

MORFOLOGÍA DE LAS CÉLULAS CANCEROSAS

6 grupos de estudiantes

1. OBJETIVO DEL EXPERIMENTO

En este experimento, los estudiantes explorarán la morfología de las células normales y cancerosas mediante la tinción de células prefijadas con azul de metileno y eosina. La morfología celular se examinará usando un microscopio óptico. Después de comparar los dos tipos de células, los estudiantes deberán identificar las células cancerosas.

2. COMPONENTES para 6 grupos de estudiantes

Esa práctica está diseñada para seis grupos de 2-4 estudiantes por grupo.

COMPONENTES	Conservación
Portaobjetos listos para teñir, con células normales y cancerosas	Tª ambiente
Tampón de rehidratación	Tª ambiente
Colorante eosina	Tª ambiente
Colorante azul de metileno	Tª ambiente
Medio de montaje	Tª ambiente
Cubreobjetos	Tª ambiente
Pipetas de transferencia	Tª ambiente

NOTA: Tras la recepción, almacene los componentes de este kit a temperatura ambiente.

NOTA: Todos los componentes de este kit están destinados a la investigación educativa. No pueden ser utilizados con fines de diagnóstico o médicos, ni pueden ser administrados o consumidos por seres humanos o animales.

2.1 Material requerido y no suministrado

- Agua destilada
- Microscopio (se recomienda una ampliación total de 400x)
- Pinzas
- Guantes desechables de laboratorio
- Gafas protectoras
- Toallas de papel
- Paños para tareas delicadas (p.ej. Kimwipes)
- Cubetas
- Temporizadores

NOTA: Para mayor comodidad, se pueden comprar pipetas de transferencia desechables adicionales para los pasos de extracción y de lavado con líquidos.

3. INTRODUCCIÓN

COMPRENSIÓN DE LA BASE GÉNÉTICA Y MOLECULAR DEL CÁNCER

El **cáncer** es una de las principales causas de muerte en los Estados Unidos de América (también en España), contribuyendo a casi una de cada cuatro muertes. Casi todo el mundo ha sido afectado por el cáncer, ya sea a través de la experiencia personal o por el impacto de la enfermedad en alguien que conocen. Afortunadamente, se siguen haciendo progresos en el conocimiento de esta enfermedad y las expectativas de vida para muchos pacientes con cáncer han aumentado constantemente en las últimas décadas. Los investigadores están continuamente mejorando nuestra comprensión de los mecanismos moleculares y genéticos detrás del desarrollo del cáncer. Estos nuevos descubrimientos, combinados con observaciones microscópicas tradicionales, han aumentado nuestra comprensión de las distinciones entre células normales y de cáncer.

EL CICLO CELULAR DURANTE EL DESARROLLO DEL CÁNCER

El **ciclo celular** es una serie de rutas de señalización bioquímica que llevan a las células al crecimiento y la proliferación. Este proceso, que implica la duplicación de ADN durante la **mitosis** y la división de la célula a través de la **citocinesis**, da como resultado dos células hijas idénticas. La división celular normal tiene cuatro fases discretas conocidas como **M, G1, S y G2**. En medio de cada una de estas fases se controlan estrictamente los bloqueos moleculares conocidos como **puntos de control** que regulan el paso a través de la división celular (**Figura 1**). Esta serie de eventos coordinados controla la proliferación, el desarrollo y el mantenimiento de las células en un organismo.

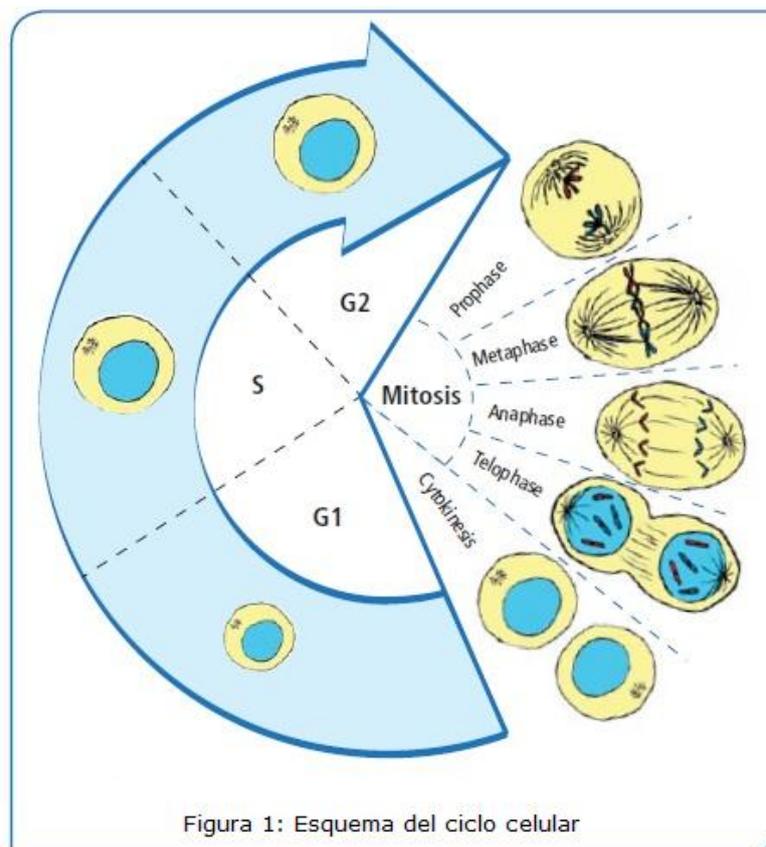
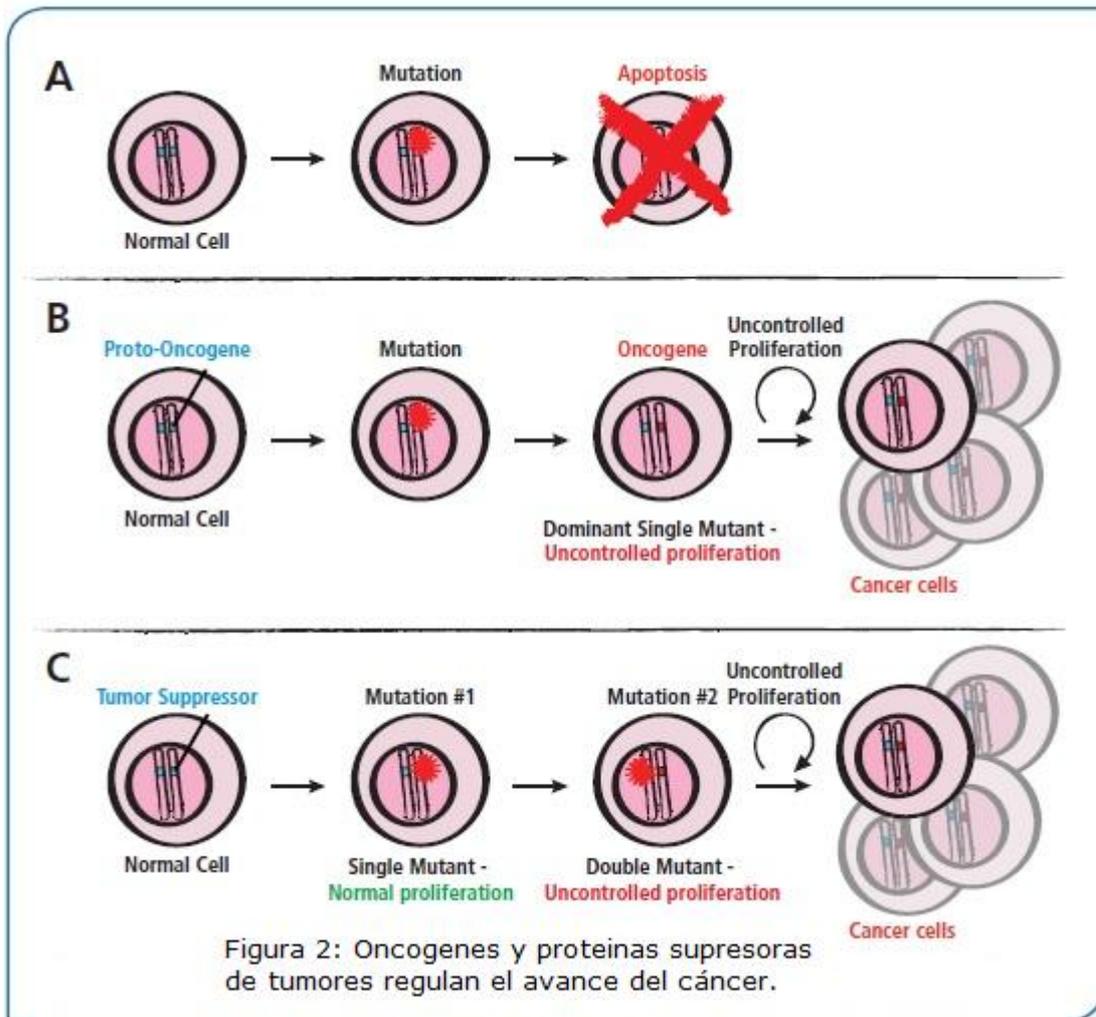


Figura 1: Esquema del ciclo celular

El crecimiento y la muerte de las células eucariotas están estrictamente controlados. Las células utilizan señales extracelulares para regular la velocidad y la ubicación de la división. Además, si se produce daño grave en el ADN, las células normales pueden

desencadenar la **apoptosis**, o la muerte celular regulada (**Figura 2A**). Por el contrario, las **mutaciones** pueden proporcionar un mecanismo que permite a las células pasar por alto los puntos de control del ciclo celular e inhibir la apoptosis, dando lugar al cáncer. En las células cancerosas, la mitosis puede producirse continuamente, generando una sobre-abundancia de células que acaben formando tumores y propagarse por todo el cuerpo.



PROTEÍNAS SUPRESORAS DE TUMORES Y ONCOGENOS

Hay muchas teorías que explican cómo una célula sana puede llegar a ser cancerosa. En general, la mayoría de las células cancerosas parecen resultar de mutaciones en los genes que controlan el crecimiento celular. Estas mutaciones conducen a la ganancia o pérdida de importantes funciones proteicas, a la desestabilización de la célula y, finalmente, al desarrollo del cáncer.

Los **proto-oncogenes** son un grupo de genes que codifican proteínas que regulan el crecimiento y la división celular.

Durante los primeros pasos de desarrollo del cáncer, una mutación o combinación de múltiples mutaciones puede conducir a la conversión de un proto-oncogén en un **oncogén**. Una vez convertidos, los oncogenes se vuelven más activos y dan señales repetidamente para que la célula se divida. Muchos oncogenes son dominantes, lo que significa que una mutación es necesaria en sólo una copia del gen en las células diploides. Las células con mutaciones oncogénicas son incapaces de controlar la proliferación celular, uno de los promotores primarios de la formación de cáncer

(Figura 2B). Por ejemplo, el **oncogén Myc** está mutado en muchos cánceres diferentes, incluyendo mama, pulmón, colon y estómago. El **oncogén Myc** activado puede controlar hasta 15% de los genes en una célula, lo que lo convierte en el principal factor de la proliferación celular.

En contraste con los oncogenes, las **proteínas supresoras de tumores** son capaces de inhibir el crecimiento celular y prevenir la formación de tumores. Las mutaciones en genes supresores de tumores pueden inactivar o destruir las proteínas correspondientes. De este modo, una mutación en un gen supresor de tumores elimina una de las barreras que impide la proliferación celular no controlada y la formación de tumores (Figura 2C). Es importante recordar que las células humanas normales son diploides, conteniendo dos copias de cada gen. Debido a esto, una sola mutación supresora de tumor puede ser compensada a menudo por el gen normal restante en el cromosoma duplicado. En estos casos, ambas copias del gen deben ser mutadas en células cancerosas.

Un ejemplo de una proteína supresora de tumores es **p53**, codificada por el **gen TBP53**. La **p53** es una proteína importante en la supresión tumoral, la regulación de la reparación del daño del ADN, detener el crecimiento celular, y el inicio de la apoptosis en las células no saludables. La pérdida homocigótica de la **p53**, donde se han producido mutaciones en ambas copias del gen, se encuentra en el 65% de cánceres de colon, entre 30-50% de cáncer de mama y el 50% de cáncer de pulmón. Debido a la prevalencia de las mutaciones en el **p53**, y la importancia del gen en el desarrollo del cáncer, se ha convertido en uno de los genes mejor estudiados del cáncer.

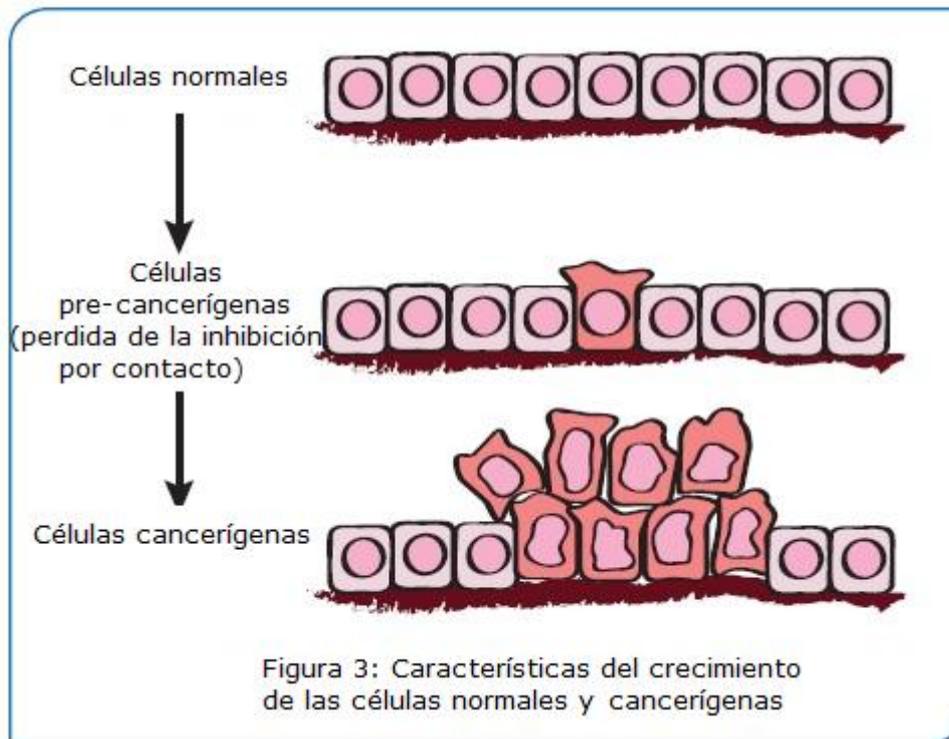
Las mutaciones en oncogenes y las proteínas supresoras de tumores son a menudo la causa principal detrás de la formación de cáncer, y es raro que las células cancerosas contengan sólo una sola mutación. De hecho, las mutaciones iniciales en células precancerosas pueden conducir a una inestabilidad genética adicional, dando lugar a mutaciones adicionales en esa célula y sus células hijas. Las células cancerosas a menudo contienen uno o más oncogenes combinados con la inactivación de una importante proteína supresora tumoral.

LAS CARACTERÍSTICAS DE LAS CÉLULAS DEL CÁNCER

Si bien el crecimiento celular no controlado es la característica definitoria del cáncer, existen varias características adicionales que distinguen las células cancerosas de sus contrapartes normales. Por ejemplo, las células normales son difíciles de hacer crecer en el laboratorio. Estas células, las normales, son generalmente muy sensibles a las condiciones de cultivo celular y exigen tratamientos y medios especializados.

Además, las células normales sólo se dividirán unas cuantas veces antes de detenerse. Por el contrario, las células tumorales son a menudo mucho más fáciles de cultivar, proliferan fácilmente en el laboratorio y se dividen indefinidamente.

Otra distinción importante entre las células normales y las cancerosas se refiere a un mecanismo conocido como **inhibición de contacto**. Las células normales se dividirán hasta que estén en contacto con las células vecinas, momento en el que dejarán de crecer. Por lo tanto, la inhibición de contacto da como resultado una lámina de células de sólo una capa de espesor, denominada **monocapa**. Las células cancerosas por lo general pierden la inhibición de contacto, haciendo que se amontonen y formen tumores (Figura 3). Además, las células cancerosas a menudo se vuelven menos adherentes, tanto a otras células como a la matriz extracelular. Esto ocurre como resultado de cambios en las glicoproteínas de la superficie celular, alterando la capacidad de una célula para formar conexiones apropiadas.



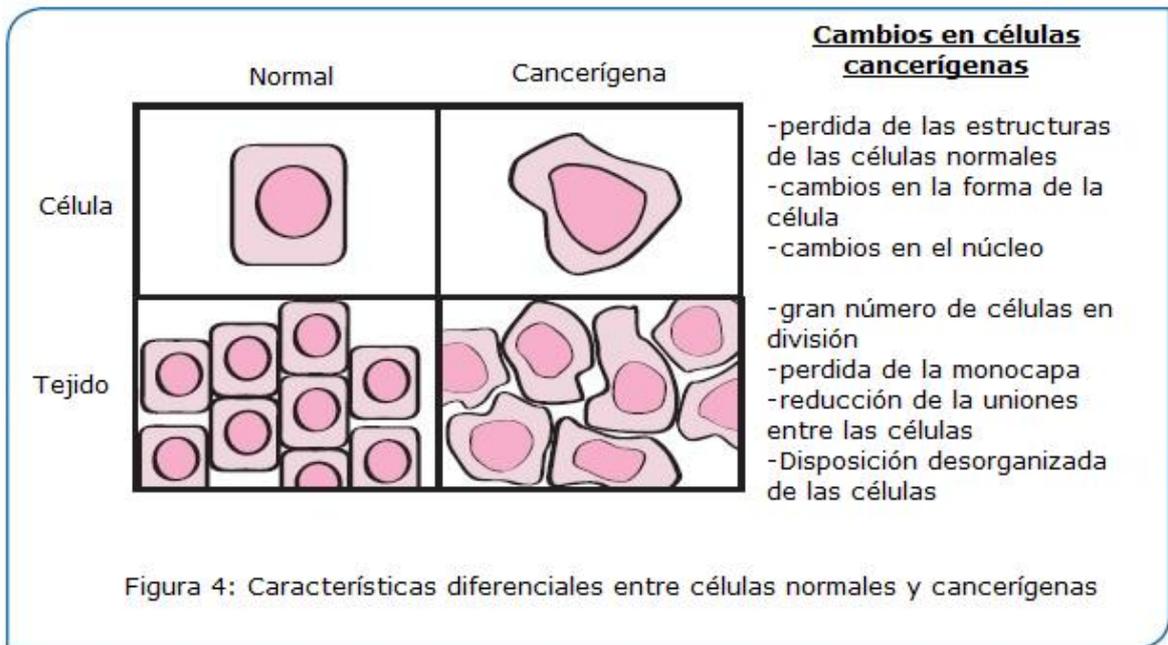
En conjunto, estas características producen los efectos más devastadores del cáncer. El crecimiento descontrolado resulta en tumores dolorosos y peligrosos, desplazando las células normales y destruyendo los tejidos circundantes. Los cambios en la adherencia y la inhibición del contacto permiten que las células cancerosas emigren lejos del tumor original y crezcan en otras partes del cuerpo, conocidas como **metástasis**. De hecho, la propagación del cáncer por todo el cuerpo es responsable de la mayor parte del sufrimiento y la muerte de los pacientes con cáncer.

MORFOLOGÍA Y ANÁLISIS DE CÉLULAS DE CÁNCER

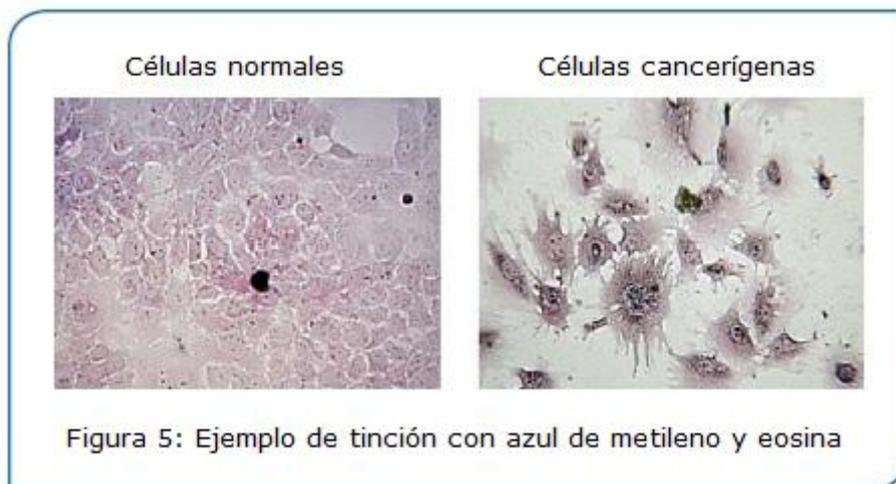
Junto con las alteraciones genómicas y el crecimiento acelerado, las características físicas se pueden utilizar para clasificar las células cancerosas. La estructura nuclear de las células cancerosas experimenta cambios que dan como resultado un núcleo grande, de forma irregular, y modificaciones en los cromosomas.

Estas características morfológicas se han considerado el "gold-standard" (la mejor y más precisa prueba diagnóstica disponible) para diagnosticar el cáncer.

En general, las células normales tienen una forma regular y elipsoide, mientras que las células cancerosas son a menudo irregulares y con contornos. La disminución de la adherencia en las células cancerosas puede conducir a la desorganización de la propagación de células y menos contactos celulares entre células, así como un aspecto caótico general en la población celular. En contraste, las células normales crecerán como una capa uniforme de células con muchas conexiones estrechas entre células vecinas. Los cambios estructurales en las proteínas de la lámina nuclear, que proporcionan apoyo mecánico a las células, pueden afectar la organización de la cromatina y alterar la expresión génica. Las células cancerosas también suelen presentar cambios en las estructuras celulares. Por ejemplo, el tamaño del retículo endoplasmático y las mitocondrias a menudo disminuye, el aparato de Golgi está subdesarrollado y el número de peroxisomas aumenta (**Figura 4**).



Histólogos y patólogos utilizan habitualmente estas características físicas para identificar las células cancerosas dentro de la muestra de tejido de un paciente. Para el diagnóstico, el tejido canceroso se biopsia y luego se fija mediante un procedimiento químico o físico para preservar las células. El tejido fijo se endurece, se corta en secciones muy delgadas (una célula de espesor), y se coloca en un portaobjetos de microscopio. Finalmente, las secciones preparadas se tratan usando una variedad de colorantes que tiñen específicamente las estructuras celulares. El azul de metileno y la eosina son dos tintes comunes utilizados para identificar características celulares específicas: el azul de metileno tiñe el material nuclear de un color azul profundo, mientras que la eosina tiñe el citoplasma y el tejido conectivo con un color rosa más claro (**Figura 5**). Juntos, estos colorantes permiten a un histólogo observar rápida y fácilmente los cambios en la estructura celular y la composición.



En esta práctica, los estudiantes rehidratarán y mancharán las células prefijadas proporcionadas en una diapositiva de cristal. Observarán y analizarán las diferencias morfológicas entre células normales y células cancerosas utilizando un microscopio. Al finalizar, los estudiantes serán capaces de describir las diferencias físicas entre las células normales y las de cáncer y comprenderán el significado funcional de estos cambios estructurales.

4. DESCRIPCIÓN DEL EXPERIMENTO

En esta práctica, los estudiantes explorarán la morfología de las células normales y cancerosas mediante la tinción de células prefijadas con azul de metileno y eosina. La morfología celular será entonces examinada usando microscopía óptica. Después de comparar los dos tipos de células, los estudiantes deberán identificar las células cancerosas.

4.1 Precauciones

1. Se deben usar los guantes y gafas de protección de forma rutinaria como buenas prácticas de laboratorio.
2. Deben tener mucho cuidado al trabajar con equipos que utilizan calor y/o la fusión de los reactivos.
3. NO PIPETEAR LOS REACTIVOS CON LA BOCA - PIPETEAR CON BOMBAS O PERAS PERAS DE SUCCIÓN.
4. Lavarse bien siempre las manos con agua y jabón después de manipular reactivos o materiales biológicos del laboratorio.
5. Tener cuidado al usar cualquier equipo eléctrico en el laboratorio.

4.2 Preparaciones previas

Notas a los preparativos del profesor de la práctica

El tamaño de la clase, la duración de las clases de prácticas y la disponibilidad de los equipos son factores que deben ser considerados en la planificación e implementación de esta práctica con sus alumnos. Estas directrices pueden adaptarse para encajar en sus circunstancias específicas.

Esa práctica está diseñada para seis grupos de 2-4 estudiantes por grupo.

Registro de las actividades de laboratorio

Los científicos documentan todo lo que ocurre durante un experimento, incluyendo condiciones experimentales, pensamientos y observaciones durante la realización del experimento y, por supuesto, cualquier información recopilada. Los alumnos que realicen esta práctica deben documentar su experimento en un cuaderno de laboratorio o en una hoja de trabajo separada.

Los alumnos deben registrar en su libreta de prácticas las actividades indicadas a continuación.

Antes de iniciar la práctica:

- Escribir una hipótesis que refleje la práctica.
- Predecir los resultados experimentales.

Durante la práctica:

- Registrar (dibujar) sus observaciones, o fotografiar los resultados.

Al finalizar la práctica:

- Formular una explicación de los resultados.
- Determinar lo que podría cambiar en la práctica si la repites.
- Escribir una hipótesis que refleje este cambio.

Preparativos antes de la práctica

La preparación previa a la práctica debe llevar aproximadamente 30 minutos y puede realizarse en cualquier momento antes del período de laboratorio.

1. Marcar veinticuatro (24) tubos de microcentrífuga de 1,5 ml como se muestra a continuación:
 - 6 - Tampón de rehidratación
 - 6 - Colorante de azul de metileno
 - 6 - Colorante de eosina
 - 6 - Medio de montaje
2. Utilizar una pipeta de transferencia diferente para dispensar cada componente en el tubo marcado apropiadamente.
3. Añadir aproximadamente 0,5 ml de cada solución a cada tubo.
4. Tape los tubos y guárdelos a temperatura ambiente.

Preparar vasos y agua destilada para lavar los portaobjetos. Si no hay vasos disponibles en el laboratorio, los portaobjetos se pueden lavar suavemente con agua corriente.

NOTA: El medio de montaje eliminará la tinción de fondo no específica y aumentará la visibilidad de los núcleos y orgánulos en las células teñidas, pero también puede hacer que las células ligeramente teñidas se desvanezcan. Si el tiempo permite que los estudiantes puedan visualizar diapositivas antes y después de agregar medios de montaje y cubreobjetos.

4.3 Material que debe recibir cada grupo

Distribuir el siguiente material a cada grupo de estudiantes, o preparar cada área de trabajo común para que los estudiantes compartan materiales:

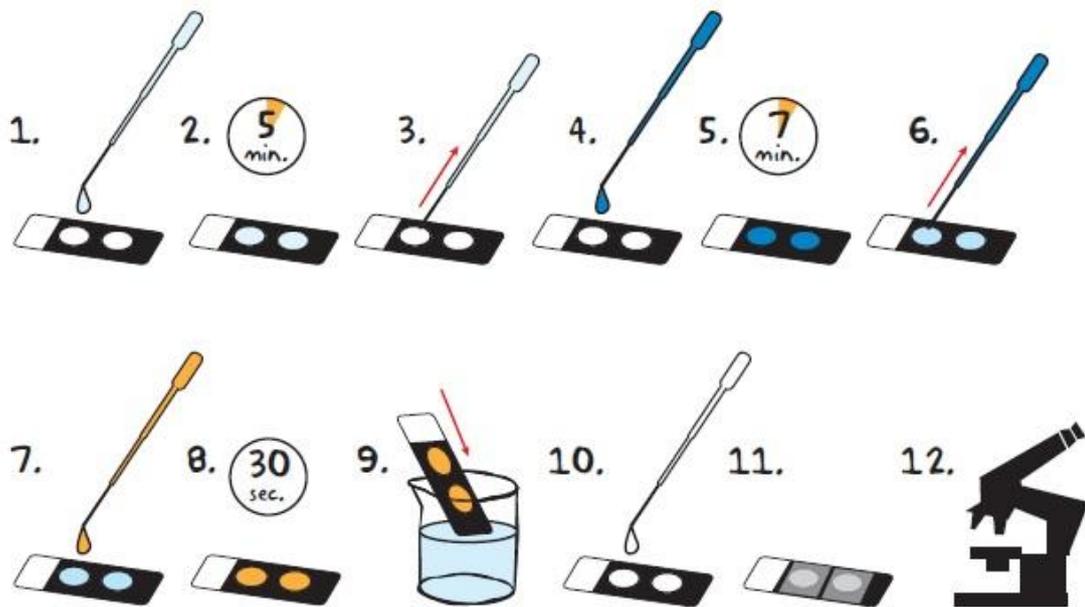
- 1 portaobjetos listo para la tinción
- Tampón de rehidratación
- Colorante azul de metileno
- Colorante de eosina
- Medio de montaje
- 3 Pipetas de transferencia
- 1 par de pinzas (opcional)
- 2 cubreobjetos
- Vaso de agua destilada
- Toallas de papel o Kimwipes
- Microscopio

4.4 Evitar los errores más comunes

1. Los estudiantes han de tener **mucho cuidado** al transvasar soluciones dentro y fuera de los campos de reacción circulares de los portaobjetos.
2. Usar solo pipetas limpias y correctamente marcadas y evitar la contaminación de los campos de reacción circulares adyacentes.
3. No intentar vaciar los campos de reacción circulares agitando la placa. No funcionará y provocará la contaminación de los pocillos adyacentes.
4. Lavar los pocillos con cuidado y lentamente, sin frotar.

5. PRÁCTICA

Módulo I: Tinción de las células prefijadas



1. Antes de comenzar la práctica, recoger un portaobjetos, un vaso de lavado, 4 pipetas de transferencia y tubos que contengan tampón de rehidratación, azul de metileno, eosina y medio de montaje.

Nota: El portaobjetos contiene dos campos de reacción circulares, cada uno de los cuales contiene una muestra celular diferente.

2. Utilizando una pipeta de transferencia, AÑADIR 8 gotas de tampón de rehidratación hasta cubrir completamente cada campo de reacción circular.
3. INCUBAR la lámina durante 5 minutos a temperatura ambiente.
4. ASPIRAR y ELIMINAR el tampón de rehidratación usando la misma pipeta de transferencia utilizada en el punto 1. No lavar el portaobjetos.
5. Utilizando una pipeta de transferencia nueva, AÑADIR 8 gotas del colorante azul de metileno en cada campo de reacción circular.
6. INCUBAR el portaobjetos durante 7 minutos a temperatura ambiente. ASPIRA y ELIMINAR el azul de metileno usando la misma pipeta de transferencia utilizada en el punto 4. No lavar el portaobjetos
7. Utilizando una nueva pipeta de transferencia, AÑADIR inmediatamente 8 gotas de colorante de eosina en cada campo de reacción circular.
8. INCUBAR el portaobjetos durante 30 segundos a temperatura ambiente.
9. LAVAR el portaobjetos brevemente sumergiéndola en agua destilada. Aplicar suavemente una toalla de papel sobre el portaobjetos para eliminar el exceso de agua.

CONSEJO:

Los portaobjetos se pueden lavar en un vaso de agua destilada sumergiéndolo suavemente durante 30 segundos. Si la mancha residual permanece, cambiar el agua y repetir el paso de lavado hasta que el agua ya no se vuelva naranja.

PUNTO DE PARADA OPCIONAL:

En este punto, los portaobjetos teñidos se pueden almacenar a temperatura ambiente o visualizarse pasando al Módulo II. Si se desea, se puede colocar un cubreobjetos y continuar en el punto 10 en un momento posterior.

10. Utilizando una pipeta de transferencia, AÑADIR 1 gota pequeña de medio de montaje en cada campo de reacción circular del portaobjetos.
11. Cuidadosamente COLOCAR un cubreobjetos encima del medio de montaje en cada campo de reacción circular.

CONSEJO:

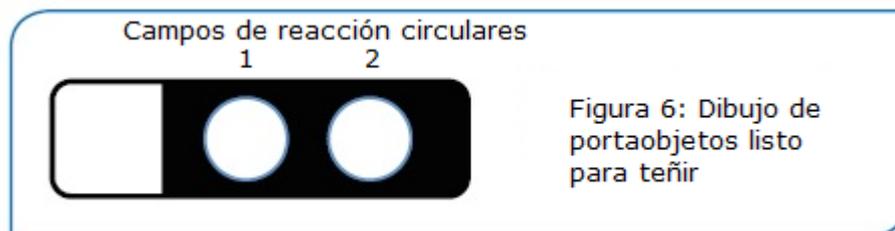
Evitar las burbujas colocando el cubreobjetos en un ángulo de 45 ° con el portaobjetos y bajar el cubreobjetos suavemente. Si se ven burbujas, presionar suavemente sobre el cubreobjetos deslizante para desplazar las burbujas.

PUNTO DE PARADA OPCIONAL:

Una vez colocada el cubreobjetos, las muestras teñidas se pueden almacenar a 4°C durante un máximo de 24 horas antes de pasar al módulo II.

Módulo II: Observación Microscópica

1. LOCALIZAR las células en el campo de reacción circular #1 (**Figura 6**) usando el objetivo de aumento más bajo. Ajustar el portaobjetos para encontrar un campo de visión aleatorio de células bien teñidas que contenga al menos 15-20 células.

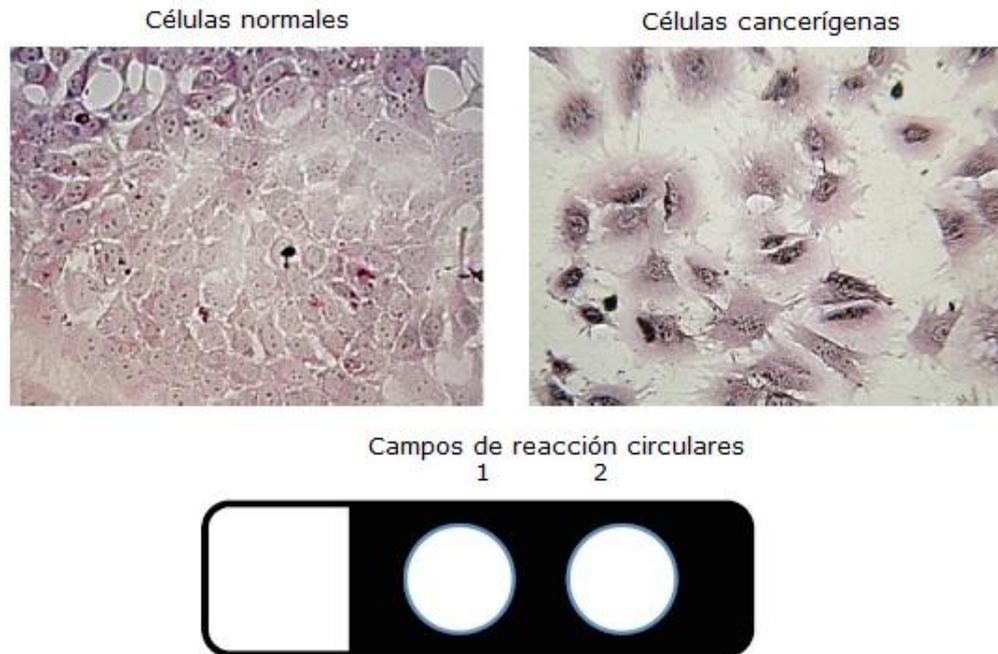


2. DESCRIBIR la morfología general de las células en la tabla anexa (**ANEXO 1**). Las características que se pueden registrar incluyen el número de células, la morfología celular general, la forma y el tamaño del núcleo, y la intensidad o el color de la tinción.
3. Usando el espacio provisto, DIBUJAR una imagen del campo de visión de las células que se observan.
4. Mover el portaobjetos y observar un segundo campo de células. ¿Las observaciones del primer campo de visión son consistentes con el segundo campo?
5. CAMBIAR a un aumento superior y registrar las observaciones como en los puntos 2-3.
6. CAMBIAR el microscopio al objetivo de aumento más bajo y repetir los pasos del 1 al 5 para el segundo tipo de célula en el campo de reacción circular #2.
7. Basándose en las observaciones, clasificar cada tipo de célula como normal o canceroso.

6. RESULTADOS Y PREGUNTAS DE LA PRÁCTICA

6.1 Resultados

Las células en el campo de reacción circular #1 (el más cercano a la etiqueta) son células normales de ratón, mientras que las células en el campo de reacción circular #2 son una línea celular de cáncer de ratón. Las imágenes de las células de ambos tipos se muestran a continuación (**Figura 7**). Estas imágenes representan los resultados típicos obtenidos de estas células pero los resultados de los estudiantes pueden variar debido a ligeras fluctuaciones en la preparación celular y la intensidad de la tinción.



Los estudiantes deben ser capaces de observar claramente los núcleos y el citoplasma en ambos tipos de células (ver a continuación ejemplos). Además, se deben observar las diferencias en la diseminación, los contactos de célula-célula y la inhibición de contacto.

Tipo de célula	Forma de la célula	Extensión	Contactos celulares de las células	Núcleos
Células epiteliales normales	Uniforme, compactas	Algunas se extienden, pero son más compactas. En monocapa	Muchas uniones célula-célula	Uniforme, pequeño
Células epiteliales del cáncer	Formas aleatorias, células más grandes	Las células muy extendidas, no forman una capa monocapa uniforme.	Menos uniones célula-célula	Al azar más grande

6.2 Preguntas

Responder a las siguientes preguntas en la libreta de prácticas:

1. ¿Qué es el cáncer?
2. ¿Cuál es la diferencia entre un oncogén y una proteína supresora de tumores?
3. ¿Cuáles son las características de las células cancerosas que las hacen fáciles de cultivar en el laboratorio?
4. ¿Cómo distinguen los patólogos entre las células normales y las cancerosas?
5. ¿Por qué se utilizan dos colorante diferentes al teñir las células?

ANEXO 1

Campo de reacción	Aumento	Observaciones	Dibujo

Clasificación de las células observadas:

Campo de reacción circular #1: _____

Campo de reacción circular #2: _____