

Universidad Autónoma de Nuevo León
Facultad de Medicina
División de Estudios Superiores

LOS ORGANIZADORES NUCLEOLARES (NOR's) EN CROMOSOMAS
METAFASICOS HUMANOS, Y SU POSIBLE RELACION CON LOS
MECANISMOS DE ENVEJECIMIENTO CELULAR

"TESIS QUE EN OPCION AL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS"

Presenta:

Dr. José Isabel Sotelo Félix

Monterrey, N. L., Diciembre de 1982.

TM

Z665

FM

1982

S6



1020071137

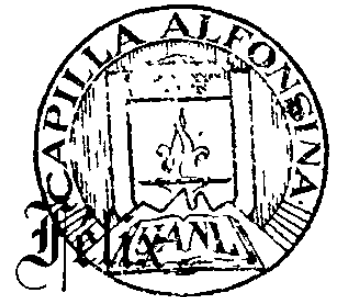
Universidad Autónoma de Nuevo León
Facultad de Medicina
División de Estudios Superiores

LOS ORGANIZADORES NUCLEOLARES (NOR's) EN CROMOSOMAS
METAFASICOS HUMANOS, Y SU POSIBLE RELACION CON LOS
MECANISMOS DE ENVEJECIMIENTO CELULAR

"TESIS QUE EN OPCION AL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS"

Presenta:

Dr. José Isabel Sotelo



ACERVO GENERAL

83657

Monterrey, N. L., Diciembre de 1982.

TM
Z 6658
FM
1982
54

SECCION DE GENETICA HUMANA
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA
FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

ASESOR:

BIOL. GUILLERMO A. FLORES BRISEÑO, M.Sc.

Este trabajo fué parcialmente financiado
por la S. E. P. bajo convenio número - -
162-20/08/49/79 y se agradece su valioso
apoyo.

PARA ADA Y ADEL CON AMOR.

AGRADEZCO A MI ASESOR BIOL. GUILLERMO A. FLORES BRISEÑO
SU TIEMPO Y ESFUERZO PARA LA REALIZACION DE ESTE TRABAJO.

A TODOS LOS COMPAÑEROS DE LA SECCION DE GENETICA HUMANA
POR HABERME BRINDADO SU VALIOSA AYUDA, Y SOBRE TODO, SU
AMISTAD.

I N D I C E

- I INTRODUCCION	1
II ANTECEDENTES	2
III MATERIAL Y METODOS	11
IV RESULTADOS	18
V DISCUSION Y CONCLUSIONES	28
VI RESUMEN	31
VII REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	33

I.- I N T R O D U C C I O N

La región de los Organizadores Nucleolares (NOR's) se encuentra localizada en la constricción secundaria de los brazos cortos de los 10 autosomas acrocéntricos humanos, - pares 13, 14, 15, 21 y 22. De acuerdo a la Conferencia de París realizada en 1971, su situación corresponde a la banda p12 de los cromosomas del grupo D y del grupo G del cariotipo humano, y se tiñe selectivamente con nitrato de -- plata (AgNO_3), según la técnica del nitrato de plata amoniacal ("Ag-As") descrita por Bloom y Goodpasture en 1976.

Los Nor's están involucrados en la organización del - nucleolo y son el loci para los genes rDNA que codifican - para el RNA ribosomal en sus fracciones 18S y 28S.

Se ha observado una disminución de la actividad de - este tipo de genes en tejidos envejecidos de diferentes - animales, incluyendo tejidos humanos.

Es interés primordial de este trabajo, determinar en linfocitos de sangre periférica una posible variación de la actividad de tales genes conforme avanza la edad, caracterizándolos por el número de NOR's positivos a la plata, estableciendo finalmente, una correlación entre los - NOR's Ag(+) con las diferentes edades.

II.- A N T E C E D E N T E S

A).- De los NOR's.

La región de los Organizadores Nucleolares (NOR's) se encuentra localizada en la constricción secundaria de los brazos cortos de los 10 cromosomas acrocéntricos humanos. Su situación específica es en el "tallo" y se tiñe selectivamente con nitrato de plata, según la técnica "Ag-As" descrita por Bloom y Goodpasture en 1976 (1). De acuerdo a la Conferencia de París en 1971, tal región corresponde a la banda p12 de los cromosomas del grupo D (pares 13, 14 y 15) y del grupo G (pares 21 y 22) del cariotipo humano (2).

Aunque para muchas especies de animales y plantas se habían descrito ya a los NOR's, fue hasta 1961 cuando Ferguson-Smith y Handmaker describieron la región de los organizadores nucleolares en los acrocéntricos de metafases mitóticas humanas a los que llamaron "Cromosomas Nucleolares", por su relación con la formación del nucleolo (3).

Así mismo Ohno y cols., en 1961 describieron "satélites" en la región distal de los brazos cortos de los - -

acrocéntricos, haciendo notar su asociación con el nucleolo en profase mitótica (4). Para 1972, Henderson y cols. usando el método de hibridización "In Situ" en cromosomas humanos, determinaron que en los brazos cortos de los --- acrocéntricos se localizaban los genes para el RNA ribosomal, aunque sin determinar el sitio específico (5).

Experimentos posteriores demostraron que las constricciones secundarias o tallos de los brazos cortos de los -- acrocéntricos representan los sitios específicos para los cistrones ribosomales 18S y 28S (6, 7), estando además involucrados en la formación del nucleolo (8, 9).

Denton y cols., en 1976 utilizando la tinción de plata amoniaca reportaron que: "La mayoría de las veces los depósitos de plata en las regiones de los satélites aparecen como botones negros". "Otras veces el material teñible está entre las asociaciones de satélites". "La región del organizador nucleolar (tallo, entre el satélite y el brazo corto), típicamente no se tiñe, mientras que el resto del cromosoma se tiñe de amarillo" (10).

Los resultados anteriores ilustran la controversia - que existía para definir la localización de los NOR's en

cromosomas humanos. Sin embargo en el mismo año, Bloom y Goodpasture utilizando cromosomas de profase, donde los cromosomas están más extendidos, reportaron que la región de los organizadores nucleolares se encuentra en la constricción secundaria (tallo) y no en los satélites de los cromosomas acrocéntricos humanos (11).

Se ha reconocido que el número de genes para rRNA -- particularmente en acrocéntricos es variable (6, 12, 13). Warburton sugiere la presencia de rDNA adicional en la asociación de satélites mencionando que el contenido de rDNA, la frecuencia de asociación de satélites, el tamaño de la constricción secundaria y la intensidad de la tinción de plata están estrechamente relacionados, aunque la constricción secundaria y la asociación de satélites pueden estar presentes sin que el rDNA sea detectado por hibridización "In Situ", o la tinción de plata (14).

Bross y Krone utilizando extractos de hígado humano como fuente de DNA para determinar la cantidad de rDNA en el cariotipo humano, encontraron entre 400 y 460 copias - de los genes 18S y 28S del rDNA en células en período G₁ de la interfase del ciclo celular (15). Por otro lado se ha referido un gran aumento en la proporción de las bases nitrogenadas Guanina y Citosina en la región de los - - -

organizadores nucleolares (16).

B).- De la tinción de plata.

Nada nuevo es el uso de las soluciones de plata para la tinción de células y cromosomas; ya el maestro Santiago Ramón y Cajal las había descrito para estudios histológicos del Sistema Nervioso Central (17). Así mismo, las utilizaron Wedel y Gless en 1941, Peters en 1955 y Gilbert en 1965 (18, 19, 20), para la tinción de cromosomas metafásicos de embriones de pollo. Bloom y Buss también han reportado el uso de la plata (21).

Hasta 1973, los métodos de tinción conocidos, inclusive las técnicas de bandeo C, G y Q no lograban teñir la -- constricción secundaria de los brazos cortos de los acro-- céntricos (22). Para 1960 se presentaron evidencias sugi-- riendo que la plata amoniacal ("As") teñía los componentes -- histónicos de la cromatina nucleolar (23). Posteriormente Marinozzi en 1963 reporta el uso de las tinciones de plata de proteínas nucleolares como ayuda al estudio de la ultra estructura del nucleolo. De esta manera, se relacionó la -- tinción de las proteínas con la plata amoniacal ("As") y las histona (24).

• Matsui y Sasaki en 1973, utilizando la técnica de --

tinción llamada Bandas N en cromosomas de mamíferos reportaron que son los satélites los sitios de los NOR's proponiendo simultáneamente que son las proteínas ácidas las responsables de la tinción de las Bandas N (25). Por otro lado Denton en 1976, al emplear plata amoniacal presentó evidencias sugiriendo que los satélites representan a los NOR's en el cariotipo humano (10). Como ya se mencionó, en 1976 Bloom y Goodpasture describieron una técnica para la visualización de los NOR's controlando el pH y la temperatura durante la impregnación de plata.

Se llevaron a cabo combinaciones de distintos métodos de bandeado simultáneo (bandas G, C, Q y R) para la confirmación del sitio ocupado por los NOR's (26). El tratamiento con hidróxido de bario para la tinción de los centrómeros seguido por el procedimiento para NOR's con soluciones de plata fué realizado por Denton en 1977 (27).

En 1977, Miller y cols., enuncian la hipótesis de que la tinción de los NOR's es un reflejo de la actividad de los genes rDNA y no la sola presencia de éstos. Ellos utilizaron hibridización de células somáticas de ratón y de humanos, reportando la presencia de tinción de plata en los NOR's de cromosomas de ratón en tanto que los de

humano fueron negativos, sugiriendo que su actividad transcripcional se inactivaba por algún mecanismo desconocido - (28).

Trabajos posteriores confirmaron la hipótesis de - - Miller en el sentido de que la tinción de los NOR's con la plata es un reflejo de la actividad transcripcional para - los genes que codifican al rRNA 18S y 28S, siendo responsa- bles de tal tinción las proteínas (29, 30, 31).

Para 1980, Hernandez-Verdun y cols., reportaron la - identificación de centros fibrilares en el nucleolo en in- terfase correspondientes a los NOR's en metafase; estos - centros fibrilares son el sitio esencial para la síntesis de rRNA y de proteínas ácidas. Ellos mismos reportan, que las proteínas ácidas teñidas con plata y los genes riboso- males, parecen ser dos elementos independientes entre sí, pero ambos incluidos en la región de los organizadores nu- cleolares, y cuya presencia combinada es necesaria para la actividad sintética nucleolar. Sin embargo, el papel exac- to de estas proteínas es desconocido, especulando que - - ellas podrían formar parte de la matriz nucleolar que jue- ga un papel importante en el proceso de condensación de la cromatina intranucleolar (32).

C).- Del envejecimiento y NOR's.

Variada es la literatura relativa al envejecimiento celular: "La estructura y función de la cromatina puede modificarse con la edad" (33, 34); "existe una represión en la transcripción en general" (33, 35, 36, 37, 38); - - "hay una declinación del contenido relativo de no-histonas y de RNA" (33, 39, 40); "los genes de copia múltiple que incluyen genes para rRNA 18S, 28S y 5S, algunos genes para tRNA y las 5 especies de histonas, por sus características de grupo, al presentarse un gene alterado puede afectarse el desempeño del genoma entero e influir en forma importante en el proceso de envejecimiento celular (41).

De cualquier manera, es evidente la relación entre los procesos de reparación del daño del material genético y el máximo período de vida observado en mamíferos. Así, para 1974 Hart propone que el acúmulo del daño del material genético puede ser el proceso primario en la determinación del envejecimiento. (42).

Dada la complejidad del genoma en mamíferos, es difícil detectar posibles alteraciones genéticas, como mutaciones somáticas, sin embargo existen genes específicos -

que sí pueden ser investigados y que están disponibles a través de sus productos transcripcionales, como son los genes rDNA. Si la disminución de los genes para rRNA es un proceso importante en el envejecimiento de los mamíferos, esto podría encontrarse en ratones, en perros o en el hombre (43). En 1978 Gaubatz y cols., presentan evidencias de que el número aparente de genes para rRNA por genoma, no es constante a través de todo el período de vida en los diferentes tejidos de ratones comenzando a decrecer significativamente en cerebro, riñón, bazo y corazón a los 800 días (op. cit.).

Ohno, también en 1978, propone que el deterioro gradual con la edad en el sistema de genes de copia múltiple en células somáticas, causa directamente la senectud (41).

La mayoría de los investigadores enfatizan que los genes para rRNA juegan un papel importante en el envejecimiento celular. La primera observación de que el contenido de rRNA decrecía en las neuronas conforme avanza la edad, fué reportada por Andrew en 1952 (44). Para 1972, Johnson cita una disminución del 30% de rDNA en las neuronas de perros de 10 años de edad comparados con perros jóvenes (45). Estudios posteriores de este autor, reportan en el mismo tipo de animales una disminución del 30% al

40% de rDNA en tejido nervioso, músculo esquelético, hígado y riñón (46). Mann y Yates en 1974 indican que la disminución en la cantidad de rRNA en neuronas humanas durante el envejecimiento, es paralela al aumento en la cantidad de pigmentos de lipofuscina (47). Por otro lado, se ha mencionado que en el humano a los 100 años de edad, -- existe una disminución del 70% de genes rDNA, proponiéndose como posibles causas del envejecimiento, la disminución del rDNA y el acúmulo de lipofuscina (48).

Como la tinción de plata es considerada reflejo de la actividad transcripcional de los genes rRNA y el envejecimiento celular puede acompañarse de una disminución en la actividad de los genes, la variabilidad de la tinción de plata de los NOR's puede usarse como instrumento de evaluación de los procesos de envejecimiento celular - "In Vivo"(49). Así para 1979 Buys y cols. reportaron diferencias significativas en grupos de edades menores a un año por un lado, y de 80 a 89 años por el otro, encontrando disminución en la frecuencia de NOR's teñidos con plata en el grupo de mayor edad y reportando también una mayor frecuencia de asociación de acrocéntricos en el grupo de edad más avanzada. (op. cit.).

III.- MATERIAL Y METODOS

Se eligió como 50 el número de individuos a muestrear los cuales se dividieron en 5 grupos de edades; cada uno de ellos integrado de 10 personas.

Grupo I: Recién Nacidos

Grupo II: 1 año

Grupo III: 30 años

Grupo IV: 50 años ;

Grupo V: 80 años o más

El muestreo se realizó en el Hospital Universitario y en la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, escogiendo personas sanas. De cada sujeto, se obtuvieron 2 mls. de sangre periférica en jeringa estéril heparinizada; en recién nacidos la punción se hizo de cordón umbilical. El cultivo de linfocitos se llevó a cabo de acuerdo a la técnica de Moorhead y cols. descrita en 1960 (50).

Para la tinción de los NOR's, las laminillas se trataron de acuerdo a la técnica de plata amoniaca (Ag-As) propuesta por Bloom y Goodpasture en 1976 (1); la tinción simultanea de los cromosomas se obtuvo sumergiendo las --

laminillas en solución de tripsina al 0.1% disuelto en -- Buffer de fosfatos a pH 7.0 y tiñéndose durante 8 minutos con Giemsa diluido, (Bandas G) según Seabright, 1971 (51).

El estudio citogenético se realizó utilizando microscopio Zeiss de campo claro, analizando 10 metafases con positividad a la plata por individuo y contando el número de NOR's Ag(+) por metafase. Se tomaron microfotografías en un fotomicroscopio Zeiss utilizando película blanco y negro Technical-Pan 35 mm. (kodak) de alta resolución y con filtro verde de interferencia de 520 nm. Los resultados fueron sometidos al análisis estadístico con la Prueba de Z, Coeficiente de correlación y Ecuación de la Recta.

A).- Cultivo de Linfocitos.-

A excepción del grupo de Recién Nacidos, donde la toma de la muestra fué obtenida de cordón umbilical, al resto de los individuos se les practicó punción venosa periférica en el pliegue del codo. La jeringa estéril estuvo preparada antes de la punción con sal amónica de heparina para evitar la coagulación sanguínea.

En el proceso de cultivo celular se empleó sangre total y la siembra se efectuó en una campana de flujo laminar

vertical (Baker y Co.). Se agregaron 6 a 8 gotas de sangre a un frasco estéril de vidrio de 30 ml, conteniendo:

Medio de Cultivo RPMI 1640 (Gibco)	5 ml.
Suero Fetal de Ternera (Gibco)	1 ml.
Fitoheماغلوتينina (Gibco)	0.2 ml.

El sistema de cultivo se incubó durante 72 horas a 37°C . en atmósfera húmeda con CO_2 al 5%.

Transcurrido el período de incubación, se inhibió la división celular en metafase, agregando al medio 0.5 ml. de colchicina 10^{-5}M ., dejándola en contacto con las células durante 1.30 horas a 37°C .

Posteriormente, la suspensión celular fué transferida a tubos cónicos centrifugándola a 1000 rpm durante 10 minutos; luego con una pipeta Pasteur se decantó el sobrenadante, dejando el paquete celular que contenía a los -- linfocitos.

El choque hipotónico que produce "hinchamiento celular" se realizó con 5 ml. de solución de cloruro de potasio (KCl) 0.075M ., que fue agregado al tubo cónico - -

conteniendo el paquete celular; esta suspensión se incubó por 20 minutos a 37°C . Pasado este tiempo, se centrifugó nuevamente a 1000 rpm por 10 minutos, se decantó la fase líquida dejando solamente el paquete celular.

El siguiente paso consistió en fijar a los linfocitos; para ello, se empleó solución fijadora (tres volúmenes de metanol por un volumen de ácido acético), de la cual se agregaron 5 ml. gota a gota, al botón celular y rápidamente se resuspendió todo el contenido con una pipeta Pasteur; luego se centrifugó, repitiéndose tres veces la misma operación de la solución fijadora; después de la última centrifugación se decantó el sobrenadante y se dejaron 0.5 ml. conteniendo el botón celular, el que fue resuspendido nuevamente, quedando listo para gotearse sobre el portaobjetos.

Antes de ser utilizados, los portaobjetos estuvieron guardados en solución de metanol y agua (1:1) a -8°C . El goteo del botón celular resuspendido se hizo en portaobjetos a una distancia de 30 cm.; posteriormente se flameó la laminilla para obtener una mejor dispersión de los cromosomas.

B).- Tinción.-

Cuando las laminillas tuvieron más de una semana de "envejecidas" previo a la tinción se lavaron en solución fijadora por 5 minutos, y después se procedió a la tinción de plata amoniacal; si las laminillas tenían menos de una semana de "envejecidas" la tinción fue directa sin lavado previo.

A continuación se describen en forma resumida la preparación de las diferentes soluciones:

a).- Técnica de Plata Amoniacal ("Ag-As").

1).- Solución Argéntica (Ag)

Nitrato de plata (AgNO_3)	2 g.
Agua bidestilada	2 ml.

2).- Solución de Plata Amoniacal ("As").

Nitrato de Plata (AgNO_3)	2 g.
Hidróxido de Amonio (NH_4OH)	2.5 ml.
Agua bidestilada	2.5 ml.

3).- Solución de formalina al 3%

Formaldehido	1.5 ml.
--------------	---------

Agua bidestilada	48.5 ml.
------------------	----------

Se neutraliza el pH a 7.0 con Acetato de Sodio cristalizado y se ajusta a pH 4.5 con Acido Formico.

Las soluciones de plata Ag y As se pasaron a través de un filtro milipore 0.22 micras. Estas soluciones y la formalina al 3% se guardaron en frascos oscuros a 4°C. - por 15 a 20 minutos antes de ser utilizadas.

b).- Técnica de tinción para bandas G.

1).- Solución de Tripsina

Tripsina 1:250 (Gibco)	0.0625 g.
------------------------	-----------

Sol. Isotónica de NaCl 0.9%	50 ml.
-----------------------------	--------

2).- Colorante Giemsa

Buffer Na_2HPO_4	1.25 ml.
----------------------------------	----------

Buffer KH_2PO_4	1.25 ml.
---------------------------------	----------

Giemsa sol. madre	1.00 ml.
-------------------	----------

Agua destilada	50.00 ml.
----------------	-----------

Todas las soluciones se prepararon inmediatamente antes de su uso. En una caja de Petri se colocaron a las laminillas y sobre ellas se vertieron 3 gotas de solución de plata-Ag luego se colocó un cubreobjetos para distribuir uniformemente la solución en las laminillas. Se incubó a 60°C . por 25 minutos. En este tiempo se observó la cristalización de los bordes del cubreobjetos, indicándonos que la reacción se estaba llevando a cabo. Al término de la incubación, se lavaron las laminillas con agua destilada y se secaron al aire.

Se agregaron luego 3 a 4 gotas de solución de plata amoniaca1 ("AS") y 3-4 gotas de formalina añ 3%, colocando después un cubreobjetos para la distribución y mezcla de estas soluciones que revelarían a los NOR's.

Para la contratinción cromosómica con bandas G, se pasó a la laminilla por la solución de tripsina durante 30 segundos a un minuto y a 37°C .; luego se lavó en solución salina isotónica de NaCl 0.9% y la tinción con Giemsa fué por 8 minutos, lavando enseguida con agua de la llave.

IV.- R E S U L T A D O S

A).- Del cultivo de linfocitos.-

Con la técnica de Moorhead y cols. (1960), se obtuvieron los resultados esperados, teniendo un índice mitótico de 5% aproximadamente y preparaciones cromosómicas adecuadas para su observación al microscopio de luz.

Es de señalar que para evitar la contaminación de cultivos, se tomaron cuidados en la técnica antiséptica previa a la punción venosa y a la siembra. Durante el período de incubación, la agitación ligera de los frascos de cultivo cada 12 a 24 horas, promueve una mejor distribución celular en el medio de cultivo, así como el intercambio de CO_2 y nutrientes, ayudando a la conservación del pH adecuado.

B).- De la tinción de plata.-

Desde luego que los patrones y la cantidad de precipitados de plata en el material nuclear varía en las diferentes etapas del ciclo celular. Para nuestros propósitos, la profase tardía y la metafase fueron las únicas tomadas en cuenta.

En profase tardía donde los cromosomas se observan como "bastones alargados", pero perfectamente identificables los grupos cromosómicos, apreciamos la reacción a la plata como depósitos oscuros únicos en los brazos cortos de los acrocéntricos. En metafase, cada cromosoma mostrando típicamente su par de cromátidas, presentaba depósitos oscuros dobles, cada uno en los brazos cortos de la cromátida respectiva; ocasionalmente se observaron metafases con depósitos triples por cromosoma.

La técnica de tinción de plata requirió condiciones especiales para su desarrollo; la preparación de las soluciones Ag y ("As") necesitaron pasarse a través de filtro milipore 0.22 micras y guardarse a 4°C. 15 minutos por lo menos antes de su uso; el pH óptimo de la formalina fue de 4.5; la temperatura óptima para la solución Ag estuvo en 60°C. y su tiempo de exposición en 25 minutos; la solución ("As") fue la que tuvo mayor variación en tiempo para su reacción, siendo desde un minuto hasta cinco minutos, a temperatura ambiente.

C).- De los resultados numéricos y estadísticos.-

Se tomó como parámetro sólo la presencia o ausencia de reacción a la plata, sin importar la intensidad o la

forma del depósito sobre la región de los organizadores - nucleolares. Si la positividad a la plata existió cuando menos en un acrocéntrico, se tomó como metafase Ag (+), - contando cada acrocéntrico como unidad. Las zonas de la laminilla sin reacción a la plata no fueron tomadas en cuenta para la contabilidad de los resultados numéricos; de tal manera que el número mínimo de NOR's Ag (+) por metafase sería de uno y el máximo posible de 10.

Se analizaron un total de 468 metafases; 94 del grupo de Recién Nacidos; 100 del grupo de un año; 93 del de 30 años; 99 del de 50 años y 82 del grupo de 80 años. Esto dió un total de 4,680 cromosomas acrocéntricos, 2,808 pertenecientes al grupo D del cariotipo humano y 1,872 pertenecientes al grupo G.

Del total de cromosomas acrocéntricos, 2,632 tuvieron NOR's con positividad a la plata, haciendo el 56.23% y 2,048 acrocéntricos con NOR's negativos a la plata, reportando el 43.77%. (Tabla I)

Tabla I.-

Total de cromosomas acrocéntricos estudiados

NOR's Ag (+)	2,632	56.23%
NOR's Ag (-)	2,048	43.77%
Total	4,680	100.00%

De los 2,808 acrocéntricos del grupo D, 1,587 mostraron NOR's Ag (+) y 1,221 carecieron de tal positividad y los promedios fueron 56.51% y 43.49% respectivamente. (tabla II).

Tabla II.-

Cromosomas acrocéntricos del grupo D
(pares 13 al 15)

NOR's Ag (+)	1,587	56.51%
NOR's Ag (-)	1,221	43.49%
Total	2,808	100.00%

De los 1,872 acrocéntricos del grupo G la tinción de plata en los NOR's existió en 1,045 y estuvo ausente en 827, con promedios de 55.82% y 44.18% de manera respectiva. (tabla III).

Tabla III.-

Cromosomas acrocéntricos del grupo G
(pares 21 y 22)

NOR's Ag (+)	1,045	55.82%
NOR's Ag (-)	827	44.18%
Total	1,872	100.00%

Los valores medios de los NOR's Ag (+) por grupo de edad fueron los siguientes:

Reci3n Nacidos	$\bar{X} = 5.98$
1 A3o	$\bar{X} = 5.89$
30 A3os	$\bar{X} = 5.42$
50 A3os	$\bar{X} = 5.60$
80 A3os o m3s	$\bar{X} = 5.30$

En la tabla IV se muestra adem3s de las medias totales, las medias por grupo cromos3mico (\bar{X}_D y \bar{X}_G).

Tabla IV.-

Valores promedio (\bar{X}) de los NOR's Ag (+) en los cinco grupos.

<u>GRUPO</u>	<u>\bar{X}_D</u>	<u>\bar{X}_G</u>	<u>\bar{X} TOTAL</u>
R/N	3.66 ^x	2.32	5.98
1 A3O	3.51	2.38	5.89
30 A3OS	3.43	2.01	5.44
50 A3OS	3.31	2.30	5.61
80 A3OS	3.21	2.09	5.30

Para comparar los valores medios de los acrocéntricos del grupo D entre los distintos grupos de edades, se utilizó como prueba estadística la Prueba de Z para grandes muestras a una confiabilidad de 99% ($P < 0.01$) sin encontrar diferencias estadísticas significativas. El mismo procedimiento se utilizó para comparar los acrocéntricos del grupo G, reportándose similares resultados, a excepción del grupo de 1 año vs 30 años. (Tabla V).

Tabla V.-

Valores de Z al comparar las frecuencias de cromosomas
D Ag (+) y G Ag (+) entre las 5 poblaciones. ($p < 0.01$)

	D vs D	G vs G
R/N vs 1 Año	0.904	0.420
30 Años	1.225	1.967
50 Años	1.978	0.127
80 Años	2.469	1.478
1 Año vs 30 Años	0.473	2.600**
50 Años	1.274	0.562
80 Años	1.843	2.070
30 Años vs 50 Años	0.667	-1.846
80 Años	1.189	-0.515
50 Años vs 80 Años	0.574	1.354

** valor significativo

Se pretendió posteriormente determinar si la relación normal del número de NOR's Ag (+) del grupo D vs el grupo G se mantenía entre los diferentes grupos de edades estudiadas utilizando también la prueba de Z a la misma confiabilidad, encontrando que la relación teórica 1.5:1 se mantenía, y sin diferencias estadísticas significativas. (tabla VI).

Tabla VI.

Relación entre D Ag (+) y G Ag(+) por grupos de edad-

R/N	Relación	Valor Z
	1.58 : 1	8.32
1 Año	1.47 : 1	8.37
30 Años	1.71 : 1	8.13
50 Años	1.44 : 1	6.20
80 Años	1.54 : 1	6.72

($P < 0.01$)

Intentando predecir el número de NOR's Ag (+) en los acrocéntricos del grupo G, previamente determinado el número de D Ag (+) se empleó el coeficiente de correlación (r) para el grupo D vs el grupo G en cada uno de los cinco grupos de edades. Se encontró que la positividad a la plata se distribuye totalmente al azar entre los acrocéntricos en cada una de las metafases. A veces existe mayor número de NOR's Ag (+) en el grupo D; otras veces existe mayoría en el grupo G; y en otras, la distribución es igual para ambos grupos. (Tabla VII).

Tabla VII.-

Coeficiente de correlación (r) encontrado de los valores de D vs G.

R/N	r = -0.144
1 Año	r = 0.00678
30 Años	r = 0.08933
50 Años	r = 0.09713
80 Años	r = 0.20794

Finalmente, se utilizó la ecuación de la recta $Y = 5.884 - 0.0076 X$ graficándola para apreciar los valores de NOR's Ag (+) y su relación con los distintos grupos de edades, encontrándose una tendencia a la disminución de tal número a medida que avanza la edad (Gráfica I).

$\gamma = 8.882 \times 10^{-7} \text{ X}$

0 10 20 30 40 50 60 70 80

GRAVITY

V. - DISCUSION Y CONCLUSIONES

La técnica de tinción de plata utilizada para la observación de los NOR's es de difícil manejo y requiere de cuidados especiales para obtener los resultados deseados; sin embargo y aún con la máxima atención se obtiene varia bilidad en la tinción de una misma preparación. Es frecuente apreciar áreas pequeñas con positividad a la plata perfectamente delimitadas, donde la tinción alcanza su máxima expresión en reacción y calidad, alternando con zonas de negatividad a la tinción de plata. Estos resultados con- cuerdan con los reportados por Buys en 1979 y Bloom en 1976 (49, 1) y desde luego pueden ser un parámetro de dis- crepancia en cuanto a los números modales de NOR's con po- sitividad, lo que ya ha sido descrito también por autores como Varley en 1977 y Mikelssar en ese mismo año (52, 53).

La tinción de plata de los NOR's probablemente sea pro- ducto de una reacción de reducción de la plata por de- terminados grupos existentes en los organizadores nucleolares (Peters, 1955) (19). Es entonces, la observación de los depósitos de plata resultado de una reacción depen- diente de tiempo y temperatura.

Además de los factores técnicos que producen - - -

variabilidad en la reacción a la plata, pueden existir -- componentes biológicos que influyan en los resultados de la tinción. Es clara la diferencia de tinción en las di-- versas etapas del ciclo celular y particularmente en in-- terfase y profase tardía por una parte, y en metafase por la otra, según se indicó en resultados.

· Buys, en 1979 (49) sugiere que la presencia de preci-- pitado de plata en cada una de las cromatidas, es indicio de una nueva síntesis de rRNA posterior a la replicación del DNA. Sin embargo Flores-Briseño (1982, datos no publi-- cados aún) propone que tal observación, no es más que un resultado del fenómeno de contracción de la cromatina y - que los depósitos de plata visibles a partir de profase - intermedia, son producto de la conjunción de múltiples de-- pósitos pequeños dispersos en la cromatina nucleolar, los que por las fuerzas de condensación forman uno solo visi-- ble a la microscopía de luz. Lo anterior también es apoya-- do por Schwarzacher y cols. (1978) (54).

Las proteínas que reaccionan con la plata pueden es-- tar relacionadas con los procesos regulatorios de la trans-- cripción de los genes que codifican para el rRNA. Por lo - tanto, como menciona Buys (op. cit.) tales proteínas no - serían consecuencia directa de la transcripción, sino un

factor estructural condicionante para que ello ocurra.

Aún cuando nuestro estudio muestra una disminución en la frecuencia de NOR's Ag (+), tal diferencia no es muy marcada; quizá debido por un lado al proceso de selección durante el cultivo celular en aquellas células con máximo número de genes rRNA activos predominando (aunque hay que recordar que los cultivos son a corto plazo); por otro lado el uso de la fitohemaglutinina como mitógeno que selectivamente estimula a las células T (Gréaves, 1972) (55) - pudiera "enmascarar" diferencias más acentuadas entre cada uno de los grupos estudiados. Un tercer factor podría ser la falta de resolución del método para teñir los NOR's -- dejando escapar al observador diferencias cuantitativas presentes.

De cualquier manera la tinción de plata de los NOR's está asociada con la actividad de los genes para rRNA; y por el método utilizado en el prente trabajo no es posible la contabilización exacta de la cantidad de genes activos a medida que avanza la edad; pero sí podemos concluir que para nuestro estudio existe una disminución de los valores medios de NOR's Ag (+) a medida que avanza la edad.

VI.- R E S U M E N

Los NOR's se sitúan en la banda p12 de los 10 autosomas acrocéntricos humanos; representan el loci para los genes rDNA que codifican al rRNA en sus fracciones 18S y 28S, involucrándose además en la formación del nucleolo; y se tiñen selectivamente con nitrato de plata (AgNO_3), según la técnica ("Ag-As") descrita por Bloom y Goodpasture en 1976.

En los genes de copia múltiple (como los NOR's) se ha reportado disminución de su actividad transcripcional a medida que avanza el proceso de envejecimiento celular.

El objetivo de este trabajo estuvo en determinar en linfocitos de sangre periférica una posible disminución en la actividad de tales genes, reflejándose en el número de NOR's Ag(+) y establecer una correlación de esa variabilidad numérica con las diferentes edades.

La técnica para el cultivo de linfocitos que se utilizó en este trabajo fue la descrita por Moorhead y cols. en 1960; y para la tinción de plata se empleó la descrita por Bloom y Goodpasture en 1976.

Los individuos muestreados fueron 50, que se distribuyeron en cinco grupos de edades (R/N, 1 año, 30 años, 50 años y 80 años), cada uno formado por 10 personas. De cada sujeto se estudiaron 10 metafases con NOR's Ag (+).

Se encontró una disminución ligera en el número de NOR's Ag (+) en sus valores medios a medida que avanza la edad.

VII.- B I B L I O G R A F I A

- 1.- Bloom, S. E. and Goodpasture, C.: An improved technique for selective silver staining of nucleolar organizer regions in human chromosomes. Hum. Genet. 1976. 34: 199-206.
- 2.- Paris Conference (1971): Standardization in Human Cytogenetics. Birth Defects: Original Article Series, VIII: 7 1972. The National Foundation, New York.
- 3.- Ferguson-Smith, M. A., Handmaker, S. D.: Observations on the satellited human chromosomes. The Lancet. 1961. I: 638-640.
- 4.- Ohno, S., Trujillo, J. M., Kaplan, W. D., Kinoshita, R.: Nucleolus-organisers in the causation of chromosomal anomalies in man. The Lancet. 1961. II: 123-126.
- 5.- Henderson, A. S., Warburton, D. and Atwood, K. C.: Location of ribosomal DNA in the human chromosome complement. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1972 69 (11): 3394-3398.
- 6.- Evans, H. J., Buckland, R. A. and Pardue, M. L.: Location of the genes coding for 18S and 28S ribosomal RNA in the human genome. Chromosoma. 1974. 48: 405-426.

- 7.- Paerdue, M. L., Hsu, T. C.: Location of 18S and 28S ribosomal genes in the chromosomes of the Indian Muntjak. *J. Cell Biol.* 1975. 64: 251-254.
- 8.- Hsu, T. C., Spirito, S. E., Paerdue, M. L.: Distribution of 18S + 28S ribosomal genes in mammalian genomes. *Chromosoma.* 1975. 53: 25-36.
- 9.- Tantravahi, R., Miller, D. A., Dev, V. G. and Miller, O. J.: Detection of nucleolus organizer regions in chromosomes of human, chimpanzee, gorilla, orangutan and gibbon. *Chromosoma.* 1976. 56: 15-27.
- 10.- Denton, T. E., Howell, W. M. and Barret, J. V.: Human nucleolar organizer chromosomes: Satellite associations. *Chromosoma.* 1976. 55: 81-84.
- 11.- Goodpasture, C., Bloom, S. E., Hsu, T. C. and Arrighi, F. E.: Human nucleolus organizers: The satellites or the stalks?. *Am. J. Hum. Genet.* 1976. 28: 559-566.
- 12.- Henderson, A. S., Warburton, D., Atwood, K. C.: Ribosomal DNA connectives between human acrocentric chromosomes. *Nature.* 1973. 245: 95-97.
- 13.- Dittes, H., Krone, W., Bross, K., Schmid, M. and Vogel, W.: Biochemical and cytogenetic studies on the nucleolus organizing regions (NOR) of man. *Humangenetik.* 1975. 26: 47-59.

- 14.- Warburton, D. and Henderson, A. S.: Sequential silver staining and hybridization in situ on nucleolus organizing regions in human cells. *Cytogenet. Cell Genet.* 1979. 24: 168-175.
- 15.- Bross, K. and Krone, W.: On the number of ribosomal RNA genes in man. *Humangenetik.* 1972. 14: 137-141.
- 16.- A. Flores-Briseño, G.: Morphology of nucleolar organizer region in human prophase and prometaphase chromosomes. M. Sc. Thesis. University of Minnesota. 1978.
- 17.- Ramón y Cajal, S.: Degeneration and regeneration of the nervous system. London, Oxford University Press. 1928.
- 18.- Weddel, G. and Glees, P.: The early stages in the degeneration of cutaneous nerve fibers. *J. Anat.* 1941. 76: 65-93.
- 19.- Peters, A.: Experiments on the mechanism of silver staining. I Impregnation. *Quart. J. Micr. Sci.* 1955. 96: 84-102.
II Development. *Quart. J. Micr. Sci.* 1955. 96: 103-115.
- 20.- Gilbert, A. B.: Triple silver impregnation for selective staining of avian nerves. *Stain Technol.* 1965. 40: 301-304.

- 21.- Bloom, S. E. and Buss, E. G.: Ammoniacal silver staining of embryonic chicken cells and chromosomes. Poultry Sci. 1969. 48: 1114- 1116.
- 22.- Osztovcics, M., Bühler, E. M., Müller, H. and Stalder, G. R.: Banding Techniques in the evaluation of human - chromosomal variants. Humangenetik. 1973. 18: 123-128.
- 23.- Black, M. M., Speer, F. D. and Lillick, L. C.: Acid-extractable nuclear proteins of cancer cells. I. Staining with ammoniacal silver. J. Nat. Cancer Inst. 1960. 25: 967-977.
- 24.- Marinozzi, V.: The role of fixation in electron staining. J. Roy. Microscop. Soc. 1963. 81: 141-154.
- 25.- Matsui, S., Sasaki, M.: Differential staining of nucleolus organizers in mammalian chromosomes. Nature. 1973. 246: 148-150.
- 26.- Tantravahi, R., Miller, D. A. and Miller, O. J.: Ag-staining of nucleolus organizer regions of chromosomes after Q, C, G or R banding procedures. Cytogenet. Cell Genet. 1977. 18: 364-369.
- 27.- Denton, T. E., Brooke, W. R. and Rowell, W. M.: A technique for the simultaneous staining of both nucleolar organizer regions and kinetochores of human chromosomes with silver. Stain Tech. 1977. 311-313.

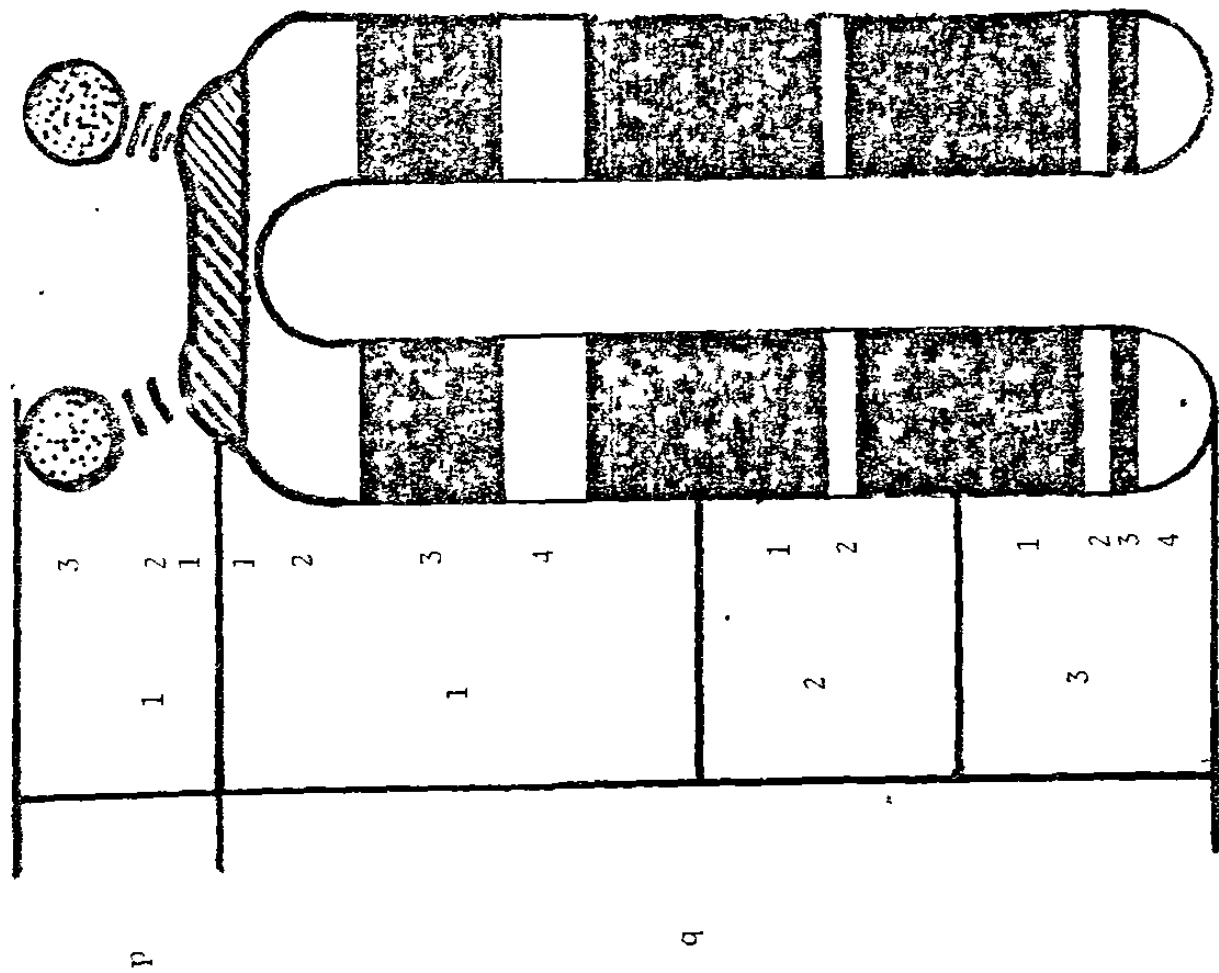
- 28.- Miller, D. A., Dev, V. G., Tantravahi, R. and Miller, O. J.: Suppression of human nucleolus organizer activity in mouse-human somatic hybrid cells. *Exp. Cell Res.* 1976. 101: 235-243.
- 29.- Pathak, S. and Keiffer, N. M.: Sterility in hybrid cattle. I. Distribution of constitutive heterochromatin and nucleolus organizer regions in somatic and meiotic chromosomes. *Cytogenet. Cell Genet.* 1979. 24: 42-52.
- 30.- Pelliccia, F., Capoa, A. de, Belloni, G., Rocchi, A. and Ferraro, M.: Localization of silver staining in interphase, prophase and metaphase lymphocytes. *Exp. Cell Res.* 1978. 115: 439-441.
- 31.- Hubbell, H. R., Rothblom, L. I. and Hsu, T. C.: Identification of silver binding protein associated with the cytological silver staining of actively transcribing nucleolar regions. *Cell Biology International Reports.* 1979. 3: 7. 615-622.
- 32.- Hernandez-Verdun, D., Hubert, J., Bourgeois, C. A. and Bouteille, M.: Ultrastructural localization of arg-NOR stained proteins in the nucleolus during the cell cycle and in other nucleolar structures. *Chromosoma.* 1980. 79: 349-362.

- 33.- Berdyshev, G. D.: Age-Dependent changes of in vitro - transcription activities of animals. Interdiscip. Top. Gerontol. 1976. 9: 83-133.
- 34.- Hahn, H. P.: The regulation of protein synthesis in - the aging cell. Exp. Gerontol. 1970. 5: 323-334.
- 35.- O'Meara, A. R. and Herrmann, R. L.: A modified mouse liver chromatin preparation displaying age-related - differences in salt dissociation and template ability. Biochim. Biophys. Acta. 1972. 269: 419-427.
- 36.- Pythila, M. J. and Sherman, R. G.: Studies on thermal stability and template effectiveness of DNA and nucleoproteins from beef thymus. Biochem. Biophys. Res. Commun. 1968. 31: 340-344.
- 37.- Ogrodnik, J. P., Wulf, J. H. and Cutler, R. G.: Altered protein hypothesis of mammalian ageing processes. II. Discrimination ratio of methionine vs ethionine - in the synthesis of ribosomal protein and RNA of -- C57/BL/6J mouse liver. Expl. Gerontol. 1975. 10: - 119-136.
- 38.- Wulf, J. H. and Cutler, R. G.: Altered protein hypothesis of mammalian ageing processes. I Thermal stability of glucose-6-phosphate dehydrogenase in - - C57/BL/6J mouse tissue. Expl. Gerontol. 1975. 10: 101-118.

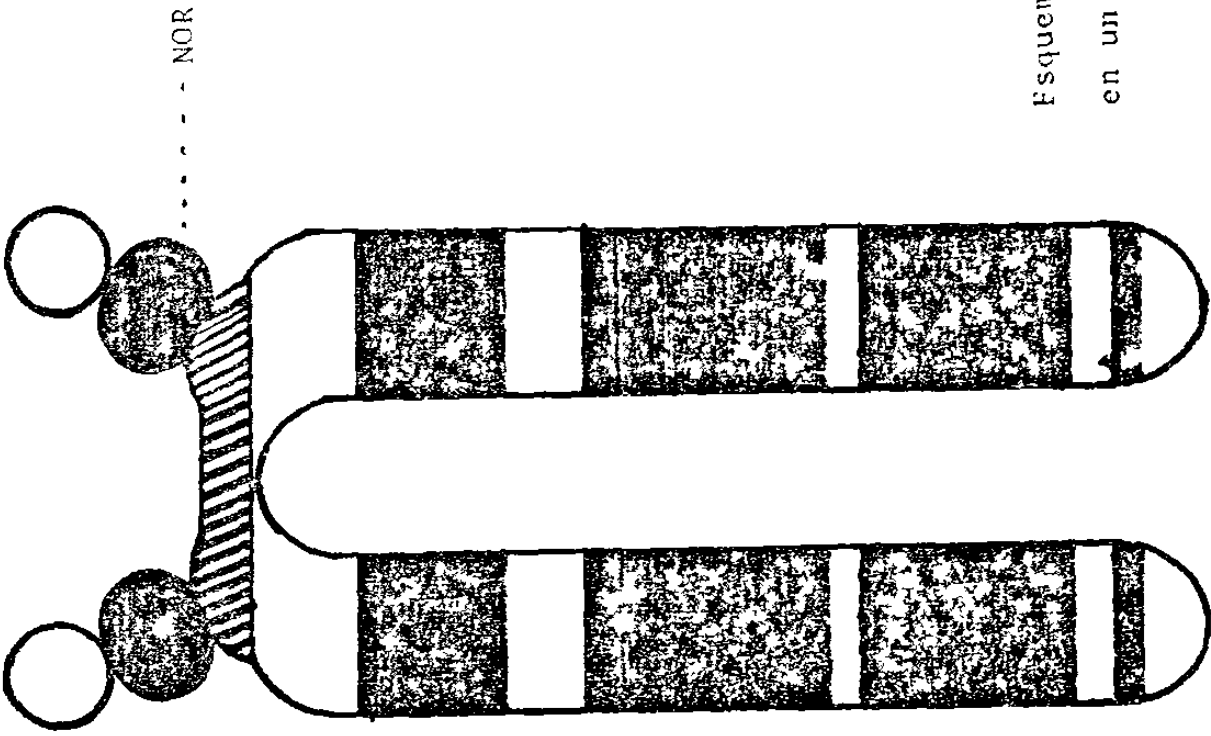
- 39.- Dingmann, D. W. and Sporn, M. B.: Studies of chromatin. I. Isolation and characterization of nuclear complexes of DNA, RNA and protein from embryonic and adult tissues of the chicken. J. Biol. Chem. 1964. 239: 3483-3492.
- 40.- Kurtz, D. I., Russel, A. P. and Sinex, F. M.: Multiple peaks in the derivative melting curve of chromatin from animals of varying age. Mech. Ageing Dev. 1974. 3: 37-49.
- 41.- Ohno, S. and Nagai, Y.: Genes in multiple copies as the primary cause of aging. Birth Defects: Original Article Series. 1978. XIV: 1. 501-514. The National Foundation.
- 42.- Hart, R. W. and Setlow, R. B.: Correlation between deoxyribonucleic acid excision-repair and life-span in a number of mammalian species. Proc. natn. Acad. Sci. USA. 1974. 71: 2169-2173.
- 43.- Gaubatz, J. W. and Cutler, R. G.: Age-related differences in the number of ribosomal RNA genes of mouse tissues. Gerontology. 1978. 24: 179-207.
- 44.- Andrew, W.: "Cellular changes with age". Springfield, C. C. Thomas, 1952.

- 45.- Johnson, R., Strehler, B. L.: Loss of genes coding for ribosomal RNA in ageing brain cells. *Nature*. 1972. - 240: 412-414.
- 46.- Johnson, R., Chrisp, C., Strehler, B.; Selective loss of ribosomal RNA genes during the ageing of postmitotic tissues. *Mech. Ageing Dev.* 1972. 1: 183-198.
- 47.- Mann, D. M. A., Yates, P. O.: Lipoprotein pigments. Their relationships to aging in the human nervous system. 1' The lipofuscin content of nerve cells. - *Brain*. 1974. 97: 481-488.
11. The melanin content of pigmented nerve cells. *Ibid.* 489-498.
- 48.- Strehler, B. L.: Roles and mechanisms of rDNA changes during aging. *Birth Defects: Original Article Series*, 1978. XIV: 1. 449-462. The National Foundation.
- 49.- Buys, C. H. C. M., Osinga, J. and Anders, G. J. P. A.: Age-dependent variability of ribosomal RNA-gene activity in man as determined from frequencies of silver-staining nucleolus organizing regions on metaphase chromosomes of lymphocytes and fibroblasts. *Mechanisms of Ageing and Development*. 1979. 11: 55-75.
- 50.- Moorhead, P. S., Nowell, P. C., Mellman, W. J., Battips, D. M. and Hungerford, D. A.: Chromosome preparations of leukocytes cultured from human peripheral blood. *Exptl. Cell Res.* 1960. 20: 613-616.

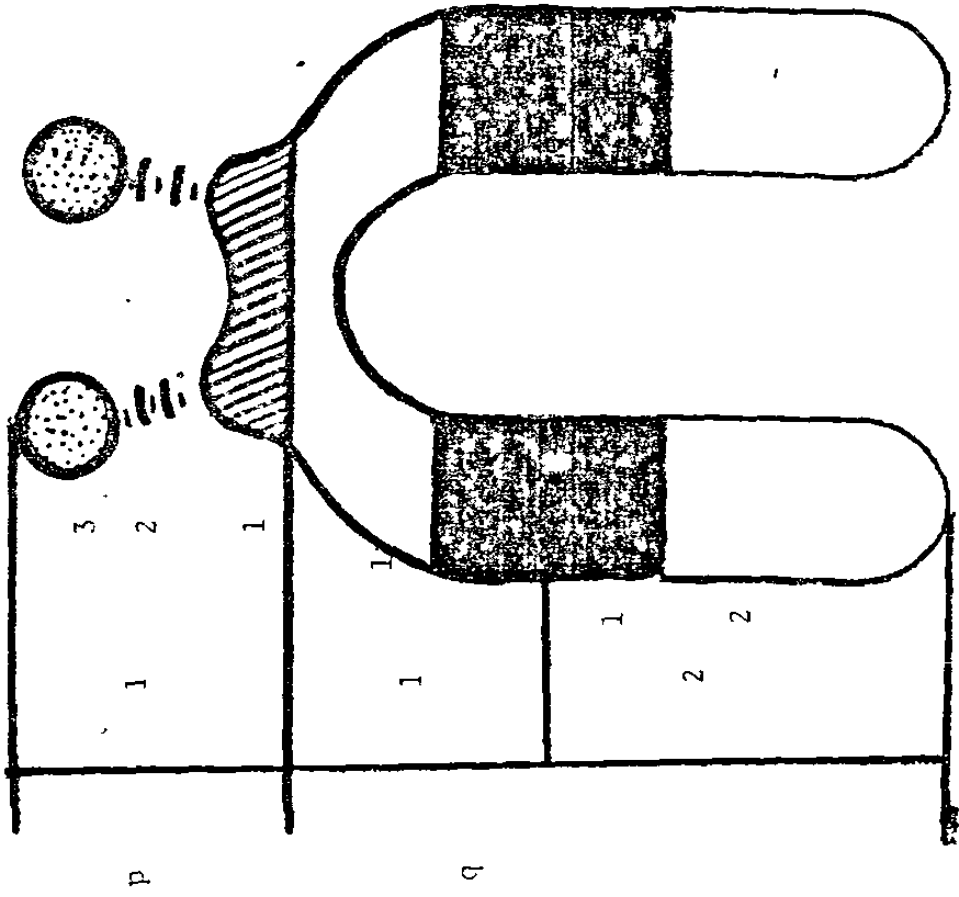
- 51.- Seabright, M.: A rapid banding technique for human - chromosomes. *The Lancet*. 1971. II: 971-972.
- 52.- Varley. J. M.: Patterns of silver staining of human chromosomes. *Chromosoma*. 1977. 61: 207-214.
- 53.- Mikelsaar, A. V., Schmid, M., Krone, W., Schwarzacher, H. G. and Schnedl, W.: Frequency of Ag-Stained nucleolus organizer regions in the acrocentric chromosomes - of man. *Hum. Genet*. 1977. 37: 73-77.
- 54.- Schwarzacher, H. G., Mikelsaar, A. V. and Schnedl, W.: The nature of the Ag-staining of nucleolus organizer - regions. Electron and light microscopic studies on - human cells in interphase, mitosis and meiosis. - - - *Cytogenet. Cell Genet*. 1978. 20: 24-39.
- 55.- Greaves, M. F. and Janossy, G.: Elicitation of selective T and B lymphocyte response by cell surface - - - binding ligands. *Transplant. Rev*. 1972. 11: 87-130.



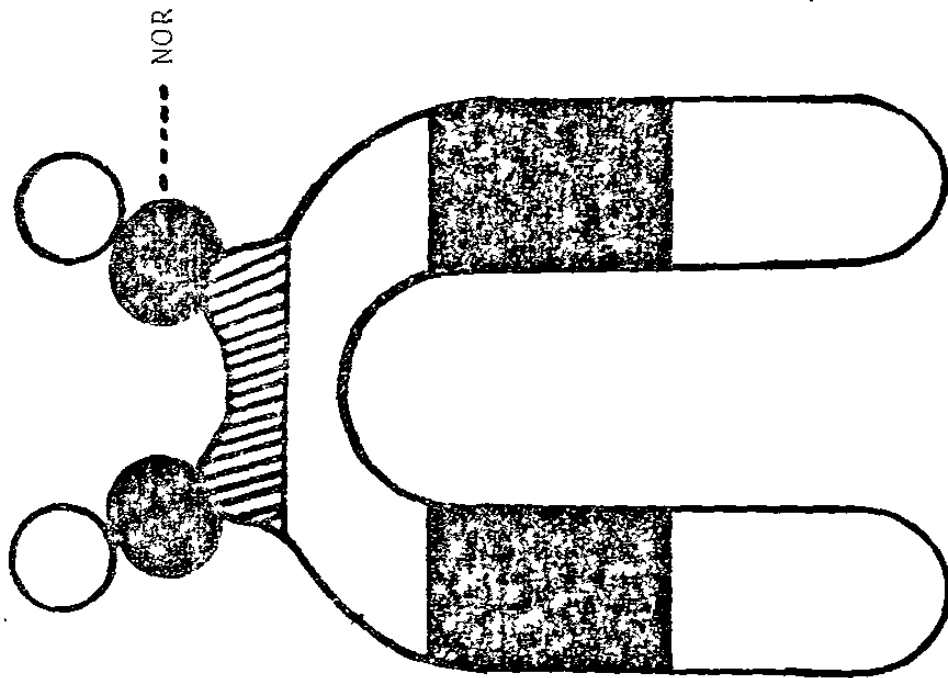
Esquema del cromosoma núm 13
 (Grupo D) según la Conferencia
 de París de 1971.



Esquema que muestra a los NOR's
en un cromosoma del grupo D.



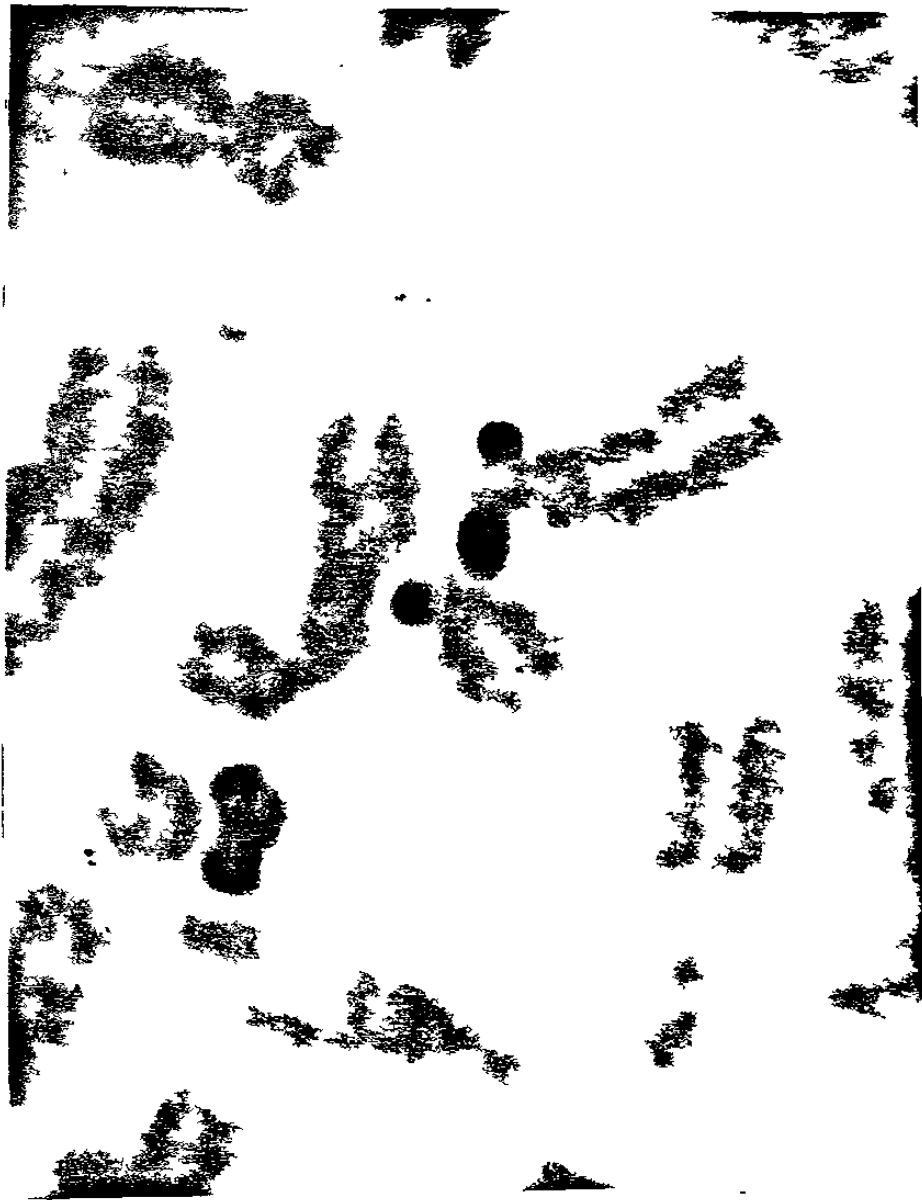
Esquema del cromosoma número 21 (Grupo C)
 Según la Conferencia de París de 1971.



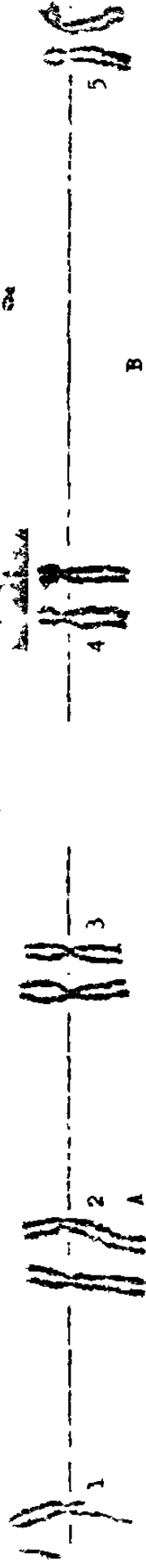
Esquema que muestra a los NOR's en un cromosoma del grupo G.



Fotografía de metafase que muestra NOR's Ag (+).



Fotografía mostrando cromosomas de los grupos D y G con NOR's positivos a la plata.



CROMOSOMAS SEXUALES

F G

CARDIOMITO MACIDANINO MORTIS A. 6 (4)

ANEXO I RESULTADOS NUMERICOS OBTENIDOS PARA LA POBLACION DE RECIEN NACIDOS. (NOR's Ag +)

Casos y grupos cromosómicos

Metafase	1		2		3		4		5		6		7		8		9		10		
	D	G	D	G	D	G	D	G	D	G	D	G	D	G	D	G	D	G	D	G	
1	6	3	4	2	5	2	3	3	6	1	4	4	3	2	4	4	3	2	2	1	3
2	5	4	4	0	4	1	5	4	6	3	4	4	3	1	2	2	3	2	2	2	2
3	4	3	3	2	4	1	3	3	4	1	2	4	5	2	3	3	4	2	4	2	0
4	4	2	4	1	3	2	3	4	5	2	5	3	3	2	2	3	3	1	2	2	1
5	4	2	4	2	2	3	4	4	5	3	5	3	4	1	1	4	2	2	3	2	2
6	3	3	4	0	5	1	4	3	4	2	3	2	5	3	4	4	4	2	2	2	2
7	4	3	3	2	1	3	3	3	5	3	5	3	5	2	4	4	3	2	2	2	2
8	3	2	4	4	4	2	4	3	5	3	6	3	4	4	4	2	3	0	3	3	3
9	2	3	4	1	3	2	-	-	6	0	4	3	5	2	-	-	4	1	5	0	0
10	1	3	-	-	-	-	-	-	6	1	5	4	3	2	-	-	5	1	2	1	1
\bar{X}	3.6	2.8	3.7	1.5	3.4	1.8	3.6	3.3	5.2	1.9	4.4	3.3	4	2.1	2.8	3.1	3.2	1.8	2.3	1.6	1.6
S	1.4	0.6	0.4	1.2	1.3	0.7	0.7	0.5	0.1	1.1	1.1	0.6	0.9	0.8	0.8	1.1	1.0	0.6	1.4	1.0	1.0
S ²	1.8	0.3	0.1	1.3	1.5	0.5	0.4	0.2	0.5	1.0	1.2	0.4	0.8	0.6	0.6	1.1	0.9	0.3	1.8	1.8	1.0

$\bar{X} D_T = 3.66$

$\bar{X} G_T = 2.32$

ANEXO II RESULTADOS NUMERICOS OBTENIDOS PARA LA POBLACION DE 1 ANO (NOR's Ag +)

Casos y grupos cromosómicos

Metafase	1		2		3		4		5		6		7		8		9		10	
	D	G	D	G	D	G	D	G	D	G	D	G	D	G	D	G	D	G	D	G
1	4	2	4	2	4	2	4	4	6	4	4	2	4	4	3	1	5	4	5	2
2	4	0	3	4	3	3	3	2	3	3	4	2	2	3	2	2	4	3	3	3
3	4	1	2	2	3	2	3	2	4	3	3	3	3	4	3	2	3	2	3	2
4	4	3	5	3	3	2	6	3	4	3	4	1	2	2	3	1	5	3	4	1
5	3	2	4	2	2	3	4	1	3	4	3	2	4	3	1	3	3	3	2	2
6	4	2	4	4	3	3	2	2	3	4	1	4	2	4	2	5	2	2	2	3
7	4	3	3	1	4	3	4	1	2	3	5	2	4	3	2	2	5	3	3	3
8	3	2	5	1	3	3	4	3	2	3	5	1	3	1	3	1	4	2	3	3
9	2	2	4	3	2	3	3	1	5	2	2	2	3	3	3	5	5	3	4	2
10	3	3	4	3	4	3	6	3	4	2	6	2	3	1	4	2	4	2	2	3
\bar{X}	3.5	2.0	3.8	2.5	2.9	2.7	3.9	2.2	3.6	3.0	4.0	1.7	3.0	2.9	2.9	1.7	4.4	2.7	3.1	2.4
S	0.7	0.9	0.9	1.0	0.7	0.4	1.2	1.0	1.2	0.6	1.1	0.4	0.8	1.1	0.5	0.6	0.6	0.6	0.9	0.6
S ²	0.4	0.8	0.7	1.0	0.4	0.2	1.4	0.9	1.4	0.4	1.2	0.2	0.6	1.0	0.2	0.4	0.4	0.4	0.8	0.4

$\bar{X} D_T = 3.51$ $\bar{X} G_T = 2.38$

ANEXO III RESULTADOS NUMERICOS OBTENIDOS PARA LA POBLACION DE 30 AÑOS (NOR's Ag +)

Casos y grupos cromosómicos

Metafase	1		2		3		4		5		6		7		8		9		10	
	D	G	D	G	D	G	D	G	D	G	D	G	D	G	D	G	D	G	D	G
1	2	3	3	2	5	2	6	2	5	4	4	3	3	3	5	2	3	1	2	3
2	1	2	2	2	3	1	4	1	5	4	4	2	4	2	4	3	3	3	2	3
3	3	1	1	3	2	2	4	3	3	4	4	3	5	1	3	2	1	2	3	0
4	4	3	3	1	5	2	4	3	4	2	4	3	1	2	6	4	3	2	4	1
5	4	3	3	1	1	3	6	3	4	2	5	3	2	1	4	2	2	2	4	0
6	4	3	2	2	4	0	3	2	4	0	5	3	4	1	4	0	1	3	3	0
7	2	2	2	2	3	0	5	3	3	3	5	4	3	1	5	2	2	1	2	1
8	3	3	3	1	4	2	2	2	4	0	3	3	2	2	5	2	2	1	3	1
9	3	3	3	4	2	2	5	3	-	-	3	3	-	-	5	1	-	-	4	0
10	2	3	2	2	3	0	6	2	-	-	-	-	-	-	4	3	-	-	6	1
X	2.8	2.6	2.4	2.0	3.2	1.4	4.5	2.4	4.0	1.7	4.3	3.3	3.0	1.6	4.5	2.1	2.1	1.8	3.3	1.0
S	1.0	0.6	0.6	0.9	1.3	1.0	1.3	0.6	0.7	1.1	0.8	0.5	1.3	0.7	0.8	1.1	0.8	0.8	1.2	1.1
S ²	0.9	0.4	0.4	0.8	1.5	1.0	1.6	0.4	0.5	1.1	0.6	0.2	1.5	0.4	0.6	1.0	0.6	0.6	1.4	1.2

$\bar{X} D_T = 3.43$ $X D_T = 2.01$

ANEXO IV RESULTADOS NUMERICOS OBTENIDOS PARA LA POBLACION DE 50 AÑOS (NOR's Ag +)

Casos y grupos cromosómicos

Me La fase	1		2		3		4		5		6		7		8		9		10	
	D	G	D	G	D	G	D	G	D	G	D	G	D	G	D	G	D	G	D	G
1	3	3	4	3	1	2	6	3	3	3	4	1	3	3	3	2	3	0	1	2
2	2	3	4	2	4	1	4	4	4	4	4	1	4	3	3	2	4	1	3	2
3	3	1	2	2	2	2	5	2	4	4	3	4	3	4	5	2	2	3	2	1
4	3	1	4	2	2	1	4	3	4	2	5	2	4	3	3	1	1	3	1	3
5	3	1	3	1	4	2	4	3	5	4	2	4	2	3	5	2	3	2	3	2
6	1	3	2	3	5	1	4	4	3	3	5	3	3	3	4	3	2	1	1	2
7	2	3	3	1	3	1	5	3	4	4	5	0	3	3	4	1	3	0	1	3
8	2	1	2	2	4	4	3	4	4	4	5	2	3	3	4	2	2	1	2	1
9	3	3	3	0	4	2	6	4	5	4	5	1	4	2	5	3	3	2	4	3
10	2	4	-	-	3	1	4	2	5	4	4	1	2	3	3	1	2	2	4	3
X	2.4	2.3	3.0	1.7	3.2	1.7	4.5	3.2	4.0	3.6	4.3	1.8	3.1	3.0	3.9	1.9	2.1	1.5	2.2	2.2
S	0.6	1.1	0.8	0.9	1.2	0.9	0.9	0.7	0.8	0.6	0.9	1.2	0.7	0.4	0.8	0.7	1.1	1.0	1.2	0.7
S ²	0.4	1.2	0.6	0.8	1.3	0.8	0.8	1.2	0.6	0.4	0.8	1.3	0.4	0.2	0.6	0.4	1.1	1.0	1.3	0.5

$\bar{X} D_T = 3.31$ $X G_T = 2.30$

ANEXO V RESULTADOS NUMERICOS OBTENIDOS PARA LA POBLACION DE 80 AÑOS (NOR's Ag +)

Casos y grupos cismosomícos

Metilases	1		2		3		4		5		6		7		8		9	
	D	G	D	G	D	G	D	G	D	G	D	G	D	G	D	G	D	G
1	1	2	2	1	5	4	6	3	5	2	4	3	4	1	4	2	2	2
2	3	2	2	1	4	1	4	4	4	1	3	3	3	3	3	2	2	2
3	3	1	3	1	2	2	5	2	4	2	2	3	3	0	3	0	4	2
4	2	4	3	3	5	2	4	3	4	3	2	3	5	3	2	1	3	2
5	2	1	2	1	2	1	4	3	4	4	2	3	3	1	5	1	3	3
6	2	1	4	0	3	1	4	4	5	3	5	2	5	1	2	2	3	2
7	0	2	1	3	2	1	5	3	5	3	2	2	4	1	2	2	2	4
8	-	-	2	2	2	1	3	4	4	2	2	2	-	-	3	2	3	3
9	-	-	2	2	4	1	6	4	4	1	4	3	-	-	-	-	3	2
0	-	-	2	1	3	1	4	2	4	3	3	2	-	-	-	-	2	3
X	1.8	1.7	2.3	1.5	3.2	1.5	4.5	3.2	4.3	2.4	2.9	2.6	3.8	1.4	3.0	1.5	2.7	2.5
S	1.0	1.1	0.8	0.9	1.2	0.9	0.9	0.7	0.4	0.9	1.1	0.5	0.8	1.1	1.0	0.7	0.6	0.7
S ²	0.9	1.0	0.6	0.8	1.3	0.8	0.8	0.5	0.2	0.8	1.0	0.2	0.6	1.1	1.0	0.4	0.4	0.4

$\bar{X} D_T = 3.21$ $\bar{X} G_T = 2.09$

