

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO



" ACTIVIDAD DE GENES RIBOSOMALES
Y ASOCIACION DE CROMOSOMAS ACROCENTRICOS
EN LA TRISOMIA 21 Y EL ABORTO HABITUAL "

T E S I S

QUE EN OPCION AL GRADO DE
MAESTRIA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA

BIOL. VICTOR MANUEL RICOJAS VALDES



MONTERREY, NUEVO LEON, MEXICO

NOVIEMBRE, 1984

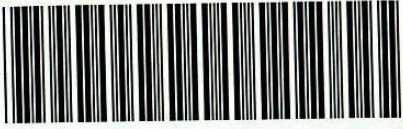
TM

Z53

FCB

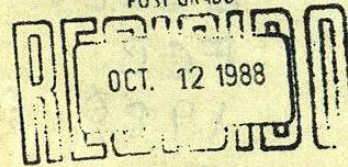
198

R5



1020066493

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
DIRECCION GENERAL DE ESTUDIOS DE
POST GRADO

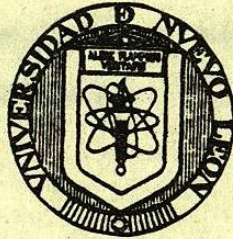


FIRMA

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO



" ACTIVIDAD DE GENES RIBOSOMALES
Y ASOCIACION DE CROMOSOMAS ACROCENTRICOS
EN LA TRISOMIA 21 Y EL ABORTO HABITUAL "



DIRECCION GENERAL DE
ESTUDIOS DE POSTGRADO

T E S I S

QUE EN OPCION AL GRADO DE
MAESTRIA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA

BIOL. VICTOR MANUEL RIOJAS VALDES

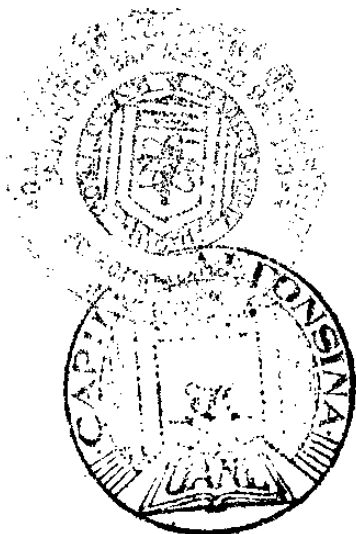


MONTERREY, NUEVO LEON, MEXICO

NOVIEMBRE, 1984

128815

TM
ZS320
FCB
198~~0~~
R5



153312

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

" ACTIVIDAD DE GENES RIBOSOMALES Y ASOCIACION DE CROMOSOMAS
ACROCENTRICOS EN LA TRISOMIA 21 Y EL ABORTO HABITUAL "

T E S I S

QUE EN OPCION AL GRADO DE
MAESTRIA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA

BIOL. VICTOR MANUEL RIOJAS VALDES

COMISION DE TESIS


BIOL. M.C. CARLOS LEAL GARZA


DR. SALVADOR SAID FERNANDEZ


DR. RAUL GARZA CHAPA



MONTERREY, NUEVO LEON, MEXICO

NOVIEMBRE, 1984

DEDICATORIA

A mis padres

como muestra de cariño y gratitud, pues gracias a sus esfuerzos
logré alcanzar esta meta.

Sr. Manuel Riojas R.

Sra. Emma Valdés de R.

A mis hermanas:

Ileana Guadalupe

Emma Beatriz y

Laura Esthela

con mi más sincero afecto.

A G R A D E C I M I E N T O S

Al Laboratorio de Citogenética de la División de Genética en la Unidad de Investigación Biomédica del Noreste del Instituto Mexicano del Seguro Social, por las facilidades otorgadas para el desarrollo del presente trabajo de investigación y por la beca para la realización de los estudios de posgrado.

A la División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, por el apoyo para la obtención de los créditos académicos.

Al Maestro en Ciencias Carlos Leal Garza, Director del presente trabajo de tesis, quien siempre demostró ser un gran amigo, compañero y maestro, por lo que su tutela en la realización del presente trabajo fué una magnífica experiencia que permitió mi desarrollo en los estudios de posgrado y la actividad científica.

Al Doctor Raúl Garza Chapa, codirector de esta tesis, agradeciéndole mucho su ayuda y ejemplo que hicieron posible mi formación y encauzamiento en la actividad profesional, muy especialmente en la investigación científica y la práctica docente.

Al Doctor Salvador Said Fernández, miembro de la Comisión de Tesis y revisor de la misma, por sus contribuciones y entusiasmo encaminados a la mejor realización del presente trabajo.

A los Q.B.P. y M.C. Luis Galán Wong, Director de la Facultad de Ciencias Biológicas y Reyes Tamez Guerra, Coordinador del Area de Biología Experimental, y al Dr. Salvador Contreras Balderas, Subdirector de la División de Estudios de Posgrado, por el apoyo e interés demostrados en que el presente trabajo alcanzara su completa realización.

Al Biol. M.C. Mario Morales Vallarta y al Lic. Fis. Mat. Roberto Mercado, maestros e investigadores de la Facultad de Ciencias Biológicas, por sus contribuciones y ayuda dirigidas a la mejor elaboración de este estudio.

A Susana Baca Sevilla, laboratorista de Citogenética, y al Lic. Elías de Hoyos, responsable de la Biblioteca de la Unidad de Investigación, por los consejos y enseñanzas que me brindaron.

A los Biólogos Roberto Montes de Oca Luna, Ricardo Cerda Flores y Antonio Heredia Rojas, y a los Q.B.P. Jorge Saldaña Acosta y Benito Mata Cárdenas, por su amistad y apoyo, que hicieron más agradable llevar a cabo este trabajo siendo su compañero de laboratorio y de clases.

A los investigadores, maestros y estudiantes de posgrado de la Unidad de Investigación Biomédica y de la Facultad de Ciencias Biológicas, que contribuyeron a que mi formación de posgrado fuera completa y siempre demostraron estar dispuestos a ayudar.

A los compañeros estudiantes de la Facultad de Ciencias Biológicas y trabajadores de la Unidad de Investigación Biomédica, por su amistad y estímulo para lograr esta meta.

I N D I C E

	<u>PAGINA</u>
RESUMEN	1
INTRODUCCION	3
ANTECEDENTES	5
MATERIAL Y METODO	10
RESULTADOS Y DISCUSION.	14
CONCLUSIONES	23
APENDICE	26
REFERENCIAS	49

RESUMEN.

La frecuencia de tinción con plata de las regiones organizadoras del nucléolo (NORs), un indicador de la actividad transcripcional del DNA ribosomal, y la frecuencia de asociación de los cromosomas acrocéntricos (asociación de satélites), posible indicador de riesgo de no disyunción, fueron estudiados en las metafases de cultivos de linfocitos de sangre periférica de ocho parejas de padres de niños con trisomía 21 regular (síndrome de Down), cinco parejas que habían tenido abortos sucesivos y 15 individuos normales no relacionados, ocho hombres y siete mujeres, como grupo testigo. En estos tres grupos los hombres tuvieron una edad promedio de 30 años y las mujeres de 27.

Otras siete parejas, con edad promedio de 52 años, padres de niños con trisomía 21 regular, fueron comparadas contra el grupo de padres jóvenes de trisómicos para analizar el efecto de la edad. Además, se estudiaron los hijos trisómicos de ocho de estas parejas para observar el efecto del cromosoma 21 extra.

De los 63 individuos estudiados, todos excepto los hijos trisómicos, tuvieron un cariotipo normal. En todos los individuos analizados se calculó el número promedio por célula de cromosomas acrocéntricos con NORs-Ag⁺ y de cromosomas acrocéntricos asociados, analizando 25 metafases de cada persona. En cada uno de los grupos estudiados se determinó el coeficiente de correlación entre estos parámetros.

Los resultados obtenidos mostraron un patrón de actividad de NORs y asociación de satélites relacionado con el sexo. En el grupo testigo, el de los padres de trisómicos y el de los hijos trisómicos, las mujeres tuvieron los mayores promedios, mientras que en el de las parejas de aborto habitual fueron los hombres.

En los padres de trisómicos se encontró una disminución significativa con respecto a la edad, tanto en la frecuencia de NORs activos como de asociación de satélites en los cromosomas acrocéntricos del grupo G de los hombres y del grupo D de las mujeres, mientras que un aumento en la frecuencia de asociación de satélites del grupo G con la edad solamente se observó en las mujeres.

Una correlación positiva significativa entre los parámetros estudiados se encontró en los cromosomas acrocéntricos del grupo G, tanto en las mujeres del grupo testigo como en las madres jóvenes de trisómicos.

Los hombres de las parejas con abortos tuvieron mayores promedios de NORs activos y de asociación de satélites que los padres varones de trisómicos, mientras que entre las mujeres de estos grupos las diferencias fueron menores.

En los hijos trisómicos se encontró que tanto en los hombres como en las mujeres, la frecuencia de asociación de satélites era mayor que la esperada de acuerdo a lo informado en la población normal, mientras que la frecuencia de NORs activos solo estaba elevada en el grupo G de las mujeres.

En los padres jóvenes de trisómicos y en las parejas de aborto habitual, en hombres y mujeres, el número promedio de cromosomas acrocéntricos por célula, tanto con NORs-Ag⁺ como asociados, tuvieron diferencias significativas con respecto al grupo testigo, de acuerdo al sexo y la edad, excepto en el promedio de NORs activos del grupo D en los hombres y del grupo G en las mujeres de ambas poblaciones.

Puesto que en los padres de trisómicos y en las parejas de aborto habitual no se encontraron alteraciones cromosómicas numéricas o estructurales que pudieran explicar las elevadas frecuencias de NORs activos y cromosomas acrocéntricos asociados, es posible que en ellos el complemento cromosómico se encuentre funcionalmente anormal. Además, como en estos individuos se presentaron fenómenos de no disyunción que originaron sus problemas genético-reproductivos, los resultados anteriormente mencionados sugieren que la actividad de NORs y la frecuencia de asociación de satélites pueden estar relacionados con las causas de la aparición de fenómenos de no disyunción, por lo cual éstos parámetros pudieran ser útiles en la estimación del riesgo genético.

INTRODUCCION.-

Un importante renglón en los problemas de salud pública lo constituyen las anomalías genéticas de la población humana, debido a que éstas afectan a los individuos de todos los estratos sociales y su frecuencia ha aumentado progresivamente con el paso del tiempo. Por ello su estudio se justifica ampliamente.

Se han desarrollado en años recientes diversas técnicas citogenéticas que permiten visualizar y analizar detalladamente el material cromosómico de las células humanas, tanto en condiciones normales como patológicas, por lo cual ha sido posible identificar gran parte de las alteraciones que se presentan más frecuentemente.

La citogenética es útil en el estudio de los casos en que se presentan alteraciones en el número o estructura de los cromosomas, y además nos permite analizar el origen de tales alteraciones. La presencia de un número anormal de cromosomas en las células es debido a un proceso llamado no disyunción en la célula progenitora que puede ocurrir durante la primera o segunda división meiótica en la gametogénesis humana.

Sin embargo, no todos los cromosomas participan por igual en estos eventos de no disyunción, pues se ha visto que en los humanos los cromosomas de los grupos D y G, llamados acrocéntricos, están involucrados con mayor frecuencia y participan en los rearrreglos cromosómicos más comunes, como lo es la trisomía 21 o síndrome de Down, en la que el individuo afectado presenta un cromosoma 21 (del grupo G) extra.

Un factor que ha sido considerado como predisponente de la no disyunción de los cromosomas acrocéntricos (C.A.) es la llamada "asociación de satélites", que consiste en la proximidad de los C.A. a través de estas estructuras en la metafase. Además, en los tallos de los satélites de los C.A. se localizan los genes que codifican para el RNA ribosomal, y la asociación de satélites podría estar influenciada por la actividad transcripcional de los genes ribosomales, pues éstos deben unirse durante la interfase para formar el nucléolo, que es donde se sintetiza el RNAr, por lo que fallas en la estructura o en el funcionamiento de estos genes pudieran favorecer entrelazamientos entre los C.A., originando las asociaciones de

atélites en la metafase y el consecuente riesgo de no disyunción.

El objetivo del presente estudio fué analizar citogenéticamente las frecuencias de actividad de los genes ribosomales y de asociación de satélites, además de investigar si existía una correlación entre ellas, así como determinar la relación entre éstos parámetros y el sexo y la edad, en una población normal y en familias en que se han presentado problemas genético-reproductivos, como son las de síndrome de Down y las de aborto habitual, con la finalidad de observar si existen diferencias entre éstas poblaciones que puedan ser útiles tanto en la comprensión de las causas de la alteración, como en la estimación del riesgo genético.

Con ello se espera contribuir al desarrollo de la Biología, así como a la solución de los problemas genéticos de salud en la población.

ANTECEDENTES.-

Con el progreso de las técnicas de cultivo y el empleo de soluciones hipotónicas en la preparación de los cariotipos, fué posible establecer en 1956 que el número normal de cromosomas en el humano es de 46 (44 + XX en la mujer y 44 + XY en el varón). (77).

La individualización de los distintos pares de cromosomas homólogos se logró basándose en su morfología, tamaño relativo, grado de condensación de la cromatina y patrón de distribución de proteínas sobre ésta (bandas), así como otras características estructurales. En el cariotipo humano, los 22 pares de autosomas se numeran en orden decreciente de longitud y son clasificados además por la posición del centrómero en: a) Metacéntricos, que son los cromosomas que poseen su centrómero en la parte media; b) Submetacéntricos, los que lo tienen entre la parte media y un extremo, y c) Acrocéntricos, que lo tienen en un extremo. (32).

En 1960, durante la Conferencia de Denver, en Colorado, E.U.A., sobre la estandarización de los cromosomas, se adoptó un sistema de clasificación para ellos. De acuerdo con ésta, se dividen en los siguientes grupos: (16)

- A. Pares metacéntricos 1, 2 y 3.
- B. Pares submetacéntricos 4 y 5.
- C. Pares submetacéntricos 6, 7, 8, 9, 10, 11 y 12.
- D. Pares acrocéntricos 13, 14 y 15.
- E. Pares submetacéntricos 16, 17 y 18.
- F. Pares aproximadamente metacéntricos 19 y 20.
- G. Pares acrocéntricos 21 y 22.

En 1961, Ferguson-Smith y Handmaker demostraron que los cinco pares de cromosomas acrocéntricos (C.A.), 13, 14, 15, 21 y 22 pueden tener satélites, pero su presencia y número suele ser variable en una célula en particular. (32). Los satélites son dos elementos morfológicos redondos colocados cada uno en el extremo de los brazos cortos de los C.A. y están unidos a los cromosomas por un delgado segmento cromatínico llamado tallo del satélite. (17).

También en 1961 se informó que las terminaciones de los satélites se asocian entre sí durante la metafase con una frecuencia mayor a la que tendrían si el evento fuese al azar. El número máximo de estas asociaciones era de seis, en cual-

quer célula, lo cual se relaciona con las observaciones de que en una célula en particular hay un número máximo de seis C.A. con satélites y un máximo de seis nucléolos en la interfase. (32).

En 1963 se llegó a la conclusión de que los nucléolos son el resultado de las asociaciones de los C.A. a través de sus satélites, fusionándose varios de ellos para formar un solo nucléolo en la interfase. El punto de unión ~~son los puntos~~ de los satélites. A estas regiones cromosómicas se les llamó "regiones organizadoras del nucléolo" (nucleolar organizer regions o NORs). Por lo tanto, de los diez C.A. humanos, seis poseen NORs activos para la formación del nucléolo, y en los otros cuatro los NORs son inactivos. (32).

En años recientes se han desarrollado técnicas con las cuales los NORs pueden ser teñidos específicamente en preparaciones cromosómicas rutinarias, por métodos basados en la utilización de nitrato de plata (4, 28, 30, 44, 74, 84) o por el método de bandeado N. (25, 63, 84). Mediante las técnicas de hibridización in situ de DNA-RNA se ha establecido que, en el humano, los sitios que se marcan con estos procedimientos son los tallos de los satélites, región donde se localiza el DNA ribosomal 18S y 28S (5, 9, 21, 22, 41). Además se ha observado que la fracción 5S del DNAr está localizada en el cromosoma número 1. (2).

Mientras que con la técnica de hibridización se marcan los NORs de los diez C.A., el nitrato de plata tiñe sólo de tres a nueve de ellos. (4, 7, 79). La sustancia que se tiñe con la plata se encuentra localizada en la superficie externa de los NORs y no forma parte del cromosoma; diversos estudios sobre esto indican que el material que reacciona con la plata (Ag^+) es una proteína ribonucleica acídica que se acumula alrededor de los NORs que estuvieron transcripcionalmente activos en la interfase precedente, y algún residuo de ella permanece unido a los NORs en la metafase. (31, 43, 71, 73).

Por lo tanto, la presencia o ausencia de tinción con plata de los NORs está en relación directa con su funcionamiento, por lo que el promedio de NORs activos (Ag^+) en una célula determinada puede variar en diferentes condiciones fisiológicas y del desarrollo, así como durante la diferenciación celular (43, 71, 73); o puede depender del contenido genético, como se ha visto en pacientes con cáncer, cuyas células afectadas tienen un contenido genético anormal (8, 78, 79), o en híbridos celulares somáticos, en los que se pierden algunos cromosomas y hay activación y supresión de NORs. (11, 50, 58, 59).

El número de NORs-Ag⁺ puede variar dependiendo del sexo y la edad de los individuos (4, 24, 27, 46, 49), o el estado funcional de la glándula tiroides (85). Se ha observado que un número anormal de NORs-Ag⁺ puede estar relacionado con alteraciones en el número o estructura de los cromosomas, tanto en los individuos afectados con tales anomalías (1, 18, 20, 45, 46, 47, 55, 57, 68, 72), como en los padres de éstos. (18, 47, 57, 68).

El comportamiento de los NORs, tanto en los individuos normales como en los portadores de defectos genéticos sugiere que el sistema de activación de los genes ribosomales es flexible, a diferencia de lo que sucede en los cromosomas X en las células somáticas de las mujeres, en las que uno de los cromosomas X es siempre inactivo. (83).

En las células de un mismo individuo existe un número modal de NORs-Ag⁺ que es constante (4, 79) y se mantiene estable en diferentes tejidos (54), perdurando por largo tiempo. (53, 79, 83). Además, el patrón de tinción de los NORs de los diferentes C.A. de un individuo es constante, como fué determinado mediante bandeo Q (54), y este patrón es una característica heredable dentro de ciertos límites. (47, 75, 83).

En la población normal, el promedio de C.A. con NORs-Ag⁺ es de seis por célula (4,46,53,79), lo que está de acuerdo con el número máximo que se ha informado de nucléolos y C.A. en asociación en las profases de células normales. Como seis de estos cromosomas pertenecen al grupo D y cuatro al G, se espera que el 60% (3.5) y el 40% (2.5) correspondan a los grupos D y G respectivamente. (17, 32).

Como se mencionó anteriormente, los C.A. con NORs activos tienden a formar un nucléolo común, por lo que las regiones adyacentes a los NORs están muy cercanas entre sí durante la interfase. Esto propicia una frecuencia mayor de rompimientos comparados con otras regiones cromosómicas. (65). La idea de que los NORs pueden estar implicados en algunas anomalías cromosómicas es apoyada por el hecho de que en muchos casos de translocaciones de regiones de C.A. se presentan NORs anormales (18, 20, 33, 42, 45, 51, 55, 70, 72), y por estudios en los que se muestra que la actinomicina D ocasiona entrelazamientos y rupturas específicamente en los NORs. (66).

Un factor que puede ser predisponente de los eventos de translocación y no disyunción de los C.A. es la llamada "asociación de satélites" (12, 13, 15, 19,

7, 65, 85), que consiste en la proximidad durante la metafase de dos o más C.A. a través de éstas estructuras. (12, 32). La tinción con plata muestra uniones entre las regiones de satélites de los C.A. en asociación. (15).

Algunos estudios en los cuales se usaron técnicas para la identificación cromosómica individual han tratado de establecer la posible existencia de una relación entre la asociación de satélites, translocaciones y el fenómeno de no disyunción (30, 56, 76); en individuos normales, algunos autores han encontrado que los diferentes C.A. participan en las asociaciones con frecuencias iguales a las esperadas al azar, considerando como el total a 1.0 C.A. asociados por célula, 0.60 del grupo D y 0.40 del grupo G (3, 15, 34), aunque otros autores informan que los del grupo D o G participan más frecuentemente que lo que se espera al azar. (10, 62).

Sin embargo, al igual que el patrón de tinción de NORs, el de asociación de satélites puede variar entre los individuos de acuerdo a su sexo y edad (6, 34, 48, 49), el estado funcional de la tiroides (64, 85), y en individuos portadores de rearrreglos cromosómicos (35, 47, 56), así como en los padres de éstos (30, 39, 47, 56, 76).

Diversos autores han estudiado la relación existente entre la actividad de los genes ribosomales y la asociación de satélites, y se piensa que hay una estrecha relación entre éstos parámetros, puesto que los C.A. involucrados en las asociaciones son siempre teñidos con plata (13, 15) y si un C.A. pierde sus NORs, nunca es teñido con plata ni interviene en asociaciones (12, 67).

Por otra parte, existen informes de algunas variantes morfológicas de los NORs que participan en asociaciones y son teñidos con plata más frecuentemente que los normales. (13, 19). También se ha visto que la frecuencia de asociación de satélites puede estar correlacionada con el número de genes ribosomales de un NOR particular (20, 81), o con el tamaño del depósito de plata que sobre él se acumula al teñirlo. (13, 19, 27, 59, 75). Igualmente al estudiar a pacientes hipertiroideos se encontró que después del tratamiento había una frecuencia aumentada de asociación de satélites y actividad de NORs del cromosoma número 14. (85).

En individuos con síndrome de Down (trisomía 21) se vió que puede haber una compensación de la dosis génica en las células trisómicas, pues aunque tienen un acrocéntrico extra, el número de NORs activos y de C.A. que participan en asociaciones de satélites no difiere significativamente de lo esperado (86), aunque la información anterior no fué confirmada en otro estudio. (82).

Recientemente, se han realizado estudios sobre la frecuencia de asociación de satélites en los padres de individuos con síndrome de Down, con el propósito de ver si existe una alteración de este factor que pudiera estar relacionado con el fenómeno de no disyunción. Algunos de éstos padres son portadores de translocaciones que originan la trisomía (80), pero cerca del 90% de los casos de síndrome de Down se deben a trisomía regular, y los padres tienen un cariotipo normal. (23, 32, 40,69).

Algunos autores sostienen que existen frecuencias aumentadas de asociación de satélites en los padres de los individuos trisómicos (6, 29, 36, 38, 52, 68, 76). Además se ha informado que la edad de los padres puede ser un factor importante en la aparición de la trisomía 21, principalmente la de la madre, pues se ha visto que éstos son en su mayoría de edad avanzada al momento del nacimiento del hijo trisómico. (6, 61).

El aborto habitual ha sido estudiado en relación a rearrreglos estructurales de los cromosomas de la pareja afectada, y se ha observado que sólo un 30% de los casos presentan una anomalía estructural detectable citogenéticamente. (14, 26). Sin embargo, en este tipo de población no se han estudiado las frecuencias de asociación de satélites y de actividad de NORs en comparación a un grupo testigo, así como tampoco se ha estudiado en los padres de trisómicos la frecuencia de actividad de NORs. Por lo tanto, el estudio de las frecuencias de NORs activos y de asociación de satélites en los casos de problemas genético-reproductivos, como las familias de síndrome de Down y las parejas de aborto habitual, pudieran tener utilidad para la comprensión de las posibles causas de estos problemas, así como en la estimación del riesgo genético, por lo que en el presente estudio se pretende evaluarlas, comparándolas contra un grupo de individuos sin antecedentes de problemas genético-reproductivos.

MATERIAL Y METODO .

Población estudiada.

En el presente estudio se analizan 63 individuos que se dividieron en cinco grupos. (Tabla I). Todos los individuos presentaron un cariotipo normal tanto numérico como estructural, excepto las personas del grupo número cinco; estos grupos fueron los siguientes:

- 1) Grupo testigo. Formado por 15 individuos fenotípicamente normales, sin antecedentes genéticos y no emparentados entre sí. Incluye ocho hombres y siete mujeres, con una edad promedio de 30 años.
- 2) Padres jóvenes de trisómicos. Formado por ocho parejas que procrearon hijos con trisomía 21 regular. Tenían una edad promedio de 30 años.
- 3) Padres mayores de 30 años de trisómicos. Incluye siete parejas con una edad promedio de 52 años, que procrearon cada una un hijo con trisomía 21 regular.
- 4) Parejas con problemas de aborto habitual. Formado por cinco parejas que habían tenido abortos sucesivos por causas no especificadas. Tenían una edad promedio de 26 años.
- 5) Hijos trisómicos. Incluye ocho hijos con trisomía 21 regular; cada uno de ellos era hijo de una pareja diferente. La edad promedio en este grupo fué de 10 años.

Técnicas de laboratorio.

Se obtuvo el cariotipo de cada uno de los 63 individuos involucrados en este estudio por medio de las técnicas convencionales. Todas las preparaciones cromosómicas analizadas se tiñeron con nitrato de plata, usando el método desarrollado por Howell y Black (44), con el cual se tiñen selectivamente los NORs activos de los cromosomas acrocéntricos (C.A.) humanos. Los métodos para obtener microcultivos de linfocitos de sangre periférica de los que se obtuvieron los cariotipos y el usado para la tinción de NORs se describen a continuación.

I.- Preparación del medio de cultivo.

El medio de cultivo utilizado en este trabajo fué el de McCoy 5A modificado, y los componentes de cada frasco de cultivo son los siguientes:

1. Medio McCoy 5A modificado. (GIBCO).	8.00 ml.
2. Suero fetal de ternera. (GIBCO).	2.00 ml.
3. Ficohemaglutinina. (GIBCO).	0.3 ml.
4. Heparina. (Lipohepin).	0.1 ml.
5. Solución de antibióticos:	
Penicilina 1000 u/ml. + Estreptomicina 2000 microgramos/ml.	0.05 ml.

II.- Inoculación y cultivo.

1. Se calientan los tubos con el medio de cultivo a 37°C. en baño maría.
2. Se toman 0.5 ml. de sangre con una jeringa heparinizada. Se quita la aguja y se agregan seis o siete gotas de sangre al medio de cultivo, e inmediatamente se mezcla la sangre con movimientos suaves. Todos los pasos anteriores deben hacerse con la mayor precaución y limpieza posibles para evitar la contaminación.
3. En posición vertical se incuban los tubos inoculados con sangre a 37°C. durante 68 a 72 horas.
4. Se agregan 0.2 ml. de una solución de Colcemid de 10 microgramos/ml. al medio de cultivo y nuevamente se incuban por una hora a 37°C. Lo anterior con el fin de detener la división de los linfocitos en metafase.

III.- Cosecha de linfocitos.

1. Se transfiere el medio a un tubo cónico de centrifuga de 15 ml., y se centrifuga por cinco minutos a 700-800 r.p.m.
2. Con una pipeta Pasteur se remueve lentamente el sobrenadante, dejando sólo 0.5 ml.
3. Agregar 4 ml. de una solución recién preparada de KCl (0.075 M). Con la misma pipeta para cada tubo se resuspenden las células y se incuban los tubos a 37°C. por 15 minutos.
4. Se centrifuga a 700-800 r.p.m. durante cinco minutos.
5. Con la pipeta se remueve el líquido sobrenadante, dejando sólo 0.5 ml.
6. Lentamente se agregan 4 ml. de fijador de reciente preparación (una parte de ácido acético glacial y tres partes de metanol). Sin agitar las células se dejan reposar por cinco minutos a temperatura ambiente.

7. Centrifugar a 700-800 r.p.m. durante cinco minutos.
8. Con la pipeta se remueve el líquido sobrenadante, dejando sólo 0.5 ml.
9. Agregar 4 ml. de fijador y resuspender las células con la pipeta.
10. Se centrifuga a 700-800 r.p.m. durante cinco minutos.
11. Con la pipeta se remueve el líquido sobrenadante, dejando 0.5 ml.
12. Se repiten los pasos 10 y 11 hasta que la suspensión celular (botón) se vea limpia.
13. Se remueve el sobrenadante dejando sólo 0.2 ml., resuspender las células en este volumen.

IV.- Preparaciones microscópicas.

1. Se deben usar portaobjetos limpios que hayan sido guardados en agua destilada o etanol cuando menos cuatro horas antes de realizar las preparaciones.
2. En el portaobjetos se colocan dos gotas de la suspensión de células e inmediatamente se pasa el portaobjetos sobre una llama de mechero. (Con los 0.2 ml. de la suspensión de células pueden prepararse de tres a cuatro portaobjetos).
3. En seguida se tiñen las laminillas con el método para la visualización de los NORs. El procedimiento se describe a continuación.

V.- Tinción específica de los NORs con nitrato de plata.

Se colocan cuatro gotas de la solución Ag I (4 gr. de AgNO_3 disueltos en 8 ml. de agua deionizada) sobre la superficie del portaobjetos no teñido y se coloca el cubreobjetos. La preparación se deja sobre la superficie de una placa térmica estabilizada a 68°C . por tres a cinco minutos; durante este tiempo el AgNO_3 cristaliza alrededor y debajo del cubreobjetos. Se lava la preparación con agua deionizada corriente para remover el cubreobjetos y se seca con aire.

Se agregan a la superficie de la preparación dos gotas de formalin 3% (neutralizado con cristales de acetato de sodio y envejecido por lo menos tres días antes de su uso) y dos gotas de la solución Ag II (4 gr. de AgNO_3 disueltos en 5 ml. de agua deionizada y 7.5 ml. de NH_4OH) y se coloca sobre ella un cubreobjetos.

Se sigue el progreso de la reacción bajo el microscopio de contraste de fases, hasta que los NORs se pueden ver de color negro y los brazos de los cromosomas de un color amarillo claro. Entonces se lava la preparación con agua deionizada y se seca con aire. Se monta la preparación agregando resina entre el cubre y el portaobjetos.

Criterio experimental.

I.- Cuantificación de los promedios de NORs-Ag⁺ y de C.A. asociados.

En cada individuo se calculó tanto el promedio de C.A. (cromosomas acrocéntricos) que se teñían con plata como de C.A. asociados por célula, cuantificando en 25 células metafásicas de cada individuo.

Como criterio de actividad de NORs no se consideró el tamaño del depósito de plata, sino solamente su presencia, y sólo se consideraron como asociados aquellos cromosomas que mostraban puentes de material Ag⁺ entre los extremos en asociación. (15, 83). Asimismo, sólo se clasificaron los C.A. de acuerdo al grupo a que pertenecían (D o G), y no se especificaron pares determinados para evitar el posible ocultamiento de NORs-Ag⁺ que pudiera ocasionar el proceso de bandeo G, que es necesario para la identificación de los distintos pares de cromosomas.

Esta información se agrupó y se comparó entre las poblaciones antes descritas. Además, para cada población se calculó el coeficiente de correlación (r) entre los parámetros estudiados.

II.- Comparación de los promedios de NORs-Ag⁺ y de C.A. asociados.

Sólo se compararon contra el grupo testigo y de acuerdo al sexo las poblaciones de padres jóvenes de trisómicos y las parejas de aborto habitual, debido a que sólo en éstas poblaciones la edad promedio fué similar.

Con el propósito de observar el efecto de la edad sobre el promedio de NORs-Ag⁺ y de C.A. asociados, la población de los padres mayores de trisómicos se comparó contra la de los padres jóvenes de trisómicos.

Con el objetivo de analizar el efecto del cromosoma 21 extra, se compararon los resultados obtenidos en los hijos trisómicos contra los esperados en una población normal. (4, 32).

Todas las comparaciones fueron realizadas mediante pruebas de X^2 , y el coeficiente de correlación se calculó con el método paramétrico de Pearson.

RESULTADOS Y DISCUSION.

I. Comparación de los resultados obtenidos en los padres jóvenes de trisómicos y en las parejas de aborto habitual con el grupo testigo, de acuerdo al sexo.

Con el objeto de determinar si los padres jóvenes de trisómicos (P.J.T.) y las parejas de aborto habitual (P.A.H.) tenían promedios de C.A. con NORs-Ag⁺ (\bar{X}_1) y de C.A. asociados (\bar{X}_2) por célula, en ambos grupos D y G en conjunto e individualmente, diferentes a los encontrados en las personas del grupo testigo (G.T.), se compararon los resultados obtenidos en estas poblaciones, de acuerdo al sexo, mediante pruebas de χ^2 . Además se determinó el coeficiente de correlación (r) entre éstos parámetros en las poblaciones mencionadas. Los resultados obtenidos se muestran a continuación.

A.- En Hombres.

Ambos grupos D y G.

En la tabla II puede observarse que los promedios por célula de C.A. con NORs-Ag⁺ (\bar{X}_1) variaron del 6.13 en el G.T. al 7.34 en las P.A.H.; igualmente los promedios de C.A. asociados (\bar{X}_2) tuvieron una variación del 1.42 en el G.T. al 2.93 en las P.A.H. Cuando las \bar{X}_1 y \bar{X}_2 de los P.J.T. y las P.A.H. se compararon contra las del G.T. se encontró que eran estadísticamente diferentes con $p < 0.01$. Los coeficientes de correlación entre los C.A. con NORs-Ag⁺ y los asociados, dentro de cada población, no fueron significativos.

Grupo D.

Los promedios por célula de C.A. del grupo D con NORs-Ag⁺ (\bar{X}_1) y asociados (\bar{X}_2) se presentan en la tabla III. Es posible observar que los valores de las \bar{X}_1 variaron del 3.82 en el G.T. al 4.19 en las P.A.H., pero las diferencias encontradas entre los tres grupos estudiados no fueron significativas. Por otra parte, los promedios de C.A. del grupo D asociados (\bar{X}_2) variaron entre 0.82 en el G.T. y 1.62 en las P.A.H., encontrándose que la \bar{X}_2 del G.T. fué significativamente distinta a las de los P.J.T. y las P.A.H. con $p < 0.01$. Cuando se calculó el coeficiente de correlación entre el número de C.A. del grupo D con NORs-Ag⁺ y el número de asociados, dentro de cada grupo de hombres, se encontró que no era significativo.

Grupo G.

En la tabla IV se presentan las medias de C.A. del grupo G con NORs-Ag⁺ (\bar{X}_1) y asociados (\bar{X}_2). Se encontró que los valores de \bar{X}_1 variaron del 2.31 en el G.T. al 3.16 en las P.A.H.; también se encontró que la \bar{X}_2 tuvo variaciones del 0.60 en el G.T. al 1.31 en las P.A.H. Cuando las \bar{X}_1 y \bar{X}_2 encontradas en los hombres de los P. J.T. y las P.A.H. se compararon contra las de los hombres del G.T., fueron estadísticamente diferentes, con $p < 0.01$. Al igual que en las tablas anteriores, dentro de cada grupo de personas estudiadas, no se encontraron coeficientes de correlación significativos entre el número de C.A. del grupo G con NORs-Ag⁺ y el de asociados.

En la población de hombres del G.T., tanto los promedios de C.A. con NORs-Ag⁺ de ambos grupos D y G (6.13), del grupo D (3.82) y del grupo G (2.31), como el promedio de C.A. asociados de los dos grupos (1.42), del D (0.82) y del G (0.60) se encuentran dentro de los límites que han sido informados en la literatura para personas testigo y que son proporcionales al número de cromosomas que se encuentran en cada grupo de acrocéntricos. (3, 4, 15, 34, 46, 53, 79).

Se encontraron diferencias significativas entre éstos promedios y los de los padres jóvenes de trisómicos y los hombres de las parejas de aborto habitual, excepto en los promedios de NORs-Ag⁺ del grupo D en ambas poblaciones, lo cual apoya lo informado por otros autores que han encontrado una alta frecuencia de asociación de satélites en los padres de trisómicos. (29, 36, 37, 38, 52, 76). No se dispone de informes sobre alta actividad de NORs, en comparación a un grupo testigo, en los padres de trisómicos, sino solamente de alta actividad de NORs y de asociación de satélites del cromosoma número 21 en comparación con los demás C.A. (13, 37, 39, 76). Tampoco se han encontrado informes de actividad de NORs y asociación de satélites en comparación a un grupo testigo en las parejas de aborto habitual. En relación a que los hombres de las P.A.H. tuvieron mayores promedios de C.A. con NORs-Ag⁺ y asociados que los padres de trisómicos, no se encontraron informes en la literatura disponible.

En ninguna de las tres poblaciones de hombres se encontró una correlación significativa entre los parámetros estudiados. Se ha informado de la existencia de una correlación entre el tamaño del depósito de plata, como criterio de actividad de NORs, y la frecuencia de asociación de satélites de un cromosoma determinado, pero en el presente estudio sólo se consideró la presencia de tinción, independientemente del tamaño. (13, 19, 27, 59, 75).

B.- En Mujeres.

Ambos grupos D y G.

Los promedios por célula de C.A. de los grupos D y G con NORs-Ag⁺ (\bar{X}_1) y asociados (\bar{X}_2) se presentan en la tabla V. Puede observarse que los promedios de C.A. con NORs-Ag⁺ en las mujeres de los P.J.T., 6.94, y en las de las P.A.H., 6.93, fueron estadísticamente distintos al de las mujeres del G.T., 6.25, con una $p < 0.01$. Igualmente los promedios de C.A. asociados, de 2.50 y 2.59 en las mujeres de los P.J.T. y P.A.H. fueron también significativamente diferentes al promedio de 1.76 de las mujeres del G.T. Con referencia al coeficiente de correlación entre el \bar{X}_1 y el \bar{X}_2 , sólo fué positivo con $p < 0.05$ en el grupo de las mujeres testigo.

Grupo D.

En la tabla VI se presentan los promedios por célula de C.A. del grupo D con NORs-Ag⁺ (\bar{X}_1) y asociados (\bar{X}_2). Los valores de \bar{X}_1 encontrados en las madres de tri-sómicos, 4.35, y en las mujeres de aborto habitual, 4.26, fueron significativamente distintos, con $p < 0.01$, al encontrado en las mujeres del G.T., de 3.61. Igualmente los valores de \bar{X}_2 de 1.42 en los P.J.T. y de 1.47 en las P.A.H. fueron diferentes al 0.93 encontrado en el G.T. con $p < 0.01$. En ninguno de estos grupos se encontró una correlación significativa entre las \bar{X}_1 y \bar{X}_2 del grupo D.

Grupo G.

Los promedios por célula de C.A. del grupo G con NORs-Ag⁺ (\bar{X}_1) y asociados (\bar{X}_2) se presentan en la tabla VII. Puede observarse que los \bar{X}_1 fueron muy parecidos en los tres grupos de mujeres, pero los \bar{X}_2 fueron estadísticamente mayores, con $p < 0.05$ en las P.J.T., de 1.08, y en las P.A.H., de 1.12, que en las mujeres del G.T., de 0.82. Con referencia al coeficiente de correlación entre las \bar{X}_1 y las \bar{X}_2 se encontró que fué positivo y significativo, con $p < 0.05$, en el G.T. y los P.J.T.

Al igual que en el grupo de hombres testigo, en el de las mujeres testigo, el \bar{X}_1 de los grupos D y G y separadamente cada uno de ellos, tuvieron valores muy parecidos a los informados en la literatura para poblaciones testigo, de 6.00, 3.50 y 2.50 respectivamente. Igualmente los \bar{X}_2 son muy similares a los encontrados en otras poblaciones testigo, de 1.00, 0.60 y 0.40 respectivamente. (3, 4, 15, 34, 46, 53, 79).

Se encontraron diferencias significativas entre los promedios de C.A. con NORs-Ag⁺ y asociados del G.T. y los de los P.J.T. y las P.A.H., excepto en el \bar{X}_1 del grupo G en ambas poblaciones, lo cual apoya lo informado anteriormente sobre la frecuencia elevada de asociación de satélites en las madres de trisómicos. (6, 29, 36, 38, 52, 76). No se tiene información disponible sobre alta actividad de NORs, en comparación a un grupo testigo, en madres de trisómicos, así como tampoco de actividad de NORs y asociación de satélites en las P.A.H.

Las mujeres de las P.A.H. tuvieron mayores \bar{X}_1 y \bar{X}_2 que las de los P.J.T., excepto en el \bar{X}_1 de ambos grupos D y G y del grupo D. No se encontraron informes en la literatura sobre este aspecto.

Los parámetros aquí estudiados se correlacionaron positivamente y significativamente en el promedio de C.A. de ambos grupos D y G y en el del grupo G de las mujeres del G.T., y en el grupo G de las mujeres de los P.J.T., pero no se encontraron informes en la literatura de correlación entre el promedio de C.A. por célula con NORs-Ag⁺ y el de asociados, independientemente del tamaño del depósito de plata y sin considerar pares particulares de C.A., tanto en poblaciones normales como en P.J.T. y P.A.H.

II. Efecto de la edad en los progenitores de trisómicos.

Con el objeto de estudiar el efecto de la edad sobre el promedio de C.A. por célula, con NORs-Ag⁺ (\bar{X}_1) y el de C.A. asociados (\bar{X}_2) en los progenitores de trisómicos, mediante pruebas de X^2 se compararon los promedios encontrados en los padres jóvenes de trisómicos (P.J.T.) contra los de los padres mayores de 30 años de trisómicos (P.M.T.), de acuerdo al sexo, para ambos grupos de C.A. en conjunto y para cada uno de ellos separadamente. Además se calculó el coeficiente de correlación entre éstos parámetros en los P.M.T. Los resultados obtenidos se comentan a continuación.

A.- En Hombres.

Ambos grupos D y G.

En la tabla VIII se puede observar que existe una disminución tanto en el número promedio de C.A. con NORs-Ag⁺ (\bar{X}_1) como en el de asociados (\bar{X}_2) al aumentar la edad de los padres varones de trisómicos, pero sólo se encontró diferencia significativa en esta disminución, con $p < 0.05$, en el \bar{X}_1 de 6.92 a 6.31. Por otra parte, no se encontró correlación entre los parámetros estudiados en ambos grupos de P.J.T. y P.M.T.

Grupo D.

Puede observarse en la tabla IX que casi no hubo cambio en los dos grupos de edad en los valores de \bar{X}_1 , 4.11 y 4.08, y en los \bar{X}_2 , 1.20 y 1.20 de los C.A. del grupo D en los padres varones de trisómicos. La correlación entre los \bar{X}_1 y \bar{X}_2 en los dos grupos de padres de trisómicos no fué significativa.

Grupo G.

En la tabla X se muestra que los \bar{X}_1 y \bar{X}_2 del grupo G en los padres varones de trisómicos tuvieron una disminución significativa en el grupo de mayor edad, con $p < 0.01$ y $p < 0.05$ respectivamente. El \bar{X}_1 bajó de 2.81 a 2.23 y el \bar{X}_2 de 0.90 a 0.63 de los jóvenes a los mayores. No se encontró correlación significativa entre los parámetros evaluados en los dos grupos de padres varones estudiados.

B.- En Mujeres.

Ambos grupos D y G.

En la tabla XI se observa que en las madres de trisómicos, al igual que en los padres varones, hubo una disminución con la edad en el \bar{X}_1 de ambos grupos D y G, así como también en el \bar{X}_2 , siendo de 6.94 a 6.41 y 2.50 a 2.21 respectivamente, aunque estas diferencias encontradas no fueron significativas. Por otra parte, no se encontró correlación entre estos valores en cada grupo de madres de trisómicos.

Grupo D.

Puede observarse en la tabla XII que tanto el \bar{X}_1 como el \bar{X}_2 del grupo D en las madres de trisómicos disminuyeron significativamente en el grupo de mayor edad, con $p < 0.01$ y $p < 0.05$ respectivamente, de 4.35 a 3.42 y de 1.42 a 1.11. Sin embargo, no se obtuvo correlación significativa entre éstos parámetros en ambos grupos de madres.

Grupo G.

En relación a los \bar{X}_1 y \bar{X}_2 del grupo G, puede observarse en la tabla XIII que, a diferencia de lo encontrado en el grupo D, que en las madres de trisómicos de mayor edad se incrementan los valores de \bar{X}_1 y de \bar{X}_2 en relación a las madres jóvenes, aunque sólo para el \bar{X}_1 el incremento de 2.59 a 2.99 fué significativo con una $p < 0.05$. Cuando se estimó el coeficiente de correlación entre éstos promedios, únicamente en el grupo de las madres jóvenes fué significativo con una $p < 0.05$.

En general se observó que en los padres varones de trisómicos hubo una disminución en el grupo de mayor edad, tanto en el promedio de C.A. con NORs-Ag⁺ (\bar{X}_1) como en el de asociados (\bar{X}_2), cuando se analizaron ambos grupos de cromosomas D y G en conjunto y separadamente, pero sólo fué significativo en el \bar{X}_1 de ambos grupos D y G en conjunto, y en el \bar{X}_2 del grupo G. En las madres de trisómicos también se observó una disminución en las mujeres de mayor edad en los \bar{X}_1 y \bar{X}_2 de ambos grupos D y G y del grupo D, mientras que en los promedios del grupo G de ellas se observó un aumento en las de mayor edad en los valores de \bar{X}_1 y \bar{X}_2 , pero sólo fué significativo en el \bar{X}_1 .

Estos últimos resultados apoyan lo encontrado en otros estudios sobre la mayor participación del cromosoma número 21, y por lo tanto del grupo G, en asociaciones de satélites en las madres de trisómicos, y más frecuentemente en las de mayor edad. (6, 29, 36, 37, 38, 52, 76). No se encontró información en la literatura sobre la disminución con la edad de las frecuencias de NORs-Ag⁺ y de C.A. asociados en los padres de trisómicos, principalmente del grupo G en los hombres y del grupo D en las mujeres, como fué lo observado en el presente estudio.

En los padres y madres mayores de trisómicos no se encontraron correlaciones significativas entre los parámetros estudiados, tanto para ambos grupos de C.A. como en los grupos D y G separadamente. No se localizaron resultados sobre este tipo de correlación en la literatura disponible.

III. Efecto del sexo en el grupo testigo, padres jóvenes y mayores de trisómicos y parejas de aborto habitual.

Con el objetivo de analizar el efecto que pudiera tener el sexo sobre las frecuencias de C.A. con NORs-Ag⁺ y asociados por célula (\bar{X}_1 y \bar{X}_2) en los grupos de testigos (G.T.), los padres jóvenes y mayores de trisómicos (P.J.T. y P.M.T.) y las parejas de aborto habitual (P.A.H.), se compararon los resultados de los hombres contra los de las mujeres en cada población, en ambos grupos de C.A. D y G, así como en cada uno por separado, haciendo un agrupamiento de la información de las tablas anteriores, de acuerdo al sexo de las personas y los C.A. analizados. (Tablas XIV, XV y XVI).

Puede observarse que en el grupo testigo, las mujeres tuvieron valores mayores de C.A. con NORs-Ag⁺ (\bar{X}_1) y asociados (\bar{X}_2) que los hombres, tanto para ambos grupos D y G como para cada uno de ellos por separado, excepto en el \bar{X}_1 del grupo D. En los padres jóvenes de trisómicos, al igual que en el G.T., las mujeres tuvieron mayores \bar{X}_1 y \bar{X}_2 que los hombres, tanto en ambos grupos D y G como en cada uno separadamente, con excepción del \bar{X}_1 del grupo G, que fué mayor en los hombres.

En los padres mayores de trisómicos, las mujeres también tuvieron mayores \bar{X}_1 y \bar{X}_2 que los hombres, excepto en los \bar{X}_1 y \bar{X}_2 del grupo D, que fueron más altos en los hombres, posiblemente debido a la disminución con la edad de estos promedios en las madres de trisómicos. En las parejas de aborto habitual, a diferencia del G.T. y los padres de trisómicos, los hombres tuvieron los mayores promedios, tanto para ambos grupos D y G juntos como para cada uno por separado, excepto en el \bar{X}_1 del grupo D.

En general se observó que tanto en el grupo testigo como en los padres jóvenes y mayores de trisómicos, las mujeres tuvieron promedios de C.A. con NORs-Ag⁺ y asociados más altos que los hombres, excepto en el \bar{X}_1 del grupo G en los P.J.T. y en los valores de \bar{X}_1 y \bar{X}_2 del grupo D en los P.M.T. Estos resultados apoyan lo informado respecto a la actividad de NORs y asociación de satélites, siendo más alta en las mujeres, tanto en poblaciones normales (48), como en padres de trisómicos. (36, 37, 38, 76). En las parejas de aborto habitual, a diferencia del grupo testigo y los padres jóvenes y mayores de trisómicos, los hombres tuvieron mayores promedios de C.A. con NORs-Ag⁺ y asociados que las mujeres, excepto en el valor de \bar{X}_1 del grupo D. No se encontraron en la literatura informes de lo anterior en relación a las parejas de aborto habitual.

IV. Comparación de acuerdo al sexo de los promedios de C.A. por célula con NORs-Ag⁺ y asociados de los hijos trisómicos contra lo informado en la literatura para la población normal.

Con la finalidad de observar si los hijos trisómicos (H.T.) presentaban diferencias en los promedios de C.A. con NORs-Ag⁺ (\bar{X}_1) y de C.A. asociados (\bar{X}_2) por célula, comparados contra los esperados de acuerdo a lo informado para la población normal, que pudieran ser debidos al cromosoma número 21 que ellos presentan extra, mediante pruebas de X^2 se compararon estos promedios en ambos grupos de C.A. juntos y en los grupos D y G separadamente. Los resultados obtenidos, de acuerdo al sexo, se muestran a continuación.

A.- En Hombres.

Ambos grupo D y G.

En la tabla XVII puede observarse que en los hijos trisómicos existen \bar{X}_1 y \bar{X}_2 de los grupos D y G mayores a los esperados en la población normal, pero éstas diferencias sólo fueron significativas en los valores de \bar{X}_2 , de 1.54 y 1.00 respectivamente, con una $p < 0.01$.

Grupo D.

Los valores de \bar{X}_1 y \bar{X}_2 del grupo D en los hijos trisómicos son mayores a los esperados, como lo muestra la tabla XVIII, pero sin embargo las diferencias no fueron estadísticamente significativas.

Grupo G.

No se encontraron diferencias significativas en los \bar{X}_1 y \bar{X}_2 del grupo G en los hijos trisómicos y los esperados en la población normal, a pesar de que en los H.T. estos valores fueron mayores, como puede verse en la tabla XIX.

B.- En Mujeres.

Ambos grupos D y G.

Los valores de \bar{X}_1 y \bar{X}_2 para ambos grupos de C.A. en las hijas trisómicas fueron mayores que los esperados en la población normal, pero ésta diferencia sólo fué significativa para el \bar{X}_2 , de 3.55 y 1.00 respectivamente, con una $p < 0.01$, según se muestra en la tabla XX.

Grupo D.

En la tabla XXI puede verse que los promedios de C.A. \bar{X}_1 y \bar{X}_2 del grupo D en las H.T. fueron mayores que los valores teóricos, pero sólo la diferencia en el \bar{X}_2 , de 1.68 a 0.60 fué significativa con una $p < 0.01$.

Grupo G.

Los \bar{X}_1 y \bar{X}_2 del grupo G en las H.T. fueron mayores que los esperados (Tabla XXII), y se encontró diferencia significativa tanto en la \bar{X}_1 , 3.43 y 2.50, con una $p < 0.05$, como en la \bar{X}_2 , de 1.87 y 0.40, con $p < 0.01$.

Estos resultados apoyan lo que ha sido informado de la existencia de mecanismos compensatorios de la actividad de los NORs en los hijos trisómicos del sexo masculino (86), pero no lo hacen en los resultados del grupo G de las hijas trisómicas, lo cual al igual que en este trabajo se encontró un aumento en los promedios de C.A. con NORs-Ag⁺ y asociados. (82).

Asimismo, apoyan lo anteriormente informado sobre la alta frecuencia de asociación de satélites en hijos trisómicos, que en el presente estudio se encontró en las mujeres (82), mientras que en los hijos trisómicos varones esta frecuencia fué cercana a la esperada en individuos normales, lo que también ha sido encontrado por otros autores. (86).

CONCLUSIONES.

Los resultados anteriormente mencionados permiten derivar las siguientes conclusiones:

- 1- El grupo testigo estudiado presentó promedios de cromosomas acrocéntricos (C.A.) con NORs-Ag⁺ y de C.A. asociados, para ambos grupos de cromosomas en conjunto y de los grupos D y G por separado que fueron cercanos a los que han sido informados para las poblaciones normales.
- 2- Al comparar a los progenitores jóvenes de trisómicos contra el grupo testigo de acuerdo al sexo, se encontró una alta actividad de NORs, excepto en el grupo D de los hombres y el G de las mujeres.
- 3- Al comparar a las parejas de aborto habitual contra el grupo testigo de acuerdo al sexo, se encontró una alta actividad de NORs excepto en el grupo D de los hombres y el G de las mujeres.
- 4- Se encontró tanto en hombres como en mujeres una alta frecuencia de asociación de satélites en los padres jóvenes de trisómicos cuando se compararon contra el grupo testigo de acuerdo al sexo, tanto para los C.A. de los grupos D y G en conjunto como de cada uno por separado.
- 5- Se encontró tanto en hombres como en mujeres una alta frecuencia de asociación de satélites en las parejas de aborto habitual cuando se compararon contra el grupo testigo de acuerdo al sexo, para ambos grupos de C.A. y para los grupos D y G por separado.
- 6- Los hombres y mujeres de las parejas de aborto habitual tuvieron mayores promedios de C.A. con NORs-Ag⁺ y asociados por célula que los padres de trisómicos, excepto en el promedio de actividad de NORs del grupo D en las mujeres.
- 7- El número de C.A. con NORs-Ag⁺ y asociados solamente tuvieron una correlación positiva significativa en los promedios de cromosomas del grupo G de las mujeres del grupo testigo y en las madres jóvenes de trisómicos.

- 8- En los padres de trisómicos se encontró que al aumentar la edad se presentó una disminución en los promedios de C.A. con NORs-Ag⁺ y asociados del grupo G en los hombres y del grupo D en las mujeres.
- 9- En las madres de trisómicos al aumentar la edad se presentó un incremento de los promedios de C.A. con NORs-Ag⁺ y asociados del grupo G.
- 10- Las mujeres del grupo testigo tuvieron mayores promedios de C.A. con NORs-Ag⁺ y asociados que los hombres de este mismo grupo.
- 11- Las madres jóvenes y mayores de trisómicos tuvieron en general promedios más altos de C.A. con NORs-Ag⁺ y asociados que los padres varones de trisómicos, excepto en los promedios de NORs-Ag⁺ del grupo G de los padres jóvenes y de NORs-Ag⁺ y C.A. asociados del grupo D en los padres mayores.
- 12- Los hombres de las parejas con aborto habitual tuvieron en general promedios más altos de C.A. con NORs-Ag⁺ y asociados que las mujeres de este mismo grupo, excepto en el de NORs-Ag⁺ de los C.A. del grupo D.
- 13- Se encontró que en los hijos trisómicos varones existe una compensación de la actividad de los NORs y de la frecuencia de asociaciones de satélites de los C.A., pues aunque tienen un cromosoma número 21 extra, los promedios encontrados en ellos no difieren significativamente de los informados para la población normal.
- 14- En las hijas trisómicas se encontró que los C.A. del grupo G tenían una alta actividad de NORs y de asociación de satélites, por lo que en ellas no hubo una compensación de las actividad de los NORs debido al material cromosómico extra.

Con base a estas conclusiones es posible postular la hipótesis de que las elevadas frecuencias de actividad de NORs de los cromosomas acrocéntricos, evaluadas por su tinción positiva con plata, y de asociación de satélites, determinada por el número de cromosomas acrocéntricos asociados, encontradas en los padres de trisómicos, pueden ser factores relacionados con la aparición del síndrome de Down. Además, como en los cromosomas acrocéntricos del grupo G de las madres jóvenes de trisómicos éstos parámetros se correlacionaron y aumentaron con la edad, es posible que la no disyunción del cromosoma 21, que la mayoría de las veces ocurre durante la ovogénesis, esté influenciada por la mayor actividad de NORs y de asociaciones de satélites que se presenta, como se vió en este estudio, en los cromosomas acrocéntricos del grupo G principalmente en las mujeres, y más marcadamente en las madres de trisómicos.

Además, en los padres varones de trisómicos también se encontraron frecuencias elevadas de actividad de NORs y de asociaciones de satélites, por lo que es posible que también durante la espermatogénesis de ellos exista riesgo de no disyunción. Otra posibilidad es que tal vez sea necesario que en ambos padres se presenten frecuencias elevadas para que ocurra la concepción de un hijo con trisomía 21. Aunque no se ha establecido la relación entre las frecuencias de actividad de NORs y de asociación de satélites de los linfocitos de sangre periférica con los procesos de no disyunción que ocurren durante la formación de los gametos, el hecho de que en las parejas que ya tuvieron un hijo trisómico estas frecuencias se encuentren elevadas en sus linfocitos, sugiere que dicha relación debe de existir.

En las parejas de aborto habitual se encontraron mayores frecuencias de NORs activos y cromosomas acrocéntricos asociados que en los padres de trisómicos, lo cual sugiere que en los productos abortados se podría presentar una alteración cromosómica más grave que la que presentan los niños trisómicos 21, como efectivamente se ha observado en los productos abortados, por lo cual se explica su inviabilidad.

En el grupo testigo y en el de los padres de trisómicos las mujeres tuvieron las mayores frecuencias de actividad de NORs y asociación de satélites, a diferencia de las parejas de aborto habitual, en las que fueron los hombres, lo cual podría indicar que la población normal tiene mayor propensión a la concepción de un hijo con síndrome de Down que a tener abortos sucesivos, y explicaría la mayor frecuencia de aparición de este síndrome en relación al aborto habitual.

En resumen, las frecuencias de actividad de NORs y de asociación de satélites de los cromosomas acrocéntricos humanos pueden estar relacionados con las causas de algunos problemas genético-reproductivos, por lo que su determinación en las parejas en edad reproductiva puede ser útil para evaluar este riesgo. Se recomienda realizar más estudios para obtener evidencias que apoyen o refuten los resultados obtenidos en el presente trabajo.

A P E N D I C E

TABLA I. Edad promedio y número de individuos (n) en las poblaciones estudiadas de acuerdo al sexo.

Sexo	Población	Edad promedio (años)	n
Hombres	Hombres del grupo testigo	33	8
	Padres de trisómicos (jóvenes)	30	8
	Padres de trisómicos (mayores)	51	7
	Hombres de parejas con aborto habitual	27	5
	Hijos trisómicos	16	5
Mujeres	Mujeres del grupo testigo	27	7
	Madres de trisómicos (jóvenes)	29	8
	Madres de trisómicos (mayores)	53	7
	Mujeres de parejas con aborto habitual	25	5
	Hijas trisómicas	4	3

TABLA II. Número promedio y correlación entre las frecuencias por célula de NORs-Ag⁺ y cromosomas acrocéntricos asociados, de ambos grupos D y G, en los hombres del grupo testigo, los padres jóvenes de trisómicos y los hombres de las parejas con aborto habitual.

Población	X̄ de acrocéntricos por célula		
	Con NORs-Ag ⁺	Ambos grupos D y G	r
Hombres del grupo testigo	6.13	1.42	N.s.
Padres jóvenes de trisómicos	6.92 ++	2.10 ++	N.s.
Hombres de parejas con aborto habitual	7.34 ++	2.93 ++	N.s.

++ : p < 0.01 en X² vs. grupo testigo.

r : coeficiente de correlación.

N.s.: no significativo.

TABLA III. Número promedio y correlación entre las frecuencias por célula de NORs-Ag⁺ y cromosomas acrocéntricos asociados, del grupo D, en los hombres del grupo testigo, los padres jóvenes de trisómicos y los hombres de las parejas con aborto habitual.

Población	\bar{X} de acrocéntricos por célula		
	Con NORs-Ag ⁺	Grupo D	r
Hombres del grupo testigo	3.82	0.62	N.s.
Padres jóvenes de trisómicos	4.11	1.20 ++	N.s.
Hombres de parejas con aborto habitual	4.19	1.62 ++	N.s.

++: $p < 0.01$ en χ^2 VS. grupo testigo.

r: coeficiente de correlación.

N.s.: no significativo.

TABLA IV. Número promedio y correlación entre las frecuencias por célula de NORs-Ag⁺ y cromosomas acrocéntricos asociados, del grupo G, en los hombres del grupo testigo, los padres jóvenes de trisémicos y los hombres de las parejas con aborto habitual.

Población	\bar{X} de acrocéntricos por célula		
	Con NORs-Ag ⁺	Grupo G	Asociados r
Hombres del grupo testigo	2.31	0.60	N.s.
Padres jóvenes de trisémicos	2.81 ++	0.90 ++	N.s.
Hombres de parejas con aborto habitual	3.16 ++	1.31 ++	N.s.

++: $p < 0.01$ en χ^2 vs. grupo testigo.

r: coeficiente de correlación.

N.s.: no significativo.

TABLA V. Número promedio y correlación entre las frecuencias por célula de NORs-Ag⁺ y cromosomas acrocéntricos asociados, de ambos grupos D y G, en las mujeres del grupo testigo, las madres jóvenes de trisómicos y las mujeres de las parejas con aborto habitual.

Población	\bar{X} de acrocéntricos por célula		
	Con NORs-Ag ⁺	Ambos grupos D y G	r
Mujeres del grupo testigo	6.25	1.76	+
Madres jóvenes de trisómicos	6.94 ++	2.50 ++	N.s.
Mujeres de parejas con aborto habitual	6.93 ++	2.59 ++	N.s.

++ $p < 0.05$, +++ $p < 0.01$ en χ^2 VS. grupo testigo.

r: coeficiente de correlación.

N.s.: no significativo.

TABLA VI. Número promedio y correlación entre las frecuencias por célula de NORs-Ag⁺ y cromosomas acrocéntricos asociados, del grupo D, en las mujeres del grupo testigo, las madres jóvenes de trisómicos y las mujeres de las parejas de las parejas con aborto habitual.

Población	\bar{X} de acrocéntricos por célula			r
	Con NORs-Ag ⁺	Grupo D	Asociados	
Mujeres del grupo testigo	3.61	0.93		N.s.
Madres jóvenes de trisómicos	4.35 ++	1.42 ++		N.s.
Mujeres de parejas con aborto habitual	4.26 ++	1.47 ++		N.s.

+++ p < 0.01 en χ^2 VS. grupo testigo.

++ coeficiente de correlación.

N.s.: no significativo.

TABLA VII. Número promedio y correlación entre las frecuencias por célula de NORs-Ag⁺ y cromosomas acrocéntricos asociados, del grupo G, en las mujeres del grupo testigo, las madres jóvenes de trisómicos y las mujeres de las parejas con aborto habitual.

Población	\bar{X} de acrocéntricos por célula		
	Con NORs-Ag ⁺	Grupo G	Asociados r
Mujeres del grupo testigo	2.64	0.62	+
Madres jóvenes de trisómicos	2.59	1.08	+
Mujeres de parejas con aborto habitual	2.67	1.12	N.s.

+: $p < 0.05$ en χ^2 vs. grupo testigo.

r: coeficiente de correlación.

N.s.: no significativo.

TABLA VIII. Número promedio y correlación entre las frecuencias por célula de NORs-Ag⁺ y cromosomas acrocéntricos asociados, en ambos grupos D y G, en los padres jóvenes y mayores de trisómicos.

Población	\bar{X} de acrocéntricos por célula		r
	Con NORs-Ag ⁺	Ambos grupos D y G	
Padres jóvenes de trisómicos	6.92	2.10	N.s.
Padres mayores de trisómicos	6.31 +	1.83	N.s.

+ : $p < 0.05$ en χ^2 vs. padres jóvenes de trisómicos.

r: coeficiente de correlación.

N.s.: no significativo.

TABLA IX. Número promedio y correlación entre las frecuencias por célula de NORs-Ag⁺ y cromosomas acrocéntricos asociados, del grupo D, en los padres jóvenes y mayores de trisómicos.

Población	\bar{X} de acrocéntricos por célula		
	Con NORs-Ag ⁺	Grupo D	Asociados r
Padres jóvenes de trisómicos	4.11	1.20	N.s.
Padres mayores de trisómicos	4.08	1.20	N.s.

r: coeficiente de correlación.

N.s.: no significativo.

TABLA X. Número promedio y correlación entre las frecuencias por célula de NORs-Ag⁺ y cromosomas acrocéntricos asociados, del grupo G, en los padres jóvenes y mayores de trisómicos.

o Población	\bar{X} de acrocéntricos por célula		
	Con NORs-Ag ⁺	Asociados	r
Padres jóvenes de trisómicos	2.81	0.90	N.s.
Padres mayores de trisómicos	2.23 ++	0.63 +	N.s.

+: $p < 0.05$; ++: $p < 0.01$ en χ^2 VS. padres jóvenes de trisómicos.

r: coeficiente de correlación.

N.s.: no significativo.

TABLA XI. Número promedio y correlación entre las frecuencias por célula de NORs-Ag⁺ y cromosomas acrocéntricos asociados, de ambos grupos D y G, en las madres jóvenes y mayores de trisómicos.

Población	\bar{X} de acrocéntricos por célula		r
	Con NORs-Ag ⁺	Ambos grupos D y G	
Madres jóvenes de trisómicos	6.94	2.50	N.s.
Madres mayores de trisómicos	6.41	2.21	N.s.

r: coeficiente de correlación.

N.s.: no significativo.

TABLA XII. Número promedio y correlación entre las frecuencias por célula de NORs-Ag⁺ y cromosomas acrocéntricos asociados, del grupo D, en las madres jóvenes y mayores de trisómicos.

Población	\bar{X} de acrocéntricos por célula		
	Grupo D		
	Con NORs-Ag ⁺	Asociados	r
Madres jóvenes de trisómicos	4.36	1.42	N.s.
Madres mayores de trisómicos	3.42 ++	1.11 +	N.s.

+: $p < 0.05$; ++: $p < 0.01$ en χ^2 VS. madres jóvenes de trisómicos.

r: coeficiente de correlación.

N.s.: no significativo.

TABLA XIII. Número promedio y correlación entre las frecuencias por célula de NORs-Ag⁺ y cromosomas acrocéntricos asociados, del grupo G, en las madres jóvenes y mayores de trisómicos.

Población	Grupo G		r
	Con NORs-Ag ⁺	Asociados	
Madres jóvenes de trisómicos	2.59	1.00	+
Madres mayores de trisómicos	2.99 +	1.10	N.s.

+ : $p < 0.05$ en χ^2 VS. madres jóvenes de trisómicos.

r : coeficiente de correlación.

N.s. : no significativo.

TABLA XIV. Número promedio de NORs-Ag⁺ y cromosomas acrocéntricos asociados, de ambos grupos D y G, en el grupo testigo, los padres jóvenes y mayores de trisómicos y en las parejas de aborto habitual, de acuerdo al sexo.

Población	\bar{X} de acrocéntricos por célula			
	Ambos grupos D y G		Mujeres	
	Hombres	Mujeres	NORs-Ag ⁺ Asociados	NORs-Ag ⁺ Asociados
Grupo testigo	6.13	1.42	6.25	1.76
Padres jóvenes de trisómicos	6.92	2.10	6.94	2.50
Padres mayores de trisómicos	6.31	1.83	6.41	2.21
Parejas de aborto habitual	7.34	2.93	6.93	2.59

TABLA XV. Número promedio de NORs-Ag⁺ y cromosomas acrocéntricos asociados, del grupo D, en el grupo testigo, los padres jóvenes y mayores de trisómicos y en las parejas de aborto habitual, de acuerdo al sexo.

Población	\bar{X} de acrocéntricos por célula			
	Grupo D			
	Hombres		Mujeres	
	NORs-Ag ⁺ Asociados	NORs-Ag ⁺ Asociados	NORs-Ag ⁺ Asociados	
Grupo testigo	3.82	0.82	3.61	0.93
Padres jóvenes de trisómicos	4.11	1.20	4.35	1.42
Padres mayores de trisómicos	4.08	1.20	3.42	1.11
Parejas de aborto habitual	4.19	1.62	4.26	1.47

TABLA XVI. Número promedio de NORs-Ag⁺ y cromosomas acrocéntricos asociados, del grupo G, en el grupo testigo, los padres jóvenes y mayores de trisómicos y en las parejas de aborto habitual, de acuerdo al sexo.

Población	\bar{X} de acrocéntricos por célula			
	Grupo G			
	Hombres		Mujeres	
	NORs-Ag ⁺ Asociados	NORs-Ag ⁺ Asociados	NORs-Ag ⁺ Asociados	
Grupo testigo	2.31	0.60	2.64	0.82
Padres jóvenes de trisómicos	2.61	0.90	2.59	1.08
Padres mayores de trisómicos	2.23	0.63	2.99	1.10
Parejas de aborto habitual	3.16	1.31	2.67	1.12

TABLA XVII. Número promedio de NORs-Ag⁺ y cromosomas acrocéntricos asociados, de ambos grupos D y G, informados para la población normal y lo encontrado en los hijos trisómicos varones.

Población	\bar{X} de acrocéntricos por célula	
	Con NORs-Ag ⁺	Asociados
Esperados en la población normal	6.00	1.00
Hijos trisómicos varones	6.80	1.54 ++

++: $p < 0.01$ en χ^2 VS. lo esperado en la población normal.

TABLA XVIII. Número promedio de NORs-Ag⁺ y cromosomas acrocéntricos asociados, del grupo D, informados para la población normal y lo encontrado en los hijos trisómicos varones.

Población	\bar{X} de acrocéntricos por célula	
	Con NORs-Ag ⁺	Grupo D Asociados
Esperados en la población normal	3.50	0.60
Hijos trisómicos varones	4.00	0.90

TABLA XIX: Número promedio de NORs-Ag⁺ y cromosomas acrocéntricos asociados, del grupo G, informados para la población normal y lo encontrado en los hijos trisómicos varones.

Población	\bar{x} de acrocéntricos por célula	
	Con NORs-Ag ⁺	Grupo G Asociados
Esperados en la población normal	2.50	0.40
Hijos trisómicos varones	2.80	0.65

TABLA XX. Número promedio de NORs-Ag⁺ y cromosomas acrocéntricos asociados, de ambos grupos D y G, informados para la población normal y lo encontrado en las hijas trisómicas.

Población	\bar{X} de acrocéntricos por célula	
	Con NORs-Ag ⁺	Asociados
Esperados en la población normal	6.00	1.00
Hijas trisómicas	6.96	1.35 ++

++: $p < 0.01$ en χ^2 VS. lo esperado en la población normal.

TABLA XXI. Número promedio de NORs-Ag⁺ y cromosomas acrocéntricos asociados, del grupo D, informados para la población normal y lo encontrado en las hijas trisómicas.

Población	\bar{X} de acrocéntricos por célula	
	Con NORs-Ag ⁺	Grupo D Asociados
Esperados en la población normal	3.50	0.60
Hijas trisómicas	3.53	1.68 ++

++: $p < 0.01$ en χ^2 VS. lo esperado en la población normal.

TABLA XXII. Número promedio de NORs-Ag⁺ y cromosomas acrocéntricos asociados, del grupo G, informados para la población normal y lo encontrado en las hijas trisómicas.

Población	\bar{X} de acrocéntricos por célula	
	Con NORs-Ag ⁺	Grupo G Asociados
Esperados en la población normal	2.50	0.40
Hijas trisómicas	3.43 +	1.87 ++

+: $p < 0.05$; ++: $p < 0.01$ en χ^2 Vs. lo esperado en la población normal.

REFERENCIAS. -

- 1- Archidiacono, A.; DeCapoa, A.; Ferraro, M.; Pelliccia, F.; Rocchi, A.; Rocchi, M. 1977. Nucleolus organizer and N-band distribution in morphologic and fluorescence variants of human chromosomes. *Hum.Genet.* 37:285-289.
- 2- Atwood, K.C.; Yu, M.T.; Johnson, L.D.; Henderson, A.S. 1975. The site of 5S RNA genes in human chromosome 1. *Cytogenet.Cell Genet.* 15:50-54.
- 3- Back, E.; Zang, K.D. 1969. Quantitative studies on the arrangement of human metaphase chromosomes. II- Influence of the preparation technique on the association pattern of the acrocentric chromosomes. *Cytogenetics* 8:304-314.
- 4- Bloom, S.E.; Goodpasture, C. 1976. An improved technique for selective silver staining of the NORs in human chromosomes. *Hum.Genet.* 34:199-206.
- 5- Bross, K.; Krone, W. 1973. Ribosomal cistrons and acrocentric chromosomes in man. *Humangenetik* 18:71-75.
- 6- Cerda-Flores, R.M.; Leal-Garza, C.H.; Baca-Sevilla, S.; Garza-Chapa, R. 1981. Frecuencia de asociación de cromosomas acrocéntricos y determinación de su relación con sexo y edad en individuos con síndrome de Down y sus padres. *Res. II Enc. Reg. de Inv. Bioméd. Monterrey, N.L., México.*
- 7- Cervenka, J.; Flores-Briseño, G. 1978. Structure and localization of the human nucleolar organizer regions. *Am.J.Hum.Genet.* 30:75.
- 8- Cheng, D.M.; Denton, T.E.; Liem, S.L.; Elliot, C.L. 1981. Variation in nucleolar organizer activity in lymphocytes of females with adenocarcinoma. *Clin.Genet.* 19:145-148.
- 9- Clark, B.F.C. 1977. *The genetic code. Studies in Biology No. 83.* Edward Arnold, Ltd. Southampton, Inglaterra.
- 10- Cooke, P. 1971. Non-random participation of chromosomes 13, 14 and 15 in acrocentric association. *Humangenetik* 13:309-314.

- 17 Croce, C.M.; Talavera, A.; Basilico, C.; Miller, O.J. 1977. Suppression of production of mouse 28S ribosomal RNA in mouse-human hybrids segregating mouse chromosomes. Proc.Natl.Acad.Sci. (USA) 74:694-697.
- 12 DeCapoa, A.; Ferraro, M.; Archidiacono, N.; Pelliccia, F.; Rocchi, M.; Rocchi, A. 1976. Nucleolus organizer and satellite association in a variant D-group chromosome. Hum.Genet. 34:13-16.
- 13 DeCapoa, A.; Ferraro, M.; Menendez, F.; Mostacci, C.; Pelliccia, F.; Rocchi, A. 1978. Ag staining of the nucleolus organizer (NO) and its relationship to satellite association. Hum.Genet. 44:71-77.
- 14 DeLeón-Esparza, M.; Leal-Garza, C.; Baca-Sevilla, S.; Garza-Chapa, R. 1982. Estudios citogenéticos en la pareja con aborto habitual. Res. VII Cong. Nac. Genet. Hum. Zacatecas, Zac., México.
- 15 Denton, T.E.; Howell, W.M.; Barrett, J.V. 1976. Human nucleolar organizer chromosomes: satellite associations. Chromosoma 55:81-84.
- 6 Denver Conference. 1960. A proposed standard system of nomenclature of human mitotic chromosomes. Am.J.Hum.Genet. 12:384-388.
- DeRobertis, E.D.P.; Nowinski, W.W.; Sáez, F.A. 1976. Biología Celular. 8ª edición. Ed. El Ateneo, Buenos Aires, Argentina.
- 16 Dev, V.G.; Byrne, J.; Bunch, G. 1979. Partial translocation of NOR and its activity in a balanced carrier and her cri-du chat fetus. Hum.Genet. 51:277-280.
- 19 DiLernia, R.; Riva, M.L.; Ginelli, E. 1980. Satellite association and silver staining in a case of multiple G and D variants. Hum.Genet. 53:237-240.
- 10 Dittes, H.; Krone, W.; Bross, K.; Schmid, M. Vogel, W. 1975. Biochemical and cytogenetics studies on the NORs of man. II. A family with the 15/21 translocation. Human-genetik 26:47-69.

17. Evans, H.J.; Buckland, R.A.; Pardue, M.L. 1974. Location of the genes coding for 18S and 28S ribosomal RNA in the human genome. *Chromosoma* 48:405-426.
22. Ferraro, M.; Archidiacono, N.; Pelliccia, F.; Rocchi, A.; DeCapoa, A. 1977. Secondary constrictions and nucleolus organizer regions in man. *Exp. Cell Res.* 104:428-430.
23. Fitzgerald, P.H.; Pickering, F.; Mercer, J.M.; Miethke, P.M. 1975. Premature centromere division: A mechanism of non-disjunction causing X chromosome aneuploidy in somatic cells of man ? *Ann. Hum. Genet.* 38:417-428.
24. Flores-Briseño, G.; Sotelo-Félix, J.I. 1982. Los organizadores nucleolares (NORs) en cromosomas metafásicos humanos y su posible relación con los mecanismos de envejecimiento celular. *Res. VII Cong. Nac. Genet. Hum. Zacatecas, Zac., México.*
25. Funaki, K.; Matusi, S.; Sasaki, M. 1975. Location of nucleolar organizers in animal and plant chromosomes by means of an improved N-banding technique. *Chromosoma* 49:357-370.
26. Gahmberg, N.; Pajunen, L.; DeLaChapelle, A. 1980. NOR activity in two families with balanced D;D translocations and numerous consecutive miscarriages. *Hereditas* 92:217-221.
27. Galperin-Lemaitre, H.; Hens, L.; Sèle, B. 1980. Comparison of satellite associations in male and female cells. Relationship to active nucleolar organizers. *Hum. Genet.* 54:349-353.
28. Goodpasture, C.; Bloom, S.E. 1975. Visualization of nucleolar organizer regions in mammalian chromosomes using silver staining. *Chromosoma* 53:37-50.
29. Goodpasture, C.; Bloom, S.E. 1975. Satellite associations: Giemsa banding studies in parents of Down's syndrome patients. *Clin. Genet.* 8:319.
30. Goodpasture, C.; Bloom, S.E. 1976. Human nucleolus organizers: The satellites or the stalks ? *Am. J. Hum. Genet.* 28:559-566.
31. Gordon-Phillips, S. 1972. Repopulation of the postmitotic nucleolus by preformed RNA. *J. Cell Biol.* 53:611-623.

- 7 Hamerton, J.L. 1971. Human Cytogenetics-General Cytogenetics. Vol. I. Academic Press, New York, U.S.A.
- 17 Hansman, I.; Wiedeking, C.; Grimm, T.; Gebauer, J. 1977. Reciprocal or non-reciprocal human chromosome translocations ? The identification of reciprocal translocations by silver staining. Hum. Genet. 38:1-5.
- 47 Hansson, A. 1970. Differences in satellite association pattern in human population. Hereditas 66:21-30.
- 57 Hansson, A. 1975. Compensatory mechanisms in the satellite association patterns of individuals with Robertsonian translocations. Hereditas 81:101-112.
- 167 Hansson, A. 1979. Satellite associations in human metaphases. A comparative study of normal individuals, patients with Down syndrome and their parents. Hereditas 90: 59-83.
- 377 Hansson, A.; Mikkelsen, M. 1974. An increased tendency to satellite association of human chromosome 21: A factor in the aetiology of Down's syndrome ? IRCS (Med. Sci.) 2:1617.
- 387 Hansson, A.; Mikkelsen, M. 1976. Maternal and paternal non-disjunction in parents with Down syndrome: Family studies of fluorescent markers and satellite associations. Exc. Med. Int. Cong. Serie No. 397. V Int. Cong. Hum. Genet., Méx. Abstr. No. 333, p. 129.
- 397 Hansson, A.; Mikkelsen, M. 1978. The origin of extra chromosome 21 in Down syndrome. Studies of fluorescent variants and satellite associations in 26 informative families. Cytogenet. Cell Genet. 20:194-203.
- 407 Hara, Y.; Sasaki, M. 1975. A note on the origin of extra chromosomes in trisomies 13 and 21. Proc. Jap. Acad. Sci. 51:295-299.
- 417 Henderson, A.S.; Warburton, D.; Atwood, K.C. 1972. Location of ribosomal DNA in the human chromosome complement. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 69:3394-3398.
- 427 Howard-Peebles, P.; Stoddard, G.R. 1976. A satellited Yq chromosome associated with

- trisomy 21 and an inversion of chromosome 9. *Hum.Genet.* 34:223-225.
- 37 Howell, W.M. 1977. Visualization of ribosomal gene activity: silver stains proteins associated with rRNA transcribed from oocyte chromosomes. *Chromosoma* 62:361-367.
- 47 Howell, W.M.; Black, D.A. 1978. A rapid technique for producing Ag-NORs and trypsin-Giemsa bands in human chromosomes. *Hum.Genet.* 43:53-56.
- 57 Howell, W.M.; Howard-Peebles, P.; Block, B.M.; Stoddard, G. 1978. Silver stain reveals nucleolus organizer regions on a satellited Yq chromosome. *Hum.Genet.* 42:245-250.
- 67 Lau, Y.F.; Wertelecki, W.; Pfeiffer, R.A.; Arrighi, F.E. 1978. Analysis of human normal and variants acrocentric chromosomes using N-banding and Ag-NOR staining. *Am.J.Hum.Genet.* 30:86.
- 77 Leal-Garza, C.; Riojas-Valdés, V.; Garza-Chapa, R. 1981. Frecuencia y asociación de las regiones organizadoras del nucléolo en una familia con inversión pericéntrica del cromosoma 14. Res. II Enc. Reg. Inv. Bioméd. Monterrey, N.L., México.
- 87 Liem, S.L.; Denton, T.E.; Cheng, K.M. 1977. Distribution patterns of satellite associations in human lymphocytes relative to age and sex. *Clin.Genet.* 12:104-110.
- 97 Licznarski, G.; Lindstern, J. 1972. Trisomy 21 in man due to maternal non-disjunction during the first meiotic division. *Hereditas* 70:153-154.
- 107 Marshall, C.J.; Handmaker, S.D.; Bramwell, M.E. 1975. Synthesis of ribosomal RNA in synkaryons and heterokaryons formed between human and rodent cells. *J.Cell Sci.* 17:307-325.
- 117 Martin, A.D.; Miller, L.; Elías, S.; Simpson, J.L. 1977. Analysis of NORs for the use of satellite variants on No. 21. *Am.J.Hum.Genet.* 29:75.
- 127 Mattei, J.F. 1974. Etude génétique des parents d'enfants trisomiques 21. Thesis. Fac.Med., Marseille, Francia.
- 137 Mikelsaar, A.W.; Schmid, M.; Krone, W.; Schwarzacher, H.G.; Schnedl, W. 1977. Frequency of Ag-stained nucleolar organizer regions in the acrocentric chromosomes of man. *Hum. Genet.* 37:73-77.

- 54- Mikelsaar, A.W.; Schwarzacher, H.G. 1978. Comparison of silver staining of nucleolus organizer regions in human lymphocytes and fibroblasts. *Hum.Genet.* 42:291-299.
- 55- Mikkelsen, M.; Basli, A.; Poulsen, H. 1980. NORs in translocations involving acrocentric chromosomes. *Cytogenet.Cell Genet.* 26:14-21.
- 56- Mikkelsen, M.; Hansson, A.; Jacobsen, P.; Hobolth, N. 1975. Translocation (13q21q)- Four generation family study with analysis of satellite associations, fluorescent markers and prenatal diagnosis. *Humangenetik* 27:303-307.
- 57- Miller, D.A.; Breg, W.R.; Warburton, D.; Dev, V.G.; Miller, O.J. 1978. Regulation of rRNA gene expression in human familial 14p⁺ chromosome. *Hum.Genet.* 43:289-297.
- 58- Miller, D.A.; Dev, V.G.; Tantravahi, R.; Miller, O.J. 1976. Suppression of human nucleolus organizer activity in mouse-human somatic hybrids cells. *Exp.Cell Res.* 101:235-243.
- 59- Miller, D.A.; Tantravahi, R.; Dev, V.G.; Miller, O.J. 1977. Frequency of satellite association of human chromosomes is correlated with amount of Ag-staining of the NOR. *Am.J.Hum.Genet.* 29:490-502.
- 60- Miller, O.J.; Miller, D.A.; Dev, V.G.; Tantravahi, R.; Croce, C.M. 1976. Expression of human and suppression of mouse nucleolus organizer activity in mouse-human somatic hybrids cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.* 73:4331-4335.
- 61- Moreno-Mendiola, A.; Leal-Garza, C.; Baca-Sevilla, S.; Garza-Chapa, R. 1981. Algunos factores relacionados con el síndrome de Down en el noreste de México. Res. II - Enc. Reg. Inv. Bioméd., Monterrey, N.L., México.
- 62- Nakagome, Y. 1973. G-group chromosomes in satellite associations. *Cytogenet.Cell Genet.* 12:336-341.
- 63- Niikawan, N.; Kajii, T. 1975. Satellite-stalk staining of human chromosomes. *Lancet* 2:1383.
- 64- Nilsson, C.H.; Hansson, A.; Nilsson, G. 1975. Influence of thyroid hormones on satellite association in man and the origin of chromosome abnormalities. *Hereditas* 80: 157-166.

- 65- Ohno, S.; Trujillo, J.M.; Kaplan, W.D.; Kinoshita, R. 1961. Nucleolar organizers in the causes of chromosome anomalies in man. *Lancet* 2:123.
- 66- Pathak, S.; McGill, M.; Hsu, T.C. 1975. Actinomycin-D effects on mitosis and chromosomes: sticky chromatids and localized lesions. *Chromosoma* 50:79-88.
- 67- Patil, S.R.; Bent, F.C. 1980. Silver staining and the 17ps chromosome. *Clin.Genet.* 17:281-284.
- 68- Riojas-Valdés, V.; Leal-Garza, C.; Garza-Chapa, R. 1982. Actividad de genes ribosomales y asociación de cromosomas acrocéntricos en familias con un hijo con trisomía 21. Res. VII Cong. Nac. Genet. Hum., Zacatecas, Zac., México.
- 69- Robinson, J.A. 1973. Origin of extra chromosome in trisomy 21. *Lancet* 2:131.
- 70- Schroer, R.J.; Stevenson, R.E.; Simensen, R.J.; Culp, D. 1979. An X/21 translocation with satellite incorporation. *Am.J.Hum.Genet.* 31:370.
- Schwarzacher, H.G.; Mikelsaar, A.V.; Schnedl, W. 1978. The nature of Ag-staining of the NORs. Electron and light-microscopic studies in human cells in interphase, mitosis and meiosis. *Cytogenet.Cell Genet.* 20:24-39.
- 72- Sofuni, T.; Tanabe, K.; Awa, A. 1980. Chromosome heteromorphism in the Japanese. II- Nucleolus organizer region of variant chromosome in D and G groups. *Hum.Genet.* 55: 265-270.
- 73- Sthal, A.; Luciani, J.M.; DeVictor, M.; Capodano, A.M.; Hartung, M. 1974. Heterochromatin and nucleolus organizer during first meiotic prophase in quail oocytes. *Exp. Cell Res.* 91:365-371.
- 74- Tantravahi, R.; Miller, O.J.; Miller, D.A. 1977. Ag-staining of NORs of chromosomes after Q-, C-, G- or R-band procedures. *Cytogenet.Cell Genet.* 18:364-369.
- 75- Tayler, F.E.; Martin-DeLeón, P. 1980. Comparison of N-banding and silver staining of human NORs. *Hum.Genet.* 54:217-219.
- 76- Taysi, K. 1975. Satellite associations: Giemsa banding studies in parents of Down's syndrome patients. *Clin.Genet.* 8:319-323.

17. Tjio, J.H.; Levan, A. 1956. The chromosome number of man. *Hereditas* 42:1-6
18. Trent, J.M.; Carlin, D.A.; Davis, J.R. 1981. Expression of silver-stained nucleolus organizer regions (Ag-NORs) in human cancer. *Cytogenet. Cell Genet.* 30:31-38.
19. Varley, D.M. 1977. Patterns of silver staining of human chromosomes. *Chromosoma* 61:207-214.
20. Vinson, P.; Finley, S.; Howell, M.; Finley, W. 1979. Trisomy 21 associated with familial translocation involving other chromosomes. *Am. J. Hum. Genet.* 31:115.
21. Warburton, D.; Atwood, K.C.; Henderson, H.S. 1976. Variation in the number of genes for rRNA among human acrocentric chromosomes: correlation with frequency of satellite associations. *Cytogenet. Cell Genet.* 17:221-230.
22. Wegner, R.D.; Aldenhoff, P.; Sperling, K. 1980. Activity of rRNA genes in cells of a patient with Down syndrome mosaic. *Hum. Genet.* 55:227-229.
23. Zakharov, A.F.; Davudov, A.Z.; Benjush, V.A.; Egolina, N.A. 1982. Genetic determination of NOR activity in human lymphocytes from twins. *Hum. Genet.* 60:24.
24. Zankl, H.; Bernhardt, S. 1977. Combination of the silver staining of NORs and Giemsa banding in human chromosomes. *Hum. Genet.* 37:79-80.
25. Zankl, H.; Mayer, C.; Zang, K.D. 1980. Association frequency and silver staining of NORs in hyperthyroid patients. *Hum. Genet.* 54:111-114.
26. Zankl, H.; Nagl, H. 1980. Satellite association and NOR staining in mitosis of trisomy 21 mosaicism. *Hum. Genet.* 55:115-117.

