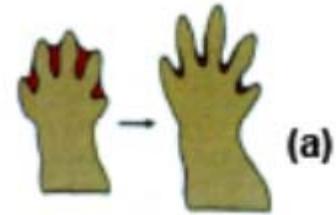


Medicina Molecular

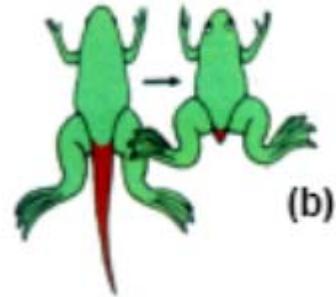
Apoptosis

Apoptosis en la biología del desarrollo

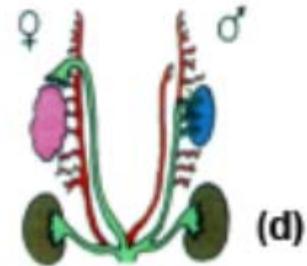
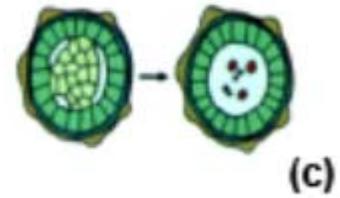
Desarrollo y morfogénesis



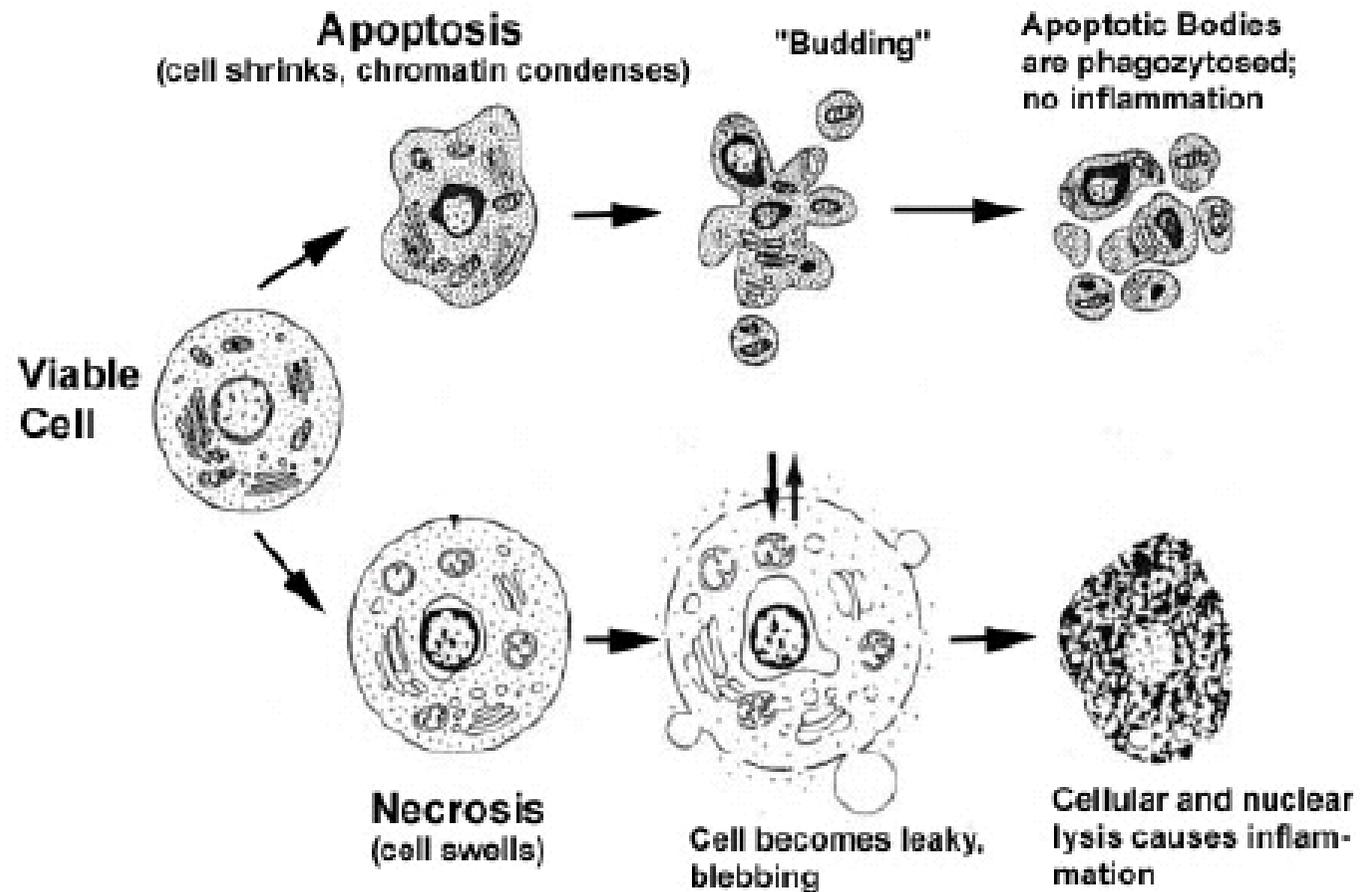
Homeostasis



Eliminación de células dañadas o peligrosas



Diferencias entre los procesos de apoptosis y necrosis



Detección de la apoptosis

- Caracterización morfológica
- Fragmentación del ADN
- Detección de oligonucleosomas
- Externalización de fosfatidilserina
- Evaluación de caspasas

Caracterización morfológica

• **Microscopía óptica:**

- ✚ Se utiliza para cortes histológicos teñidos con HE. Permite visualizar condensación de cromatina marginada en los bordes del núcleo.
- Depende del ojo del operador, no es específico para apoptosis.

• **Microscopia fluorescencia:**

Las tinciones son apropiadas para células en cultivo.

Se usan DAPI, Hoechst, IP, Naraja de Acridina/Bromuro de etidio.

- ✚ DAPI y Hoechst pueden atravesar la membrana y teñir el núcleo de células normales y apoptóticas, que se diferencian al microscopio.
- IP es colorante de ADN y por su gran tamaño no penetra células intactas, no tiñe células apoptóticas hasta las etapas más tardías.

Naranja de Acridina/ BrEt : captación diferencial. NA se intercala en el ADN dando una apariencia verde, BrEt es captado sólo en células no viables, se intercala en el ADN dándole una apariencia naranja.

 Si la célula está muerta, el BrEt sobrepasa el NA y se observa un núcleo naranja brillante.

 En cultivos primarios es poco viable porque requiere muchas células y gran cantidad de apoptosis.

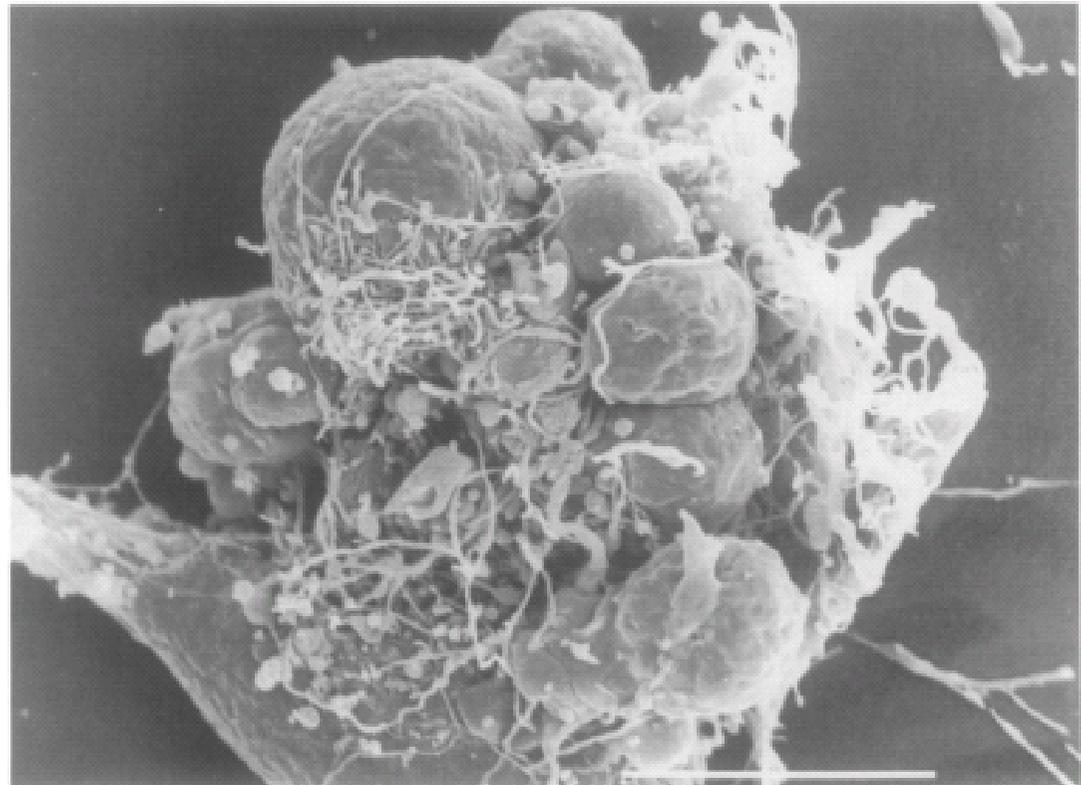
• **Microscopía electrónica:**

 Es la mejor forma de caracterización morfológica. Se pueden visualizar ultraestructuras como condensación de cromatina, contracción celular y cuerpos apoptóticos.

 El equipamiento es factor limitante.

Microscopía Electrónica

Figure 1. Scanning electron micrograph of apoptotic human aortic smooth muscle cell 24 h after addition of staurosporine (50 nM), a protein kinase C inhibitor, to culture medium (scale bar = 10 μm). A normal smooth muscle cell can be seen in the lower left corner.



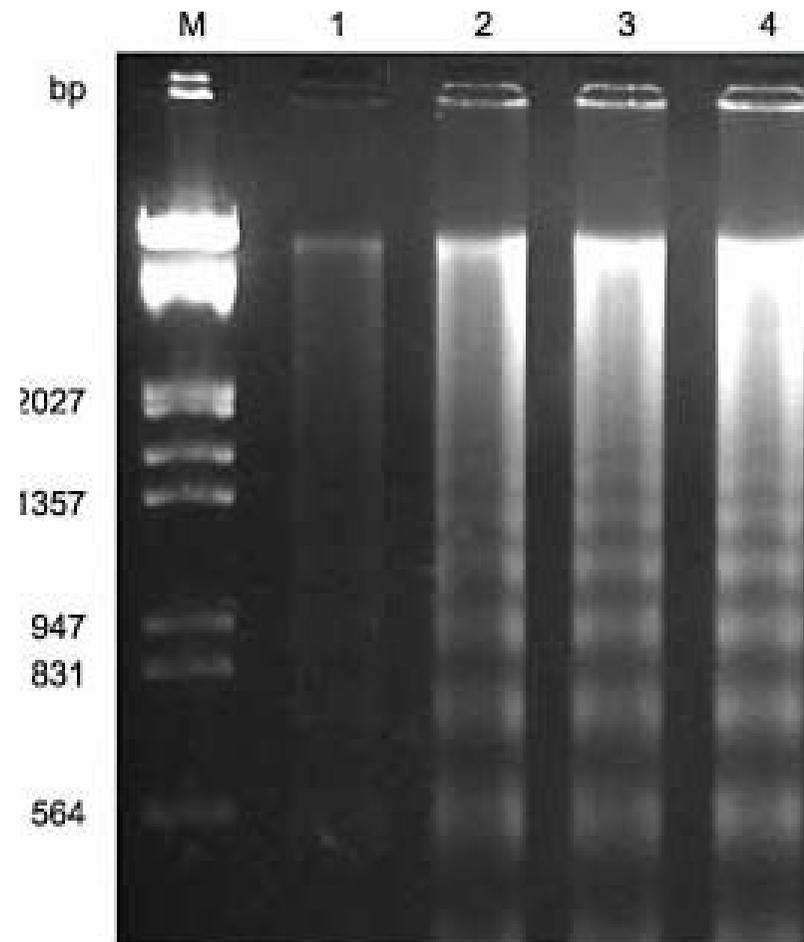
Fragmentación del ADN

- Durante el proceso de apoptosis se produce el corte internucleosomal del ADN en fragmentos múltiples de 180-200pb.
- La electroforesis en geles de agarosa y tinción con bromuro de etidio evidencia un patrón de “Ladder” que se visualiza con luz UV.
- El ADN necrótico se corta en forma aleatoria y se observa un patrón difuso.

 Técnica altamente específica.

-  Es poco sensible, se requieren grandes cantidades de ADN. Si se observa *ladder* se corrobora la apoptosis, pero si está ausente no se puede descartar la apoptosis y hay que evaluarla por otra técnica.

Electroforesis en geles de agarosa



Macrófagos tratados con dosis de testosterona superiores a 100nM sufren apoptosis.
Zhang, H et al, Methods Find Exp Clin Pharmacol 2003, 25(10).

Deteccción de oligonucleosomas: TUNEL

TUNEL =TdT- mediated dUTP nick end labelling.

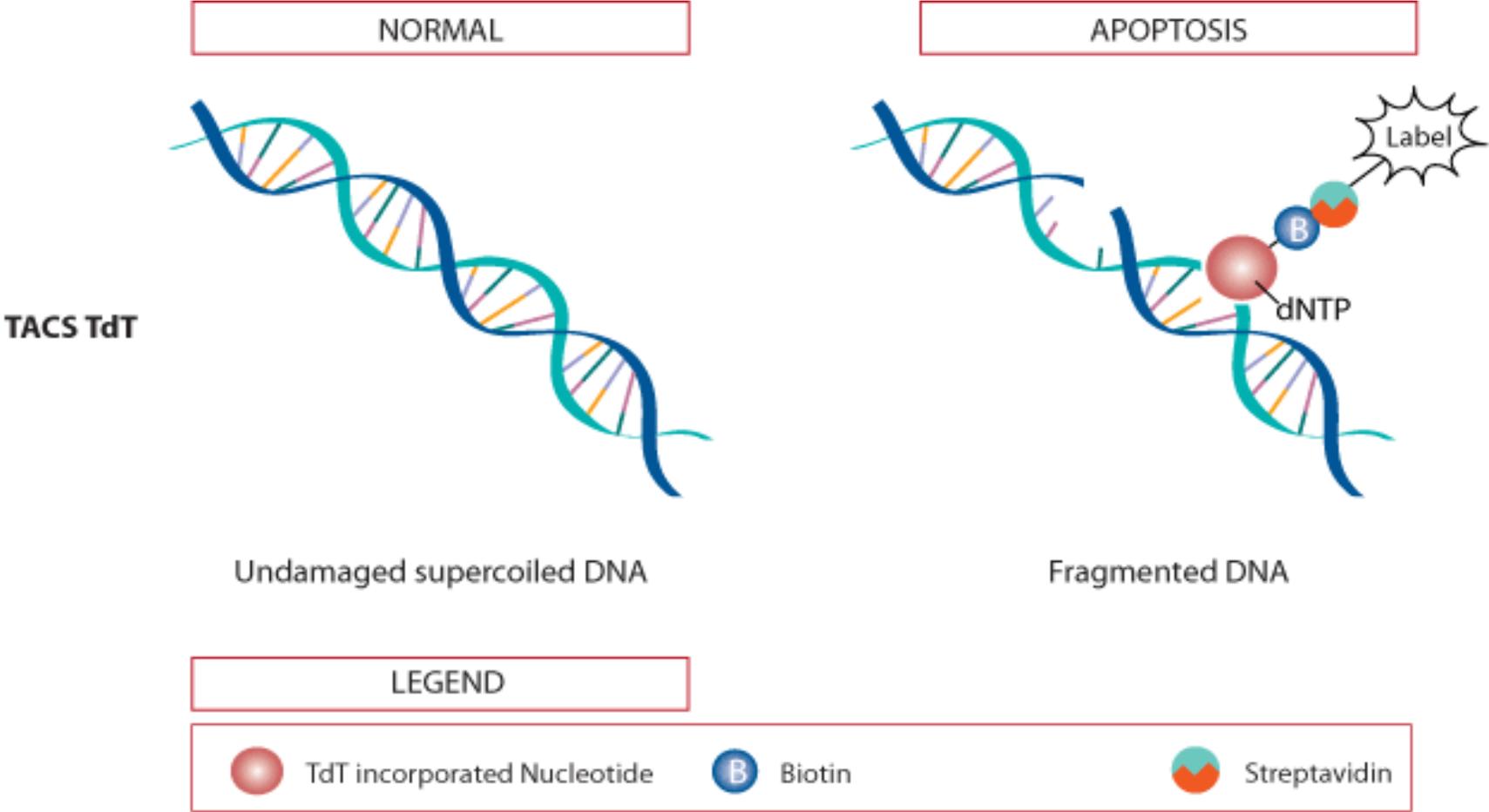
- La activación de endonucleasas durante la apoptosis genera fragmentos de ADN con terminaciones 3'-OH.
- Se utiliza la enzima TdT (Deoxinucleotidil Transferasa Terminal) para adosar deoxinucleótidos trifosfatos (dUTP), unidos a dioxigenina o biotina, a los fragmentos terminales.
- El conjugado anti-dioxigenina (o avidina) peroxidasa seguido de un revelado colorimétrico con el sustrato DAB, permite visualizar núcleos apoptóticos teñidos de marrón al microscopio. También se pueden utilizar marcadores fluorescentes.

 Es una técnica mucho más sensible que el Ladder porque evalúa células individuales.

Se puede realizar en cortes histológicos o en células fijadas provenientes de cultivos celulares.

 Las células necróticas tardías que presentan fragmentación del ADN pueden ser identificadas como apoptóticas.

TUNEL



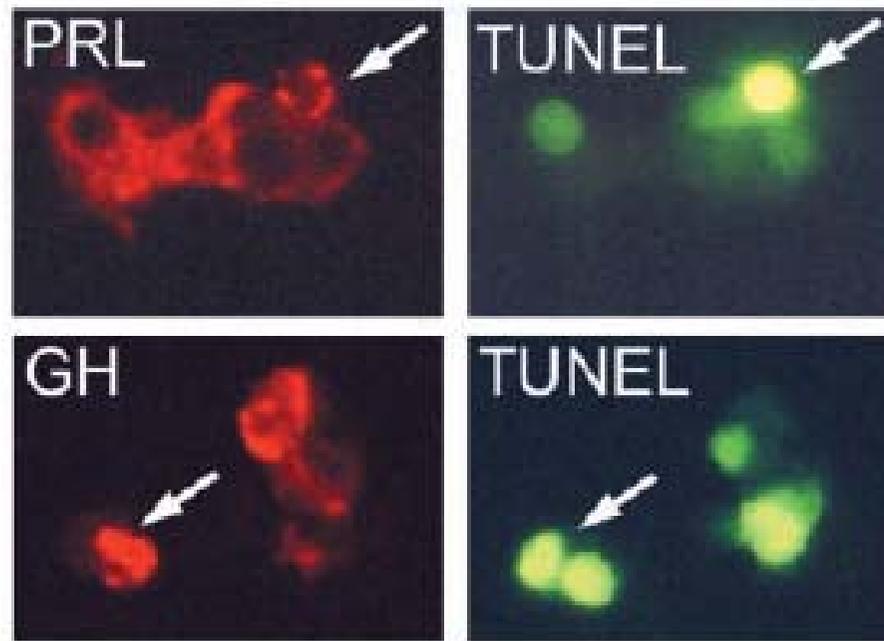
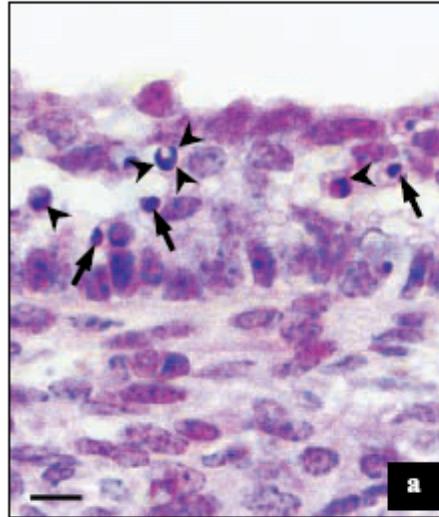


FIG. 3. A, TUNEL-positive lactotropes and somatotropes. Representative anterior pituitary cells showing immunoreactivity for PRL or GH and nuclear condensation by the TUNEL method (*green*); magnification, 500.

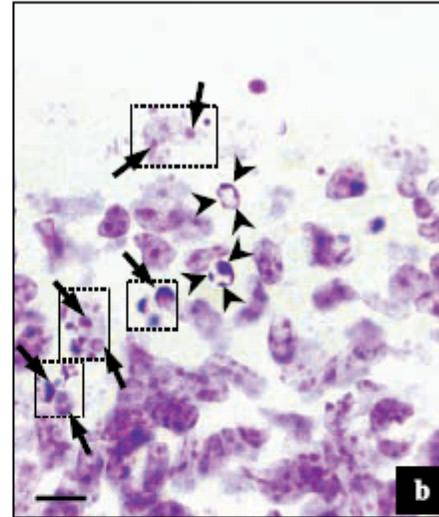
C. CARUSO, M. C. BOTTINO, M. PAMPILLO, D. PISERA, G. JAITA, B. DUVILANSKI, A. SEILICOVICH, AND M. LASAGA. *Endocrinology* 145(10):4677–4684

Células foliculares de un folículo ovarico atrésico

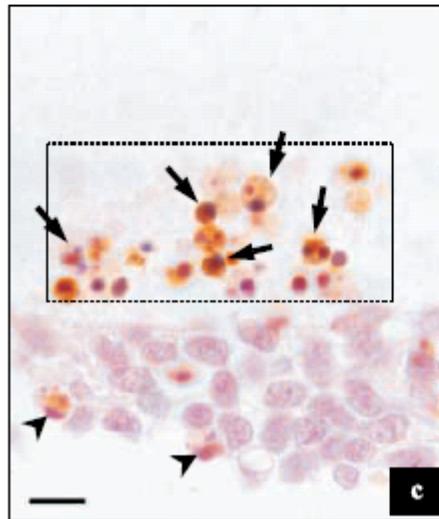
Hematoxilina-Eosina
de un ovario bovino



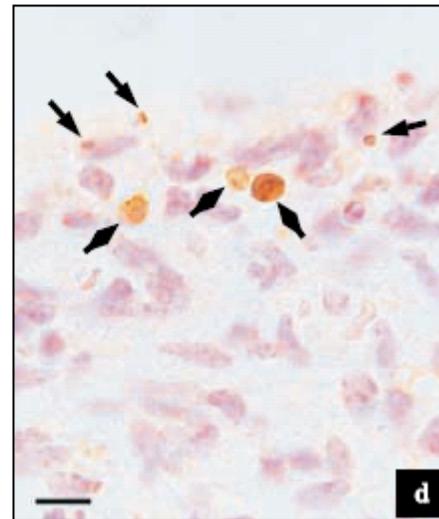
Tinción de Feulgen
de un ovario bovino



TUNEL de un ovario
canino



Tinción IHQ de ovario
bovino con
anticuerpos
monoclonales contra
simple hebra de ADN.



DetECCIÓN DE OLIGONUCLEOSOMAS: ELISA

- Durante la apoptosis las endonucleasas activas generan oligonucleosomas, la estructura de las histonas permanece conservada y el ADN se mantiene como doble cadena.
 - Durante la necrosis se degradan las histonas, hay muy pocos oligonucleosomas y muy poco ADN.
 - El ELISA es un método altamente específico porque detecta histonas intactas (1°Ac) y ADN doble cadena (2° Ac).
-
- ✓ Es un kit: placa 96wells cubierta con Acs contra histonas al que se agrega el lisado celular a evaluar.
 - ✓ Se unen las histonas a los Acs y se agrega el Ac 2° anti ADNds conjugado a un sistema de detección (x ej peroxidasa) y se revela desarrollando color visible a 405nm.

Externalización de FS- Anexina V

- La fosfatidilserina (FS) es un componente de la membrana plasmática. Se encuentra en la cara interna de células viables.
- La esternalización de FS es un evento temprano e irreversible en la apoptosis.
- La Anexina V es una proteína que se une con muy alta afinidad a la FS, se la utiliza acoplada a FITC.
- Se la combina con IP que, como no penetra células intactas, tiñe sólo células necróticas .
- Se evalúa con un citómetro de flujo o por microscopía de fluorescencia.

 Es una técnica muy sensible y específica.

 No se puede utilizar en cortes de tejido o células fijadas.

La tripsina puede producir externalización de FS!! No usarla para levantar células adheridas.

Evaluación de caspasas

1. Expresión de pro-caspasa y/o caspasa procesada mediante Western Blot, IHQ, Inmunofluorescencia.
 - Existen en el mercado anticuerpos que reconocen ambos fragmentos y otros que reconocen solo al fragmento procesado.

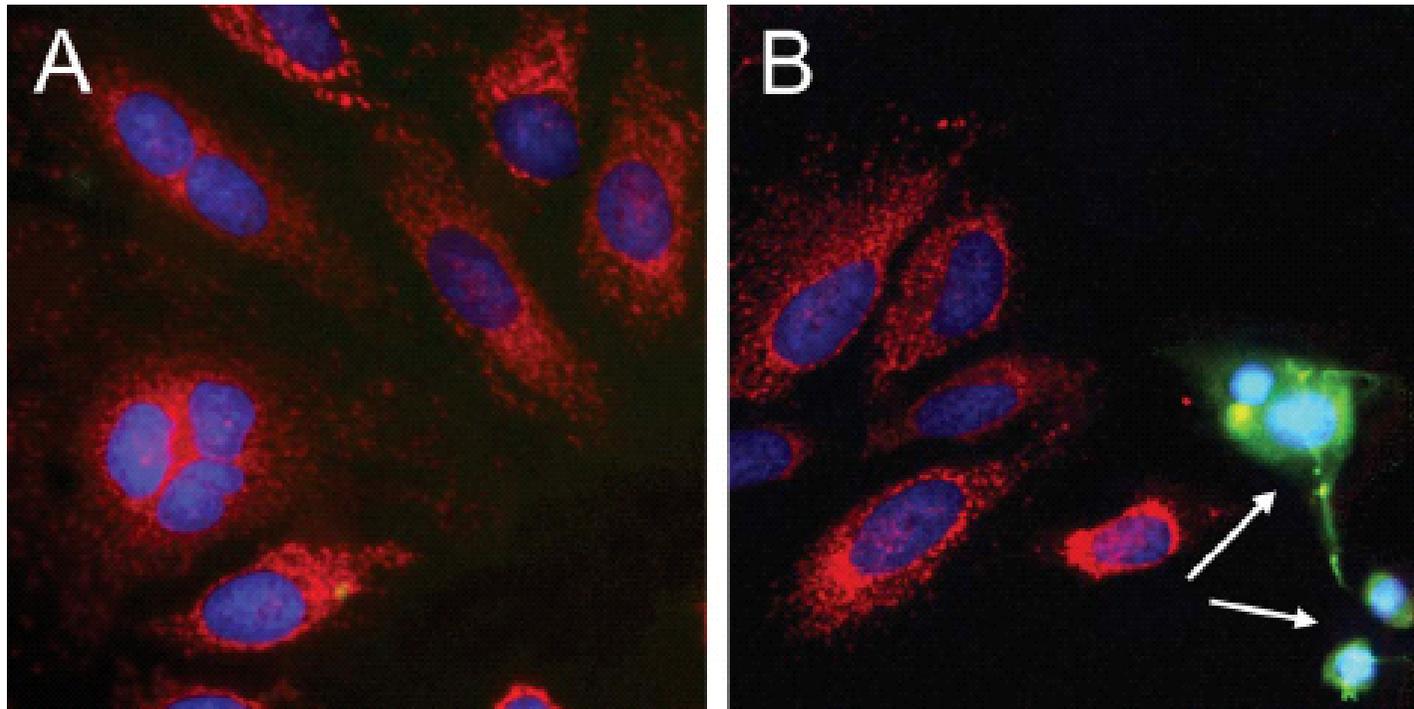
 Por WB se puede evaluar procesamiento en extractos protéicos de células de cultivo o biopsias de tejido.

Se puede partir de fracciones subcelulares, evaluar la cinética de procesamiento, y comparar la expresión de varias caspasas en la misma muestra.

 Se requiere alta calidad de Acs.

La presencia de caspasas procesadas no significa siempre activación. Usar métodos complementarios.

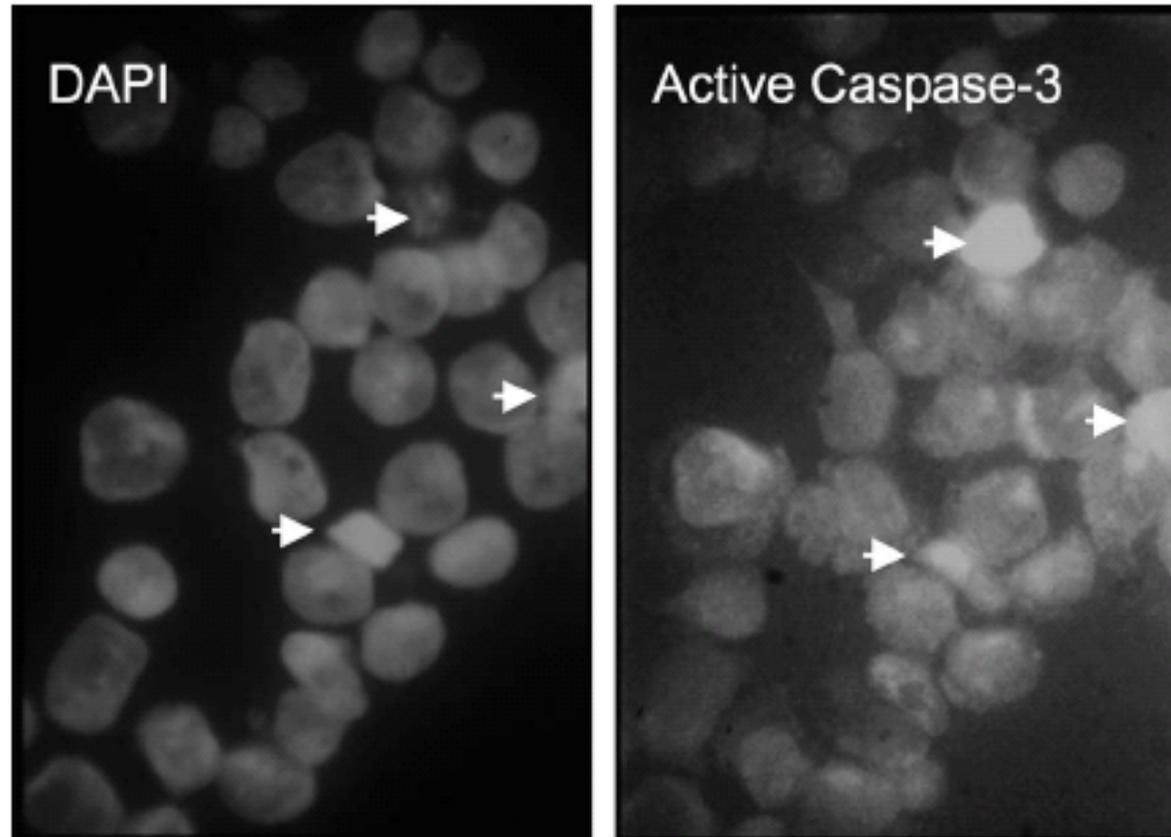
Microscopia de fluorescencia



A. Células HeLa de carcinoma cervical mostrando una brillante coloración para chlorometil-x-rosamina (rojo) y núcleos de forma oval, uniformemente teñidos (azul) indicando células viables.

B. Exposición a 0.4 mM staurosporina por 4 h activa la actividad de caspasa-3 en algunas células (verde, flechas).

Microscopia Confocal



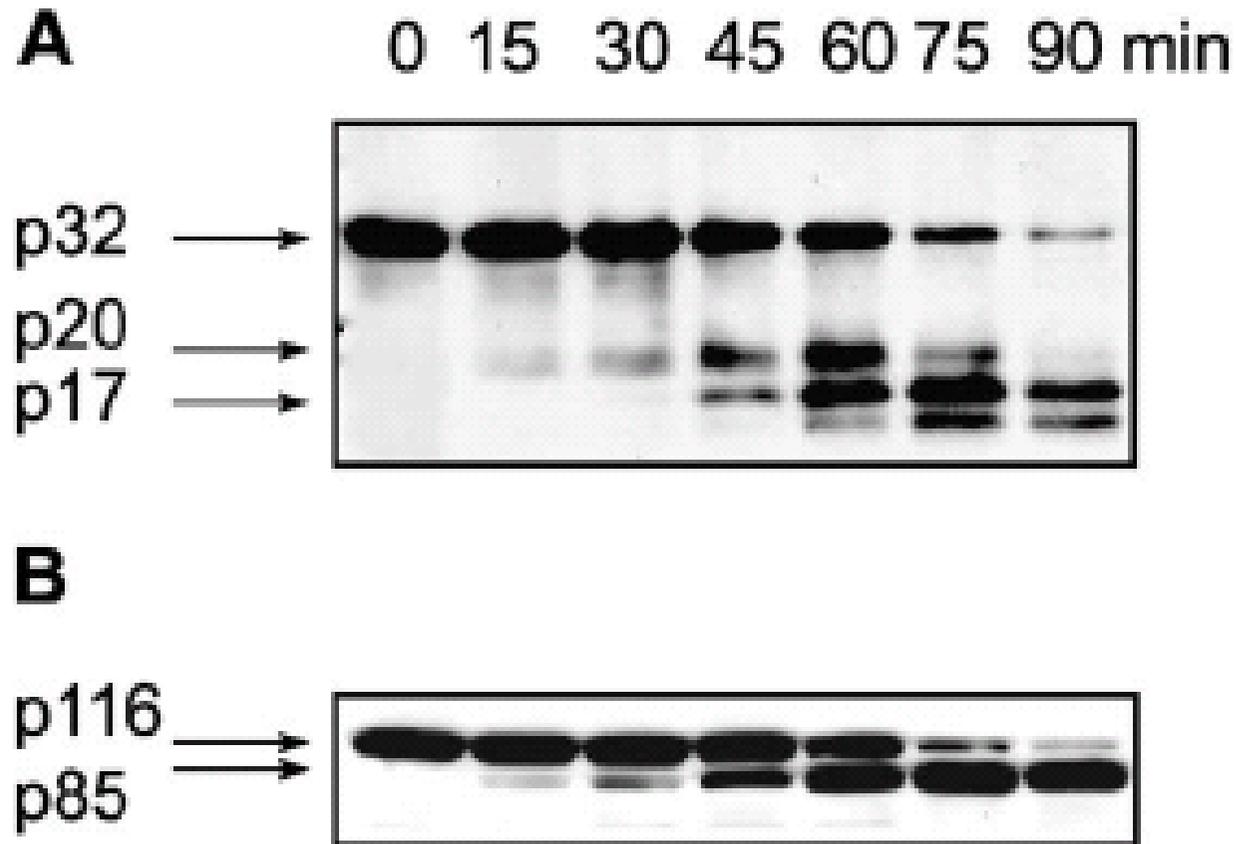
Detección de caspasa-3 activa en células U1285 utilizando microscopía confocal. Nucleos teñidos con DAPI y anticuerpo contra caspasa-3 activa. Las flechas blancas indican acumulación de caspasa-3 activa en el núcleo.

Evaluación de caspasas

2. Detección de sustratos endógenos de caspasas (como PARP):

- Es una forma indirecta de evaluar la activación.
- Los sustratos son clivados en sitios específicos, se obtienen fragmentos de tamaños definidos.
- Se puede evaluar por WB o IHQ si se cuenta con Acs contra la proteína procesada.

Electroforesis en geles de acrilamida



Procesamiento de Caspasa-3 y clivaje de PARP en células Jurkat tratadas con anti-CD95 a varios tiempos. Detectados con anti-p17 (A) o anti-PARP (B).

Evaluación de caspasas

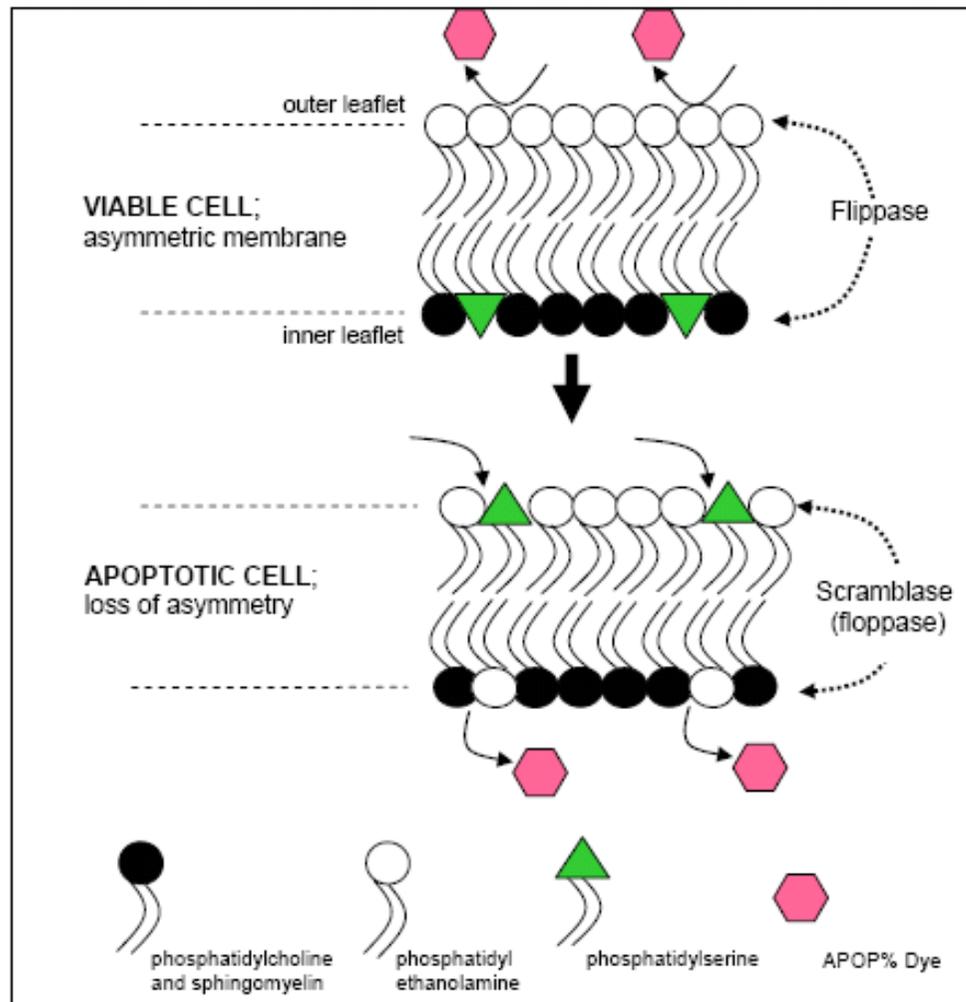
3. Evaluación de la actividad de caspasas:

- Se evalúa el procesamiento del sustrato luego de su incubación con un lisado o con células.
- Los sustratos pueden estar unidos a cromóforos o fluoróforos.
- Luego del clivaje, se libera el cromóforo y se evalúa en espectrofotómetro o fluorímetro.

APOPercentage (Bicolor):

Para células en cultivo, se utiliza colorante selectivo que penetra en células en apoptosis temprana.

Se puede evaluar por microscopía o midiendo absorbancia.



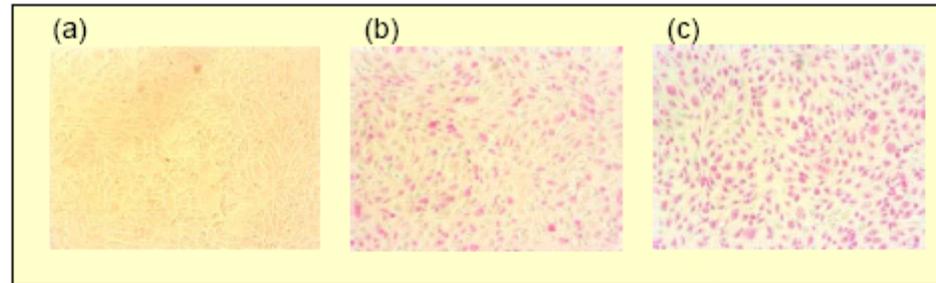


Figure 1: Digital images of CHO cells labelled with 5 mM hydrogen peroxide (H₂O₂) for (a) 0 h, (b) 2 h, (c) 4 h, and labelled with APOPercentage Dye.

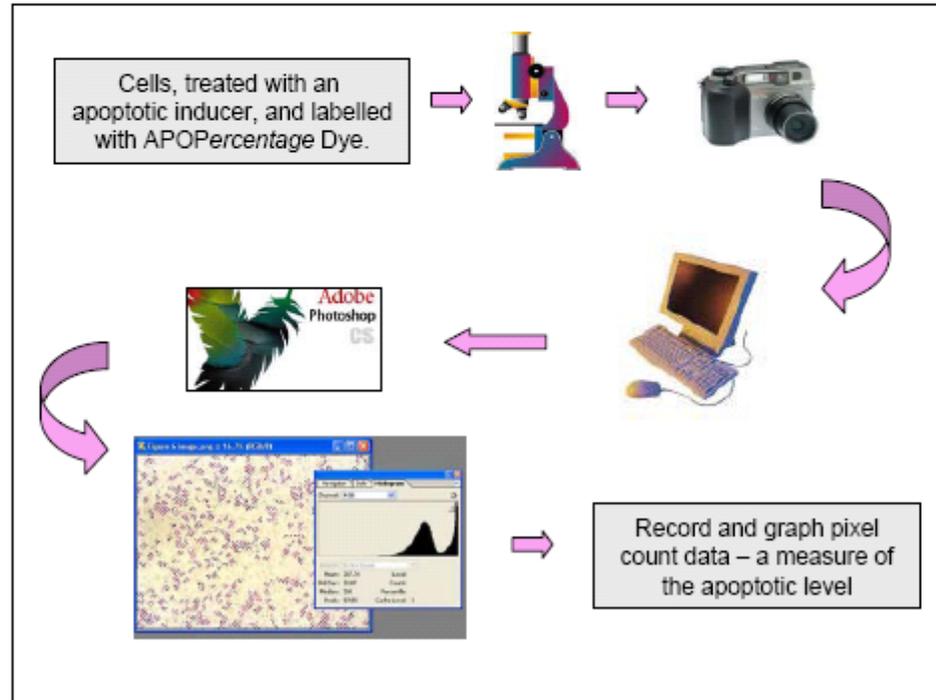


Figure 2: ANALYTICAL DIGITAL PHOTOMICROSCOPY (ADP*)
Sensitive quantification of apoptotic levels in anchorage-dependent mammalian cells

Apoptosis en la biología del desarrollo

In the human body about 100,000 cells are produced every second by mitosis and a similar number die by apoptosis (Vaux and Korsmeyer, 1999, Cell) !

Development and Morphogenesis:

- 131 of the 1,080 somatic cells die during *C.elegans* development
- during limb formation separate digits evolve by death of interdigital mesenchymal tissue (a)
- ablation of cells no longer needed such as the amphibian tadpole tail during metamorphosis (b)
- demise of cells allows sculpturing of hollow structures (c)
- formation of reproductive organs (d)
(Müllerian duct → uterus, deleted in males; Wolffian duct → male organs, deleted in females)
- massive cell death occurs during early development of the nervous system (> 50 percent of all neurons die)

Homeostasis:

- a paradigm for the involvement of apoptosis in homeostasis is the immune system: several millions of B and T cells are generated every day and the majority (> 95 percent) of those die during maturation (death by neglect, negative selection) or by AICD of peripheral immune cells)

Deletion of damaged and dangerous cells:

- Cells with severely damaged DNA that cannot be repaired appropriately usually are removed by apoptosis
- Inappropriate mitogenic signalling that is in conflict with the environmental or cellular status of the cell usually results in cell cycle arrest or apoptosis
- Autoreactive cells of the immune system are deleted by apoptosis
- Elimination of infected cells

