

## **MARCAJE Y VISUALIZACIÓN DE NÚCLEOS MEDIANTE MICROSCOPÍA DE FLUORESCENCIA**

- 1. Resumen.**
- 2. Introducción.**
- 3. Materiales y métodos.**
- 4. Resultados y discusión.**
- 5. Bibliografía.**

### **1. Resumen**

La práctica consiste en añadir distintos compuestos a células HeLa sembradas sobre un cubreobjetos en una placa de 6 pocillos (3 pocillos por grupo). Se trata de observar la muerte de las células (apoptosis) mediante microscopía de fluorescencia. La condensación de los núcleos es el fenómeno observado ya que añadimos un tinte fluorescente para portaobjetos (Fluoromount-g) y un contraste para aquellas partes de la célula no teñidas (Hoechst 33342).

### **2. Introducción**

El proceso de apoptosis es una muerte celular regulada por la propia célula y se trata de un mecanismo de control del crecimiento, la ausencia de este mecanismo puede indicar la presencia de tumores en el tejido. Se caracteriza frente a la necrosis visualmente por la condensación y fractura de la cromatina, una forma cualitativa de observar esta fragmentación es mediante el contraste en microscopía de fluorescencia. La tinción por contraste ayuda a diferenciar el núcleo del resto de partes la célula, los fragmentos producidos son englobados, de modo que lo que se ve son formas circulares más pequeñas que parten o no de una mayor (núcleo); el fenómeno observado es por tanto la condensación del DNA y su rotura.

Hay otras evidencias de apoptosis celular por las que nos podríamos guiar como la detección de caspasas (implicadas en el mecanismo), las alteraciones en la membrana citoplasmática y cambios en los procesos mitocondriales. Estos factores pueden llevarnos incluso a la cuantificación, pero el objetivo de la práctica es la observación, mediante la que podemos comparar los distintos compuestos usados para inducir el proceso.

### **3. Materiales y métodos**

Teniendo las células ya cultivadas en el portaobjetos con el medio adecuado (medio completo: DMEM + 5% suero fetal bovino + 1 mM Glut + Penicilina/Estreptomicina), se procede a añadir la concentración de compuesto adecuada, de modo que tengamos una mortalidad notable:

	concentración	Volumen añadido
doxorubicina	20 $\mu$ M	6 $\mu$ L
Vincristina	2 $\mu$ M	1,2 $\mu$ L

El resultante se deja calentar en la estufa durante 24h. Se añade un volumen de 3  $\mu\text{L}$  de Hoechst 33342 (concentración final de 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), se dejan incubar 15 min a  $T^{\text{a}}$  amb.

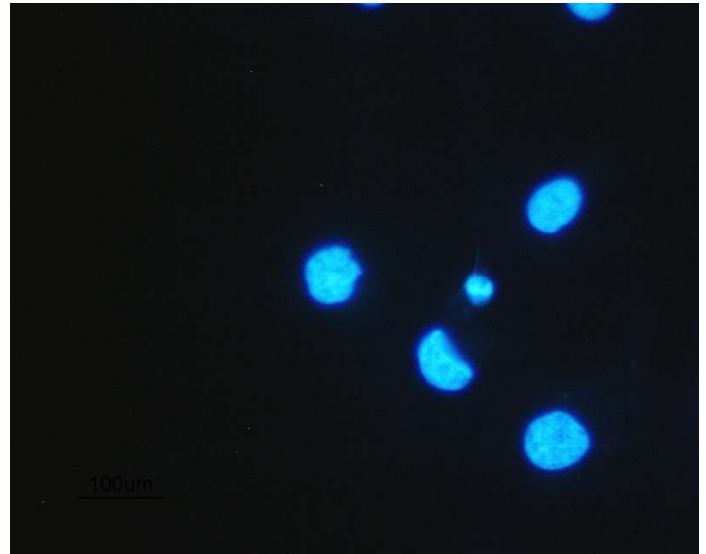
Se retira el cubre con las células cultivadas y se deja secar, en el portaobjetos se ponen dos gotas de fluoromount-g y se coloca el cubreobjetos sobre el mismo, poniendo en contacto el medio con el cultivo.

#### 4. Resultados y discusión

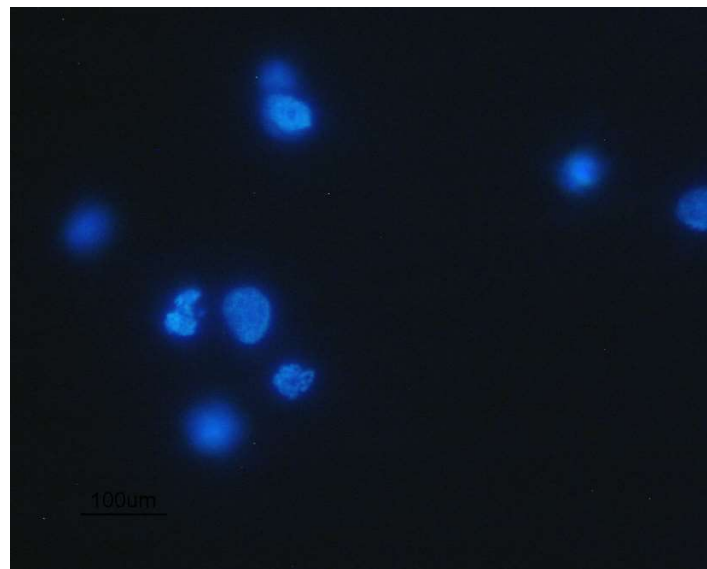
Fotos tras la adición de los dos compuestos y el control



control



Doxorrubicina



Vincristina

En teoría se deberían observar mayor número de núcleos apoptóticos al aumentar la toxicidad del compuesto, pero se hizo difícil encontrar una zona donde se apreciase mejor la condensación de la cromatina para la doxorubicina.

Teniendo en cuenta las conclusiones y resultados de otros artículos encontrados, aunque la existencia de núcleos apoptóticos no es tan obvia como la que se ve en los mismos (la condensación es difícil apreciar y la fragmentación es escasa) existe una evidencia clara en el caso de la vincristina y vagos indicios para la doxorrubicina.

## **5. Bibliografía**

Artículos consultados

- <http://www.biomedres.info/biomedical-research/bakuchiol-inhibits-cell-proliferation-and-induces-apoptosis-and-cell-cycle-arrest-in-sgc7901-human-gastric-cancer-cells.html>
- <https://revistas.unal.edu.co/index.php/biotecnologia/article/view/11762/38369>