortes de tejido sólo con el anticuerpo primario (control de espécimen) y sólo con el anticuerpo secundario (control de reactivo).

Las inmunolocalizaciones con este sistema se realizaron en diferentes órganos de *N. alata* de acuerdo al siguiente protocolo:

- a) Colocar las preparaciones en cajas Koplenn de vidrio con una separación adecuada para que los cortes no se adhieran entre sí por la parafina que poseen
- b) Desparafinar en una estufa a 60°C durante 30 minutos
- c) Hacer dos lavados, de 3 minutos cada uno, sumergiendo las preparaciones en xilol

- d) Remover con gasa⁹ el exceso de xilol
- e) Hidratar el tejido con una serie etanólica: 100% (dos cambios), 96% (dos cambios) y agua desionizada (dos cambios), cada cambio de tres minutos
- f) Colocar las preparaciones en el buffer de reconstitución antigénica (citrato de sodio 0.1M pH 6.9)¹⁰, durante 5 minutos en baño maría u horno de microondas¹¹
- g) Lavar con agua desionizada, la punta de la piseta no debe dirigirse hacia el tejido para no dañarlo (dirigirla a los bordes del portaobjetos)
- h) Colocar las preparaciones en PBS 1X durante 5 minutos. Repetir este paso
- i) Secar el exceso de éste con gasa y verificar que el tejido no se haya desprendido
- j) Aplicar una gota de peróxido de hidrógeno al 3% (frasco 1 del equipo DAKO)
- k) Tapar las preparaciones o colocarlas en una cámara húmeda para evitar la evaporación de los reactivos (**durante todo el ensayo el tejido no debe secarse**)
- l) Lavar con agua y después con PBS 1X (dos cambios de PBS de 5 minutos cada uno)
- m) Remover el exceso de éste de las preparaciones y secar cuidadosamente alrededor del tejido con gasa
- n) Marcar con un plumón hidrofóbico (DAKO PEN o PAN-PEN) alrededor de cada corte teniendo cuidado de no derramar la tinta de éste sobre el tejido ya que lo bloquea
- o) Incubar con el primer anticuerpo en PBS 1X durante 30 minutos (durante cada incubación tapar las preparaciones para disminuir la evaporación y evitar que el tejido se seque). Se requieren aproximadamente 100 µL de solución de anticuerpo para cubrir por completo un corte. Los anticuerpos probados y sus correspondientes títulos se muestran en la siguiente tabla:

Anticuerpos	Títulos				
	1:20	1:50	1:100	1:250	1:500
Suero preinmune	✓	✓	✓	✓	✗
Anti-NaTrxh sin purificar	✓	✓	✓	✓	✓
Anti-NaTrxh purificado por dos columnas (proteína A-agarosa y Affigel-10/NaTrxh)	✓	✓	✓	✓	✓
Anti-NaTrxh purificado por una columna (Affigel-10/NaTrxh)	✓	✓	✓	✓	✓

⁹ Para secar las preparaciones o remover el exceso de alguna solución es muy importante no utilizar materiales absorbentes de los que se desprendan fácilmente sus fibras.

¹⁰ El paraformaldehído puede inducir cambios estéricos en las moléculas antigénicas por la formación de enlaces intermoleculares, por lo tanto, debe darse un tratamiento a las muestras con un buffer que reconstituya los sitios antigénicos.

¹¹ Los portaobjetos utilizados deben estar tratados con algún material adhesivo para evitar la pérdida de tejido durante el calentamiento o algún otro tratamiento durante el ensayo.

- p) Lavar con agua desionizada y después dejar las preparaciones en PBS 1X durante 5 minutos. Repetir el lavado con PBS 1X
- q) Secar el exceso de PBS y colocar sobre los cortes de tejido 2 gotas del anticuerpo secundario biotinilado (frasco 3 del equipo). Incubar durante 15 minutos
- r) Lavar con agua, después con PBS 1X y secar como se describe en los pasos anteriores
- s) Colocar sobre el tejido dos gotas de la solución que contiene peroxidasa acoplada a estreptavidina (frasco 4 de color rojo del equipo), tapan las preparaciones e incubar durante 15 minutos
- t) Lavar nuevamente como ya se describió
- u) Preparar el buffer sustrato con 1 mL de la solución sustrato (frasco 5 del equipo) y una gota del cromógeno (frasco 6) y mezclar rotando suavemente el tubo contenedor con las manos para evitar la precipitación del cromógeno
- v) Adicionar el cromógeno recién preparado a los cortes dejándolo de 30 a 60 segundos sobre éstos¹²
- w) Detener la reacción del cromógeno¹³ colocando las preparaciones en agua desionizada y después colocar las preparaciones durante 3 minutos en el medio de contraste (hematoxilina de Meyer), este paso es opcional
- x) Dejar las preparaciones durante 10 minutos en un baño de agua amoniacal (700 µL de hidróxido de amonio 15M en 200 mL de agua desionizada) y después colocarlas en agua desionizada, seguida de alcohol absoluto (etanol al 100%)
- y) Secar las preparaciones con gasa y colocarlas en un baño de xilol
- z) Montar las preparaciones (medio de montaje acuoso DAKO ULTRAMOUND) y realizar el análisis de las preparaciones por microscopía de campo claro (figuras 26, 27 y 28).

4.13 Inmunolocalización de la NaTrxh en diferentes tejidos del estilo de *N. alata* con el sistema DAKO FITC– anticonejo

Debido a que con el sistema de inmunolocalización anterior no se obtuvieron los resultados esperados, fue necesario realizar más ensayos de éste tipo utilizando otro sistema. Estos sólo se llevaron a cabo en estilos de etapa madura de *N. alata*. El sistema de tinción inmuno-histoquímica denominado FITC–anticonejo utiliza como anticuerpo secundario inmunoglobulinas G (IgG's) de cerdo (anticonejo) marcadas con isotiocianato de fluoresceína (FITC), lo cual, permite hacer el análisis de antígenos celulares por microscopía de fluorescencia excitando al fluorocromo, acoplado al segundo anticuerpo, con luz UV.

¹² El tiempo de incubación con el cromógeno puede establecerse según la intensidad de color requerida observando un corte (microscopio óptico a 10X) sin cubreobjetos a diferentes tiempos.

¹³ El cromógeno es cancerígeno, por lo tanto, antes de desecharlo debe inactivarse con cloro.

En estas pruebas tampoco se trabajó con los anticuerpos desarrollados contra el péptido acoplado a hemocianina y sólo se probaron los anticuerpos anti-NaTrxh purificados sólo con la columna de Affigel-10/NaTrxh y el suero preinmune. Como marcadores de la matriz extracelular del tejido de transmisión del estilo (controles positivos) se utilizaron anticuerpos contra proteínas específicas de este tejido, una de éstas involucrada con las reacciones de autoincompatibilidad (AI) en *N. alata* conocida como S₁₀₅-RNasa y otra relacionada con el crecimiento del tubo polínico en *N. tabacum* denominada NaTTS.

Las inmunolocalizaciones se realizaron como se describe a continuación:

- a) Desparafinar el tejido colocando las preparaciones en cajas Koplenn de vidrio dentro de una estufa a 60°C durante 30 minutos
- b) Eliminar los residuos de parafina con xilol o un sustituyente de este (Hemo D o Histo-clear) que sea menos agresivo con el tejido¹⁴. Realizar 3 lavados de 5 minutos cada uno
- c) Eliminar el exceso de Histo-clear secando las preparaciones con gasa (también puede utilizarse papel filtro)
- d) Hidratar con una serie etanólica: 100% (2 cambios), 96% (3 cambios), 70% y PBS 1X recién preparado (3 cambios), todos los cambios son de 5 minutos
- e) Preparar, mientras se realiza el último cambio de PBS, la solución de bloqueo con 100 µL de suero de cabra (SIGMA) + 900 µL de PBS 1X, mezclar con vortex (para 5 preparaciones se necesita 1 mL de solución de bloqueo)
- f) Secar con mucho cuidado para no tocar el tejido, marcar alrededor de los cortes con el plumón PAN-PEN (no debe derramarse la tinta de éste sobre el tejido)
- g) Colocar inmediatamente las preparaciones marcadas en una cámara de humedad (recordar que es muy importante que el tejido no se seque) y aplicar la solución de bloqueo. Incubar el tejido con esta solución durante 4 horas a temperatura ambiente
- h) Hacer un lavado de 10 segundos con PBS 1X sobre el tejido, es decir, colocando unas gotas sobre éste y luego decantar el buffer inclinando el portaobjetos
- i) Dejar las preparaciones sumergidas en PBS 1X mientras se aplica el anticuerpo primario + suero de cabra al 1% en PBS 1X.
- j) Realizar también los controles negativos descritos en la inmunolocalización con el sistema DAKO LSAB-peroxidasa.

Los anticuerpos primarios probados y sus correspondientes títulos se muestran en la siguiente tabla:

¹⁴ Si se tiene algún solvente sustituyente del xilol como el Hemo D o Histo-clear no es necesario desparafinar en la estufa pues estos poseen aceites de cítricos que remueven eficazmente la parafina.

Anticuerpos	Títulos					
	1:20	1:50	1:100	1:200	1:3,000	1:10,000
Suero preinmune	X	X	✓	X	X	X
Anti-NaTrxh purificado con la columna de Affigel-10/NaTrxh	✓	✓	✓	✓	X	X
Anti-S ₁₀₅ - RNasa	X	X	X	X	X	✓
Anti-NaTTS	X	X	X	X	✓	X

- k) Incubar durante 12 horas con el anticuerpo primario en cámara húmeda
- l) Hacer 3 lavados de 10 minutos cada uno con PBS 1X (sobre el tejido) y decantarlo con cuidado después de cada lavado
- m) Preparar, durante el segundo y tercer lavados, el anticuerpo secundario con 10 µL del anticuerpo anti-conejo acoplado al isotiocianato de fluoresceína (FITC) + 10 µL de suero de cabra en 980 µL de PBS 1X
- n) Mezclar con vortex y centrifugar a 12,000 rpm durante 10 minutos a 4°C, tomar cuidadosamente sólo 980 µL de la solución y colocarlos en otro tubo eppendorf (este volumen de solución del segundo anticuerpo es suficiente para 5 preparaciones)
- o) Concluido el último lavado con PBS, secar el exceso de este en las preparaciones con gasa sin tocar el tejido
- p) Colocarlas en cámara húmeda y aplicar el segundo anticuerpo. Incubar durante 4 horas
- q) Lavar 3 veces sumergiendo las preparaciones en PBS 1X durante 15 minutos
- r) Remover el exceso de PBS con gasa
- s) Montar las preparaciones (medio de montaje VECTASHIELD H-100)
- t) Analizar por microscopía de fluorescencia (figuras 29, 30, 31 y 32).

4.14 Pruebas histoquímicas

Las técnicas histoquímicas permiten localizar e identificar sustancias y actividad enzimática en tejidos, células y organelos, con lo cual, se puede conocer la composición química de algún tejido en particular. En este caso es importante saber qué sustancias son las que predominan en el tejido de transmisión del estilo de *N. alata* para tener una caracterización de éste. Se realizaron tres pruebas (APS, azul-negro de naftol y lugol) en cortes desparafinados e hidratados de estilo maduro y estilo disecado. La dos primeras fueron para determinar la presencia de polisacáridos y proteínas. Los ensayos se desarrollaron de la siguiente forma:

- a) Desparafinar el tejido dejando las preparaciones (portaobjetos con cortes) en una estufa a 60°C durante 30 minutos

- b) Colocar las preparaciones en un baño de xilol durante 3 minutos
- c) Repetir el baño con xilol 2 veces más
- d) Hidratar el tejido con una serie etanólica: 100% (2 cambios), 96%, 70%, 50%, 30% y agua desionizada (los cambios de alcoholes y agua son de 3 minutos cada uno)
- e) Aplicar ácido peryódico (ver apéndice) durante 15 minutos (colocar sólo unas gotas que cubran el tejido)
- f) Lavar con agua desionizada (no dirigir la punta de la piqueta hacia el tejido para no dañarlo)
- g) Aplicar al tejido el reactivo de Schiff (ver apéndice) durante 15 minutos
- h) Lavar nuevamente con agua
- i) Lavar con ácido acético al 2% durante 1 minuto para evitar la formación de cristales. Lavar el exceso de ácido acético con agua
- j) Deshidratar el tejido con xilol
- k) Aplicar unas gotas de azul negro de naftol (ver apéndice) durante minuto y medio
- l) Lavar las preparaciones con butanol y pasar a xilol durante 3 minutos
- m) Montar las preparaciones con una resina adecuada (de secado rápido de preferencia) y cubreobjetos para que sean permanentes
- n) Observar con campo claro en un fotomicroscopio (OLYMPUS PROVIS) (figura 33A).

También se hizo un ensayo en estilos frescos (tejido sin tratamiento sólo disecado) para evaluar la presencia de almidón:

- a) Disecar longitudinalmente el estilo fresco con ayuda de una navaja y un microscopio estereoscópico
- b) Colocar el tejido disecado sobre un portaobjetos limpio
- c) Aplicar lugol (ver apéndice) durante 5 minutos (si está muy concentrado diluirlo con agua en partes iguales)
- d) Colocar un cubreobjetos limpio sobre el tejido
- e) Observar con campo claro en un fotomicroscopio (figura 33B).

5. Resultados y discusión

Para conocer la pureza de los anticuerpos desarrollados contra NaTrxh recombinante, expresada en el cDNA-NaTrxh (aislado por la técnica de cDNA-AFLP en un trabajo previo) y, evaluar su capacidad para inmunodetectar a la NaTrxh en los órganos de *N. alata*, se realizaron ensayos de western-blot. Para esto se prepararon extractos de proteínas totales de diferentes órganos de *N. alata*. De cada extracto se utilizaron 30 μ g de proteínas totales; estas se separaron por electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizante al 12.5% (SDS-PAGE) (figura 15).

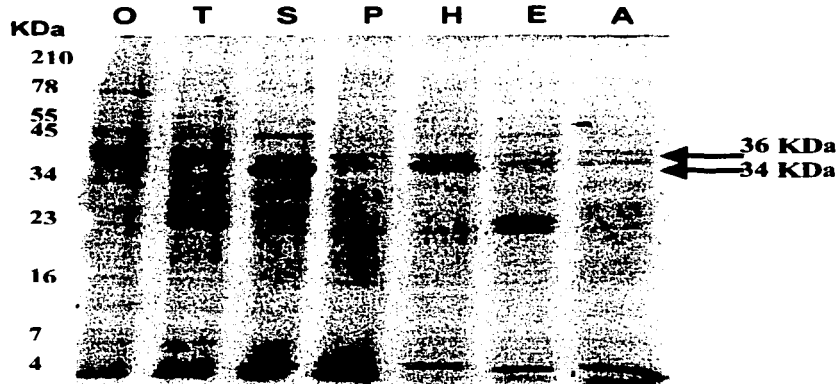


Figura 15. Separación electroforética por SDS-PAGE al 12.5% de los extractos de proteínas totales de diferentes órganos de *N. alata*: (O) ovario, (T) tallo, (S) sépalos, (P) pétalos, (H) hoja, (E) estilo y (A) antera (gel teñido con azul de Coomassie).

Con este tipo de análisis se pueden fraccionar mezclas de proteínas por sus pesos moleculares y, también es útil, para conocer cuáles de estas son específicas de algún órgano de *N. alata*. En este caso destaca la presencia, en todos los órganos, de dos proteínas una de 36KDa y otra de 34KDa aproximadamente, siendo muy abundante la proteína de 34KDa en los extractos de sépalos (S) y hoja (H) (figura 15). Las proteínas que se separaron en el gel de poliacrilamida, fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa para inmunodetectar a la NaTrxh por western-blot con los anticuerpos anti-NaTrxh sin purificar. En estos ensayos se observa que estos anticuerpos tienen reacción cruzada tanto con proteínas de alto peso molecular (sobre todo en el extracto de estilo de etapa madura) (figuras 16A y 16B-E5), como con proteínas de peso molecular muy cercano al de la NaTrxh nativa (~16KDa) (figura 16B). Además se observa que la NaTrxh se expresa en todos los órganos de la planta (figuras 16A y 16B).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

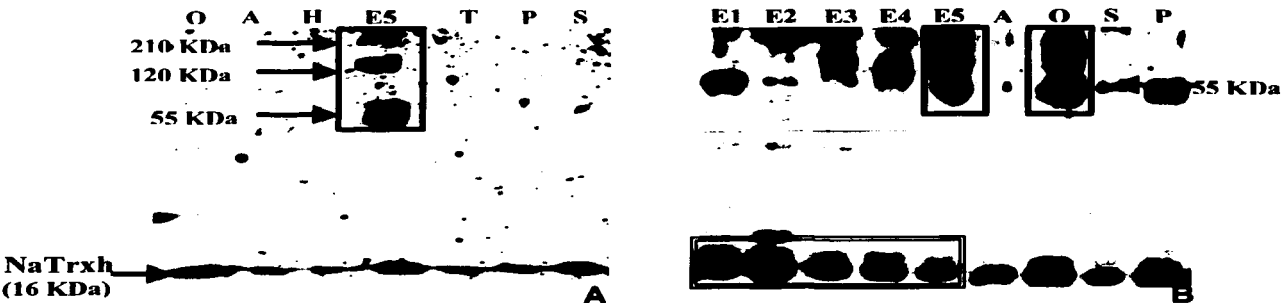


Figura 16. Inmunodetección por western-blot de la NaTrxh en extractos de proteínas totales de diferentes órganos de *N. alata*: con los anticuerpos anti-NaTrxh sin purificar: (A) título 1:100 y (B) 1:500. En el recuadro inferior izquierdo de la figura B, se muestran las proteínas de peso molecular muy cercano al de la NaTrxh en el estilo. En los cuadros del centro, las proteínas de alto y mediano peso molecular en estilo y ovario de etapa madura. (O) ovario, (A) antera, (H) hoja, (E1, 2, 3, 4 y 5) estilos de diferentes etapas de desarrollo, (T) tallo, (P) pétalos y (S) sépalos.

Otro aspecto importante de estos ensayos son los títulos o diluciones de los anticuerpos probados. En el ensayo de la figura 16A se utilizó un título de 1:100, mientras que en el ensayo de la figura 16B el título fue de 1:500 y, a pesar de que estos últimos anticuerpos están más diluidos, sí pueden detectar a las proteínas de 210, 120 y 55 KDa en los extractos de ovario, sépalos y pétalos (figura 16B), señal que no se observa con el título 1:100 (figura 16A).

Lo anterior puede ser provocado por los ciclos de congelación-descongelación a los que se han sometido los anticuerpos ya que la inmunodetección con el título 1:500, se realizó con anticuerpos recién obtenidos y, los anticuerpos con título 1:100, ya habían sido utilizados en experimentos previos.

También es probable que la transferencia de las proteínas a la membrana de nitrocelulosa no se haya realizado por completo, pero si las proteínas de 210, 120 y 55 KDa son igual de abundantes en estilo y ovario y, una parte de estas fue transferida en el extracto de estilos, en el ensayo de la figura 16A también debieron ser inmunodetectadas y, al no ser así, se apoya la hipótesis de una posible degradación de los anticuerpos.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Debido a las reacciones cruzadas de los anticuerpos anti-NaTrxh con otras proteínas, se procedió a desarrollar anticuerpos contra un péptido de una región hidrofílica y expuesta al disolvente de la NaTrxh. Para diseñar el péptido se tomó la secuencia aminoacídica de la NaTrxh para realizar un análisis de hidrofiliidad (Hopp & Woods) y conocer qué aminoácidos de esta proteína son hidrofílicos y, por lo tanto, fuera posible que resultaran un buen sitio antigénico al estar expuestos como se muestra en la figura 17.

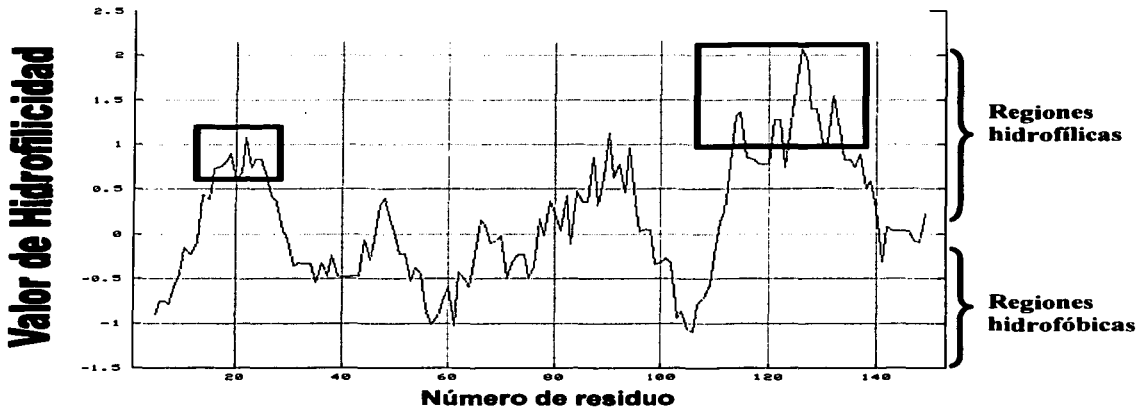


Figura 17. Perfil de hidrofiliidad Hopp & Woods (**ExPASy Proteomics Tools**[®]) de la NaTrxh inferida del cDNA-NaTrxh. En los cuadros se muestran las regiones hidrofílicas hacia los extremos amino y carboxilo de la NaTrxh.

Es importante señalar que el péptido seleccionado para su síntesis corresponde a una región hacia el extremo amino de la NaTrxh; esta región no se encuentra conservada entre otras tiorredoxinas, como se observa en el alineamiento múltiple a nivel de aminoácidos de la figura 18.

El perfil de hidrofiliidad también señalaba otra región hidrofílica hacia el extremo carboxilo con alta potencialidad de ser antigénica. Sin embargo, ésta fue descartada porque es una región conservada con otras tiorredoxinas (figuras 17 y 18).

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

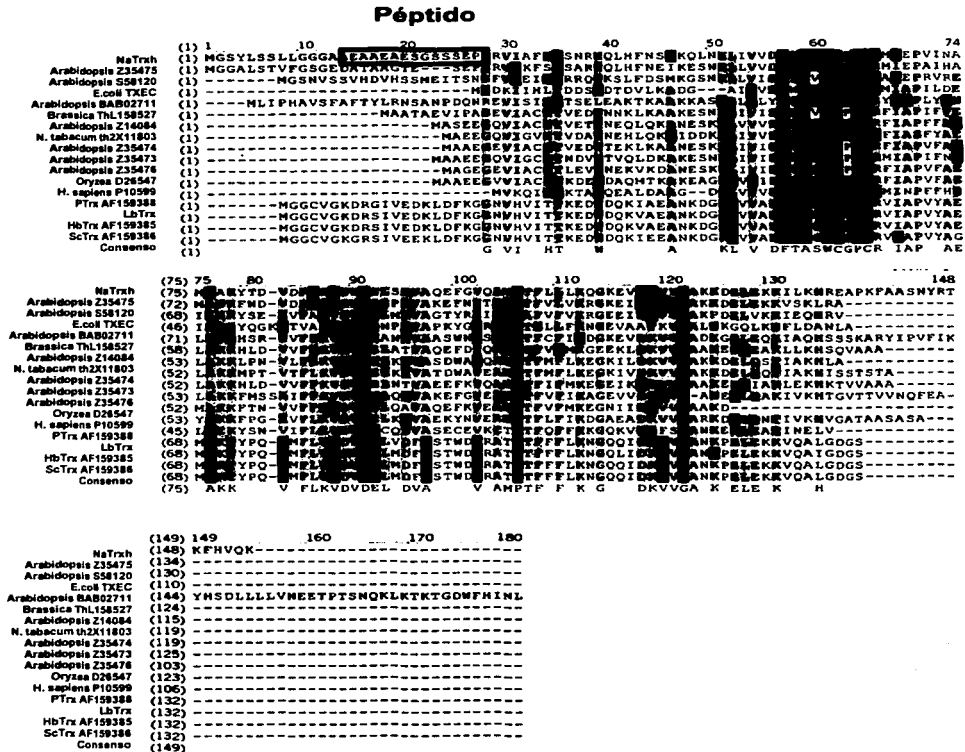


Figura 18. Alineamiento múltiple a nivel de aminoácidos (programa Vector NTI Suite 5.5) de diferentes secuencias de tioredoxinas con la NaTrxh, inferida a partir del cDNA-NaTrxh, donde se puede observar las regiones poco conservadas entre éstas hacia los extremos amino y carboxilo. Las regiones sombreadas en negro muestran los residuos de aminoácido que son idénticos, las regiones de color gris oscuro muestran los aminoácidos conservados y las regiones de color gris claro muestran los aminoácidos que sólo son similares. En el cuadro se muestra la secuencia de 13 aminoácidos seleccionada para el diseño del péptido.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

Se sabe que las moléculas pequeñas, como este péptido, no son buenos inmunógenos, es decir, no pueden provocar una respuesta inmunológica como la producción de anticuerpos, por lo que, generalmente se unen a una molécula transportadora muy antigénica para que tengan efecto en el organismo al que se le administren.

Así, el péptido diseñado se acopló a hemocianina (KLH), una proteína de gran tamaño proveniente de un molusco, a través de enlaces disulfuro (método MBS o del éster de m-maleimido-benzoilhidroxisuccinimida) (Frederick *et al.*, 1997).

Los anticuerpos obtenidos, después de la inmunización con el péptido (220 µg) acoplado a hemocianina, se analizaron también por western-blot utilizando membranas con 2 µg de la NaTrxh recombinante (figura 19A) y con extractos de proteínas totales de estilo y antera (figura 19B). Estos anticuerpos reconocen a la NaTrxh recombinante (2M), con una señal casi tan intensa como la del control positivo (C+) (figura 19A); con este ensayo se determinó también su título (1:100). también, reconocen a la NaTrxh nativa en extractos de proteínas totales de estilo y antera de etapa madura (figura 19B).

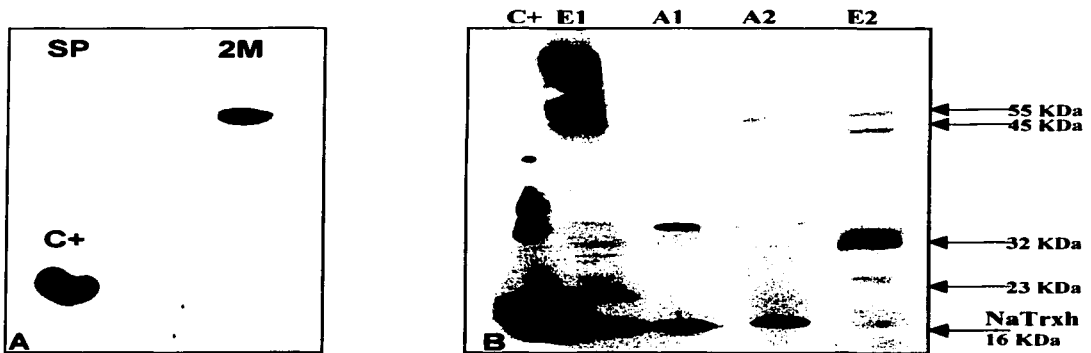


Figura 19. Inmunodetección por western-blot de la NaTrxh con: (A) suero preinmune y los anticuerpos anti-péptido para determinar su título. (C+) control positivo, (SP) suero preinmune título 1:100 y (2M) anticuerpos anti-péptido extraídos de la 2ª muestra sanguínea título 1:100, todos probados en membranas con 2 µg de la NaTrxh recombinante y (B) anticuerpos anti-péptido también de la 2ª muestra sanguínea pero probados en membranas con extractos de proteínas totales de estilo y antera. (E1) membrana con extracto de estilos y (A1) membrana con extracto de anteras, ambas hidridadas con anticuerpos anti-NaTrxh sin purificar título 1:100, (A2) y (E2) duplicado de las membranas A1 y E1, respectivamente, pero hibridadas con anticuerpos anti-péptido sin purificar título 1:100.

En el extracto de proteínas totales de antera, los anticuerpos anti-péptido además de reconocer a la NaTrxh (~16KDa), cruzan con una proteína de 55 KDa (figura 19B-A2). En el extracto de estilos, reconocen débilmente a la NaTrxh y cruzan con cuatro proteínas de pesos moleculares muy variados 55, 45, 32 y 23 KDa, respectivamente (figura 19B-E2). La señal de reconocimiento de la NaTrxh nativa, en el extracto de antera por los anticuerpos anti-péptido, es casi tan intensa como la que se observa en los controles positivos A1 y E1, membranas hibridadas con los anticuerpos anti-NaTrxh sin purificar (figura 19B), pero en el estilo el reconocimiento de la NaTrxh fue muy pobre (figura 19B-E2). Con el diseño del péptido se eliminaron las reacciones cruzadas con proteínas de peso molecular cercano al de la NaTrxh pero aumentaron las reacciones cruzadas con proteínas de mediano y bajo peso molecular. Y, aunque el reconocimiento de los anticuerpos anti-péptido no fue el esperado, sobre todo en el extracto de proteínas totales de estilos maduros, se pensó en su purificación al igual que los anticuerpos anti-NaTrxh por cromatografía de afinidad en columna.

Para elaborar la columna de purificación (Affigel-10/NaTrxh), fue necesario sobreexpresar el cDNA-NaTrxh clonado en el vector pGEX (ver sección de material y métodos figura 20) en un trabajo previo; este vector es útil porque permite la expresión de polipéptidos acoplados a la proteína citoplasmática GST (~29KDa). La sobreexpresión fue necesaria porque se requirió una gran cantidad de la NaTrxh recombinante (35 mg) para utilizarla como ligando.

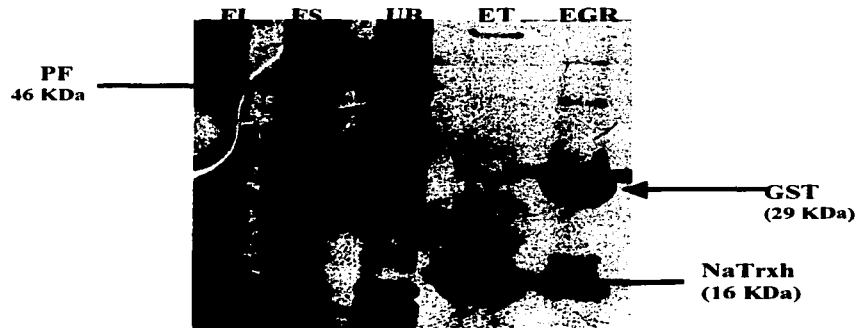


Figura 21. Análisis electroforético por SDS-PAGE al 12.5% de las fracciones de purificación de la proteína de fusión (GST-NaTrxh) después de la sobreexpresión del cDNA-NaTrxh. (FI) fase insoluble, (FS) fase soluble, (UB) fracción no unida, (ET) eluato con trombina (NaTrxh), (EGR) eluato con glutatión reducido (GST), (PF) proteína de fusión.

Después de la sobreexpresión del CDNA-NaTrxh en bacterias de *E. coli* cepa BL21(DE3)pLysS, se purificó la NaTrxh recombinante de la fase soluble del sonificado bacteriano con: a) la resina Glutación-Sepharosa 4B, que tiene como ligando glutatión oxidado (molécula afin a la proteína GST) y que permite separar la proteína de fusión (GST-NaTrxh) de la fase soluble y b) la proteasa trombina, que corta la proteína de fusión entre al extremo carboxilo de la proteína GST y el extremo amino de la NaTrxh. Todas las fracciones de purificación de la NaTrxh recombinante se analizaron por SDS-PAGE (figura 21). En la figura 21 se muestran las proteínas de la fase soluble del sonificado bacteriano (FS); en esta fase se observa un gran número de proteínas siendo muy evidente la presencia de la proteína de fusión o quimérica (GST-NaTrxh) de aproximadamente 46 KDa que demuestra que la sobreexpresión se llevó a cabo satisfactoriamente. También, se observa la fracción del eluato con trombina (ET) donde la NaTrxh recombinante (~16KDa) fue separada de la proteína GST; esta fracción está contaminada por una proteína de 29 KDa que corresponde a la GST, la contaminación pudo presentarse por el arrastre de la resina de agarosa (con GST unida) durante la separación de la fracción, por ello, debe cuidarse mucho esta etapa durante la purificación. Se ve además la fracción de elución con glutatión reducido (EGT), donde se encuentra la proteína GST libre (29 KDa); esta fracción está contaminada pero con la propia NaTrxh y, con dos proteínas de alto peso molecular, lo cual, refleja que no se está recuperando por completo la NaTrxh recombinante y, por lo tanto, debe optimizarse este paso en la purificación para no perderla.

Con la NaTrxh recombinante purificada se elaboró la columna de Affigel-10/NaTrxh, pero antes de purificar los anticuerpos anti-NaTrxh con ésta, se pasaron a través de la columna de proteína A-agarosa para separar del suero sólo las inmunoglobulinas G (IgG's), que son los anticuerpos con todas las especificidades.

Tabla 6. Purificación de los anticuerpos anti-NaTrxh con la columna de proteína A-agarosa.

Fración de elución:	A₂₈₀ nm
1	0.000
2	0.018
3	2.654
4	1.231
5	0.069
6	0.010
7	0.001
8	0.000

La purificación de IgG's se logra gracias a que el ligando de la columna es la proteína A del *Stafilococcus aureus*, una proteína que tiene la propiedad de unirse específicamente a la región Fc de las IgG's de mamíferos.

Los valores de absorbancia a 280 nm de las fracciones de elusión colectadas, números en negritas (tabla 6), son las que poseen la mayor cantidad de IgG's y, por lo tanto, fueron las que se mezclaron y utilizaron en el siguiente ensayo de purificación.

Estas fracciones se purificaron después con la columna de Affigel-10/NaTrxh para obtener las IgG's específicas contra la NaTrxh, pero debido a las dos etapas de purificación (columnas de proteína A-agarosa + Affigel-10/NaTrxh), se perdió una gran proporción de anticuerpos. Esto se sabe por las lecturas de absorbancia a 280 nm tan bajas en ésta purificación con dos columnas (tabla 7), comparadas tanto con las lecturas de purificación con una columna (Affigel-10/NaTrxh) (tabla 7) y como con los perfiles de elusión (figura 22).

Los números en negritas corresponden a las fracciones que tienen la mayor proporción de anticuerpos y, en ambas purificaciones (con una y dos columnas), pareciera que la cantidad de estos es casi igual (tabla 7); sin embargo, si comparamos los perfiles de elusión se ve claramente que es un poco mayor la cantidad de anticuerpos, específicos contra la NaTrxh, cuando sólo se purifican con la columna de Affigel-10/NaTrxh (figura 22).

A pesar de que la elusión de los anticuerpos tiene un máximo entre la 3ª y 4ª fracción (tabla 7), existen más fracciones con lecturas tan altas como las del máximo de elusión, por lo que, fue necesario mezclar un número mayor de éstas (hasta 6); la desventaja de esto es que los anticuerpos quedan distribuidos en un volumen mayor y deben ser liofilizados.

La distribución de los anticuerpos en cada fracción refleja la fuerza de la interacción entre estos y el ligando acoplado en la columna y, la capacidad del buffer de elusión, para romper con esta.

Tabla 7. Purificación de los anticuerpos anti-NaTrxh con dos columnas (proteína A-agarosa y Affigel – 10/NaTrxh) y sólo con la columna de Affigel-10/NaTrxh.

Fracción de elusión:	A ₂₈₀ nm (dos columnas)	A ₂₈₀ nm (una columna)
1	0.000	0.000
2	0.013	0.009
3	0.040	0.033
4	0.051	0.061
5	0.041	0.084
6	0.034	0.059
7	0.020	0.044
8	0.018	0.009

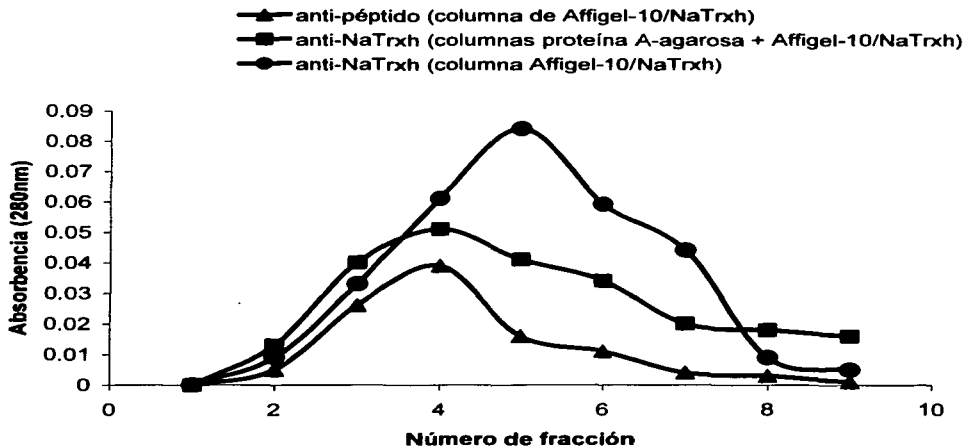


Figura 22. Comparación de los perfiles de elución de los anticuerpos: (■) anti-NaTrxh purificados con dos columnas (proteína A-agarosa + Affigel-10/NaTrxh), (●) anti-NaTrxh y (▲) anti-péptido, ambos purificados sólo con la columna de Affigel-10/NaTrxh.

Por el empobrecimiento de anticuerpos monoespecíficos (anti-NaTrxh) en las fracciones de elución, se descartó la purificación secuencial (con dos columnas cromatográficas) de los anticuerpos anti-NaTrxh y, la única purificación realizada a ambos tipos de anticuerpos (anti-NaTrxh y anti-péptido), fue con la columna de Affigel-10/NaTrxh.

En el caso de los anticuerpos anti-péptido purificados con Affigel-10/NaTrxh, se obtuvieron valores de absorbancia a 280 nm muy bajos, tanto de los anticuerpos extraídos de la 2ª muestra sanguínea (2M) como de los obtenidos en la punción cardíaca (tabla 8). Su perfil de elución (figura 22 ▲), también muestra que en las fracciones colectadas hay una pequeña cantidad de anticuerpos específicos contra la NaTrxh; ésto puede deberse a que el número de epítopes contra los que se producen anticuerpos es menor al reducirse el tamaño del polipéptido, en este caso, se trata de un péptido de tan sólo 13 aminoácidos comparado con la NaTrxh recombinante completa de 153 aminoácidos.

A pesar, de que el péptido se acopló a hemocianina y se administró en cantidad suficiente (220 µg por cada mL de suspensión inoculada), el título de anticuerpos fue bajo (1:100) y, por lo tanto, es baja la cantidad de estos después de la purificación cromatográfica, esto en comparación con los anticuerpos anti-NaTrxh purificados con la misma columna (tabla 7).

Tabla 8. Purificación de los anticuerpos anti-péptido (extraídos de la segunda muestra sanguínea y de la punción cardiaca) con la columna de Affigel-10/NaTrxh.

Fracción de elusión:	(2ª muestra) A _{280 nm}	(Punción) A _{280 nm}
1	0.000	0.000
2	0.005	0.058
3	0.026	0.035
4	0.039	0.005
5	0.016	0.002
6	0.011	0.001
7	0.004	0.000
8	0.003	0.000
9	0.001	0.000

Los valores en negritas muestran qué fracciones fueron seleccionadas para los ensayos de inmunodetección por western-blot.

En este caso, sólo se mezclaron cuatro fracciones ya que la mayoría de los anticuerpos eluyeron en éstas (tabla 8).

La especificidad de los anticuerpos anti-NaTrxh purificados con dos columnas (proteína A-agarosa + Affigel-10/NaTrxh), se comprobó en extractos de proteínas totales de varios órganos de *N. alata*, con lo cual, se observó que la NaTrxh se distribuye en todos los órganos de la planta y, que las reacciones cruzadas con proteínas de alto peso molecular (sobre todo en el extracto de estilos), se eliminan completamente (figura 23B), pues al comparar los ensayos de inmunodetección con los anticuerpos anti-NaTrxh sin purificar o crudos y con los anticuerpos purificados con la columna de Affigel-10/NaTrxh, ambos con el mismo título (1:100), en este último sólo se observa la señal de la NaTrxh de aproximadamente 16 KDa en todos los órganos (figura 23B) y, aunque la señal no es tan intensa como la que se obtiene con los anticuerpos sin purificar (figura 23A), muestra que la purificación fue exitosa.

El que la señal de reconocimiento de la NaTrxh fuera tan débil en el extracto de estilo, probablemente se deba a que los anticuerpos utilizados fueron purificados con dos columnas, por lo tanto, también fue importante probar los anticuerpos anti-NaTrxh que sólo se purificaron con una columna (Affigel-10/NaTrxh) (figura 24B).

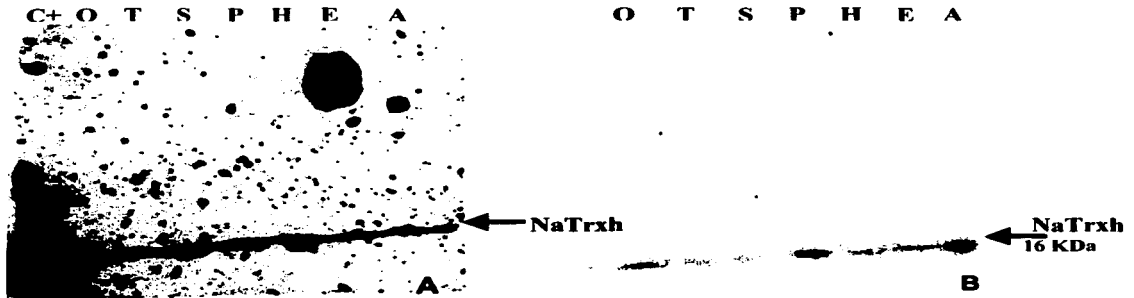


Figura 23. Inmunodetección por western-blot de la NaTrxh en extractos de proteínas totales de diferentes órganos de *N. alata*: **A)** con los anticuerpos anti-NaTrxh sin purificar y **B)** con los anticuerpos anti-NaTrxh purificados con las columnas de proteína A-agarosa y Affigel-10/NaTrxh, ambos en título 1:100. (O) ovario, (T) tallo, (S) sépalos, (P) pétalos, (H) hoja, (E) estilo, (A) antera y (C+) control positivo.

Los anticuerpos anti-péptido purificados (sólo con la columna de Affigel-10/NaTrxh), también se probaron en extractos de proteínas totales de diferentes órganos de *N. alata* (figura 24).

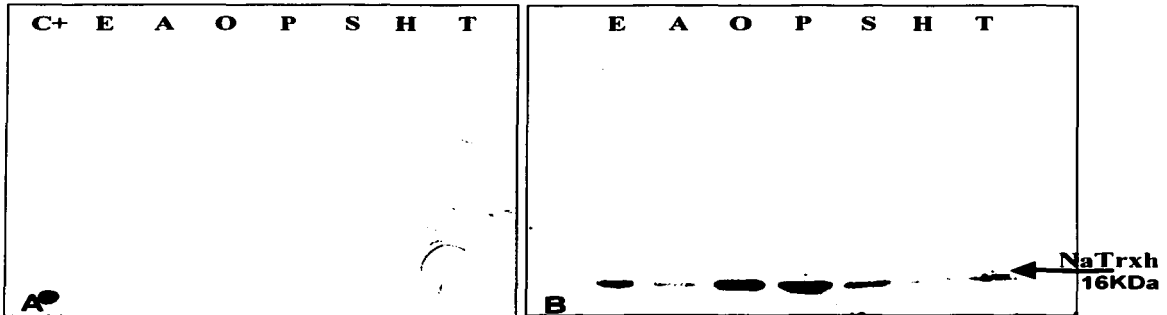
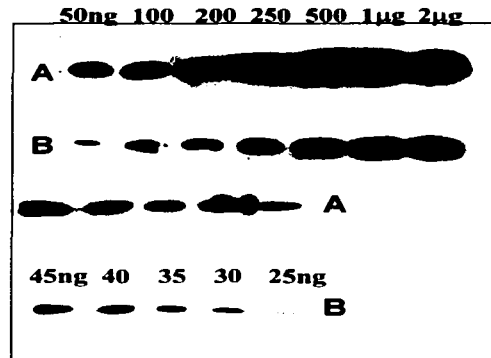


Figura 24. Inmunodetección por western-blot de la NaTrxh en extractos de proteínas totales de diferentes órganos de *N. alata*: **A)** con los anticuerpos anti-péptido y **B)** con los anticuerpos anti-NaTrxh, ambos purificados sólo con la columna de Affigel-10/NaTrxh y con título 1:100. (E) estilo, (A) antera, (O) ovario, (P) pétalos, (S) sépalos, (H) hoja, (T) tallo y (C+) control positivo.

Pero los anticuerpos anti-péptido no mostraron reconocimiento de la NaTrxh nativa (figura 24A), comparado con el reconocimiento que muestran los anticuerpos anti-NaTrxh purificados con la misma columna (figura 24B).

Inicialmente, se pensó que esto se debía a que la cantidad de la NaTrxh presente en los extractos era muy baja y se procedió a precipitar las proteínas de los extractos con acetona y a concentrarlos por liofilización, pero tampoco hubo reconocimiento (resultados no mostrados).

No obstante, los anticuerpos anti-péptido purificados reconocen cantidades de hasta 25 ng de la NaTrxh recombinante (figura 25B), la cual, se tomó como patrón para el diseño del péptido y, aunque no producen una señal tan intensa como los anticuerpos anti-NaTrxh (figura 25A), su señal es muy evidente y casi comparable con la de estos.



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Figura 25. Inmunodetección por western-blot de la NaTrxh con diferentes cantidades de NaTrxh recombinante (de 25ng hasta 2 µg) utilizando los anticuerpos anti-NaTrxh (A) y anti-péptido (B), ambos purificados sólo con la columna de Affigel-10/NaTrxh con un título 1:100.

Esta diferencia en el reconocimiento de las NaTrxh (recombinante y nativa), puede deberse que la NaTrxh recombinante (que se expresa en *E. coli* y después se purifica de la fase soluble del sonificado bacteriano), presente un plegamiento diferente al que tiene la NaTrxh nativa y que, a pesar, de que ambas se reduzcan con β -mercaptoetanol y ditiotreitól (DTT), no exponen los mismos sitios de unión a anticuerpos (epitopes), sin olvidar que el número de estos es menor en el caso del péptido diseñado. Por lo tanto, los anticuerpos anti-péptido puedan reconocer muy bien a la NaTrxh recombinante y no así a la tiorredoxina nativa. Por lo anterior, los anticuerpos anti-péptido no se utilizaron en los ensayos de inmunolocalización.

Las primeras inmunolocalizaciones de la NaTrxh se realizaron con el sistema DAKO-LSAB que tiene como reactivos un segundo anticuerpo unido a biotina (pequeña molécula hidrofóbica que sirve como coenzima de carboxilasas) y una peroxidasa acoplada a moléculas de estreptavidina (proteína de *Streptomyces* sp.).

Cuando el anticuerpo primario (anti-NaTrxh) se une a su antígeno celular puede entonces acoplarse a éste el anticuerpo secundario (anti-conejo marcado con biotina); la presencia de la molécula de biotina asegura la unión específica de la peroxidasa al segundo anticuerpo, pues la enzima está acoplada a estreptavidina que se une, a su vez, fuertemente a las moléculas de biotina.

Aprovechando este sistema se probaron los anticuerpos anti-NaTrxh sin purificar como control positivo en diferentes órganos de *N. alata* y el suero preinmune como control negativo.

La reacción positiva se determina con la presencia de un precipitado café-rojizo (debido al cromógeno DAB) en el sitio donde se ubica el antígeno celular. En la figura 26A se ve claramente este tipo de señal positiva, sobre todo el tejido, en los cortes longitudinales de pistilo (estigma, estilo y ovario).

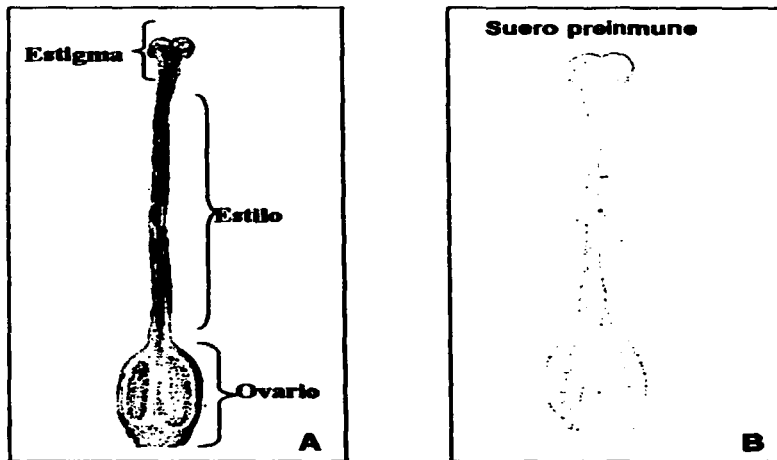


Figura 26. Inmunolocalización (DAKO-LSAB) de la NaTrxh en cortes longitudinales del pistilo de *N. alata* con: (A) los anticuerpos anti-NaTrxh sin purificar y (B) con suero preinmune, ambos título 1:100.

Resultados y discusión

La señal positiva en el pistilo es casi tan intensa como la que se observa en los cortes de antera (figura 27 A+) y, no así, en los cortes de hoja y tallo (figura 27 H+ y T+).

La reacción negativa se distingue fácilmente por el color azul que le brinda al tejido la hematoxilina, el reactivo de contraste (figuras 26B y 27 A- y O-).



Figura 27. Inmunolocalización (DAKO-LSAB) de la NaTrxh en cortes transversales y longitudinales de diferentes órganos de *N. alata*: con anticuerpos anti-NaTrxh sin purificar título 1:100. Los controles negativos fueron tratados con suero preinmune y contrastados con hematoxilina, por lo que, se tifen de color azul y se distinguen fácilmente de las reacciones positivas. (A+) antera positiva, (A-) antera negativa, (O+) ovario positivo, (O-) ovario negativo, (T+) tallo positivo y (H+) hoja positiva.

Los resultados muestran que las inmunolocalizaciones de la NaTrxh se están realizando de forma adecuada y, además, concuerdan en cierto grado con lo encontrado en los ensayos de inmunodetección por western-blot, pues los anticuerpos anti-NaTrxh sin purificar reconocen, además de la NaTrxh nativa, proteínas que son muy abundantes en los tejidos reproductivos femeninos (estigma-estilo y ovario), pero que también están presentes en pétalos y sépalos, pero no en antera, tallo y hoja como se observa en el ensayo de inmunodetección de la figura 18A. Sin embargo, no brindan información confiable ya que el suero anti-NaTrxh tiene reacción cruzada con otras proteínas.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

A pesar de que la señal positiva es débil en tallo y hoja comparada con la del pistilo, no debería verse tan intensa en antera, pues esta última señal hace pensar que la presencia de la NaTrxh es real en este órgano ya que en este la señal no puede ser provocada por la presencia de las proteínas de 210, 120 y 55 KDa, pues esta no se observan en el extracto de antera (ensayo de inmunodetección figuras 16A y 16B). Aunque cabe la posibilidad, de que sea una señal inespecífica, por lo que, es muy necesaria la purificación de los anticuerpos anti-NaTrxh.

Contrario a lo que se esperaba, las inmunolocalizaciones con los anticuerpos anti-NaTrxh purificados con una (Affigel-10/NaTrxh) y dos columnas (proteína A-agarosa + Affigel-10 /NaTrxh), no fueron exitosas. En los tejidos del estigma y estilo no hay señal de precipitación alguna (figura 28A y 28B). Y, aunque se utilizaron títulos de anticuerpos más bajos (anticuerpos menos diluidos), tampoco se logró observar señal positiva sobre el tejido.

Este resultado hace pensar que probablemente la cantidad de la NaTrxh es tan baja en el tejido que el número de anticuerpos que se le unen no es el suficiente para desarrollar una reacción de precipitación del cromógeno visible sobre el tejido. Pero más probable es el hecho de que, durante la fijación del tejido, se haya modificado el arreglo tridimensional de la NaTrxh y esto provocara el enmascaramiento de los sitios antigénicos (epitopes), por lo que, el anticuerpo primario no puede unirse al tejido y, sin éste, no se puede llevar a cabo ningún acoplamiento entre el anticuerpo secundario y la peroxidasa, con lo cual, no hay reacción de precipitación.

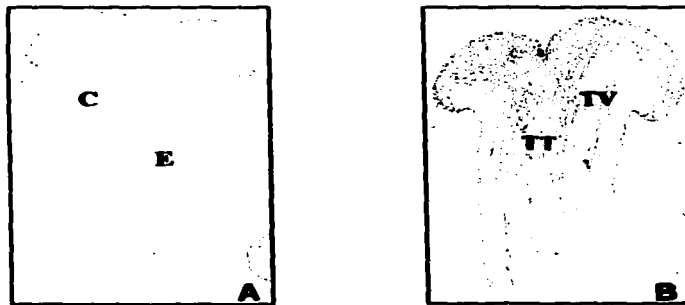


Figura 28. Inmunolocalización (DAKO-LSAB) de la NaTrxh en cortes longitudinales de estilo de *N. glauca* con: A) los anticuerpos anti-NaTrxh purificados por dos columnas y B) purificados sólo con la columna de Affigel-10/NaTrxh, ambos título 1:100. (E) epidermis, (TV) tejido vascular, (C) cortex, (TT) tejido de transmisión. El tejido muestra el color característico del tejido sin tratamiento.

El equipo DAKO-LSAB incluye un buffer de reconstitución antigénica que corrige este fenómeno de enmascaramiento y, aunque se probaron distintas condiciones de reconstitución, tampoco se logró observar la señal positiva sobre el tejido incubado con los anticuerpos anti-NaTrxh purificados con una y dos columnas.

Otros factores muy importantes que pudieran estar involucrados en la ausencia de señal positiva se presentan durante el tratamiento del tejido. Primero, el tejido debe fijarse con paraformaldehído (en PBS 1X) recién preparado.

Al poner en contacto el tejido con el fijador este debe estar frío (4°C) para asegurar una penetración adecuada y, el tiempo de fijación, no debe ser excesivo (2 a 3 horas) para no enmascarar sitios antigénicos. Además, su deshidratación y rehidratación deben ser graduales para no dañarlo y los lavados prolongados con xilol pueden endurecerlo; durante su preinclusión e inclusión con parafina, la temperatura de la estufa no debe ser mayor a 60°C. Y una vez que se ha infiltrado con parafina, no debe permanecer por más de 24 horas en la estufa, es decir, que inmediatamente después de concluir la etapa de inclusión debe colocarse en bloques para ser cortado en el microtomo. En resumen y, como en todo experimento, existen variables que deben vigilarse estrechamente y, las mencionadas anteriormente, pueden determinar en gran parte el éxito de este tipo de ensayos de tinción inmuno-histoquímica (IHQ).

Pensando entonces, que el tratamiento tan exhaustivo del tejido, pudiera estar dañándolo o modificando su estructura celular y, tomando en cuenta la posibilidad de una realmente baja cantidad de antígeno (NaTrxh) en el tejido, se utilizó un sistema de tinción inmuno-histoquímica diferente; este cuenta con un segundo anticuerpo anti-conejo marcado con isotiocianato de fluoresceína (DAKO-FITC), una molécula que puede ser excitada con luz UV de cierta longitud de onda (278 nm), lo cual, aumenta o enriquece la señal que genera un antígeno celular presente en baja concentración, como puede ser el caso de la NaTrxh.

Los ensayos de inmunolocalización de la NaTrxh con este nuevo sistema sólo se llevaron a cabo en cortes longitudinales del estigma y estilo de *N. alata*, pues lo más importante era conocer su localización en los diferentes tejidos que los forman como son: la epidermis, el tejido vascular, el cortex y el tejido de transmisión (TT), sobre todo en este último tejido cuya matriz extracelular (MEC) es muy rica en cierto tipo de glicoproteínas, específicamente proteínas ricas en hidroxiprolinas (HRGPs), como las ricas en arabinogalactanos específicas del tejido de transmisión (NaTTS) y las S-RNasas (determinantes genéticas femeninas del rechazo de polen alelo-S específico), todas además ricas en residuos de cisteína e involucradas en el proceso de polinización.

Por ello, se utilizaron como marcadores de la MEC del tejido de transmisión del estilo y controles positivos, anticuerpos anti-S₁₀₅ RNasa y anti-NaTTS, en los primeros ensayos de inmunolocalización con fluorescencia, para así conocer cómo debía observarse una señal positiva sobre el tejido.

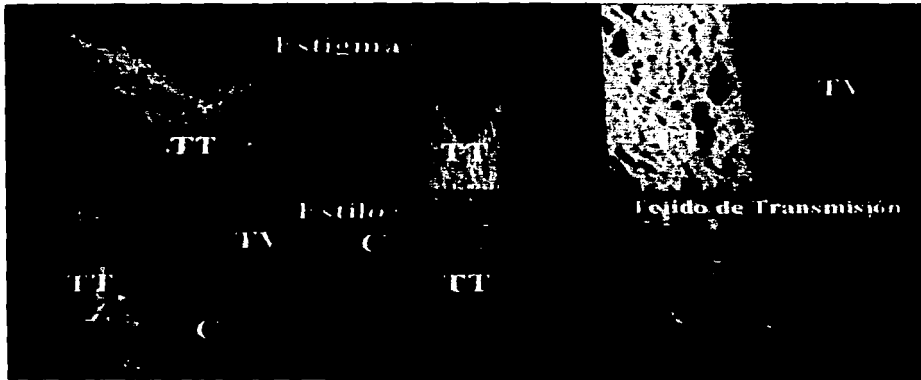


Figura 29. Inmunolocalización (DAKO-FITC) de la S_{105} -RNasa en cortes longitudinales de estilo de *N. alata* con anticuerpos anti-RNasa S_{105} título 1:10,000. (TV) tejido vascular, (C) cortex y (TT) tejido de transmisión.

La señal fluorescente positiva es de color verde y, en el caso de la S_{105} -RNasa, se observa específicamente en el tejido de transmisión (TT) tanto del estilo como el estigma (figura 29); esto muestra que la tinción IHQ se realizó correctamente y se comprueba, de forma experimental, que la S_{105} -RNasa se localiza sólo en el tejido de transmisión (TT).

La señal positiva generada por la presencia de la proteína NaTTS, es de color más verdoso y menos intenso, que el observado en los ensayos de inmunolocalización con la S_{105} -RNasa; ésto es lógico debido a la abundancia de RNasas en este tejido, pues constituyen alrededor del 30% del total de proteínas (Raghavan *et al.*, 1997), mientras que la proteína NaTTS se encuentra en un porcentaje menor, de hecho, en los ensayos de inmunolocalización se utilizaron anticuerpos contra estas en diferentes títulos.

Para el ensayo con la S_{105} -RNasa este fue de 1:10,000, es decir, que los anticuerpos estaban muy diluidos pero la proteína es tan abundante que aún con este título puede observarse una señal intensa y definida. En cambio, con los anticuerpos anti-NaTTS, la dilución fue menor tres veces menor (título 1:3,000) y, sin embargo, la señal positiva es evidente pero más tenue, aunque también es posible observarla sobre el tejido de transmisión tanto del estigma y del estilo (figura 30).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Figura 30. Inmunolocalización (DAKO-FITC) de la proteína NaTTS en cortes longitudinales de estilo de *N. alata* con anticuerpos anti-NaTTS título 1:3,000. (TV) tejido vascular, (C) cortex y (TT) tejido de transmisión.

La señal positiva provocada por la proteína NaTTS es más intensa en el tejido de transmisión del estilo (TT) y no se observa sobre el cortex (C) o el tejido vascular (TV). Con estos ensayos, comprobamos nuevamente que las inmunolocalizaciones se están realizando de forma adecuada y tenemos un patrón de como debe verse la señal provocada por la NaTrxh.

También se probaron, en cortes longitudinales de estilo, los anticuerpos anti-NaTrxh purificados con la columna de Affigel-10/NaTrxh y como control negativo en se utilizó el suero preinmune.

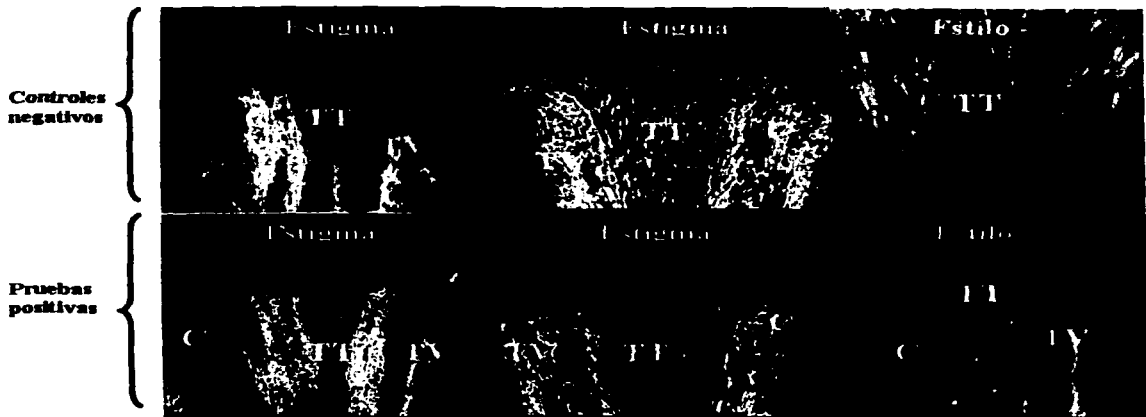


Figura 31. Inmunolocalización (DAKO-FITC) de la NaTrxh en cortes longitudinales de estilo de *N. alata* con suero preinmune y con los anticuerpos anti-NaTrxh purificados con la columna de Affigel-10/NaTrxh título 1:100. (Estigma- y Estilo-) tratados con suero preinmune y (Estigma+ y Estilo+) tratados con los anticuerpos anti-NaTrxh purificados. (TV) tejido vascular. (C) cortex y (TT) tejido de transmisión.

La señal fluorescente positiva muestra que la NaTrxh se localiza en el tejido vascular (TV) y el tejido de transmisión (TT), siendo más abundante en este último (figura 31). Además, se puede notar que la señal positiva es menos intensa que en los ensayos con los anticuerpos anti-S₁₀₅ RNasa y anti-NaTTS, lo cual, sugiere que la NaTrxh está presente en el tejido en baja cantidad ya que, a pesar, de utilizar anticuerpos con una dilución baja o muy concentrados (1:100), no se tiene una señal tan intensa como en los ensayos con los controles positivos. La fluorescencia que se observa en el tejido vascular (TV) puede ser auto-fluorescencia del tejido (figura 31), como la que también se presenta en las inmunolocalizaciones de la S₁₀₅ RNasa (figura 29).

Observaciones, a un mayor aumento, en el TT del estilo evidencian que la señal de la NaTrxh es muy marcada en las células de este tejido (figura 32C) y, no así, en las células del cortex (figuras 32A y B) y, definitivamente, esta señal no se observa en las células del TT que fueron tratadas con suero preimmune (figura 32D).

Células del tejido de transmisión

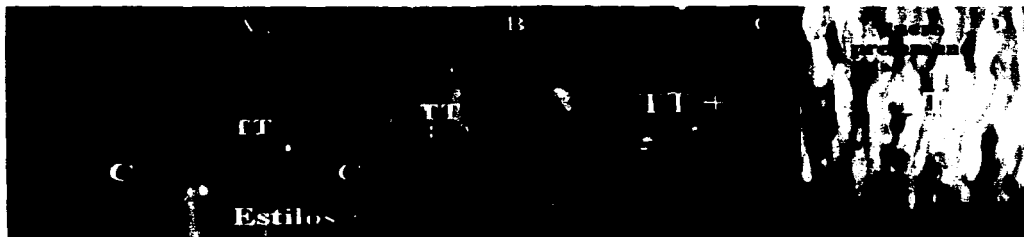


Figura 32. Inmunolocalización (DAKO-FITC) de la NaTrxh con los anticuerpos anti-NaTrxh purificados con la columna de Affigel-10/NaTrxh título 1:100. Acercamientos hacia el cortex (C) y el tejido de transmisión (TT) del estilo de *N. alata*.

Finalmente, se realizaron tres pruebas histoquímicas con las que se comprobó la riqueza de polisacáridos y proteínas del TT del estilo. Estos ensayos se realizaron para corroborar la presencia de proteínas que pueden ser blanco de la NaTrxh.

En la figura 33A se observan cortes longitudinales de estilo que fueron teñidos por dos técnicas: la técnica APS (ácido peryódico-reactivo de Schiff) y la técnica azul-negro de naftol.

Con la primera de estas, se pone de manifiesto la presencia de polisacáridos (se tiñen de color púrpura), mientras que con la tinción con azul-negro de naftol se tiñen de color azul oscuro las proteínas.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Los colores azul y púrpura tan intensos que se observan en todo el TT, tanto en estigma como en estilo (figura 33A), muestra que en este tejido los polisacáridos y las proteínas son los componentes más abundantes.

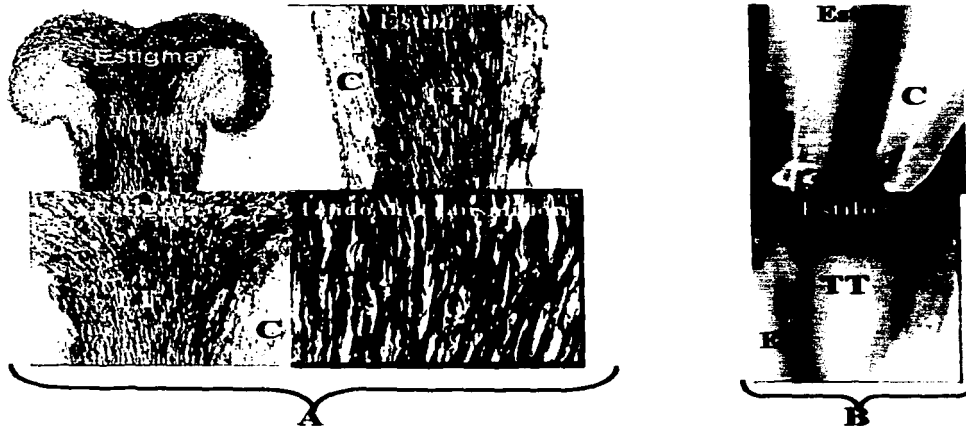


Figura 33. Pruebas histoquímicas: A) técnicas APS (detecta polisacáridos) y azul-negro de naftol (detecta proteínas) en cortes longitudinales de estilo y B) técnica con lugol (detecta almidón) en tejido estilar de *N. alata* disectado. (E) epidermis, (C) cortex y (TT) tejido de transmisión.

Generalmente, también en este tipo de tejido vegetal es común el almidón y para detectar su presencia se hacen pruebas con lugol (yodo-yoduro de potasio) en cortes de tejido o en tejido disecado; este reactivo tinte las áreas ricas en almidón de color café oscuro. Así, en la figura 33B se observa que el almidón sólo está presente en tejidos como la epidermis (E) y el cortex (C), por lo tanto, los polisacáridos del TT estilar no son glucosa sino, como se ha estudiado ya, otro tipo de azúcares como la arabinosa y galactosa, pues las proteínas que enriquecen este tejido son, entre otras, las AGP cuyos residuos de azúcar representan, en la mayoría de los casos, hasta el 70% de su peso molecular (Showalter, 1993), por esto, la coloración púrpura del tejido es tan intensa (figura 33A). Esta característica de glicosilación es la que les permite nutrir al tubo polínico para que este pueda elongarse hasta alcanzar el ovario (Cheung *et al.*, 1995), sin olvidar, que estas glicoproteínas también se caracterizan por sus residuos de cisteína (Cheung *et al.*, 2001). Y si la NaTrxh, estas glicoproteínas y las S-RNAs coexisten en ese tejido, probablemente interaccionen entre sí.

6. Discusión general

En esta investigación se evaluó la localización tisular de la NaTrxh mediante estudios de inmunolocalización, en los diferentes órganos y tejidos de *N. alata*.

Estudiar la localización tisular de esta tiorredoxina-h es relevante porque algunos resultados en nuestro laboratorio sugieren fuertemente que las S-RNasas son reducidas por ésta, lo cual sugiere, que la NaTrxh podría estar involucrada en la reacción de autoincompatibilidad (AI) a través de la interacción con la S-RNasas (de Nettancourt, 1997; Bernatzky *et al.*, 1988; Franklin, 1995). Las S-RNasas son las determinantes genéticas femeninas alelo S específicas del rechazo de polen en las Solanáceas (McClure *et al.*, 1989; Gary *et al.*, 1991). Aunque, recientemente se han involucrado otros factores genéticos denominados genes modificadores en la reacción de AI (McClure *et al.*, 2000).

Los genes modificadores se han dividido en tres grupos. El grupo I está integrado por factores que afectan directamente la expresión de los genes que determinan la especificidad de la reacción de AI. El grupo II lo componen factores que interactúan genética o bioquímicamente con las determinantes de especificidad y, por lo tanto, son factores que se requieren específicamente para el rechazo del polen. El grupo III incluye genes que funcionan en la respuesta de AI y que también están involucrados en otros eventos de la polinización (McClure *et al.*, 2000).

Ya se conoce la importancia de los genes modificadores en *N. alata* por la identificación del gen HT, cuyo transcrito se expresa fuertemente en estilos de plantas AI de *N. alata* pero no se detecta en estilos de *N. plumbaginifolia* (AC). Este gen codifica una proteína de 101 aminoácidos con una región rica en residuos de asparagina y ácido aspártico en su extremo carboxilo y se ha clasificado en el grupo II, es decir, que su producto génico tiene especificidad de acción en la respuesta AI (McClure *et al.*, 1999).

En nuestro laboratorio estudiamos genes modificadores como factores genéticos que afectan la polinización. Por la técnica de cDNA-AFLP (Amplificación de Fragmentos Polimórficos en Longitud) (Liscum E., 1998), se clonó un gen que se expresa al menos 6 veces más en estilos de plantas AI (*N. alata*) que en plantas AC (*N. plumbaginifolia*). Este gen codifica una tiorredoxina de tipo h de aproximadamente 16.8 KDa (NaTrxh).

La expresión diferencial de este gen y su relativa abundancia en plantas AI de *N. alata*, sugiere que puede ser un gen modificador.

Para comprobar esta hipótesis fue necesario producir anticuerpos policlonales contra la NaTrxh recombinante (expresada en *E. coli*), los cuales, fueron purificados por cromatografía de afinidad. Estos se utilizaron para conocer si la NaTrxh se localizaba en los tejidos reproductivos femeninos de *N. alata*, específicamente si se encontraba en el tejido de transmisión (TT) del estilo, ya que en este se ubican, además de la S-RNasas, otras proteínas ricas en residuos de cisteína como NaTTS, p120, PELP III y CELP (Cheung *et al.*, 2001), pertenecientes al grupo de las glicoproteínas ricas en hidroxiprolinas o HRGPs (Showalter, 1993), que en condiciones redox adecuadas pueden ser también proteínas blanco de la NaTrxh.

Actualmente, se conoce muy bien la composición química de la matriz extracelular (MEC) del TT del estilo de las angiospermas (Hoggart y Clarke, 1984), incluidas Solanáceas como *Nicotiana tabacum* (de Goldman *et al.*, 1992; Bosch *et al.*, 2001) y *N. alata* (Gell *et al.*, 1986; Sedgley y Clarke, 1986; Lind *et al.*, 1994). También, se ha comprobado la participación de algunos de sus componentes en el proceso de polinización, como es el caso de las S-RNasas (Gary *et al.*, 1991; Murfett *et al.*, 1996) y las proteínas p120 y NaTTS (Lind *et al.*, 1996; Cheung *et al.*, 2001). Los componentes más abundantes de esta MEC son glicoproteínas cuyos residuos de azúcar son la arabinosa y la galactosa, por lo cual, se subclasifican como proteínas ricas en arabinogalactanos o AGPs.

Las inmunolocalizaciones de la S-RNasa S₁₀₅, la proteína NaTTS (del tipo AGP) y la NaTrxh, realizadas en el estilo de *N. alata*, permitieron comprobar que éstas se ubican en el tejido de transmisión estilar.

El hecho de que las tres proteínas coexistan en el mismo tejido y que tengan como características en común, además del grado de glicosilación, la presencia de residuos de cisteína en posiciones conservadas (Wu *et al.*, 1993; Cheung *et al.*, 2001), sugiere que la NaTrxh puede modificar su estructura terciaria, ya que la función básica de una tioredoxina es modular la actividad proteica a través de la reducción de puentes disulfuro (Holmgren, 1985, 1989; Bower *et al.*, 1996; Powis Garth *et al.*, 2001) y, en la estructura terciaria típica de las RNasas S_{F11} (Ida Koh *et al.*, 2001) y S₂ (Oxley y Bacic, 1996) de *N. alata* existen 9 cisteínas, de las cuales, 8 se encuentran formando puentes disulfuro (Cys₁₆-Cys₂₁, Cys₄₅-Cys₄₉, Cys₁₅₃-Cys₁₈₆, Cys₁₆₉-Cys₁₈₀).

Además, poseen un residuo de cisteína libre (Cys₉₅) adyacente al puente disulfuro entre las cisteínas 45 y 94 (Cys₄₅-Cys₉₄). La presencia de este grupo tiol libre juega un papel importante en la actividad de las S-RNasas debido a que hace posible la unión de éstas con otras proteínas o, incluso, su dimerización, que sólo requiere pequeños cambios en la conformación de la S-RNasa para presentarse. Ese pequeño cambio de conformación puede ocurrir *in vivo*, tal vez mediado por una tioredoxina-h, permitiendo la interacción tan específica que ocurre entre la S-RNasa y su receptor en el tubo polínico (Oxley y Bacic, 1996).

Por otro lado, en el sistema de AI de *Brassica*, se demostró la participación de las tioredoxinas-h presentes en su estigma (THL-1 y THL-2) en la reacción de AI. Estas inhiben la autofosforilación del receptor de cinasa (SRK) involucrado en el rechazo de polen. Se ha sugerido que, al igual que en células animales, el ligando activa a su receptor al inducir su oligomerización; esto también ocurre con el receptor SRK en presencia de su ligando, la proteína S rica en cisteínas (determinante masculina del rechazo de polen alelo específico), por lo tanto, la THL-1 inhibe la autofosforilación del receptor SRK al impedir su dimerización (Cabrillac *et al.*, 2001).

Las evidencias anteriores apoyan fuertemente la hipótesis de que el gen que codifica la NaTrxh podría ser un gen modificador y, por lo tanto, que la NaTrxh puede participar en el proceso de polinización en *N. alata*.

7. Conclusiones

- Los anticuerpos anti-NaTrxh purificados por cromatografía de afinidad, reconocen específicamente a la tiorredoxina-h nativa de *N. alata*, mientras que los anticuerpos anti-péptido sólo reconocen a la NaTrxh recombinante (expresada en *E. coli*).

- La tiorredoxina-h de *N. alata* (NaTrxh) se localiza principalmente en el tejido de transmisión del estilo.

Perspectivas

Este trabajo de investigación puede extenderse hacia la realización de inmunolocalizaciones por precipitación con partículas de oro, con lo cual, también se desarrollarían análisis por Microscopía Electrónica (ME) para saber con certeza si la tiorredoxina-h de *N. alata* (NaTrxh) se localiza en la matriz extracelular (MEC) del tejido de transmisión del estilo y, vincularla así, con el proceso de polinización, ya que estos eventos ocurren en este tejido.

8. Bibliografía

- Anderson M. A., Sandrin M. S. y Clarke A. E. (1984). A high proportion of hybridomas raised to a plant extract secrete antibody to arabinose or galactose. *Plant Physiol.* **75**: 1013-1016
- Anderson M. A., Harris P.J., Bonig I. y Clarke A. E. (1987). Immunogold localization of α -L-arabinofuranosyl residues in pollen tubes of *Nicotiana glauca* Link et Otto. *Planta* **171**: 438-442
- Bernatzky R., Anderson M. A. y Clarke A. E. (1988). Molecular genetics of self-incompatibility of flowering plants. *Devel Genet.* **9**: 1-12
- Bosch M., Sommer-Knudsen J., Derksen J. y Mariani C. (2001). Class III pistil-specific extensin-like proteins from tobacco have characteristics of arabinogalactan-protein. *Plant Physiol.* **125**: 2180-2188
- Bower M. S. *et al.* (1996). Two members of the thioredoxin-h family interact with the kinase domain of Brassica S locus receptor kinase. *The Plant Cell* **8**: 1641-1650
- Bréhélin C. *et al.* (2000). Characterization of determinants for the specificity of *Arabidopsis* thioredoxins-h in yeast complementation. *The Journal of Biological Chemistry* **275** (41): 31641-31647
- Brugidou C., Isabelle M., Chartier Y. y Meyer Y. (1993). The *Nicotiana glauca* genome encodes two cytoplasmic thioredoxin genes which are differently expressed. *Mol. Gen Genet.* **238**: 285-29
- Cabrillac D., Mark-Cock J., Dumas Christian y Gaude T. (2001). The S-locus receptor kinase is inhibited by thioredoxins and activated by pollen coat proteins. *Nature* **410**: 220-223
- Cheung A. Y., Wang H. y Wu H.-M. (1995). A floral transmitting tissue-specific glycoprotein attracts pollen tubes and stimulates their growth. *Cell* **82**: 385-393
- Cheung A. Y. y Wu H.-M. (1999). Arabinogalactan proteins in plant sexual reproduction. *Protoplasma* **208**: 87-88
- Cheung A. Y., Wu H., de Graaf B. y Mariani C. (2001). Hydroxyproline-rich glycoproteins in plant reproductive tissues: structure, functions and regulation. *Cell Mol. Life Sci.* **58**: 1418-1429

- Cho Myeong-Je *et al.* (1999). Overexpression of thioredoxin-h leads to enhanced activity of starch debranching enzyme (pullulanase) in barley grain. *Plant Biology (PNAS)* **96**(25): 14641-14646
- Clarke A. E., Considine J. A., Ward R. y Knox R. B. (1977). Mechanism of pollination in *Gladiolus*: roles of the stigma and pollen-tube guide. *Ann. Bot.* **41**: 15-20
- Clarke A., Gleeson P., Harrison S. y Knox R. B. (1979). Pollen-stigma interactions: identification and characterization of surface components with recognition potencial. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **76**: 3358-3362
- Cresti M. Pacini E., Ciampolini F. y Sarfatti G. (1977). Germination and early tube development in vitro of *Lycopersicum peruvianum* pollen: ultrastructural features. *Planta* **136**: 239-247
- Cresti M., Hepler P. K., Tiezzi A. y Ciampolini F. (1986). Fibrillar structure in *Nicotiana* pollen: changes in ultrastructure during pollen activation and tube emission. En: *Biotechnology and Ecology of Pollen*, Edit. D. L. Mulcahy, Nueva York, p.p. 283-288
- Darbre. (1986). Analytical Methods. En : *Practical Protein Chemistry*, Edit. WILEY, Nueva York, p.p. 227-335
- Dumas C., Rougier M. Zandanella P., Ciampolini F., Cresti M. y Pacini E. (1978). The secretory stigma in *Lycopersicum peruvianum* Mill.: ontogenesis and glandular activity. *Protoplasma* **96**: 173-187
- Dumas C. y Gaude T. (1981). Stigma-pollen recognition and pollen hydration. *Phytomorphology* **31**: 191-201
- de Graaf B. H., Knuiman B., Bosch M. J. y Mariani C. (2000). The class III pistil-specific extensin-like protein of *Nicotiana tabacum* shows arabinogalactan-protein like characteristics and are non-specificially translocated trough pollen tube walls in vivo. En: *Cell and Developmental Biology of Arabinogalactan Proteins*, (Ed) Nothnagel E., Nueva York, p.p. 283-284
- de Goldman M. H., Pezzoti M., Seurinck J. y Celestina L. (1992). Developmental expresión of tobacco pistil-specific genes encoding novel extensin-like proteins. *The plant Cell* **4**: 1041-1051

- de Nettancourt D. (1977). Incompatibility in angiosperms. 3. Theoretical and applied genetics, Springer Verlag. En: Weissman S M. (1999). Methods of Enzymology, volumen 33, Academic Press, Nueva York, p.p. 35-49
- Elias S. J. y Holmgren A. (2000). Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin-reductase. Eur. J. Biochem. **267**: 6102-6109
- Esaú K. (1965). Anatomy of Seed Plants. Edit. John Wiley&Sons, Nueva York, p.p. 234-271
- Fincher G. B., Stone B. A. y Clarke A. E. (1983). Arabinogalactan proteins: structure, biosynthesis and function. Ann. Rev. Plant Physiol. **34**: 7-70
- Franklin Christopher. (1995). Cell and molecular biology of Self-incompatibility flowering plants. International Reviews of Cytology **158**: 1-64
- Frederick *et al.* (1997). Short Protocols in Molecular Biology, 3^a edición, Ed. WILEY, N. Y., p.p. 11.30-11.31
- Gane A. M., *et al.* (1994). Histochemistry and composition of the cell walls of styles of *Nicotiana alata* Link et Otto. Planta **195**: 217-225
- Gary J. E., McClure B. A., Boning J., Anderson M. A. y Clarke A. E. (1991). Action of the style product of the self-incompatibility gene of *Nicotiana alata* (S-RNase) on in vitro-grown pollen tubes. Plant Cell **3**: 183-271
- Gasser Charles y Robinson-Beers (1993). Pistil development. The Plant Cell. **5**: 1231-1239
- Gell A. C., Bacic A. y Clarke A. E. (1986). Arabinogalactans-proteins of the female sexual tissue of *Nicotiana alata*. I. Changes during flower development and pollination. Plant Physiol. **82**: 885-889
- Gilbert H. I. (1990). Molecular and cellular aspects of thiol-disulfide exchange. Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol. **63**: 69-172
- Goldberg Robert *et al.*, (1993). Anther development: basic principles and practical applications. The Plant Cell **5**: 1217-1229

- Heslop-Harrison Y. y Shivanna K. R. (1977). The receptive surface of the angiosperms stigma. *Ann. Bot.* **41**: 1233-1258
- Heslop-Harrison J. y Heslop-Harrison Y. (1981). The pollen stigma interaction in the grasses. 2. Pollen tube penetration and the stigma response in *Secale*. *Acta Bot. Neerl.* **30**: 289-307
- Heslop-Harrison H., Reger B. J. y Heslop-Harrison J. (1984). The pollen-stigma interaction in the grasses 5. Tissue organization and citochemistry of the stigma ("silk") of *Zea mays* L. *Acta Bot. Neerl.* **33**: 81-89
- Heslop-Harrison J. y Heslop-Harrison Y. (1992). Intracellular motility the actin cytoskeleton and germinability in the pollen of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Sex Plant Reprod.* **5**: 247-255
- Hoggart R. M. y Clarke A. E. (1984). Arabinogalactans are common components of angiosperm styles. *Phytochemistry* **23**: 1571-1573
- Holmgren A. 1979. Thioredoxin catalyzes the reduction of insulin disulfides by dithiothreitol and dihydrolopoamida. *J. Biol. Chem.* **254**(19): 9627-9632
- Holmgren A., (1985). Thioredoxin. *Ann. Rev. Biochem.* **54**: 237-271
- Holmgren A., (1989). Thioredoxin and Glutaredoxin Systems. *The Journal of Biological Chemistry.* **264**(24): 13963-13966
- Hopp y Woods. (1981). Hydrophaty plot. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**: 3824-3828
- Huang S., Lee H.-S., Karunanandaa B. y Kao T. H. (1994). Ribonuclease activity of *Petunia inflata* S proteins is essential for rejection of self-pollen. *Plant Cell* **6**: 1021-1028
- Ida Koh et al. (2001). The 1.55 °A resolution structure of *Nicotiana alata* S_{F11}-Rnasa associated with gametophytic Self-incompatibility. *J. Mol. Biol.* **314**: 103-112
- Jacquot Jean-Peer, Lancelin J.-M. y Meyer Y. (1996) Thioredoxins: structure and function in plant cells. *The Plant Cell* **94**: 543-570

- Jauh G. Y. y Lord E. M. (1996). Localization of pectins and arabinogalactan-proteins in Lily (*Lilium longiflorum* L.) pollen tube and style, and their possible roles in pollination. *Planta* **199**: 251-261
- Kandasamy M. K. y Kristen U. (1987). Developmental aspects of ultrastructure histochemistry and receptivity of the stigma of *Nicotiana sylvestris*. *Ann. Bot.* **60**: 427-737
- Li Y.-Q. y Linskens H. F. (1983). Neutral sugar composition of pollen tube walls of *Lilium longiflorum*. *Acta Bot. Neerl.* **32**: 437-445
- Lind J. L., Bacic A. , Clarke A. E. y Anderson M. A. (1994). A style-specific hydroxyproline-rich glycoprotein with properties of both extensions and arabino-galactan proteins. *Plant J.* **6**: 491-502
- Lind J. L., Bonig I., Clarke A. E. y Anderson M. A. (1996). A style-specific 120 KDa glycoprotein enters pollen tubes of *Nicotiana glauca* in vivo. *Sex. Plant Reprod.* **9**: 75-86
- Liscum Emmanuel. (1998). AFLP: Studies on Plant Development. En: *PCR-Methods Manual*. Universidad de Columbia, USA, p.p. 1-22
- Mattson O., Knox R. B., Heslop-Harrison J. y Heslop-Harrison Y. (1974). Protein pellicle of stigmatic papillae as a probable recognition site in incompatibility reactions. *Nature* **274**: 293-300
- McClure B. A., Harring V., ebert P. R., Anderson M. A., Simpson R. J., Sakiyama F. y Clarke A. E. (1989) Style self-incompatibility gene products of *Nicotiana glauca* are ribonucleases. *Nature* **342**: 955-957
- McClure B. A. et al., (1999). A small asparagin-rich protein required for S-allele-specific pollen rejection in *Nicotiana*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **80**: 32-49
- McClure B. A., Cruz-García F., Beecher B. S. y Sulaman W. (2000). Factors affecting inter- and intra-specific pollen rejection in *Nicotiana*. *Annals of Bot.* **85**: 113-123
- Meyer Y, Verduocq y Vignols F. (1999). Plant thioredoxins and glutaredoxins identity and putative roles. *Trends. Plant. Sci.* **4**(10): 388-394

- Murfett J., Strabala T. J., Zurek D. M., Mou B., Beecher B. y McClure B. A. (1996). S-RNases and interspecific pollen rejection in the genus *Nicotiana*: multiple pollen rejection pathways contribute to a unilateral incompatibility between self-incompatible and self-compatible species. *Plant Cell* **8**: 943-958
- Oxley David y Bacic Antony. (1996). Disulphide bonding in a stylar self-incompatibility ribonucleasa of *Nicotiana alata*. *Eur. J. Biochem.* **242**: 75-80
- Powis Garth y Montfort William R. (2001). Properties and biological activities of thioredoxins. *Ann. Rev. Pharmacol.* **41**: 251-295
- Raghavan V. (1997) Reproductive Biology of Angiosperms: retrospect and prospect. En: *Molecular embryology of flowering plants*. Editorial Cambridge University, Nueva York, p.p. 1-14, 17-60, 181-243
- Reynolds J. D. y Dashek W. V. (1976). Cytochemical analysis of callose localization in *Lilium longiflorum* pollen tubes. *Ann. Bot.* **40**: 409-416
- Roiz L., Goren R. y Shoseyov O. (1995). Stigmatic RNase in calamondin (*Citrus reticulata* var *austera* X *Fortunella* sp.) *Physiol. Plant.* **94**: 585-590
- Sarker R. H., Elleman C. J. y Dickinson H. G. (1988). Control of pollen hydration in *Brassica* requires continued protein synthesis and glycosylation is necessary for intraspecific incompatibility. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **85**: 4340-4344
- Schrauwen J. y Linskens H. F. (1972). Ribonuclease in styles. *Planta* **102**: 277-285
- Sedgley M. y Clarke A. E. (1986). Immuno-gold localization of arabinogalactan-proteins in the developing style of *Nicotiana alata*. *Nord. J. Bot.* **6**: 591-598
- Shivanna K. R. y Heslo-Harrison J. (1981). Membrane state and pollen viability. *Ann. Bot.* **47**: 759-770
- Showalter A. M. (1993). Structure and function of plant cell wall proteins. *The Plant Cell* **5**: 9-23

- Tirlapur U. K. , Ca G., Faleri C., Moscatelli A., Scali M., Del Casino C., Tiezzi A. y Cresti M. (1995). Confocal imaging and immunogold electron microscopy of changes in distribution of myosin during of pollen hydration, germination and pollen tube growth in *Nicotiana tabacum*. L. *Zigote* **2**: 63-68
- Vithanage H. I. M. V. y Heslop-Harrison J. (1979). The pollen-stigma interaction: fate of fluorescent labeled pollen-wall proteins on the stigma surface in rye (*Secale cereale*). *Ann. Bot.* **43**: 113-114
- Weber M. (1994). Stigma, style and pollen tube pathway in *Smyrnium perfoliatum* (Apiaceae). *Int. J. Plant Sci.* **155**: 437-444
- Wang H., Wu H.-M. y Cheung A., (1993). Development and pollination-regulated accumulation and glycosylation of a stilar transmitting tissue-specific proline-rich protein. *Plant Cell* **5**: 1639-650
- Wu H.-M., Zou J.-T., May B., Gu Q. y Cheung A. Y. (1993). A tobacco gen family for flower cell wall proteins with a proline-rich and cistein-rich domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**: 6829-6833

APÉNDICE

- **Buffer de extracción**
Para 3 mL de solución:
 1. NaCl 50 mM
 2. Acetato de sodio 50 mM
 3. Inhibidores de proteasas al 1%
 4. Hasta el momento de usar adicionar β -mercaptoetanol al 1%
 5. Llevar a volumen con agua desionizada

- **SDS-PAGE**
Acrilamida al 30%:
 1. Acrilamida 29.2g
 2. Bis-acrilamida 0.8g
 3. H₂O c.b.p. 100 mL

- Buffer del gel apilador 2X (pH 6.8):**
1. Tris-Cl 7.88g
 2. SDS (dodecil-sulfato de sodio) 0.4g
 3. H₂O c.b.p. 100 mL

- Buffer del gel separador 2X (pH 8.8):**
1. Tris-Cl 23.64g
 2. SDS 0.4g
 3. H₂O c.b.p. 100 mL

- Gel apilador:**
1. Buffer del gel apilador 2X 750 μ L
 2. Acrilamida/ Bisacrilamida al 30% 500 μ L
 3. Persulfato de amonio al 20% 7.5 μ L
 4. TEMED 10 μ L
 5. H₂O 1.83 mL

Gel separador:

	10%	11%	14%
Buffer del gel separador 2X	1.25 mL	1.25 mL	1.25 mL
Acrilamida/ Bisacrilamida al 30%	3.3 mL	3.6 mL	4.33 mL
Persulfato de amonio al 20%	25 μ L	25 μ L	25 μ L
TEMED	10 μ L	10 μ L	10 μ L
H ₂ O	6.03 mL	5.0 mL	4.7 mL

Buffer de muestra 6X:

Para cargar los extractos de proteína en el gel de poliacrilamida se requiere un buffer de muestra (por cada 10 μ L de extracto se requieren 2 μ L de este buffer) que se prepara de la siguiente forma:

1. Tris 0.28M pH 6.8
2. Glicerol al 30% (v/v)
3. SDS al 1%
4. Azul de bromofenol 0.0012%
5. DTT (ditiotreitól) 0.5M
6. Aforar a 10 mL con H₂O desionizada

Buffer de corrida 10X:

Este se utiliza 1X (una vez concentrado) tanto en el cátodo como en el ánodo de la cámara de electroforesis.

1. Tris-base 30.32g
2. Glicina 144g
3. SDS 10g
4. Aforar a 1L con H₂O

- **Tinción de proteínas en gel de poliacrilamida con azul de Coomassie**
Al finalizar la separación electroforética dejar el gel en:
 1. solución de tinción (Metanol 50% + ácido acético 10% + azul brillante de Coomassie 0.5%) durante 30 minutos
 2. Retirar la solución de tinción y guardarla en un frasco ámbar ya que puede ser reutilizada
 3. Agregar al gel la solución desteñidora (metanol 50% + ácido acético 10%) y dejarlo en esta hasta que el fondo del gel sea lo suficientemente claro para observar las bandas de proteína

- **Tinción de proteínas en gel de poliacrilamida con nitrato de plata**
Al finalizar la electroforesis dejar el gel en:
 1. Metanol al 50% durante 1.5 horas
 2. Lavar 3 veces con H₂O desionizada (10 minutos cada lavado)
 3. Dejar el gel toda la noche en agua
 4. Dejar en 100 mL de metanol al 50% con 100 μ L de formaldehído al 37% durante 1.5 horas
 5. Lavar tres veces rápidamente con agua
 6. Realizar un cuarto lavado con agua y dejar el gel en esta mientras se preparan las siguientes soluciones:
 7. Solución A:
 - a) Nitrato de plata 0.8g
 - b) Agua 2 mL

Solución B:

- a) NaOH 0.36% 21 mL
- b) Hidróxido de amonio 1mL

Solución C:

- a) Adicionar por goteo y con agitación constante la solución A a la B
 - b) Adicionar hidróxido de amonio hasta que la solución quede totalmente transparente
 - c) Aforar a 100 mL con agua
8. Desechar el agua y adicionar la solución C al gel (incubar durante 15 minutos)
 9. Lavar tres veces con agua (5 minutos cada lavado)
 10. Preparar la solución D durante el último lavado

Solución D:

- a) Citrato de sodio al 1% 2.5 mL
 - b) Formaldehído al 37% 250 μ L
 - c) Aforar a 500 mL con agua
11. Desechar el agua y adicionar la solución D
 12. Mantener con agitación hasta que las bandas de proteína tengan una coloración adecuada
 13. Desechar la solución D y colocar el gel en solución destefnidora (Metanol al 50% + ácido acético glacial al 10%)

- Soluciones para la transferencia semi-seca de proteínas a membrana de nitrocelulosa

Solución I 4X:

Tris 0.3M pH 10.4

1. Pesar 29.08g de Tris
2. Disolver en 150 mL de H₂O desionizada
3. Ajustar el pH a 10.4
4. Aforar a 200 mL con agua

Solución II 4X:

Tris 25mM pH 10.4

1. Pesar 2.42g de Tris
2. Disolver en 150 mL de H₂O desionizada
3. Ajustar el pH a 10.4
4. Aforar a 200 mL

Solución III 4X:**Acido 6-amino-n-hexano-caproico 10mM pH 7.2**

1. Pesar 1.06g de la sal
2. Disolver en 150 mL de H₂O desionizada
3. Ajustar el pH a 7.2¹
4. Aforar a 200 mL

Preparar con las soluciones patrón anteriores las soluciones de transferencia:

Solución patrón 4X (mL)	I	II	III
Metanol (mL)	6.25	6.25	6.25
H ₂ O c.b.p.	5	5	5
	25 mL	25 mL	25 mL

- **Tinción de proteínas en membrana con rojo de Ponceau:**
 1. Disolver 0.5g de Ponceau S en 1 mL de ácido acético y aforar a 100 mL con agua desionizada
 2. Una vez transferidas las proteínas a la membrana, colocarla con ayuda de unas pinzas en un recipiente de tamaño adecuado
 3. Colocar la solución de rojo de Ponceau y dejar en agitación durante 10 minutos
 4. Retirar la solución de tinción y guardarla en un frasco ámbar (se puede reutilizar)
 5. Lavar el exceso de colorante con agua desionizada; los lavados se realizan hasta que se distingan las bandas de proteína
 6. Si se requiere, se puede cortar la membrana para diferentes hibridaciones

- **PBS 10X (buffer de fosfatos)**
Pesar las siguientes sales:
 1. NaCl 1.37 M 40.0314g
 2. KCl 27 mM 1.0065g
 3. Na₂HPO₄·7H₂O 43mM 5.7635g
 4. NaH₂PO₄·H₂O 14mM 0.9659g
 5. Disolver en 300 mL de H₂O desionizada
 6. Ajustar el pH a 7.3 con NaOH
 7. Aforar a 500 mL
 8. Esterilizar en autoclave

¹ El pH de este solución tarda en estabilizarse, oscilando entre 6.68 y 8.87. Por lo tanto, debe dejarse aproximadamente 15 minutos con agitación y el electrodo dentro de la solución para que se establezca la lectura. Además debe ajustarse el pH con soluciones de NaCl o HCl muy diluidas y esperar 5 minutos para que se mantenga la lectura.

- *E. coli* cepa BL21(DE3)pLysS

Colonias:

1. Resistentes a ampicilina (concentración 100 µg/ µL)
2. Conservar en medio LB con glicerol al 15% a -70°C

- Medio 2xYTA

1. Triptona 16g
2. Extracto de levadura 10g
3. NaCl 5g
4. Disolver en 900 mL de H₂O desionizada
5. Ajustar el pH a 7.0 con NaOH
6. Aforar a 1L
7. Esterilizar en autoclave

- Tinción de cortes de tejido con safranina (metilcelosolve)–verde rápido (metilcelosolve)

1. Desparafinar el tejido e hidratar hasta alcohol al 96%
2. Teñir con safranina durante 24 horas
3. Lavar el exceso de colorante con agua (no directamente sobre el corte)
4. Diferenciar y deshidratar simultáneamente con etanol al 96% más ácido pícrico al 5% (solución saturada de ácido pícrico)
5. Lavar con etanol al 96% más amoniaco (4-5 gotas) durante 1 minuto. Los cortes deben estar sobreteñidos²
6. Deshidratar con etanol absoluto (100%) durante 10 segundos
7. Contrastar con verde rápido durante 15 segundos
8. Lavar con aceite de clavo para eliminar el exceso de colorante
9. Aclarar el tejido con una mezcla de aceite de clavo 50% + xilol 25% + etanol absoluto 25%
10. Lavar con xilol
11. Montar las preparaciones con una resina de secado rápido

- Pruebas histoquímicas

Acido peryódico:

1. Acido peryódico 0.6g
2. Aforar con H₂O a 100 mL

Reactivo de Schiff:

1. Fucsina básica 0.1g
2. m-bisulfito de sodio 2g
3. Acido acético 2 mL

² Los cortes no deben permanecer más de un minuto en este paso porque el alcohol extrae el colorante.

4. **Disolver la fucsina en 50 mL de agua + ácido acético con agitación constante durante 2 horas**
5. **Adicionar 0.3g de carbón activado si la solución no es incolora**
6. **Aforar a 100 mL**

Azul negro de naftol:

1. **Azul negro de naftol 1g**
2. **Disolver en 50 mL de etanol al 50%**
3. **Aforar a 100 mL con etanol al 50%**
4. **Filtrar**

Lugol:

1. **Yoduro de potasio 2g**
2. **Yodo 0.5g**
3. **Aforar con agua a 100 mL**