

TINCIÓN DE CROMOSOMAS DE CÉLULAS CANCERÍGENAS PREFIJADAS

6 Grupos de Estudiantes

1. OBJETIVO DEL EXPERIMENTO

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

Las células sobre las que se realiza la observación microscópica han sido previamente fijadas en un portaobjetos. El ciclo celular de algunas de las células que se observan al microscopio se encuentra en la metafase, permitiendo a los estudiantes teñir y observar los cromosomas condensados -el número de células en metafase varía entre las diferentes preparaciones celulares-.

Se desarrollará el conocimiento del cariotipo y de la asociación de anomalías cromosómicas con ciertas enfermedades.

2. MATERIAL INCLUIDO EN EL KIT para 6 grupos de alumnos

COMPONENTES	CONSERVACIÓN
Portaobjetos con células fijadas	Temperatura ambiente
Tinción GIEMSA	Temperatura ambiente
Solución de dilución del colorante Giemsa	Temperatura ambiente
Solución de hidratación	Temperatura ambiente
Medio de montaje	Temperatura ambiente
Tubos de 5 ml	Temperatura ambiente
Micropipetas	Temperatura ambiente

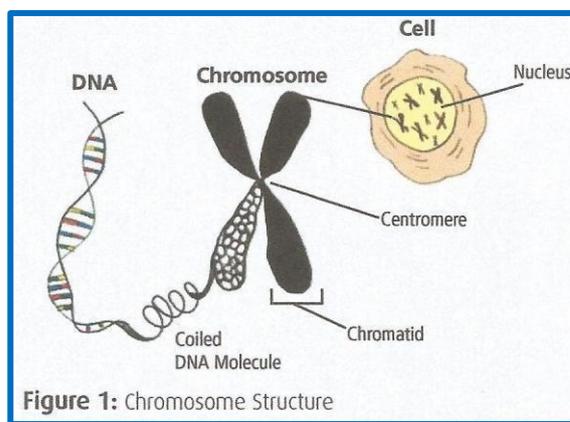
Material requerido y no suministrado:

- Microscopio óptico (400X).
- Vasos de precipitados.
- Botella lavadora con agua del grifo.
- Pinzas.
- Papel absorbente.
- Guantes.
- Cubreobjetos.

3. INFORMACIÓN GENERAL

CROMOSOMAS

Los cromosomas son hebras de ADN condensadas y proteínas que 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 el ADN de forma compacta, 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.



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).

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 los 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.

Los núcleos de las células somáticas humanas normales contienen 23 pares de cromosomas, cada uno de ellos está compuesto por dos cromátidas hermanas unidas entre sí en el centrómero. Durante la reproducción, cada par de cromosomas está formado por un cromosoma de origen materno y otro cromosoma 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 cromosomas X e Y. Las mujeres normales tienen dos cromosomas X en cada núcleo celular, 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

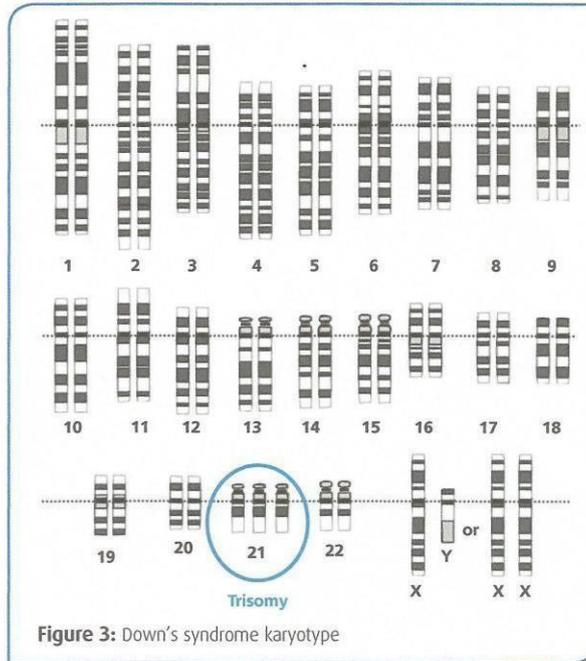
Las variaciones del complemento normal de cromosomas se han asociado con numerosas enfermedades prenatales. Esto puede incluir **alteraciones numéricas**, donde el número de cromosomas aumenta o disminuye respecto de su número normal o **alteraciones estructurales**, tales como deleciones, duplicaciones 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

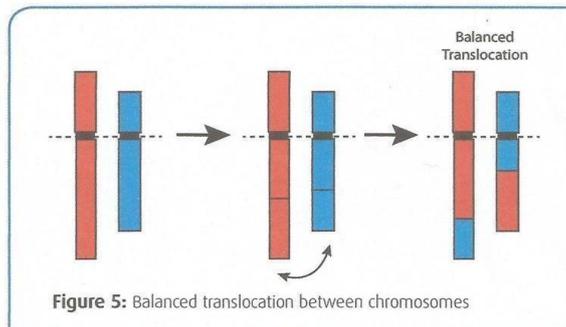
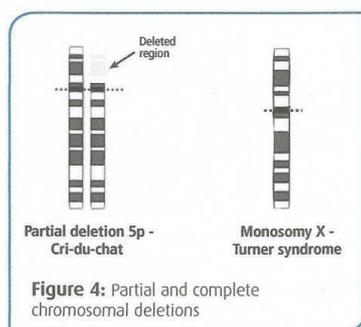
De todas las alteraciones genéticas, la más común es el Síndrome de Down, que se encuentra en el 0.125% de los nacimientos vivos. La aparición de este síndrome se debe a una duplicación del cromosoma 21, lo cual resulta en una trisomía del cromosoma 21 -trisomía del par 21- (Figura 3). Existen otras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



Deleciones parciales o totales de cromosomas se han ligado a estos trastornos. Por ejemplo, una deleción parcial en el brazo corto o "brazo p" del cromosoma 5, es responsable del síndrome de Cri-du-Chat, llamado así porque los niños afectados realizan un grito parecido al de 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.

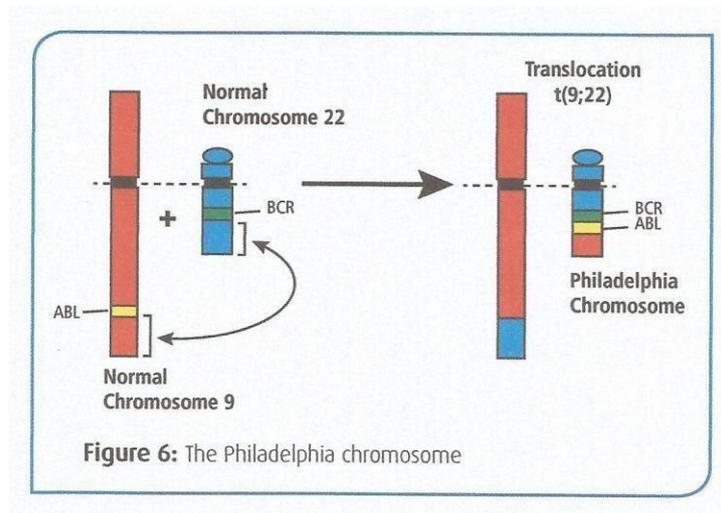
Otros cariotipos anormales pueden producir individuos sanos, por ejemplo, las translocaciones balanceadas en las cuales regiones recíprocas de diferentes cromosomas son intercambiadas (Figura 5).



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.



Además, se ha demostrado que la mayoría de los 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, provocando que la división celular sea detenida en la metafase.

Estas células incubadas con colchicina posteriormente son fijadas y adheridas a un portaobjetos de microscopio. Finalmente, se realiza la tinción con Giemsa, una mezcla de colorantes que, selectivamente, tiñe el ADN de color azul 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 PROFESOR**

5. PRÁCTICA

PREPARACIONES PREVIAS (a realizar por el profesor o los alumnos)

Distribuir los alumnos en 6 grupos de trabajo.

1. Distribuir un portaobjetos con la preparación celular a cada grupo, 2 pipetas, 1 tubo con GIEMSA, 1 tubo de 5 ml y un vaso de precipitados.
2. Marcar 6 tubos de 5 ml con la etiqueta GIEMSA. Dispensar 200 ul de reactivo de GIEMSA a cada uno de los tubos.
3. Preparar los vasos de precipitados para lavar las preparaciones.
4. Preparar una botella lavadora del laboratorio que contenga agua del grifo.
5. Marcar las 2 pipetas pasteur de la siguiente manera:
 - * Marcar una pipeta con las letras **SH** → *Solución de hidratación*
 - * Marcar una pipeta con la letra **G** → *Colorante Giemsa*



NOTA: Para realizar la observación microscópica no se montan las preparaciones con el cubreobjetos. Únicamente se utilizarán los cubreobjetos para la observación con el objetivo de inmersión, siguiendo las indicaciones que figuran en el protocolo de la práctica.

Protocolo de tinción y observación microscópica

1. Con ayuda de la *pipeta G*, añadir 1,8 ml de *solución de dilución* al tubo que contiene los 200 ul de GIEMSA. Agitar.
 2. Con ayuda de la *pipeta SH*, añadir 2 ml de *solución de hidratación* al portaobjetos que contiene la muestra de células.
- IMPORTANTE: NO añadir** la solución directamente sobre las células ya que podría alterar la morfología e incluso desenganchar las células del portaobjetos, perdiendo la preparación.
3. Incubar durante 3 minutos.
 4. Con ayuda de la *pipeta SH* aspirar la *solución de hidratación* y descartarla en el vaso de precipitados.
 5. Con ayuda de la *pipeta G*, añadir la *solución GIEMSA* al portaobjetos que contiene las células.

IMPORTANTE: NO añadir la solución directamente sobre las células ya que podría alterar la morfología e incluso desenganchar las células del portaobjetos, perdiendo la preparación.

Asegurarse de que el colorante cubre bien el portaobjetos, evitando que se desborde.

3. Incubar durante 20 minutos a temperatura ambiente.

4. Con cuidado, sujetar el portaobjetos en posición vertical sobre el vaso de precipitados y lavar con precaución utilizando la botella de lavado, dirigiendo la boquilla a la parte superior del portaobjetos, **NUNCA** sobre la preparación.

NO EXCEDERSE en el tiempo de lavado ya que las muestras perderán coloración. Uno o dos segundos de lavado es suficiente.

5. Dejar secar el portaobjetos en posición vertical, sobre papel de filtro -unos 4 o 5 minutos será suficiente-.

6. Observar la preparación al microscopio óptico, utilizando los diferentes aumentos, empezando con el de menor aumento, p.e. el de 4x. Utilizar el objetivo 10x o 20X y buscar un campo bien teñido para localizar las mejores metafases y que contenga cromosomas dispersos y no superpuestos.

7. Utilizar el objetivo de 40X y contar el número de cromosomas en el campo observado. Tomar nota en el cuaderno de laboratorio y también dibujar las características de los cromosomas incluyendo disposición, número, presencia de centrómeros o estructuras anormales de cromosomas, si la célula contiene cromosomas individuales o en parejas, y otras observaciones.

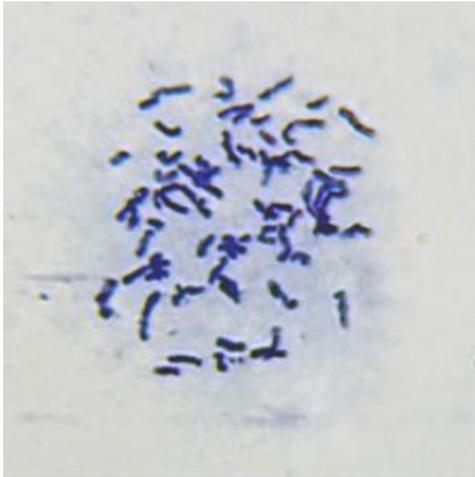
8. Después de un mínimo de 30 minutos de observación añadir a la preparación 1 o 2 gotas del medio de montaje y con cuidado, colocar encima un cubreobjetos. Localizar los cromosomas y observar con el microscopio de inmersión.

IMPORTANTE: Una vez que se ha montado el portaobjetos **NO DEJAR LA PREPARACIÓN PARA OBSERVARLA AL DÍA SIGUIENTE** pues la observación microscópica irá perdiendo calidad a medida que pasa el tiempo, ya que el colorante se difunde en el medio de montaje. ANOTAR las observaciones en el cuaderno de prácticas.

6. RESULTADOS

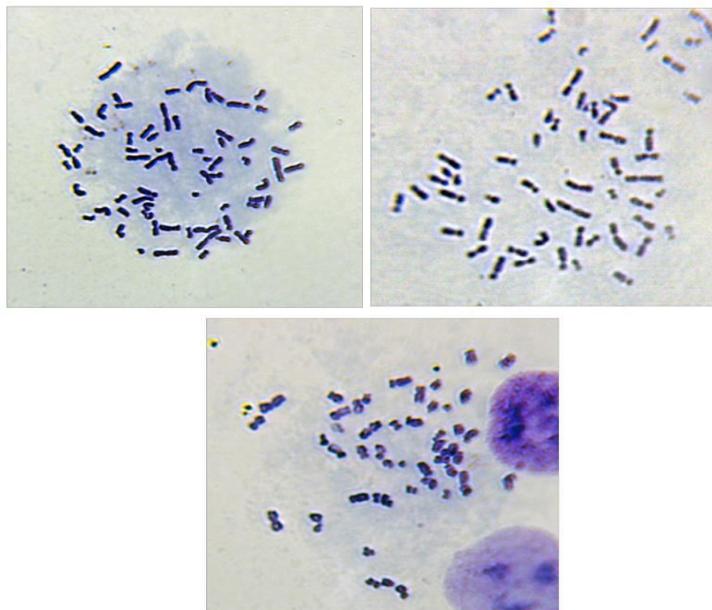
En las imágenes se muestran resultados típicos conseguidos con estas células, las cuales contienen numerosas translocaciones (difíciles de entender para no expertos y el tipo de tinción utilizado) y desorganizaciones cromosómicas. Se pueden contar 68 cromosomas.

Con la tinción de GIEMSA no se pueden observar el patrón de bandas características 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 **acrocentricos** 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.