

COGNOMS I NOM _____

PRÀCTICA 3

Els fàrmacs citostàtics restringeixen la proliferació de cèl·lules i per aquesta raó son capaços d'inhibir o impedir l'evolució de la neoplàsia, atès que actuen enfront de cèl·lules que es troben en un procés de divisió actiu.

Esteu treballant en un laboratori farmacèutic, on es desenvolupen agents antitumorals de nova generació. Per avaluar de manera rutinària el seu efecte citostàtic en cèl·lules humanes, es realitzen estudis toxicològics en cèl·lules cultivades *in vitro*. Les metodologies utilitzades inclouen el tractament de les cèl·lules amb el fàrmac durant unes 30 hores –temps necessari per a què es completi un cicle cel·lular que té una durada de 24 hores- i, posterior valoració de si les cèl·lules tractades aturen la seva proliferació. Cal esmentar que durant el cicle cel·lular es succeeixen múltiples esdeveniments, els quals als ser inhibits, poden o no, promoure l'aturada del cicle cel·lular i la proliferació de les cèl·lules.

Per determinar la capacitat antiproliferativa d'un nou fàrmac citostàtic, les cèl·lules tractades s'analitzen mitjançant diferents procediments, com ara:

- fer una anàlisi morfològica de les cèl·lules.
- avaluar el contingut de DNA de les cèl·lules en un citòmetre de flux.
- fer un estudi multiparamètric -en el citòmetre de flux- on s'avaluen conjuntament, i per cadascuna de les cèl·lules, el contingut de DNA i la presència de determinats marcadors de cicle cel·lular.

Les metodologies emprades, però, s'han de seleccionar amb cura per tal d'aconseguir un resultat fiable amb una mínima despesa econòmica.

OBJECTIU

Establir si 3 nous fàrmacs [B; C; D], sintetitzats per una empresa farmacèutica, tenen un efecte citostàtic i, per tant, poden ser utilitzats per restringir la proliferació de cèl·lules malignes.

QÜESTIONS

Part I

A les fotografies adjuntes es presenten quatre imatges de microscòpia òptica de camp clar (400x) que provenen de cultius de fibroblasts humans que corresponen a les següents situacions experimentals:

[A], sense tractar –CONTROL- on les cèl·lules proliferen de manera asincrònica.

[B, C i D], tractats amb els 3 fàrmacs sintetitzats que poden ser potencialment capaços de bloquejar les cèl·lules en un punt determinat del cicle cel·lular. Com a conseqüència, els cultius poden estar enriquits en cèl·lules aturades en alguna de les fases del cicle cel·lular (G1, S, G2 o M).

En tots els casos [A; B; C; D], les cèl·lules han estat fixades i tenyides amb colorants que permeten visualitzar el citoplasma i la cromatina de les cèl·lules.

Observeu les fotografies adjuntes i feu un recompte de cèl·lules interfàsiques i mitòtiques en cadascuna de les imatges. Analitzeu un mínim de cèl·lules per imatge. Anoteu els resultats en la següent taula:

	Nombre de cèl·lules			
	Control [A]	Fàrmac [B]	Fàrmac [C]	Fàrmac [D]
Cèl·lules Interfàsiques				
Cèl·lules Mitòtiques				
Total cèl·lules analitzades				

Qüestió 1. (0,8 punts). Calculeu l'índex mitòtic (*nombre de cèl·lules mitòtiques/ total de cèl·lules*), en cada cas.

Control [A]=

Fàrmac [B]=

Fàrmac [C]=

Fàrmac [D]=

Qüestió 2. (1,2 punts). Feu un dibuix de la morfologia de les cèl·lules que estan enriquides en les preparacions tractades amb els fàrmacs.

[B]

[C]

[D]

Qüestió 3. (1,8 punts). Creieu que l'anàlisi morfològica us permet determinar si els fàrmacs B, C i D aturen les cèl·lules en alguna fase concreta del cicle cel·lular i, per tant, esbrinar de forma segura que el fàrmac té un efecte citostàtic?

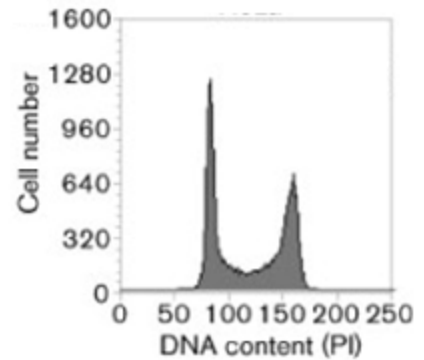
En la següent taula responeu a la pregunta i raoneu, en cada cas, el per què de la vostre resposta.

	SI/NO	Fase(s) del cicle cel·lular on es bloquegen les cèl·lules	Breu Justificació
[B]			
[C]			
[D]			

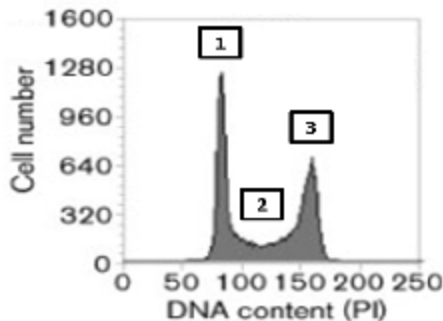
Part II

Una forma ràpida i potser més acurada d'analitzar en quina fase del cicle cel·lular es troben les cèl·lules d'un cultiu és mitjançant citometria de flux. El citòmetre, és un aparell que analitza la intensitat de la fluorescència emesa per cèl·lules tenyides amb una molècula fluorescent. Si les cèl·lules es tracten amb un colorant fluorescent que s'uneix al DNA, la quantitat de fluorescència es correspondrà amb la quantitat de DNA que hi ha a la cèl·lula.

Quan un cultiu asincrònic de cèl·lules s'incuba breument amb una molècula fluorescent que tenyeix específicament el DNA com el iodur de propidi (PI), i després se separen les cèl·lules en un citòmetre de flux en funció de la quantitat de fluorescència que emeten, s'obté un perfil com el que es mostra a la figura de la dreta. En l'abscissa es mostra la quantitat de DNA en funció de la fluorescència emesa i en l'ordenada, el nombre de cèl·lules.



Qüestió 4. (0,8 punts). Indiqueu en la taula següent a quina(es) fases del cicle cel·lular (G1; S; G2 i M) es corresponen els números 1, 2 i 3 en el perfil del citòmetre de flux obtingut a l'analitzar les cèl·lules d'un cultiu asincrònic incubat amb iodur de propidi.



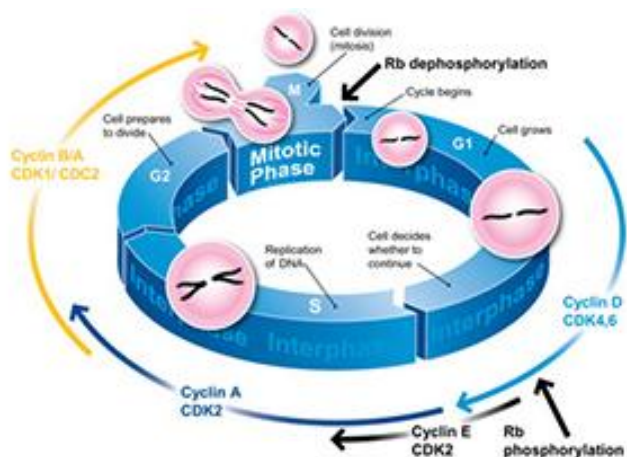
	Fase(s) cicle cel·lular
1	
2	
3	

Qüestió 5. (1,8 punts). En un segon experiment, després d'unes 30 hores de tractament amb els diferents fàrmacs [B;C;D], teniu les cèl·lules amb iodur de propidi i les analitzeu en un citòmetre de flux. Creieu que els perfils que s'obtidrien us donarien la informació necessària per acabar d'establir si les cèl·lules tractades amb els fàrmacs s'aturen en un punt concret del cicle cel·lular? Responen la pregunta i raoneu la resposta en la següent taula:

	Fàrmac [B]	Fàrmac [C]	Fàrmac [D]
SÍ/NO			
Per què?			

Part III

Les ciclines són una família de proteïnes involucrades en la regulació del cicle cel·lular. De fet, les ciclines formen complexos amb cinases dependents de ciclines (CDKs). Aquests complexos fosforilen diverses proteïnes diana, permeten el pas d'una fase del cicle cel·lular a l'altra. Com s'observa a la figura, existeixen diferents tipus de ciclines que són presents en les diferents fases del cicle cel·lular de forma específica.



La citometria de flux pot ser també emprada per fer anàlisis multiparamètrics. Es a dir, permet analitzar la presència de diferents marcadors de manera simultània en una mateixa cèl·lula i relacionar-los gràcies a la utilització de diferents molècules fluorescentes que emeten a diferents longituds d'ona. Per exemple, si prèviament a la tinció amb iodur de propidi (PI) es tracten les cèl·lules amb anticossos monoclonals marcats amb molècules fluorescentes, es pot avaluar per a cada cèl·lula la quantitat de DNA (emissió corresponent al iodur de propidi) que conté i la presència d'antígens determinats (emissió corresponent als anticossos marcats).

Qüestió 6. (1,8 punts). Creieu que és absolutament necessari fer un doble marcatge, amb iodur de propidi (PI) i alguna ciclina concreta, per determinar de forma fefaent si algun dels diferents fàrmacs analitzats [B;C;D] bloqueja les cèl·lules en una fase concreta del cicle cel·lular? Considereu que utilitzar un doble marcatge implica un procediment metodològic més llarg i que alhora és molt més car.

En la següent taula responeu la pregunta, indicant el per què de la vostra resposta i també quina ciclina concreta utilitzaríeu en cas de resposta afirmativa.

		Fàrmac [B]	Fàrmac [C]	Fàrmac [D]
SI/NO				
Quina ciclina utilitzaríeu?	Ciclina A			
	Ciclina B			
	Ciclina D			
	Ciclina E			
Per què?				

Qüestió 7. (1,8 punts). En la següent taula es llisten una sèrie d'inhibidors utilitzats habitualment per bloquejar algun dels processos que es succeeixen durant la divisió de les cèl·lules eucariotes humanes, així com el seu mecanisme d'acció.

Completeu la taula tot indicant

- Quin procés cel·lular es bloqueja en cada cas.
- En quina fase del cicle cel·lular es bloquejarien les cèl·lules, si és el cas.

- Si hi ha algun mecanisme d'acció d'aquests inhibidors que pugui ser compatible amb els resultats que heu obtingut de l'anàlisi de les vostres preparacions prèviament tractades amb els fàrmacs.

Inhibidor	Mecanisme d'acció	Procés bloquejat	Fase del cicle cel·lular bloquejada	Compatible amb fàrmac[B][C][D]
Nocodazol	Inhibició polimerització de microtúbuls			
Citocalasina B	Inhibició polimerització microfilaments d'actina			
Afidicolina	Inhibició DNA polimerasa α i δ			
Mimosina	Inhibició de la síntesi de nucleòtids			