



# EL INMUNOMARCAJE COMO CRITERIO DE ANÁLISIS DE LOS ESTADIOS DE LA ESPERMATOGÉNESIS EN ANFIBIOS CUBANOS DEL GÉNERO *Eleutherodactylus* (Anura: Eleutherodactylidae).



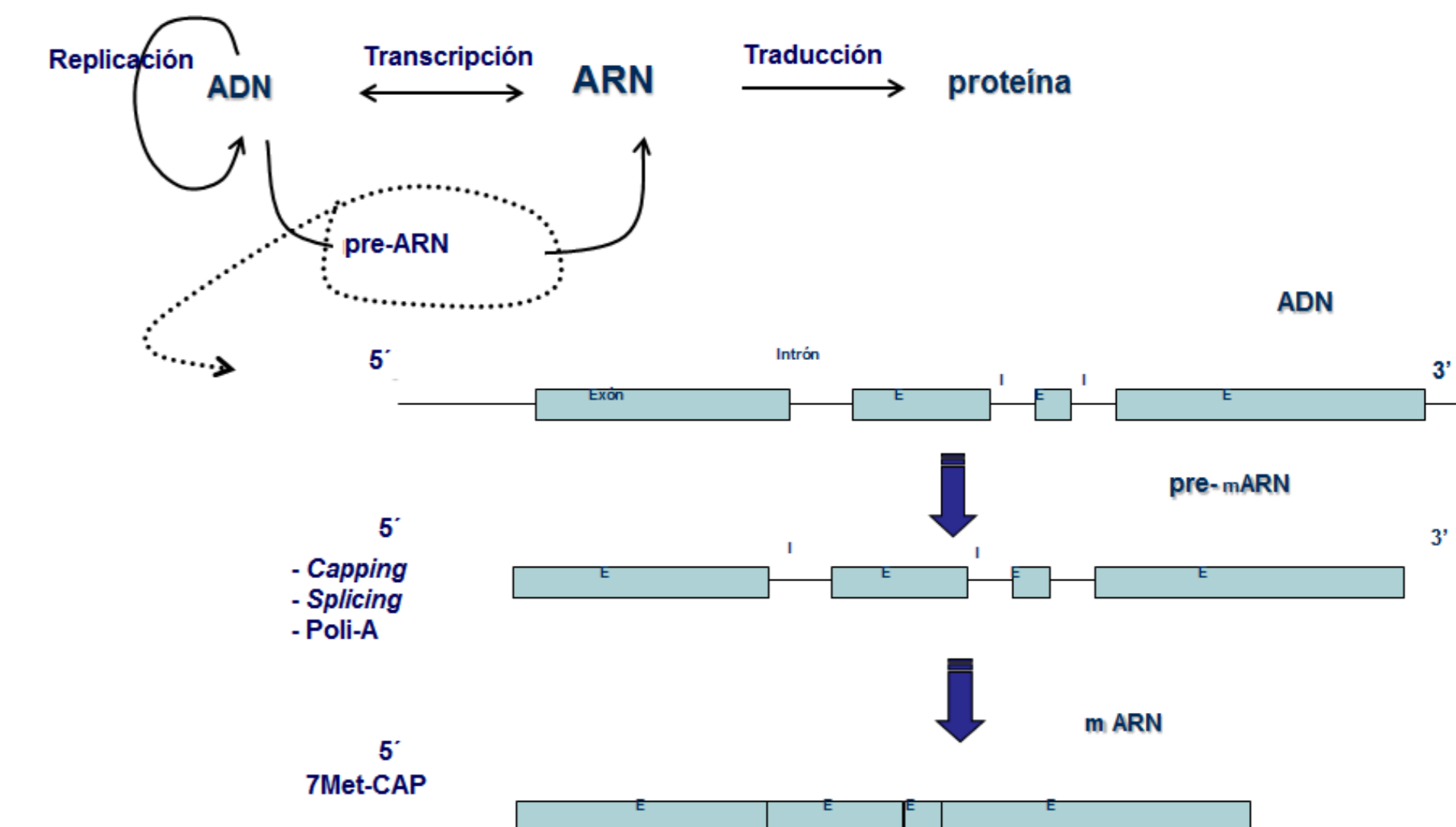
Rodríguez Gómez Yamilka<sup>1</sup>, Sanz Ochotorena Ana C.<sup>1</sup>, Segura Valdéz María de L.<sup>2</sup>, Lara Martínez Reyna<sup>2</sup>, \*Jiménez García Luis F.<sup>2</sup>.

<sup>1</sup>Departamento de Biología Animal y Humana, Facultad de Biología, Universidad de La Habana, Cuba.

<sup>2</sup>Laboratorio de Nanobiología Celular, Facultad de Ciencias, UNAM, México.

e-mail: [yami@fbio.uh.cu](mailto:yami@fbio.uh.cu); \* [luisfelipe\\_jimenez@ciencias.unam.mx](mailto:luisfelipe_jimenez@ciencias.unam.mx)

**INTRODUCCIÓN.** Las técnicas de inmunomarcaje utilizan anticuerpos como reactivos específicos para demostrar la existencia de una multitud de moléculas diferentes, incluso la ubicación del ADN. Entre estas se puede encontrar una familia de proteínas denominadas SR. Las proteínas SR son ricas en serina y arginina, lo cual les confiere la capacidad de asociarse con factores de "splicing" [1]. El "splicing" es un término en inglés por el cual es conocido el proceso de adición de un "capuchón" de 7 metil-guanosina en el extremo 5', la adición de una secuencia de adeninas en el extremo 3' y la eliminación de intrones y unión de exones a través del empalme [2]. Lo anterior forma parte del proceso de maduración del ARNm. De esta manera se ha propuesto que la presencia de un patrón moteado en un tipo celular dado, es un reflejo de su actividad transcripcional, y más específicamente, de su proceso de "splicing" [3]. La presencia del patrón moteado en núcleos de células en cultivo de mamíferos está bien documentada, y durante muchos años, fueron el tipo celular utilizado para demostrar la existencia o no de actividad transcripcional. Estos datos sugieren la posibilidad de que la organización intranuclear de los factores de "splicing" en un patrón moteado, incluidas las proteínas SR, puede estar ampliamente presente en otros vertebrados [4]. También se pudiera suponer que sería útil su empleo para describir determinados procesos en los que la actividad transcripcional se supone variable, como es el caso de la gametogénesis cística en anfibios anuros.



Esquema que muestra el proceso de "splicing" (Modificado de Jiménez, L. F.; R. Lara; I. Gil; A. Zamora; M. Salcedo; L. Agredano; J. J. Moncayo; M. L. Segura (2007): Biología celular del splicing. Mensaje bioquímico 31:141-156)

**OBJETIVO GENERAL.** Demostrar la utilidad de las técnicas de inmunomarcaje en el estudio de cortes de testículos de anfibios anuros para la identificación de los estadios de la espermatogénesis.

**METODOLOGÍA.** Se recolectaron de la naturaleza tres machos adultos de cuatro especies del género *Eleutherodactylus* (*E. goini*, *E. planirostris*, *E. riparius* y *E. varleyi*) entre los meses de mayo y septiembre, temporada lluviosa en Cuba, por lo se encontraban en etapa reproductiva. Los ejemplares fueron sacrificados y tratados éticamente. Se les extrajeron ambas gónadas: la izquierda fue fijada en paraformaldehído al 4 % (Panreac) para ser teñida con hematoxilina-eosina (H-E) (Merck) y para la inmunodetección por fluorescencia y la derecha se utilizó para otros estudios. Se realizó la técnica clásica de inclusión en parafina y los cortes se tiñeron con H-E. Para la inmunofluorescencia por el método indirecto, se utilizó como anticuerpo primario el anticuerpo monoclonal 3C5 contra proteínas de la familia SR y como anticuerpo secundario un anti-IgG de ratón acoplado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) (DAKO), el cual permite obtener una fluorescencia de color verde. Las preparaciones se observaron en un microscopio óptico con aditamento de epifluorescencia (Nikon E800). Las imágenes se registraron digitalmente con una cámara CCD (3CCD, MTI) acoplada al microscopio mediante el programa FlashPoint 3D FPG.

**RESULTADOS Y DISCUSIÓN:** La inmunolocalización por fluorescencia muestra que en la medida que la espermatogénesis avanza, el patrón moteado se va modificando, muy marcado en los primeros estadios y ausente en los espermatozoides, lo cual es consistente con el hecho de que las células van perdiendo actividad transcripcional [3]. En los cistos de espermatogonias el patrón moteado se observa ligero, mientras que en los espermatoцитos I es mucho más intenso, lo que denota una fuerte actividad transcripcional. En el interior de los núcleos se distingue un área redondeada sin marca positiva para el patrón moteado, que se corresponde con la zona donde debe estar ubicado el nucléolo. En las espermátidas se observa que las motas van disminuyendo su coloración verde difusa, prácticamente se reduce a unas cuantas motas brillantes y redondas, debido a que ha concluido el proceso de compactación de la cromatina y por lo tanto hay muy poca actividad de síntesis. Los espermatozoides muestran una disposición típica en ramillete y sin patrón moteado, lo cual se debe al alto grado de compactación de la cromatina en su núcleo y ausencia de actividad transcripcional. Debe destacarse que aparece marcaje verde difuso en la periferia de los túbulos, en el tejido intersticial, indicando que allí hay células con actividad transcripcional. Estas células marcadas coinciden con los fibroblastos, los cuales se encargan de sintetizar la matriz extracelular del tejido, por lo que su actividad de transcripción debe ser alta.

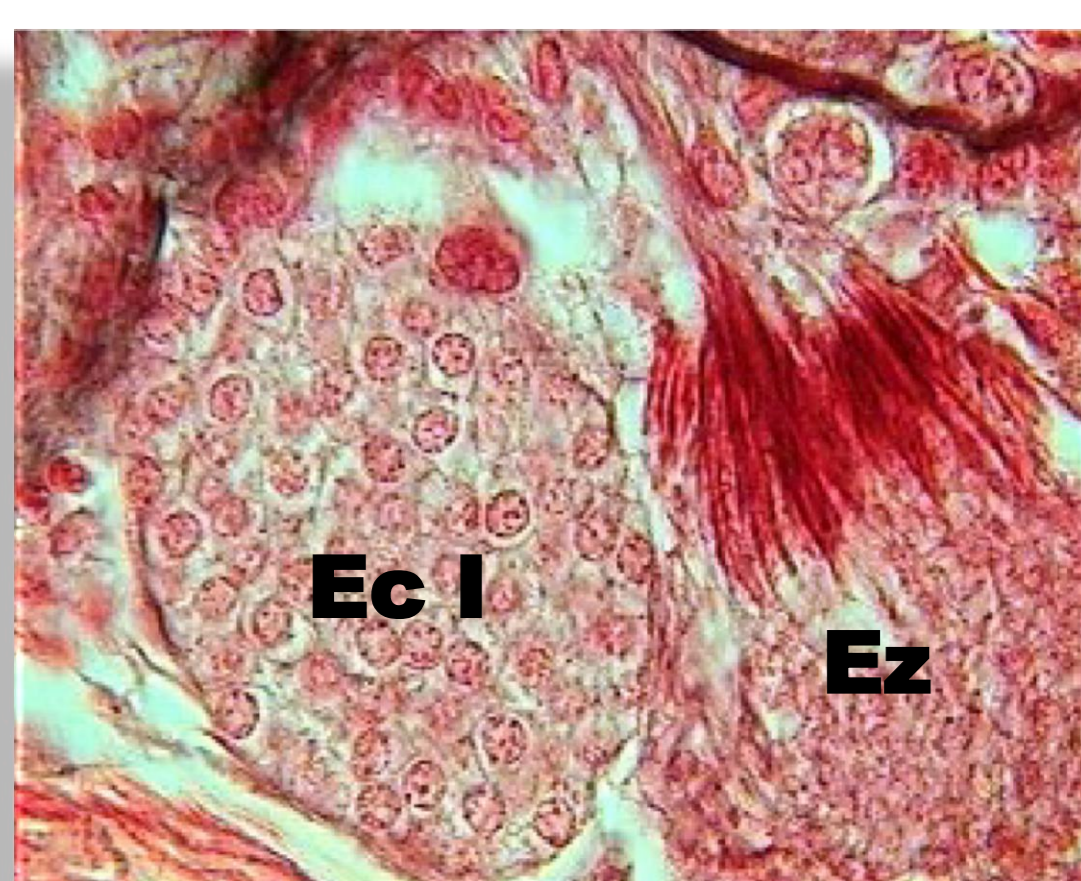


Fig. 1. Corte de túbulo seminífero de *E. riparius* donde se observan cistos de espermatoцитos I (Ec I) y espermatozoides (Ez). H-E. 1000X

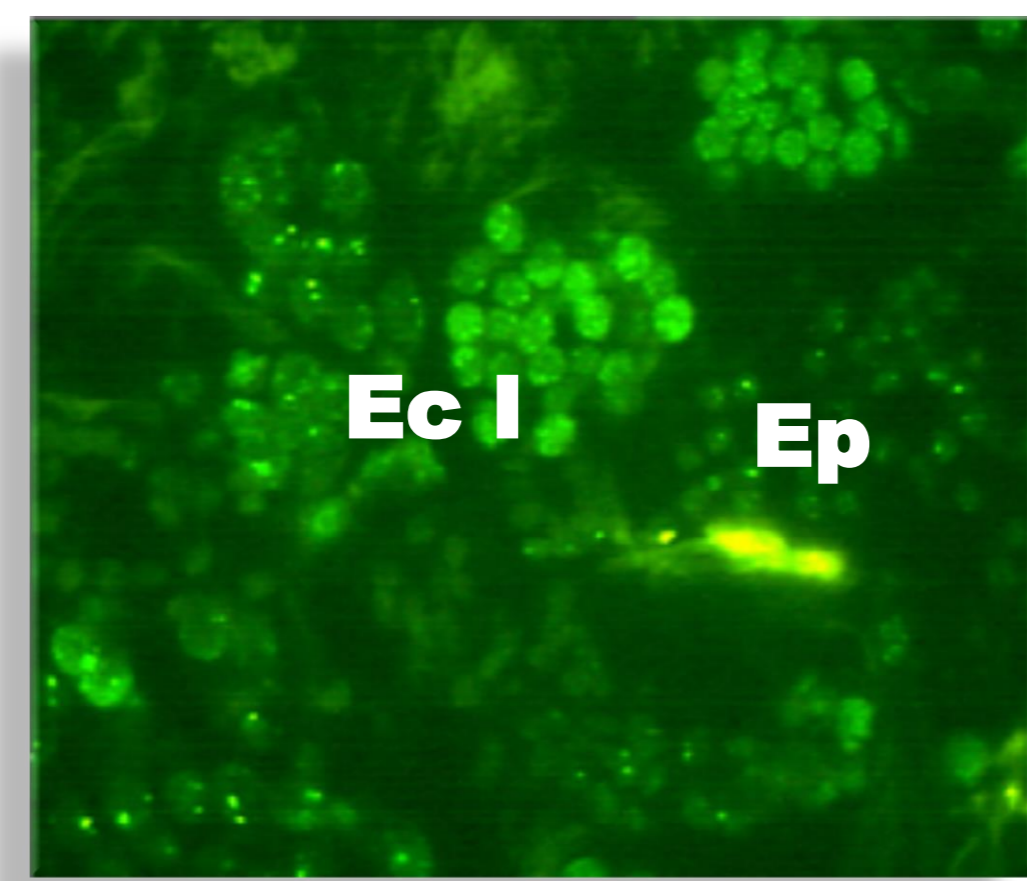


Fig. 2. Cistos de *E. varleyi* donde se muestra el marcaje con FITC. El patrón moteado más intenso aparece en los cistos de espermatoцитos I (Ec I) y menos marcado en los de espermátidas (Ep). 400X

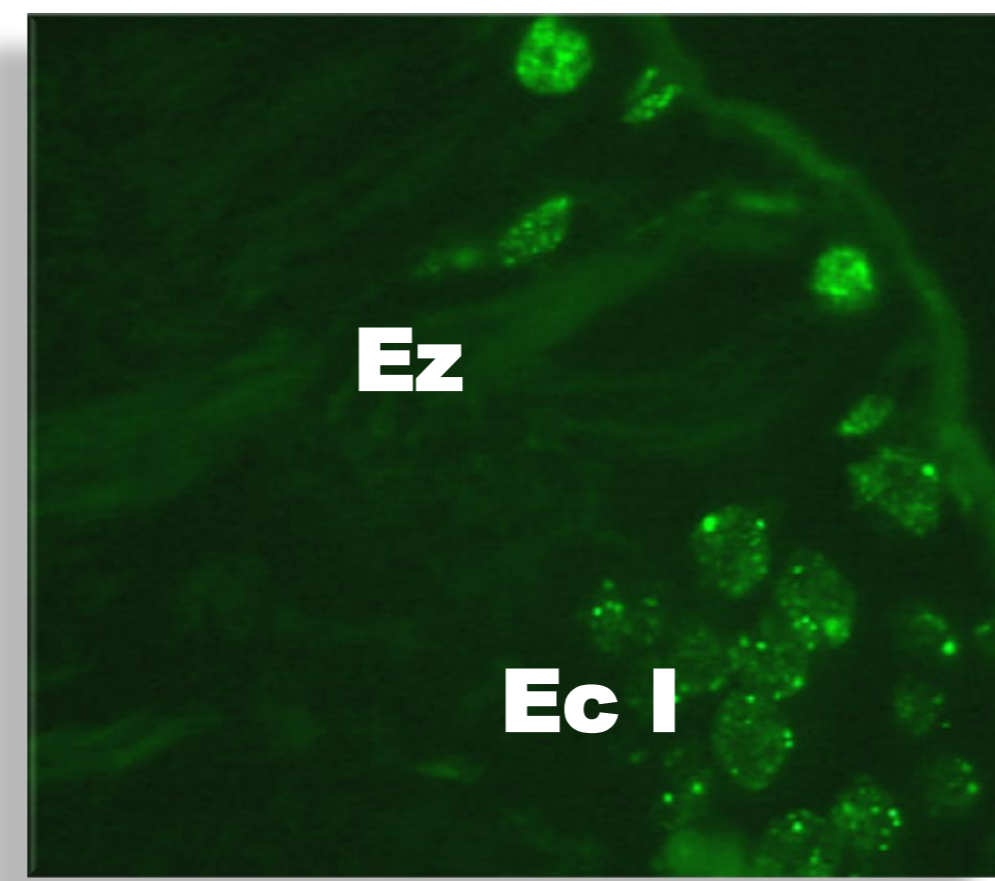


Fig. 3. Cistos de espermatozoides (Ez) de *E. planirostris* donde se demuestra la ausencia del patrón moteado y espermatoцитos I (Ec I) con el patrón moteado en verde difuso. 1000X

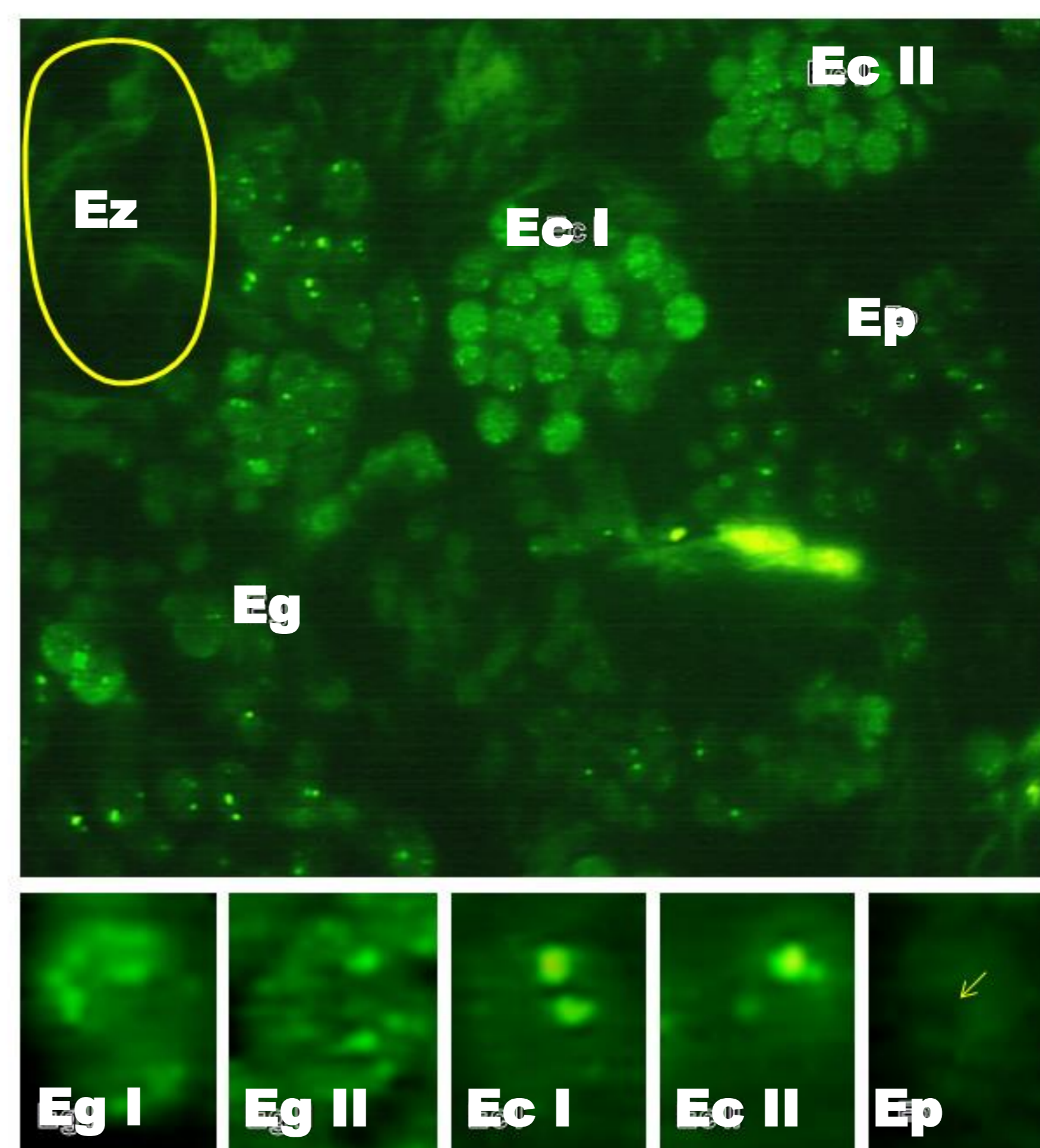


Fig. 4. Corte de lóbulo de *Eleutherodactylus goini* donde se aprecian las diferentes etapas de desarrollo de las células sexuales masculinas y los cambios hacia la disminución de la actividad transcripcional conforme avanza la diferenciación.

Se muestran cistos de espermatogonias I (Eg I), espermatogonias II (Eg II), espermatoцитos I (Ec I), espermatoцитos II (Ec II), espermátidas (Ep) y espermatozoides (Ez).

Debajo se presenta en detalles cada uno de estos tipos celulares a mayor aumento y que se identifican mediante el inmunomarcaje con FITC. La flecha señala la región del nucléolo con marca negativa.

**CONCLUSIÓN.** La presencia, disminución y desaparición del patrón moteado en los cistos de células sexuales masculinas de cuatro especies del género *Eleutherodactylus* es un criterio adecuado para identificar los estadios de la espermatogénesis sobre la base de la intensidad de su actividad transcripcional.

## LITERATURA CITADA

- [1] Misteli, T. and D. L. Spector. 1997. Protein phosphorylation and the nuclear organization of pre-mRNA splicing. *Trends in Cell Biol.* 7:135-138
- [2] Spector D. L. 2001. Nuclear domains. *J. Cell Sci.* 114: 2891-2893
- [3] George, R., M. L. Segura, L. González and L. F. Jiménez. 2002. Cellular organization of pre-mRNA splicing factors in several tissues. Changes in the uterus by hormone action. *Biol. Cell* 94: 99-108
- [4] Segura, M. L., S. Cruz, R. López, R. Lara, L. T. Agredano y L. F. Jiménez. 2006. Observaciones sobre la estructura del núcleo de células de meristemo de raíz de cebolla (*Allium cepa* L.) con el microscopio de fuerza atómica. *TIP* 9(1):30-33