

1.- MATERIAL.

1.1.- Mamíferos.

Para la realización del presente trabajo se utilizaron ratones Swiss-albinos en todos los estadios embrionarios, posnatales y adultos suministrados por animalario central de la Universidad de la Laguna así como por el animalario central de la Universidad de Murcia. Los ratones fueron puestos a aparear y mantenidos en condiciones estandar de laboratorio. La presencia de tapón vaginal la mañana siguiente al apareo se tomó como el día embrionario 0 (E.0). Hembras gestantes de diferentes estadios a partir del día 10 de desarrollo embrionario (E.10) fueron anestesiadas con éter dietílico y los embriones fueron rápidamente extraídos por cesárea, decapitados y fijados por inmersión. Los animales, en diferentes estadios de desarrollo postnatal (P.0, P.2, P.5, P.21) y adultos fueron igualmente anestesiados con éter dietílico y fijados por perfusión intracardiaca.

Para el estudio de proliferación celular, hembras gestantes a partir del día 12 de desarrollo embrionario, postnatales y adultos fueron inyectados con Bromodeoxiuridina a una dosis de 5 mgrs/kg, transcurridas tres horas, los animales fueron anestesiados y fijados por inmersión ó perfusión intracardiaca.

1.2.- Aves.

Para la realización del presente trabajo se utilizaron embriones de todos los estadios y posnatales de diferentes estadios (P.1, P.3, P.5, P.14, P.21) de dos especies de aves, pollo (*Gallus gallus*) y codorniz (*Coturnix coturnix* var. *japonica*). Huevos fertilizados de ambas especies fueron obtenidos a partir de granjas privadas, y puestos en incubadora a 38°C con una humedad ambiental entre el 45% - 75%. Los embriones de estadios entre 4 y 10 días fueron rápidamente extraídos del huevo, decapitados y fijados por inmersión. Los embriones a partir de 10 días, así como los postnatales, fueron anestesiados con éter dietílico y fijados por perfusión intracardiaca.

2.- MÉTODOS.

Para el estudio de este material se han empleado los siguientes métodos:

* 2.1 Histología clásica.

* 2.2 Ultraestructura.

* 2.3 Inmunohistoquímicos.

Técnica de elución-retratamiento.

Técnica de doble marcaje.

* 2.4 Hibridación in situ no radiactiva.

2.1.- Histología clásica.

El material destinado a histología clásica fue fijado en fijador de Bouin, incluido en paraplast y cortado en un Micrótopo (Reichert Jung 1130 Biocut) en secciones de 5 a 8 μm de grosor. Las secciones se montaron tanto en serie como en paralelo realizándose sobre ellas la técnica de tinción topográfica (Hematoxilina de Harris-Eritrosina) para el estudio del desarrollo morfológico hipofisario.

Protocolo de Inclusión.

* Fijación.

* Deshidratación en alcoholes crecientes.

* Alcohol 96° 2 x 30´.

* Alcohol 100° 3 x 100´.

* Aclarado en toluol 10´y 20´.

* Baños en Paraplast.

* Inclusión en Paraplast.

Protocolo de Tinción.

- * Desparafinado en toluol.
- * Tinción con Hematoxilina de Harris 2`.
- * Lavado en agua corriente 5`.
- * Lavado en agua destilada.
- * Tinción con Eritrosina 2`.
- * Lavado rápido con agua destilada.
- * Deshidratación en alcoholes crecientes.
- * Aclarado en toluol.
- * Montaje con Eukit.

2.2.- Ultraestructura.

El material destinado a ultraestructura fue fijado en Glutaraldehido al 5% en PB 0.1M a pH=7.4. Posteriormente se realizó un posfijación con tetróxido de osmio al 2% en tampón Millonig. La inclusión se realizó en resinas Spurr y Durcupan y las muestras se cortaron en un ultramicrótopo (Reichert Ultracut S Leica) en secciones de 1 μ m para semifinos y en secciones de 50nm para ultrafinos.

Protocolo de inclusión.

- * Fijación en Glutaraldehido 5% 3 horas.
- * Lavados en tampón Millonig 3 x 20`.
- * Postfijación en tetróxido de osmio al 2% en tampón Millonig 2 horas.
- * Lavados en agua destilada 10`.

- * Deshidratación en alcoholes crecientes.
- * Alcohol 30° 15´.
- * Alcohol 50° 15´.
- * Alcohol 70° 15´.
- * Incubación en acetato de uranilo al 2% en alcohol 70° 2 horas.
- * Alcohol 90° 15´.

- * Alcohol 100 ° 2 x 15´.
- * Aclarado en óxido de propileno 2 x 15´.
- * Óxido de propileno-Resina 1:1 1hora.
- * Resina 12 horas.
- * Bloque en estufa a 60 ° 24 horas.

Protocolo de Tinción.

- * Acetato de uranilo al 2% 15´.
- * Lavados con agua destilada 3x10´.
- * Citrato de plomo al 2% 20´.
- * Lavados con agua destilada 3x10´.
- * Secar al aire

2.3.- Inmunohistoquímica.

El material destinado a inmunohistoquímica fue fijado con distintos fijadores según los casos:

2.3.1.- Proliferación Celular.

El material fue fijado en fijador de Clarke (Etanol:Acético 3:1) incluido en paraplast y cortado en un Microtomo (Reichert Jung 1130 Biocut) en secciones de 5 a 8 μm que se montaron tanto en serie como en paralelo. Sobre estas secciones se llevo a cabo una técnica

inmunoenzimática indirecta simple para la detección de Bromodeoxiuridina y de doble marcaje para la detección simultánea de Bromodeoxiuridina y hormonas hipofisarias.

Anticuerpo contra la Bromodeoxiuridina.

El anticuerpo dirigido contra la Bromodeoxiuridina, Anti-BrdU, es un anticuerpo monoclonal de ratón de la casa comercial DAKO (Clón Bu20a. Isotipo IgG1, Kappa).

Protocolo de Inmunoenzimática indirecta para la detección de Bromodeoxiuridina.

- * Desparafinado en toluol.
- * Hidratación con alcoholes decrecientes hasta agua.
- * Lavados con tampón TBS 2 x 10´.
- * Solución de NaOH al 0.5% en TBS 15´ (desnaturalización del DNA).
- * Lavados con tampón TBS 2 x 10´.
- * Lavado con una solución de H₂O₂ al 0.5% en tampón TBS 10´-15´.
- * Lavado con tampón TBS 2 x 10´.
- * Incubación en solución de leche desnatada al 0.5% en tampón Coons (bloqueo de los sitios de unión inespecíficos).
- * Lavados con tampón TBS 3 x 10´.
- * Lavado con tritón X-100 al 0.2% en tampón TBS.
- * Incubación con anticuerpo anti-BrdU (dilución 1/75) toda la noche a T^a ambiente.
- * Lavados con tampón TBS 3 x 15´.
- * Lavado con tritón X-100 al 0.2% en tampón TBS.
- * Incubación con anticuerpo anti IgG de ratón (anticuerpo 2^o) marcado con biotina (dilución 1/200) 1 hora.
- * Lavados con tampón TBS 3 x 10´.
- * Lavado con tritón X-100 al 0.2% en tampón TBS.
- * Incubación con un complejo Avidina-Biotina-Peroxidasa o Streptavidina-Peroxidasa (dilución 1/300) 1 hora.

- * Lavados con tampón TBS 3 x 10´.
- * Lavado con tampón Tris 15´.
- * Revelado con un sustrato cromogénico, 3,3´Diaminobenzidina (SIGMA).
- * Montaje.

Para los dobles marcajes, una vez revelada la 1ª reacción inmunohistoquímica, se lava exhaustivamente con tampón TBS ó Coons y se procede a realizar la segunda reacción según el mismo protocolo, revelando en este caso con un cromógeno diferente 4-Cl, 1-Naftol.

2.3.2.- Diferenciación Hormonal.

El material fue fijado en fijador de Bouin y en PFA 4% ácido pícrico 0.2% en PB 0.1M pH=7.4. El material fijado con fijador de bouin fue incluido en paraplast y cortado con un Microtomo (Reichert Jung 1130 Biocut) en secciones de 5 a 10 µm. El material fijado con PFA 4% ácido pícrico 0.2%, fue crioprotegido en una solución de sacarosa al 20% en tampón coons, incluido en tissue-tex (medio de inclusión para especímenes congelados) y cortado en un Criostato (Reichert Jung 2800 Frigocut) en secciones de 5 a 10 µm. Las secciones se montaron tanto en serie como en paralelo y sobre ambos tipos de secciones se llevó a cabo una técnica inmunoenzimática indirecta para la detección de las hormonas hipofisarias así como la técnica de elución-retratamiento para detectar la coexistencia de dos o más moléculas en la misma célula.

Antisueros utilizados.

Antisueros contra las hormonas hipofisarias.

Los antisueros dirigidos contra las hormonas hipofisarias son antisueros policlonales obtenidos en conejo en el laboratorio del Dr. G. Tramu Universidad de Burdeos II. Francia.

AS anti ACTH (1-24) y anti ACTH (17-39).

AS anti β Endorfina.

AS anti α y β MSH.

AS anti h β TSH.

AS anti h STH.

AS anti p β LH.

AS anti h β FSH.

AS anti rPRL.

Protocolo de Inmunoenzimática indirecta.

* Desparafinado con toluol.

* Hidratación con alcoholes decrecientes hasta agua destilada.

* Lavados con tampón Coons 2 x 10´.

* Lavado con una solución de H₂O₂ al 0.5% en tampón Coons 10´-15´.

* Lavado con tampón Coons 2 x 10´.

* Incubación en solución de leche desnatada al 0.5% en tampón Coons (bloqueo de los sitios de unión inespecíficos).

* Lavados con tampón Coons 3 x 10´.

* Incubación con antisuero específico (anticuerpo 1º) (dilución 1/1000-1/800) o/n a T^a ambiente.

* Lavados con tampón Coons 3 x 15´.

* Incubación con anticuerpo anti IgG conejo (anticuerpo 2º) (dilución 1/1000) marcado con biotina

* Lavados con tampón Coons 3 x 10´.

* Incubación con un complejo Avidina-Biotina-Peroxidasa o Streptavidina-Peroxidasa (dilución 1/1000).

- * Lavados con tampón Coons 3 x 10´.
- * Lavados con tampón Tris 1 x 15.
- * Revelado de la reacción con un sustrato cromogénico. Los sustratos empleados fueron diferentes según los objetivos. Se utilizaron 4-Cloro,1-Naftol (SIGMA), 3,3´Diaminobenzidina (SIGMA) y 3,3´Diaminobenzidina intensificado con sulfato de níquel y amonio.
- * Montaje con glicerina tamponada.

Técnica de elución-retratamiento.

Esta técnica permite detectar dos o más moléculas diferentes que coexisten en una misma célula utilizando inmunohistoquímica. La técnica consiste en eluir el primer anticuerpo y realizar una segunda reacción inmunohistoquímica sobre la misma sección. Esta técnica fue descrita por el Dr. G. Tramu y col. (1.978).

Protocolo de elución-retratamiento.

- * Primera reacción inmunoenzimática.
- * Revelado con 4-Cloro, 1-Naftol. Montaje con glicerina tamponada y fotografiado.
- * Elución del primer anticuerpo mediante el siguiente protocolo:
 - * Acetona 5´´.
 - * Lavado en agua destilada.
 - * Solución de Permanganato potásico: Acido sulfúrico (1:1) en agua destilada 1/100 1´.
 - * Lavado en agua destilada.
 - * Metabisulfito potásico al 0.5% 5´´.
 - * Lavado en agua destilada.
 - * Lavados en tampón Coons 3 x 10´.
 - * Incubación con antisuero específico (dilución 1/800 – 1/1000) toda la noche a T^a ambiente.
 - * Lavados con tampón Coons 3 x 15´.

- * Incubación con anticuerpo anti IgG conejo (anticuerpo 2º) marcado con biotina (dilución 1/1000).
- * Lavados con tampón Coons 3 x 10´.
- * Incubación con un complejo Avidina-Biotina-Peroxidasa o Streptavidina-Peroxidasa (dilución 1/1000).
- * Lavados con tampón Coons 3 x 10´.
- * Lavados con tampón Tris 15´.
- * Revelado de la reacción con un sustrato cromogénico.
- * Montaje.

Protocolo de Inmunofluorescencia indirecta.

- * Hidratación con tampón Coons 2x 10´.
- * Incubación en solución de leche desnatada al 0.5% en tampón Coons (bloqueo de los sitios de unión inespecíficos).
- * Lavados con tampón Coons 3 x 10´.
- * Incubación con antisuero específico (anticuerpo 1º) (dilución 1/1000-1/800) o/n a Tª ambiente.

- * Lavados con tampón Coons 3 x 15´.
- * Incubación con anticuerpo anti IgG conejo (Anticuerpo 2º) marcado con biotina (Dilución 1/1000).
- * Lavados con tampón Coons 3 x 10´.
- * Incubación con un complejo Streptavidina-FITC (Dilución 1/1000).
- * Lavados con tampón Coons 4 x 15´.
- * Montaje con glicerina tamponada.

2.3.3.- Proteínas Ligantes de Calcio.

El material fue fijado con fijador de Clarke (Etanol:Acético 3:1) incluido en paraplast y cortado en un Microtomo (Reichert Jung 1130 Biocut) en secciones de 5 a 8 µm que se

montaron tanto en serie como en paralelo. Sobre estas secciones se llevó a cabo un técnica inmunoenzimática indirecta para la detección de Calbindina D28K, Calretinina y Parvalbúmina. Se realizaron asimismo técnicas de doble marcaje y colocalización con hormonas hipofisarias.

Antisueros contra las Proteínas Ligantes de Calcio.

Los antisueros dirigidos contra las proteínas ligantes de calcio, son antisueros policlonales obtenidos en conejo de procedencia comercial, concretamente proceden de la casa Swant (Swiss antibodies).

AS anti CB D28K.

AS anti CR.

AS anti PV.

PV-19: Anticuerpo Monoclonal contra Parvalbúmina.

Protocolo de Inmunoenzimática indirecta para la detección de Proteínas Ligantes de Calcio.

* Desparafinado con toluol.

* Hidratación con alcoholes decrecientes hasta agua destilada.

* Lavados con tampón Coons 2 x 10´.

* Lavado con una solución de H₂O₂ al 0.5% en tampón Coons 10´-15´.

* Lavado con tampón Coons 2 x 10´.

* Incubación en solución de leche desnatada al 0.5% en tampón Coons (bloqueo de los sitios de unión inespecíficos).

* Lavados con tampón Coons 3 x 10´.

* Incubación con antisuero específico (anticuerpo^{1º}) (dilución 1/2000) toda la noche a T^a ambiente.

* Lavados con tampón Coons 3 x 15´.

- * Incubación con anticuerpo anti IgG conejo (anticuerpo^{2º}) marcado con biotina (dilución 1/200) 1 hora.
- * Lavados con tampón Coons 3 x 10´.
- * Incubación con un complejo Avidina-Biotina-Peroxidasa o Streptavidina-Peroxidasa (dilución 1/300) 1 hora.
- * Lavados con tampón Coons 3 x 10´.
- * Lavados con tampón Tris 1 x 15.
- * Revelado de la reacción con un sustrato cromogénico. Los sustratos empleados fueron diferentes según los objetivos. Se utilizaron 4Cloro,1-Naftol (SIGMA), 3,3´Diaminobenzidina (SIGMA) y 3,3´Diaminobenzidina intensificado con Sulfato de Niquel.
- * Montaje.

2.3.4.- Factores Liberadores Hipotalámicos y Péptidos.

El material fue fijado con PFA 4% ácido pícrico 0.2% en PB 0.1M pH=7.4 crioprotegido en una solución de sacarosa al 20% en tampón Coons, incluido en tissue-tex (medio de inclusión para especímenes congelados) y cortado en un Criostato (Reichert Jung 2800 Frigocut) en secciones de 5 a 10 µm. Las secciones se montaron tanto en serie como en paralelo. Sobre estas secciones se llevó a cabo una técnica inmunoenzimática indirecta para la detección de diferentes factores liberadores hipotalámicos y péptidos.

Antisueros contra los Factores Hipotalámicos y Péptidos.

Los antisueros dirigidos contra las hormonas hipofisarias son antisueros policlonales obtenidos en conejo en el laboratorio del Dr. G. Tramu Universidad de Burdeos II. Francia.

AS anti CRF.

AS anti LHRH.

AS anti GHRH.
AS anti Gal.
AS anti NPY.
AS anti NT.
AS anti Met-enc.
AS anti Leu-enc.

Protocolo de Inmunoenzimática indirecta para la detección de FH y Péptidos.

- * Hidratación en tampón Coons 2 x 10´.
- * Lavado con una solución de H₂O₂ al 0.5% en tampón Coons 10´-15´.
- * Lavado con tampón Coons 2 x 10´.
- * Incubación en solución de leche desnatada al 0.5% en tampón Coons (bloqueo de los sitios de unión inespecíficos).
- * Lavados con tampón Coons 3 x 10´.
- * Incubación con antisuero específico (anticuerpo 1º) (dilución 1/1000-1/800) toda la noche a T^a ambiente.
- * Lavados con tampón Coons 3 x 15´.
- * Incubación con anticuerpo anti IgG conejo (anticuerpo 2º) marcado con biotina (dilución 1/200) 1 hora.
- * Lavados con tampón Coons 3 x 10´.
- * Incubación con un complejo Avidina-Biotina-Peroxidasa o Streptavidina-Peroxidasa (dilución 1/300) 1 hora.
- * Lavados con tampón Coons 3 x 10´.
- * Lavados con tampón Tris 1 x 15.

- * Revelado de la reacción con un sustrato cromogénico en tampón Tris. El sustrato empleado fué el 4-Cloro,1-Naftol (SIGMA).
- * Montaje.

2.3.5.- Controles de especificidad.

De los antisueros.

Los antisueros dirigidos contra las hormonas hipofisarias y contra los distintos péptidos analizados, utilizados en este estudio fueron obtenidos del laboratorio de Neurocitoquímica funcional, URA CNRS 339 del Dr. G. Tramú (Burdeos, Francia). Los protocolos de especificidad de los mismos han sido publicados en diferentes trabajos de investigación (Dubois 1.972; Dubois 1.972; Tramu y Dubois 1.977; Tramu y col. 1.983; Hemming y col. 1.986; Ciofi y col. 1.990; Bello y col. 1.992; Bello y col. 1.993; Jamali y col. 1.999; Ciofi 2.000).

Los antisueros dirigidos contra las proteínas ligantes de calcio (Calbindina, Calretinina y Parvalbúmina), utilizados en este estudio son de procedencia comercial, concretamente proceden de la casa Swant (Swiss antibodies). Los protocolos de especificidad de los mismos han sido publicados en diferentes trabajos de investigación (Rogers 1.987; Celio 1.990; Schwaller y col. 1.993; Gotzos 1.996; Doglioni 1.996).

El anticuerpo dirigido contra la Bromodeoxiuridina utilizado en este estudio procede de la casa comercial DAKO (Clón Bu20a) Lot. 018. Los protocolos de especificidad de este anticuerpo han sido publicados en diferentes trabajos de investigación (Gratzner 1.982; Vanderlaan y col. 1.985; Magaud y col. 1.989)

De la reacción inmunohistoquímica.

En todas las reacciones realizadas, se hicieron los siguientes controles de especificidad:

- a. Sustitución del primer antisuero (antisuero específico) por antisuero normal de conejo.
- b. Omisión del primer antisuero.
- c. Utilización del antisuero específico previamente bloqueado con el antígeno correspondiente.

2.4.- Hibridación *in situ* no radiactiva.

Todo el material utilizado en este apartado fue tratado y procesado en condiciones totalmente estériles. El material destinado a hibridación *in situ* fue fijado con PFA 4% en PB 0.1M a pH=7.4, deshidratado e hidratado en soluciones de gradación creciente y decreciente respectivamente de metanol, crioprotegido en una solución de sacarosa al 30% en PB, incluido en tissue-tex (medio de inclusión para especímenes congelados) y cortado en un Criostato (Reichert Jung 2800 Frigocut) en secciones de 5 a 10µm. Las secciones se montaron tanto en serie como en paralelo. Sobre estas secciones se realizó una técnica de hibridación *in situ* no radiactiva usando dos sondas diferentes. Sobre estas mismas secciones se realizó posteriormente una inmunofluorescencia indirecta para la detección de hormonas hipofisarias. Sobre secciones adyacentes se realizó una técnica inmunoenzimática indirecta para la detección de hormonas hipofisarias.

2.4.1.- Sondas utilizadas.

Las sondas utilizadas para este estudio fueron las siguientes:

* Sonda antisentido Pitx2 de 1.8 Kb marcada con digoxigenina obtenida mediante síntesis a partir de un subclón pKS por transcripción *in vitro* con T3 polimerasa.

Protocolo de Hibridación *in situ* no radiactiva.

* Antes de comenzar a procesarlas, las secciones se dejaron secar al aire durante 1 hora.

* Postfijación durante 5' en PFA4% en PBS1X.

* Lavados con PBT (PBS1x, Tween-20 0.1%) 2 x 10'.

* Hibridación con la mezcla de hibridación (tampón de hibridación con sonda marcada) a 60°C en cámara húmeda toda la noche.

* Lavados:

* 1 x 15' Solución de lavado para eliminar los cubres a 60°C

* 3 x 30' Solución de lavado a 60°C

- * 3 x 30' MABT 1X a T^a ambiente.
- * Incubación durante 2 horas en solución de bloqueo a T^a ambiente.
- * Incubación con el anticuerpo anti-DIG-AP 1/3500 preparado en solución de bloqueo a T^a ambiente en cámara húmeda toda la noche.
- * Lavados con MABT 1X 10 x 30'.
- * Lavados con NTMT 1X 2 x 10'.
- * Revelado de la reacción en solución de revelado (BCIP/NBT) en oscuridad.
- * Montaje.

2.4.2.- Controles de especificidad.

De las sondas.

Las sondas utilizadas en este estudio fueron obtenidas de la siguiente forma:

- a. La sonda de Pitx2 fue cedida por el Dr. Salvador Martínez del Departamento de Ciencias Morfológicas y Psicobiología de la Universidad de Murcia.

Los protocolos de especificidad para esta sonda han sido publicados en los siguientes trabajos de investigación (Mucchielli y col. 1.996,1.997).

De la reacción de hibridación *in situ*.

En todas las reacciones realizadas se hicieron los siguientes controles de especificidad:

- a. Control sin sonda.
- b. Control con sonda sentido (sense).
- c. Control con exceso de sonda no marcada.

3.- ESTUDIO DEL MATERIAL PROCESADO.

El material procesado con las diferentes técnicas, fue observado y fotografiado con los siguientes equipos:

a.-Microscopio óptico convencional Leitz-Laborluz S equipado con lámpara de fluorescencia. Fotografías con AGFAPAN-25, AGFACHROME-100, AGFACHROME-400, KODAK ELITE CHROME-160T.

b.- Microscopio electrónico de transmisión JEOL - JEM 1010.

4.- FIJADORES Y TAMPONES.

4.1.- Fijadores.

Los Fijadores utilizados han sido los siguientes:

Fijador Bouin 100ml.

Formaldehido 35%-40%.....135ml.
Acido acético glacial.....27ml.
Acido pícrico 1.4%..... 400ml.

Fijador Clarke 100ml.

Etanol absoluto.....75ml.
Ácido acético glacial25ml.

Paraformaldehido-Pícrico 100ml.

Paraformaldehido.....4grs.
Ácido Pícrico.....0.2grs.
Tampón fosfato.....0.1M.

4.2.- Tampones.

Los Tampones utilizados han sido los siguientes:

4.2.1.- Tampones para Inmunohistoquímica.

Tampón Fosfato 0.1M (pH 7.4) 1 litro.

HNa₂PO₄ . (2H₂O).....17.8 grs.
H₂NaPO₄ . (2H₂O).....15.6 grs.

Tampón Coons (pH 7.4) 1 litro.

Metilmalonilurea (sal sódica).....4.12 grs.
Cloruro sódico.....17 grs.
Timerosal0.1 grs.

Tampón TBS (Tris-salino) (pH 7.4) 1 litro.

Tris-Hidrochloride.....6.06 grs.
Trizma-Base.....1.39 grs.
Cloruro sódico.....9 grs.

Tampón Tris (pH 7.6) 1 litro.

Tris-Hidrócloride.....6.06 grs.

Trizma-Base.....1.39 grs.

4.2.2.- Tampones para Microscopía Electrónica.

Tampón Fosfato 0.1M (pH 7.4) 1 litro.

HNa₂PO₄ . (2H₂O).....17.8 grs.

H₂NaPO₄ . (2H₂O).....15.6 grs.

Tampón Millonig

Tampón fosfato.....0.1M.

Glucosa.....0.5%.

4.2.3.- Tampones para Hibridación *in situ*.

Tampón Fosfato 0.1M (pH 7.4) 1 litro.

HNa₂PO₄ . (2H₂O).....17.8 grs.

H₂NaPO₄ . (2H₂O).....15.6 grs.

Tampón MABT (pH 7.5).

MATERIAL Y MÉTODOS

Acido Maléico.....0.1M.
Cloruro sódico.....0.15M.
Tween-20.....0.1%.

Tampón NTMT (pH 9.5).

Tris-Hidrchloride.....0.1M.
Cloruro sódico.....0.1M.
Cloruro de magnesio . (6H₂O).....50mM.
Tween-20.....0.1%.