

1.3.4. El CS i l'entrecreuament cromosòmic

En tots els organismes estudiats fins el moment, l'entrecreuament cromosòmic és acompanyat per la presència del complex sinaptinèmic (Westergaard i Von Wettstein, 1972; Gillies, 1975), mentre que en organismes on no es dona la recombinació tampoc no es veu la formació del complex sinaptinèmic (Rasmussen, 1973; Gillies, 1975; Rasmussen i Holm, 1980). Això sembla demostrar que l'aparellament de cromosomes homòlegs amb la formació del complex sinaptinèmic és condició prèvia per a l'entrecreuament.

No obstant, la presència del CS no és una condició suficient perquè tingui lloc la recombinació, com s'ha demostrat en certs organismes (Gillies, 1974; Carpenter, 1979) en què no es detecta recombinació, encara que sí que es forma el complex sinaptinèmic.

Sembla ser, per tant, que en una de les funcions del complex sinaptinèmic en la recombinació seria la d'oferir una base estructural que assegurés que les regions homòlogues del DNA es situïn de forma propera i que es mantinguin així durant un cert espai de temps. Aquesta organització podria facilitar l'intercanvi de DNA a través de la regió central del CS, com indicaria la presència de petits fragments de CS que es conserven fins a metafase I, i una formació anormal del complex sinaptinèmic (Moriwaki i Tsujita, 1974) donaria lloc a una disminució en el nombre de quiasmes (Grell i col., 1972).

Un cop reconeguda la relació entre la recombinació i el complex sinaptinèmic es va intentar localitzar els punts d'entrecreuament amb diferents variants o estructures associades als elements del complex.

Carpenter (comunicació personal a Gillies, 1975) va descriure unes estructures densament tenyides i localitzades en la zona central del complex sinaptinèmic d'ocells de Drosophila melanogaster. Es va suposar que aquestes estructures podrien tenir relació amb l'entrecreuament i se'ls va anomenar "nòduls de recombinació". El nombre de nòduls coincidia amb el de quiasmes detectats a diacinesi i estaven situats a les mateixes zones dels bivalents. Posteriorment la presència d'aquestes estructures va ésser descrita en d'altres organismes per diferents autors (Storms i Hastings, 1977; Zickler, 1977; Gillies, 1979).

En l'espècie humana, l'estudi dels nòduls de recombinació es va dur a terme, per primer cop, per Rasmussen i Holm (1978) en talls seriats d'espermatoïts.

Els nòduls de recombinació apareixen, al microscopi electrònic, com a cossos densos, granuloses i situats a la zona central del CS. La seva mida, forma, densitat i posició en els complexos presenten nombroses variacions (fig. 15).

Segons Rasmussen i Holm (1978, 1980), els nòduls de recombinació s'observen associats a l'element central del CS des de les primeres etapes de zigotè. El nombre de nòduls augmenta al llarg del zigotè i té un màxim al final del zigotè (taula II). Entre el zigotè i l'inici del paquitè s'observa una reducció del 50% i seguidament una quasi total desaparició dels nòduls cap al final del paquitè

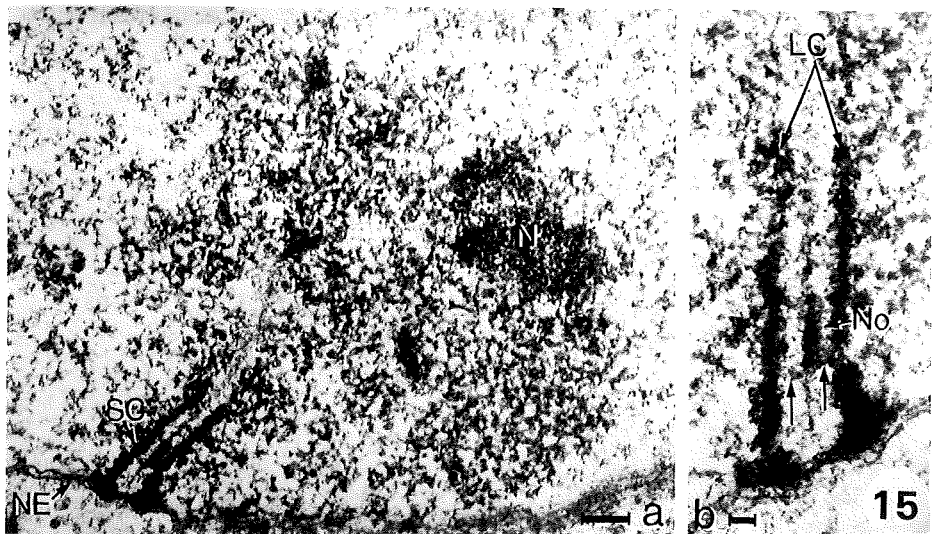


Figura 15a. _Fotografia al microscopi electrònic del bivalent XY en una secció d'un nucli paquitènic humà. CS: complex sinaptinèmic entre XY. NE: embolcall nuclear; N: nuclèol associat al cromosoma Y. 15b) Ampliació del complex sinaptinèmic de la figura 15a. No: nòdul de recombinació associat a l'element central del complex i als elements laterals (LC). (Rasmussen i Holm, 1978).

(Holm i Rasmussen, 1977). Els nòduls observats a paquitè presenten una estructura més engruixida i més densa que en el zigotè, encara que no es coneix el perquè d'aquest canvi.

S'ha trobat una relació directa entre la longitud dels complexos sinaptinèmics i el nombre de nòduls de recombinació per complex. No obstant, una excepció clara d'aquesta regla ens l'ofereix el bivalent XY, que en el seu curt segment de CS acostuma a presentar 1 o 2 nòduls de recombinació.

L'estudi de la distribució dels nòduls de recombinació al larg dels complexos fa la impressió que són a l'atzar, encara que poden ésser destacades algunes característiques (Rasmussen i Holm, 1978, 1980) importants:

- els nòduls són escassos a les regions del cinetocor
- són molt escassos o fins i tot no es troben en els braços curts dels acrocèntrics i en les constriccions secundàries dels bivalents 1, 9 i 16
- són abundants a les zones terminals o subterminals.

Si acceptem que la presència de un quiasme és el resultat d'un entrecreuament, veiem una discrepància entre les dades de la taula II i les aportades per Hultén (1974), fent referència a un promig de 50,6 quiasmes observat a diacinesi. Segons Rasmussen i Holm (1980), la diferència entre el nombre de nòduls a paquitè (75) i el nombre de quiasmes podria ésser deguda a dos motius: la poca resolució del microscopi òptic que no permetria diferenciar entre dos quiasmes molt propers, i la terminalització de quiasmes.

<u>Estadi</u>	<u>Nombre de nòduls</u> <u>per nucli</u>
Zigotè primerenc	21
Zigotè mitjà	60
Zigotè tardenc	101
Paquitè primerenc	75
Paquitè mitjà-tardenc	5 - 10

Taula II. - Nombre de nòduls de recombinació per nucli en espermatòcits humans. (Rasmussen i Holm, 1978).

Per altra banda, la diferència entre el nombre de quiasmes a diacinesi i el de nòduls a zigotè (101) és encara més pronunciada. En aquest cas es postula que tan sols aquells nòduls que participessin directament en l'entrecreuament romandrien associats amb el complex, mentre que els altres es desenganxarien; cosa que explicaria també la reducció al 50% en el nombre de nòduls durant la transició zigotè-paquità.

La composició dels nòduls de recombinació no es coneix, encara que es postula que podrien ser formats per un tipus de proteïnes amb afinitat pel DNA i que fàcilment interaccionarien amb la DNA-polimerasa, ligasa i nucleases de recombinació, facilitant així l'acció coordinada d'aquests enzims (Mosing i col., 1977).

Així doncs els nòduls realitzarien dues funcions en la recombinació: aportar la majoria de la maquinària enzimàtica i estructural per a l'intercanvi i alhora actuar com a diana per a la regulació de la recombinació gènica (Rasmussen i Holm, 1980).

Recentment Solari (1980) ha descrit la presència d'uns cossos comparables als nòduls en extensions d'espermàtòcits humans a paquità (fig. 16). Aquestes estructures, anomenades "barres", tenen una mida i forma quelcom diferent dels nòduls, encara que la seva situació en els bivalents és similar. Són una mica més ben definits que els nòduls, el seu promig per nucli és de 46.2 i per tant proper al promig de quiasmes 50.6 (Hultén, 1974) i la seva localització també és molt similar a la dels quiasmes definida per Hultén.

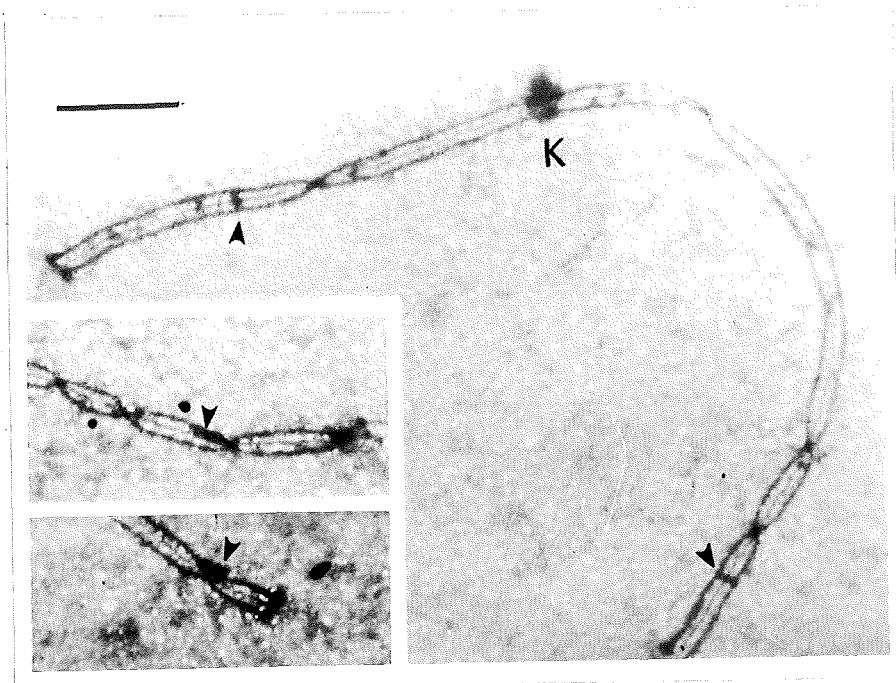


Figura 16.- Complex sinaptinèmic autosòmic vist amb microscopi electrònic, d'un nucli paquitènic d'espermatòcit humà. Les fletxes assenyalen les "barres" de recombinació. K: cinetocor. (Solari, 1980).

Podria ésser que els nòduls de recombinació de Rasmussen i Holm (1978) incloguessin les barres definides per Solari, junt amb altres estructures integrants del CS, ja que les característiques de resolució de les dues tècniques emprades són molt diferents.

Solari (1970) i Holm i Rasmussen (1977) van descriure la presència de fragments intactes de complex entre els bivalents cromosòmics a l'estadi de metafase I. L'exacta funció d'aquests fragments no es coneix, encara que es suposa que podrien ésser troços retinguts per intervenir en un entrecreuament i per tant serien la representació ultras-structural dels quiasmes.

Si tenim en compte les dades de Hultén (1974) sobre el promig de quiasmes per cèl.lula (50.6) i el nombre de fragments de CS observats per nucli (32-43) veiem una certa correspondència i la petita diferència observada podria ésser deguda a l'inici de desintegració dels CS o a fusió de fragments de CS (Rasmussen i Holm, 1978, 1979).

L'anàlisi a fons dels fragments de complexos observats a metafase I va demostrar que estaven desproveïts de nòduls. Sembla ésser per tant que l'eliminació dels nòduls és total a paquità mitjà, immediatament després que tingui lloc la recombinació.

1.3.5. Els CS i les reorganitzacions cromosòmiques

El complex sinaptinèmic ens ofereix una representació esquemàtica del comportament cromosòmic a profase. Qualsevol anomalia estructural que pugui afectar a l'aparellament cromosòmic (translocacions, inversions, duplicacions,

etc...) es veu reflexada en una determinada morfologia del CS.

L'estudi d'aquestes anomalies mitjançant el comportament dels complexos sinaptinèmics s'ha dut a terme quasi exclusivament en animals d'experimentació; principalment amb microscopi electrònic (Comings i Okada, 1971; Moses, 1977a; Moses i col., 1975, 1979; Rusell i col., 1975; de Boer i Branje, 1979; Poorman i col., 1981; Moses i Poorman, 1981) i més recentment en uns pocs estudis amb microscopi òptic (Pathak i Lin, 1981; Forejt i col., 1981).

Els estudis de complexos sinaptinèmics en les re-estructuracions cromosòmiques ens permeten la caracterització d'anomalies que podrien passar inadvertides per afectar petits fragments cromosòmics (duplicacions, inversions, delecions ...) i que no podrien ser detectades en metafase I. Per altra banda, una de les aportacions importants de l'estudi de CS es dona en els individus portadors de fusions cromosòmiques, com demostren Moses i col., (1979), ja que ens permet analitzar el tipus d'orientació centromèrica en l'aparellament del trivalent, configuració cis o trans, i per tant preveure el percentatge de formació de gamets desequilibrats (configuració trans).

En l'espècie humana són pràcticament nuls els estudis de complexos sinaptinèmics en individus portadors d'anomalies estructurals; es redueixen pràcticament al realitzat per Rasmussen i Holm (1978) amb microscopi electrònic, en talls seriats, i posterior reconstrucció tridimensional d'espermatozòits d'un individu 46,XY, t(5p-; 22p+), i es limita tan sols a la descripció dels CS en el quadrivalent.

1.4. Infertilitat d'origen cromosòmic

Des que Mc Ilree i col. (1966) varen descriure la presència d'anomalies meiòtiques en un individu subfèrtil, els estudis meiòtics han anat adquirint un progressiu interès, en oferir-nos una important informació en els estudis d'infertilitat masculina.

Un cop establert que hi ha anomalies cromosòmiques que poden ésser causa d'infertilitat, s'han dut a terme en els darrers anys diferents tipus d'estudis meiòtics en pacients infèrtils, (Pearson i col., 1970; Hultén i col., 1970; Chandley i col., 1972, 1975, 1976; Skakkebaek i col., 1973; Luciani i Stahl, 1978; Templado i col., 1976, 1978, 1980, 1981; Chaganti i col., 1980 ..) a fi d'intentar caracteritzar l'etiologia de la seva infertilitat.

Les alteracions que poden afectar el comportament meiòtic s'han agrupat en dos grans blocs:

- alteracions cromosòmiques, estructurals o numèriques, que també poden ésser detectades en cèl.lules somàtiques. La seva freqüència entre individus infèrtils és del 2.2% fins el 19% si s'inclou el Síndrome de Klinefelter (Chandley, 1979)
- alteracions limitades a la línia germinal, degudes a mutacions meiòtiques que afecten principalment al procés d'aparellament cromosòmic, i que tan sols poden ésser detectades en un estudi meiòtic. A les sèries estudiades la seva freqüència varia entre el 2% i el 4% (Koulischer i Schoysman, 1974; Ferguson-Smith, 1976; Templado, 1981).

Els estudis meiòtics es duen a terme generalment a metafase de la primera divisió meiòtica. S'analitzen les configuracions cromosòmiques obtingudes, que ens donaran idea de les possibles alteracions cromosòmiques de què l'individu sigui portador, i es realitzen recomptes de quiasmes.

Tenint en compte els estudis cromosòmics fets al llarg d'aquests darrers anys (Hultén i col., 1970; Pearson i col., 1970; Dutrillaux i Guéguén, 1971; Chandley i col., 1976, 1981; Templado, 1981; Templado i col., 1976, 1978, 1980, 1981) les principals anomalies associades a la infertilitat masculina poden classificar-se segons l'esquema de la pàgina 58.

Tots els tipus d'anomalies descrites poden ser causa d'infertilitat degut principalment a dos mecanismes:

- producció de gamets desequilibrats que poden ser inviables, no fecundants, o donar lloc a la formació de zigots anormals que poden provocar avortaments espontanis
- provocar un bloqueig, més o menys dràstic, en el procés meiòtic en qualsevol de les seves fases, que es manifestaria per una reducció en el nombre d'espermatozous produïts.

La producció de gamets desequilibrats pot produir-se degut a la divisió d'espermatòcits primaris portadors d'anomalies cromosòmiques (el 2.2% segons Chandley, 1979), o bé degut a errors de formació de bivalents que predisposaria a una distribució a l'atzar de cromosomes en metafase I i per tant afavoriria una disjunció anormal.

Tenint en compte les dades aportades per Mc Dermott (1974), Hendry i col., (1976); Miçiç i col., (1978) i les recents de Templado (1981) i Templado i col., (1981), aproximada-

Numèriques: monosomies, trisomies, etc...

Estructurals: inversions, translocacions, etc...

- Numèriques

- Estructurals

Anomalies cromosòmiques

- Desinapsi

Profases amb vesícula sexual, anomalies d'aparellament a metafase I i baixa freqüència de quiasmes.

Anomalies d'aparellament a meïosi

- Asinapsi

Profases sense vesícula sexual, anomalies d'aparellament desde inici de profase I i baixa freqüència de quiasmes a metafase I

Amb fragmentació

Completa
Afecta a tots els bivalents

Sense fragmentació

Total

Parcial

Individual
Afecta a algun bivalent

Total: totes les cèl.lules afectades

Parcial: alguna cèl.lula afectada

ANOMALIES DETECTABLES EN

CÈL.LULES SOMÀTIQUES

ANOMALIES DETECTABLES EN

CÈL.LULES GERMINALS

ment un 15.2% d'individus infèrtils estudiats cromosòmicament presenten un bloqueig a metafase I i un 12.7% a paquitè. En tots els casos presentats, el bloqueig de l'espermatoogènesi va associat a un error en l'aparellament cromosòmic, que pot afectar tots els bivalents o tan sols alguns d'ells (esquema pàg. 58).

Per tant, agrupant les dades anteriors, obtenim que aproximadament en el 30% de pacients infèrtils per causes cromosòmiques el motiu de la seva infertilitat podria anar lligat a mecanismes d'aparellament cromosòmic. Això representa que qualsevol estudi del procés meiótic en aquests individus s'hauria de dur a terme en l'etapa en què té lloc l'aparellament cromosòmic, o sigui a profase I, i més concretament a nivell de complexos sinaptinèmics, ja que com hem vist en l'apartat 1.3. els CS són la representació linial del comportament dels bivalents a profase i per tant la seva anàlisi és l'única que ens permet aprofundir en l'estudi de la sinapsi cromosòmica.

Fins el moment, els estudis de CS en relació amb l'infertilitat masculina són pràcticament nuls, es limiten tan sols als treballs presentats per Hultén i col., 1974; Ferguson-Smith, 1976; i Chaganti i col., 1980, en els quals es fa referència a una possible formació anormal del complex sinaptinèmic en individus amb una baixa freqüència de quiasmes i anomalies d'aparellament a Metafase I.

L'estudi dels complexos sinaptinèmics en els individus portadors de translocacions recíproques o de fusions centríques és important. S'ha demostrat que el pronòstic per a aquestes anomalies depèn del comportament meiótic del

tetravalent o trivalent format (Lindenbaum i Brobow, 1975; Chandley i col., 1976), i en aquests casos l'estudi de CS permetria caracteritzar més fàcilment i acurada la geometria de l'aparellament cromosòmic.

No obstant la importància de la informació que ens ofereixen en els estudis d'infertilitat, l'estudi de complexos sinaptinèmics s'ha dut a terme en molt poques ocasions, degut possiblement a les dificultats que presenten les tècniques de microscopia electrònica descrites fins ara per al seu estudi.

1.5. Objetius de la Tesi

Els objectius que es pretenien al realitzar aquest treball es poden resumir en els punts següents:

- a) la posada a punt, per a l'estudi de biopsies testiculars humanes, de les tècniques descrites per Fletcher (1979) i Pathak i Hsu (1979) que permeten l'observació de complexos sinaptinèmics amb microscopi òptic
- b) establir els diferents estadis de la profase meiótica a partir dels estudis de complexos sinaptinèmics amb microscopi òptic
- c) obtenir el cariotip de complexos sinaptinèmics amb microscopi òptic a partir d'extensions de nuclis paquí-tènics
- d) conèixer l'activitat meiótica a profase I i analitzar la morfologia, estructura i comportament dels complexos sinaptinèmics en els individus infèrtils estudiats
- e) detectar qualsevol anomalia del complex sinaptinèmic que pugui ser causa d'infertilitat i establir-ne la incidència en la població d'individus infèrtils
- f) obtenir una informació més profunda dels mecanismes d'aparellament cromosòmic
- g) i per últim, comparar els resultats obtinguts en l'anàlisi de complexos sinaptinèmics amb els convencionals, a nivell cromosòmic, i evaluar-ne la importància en l'estudi de la infertilitat masculina.

2. MATERIALS I MÈTODES

2.1. Material d'experimentació

Els estudis meiòtics (convencionals i de complexos sinap-tinèmics) s'han dut a terme en una sèrie de 117 individus (taula III).

Tots els individus infèrtils estudiats presentaven un fenotip normal.

En tots ells, paral·lelament, es va realitzar un seminograma. En la seva major part aquests individus presentaven una alteració en un o més dels tres principals paràmetres a tenir en compte en aquesta anàlisi: motilitat, nombre i morfologia dels espermatozous.

En tots els individus estudiats el material utilitzat provenia de biopsies testiculars.

Les mostres de biopsies analitzades provenien de la consulta d'Andrologia de la Fundació Puigvert o del Centro de Estudios Andrológicos, tots dos de Barcelona.

- Individus control 6
(cromosòmicament normals i de fertilitat coneguda)
- Individus infèrtils
- cromosòmicament normals 108
- portadors d'anomalies cromosòmiques 3
(1 individu mosaic Klinefelter 46,XY/47,XXY
1 individu portador de una translocació 13/14
1 individu portador de una translocació 14/21)

Taula III: Individus estudiats

2.2. Material de laboratori

2.2.1. Productes utilitzats

Fixador: - Carnoy: Metanol - Ac. acètic, 3:1
 - Formaldehid

Es dissol el formaldehid al 9% en aigua destil.lada.

S'ajusta el pH a 9.0 amb una sol.lució 1N de NaOH.

Colorants: - Leishman al 2% en tampó Leishman de pH 6.8
 - Nitrat d'argent al 70% en aigua destil.lada
 - Nitrat d'argent al 50% en aigua destil.lada
 - Giemsa Merck al 10% en tampó Sørensen pH 6.8.

Sol.lucions salines: - Tampó Leishman pH 6.8 (BDH Lab.)
 - Tampó Sørensen pH 6.8

KH_2PO_4 9.078 g.

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 11.876 g.

H_2O destil.lada 2 litres

- KCl 0.038M

Altres sol.lucions: - Sèrum fetal de vedella (Gibco)

- F-10 (Gibco)

- NaOH 1N

- Formalina al 3% en solució aquosa

- Sacarosa 0.2M.

2.2.2. Material fotogràfic

Revelador: VALCA

Es fa servir en una proporció 1:19 (revelador: aigua) per als negatius.

Es fa servir en una proporció 1:9 (revelador: aigua) per als positius.

Bany d'atur: Ac. acètic glacial en solució aquosa al 5%.

Fixador: VALCA

Es fa servir en una proporció 1:4 (fixador: aigua) per a negatius i positius.

<u>Pel·lícules:</u>	-- COPEX PAN	12 DIN	AGFA-GEVAERT
	-- PAN ATOMIC X	16 DIN	KODAK
	-- AGFACHROME 50L	18 DIN	AGFA-GEVAERT
	-- PAN ATOMIC X	16 DIN	KODAK

Paper per a positius: --AGFA-GEVAERT Brovira--BS1 no 2
 --AGFA-GEVAERT Brovira--BN1 no 3
 --AGFA-GEVAERT Brovira--BH1 no 4

2.2.3. Aparells

- Agitador magnètic IKA WERK
- Agitador de tubs MIXO TUB
- Ampliadora DURST M 800; 65x90mm Neg Format 2½ x 3½ mm
- Balança (pes màxim 150 gr.) SARTORIUS
- Bany maria SELECTA

- Cambra estèril de flux laminar
- Cambra Orthomat per a microfotografia LEITZ
- Centrifugadora JANETZKI TS
- Esmaltadora fotogràfica ZAIK
- Estufa de cultius SELECTA
- Estufa MEMMERT (0°C - 120°C)
- Estufa de dessecació HERAEUS
- Estufa de dessecació MEMMERT
- Frigorífic PHILLIPS
- Microscopi LEITZ DIALUX 20 EB
- Microscopi LEITZ ORTHOLUX

2.3. Metodologia experimental

2.3.1. Obtenció de mostres

Les biopsies testiculars, obtingudes per escissió i amb anestèsia local, es divideixen en dos fragments.

L'un es recull en un flascó amb 5 ml. de solució hipotònica (K Cl, 0.038 M) i es tractarà per a dur a terme l'estudi meiótic convencional.

L'altre es col·loca en un flascó amb 5 ml. de medi de cultiu i ens servirà per realitzar l'estudi dels complexos sinaptinèmics.

Es adequat procedir al tractament de les biòpsies tan aviat com puguem; no obstant, es poden guardar dins la nevera a 4°C durant un curt espai de temps (24 h) sense afectar la qualitat de les preparacions a obtenir.

2.3.2. Composició del medi de cultiu

- 80% F-10 (Gibco), medi utilitzat normalment per a cultius de cèl·lules; conté: sals minerals, aminoàcids essencials i no essencials, precursors del DNA i fraccions proteiques purificades.

- 20% sèrum fetal de vedella (Gibco).

Aquest medi no conté cap tipus d'estimulador ni d'antibiòtics; és una solució isotònica i el seu pH és de 7.3-7.4.

2.3.3. Obtenció de les preparacions

- Les preparacions cromosòmiques s'obtenen pel mètode d'eixugat a l'aire (Evans i col., 1964; Ferguson-Smith, 1964; Sasaki i Makino, 1965; Hultén i col., 1966; Ford i Evans, 1969; Hungerford i col., 1971a).

- La metodologia emprada per a l'estudi de complexos sinaptinèmics a microscopi òptic és una modificació de les descrites per Fletcher (1979), Pathak i Hsu (1979) i Pathak i Elder (1980).

En aquest treball s'han fet servir bàsicament les tècniques d'estudi de complexos sinaptinèmics i l'estudi cromosòmic s'ha dut a terme com a comparació de les dades obtingudes a través dels CS.

2.3.3.1. Estudi de complexos sinaptinèmics

- Un cop obtinguda la biòpsia, es col·loca el fragment sobre un vidre de rellotge amb medi de cultiu. Amb l'ajut d'unes tisores de dissecció es tallen els túbuls fins aconseguir que quedin ben trocejats i que s'alliberin del major nombre possible de cèl·lules.

- La suspensió de cèl·lules es recull amb una pipeta Pasteur i es posa dins un tub de centrifugació, es pipeteja una estona per afavorir que les cèl·lules que encara són enganxades es desenganxin.

- Durant aproximadament 3 minuts deixem sedimentar els fragments de túbuls i recollim el sobrenedant en un tub de centrifugadora net.

- Centrifuguem durant 5 min. a 800 r.p.m., decantem el sobrenedant, resuspenem les cèl.lules del botó, afegim 3-5 ml. de medi de cultiu i repetim la centrifugació.

Cal rentar 3 o 4 cops amb medi de cultiu per aconseguir eliminar els restes o brutícies que poguessin trobar-se a la suspensió cel.lular.

- A l'última centrifugació, es decanta el sobrenedant i es resuspèn el botó en 0.5 - 1 ml. de medi.

- Les extensions s'obtenen fent servir com a solució d'extensió sacarosa 0.2 M.

En aquesta tècnica la sacarosa, a més de servir-nos de pel.lícula d'extensió, actua com a medi hipotònic per tal d'inflar les cèl.lules a estudiar. Formem una bombolla de solució d'extensió sobre un troç de Parafilm amb aproximadament 2-3 ml de sacarosa.

Amb l'ajut d'una Pipeta Pasteur, recollim part de la suspensió cel.lular i deixem caure 1 o 2 gotes sobre la bombolla d'extensió.

Deixem que les cèl.lules s'estenguin per la superfície, durant aproximadament 1 min., i després passem a recollir-les tocant lleugerament la superfície de la bombolla amb un portaobjectes.

Les preparacions es deixen eixugar a l'aire durant 10 min, per aconseguir que el màxim de cèl.lules s'enganxin al vidre.

Per obtenir bones extensions és important fer servir portaobjectes ben desengreixats; per això nosaltres els mantenim en acetona fins el moment d'utilitzar-los, en què els eixugarem amb un drap de cotó.

- La fixació del material es fa amb formaldehid al 9% en aigua destil·lada. El pH del fixador s'ajusta fins a 9.0 amb una solució de NaOH 1 N.

Els portaobjectes s'introdueixen seguidament dintre d'una cubeta plena amb formaldehid i es deixen en fixador durant 10 min.

Per aconseguir una bona fixació i obtenir nuclis de bona qualitat cal tenir en compte el pH del fixador i aquest s'ha de preparar de nou cada cop que es fa servir.

Sembla que degut a la basicitat del fixador s'aconsegueix una extracció o desnaturalització del DNA; obtenim així els complexos sinaptinèmics sense el seu embolcall de fibres de DNA.

- Es treuen les preparacions un cop fixades i es renten amb una solució de Photofló (Kodak) al 0.4% durant 30 seg. Les preparacions així obtingudes es deixen assecar a l'aire.

- Solem obtenir unes 8 preparacions per mostra, que es poden tenyir directament.

2.3.3.2. Estudi cromosòmic

- Es col·loca la biòpsia sobre un vidre de rellotge amb una solució hipotònica (KCl 0.038M) i es procedeix igual que a l'apartat anterior: trocejem, recollim la suspensió, la col·loquem en un tub de centrifugació, deixem sedimentar els túbuls, recuperem el sobrenedant i fem una primera centrifugació a 800 r.p.m. durant 5 min.

Decantem el sobrenedant i en el botó tenim les cèl·lules que cal fixar amb Carnoy (Metanol-acètic, 3:1).

- Les cèl·lules resuspeses en Carnoy (aprox. 3 ml) es mantenen durant 30 min. a 4°C.

- Un cop fixades les cèl·lules, centrifuguem (5 min. a 800 r.p.m.).

- Rentem tantes vegades com sigui necessari amb fixador fins obtenir una suspensió neta.

Els rentats es fan resuspenent en fixador, centrifugant i decantant el sobrenedant, que és el que porta les restes de citoplasma.

- Un cop net, es resuspen el botó en algunes gotes de fixador tot just preparat i es fan les extensions sobre portaobjectes ben nets i desengreixats.

- Obtenim unes 8 preparacions que es deixen assecar a l'aire i es poden tenyir directament.

2.3.4. Tècniques de tinció

2.3.4.1. Tinció de complexos sinaptinèmics

En aquesta tesi, i per a la identificació dels complexos sinaptinèmics, s'ha utilitzat exclusivament la tècnica de tinció amb argent:

2.3.4.1.1. Metodologia

Es presenten dues alternatives quant a la seva metodologia:

- a) la tècnica de Fletcher (1980) que fa servir tan sols nitrat d'argent i
- b) la de Pathak i Elder (1980) modificada per nosaltres, que combina la tinció amb nitrat d'argent i l'acció d'un revelador.
 - a). Es posen 2 o 3 gotes de solució de AgNO_3 , al 70%, en aigua destil·lada, sobre els portaobjectes.
 - . Es posa un cobreix-objectes i s'emplacen les preparacions dins una placa de Petri damunt dues barretes de vidre. El fons de la càpsula es tapa amb paper de filtre i es mulla per aconseguir un ambient humit durant la tinció.
 - . S'incuben al forn a 60°C durant 12-16 hores. Passat aquest temps es renten amb aigua i es deixen assecar

a l'aire.

- . Un cop eixutes es fa una lleugera tinció de contrast amb Leishman al 2%, en Leishman buffer, durant 2 min.
- b). Es procedeix de forma similar a la descrita anteriorment però tenint en compte les modificacions següents:
 - . Es fa servir AgNO_3 , al 50% en aigua destil.lada, i s'hi afegeixen unes gotes de formalina al 3% en aigua destil.lada (2 gotes de formalina per mililitre de solució d'argent).
 - . S'incuben les preparacions en les mateixes condicions que en l'apartat anterior, però a 65°C i durant 1-2h., controlant el grau de tinció.
 - . Es renten i tenyeixen amb Leishman al 2% seguint el protocol anterior.

En ambdós casos, si l'exposició ha estat bona els CS apareixen de color marró fosc i les restes de DNA d'un marró clar. En la majoria dels nuclis, els CS són fàcilment identificables per la seva mida i per la posició del cinetocor. Si l'exposició ha estat massa llarga es troben taques de precipitats d'argent embrutant les preparacions, els CS i les restes de DNA apareixen tenyits de color marró fosc i no es poden diferenciar. Si el tractament ha estat insuficient serà molt difícil distingir els CS. En aquest últim cas es pot repetir la tinció fins aconseguir una bona exposició.

Nosaltres hem fet servir les dues tècniques, però actualment estem utilitzant la segona i ens dóna molt millors resultats, ja que podem controlar millor el grau de tinció de les preparacions, i aquestes poden ésser estudiades a les poques hores d'obtenir el material.