

Tècniques per a l'obtenció de prometafases: comparació del seu rendiment en diferents espècies de Primats.

A. Genescà¹, I. Clemente¹, M. Garcia^{1,3}, M. Ponsà^{2,3}.

(1) Dep. Biologia. Fac. Medicina. (2) Dep. Biologia cel.lular. Fac. Ciències. (3) Institut de Biologia Fonamental "V= Villar Palasí". Universitat Autònoma de Barcelona. BELLATERRA. Barcelona.

Abstract

A comparison of techniques for obtaining prometaphase chromosomes in different Primate species.

Recently various techniques have been described for obtaining prometaphase chromosomes which improve the resolution of the conventional G and C banding techniques. High resolution chromosomal techniques were performed in the species Cebus apella (F. Cebidae), C. mona campbelli (F. Cercopithecidae) and H. sapiens (F. Hominidae), using the leukocyte cultures techniques according to Viegas-Pequignot and Dutrillaux (1978), Camargo and Cervenka (1980) and Antich i Gean (personal communication). In this work we compare the results of four techniques (including the standard method) using the parameters: lymphocyte stimulation, percentage of prometaphases and band resolution. In conclusion, all four of these techniques may be useful to cytogenetic laboratories involved in comparative primate cytogenetic analysis.

Introducció.

En el nostre grup de treball, l'estudi dels cromosomes de diferents espècies de Primats és, desde fa molts anys i encara en la actualitat, una de les principals línies de recerca.

En el camp de la citogenètica, durant aquests darrers anys han aparegut una sèrie de tècniques encaminades a aconseguir alta resolució en cromosomes. Altrament s'ha dit (Goyanes i Méndez, 1981) que moltes de les subbandes aconseguides per alguns autors emprant tècniques d'alta resolució, es trobaven en el límit del poder resolutiu del microscopi òptic. Això, no ens ha representat cap inconvenient per a portar endavant el nostre estudi, i creiem que malgrat tot val la pena comparar diferents aspectes del rendiment que donen algunes d'aquestes tècniques.

Material i Mètodes

Hem treballat amb espècies pertanyents a tres grans famílies del grup dels Primats: Cebus apella, Cercopithecus mona campbelli i Homo sapiens, utilit-

zant quatre tècniques de cultiu de limfòcits (Fig. 1): Tècnica clàssica (T1); Tècnica d'Antich i Gean (comunicació personal)(T2); Tècnica de Viegas-Pequignot i Dutrillaux (1978)(T3); Tècnica de Yunis (1976) modificada per Camargo i Cervenka (1980)(T4). Les tres últimes tècniques (T1,T2 i T3) són específiques per a l'obtenció de profases i prometafases.

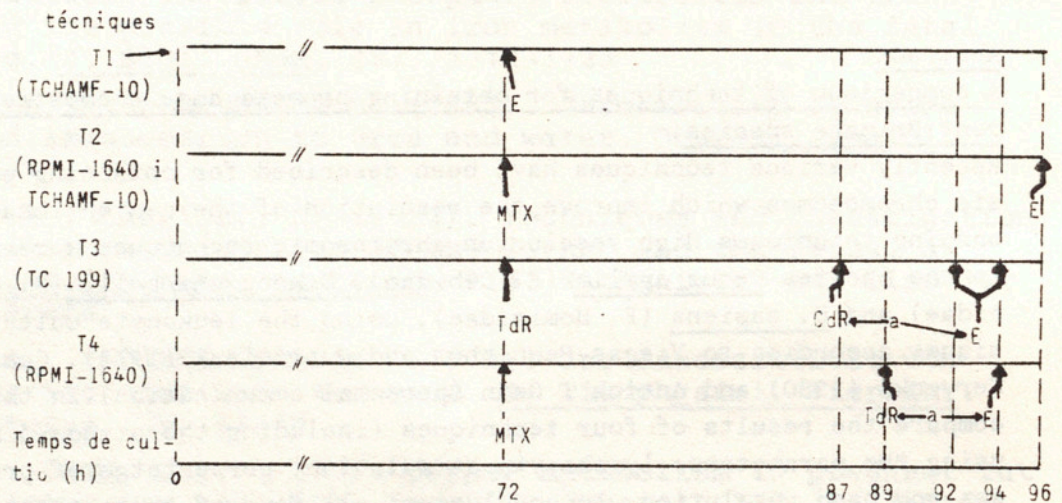


Figura 1. Esquema on queden resumits els protocols de les quatre tècniques de cultiu de limfòcits. S'assenyala el temps d'adició dels productes específics per aconseguir alta resolució cromosòmica que hem fet servir per cada una de les tècniques T2, T3 i T4. (MTX: metotrexat, TdR: timidina, CdR: 2'-desoxicitidina). Indiquem entre parèntesi els diferents medis de cultiu que hem fet servir per cada una de les tècniques. (E: extracció del cultiu).

El MTX actua bloquejant o enlentin el cicle cel.lular dels limfocits en l'etapa de síntesi de l'ADN, ja que inhibeix competitivament la dihidrofolat reductasa. Aquest enzim té especial importància en la síntesi de dTPM. L'efecte inhibitor induït pel MTX es pot revertir si afegim al medi de cultiu un producte capaç de proveir dTPM a les cèl.lules (TdR). D'altra banda, la timidina afegida a un cultiu de cèl.lules animals en concentració suficient (superior a 1×10^{-3} M) és capaç també de bloquejar la síntesi d'ADN per inhibició de la reducció del CDP a dCDP; aquest últim necessari com a precursor de dCTP per la síntesi de l'ADN. El bloqueig es pot revertir afegint CdR al medi.

Em les tècniques T3 i T4 és molt important el temps que transcorre desde que s'allibera el bloqueig fins que es procedeix a l'extracció del cultiu, ja que d'ell depèn obtenir divisions amb cromosomes més o menys llargs.

Resultats i Discussió

El grau de resolució obtingut (nombre de bandes) en els cromosomes profàsics i prometafàsics és sens dubte molt més alt que el de metafàsics (Fig.2) Un examen cuidados dels cromosomes en diferents estadis d'allargament, mostra que els patrons de bandes són consistents. Generalment, cada banda manté una posició constant respecte la longitud total del cromosoma. A més algunes bandes permaneixen bastant visibles, servint-se de marcadors per a la identificació de cromosomes i segments cromosòmics.



Fig. 2. Comparació de la resolució obtinguda per el cromosoma 2 de l'especie humana desde l'estadi de prometafase primerenca fins a l'estadi metafàsic. S'assenyalen el nombre de bandes i la tècnica de cultiu.

Per tal de poder comparar el rendiment de les quatre tècniques de cultiu de limfòcits (una clàssica i tres per a conseguir alta resolució en cromosomes) ens hem basat en l'estudi dels següents paràmetrs: (veure Taula I)

1. Creixement (nombre de nuclis en divisió per portaobjectes)
2. Percentatge de profases i prometafases respecte al total de divisins
3. Resolució (nombre de bandes visualitzades per cariotip haploide)
4. Sincronització.

Les modificacions introduïdes en la tècnica T2 (canvi de medi de cultiu RPMI-1640 per TC HAM F-10 i a més en l'espècie CMC, una disminució del mitogen fito-hemaglutinina), han permés augmentar l'index de creixement dels limfòcits.

A partir de les dades indicades en la taula I, hem construït la gràfica de la figura 3. Fixant-nos en la figura 3a podem dir que el creixement obtingut per l'espècie HSA no és superat per CMC ni per CAP, L'explicació es fàcil: són tècniques que han estat posades a punt per HSA i per tant, estan millor adequades a aquesta espècie que a d'altres. Per altra banda, comparant les

	\bar{x}	\bar{y}	Z	
HSA	T1	252 ± 134.22	1.07% ± 1.02%	309
	T2	13.69 ± 5.25	37.62% ± 4.19%	---
	T2 modificada	60 ± 21.43	28.40% ± 4.74%	515
	T3	101.5 ± 9.23	9.6% ± 4.16%	540
CMC	T4	452.57 ± 141.69	4.03% ± 0.88%	715
	T1	20.15 ± 7.12	0.44% ± 0.96%	275
	T2	1 ± 1.63	0%	---
	T2 modificada	17.78 ± 16.81	0.49% ± 1.13%	447
CAP	T3	25.83 ± 4.89	19.24% ± 10.92%	503
	T1	64.5 ± 21.17	8.42% ± 1.97%	304
	T2	0	0%	---
	T2 modificada	16.50 ± 8.04	15.09% ± 8.94%	483
	T3	28.86 ± 9.39	21.74% ± 11.21%	---

Taula I. Resultats obtinguts quan s'estudien els paràmetres: creixement mig (\bar{X}), percentatge mig de profases i prometafases (\bar{Y}) i nombre de bandes per cariotip haploid (Z). Cal destacar que els valors que acompanyen les mitjes no són l'error estàndard d'aquestes, sinó l'interval o límit de confiança de la mitja a un nivell de probabilitat = 95% (HSA: Homo sapiens, CMC: Cercopithecus mona campbelli, CAP: Cebus apella).

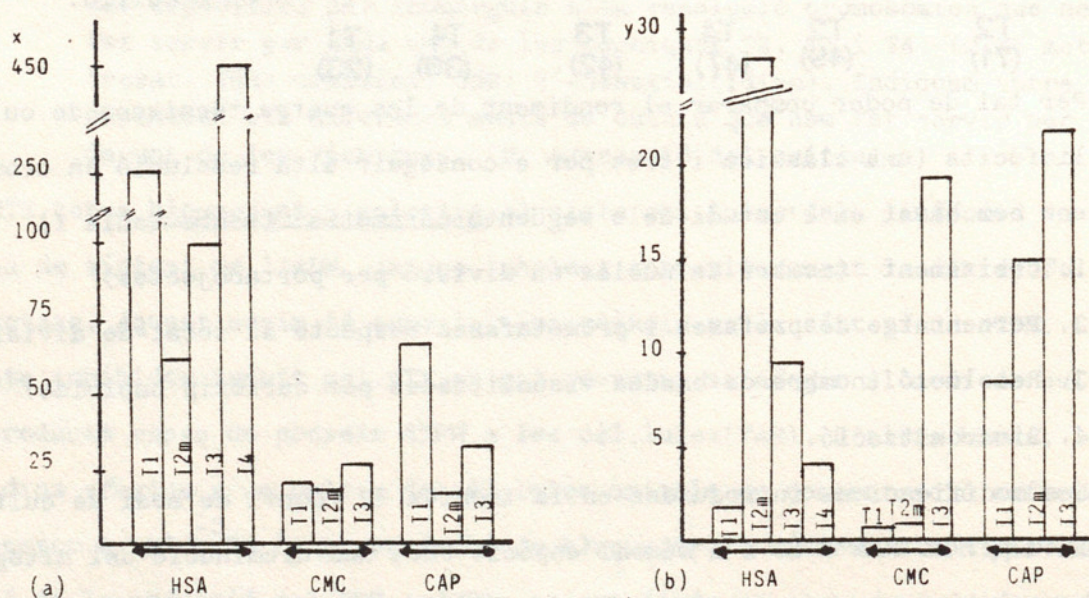


Figura 3. Gràfiques que mostren el creixement (a) i percentatge de profases i prometafases (b) obtinguts per diferents tècniques de cultiu de limfòcits en les espècies HSA, CMC i CAP. Per la tècnica T2, que hem modificat en alguns aspectes, representem en les tres espècies els resultats que hem trobat al utilitzar TC HAM F-10 com a medi i baixa concentració de fitohemaglutinina en CMC. (T2m: tècnica T2 modificada).

tècniques per a l'obtenció de cromosomes amb alta resolució en les tres es-

pècies, i sobretot en HSA, s'observa que el creixement mig obtingut per la tècnica T2 és el més baix. Aquest resultat concorda amb el que esperavem, ja que mentre en les tècniques T3 i T4, el bloqueig induït sobre la síntesi d'ADN és alliberat per la desoxicitidina i la timidina respectivament, en la tècnica T2 no s'hi afegeix cap d'aquest segon tipus de productes (Fig.1) En el que es refereix al paràmetre percentatge mig de profases i prometafases (Fig. 3b) s'observa que, dins d'una mateixa espècie, aquest augmenta al substituir la tècnica clàssica (T1) per qualsevol de les altres tècniques. Els resultats difereixen segons l'espècie, així doncs, tenim que per HSA la tècnica que dona un percentatge més alt es la T2m, mentre que en CMC i CAP és la T3.

La presència de nuclis en divisió al aplicar les tècniques T2 i T2m no es pot explicar per resistència al MTX, (ja que cal optar per una selecció esgronada per obtenir una freqüència acceptable de cèl.lules resistents (Schimke et al., 1983)), ni per un esgotament de la droga (ja que la concentració utilitzada és suficient per produir una inhibició total del creixement dels limfòcits (Borsa i Whitmore, 1969)). Camargo i Cervenka (1980) han demostrat que el MTX no inhibeix la síntesi d'ADN, sino que l'enlenteix; les cèl.lules poden avançar, encara que lentament, per la fase S del seu cicle vital. Aquesta explicació no és tampoc del tot satisfactòria, ja que ens justifica la presència de divisions, però no l'obtenció d'un percentatge de profases i prometafases superior al que s'aconsegueix amb la tècnica clàssica de cultiu de limfòcits. Així doncs, no trobem una hipòtesi acceptable que ens permeti interpretar els nostres resultats.

Creiem que és important destacar els diferents graus de sincronització obtinguts per HSA amb les tècniques T3 i T4: baix per la primera i alt per la segona. Això ens fa pensar que pot ésser millorat el rendiment de la tècnica T4 (en quant al paràmetre percentatge mig de profases i prometafases) si s'optimitzés el temps d'actuació de la timidina.

Una de les conclusions que s'extrau d'aquest treball és que s'han de tenir a punt totes aquestes tècniques ja que una de sola no és d'ús generalitzable a les diferents espècies de Primats.

Tal i com a quedat reflectit en la figura 2, és evident que la resolució incrementa quan s'utilitzen cromosomes llargs (en estadis previs al de metafase) com a material d'estudi. A la figura 4 mostrem el cariotip procedent d'una prometafase de l'espècie CMC.



Figura 4

Bibliografia

- BORSA J, WHITMORE G.F. (1969). Studies relating to the mode of action of methotrexate. II: Studies on sites of action in L-cells "in vitro". Mol. Pharmacol. 5, 303-317
- CAMARGO M., CERVENKA J. (1980). Pattern of chromosomal replication in synchronized lymphocytes. I. Evaluation and application of methotrexate block Hum. Genet. 54, 47-53.
- SCHIMKE R.T., BROWN P.C., JOHNSTON R.N., MARIANI B., TLSTY T. (1983) Gene amplification and methotrexate resistance in cultured animal cells. in "Genes and proteins in oncogenes". Ed. Weintein and Vogel Academic press.
- VIEGAS-PEQUIGNOT E., DUTRILLAUX B. (1978). Une méthode simple pour obtenir des prophases et des prométaphases. Ann. Génét. 21, 2, 122-125

Aquest treball s'ha realitzat amb un ajut concedit per la CIRIT (Generalitat de Catalunya).