

CAPÍTULO III

Metodología e instrumentación de análisis celular

- 1.- Hemocitómetro y test de exclusión de colorante “Trypan blue”**
- 2.- Citometría de flujo**
- 3.- PCR**
- 4.- Electroforesis en gel**
- 5.- Secuenciación de DNA**

1.-Hemocitómetro y test de exclusión de colorante “trypan blue”

El hemocitómetro empleado para contar las células consiste en una rejilla graduada en la que se cuenta individualmente cada célula pegada a la placa. (Figura 3.1) Cada cuadrado del hemocitómetro representa un volumen total de 0.1 mm^3 . Por lo tanto, la concentración celular por ml se calcula como:

$$C(\text{cel/ml}) = c \cdot f \cdot 10^4$$

donde c: promedio de número de células por cuadrado

f: factor de dilución

y para calcular el porcentaje de células viables simplemente bastará con:

$$V(\%) = \frac{n}{N} \cdot 100$$

n: nº total de células viables (sin teñir)

N: nº total de células (teñidas y no teñidas)

El test de exclusión de colorante “trypan blue” es un procedimiento para contar células viables a través de la tinción de las mismas. Este método se basa en el hecho de que las células vivas no incorporan el tinte a su interior, mientras que las muertas o no viables sí lo hacen.

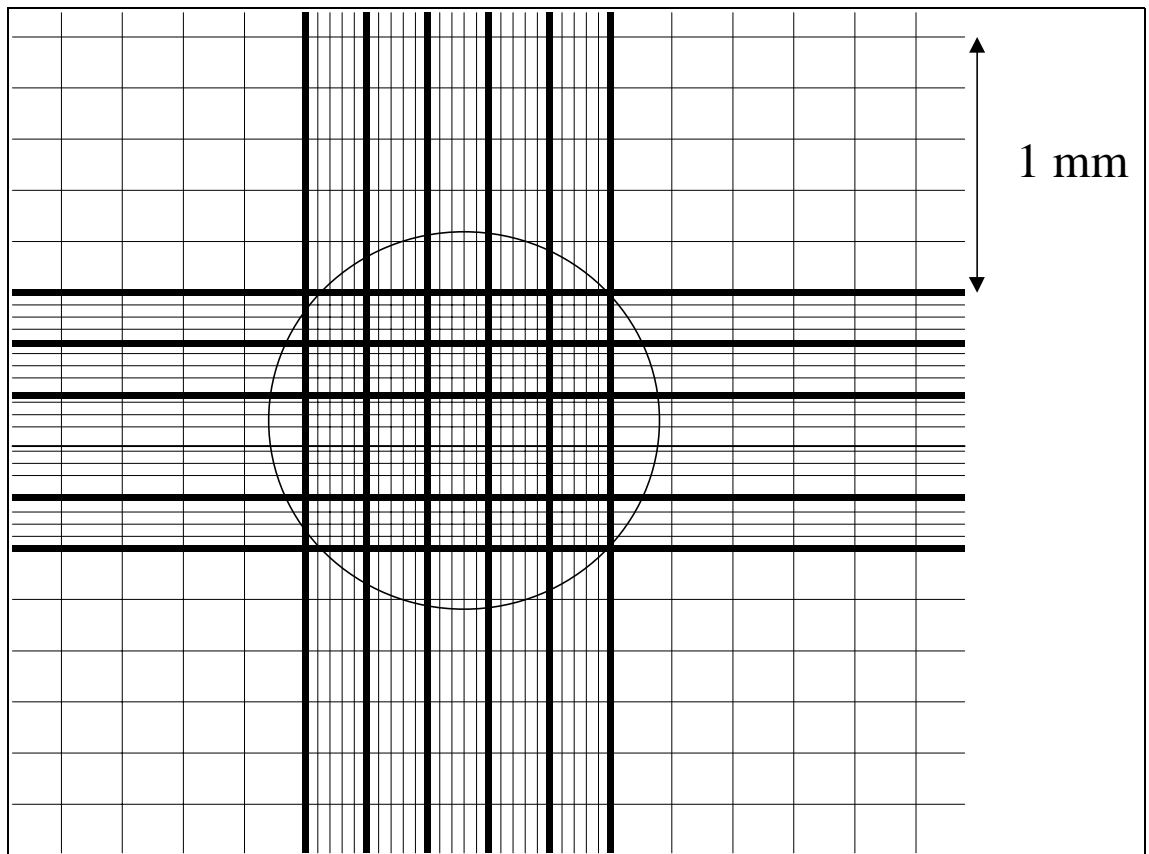


Fig. 3.1: Esquema descriptivo de un hemocitómetro

2.- Citometría de flujo

La citometría de flujo es un método analítico que permite estudiar propiedades celulares a partir de la medida de emisión de fluorescencia y dispersión de luz producidas por la iluminación de células expuestas individualmente y arrastradas por un flujo portador. Las células deben encontrarse en suspensión para permitir el paso una a una, lo cual supone una limitación para el empleo de la técnica. Asimismo, las células deben ser marcadas con moléculas fluorescentes (fluorocromos) capaces de excitarse con una fuente luminosa de alta energía, habitualmente luz láser.

Las posibilidades analíticas de esta técnica se han incrementado notablemente con el desarrollo de un amplio número de fluorocromos que se unen específicamente a moléculas celulares, se acumulan selectivamente en compartimentos celulares o

modifican sus propiedades a través de reacciones bioquímicas específicas. Así, la citometría de flujo es capaz de detectar y cuantificar estructuras y funciones de células individuales ó partículas biológicas aisladas de forma rápida y eficaz. La posibilidad de combinar diferentes moléculas fluorescentes permite realizar un análisis simultáneo de diferentes parámetros, lo cual supone una ventaja frente a otros sistemas de análisis celular.

Un citómetro de flujo está compuesto por diferentes sistemas básicos como se describe a continuación:

- Sistema hidráulico: Es el encargado de enfocar la suspensión celular para permitir el paso individual de células frente al haz de luz. Consiste en una cámara por la que circula un fluido en régimen laminar (para evitar mezclas) que envuelve a la suspensión celular y la mueve a velocidad constante a través de la zona de detección ó cámara de flujo. La diferencia de presiones entre la suspensión y la vaina o embudo formado por el fluido envolvente produce un efecto de enfoque hidrodinámico que reduce la sección de paso de la suspensión hasta 50-100 μm , logrando una cadena lineal de células a su paso frente a la fuente luminosa.

- Sistema de iluminación: Este sistema produce un haz de luz que ilumina la muestra. La fuente suele consistir en uno o más láseres. Aunque algunos sistemas emplean lámparas de arco (por ejemplo de mercurio o xenon), la luz láser presenta importantes ventajas. Se trata de una luz coherente, monocromática, estable y de intensidad conocida. El tamaño de spot o sección del rayo puede ajustarse al tamaño típico celular (5-50 μm) manteniendo las propiedades mencionadas. Por ello, resulta crítico el correcto alineamiento entre el haz láser y la cadena celular en el punto de intersección de ambos. El centro del haz láser debe estar orientado de forma que se logre la máxima intensidad de fluorescencia del fluorocromo presente en la célula.

Los citómetros actuales utilizan gran variedad de fuentes láser que recorren longitudes de onda del rango visible, desde fuentes de Argon (488 nm) hasta Helio-Neon (633 nm). La elección del láser empleado en un citómetro de flujo depende del tipo de análisis que se desee realizar y, en definitiva, del rango de excitación de los fluorocromos usados en dicho análisis.

- Sistema óptico: Su función es orientar y filtrar la fluorescencia y la luz dispersada por las células hacia los sistemas de detección para su posterior análisis. Éste sistema está formado por filtros que seleccionan las longitudes de onda de interés, y por espejos dicróicos, que seleccionan y orientan la luz hacia los detectores (Fig. 3.2).

Cuando la célula teñida con fluorocromos interacciona con el haz láser ocurren dos fenómenos independientes. Uno es la dispersión de la luz incidente en todas direcciones y con la misma longitud de onda, y el otro la emisión de fluorescencia (emisión de luz de menor energía, mayor longitud de onda) debida a la interacción entre el láser y los fluorocromos presentes en la célula. De la luz dispersada por la célula puede obtenerse información acerca de su tamaño y complejidad (rugosidad de superficie y estructura interna). La cantidad de luz dispersada en la dirección de incidencia del láser (“forward scatter”) es proporcional al tamaño de la célula si se supone una forma esférica y homogénea. Esta relación no es exacta ya que las células reales no cumplen estas condiciones. Por otro lado, se ha mostrado empíricamente que la cantidad de luz dispersada a 90° del haz incidente (“side scatter”) está relacionada con la rugosidad de la membrana citoplasmática y la estructura interna de la célula. Estas propiedades de dispersión que muestra la célula suelen denominarse propiedades intrínsecas, ya que pueden ser medidas sin necesidad de añadir fluorocromos.

La fluorescencia emitida por los fluorocromos presentes en la célula se debe a la absorción por éstos de la luz incidente y la posterior emisión de luz de mayor longitud de onda. Cada fluorocromo presenta un espectro de absorción/emisión propio, y por ello el sistema de filtros y espejos dicróicos resultan necesarios para seleccionar las longitudes de onda específicas según el tipo de análisis que se desee realizar.

- Sistema electrónico y de detección: Estos sistemas son los responsables de controlar variables como la intensidad y orientación del haz láser, y de detectar y amplificar las señales producidas por la dispersión y la fluorescencia. Los detectores suelen ser fotomultiplicadores, ya que al contrario de otro tipo de detectores como las células fotovoltaicas, permiten amplificar señales débiles.

- Sistema de adquisición y análisis de datos: Permite la adquisición multiparamétrica de datos y el análisis en tiempo real, así como el análisis restringido a subpoblaciones seleccionadas. Las diferentes presentaciones de los resultados dependen del tipo de programas informáticos empleados, siendo normalmente histogramas uniparamétricos o representaciones biparamétricas, junto con información estadística de las distribuciones.

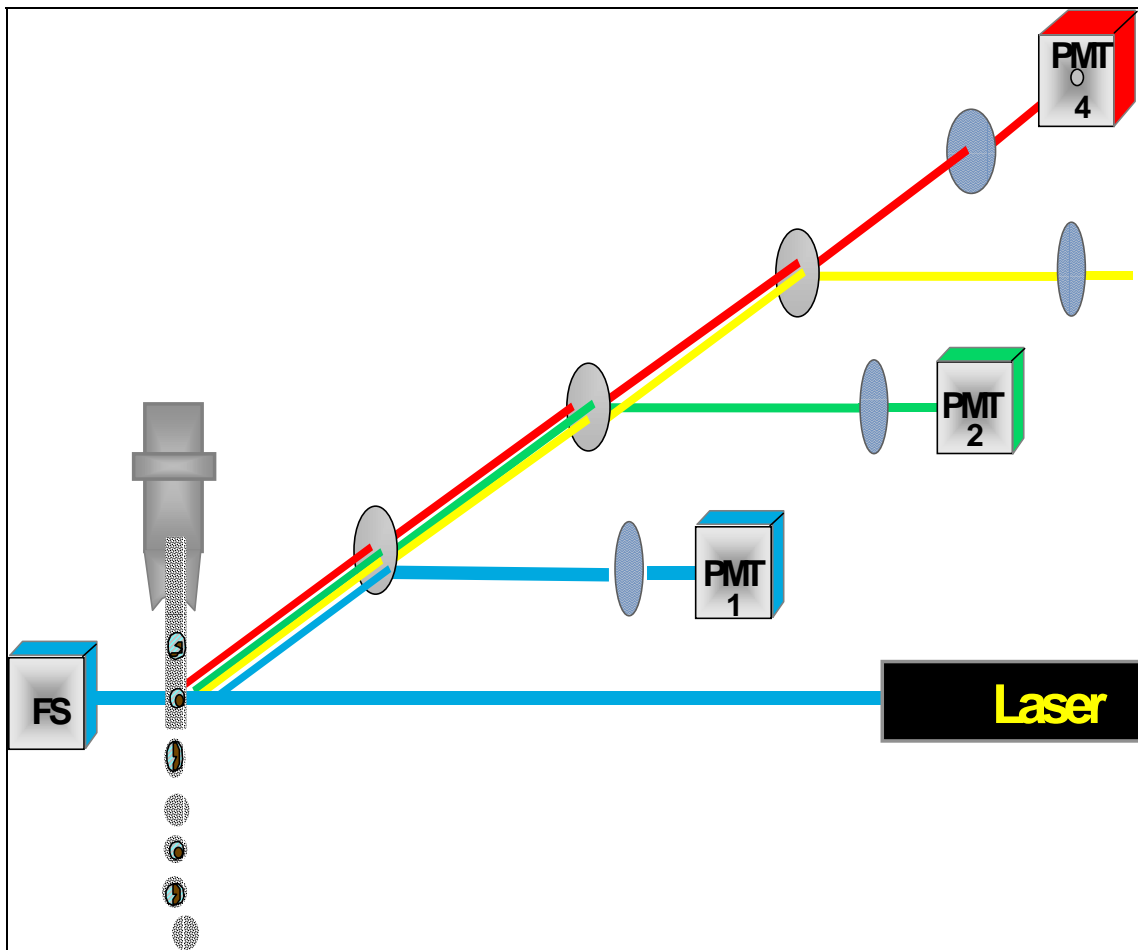


Fig 3.2: Esquema de un citómetro de flujo. Los PMTi son fotomultiplicadores destinados a detectar diferentes fluorescencias y el FS (forward scatter) detecta la luz no desviada tras atravesar la suspensión unicelular.

Análisis del ciclo celular y apoptosis

Como ya se ha señalado, la gran variedad de fluorocromos actualmente disponibles permite estudiar diversas características estructurales y funcionales de células en suspensión. En los experimentos realizados con radón y taxol se utilizó la citometría de flujo para analizar la cantidad de ADN presente en las células, y con ello, la fase del ciclo celular y el número de células muertas.

Generalmente, la cantidad de ADN se analiza para determinar la presencia de células aneuploides (con alteración del contenido en ADN) y el porcentaje de células en cada fase del ciclo celular. En cada una de estas fases, las células normales tienen una cantidad de ADN conocida. En la fase G_0 (reposo) y G_1 (presintética), la célula tiene un contenido diploide ($2n$) de ADN, correspondiente a 23 pares de cromosomas. Durante la fase S o de síntesis, la célula duplica su contenido en ADN convirtiéndose en tetraploide (paso de $2n$ a $4n$). En la fase G_2 o postsintética, y al inicio de la mitosis M la célula mantiene este doble contenido de ADN hasta que se divide en dos hijas de contenido diploide.

Para estudiar la ploidia de una población celular se emplea una población de referencia, con un contenido de ADN conocido, que sirve para identificar la posición del pico diploide en el histograma. En un histograma para estudiar el ciclo celular que represente la cantidad de ADN en una población celular habrá cuatro regiones bien definidas (Fig. 3.3). La región que se encuentra en los canales más bajos del espectro, llamada $subG_0$, corresponde a células con el ADN fragmentado, lo cual puede correlacionarse con una fase tardía de apoptosis. Al final de esta región se encuentra el pico G_0/G_1 correspondiente a células con contenido diploide de ADN. La siguiente región no muestra un pico, sino un intervalo de canales que corresponde a una cantidad de ADN variable entre $2N$ y $4N$. Esta región se asocia a células en diferentes etapas de la fase de síntesis S. Al final de ésta región se encuentra el pico G_2/M , situado en un canal doble del correspondiente al pico G_0/G_1 , ya que se debe a células tetraploides.

Existe una gran variedad de fluorocromos para realizar análisis de ADN. Y en todos los casos resulta necesario que la molécula fluorescente se una a la molécula de DNA estequiométricamente para poder relacionar directamente la cantidad de

fluorescencia medida con el contenido celular de ADN. El fluorocromo más utilizado para este tipo de estudios es el yoduro de propidio. Sus ventajas principales son la facilidad de uso, estabilidad y espectro de absorción/emisión, que le hace válido para la mayoría de citómetros de flujo. Se excita con luz entorno a los 480 nm (para lo cual resulta válido un láser de Argon-ion) y emite fluorescencia roja (entorno a los 620 nm). Las moléculas de yoduro de propidio se intercalan entre los pares de bases de los ácidos nucleicos, tanto del ADN como del ARN, por lo cual es necesario eliminar éste último por procesos enzimáticos si se quiere una determinación lo más exacta posible de la cantidad de ADN.

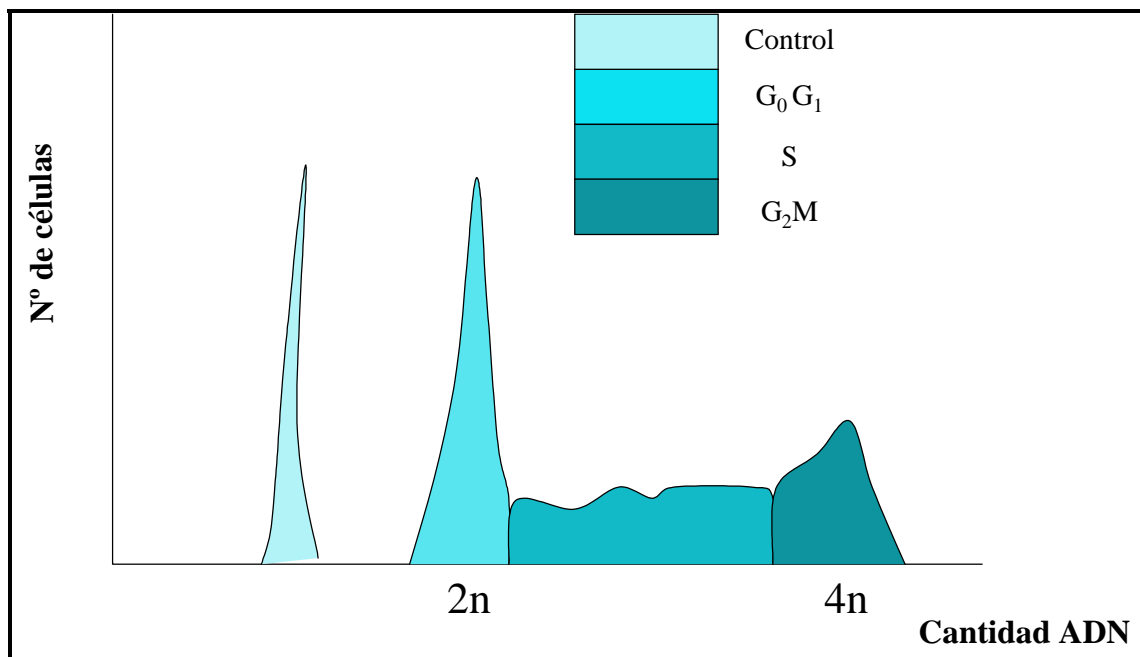


Fig. 3.3: Análisis del ciclo celular por citometría de flujo

3.- PCR

Para llevar a cabo el análisis de la expresión de genes relacionados con apoptosis se utilizaron dos técnicas complementarias: la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y la electroforesis en gel. A continuación se describen brevemente los principios de estas técnicas, así como los protocolos seguidos para su utilización en los experimentos presentados.

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es un procedimiento de síntesis enzimática de ADN in vitro, a partir de un molde cuya secuencia se conoce parcial o totalmente. La enzima usada es una ADNpolimerasa, que inicia la síntesis a partir de un “primer” o cebador de secuencia complementaria a uno de los extremos de la secuencia que sirve de molde. La PCR se distingue de otras técnicas de síntesis por la amplificación que puede producir, es decir, por la aplicación de ciclos repetidos que dan lugar a la síntesis de gran número de moléculas complementarias al molde. En muchas de las aplicaciones de la PCR se usan moldes cuya secuencia se conoce previamente. Partiendo de un molde de ARNm que se desee amplificar, la PCR se desarrolla usando como cebadores oligonucleótidos complementarios a secuencias situadas a ambos extremos de la secuencia diana. De este modo, la PCR permite sintetizar, a partir de una mínima cantidad de molde, cantidades relativamente grandes de la secuencia deseada, y proceder a continuación al análisis o uso experimental del producto.

Cuando se estudia la expresión de determinados genes los resultados obtenidos con PCR permiten un análisis semicuantitativo. Cuanto más expresado se encuentra un gen, mayor es la cantidad de RNAm correspondiente a la información codificada por dicho gen. De este modo, usando el molde adecuado (que contenga la información del gen que se desea estudiar) la magnitud de la expresión del gen vendrá indicada por la amplificación que la PCR produzca de su secuencia. El análisis es semicuantitativo en tanto que necesita el análisis simultáneo de un gen cuya expresión sea conocida, que actúe como control para cuantificar la expresión del resto.

4.- Electroforesis en gel

Para visualizar las diferencias en la expresión de genes se emplea la electroforesis en gel. Ésta es una técnica por la cual se separan biomoléculas según su carga eléctrica, peso molecular y estructura bajo la acción de un campo eléctrico. En principio, el parámetro esencial que determina la movilidad de la molécula en el campo eléctrico es su carga eléctrica. Sin embargo, determinados soportes como el gel de agarosa o poliacrilamida usados en nuestros experimentos, ofrecen una resistencia importante al avance de las moléculas, por lo cual la movilidad también depende del tamaño de la molécula. Las moléculas de ADN y ARN son por lo general demasiado grandes como para avanzar a velocidades notables a través de estos geles, por lo que la técnica se emplea para analizar fragmentos de éstas moléculas.

La agarosa y la poliacrilamida son polímeros cuyas disoluciones poseen la propiedad de permanecer líquidos por encima de 50°C y formar un gel semisólido al enfriarse. Estos geles están constituidos por una trama tridimensional de fibras poliméricas dentro de un medio líquido que retarda el paso de moléculas de ácido nucleico tanto más cuanto mayor sea la molécula. Al preparar el gel en un molde adecuado, se dejan en él unos huecos o pocillos para poder introducir luego en ellos la muestra. Así, esta se ve obligada a introducirse en el seno del gel cuando se aplica el campo eléctrico. Dado que la carga eléctrica de un ácido nucleico es proporcional a su longitud en nucleótidos, la electroforesis separa los fragmentos de ADN o ARN según su tamaño o longitud, expresado en nucleótidos (en el caso del ARN) o en pares de bases (en el caso del ADN).

Para visualizar las bandas formadas tras la exposición al campo eléctrico, se añade bromuro de etidio en la elaboración del gel. Esta molécula fluorescente se excita con luz ultravioleta, lo cual facilita el examen de las bandas. El bromuro de etidio se intercala en la estructura de doble hélice del ADN incrementando su rendimiento de fluorescencia con respecto a su disposición libre en el seno del gel. Esto permite distinguir pequeñas cantidades de ADN bajo luz ultravioleta aún en presencia de moléculas de bromuro libres en el gel.

5.- Secuenciación de ADN

La última etapa de los análisis genéticos es la secuenciación de los fragmentos correspondientes a los genes que se desean estudiar. Cualquier método de secuenciación comienza con una población compuesta por un fragmento definido de ADN marcado en su extremo. A partir de esta población, se genera un conjunto de moléculas cuyo tamaño difiere en una sola base en el extremo no marcado. Posteriormente, estas moléculas se fraccionan mediante electroforesis en geles de acrilamida, tras ser convertidos en moléculas de ADN de cadena sencilla. La movilidad de estas cadenas es inversamente proporcional al logaritmo de su longitud. Esta técnica es tan sensible que permite la separación de fragmentos cuya longitud difiere en un solo nucleótido. Para establecer la secuencia de nucleótidos, se determina la base que ocupa la última posición en el extremo truncado de las moléculas fraccionadas.

Protocolo de secuenciación

Para secuenciar un producto de PCR es necesario realizar varios pasos previos. Una vez que se ha amplificado correctamente el gen que estamos estudiando, hay que purificar el producto de la PCR para retirar el ADN añadido al principio, así como el resto de reactivos sobrantes (oligos, dideoxinucleótidos “dNTP’s”, DNAPolimerasa, etc...). Este proceso se lleva a cabo utilizando kits comerciales consistentes en una solución de resinas que se mezcla con el producto de PCR en una determinada proporción. A continuación, la mezcla se pasa por una columna que contiene una doble membrana de sílica donde la doble hebra de ADN queda atrapada. Los demás reactivos eliminan mediante varios lavados en una solución con alto contenido en alcohol.

A continuación, se realiza una variante de la PCR general llamada “PCR de secuencia”. En ella sólo se añade un oligo en lugar de dos, quedando uno de los extremos de la hebra libre. En este caso se añaden dNTP’s diferentes, ya que en este caso son una mezcla de dNTP’s normales y dideoxinucleótidos marcados con fluorocromos. Así, la DNAPolimerasa irá incorporando dNTP’s a las cadenas amplificadas hasta que se añada un dideoxinucleótido que, como no dispone de un extremo OH 3’, impide que la polimerasa continúe añadiendo más nucleótidos. De esta

forma, se obtiene un conjunto de cadenas que terminan en un dideoxinucleótido marcado con una molécula fluorescente, el cual al ser leído por el secuenciador va a indicar a éste de que base se trata. El programa de la PCR de secuencia es un programa especial con un primer paso de desnaturalización a 96 °C durante 10 s, hibridación a 50 °C durante 5 s y extensión a 60 °C durante 4 m.

Al terminar la PCR de secuencia es necesario precipitar la muestra para eliminar restos de reactivos y dideoxinucleótidos marcados para que no interfieran en la posterior lectura. Para ello se precipitan las muestras en presencia de cloruro de magnesio y etanol absoluto. Las muestras se centrifugan durante 20 m y, a continuación, se decanta y se lava el exceso de sales con etanol al 75 % y se vuelve a centrifugar durante 5 m a máxima velocidad.

Finalmente las muestras se preparan para ser analizadas en un secuenciador automático. Para ello, se resuspenden en un buffer específico denominado TSR (Template Suspension Reagent), recomendado por la casa comercial que distribuye el secuenciador automático. Tras una centrifugación breve, se desnaturalizan las muestras a 95 °C durante 3 m, se vuelve a centrifugar y se trasvasa a los tubos del secuenciador. En el secuenciador se realiza una electroforesis capilar de manera que es capaz de separar las cadenas de ADN obtenidas en la PCR de secuencia que se diferencian en una sola base. El láser va leyendo la secuencia según la longitud de onda que van emitiendo los fluorocromos, asociando cada longitud de onda a una determinada base nitrogenada. Los fluorocromos empleados en este protocolo fueron:

- R110 (azul) asociado a Citosina
- R6G (verde) asociado a Adenina
- TAMRA (amarillo) asociado a Guanina
- ROX (rojo) asociado a Timina