TINCIÓN DE CROMOSOMAS DE CÉLULAS CANCERIGENAS PREFIJADAS

6 grupos de estudiantes

1. OBJETIVO DEL EXPERIMENTO

En este experimento los estudiantes utilizarán la tinción de Giemsa para examinar el cariotipo de células cancerígenas.

En este experimento las células han sido previamente fijadas en un portaobjetos. En muchas de ellas, el ciclo celular se encuentra en la metafase, permitiendo a los estudiantes teñir y observar los cromosomas condensados. Se desarrollará el conocimiento del cariotipo y la asociación de anomalías cromosómicas con enfermedades.

2. COMPONENTES para 6 grupos de estudiantes

COMPONENTES	CONSERVACIÓN
Portaobjetos con células fijadas	Temperatura ambiente
Tinción GIEMSA	Temperatura ambiente
Medio de Montaje	Temperatura ambiente
Cubreobjetos	Temperatura ambiente
Microtubos	Temperatura ambiente
Micropipetas	Temperatura ambiente

Material requerido y no suministrado

- Microscopio con (400 o 100X).
- Vasos.
- Agua destilada.
- Pinzas.
- Papel absorbente.
- Guantes.

3. INFORMACIÓN GENERAL

CROMOSOMAS

Los cromosomas, las hebras de ADN condensadas y las proteínas, se encuentran en el núcleo de casi todas las células de nuestro cuerpo. Cada cromosoma se compone de una molécula de ADN de doble cadena que está estrechamente rodeada por unas proteínas conocidas como histonas, formando un complejo conocido como cromatina (Figura 1). Esta disposición de la cromatina es esencial para el empaquetamiento de las moléculas de ADN; el ADN sin empaquetar es demasiado largo para caber en el núcleo y se podría dañar. En lugar de ello, los cromosomas permiten que las células eucariotas almacenen de forma compacta el ADN, reduciendo en gran medida la longitud total. Además de proporcionar estructura, los cromosomas ayudan a regular la expresión génica, ocultando o exponiendo segmentos de ADN, o bien alterando la velocidad de transcripción de genes individuales.

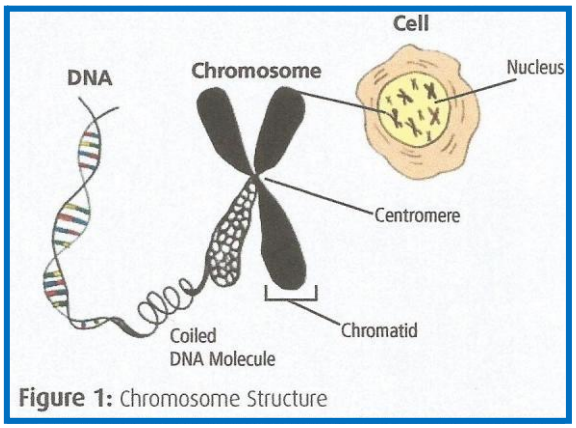


Figure 1: Chromosome Structure

La **MITOSIS** es el proceso de división de las células somáticas fundamental en la proliferación celular que tiene lugar durante el desarrollo embrionario, el crecimiento y el mantenimiento de los tejidos, Supone una reorganización drástica de todos los componentes celulares, pero muy especialmente de los cromosomas, cuya segregación a cada una de las células hijas debe ser muy precisa y estar finamente regulada y coordinada con la separación física de las nuevas células **(CITOQUINESIS).**

L
En la primera fase, la **PROFASE,** comienza la condensación de la cromatina, la ruptura de la envuelta nuclear y el desarrollo del huso mitótico. La segunda fase o **METAFASE,** cada cromosoma está unido a microtúbulos procedentes de los polos de la célula, de modo que todos los cromosomas están en el ecuador del huso mitótico, sometidos a fuerzas tensionales opuestas. La metafase va seguida de la **ANAFASE,** en la que tiene lugar la segregación de las cromátidas de cada cromosoma hacia polos opuestos de la célula. La última fase de la mitosis es la **TELOFASE** en la que los cromosomas ya no están condensados y se forma la envoltura nuclear alrededor de cada uno de los nuevos núcleos que se han formado en cada polo de la célula.

La mitosis representa una pequeña parte del ciclo celular. De hecho, muchas células permanecen durante la mayor parte de su tiempo en la **INTERFASE (G1,S, y G2),** preparando a la célula para división celular.

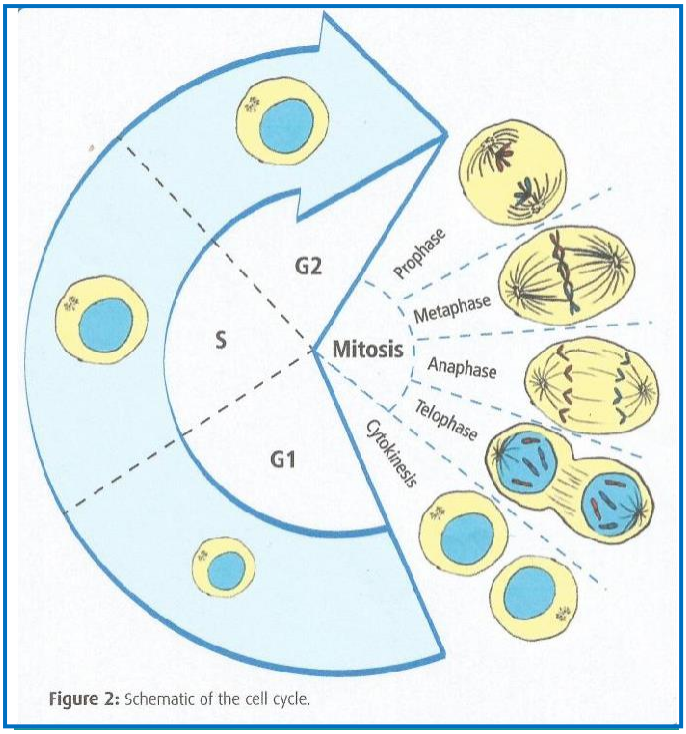


Figure 2: Schematic of the cell cycle.

Los núcleos de las células somáticas humanas normales contienen 23 pares de cromosomas, cada uno de ellos compuesto por dos cromátidas hermanas unidas entre sí en el centrómero. Durante la reproducción, en cada par de cromosomas uno es de origen materno y el otro es de origen paterno. En los seres humanos, los autosomas o cromosomas no sexuales, han sido numerados históricamente del 1 al 22 en una aproximación de tamaño decreciente. El par 23 representa el cromosoma sexual, referido como X e Y; las mujeres normales tienen dos cromosomas X por núcleo, mientras que los hombres normales contienen un cromosoma X y otro Y. Es de vital importancia que cada uno de estos cromosomas sean segregados adecuadamente durante la mitosis y la meiosis ya que, el ADN, codifica las instrucciones necesarias para el comportamiento celular y la supervivencia. Cualquier anomalía en el número o composición de los cromosomas puede conducir a la manifestación de una enfermedad.

LAS ANOMALIAS CROMOSÓMICAS CONDUCEN A ENFERMEDADES

Las variaciones en el complemento normal de cromosomas se han asociado con numerosas enfermedades prenatales. Esto puede incluir **alteraciones numéricas**, donde el número de cromosomas aumenta o disminuye respecto de su número normal o **alteraciones estructurales,** tales como deleciones, duplicaciones y translocaciones. Aproximadamente el 0,5% de todos los individuos nacidos vivos, se asocian con algún tipo de anomalía cromosómica (Tabla 1).

Los fenotipos provocados por las anomalías cromosómicas son muy variables pero en casi todos los casos se asocian con retraso en el desarrollo y retraso mental, alteraciones faciales y determinadas malformaciones congénitas.

Chromosome	Abnormality	Disease
5	5p deletion	Cri-du-Chat
7	7q deletion	William's syndrome
8	Trisomy	Warkany syndrome
8	8q deletion	Langer-Giedon syndrome
9	Trisomy	Rethore syndrome, Trisomy 9 syndrome
9	9p deletion	Alfi's syndrome
11	Deletion	11p- Wilms tumor, 11q- Jacobson syndrome
13	Trisomy	Patau's syndrome
15	15q deletion	Prader-Willi, Angelman's syndrome
16	Trisomy	Fatal in early development
17	Trisomy (17p duplication)	Charcot-Marie-Tooth disease
18	Trisomy	Edward's syndrome
21	Trisomy	Down's syndrome
22	Trisomy	Trisomy 22 syndrome
22	22q deletion	DiGeorge syndrome
X	Monosomy	Turner's syndrome
X	Duplication	XXY-Klinefelter, XXX-Trisomy X, XXXX-Four X
Y	Duplication	Double Y syndrome

TABLA 1: Anomalías cromosómicas comunes

De todas las alteraciones genéticas, la más común es el Síndrome de Down, que se encuentra en el 0.125% de los nacimientos vivos. La aparición de este síndrome, se debe a una duplicación del cromosoma 21, lo cual resulta en una trisomía del cromosoma 21 -trisomía del par 21- (Figura 3). Existen otras trisomías menos abundantes como la del cromosoma 13 (Síndrome de Patau) o la del cromosoma 18 (Síndrome de Edwads).

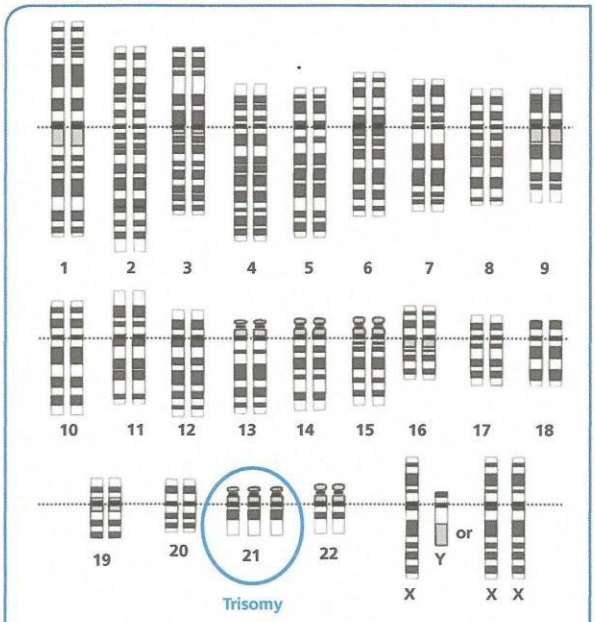


Figure 3: Down's syndrome karyotype

Deleciones parciales o totales de cromosomas se han ligado a estos trastornos. Por ejemplo, una deleción parcial en el brazo corto o "p" del cromosoma 5, es responsable del síndrome de Cri-du-Chat, llamado así porque los niños afectados realizan un grito parecido a los gatos (Figura 4).
Las deleciones o duplicaciones en los cromosomas sexuales son mejor toleradas. La monosomía del cromosoma X conduce al Síndrome de Turner. También han sido descritas otras deleciones en individuos vivos con cariotipos XXX, XXY, XYY que pueden ser toleradas con síntomas más leves.
Otros cariotipos anormales pueden producir individuos sanos, por ejemplo, las translocaciones balanceadas en las cuales regiones recíprocas de diferentes cromosomas son intercambiadas (Figura 5).

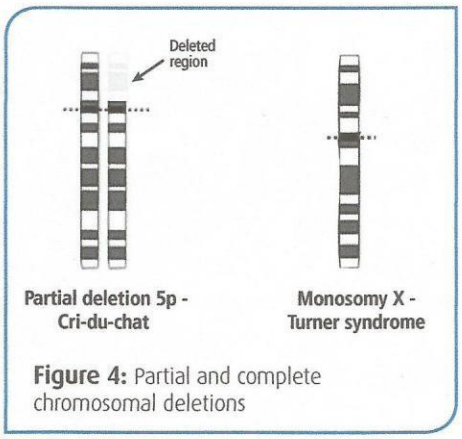


Figure 4: Partial and complete chromosomal deletions

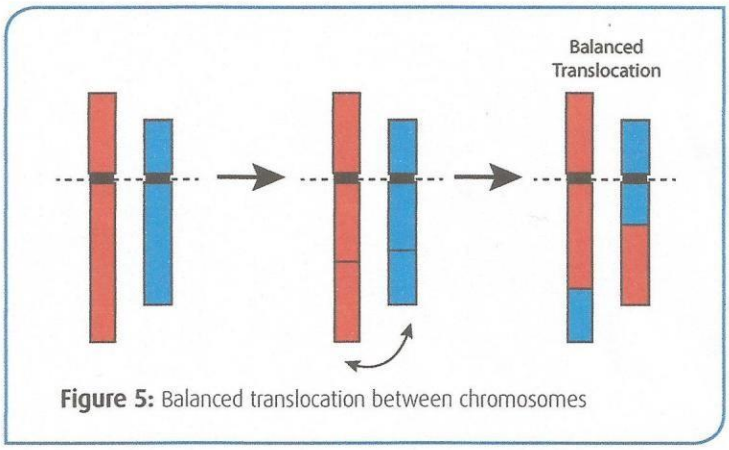


Figure 5: Balanced translocation between chromosomes

ANOMALIAS CROMOSOMICAS EN CANCER
El análisis de cromosomas también se utiliza para ciertos tipos de cánceres, leucemias, linfomas y sarcomas. Se caracterizan por presentar translocaciones cromosómicas específicas. Estas translocaciones conducen a la activación de oncogenes o a la formación de proteínas de fusión. La primera translocación descrita en cáncer humano, fue el cromosoma Philadelphia, presente en la leucemia mieloide crónica. Esta anomalía se debe a una translocación cromosómica recíproca entre los cromosomas 9 y 22, resultando en la fusión del gen BCR y el protooncogen c-ABL (figura 6). Otros muchos cánceres, se producen por alteraciones cromosómicas incluyendo deleciones de regiones que codifican para genes reparadores del ADN, genes supresores de tumores, o bien reordenamientos que conducen a un incremento en la función de algún oncogen.

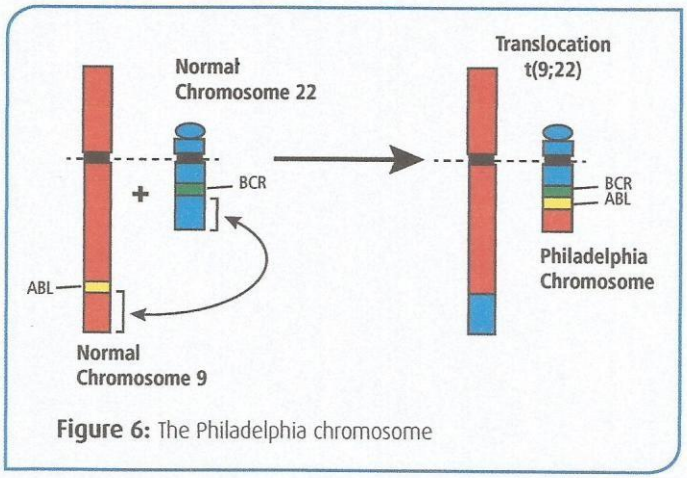


Figure 6: The Philadelphia chromosome

Además se ha demostrado que la mayoría de cánceres humanos tienen una pérdida o ganancia de cromosomas como resultado de la inestabilidad genética.

4. DESCRIPCIÓN DEL EXPERIMENTO

Las células utilizadas en este experimento proceden de una línea celular inmortalizada de la leucemia mieloide crónica que ha sido mantenida en laboratorios durante décadas, contribuyendo a su inestabilidad genómica. Por tanto, estas células presentan un cariotipo anormal, el cromosoma Philadelphia, una segunda translocación entre el cromosoma 15 y 17, y un total de 68 cromosomas.

Los cariotipos han conseguido ser la principal herramienta en la detección de enfermedades cromosómicas. Para realizar un cariotipo, las células son cultivadas durante un periodo breve de tiempo en el laboratorio y luego son tratadas con colchicina, que inhibe la formación de microtúbulos, y la división celular es detenida en la metafase. Estas células son fijadas y adheridas a portaobjetos de microscopio. Finalmente, se realiza la tinción con Giemsa, una mezcla de colorantes que, selectivamente, tiñe de azul el ADN permitiendo visualizar los cromosomas al microscopio.

En este experimento los estudiantes se familiarizarán con los principios básicos de la microscopía y el estudio de los cromosomas.

Precauciones

1. Llevar gafas y guantes de laboratorio mientras se trabaja.

2. **NO PIPETEAR CON LA BOCA**, utilizar los dispositivos adecuados.

3. Lavarse las manos con jabón y agua después de haber trabajado en el laboratorio.

4. **Si no estás seguro de alguna cosa**, PREGUNTA A TU INSTRUCTOR

5. PRÁCTICA

PREPARACIONES PREVIAS (a realizar por el profesor o alumnos). 6 grupos de trabajo.

1. Marcar 12 microtubos de la siguiente forma:
   a) 6 microtubos GIEMSA
   b) 6 microtubos Medio de montaje.

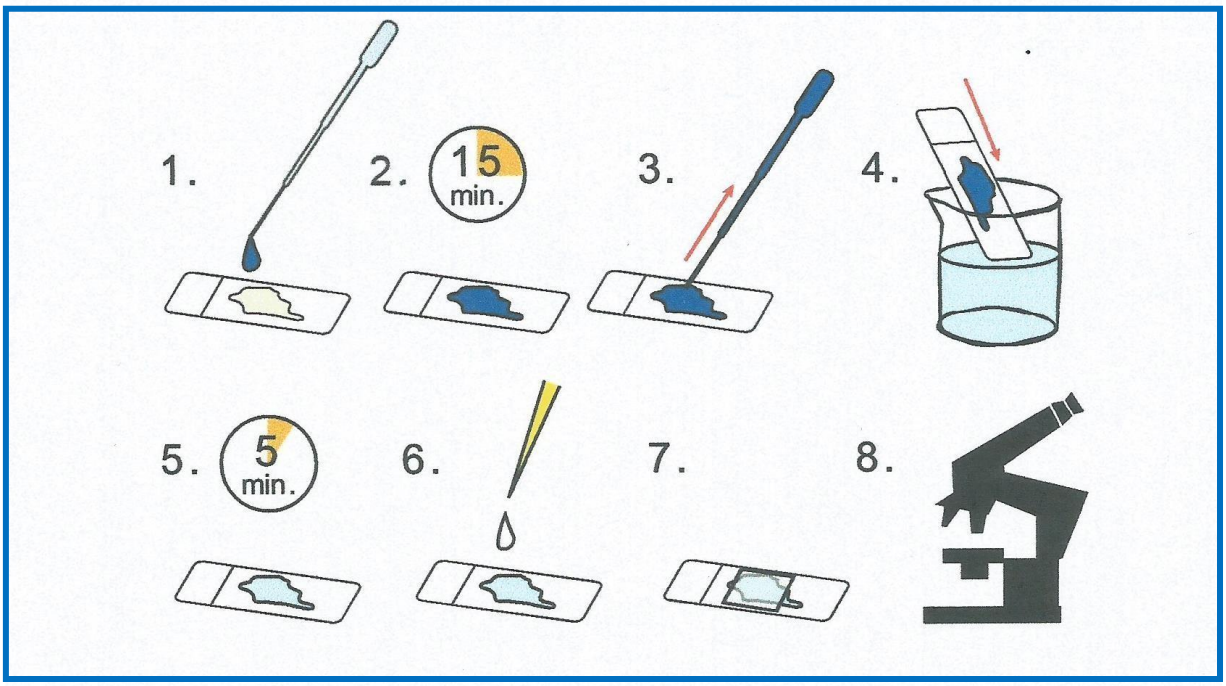
2. Añadir 7 ml de agua destilada al bote con GIEMSA concentrado y mezclar por inversión.

3. Dispensar 1 ml del reactivo GIEMSA diluido a los microtubos correspondientes.

4. Dispensar aproximadamente 0.25 ml del Medio de montaje a los microtubos correspondientes.

5. Preparar vasos con agua destilada para lavar las preparaciones.

6. Distribuir una preparación por grupo, 1 cubreobjeto, 2 micropipetas, 1 vaso con agua destilada.



1. TINCIÓN

1. Añadir 10 gotas o 250 ul de la tinción GIEMSA en el área del portaobjetos que contiene la extensión de células en metafase.
IMPORTANTE: Asegurarse de que el colorante cubre bien el portaobjetos y añadir más volumen si es necesario.
Agitar muy suavemente en círculos pequeños de forma que quede cubierto toda el área.

2. Incubar durante 15 minutos a temperatura ambiente.

3. Decantar el colorante en un vaso de precipitados y, rápidamente, sumergir cuidadosamente la preparación en el vaso que contiene el agua destilada durante 60 segundos, moviendo el portaobjetos suavemente. Se recomienda colocar el portaobjetos sobre un folio blanco que haga contraste para observar la tinción azul.

4. Secar a temperatura ambiente durante 5-10 minutos.

IMPORTANTE: Mientras tanto, observar al microscopio (10x, 20x, 40x) y localizar las células teñidas y, sobre todo, el lugar en el que se encuentran los cromosomas.
Para eliminar toda el agua, inclinar el portaobjetos para recoger el agua en un extremo y ayudarse con la punta de papel secante. **En ningún caso** aplicar el papel secante en la zona del portaobjetos en la que se encuentran las células.

Con cuidado, podemos utilizar el calor de la llama de un mechero bunsen para ayudar a que se acabe de evaporar totalmente el agua que todavía hay en la muestra. Siempre se debe aplicar el calor por la cara del portaobjetos opuesta a la que se encuentran las células fijadas

5. Utilizando una micropipeta, añadir 1 o 2 gotas de medio de montaje a las células teñidas.

6. Cuidadosamente colocar un cubreobjetos encima del medio de montaje. Evitar la formación de burbujas. Si hay burbujas presionar muy suavemente para desplazarlas.

2. OBSERVACIÓN AL MICROSCOPIO

1. Utilizar un microscopio de campo claro. El objetivo de inmersión ayudará en la correcta visión de los cromosomas. Utilizar el objetivo 10x o 20X y buscar un campo bien teñido para localizar las mejores metafases.

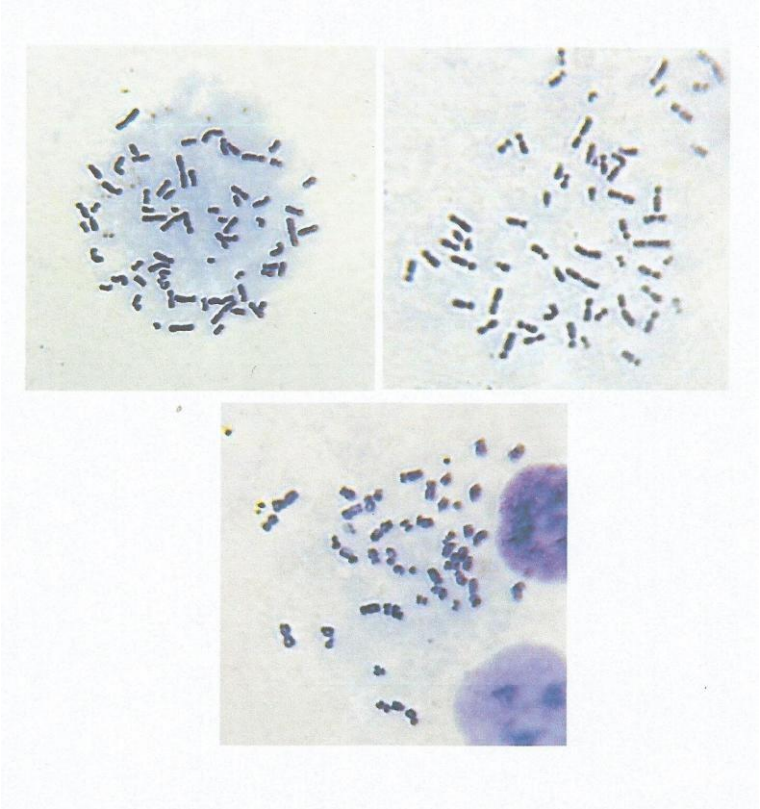
2. Mover al objetivo de 40X 0 100X y contar el número de cromosomas en el campo observado. Tomar nota de las características de los cromosomas incluyendo la presencia de centrómeros o estructuras anormales de cromosomas, si la célula contiene cromosomas individuales o en parejas, y otras observaciones.

3. Buscar otro diferente campo o células y repetir las observaciones por 4 veces más.

6. RESULTADOS Y PREGUNTAS

En las imágenes se muestran resultados típicos conseguidos con estas células, los cuales contiene numerosas translocaciones (difíciles de entender para no expertos y el tipo de tinción utilizado) y desorganizaciones cromosómicas. Se pueden contar 68 cromosomas.
Con la tinción de GIEMSA no se pueden observar el patrón de bandas característicos que forman los cromosomas pero la longitud de los cromosomas y localización del centrómero puede ser detectada.

Bajo el microscopio, los cromosomas se ven como estructuras delgadas y alargadas. Tienen un brazo corto y otro largo separados por un estrechamiento o constricción primaria, llamada ***centrómero***. El brazo corto se designa como ***p*** y el brazo largo como ***q***.
Los cromosomas ***metacéntricos*** tienen los brazos corto y largo de aproximadamente la misma longitud, con el centrómero en el punto medio. Los cromosomas ***submetacéntricos*** tienen los brazos corto y largo de longitudes desiguales, con el centrómero más próximo a uno de los extremos. Los cromosomas ***acrocéntricos*** tienen el centrómero muy cerca de un extremo, con un brazo corto muy pequeño. Con frecuencia tienen constricciones secundarias en los brazos cortos, que conectan trozos muy pequeños del DNA, llamados tallos y satélites, con el centrómero. Los tallos contienen genes que codifican el RNA ribosómico.



Preguntas y respuestas para los alumnos

1. ¿Cuál es el número normal de cromosomas en las células humanas? ¿Son las células normales haploides o diploides?
46 cromosomas diploides (n=23)

2. ¿Cómo funciona la colchicina en las células y por qué es útil en la metafase?
La colchicina se une a la tubulina e inhibe la formación de los microtúbulos, los cuales son los responsables de la separación de las cromátidas hermanas durante la mitosis. Por tanto, la colchicina detiene la progresión del ciclo celular en la metafase. En este momento los cromosomas están más condensados y el núcleo ha sido degradado permitiendo la fácil visualización de los cromosomas.

3. ¿Por qué sólo algunas células muestran los cromosomas mientras otras mantienen el núcleo intacto?
El ciclo celular de las células tiene un tiempo aproximado de 24 horas, y el tratamiento de la colchicina sólo puede durar algunas horas antes de convertirse tóxico para las células. Por tanto, sólo una proporción de células se pararán en la metafase cuando sean fijadas en el portaobjetos. Estas células mostrarán los cromosomas y las otras se encontrarán en otros estados del ciclo celular y el núcleo intacto.

4. ¿Por qué crees que hay anomalías cromosómicas severas o letales, mientras que otras anomalías son relativamente suaves?
Algunas anomalías autosómicas incluyendo deleciones o duplicaciones conducen a una concentración no adecuada del producto de los genes. Las células requieren una expresión específica de los niveles de sus proteínas y los cambios en los cromosomas pueden llevar a una alteración en la expresión génica. En el caso de la trisomía del 21 (Síndrome de Down), el incremento de los niveles de proteínas producido por un cromosoma extra es relativamente bien tolerado mientras que otros cambios en otros cromosomas autosómicos son letales. Las deleciones o duplicaciones del cromosoma X conduce a producir sólo algunos efectos negativos ya que sólo existe un cromosoma X activo, debido a esto, un cromosoma X extra es inactivado.

5. ¿Por qué una translocación balanceada entre 2 cromosomas conduce a individuos sanos?
En una translocación balanceada, partes de un cromosoma es intercambiada pero el material genético no se pierde o duplicado. Frecuentemente, el resultado son individuos sanos sin efectos negativos aunque ciertas translocaciones pueden producir una baja expresión de los genes, o bien, aumentada, dando lugar a la manifestación de una enfermedad.