

Práctico 8 – Adquisición de Multicelularidad

Análisis de algunos parámetros del ciclo celular

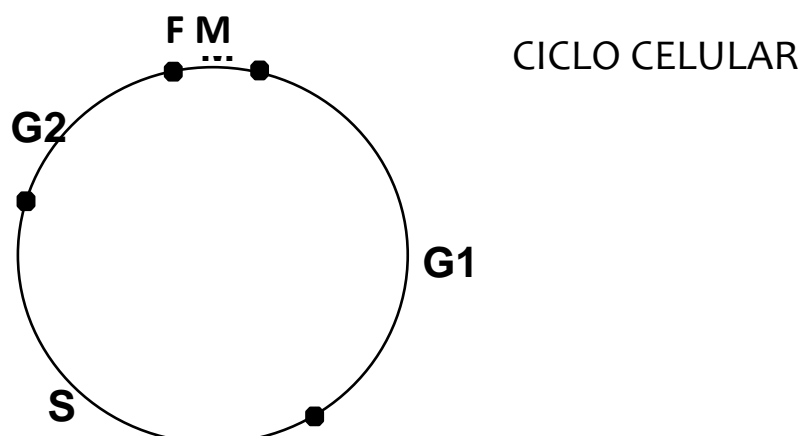
Objetivos:

- Reconocimiento al microscopio de luz de células en interfase y en las distintas etapas de la mitosis. Estimación del índice mitótico de una población celular.
- Estimación de la duración de las fases del ciclo celular en base a datos tomados de la literatura, obtenidos mediante la técnica de autorradiografía.

Introducción:

Parte 1

El ciclo de vida de la célula, visto al microscopio, se divide en dos grandes fases, la interfase y la fase M, etapa de división compuesta por la mitosis (división nuclear) y la citocinesis (división del citoplasma). A su vez, la interfase se subdivide típicamente en las fases G1, S y G2. La fase S corresponde a la etapa de duplicación del ADN; la fase G1 es el intervalo entre la salida de la fase M y la entrada en fase S; y la fase G2 es el intervalo entre la fase S y una nueva fase M:



La duración de estas fases es variable y depende de distintos factores, en particular de la duración de G1.

Al microscopio, las células en interfase se reconocen por la presencia de un núcleo que se tiñe difusamente, sin que sea posible individualizar cromosomas, aunque sí puede observarse dentro del núcleo un punto oscuro, el nucléolo.

La fase M se divide en la mitosis y la citocinesis (división nuclear y división del citoplasma).

La **mitosis** también se subdivide en etapas, claramente distinguibles al microscopio:

Profase. La cromatina en el núcleo comienza a condensarse en cromosomas bien definidos, visibles al microscopio. Cada cromosoma se ha duplicado y consiste en dos cromátidas hermanas. Cada una de ellas posee una región especializada, el centrómero, y ambos centrómeros las mantienen apareadas. Hacia el fin de la profase los microtúbulos citoplasmáticos se desensamblan y reensamblan para formar el huso mitótico.

Prometafase. La prometafase comienza con el desensamblaje de la envoltura nuclear. Los microtúbulos del huso mitótico pueden entrar ahora a la región nuclear. En los

centrómeros, comienzan a formarse complejos proteicos denominados cinetocoros. A ellos se adhieren parte de los microtúbulos del huso, y permiten que los cromosomas empiecen a moverse. Estos microtúbulos reciben el nombre de microtúbulos cinetocóricos, mientras que los restantes microtúbulos del huso mitótico se denominan microtúbulos polares (los que crecen alejando los centros polares) y astrales (que interactúan mediante proteínas con la envoltura tirando de los centros polares).

Metafase. Los microtúbulos cinetocóricos desplazan a los cromosomas a lo largo del huso y terminan por alinearlos en la línea media del huso mitótico, la placa metafásica. Esta organización ayuda a asegurar que en la próxima fase, cuando los cromosomas se separan, cada nuevo núcleo recibirá una copia de cada cromosoma.

Anafase. La anafase comienza cuando los cinetocoros en cada cromosoma se separan, permitiendo que las dos cromátidas hermanas se desaparean y se desplacen hacia polos opuestos. A partir de este momento cada cromátida pasa a ser considerada un cromosoma. El movimiento de los cromosomas se divide en dos etapas. Durante la anafase A, los microtúbulos cinetocóricos se acortan, acercando los cromosomas a los polos del huso mitótico. Durante la anafase B, los microtúbulos polares se alargan, aumentando la separación entre los polos.

La **citocinesis** usualmente comienza en esta fase y luego continúa durante la telofase.

Telofase. Una nueva envoltura nuclear se forma alrededor de cada grupo de cromosomas hijos, que vuelven a descondensarse y dejan de ser visibles al microscopio fotónico. En células vegetales, se puede observar en esta fase una estructura denominada fragmoplasto en el espacio entre ambos núcleos, y es el precursor de la nueva pared celular que va a separar a las células hijas.

Una población de células que se dividen activamente puede clasificarse en:

- **Población sincrónica**, en que las células van atravesando las distintas etapas del ciclo a la vez, y en particular se dividen al mismo tiempo. Las células de los embriones tempranos de la mayoría de los animales son un ejemplo de población sincrónica.
- **Población asincrónica**, las células atraviesan el ciclo desfasadamente, y a cada momento pueden encontrarse células en todas las etapas del ciclo celular.

Estrategia experimental

El análisis de los parámetros de la cinética celular ha sido objeto de intenso estudio, principalmente debido a sus implicaciones en el desarrollo de terapias para el cáncer. En esta actividad práctica introduciremos algunos conceptos clave para el análisis de estos parámetros.

El **índice mitótico** de una población celular es la proporción de células en mitosis que hay en esta población:

$$I_M = n^{\circ} \text{ de células en mitosis} / n^{\circ} \text{ de células totales.}$$

En una población asincrónica, el número de células en mitosis va a depender de la proporción que ocupe la mitosis dentro de la duración del ciclo celular. Por ejemplo, si para cierta población celular la mitosis ocupa un 5 % del total del ciclo celular, cabría esperar, por probabilidad, que aproximadamente un 5 % de las células estuviera en mitosis en un momento dado. A la inversa, al obtener el índice mitótico de una población celular asincrónica, se obtiene la proporción que ocupa la mitosis dentro del ciclo celular para esa población. Además, puesto que en la mayoría de las células la mitosis dura aproximadamente una hora, conocer el índice mitótico permite calcular la duración total aproximada del ciclo celular. En el ejemplo anterior, el

ciclo celular duraría 20 horas (1 hora * 100/5).

La población celular que utilizaremos en la parte 1 es un **meristemo de raíz de cebolla**. Un meristemo es un tejido vegetal no diferenciado, en el cual las células se dividen activamente para luego diferenciarse, y por lo tanto es ideal para reconocer células en interfase y en distintas etapas de la mitosis, así como para calcular el índice mitótico.

Parte 2

La autorradiografía es una técnica que permite localizar en tejidos y células un isótopo radiactivo, que puede haberse incorporado de diversas maneras. Consiste en cubrir al tejido o células que contienen al isótopo radiactivo con una delgada capa de emulsión fotográfica, dejándolo en oscuridad por un cierto tiempo, para que la emulsión quede expuesta a la radiación emitida por el espécimen. La emulsión que se encuentra exactamente arriba de las zonas que poseen radiactividad va a velarse, y luego del revelado se van a ver al microscopio como granos oscuros.

En la **tabla I** del protocolo de actividades prácticas, se muestran datos obtenidos mediante autorradiografía.

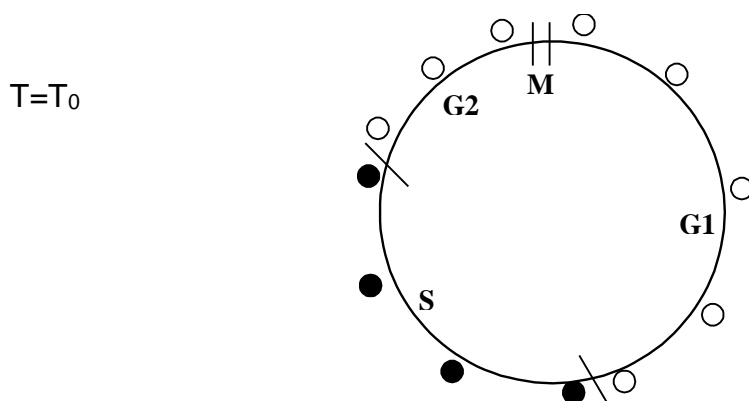
Un cultivo de células de mamífero en crecimiento rápido fue incubado por 30 minutos con ^3H -timidina. La timidina es la base timina unida a desoxirribosa, y es un precursor del ADN. La ^3H -timidina contiene tritio, el isótopo radiactivo del hidrógeno. La ^3H -timidina va a incorporarse al ADN de las células, pero sólo al de las células que estén en la fase de síntesis de ADN, es decir en la fase S del ciclo celular.

Luego de la incubación, la ^3H -timidina fue removida del medio de cultivo y se extrajeron muestras a intervalos regulares de 3 horas, que fueron procesadas para autorradiografía. Posteriormente, las muestras fueron teñidas con hematoxilina, para visualizar los núcleos de las células que no incorporaron timidina marcada. En cada muestra, se contó el número de células mitóticas, y se las clasificó en marcadas y no marcadas, calculándose el porcentaje de mitosis marcadas sobre mitosis totales, tal como aparece en la tabla. Por último, se graficó este porcentaje en función del tiempo.

Para entender cómo puede obtenerse la duración de las fases del ciclo celular a partir de este tipo de gráfico, consideraremos una situación simplificada.

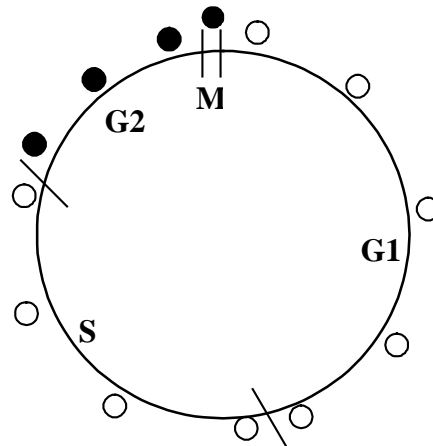
Un cultivo celular típico es una población asincrónica, en la que las células entran y salen de la fase M a distintos tiempos. Más aún, la duración de cada fase, en particular G1, va a ser distinta para cada célula. Para hacer más sencillo el análisis, consideraremos una población asincrónica, pero en la cual las fases del ciclo celular duran lo mismo para todas las células. También asumiremos que la fase M es tan corta comparada con las demás fases que puede tomarse como instantánea. La pregunta a resolver es: ¿qué forma tendría una gráfica de mitosis marcadas sobre mitosis totales en función del tiempo, en esta situación?

Veamos en primer lugar como se distribuyen las células a T_0 , o sea al final del pulso de ^3H -timidina:



A este tiempo, las células marcadas están todas en fase S, porque sólo las células que sintetizan ADN pueden incorporar ^3H -timidina y marcarse. Por lo tanto, a T_0 el porcentaje de mitosis marcadas será igual a 0. Cuando las primeras células marcadas lleguen a la fase M, a $T = T_1$, la distribución será la siguiente:

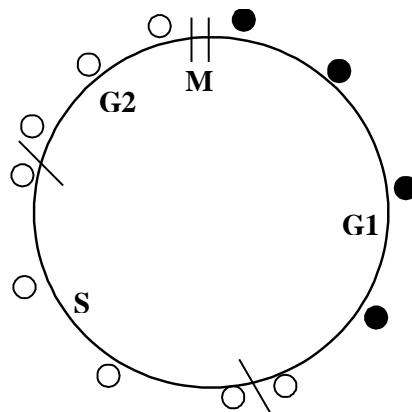
$T = T_1$

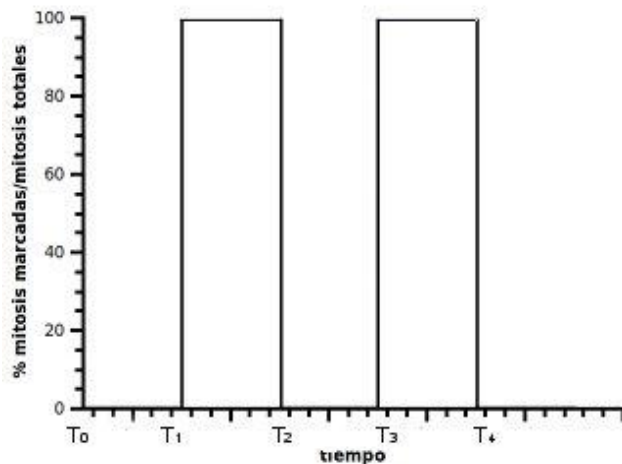


Como las células atraviesan el ciclo a la misma velocidad (porque la duración de cada fase es igual para todas), cuando las células marcadas llegan a fase M, las células que a T_0 estaban en G2 ya pasaron la fase M y ahora están en G1. Por lo tanto, a T_1 , en fase M solo hay células marcadas, y el porcentaje de mitosis marcadas es 100%. A medida que vayan llegando células marcadas a fase M, el porcentaje de mitosis marcadas se mantendrá en 100%.

Cuando la última célula marcada salga de fase M, a $T = T_2$, el porcentaje de mitosis marcadas volverá a caer a 0. Eventualmente, a $T = T_3$, las células marcadas volverán a llegar a fase M, repitiéndose el esquema correspondiente a T_1 .

$T = T_2$





Por lo tanto, la gráfica de mitosis marcadas sobre mitosis totales en función del tiempo, para esta situación, tendrá la siguiente forma:

Una serie de picos regulares...

El 100% de mitosis marcadas se alcanza a T_1 , cuando las primeras células marcadas llegan a fase M. A su vez, las primeras células marcadas en llegar a fase M son células que a T_0 estaban al final de la fase S, y por ende sólo les queda recorrer G2 para llegar a fase M (ver esquema a $T = T_0$). Por lo tanto, en este gráfico, $T_1 - T_0$ es igual a G2.

El 100% de mitosis marcadas se mantiene hasta que llegan a fase M las últimas células marcadas. Estas son células que a T_0 estaban al comienzo de S. Por lo tanto, el tiempo que transcurre entre que llegan a fase M las primeras y las últimas células marcadas es igual a la duración de la fase S. Este tiempo es igual a $T_2 - T_1$.

Por último, el tiempo entre T_1 y T_3 es igual a la duración total del ciclo celular, ya que es el tiempo entre dos fases M para las mismas células.

En suma, de esta gráfica se obtienen la duración de G2, de S y del total del ciclo celular. Si conocemos la duración de la fase M (en general igual a 1 hora), podemos además obtener la duración de G1.

En resumen, la idea básica es usar la mitosis como una ventana y observar a la cohorte de células marcadas con timidina tritiada pasar por ella.

El análisis de la gráfica obtenida con los datos de la tabla I es muy similar, pero debe considerarse el efecto de la variación del ciclo celular y sus fases dentro de la población celular. El efecto gráfico que produce esta consideración es una curva suavizada de una oscilación amortiguada. El problema biomatemático que se suscita es cómo obtener información de los parámetros celulares a partir de este gráfico.

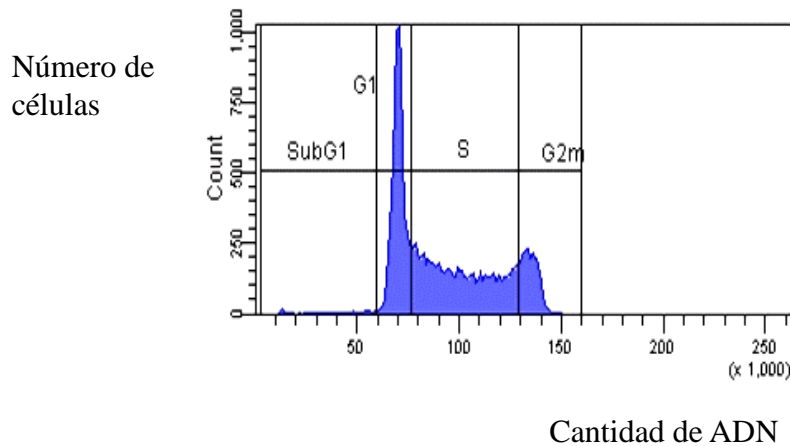
El propio Henry Quastler, pionero en el análisis autorradiográfico del ciclo celular también fue el padre del concepto de utilizar las intersecciones de la curva con el 50% de las mitosis marcadas/mitosis totales como un estimador de las duraciones medias de las fases del ciclo. Este es el método que se utilizará en clase. Sin perjuicio de ello, debe saberse que en los casos en que el segundo pico no alcanza al 50% se debe recurrir a modelos matemáticos complejos que están fuera de la órbita de este curso.

Como verán en la parte práctica, para poder obtener una curva de la que se puedan estimar los tiempos de las etapas del ciclo celular se deberá, previamente, sincronizar la población celular. Hablamos de sincronizar una población asincrónica cuando logramos que todas las células se encuentren en la fase M en un determinado momento.

Análisis de parámetros del ciclo celular mediante citometría de flujo

Quantificación de ADN

Para determinar rápidamente parámetros del ciclo de una población celular puede utilizarse citometría de flujo. Un método clásico consiste en incubar a las células (vivas o fijadas y previamente permeabilizadas) con yoduro de propidio (PI), un agente que se intercala en el ADN de forma estequiométrica y emite fluorescencia cuando es excitado con una determinada longitud de onda. El material teñido es entonces medido en el citómetro de flujo, y la señal fluorescente genera un pulso electrónico en los detectores con una altura (amplitud) que es proporcional a la emisión de fluorescencia total de la célula. La clave para esta interpretación es que la célula incorpora una cantidad de colorante proporcional a su contenido de ADN. Utilizando estándares adecuados, con contenidos diploides conocidos, como eritrocitos de pollo, se puede determinar la ploidía de las células de interés.



Determinación de parámetros cinéticos del ciclo celular (análisis multivariado)

El análisis cuantitativo de ADN es ampliamente utilizado para estimar la distribución de las fases del ciclo celular. Sin embargo, este tipo de análisis no aporta información citodinámica como la duración del ciclo o el tiempo de tránsito entre las fases. Estos parámetros pueden determinarse utilizando autorradiografía y determinando la cantidad de mitosis marcadas, o mediante técnicas más modernas de marcaje de células que están sintetizando ADN.

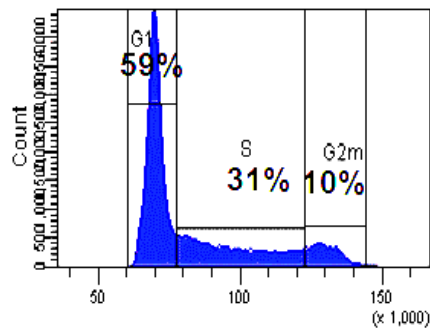
Fase S

Uno de los abordajes más utilizados es la incorporación en el medio de cultivo de un nucleótido no radiactivo, la bromodesoxiuridina (BrdU), un análogo de timidina que puede ser identificado mediante el uso de anticuerpos anti-BrdU conjugados a una molécula fluorescente. La citometría de flujo permite la medición simultánea de la cantidad de BrdU incorporado y del contenido de ADN en cada célula, permitiendo realizar el seguimiento de un grupo de células a través del ciclo.

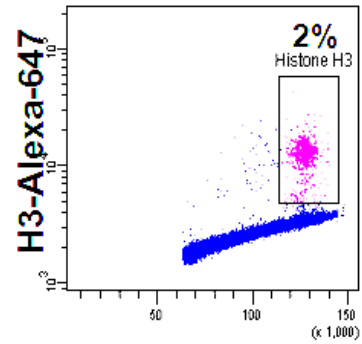
Fase M

La histona H3 es fosforilada durante la mitosis entre la profase y la anafase tanto mitótica como meiótica, y por tanto su fosforilación puede ser utilizada para determinar la cantidad de células

que se encuentran en fase M. Para ello se utiliza un anticuerpo conjugado a un fluorocromo (en el ejemplo, Alexa-647) capaz de unirse sólo a la forma fosforilada de la histona H3. Combinando esta técnica con la tinción de ADN, es posible discriminar las células que se encuentran en fase M de la región G2M, y por consecuencia también aquellas que se encuentran en G2, como se muestra en las siguientes gráficas.



contenido de ADN



contenido de ADN