

Estudios fotobiológicos en el *Hydroa vacciniforme*

Mario Lecha Carralero

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tesisenxarxa.net) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tesisenred.net) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tesisenxarxa.net) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

Universidad de Barcelona
Facultad de Medicina

ESTUDIOS FOTOBIOLOGICOS EN EL HYDROA VACCINIFORME

Mario Lecha Carralero

Resumen de la tesis presentada para aspirar al grado de Doctor

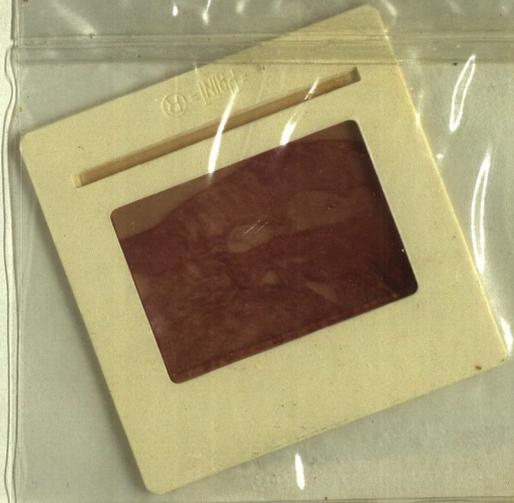
Octubre 1976

PANORAMICA LESIONES DERMO-EPIDERMICAS - FASE FINAL

A)



B)



C)



FORMACION DOBLE AMPOLLA

c) Estudio fotobiológico

La exploración de estos enfermos permitió obtener los siguientes

Determinación del

A) todos los enfermos situándose el ESD en un

La administración de respuestas normales tanto en piel cubierta habitualmente como en piel descubierta, excepto en los casos 1, 6 y 7 en que la respuesta fué edematosa (papulosa) al bien no se pudo constatar ninguna lesión específica que pudiera considerarse como reproducción de la lesión

Acción

y WG)(Monómetro tipo prisma - Regua, 1.4 y 0.15.). El estudio de la sensibilidad de estos enfermos a las diferentes longitudes de onda de espectro efectuadas según permitieron establecer la los casos nos. 1, 4, 6, el umbral crítico era de $1.4 \text{ cm} \cdot 1.25 \times 10^2 \text{ } \mu\text{W/cm}^2/\text{seg}$ la resp

Estos resultados de la clínica no aportan co no vemos ningún dato definitivo sobre la etiopatogenia del hidrox y en es te resultado decepcionante de la exploración fotobiológica coincidimos con otros autores (Mac Ghee y Percy, Jaschke, Reinker y Friisch) que afirman que hasta ahora no se ha demostrado en todos los casos de Hidrox pa-



c) Estudio fotobiológico

La exploración fotobiológica practicada en nuestros enfermos permitió obtener los siguientes resultados.

Determinación del MED: (Luz policromática - Lámpara de Hanovia 150 W). En todos los enfermos la determinación del MED dió resultados normales situándose el MED en umbrales normales (15" - $1,65 \times 10^2 \mu\text{W}/\text{cm}^2/\text{seg}$).

La administración de DED (120" - $8 \times 1,65 \times 10^2 \mu\text{W}/\text{cm}^2/\text{seg}$), dió lugar a respuestas normales tanto en piel cubierta habitualmente como en piel descubierta, excepto en los casos 1, 6 y 7 en que la respuesta fué edematosa (papulosa) si bien no se pudo constatar ninguna lesión específica que pudiera considerarse como reproducción de la lesión.

Acción espectro: (Lámpara de Hanovia 150 W - Filtros Schott Serie UG y WG)(Monocromator tipo prisma - Magnus, I.A. y cols.). El estudio de la sensibilidad de estos enfermos a las diferentes longitudes de onda de espectro efectuadas según las condiciones de nuestras instalaciones no permitieron establecer la existencia de sensibilidades anormales excepto en los casos nos. 1, 4, 6, 7 y 10 en los que en la banda 290-320 nm. si bien el umbral eritema era normal (10" - distancia f - P 4 cm. - $1,25 \times 10^2 \mu\text{W}/\text{cm}^2/\text{seg}$) la respuesta era eritemato-edematosa.

Estos resultados de la exploración fotobiológica clínica no aportan como vemos ningún dato definitivo sobre la etiopatogenia del hydroa y en este resultado decepcionante de la exploración fotobiológica coincidimos con otros autores (Mac Grae y Percy, Jaschke, Reinker y Frisch) que afirman que hasta ahora no se ha demostrado en todos los casos de Hydroa pu-

EXPLORACION FOTOBIOLOGICA

CASO	MED	DED	ACCION ESPECTRO
1	NORMAL	RESPUESTA PAPULOSA	HIPERSENSIBILIDAD A 280-320 NM
2	NORMAL	NORMAL	NORMAL
3	NORMAL	NORMAL	NORMAL
4	NORMAL	NORMAL	HIPERSENSIBILIDAD A 280-320 NM
5	NORMAL	NORMAL	NORMAL
6	NORMAL	RESPUESTA PAPULOSA	HIPERSENSIBILIDAD A 280-320 NM
7	NORMAL	RESPUESTA PAPULOSA	HIPERSENSIBILIDAD A 280-320 NM
8	NORMAL	NORMAL	NORMAL
9	NORMAL	NORMAL	NORMAL
10	NORMAL	NORMAL	HIPERSENSIBILIDAD A 280-320 NM

blicados ninguna alteración objetiva de la sensibilidad a la luz en vivo, con una mayoría de pruebas fotobiológicas normales.

Las alteraciones mínimas halladas correspondientes a las respuestas papulosas señaladas para los casos 1, 4, 6, 7 y 10 frente a las radiaciones de 290-320 nm. que corresponden sin embargo a umbrales normales. Estas alteraciones pueden superponerse al hallazgo de Schiff y Jillson aunque evidentemente es difícil comparar objetivamente exploraciones fotobiológicas diversas dada la diferencia de condiciones en que suelen practicarse.

Como observación final quisiéramos indicar que evidentemente el resultado de la exploración fotobiológica en cada caso depende del momento en que se practica puesto que la sensibilidad del enfermo puede variar extremadamente según la localización de las pruebas y la evolución de la misma entidad. Para explicarlo en forma más clara, el fenómeno fotobiológico en el hydroa dependería de factores comparables a los que se presentan en los casos de porfiria y que determinan que también en estos enfermos si bien es incuestionable la fotosensibilidad, ésta no sea demostrable en todo momento.

Debemos concluir por tanto que no hemos podido establecer ningún patrón de fotosensibilidad fijo y específico de esta entidad.

d) Otras exploraciones

En relación a otras posibles exploraciones en estos enfermos creimos que el problema debía centrarse ante todo en las determinaciones de porfirinas por la simple razón que la ausencia de alteración en el metabolismo de las mismas constituye un parámetro primordial del diagnóstico del hydroa. Además a lo largo de la historia de esta entidad, como ya hemos visto, el metabolismo de las porfirinas ha sido materia de gran discusión en torno a la naturaleza etiopatogénica de esta entidad, especialmente desde que Fischer afirmó que "no había hydroa sin porfirinuria", afirmación que no ha podido ser totalmente rebatida hasta ahora (Mc Grae y Percy 1963) (100).

En nuestro servicio disponemos de un laboratorio especializado en la determinación de porfirinas Técnica de Rimington (127).

Se efectuaron en todos nuestros enfermos screenings completos de porfirinas en orina, sangre y heces. Determinaciones que siempre dieron resultados normales.

Otro punto de controversia en relación con el hydroa lo constituye también la alteración del metabolismo aminoácido. Evidentemente dado que el problema etiopatogénico del hydroa parece insoluble y dado que también parece evidente su relación con el factor radiación lumínica, es lógico suponer que todos los autores que han trabajado en este tema han intentado por lo menos determinar una posible relación de este proceso con alteraciones metabólicas que pudieran condicionar fotosensibilidad, cuales son además del metabolismo porfirínico que ya hemos mencionado, el metabolismo de los aminoácidos. Como sea que en investigaciones amplias realizadas en enfermos fotosensibles se han observado alteraciones especialmente del metabolismo de la histidina, con excreción urinaria elevada de la misma que algunos autores (132, 133) quieren relacionar con el ácido urocánico, sus-

OTRAS EXPLORACIONES

CASO	PORFIRINAS sangre	orina COPROPORFIRINA 36 y 124 HORAS	heces COPROPORFIRINA 7y15: PROTOPORFIRINA 40 y 15:	AMINOACIDURIA
1	—	—	—	—
2	—	—	—	—
3	—	—	—	—
4	—	—	—	—
5	—	—	—	↑ 4-METIL - HISTIDINA 3-METIL - HISTIDINA VALINA METIONINA TIROSINA
6	—	—	—	↑ HISTIDINA
7	—	—	—	—
8	—	—	—	—
9	—	—	—	—
10	—	—	—	—

tancia que actúa como absorbente de radiación U.V. en la capa córnea. Hemos efectuado estas determinaciones en nuestros enfermos con los resultados siguientes:

No se observa ningún patrón de alteración excretoria de aminoácidos que permita caracterizar al Hydroa ni permita superar la acción patogénica de una alteración metabólica de aminoácidos.

Las alteraciones halladas en dos de nuestros enfermos no pueden considerarse como valorables por su inconstancia.

e) Estudio de los mecanismos de reparación del DNA

Para realizar el estudio del estado de estos mecanismos en nuestros casos de Hydroa (casos escogidos Nos. 4, 5, 6, 7, y 8) hemos procedido según los métodos de Cleaver J.E. (1), establecidos para el estudio del Xeroderma pigmentosum.

Para poner en práctica dicha técnica se requiere el establecimiento de cultivos de fibroblastos técnica que se describe a continuación:

Cultivo de fibroblastos

Para proceder al cultivo de fibroblastos hemos utilizado las técnicas y procedimientos empleados por Cleaver (1) y más tarde por Reed, Landing, Sugarman, Cleaver y Melnyk (2) y Goldstein (3), Goldstein Littlefiel, Soeldner (123) y Cleaver (67).

Método.- Para establecer el cultivo se utiliza dermis procedente de una biopsia cutánea de piel normal, recogida en condiciones de absoluta esterilidad. De la misma se recorta y elimina el tejido graso y epidermis y la dermis aislada se fragmenta en pequeñas porciones con unas tijeras. Los fragmentos se implantan en el fondo de un frasco de cultivo tipo Falcon. Una vez depositado se añade a cada frasco una pequeña cantidad (1 -2 cc.) de medio de cultivo: El medio empleado por nosotros es el siguiente (De Vries (124)):

Para 1.000 cc.: M.E.M. (DIFCO) - 95 gra.

Rojo Fenol (DIFCO) - 0,02 grs.

HEPES Buffer (GIBCO) - 10 cc.

Penil-Estreptomicina 100.000 u.u.

Suero AB

L-Glutamina (GIBCO) 10 cc.

Este medio de cultivo se equilibra a pH 7.4 alcalinizando si es preciso con solución acuosa de NaOH 1N o se acidifica con Hepes Buffer.

Durante la primera semana se cambia el medio de cultivo diariamente añadiendo cantidades progresivas de medio de cultivo. Así el primer día se añade 0.5 cc. Se procura que esta cantidad de medio de cultivo impregne todo el fondo del frasco y seguidamente se deja este en posición vertical para permitir una mejor adherencia de los fragmentos de dermis al fondo. A las 24 horas se ha producido ya la adherencia. Se cambia el medio añadiendo 1 cc. y se ponen los frascos ya en posición horizontal correcta. Sucesivamente se va añadiendo más medio de cultivo a razón de 0.5 cc. más por día hasta alcanzar 5 cc. Los cultivos se mantienen en estufa a 37° C.

A los 15 días de iniciado el cultivo puede observarse el crecimiento de los fibroblastos que empiezan a emerger del fragmento de dermis adherido y se extienden por el fondo. El cultivo se mantiene en estas condiciones hasta que el crecimiento celular sea considerable, lo que permite pasar a la siguiente fase, el establecimiento de cultivos en monocapa. Todo el proceso se realiza en condiciones de absoluta esterilidad.

Cultivos monocapa (Tripsinización)

Una vez el cultivo inicial de fibroblastos está en buenas condiciones de crecimiento puede procederse a su paso a monocapa en frasco adecuado para efectuar la investigación deseada.

Para someter a las células a irradiación U.V., posterior marcado y finalmente autorradiografía, debemos situar las células en monocapa sobre una superficie de cubreobjetos que permita su irradiación, y por otra parte sea manejable para poder efectuar la aplicación de las placas de auto-

rradiografía. Con este objetivo hemos utilizado cápsulas de Petri de 10 cm. de diámetro sobre cuyo fondo hemos dispuesto cubreobjetos de 32 x 24 mm. para que sobre ellos se adhieran las células.

Para conseguir esta finalidad procedimos a la tripsinización del cultivo inicial. Para ello se utiliza una solución de tripsina al 0,5% en líquido de Hanks.

La técnica es la siguiente:

Se decanta el medio de cultivo del frasco. Se añade 1 cc. de sol. de tripsina al 0'5%. Se mantiene durante 2 minutos y después se comprueba si las células han comenzado a desprenderse del fondo del frasco de cultivo al que estaban adheridas. Ellos se observa fácilmente al microscopio esteroscópico viendo que los fibroblastos que normalmente tienen un aspecto triangular o poligonal se redondean y empiezan a flotar en el líquido.

En este momento se añade 5 cc. de líquido de Hanks para inhibir la acción de la tripsina. Se pipetea para ayudar al desprendimiento de las células, que se recogen con el líquido de Hanks.

Se lava de nuevo el frasco con 5 cc. de Hanks para recoger células que hubieran podido quedar y seguidamente se precede a su lavado. La suspensión de células se centrifuga a 2000 rpm/10 mn. y se realizan dos suspensiones sucesivas de las células recogidas con líquido de Hanks y lavadas con centrifugación a 2000 rpm durante 10 min.

Una vez efectuados los dos lavados las células se resuspenden en 1 cc. de medio de cultivo, en esta suspensión se obtiene una gota que se tiñe con cristal de violeta y se diluye mediante una pipeta de recuento. Se dispone de una cámara de recuento y se efectúa un contaje para determinar si disponemos de una cantidad de células suficiente. Si obtenemos 5 millones de células, es suficiente. Esta cantidad se diluye a razón de 500.000/cc. de medio de cultivo y la suspensión se dispone en la cápsula de Petri con los cubres.

Irradiación y marcado

A las 24 horas de haber dispuesto la cápsula de Petri con los cubres se observa que los fibroblastos ya se han adherido a los mismos. Con su proliferación han de llegar a formar un sincicio reticulado que los cubre completamente. De esta forma ya tenemos un cultivo monocapa que puede utilizarse para prosecución de la experiencia. Se procede a la irradiación de estas células según la técnica siguiente:

Una vez preparado el cultivo se decanta el medio. Se lava con líquido de Hanks que también se decanta.

Se procede a la irradiación de las células adheridas a los cubres mediante un tubo de luz germicida con una longitud de onda predominante de 2570 \AA con una intensidad de 10 ergs/mm^2 . Se destapa la cápsula de Petri y se somete a una irradiación de 50 seg. a 30 cm. de distancia.

Posteriormente se añade para el marcado 5 cc. de medio de cultivo adicionado de Timidina marcada (TdH3R) (proporcionado por el laboratorio Hammersham) en proporción de 5 por cc. de medio de cultivo, posteriormente se incuba durante 3 horas en las condiciones habituales de mantenimiento (en estufa a 37° C) y en total oscuridad.

A las 3 horas se retiran de la estufa y se procede al lavado y fijación de las células de la siguiente forma:

Se decanta el medio de cultivo + TdHR. Se lava con solución molar de Citrato sódico y ClNa de pH 7. Se fija con Ac. Acético y Etanol 3/1 durante 15 minutos. Se lava con alcohol de 70. Se secan al aire. Una vez fijadas las células se recogen los cubres que se disponen sobre portaobjetos como soporte y quedan preparados para la autorradiografía.

Preparación para Autorradiografía

Una vez los cubres están recubiertos con las células fijadas, irradiadas y marcadas, montados sobre el soporte de un portaobjetos, se puede proceder a la autorradiografía para poder obtener la imagen del marcado.

Autorradiografía

En estos últimos años se ha hecho un sorprendente progreso en el mejoramiento y utilización de la sensibilidad de las emulsiones fotográficas para registro de partículas atómicas cargadas tales como electrones, mesones, protones y partículas alfa. Actualmente se dispone de materiales capaces de registrar partículas cargadas de cualquier energía, que tienen una amplia aplicación en todos los campos de investigación científica.

La base de la técnica fotográfica para registrar huellas isotópicas es la puesta en contacto con la muestra, tal como puede ser una sección histológica conteniendo el material radioactivo con una película o placa adecuadas. Después de la exposición y el procesado, la capa fotográfica revela la localización del material radioactivo dentro de la muestra. La imagen así obtenida se denomina autorradiografía.

Una de las aplicaciones más simples de la técnica de autorradiografía es la del estudio de una macroestructura de un tejido o dentro de la microestructura de un elemento celular. La emisión de electrones a gran velocidad a partir de los átomos marcados produce la ionización de los granos de aluro de plata de la emulsión y los hace revelables, demostrando después del proceso la distribución que ha adquirido el elemento radioactivo.

Como sea que el registro final deberá ser examinado al microscopio en la técnica de autorradiografía debe también conseguirse un buen grado de resolución combinado con una alta sensibilidad del material fotográfico. Este problema ha sido resuelto mediante el uso de material adecuado específicamente al registro de partículas nucleares, de alta sensibilidad intrínseca, grano fino y concentración muy elevada de aluro de plata en una emulsión sobre gelatina.

Este tipo de emulsión es particularmente adecuado para la autorradiografía de microsecciones ya que proporciona una alta resolución combinada con una gran sensibilidad frente a las partículas atómicas cargadas. A causa de la divergencia de las partículas que se originan y su diseminación dentro del mismo, se ha calculado que es necesario un espesor máximo de 5 micras o menor para una resolución óptima. Se han sugerido diversas técnicas para la autorradiografía de microsecciones. De acuerdo con ello el porte puede colocarse sobre la capa de emulsión fotográfica o bien aplicar la capa de emulsión sobre aquél, probablemente el método más conveniente es una película o placa despegable (Striping film).

La casa Kodak fabrica dos tipos de placas para la técnica de "Stripping" la AR. 10 y la AR. 50.

La placa AR. 10 tiene una emulsión más lenta y de grano fino (Fine-grain autorradiographic Stripping Plates), mientras que la AR. 50 (Fast Autorradiographic Stripping Plates) tiene una emulsión más rápida de grano más grueso. Esta segunda es muy apropiada si se requiere una rapidez intermedia entre la placa AR. 10 y la placa radiográfica de doble emulsión. La velocidad depende enteramente del isótopo radioactivo que se emplee, es decir, de la energía de los electrones a partículas alfa emitidas. Como guía indicaremos que una placa AR. 50 posee una velocidad superior a la placa AR. 10.

Estos materiales poseen una capa de emulsión muy fina adherida a un soporte también muy fino y se puede despegar globalmente de otro soporte temporal y transferida sobre la preparación. Este segundo soporte es necesario por cuanto la capa de emulsión de solo unas micras de espesor se dañaría muy fácilmente y sería imposible manipular. En la placa AR. 10 la emulsión es de un espesor de 5 micras reforzada por otra capa de gelatina de 10 micras. En la placa AR. 50 la capa de emulsión es de 12 micras transportada sobre un soporte de gelatina de 10 micras.

De esta forma la emulsión se puede poner en contacto permanente con la preparación ya que las soluciones para su procesado puede atravesar la capa de gelatina.

Técnica: El procedimiento empleado en la técnica de la autorradiografía utilizando las placas descritas es como sigue. Se corta sobre la capa de emulsión un área suficiente para cubrir la preparación entera dejando alrededor un margen de menos de 6 mm. El portaobjetos que sostiene

ne la preparación conteniendo el isótopo radioactivo se coloca entonces en el fondo de una cubeta de cristal llena de agua destilada. La emulsión y su soporte de gelatina se desprenden entonces de la placa de cristal que constituye el soporte temporal y se depositan sobre la superficie del agua con la emulsión cara abajo mirando la preparación. Al entrar en contacto con la superficie acuosa, la película despegada se arruga primero y se extiende más tarde quedando completamente aplanada. Se debe dejar que la película se esponje durante 2 o 3 minutos y entonces se saca del agua levantándola con el portaobjetos que previamente hemos depositado en el fondo de la cubeta. El portaobjetos se levanta en un ángulo de unos 30 grados de forma que el contacto con la película sea inicialmente por el borde. De esta forma una vez se efectúa el primer contacto la película se adhiere después espontáneamente sobre el portaobjetos escurriéndose simultáneamente el agua a medida que vamos extrayendo la placa y el portaobjetos del agua. Una vez queda la película bien aplicada sobre la preparación debe procederse a su secado en camara hermética y mediante una corriente de aire frío, y posteriormente se incuba en una caja hermética con un desecante durante los días que deba prolongarse la exposición. La temperatura dentro de la caja no debe exceder de los 21 grados. La exposición puede requerir desde unos cuantos días a varias semanas, dependiendo de la actividad del isótopo radioactivo y su vida media.

Iluminación de seguridad: Hasta la fase de fijado, las placas AR.10 y AR.50 y las capas de emulsión transferidas deben ser manejadas bajo iluminación de una pantalla de seguridad Wratten, serie I (rojo). Para la AR.50 solamente se puede trabajar con una iluminación de seguridad más brillante mediante el uso de una pantalla Wratten, serie 6B (marrón)

Cuando se emplee AR.10 en las técnicas de contaje de grano se recomienda que no se permita incidir sobre la placa más que la mínima cantidad de luz posible hasta completar el fijado.

Procesado: Durante y después de la exposición, la capa de emulsión permanece en contacto con el espécimen y la preparación compuesta quedará inmersa en las diferentes soluciones procesadoras. Al ser el contacto permanente se podrá obtener un registro adecuado.

El revelador general recomendado para ambas emulsiones es el Kodak D-19 B sin diluir.

REVELADOR KODAK D-19 B

Agua, aprox. 50 ° C.....	500	cc.
Agente Revelador Kodak Elon.....	2.0	grms.
Sulfito Sódico Kodak, seco.....	72.0	grms.
Hidroquinona Kodak.....	9.0	grms.
Carbonato Sódico Kodak, monohidratado.....	50.0	grms.
Bromuro Potásico Kodak.....	4.0	grms.
Agua fría hasta hacer.....	1.0	litro

Si la exposición ha sido suficiente la resolución óptima se obtendrá con estas emulsiones revelando durante no más de 5 minutos a una temperatura de 20 grados en dicho revelador. No obstante cuando se dude de si la exposición es adecuada, pueden ser necesarios tiempos de revelado mayores para aumentar la rapidez efectiva de la emulsión. La emulsión AR.10 es de tal flexibilidad que permite emplear tiempos de revelado hasta 20-30 minutos proporcionando un incremento sustancial de la rapidez efectiva con algún sacrificio de la resolución. Con la emulsión AR.50 se deben dar 10 min. como tiempo máximo con el mismo revelador.

Para neutralizar cualquier exceso de revelador el espécimen y la emulsión adherida deben sumergirse en un baño de agua limpia a 18°-21° por un periodo no inferior a 30 segundos y se procede después a la fijación a la misma temperatura en una solución de Fijador ácido rápido durante un tiempo doble al requerido para la clarificación. Finalmente se lava con agua corriente durante 2 -3 min. y se seca al aire.

Las placas empleadas por nosotros han sido tipo AR. 10.

PLACAS AUTORADIOGRAFICAS KODAK DE GRANO FINO TIPO STRIPPING AR. 10

ETAPA	SOLUCION	TIEMPO	TEMPERATURA
1.Revelado	Revelador Kodak D-19b	5 min.	20 ° C
2.Paro	Agua corriente	30 seg.	18-21 ° C
3.Fijado	Fijador Kodad	-	18-21 ° C
4.Lavado	Agua corriente	2-3 min.	18-21 ° C
5.Secado	Lentamente con aire filtrado		--

El tiempo de fijado deberá ser el doble de lo que tarda la película en clarificarse.

Valoración de la técnica autorradiográfica del "Dark repair"

Método para evidenciar el funcionamiento del mecanismo de "Dark repair" mediante técnica de Autorradiografía (Cleaver, 1968)(1).- El fallo de la reparación por replicación se puede evidenciar procediendo con la siguiente técnica autorradiográfica. Los cultivos de fibroblastos obtenidos según el método antes descrito se irradian con una dosis determinada de luz U.V., se marcan con TdR-H₃ durante 3 horas, se fijan y se procede a autorradiografía. En los cultivos de fibroblastos normales se produce con cualquier dosis de irradiación un marcado del 100% de las células. En cambio en los cultivos de enfermos con xeroderma pigmentosum por ejemplo, el índice o porcentaje de células marcadas no sufre variación alguna ni después ni antes de la irradiación, según puede evidenciarse con la autorradiografía después de la 1ª semana o más de exposición. En el caso de fibroblastos normales en que el porcentaje de marcado después de la irradiación es del 100% de la población celular, se observa la presencia de dos fracciones de células, una muy densamente marcada y otra compuesta por células ligeramente marcadas. Las primeras corresponden a la misma fracción de células que en el control no irradiado ya aparecen marcadas. Por tanto en las preparaciones irradiadas corresponderían a las células que se hallaban en la fase S en el momento en que se adicione el medio de cultivo con TdR-H₃, correspondiendo las restantes a células en otras fases (G₁, G₂ o mitosis). En estos casos la incorporación de TdR-H₃ en estas fases (G₁, G₂, o mitosis) representa por tanto la objetivación durante la fase S pero en este caso queda camuflada por la gran cantidad de TdR-H₃ incorporada por la replicación semiconservadora normal, del DNA de la célula.

La información mas importante que la evidenciación autorradiográfica del funcionamiento del mecanismo de reparación nos procurará, vendrá de da complementariamente por el contaje de granos sobre los núcleos de las células ligeramente marcadas. El número de granos representa una función lineal de la cantidad de TdR-H3 incorporada. Como sea que la ma yor parte del daño biológico que la radiación U.V. produce a nivel del DNA se supone es la formación de dímeros de Timina, la relación de dosis número de granos puede estimarse como traducción del número de bases nuevas insertadas. Así por ejemplo tenemos que una dosis de 100 ergs./mm² convierte un 0,5% de bases timidínicas en dímeros y la mitad de el las son escindidas en las células de los mamíferos normales, hallamos que ello se traduce autorradiográficamente en la aparición de unos 37 granos por núcleo marcado en las fases G1 y G2 tras una exposición autorradiográfica de 7 días. Con estos datos podemos establecer unos parámetros cuantitativos que nos permitirán extraer consecuencias objetivas de nu es tr as experiencias. Como datos en orden a posibles comparaciones y establecimiento de controles tenemos:

VALORES DE LOS CONTAGES DE GRANULACIONES
OBTENIDOS POR CLEAVER (1968)

	IRRADIACION CON 100 ejs/mm ²	IRRADIACION CON 1000 ejs/mm ²
FIBROBLASTOS NORMALES	136	204
XERODERMA PIGMENTOSUM	27	19

Resultados obtenidos en nuestra investigación

Siguiendo pues la técnica descrita y una vez establecidos los cultivos en monocapa, fueron irradiados con una dosis de 500 ergs/mm² de 254 nm. y otro cultivo se mantuvo con control sin irradiar. Se añadió después de la irradiación medio de cultivo con TdR-H³ manteniéndose en incubación en la oscuridad durante tres horas.

En los cultivos de individuos normales los mecanismos de reparación actuaron con normalidad, produciéndose en las preparaciones irradiadas una reparación de un 100% (es decir, todos los núcleos celulares aparecieron marcados). De la población celular poco marcada (Fase G₁, G₂ o S) y que es la que con la incorporación de timidina traduce la actuación de los mecanismos de reparación sin actividad de replicación semiconservadora normal, se practicó un estudio de los núcleos procediéndose al contaje de granos incorporados con el resultado siguiente:

Fibroblastos normales: Número de gránulos 476.

En el caso del enfermo afecto de Síndrome de Rothmund-Thompson la replicación también fué de un 100% y el contaje de granulaciones en los núcleos dió como resultado:

Nº de gránulos: 384.

En el caso del Xeroderma pigmentosum se observó que la irradiación en las condiciones indicadas no producían un aumento del número de células marcadas que se mantenía en una cifra de un 11% como en las preparaciones de control. El contaje de las granulaciones en estos núcleos marcados dió el resultado siguiente:

Nº de gránulos: 170.

Los cinco cultivos de fibroblastos pertenecientes a los enfermos de *Hydroa aestivalis* o vacciniforme fueron estudiados en las mismas condiciones. Después de la irradiación no se observó un marcado evidente de los núcleos celulares que solamente a gran aumento (100 x) permitían descubrir la presencia de una granulación mínima en el 90% de los mismos.

Los contajes repetidos de estas granulaciones dieron como resultado las cifras promedio que se tabulan a continuación.

FIBROBLASTOS (IRRADIADOS - 500 ergs/mm ²) $\lambda = 254\text{mm.}$	PORCENTAJE DE NUCLEOS MARCADAS	N° de GRANULOS
NORMALES (3)	100%	476
SIND. ROTHMUND-THOMSON (1)	100%	384
XERODERMA PIGMENTOSUM (1)	11%	170
HYDROA 1 (CASO 4)	90%	75
HYDROA 2 (CASO 7)	90%	34
HYDROA 3 (CASO 8)	90%	5
HYDROA 4 (CASO 5)	90%	92
HYDROA 5 (CASO 6)	90%	92

Las imágenes que aportamos a continuación corresponden:

Pág.158 : Fotografías de un campo cualquiera de los cultivos en monocapa de fibroblastos correspondientes según se indica a tres sujetos normales, a un enfermo afecto de síndrome de Rothmund-Thompson y a un enfermo afecto de Xeroderma pigmentosu, antes y después de ser sometidos a la acción de la luz. En este segundo caso las fotografías fueron tomadas después de la incubación de tres horas según la técnica descrita.



Pág.159 : Fotografías de un campo cualquiera escogido al azar de los cultivos en monocapa de fibroblastos correspondientes a cinco de los enfermos afectados de Hydroa estudiados antes y después de haber sido irradiados tal como está indicado.

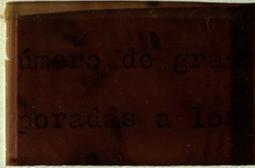
REPARACION POR EXCISION ("DARK REPAIR")

CULTIVOS DE FIBROBLASTOS CONTROL

ANTES

DESPUES DE IRRADIAR

Individuo normal



Individuo normal



Individuo normal



Síndrome Rothmund-Thomson



Xeroderma pigmentosum



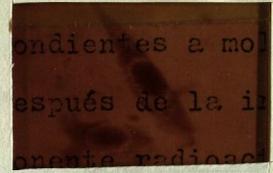
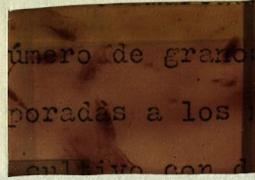
REPARACION POR EXCISION ("DARK REPAIR")

CULTIVOS DE FIBROBLASTOS DE ENFERMOS AFECTOS DE HYDROA

ANTES

DESPUES DE IRRADIAR

CASO N^o 4



CASO N^o 7



CASO N^o 8



CASO N^o 5



CASO N^o 6

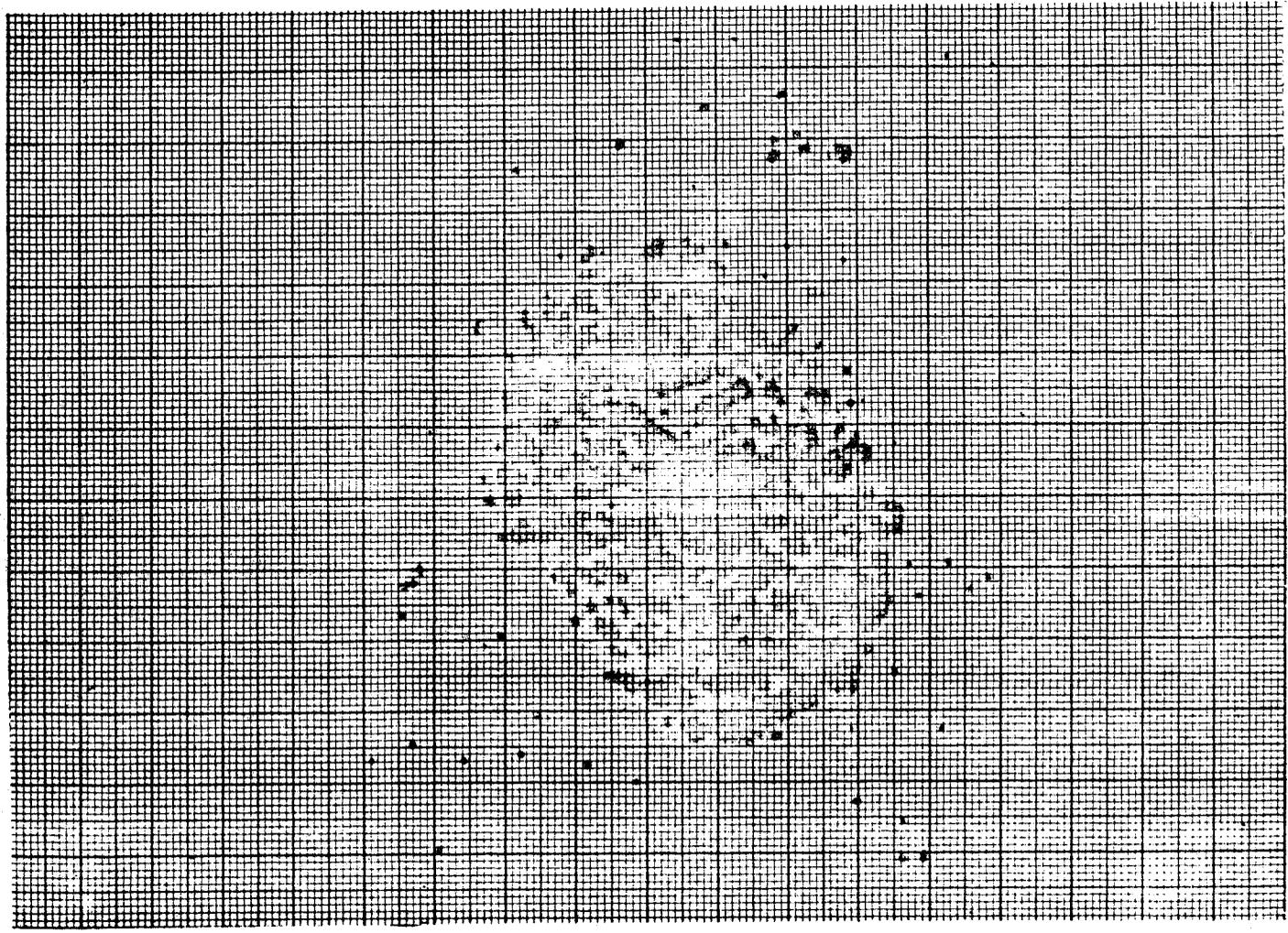
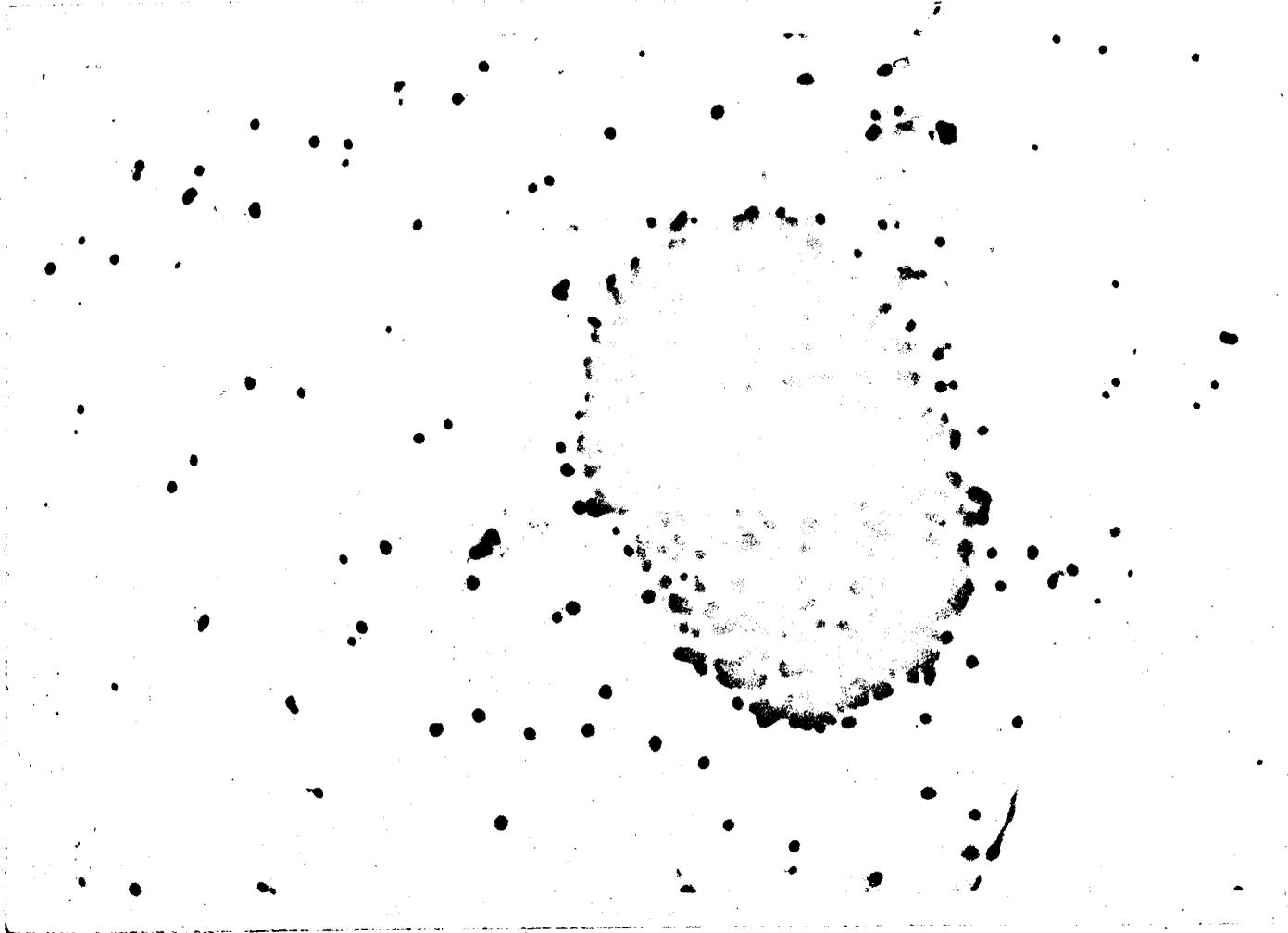


Las imágenes siguientes corresponden a las ampliaciones fotográficas practicadas sobre los núcleos marcados de forma que se posibilite el contaje objetivo del número de granos correspondientes a moléculas de Timidina marcada incorporadas a los núcleos después de la irradiación e incubación en medio de cultivo con dicho componente radioactivo.

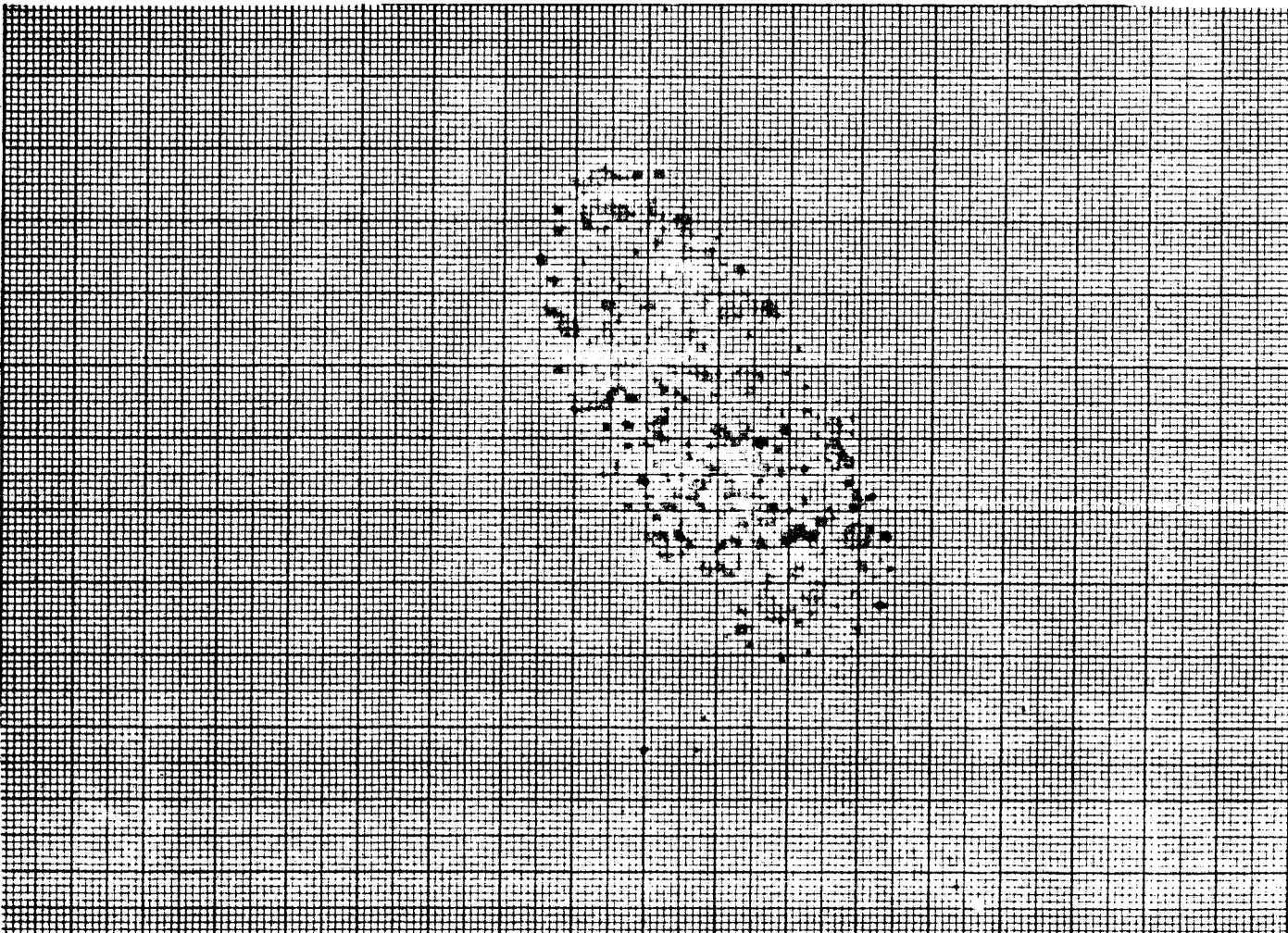
Estas imágenes constituyen la materialización autorradiográfica y fotográfica del "DARK REPAIR" según la técnica empleada y ya descrita.



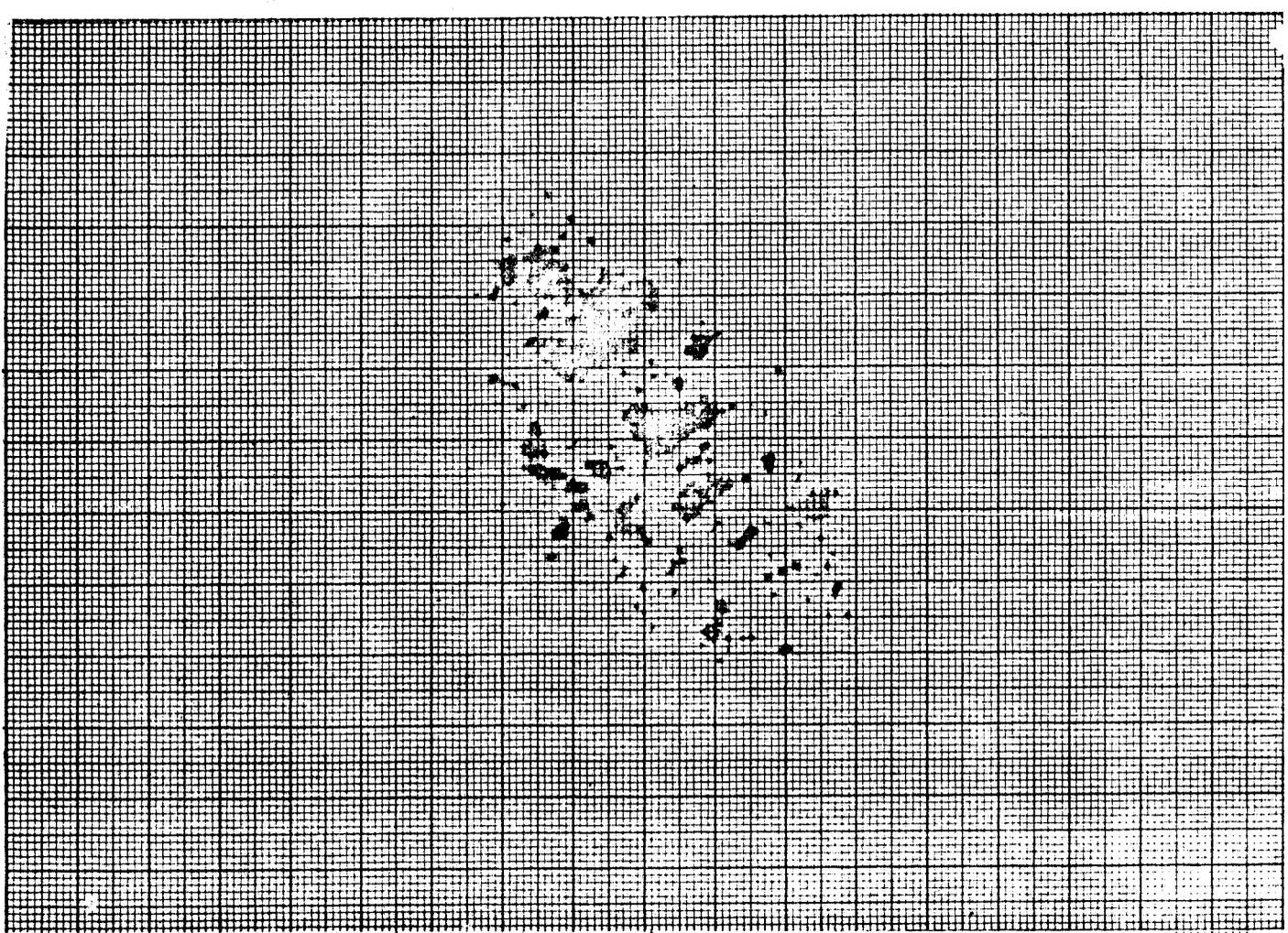
CONTROL - FIBROBLASTOS NORMALES



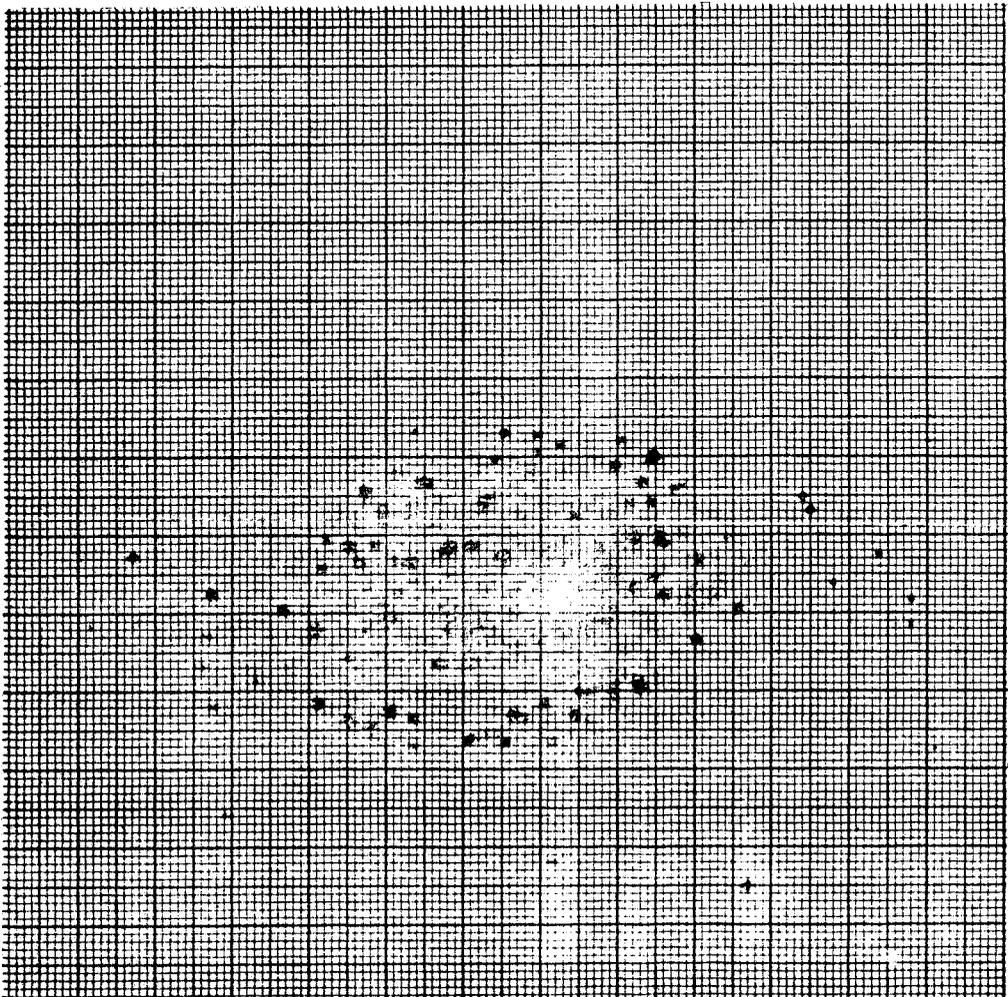
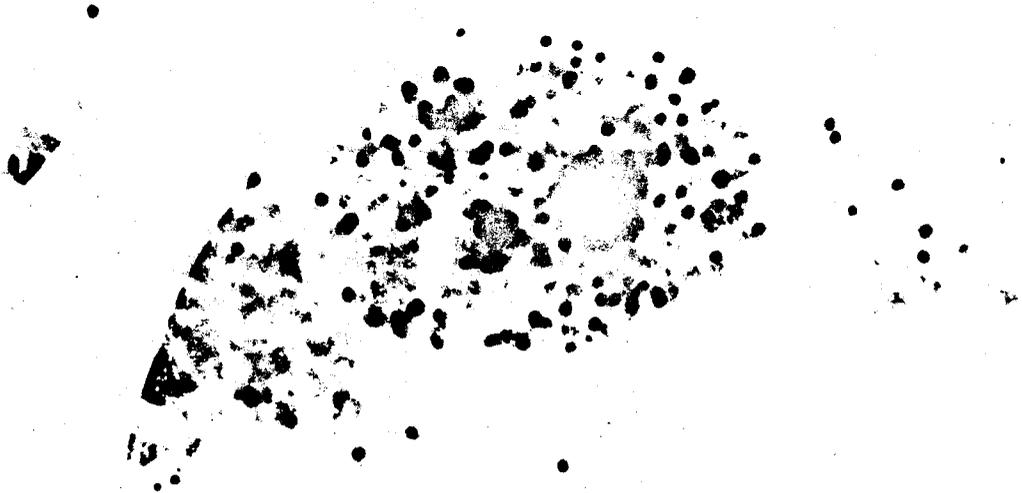
CONTROL - SIND. DE ROTHMUND - THORSON.



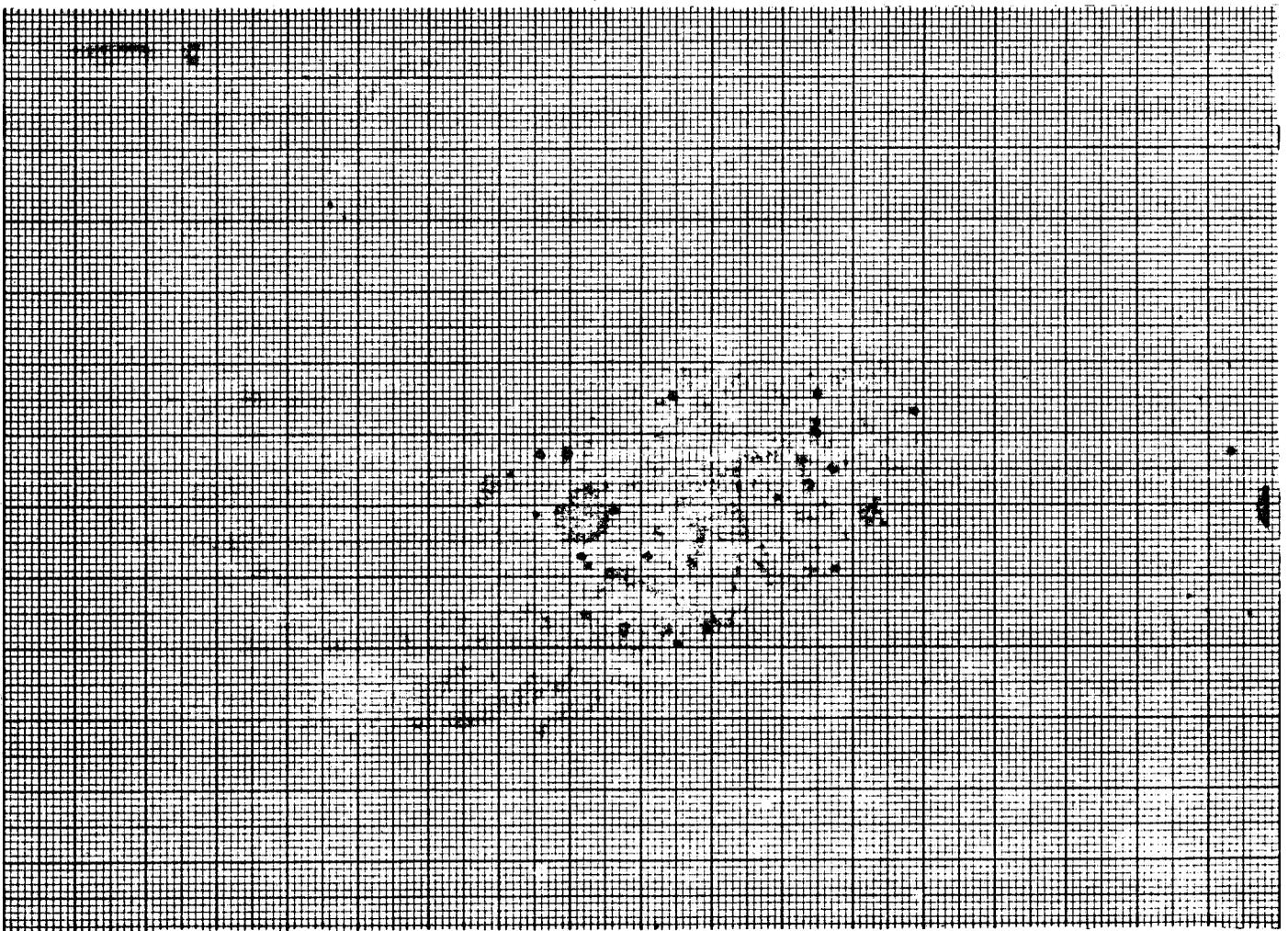
CONTROL - XERODERMA PIGMENTOSUM



HYDROA VACCINIFORME



HYDROA VACCINIFORME



Incorporación de Timidina marcada en los linfocitos de enfermos afectados de *Hydroa vacciniforme*.

La investigación de la incorporación de timidina marcada en los linfocitos en una técnica comparable a la establecida por Cleaver fue realizada por Herkay, Tamasi y Csongor (1973)(129). Estos autores procedieron mediante una técnica personal que consistía en la irradiación de linfocitos suspendidos en una solución de Dextrano y contenidos en una cápsula de Petri con dosis progresivas de radiación U.V. (260 nm.). Posteriormente estos linfocitos irradiados se incubaban a 37° C en medio de cultivo Parker TC 199 adicionado de 10^{-3} M de Hydroxyurea como inhibidor de la replicación semiconservadora y Timidina tritiada. Después de una incubación de 4 horas los linfocitos pasaban a suspenderse en líquido para centelleo y a la lectura de la radiación incorporada después de lavados previos con solución salina y de TCA al 5%.

Basándonos en la técnica empleada por estos autores practicamos en nuestros enfermos (casos 4, 5, 6 y 7) un test de incorporación de timidina a los linfocitos para establecer la tasa de incorporación relativa de timidina tritiada en linfocitos no irradiados y linfocitos irradiados con dosis progresivas de radiación U.V. (254 nm.).

Técnica del test linfocitario

En la sección de Inmunología dermatológica de nuestro servicio dirigida por el Prof. Castells Rodellas se procedió a la preparación de los cultivos linfocitarios de la siguiente forma (125):

Se procedió a la extracción de 20 cc. de sangre venosa con heparina. A esta sangre se añadieron 40 cc. de PBS. En otro tubo aparte se dispu-

sieron 5 cc. de Ficoll-Pielograf a los que se añadieron lentamente dejando resbalar por la pared del tubo 7 cc. de la sangre extraída adicionada de PBS. Se procedió entonces a su centrifugado a 1800 rpm. durante 20 min. Con ello se separan en distintas fases los componentes formes hemáticos. Se extraen entonces los linfocitos que han quedado separados. Se procedió entonces a su centrifugado a 2000 rpm. durante 10 min. y se lavaron posteriormente dos veces con PBS.

Entre tanto se habían preparado aparte sendas cápsulas de Petri a las que se añadieron 5 cc. de linfocitos suspendidos después de lavados con TCC 199 adicionado de 20% de suero AB. (500.000 cels./cc.).

Estas cápsulas de Petri se utilizaron entonces para proceder a la irradiación de estos linfocitos con las siguientes dosis: 500 ergs./mm² y 1000 ergs./mm².

Una vez irradiados se añadió timidina tritiada (10 μ Ci/cc.) y se dejaron en incubación durante 3 horas.

Finalmente se recogieron los cultivos ya incubados, se procedió a su lavado con solución de Hanks y centrifugado a 2000 rpm. durante 10 min. para resuspenderlos en líquido de centelleo y proceder a las lecturas en un Packard 3000.

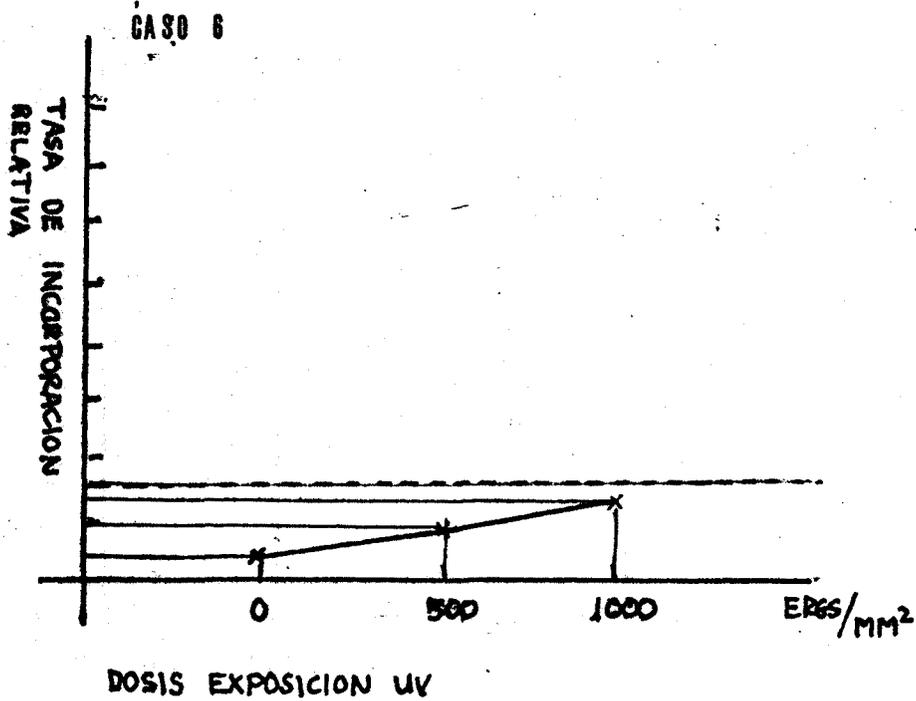
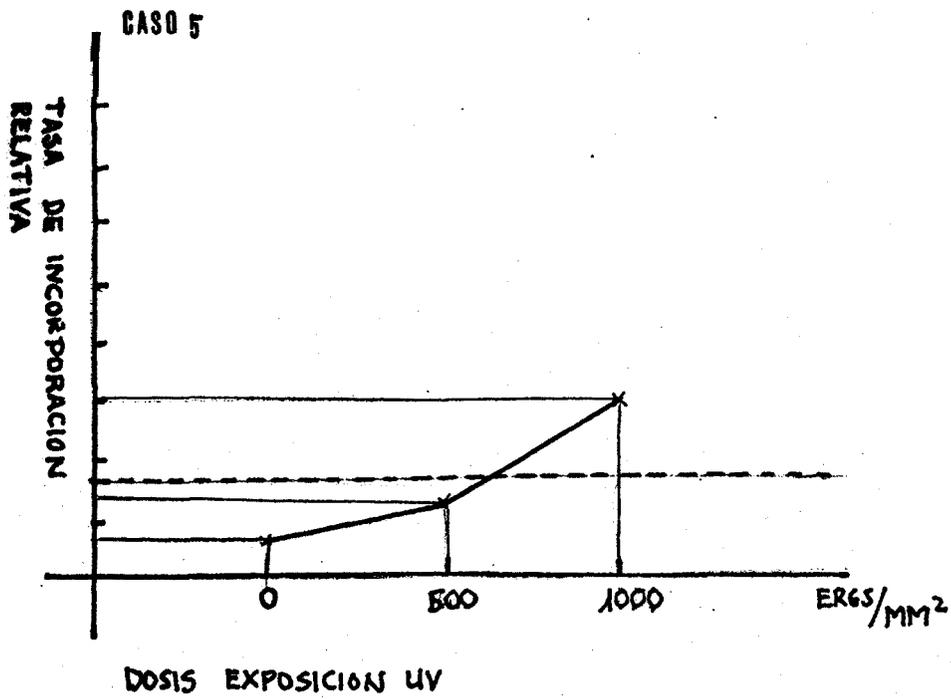
Resultados

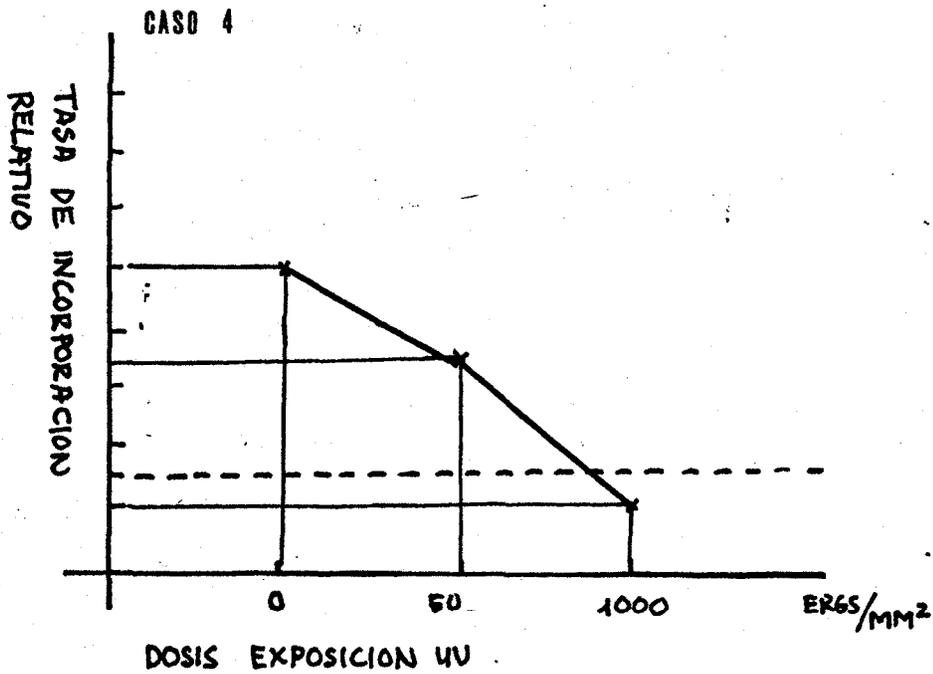
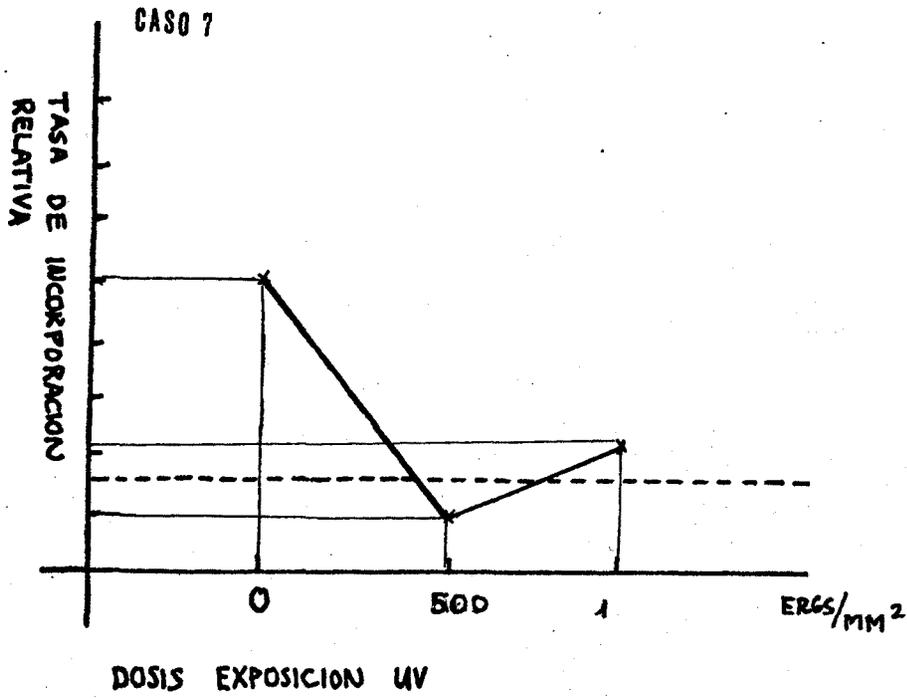
Los resultados obtenidos en este test se han traducido en una gráfica de incorporación relativa en función de la dosis de irradiación recibida. En los linfocitos de individuos normales los mecanismos de reparación del DNA que funcionan normalmente dan lugar a una incorporación de

timidina progresiva al aumentar la dosis de irradiación, lo que se traduce en una curva ascendente. Es decir la tasa de incorporación relativa es una proporción directa de la dosis de la radiación recibida.

En nuestros enfermos en cambio, estas curvas muestran un perfil descendente o se aplanan, es decir, traducen una falta de incorporación de timidina en los linfocitos subsiguiente al estímulo de la radiación administrada.

Las gráficas obtenidas fueron las siguientes.





Conclusión

De los resultados de los tests de incorporación de timidina a los cultivos de linfocitos se deduce que coincidiendo con los resultados obtenidos en las autorradiografías de los cultivos de fibroblastos, en los linfocitos también se produce un déficit de incorporación de timidina, por tanto existe una alteración de los mecanismos de reparación del DNA.

Resultados terapéuticos

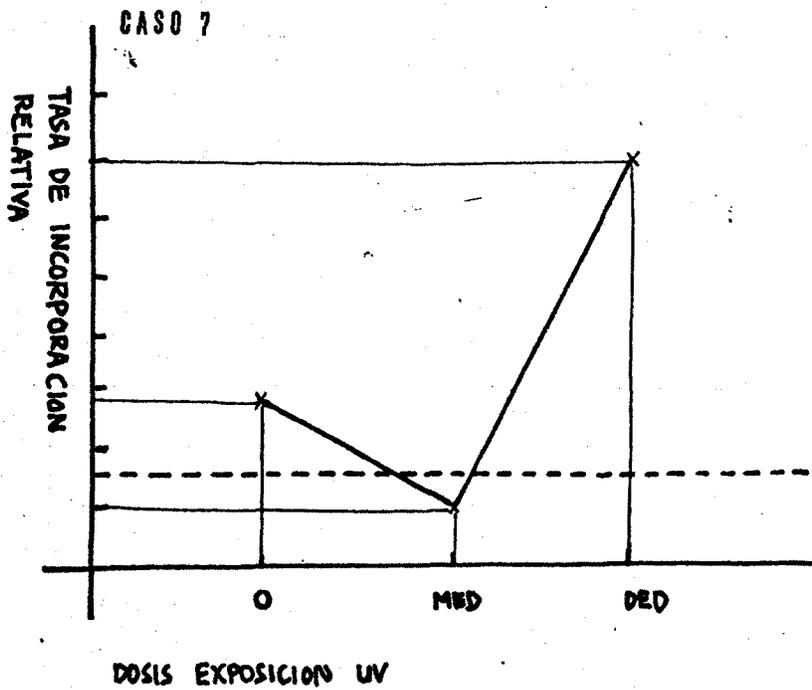
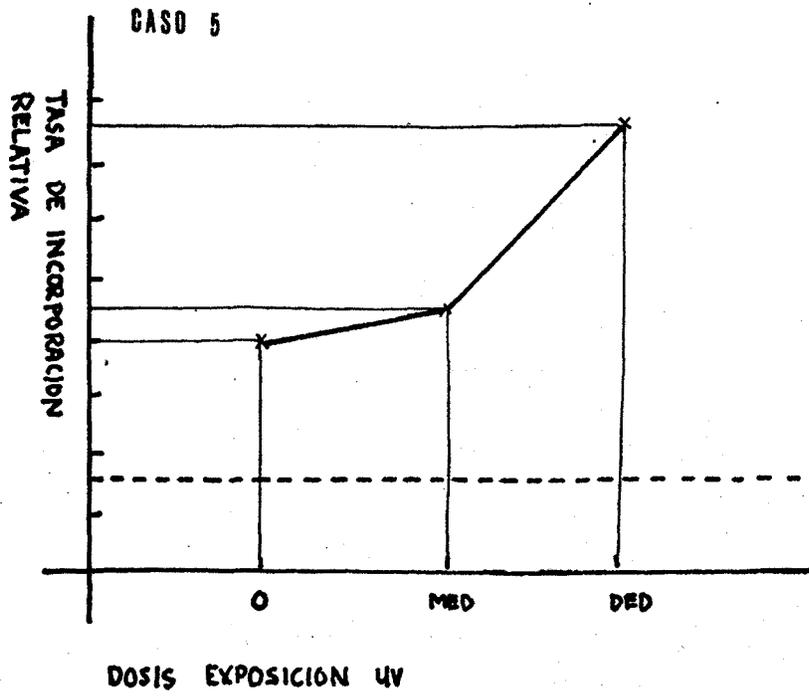
Este test más simple nos ha permitido por otra parte valorar los resultados de la terapéutica ensayada en estos enfermos.

En el tratamiento de esta afección y vista la ineficacia de los tratamientos habituales de las dermatosis lumínicas, ensayamos la terapéutica sugerida por Londoño (130) para el tratamiento del prurigo actínico. El tratamiento fue posible en cinco de nuestros enfermos a los que se prescribió una dosis inicial de talidomida de 7 mgrs./kg/día. En tres de estos casos la mejoría se presentó a los pocos días de tratamiento, remitiendo las lesiones progresivamente hasta su total desaparición en el espacio de unas dos semanas, lo que permitió una disminución progresiva de la dosis hasta establecer como tratamiento de sostén una dosis de 25 mgrs./día en total.

La dificultad en la obtención de este fármaco obligaba en muchas ocasiones a la interrupción de la terapéutica lo que nos permitió observar que una vez suspendida la medicación se producía una recidiva de las lesiones a corto plazo por lo que hemos de considerar que el efecto terapéutico de la talidomida es puramente transitorio.

Sin embargo la eficacia del mismo es evidente y se traduce incluso en la modificación del test linfocitario, como se pudo comprobar en los casos 5 y 7. En estos enfermos una vez regresadas las lesiones clínicas y sometidos a la simple dosis de sostén de talidomida, se practicó un nuevo test de incorporación de timidina a los linfocitos para comparar su resultado con el obtenido antes de iniciar la terapéutica, es decir en la fase de estudio.

En estos enfermos el tratamiento producía durante su administración una tendencia a la normal incorporación de timidina con curvas ascendentes en las gráficas establecidas, gráficas que aportamos a continuación y que pueden compararse a las aportadas anteriormente para los mismos casos.



PARTE IX - CONCLUSIONES

a) Desde el punto de vista clínico

El estudio de nuestros casos nos permite concluir que los aspectos clínicos de la entidad no son uniformes. Destaca entre los factores de diversidad la multiplicidad de las posibles localizaciones de las lesiones con aparición de elementos lesionales incluso en partes de la superficie cutánea habitualmente cubiertas.

En segundo lugar la morfología de las lesiones tampoco es uniforme y podemos describir una forma mayor, una forma menor, una variedad con carácter impetigoide.

Por otra parte se describe un cuadro clínico muy peculiar dentro del polimorfismo clínico del Hydroa, cual es la forma de Hydroa periorificial.

b) Histología

El estudio de las lesiones de nuestros enfermos nos ha llevado al establecimiento de unas características histológicas perfectamente definidas y que hasta el momento no habían sido fijadas de forma clara. Histológicamente el Hydroa vacciniforme es un cuadro histológico uniforme de finido por:

1) Una secuencia lesional característica y monótona.

2) Esta secuencia lesional tiene como punto de partida una lesión primaria dérmica papilar.

- 3) Esta lesión se sigue de una destrucción progresiva del dermis papilar con aparición de angeitis leucocitoclásica y formación de ampollas subepidérmicas.
- 4) Finalmente se presentan las lesiones epidérmicas que de forma simultánea o probablemente de forma consecutiva llevarán a la destrucción de la epidermis y formación de una ampolla intraepidérmica (dobles ampollas).

c) Fotobiología

La exploración exhaustiva y repetida de nuestros enfermos desde el punto de vista fotobiológico no nos ha permitido establecer ninguna alteración específica de la sensibilidad lumínica de los mismos coincidiendo estos resultados con los obtenidos por los diversos autores que han estudiado específicamente la fotosensibilidad de los enfermos afectados de Hydroa vacciniforme.

Sin embargo como único dato valorable recogemos la existencia en nuestros casos de una sensibilidad aumentada a las radiaciones de la banda eritrógena (280-320 nm.), en el 50% de ellos (casos 1, 4, 6, 7 y 10).

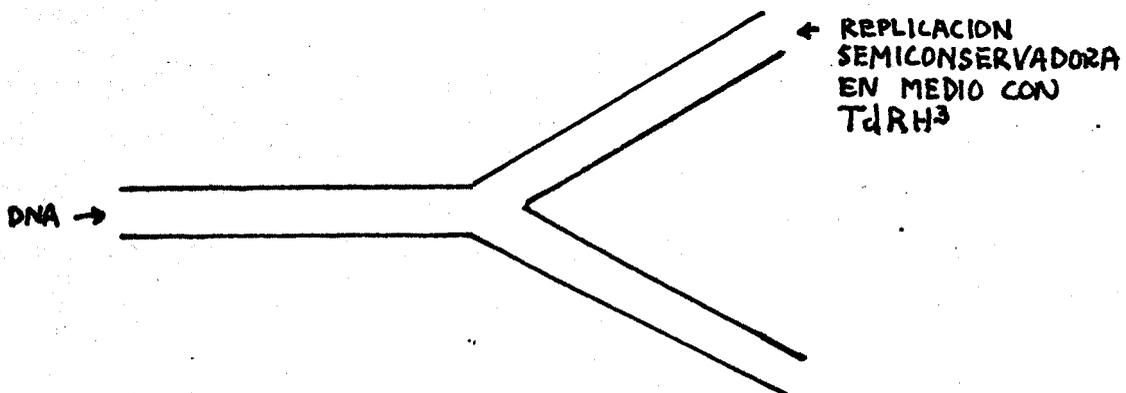
d) Otras exploraciones

En las entidades clínicas en las que etiológicamente se sospecha la presencia de una fotosensibilidad deben estudiarse aquellos factores metabólicos que puedan condicionarla. Así el metabolismo de las porfirinas ha sido el punto de estudio y de confusión en el caso del Hydroa Vacciniforme.

El "screening" completo de porfirinas que se ha practicado en nuestros enfermos nos permite concluir que no existe en ellos alteración ninguna de las porfirinas.

Asímismo el estudio del metabolismo de los aminoácidos que también puede implicarse en las alteraciones de la fotosensibilidad especialmente en enfermos de corta edad, es normal. Los hallazgos en los casos 5 y 6 no los consideramos valorables dada su inconstancia.

e) Diferencias entre la captación de timidina de los fibroblastos normales y los del xeroderma pigmentosum.- Los fibroblastos normales duplican sus cromosomas mediante el conocido mecanismo de la "replicación semiconservadora". Cuando estas células crecen en un medio que contiene timidina con átomos radioactivos, la segunda generación de reproducción cromosómica se hace a partir de una cromátida que consta de dos partes que permanecen intactas y actúan de moldes o templates. Cada una de las cromátides originales después de partirse en dos, produce un partener radioactivo y por tanto los nuevos cromosomas están también marcados y la radioactividad se distribuye por igual entre las dos cromátides de cada cromosoma. La mitad de los filamentos están marcados y la otra mitad no lo están, y se produce un DNA híbrido en el que existen moléculas formadas por una cadena nueva que contiene timidina y otra vieja que no lo contiene. La replicación semiconservadora es la forma por la que se reduplica el DNA durante el crecimiento normal en todos los tipos de célula.



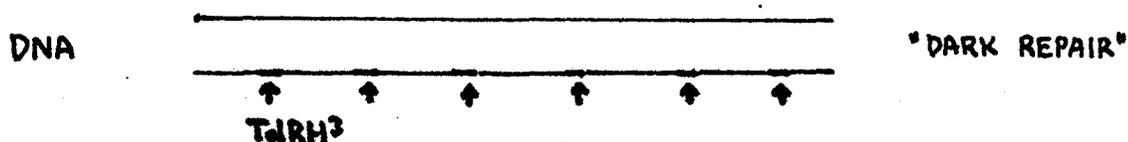
Ello explica el por qué en los cultivos observados antes de la irradiación encontramos un cierto número de elementos celulares intensamente marcados que corresponden a las células que se hallaban en fase de premitosis con replicación semiconservadora (Fase S).

En los cultivos observados después de la irradiación además de estos elementos intensamente marcados (que corresponden a aquellos elementos que estaban en fase S y que por tanto hubiesen quedado marcados incluso sin irradiación) aparece el resto de núcleos marcados en forma menos densa que están efectuando no la replicación semiconservadora, sino la reparación en la oscuridad. Estos corresponden a núcleos en las restantes fases del ciclo celular, es decir, G1, G2 y mitosis, en las que el marcado traduce exactamente la actividad de reparación que se desarrolla después de la radiación.

Esta diferencia entre los cultivos irradiados y no irradiados objetiva pues la actividad de los mecanismos de reparación del DNA, traducéndose por la incorporación de timidina durante las fases G1, G2 y mitosis del ciclo celular. En la fase S la actividad queda enmascarada por la masiva incorporación de timidina correspondiente a la replicación semiconservadora.

Una mayor información puede obtenerse mediante el contaje de las granulaciones presentes en los núcleos de las células menos densamente marcadas. El número de gránulos está en función de la dosis de radiación administrada y por otro lado traduce también la sensibilidad de las células a la radiación. En los heterocigotos de xeroderma y en los fibroblastos normales la síntesis con reparación en la oscuridad va aumentando con la dosis de U.V. y alcanza una meseta después de los 300/400 erg.

mm² (Cleaver, 1970)(67). El daño producido a los dímeros queda evidenciado por el mayor o menor número de gránulos incorporados a la nueva cadena híbrida del DNA.



Fases G1 y G2

En el xeroderma pigmentosum homocigote en el que no se produce la reparación por escisión o solo se produce en grado mínimo, siguen apareciendo los elementos intensamente marcados correspondientes a la fase S de la mitosis. Por el contrario faltan los núcleos menos marcados correspondientes a las fases G1 y G2 y mitosis del resto de las células. El número de granulaciones desciende todavía más si aumentamos la dosis de radiación administrada, al revés de lo que ocurre en los fibroblastos normales en los que aumenta. Esto es en síntesis lo que demostró Cleaver. (1, 61, 64, 67, 68, 69, 74).

Diferencias entre la captación de timidina marcada de los fibroblastos del xeroderma pigmentosum y los fibroblastos del Hydroa vacciniforme

En el hydroa vacciniforme se observa el mismo fenómeno que en el xeroderma pigmentosum pero de forma mucho más acusada. Así como en este último las granulaciones faltan en muchos núcleos y son escasas en otros, en el primero, el déficit de reparación, si bien es evidente, se produce de manera uniforme en todos los núcleos y en mucha menor escala que en los

fibroblastos de enfermos afectados de xeroderma pigmentosum. El número de dímeros de timina susceptibles de ser reparados es menor o bien los mecanismos enzimáticos de reparación son menos insuficientes que en el xeroderma pigmentosum.

Nivel a que se produce la alteración de la reparación del DNA en el Hydroa.-

Como hemos indicado anteriormente, la secuencia enzimática de los mecanismos de reparación en la obscuridad es muy compleja. Esta reparación requiere: a) un enzima que reconozca la lesión, b) un enzima que elimine por escisión el fragmento lesionado. Mas tarde, c) un enzima que resintetice la zona eliminada y finalmente d) otro que suelde el fragmento resintetizado a la cadena de DNA. Toda esta secuencia se produce en el espacio de unas 4 a 8 horas.

Tal como sucede en el xeroderma pigmentosum, los datos que hemos podido obtener en el estudio de la reparación en la obscuridad del hydroa, no parecen demostrar que exista una alteración de los mecanismos de resintetización o de soldadura del DNA lesionado (alteraciones de la polimerasa o la ligasa). Es en cambio más probable una interferencia a nivel de la Endonucleasa en un grado menor que en el xeroderma pigmentosum.

Por otro lado, en el xeroderma pigmentosum existen otros factores característicos. Además de los datos que indican que existe esta frecuente pero no obligada alteración de los enzimas nucleares, hay otra alteración más constante y hasta ahora no aclarada anomalía de la reparación del DNA, que condicionaría la obligada carcinogénesis que se presenta en

este síndrome. Esta tendencia a la carcinogénesis secundaria a la exposición al sol, se transmitiría genéticamente en todos los casos mediante una transmisión autosómica recesiva, constituyendo por tanto un locus genético anormal "sine qua non".

Ello hace insostenible el punto de vista de que el hydroa vaccini-forme pueda representar una forma minor o una mutación peculiar del xeroderma pigmentosum como en ocasiones anteriores se había postulado por algunos autores. (Jamieson, 85).

A pesar de que tal como hemos indicado antes, pueden existir cuadros de fotosensibilización cutánea con transmisión genética sin trastornos de la reparación del DNA (erupción polimorfa lumínica, Síndrome de Rothmund-Thomson, Síndrome de Bloom) y de que hay casos de xeroderma pigmentosum sin anomalías evidenciables de los enzimas reparadores (61, 62) este trastorno celular debe ser forzosamente muy importante en el desarrollo de la fotosensibilización y hasta ahora constituye el único que ha podido ser demostrado de forma evidente. Recordemos que en ninguna de estas afecciones se han logrado comprobar alteraciones de los mecanismos de protección constituidos por la acción pantalla de la melamina, como sucede en el albinismo, y de la capa córnea, ni tampoco se han podido demostrar sustancias fotoactivas endógenas (aminoácidos, porfirinas) o exógenas (sustancias fototóxicas o fotoalérgicas) condicionadoras de la hipersensibilidad a la luz.

Investigaciones a realizar en el futuro:

a) Comprobación de la limitación del defecto reparador a los fibroblastos o de su ubicuidad.

Una pregunta que debemos hacernos es que si tal como sucede en el xeroderma pigmentosum, además de los fibroblastos, todas las restantes

células de los pacientes de hydroa vacciniforme presentan igual sensibilidad o disminución de la resistencia frente a la acción de las radiaciones ultravioleta. En el xeroderma pigmentosum es de suponer que así suceda, ya que se trata de un proceso hereditario y de hecho ha sido probado ya por Bootsma (60) con los cultivos de linfocitos y por Jung (66) en los linfocitos y en células epidérmicas. Se han practicado también experiencias "in vivo" que demuestran que las células basales de los enfermos afectados de xeroderma pigmentosum no pueden realizar tampoco esta síntesis reparadora (134). En el hydroa no puede tomarse en consideración una transmisión genética, por lo menos hasta ahora no ha sido probada. Si se hallase el mismo fenómeno en las células epiteliales podría hablarse de un defecto general, pero hasta ahora no se ha practicado el examen autorradiográfico de las células epiteliales de la basal (la única capa de epitelio que presente la replicación semiconservadora) en esta enfermedad. Este es pues uno de los puntos a estudiar en esta afección.

b) Comprobación de su posible origen genético. Otra investigación a realizar en este proceso es la demostración de una transmisión genética a través de la comprobación de la reparación del DNA de los familiares de estos enfermos. Se ha demostrado que los heterocigotos del xeroderma pigmentosum muestran igualmente una reparación reducida de DNA cuando sus fibroblastos son sometidos a dosis altas de U.V. (Cleaver, 61). Ello supone un defecto parcial heterocigótico de la endonucleasa.

Por otra parte cabe la posibilidad de comprobación prenatal del defecto en las células del líquido amniótico, por el examen mediante las técnicas desarrolladas por Regan para el xeroderma pigmentosum, en las enfermas embarazadas afectas de hydroa vacciniforme.

c) Posibilidad de modificación del defecto de reparación. Mediante las técnicas de fusión celular, De Weerd-Kastelein, Keijer y Bootsma (1972) (131) pudieron demostrar que en el xeroderma pigmentosum, las cé

lulas binucleadas formadas por la unión de fibroblastos procedentes de xeroderma pigmentosum clásico y otros de síndrome de De Sanctis Caccione presentaban una complementación intergénica de tal forma que irradiados con U.V. proporcionaban patrones idénticos a los de los fibroblastos sanos controles. Ello indicaba que en estas células binucleadas híbridas se producía endonucleasa normal. La interpretación más simple era de que en estos procesos hay una afectación de dos diferentes genes y que estos podían complementarse por acción intergénica. Sería pues interesante practicar cultivos mixtos de fibroblastos de hydroa vaccini-forme con fibroblastos de xeroderma pigmentosum y con fibroblastos normales para ver qué sucede en la primera enfermedad.

d) Actuación de la talidomida . El hecho de que la sintomatología clínica del hydroa desaparezca tras la administración de una droga que actúa sobre los mecanismos de división nuclear, si bien nos indica que el defecto primordial del hydroa estriba posiblemente en una interferencia en la síntesis de los ácidos nucleicos durante el estadio S de la interfase, no aporta datos en favor de que la alteración se establezca a través de un mecanismo puramente enzimático. Si la talidomina se incorpora a la cadena de DNA o modifica su composición en algún momento de la interfase, podría o bien proteger a la citada cadena frente a la acción de los rayos U.V. o lo haría más sensible a la enzima. Resulta más difícil aceptar una activación de esta última por el medicamento. Estamos en camino de complementar la investigación llevada a cabo hasta ahora mediante la repetición del test de reparación en la oscuridad de los fibroblastos en los pacientes que han estado sometidos a esta droga, para observar si se presentan modificaciones de esta reparación en el sentido de una normalización. Hasta que no tengamos datos suficientes no podemos decir nada sobre este tan interesante punto.