

Departamento de Fisiología
Facultad de Medicina de Valladolid
(Prof. E. Romo Aldama)

Endorreduplicación inducida por el Colcemid en linfocitos humanos. Estudio autorradiográfico de la síntesis de DNA en los diplocromosomas

por

E. Romo, B. Herreros * y A. Guerra

(Recibido para publicar el 6 de marzo de 1967)

El fenómeno de la endorreduplicación, como fue definido por LEVAN y HAUSCHKA (16), es un mecanismo celular de poliploidogénesis consistente en dos (o más) reduplicaciones sucesivas de los cromosomas, en un núcleo en interfase, que se evidencia en la mitosis subsiguiente por la aparición de cromosomas *dobles* o diplocromosomas. Cada uno de éstos está constituido por dos elementos idénticos, los cromosomas hermanos formados en el curso de dichas reduplicaciones, los cuales permanecen característicamente uno junto al otro durante la mayor parte de la mitosis.

LEVAN y HAUSCHKA (16) observaron la aparición espontánea de endorreduplicación en células de tumor ascitis. También se ha encontrado en células tumorales humanas (7, 12, 15, 20, 24), en cultivos de células HeLa (11) y en cultivos de células no tumorales tales como fibroblastos (8, 26, 32) y linfocitos (1, 2, 4, 5, 6, 31).

Aparte del interés que pueda tener el

estudio de los mecanismos por los que se pone en marcha este fenómeno, sus implicaciones funcionales o su posible relación con el estado neoplásico, los diplocromosomas constituyen un modelo excepcional para la investigación de ciertos problemas en el campo de la citogenética. Tales son, entre otros, el estudio de las diferencias o analogías morfológicas entre cromosomas homólogos, la segregación y distribución espacial del DNA sintetizado en sucesivas reduplicaciones, los intercambios entre cromátides hermanas o el grado de sincronismo entre homólogos respecto a la síntesis del DNA.

En los cultivos de células normales, la frecuencia de aparición espontánea de endorreduplicación raramente alcanza el 1 % de las mitosis, pero esta frecuencia puede elevarse experimentalmente mediante diversos tratamientos. Por ejem-

* Con una beca de la Comisaría de Protección Escolar.

plo, BELL y BAKER (3) han encontrado aumento del número de endorreduplicaciones en cultivos de linfocitos estimulados con Fitohemaglutinina después de tratamientos con Rayos X. Por otra parte, JACKSON (13) ha publicado un método de inducción de endorreduplicación en este mismo material mediante la adición de α -mercaptoetanol al medio de cultivo. Esta sustancia, sin embargo, es muy tóxica para las células y los caracteres morfológicos normales de los cromosomas son pobremente conservados en las endorreduplicaciones (27). Nosotros hemos descrito recientemente un método alternativo usando Colcemid (deacetilmetil-colchicina) (9), y en este trabajo presentamos un resumen de los caracteres morfológicos más sobresalientes de los diplocromosomas así obtenidos, así como un estudio de la síntesis de DNA en los mismos mediante el empleo de Timidina- H^3 y la técnica autorradiográfica. Además, se discuten los posibles mecanismos de producción de la endorreduplicación por la acción del Colcemid.

Material y métodos

CULTIVOS. — La preparación de los cultivos y el tratamiento con Colcemid se realizó de la manera previamente descrita (9), usando linfocitos de sangre periférica de donadores varones normales. Todos los resultados aquí presentados proceden de cultivos incubados durante 6 días.

TIMIDINA- H^3 .—Hemos empleado Timidina- H^3 (Radiochemical Center, Amer-sham, Inglaterra) de una actividad específica de 5.000 milicurios/mM, añadiéndola a los cultivos en cantidad de 0,5 microcurios/c. c. En los experimentos aquí descritos, la adición se realizó al final de los tres primeros días de incubación, 6 horas antes del cambio del medio de cultivo por otro fresco con Timidina no radioactiva. De esta forma,

las células estuvieron en contacto con el isótopo durante 6 horas, aproximadamente 65 a 70 horas antes de ser fijadas.

AUTORRADIOGRAFÍAS. — Las preparaciones de cromosomas, obtenidas por el método habitual de secado al aire (18), fueron cubiertas con film AR-10 (Kodak), expuestas en refrigerador a 4° C durante 4 días, reveladas durante 5 minutos con la fórmula D-19b y teñidas finalmente con Giemsa. Otros detalles de la técnica autorradiográfica pueden encontrarse en el trabajo de SCHMID (25).

Resultados

MORFOLOGÍA DE LAS ENDORREDUPLICACIONES INDUCIDAS POR EL COLCEMID. Las metafases con endorreduplicación inducida por el Colcemid son morfológicamente similares a las que aparecen espontáneamente (Fig. 1a). Los diplocromosomas están constituidos por dos cromosomas hermanos asociados lateralmente en toda la longitud de dos de sus cromátides (*cromátides internas*). Aunque ambos elementos parecen estar siempre separados a nivel del centrómero, es decir, cada uno posee su propio centrómero, su asociación es más estrecha a este nivel, siendo muchas veces el único punto por el que permanecen asociados los dos cromosomas hermanos.

En las preparaciones obtenidas a los tres días de la adición del Colcemid al cultivo, junto a las células con endorreduplicación «simple» como la de la figura 1a, se encuentra también aproximadamente un 5% de endorreduplicaciones «dobles», en las que cada cromosoma aparece repetido cuatro veces constituyendo cuadruplicromosomas (fig. 1d, parte inferior, y fig. 2c). Además, otro 5 a 10% de las endorreduplicaciones son simples pero contienen un número tetraploide de diplocromosomas. Naturalmente, este último tipo de células, así como aquellas con cuadruplicromosomas, son

de hecho células octaplóides, mientras que las endorreduplicaciones simples son tetraploides.

En general, la morfología normal de los cromosomas está tan bien conservada en las endorreduplicaciones inducidas por el Colcemid, como en las metafases diploides normales de los cultivos habituales de linfocitos. La única diferencia notable es la mayor frecuencia de roturas de cromátides o de cromosomas en las primeras, lo que a menudo va seguido de reunión y soldadura de fragmentos pertenecientes a distintos cromosomas, originándose así complejas translocaciones en las que están implicadas una o más cromátides de los diplocromosomas (fig. 1c).

Los caracteres morfológicos específicos de ciertos cromosomas, tales como satélites o constricciones secundarias, se observan también en los diplo y cuadruplicromosomas. De hecho, este material permite estudiar de manera excepcionalmente simple la transmisión de estos u otros caracteres morfológicos durante la reduplicación, ya que los cromosomas hermanos que resultan en el proceso permanecen unidos y, en consecuencia, son rápidamente identificables. A este respecto, a nosotros nos ha interesado el estudio de la transmisión de las constricciones secundarias y de las diferencias de tamaño entre cromosomas homólogos, por las razones que señalamos más adelante (véase la discusión).

En alrededor de un centenar de endorreduplicaciones examinadas detalladamente, hemos observado que cuando un diplo o cuadruplicromosoma presenta constricciones secundarias, éstas aparecen siempre con idénticos caracteres en los dos o los cuatro cromosomas hermanos. En ningún caso hemos observado discrepancias a este respecto entre dichos elementos hermanos, es decir, que unos presenten constricciones y otros no, mientras que tales discrepancias se observan muy frecuentemente entre cro-

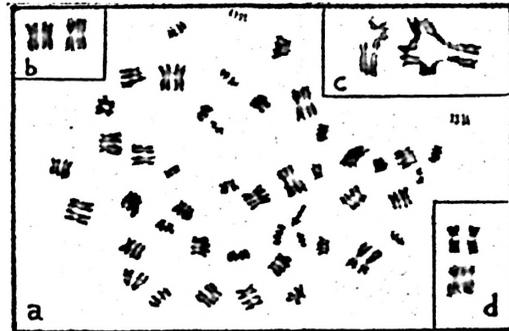


FIG. 1. a) Metafase con endorreduplicación simple. La flecha señala la asociación por los satélites de dos diplocromosomas acrocéntricos. b) Diferencia de tamaño entre los diplocromosomas del primer par de la célula anterior. c) Dos imágenes de translocaciones entre diplocromosomas. d) Constricciones secundarias en dos diplocromosomas (parte superior) y en un cuadruplicromosoma (parte inferior).

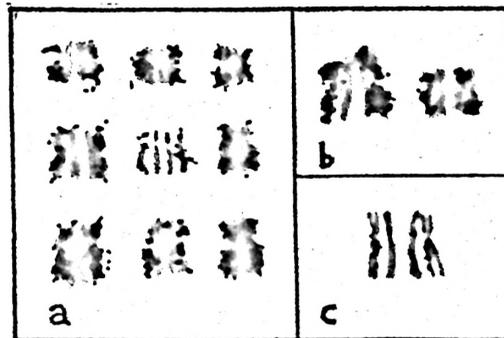


FIG. 2. a) Varios ejemplos de diplocromosomas con sólo las dos cromátides externas marcadas. La imagen autorradiográfica producida en la película por la emisión β del Tritium, aparece superpuesta sobre aquellas partes del cromosoma que contienen Timidina- H^3 , en este caso las cromátides externas. b) Dos ejemplos de diplocromosomas con intercambios de segmentos entre cromátides. En ambos casos, el marcaje en el cromosoma de la derecha cambia de la cromátide externa a la interna en la parte superior. c) Un cuadruplicromosoma en el que están marcadas las cromátides internas de los dos cromosomas externos.

mosomas homólogos no hermanos. Como ejemplo en la figura 1d se muestran dos diplocromosomas (parte superior) y un cuadruplocromosoma (parte inferior) con constricciones secundarias, todos ellos pertenecientes al par número 9 del kariotipo humano, el cual, como ocurre en las metafases diploides normales, es también el que con más frecuencia presenta constricciones secundarias en las células con endorreduplicación.

En relación con el tamaño de los cromosomas hemos observado que, cuando la calidad técnica de las metafases es adecuada, los dos o los cuatro elementos hermanos de los diplo o cuadruplocromosomas, respectivamente, tienen siempre idéntica longitud. Sin embargo, en estas mismas metafases pueden encontrarse diferencias de tamaño significativas entre diplo o cuadruplocromosomas homólogos no hermanos. Por ejemplo, en la figura 1b se muestra la diferencia de tamaño entre los dos diplocromosomas homólogos de la primera pareja de la célula de la figura 1a. Estos hechos parecen indicar que el tamaño de un determinado cromosoma en un momento dado del ciclo celular es una característica del mismo que se transmite en la reduplicación, de tal forma que si existen originalmente diferencias de tamaño entre homólogos, éstas persisten en los cromosomas hijos. En otras palabras, la condición estructural o funcional responsable de las diferencias de tamaño entre homólogos, parece transmitirse durante la reduplicación de los cromosomas.

ESTUDIO AUTORADIOGRÁFICO. Cuando los cultivos se incubaron con Timidina- H^3 como se indica en «Material y métodos», las autorradiografías de las células fijadas 65 a 70 horas más tarde mostraron que alrededor de un 50 % de las endorreduplicaciones simples habían incorporado el isótopo en su DNA, dando sus cromosomas la correspondiente imagen autorradiográfica. En la ma-

yoría de estas células cada diplocromosoma aparecía marcado solamente en dos de sus cuatro cromátides. Más raramente (1 % de las células aproximadamente) una sola cromátide aparecía marcada, mientras que el otro 50 % de las endorreduplicaciones simples no mostraban imagen autorradiográfica alguna presumiblemente porque no habían incorporado la Timidina- H^3 en su DNA.

Las endorreduplicaciones con sólo una cromátide marcada no van a ser incluidas en el presente estudio. Únicamente queremos señalar que deben haber derivado de células que completaron por lo menos una mitosis normal después de incorporar el isótopo y antes de iniciarse el proceso de la endorreduplicación, como puede deducirse de lo expuesto más adelante en la discusión.

Cuarenta células del primer grupo, con dos cromátides marcadas y dos sin marcar en cada diplocromosoma, fueron analizadas detalladamente con el fin de ver si la distribución espacial de cromátides marcadas y sin marcar seguía algún patrón determinado o sí, por el contrario, se distribuían al azar. Para esto sólo fueron considerados aquellos diplocromosomas en los que aparentemente se podía reconocer una disposición regular de las cuatro cromátides, es decir, paralelas entre sí, sin entrecruzamientos entre ellas ni superposiciones con otros cromosomas. Aproximadamente la cuarta parte de todos los diplocromosomas fueron seleccionados de esta forma y analizados. No obstante, queremos hacer constar que se puede haber cometido algún error en esta selección, ya que las células no fueron fotografiadas antes de realizar las autorradiografías y, como es sabido, la tinción posterior a través de la película nunca proporciona imágenes tan claras como las de las preparaciones habituales, estando además dificultada la visión de los cromosomas por la superposición de los granos de su imagen autorradiográfica.

La observación más relevante fue que la mayoría de los diplocromosomas (aproximadamente un 60 % de los analizados) tenían marcadas las dos cromátides externas, mientras que las internas estaban sin marcar en toda su longitud (fig. 2a). De las excepciones a esta regla, las más frecuentes eran diplocromosomas en los que el marcaje, aunque limitado siempre a dos de las cuatro cromátides a cualquier nivel que se considerara, cambiaba de las externas a las internas en uno o más puntos a lo largo de las mismas (fig. 2b), presumiblemente por haber ocurrido intercambios de segmentos entre dichos cromátides. Estas imágenes se observaron en el 30 % de los casos, aproximadamente. En el resto de los diplocromosomas analizados, las cromátides marcadas parecían ser la externa de un lado y la interna del lado opuesto, es decir, una de cada cromosoma hermano, o mucho más raramente las dos internas.

Todas las endorreduplicaciones dobles observadas en las preparaciones autorradiografiadas parecían haber captado la Timidina- H^3 , pero el análisis detallado de estas células presentaba más dificultades, ya que muy frecuentemente los cuatro homólogos hermanos de los cuadruplicromosomas aparecen superpuestos unos encima de otros. No obstante, en algunos casos favorables pudo observarse que también estaban marcadas solamente dos cromátides y, precisamente, las cromátides internas de los dos cromosomas hermanos colocados a un lado y a otro en posición externa (fig. 2c).

Finalmente, se observó en algunas endorreduplicaciones, tanto simples como dobles, el marcaje de los cromosomas no era completo en toda su longitud, sino que ocupaba solamente segmentos más o menos extensos de las correspondientes cromátides. Tal fenómeno es explicable si se tiene en cuenta que algunas células pueden haber comenzado la síntesis del DNA antes de añadir la Timi-

dina- H^3 al cultivo, mientras que otras la habrán completado después de retirar el isótopo. En ambos casos, parte del DNA habrá sido sintetizado con Timidina no radiactiva y por lo tanto no aparece marcado en las autorradiografías. Esta situación, sin embargo, es irrelevante para los fines de nuestro estudio.

Discusión

MECANISMO DE PRODUCCIÓN DE LAS ENDORREDUPLICACIONES INDUCIDAS POR EL COLCEMID. La acción mejor conocida del Colcemid, así como de su sustancia madre la Colchicina, es una interferencia con la formación del huso acromático, alterando en consecuencia el curso normal de la división celular. En las células animales el efecto más llamativo es un bloqueo de las mitosis en metafase, y está generalizada la opinión de que esta alteración ocasiona finalmente la muerte de las células. Por el contrario, las células vegetales pueden entrar en interfase después de la mitosis alterada por la droga (c-mitosis), originándose de este modo células poliploides. Pero la realidad es que las células animales pueden responder también de una manera similar, por lo menos en ciertos casos. Por ejemplo, LEVAN encontró poliploidía inducida por la Colchicina en células de tumor ascitis (14), y más recientemente STUBBLEFIELD (29) ha estudiado un efecto idéntico de Colcemid en cultivos de células del hamster chino. Nosotros hemos visto que los linfocitos humanos estimulados con Fitoheماغlutinina pueden sobrevivir también a la acción del Colcemid (9) y que en los cultivos tratados con esta droga aparecen abundantes células poliploides, 10 a 50 % de las cuales muestran endorreduplicación. Es interesante señalar a este respecto que LEVAN también observó en sus experimentos alguna célula con endorreduplicación, aunque muy raramente.

Admitiendo que ambos tipos de célu-

las poliploides proceden de *c*-mitosis, la diferencia entre aquéllas con los cromosomas distribuidos al azar y las que muestran endorreduplicación podría deberse a que las primeras derivan de *c*-mitosis, que entran en interfase después de la división del centrómero en cada cromosoma, mientras que las endorreduplicaciones derivarían de *c*-mitosis, que entran en interfase sin que se hayan separado las cromátides a nivel del centrómero (9). Las dos cromátides quedarían así una junto a otra en la fase de desespiralización (interfase), y en este estadio, el mecanismo normal de *apareamiento somático* que parece existir durante la interfase (véase la referencia 28) podría ser el principal responsable de la estrecha asociación de aquéllas en toda su longitud, siendo presumible también que dicho mecanismo sea más efectivo en la asociación de cromátides o cromosomas hermanos idénticos que en la de simples cromosomas homólogos.

Sin embargo, LEVAN observó que las *c*-mitosis de las células tumorales entraban en interfase generalmente sin que hubiera tenido lugar la división del centrómero (14). La escasa producción de endorreduplicaciones en dicho material podría explicarse entonces si el mecanismo de apareamiento somático es muy deficiente en la mayoría de las células tumorales o no existe en absoluto en las mismas. También cabría pensar que la Fitoheماغlutinina estimula este mecanismo en los linfocitos.

Si esta hipótesis es correcta, las endorreduplicaciones inducidas por el Colcemid en los linfocitos no cumplen exactamente con la definición de LEVAN y HAUSCHKA (16), ya que estos autores suponen que las dos reduplicaciones que dan lugar a la formación de los diplocromosomas suceden una a continuación de otra en un mismo período de interfase. Pero por otra parte, las endorreduplicaciones espontáneas estudiadas por ellos pudieran originarse también por un

mecanismo similar al que nosotros proponemos, ya que espontáneamente aparecen a veces alteraciones del huso acromático que dan lugar a la producción de aparentes *c*-mitosis y poliploidia (14, 16). Sin embargo, no se pueden excluir otras posibilidades, por ejemplo una alteración de los mecanismos de control celular de la reduplicación de los cromosomas o de aquellos que inician la mitosis cuando una reduplicación se ha completado. El problema necesita posteriores investigaciones.

TRANSMISIÓN DE CARACTERES MORFOLÓGICOS DE LOS CROMOSOMAS DURANTE EL PROCESO DE REDUPLICACIÓN. — Los diplo y cuadruplicromosomas están constituidos por dos y cuatro cromosomas, respectivamente, derivados de reduplicaciones sucesivas de uno original. En consecuencia, este material permitirá discernir entre aquellas características morfológicas que se transmiten en la reduplicación y que, por lo tanto, estarán presentes en todos los cromosomas hermanos, y aquellas otras de aparición no constante que pueden ser simplemente artefactos técnicos. Nosotros hemos estudiado la transmisión de las constricciones secundarias y la de las diferencias de tamaño entre cromosomas homólogos.

Las constricciones secundarias son segmentos específicos de ciertos cromosomas que en metafase aparecen como zonas con heteropicnosis negativa, es decir, más pálidamente teñidas que el resto del cromosoma y muchas veces, aunque no siempre, como segmentos más estrechos (de ahí el nombre de constricciones). En el kariotipo humano, los cromosomas 1, 9, 16 e Y son los que con más constancia muestran constricciones. Sin embargo, las células de un mismo individuo, y aún los cromosomas homólogos de un mismo par, difieren con frecuencia a este respecto.

Puesto que las constricciones secundarias se limitan a ciertos segmentos es-

pecíficos de los cromosomas, hay que admitir que la cromatina de estos segmentos tiene propiedades (estructurales o funcionales) especiales. Pero por otra parte, varios autores creen haber encontrado que la frecuencia de aparición de este fenómeno puede incrementarse mediante ciertos artilugios técnicos (22, 23). En consecuencia, se plantea la duda de si las variaciones en la expresión de la heteropicnosis negativa de unas células a otras son una mera consecuencia de factores técnicos o, por el contrario, son un reflejo del variable estado morfofuncional de dicha cromatina específica en las distintas células.

En los diplo y cuadruplicromosomas, las constricciones secundarias se comportan como un carácter morfológico que se transmite fielmente en la reduplicación. Este hecho está más en consonancia con la segunda interpretación, es decir, que la heteropicnosis negativa es expresión de un estado morfofuncional especial del correspondiente segmento del cromosoma.

Según nuestras observaciones, las diferencias de tamaño entre homólogos se transmiten también durante la reduplicación. Este dato, por lo tanto, tampoco está en desacuerdo con una interpretación funcional de dicho fenómeno (10, 21). Sin embargo, BOCZKOWSKI y TETER (6) y BISHUN y MORTON (5) han publicado fotografías de diplocromosomas en los que parecen existir diferencias de tamaño entre los dos cromosomas hermanos, presentándolas como un argumento en favor de que tales diferencias puedan ser producidas durante las manipulaciones técnicas. Pero en realidad el material estudiado por estos autores es escaso y de mala calidad y en ambos casos, pero especialmente en las fotografías de BISHUN y MORTON, se ve claramente que los diplocromosomas proceden de endorreduplicaciones muy alteradas durante su preparación, con los cromosomas irregularmente extendidos.

En estas circunstancias no es extraño encontrar tales diferencias. BOCZKOWSKI y TETER, por otra parte, pasan por alto una diferencia de tamaño entre los diplocromosomas homólogos del primer par de su fotografía, similar a las que nosotros encontramos y, en este caso, más notable que las otras que señalan.

DISTRIBUCIÓN ESPACIAL DEL DNA SINTETIZADO EN SUCESIVAS REDUPLICACIONES. — Aunque se desconoce la forma en que están dispuestas las moléculas de DNA en los cromosomas, experimentalmente se ha visto (19,30) que en la reduplicación cada cromátide se comporta como si estuviera constituida por dos subunidades funcionales de DNA, las cuales se separan en el proceso y pasan a formar parte de las cromátides hijas unidas a las subunidades de DNA nuevamente sintetizado. Así, cada cromátide hija va a estar constituida por una subunidad antigua y otra nueva, y por lo tanto los cromosomas se reduplican semiconservativamente a un nivel microscópico, de la misma forma que lo hace el DNA a un nivel molecular (17).

Los diplocromosomas se originan en dos reduplicaciones sucesivas y los cuadruplicromosomas en tres. De acuerdo con el modelo semiconservativo, si la Timidina- H^3 es incorporada en el DNA sintetizado durante la última de tales reduplicaciones, todas las cromátides aparecerán marcadas en la metafase siguiente, pues todas tendrán una subunidad de DNA radioactivo. Por el contrario, si la incorporación de la Timidina- H^3 se realiza únicamente durante la primera reduplicación, los diplo y cuadruplicromosomas tendrán marcadas sólo dos de sus cromátides, aquellas que contengan las dos subunidades de DNA que fueron sintetizadas en esta primera reduplicación.

En consecuencia con estas predicciones teóricas, las células estudiadas por nosotros con sólo dos cromátides marcadas deben haber estado en su primer

período de síntesis durante las 6 horas en que la Timidina- H^3 se añadió al cultivo. Puesto que ésta fue sustituida después por Timidina no radioactiva, sólo las dos subunidades de DNA sintetizadas en aquella primera reduplicación estarán marcadas y, por lo tanto, el estudio autorradiográfico de su situación en los diplo y cuadruplicromosomas proporcionará información del modo en que se distribuyen espacialmente las subunidades de DNA en sucesivas reduplicaciones.

Nuestras observaciones en los diplocromosomas indican que esta distribución no se realiza al azar. Como puede deducirse fácilmente, una distribución al azar daría lugar a la aparición de diplocromosomas con las dos cromátides externas marcadas, con una externa y otra interna, o con las dos internas, en proporciones de 25, 50 y 25 % respectivamente. Sin embargo, lo que se observa es una clara predominancia del primer grupo, y una mínima frecuencia de los otros dos. Por otra parte, si se intenta encuadrar en cada uno de estos tres grupos a los diplocromosomas con intercambios de segmentos entre cromátides, las frecuencias reales se alejan aún más de aquellas teorías. Puesto que teóricamente las posibilidades de producción de tales intercambios deben ser las mismas en los tres tipos de diplocromosomas, cabe esperar que el tipo más frecuente habrá contribuido en el mayor número de casos. En la realidad, esta predicción está de acuerdo con los hechos, ya que la mayoría de las imágenes de intercambios podían explicarse satisfactoriamente suponiendo que éstos habían ocurrido en diplocromosomas que originalmente sólo habían tenido marcadas las cromátides externas. En consecuencia, esta distribución parecía ser la regla en la mayoría de los casos.

Resultados similares han sido obtenidos recientemente por WALEN (32) en endorreduplicaciones espontáneas de cul-

tivos de fibroblastos, y por SCHWARZACHER y SCHNEDL (27) en las inducidas por α -mercaptoetanol. Como nosotros, estos autores encuentran también una pequeña proporción de diplocromosomas en los que las cromátides marcadas son una externa y otra interna o, más raramente, las dos internas. Tales excepciones son explicadas suponiendo que el patrón general (cromátides externas marcadas) ha sido modificado posteriormente por rotación de 180° de uno o de los dos cromosomas hermanos del diplocromosoma. Esta interpretación puede ser aplicada también en nuestro material, pero no hay que descartar totalmente otras posibilidades. Por ejemplo, cabría pensar que la segregación del DNA marcado hacia las cromátides externas tiene solamente un carácter preferencial y no es una norma rígida para todos los cromosomas.

No obstante estas excepciones, creemos se puede concluir que la distribución espacial de las subunidades de DNA sintetizadas en las dos reduplicaciones en que se originan los diplocromosomas no se realiza al azar, y además que no existen diferencias a este respecto entre las endorreduplicaciones aparecidas espontáneamente y las inducidas por α -mercaptoetanol o Colcemid. Previamente no habían sido investigados los cuadruplicromosomas. Nuestras observaciones en los mismos proporcionan evidencia de que el reparto selectivo de las subunidades sigue operando también por lo menos durante tres reduplicaciones sucesivas.

En la figura 3 se ha representado esquemáticamente el curso de tres reduplicaciones sucesivas a partir de un cromosoma telofásico (es decir, una cromátide de la metafase precedente), marcando con Timidina- H^3 las subunidades de DNA sintetizadas en la primera de aquellas. En la mitad superior de la figura se ha supuesto que la síntesis de nuevas subunidades en cada cromátide tiene

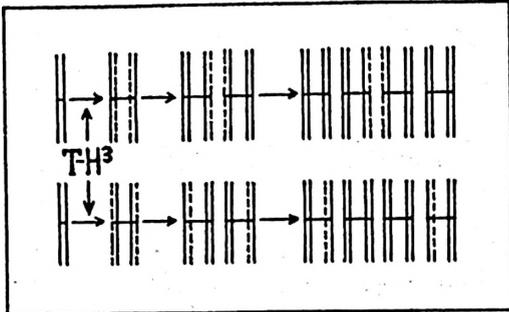


FIG. 3. Representación esquemática del curso de tres reduplicaciones sucesivas, con formación de diplocromosomas (en la segunda) y cuadruplocromosomas (en la tercera). Cada cromátide está representada por dos líneas paralelas que simbolizan las dos subunidades funcionales de DNA de que está formada. Las líneas a trazos simbolizan las subunidades de DNA radioactivo sintetizadas en la primera reduplicación, durante la cual las células incorporaron Timidina- H^3 . Los trazos horizontales representan los centrómeros de cada cromosoma. Para más explicaciones léase el texto.

lugar entre las dos subunidades antiguas, una imagen que nos es familiar por ser la forma en que habitualmente se representa la reduplicación de las moléculas simples de DNA. Sin embargo, puede observarse que en tal caso los diplocromosomas deberían tener marcadas las dos cromátidas internas y lo mismo los cuadruplocromosomas.

Por el contrario, en la mitad inferior de la figura las nuevas subunidades sintetizadas en cada reduplicación se han colocado por fuera de las antiguas, y puede verse que de esta forma los diplocromosomas van a tener marcadas las cromátidas externas y los cuadruplocromosomas las cromátidas internas de los dos cromosomas externos. Puesto que, como hemos visto antes, tal es el patrón de marcaje que aparece preferentemente en la realidad, este tipo de disposición espacial de las subunidades nuevas con respecto a las antiguas explica por el momento los hechos, si bien la

causa de esta selectividad nos es desconocida. Esta debe residir sin duda en alguna característica especial de la estructura íntima del cromosoma, pero en este punto nuestro conocimiento es tan escaso que cualquier hipótesis sería excesivamente aventurada. Sin embargo, como señala WALEN (32), estos hechos deberán ser tenidos en cuenta a la hora de proponer modelos de dicha estructura.

Resumen

Se han estudiado algunas características de las células con endorreduplicación inducidas por el Colcemid en cultivos de linfocitos humanos, discutiéndose los posibles mecanismos de esta inducción. Dichas células son morfológicamente similares a las que aparecen espontáneamente pero con una mayor frecuencia de roturas de cromátides y traslocaciones. Las constricciones secundarias y las diferencias de tamaño entre homólogos son caracteres morfológicos que se transmiten en la reduplicación de los cromosomas, como se deduce del estudio de estos caracteres en los diplo y cuadruplocromosomas.

Quando las endorreduplicaciones se marcan con Timidina- H^3 durante su primer período de síntesis de DNA, los diplocromosomas tienen marcadas preferentemente las dos cromátidas externas y los cuadruplocromosomas las internas de los dos cromosomas hermanos colocados periféricamente.

Estos datos parecen indicar la existencia de una disposición espacial ordenada, y no al azar, de las subunidades de DNA sintetizadas en sucesivas reduplicaciones. Curiosamente, tal disposición no coincide con la que habitualmente se emplea en los esquemas de reduplicación del DNA a nivel molecular.

Summary

Endoreduplication induced by Colcemid in human lymphocytes. Autoradiographic study of the DNA synthesis in diplochrosomes.

A study has been made of some characteristics of cells with endoreduplication induced by Colcemid in cultures of

human lymphocytes, the possible mechanisms of this induction being discussed. The said cells are morphologically similar to those which appear spontaneously, but with a greater incidence of breaks in chromatides and translocations. The secondary constrictions and the difference in size between homologues are morphological characters which are transmitted in the reduplication of the chromosomes, as is deduced from the study of these characters in the diplo- and quadruplochromosomes.

When the endoreduplications are marked with Thymidine- H^3 during their first period of DNA synthesis, the diplochromosomes are more apt to have the two external chromatides marked, and the quadruplochromosomes the internal, of the two brother chromosomes placed peripherally. These data seem to point to the existence of a special disposition, ordered and not haphazard, of the synthesized DNA subunits in successive reduplications. Curiously, such a disposition does not coincide with that which is habitually employed in the reduplication schemes of DNA at the molecular level.

Bibliografía

1. ASPILLAGA, M. J., NEU, R. L., and GARDNER, L. I. : *Lancet*, **1**, 937, 1964.
2. BAIN, A. D., and GAULD, I. K. : *Lancet*, **1**, 936, 1964.
3. BELL, A. G., y BAKER, D. G. : *Exptl. Cell Res.*, **38**, 144, 1965.
4. BIESELE, J. J., SCHMID, W., LEE, C. H., and SMITH, P. M. : *Am. J. Human Genet.*, **14**, 125, 1962.
5. BISHUN, N. P., and MORTON, W. R. M. : *Lancet*, **1**, 1169, 1965.
6. BOCZKOWSKI, K., and TETER, J. : *Lancet*, **1**, 659, 1965.
7. BOTIURA, C., and FERRARI, I. : *Blood*, **21**, 207, 1963.
8. FRACCARO, M., KAIJSER, K., and LINDSTEN, J. : *Ann. Hum. Genet.*, **24**, 45, 1960.
9. HERREROS, B., GUERRO, A., and ROMO, E. : *Lancet*, **2**, 500, 1966.
10. HERREROS, B., ORTIZ, O., BAÑUELOS, J., VELASCO, R., and BOSQUE, P. G. : *Lancet*, **1**, 557, 1964.
11. HSU, T. C., and MOORHEAD, P. S. : *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **63**, 1083, 1956.
12. ISING, U., and LEVAN, A. : *Acta path. microbiol. Scand.*, **40**, 13, 1957.
13. JACKSON, J. F. : *Exptl. Cell. Res.*, **31**, 194, 1963.
14. LEVAN, A. : *Hereditas*, **40**, 1, 1954.
15. LEVAN, A. : *Cancer*, **9**, 648, 1956.
16. LEVAN, A., and HAUSCHKA, T. S. : *J. Nat. Cancer Inst.*, **14**, 1, 1953.
17. MESELSON, M., and STAHL, F. W. : *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **44**, 671, 1958.
18. MOORHEAD, P. S., NOWELL, P. C., MELLMAN, W. J., BATTIPS, D. M., and HUGERFORD, D. A. : *Exptl. Cell. Res.*, **20**, 613, 1960.
19. PRESCOTT, D. M., and BENDER, M. A. : *Exptl. Cell. Res.*, **29**, 430, 1963.
20. REISMAN, L. E., ZUELZER, W. W., and MITANI, M. : *Lancet*, **2**, 1038, 1963.
21. ROMO, E., GUERRO, A., y HERREROS, B. : *R. esp. Fisiol.*, **23**, 19, 1967.
22. SAKSALA, E. and MOORHEAD, P. S. : *Cytogenetics*, **1**, 225, 1962.
23. SASAKI, M. S., and MAKINO, S. : *Am. J. Human Genet.*, **15**, 24, 1963.
24. SASAKI, M. S., FUKUSCHIMA, T., and MAKINO, S. : *Gann*, **53**, 101, 1962.
25. SCHMID, W. : *En Human Chromosome Methodology*. Editado por J. J. Yunis. Academic Press, New York, p. 91, 1965.
26. SCHWARZACHER, H. G., and SCHNEDL, V. : *Cytogenetics*, **4**, 1, 1965.
27. SCHWARZACHER, H. G., and SCHNEDL, V. : *Nature*, **209**, 107, 1966.
28. SHAW, M. W., and COHEN, M. M. : *Genetics*, **51**, 181, 1965.
29. STUBBLEFIELD, E. : *En Cytogenetics of Cells in Culture*. Editado por R. J. C. Harris, Academic Press, New York, p. 223 1964.
30. TAYLOR, J. H. : *En Molecular Genetics*. Editado por J. H. Taylor, Academic Press, New York, Vol. I, p. 65, 1963.
31. VALDMANIS, A., and MAAN, J. D. : *Lancet*, **1**, 1452, 1964.
32. WALLEN, K. H. : *Genetics*, **51**, 915, 1965.