



TÉCNICAS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE CÉLULAS EN PROCESO DE MUERTE POR APOPTOSIS EN TESTÍCULO DE RATA WISTAR PREPÚBER



Juárez Chavero Silvia¹, Dr. Vázquez Nin Gerardo H.¹, Dra. Echeverría Martínez Olga M^{1*}.

1Lab. de Microscopía Electrónica de la Fac. de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México.
silviajuarez59@yahoo.com; ghvn@hp.fciencias.unam.mx; omem@hp.fciencias.unam.mx

INTRODUCCIÓN

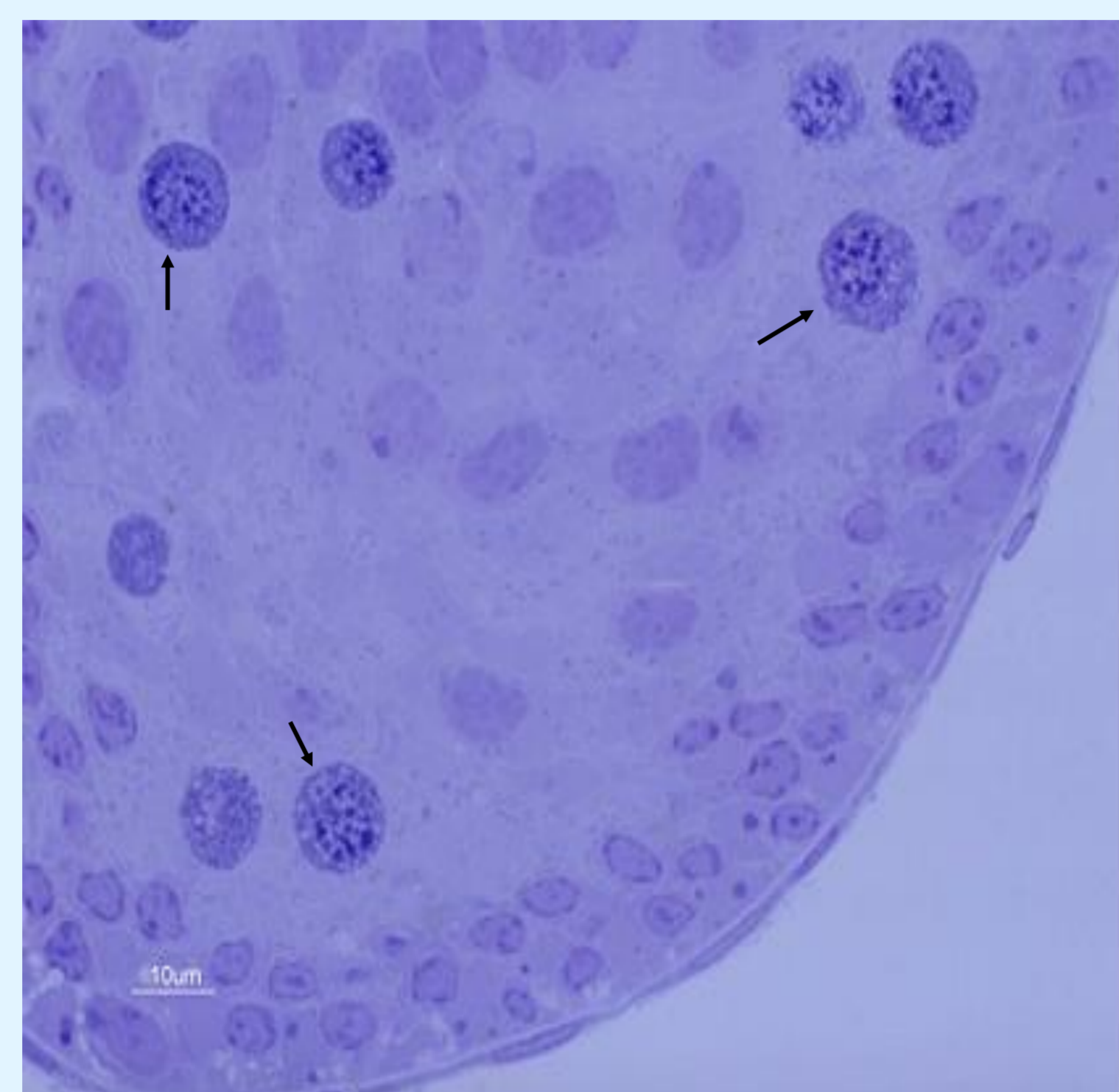
El proceso de muerte celular por apoptosis es un proceso regulado y controlado, encargado de mantener la homeostasis tisular eliminando células dañadas, es inducida por factores intracelulares o extracelulares [5], requiere de energía y biosíntesis de proteínas llamadas Caspasas (4), en este tipo de muerte se produce la condensación y fragmentación del DNA genómico, el citoplasma se condensa y se forman vesículas, denominadas cuerpos apoptóticos (1,2). Las caspasas activan a las desoxirribo-nucleasas y estas fragmentan el ADN cada 180 pares de bases o sus múltiplos (4,5). La consecuencia última de este proceso es la falta de síntesis de ARN mensajero, ribosómico y de transferencia, la imposibilidad de síntesis proteica y la consiguiente muerte y fragmentación de la célula (6).

OBJETIVO

Utilizar diferentes técnicas histológicas, inmuo-histoquímicas y microscopía electrónica, para identificar células en proceso de muerte por apoptosis en testículo de ratas WISTAR en etapa prepuber.

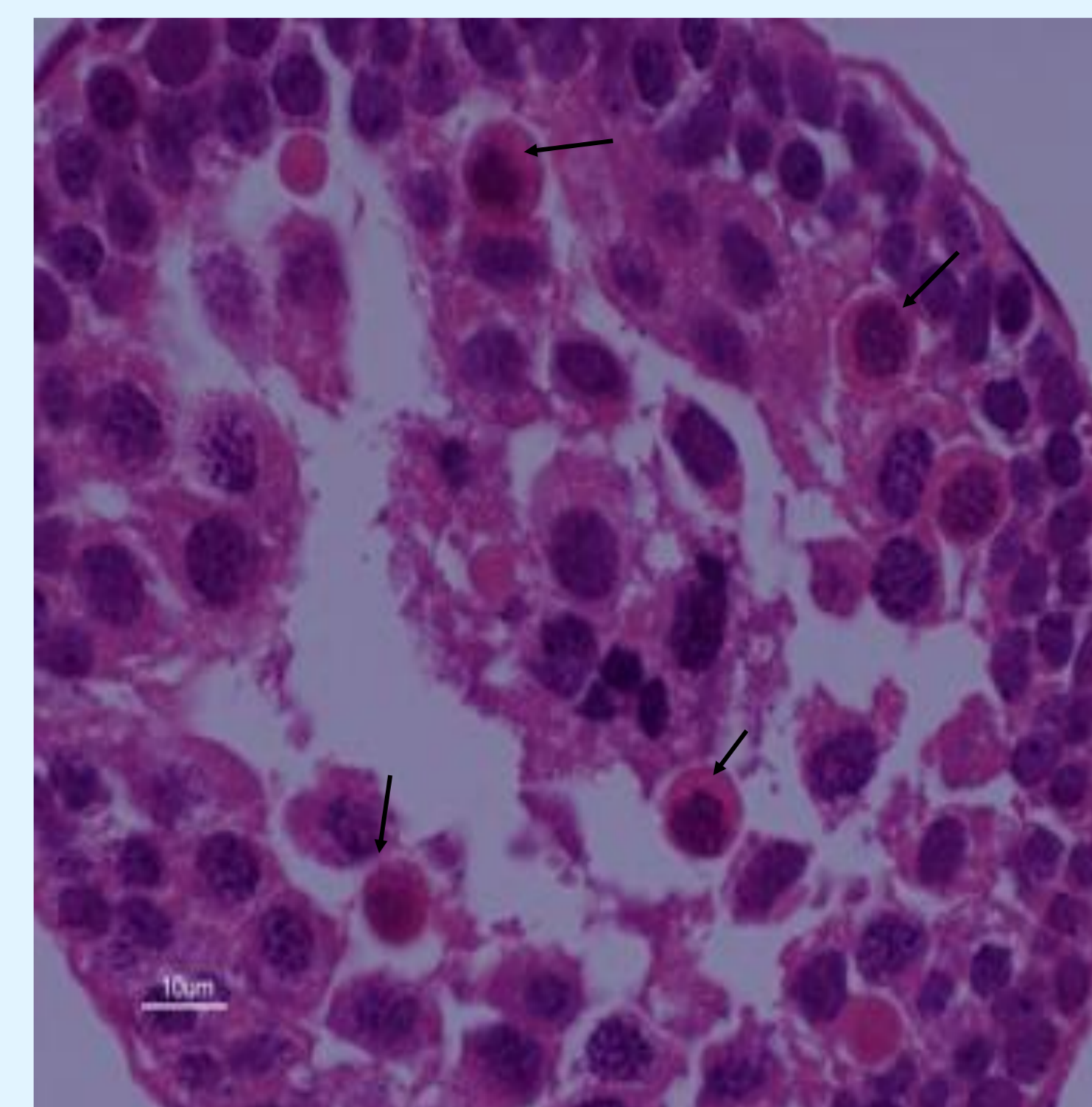
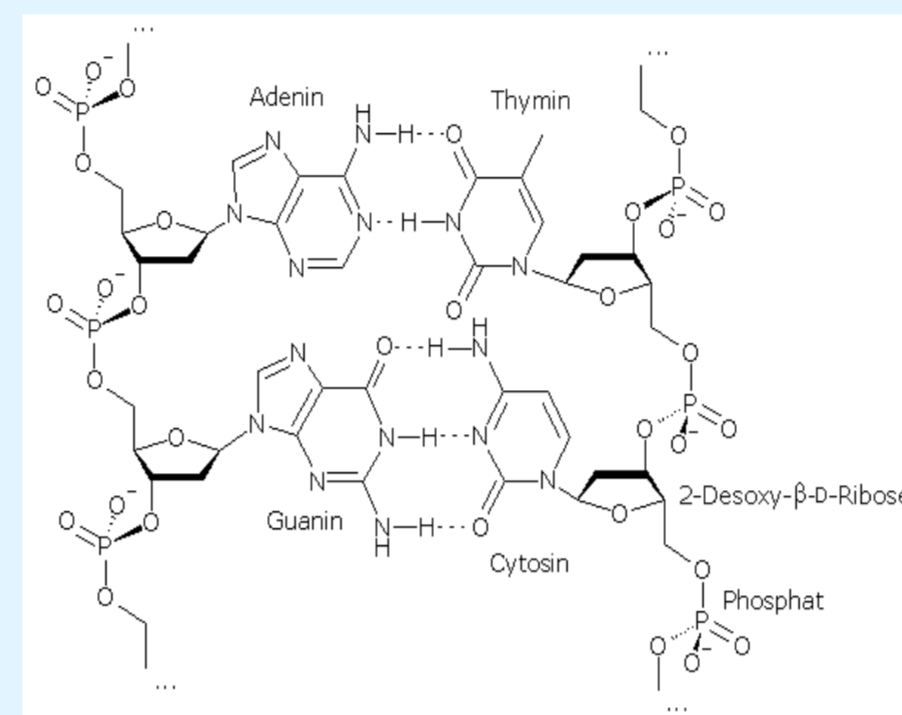
MATERIAL Y MÉTODOS

Se fijaron muestras de testículo para microscopía óptica, con paraformaldehído 4 %, se incluyeron en parafina, se realizaron cortes y se realizaron las siguientes técnicas: hematoxilina-eosina, DAPI; TUNEL, inmunodetección de Caspasa 3 activa. Se procesaron muestras para microscopía electrónica, fijadas con paraformaldehído 4% y glutaraldehído al 2.5 %, posfijadas con tetra óxido de osmio al 1%, se incluyeron en resina epóxica, se realizaron cortes semifinos y se tiñeron con azul de toluidina, se realizaron cortes ultrafinos y se contrastaron con Acetato de Uranilo y Citrato de Plomo. Se tomaron imágenes, con microscopía de luz, fluorescencia, contraste de fase y electrónico de transmisión.

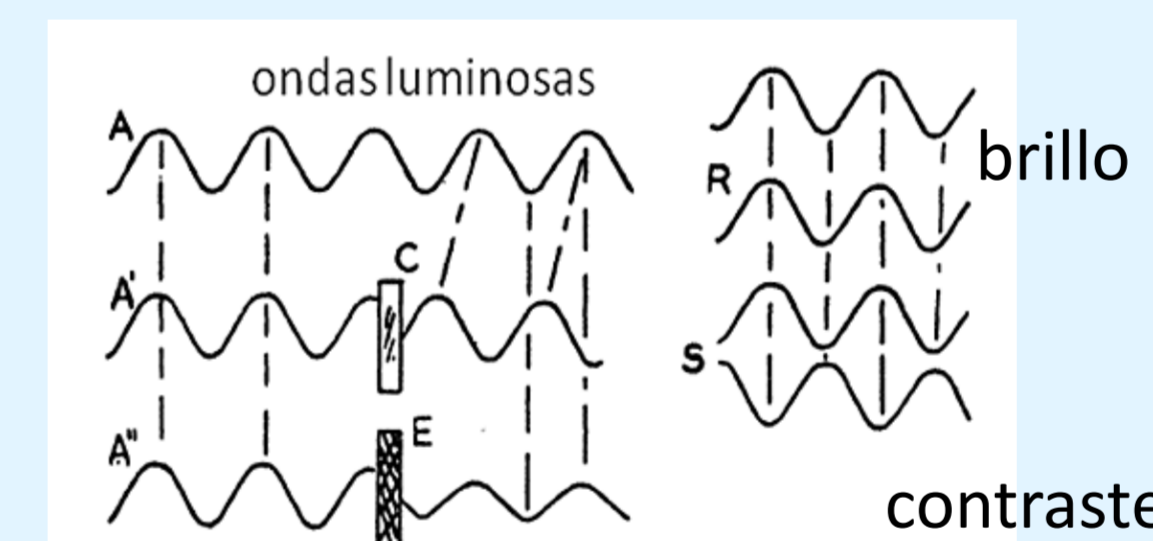
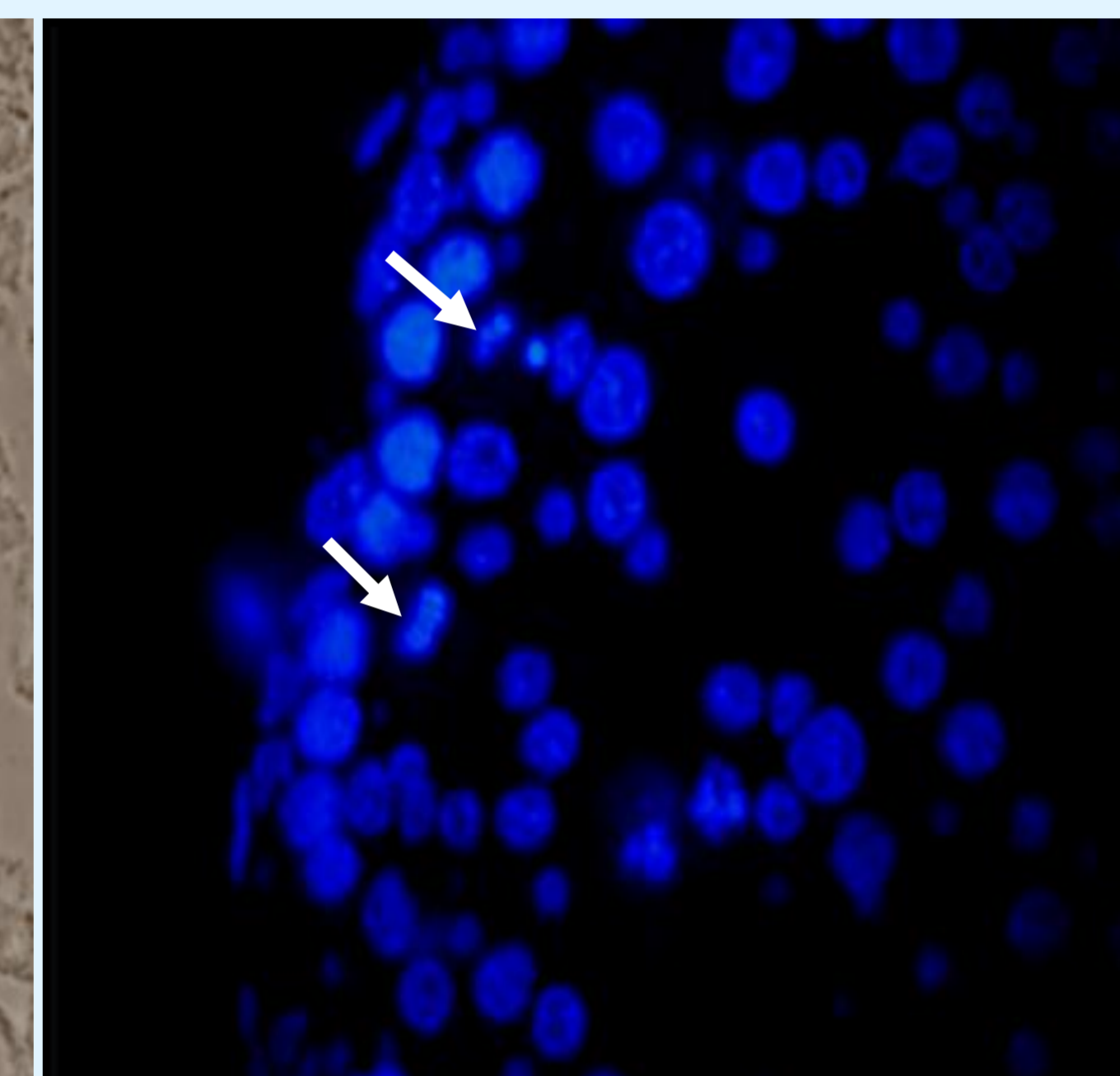
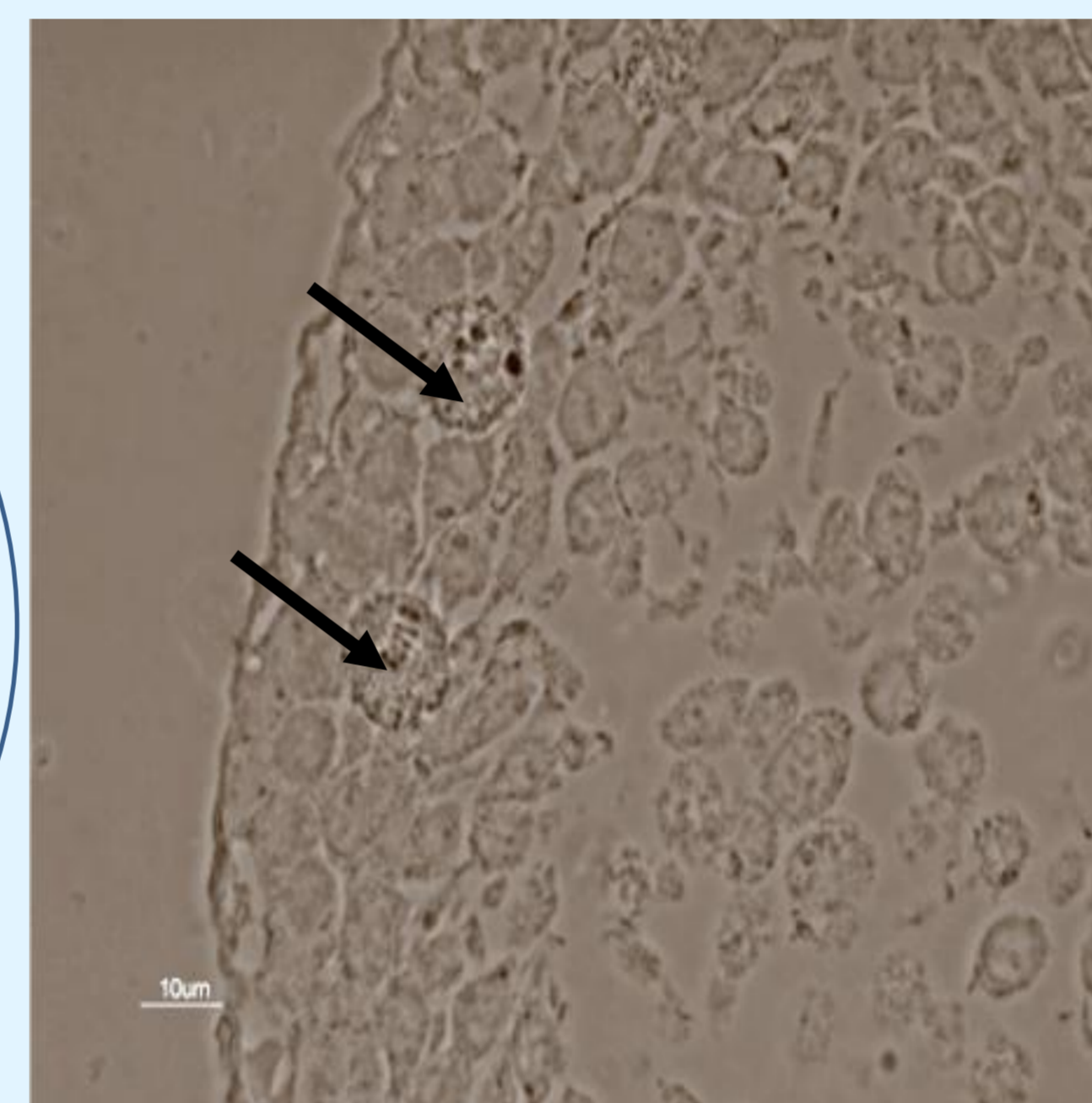
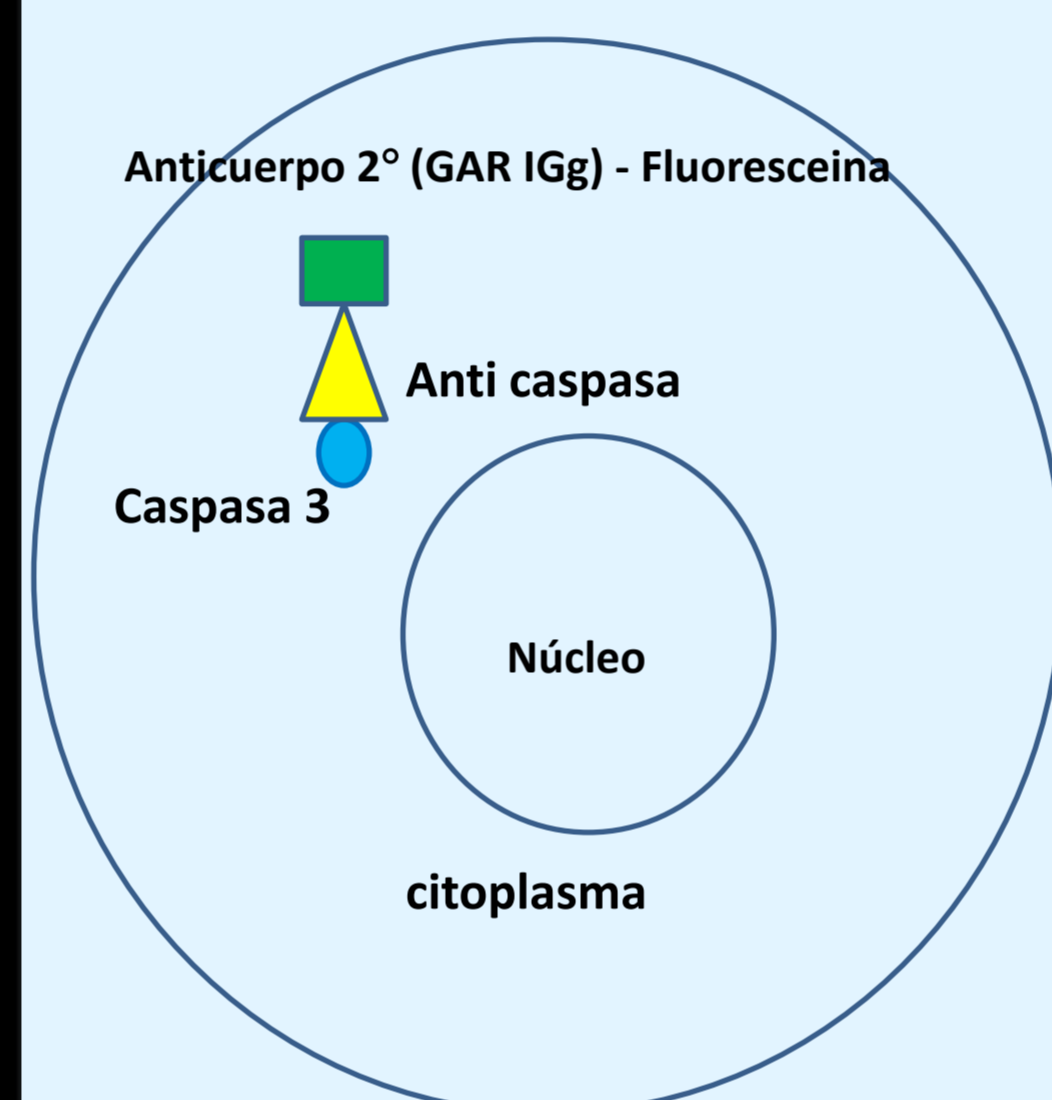
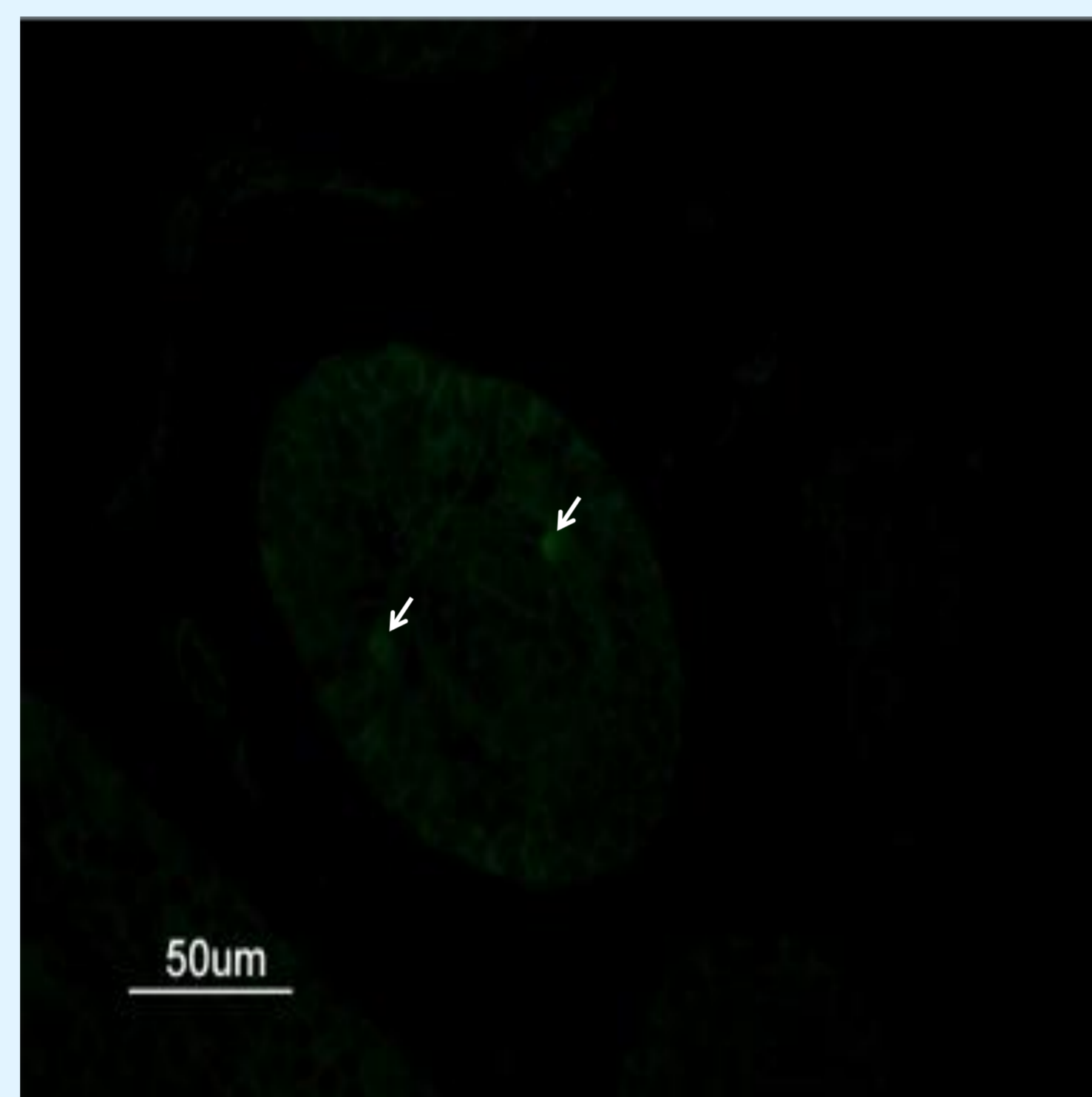


RESULTADOS

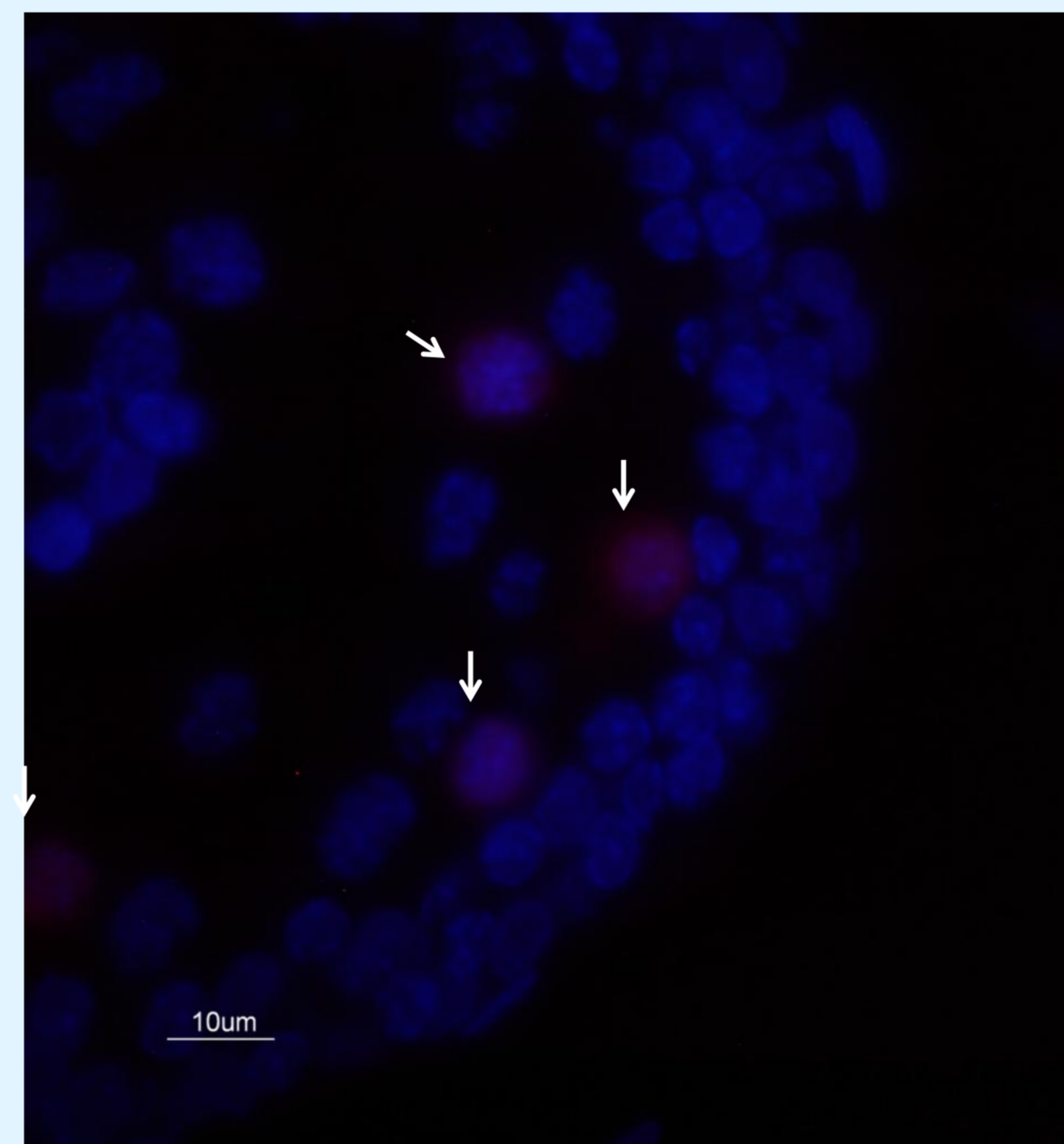
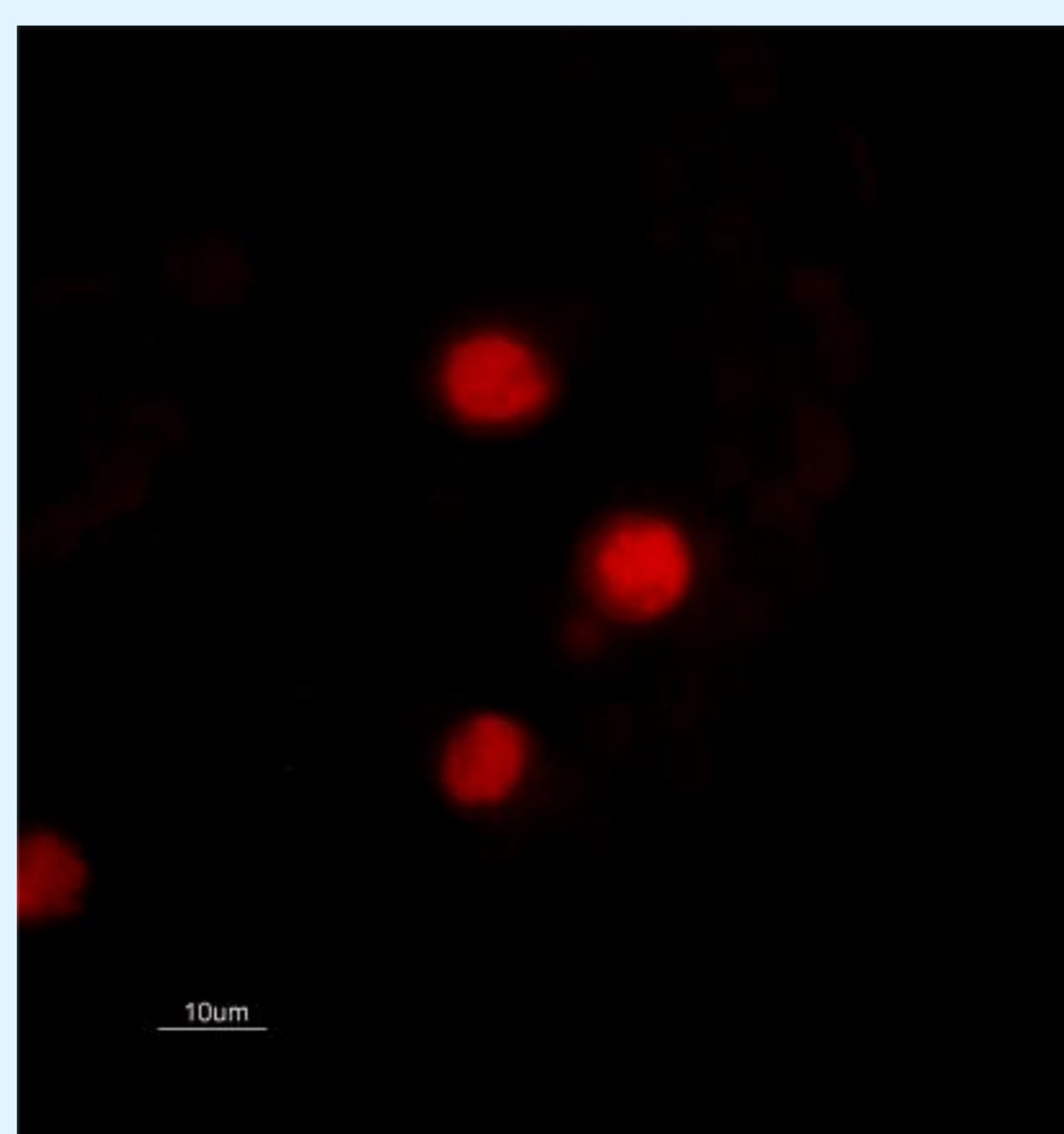
El Azul de toluidina es un colorante que interactúa con los fosfatos negativos del DNA.



Hematoxilina: se asocia con los grupos fosfatos del DNA y RNA. La Eosina es un colorante ácido con densidad de carga negativa, que se une a estructuras catiónicas en el citoplasma, como filamentos y membranas

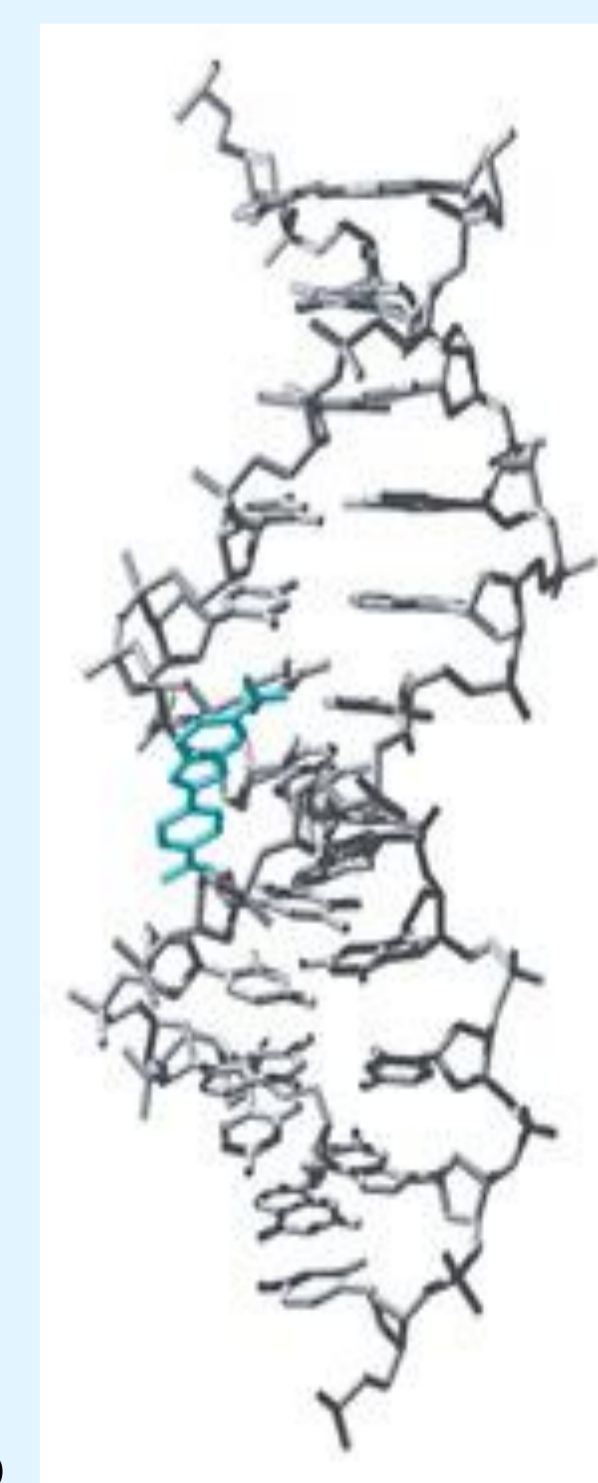


DAPI:4',6-Diamidino-2-phenylindole Es un marcador fluorescente que se une fuertemente a regiones enriquecidas en Adenina y Timina en secuencias de ADN. Es utilizado ampliamente en la microscopía de fluorescencia.



MICROSCOPIO DE CONTRASTE DE FASE

El paso de luz a través de un corte histológico, produce un retraso en la longitud de onda, cuando los rayos de luz pasan por regiones densas de la muestra, se retrasan o desfazan 1/4 de longitud de onda. El microscopio de contraste de fase aparece estas longitudes de onda fuera de fase por medio de anillos ópticos, colocados en el objetivo y el condensador incrementando más el contraste. Las partes oscuras de la imagen corresponden a las porciones densas del espécimen; las partes claras de la imagen corresponden a porciones menos densas.

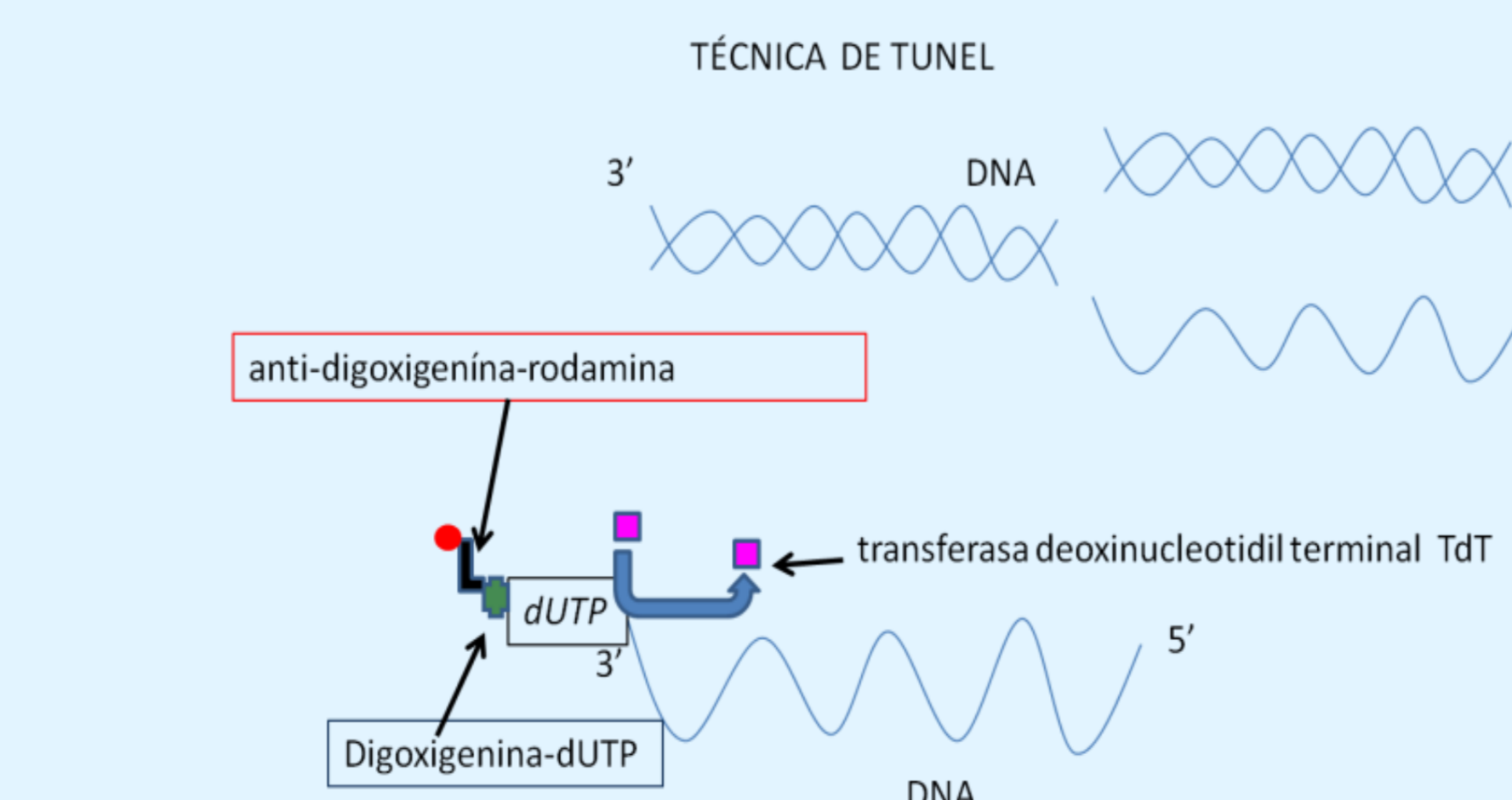


CONCLUSIONES

Las técnicas utilizadas son útiles para identificar a las células en proceso de muerte, estas últimas presentan una separación de las células contiguas, tienen forma esférica, son compactas, su cromatina forma cuerpos compactos, el citoplasma es escaso y tiene vesículas con restos celulares, estructuras membranosas, la membrana plasmática conservada, al igual que la envoltura nuclear .

BIBLIOGRAFÍA

- 1.- Caspersson T, Zech L, Johansson C, Modest E.J.(1970). Identification of human chromosomes by DNA-binding fluorescent agents.30(2):215-227
- 2.- Carretero M.I., Giuliano, S.M, Casaretto, C.I, Gambarotta, M.C, Neild, D.M. (2009). Evaluación del ADN espermático de llamas utilizando azul de toluidina. Vet v. Ciudad Autónoma de Buenos. 11 n.1
- 4.- Elinos-Báez C.M.; Vilma Maldonado, Jorge Meléndez-Zajgla (2003). Caspasas: moléculas inductoras de apoptosis Gac Méd Méx Vol.139 No. 5, 493-499.
- 5.- Degterev A. and Yuan J. (2008) Expansion and evolution off cell death programmes. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 9, 378-390.
- 6.- Panizo A. Santos y F Vega Vázquez (1930). Estudio de la apoptosis mediante la técnica de TUNEL. Rev. Esp. Pat Vol. 30 No. 3, pág. 243-245



Célula germinal de rata prepuber en proceso de muerte, observada con microscopía electrónica, Envoltura nuclear(En), cromatina compacta (Cr), espacio intercelular (Ei), Citoplasma (C), UrPb, 8000x.

