

APLICACIÓN DE LA MICROSCOPIA DE CONTRASTE DE FASES Y MICROSCOPIA DE LUZ, EN LA INTERPRETACIÓN DE LA FAGOCITOSIS DE LOS HEMOCITOS DE LA LANGOSTA

Cherax quadricarinatus

Yohana Belen Carbajal Nava¹, Edgar Zenteno Galindo³, Mohamed Ali Pereyra Morales⁴, Ma. Concepción Agundis Mata⁵, Claudia Sierra Castillo^{1,2}.

¹Lab. de Biología Celular, Facultad de Ciencias Biológicas UAEM. ²Lab. de Bioingeniería Acuícola, Centro de Investigaciones Biológicas. ^{3,4,5}Lab. de Inmunología, Dpto. de Bioquímica, Facultad de Medicina UNAM. Av. Universidad 1001. Col. Chamilpa. Cuernavaca Fax: 329-7047 Ext. 3532 e-mail yohana_belen@yahoo.com.mx

Introducción: Todos los organismos en algún momento pueden estar sometidos a estrés, por lo tanto son más susceptibles a adquirir enfermedades afectando su desarrollo, crecimiento y reproducción. Uno de los tejidos que puede proporcionar información acerca del estado de salud del organismo, es el tejido sanguíneo que en crustáceos está constituido por la hemolinfa, que posee la fase líquida “suero” en donde se encuentran los factores humorales, permite distribuir el oxígeno, nutrientes y hormonas a todo el cuerpo, además en ella se encuentra la fracción celular “hemocitos”. Estos últimos se consideran análogos a los leucocitos de mamíferos debido a las funciones que realizan en el mecanismo de defensa como: la fagocitosis, nodulación y encapsulación que junto con los factores humorales son considerados la primera línea de defensa inmunitaria [2]. El principal mecanismo de defensa celular que presentan los invertebrados es la fagocitosis, proceso realizado por células especializadas, que tienen la propiedad de reconocer e ingerir las partículas extrañas como bacterias, esporas o células envejecidas del propio organismo [1]. La fagocitosis consiste en los siguientes pasos: Atracción quimiotáctica, donde los hemocitos son atraídos por las partículas extrañas, el reconocimiento por parte de los hemocitos hacia las partículas extrañas; adherencia que ocurre cuando las partículas se fijan a la superficie de los hemocitos, durante este proceso se involucran fuerzas físicoquímicas en las moléculas receptoras de las partículas extrañas, ingestión de la partícula; se presenta cuando la membrana invagina a la partícula y forma una vacuola fagocítica; la destrucción de la partícula resulta de la transformación de enzimas a partir de los lisosomas dentro de la vacuola fagocítica y la digestión de la partícula ocurre por enzimas lisosomales [3]. Para el estudio de las funciones celulares que llevan a cabo los hemocitos, se han utilizado varios métodos, entre ellos la microscopia de contraste de fases, microscopia electrónica de transmisión y Normaski, sin embargo estas técnicas solo permiten atribuir algunas características morfológicas de las células, como la presencia o ausencia de gránulos citoplasmáticos, tamaño, forma del hemocito y con la microscopia electrónica la ultraestructura [4]. Recientemente se realizó la caracterización de los hemocitos de la langosta *Cherax quadricarinatus* por medio de frotis de hemolinfa y el método Romanowsky, proporcionando una clasificación más amplia de acuerdo a los contenidos celulares, clasificando a los hemocitos en cinco grupos: neutrocito, eosinocito, basofilocito, nucleocito grande de núcleo azul y nucleocito pequeño, y tres subgrupos eosinocitos de gránulos pequeños, basofilocito de gránulos

pequeños y nucleocito grande de núcleo rosa [5]. Considerando que cada método de microscopía nos aporta información específica, en este trabajo pretendemos identificar la actividad fagocítica de los hemocitos de la langosta *Cherax quadricarinatus* a través de la microscopía de contraste de fases y la microscopía de luz.

Objetivo General:

Identificar el proceso de fagocitosis con eritrocitos en los hemocitos de la langosta *C. quadricarinatus*, utilizando la microscopía de contraste de fases y la microscopía de luz con apoyo de la tinción de Wright.

Metodología

Las langostas se colectaron en “El compartidor las peñitas” Jojutla, Morelos, se extrajo 1ml de hemolinfa de la zona pericárdica de la langosta, se centrifugó a 560 xg, el conteo total de células se realizó en la cámara de Neubauer. Para la observación de la respuesta celular, se utilizaron portaobjetos de vidrio tratados previamente con Poli-L-lisina, a los que se les adicionaron 50 µl de células suspendidas, se incubaron durante 30 min a temperatura ambiente, a las células adherentes se le agregaron eritrocitos de rata, conejo, humano y pollo al 2% dejándose incubar la monocapa de células durante 30 min. La fijación se realizó con paraformaldehído al 4 % durante 1 hora a 4 °C. Se dejó secar y se contrastó con colorante de Wright, el análisis por microscopio de contraste de fases se realizó con muestras sin tinción.

Resultados:

La identificación de los hemocitos de la “langosta” *Cherax quadricarinatus* se realizó en frotis de hemolinfa mediante la técnica de Wright, las características que presenta cada grupo celular son en base a la reacción de tinción con sus componentes celulares (Fig. 1). La interacción que se presenta entre los hemocitos y los diferentes tipos de eritrocitos se debe a la especificidad y al reconocimiento de carbohidratos que se encuentra en la membrana de los antígenos. Se considera que la capacidad fagocítica que presentan los hemocitos, es debido al reconocimiento específico de estructuras de glicoconjugados que se encuentra en la membrana de los eritrocitos de rata, conejo, pollo y humano. En base a lo anterior se determinó mayor actividad fagocítica en presencia de los eritrocitos de rata, pollo y humano; en menor proporción con los eritrocitos de conejo (Fig. 2). Por otra parte con el método de Romanowsky nos permitió definir que tipo específico de granulocito lleva a cabo la fagocitosis, ya que anteriormente se reporta que los granulocitos realizan la fagocitosis, pero no indica los contenidos granulares del hemocito por el cual se realiza cada función.

