



Proyecto: Universidad de Sevilla

Centro: Departamento de Biología Celular. Grupo de Investigación Cultivo Celular y Radiobiología

Título del proyecto: Visualización de los efectos de la radiación sobre las células.

Investigadores participantes:

Inmaculada Domínguez García (idomin@us.es)

Nuria Pastor Carrillo (npastor@us.es)

Manuel Luís Orta Vázquez (morta2@us.es)

Santiago Mateos Cordero (smateos@us.es)

Número Máximo de alumnos que pudieran participar en el proyecto: 4

Necesidad de conocimientos previos del alumnado: Es recomendable que los alumnos tengan conocimientos básicos sobre la organización general de la célula eucariótica y el ciclo celular.

Hipótesis científica planteada: Demostración de la relación directa que existe entre daño cromosómico y letalidad celular.

Descripción del proyecto: El proyecto pretende mostrar con unos experimentos muy sencillos, que el material genético (el DNA de nuestros cromosomas) es el principal blanco en relación a la letalidad celular inducida por radiación.

Los experimentos se van a plantear con un modelo *in vitro* de cultivo celular.

Concretamente, vamos a utilizar la línea celular AA8 procedente de fibroblastos de ovario de hámster chino. Células creciendo en frascos de cultivo se irradiarán utilizando

un tubo de rayos X a diferentes dosis (0, 3, 6, 10 Gy) y posteriormente se aplicarán diferentes técnicas para la observación del efecto de la radiación ionizante sobre los cromosomas (ensayo de micronúcleos), así como para la observación del efecto de la radiación sobre la capacidad proliferativa de las células (ensayo clonogénico).

Finalmente mostraremos de forma gráfica, la relación existente entre la dosis de radiación administrada a las células y la proporción de células que sobreviven.

El proyecto permitirá al alumnado compartir tareas con un grupo de investigación que trabaja desde hace años en daño y reparación del ADN, en relación con la búsqueda de terapias innovadoras en la lucha contra el cáncer. En este sentido, actualmente estamos estudiando la eficacia de diferentes técnicas radioterápicas en combinación con inhibidores de la reparación del ADN. Discutiremos con los alumnos las investigaciones que actualmente estamos llevando a cabo, nuestro propósito es que ellos puedan visualizar de una manera clara, no solo los efectos nocivos de la radiación sino también la utilización de la misma en la terapia antitumoral.

Metodología

Material de trabajo e irradiaciones

Como material vamos a utilizar la línea celular AA8 procedente de fibroblastos de ovario de hámster chino. En cuanto a sus condiciones de cultivo, las células crecen en frascos de cultivo con medio esencial mínimo (MEM) suplementado con suero fetal bovino al 10%, L-glutamina 2 mM, y los antibióticos penicilina (50 U/ml) y estreptomina (50 µg/ml). Los cultivos crecen a 37 °C en oscuridad en una atmósfera con un 5% de CO₂ en el aire. La duración del ciclo celular es de aproximadamente 12h. Las células serán sometidas a diferentes dosis de radiación ionizante utilizando un equipo de rayos X modelo Philips MU 15F operado a 100 kilovoltios y una tasa de dosis de 1Gy/min.

Cuantificación del daño cromosómico inducido por radiación

Los micronúcleos son fragmentos de cromosomas o cromosomas enteros que no se incorporan al núcleo de las células hijas durante la mitosis, como resultado de roturas cromosómicas (clastogénesis) o defectos en el huso mitótico (aneugénesis). Presentan las mismas propiedades que el núcleo principal, y están envueltos por una envoltura

nuclear, aunque son de un tamaño mucho menor (Figura 1). Solamente las células que se han dividido pueden expresar los micronúcleos, por lo que esta técnica daría lugar a una estimación errónea del daño si no se identifican claramente las células que han sufrido un ciclo de división. Incluir células que se han dividido más de una vez puede resultar también en una estimación incorrecta del daño (Fenech y col., 1993). En este sentido, el método de bloqueo en citocinesis introducido por Fenech y Morley en 1985 ha mejorado notablemente la fiabilidad de la técnica.

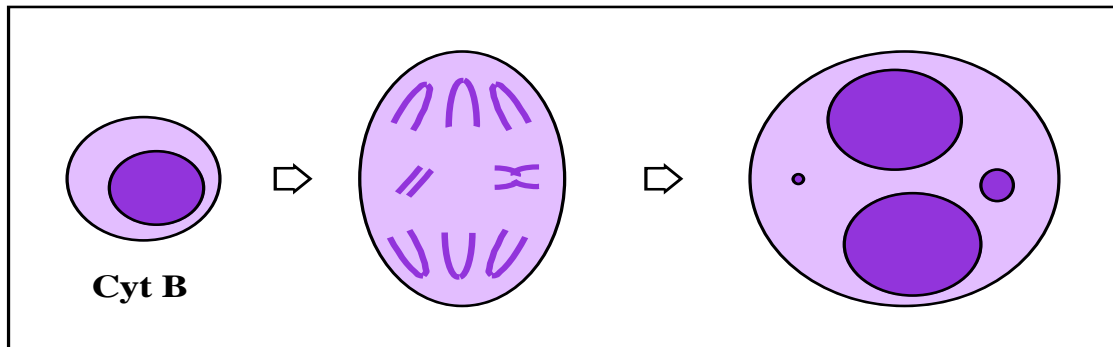


Figura 1. Origen de los micronúcleos. Los micronúcleos se originan a partir de cromosomas enteros o de fragmentos de cromosomas que no se incorporan al núcleo de las células hijas durante la mitosis. Las células que son tratadas con citocalasina B, y han dividido su núcleo una sola vez, aparecen como binucleadas. Los micronúcleos se cuentan solamente en estas células, evitándose así la estimación incorrecta del daño que supondría incluir en el recuento células que no se han dividido.

Para identificar las células que se han dividido una sola vez se bloquea la citocinesis con citocalasina B (Cyt-B). Esta droga, aislada del hongo *Helminthosporium dematoideum*, impide la polimerización de la actina necesaria para la separación de las células hijas tras la telofase, de manera que las células se muestran como binucleadas, lo que las hace fácilmente identificables con relación al resto de la población celular. Las células después de ser irradiadas a diferentes dosis de RX deben permanecer en citocalasina B al menos durante un ciclo celular. Posteriormente, se procede a la tripsinización de las mismas utilizándose 3 ml de tripsina por frasco de cultivo, incubación durante 5 minutos a 37°C y neutralización con 7ml de medio. Posteriormente, las células se resuspenden muy bien para evitar la formación de grumos, se recogen en tubos de plástico de 10 ml de fondo cónico y se centrifugan a 1200 rpm durante 6 minutos. A continuación se elimina el sobrenadante y el precipitado celular se resuspende con suavidad en una solución fijadora de metanol:ácido acético glacial recién preparada (3:1 v/v), en la que se mantienen a 4°C al menos 10 min., tras los cuales se vuelven a

centrifugar y se realiza una segunda fijación. El precipitado de la última centrifugación se resuspende en el volumen adecuado de fijador, se toman algunas gotas de la suspensión de células fijadas con una pipeta Pasteur y se vierten sobre portaobjetos de cristal humedecidos (4°C). Las preparaciones se dejan secar en cajas de madera sobre una placa calefactora a 37°C durante al menos 24 horas. La tinción se realiza con Giemsa (Merck) al 3% en tampón fosfato Sörensen (PO₄KH₂ 60 mM, PO₄Na₂H 60 mM, pH 6.8) durante 4-6 min. Una vez realizada la tinción, las preparaciones se dejan secar a 37°C y se ponen en definitivo, dándoles 2 pasos en Xilol antes de colocar los cubreobjetos con el medio de montaje DPX.

Ensayo de supervivencia celular

Las células en crecimiento exponencial son recolectadas mediante tripsinización, resuspendidas en medio completo y sembradas a las concentraciones adecuadas en placas de cultivo. Después de 2 horas de incubación, tiempo necesario para que las células se adhieran individualmente al fondo de la placa de cultivo, éstas se irradian y se incuban durante de 7 a 10 días en medio completo. Posteriormente, descartamos el medio y teñimos con azul de metileno al 2% en metanol. Finalmente, se descarta el medio, y las colonias con 50 o más células son contadas como células supervivientes. Es necesario realizar controles negativos (células sin tratar) en ambos ensayos.

Referencias

- French, M, Morley, (1985) A Measurement of micronuclei in lymphocytes. *Mutat. Res.* 47,29-36.
- French, M. (1993) the cytokinesis-block micronucleus technique and its application to genotoxicity studies in human population. *Environ.Helth. Perspect.* 101.101-107.
- Salmon S., Hamburger A. et al. Quantitation of differential sensitivity of human – tumor stem cells to anticancer drugs. *The New England Journal of Medicine* 1978; 298 (24): 1321–1327
- El ADN bajo el efecto del sol. *Investigación y Ciencia* Agosto 2012, n° 431
- Radiaciones ionizantes. *Investigación y Ciencia* Mayo 2011 n° 416
- Efectos biológicos de los rayos X de baja energía. *Investigación y Ciencia* Marzo 2012 n° 426.