

## Método de selección de células en distintas fases del ciclo mitótico

J. Rigau-Lloveras, M. R. Grau-Oliete y M. P. Rivera-Fillat

Instituto de Farmacología  
del Centro de Investigación y Desarrollo  
de Barcelona (C.S.I.C.)  
Barcelona-34 (España)

(Recibido el 29 de julio de 1983)

J. RIGAU-LLOVERAS, M. R. GRAU-OLIETE and M. P. RIVERA-FILLAT. *Method for Selection of Cells Under Various Phases of the Mitotic Cycle*. Rev. esp. Fisiol., 40, 87-94. 1984.

Exponentially growing L5178Y cells in suspension culture were separated according to their position in the cell cycle on the basis of their volume with a velocity sedimentation method in which a linear and continuous ficoll gradient was used.

Highly purified populations of G1 and S cells were obtained, containing about 90 % G1 phase cells and 80 % S phase cells. The method is rapid and a larger number of cells can be easily processed with no loss of viability.

**Key words:** Cell selection, Cell cycle, L5178Y.

En estudios que requieren grandes cantidades de células en fases específicas del ciclo vital, se han utilizado métodos de sincronización que bloquean el tránsito de las mismas en determinadas fases del ciclo por adición de agentes citostáticos (6). Estos tratamientos, además de producir células en una sola fase, modifican el equilibrio bioquímico intracelular y generalmente alteran las características de proliferación de las células una vez liberadas del bloqueo (7).

Se han obtenido también cultivos celulares sincrónicos mediante selección mitótica (13) que, aprovechando que las células que crecen en monocapa se liberan

del substrato de cultivo durante la mitosis, las seleccionan en esta fase por simple agitación periódica del cultivo. Este método, además de ser útil únicamente para cultivos en monocapa, tiene el inconveniente de su bajo rendimiento.

Finalmente, otros métodos se basan en el crecimiento lineal y continuo del tamaño celular durante el ciclo mitótico (13) y seleccionan las células según su volumen ya sea por elutriación, que permite obtener fundamentalmente poblaciones de células seleccionadas en fase G1 (5) o por sedimentación diferencial a través de un gradiente sometido a un campo gravitacional. Puesto que la velo-

cidad de sedimentación separa las células primariamente en base a su volumen (4), estas técnicas pueden ser útiles para el fraccionamiento de una población celular en crecimiento exponencial y separar simultáneamente células en todas las fases del ciclo.

La necesidad de obtención de una cantidad suficiente de linfoblastos leucémicos L5178Y en distintas fases, que no hayan sufrido alteraciones en sus características de proliferación y metabolismo, obliga a la búsqueda de un sistema de selección que cumpla esos requisitos y sea aplicable a células que crecen en suspensión como es el caso de la línea L5178Y.

EVERSON *et al.* (2) utilizaron gradientes de ficoll para separar células linfoblastoides humanas que crecen en cultivo. Tomando como punto de partida esos trabajos y puesto que se ha comprobado que estas células crecen de una manera uniforme a lo largo del ciclo vital doblando su volumen en el transcurso del mismo, se ha puesto a punto un método de selección de linfoblastos leucémicos de ratón L5178Y que permite obtener cantidades considerables de células en fases S y G1 en condiciones que facilitan la realización de estudios bioquímicos posteriores. La validez del método se ha establecido en base a su capacidad resolutive, reproductividad y rendimiento en células que encontrándose en una misma fase del ciclo vital no hayan sufrido alteración de la viabilidad ni de sus características de crecimiento.

### Material y métodos

*Características celulares.* Los linfoblastos leucémicos de ratón L5178Y fueron obtenidos por FISCHER y SARTORELLI (3) en 1964. Esta línea celular presenta un tiempo de duplicación de  $12 \pm 2$  h, con los siguientes parámetros de ciclo: G1-21,8%, S-66,3%, G2-8,3% y M-3,6%.

Estas células crecen en suspensión en medio de cultivo Fischer (Gibco, Biocult, Glasgow Scotland, Fischer's Medium 173G; 10X) suplementado con un 10 % de suero de caballo, a 37° C y en la cavidad abdominal de ratones BDF1 (C57BL/6  $\times$  DGA2). Presentan además la particularidad de formar colonias macroscópicas en agar semisólido.

*Preparación de las suspensiones celulares.* Las células se aíslan del líquido ascítico de ratón BDF1, 10 días después de la inoculación i.p. de  $2 \times 10^6$  células, se lavan con NaCl 0,85 % y centrifugan a 1.000 g durante 7 minutos. Los hematíes contaminantes son eliminados mediante lisis hipotónica (11) y la integridad celular se controla mediante el test de exclusión de colorante con eosina-Y (0,2 % durante 10 min a temperatura ambiente) (10).

*Preparación de los gradientes y separación de las células.* Se prepara una solución concentrada de ficoll (ficoll 400, Pharmacia Fine Chemicals) en agua destilada (40 % peso/peso), a partir de la cual se obtiene una al 20 % peso/peso por dilución en solución Hanks (BBS) de doble concentración salina (570-580 mosmol), mientras que las diluciones sucesivas se preparan con Hanks isosmolar. Los gradientes de ficoll de 80 ml, lineales y continuos, del 5-15 % y del 5-20 % peso/peso, se preparan en tubos cilíndricos de cristal de 3 cm (diámetro) por 10,5 cm (largo) valorándose la linealidad de los mismos por el índice de refracción en un refractómetro Bausch y Lomb. Sobre cada gradiente se estratifican 5 ml de ficoll al 5 %, para modificar la pendiente inicial de los mismos y poder aplicar mayor número de células (2).

Sobre los gradientes se depositan 5 ml de la suspensión celular en Hanks que contiene un máximo de  $5 \times 10^7$  células totales e inmediatamente se centrifugan a 4° C en una centrifuga MSE (Mistral 2L)

usando rotor oscilante. La velocidad del rotor y el tiempo de centrifugación varían en las distintas pruebas realizadas estableciéndose finalmente en 200 g durante 6 min, en función de los resultados preliminares obtenidos.

Las distintas fracciones se recogen desde el fondo a la superficie del gradiente a través de un tubo de acero inoxidable (2 mm de diámetro por 20 cm de longitud) cuidadosamente introducido por el centro del mismo. En cada fracción se determina el número de células, volumen corpuscular medio de índice mitótico, y se identifican las células en fase S mediante la valoración de la incorporación de timidina tritiada (3H-TdR) por centelleo líquido y autorradiografía.

#### *Contaje celular y análisis del volumen.*

El número de células presentes en cada fracción se determina en un contador electrónico de partículas Coulter Counter modelo DN con 100  $\mu$  de diámetro de apertura, cuyo umbral de conteo se gradúa para eliminar partículas menores de 2  $\mu$  de diámetro.

La distribución del volumen celular se valora con un analizador multicanal Coulter (modelo TAI con 14 canales) que permite conocer el volumen corpuscular medio en cada fracción.

*Análisis de la viabilidad celular.* La integridad celular se controla por el test de exclusión de eosina-Y (0,2 %) (10) y la viabilidad y características de proliferación mediante cultivos en suspensión en medio Fischer suplementado con un 10 % de suero de caballo, lo cual permite valorar el tiempo de duplicación de las células.

*Caracterización de la sincronía celular.* Se emplearon distintos métodos para analizar el grado de sincronía de las células presentes en las diferentes fracciones obtenidas de los gradientes.

**Índice mitótico:** las células en fase de mitosis se contabilizan en frotis celulares teñidos con orceína acética. Para ello, las preparaciones fijadas con solución Carnoy (acético-metanol, 3:1), se tiñen durante 20 minutos en una solución al 2 % de orceína acética a 30° C, se lavan una vez con ácido acético al 50 % durante 3-4 segundos y otra con etanol al 95 % durante 5 segundos, dejándolas secar al aire. Las células son examinadas por microscopía óptica y se establece el porcentaje de células en metafase, anafase y telofase como medida del «índice mitótico».

**Incorporación de 3H-TdR:** para localizar las células que sintetizan ADN, se marcan con 3H-TdR antes de depositarlas sobre el gradiente. La población en crecimiento exponencial se resuspende en Hanks ( $1 \times 10^8$  cel/10 ml) conteniendo 5  $\mu$ Ci/ml de 3H-TdR y se incuba a 37° C con agitación suave. Transcurridos 30 minutos, se lava 3 veces con Hanks y se resuspende en 5 ml de dicho medio a una proporción de  $1 \times 10^7$  cel/ml.

La radiactividad incorporada en fracción insoluble en ácidos se mide mediante centelleo líquido en un Liquid Scintillation Counter (Beckman LS-250) tras su precipitación en frío con ácido tricloroacético (TCA) 0,5 N (2 X, 20 minutos) y digestión a 70° C con TCA (7 %).

El porcentaje de células en fase S presente en cada fracción del gradiente, se determina por técnicas autorradiográficas (9), mediante la técnica del «Striping film» usando película AR-10 de Kodak y 15 días de exposición, transcurridos los cuales se revelan las preparaciones y se tiñen con orceína acética para su estudio microscópico posterior.

## Resultados

Se llevaron a cabo experiencias preliminares para establecer las condiciones del gradiente que permitieran obtener un

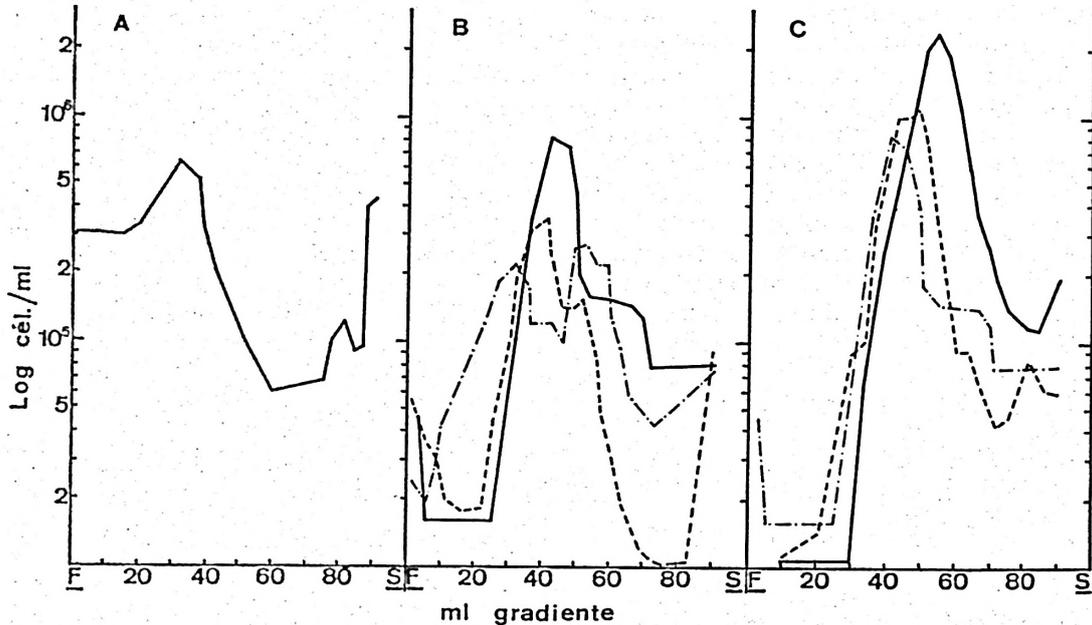


Fig. 1. Distribución celular en gradientes de ficoll.

A: gradiente del 5-15 % peso/peso aplicando  $5 \times 10^7$  cél. y centrifugando 25 minutos a 80 g ( $4^\circ$  C). B: del 5-20 % peso/peso aplicando  $2 \times 10^7$  cél. y centrifugando 25 minutos a 80 g (— · —), 6 minutos a 200 g (—) y 11 minutos a 200 g (—) ( $4^\circ$  C). C: centrifugando 6 minutos a 200 g ( $4^\circ$  C) en gradientes del 5-20 % peso/peso y aplicando  $2 \times 10^7$  cél. (— · —),  $4 \times 10^7$  cél. (— —) y  $5 \times 10^7$  cél. (—). F = fondo del gradiente; S = superficie.

número elevado de células viables en fases específicas del ciclo celular.

Se probaron gradientes lineales y continuos de ficoll del 5-15 % y del 5-20 % peso/peso en distintas condiciones de sedimentación y variando el número de células totales aplicadas (fig. 1). En todos los casos se encontró un ligero acúmulo de células en la superficie del gradiente y el resto repartidas a lo largo del mismo. La separación mejor se obtuvo con gradientes del 5-20 % peso/peso, aplicando 200 g durante 6 minutos a  $4^\circ$  C y una carga de  $5 \times 10^7$  células. En este caso, como se observa en la figura 1C, la distribución celular a través del gradiente muestra un pico bien definido con el valor máximo a los 54 ml (10,8 % ficoll). El grado medio de recuperación alcanzado es del 80% de las células aplicadas.

*Distribución del volumen celular y del marcaje radiactivo en el gradiente.* Se ha comprobado que el volumen corpuscular medio en cada fracción aumenta paralelamente con la concentración de ficoll en el gradiente (fig. 2). Estos resultados demuestran que la separación se basa realmente en el tamaño celular y por lo tanto en el estado proliferativo dentro del ciclo, ya que existen claras evidencias de un incremento paulatino del volumen de las células L5178Y a medida que su posición en el ciclo mitótico avanza (1).

Las células que sintetizan ADN, indetectables por la incorporación de  $^3\text{H-TdR}$  en el mismo, se localizan en el centro del gradiente (fig. 3) siguiendo un pico de distribución bien definido y ligeramente desplazado hacia el fondo del mismo, en relación con el pico de distribución celular.

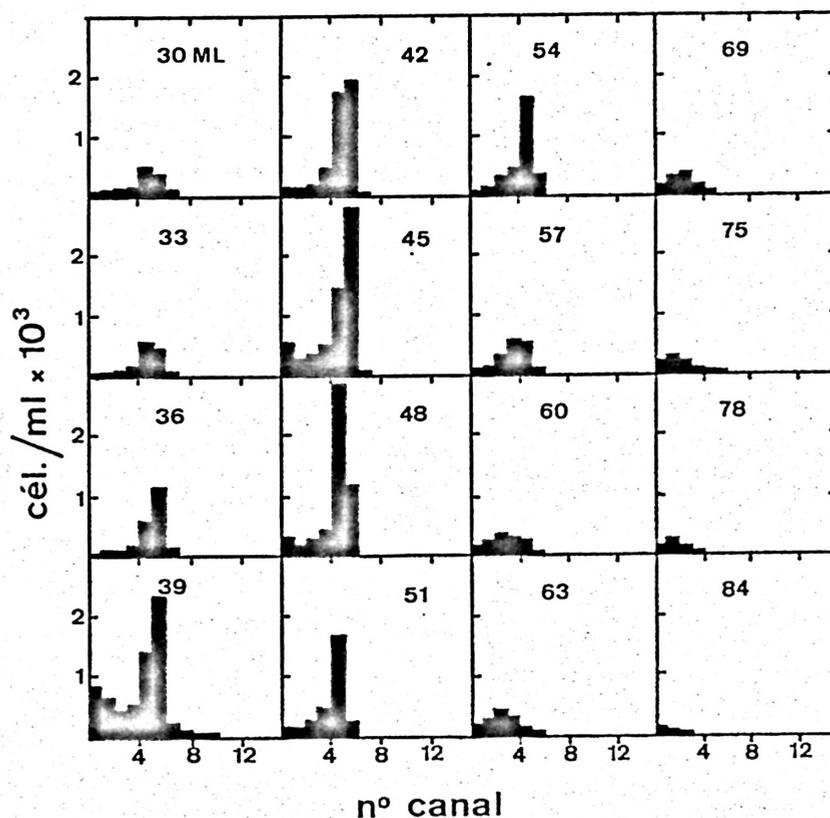


Fig. 2. Distribución de los volúmenes celulares de cada fracción del gradiente (ml) distribuidos en 14 canales (Coulter Counter modelo TAll).  
 Volumen celular ( $\mu^3$ ) =  $32 \times 2^{n.º \text{ canal}}$ .

La curva de distribución de células marcadas con <sup>3</sup>H-TdR controlada por autorradiografía sigue paralela al marcaje global estimado por centelleo líquido (figura 3). Ambos picos muestran que las células en fase S pueden ser fácilmente localizables y separadas de las que no sintetizan ADN.

En la región de menor concentración de ficoll en el gradiente se localizan las células más pequeñas (fase G1), mientras que las que están en fase G2 se aíslan en la zona de mayor concentración.

La distribución descrita se mantiene constante en todas las experiencias realizadas y proporciona una pauta para la

recolección de las fracciones enriquecidas en células que se encuentran en una misma fase del ciclo. Se recogen tres fracciones, la primera de 38 ml que incluiría las células en fase G2; la segunda, correspondiente a células en fase S, cuyo límite se establece en el mililitro siguiente al máximo en la curva de distribución celular, y la tercera, hasta un volumen total de 22 ml, corresponde a células en fase G1. Descartamos los mililitros finales del gradiente (13 ml) por contener, en la mayoría de los casos, restos de células de la población inicial que adheridos a la pared del tubo descenden, junto con algunos eritrocitos contaminantes a medida que se

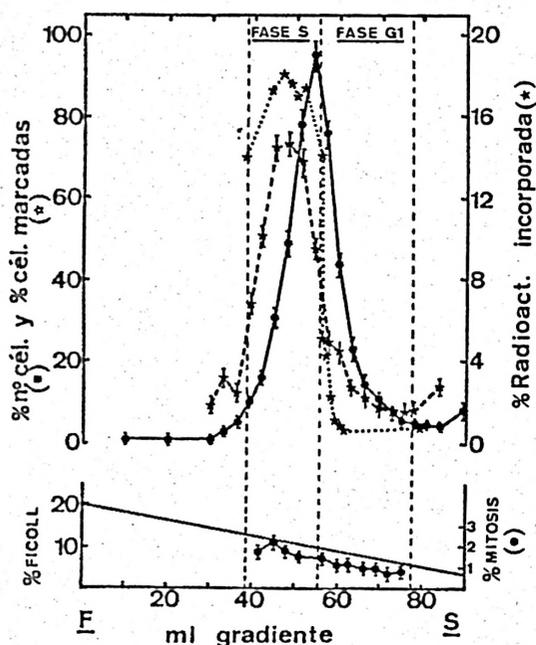


Fig. 3. Distribución del marcaje radiactivo, incorporación de  $^3\text{H-TdR}$  en célula total, autorradiografía ( $\star\cdots\star$ ); distribución celular en el gradiente ( $\star\text{---}\star$ ); linealidad del mismo en de ficoll ( $\text{---}$ ) y distribución de células mitóticas a lo largo del gradiente ( $\bullet\text{---}\bullet$ ).  
F = fondo; S = superficie.

va llevando a cabo la extracción de fracciones.

**Control de pureza de las fracciones.** Los resultados de las autorradiografías, la determinación del índice mitótico y el examen microscópico, se usaron para evaluar la pureza de las fases celulares obtenidas (fig. 3).

El test de exclusión de colorante se usó para valorar la presencia de células dañadas y de grumos celulares en cada fracción, mostrando que la zona inferior del gradiente, que contiene muy pocas células, incluye además de las que están en G2 algunas poliplodes y grumos celulares que contribuyen a reducir la pureza de la

fracción, razón por la que ésta se desecha.

El índice mitótico de las fracciones individuales se determinó en preparaciones teñidas con orceína, comprobándose que las células mitóticas no se localizan selectivamente en ninguna región; sin embargo, la contaminación que producen en otras fases es del orden del 5 %.

La autorradiografía permite por un lado controlar la contaminación por células en fase S de la fracción que recoge la fase G1 y por otro, conocer qué proporción de células, que no sintetizan ADN, se separan con la fracción S (fig. 3). Los resultados obtenidos indican que la fase S tiene un porcentaje de pureza del 95 % y que la contaminación de la fase G1 con células en S representa un 8,5 %.

**Viabilidad de las células después de su separación en los gradientes.** La integridad y estado metabólico de la célula valorados por la capacidad de exclusión de eosina-Y, resultó ser tan sólo del 8,5 % en células recién extraídas del gradiente, en comparación con el 80 % observado para las células control no sometidas a selección. Después de 30 min de incubación en medio de cultivo a  $37^\circ\text{C}$ , las células seleccionadas presentan valores similares a los controles.

La viabilidad se determinó siguiendo las características de crecimiento de células en cultivo sometidas a las condiciones del método de selección y comparándolas con la población original. El tiempo de duplicación fue el mismo para ambas poblaciones si se atemperaban las células seleccionadas durante 30 minutos a  $37^\circ\text{C}$ , antes de su siembra.

Por lo tanto, los ligeros efectos producidos por el método de selección sobre la viabilidad y metabolismo celular (efecto osmótico, frío, composición del gradiente, etc.) son fácilmente subsanables tras este corto período de recuperación en medio de cultivo, presentando la población resultante idénticos parámetros

de crecimiento que las células control y siendo, de este modo, utilizables para posteriores estudios bioquímicos.

### Discusión

El aumento progresivo de volumen que experimentan los linfoblastos leucémicos L5178Y al ir avanzando hacia una nueva división celular, ha permitido separar simultáneamente poblaciones de estas células que se encuentran en fases S y G1, mediante centrifugación de la población exponencial en un gradiente de ficoll.

Aunque la sustancia base del gradiente produce una ligera disminución del volumen celular a las concentraciones utilizadas, este hecho no altera la colocación de las células en el mismo después de la centrifugación, como se comprueba por su distribución en un pico bien definido. El volumen corpuscular medio de las células en cada fracción guarda una relación directa y lineal con la concentración de ficoll respectiva. Esto indica que el ligero efecto osmótico observado no modifica la resolución final del método de selección, hecho que se ve confirmado por la buena separación que se obtiene entre las distintas fases aisladas.

Por otra parte, la permanencia de las células en el medio de selección no modifica sus características de proliferación siempre que se hayan atemperado durante 30 minutos a 37° C antes de su cultivo, ya que se ha comprobado que las bajas temperaturas a las que se trabaja producen un enlentecimiento del metabolismo celular que requiere ese tiempo para normalizarse (12).

Se recupera un 80 % de las células aplicadas, siendo el rendimiento en las fases S y G1 de un 44,7 % y un 30,6 % respectivamente, lo que hace al método muy útil para la selección de poblaciones celulares en esas fases del ciclo, especialmente si se tiene en cuenta la pureza de las mismas que oscila entre un 80 y un 90 %.

La fuente más importante de contaminación procede de las células en mitosis (del orden del 5 %), que se distribuyen en el gradiente de una manera uniforme, no selectiva, debido a que en esta fase se modifica la densidad celular, con lo que se alteran sus propiedades de sedimentación en el gradiente impidiendo su selección (12).

El bajo rendimiento del método en células que se encuentran en fase G2 se debe fundamentalmente a la escasa proporción de las mismas en la población exponencial; este hecho, junto con la contaminación de esta fracción por la presencia de células poliploides, inutiliza el método para la selección directa de células en esa fase del ciclo.

Una ventaja que aporta el método es la rapidez de su ejecución que limita los daños ocasionados a las células por la manipulación prolongada de las mismas y reduce la posibilidad de su progresión a través del ciclo mitótico durante el proceso de selección, con lo que se garantiza una mayor pureza de las fracciones.

### Resumen

Se describe un método de selección de poblaciones celulares que se encuentran en distintas fases del ciclo mitótico, aplicable a suspensiones de células esféricas cuyo volumen aumenta de una manera uniforme en su tránsito a través del ciclo.

El método, basado en la centrifugación de la población celular en crecimiento exponencial a través de gradientes continuos de ficoll, permite aislar linfoblastos leucémicos de ratón L5178Y en fases S y G1 con una pureza del 80 % y 90 % respectivamente. Su realización es rápida y permite la separación del 80% de las células totales aplicadas sin pérdida de su viabilidad.

### Bibliografía

1. ANDERSON, E. C., BELL, G. F., PETERSEN, D. F. y TOBEY, R. A.: *Biophys. J.*, 9, 246-253, 1969.
2. EVERSON, L. K., BUELL, D. N. y ROENTINE,

- G. N.: *J. Exp. Med.*, 137, 343-358, 1973.
3. FISCHER, F. A. y SARTORELLI, A. C. I.: *Methods Med. Res.*, 10, 247-253, 1964.
  4. McDONALD, H. R. y MILLER, R. G.: *Biophys. J.*, 10, 834-842, 1970.
  5. MEISTRICH, M. L., MEYN, R. E. y BARLOGIE, B.: *Exp. Cell. Res.*, 105, 169-177, 1977.
  6. NIAS, A. H. W. y FOX, M.: *Cell Tissue Kinet.*, 4, 375-398, 1971.
  7. OOKA, T.: *Biochimie*, 58, 1135-1139, 1976.
  8. RIVERA, M. P., RIGAU, J., GRAU, M. R. y VALDECASAS, F. G.: *7th Intern. Congress of Pharmacol. (IUPHAR)*, París, 1978, n.º 177, n.º 177.
  9. ROGERS, A. W.: En «Techniques of autoradiography». Elsevier, Amsterdam, 1969, p. 240.
  10. ROPER, P. R. y DREWINKO, B.: *Cancer Res.*, 36, 2182-2188, 1976.
  11. SCHOLAR, E. M. y CALABRESI, P.: *Cancer Res.*, 33, 94-103, 1973.
  12. SKOG, S., ELIASSON, E. y ELIASSON, E.: *Cell Tissue Kinet.*, 12, 501-511, 1979.
  13. TERASIMA, T. y TOLMACH, L. J.: *Exp. Cell Res.*, 30, 344-347, 1963.