

SÍNTESI DE L'ADN I ESTUDIS CROMOSÒMICS

Comunicació presentada el dia 21 de març de 1968 per

M. RIBAS i MUNDÓ

Metge Col·laborador de l'Escola d'Hematologia de Barcelona (Prof. Pere Farreras i Valentí), i de la Clínica Mèdica Universitària de la Facultat de Medicina de Barcelona (Prof. Agustí Pedro i Pons)

El limfòcit perifèric té la propietat d'ésser estimulat «in vivo» i «in vitro» per molt diverses substàncies antigèniques. Ha estat comprovat experimentalment que la fitohemaglutinina és capaç d'estimular la síntesi de l'ADN i de provocar la divisió mitòtica dels limfòcits perifèrics cultivats «in vitro». De fet, el limfòcit petit és la cèl·lula fonamental dels fenòmens immunitaris. Això ha permès d'estudiar la dotació cromosòmica dels individus humans mitjançant els cultius «in vitro» de limfòcits estimulats per la fitohemaglutinina.

A la primera part d'aquesta comunicació exposarem les nostres investigacions sobre la síntesi de l'ADN en el nucli dels limfòcits, la qual síntesi és de fet, la fase prèvia a la divisió mitòtica. A la segona part resumirem els resultats dels estudis cromosòmics obtinguts en 254 casos estudiats per mitjà del cultiu de limfòcits «in vitro». Aquestes aportacions formen part de la nostra tesi doctoral.

I

SÍNTESI DE L'ADN. ESTUDI AUTORADIOGRÀFIC

Material i Mètodes. Els limfòcits perifèrics obtinguts per punció venosa i separats dels eritròcits per sedimentació són col·locats en un medi de cultiu 199 TC amb 20 % de sèrum humà i en presència de fitohemaglutinina. Sis hores abans d'acabar el cultiu, s'hi afegeix timidina radioactiva marcada amb triti a la dosi final d'un microcurie per ml. de cultiu. Al final del cultiu hom fixa les cèl·lules amb àcid acètic glacial i alcohol etílic, en proporció 1:3. Un cop suspeses les cèl·lules en el fixador, hom fa les extensions deixant caure dues o tres gotes de la suspensió celular sobre el porta, el qual s'asseca immediatament a la flama.

Autoradiografia. Fetes les extensions, hom col·loca una pel·lícula sensible a les radiacions β (Kodak stripping fil AR-10), i després de 14 dies de temps d'exposició, hom revela la preparació amb revelador D-19b Kodak i fixador àcid. Seguidament hom tenyeix les preparacions amb solució tamporada de Giemsa, al 5 %.

Resultats. La síntesi de l'ADN de la cromatina nuclear no segueix una evolució a l'atzar, sinó que presenta tres fases o patrons de síntesi ben definits per l'estudi autoradiogràfic, els quals no havien estat descrits prèviament.

A les 42 hores de cultiu, el 59 % de les cèl·lules que sintetitzen ADN, presenten un marcatge de timidina difús, distribuït uniformement per tot el nucli, tot deixant sense marcatge els nuclèols. Aquest patró de síntesi, l'hem denominat *nuclèol-negatiu*. El 38 % de les cèl·lules presenten un marcatge intens i difús que cobreix nucli i nuclèols. Aquest patró, el denominem *intermedi*. Tan sols en el 3 % de les cèl·lules que sintetitzen ADN, a les 42 hores de cultiu hom troba el marcatge limitat exclusivament als nuclèols i a les zones perifèriques del nucli. Aquest és el patró *nuclèol-positiu*.

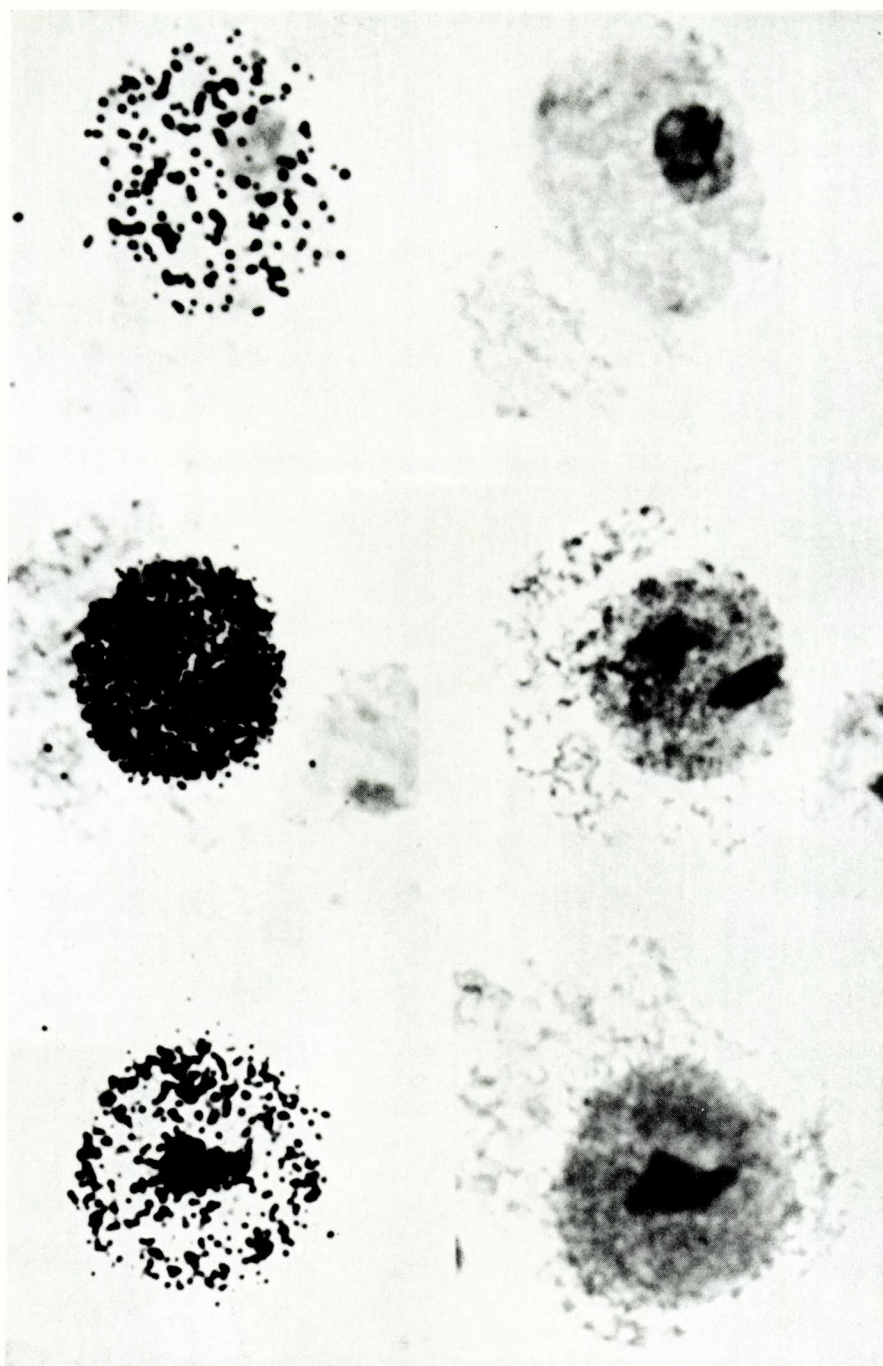
En les hores successives del cultiu la distribució d'aquests patrons varia sensiblement. A les 50 hores, els percentatges corresponents a aquests tres patrons, són respectivament 19 %, 75 % i 8 %; a les 56 hores: 16 %, 62 % i 22 %; a les 72 hores: 15 %, 58 % i 27 %; a les 96 hores: 11 %, 69 % i 20 %.

A les 24 hores de cultiu menys del 0,3 % de les cèl·lules cultivades sintetitzen ADN. A les 42 hores, el 6 % de les cèl·lules sintetitzen ADN; a les 50 hores el 27 %, a les 56 hores el 40 %, a les 72 hores el 51 %, i a les 96 hores el 48 %. Això indica que durant les primeres 24 hores del cultiu el nombre de cèl·lules que inicien la síntesi de l'ADN és molt petit. Per aquest motiu no hem pogut valorar la distribució dels patrons de síntesi a les 24 hores.

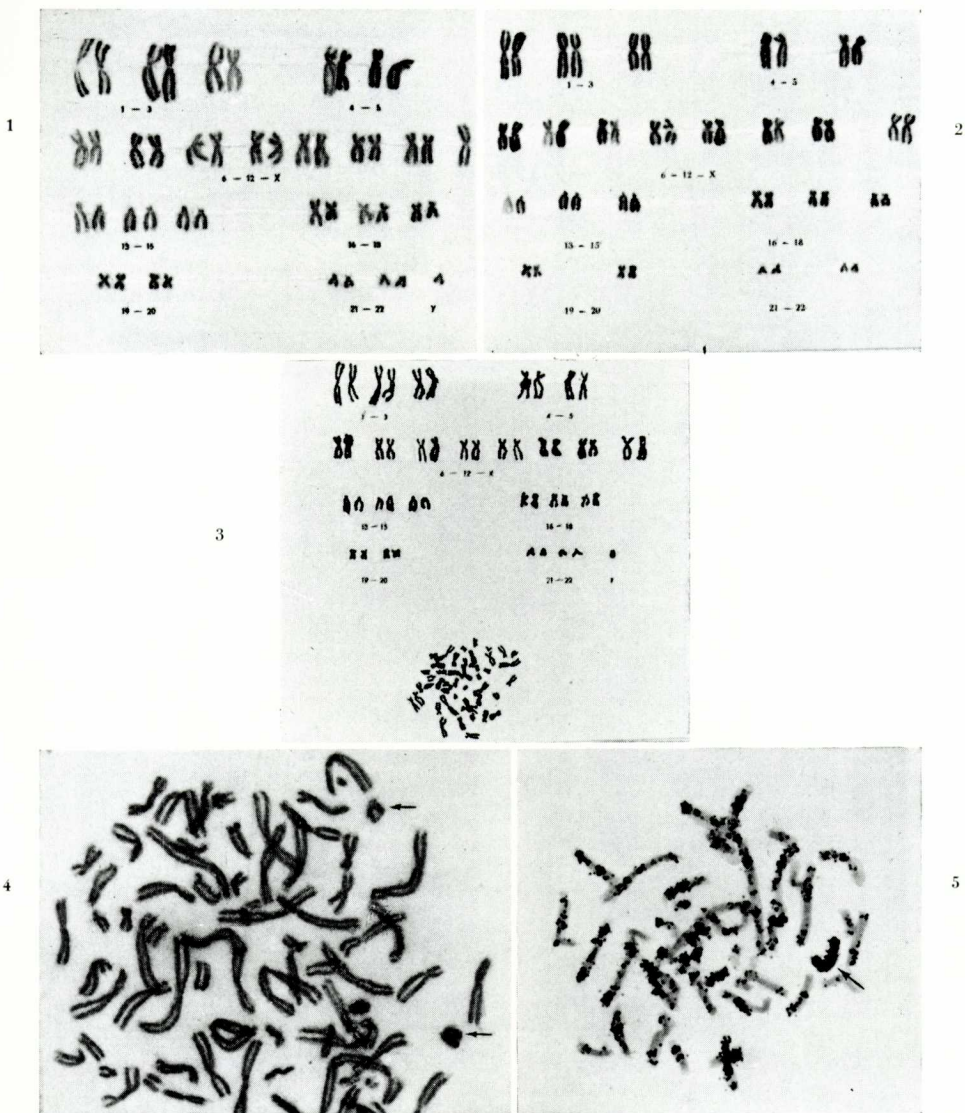
De les 42 a les 56 hores aproximadament, una tercera part de les cèl·lules del cultiu inicien la síntesi de l'ADN, ja que del 6 % de cèl·lules marcades hom passa al 40 %. Aquesta fase semisincronitzada del cultiu és la que ens ha permès de conèixer l'evolució en el temps dels tres patrons de síntesi de l'ADN.

Comentari. Aquests resultats ens indiquen:

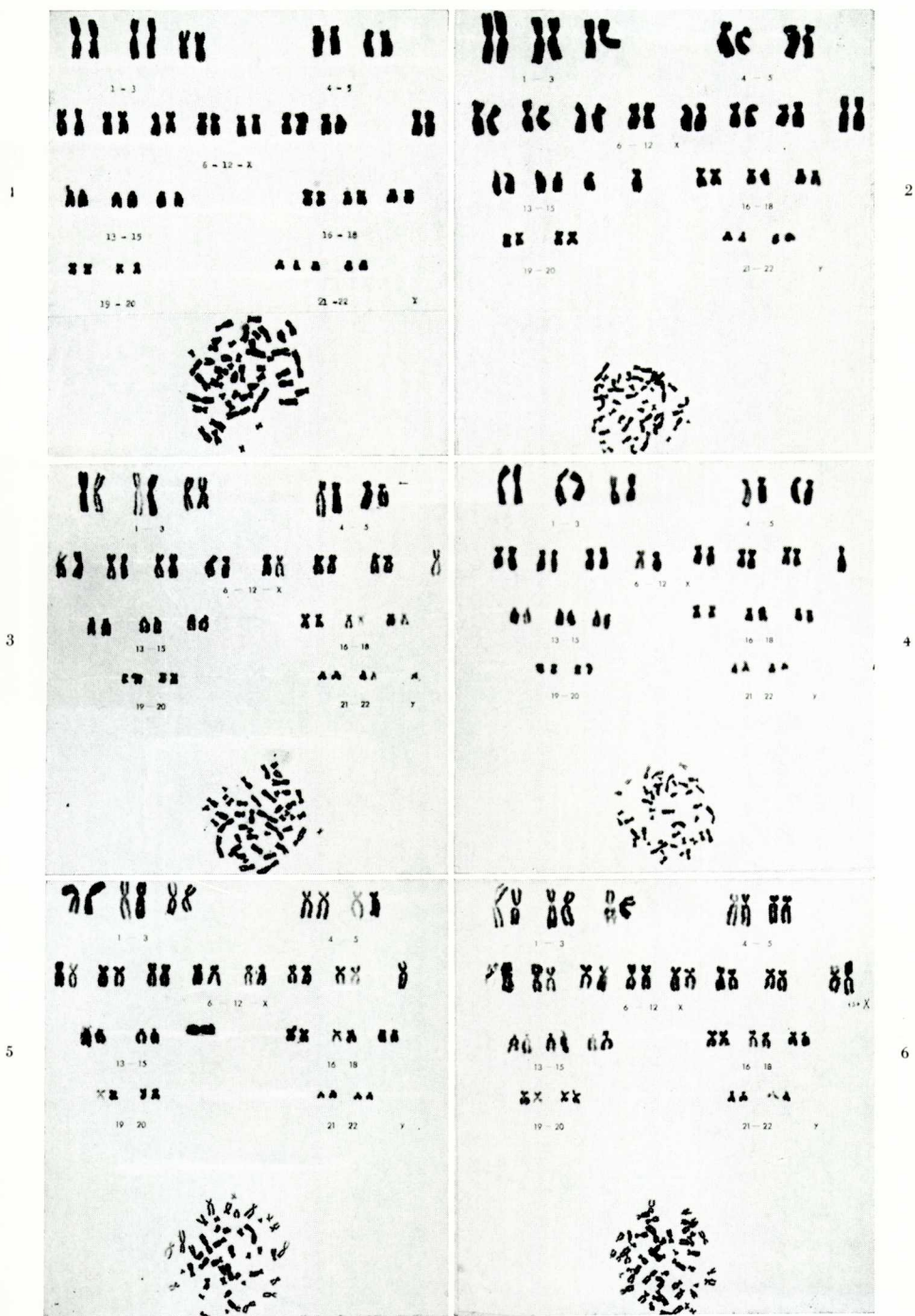
- 1) Que els tres patrons de marcatge corresponen a tres fases de la síntesi de l'ADN:
 - a) *Fase nuclèol-negativa:* Síntesi de l'ADN nuclear difusa sense que hi hagi síntesi de l'ADN nucleolar.
 - b) *Fase intermèdia.* Síntesi de l'ADN intensa en nucli i nuclèols.
 - c) *Fase nuclèol-positiva:* Síntesi de l'ADN localitzada exclusivament en els nuclèols i en les zones perifèriques del nucli.



LÀMINA I. — A) Fase nuclèol-negativa. B) Fase intermèdia. C) Fase nuclèol-positiva



LÀMINA II. — 1. Cariòtipus masculí normal. — 2. Cariòtipus femení normal. — 3. Cariòtipus 47,XXY d'una síndrome de Klinefelter. — 4. Mitosi encaploide amb dos cromosomes en anell produïts probablement per radioteràpia esplènica. — 5. Síntesi tardana de l'ADN de cromosomes X (autoradiografia)



LÀMINA III. — 1. Cariòtipus de mongolisme femení. — 2. Cariòtipus de mongolisme femení amb translocació D-G. — 3. Cariòtipus de «cri du chat» amb delecció parcial dels braços curts del cromosoma 5. — 4. Cariòtipus 45,X, d'una síndrome de Turner. 5. Cariòtipus 44,X d'una síndrome de Turner amb translocació D-D. — 6. Cariòtipus 46,XX g d'una síndrome dels braços llargs del cromosoma X

- 2) Que la fase nuclèol-negativa és la fase inicial de la síntesi de l'ADN nucleal, mentre que la fase nuclèol-positiva és la fase final del procés de síntesi. Això vol dir que l'ADN nucleolal sintetitza al final de la fase S.

Aquests resultats s'oposen en part als conceptes admesos fins ara des dels treballs de HARRIS, fets el 1959, segons els quals la síntesi de l'ADN s'inicia en el nuclèol.

Les nostres investigacions han estat confirmades independentment per KASTEN i per STRASSER de la Universitat de Palo Alto, Califòrnia, i posteriorment per BÜCHNER i per PFEIFFER de la Universitat de Münster, Alemanya.

Segons els nostres càlculs, els temps de síntesi de les tres fases descrites són: fase nuclèol-negativa: 2-2,7 hores; fase intermèdia: 6,5-8,8 hores; fase nuclèol-positiva: 0,5-3,5 hores. La fase total de síntesi és aproximadament de 14 hores. Aquests temps es refereixen exclusivament als cultius de limfòcits «in vitro» estimulats per la fitohemaglutinina.

II

ESTUDIS CROMOSÒMICS

En 254 casos estudiats mitjançant el cultiu de limfòcits «in vitro» hem pogut comprovar que les alteracions cromosòmiques més freqüents en la clínica humana són les alteracions dels cromosomes sexuals, i la trisomia 21 o síndrome de DOWN (mongolisme).

I) Alteracions dels cromosomes sexuals.

Disgenèsia gonadal. En 21 casos de disgenèsia gonadal hem registrat els següents cariotipus: 4 casos de 45,Xo; 6 casos de 45,Xo/46,XX; 2 casos de 46,XisoX; 1 cas de 45,Xo/46,XisoX; 2 casos de 46,XX/47,XXX; 1 cas de 45,Xo/46,XY; 1 cas de 46XY; 1 cas de 46,XX; 1 cas de 45Xo/46,XX/47XXX; 1 cas de 45,Xo/46,XX/47,XXY i 1 cas de 44,Xo amb translocació D-D. Aquest darrer cariotipus és el primer cas descrit en la literatura de disgenèsia gonadal amb aquesta constitució cromosòmica.

La correlació clínico-cromosòmica d'aquests 21 casos de disgenèsia gonadal, la cinquena possiblement de la literatura pel seu nombre de casos, ens permeté d'establir que l'alteració cromosòmica fonamental causant de la disgenèsia gonadal és la *monosomia dels braços curts del cro-*

mosoma X. Segons el cariotipus trobat i la clínica de cada cas, podem establir els següents grups:

Grup 45,Xo; 45,Xo/46,XisoX; 46,XisoX. El fenòtipus d'aquests casos presenta en general les alteracions pròpies de la síndrome descrita primerament per TURNER. En els casos amb 46,XisoX, els estigmes Turner poden ésser menys marcats, però la talla curta i la disgenèsia gonadal són constants. Si no és així, cal sospitar un mosaic cromosòmic no detectat. El cas de 44,Xo amb translocació D-D presentava un fenòtipus típic de síndrome de Turner.

Grup 45,Xo/46,XX; 46,XX; 45,Xo/46,XX/47,XXX; 45,Xo/47,XXX. El fenòtipus oscil·la entre la clàssica síndrome de Turner, i la de la disgenèsia gonadal pura, àdhuc de vegades amb signes de feminització. Dos dels nostres casos tingueren menàrquia espontània, malgrat presentar estigmes Turner. Possiblement la sèrie cel·lular 46,XX normal del mosaic, actua disminuint o inclús anul·lant alguns dels aspectes patològics característics de la sèrie cel·lular 45,Xo.

Grup 45,Xo/46,XY; 46,XY; 45,Xo/46XX/47,XXY. El fenòtipus varia des de la síndrome de Turner a la disgenèsia gonadal pura, segons sigui el predomini de la sèrie cel·lular 45,Xo. La sèrie 46,XY caracteritza aquest grup, ja que pot induir a la formació d'una gònada testicular disgenètica, insuficient però, per a la masculinització de la malalta. El cas amb cariotipus 45,Xo/46,XX/47,XXY presentava un fenòtipus femení normal amb menstruacions espontànies des dels 21 anys.

Segons aquests resultats, cal ampliar el concepte de disgenèsia gonadal fins a aquells casos de menàrquia tardana o menopàusia precoç, amb estigmes Turner o sense ells, que presenten mosaics cromosòmics amb una sèrie cel·lular 45,Xo. Considerem aquests casos com a disgenèsies gonadals «minor».

Pseudo-hermafroditisme masculí. El cariotipus 45,Xo/46,XY adquireix una personalitat particular en l'estudi dels estats intersexuals, ja que ens permet de comprendre el pas gradual dels diversos casos clínics, des de la disgenèsia gonadal, passant per la disgenèsia gonadal pura i la disgenèsia gonadal mixta, fins al pseudo-hermafroditisme masculí. Segons que predomini en les cèl·lules germinals primitives, la sèrie cel·lular 45,Xo o la sèrie cel·lular 46,XY, el fenòtipus correspondrà a la disgenètica gonadal amb major o menor diferenciació testicular disgenètica, o al pseudo-hermafroditisme masculí amb capacitat masculinitzant del testicle.

En 4 casos de pseudo-hermafroditisme masculí trobem dos casos amb cariotípus 46,XY, un cas amb mosaic 45,Xo/46,XY i un amb cariotípus 46,XX.

Hermafroditisme ver. El cariotípus fonamental de l'hermafroditisme ver és el de 46,XX/46,XY. Descrivim un cas amb cariotípus 46,XX/47,XY/47,XXY.

La feminització testicular i el pseudo-hermafroditisme femení no són deguts a alteracions cromosòmiques. Hem estudiat 5 casos de feminització testicular, tots ells amb cariotípus 46,XX masculí normal, i 6 casos de pseudo-hermafroditisme femení, amb cariotípus 46,XX femení normal.

La síndrome de Klinefelter presenta un cariotípus de 47,XXY típic en tres dels 7 casos estudiats. Altres tres casos presenten un mosaic cromosòmic 46,XY/47,XXY. Un darrer cas presentava un cariotípus 46,XX femení normal, però sospitem que es tracta d'un mosaic no detectat, 46,XX/47,XXY.

II) Alteracions dels autosomes.

Trisomia 21. De 56 casos en què hom sospitava clínicament un mongolisme, hem comprovat en 50 la típica trisomia 21. En dos casos hi havia un mosaic amb una sèrie cel·lular normal, i l'altra trisòmica regular. En dos casos hi havia una trisomia 21 per translocació, en un cas D-G i en l'altre G-G, i, per tant, amb 46 cromosomes. Els altres dos casos presentaven un cariotípus normal i possiblement no es tractava de mongolisme.

Entre 44 casos de *malformacions congènites múltiples* només trobem dos casos amb alteracions cromosòmiques. Un d'ells presentava clínicament anoftàlmia bilateral, imperforació anal i lesions microquistiques renals. L'estudi cromosòmic demostrà un cariotípus de 46 cromosomes, amb un cromosoma del grup C anormal. Es tracta del primer cas descrit en la literatura amb aquestes alteracions clíniques i citogenètiques. L'altre cas corresponia clínicament a un quadre típic de síndrome de «cri-du-chat». L'estudi cromosòmic revelà un mosaic amb una sèrie cel·lular normal i amb una altra de patològica amb la característica delecció parcial dels braços curts del cromosoma 5.

AGRAÏMENT

Agraïm als doctors Jordi Prats i Jaume Antich llur col·laboració en els estudis cromosòmics.

DISCUSSIÓ

Dr. ALEMANY

Pregunta al doctor Ribas si les cèl·lules blastoides poden reversibilitzar-se i esdevenir novament limfòcits, i si ha fet estudis amb persones afectades per al·lèrgies.

Dr. GRINYÓ

Creu que la síndrome de Klinefelter és especialment freqüent en els malalts mentals.

Diu que les alteracions dels heterocromosomes ocasionen, amb més freqüència que les dels normals, trastorns mentals. En les dones XXX és freqüent la disminució mental. Algunes persones especialment agressives recloses en presons presenten un cariotipus XYY. Aquesta alteració cromosòmica és possiblement la causa, si més no en part, de llur comportament agressiu.

Dr. PREVOSTI

S'interessa per la possible significació de l'ADN nucleolal, i per les possibles relacions d'aquest ADN amb els mecanismes de duplicació, a partir d'un patró, dels àcids nucleics.

Dr. RIBAS

Contesta al doctor Alemany que si no persisteix l'estimulació un cop reduplicada la cèl·lula, tant «in vivo» com «in vitro», sobrevé la regressió a limfòcit. «In vivo», un estímul antigènic que ateny un gangli limfàtic, produeix cèl·lules immunoblàstiques, les quals esdevenen limfòcits en desaparèixer l'estímul. Aquests limfòcits passen a la circulació perifèrica, sembla que circulen durant molts dies, potser durant anys, i es redupliquen cada cop que hi ha estimulació antigènica. Quant als estudis d'al·lèrgia, el doctor Ribas manifesta que no ha treballat en aquest cas.

Manifesta al doctor Prevosti que desconeix les possibles significacions de l'ADN nucleolal. La literatura és en aquest sentit confusa, perquè fins fa poc hom no acceptava l'existència d'ADN al nuclèol. El doctor Ribas constata que l'ADN per ell trobat al nuclèol era de procedència perinucleolal. Creu que la duplicació de la cromatina perinucleolal i nucleolal planteja un problema de pèrdua d'informació si realment, com sembla, la cromatina nucleolal és de procedència perinucleolal.