

# TRABAJO PRÁCTICO: MITOSIS y CITOGÉNÉTICA HUMANA

## A) MITOSIS

### Objetivo

1. Realizar una actividad de repaso y reconocimiento sobre las distintas fases de la división mitótica y sus características más importantes.
2. Relacionar los patrones de reconocimiento de cada fase mitótica con los procesos subyacentes y los resultados funcionales de dicho proceso.

### Material a utilizar

- Preparados permanentes de meristemas de raíces de *Allium cepa*
- Microscopio óptico

### Desarrollo del trabajo práctico

Los alumnos observarán los preparados en el microscopio a 400X y reconocerán las distintas fases de la mitosis. Seguidamente cuantificarán en un total de 500 células contadas en por lo menos 3 campos distintos, las distintas fases y registrarán los valores obtenidos. Calcularán los siguientes parámetros

Índice mitótico (IM):  $\text{Número de células en mitosis} / 500 \text{ células totales observadas}$

Índice de fases ( $I_f$ ):  $\text{Número de células en fase} / \text{total de células en mitosis}$

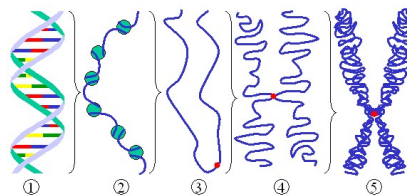
Responder:

- a. ¿Cuál podría ser la utilidad de obtener el IM de un tejido proliferante?
- b. ¿Cómo relacionaría los valores de  $I_f$  e IM con la duración de la mitosis?
- c. ¿Cómo relacionaría los diferentes valores de los  $I_f$  con los eventos que transcurren en cada una de estas?
- d. La condensación de los cromosomas es un factor presente en la división mitótica. ¿Con que otro evento se podría correlacionar?
- e. ¿Cuál de las fases es más adecuada para la observación de la morfología cromosómica? ¿Por qué es necesario inhibir la formación de los microtúbulos e inducir la hipotonía?

## B) CITOGÉNÉTICA HUMANA

### Introducción

La Citogenética es el campo de estudio sobre la estructura y organización del genoma eucariota así como su composición molecular y genómica basada en análisis cromosómicos. Los cromosomas son unidades de cromatina que portan una determinada secuencia de ADN en asociación con ARN y proteínas histónicas y no histónicas. El número y la estructura cromosómica en eucariotas caracterizan grupos taxonómicos y en última instancia las especies.



La estructura y morfología de los cromosomas eucarióticos se visualiza y define cuando la cromatina presenta máximo grado de compactación y el ADN se encuentra duplicado formando 2 cromátides. La observación de células en división meiótica también aplica las mismas técnicas aunque los objetivos de los estudios están orientados a la búsqueda de patrones característicos en la meiosis como es el entrecruzamiento, los quiasmas, las regiones homólogas que se manifiestan en el apareamiento de los cromosomas, etc, para estudios evolutivos, clínicos poblacionales etc.

La técnica de observación de cromosomas fue llevada a cabo por Tjio y Levan en la década del 50 y fue a partir de ese momento que la citogenética amplió su campo de estudio integrando los conocimientos provenientes de la genética mendeliana, la mutagénesis y la genética molecular. Los campos de aplicación más relevantes son el diagnóstico clínico, la evolución cromosómica, el mejoramiento genético, la evaluación genotoxicológica.

Las técnicas citogenéticas incluyen el bandeo cromosómico, siendo el bandeo G el más utilizado para identificar y diferenciar a los cromosomas, aunque existen otras técnicas de bandeo citogenético. La citogenética molecular aplica hibridación de sondas de ADN reveladas por fluorescencia *in situ* (FISH) e hibridación genómica comparativa (CGH).

### **Metodología para el estudio de morfología cromosómica en células humanas**

Los cromosomas metafásicos permiten el estudio de la morfología de los cromosomas y la determinación del número modal o número cromosómico más frecuente. Dado que esta fase es bastante corta, la proporción de metafases en una población de células proliferantes es en general, escasa. Para facilitar el análisis se puede enriquecer el tejido en células metafásicas al incorporar al medio un inhibidor del huso mitótico como la colchicina u 8-Q (este último es de preferencia en meristemas). Se pueden identificar 2 métodos generales para la obtención de células mitóticas

Métodos directos: Las células mitóticas se obtienen a partir de tejidos proliferantes que se extraen y se extienden o aplastan en un portaobjeto y se observan con una tinción adecuada. En estos tejidos las células están en división mitótica espontánea (por ej.: meristemas, médula ósea, mucosas)

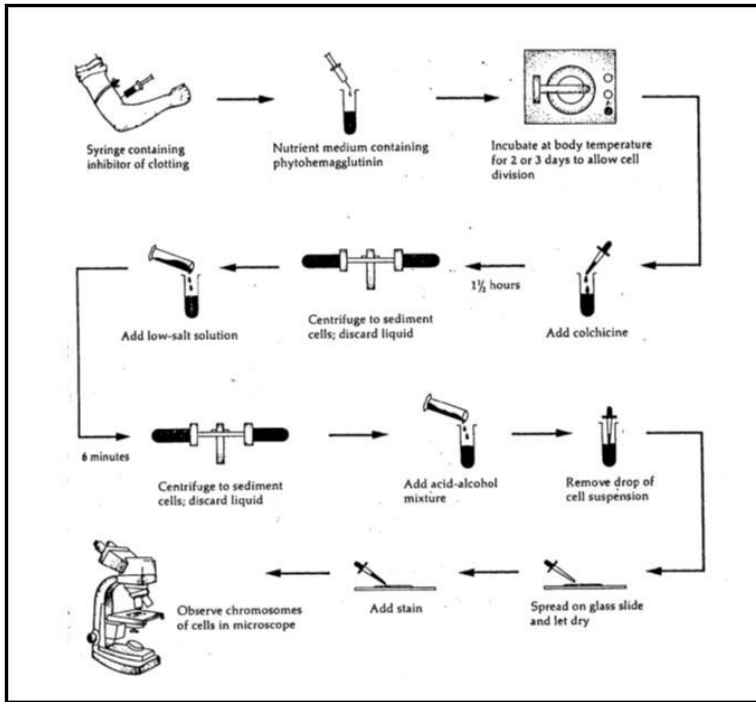
Métodos de cultivo: pueden ser cultivos primarios (ej: fibroblastos) o líneas celulares (HepG2, Hep-2, HeLa, etc.) que proliferan espontáneamente en un medio de crecimiento,

Métodos de cultivo con estimulación: las células deben ser estimuladas con un agente mitógeno, para inducir la dediferenciación y el reinicio de la división mitótica (por ej.: linfocitos de sangre periférica, siendo éstos los más utilizados en citogenética humana). Para los análisis cromosómicos clínicos, las células tienen que crecer y dividirse rápidamente en cultivo. Las células más accesibles que cumplen estos requisitos son los leucocitos de la sangre, en especial los linfocitos T.

### **Cultivo de linfocitos de sangre periférica**

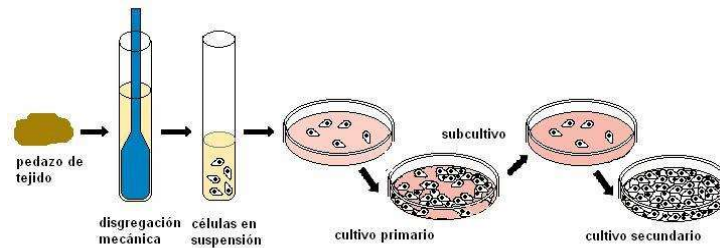
La muestra sangre periférica se obtiene por venopunción, mezclándola con heparina para impedir su coagulación. La sangre puede usarse entera o aislando los leucocitos por centrifugación. Las células se colocan en un medio de cultivo y se estimulan para que se dividan con un agente mitógeno. Al cabo de unos cuantos días de incubación, las células en división se detienen en metafase mediante la inhibición del huso mitótico con agentes químicos o frío. Posteriormente los cultivos se retiran de incubación y se tratan con una solución hipotónica para que la membrana nuclear se rompa al realizar el extendido y los cromosomas se separen. Se coloca fijador para detener el proceso y finalmente se extiende la fijación sobre un portaobjeto y se tiñen con una de las técnicas disponibles. Los cromosomas ya están listos para su análisis básico. El análisis del cariotipo a nivel citológico puede ser complementado por cariotipado molecular, es decir, la aplicación de las técnicas citomoleculares para la evaluación de la integridad y las características del cariotipo a nivel del genoma completo. Los niveles de resolución, sensibilidad y facilidad del análisis de los cromosomas y del genoma son cada vez mayores.

**Figura 1:** siembra y cosecha.



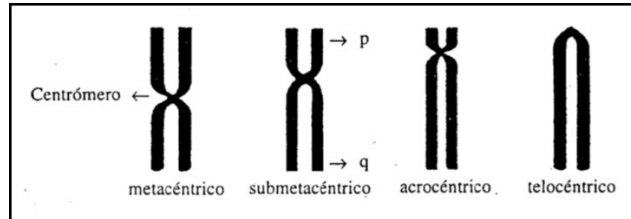
### Cultivo de líneas celulares

Las células en cultivo se dividen hasta cubrir la superficie del recipiente de cultivo, formando una monocapa). Como consecuencia del contacto entre las células se detiene temporalmente su proliferación hasta que se pasan a un recipiente de subcultivo con medio fresco. Alícuotas del cultivo pueden conservarse por congelación y descongelarse para subcultivarse nuevamente al momento de hacer los estudios. Algunas líneas celulares humanas son de utilidad para estudios cromosómicos aunque estos suelen presentar alteraciones en el número y estructura conforme aumentan los pasajes.



## Análisis citogenético

En metafase cada cromosoma está formado por dos cromátidas hermanas unidas por el centrómero, que controla la segregación cromosómica durante la división celular. El centrómero divide al cromosoma en brazos: el brazo corto se llama p y el brazo largo se llama q, y tiene una posición fija y única para cada cromosoma. Ésta puede ser medial (cromosoma metacéntrico), submedial (cromosoma submetacéntrico), subterminal (cromosoma acrocéntrico) o terminal (cromosoma telocéntrico) (Fig. 2).



**Figura 2:** Morfología cromosómica

El idiograma de un cromosoma es un mapa que muestra la relación entre los brazos, el centrómero y la presencia de tallos y satélites. En el idiograma se ilustra, también, el patrón de bandas específico de ese cromosoma. Por otro lado, el cariograma es el ordenamiento sistematizado de los cromosomas de una única célula. Tras el análisis al microscopio óptico se toman imágenes de aquellas células en metafase que sean de la mejor calidad. La observación de 15 a 20 células con un análisis completo de al menos 5 de ellas permite disponer de los cromosomas de a pares según su tamaño y bandeo, definiendo así el cariotipo del individuo en cuestión.

El número, la morfología (dada por el tamaño y posición del centrómero) y la estructura de los cromosomas definen las constantes cromosómicas. Las metodologías de bandeo (ver más adelante) han hecho posible el análisis detallado de la estructura cromosómica.

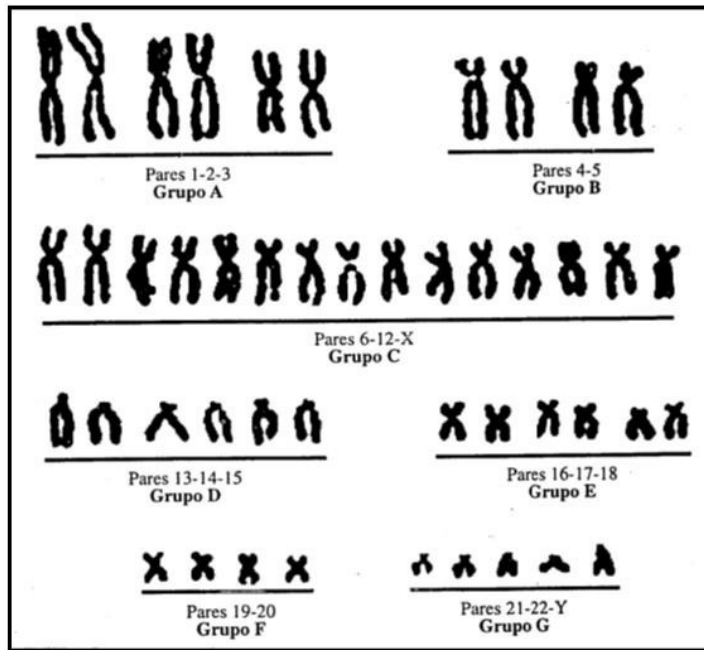
### **El cariotipo humano**

Las células somáticas de *Homo sapiens sapiens* contienen 23 pares de cromosomas homólogos (22 pares de autosomas y un par sexual: XX en la mujer, XY en el varón). En humanos se utiliza una nomenclatura específica: primero se escribe el número cromosómico (2n), seguido por la descripción del par sexual, y a continuación se indica la alteración cromosómica, si la hubiere. Por ejemplo: la nomenclatura correspondiente a los complementos cromosómicos normales es 46,XX (mujer) y 46,XY (varón).

Los 23 pares cromosómicos presentan diferente tamaño y morfología. Según las variables cromosómicas, se distinguen 7 grupos de cromosomas humanos; los autosomas se enumeran del 1 al 22 en orden decreciente de tamaño (Tabla 1, Fig. 3).

Grupo	Morfología	Pares cromosómicos
A	Metacéntricos grandes	1 - 2 - 3
B	Submetacéntricos grandes	4 - 5
C	Submetacéntricos medianos	6 - 7 - 8 - 9 - 10 - 11 - 12 - X
D	Acrocéntricos grandes	13 - 14 - 15
E	Submetacéntricos pequeños	16 - 17 - 18
F	Metacéntricos pequeños	19 - 20
G	Acrocéntricos pequeños	21 - 22 - Y

**Tabla 1**



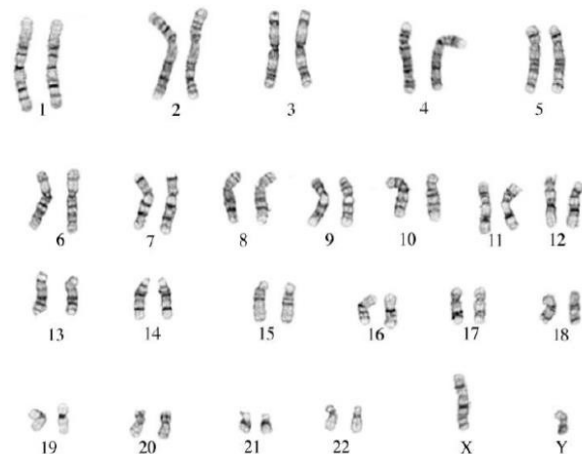
**Figura 3:** Los cromosomas humanos ordenados según los diferentes grupos.

## Bandeo cromosómico

Las técnicas de bandeo permiten detectar, a lo largo de cada cromosoma, bandas alternantes de mayor y menor tinción (o fluorescencia), que forman un patrón estable y característico de cada cromosoma. Este patrón de bandas es de gran utilidad práctica porque facilita la identificación precisa de cada cromosoma y, además, hace posible la caracterización de regiones particulares dentro de cada brazo cromosómico. El primer bandeo utilizado fue el llamado “Q” (por la sustancia fluorescente empleada, quinacrina) que exhibe uno de los patrones de bandas más informativos, aunque requiere de microscopía de fluorescencia. Posteriormente, se comprobó que el mismo patrón de bandeo podía ser obtenido mediante la extracción selectiva de componentes cromosómicos, utilizando la enzima tripsina o soluciones salinas y una tinción con el colorante de Giemsa (usado habitualmente en hematología). Este patrón de bandas llamado G (de “Giemsa”) es el utilizado como estándar (Fig. 4 y 5).



**Figura 4:** Metafase humana con Bandeo G.

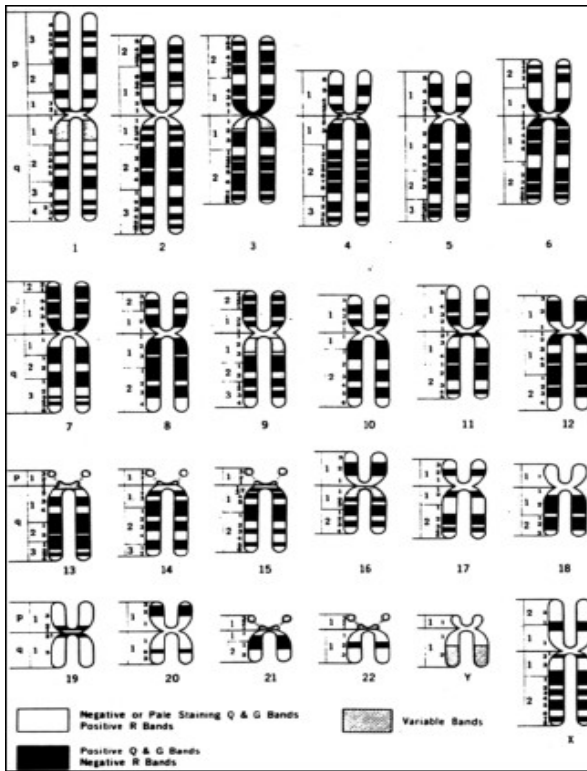


**Figura 5:** Cariotipo humano con Bandeo G.

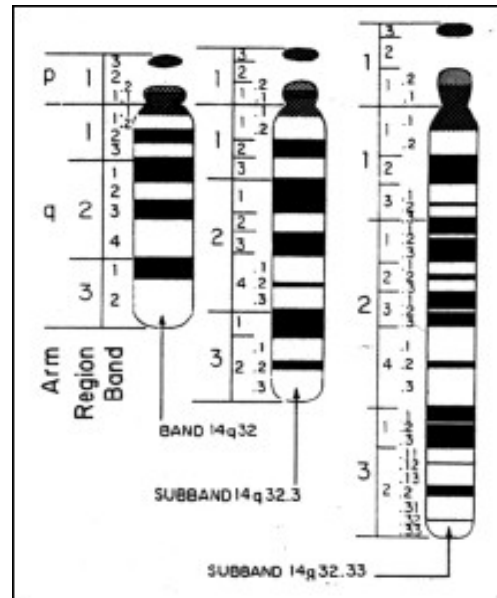
El patrón de bandeo varía según el estado de elongación de los cromosomas; en los cromosomas más acortados, propios de la metafase (y también acortados por mayor tiempo pasado en presencia de colchicina), el número total de bandas detectables en el cariotipo humano es de aproximadamente 400 (Fig. 6).

Cuando se observan células en prometafase, con cromosomas más elongados, el número de bandas visibles puede llegar a sobrepasar las mil. Este patrón de bandas es llamado “de alta resolución” (Fig. 7). Las diferencias entre el primer patrón y el segundo consisten en el desdoblamiento de bandas metafásicas en subbandas en la prometafase. El bandeo Q y el bandeo G producen bandas que están relacionadas con la composición de bases del ADN en las regiones bandeadas. Las bandas oscuras del bandeo G y las brillantes (fluorescentes) del bandeo Q representan regiones cuyo ADN es rico en el par A-T, de manera que su coloración es proporcional a la concentración de A+T. Esto es apoyado por los resultados obtenidos con sustancias de afinidad específicas por el par de bases A-T, tales como la daunomicina y el “Hoechst 33258”; mientras que las sustancias que se unen preferencialmente al par G-C, como la cromomicina A3, dan un patrón de bandeo fluorescente inverso al bandeo Q y al G.

Además de poseer riqueza en el par A-T, las bandas oscuras del bandeo G se caracterizan por poseer relativamente pocos genes y por contener proteínas diferentes a las halladas en las bandas claras (no coloreadas).



**Figura 6:** Representación esquemática del cariotipohumano en el estado de 400 bandas con bandeoG.



**Figura 7:** Representación esquemática del cromosoma 14 con bandeo G en estado de 320 bandas (izquierda), 500 (centro) y 900 (derecha); ilustrando el uso del Sistema Internacional de Nomenclatura para designar a las regiones, bandas y subbandas cromosómicas.

## **Objetivo del TP**

1. Experimentar el conteo y reconocimiento de cromosomas en preparados provenientes de linfocitos de sangre periférica (LSP) y línea celular humana HEp-2 (human epidermoidlaryngeal carcinoma)
2. Familiarizarse con el reconocimiento de los grupos cromosómicos en los preparados celulares de LSP.
3. Observar patrones de Bandas G en los preparados y comparar con figuras preestablecidas con el objetivo de reconocer alguno de los cromosomas del esquema en el preparado.

## **Material a utilizar**

- Preparados de cultivos de linfocitos de sangre periférica humana (LSPH) con y sin bandeo
- Preparados de cultivos celulares HEp-2 con y sin bandeo
- Microscopio

## **Desarrollo del Trabajo Práctico**

### **Observación de preparados LSPH al microscopio óptico:**

Los alumnos recorrerán los preparados a 100X y 400X tratando de localizar células en metafase. El objetivo de esta parte es observar metafases y tratar de determinar el número cromosómico mediante el conteo de los cromosomas presentes en cada metafase. Algunos vidrios corresponden a metafases con tinción estándar (o tinción uniforme) y otros, bandeo G. Pueden verse con aceite de inmersión sin necesidad de ponerles cubreobjetos. ¡¡¡NO olvidar limpiar la lente del microscopio al terminar de usarlo!!!

Observación de preparados provenientes de líneas celulares HEp-2:

Seguir las indicaciones que en el ítem anterior, y contar el número de cromosomas de las células. Es probable encontrar células tengan un número muy diferente a 46 con frecuencia. Investigar las características de la línea en relación con el número cromosómico o ploidía que la caracteriza.

Obtener un número modal a partir del conteo de 30 metafases.

Identificar por lo menos 3 grupos cromosómicos de acuerdo al tamaño.

Observar algún preparado con bandeo G y reconocer algún cromosoma por comparación con el esquema de la guía.

## **Responder**

¿Cuál es el número más frecuente encontrado en los LSP humana? Y en la línea HEp-2?

¿Cuántos grupos pudo reconocer de acuerdo al tamaño de los cromosomas humanos?

¿Y a su morfología?

¿Qué cromosomas pudo identificar en preparados con bandeo cromosómico?

**Confección del cariotipo** (actividad interactiva): Los alumnos realizarán un ejercicio de simulación con imágenes digitales obtenidas de la siguiente dirección de internet:

<http://www.biologia.arizona.edu/human/act/karyotyping/karyotyping2.html>. El ejercicio involucra la comparación de los cromosomas por su tamaño, la ubicación del centrómero y la secuencia de bandas G. Los cromosomas se ordenarán en un cariotipo completo y se interpretarán los resultados como si se estuviera trabajando en un servicio de genética médica de un hospital. El cariotipo se completará electrónicamente para tres casos, buscando alteraciones citogenéticas que puedan explicar el fenotipo de los pacientes.

## **BIBLIOGRAFÍA**

Glass, B.; Kistler, J.C. Distal hyperextensibility of the thumb. *Acta Genet Statist. Med.* 4:192-206, 1953

Hsu, T.C. Tongue upfolding: a newly reported heritable character in man. *J. Hered.* 39:187-188, 1948.

Reed, D.R.; Nanthakumar, E.; North, M.; Bell, C.; Bartoshuk, L.M.; Price, R.A. Localization of a gene for bitter taste perception to human chromosome 5p15.1 (Letter) *Am. J. Hum. Genet.* 64:1478-1480, 1999.

Rozental, S; Navarro, R y Alba, L. 1995. Guía de Trabajos prácticos. Curso Anual Teórico Práctico de



Genética Médica. Centro Nacional de Genética Médica. ANLIS. Ministerio de Salud.  
Solari, A. J. 1999. Genética humana. Fundamentos y aplicaciones en Medicina. 2ª Edición. Ed. Médica Panamericana. Therman E, M. Susman. 1992. Human chromosomes. Structure, behavior and effects. Ed. Springer-Verlag.  
Snyder, L.H. Studies in human inheritance. IX. The inheritance of taste deficiency in man. Ohio J. Sci. 32:436-440, 1932.  
Stutrevant, A.H. A new inherited character in man. Proc. Nat. Acad. Sci. 26: 100-102, 1940.  
Thompson J. S. y Thompson M. N. Genética Médica. Ed. Salvat. 1985.  
Verma R., A. Babu. 1994. Human chromosomes. Principles and techniques. Ed. McGraw-Hill.

Nota: La elaboración de este TP fue posible gracias al trabajo y la colaboración de las Dras. Gabriela Chaufan, Laboratorio de Enzimología, Estrés y Metabolismo (LEEM) del Departamento de Química Biológica y de la Dra. Mariela Nieves del Grupo de Investigación en Biología Evolutiva (GIBE), Departamento de Ecología, Genética y Evolución. FCEN-UBA