

**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA**

**FACULTAD DE CIENCIAS**



**ANALISIS DE LOS FACTORES ( pH, TEMPERATURA, CONCENTRACION  
DEL NITRATO DE PLATA, TIEMPO DE TINCION Y ENVEJECIMIENTO  
DE LAS LAMINILLAS) QUE INTERVIENEN EN LA OBTENCION DE  
LAS BANDAS NOR DE CROMOSOMAS HUMANOS**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE**

**B I O L O G O**

**PRESENTA**

**Hector Manuel Ruiz Valencia**

Ensenada, B. C.

Abril de 1992

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE CIENCIAS

ANALISIS DE LOS FACTORES (pH, TEMPERATURA, CONCENTRACION DEL NITRATO DE PLATA, TIEMPO DE TINCION Y ENVEJECIMIENTO DE LAS LAMINILLAS) QUE INTERVIENEN EN LA OBTENCION DE LAS BANDAS NOR DE CROMOSOMAS HUMANOS .


TESIS PROFESIONAL QUE PRESENTA:  
HECTOR MANUEL RUIZ VALENCIA

Aprobada por:



M. C. Carlos Marquez B.  
Presidente del Jurado

~~BIOL. OLIVIA TAPIA V.~~  
~~Vocal~~



Q.F.B. Miguel Carrillo M.  
Secretario

DEDICATORIA :

*A mis padres, por todo su cariño*

*A mis hermanos : Hugo, Horacio e Hiram.*

*Y a todos aquellos que me brindaron su ayuda  
desinteresada para realizar mis estudios.*

## AGRADECIMIENTOS :

Quiero agradecer sinceramente a mi asesor M. en C. Carlos Márquez Becerra, por el apoyo dado durante todo el desarrollo del trabajo. Al M. en C. Faustino Camarena R., Director de la Facultad de Ciencias, a la M. en C. Irma Rivera G., Subdirector Académico de la Facultad de Ciencias y al Biólogo Elias Torres B., Subdirector Administrativo.

Agradezco también, a la Bióloga Olivia Tapia V. por compartir su experiencia durante toda la carrera y especialmente en la última etapa. Al Q.F.B. Miguel Carrillo M. por su compañerismo y por su interés mostrado en la revisión del escrito final.

Quiero agradecer especialmente al Biólogo Guillermo Bojorquez Rangel por las revisiones del trabajo, por sus valiosas sugerencias y por haberme otorgado su amistad y apoyo. Así como también al P. Biol. Eligio Mancinas Santos y Familia, porque siempre me brindaron ayuda y amistad incondicional.

A Enoe Cruz Morales por todo su amor y paciencia y a su Familia por su desinteresada ayuda para concluir la última etapa de este trabajo.

También agradezco a todos mis compañeros de Laboratorio, a los de mi generación y a los de la generación del 89 por haber convivido conmigo y por haberme invitado a sus cotorreos.

## RECONOCIMIENTO:

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Genética de la Facultad de Ciencias, U A B C; en donde se realizan diversos proyectos. Uno de éstos, que ha sido central es el titulado: "Detección de agentes mutagénicos en la costa de Baja California", a través del cual se han recibido apoyos que han contribuido a que se desarrollen otras investigaciones en Genética, entre ellas esta tesis.

Los recursos recibidos han sido principalmente de la Dirección General de Investigación y Posgrado, UABC y de DGICSA, SEP: convenio C88-01-0413.

## RESUMEN :

Para la determinación de parámetros más adecuados en la obtención de bandas NOR (Región Organizadora del Nucléolo) mediante la técnica de Bloom y Goodpasture (1976) modificada (Márquez, 1987), se diseñaron 14 variaciones de dicha técnica y se aplicaron en 253 metafases de linfocitos humanos cultivados. Encontrándose como resultado 3 niveles de calidad para el total de las preparaciones : bandas con buena calidad, mediana a mala calidad y sin bandas.

La mayor frecuencia de mitosis con bandas NOR de buena calidad que se presentó, fué del 50% con la aplicación del tratamiento V, del 42.5% con el tratamiento IV, del 41% con el III, del 32% con el I y del 30.8% con el II. Para el resto de los tratamientos no se obtuvieron bandas debido a los problemas de precipitación que presentó la solución de nitrato de plata y a la mala calidad con que resultaron las preparaciones.

Los valores más adecuados que se encontraron para los distintos parámetros fueron los siguientes : 2.95 M y 1.5 M para la concentración del nitrato de plata, 2.65 para el pH de la solución de formalina, 37 C y 50 C para la temperatura de incubación y el tiempo promedio de incubación a 50 C fué de 11.5 minutos.

Por otro lado, aunque en este trabajo no fué un objetivo el revisar si de la calidad del reactivo dependía la calidad de la tinción, se determinó (de forma cualitativa), que la vigencia y calidad de los reactivos es de suma importancia para la generación de buenas bandas NOR.

INDICE.

Introduccion .....	1
Antecedentes .....	10
Objetivo .....	14
Metodologia .....	15
Resultados .....	18
Discusiones .....	27
Conclusiones .....	34
Recomendaciones .....	36
Bibliografia .....	37

FIGURAS.

1a .....	7
2b .....	8
1c .....	9
2a .....	19
2b .....	20
3 .....	22
4 .....	24

TABLAS.

I .....	25
II .....	26

## INTRODUCCION.

El estudio de la citogenética humana así como de áreas relacionadas tales como la evolución y la genética clínica, han tenido un gran avance debido al desarrollo de nuevas técnicas de análisis, entre las que destacan las de bandeo de cromosomas (bandas C, Q, R, NOR, G y otras más). Las técnicas de bandas son tratamientos diversos basados en soluciones amortiguadoras, enzimas y colorantes, que permiten la formación de bandas claras y oscuras a lo largo de todo el cromosoma, lográndose con ello la observación de regiones específicas y de las variaciones de éstas.

Hasta hace poco tiempo un cromosoma sólo podía distinguirse por su longitud y la posición de su centrómero en el momento de máxima condensación. Con las técnicas actuales de bandeo específico se lleva a cabo la identificación de cromosomas sin ningún problema, así como también son útiles en el mapeo genético y en la determinación de variantes cromosómicas (Stanfield, 1983). Además permiten identificar diversas regiones cromosómicas como centrómeros, tallos, telómeros, etc.

Los problemas cromosómicos, como las traslocaciones, deleciones, poliploidías, aneuploidías y otras alteraciones, muchas veces van ligados a padecimientos tales como: síndromes y diversos tipos de leucemias.

La determinación de estas anormalidades es realizada

bandas. De aquí la necesidad de afinar dichas técnicas con objeto de optimizar recursos monetarios, tiempo y trabajo, sin que esto implique pérdida de calidad.

Este trabajo se enfocará únicamente a las bandas NOR (del inglés Nucleolus Organizer Regions: Regiones Organizadoras del Nucléolo) del genoma humano, las cuales se localizan en las constricciones secundarias de los cromosomas acrocéntricos 13, 14, 15, 21 y 22 que constituyen los grupos D y G respectivamente (Figs. 1a y 1b).

Dichos grupos de cromosomas se han tornado de gran interés debido a la diversidad de heteromorfismos y asociaciones presentadas en sus brazos cortos, tallos y satélites (Fig. 1c). Además son importantes ya que presentan los genes para la codificación del ARNr (18s y 28s), los cuales están relacionados con la formación de estructuras indispensables para el desarrollo celular normal, tales como el nucléolo y los ribosomas. (citado por Bojórquez Rangel, 1990).

Recientemente estos cromosomas han aumentado su importancia, porque debido a su alta actividad transcripcional ellos ofrecen un sistema modelo para el análisis celular y molecular de la expresión de genes (Clavaguera et al., 1983).

En lo que se refiere al aspecto clínico, es común que esten involucrados en situaciones patológicas entre las que destacan las traslocaciones robertsonianas o fusiones céntricas ( $\frac{D}{D}$ ,  $\frac{D}{G}$ ,  $\frac{G}{G}$ ) que se presentan con relativa frecuencia, así como las trisomías 13 y 21 que corresponden al síndrome de Patau y síndrome de Down respectivamente (Hienz, 1975).

Matsui y Sasaki (1973) y Funaki et al., (1975) son los primeros que describieron una técnica específica para revelar los tallos y utilizaron el método para bandas-N. Sin embargo, Goodpasture y Bloom (1975) trataron de reproducir el experimento sin obtener buenos resultados. El mismo problema ocurrió en otros laboratorios. En ese mismo año (1975), Goodpasture y Bloom proponen una modificación a la técnica de Howell et al., (1975), que es específica para satélites de cromosomas del grupo D y G obteniendo un método más seguro para la impregnación de NORs. A partir de entonces se han desarrollado variantes de dicha técnica con el fin de mejorarla y obtener resultados más finos y seguros.

La técnica para obtener bandas NOR utiliza básicamente una solución de nitrato de plata aplicada bajo ciertos parámetros de temperatura, pH, concentración del nitrato, tiempo de incubación, pretratamientos de las laminillas a trabajar, envejecimiento de las mismas y calidad de los reactivos, por medio de los cuales se rige en gran medida la calidad de impregnación que se obtiene. Se ha establecido que los iones de plata son afines a todos los componentes de la cromatina (ADN, ARN, histonas, proteínas no histónicas, y proteínas no histónicas llamadas HMG) pero de preferencia a los ácidos nucleicos, especialmente ADN (Clavaguera et al., 1983). Por otro lado, en oposición a lo anterior, se ha propuesto la Teoría de que los iones de plata son específicos para ciertas proteínas ácidas denominadas C23 y B23, las cuales se presentan asociadas al ADNr en la parte externa de los cromosomas (Howell, 1977; Schwarzacher et al., 1978; Olert et

*al* , 1979; Plotons *et al* , 1983 y 1984). Esta teoría supone que dichas proteínas ácidas poseen un gran número de grupos carboxilo, sulfhidrilo y disulfuro los cuales pueden reducir fácilmente la plata y de esta manera provocar la impregnación de las regiones cercanas a las NOR (Olert *et al* , 1979). Daskal *et al* (1980) sugiere que las proteínas C23 y B23 requieren de un pretratamiento para quitar elementos que se encuentren asociados a estas proteínas y que posteriormente puedan reaccionar con los iones de plata. Dicho pretratamiento lo realizarón con Metanol:Ac. Acético (3:1).

Por otro lado, Lomholt y Toft (1987) mencionan que a pHs extremos se da una modificación de los sitios reductores de las proteínas, con lo cual se facilita la reacción de la Plata.

Las pruebas para apoyar la Teoría antes mencionada, surgen de experimentos en los que las laminillas son previamente tratadas con ADNasas, ARNasas, TCA (Ac. Tricloroacético) y Tripsina. Encontrandose que la impregnación con Plata resulta negativa al aplicar Tripsina, lo que sugiere que el principal elemento que se impregna es una proteína (Schwarzacher *et al* , 1978; Babu y Verma, 1985).

La técnica original de Goodpasture y Bloom (1975), presentó varios problemas (abundante precipitado de plata, tiempo y temperatura de incubación no estandarizados, desnaturalización del material, sobreimpregnación y un alto gasto de nitrato de plata en las preparaciones resultantes), por lo que algunos investigadores diseñaron variantes de esta técnica intentando resolver dichos problemas.

Algunos ejemplos de estas modificaciones son los trabajos recientes de Howell y Black (1980), en los que aplican la solución de nitrato de plata más un coloide protector (2gr gelatina-polvo + H<sub>2</sub>O + 1ml ac. fórmico) logrando estandarizar el tiempo de incubación (2 min.) y mejorar la calidad.

Por otro lado, Lomholt y Toft (1987) utilizan sustancias no volátiles como son: etanolamina (1M) y nitrato de etanolamonio (0.5 M) con la intención de mantener estable el pH y que no produzca variaciones en la impregnación.

Sin embargo, éstas y otras modificaciones que aún se siguen haciendo a dichas técnicas (Howell *et al* , 1978, Bloom y Goodpasture 1976, Lau *et al* , 1978, Howell y Black 1978, Lomholt y Toft 1987) nos indican que existen problemas que hasta la fecha no se han podido solucionar totalmente y que incluso se comentan en diversas reuniones de especialistas.

En el laboratorio de Genética de la Facultad de Ciencias de la U.A.B.C. se practica la técnica para bandas NORs con cierta frecuencia, sin embargo también presenta ocasionalmente una serie de problemas tales como : abundante precipitado de plata, sobretinción y desnaturalización de los cromosomas, así como impregnación no homogénea de las preparaciones. Tales problemas aunque no siempre se presentan, sí entorpecen el trabajo y además representan pérdida de tiempo y recursos. Por ello el propósito del presente trabajo, es revisar experimentalmente algunos de los parámetros que pudieran afectar la reproducibilidad y la calidad de las bandas NORs. De los cuales existen algunos antecedentes, sin embargo no todos los parámetros han sido revisados bajo un

enfoque experimental. Por otra parte, diversos datos experimentales que se han reportado, no coinciden con las experiencias y observaciones que se han tenido en nuestro laboratorio.



Figura 1a : Metafase humana normal. Las flechas señalan a los cromosomas acrocéntricos.

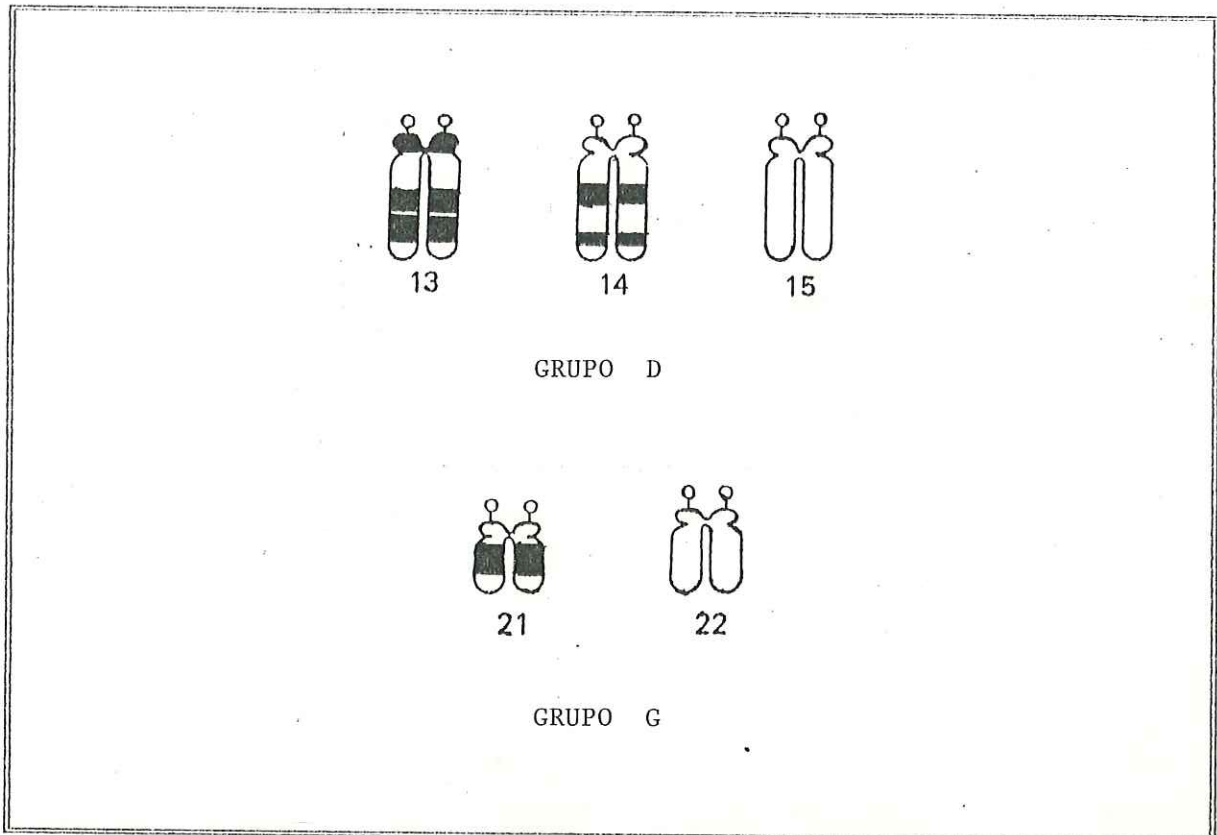


Figura 1b. - Cariotipo humano parcial, mostrando los cromosomas acrocéntricos del grupo D (13,14 y 15) y grupo G (21 y 22).

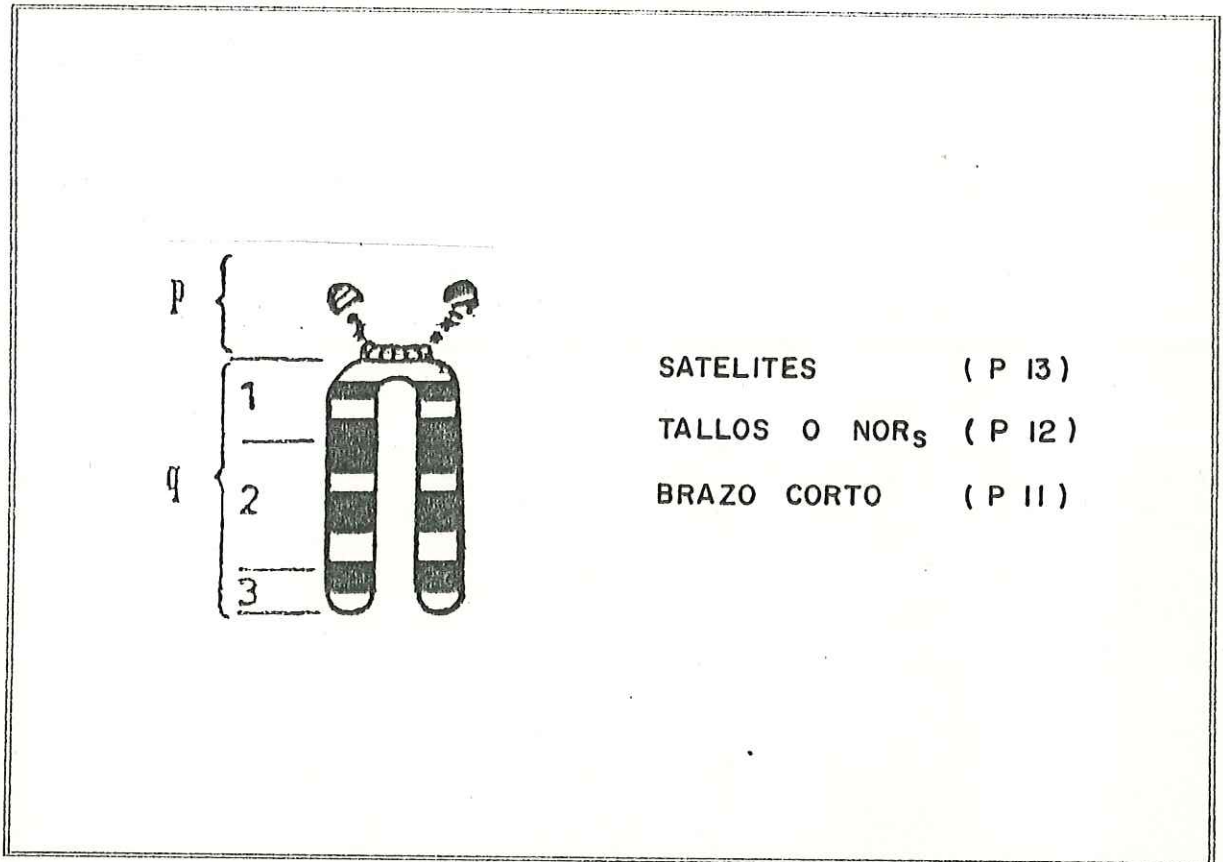


Figura 1c.- Esquema de un cromosoma acrocéntrico mostrando las diferentes partes que lo forman : Brazos largos (q) y Brazos cortos (p). En ellos se pueden identificar diversas regiones : En los brazos cortos destaca la región pericentromérica (p 11), los tallos o NORs (p 12) y los satélites (p 13). (Tomado de Bojórquez, 1990).

## ANTECEDENTES.

Como se conoce actualmente, tanto el nucléolo de células en interfase, como la región organizadora del nucléolo de cromosomas metafásicos pueden teñirse específicamente con soluciones de plata.

Las primeras noticias que se tuvieron sobre la elevada afinidad del nucléolo por la plata fueron a principio de este siglo con Michotte en 1904, Marinesco en 1905 y otros (Citados en: Schwarzacher *et al* , 1978). Posteriormente se siguieron realizando estudios que requirieron del uso básico de la plata, por ejemplo: Black y Speer en 1958 ( Citados en: Schwarzacher *et al* , 1978), reportaron bajo condiciones controladas, la tinción con plata amoniacal de cromatina nucleolar en una gran variedad de células .

Posteriormente Black y Ansley (1964), diseñaron una técnica para teñir con plata amoniacal cromosomas de la glándula salival del díptero *Sciara copriphila*, presentándose variaciones en la intensidad de la tinción y por ello no siempre fué reproducible. En 1969 Bloom y Buss aplicando la misma técnica en células de embrión de pollo, tuvieron los mismos problemas que Black y Ansley (1964).

No es sino hasta 1973 cuando Matsui y Sasaki obtuvieron una técnica específica para la región organizadora del nucléolo, dichos científicos presentaron el método para bandas-N y sus resultados. Poco después Funaki *et al* , (1975) reportaron resultados similares. Goodpasture y Bloom (1975) intentaron

reproducir los experimentos de Matsui y Sasaki (1973) y de Funaki *et al* , (1975) pero no obtuvieron resultados satisfactorios, ocurriendo lo mismo en otros laboratorios (Goodpasture y Bloom 1975). Ese mismo año, los mismos investigadores hicieron modificaciones a la técnica de Howell *et al* , (1975) y Denton *et al* , (1975) obteniendo un método que les permitió teñir específicamente los sitios de ADNr, presentando en ocasiones problemas de abundante precipitación de plata, sin uniformidad de la tinción y desnaturalización de los cromosomas.

En 1976, Bloom y Goodpasture revisaron de nuevo la técnica con el objeto de solucionar los problemas que los provocaba y realizaron varios experimentos en donde trataron de controlar cuidadosamente los parámetros de temperatura, pH, concentración de plata y tiempo de tratamiento; además utilizaron solución de plata amoniacal llegando a obtener sus mejores resultados al utilizar únicamente  $\text{AgNO}_3$  y formalina, es decir, sin agregar la solución amoniacal.

Posteriormente Olert *et al* ,(1979) propusieron un nuevo método de tinción con plata ( $\text{Ag-II}^*$ ), el cual proporciona una forma rápida y segura de teñir selectivamente las NORs , en comparación con otras técnicas tales como: Nitrato de plata y solución amoniacal ( $\text{Ag-As}^*$ ) y Nitrato de plata muy concentrado con un pH de 4.9 y 5.2 a  $37^\circ\text{C}$  ( $\text{Ag-I}^*$ ). Sin embargo, los autores encontraron también problemas de precipitación de la plata en algunos casos; lo cual probablemente se debe a la tinción de proteínas citoplásmicas.

\*Ag-AS y Ag-I fueron designados como nombres para dos variaciones de la misma técnica desarrollada por Goodpasture y Bloom en 1975 y 1976 respectivamente, para la obtención de bandas NOR.

Ag-II es el nombre de la técnica para bandas NOR implementada por Olert *et al* en 1979.

Más recientemente Howell y Black (1980), presentaron un procedimiento que requiere de sólo 2 minutos para revelar las NORs y que resuelve en su mayoría los problemas que producen las otras técnicas (precipitación de plata causada por un rápido revelado, tiempo de impregnación no estandarizado, etc.). Este método requiere del uso de solo dos soluciones : una solución coloidal y una solución de nitrato de plata acuoso, y proporciona buenos resultados al no presentarse problemas como el exceso de precipitación de la plata. Con él se diferencian muy bien las NORs del resto del cromosoma y la tinción se lleva a cabo a través de toda la preparación. Por otro lado ahorra tiempo y dinero. Lo más importante fué que se planteó una técnica que aparentemente resolvía muchos problemas, pero desafortunadamente solo fué un buen avance que no ofreció una solución global.

Otra técnica para observar preparaciones al microscopio electrónico fué utilizada por Daskal *et al* , (1980) para tratar de determinar que proteínas del componente fibrilar en el nucléolo eran las que se impregnaban con plata. Encontraron que las principales causas de dicha impregnación eran las proteínas ácidas C23 y B23.

Clavaguera *et al* , (1983) utilizaron la técnica de Goodpasture y Bloom (1975) con algunas modificaciones para investigar si la tinción de las NORs es exclusiva de proteínas, reportando grandes alteraciones morfológicas de los cromosomas debidas posiblemente a la técnica.

Lomholt y Toft (1987) señalaron que las múltiples modificaciones a la técnica de plata en solución amoniacal realizadas por Howell *et al* ,(1975), Bloom y Goodpasture (1976), Lau *et al* , (1978) y Howell y Black (1978), indicaban solo intentos por controlar las alteraciones del pH debidas a la evaporación del amonio Y para analizar tales alteraciones Lomholt y Toft (1987), hicieron varios experimentos sustituyendo el amonio por sustancias no volátiles, como son: etanolamina y etanolamonio; además emplearon varios pH.

A pesar de lo anterior, los mecanismos de la tinción con plata de las NORs son pobremente entendidos (Lomholt y Toft, 1987), por lo que en la medida en que se conozcan mejor, surgirán técnicas de tinción más reproducibles y menos problemáticas.

## OBJETIVO.

Analizar experimentalmente los factores (pH, temperatura, concentración del nitrato de plata, tiempo de tinción y envejecimiento de las laminillas) que intervienen en la reproducibilidad y la calidad de la técnica para bandas NOR de cromosomas de linfocitos humanos cultivados.

## METODOLOGIA.

## I. CULTIVO DE LINFOCITOS HUMANOS.

Se obtuvo un mínimo de 10 muestras de sangre (3 ml c/u), las cuales se extrajeron con jeringas heparinizadas y en condiciones estériles. Se hicieron cultivos de sangre de acuerdo a la técnica de Araçaki y Sparkes (1963) modificada por León Cázares :

1.- En tubos de ensaye marca Pyrex No. 9800 se virtió 1 mL de medio MacCoy 5A modificado (Sigma), 0.05 mL de fitohemaglutinina (Microlab), 1 gota de antibiótico (Penicilina 5000 u/mL-Estreptomicina 5 mg/mL, preparado en NaCl al 0.9%) y 8 gotas de sangre heparinizada. Se incubaron a 37 °C por 72 h con una inclinación de aproximadamente 20°.

2.- Una vez transcurrido dicho tiempo, se agregaron 3 gotas de colchicina (Sigma) a una concentración de 4 µg/mL y se volvieron a incubar por 1 h a 37°C.

3.- Posteriormente se centrifugó (en centrífuga clínica IEC MODELO HN-SII/MANUAL # IM-201) por 8 min. a 1000 rpm y el sobrenadante que quedó se extrajo con pipetas Pasteur y se eliminó hasta dejar 1mL de muestra, a la cual se le agregaron 5mL de una solución de KCl 0.075 M a 37°C resuspendiéndose el botón celular y reincubándose a 37°C durante 15 min.

4).-Enseguida se volvió a centrifugar a 1000 rpm por 8 min para luego desechar el sobrenadante y agregar 5 mL de fijador (ác. acético-metanol 1:3 ), resuspendiendo con este el botón celular y manteniéndolo por 15 min a temperatura ambiente. Posteriormente

se centrifugó por un período de 8 min a 1000 rpm para luego obtener un botón celular blanquecino después de 2 o 3 lavados con fijador. Finalmente, se desechó el sobrenadante y con el paquete celular se hicieron preparaciones mediante la técnica de goteo y secado a la flama.

Todas las preparaciones se etiquetaron con el propósito de llevar un control de las mismas.

## II. BANDAS NOR.

Posteriormente se hizo la tinción de las bandas NOR según la técnica de Bloom y Goodpasture (1976) modificada :

SOLUCION-A: Consiste de 2 g de  $\text{AgNO}_3$  diluidos en 2 mL de agua desionizada.

SOLUCIONO B: La formalina se preparó al 3.5% v/v diluyendo 3.5 mL de formol (37 wt. % solución en agua) en 96.5 mL de agua bidestilada y se ajusto a pH 2.6 con ácido fórmico.

SOLUCION-C: De la solución-A se tomó 1 mL y se mezcló con 0.20 mL de la solución-B. Con esta solución de trabajo se cubrieron las preparaciones y se incubaron a  $60^\circ\text{C}$  durante 15 min lavándose posteriormente con agua destilada.

LOS PARAMETROS A PROBAR FUERON LOS SIGUIENTES :

TEMPERATURA :  $37^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ ,  $50^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ ,  $60^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ ,

CONCENTRACION DE NITRATO DE PLATA :

Concentración al 5.9 M (50% p/v) : Como se indica arriba.

Concentración al 2.95 M (25% p/v): 1gr de  $\text{AgNO}_3$  en 2 mL de agua desionizada.

Concentración al 1.5 M (12.5% p/v): 0.5 g de  $\text{AgNO}_3$  en 2 mL de agua desionizada.

pH : 2.65 , 3.5 , 11.7 (todos obtenidos a temperatura ambiente).

\* El pH 2.65 se eligió de la técnica que se realiza en el laboratorio de genética, el de 3.5 de Howell y Black (1980), y el de 11.7 de Lomholt y Toft (1987).

ENVEJECIMIENTO DE LA PREPARACION :

a) Recién preparadas. b) 1 día. c) 3 días. d) 6 días. e) 1 mes.

TIEMPO DE INCUBACION CON PLATA: Este se estimó de acuerdo con el color de la preparación, mismo que varió desde dorado-pálido hasta dorado intenso.

ANALISIS MICROSCOPICO : Se revisaron un mínimo de 12 metafases para cada una de las laminillas. La forma de clasificar las impregnaciones fué según su calidad :

- 1) Bandas NOR de buena calidad.
- 2) Bandas NOR de calidad media a mala calidad.
- 3) Sin bandas NOR.

Finalmente, se hizo el registro de datos, que consistió en determinar el porcentaje de mitosis con óptimas bandas NOR para cada tratamiento y se tomaron fotografías de las metafases más representativas que se encontraron. Se utilizó un microscopio compuesto Mikron para buscar las mitosis, y las microfotografías se tomaron con un microscopio American Optical 110 equipado con una cámara fotográfica y un exposímetro automático. Para las transparencias se emplearon rollos Ektachrome y para las impresiones fotográficas se utilizaron rollos Kodacolor, ambos marca Kodak.

## RESULTADOS

Se revisó un total de 283 metafases para todos los tratamientos. Del total de variaciones de la técnica original que se planteó en la metodología, se presentan resultados cuantitativos y cualitativos solamente para 6 tratamientos ya que en el resto de las pruebas no se presentaron bandas o no se pudieron determinar debido a la mala calidad de la impregnación.

A continuación se presenta una descripción de los resultados observados en cada tratamiento, los cuales se resumen en las tablas I y II.

TRATAMIENTO 1 ( $pH = 2.65$ ,  $T = 58-62^{\circ}C$ ,  $[AgNO_3] = 5.9 M$ ).

Con este tratamiento se encontró un alto grado de precipitado del nitrato de plata en la mayoría de las preparaciones y además se presentaron problemas de desnaturalización y sobreimpregnación de los cromosomas. Debido a esto la apreciación de las NORs disminuyó grandemente (Fig. 2a, tabla I). En menor proporción se observaron mitosis con buenas bandas NOR y sin precipitado (Fig. 2b).

TRATAMIENTO 2 ( $pH = 2.65$ ,  $T = 58-60^{\circ}C$ ,  $[AgNO_3] = 2.95 M$ ).

Para este caso se apreciaron bandas de mediana calidad y, de manera escasa de buena calidad. Las laminillas tratadas con este método presentan problemas de precipitado, desnaturalización y sobreimpregnación al igual que en la Fig. 2a. Este último problema se determina por la coloración (café-oscuro) que toman los cromosomas y que llega a enmascarar las bandas NOR (Tabla I).

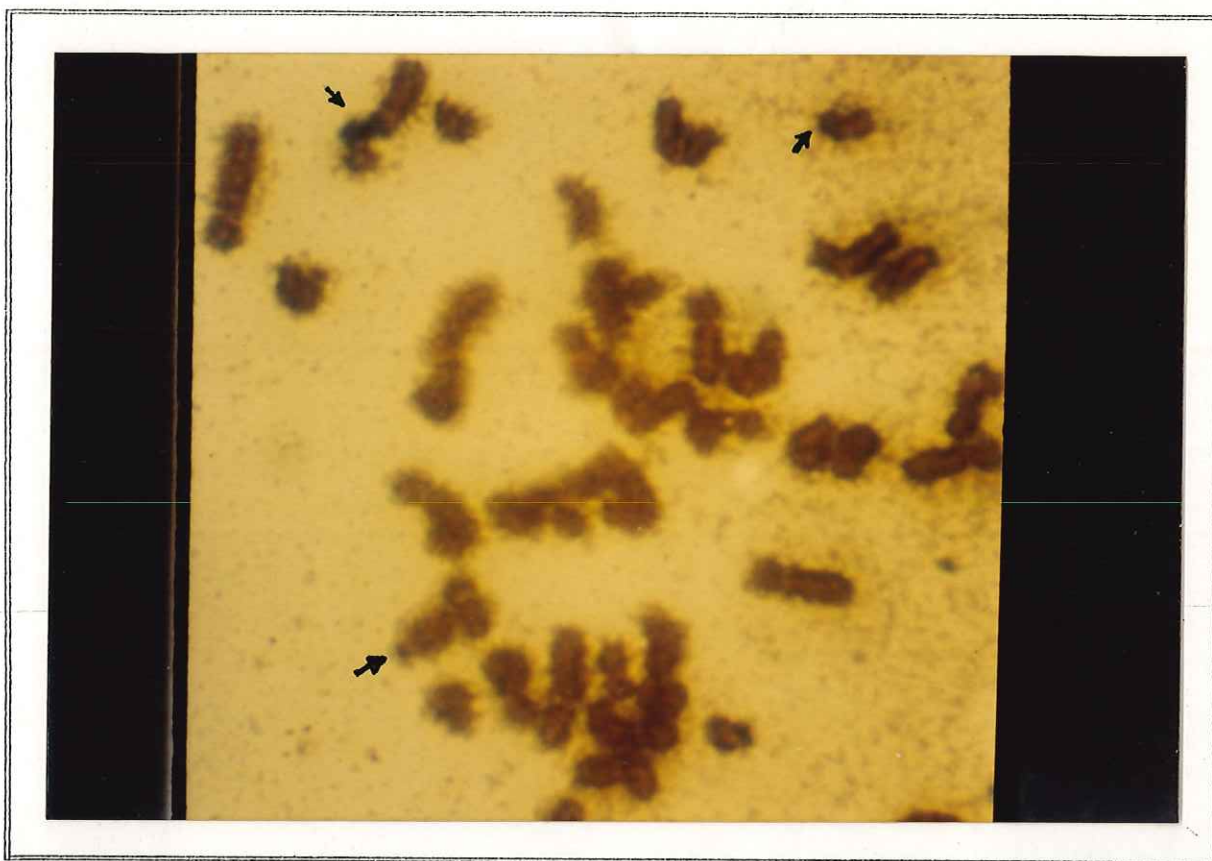


Fig. 2a. - Se muestran cromosomas desnaturalizados pero se alcanzan a distinguir las bandas NOR (↑).

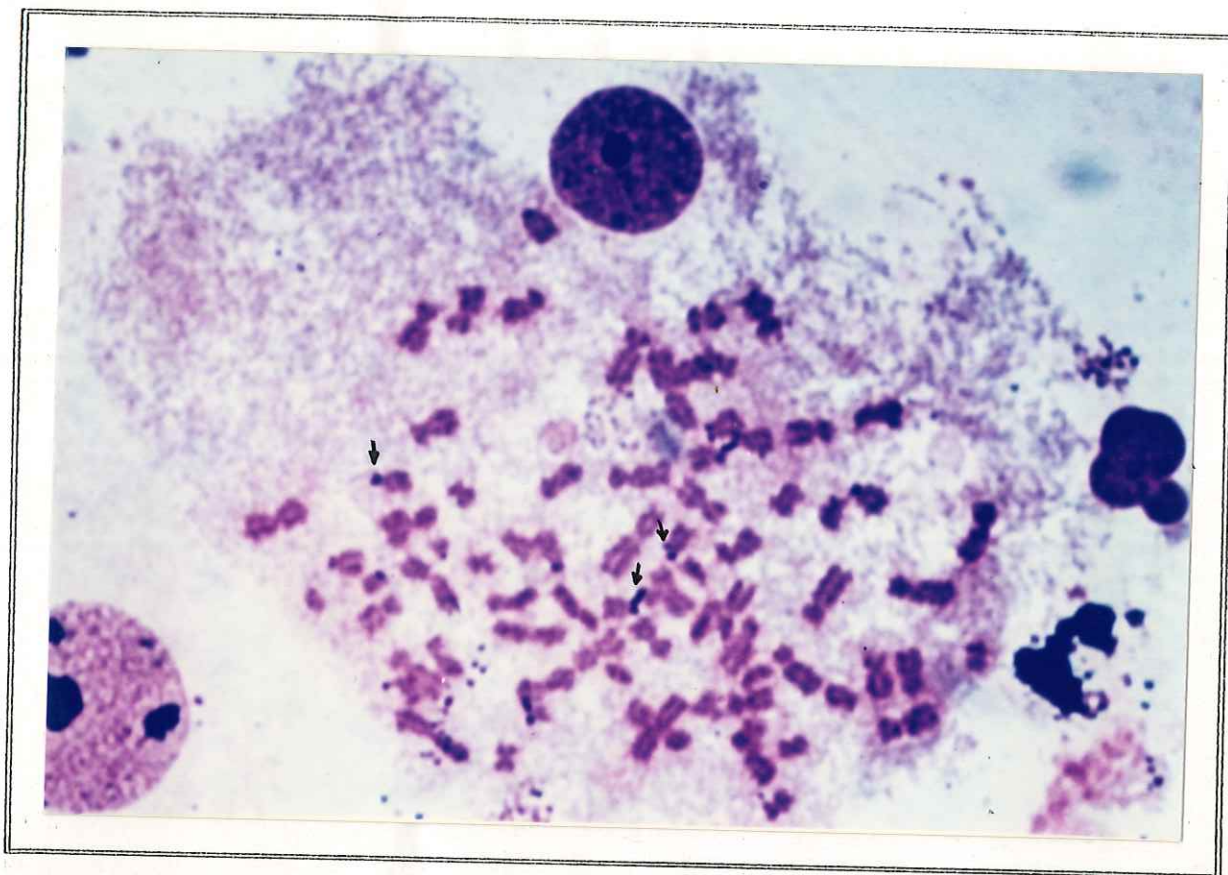


Figura 2b. - Aquí se presentan dos metafases juntas. Una de ellas tiene mucho precipitado de plata y la otra lo tiene en menor cantidad, de tal forma que se observan bien las banda NOR.

TRATAMIENTO 3 ( $pH = 2.65$ ,  $T = 50^{\circ}C$ ,  $[AgNO_3] = 2.95 M$ ).

A pesar de que con este tratamiento se obtuvo una gran cantidad de metafases con bandas de buena calidad, en ocasiones disminuyó ésta, debido a la gran cantidad de precipitado de plata y de otras partículas. Además, también hay problemas de sobreimpregnación. La desnaturalización fué mínima con dicho tratamiento (Tabla I).

TRATAMIENTO 4 ( $pH = 2.65$ ,  $T = 37^{\circ}C$ ,  $[AgNO_3] = 2.95 M$ ).

Con este tratamiento se obtuvo una mayor cantidad de mitosis con bandas de mejor calidad, que con el anterior. También se encontró que la cantidad de precipitado del nitrato de plata disminuyó un poco permitiendo una mejor observación de las metafases presentes. Además, la proporción de cromosomas desnaturalizados disminuyó considerablemente. En cuanto a la coloración de la impregnación, se presentó de buena intensidad (Camarillo-dorado) para la mayoría de las metafases observadas (Tabla I, Fig. 3).

TRATAMIENTO 5 ( $pH = 2.65$ ,  $T = 50^{\circ}C$ ,  $[AgNO_3] = 1.5 M$ ).

Con esta variación del método, la región organizadora del nucléolo se evidencia muy bien en la mayoría de las metafases, es decir, se logran bandas de buena calidad. Pero no se logra una buena impregnación de las cromátidas, las cuales quedan muy claras y en ocasiones no se ven. Esto se solucionó aplicando adicionalmente una tinción con Giemsa pH 7 para contrastar el

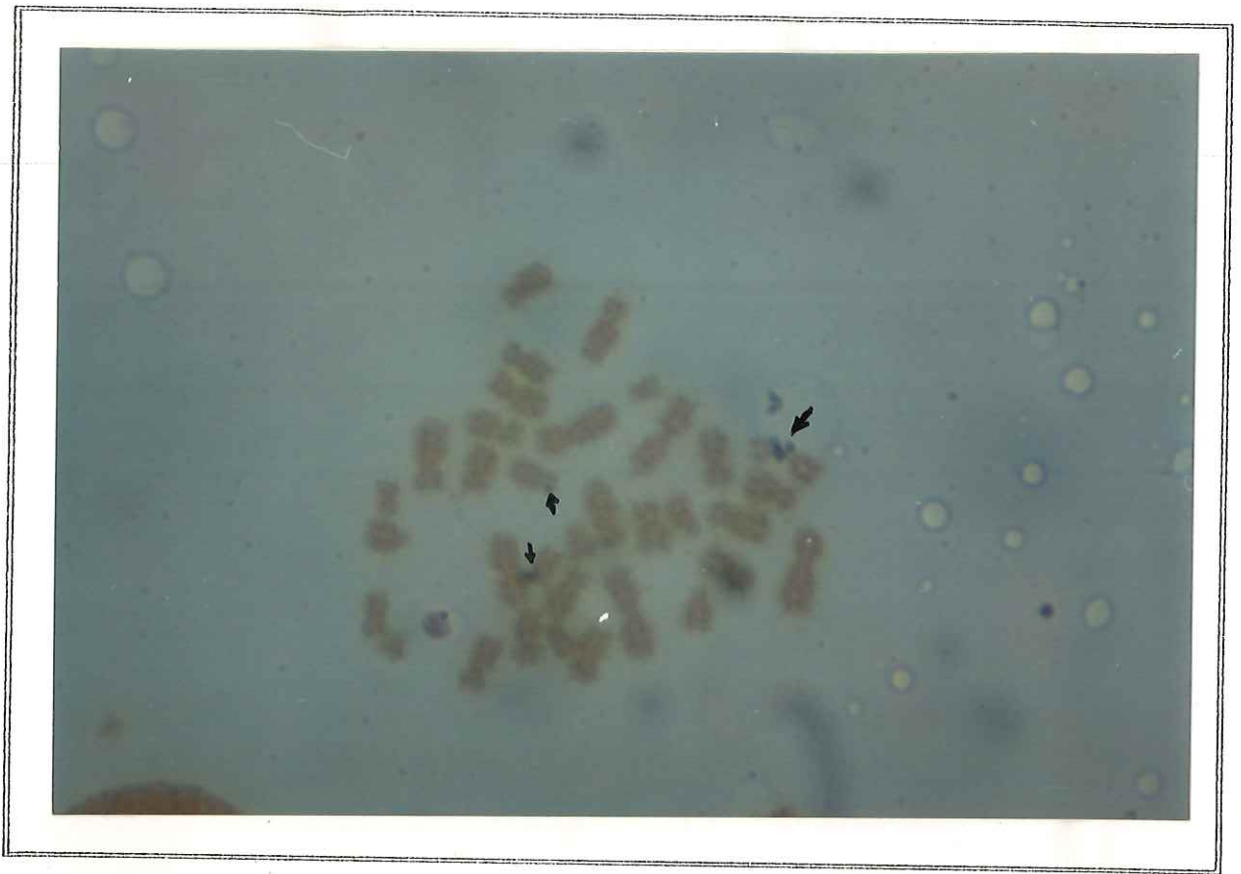


Fig. 3. - Metafase con bandas NOR de buena calidad con crómatidas de color dorado pálido, ésta célula no requirió de tinción adicional con Giemsa (↑).

resto del cromosoma.

Por otro lado, el precipitado se redujo bastante y el que se presentó es más fino que el encontrado con otros tratamientos. No hay desnaturalización de cromosomas (Tabla I, Fig. 4).

TRATAMIENTO 6 ( $pH = 2.65$ ,  $T = 37^{\circ}C$ ,  $[AgNO_3] = 1.5 M$ ).

Por medio de este tratamiento no se obtuvieron bandas NOR y los cromosomas quedaron de un color muy claro. Las únicas ventajas que se observaron son que no hay precipitado y que no hay desnaturalización ni sobreimpregnación (Tabla I).

TRATAMIENTO 7 ( $pH = 2.65$ ,  $T = 60^{\circ}C$ ,  $[AgNO_3] = 1.5 M$ ).

En este caso el principal problema fue el alto grado de desnaturalización de los cromosomas y la cantidad de precipitado, además de que la calidad de las bandas se presentó de mediana a mala calidad (vease Fig. 2).

Para el resto de los tratamientos (8-15) no se enlistan resultados cuantitativos ya que se presentaron problemas de abundante precipitación al momento de ajustar las soluciones a los pH planeados. Además, las pruebas realizadas con dichas soluciones, proporcionaron bandas de muy mala calidad como se observa en la tabla-II. En base a lo anterior se optó por no preparar un gran número de laminillas para cada uno de los tratamientos y así ahorrar material y tiempo, y solo se trabajaron las primeras preparaciones.



Fig. 4. - Se muestra una metafase con bandas NOR de buena calidad con escaso precipitado de nitrato de plata.

TIPO DE TRATAMIENTO	CALIDAD DE LAS BANDAS EN %			TIEMPO PROMEDIO DE INCU- BACION. MIN.	INTENSIDAD DE LA IM- PREGNACION. (a)	CANTIDAD PRECIPI- TADO. (b)	DESNATURA- LIZACION. (c)
	BUENA	MALA	SIN BANDAS				
I	32.0	32.0	36.0	8.5	XX	XXX	VARIO
II	30.8	53.8	14.4	8.2	XXX	XXX	XX
III	41.0	33.3	25.3	7.7	XXXX	XXX	XX
IV	42.5	41.1	16.4	13.70	XX	X	0
V	50.0	22.9	27.1	11.30	X	X	0
VI	16.25	18.75	75.0	16.70	0	0	0

TABLA-I.- RESULTADOS DE LOS PRIMEROS 6 TRATAMIENTOS.

(a)

0= no hubo impregnacion  
X= impreg. muy debil  
XX= buena impregnacion  
XXX= sobre impregnacion  
XXXX= vario

(b)

0= no hay precipitado  
X= escaso precipitado  
XX=mediana cant. de precipitado.  
XXX=abundante precipitado

(c)

0= no hubo desnt.  
X= poco desnt.  
XX= muy desnt.  
XXXX= vario

TRATAMIENTO	PRESENCIA DE BANDAS NORs.	INTENSIDAD DE LA IMPREGNACION. (A)	CANTIDAD DE PRECIPITADO (b)	DESNATURALIZACION. (c)
VII	si/ mala cal.	X	XX	XX
VIII	NO	X	XX	O
IX	NO	X	XXX	O
X	NO	XX	XXX	O
XI	NO	X	O	O
XII	si/med. cal.	X	XX	O
XIII	si/med. cal.	O - X	X	O
XIV	NO	O	XXX	O
XV	NO	O	XXX	O

TABLA-II. RESULTADOS CUALITATIVOS DE LOS ULTIMOS 9 TRATAMIENTOS.

(a)

O= No hubo impregnacion  
X= Impreg. muy debil  
XX= Buena Impregnacion  
XXX= Sobre impregnacion

(b)

O= No hay precipitado  
X= Escaso precipitado  
XX= Mediana cantidad de precipitado.  
XXX= Abundante Precipitado.

(c)

O= No hubo desnt.  
X = Poco desnt.  
XX= Muy desnt.

## DISCUSIONES.

Todos los rangos que se implementaron para los parámetros utilizados en este trabajo, se fundamentaron en la bibliografía existente hasta la fecha, y la variación que se hizo de cada uno de ellos fué con el fin de encontrar bajo que condiciones se obtenían los mejores resultados. Mismas que a continuación se discuten para cada tratamiento.

El tratamiento número uno es similar al utilizado por Goodpasture y Bloom en 1975, con la diferencia de que no se usó nitrato de plata amoniacal; pero en ambos casos se observó la presencia de grandes cantidades de precipitado de plata y un alto grado de desnaturalización de los cromosomas lo cual no permite una buena observación de las metafases. En cambio, Howell y Black (1980) y Lomholt y Toft (1987) no detectaron este problema ya que usaron menor cantidad del nitrato de plata (2.95 M, Howell y Black; 1980) o menor temperatura de incubación (21°C, Lomholt y Toft; 1987), lo cual difiere de lo utilizado en este trabajo de tesis y también difiere de lo aplicado por Goodpasture y Bloom (1975).

Lo anterior sugiere, que el combinar diversas temperaturas y concentraciones de  $\text{AgNO}_3$ , puede proporcionar metafases más limpias o con menos precipitado.

Por otro lado, el tratamiento 2 es parecido al aplicado por Howell y Black en 1980, con la diferencia de que ellos utilizaron adicionalmente una solución coloidal y una temperatura de 70°C. En nuestro caso, se presenta de nuevo el precipitado y la

sobreimpregnación de los cromosomas (presentan un color café-oscuro) de tal manera que quedan enmascaradas las bandas NOR. Quizás esto se deba al tiempo de incubación que se les dió, pues como se observa en la tabla-I, este fué de 8.2 minutos en promedio, contra 2 minutos que fué el tiempo utilizado por los investigadores arriba mencionados.

Comparando con los trabajos de Goodpasture y Bloom (1975), ellos manejaron tiempos cercanos al aquí utilizado (10 minutos) para concentraciones al 5.9 M de  $\text{AgNO}_3$ , encontrándose también con el problema de la sobreimpregnación de plata. En cambio Lomholt y Toft (1987) mencionan que para reducir este problema es recomendable manejar tiempos cortos con temperaturas altas y tiempos largos con temperaturas bajas (1 min. para  $57-60^\circ\text{C}$  y 1-2h para  $21^\circ\text{C}$ , respectivamente).

Con respecto al análisis del tratamiento número 3, se observa que proporciona un buen porcentaje de mitosis con bandas de buena calidad (41%, TABLA-1). Pero sigue presentándose el precipitado y la sobreimpregnación, encontrándose hasta un 33.3% de mitosis con mala calidad debido a estos problemas.

El tiempo de incubación aquí utilizado es mayor al que mencionan algunos autores en sus reportes (Howell y Black, 1980) el cual varía de 1 a 2 min. pero menor que el de otros (Bloom y Goodpasture 1975; 1976; Lomholt y Toft, 1987) que es de 10 min y hasta de 1 h. En cuanto a este parámetro, cabe mencionar que el tiempo de incubación para todos los casos siempre dependió de la rapidez con que se realizó la impregnación, es decir, en el

momento en que se veía que la preparación tomaba un color café dorado se retiraba de la estufa y se detenía el reloj. En cuanto a los parámetros pH y concentración, son similares a los señalados por Howell y Black (1980) pero mayores a los que experimentaron Lomholt y Toft en 1987.

La temperatura utilizada, la cual influye mucho en la velocidad de reacción (Lomholt y Toft, 1987), está en el rango que utilizaron Bloom y Goodpasture en su técnica modificada de 1976, la cual es de 50°C.

Los problemas presentes en este tratamiento (precipitado y sobreimpregnación) tal vez se deben a dos factores: Primero, el exceso de precipitado puede provenir de la impregnación de residuos de proteínas distintas a las de las NORs y de residuos de ADN (Clavaguera *et al*, 1983), los cuales aumentan posiblemente, su afinidad por la solución de nitrato de plata a esta temperatura (50°C). Segundo, la otra posible explicación es que quizás la sobreimpregnación se debió a la propiedad de la temperatura de acelerar las reacciones y con ello provocó una excesiva impregnación del nitrato de plata.

En el experimento cuatro, que proporcionó buenos resultados en cuanto a cantidad de metafases con buenas bandas, se empleó un pH ácido (2.65) que fué recomendado por Lomholt y Toft en 1987 y cercano al de Howell y Black (3.65 en 1980). Sin embargo, la temperatura utilizada en este tratamiento (que es de 37°C) es muy distinta a la que han usado Lomholt y Toft (1987), Bloom y Goodpasture (1975) y Howell y Black (1980), que es de 21, 60 y

70°C respectivamente, además de que la bibliografía no indica que dicha temperatura se hubiera practicado en alguna otra investigación.

Con estos parámetros, en nuestro trabajo se redujo considerablemente la cantidad de precipitado pudiéndose lograr preparaciones casi limpias, mientras que con el tratamiento de Goodpasture y Bloom (1976) el precipitado fué alto; tal acontecimiento lo detectaron Lomholt y Toft (1987) lo cual los llevó a disminuir la temperatura. Lo anterior comprueba nuestra hipótesis en el tratamiento tres, acerca de que la temperatura actúa como acelerador de las reacciones que llevan a la impregnación.

Por otra parte, en el tratamiento 4 se empleó el 25% p/v (2.95 M) de nitrato de plata al igual que Howell y Black (1980), mientras que Bloom y Goodpasture (1976) utilizaron el 50% p/v (5.9 M), lo anterior nos representa un ahorro significativo.

Con los parámetros particulares del tratamiento 4, se obtuvo buena calidad de bandas en un tiempo promedio de 13.5 min. (vease tabla-I), el rango de tiempo fué de 10-15 min. En tanto que Bloom y Goodpasture (1976) requieren de 10 min ó de 2-5 h incluso llegaron a utilizar hasta 18 h; por su lado Howell y Black (1980) ocuparon de solo 2 min y Lomholt y Toft de 1.5 - 2 h.

Pasando al tratamiento 5, podemos observar que presenta el mayor porcentaje de metafases con bandas NORs de buena calidad (vease tabla-I). Los resultados obtenidos en esta ocasión son similares a los del tratamiento anterior con la diferencia de que

se logra eliminar, casi en su totalidad, la sobreimpregnación y desnaturalización de los cromosomas, y además se reduce en gran medida el precipitado del nitrato de plata.

Pero lo que es más importante es que se reduce la cantidad de nitrato de plata al 12.5% p/v. Por otro lado se puede observar que los parámetros de temperatura y concentración son menores que los de Howell y Black (1980) y mayores que los de Lomholt y Toft (1987), sin embargo, los resultados son de buena calidad al igual que los reportados por ambos trabajos. Con respecto al tiempo de incubación, con este tratamiento se requiere de tan solo 11 min en promedio. Para este tratamiento en particular se requirió de aplicar la técnica de tinción con Giemsa a pH 7.0 para contrastar el resto del cromosoma con la región organizadora del nucléolo, ya que en ocasiones tan solo se lograba observar las bandas de las NORs sin saber a que cromosoma pertenecían.

Con el tratamiento 6, no se obtuvieron bandas NOR y el resto del cromosoma quedó de un color muy claro, no lográndose distinguir en muchas ocasiones. Las únicas ventajas que se observaron fueron las de no encontrar precipitado ni desnaturalización o sobreimpregnación de los cromosomas. Estos resultados posiblemente se deben a la combinación de una temperatura baja con una concentración baja del nitrato de plata. Lo anterior se fundamenta en la bibliografía consultada y en los resultados de los tratamientos antes analizados en este mismo trabajo, (vease tabla-I).

En el caso del tratamiento 7, el principal problema, como se

comenta en los resultados, fué el alto grado de desnaturalización y la cantidad de precipitado, además de que la calidad de las bandas que se presentó fué de mediana a mala. Lo anterior se le puede adjudicar a la temperatura tan alta que se aplicó.

Para el resto de los tratamientos planeados no se tienen resultados favorables de impregnación pues se tuvieron problemas en la preparación de las soluciones del nitrato de plata. Los problemas observados son los siguientes: al momento de ajustar el pH a las distintas concentraciones requeridas para los tratamientos marcados del 8 al 15 (vease metodología), se presentó un alto grado de precipitación de la plata, de tal manera que al momento de querer observar en el microscopio las preparaciones obtenidas, se tenían grandes problemas porque se enmascaraban prácticamente todas las células. Se optó por filtrar las soluciones pero se encontró que disminuía grandemente el volumen de dicha solución y por otro lado no se obtenían buenas impregnaciones a esos pH usados (3.5 y 11.7). Por lo anterior se eligió no continuar con dichos ensayos con el fin de ahorrar tiempo y reactivos.

En este trabajo aunque no era un objetivo el revisar si de la calidad del reactivo dependía la calidad de la tinción, se pensó que ese aspecto sería importante que se explorara. Y lo que se encontró es que de las 4 marcas probadas (Sigma, Reasol, Mallinckrodt y GFS Chemicals) la que mejores resultados proporcionó fué Sigma y en segundo lugar Mallinckrodt. Esto coincide con los resultados de Likovsky y Smetana (1981) quienes

trabajaron nucléolos de células de ratas mediante tinciones de plata, detectando que la calidad de sus resultados dependía principalmente de la calidad del nitrato de plata y del formaldehído.

## CONCLUSIONES.

- 1.- Para obtener bandas NOR de buena calidad; con usar concentraciones al 25% p/v (2.95 M) o 12.5% p/v (1.5 M) es suficiente.
  
- 2.- Un pH ácido de 2.65 es adecuado para obtener buenas bandas NOR, siempre y cuando se combine con los parámetros establecidos en los tratamientos 4 y 5 de éste trabajo, que consisten en :  
Tratamiento #4: pH= 2.65, T= 37°C, [AgNO<sub>3</sub>]= 2.95 M (25% p/v).  
Tratamiento #5: pH= 2.65, T= 50°C, [AgNO<sub>3</sub>]= 1.5 M (12.5% p/v).
  
- 3.- Una concentración óptima de nitrato de plata y un pH adecuado, no son los únicos elementos para la obtención de buenas bandas NOR. Se requiere conocer también qué temperatura es la mejor para realizar la impregnación sin que haya problemas secundarios (sobreimpregnación, desnaturalización, etc. ).  
En este trabajo se encontró que una temperatura de 50°C es suficiente y no provoca los problemas secundarios arriba mencionados, produciendo bandas de buena calidad.
  
- 4.- El tiempo de exposición a la temperatura de 50°C debe de ser de 11.30 min (en promedio) para que la tinción de las bandas NOR se realice y no haya problemas de exceso de precipitado, débil impregnación o desnaturalización de los cromosomas.

5.- Acerca del envejecimiento de las preparaciones, los mejores resultados se produjeron en las recién elaboradas.

6.- La calidad de los reactivos y la vigencia de los mismos es de suma importancia para obtener buenas bandas NORs.

En este trabajo se probaron 4 marcas distintas para el  $\text{AgNO}_3$ : REASOL, Mallinckrodt, GFS CHEMICALS y SIGMA. Siendo SIGMA y Mallinckrodt la que mejores resultados proporcionaron.

## RECOMENDACIONES.

- 1.- Manejar siempre con cuidado el Nitrato de Plata, ya que es un oxidante muy fuerte y puede causar severas quemaduras, además es venenoso y corrosivo.
- 2.- Con respecto a los reactivos utilizados en la técnica, se debe procurar usar siempre los de mejor calidad, especialmente el Nitrato de Plata. Para determinar dicha calidad, es necesario consultar el grado de impurezas que viene señalado en la etiqueta de cada frasco (usar los reactivos menos impuros).
- 3.- Es necesario disolver perfectamente el Nitrato de Plata en el agua desionizada y después filtrar con un dispositivo de poro pequeño,  $0.25 \mu\text{m}$ , para que no queden cristales que puedan perturbar posteriormente el análisis microscópico.
- 4.- De las 4 marcas de  $\text{AgNO}_3$  utilizadas (Reasol, Mallinckrodt, GFS Chemicals y Sigma), las de mejor resultado fueron Sigma y Mallinckrodt, debido a que presentan una mayor fineza de grano que las otras, sobre las preparaciones se puede decir además que son bastante estables, pues no precipitaron tan rápido como las otras a temperatura ambiente.
- 5.- Los datos referidos como recomendables, por ejemplo el tiempo y la temperatura deben de considerarse como promedios; por lo que cuando se practique la técnica de bandas NOR deberá vigilarse y esperar resultados en torno a dichos promedios.

## BIBLIOGRAFIA.

- Arakaki, D. T. y Sparkes, R. S. (1963). Microtechnique for culturing leukocytes from whole blood. *Cytogenetics* 2:57-60.
- Babu, K. y Verma, R. (1985). Structural and Function Aspects of Nucleolar Organizer Regions (NORs) of Human Chromosomes. *International Review of Cytology*, vol. 94:151-171.
- Black M. M. y Ansley, H. R. (1964). Histone staining with Amoniacal Silver. *Science* 143:693-695.
- Bloom S. E. y Buss, E. G. (1969). Ammoniacal Silver Staining of Embryonic chicken cells and chromosomes. *Poultry Science* 48, 114-116.
- Bloom, S. E. y Goodpasture, C. (1976). An Improved Technique Selective Silver Staining of Nucleolar Organizer Regions in Human Chromosomes. *Human. Genetic.* 34, 199-206.
- Bojorquez, R., G. (1990). Determinación de las variantes de los cromosomas acrocéntricos y frecuencias de aparición en una población humana normal. Tesis de Biólogo, Facultad de Ciencias, U.A.B.C. Ensenada, B.C.
- Clavaguera, A., Querol, E., Colls, D., Genesca, J. y Egozcue, J. (1983). Cytochemical Studies on the Nature of NOR Silver Stainability. *Cell Mol. Biol.* 29, 255-259.
- Clavaguera, A., Querol, E., Coll, D. y Egozcue, J. (1984). Is Silver Stainability of Nucleolar Organizer Regions Exclusively Attributable to proteins?. *Cell and Mol. Biol.* 30 175-177.
- Daskal, Y., Smetana, K. y Busch, H. (1980). Evidence from studies on segregated Nucleoli that nuclear silver staining. Protein C23 and B23 are in the fibrillar component. *Exp. Cell Res.* 127:285-291.

- Denton, T.; Howell, W. y Barret, J. (1975). Human nucleolar organizer chromosomes: satellite associations. *Chromosoma* 55:81-84.
- Faust, y Vogel, (1974). Are 'N-bands' selective staining of especific heterochromatin?. *Nature* :352-353.
- Funaki, K., Matsui, S. y Sasaki, M. (1975). Location of Nucleolar Organizer in Animal and Plant Chromosomes by Means of and improved N-banding technique *chromosoma (Berlin)*49:357-370.
- Goodpasture, C. y Bloom, S.E. (1975). Visualization of Nucleolar Organizer Regions in Mammalian Using Silver Staining *Chromosoma*. 53:37-50.
- Hienz, H.A. (1975). *Cromosomas*. Ed. Alambra, Madrid, España, 571p.
- Howell, W.M., Denton, T.E. y Diamond, J.R. (1975). Differential staining of the satellite regions of human acrocentric chromosomes. *Experientia (Basel)* 31, 260-262.
- Howell, W. M. (1977). Visualization of Ribosomal Gene Activity: Silver Stainins Proteins Associated whit rRNA transcribed from Oocyte Chromosomes. *Chromosoma (Berlin)*62:361-367.
- Howell, W.M. y Black, D.A., (1978). A rapid technique for producing silver-stained nucleolus organizer region and trypsin-Giemsa bands on human chromosomes. *Human Genet.* 43: 53-56.
- Howell W. M. y Black D. A. (1980). Controlled Silver-Staining of Nucleolus Organizer Regions with a Protective colloidal developer: a 1-step method. *Experientia* 336:1014-1015.
- Lau, Y.F., Pfeiffer, R.A., Arrighi, F.E. y Hsu, T.C. (1978). Combination of silver and fluorescent staining for metafase chromosomes. *Am. J. Hum. Genet.* 30:76-79.

Lombolt B. y Toft J. (1987). "The Effect of pH on silver Staining of Nucleolus Organizer Regions". *Stain Technology* Vol. 62, No. 2: 101-105.

Mamaev, N. N y Mamaeva, S. E. (1990). Nucleolar Organizer Region Activity in Human Chromosomes and Interphase Nuclei of Normal, Leukemic and Tumor Cells as Evaluated by Silver Staining. *International Review of Cytology*, 121:233-266.

Matsui, S. and Sasaki, M. (1973). Differential Staining of Nucleolos Organizers in mammalian chromosomes. *Nature (Lond.)* 245, 148-150.

Marinesco G. (1905). *J. Psychology Neurology* 5:151.

Michotte A. (1904). *Nevraxe* 6:235.

Olert, J., Sawatzki, G. Kling, H. and Gebauer, J. (1979). Cytological and Histochemical Studies on the Mechanism of the selective silver staining of Nucleolus Organizer Regions (NORs). *Histochemistry* 60:91-99.

Ploton D., Bobichon H. and Adnet J. J. (1983). Ultrastructural Localization of Ag-Nor Proteins and Nucleic Acids in Reticulated Nucleoli. *Biol. Cell* 49: 29-34.

Ploton, D.; Menager, M. y Adnet, J.J. (1984). Simultaneous high resolution localization of Ag-NOR proteins and nucleoproteins in interphasic and mitotic nuclei. *Histochemical Journal* 16: 897-906.

Scheer, H., Hugle, B., Hazan, R. y Rose, K. M. (1984). *J. Cell Biol.* 99:672.

Schwarzacher H. G., Mikelsaar A. V. and Shnedl W. (1978). The Nature of the Ag-Staining of nucleolus organizer regions. *Cytogenet. Cell Genet.* 20:24-39.

Stansfield, W. D. (1983). GENETICA (segunda edición). Serie  
SCHAUM, Ed. McGraw Hill. México D.F.