

ZAMORANO
Carrera de Ciencia y Producción Agropecuaria

**Inmunolocalización de los marcadores de
proliferación celular CYR 61 y ERK ½ en el
tracto reproductor del perro**

Proyecto especial presentado como requisito parcial
para optar al título de Ingeniero Agrónomo
en el Grado Académico de Licenciatura.

Olvin Alejandro Rodriguez Valladares

Zamorano, Honduras
Diciembre, 2007

El autor concede a Zamorano permiso
para reproducir y distribuir copias de este
trabajo para fines educativos. Para otras personas
físicas o jurídicas se reservan los derechos del autor

Olvin Alejandro Rodriguez Valladares

Zamorano, Honduras
Diciembre, 2007

Inmunolocalización de los marcadores de proliferación celular CYR 61 y ERK ½ en el tracto reproductor del perro.

Presentado por

Olvin Alejandro Rodriguez Valladares

Aprobado:

John Jairo Hincapié, Ph.D.
Asesor Principal

Miguel Vélez, Ph.D.
Director Carrera Ciencia y
Producción Agropecuaria

Isidro Matamoros, Ph.D.
Asesor

Raúl Espinal, Ph.D.
Decano Académico

John Jairo Hincapié, Ph.D.
Coordinador Área Zootecnia

Kenneth L. Hoadley, D.B.A.
Rector

DEDICATORIA

A mis padres Olvin Edme Rodriguez Rodriguez e Imelda Lizeth Valladares Medina por su incondicional apoyo y consejos.

A mis hermanos Emmanuel, Liana y Maisa por inspirarme a buscar siempre lo que quiero y lograr mis metas.

A mi amigo Juan José Castelló Zambrano (Q.E.P.D.) por siempre hacer que nuestros días en Zamorano fueran cada vez más felices.

A mi pueblo catracho Honduras.

AGRADECIMIENTOS

A mi familia por todo su amor, cariño y comprensión.

A mi asesor el Dr. John Jairo Hincapié por brindarme la oportunidad de trabajar con él y por sus conocimientos aportados en este proyecto.

Al Dr. Isidro Matamoros por sus conocimientos aportados en este proyecto.

Al Dr. José Félix Pérez por brindarme su amistad y oportunidad de poner realizar mi pasantía y este proyecto en el Laboratorio de Reproducción Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid, España.

A M.Sc. Kellen de Sousa por su interminable apoyo y gran aporte de conocimientos para la realización de este proyecto.

A Álvaro Chavez, Fredy Altamirano, Diego Ceballos, Roger Osorto, Miguel Cabrera, Jorge Rojas, Pablo Longo, Oscar Hurtado, Mario Ordoñez, Lucia Guevara, Nadia Reyes, Mireya Solé, Sarahi Castañeda, Miguel Ochoa, Mauricio Diaz, Mario Raudes, Jorge Lagos, David Andino, Juan José Castelló, Julio Orellana, Cristhian Castro, Jorge López, Carlos Lynch, Ariana Torres, Emanuel Zuniga, por todo su apoyo durante estos años.

A todos mis colegas por los mejores momentos de mi vida.

RESUMEN

Rodriguez, O. 2007. Inmunolocalización de los marcadores de proliferación celular CYR 61 y ERK $\frac{1}{2}$ en el tracto reproductor del perro. Proyecto Especial del Programa de Ingeniero Agrónomo, Zamorano, Honduras. 16 p.

Los factores de crecimiento son proteínas que interactúan con receptores localizados en la membrana celular. Los testículos de los mamíferos contienen cantidades apreciables de testosterona que, probablemente, sea la responsable del desarrollo de los conductos masculinos o de Wolff. El objetivo principal de este estudio fue la inmunolocalización de los marcadores de proliferación celular CYR61 y ERK $\frac{1}{2}$ en el tracto reproductor del perro y como objetivos específicos determinar la intensidad y proporción de tinción en diversos grupos celulares (células de Leydig, de Sertoli, peritubulares y germinales) del aparato reproductor del perro (testículo, cabeza, cuerpo y cola de epidídimo). Se utilizó tejido procedente del aparato reproductor de seis perros machos sanos que no presentaban ninguna anomalía, mestizos, entre seis y ocho años de edad. Para los marcadores de proliferación celular CYR 61 y ERK $\frac{1}{2}$ el porcentaje de células teñidas en los distintos grupos celulares que se expresaron fue siempre superior al 30% y su intensidad fue siempre superior al 50%. El uso de estos marcadores policlonales, por su misma idiosincrasia no tiene una selectividad a un determinado receptor sino que puede estar marcando más de un receptor en diferentes células.

Palabras clave: Canino, inmunohistoquímica, anticuerpos, Sertoli, Leydig, peritubulares, germinales, epidídimo, testículo, espermatogénesis.

Portadilla.....	i
Autoría.....	ii
Página de firmas.....	iii
Dedicatoria.....	iv
Agradecimientos.....	v
Resumen.....	vi
Contenido.....	vii
Índice de tablas.....	viii
Índice de figuras.....	ix
INTRODUCCIÓN.....	1
MATERIALES Y MÉTODOS.....	4
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	8
CONCLUSIONES.....	14
RECOMENDACIONES.....	15
BIBLIOGRAFÍA.....	16

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla	Página
1. Escala de intensidad utilizada para la valoración inmunohistoquímica.....	6
2. Escala de área utilizada para la valoración inmunohistoquímica.....	6
3. Composición de disolución de citrato sódico.....	6
4. Composición del PBS (Tampón Fosfato Salino).....	6
5. Intensidad de tinción en los diferentes tejidos del tracto reproductor del perro..	8
6. Área de tinción en los diferentes tejidos del tracto reproductor del perro.....	9
7. Comparación entre la intensidad y porcentaje de área de tinción entre los diferentes tejidos del tracto reproductor del perro y el anticuerpo utilizado.....	9

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1. Tinción inmunohistoquímica para CYR 61 en el testículo.....	10
2. Tinción inmunohistoquímica para CYR 61 en el testículo.....	10
3. Tinción inmunohistoquímica para ERK ½ en el testículo.....	10
4. Tinción inmunohistoquímica para ERK ½ en el testículo.....	10
5. Tinción inmunohistoquímica para CYR 61 en la cabeza del epidídimo.....	11
6. Tinción inmunohistoquímica para ERK ½ en la cabeza del epidídimo.....	11
7. Tinción inmunohistoquímica para CYR 61 en el cuerpo del epidídimo.....	11
8. Tinción inmunohistoquímica para ERK ½ en el cuerpo del epidídimo.....	11
9. Tinción inmunohistoquímica para CYR 61 en la cola del epidídimo.....	12
10. Tinción inmunohistoquímica para ERK ½ en la cola del epidídimo.....	12

INTRODUCCIÓN

A lo largo de la historia la veterinaria ha estado vinculada más a los animales de producción que a los animales domésticos, por dicha razón los avances en la misma han sido muy lentos.

Tradicionalmente los perros han cumplido un papel de guardián tanto para hogares como para propiedades, en los últimos años los perros son usados además en diversas áreas tales como: la caza, carreras, guía para gente no vidente y en la policía para detección de drogas.

Los factores de crecimiento son proteínas que tienen un peso molecular menor de 30 kDa que interactúan con receptores localizados en la membrana celular, comunicándose con segundos mensajeros a través de cambios conformacionales que inducen la autofosforilación de residuos de tirosina localizados sobre el dominio intracelular del receptor. Aunque inicialmente se les asoció con la estimulación de la proliferación celular, actualmente se ha documentado que participan en múltiples funciones, entre las cuales se encuentra: la regulación del ciclo celular, la estimulación de la migración celular, el transporte de aminoácidos y la síntesis de Acido Ribonucleico (ARN) y proteínas, la introducción y la utilización de glucosa. Además, por estar localizados en forma ubicua, se ha sugerido que estos factores tienen un papel en la supervivencia celular y en la regulación de la homeóstasis del organismo (Carpenter 1987; Hill 1989).

Los factores de crecimiento han sido clasificados en familias, considerando para ello sus características estructurales y efectos biológicos, en: la familia del Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF), la del Factor de Crecimiento Fibroblástico (FGF), la del Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas (PDGF), la del Factor de Crecimiento Similar a la Insulina (IGF), la del Factor Transformante de Crecimiento β (TGF - β) y los Factores de Crecimiento Hematopoyéticos (Hill 1989).

Los factores de crecimiento provocan respuestas celulares uniéndose a receptores de la superficie de la célula específicos en su tejido. Los factores de crecimiento polipeptídicos regulan la proliferación de muchos tipos de células, así como el crecimiento del tracto reproductor (Hafez y Hafez 2002).

Muchos de estos factores de crecimiento han sido aislados del tejido testicular de diferentes especies y la evidencia sugiere que estos factores desempeñan un rol en el control de la espermatogénesis (Lamb 1993).

Los testículos de los animales domésticos se originan cerca de los riñones y, en muchos, sino en todos los mamíferos, descienden al escroto durante la vida fetal. Durante la vida fetal, los testículos de los mamíferos contienen cantidades apreciables de testosterona que, probablemente, sea la responsable del desarrollo de los conductos masculinos o de Wolff (Cole y Cupps 1959).

Los espermatozoides se forman en los túbulos seminíferos de los testículos. Estos túbulos contienen una serie compleja de células germinales en desarrollo que finalmente constituirán los gametos masculinos (Hafez y Hafez 2002).

Cuando los espermatozoides abandonan el testículo pasan, a través del canal eferente, al epidídimo. Es éste un órgano fibroso compacto pegado al borde posterior o superior del testículo y consta, básicamente, de un tubo muy enrollado. Por lo general, el epidídimo se divide anatómicamente en cabeza, cuerpo y cola; la cabeza y la cola son las porciones agrandadas de los extremos y el cuerpo es la parte más delgada que queda entre ambos. El segmento inicial tiene un grueso epitelio y una luz estrecha que contiene pocos espermatozoides; probablemente esté implicado en la reabsorción de la mayor parte del fluido que abandona el testículo. El segmento medio tiene un epitelio ligeramente más fino y una luz más ancha con muchos espermatozoides; es en este segmento donde los espermatozoides maduran. El segmento terminal tiene un epitelio corto y un lumen muy ancho y repleto de espermatozoides; este es el lugar donde se almacenan los espermatozoides que esperan la eyaculación (Cole y Cupps 1959).

La espermatogénesis representa el total de cambios que dan lugar a la transformación de las células primordiales o espermatogonios que revisten los túbulos seminíferos, en espermatozoos libres dentro de la luz tubular. Todos estos cambios del epitelio seminífero se producen en la proximidad de un segundo tipo celular, la célula de Sertoli. Estas grandes células están insertas en la membrana basal y tienen unas expansiones largas y numerosas que pueden contactar con todas las demás células del interior del túbulo. No se conoce el papel exacto que desempeñan estas células, al parecer, aportan nutrición y permiten que maduren las espermátides, liberándolas por influencia de las hormonas de la pituitaria anterior (Dukes y Swenson 1981).

Las células intersticiales, denominadas a veces células de Leydig, están diseminadas entre los tubulos seminíferos y son la principal fuente de hormonas andrógenas. Los testículos del verraco contienen una proporción mayor de células intersticiales que los de los otros animales domésticos (Dukes y Swenson 1981).

La Inmuno-Histo-Química (IHQ) corresponde a un grupo de técnicas de inmunotinción que permiten demostrar una variedad de antígenos presentes en las células o tejidos utilizando anticuerpos marcados. Estas técnicas se basan en la capacidad de los anticuerpos de unirse específicamente a los correspondientes antígenos. Esta reacción es visible sólo si el anticuerpo está marcado con una sustancia que absorbe o emite luz o produce coloración (Manual de Patología General 2004).

La aplicación directa de anticuerpos policlonales o monoclonales sobre secciones tisulares permite la localización micro-anatómica de su expresión y su correlación con los parámetros morfológicos, aumentando la sensibilidad y especificidad del estudio y proporcionando información adicional esencial en muchos casos.

En las últimas décadas la utilización de IHQ ha sido creciente y se ha consolidado como tecnología esencial en el diagnóstico patológico de rutina. En general y muy especialmente en patología oncológica, son cada vez más las patologías cuyo diagnóstico y clasificación requiere IHQ. La incorporación de nuevos protocolos de recuperación antigénica y la afluencia constante de nuevos anticuerpos están ampliando notablemente el ámbito de aplicación con nuevas utilidades en diagnóstico y pronóstico (Histopat laboratoris 2003).

Con base en lo anterior se decidió realizar una investigación la cual tuvo como objetivo principal la inmunolocalización de los marcadores de proliferación celular CYR61 y ERK $\frac{1}{2}$ en el tracto reproductor del perro y como objetivos específicos determinar la intensidad y proporción de tinción en diversos grupos celulares: células de Leydig, Sertoli, peritubulares y germinales, del aparato reproductor del perro (testículo, cabeza, cuerpo y cola de epidídimo).

MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se realizó entre febrero y abril del año 2007 en el Laboratorio de Reproducción del Hospital Clínico Veterinario de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid, España.

Se utilizó tejido procedente del aparato reproductor de seis perros mestizos, entre seis y ocho años de edad, machos sanos que no presentaban ninguna anomalía.

Los aparatos se recolectaron inmediatamente después del sacrificio. Los testículos se fijaron en formol al 10% durante 24 horas manteniéndolos en refrigeración a una temperatura de 4°C.

Se recogieron muestras de 1cm de grosor y posteriormente se incluyeron en parafina sintética utilizando un procesador automático y se elaboraron bloques que luego fueron seccionados con un micrótomo en cortes de 5µm de grosor las cuales se montaron en portaobjetos. En cada portaobjetos se montaron dos secciones de corte, una correspondiente al control positivo y otro al control negativo. Los portaobjetos se dejaron secar a temperatura ambiente y fueron almacenados para su futura utilización.

Para localizar los marcadores y sus receptores se utilizaron técnicas inmunohistoquímicas con los siguientes anticuerpos primarios policlonales:

Anticuerpo policlonal CYR 61

Anticuerpo policlonal ERK ½

Los controles negativos procedían del mismo tejido y fueron tratados de la misma forma que los controles positivos, la única diferencia es que al tejido positivo se le añadió el anticuerpo primario y al control negativo no, a este control negativo se le aplicó PBS (Tampón Fosfato Salino) 1% para evitar que las muestras se secaran.

Los tejidos montados en los portaobjetos se sometieron a un proceso de desparafinación en Xilol (dos inmersiones durante 5 minutos cada una) y a una rehidratación en concentraciones decrecientes de alcohol absoluto de 90%, 80%, 70% (una inmersión de cinco minutos en cada una de las concentraciones) y una última inmersión en agua destilada durante 5 minutos.

Posteriormente, las muestras se sometieron a una recuperación antigénica con el fin de desenmascarar los antígenos y reducir interferencias, sumergiéndolas en una solución de citrato sódico de pH 6 a alta presión y temperatura, en una olla de presión durante 30 minutos.

Luego se procedió a una inactivación de la peroxidasa endógena sumergiendo los portaobjetos en peroxidasa pura (recubierta con papel aluminio para evitar reacción con la luz) durante 15 minutos. Al finalizar la inactivación se procedió a un triple lavado con PBS 1%. Luego se secaron los portaobjetos con un bastoncillo de algodón y se dibujó con un lápiz hidrofóbico (Daido Sangyo Corp, Tokio, Japón) una línea hidrofóbica alrededor de las secciones.

Posteriormente se realizó el bloqueo de ligaciones inespecíficas con una solución de 10mL de PBS 1% + 150 microlitros de suero de cabra (Vectastin ABC Kit, PK-6101, Vector Labs – Burlingame, CA 94010 USA) aplicando dicha solución hasta cubrir totalmente el tejido y se incubaron durante 30 minutos en una cámara húmeda a temperatura ambiente.

Una vez finalizado el bloqueo se lavaron los portaobjetos en PBS 1% y se procedió a añadir el anticuerpo primario. Este se aplicó sólo a la sección correspondiente al control positivo. El control negativo fue tratado solamente con PBS 1% para evitar su secado. Las muestras se incubaron durante 24 horas en una cámara húmeda a temperatura ambiente.

Tras la incubación con el anticuerpo primario, se sumergieron los portaobjetos en PBS 1% durante 5 minutos y se añadió el anticuerpo secundario tanto a la sección positiva como negativa hasta cubrir totalmente el tejido. Las muestras se incubaron durante 30 minutos en una cámara húmeda a temperatura ambiente.

Luego, se lavaron las muestras con PBS 1% y se procedió a aplicar el ABC (Vectastin ABC Kit, PK-6101, Vector Labs – Burlingame, CA 94010 USA) tanto en el control positivo como en el control negativo y se dejó incubar durante 30 minutos en una cámara húmeda a temperatura ambiente.

Posteriormente se lavaron las muestras con PBS 1% y luego se aplicó el colorante DAB (Chromogen System, K 3466, Dakocytomation – Carpintería, CA 93013 USA) tanto en el control positivo como en el control negativo, dejando DAB en el tejido durante un tiempo de 1 minuto, luego se procedió a un lavado por inmersión en PBS 1%.

Luego las muestras se tiñeron sumergiéndolas 10 veces en hematoxilina de Harris solución DC (PANREAC QUIMICA SA, Barcelona, España) y posteriormente se realizó el montaje de las muestras con el medio Aquatex (MERCK, HC 615844, Darmstadt, Alemania).

Valoración de las muestras. La expresión de los anticuerpos fue valorada bajo un microscopio óptico con un campo de visión 20X para la localización de ambos anticuerpos en el tejido. Posteriormente fueron sacadas 10 fotografías con una cámara digital de los sectores más representativos de la sección positiva de cada tejido para su análisis posterior en el programa Image J (Java Corporation).

VARIABLES A MEDIR FUERON LA INTENSIDAD (Tabla 1) y proporción de tinción (Tabla 2) en diversos grupos celulares (células de Leydig, Sertoli, peritubulares y germinales) del aparato reproductor del perro (testículo, cabeza, cuerpo y cola de epidídimo).

Tabla 1. Escala de intensidad utilizada para la valoración inmunohistoquímica

Intensidad con que se tiñe el grupo celular	Proporción de teñido en grupo celular
0: Sin tinción	0: No hay células teñidas
1: Tinción débil	1: 0 – 30% de células teñidas
2: Tinción moderada	2: 30 – 60% de células teñidas
3: Tinción intensa	3: 60 – 80% de células teñidas
4: Tinción muy intensa	4: > 80% de células teñidas

Tabla 2. Escala de área utilizada para la valoración inmunohistoquímica

Porcentaje con que se tiñe el grupo celular	Proporción del área teñida
0: Sin área teñida	0: No hay área teñida
1: Porcentaje bajo	1: 0 – 20% de área teñida
2: Porcentaje medio	2: 20 – 40% de área teñida
3: Porcentaje alto	3: 40 – 50% de área teñida
4: Porcentaje muy alto	4: > 50% de área teñida

Reactivos, Disoluciones y Medios. Todas las sales usadas para la preparación de los medios y disoluciones, así como los alcoholes, procedían de PANREAC QUIMICA S.A, Barcelona, España.

Tabla 3. Composición de disolución de citrato sódico

Citrato sódico ($C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$)	2.94 g
Agua destilada	1 L
Se disuelve y se ajusta el pH 5.8 – 6.2	

Tabla 4. Composición del PBS (Tampón Fosfato Salino)

Fosfato de Sodio (Na ₂ HPO ₄)	14 g
Fosfato de Potasio (KH ₂ PO ₄)	4.3 g
Cloruro de Sodio (NaCl)	7.2 g
Agua destilada	1 L
Se disuelve y se ajusta el pH 7 – 7.2	

Para el análisis de los datos se utilizó el programa Statistical Analysis System (SAS 2002), utilizando un Diseño Completamente al Azar (DCA) donde el principal factor lo constituyó el tipo de tejido analizado (testículo, cuerpo, cabeza y cola de epidídimo) con dos tratamientos (los anticuerpos) y 6 unidades experimentales (6 perros). Se realizó una separación de medias utilizando el Modelo Lineal General (GLM) y la prueba de Duncan. Los valores porcentuales fueron corregidos con la función arc-seno y el nivel de significancia exigido fue ≤ 0.05 .

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Intensidad de tinción. Se encontró mayor porcentaje de intensidad en las células del tejido de testículo ($P<0.05$) en comparación con el resto de tejidos analizados.

Cuando se utilizó el anticuerpo CYR 61 en el tejido de cuerpo de epidídimo se encontró una diferencia ($P<0.05$) con respecto al anticuerpo ERK ½ aplicado al mismo tejido, sin embargo, no hubo diferencia ($P>0.05$) entre los anticuerpos utilizados en el resto de los tejidos (Tabla 5).

Tabla 5. Intensidad de tinción (%) en los diferentes tejidos del tracto reproductor del perro.

	Testículo	Cabeza	Cuerpo	Cola
Anticuerpo				
CYR 61	87.88 ^a	45.35 ^d	67.43 ^b	53.97 ^c
ERK ½	84.54 ^a	47.11 ^d	54.80 ^c	54.80 ^c

Intensidad de tinción: 0 sin tinción (no hay células teñidas); 1 tinción débil (0 – 30% de células teñidas); 2 tinción moderada (30 – 60% de células teñidas); 3 tinción intensa (60 – 80% de células teñidas); 4 tinción muy intensa (> 80% de células teñidas)

Valores en la misma columna con distinta letra, difieren entre sí ($P<0.05$).

C.V. = 29.66.

Porcentaje de área de tinción. Se encontró el mayor porcentaje de área de tinción en las células del tejido de testículo, ($P<0.05$) en comparación con el resto de tejidos analizados.

Cuando se utilizaron ambos anticuerpos en el tejido de cuerpo de epidídimo no hubo diferencia ($P>0.05$), a diferencia del resto de tejidos, que sí expresaron diferencia ($P<0.05$) al utilizar ambos anticuerpos (Tabla 6).

Tabla 6. Área de tinción (%) en los diferentes tejidos del tracto reproductor del perro

	Testículo	Cabeza	Cuerpo	Cola
Anticuerpo				
CYR 61	48.89 ^b	37.94 ^d	31.75 ^e	42.49 ^c
ERK ½	58.29 ^a	30.96 ^e	35.96 ^e	35.96 ^d

Porcentaje de tinción: 0 sin área teñida (no hay área teñida); 1 porcentaje bajo (0 – 20% de área teñida); 2 porcentaje medio (20 – 40% de área teñida); 3 porcentaje alto (40 – 50% de área teñida); 4 porcentaje muy alto (> 50% de área teñida).

Valores en la misma columna con distinta letra, difieren entre sí (P<0.05).

C.V. = 30.00

Se encontró una correlación positiva (0.4012) entre el porcentaje del área teñida y el porcentaje de intensidad de tinción (<0.0001). Esto corrobora los datos de las tablas 5, 6 y 7, las cuales muestran que el mayor porcentaje de área teñida y la mayor intensidad de tinción se obtuvo en el tejido testicular utilizando ambos anticuerpos.

Tabla 7. Comparación entre la intensidad y porcentaje de área de tinción entre los diferentes tejidos del tracto reproductor del perro y el anticuerpo utilizado (%).

Tejido	Anticuerpo CYR 61		Anticuerpo ERK ½	
	Intensidad	Área de tinción	Intensidad	Área de tinción
Testículo	87.88	48.89	84.54	58.29
Cabeza epidídimo	45.35	37.94	47.11	30.96
Cuerpo epidídimo	67.43	31.75	54.80	35.96
Cola epidídimo	53.97	42.49	54.80	35.96
CV	29.66	30.00	29.66	30.00

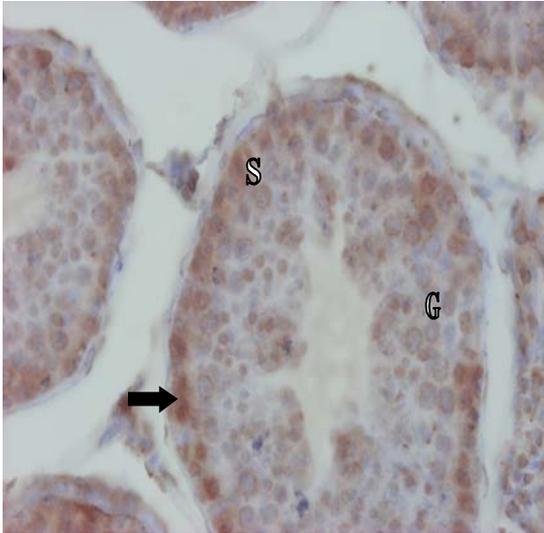


Figura 1.

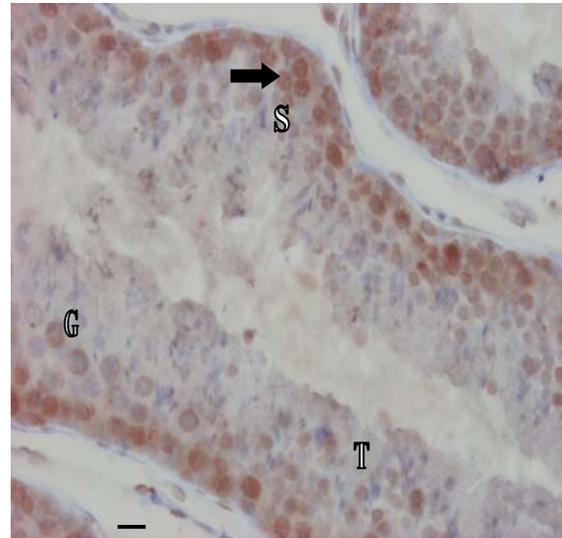


Figura 2.

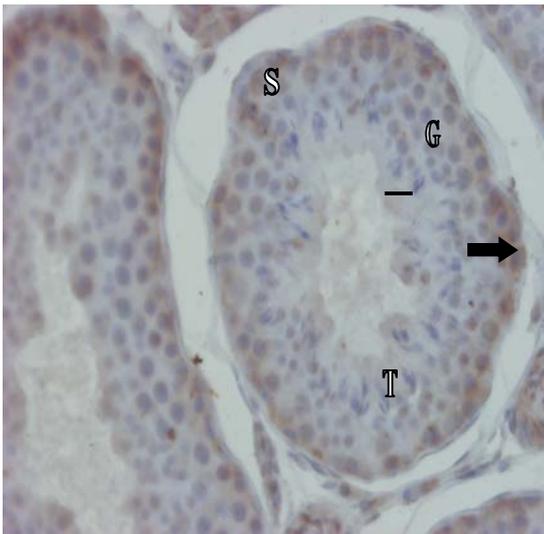


Figura 3.

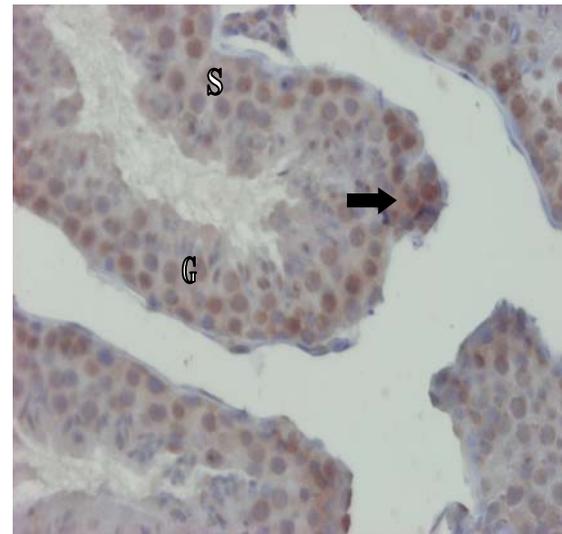


Figura 4.

Figura 1 y 2. Tinción inmunohistoquímica para CYR 61 en el testículo.

Figura 3 y 4. Tinción inmunohistoquímica para ERK 1/2 en el testículo.

Patrones representativos de tinción a 20X.

Células de Sertoli (S), células germinales (G), espermátides (T)

Tinción muy intensa (■), tinción intensa (■), tinción moderada (□) y tinción débil (□).

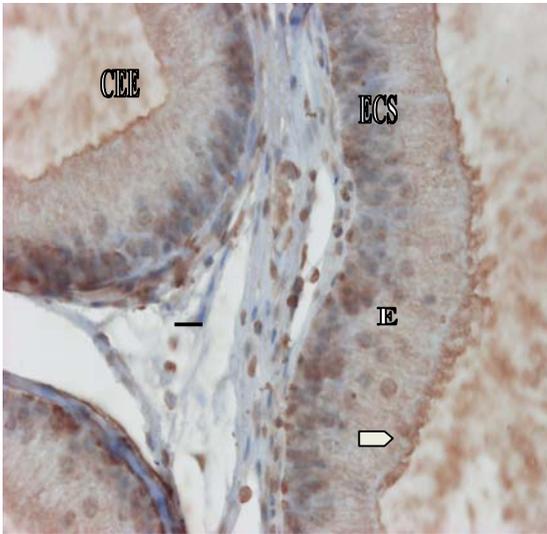


Figura 5

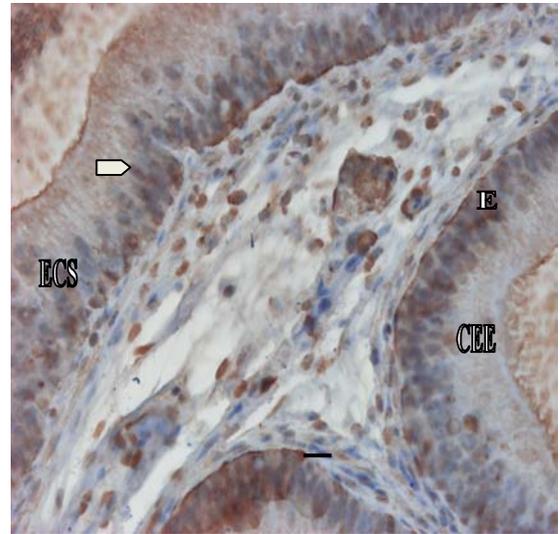


Figura 6

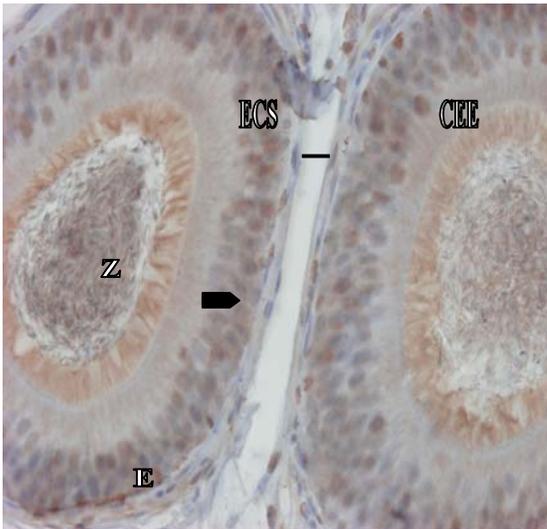


Figura 7

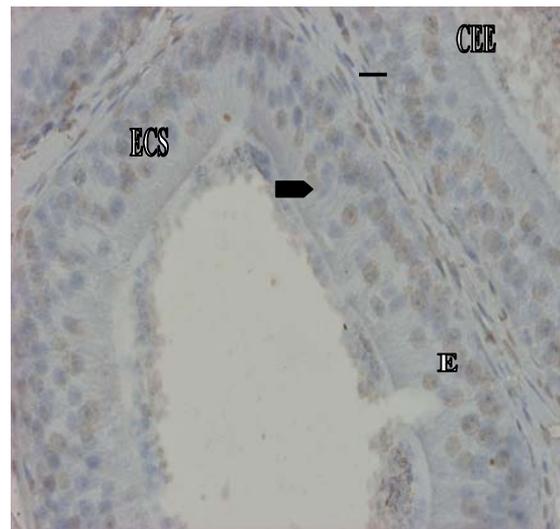


Figura 8

Figura 5. Tinción inmunohistoquímica para CYR 61 en la cabeza del epidídimo.

Figura 6. Tinción inmunohistoquímica para ERK $\frac{1}{2}$ en la cabeza del epidídimo.

Figura 7. Tinción inmunohistoquímica para CYR 61 en el cuerpo del epidídimo.

Figura 8. Tinción inmunohistoquímica para ERK $\frac{1}{2}$ en el cuerpo del epidídimo.

Patrones representativos de tinción a 20X.

Epitelio cilíndrico pseudoestratificado (ECS), células epiteliales (E), espermatozoide (Z), conducto epididimario espirolado (CEE).

Tinción muy intensa (■), tinción intensa (■), tinción moderada (□) y tinción débil (□).

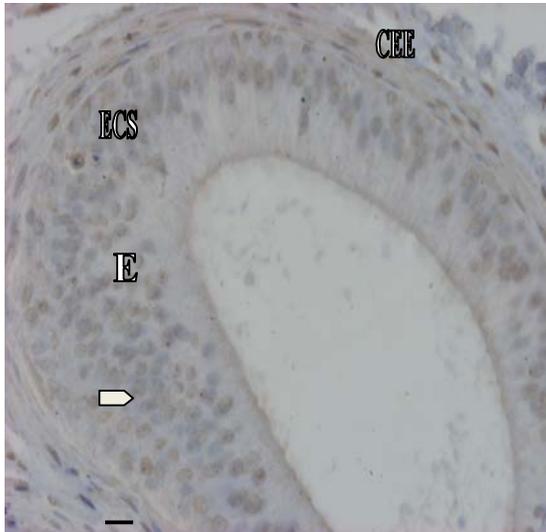


Figura 9

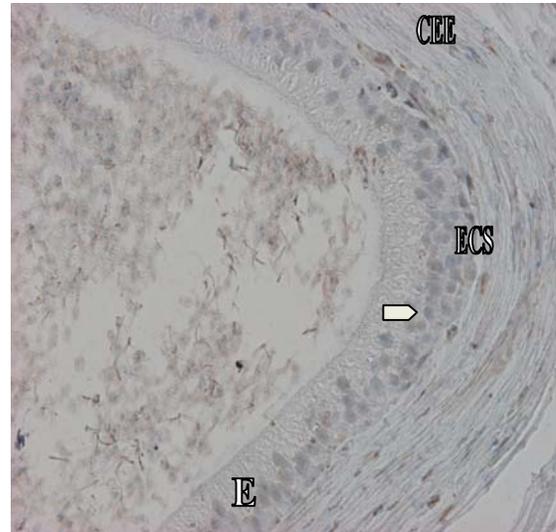


Figura 10

Figura 9. Tinción inmunohistoquímica para CYR 61 en la cola del epidídimo.

Figura 10. Tinción inmunohistoquímica para ERK 1/2 en la cola del epidídimo.

Patrones representativos de tinción a 20X.

Epitelio cilíndrico pseudoestratificado (ECS), células epiteliales (E), conducto epididimario espirolado (CEE).

Tinción muy intensa (\blacksquare), tinción intensa (\blacksquare), tinción moderada (\square) y tinción débil (\square).

Se observó la presencia de células de Sertoli, células germinales y algunas espermátides en diferentes etapas (Figuras 1, 2, 3 y 4) teniendo mayor tinción el anticuerpo CYR 61.

El ciclo espermatogénico comienza con una célula madre o espermatogonia de tipo A, que constituye el punto de partida de una serie espermatogénica. Antes de que la serie haya completado su evolución se inician otras varias en el mismo lugar del túbulo seminífero. Así cualquier sección de un túbulo seminífero muestra varias generaciones de células germinales superpuestas. Se desarrollan en estrecha relación unas con otras, de forma que en un área dada del epitelio seminífero hay una sucesión constante de asociaciones celulares que transcurren con regularidad cíclica (Cola y Cupps 1959).

En la cabeza del epidídimo se observó células epiteliales, el epitelio cilíndrico pseudoestratificado y el conducto epididimario espirolado (Figuras 5 y 6). Entre el conducto epididimario espirolado se observaron unas fibras largas con cierto grado de basofilia (azulosas) posiblemente debido al tipo de tinción, correspondientes a tejido conectivo denso irregular y a fibras musculares lisas. Dentro del conducto epididimario espirolado se observó una capa gruesa que rodea todo el conducto correspondiente al epitelio cilíndrico pseudoestratificado alto de gran espesor y una gran cantidad de estas células epiteliales de color café por efecto de la tinción. La tinción de estos grupos celulares epiteliales supone que en estos tejidos existen receptores de proliferación

celular y que posiblemente están vinculados en los procesos de maduración espermática que a su vez que pueden estar involucrados en la producción de factores para dicho proceso.

En el cuerpo del epidídimo se observó el epitelio cilíndrico pseudoestratificado, células epiteliales, espermatozoides y el conducto epididimario espirolado (Figuras 7 y 8). En esta región el conducto epididimario está rodeado por mayor cantidad de fibras musculares lisas que en la cabeza del epidídimo. Se observó el epitelio cilíndrico pseudoestratificado más delgado que en la cabeza, esto posiblemente a que cumplen una mayor función en la cabeza del epidídimo por la alta cantidad de células germinales. Los espermatozoides se logran ver con gran claridad es su proceso de maduración. En esta región es donde se obtuvo la mayor intensidad de tinción del epidídimo para el marcador CYR 61.

En la cola se determinó el epitelio cilíndrico pseudoestratificado, células epiteliales, conducto epididimario espirolado (Figuras 9 y 10). En esta región se observó el conducto epididimario revestido por un epitelio cilíndrico pseudoestratificado bajo y una gruesa capa muscular lisa. Las células igualmente se apreciaron de coloración entre basófila y café claro.

La relación entre el citoplasma de las células de Sertoli y las células germinales hace pensar que las primeras controlan el intercambio entre las células germinales y el medio que las rodea y que regula la secreción del líquido tubular en relación con la barrera hemato-testicular.

La barrera hemato-testicular no está completamente dilucidada, pero probablemente esté relacionada con la creación de las condiciones más favorables para la espermatogénesis o, más específicamente, para la división meiótica dentro de los túbulos. La barrera podría también limitar el acceso de las gonadotropinas al epitelio germinal, particularmente de los espermatocitos en adelante. Separa a las células germinales, particularmente haploides, del resto del sistema inmunológico del cuerpo, razón por la cual estas células son tratadas como extrañas cuando se inyectan al cuerpo. La barrera también evita que los anticuerpos que se forman naturalmente y que reaccionan con los espermatozoides y con las células germinales, lleguen a dichas células en condiciones normales (Cola y Cupps 1959).

Lo anterior hace suponer que el uso de este marcador policlonal, por su misma idiosincrasia no tiene una selectividad a un determinado receptor sino que puede estar inmunolocalizando más de un marcador de proliferación celular en diferentes células.

CONCLUSIONES

1. Los marcadores de proliferación CYR61 y ERK $\frac{1}{2}$ se expresaron en el aparato reproductor del perro.
2. La mayor intensidad de tinción se encuentra en el tejido testicular utilizando ambos anticuerpos.
3. El mayor porcentaje de área de tinción se encuentra en el tejido testicular, siendo el anticuerpo ERK $\frac{1}{2}$ el de mayor especificidad en este tejido.
4. Con los marcadores de proliferación celular CYR61 y ERK $\frac{1}{2}$ el porcentaje de células teñidas y su intensidad en los distintos grupos celulares que se expresaron fue siempre superior al 30% y 50% respectivamente.

RECOMENDACIONES

1. Realizar estudios de inmunolocalización utilizando otros anticuerpos policlonales y monoclonales en los mismos tejidos.
2. Realizar estudios de inmunolocalización utilizando estos mismos anticuerpos en los mismos tejidos pero en distinta especie.

BIBLIOGRAFÍA

Carpenter, G. 1987. Receptor for de epidermal growth factor and other polypeptide mitogens. Ann. Rev. Biochemistry. 56: 881-914.

Cole, H.H ; Cupps, P.T. 1959. Reproducción de los animales domésticos. 3ª ed. Acribia, S.A. España. 171, 184, 192, 199, 203.

Dukes, H.H. ; Swenson, M.J. 1981. Fisiología de los animales domésticos. 4ª ed. Vol. 2. Aguilar. México. 1649-1652.

Hafez, E.S.E. ; Hafez, B. 2002. Reproducción e Inseminación Artificial en animales. 7ª ed. Mc Graw Hill. México. 49-51, 98, 108.

Hill, D. J. 1989. Growth factor and their cellular actions. J. Reprod. Fert. 85: 723-734

Histopat laboratoris, 2003. Inmunohistoquímica: Introducción (en línea). Consultado el 14 de mayo de 2007. Disponible en <http://www.histopat.es/tec-inm-histoq.htm>

Lamb, D. J. 1993. Growth factors and testicular development. J. Urology. 150: 583-592

Manual de Patología General, 2004. Inmunohistoquímica (en línea). Consultado el 15 de mayo de 2007. Disponible en http://escuela.med.puc.cl/publ/patologiageneral/Patol_125.html.

SAS®. 2003. Statistical Analysis System 7.5 for Windows Standard Version. User's guide. Statistical Analysis Institute Inc. EUA.