MARIA ISABEL DA SILVA NOGUEIRA BASTOS MALHEIRO

ULTRAESTRUTURA DAS ASSOCIAÇÕES DE SATÉLITES DOS CROMOSSOMAS ACROCÊNTRICOS HUMANOS

PORTO
1989

MARIA ISABEL DA SILVA NOGUEIRA BASTOS MALHEIRO

ULTRAESTRUTURA DAS ASSOCIAÇÕES DE SATÉLITES DOS CROMOSSOMAS ACROCÊNTRICOS HUMANOS

PORTO
1989

MARIA ISABEL DA SILVA NOGUEIRA BASTOS MALHEIRO

ULTRAESTRUTURA DAS ASSOCIAÇÕES DE SATÉLITES DOS CROMOSSOMAS ACROCÊNTRICOS HUMANOS

Dissertação de candidatura ao grau de Doutor em Ciências Biomédicas, especialidade de Genética (Disciplina de Genética Humana), apresentada ao Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto

PORTO
1989

Orientador de Tese:

Prof. Doutor AMÂNDIO SAMPAIO TAVARES

Co-Orientador de Tese:

Prof. Doutor VICENTE GOYANES VILLAESCUSA

De acordo com nº 2 do Artigo 8º do Decreto-Lei nº 388/70 utilizaram-se para esta tese resultados do trabalho:

M,I,Malheiro; M,B,Vasconcelos; V,J,Goyanes
MORPHOMETRIC ANALYSIS OF HUMAN CHROMOSOME SATELLITES AND NORs ASYMMETRIES BY TRANSMISSION ELECTRON MICROSCOPY
"CYTOBIOS"
(Cambridge, Inglaterra)

já aceite para publicação, e dos posters a seguir referidos

M,I,Malheiro; M,B,Porto; T,Mello-Sampayo
SOMATIC ASSOCIATION OF CHROMOSSOMES OF D AND G GROUPS IN F.A.P. DISEASED INDIVIDUALS OF NORTHERN PORTUGAL
VI INTERNATIONAL CONGRESS OF HUMAN GENETICS
(Israel, 1981)

M,I,Malheiro; M,B,Vasconcelos; V,J,Goyanes
SATELLITE ULTRASTRUCTURE IN HUMAN CHROMOSOMES
KEW CHROMOSOME CONFERENCE III
(Londres, 1987)

M,I,Malheiro; M,B,Vasconcelos; V,J,Goyanes
ULTRASTRUCTURE OF SATELLITE ASSOCIATIONS IN HUMAN CHROMOSSOMES
KEW CHROMOSOME CONFERENCE III
(Londres, 1987)

Para o cumprimento do disposto naquele Decreto-Lei, esclarece-se ser da nossa responsabilidade a ordenação da metodologia, a execução das experiências que permitiram a obtenção dos resultados apresentados, a sua interpretação e discussão, bem como a redacção do artigo e elaboração dos posters.

Ao Jorge

e

Rui

Aos meus Pais

AGRADECIMENTOS

Ao Engº Tristão de Mello Sampayo com quem iniciei o estudo das Regiões dos Organizadores Nucleolares ao M.O. em doentes afectados pela P.A.F., pelos seus ensinamentos, pela sua preocupação constante de transmitir os conceitos do rigor e verdade científica, pelo forte estímulo e pela amizade com que sempre me honrou.

Ao Snr. Prof. Dr. Amândio Tavares, mestre pela mão de quem dei os primeiros passos no campo fascinante da Genética Humana, pela orientação séria e cuidadosa deste trabalho, pela revisão crítica do manuscrito, pelos seus comentários inapreciáveis, pelo seu permanente encorajamento, factores sem os quais esta tese nunca teria sido realizada.

Ao Dr. Vicente Goyanes, pela orientação técnica do estudo ultraestrutural, pelas suas preciosas sugestões, pelas grandes facilidades concedidas (primeiro no laboratório do Serviço de Genética Médica do Hospital Juan Canalejo e posteriormente no laboratório do mesmo serviço no Instituto Materno-Infantil Teresa Herrera) e por toda a sua participação entusiástica no trabalho apresentado.

À minha amiga e companheira de trabalho Drª Beatriz Porto e Vasconcelos que efectuou os cálculos estatísticos do manuscrito e a quem tudo o que pudesse dizer não exprimiria a gratidão por quanto lhe devo.

À Drª Laura Sanchez do Colégio Universitário de Lugo pela sua amizade e cooperação nos ensaios com 5-Azocitidina já em curso, que esperamos possam vir a contribuir para alargar o conhecimento sobre o tema desenvolvido.

Ao colega e amigo Dr. Pedro Anselmo Guerra pelo incentivo e pela colaboração que me proporcionaram o tempo indispensável para terminar este empreendimento.

A todos os elementos do Serviço de Genética Médica do Hospital Juan Canalejo que muito colaboraram na execução das técnicas laboratoriais utilizadas neste trabalho.

Aos meus colaboradores técnicos do Laboratório de Citogenética do Instituto Abel Salazar.

Finalmente, a todas as pessoas que, de alguma maneira contribuiram para tornar possível a concretização desta tese:

À Prof. Drª Maria de Lurdes Maciel, ao Prof. Dr. Arala Chaves, ao Prof. Dr. Carlos Azevedo, à Prof. Drª Leonor Teles Grilo, ao Prof. Dr. Kijjoa e, muito especialmente, ao meu saudoso amigo Prof. Dr. Joaquim Polónia pelo apoio moral que me dispensaram sempre que dele necessitei.

À minha Mãe pela disponibilidade de tempo que conseguiu dar-me graças à sua ajuda, apoio e compreensão.

Ao meu marido pela sua paciência e espirito infatigável de colaboração.

* * *

Je comprends le sens de l'humilité. Elle n'est pas dénigrement de soi. Elle est le principe même de l'action. Si, dans l'intention de m'absoudre, j'excuse mes malheurs par la fatalité, je me soumets à la fatalité. Si je les excuse par la trahison, je me soumets à la trahison. Mais si je prends ma faute en charge, je revendique mon pouvoir d'homme. Je puis agir sur ce dont je suis. Je suis part constituante de la communauté des hommes.

A. de SAINT ÉXUPÉRY

ÍNDICE

- PREFÁCIO

- INTRODUÇÃO 0. 1

I.

ANTECEDENTES HISTÓRICOS 1. 1

Satélite 1. 1

Regiões dos Organizadores Nucleolares (NORs) 1. 4

Heteromorfismos 1.11

Associações de satélites 1.13

II.

SATÉLITES - Ultraestrutura e assimetrias em cromossomas acrocêntricos humanos 2. 1

Análise morfométrica e ultraestrutural dos satélites .. 2. 1

Estudo comparativo das frequências dos cromossomas satelizados dos grupos D/G ao MO e ME 2. 1

Análise morfológica dos satélites ao ME 2.13

Estudo quantitativo das regiões dos cromatídeos com ou sem satélites 2.14

Diagramas de dispersão 2.19

Determinação do diâmetro e área médios do satélite e largura do braço curto 2.39

Pesquisa de assimetrias entre cromatídeos irmãos 2.40

Síntese das conclusões..... 2.42

Encerramento 2.44

III.

NOR - Assimetrias nas NORs entre cromatídeos irmãos 3. 1

Pesquisa de assimetrias laterais quantitativas das NORs 3. 1

Síntese das conclusões 3.14

Encerramento 3.15

IV.

ASSOCIAÇÕES DE SATÉLITES - Ultraestrutura das associações de satélites 4. 1

Análise ultraestrutural das associações de satélites em cromossomas inteiros 4. 1

Estudo comparativo do índice de associação ao MO e ME . 4. 2

Estudo da ultraestrutura das associações 4.17

Síntese das conclusões 4.27

CONCLUSÃO e considerações finais 5. 1

BIBLIOGRAFIA 6. 1

ADENDA 7. 1

* * *

PREFÁCIO

O cromossoma, organelo de estrutura complicada onde se situa toda a informação genética que regula a vida celular, tem sido objecto de investigação há já cem anos aproximadamente. No entanto existem ainda níveis estruturais que são quase desconhecidos por falta de métodos analíticos adequados.

O microscopista da primeira metade deste século tinha do cromossoma a imagem que lhe dava o microscópio de luz e que era a de uma unidade estática, bi-dimensional, com uma estrutura homogénea e maciça.

Os avanços recentes da microscopia electrónica (ME), associados aos das técnicas de coloração específica usadas em microscopia óptica (MO), adaptadas para ME, permitiram um desenvolvimento espectacular nos últimos 28 anos. A imagem ultraestrutural do cromossoma mostra-se agora bem diferente, em termos gerais, daquela que tinha o microscopista da 1ª metade do século.

O emprego do ME, devido ao seu elevado poder de resolução, trouxe novos dados que permitiram definir de uma maneira mais precisa este organelo tão complexo; mas mesmo este progresso alcançado não é ainda suficiente e a organização interior cromossómica permanece um assunto controverso.

Tirando vantagem da elevada capacidade discriminativa do microscópio electrónico, foi possível concretizar os objectivos que me propus atingir neste trabalho. Para consegui-los tornava-se imprescindível a diferenciação clara de certas regiões cromossómicas que, estando no limiar do poder de resolução do microscópio de luz, podem ocasionalmente não ser perceptíveis e portanto, não seriam susceptíveis, a esse nível, da análise dimensional qualitativa e quantitativa pretendida.

Ao fazer um trabalho científico, o investigador tenta aproximar-se o mais possível da Verdade, embora tenha consciência de que nunca o conseguirá completamente. Para isso procura a fiabilidade do valor e grau de segurança dos seus resultados na Estatística, ciência que embora com limitações, permite uma precisão maior nas conclusões do que se poderia conseguir por qualquer outro procedimento.

Mas para um investigador que, como eu, não pretenda apresentar uma tese na área da estatística, mas apenas aplicá-la como auxiliar de precisão do seu trabalho, não deve necessitar, em minha opinião, de saber com detalhe as manipulações dos testes estatísticos, e sim as ideias que acompanham os seus dados, podendo recorrer livremente à colaboração de um colega com conhecimentos nesse campo, como fiz.

Resumindo para concluir o prefácio, este trabalho sobre a morfologia e estrutura dos satélites dos cromossomas acrocêntricos humanos e das suas associações somáticas foi portanto possível usando a única estratégia que pareceu adequada para o fim em vista - a utilização da microscopia electrónica, complementando-a com os testes estatísticos mais indicados para precisar o valor dos resultados e concretizar as hipóteses formuladas.

* * *

Felix qui potuit rerum cognoscere causas

VIRGÍLIO

INTRODUÇÃO

Os cromossomas *acrocêntricos* humanos (termo introduzido por White em 1945), ou melhor, os seus braços curtos, são conhecidos desde longa data pelas características morfológicas particulares que apresentam e pelo significado clínico ambíguo das mesmas.

Quando em metafase são corados, por exemplo, com Giemsa, é possível observarem-se, ao MO, dois tipos de constrições acromáticas: a constrição **primária** ou região do centrómero, e a constrição **secundária**, que nestes cromossomas corresponde à zona de localização do rDNA.

A existência da constrição secundária nos braços curtos destes cromossomas, leva à formação de uma estrutura particular no seu extremo - o **satélite**, â cerca da qual pouco se sabe.

Estas diferentes regiões são susceptíveis de variações importantes cujas implicações no fenótipo humano ainda hoje continuam obscuras. São exemplo dessas características:

- o heteromorfismo para aquelas regiões, que pode incluir todo o braço curto, a constrição secundária apenas, ou mesmo só o satélite, (Paris Conference, 1971; Paris Conference Supplement, 1975; McKenzie e Lubs, 1975; Verma e Dosik, 1980; Gosden *et al.*, 1981; Werner e Herrman, 1984; Babu e Verma 1985; Babu e Verma, 1987);

- a heredabilidade dos heteromorfismos do tipo mendeliano, com raras excepções (Verma *et al.*, 1977a e b; Mikelsaar e Ilus, 1979; Wachtler e Musil, 1980; Verma e Dosik, 1980; Chen *et al.*, 1981; Zakharov *et al.*, 1982a e b; Babu e Verma, 1987);

- localização dos genes que codificam para as sub-unidades 18S e 28S do rRNA, na constrição secundária (Henderson e Warburton, 1972; Evans *et al.*, 1974; Pardue e Hsu, 1975; Verma *et al.*, 1984: Babu e Verma, 1985), zona designada por **região dos organizadores nucleolares** ou **NOR** (Heitz, 1931; McClintock, 1934);

- a estabilidade e hereditariedade, dentro de certos limites, da coloração das NORs nas células somáticas de cada indivíduo, característica que reflecte a actividade dos genes ribossomais (Matsui e Sasaki, 1973; Howell e Denton, 1974; Funaki *et al.*, 1975; Goodpasture e Bloom, 1975; Bloom e Goodpasture, 1976; Miller *et al.*, 1976; Mikelsaar *et al.*, 1977b; Varley, 1977; Marcovic *et al.*, 1978; Bellomo e Melle, 1981a e b; Zakharov *et al.*, 1982a; Babu e Verma, 1985);

- o polimorfismo relativo ao número de genes ribossomais que pode ser intra ou intercelular, individual e populacional (Verma e Lubs, 1975b; Bloom e Goodpasture, 1976; Verma *et al.*, 1977a; Varley, 1977; Warburton e Henderson, 1979; Mikelsaar e Ilus, 1979; Verma e Dosik, 1981; Zakharov *et al.*, 1982a);

- aplicação dos heteromorfismos na determinação ou exclusão de paternidade (Kamei *et al.*, 1986), na determinação da origem de um cromossoma em excesso, particularmente no síndrome de Down (Hansson e Mikkelsen, 1978; Mikkelsen *et al.*, 1980; Jacobs e Mayer, 1981; Jkson-Cook *et al*, 1985), em estudos etnológicos (Schwarzacher, 1976; Mikelsaar e Ilus, 1979; Verma *et al.*, 1981; Babu e Verma, 1985), no estudo do mecanismo de formação de mosaicos e quimeras (Verma e Dosik, 1980; Kamei *et al.*, 1986) e do destino de células transplantadas (Verma e Dosik, 1980), na demonstração da existência de uma população monoclonal em leucemias (Stamberg *et al.*, 1986);

- o envolvimento destes cromossomas em associações somáticas (Ferguson-Smith e Handmaker, 1961; Ohno *et al.*, 1961), normalmente conhecidas por **associações de satélites**, cujo papel principal parece ser o de desempenharem agrupados a sua função, isto é, participarem na formação de um mesmo nucléolo (Evans *et al.*, 1974; Warburton *et al.*,

1976; Miller *et al.*, 1977; De Capoa *et al.*, 1978; Schwarzacher *et al.*, 1978; Schwarzacher e Wachtler, 1983);

- o relacionamento deste fenómeno com o da etiologia das não-disjunções e das translocações do tipo Robertsoniano, que podem surgir na meiose ou nas primeiras divisões do zigoto (Hansson e Mikkelsen, 1978; Houghton, 1979; Mikkelsen *et al.*, 1980; Jacobs e Mayer, 1981; Jackson-Cook *et al.*, 1985; Lindenbaum *et al.*, 1985; Hassold *et al.*, 1987; Lee Gould *et al.*, 1987). Alguns autores porém não são favoráveis a esta possível correlação (Cook e Curtis, 1974; Taysi, 1975) e embora tenham sido feitos estudos citogenéticos comparativos em cariótipos normais e anormais, ainda hoje se carece de provas demonstrativas deste envolvimento particular das associações;

- a avaliação do número de NORs marcadas pelo nitrato de prata tem mostrado ser um método útil no diagnóstico de doenças hematopoiéticas do tipo leucémico (Arden *et al.*, 1985; Sato *et al.*, 1986; Mamaev *et al.*, 1987);

- esta mesma marcação tem permitido estudar, durante a mitose em células cancerosas, o comportamento do nucléolo que apresenta uma morfologia típica nestas células (Ploton *et al.*, 1982, 1985, 1987);

- a investigação da actividade das NORs tem também sido aplicada ao estudo de tumores sólidos, nomeadamente em tumores testiculares (DeLozier-Blanchet *et al.*, 1986) e de adenocarcinomas do ovário e da mama (Cheng *et al.*, 1981; Kivi e Mikelsaar, 1985).

Só por si estas razões justificavam, na nossa opinião, desenvolver o conhecimento da anatomia das regiões referidas, em indivíduos normais, tanto mais que são muito raros os trabalhos realizados a nível ultra-estrutural em cromossomas acrocêntricos inteiros. Porém devo confessar que o meu particular interesse no estudo da morfologia e ultraestrutura dos satélites e das suas associações, tema deste trabalho, foram despertados quando em 1981, num estudo citogenético feito por mim e pela Drª Beatriz Porto em doentes afectados pela Paramiloidose Familiar (PAF), encontrámos

um índice de associação dos cromossomas acrocêntricos muito superior ao dos indivíduos normais, usados como testemunho. Estes dados foram apresentados no 6th International Congress of Human Genetics, realizado em Israel em 1981, não nos tendo sido ainda possível no entanto estudar o facto mais detalhadamente com vista a um possível relacionamento com qualquer alteração bioquímica, quem sabe, talvez nenhuma das já conhecidas.

* * *

Embora as ideias criativas sejam essenciais em todos os campos da investigação, a sua demonstração é muitas vezes difícil e limitada por factores técnicos (Babu e Verma, 1987). Ora desde muito cedo o estudo da região dos satélites e das NOR mostrou-se difícil ao MO, porque estes se tornam muito pequenos na metafase e coram mal, sendo a sua definição pouco clara mesmo quando se utilizam métodos sofisticados (Howell *et al.*, 1974).

Porém, na actualidade, pode utilizar-se o ME em quase todo o tipo de investigação para o qual tradicionalmente se recorria á MO (Goyanes, 1985a).

Tendo em conta estas duas realidades, neste trabalho foram estudados ao microscópio electrónico de transmissão (MET):

- SATÉLITES
- NOR
- ASSOCIAÇÕES DE SATÉLITES

com os objectivos de fazer a análise de:

- ULTRAESTRUTURA E ASSIMETRIAS DOS SATÉLITES EM CROMOSSOMAS ACROCÊNTRICOS HUMANOS

- ASSIMETRIA NAS NORs ENTRE CROMATÍDEOS IRMÃOS

- ULTRAESTRUTURA DAS ASSOCIAÇÕES DE SATÉLITES DE CROMOSSOMAS ACROCÊNTRICOS HUMANOS

I – ANTECEDENTES HISTÓRICOS

O progresso conseguido durante os últimos anos, que permitiu dissecar e aprofundar o conhecimento da morfologia e estrutura cromossómica, só foi possível graças à invenção das técnicas de secagem das preparações ao ar, hibridização *in situ* e bandeamento cromossómico, métodos que por sua vez foram complementados com as técnicas de bandas de alta resolução (Babu e Verma, 1987).

A aplicação desta tecnologia permitiu também descobrir, ao MO, os heteromorfismos cromossómicos, cujo estudo tem sido desenvolvido pela ME.

SATÉLITES

Qualquer dos dez cromossomas acrocênticos (pares 13, 14, 15, 21 e 22) podem apresentar uma estrutura diferenciada do corpo do cromossoma e que se designa por **satélite** (Ferguson-Smith e Handmaker, 1961). Estes situam-se nos extremos dos braços curtos dos cromossomas em estudo, constituindo entidades morfologicamente diferenciadas, ligadas à parte restante do cromossoma por uma região filamentosa, na qual estão localizados os cistrões ribossomais (Babu e Verma, 1987).

A sua constituição citoquímica não está ainda bem definida, apesar de haver na literatura alguns dados indicativos de que estas regiões são constituidas por DNA repetitivo, ou DNA satélite, rico nos pares de bases A-T (Schnedl, 1978). O DNA satélite encontra-se coincidente, na maior parte das vezes, com a existência de heterocromatina constitutiva, a qual aparentemente não é transcripcional (Kurnitt, 1979; Verma e Dosik, 1980; Babu e Verma, 1987). A complexa natureza molecular do DNA satélite e da

heterocromatina está já bem documentada (Gosden *et al.*, 1975, 1978, 1981; Babu e Verma, 1987).

A investigação intensiva feita por hibridização *in situ* e autoradiografia, numa tentativa de conhecimento da distribuição do DNA satélite nos braços curtos dos cromossomas acrocêntricos, mostrou que embora heterocromáticos, os satélites citológicos têm uma composição variável de indivíduo para indivíduo. Em certos casos aparentemente não contêm DNA satélite (Gosden *et al.*, 1981), ou este se está presente é em quantidades tão pequenas que não são detectáveis; daí não haver hibridização visível com qualquer dos tipos de cRNA satélite conhecidos (Gosden *et al.*, 1975). Também foi comprovado por hibridização *in situ* que não contêm rDNA (Evans *et al.*, 1974; Goodpasture *et al.*; Ferraro *et al.* e que, quando corados por métodos de fluorescência, a intensidade daquela e o tamanho que apresentam não estão relacionados com o conteúdo em DNA satélite (Gosden *et al.*, 1981).

Os satélites terminais diferem dos intercalares, duplos ou mesmo triplos satélites, precisamente pela composição em pares de bases do seu DNA. Os primeiros parecem conter particularmente DNA satélite rico em A-T, enquanto os segundos são considerados como constituidos por material rico em G-C (Schnedl, 1978).

A formação dos satélites intercalares tem sido interpretada como consequência da existência de um excesso natural de material rico em G-C, encontrando-se separados uns dos outros por constrições secundárias com NORs que podem estar activas ou não (Balicek e Zizka, 1980; Balicek *et al.*, 1982).

Quando observadas ao ME, os satélites citológicos apresentam-se com o aspecto de esferas irregulares, de diâmetro variável, frequentemente inferior à largura do cromatídeo, e constituidas por fibras de cromatina de 24 nm de diâmetro, que se organizam em alças dispostas em rosetas. (Goyanes, 1985a; Babu e Verma, 1987)

Estas fibras têm também um aspecto de cilindros não homogéneos, isto é, não uniformes, apresentando ao longo do seu comprimento estruturas nodosas,

(Yunis e Bahr, 1979; Harrison *et al.*, 1982) que têm sido sempre relacionadas com uma superorganização da fibra (Goyanes, 1985a).

No satélite, tal como em todo o cromossoma em metafase, não é ainda possível reconhecer a forma como estas fibras se organizam. Sabe-se que elas predominam nos cromossomas metafásicos que sofreram tratamento hipotónico prévio (Schwarzacher, 1976; Sedat e Manuelidis, 1978; Goyanes, 1985a). Porém, o seu diâmetro e densidade estão dependentes de vários outros factores (Goyanes, 1985a) como, por exemplo, o uso do tratamento com colquicina para bloquear as metafases (Bahr e Colomb, 1974; Gilly *et al.*, 1976; Goyanes, 1985a) e a composição do meio de cultura (Grau *et al.*, 1982; Goyanes, 1985a).

O aspecto irregular destas fibras resulta da associação em grupos, dos nucleossomas cuja existência tem sido várias vezes confirmada (Rattner e Hamkalo, 1978a e b; Rattner e Hamkalo, 1978b; Subirana *et al.*,1981; Goyanes, 1985a). Os nucleossomas constituem a primeira unidade de organização da fibra de cromatina (Olins e Olins, 1974; Kornberg, 1974; Chambon, 1978; Goyanes, 1985a). Foram descritos modelos que procuravam explicar como eles se organizam, de forma a darem origem ao aparecimento das fibras de diâmetro compreendido entre 20-30 nm (Finch e Klug, 1976; Rattner e Hamkalo,1978; Worcel *et al.*, 1981; Woodcock *et al.*, 1984; Goyanes, 1985a).

Estas fibras parecem por sua vez organizar-se em superfibras de 50 nm (Ris, 1978 e 1979; Goyanes, 1985a), possivelmente enrolando-se em conjunto duas com a mesma dimensão (Goyanes, 1985a).

Tal como foi já referido, ainda hoje não é possível dizer-se onde se situam o começo e fim das fibras dentro dos cromossomas metafásicos nem a sua superorganização (Goyanes, 1985a). No entanto foram várias as tentativas feitas nesse sentido (DuPraw, 1965, 1966, 1970; Bahr, 1970; Comings, 1977; Sedat e Manuelidis, 1978; Laemmli *et al.*, 1978; Marsden e Laemmli, 1979; Ris e Korenberg, 1979; Comings e Okada, 1979; Yunis e Bahr, 1979; Haapala e Nokkala, 1982; Haapala, 1984, 1985a e b; Rattner e Lin, 1985; Goyanes, 1985a), tendo sido utilizados para tal fim o grupo de métodos de preparação de cromossomas inteiros desenvolvido por Gall (1963/1966).

ANTECEDENTES HISTÓRICOS

REGIÕES DOS ORGANIZADORES NUCLEOLARES (NORs)

Entre o satélite e o corpo do cromossoma está situada a constrição secundária na qual se encontra localizado o rDNA.

Foi Heitz que, em 1931, tendo observado pela primeira vez que o nucléolo estava relacionado com determinadas zonas dos braços curtos dos cromossomas acrocêntricos, chamou a atenção e despertou o interesse para estes cromossomas. As zonas referidas foram então consideradas como os locais onde se situavam provavelmente os cistrões ribossomicos e por consequência onde se dava a síntese do rRNA. Por esta razão foram designadas por **regiões dos organizadores nucleolares** ou **NOR** (Heitz, 1931; McClintock, 1934).

A localização desses cistrões foi conseguida pela aplicação das técnicas de hibridização ***in situ*** do tipo rRNA/rDNA em preparações de cromossomas em metafase, as quais permitiram a visualização de todos os genes ribossomicos, independentemente da sua actividade (Henderson e Warburton, 1972; Evans *et al.*, 1974; Hsu *et al.*,1975; Pardue e Hsu, 1975; Warburton e Henderson, 1979). Foram detectadas cerca de 400 cópias de genes rDNA, organizados como unidades repetidas, dispostas lado a lado (em tandem) e distribuidas em grupos pelos 5 pares de cromossomas acrocêntricos humanos (Henderson e Warburton, 1972).

Apesar da sua importância estas técnicas apresentavam problemas, como por exemplo, a necessidade de equipamento sofisticado, eram caras, trabalhosas e demoradas e exigiam de quem as executava bons conhecimentos de biologia molecular. Tudo isto as tornava impraticáveis em laboratórios de rotina.

A necessidade de métodos mais simples levou ao aparecimento de técnicas de coloração que coram selectivamente as NOR e permitem a sua localização em preparações de rotina de cromossomas metafásicos. Surgem assim as bandas N (Matsui e Sasaki, 1973; Funaki *et al.*, 1975) e os métodos específicos de coloração pela prata ou bandas Ag-NOR (Howell e Denton, 1974; Goodpasture e Bloom, 1975; Howell *et al.*, 1975; Bloom e Goodpasture, 1976; Ferraro *et al.*, 1977; Howell e Black, 1980). Esta coloração porém só torna visíveis os

organizadores nucleolares que tenham estado funcionalmente activos na interfase precedente (Goodpasture e Bloome, 1975 Miller *et al.*, 1976a e b; Hofgärtner *et al.*, 1979a).

Quando marcadas pela prata em cromossomas metafásicos e observadas ao MO, as NOR apresentam-se aos pares, como blocos negros com uma forma esférica ou alongada, localizadas na constrição secundária dos braços curtos dos cromossomas acrocêntricos (Goodpasture e Bloom, 1975; Schwarzacher *et al.*, 1978; Busch *et al.*, 1979; Howell, 1982; Paweletz e Risueño, 1982; Schwarzacher e Wachtler, 1983). Se a constrição é pequena o precipitado de prata cobre mesmo o satélite (Schwarzacher *et al.*, 1978; Schwarzacher e Wachtler, 1983).

A coloração não é porém uniforme na mesma preparação, podendo o aspecto das NOR variar entre o bloco negro e a ausência de coloração visivel (Mikkelsaar *et al.*, 1977a e b; Schwarzacher *et al.*, 1978).

As diferenças de coloração referidas podem ser atribuidas, em parte, ao método utilizado (Bloom e Goodpasture, 1976; Schwarzacher *et al.*, 1978). Este, que pelas suas características não pode ser padronizado, sofre a influência de vários factores nomeadamente a duração da técnica (Sozanski, 1983a e b), e a quantidade de material da NOR responsável pela marcação e pelo tamanho da área que ficou corada na primeira parte da técnica (Schwarzacher *et al.*, 1978).

A frequência com que as variações individuais aparecem levou a pensar que existem outras causas (Schwarzacher *et al.*, 1978). Na realidade há diferenças celulares, individuais e populacionais na coloração e no tamanho das NOR (Bloom e Goodpasture, 1976; Varley, 1977; Mikelsaar *et al.*, 1977a; Zakharov *et al.*, 1982a e b).

O padrão de coloração das NOR e o seu tamanho médio são características inerentes a cada cromossoma, normalmente proporcionais ao conteúdo em rDNA presente (Warburton e Henderson, 1979), dentro de certos limites consistentes de célula para célula no mesmo indivíduo (Tantravahi *et al.*, 1977), transmitindo-se de geração em geração (Miller *et al.*, 1977a e b;

Mikelsaar *et al.*, 1977b; Markovic *et al.*, 1978; Taylor e de Leon, 1981; Zakharov *et al.*, 1982a), de uma forma mendeliana (Varley, 1977; Verma *et al.*, 1977a e b; Verma e Dosik, 1981; Babu e Verma, 1985).

As diferenças encontradas foram então explicadas como estando relacionadas com:

- o sexo, raça e idade (Mikelsaar e Hilus, 1979; Buys *et al.*, 1979; Zakharov *et al.*, 1982a),

- a existência de números diferentes de genes codificadores do rRNA (Evans *et al.*, 1974; Warburton *et al.*, 1976; Warburton e Henderson, 1979; Tantravahi *et al.*, 1981),

- a falta de proporcionalidade entre o conteúdo em rDNA, grau de actividade e intensidade de coloração (Miller *et al.*, 1976a e b, 1978; Schmiady *et al.*, 1979; Tantravahi *et al.*, 1981; Ferraro e Lavia, 1983-1 e 2, 1985),

- a existência de escolha dos cistrões activos em cada ciclo celular ou de diferentes clones com diferentes actividades que se transmitem de célula para célula (Ferraro *et al.*, 1977, 1981),

- a existência de polimorfismos populacionais relativos ao tamanho, coloração e número de NORs (Mikkelsaar *et al.*, 1977a, Mikkelsaar e Ilus, 1979; Ray e Person, 1979; Taylor e DeLeon, 1981; Bellomo e Melle, 1981a e b; Zakharov *et al.*, 1982) os quais se transmitem segundo as leis de Mendel (Varley, 1977; Verma e Dosik, 1981; Babu e Verma, 1985),

- a possibilidade de serem o reflexo da activação gradual das NOR à medida que a célula atravessa a interfase e entra em mitose sob o efeito da fitohemaglutinina (Sozansky, 1983b),

- o tipo de células que se observa (Mikkelsaar e Schwarzacher, 1978; Schwarzacher *et al.*, 1978).

Procurou-se verificar, ainda ao MO, se as NORs que não coravam pela prata, quando em metafase, não o fariam na realidade pelo facto de os genes rDNA não terem estado activos, ou se essa actividade tinha sido tão pequena que a coloração, embora presente, não era detectável (Schmiady *et al.*, 1979). Para isso fizeram-se bandas de alta resolução (Sanchez e Yunis, 1977; Viegas-Pequignot e Dutrillaux, 1978) em associação com o tratamento pela prata e verificou-se que as NOR não coradas na metafase também o não estavam em profase nem em prometafase (Verma *et al.*, 1984). Esta conclusão mostrou que a variabilidade de coloração das NOR não era um artefacto e que os cromossomas tinham efectivamente uma constituição diferente no que diz respeito ao número de genes rDNA, contribuindo desigualmente para a produção do rRNA celular (Verma *et al.*, 1984).

Em geral o número de genes rDNA estava relacionado com o nível funcional respectivo (DeCapoa *et al.*, 1988). Contudo nem sempre assim acontecia, podendo haver cromossomas com um grande número de genes e a sua actividade ser reduzida (Miller *et al.*, 1977c, 1978; Warburton e Henderson, 1979). Esta falta de proporcionalidade foi considerada como podendo ser devida por exemplo, à existência de satélites duplos (Lau *et al.*, 1979), ou a uma extensa metilação (Tantravahi *et al.*, 1981), embora não haja ainda prova valorizável no que diz respeito à correlação entre hipermetilação e baixa de actividade, nestes genes (DeCapoa *et al.*, 1988). O contrário também se verificou, isto é, a existência de um pequeno número de genes altamente activos (DeCapoa *et al.*, 1988). Estes dados levaram à hipótese de haver outros factores de controlo da actividade para além do número de cópias, como por exemplo a actividade ou eficiência da polimerase I na ligação ao rDNA (DeCapoa *et al.*, 1988).

Para outros autores, porém havia uma relação directa entre a hipometilação e a actividade transcripcional destes genes (Tantravahi *et al.*,1981; Ferraro e Lavia, 1983- 1 e 2, 1985; Ferraro e Prantera, 1988), havendo menor metilação nos genes activos. Esta por seu lado favoreceria o estabelecimento e/ou a manutenção da configuração diferente da cromatina nos casos activos e não activos (Ferraro e Prantera, 1988).

ANTECEDENTES HISTÓRICOS

As técnicas de coloração pela prata aqui referidas apontavam para uma especificidade que parecia mais ligada a proteínas localizadas nas NORs do que ao DNA propriamente dito (Babu e Verma, 1985). Na realidade foi demonstrado que as propriedades argirófilas dos organizadores nucleolares são devidas a proteínas não histónicas (Miller *et al.*, 1976; Schwarzacher, 1976; Schwarzacher *et al.*, 1978; Schwarzacher e Wachtler, 1983), que se localizam na vizinhança dos genes ribossomicos (Hubell *et al.*, 1979; Angelier *et al.*, 1982a e b; Hernandez-Verdun *et al.*, 1982; Howell, 1982; Hernandez-Verdun, 1983; Hernandes-Verdun *et al.*, 1984; Babu e Verma, 1985; Matsui *et al.*, 1986).

Estudos citoquímicos demonstraram tratar-se de proteínas ácidas (Schwarzacher *et al.*, 1978; Olert *et al.*, 1979; Buys e Osinga, 1980; Sthal, 1982), particularmente do tipo fosfoproteico com grupos sulfidrilo na sua molécula (Buys e Osinga, 1980; DeCapoa, 1981, 1982; Buys e Osinga, 1984; Pfeifle *et al.*, 1986). A sua natureza bioquímica e o seu papel ainda estão porém, em discussão. Supõe-se ser uma única proteína a responsável pela coloração (Hubell *et al.*, 1979), possivelmente a C23 (Ochs *et al.*, 1983; Ochs e Busch, 1984), ou serem as proteínas B23 e C23 (Lischwe *et al.*, 1979; Daskal *et al.*, 1980; Pawelets e Risueño, 1982; Ochs *et al.*, 1983), ou finalmente a própria polimerase I (Williams *et al.*, 1982).

No entanto foi também posta a hipótese de que a prata se ligasse a todos os componentes básicos da cromatina, preferencialmente ao DNA, parecendo por isso que a coloração se devia a diferentes graus de condensação e de acessibilidade desta macromolécula (Clavaguera *et al.*, 1983, 1984).

As proteínas argirófilas foram visualizadas quer em nucléolos interfásicos quer em cromossomas em metafase (Hernandez-Verdun *et al.*, 1980, 1982, 1983). O depósito de prata encontrava-se sobreposto a uma região constituida por fibras, com uma estrutura não nucleossomica (Hernandez-Verdun *et al.*, 1982; Hernandez-Verdun e Derenzini, 1983; Derenzini *et al.*, 1983b), distendidas, cuja estrutura não se alterava pela actividade transcripcional dos genes rDNA (Derenzini *et al.*, 1983c; Derenzini *et al.*, 1987), e não apresentava histonas (Derenzini *et al.*, 1983b, 1985, 1987).

As fibras da cromatina das NOR em metafase e sem marcação pela prata, dispõem-se paralelamente ao eixo vertical do cromossoma, num feixe apertado de comprimento variável (Goyanes, 1985a) constituido por uma estrutura de filamentos com um diâmetro de 5 a 7 nm (Hsu *et al.*, 1967; Matsui *et al.*, 1986).

A aplicação conjunta do método de coloração pela prata (Goodpasture e Bloom, 1975) e da ME permitiu observar a localização do precipitado nas NORs, em cromossomas inteiros e isolados (Schwarzacher *et al.*, 1978). Estes apresentavam um aspecto homogéneo, fracamente contrastado, com o precipitado de prata localizado junto às NOR mas fora delas, como se o material argirófilo estivesse a rodear as fibras. Se a coloração fosse muito intensa poderia surgir também no interior dos cromatídeos, mesmo com confluência dos depósitos. Foram também encontradas NOR activas, que não eram observadas à MO porque a sua coloração, em parte reflexo da sua actividade, era muito pouco intensa (Schwarzacher *et al.*, 1978).

Diferenças individuais no padrão de coloração observadas ao MO foram também detectadas ao ME (Schwarzacher *et al.*, 1978). O grau de condensação pareceu sempre representar um papel importante no mecanismo de coloração pela prata, embora sem que este fosse muito claro (Buys *et al.*, 1984).

A coloração, por seu lado, aparecia coincidente com as zonas não nucleossomicas da NOR, o que levou a pensar que as proteínas argirófilas tinham uma função estrutural ligada à cromatina nessa zona. Assim, embora parecesse haver uma interacção entre estas proteínas e o rDNA (Howell, 1982; Hernandez-Verdun *et al.*, 1982), estas proteínas não estavam dependentes da síntese do rRNA (Direnzini *et al.*, 1983c; Hernandez-Verdun *et al.*, 1984). Elas pareciam ter realmente um papel mais ligado ao estado de descondensação do DNA ribossómico, não necessariamente activo (Hernandez-Verdun *et al.*, 1984; Medina *et al.*, 1983; Derenzini *et al.*, 1987) mas capaz de entrar em actividade.

O conceito de "actividade da NOR" é pouco preciso (Medina *et al.*, 1986). Para alguns autores ele liga-se directamente à "actividade transcripcional do rDNA" (Schwarzacher *et al.*, 1978; Busch e Daskal, 1979; Hubbell *et al.*,

1980; Hernandez-Verdun *et al.*, 1982), enquanto para outros ele significa "actividade potencial", isto é, a cromatina está inactiva mas descondensada e capaz de ter estado activa na interfase precedente ou vir a estar na posterior (Miller *et al.*, 1976a e b; Cermeño *et al.*, 1984).

Este estado de relaxamento, independente da fase do ciclo celular e da transcrição, sugeria que o controlo dos genes ribossomicos podia estar facilitado por ele (Derenzini *et al.*, 1987); por outro lado, como na mitose não há síntese, apesar de existir esse relaxamento, devia no entanto haver certo grau de condensação suficiente para a inibir, ou em alternativa existir um factor mitótico capaz de fazer esse bloqueio (Matsui e Sandberg, 1985). O elevado índice de transcrição do DNA podia explicar satisfatoriamente a necessidade de manter esta cromatina descondensada mesmo em mitose (Medina *et al.*, 1986).

Afinal, a verdadeira função das proteínas Ag-NOR ainda hoje é desconhecida.

As NOR coradas em cromossomas metafásicos e observadas ao ME aparecem como pares de esferas ou estruturas alongadas, parcialmente integradas na constrição secundária, projectando-se para o exterior da superfície do cromossoma (Schwarzacher *et al.*, 1978; Schwarzacher e Wachtler, 1983; Ploton *et al.*, 1987). As estruturas alongadas foram estudadas em cortes e pôde verificar-se que cada cromatídeo tem um dupleto de material corado pela prata (Ploton *et al.*, 1987).

A existência destes dupletos poderia ser uma das explicações das variações numéricas de NORs observadas por vários autores, quer em MO (Verma e Rodriguez, 1985, por exemplo), quer em ME (Schwarzacher *et al.*, 1978).

*

HETEROMORFISMOS

Os braços curtos dos cromossomas *acrocêntricos* (termo que se deve a White, em 1945), são conhecidos, como foi já referido na introdução, pelo elevado heteromorfismo em toda a sua extensão, isto é, a variação pode dizer respeito ao comprimento do braço na sua totalidade, ao comprimento ou ao número das NORs, ou ao tamanho dos satélites citológicos (Verma e Dosik, 1980; Gosden *et al.*, 1981; Werner e Herrmann, 1984; Babu e Verma, 1985 e 1987).

Os heteromorfismos, designação que actualmente substitui a de polimorfismos ou de variantes (Verma e Dosik, 1980), e que se traduzem numa variação entre indivíduos da mesma espécie, são conhecidos desde a década de 60 (Cooper e Hirschhorn, 1963). Nesta altura não tinham sido ainda descobertas as técnicas de bandas. No entanto era possível observar ao MO, mesmo sem qualquer tipo de marcação e em indivíduos normais, que os cromossomas acrocêntricos homólogos apresentavam diferenças morfológicas bem marcadas em determinadas regiões dos seus braços curtos (Paris Conference, 1971; McKenzie e Lubs, 1975; Verma e Dosik, 1980; Livingston *et al.*, 1985; Babu e Verma, 1987).

A aplicação das bandas cromossómicas permitiu reconhecer com precisão essas regiões (Verma e Dosik, 1980; Livingston *et al.*, 1985; Babu e Verma, 1987), particularmente os métodos de coloração específicas como as QFQ (bandas Q ou de fluorescência, em que é usada a mostarda de quinacrina como fluorocromo) e RFA (bandas R de fluorescência, usando o laranja de acridina) (McKenzie e Lubs, 1975; Verma e Lubs, 1975a e b, 1976; Verma *et al.*, 1977a e b, 1983a), e a técnica de Ag-NOR (Hayata *et al.*, 1977). Os parâmetros avaliados por estas técnicas são geralmente comuns, isto é, em todas elas se analisa a cor ou o tamanho (e nas duas primeiras também a intensidade da fluorescência) dessas diferentes regiões (Verma e Dosik, 1980; Chen *et al.*, 1981; Kamei *et al.*, 1986; Babu e Verma, 1987). A intensidade da fluorescência é também o parâmetro estudado nos métodos especiais como os de reacção imunológica para a 5-metilcitosina e de DA/DAPI (distamicina A e 4'-6-diamidino-2-fenilindol) (Okamoto *et al.*, 1981;

Verner e Herrman, 1984; Babu e Verma, 1985a; Babu *et al.*, 1986; Perez-Castillo *et al.*, 1987; Bühler e Malik, 1988).

No caso concreto do heteromorfismo dos satélites, a sua observação ao MO exige métodos de coloração que reduzem a sua definição, podendo o seu aparecimento variar de célula para célula (Harrison *et al.*, 1985). Além disso só grandes variações morfológicas são detectadas por esse meio (Harrison *et al.*, 1985).

Em 1985 surge um método novo que torna possível não só observar directamente e a três dimensões os satélites e suas variantes, como também no futuro, medir o seu volume, usando o microscópio electrónico de *varrimento (scanning)* (MES) (Harrison *et al.*, 1985).

O heteromorfismo parece estar associado a variabilidade quantitativa e diversidade sequencial da heterocromatina (Kurnitt, 1979; Gosden *et al.*, 1981; Babu e Verma, 1987). A primeira deverá a sua origem a fenómenos de *crossing-over* mitótico desigual; a segunda relacionar-se-á, possivelmente, com mutações nas sequências pequenas de repetição (Babu e Verma, 1987).

A NOR é uma zona de características morfológicas e moleculares muito próprias, que a fazem diferir da heterocromatina que a rodeia. Embora constituida por DNA repetitivo, é transcripcionalmente activa e não se encontra condensada (Henderson *et al.*, 1972; Schwarzacher, 1976).

Estudos ultrestruturais em mitoses, com coloração pela prata, são raros (Schwarzacher *et al.*, 1978; Hernandez-Verdun *et al.*, 1980; Paweletz e Risueño, 1982; Ploton *et al.*, 1985), e ainda o são mais quando esse estudo é feito em cromossomas inteiros e isolados (Schwarzacher *et al.*, 1978).

A natureza heteromórfica do rDNA e a sua origem não estão esclarecidas (Verma e Dosik, 1980; Babu e Verma, 1987)

Embora o significado biológico e clínico dos heteromorfismos não esteja ainda compreendido, uma vez que as variações morfológicas dos cromossomas acrocêntricos aparentemente não têm efeito directo no fenótipo (Kurnitt,

1979; Harrisson *et al.*, 1985; Werner e Herrman, 1985; Livingston *et al.*,1985; Babu e Verma, 1987), ele não deixa de ser controverso. A razão está no facto de existirem descritos casos de fenótipos anormais onde foram encontrados polimorfismos, embora não haja uma prova evidente de relação de causa e efeito (Lubs e Ruddle, 1970; Jacobs *et al.*, 1974; Imaizumi *et al.*, 1981).

ASSOCIAÇÕES DE SATÉLITES

Ferguson-Smith e Handmaker (1961) observaram pela primeira vez e ao MO, a aproximação de alguns dos cromossomas acrocêntricos humanos e a formação de figuras que designaram por **associação da satélites**.

Foi correntemente aceite que os cromossomas acrocêntricos se associavam pelas NORs e não pelos satélites, mas por uma questão de comodidade na literatura continuou a vigorar a expressão anterior (Babu e Verma, 1985). No entanto foi sugerida como mais apropriada a designação de **associação de cromossomas acrocêntricos** (Verma *et al.*, 1983c; Schwarzacher e Wachtler, 1983; Babu e Verma, 1985), ou de **associação de NORs** (Verma *et al.*, 1983c; Babu e Verma, 1985).

A formação destas figuras foi considerada como o resultado da participação conjunta de alguns dos cromossomas acrocêntricos na organização de um mesmo nucléolo (Ferguson-Smith, 1964). Foram observadas, em alguns casos, ligações físicas entre os braços curtos destes cromossomas em associação (Zang e Back, 1969). Feita a hibridização *in situ*, esta mostrou a presença de rDNA nestas ligações (Henderson *et al.*, 1973). Quando aplicada a técnica específica de coloração pela prata os depósitos apareciam localizados no exterior dos cromatídeos e também entre os cromossomas associados (Schwarzacher *et al.*, 1978; Schwarzacher e Wachtler, 1983), inclusivamente nas próprias ligações (Henderson *et al.*, 1973).

Embora se tenha acordado que os cromossomas associados estão sempre marcados pela prata (DeCapoa *et al.*, 1978; Verma *et al.*, 1983b; Verma *et al.*, 1983c) e que a responsabilidade pelo fenómeno de associação é a fusão nucleolar (Miller *et al.*, 1977) outros factores foram considerados como

possivelmente existentes e que podiam contribuir para essa aproximação dos cromossomas. Esta hipótese surgiu por terem sido encontradas, ao MO, associações entre cromossomas com pouca ou nenhuma coloração pela prata (Hens *et al.*, 1980). Em geral, aceitou-se que, para além do grau de actividade das NORs, o índice de associação dos cromossomas em metafase era muito dependente da possibilidade da fusão dos nucléolos (Schwarzacher e Wachtler, 1983), da sua função nucleolar, da orientação rígida e polaridade comum devida à matriz nucleoproteica também comum (Verma *et al.*, 1983c) e à existência de sequências homólogas - nas regiões pericentroméricas dos cromossomas acrocêntricos (Kurnitt *et al.*, 1984).

Algumas das experiências feitas sugeriram que a frequência com que um cromossoma se associava, estava relacionada com o comprimento da constrição secundária, particularmente das NORs e portanto com o número dos genes que codificam o rRNA (Evans *et al.*, 1974; Zankle e Zang, 1974; Henderson e Atwood, 1976; Hayata *et al.*, 1977; Miller *et al.*, 1977; DeCapoa *et al.*, 1978; Babu e Verma, 1985). Mas também aqui a hibridização *in situ* teve uma palavra a dizer e mostrou que a capacidade de um cromossoma entrar em associação não era só função do número de genes rDNA que transportava (Evans *et al.*, 1974). Realmente para além da relação entre a frequência de associação de um dado cromossoma e a morfologia da sua constrição secundária (Zankl e Zang, 1974; Warburton *et al.*, 1976; Hayata *et al.*, 1977), foi encontrada uma correlação no que se refere ao grau de coloração das NORs pela prata, sua morfologia e actividade (Miller *et al.*, 1977; DeCapoa *et al.*, 1978; Schwarzacher *et al.*, 1978; Galperin-Lemaître *et al.*, 1980; DeLernia *et al.*, 1980; Zakharov *et al.*, 1982; Schwarzacher e Wachtler, 1983; Verma *et al*, 1983b; Babu e Verma, 1985). Esta dependência não existia porém em relação ao tamanho do satélite (DeLernia *et al.*, 1980).

Tal como foi observado para as NORs em cromossomas livres, também se encontraram variações no padrão de associação, de célula para célula, no mesmo indivíduo. Assim, os cromossomas que apresentavam em algumas células uma maior frequência de associação e intensidade de coloração, estavam noutras, livres e negativamente corados, sugerindo estar envolvido um mecanismo de regulação na actividade ribossómica (DeLernia *et al.*, 1980). Além disso, a frequência de associação mostrou ser diferente entre os dez

cromossomas acrocêntricos, tendo sido posta a hipótese de um padrão individual de associação relacionado com o padrão individual da coloração das NORs pela prata (Varley, 1977).

Tendo-se investigado que outras causas poderiam levar ao aparecimento de variações na frequência de associação dos cromossomas, detectou-se que havia factores fisiológicos e físicos que podiam exercer a sua influência nesse sentido. São exemplos desses factores a duração do ciclo celular e actividade das NORs (Mattevi e Salzano, 1975; Sigmund *et al.*, 1979), o nível de certas hormonas como a tiroxina (Nilsson *et al.*, 1975; Zankl *et al.*, 1980), a idade (Cook, 1972; Mattei *et al.*, 1976; Liem *et al.*, 1977; Jacobs e Mayer, 1980; Kumagai *et al.*, 1982), o sexo (Liem *et al.*, 1977; Galperin-Lemaître *et al.*, 1980), condições de cultura e técnicas (Zang e Back, 1969; Nankin, 1970; Babu e Verma, 1985)) e factores físicos externos como as radiações ionizantes (Stenstrand, 1978; DeLernia *et al.*,1982), mutagéneos e toxinas (DeLernia, 1982; Musilová *et al.*, 1983).

A frequência de associação foi estudada usando vários critérios (Cohen e Shaw, 1967; Zang e Back, 1968; Nankin, 1970; Patil e Lubs, 1971; Jacobs *et al.*, 1976; Ardito *et al.*, 1978; Galperin-Lemaître *et al.*, 1980; Verma *et al.*, 1983c). Alguns deles partiam do princípio de haver realmente uma correlação directa entre a coloração das NORs pela prata e a sua participação nas associações. Porém, houve quem considerasse que talvez a capacidade de associação das NORs estivesse mais influenciada pelo meio intracelular do que pelo padrão da actividade transcripcional (Sozansky *et al.*, 1985).

Outras situações estranhas se depararam. Assim algumas vezes encontraram-se fibras a ligarem cromossomas que aparentemente não estavam associados segundo os critérios estabelecidos para esse fim. A explicação então dada era que essas fibras se tinham estabelecido entre cromossomas que não estariam envolvidos no organização do mesmo nucléolo, mas próximas por haver homologia entre as suas NORs (Varley, 1977). Também apareceram, ao MO, associações envolvendo cromossomas cujas NORs estavam inactivas, isto é, não apresentavam marcação pela prata. Porém, quando foram observadas ao ME verificou-se que na verdade existia marcação, embora esta fosse tão pequena que não era detectada ao MO (Schwarzacher *et al.*, 1978).

ANTECEDENTES HISTÓRICOS

A possibilidade de que um cromossoma determinado, ao envolver-se em associação, fosse um fenómeno que se dava ao acaso ou não permaneceu uma questão controversa (Zang e Back, 1969; Patil e Lubs, 1971; Jacobs *et al.*, 1976; Hansson, 1979; Woodruff e DeLeon, 1982). No entanto foi considerado que as associações contribuiam para um arranjo dos cromossomas em metafase que não se dava ao acaso (Bobrow e Heritage, 1980), tendo-se encontrado exemplos em que parecia haver um padrão particular de associação, como associações preferenciais dependentes do sexo do indivíduo (Galperin-Lemaître *et al.*, 1980).

Se em alguns casos foram encontradas diferenças no número e distribuição das associações de indivíduo para indivíduo (Mattei *et al.*, 1976), parecendo o cromossoma 21 aquele que aparentemente participava com mais frequência em associações (Hansson e Mikelsen, 1974; Ray e Pearson, 1979), noutros não se encontrou qualquer relação entre o fenótipo do cromossoma e a sua capacidade de associação, nem tipo preferencial de associação relativamente a um cromossoma particular (Jacobs *et al.*, 1976).

Tem sido atribuido um papel muito importante às associações dos cromossomas acrocêntricos na origem de alguns tipos de anomalias cromossómicas. O mais frequente é a não-disjunção meiótica, que levando à condição de trissomia (Ferguson-Smith e Handmaker, 1961; Ohno *et al.*, 1961), originou os clássicos exemplos dos síndromes de Down e Patau (Lejeune *et al.*, 1959; Patau, 1960; Cook, 1971, 1972; Nakagome, 1973; Curtis, 1974). Cerca de 40% das trissomias letais na espécie humana têm a ver com os cromossomas portadores de NORs (Babu e Verma, 1985), sendo a maioria deles resultantes de não-disjunções na meiose materna (Jacobs e Morton, 1977; Mattei *et al.*, 1979a; Jacobs e Mayer, 1981; Babu e Verma, 1985). Outro tipo de alteração diz respeito às translocações robertsonianas (Ohno *et al.*, 1971) observadas entre cromossomas homólogos (Buys e Osinga, 1978; Zankl e Hahmann, 1978), ou entre heterólogos (Gosden *et al.*, 1978; Mattei *et al.*, 1979a; Mikkelsen *et al.*, 1980), envolvendo um cromossoma inteiro com as respectivas NORs, ou sendo o resultado de uma fusão cêntrica e eliminação das NORs. Este último tipo de translocação robertsoniana foi o mais frequentemente encontrado (Mattei *et al.*, 1979; Mikkelsen *et al.*, 1980).

Quase todos os dados sobre as associações são descritos como tendo sido obtidos a partir de observações feitas ao MO, em cromossomas umas vezes sem qualquer marcação outras marcados pela prata. Apenas se encontraram referências a observações de associações de cromossomas inteiros ao ME em dois trabalhos, um da autoria de Schwarzacher *et al.*, de 1978 e outro de Schwarzacher e Wachtler, de 1983.

II — SATÉLITES

ULTRAESTRUTURA E ASSIMETRIAS EM CROMOSSOMAS ACROCÊNTRICOS HUMANOS

Foi sempre tacitamente aceite que o satélite é uma parte do braço curto do cromossoma acrocêntrico, mas tal facto nunca foi demonstrado quantitativamente, na prática; como unidade particular do referido braço, a sua ultraestrutura tão pouco foi considerada.

ANALISE MORFOMÉTRICA E ULTRAESTRUTURAL DOS SATÉLITES EM CROMOSSOMAS ISOLADOS E LIVRES

Os linfócitos de sangue periférico, heparinizado, de 14 mulheres sãs, com idades similares (entre 20 e 30 anos), escolhidas numa população ao acaso, foram as células a partir das quais se obtiveram os cromossomas em metafase, que se pretende analisar.

Foi feito o estudo prévio dos cromossomas dessas mulheres, ao MO, marcados pelas bandas G, para nos certificarmos de que não eram portadoras de alterações numéricas ou estruturais.

ESTUDO COMPARATIVO DAS FREQUÊNCIAS COM QUE APARECEM CROMOSSOMAS LIVRES SATELITIZADOS, DOS GRUPOS D / G, QUANDO OBSERVADOS AO MO E AO MET .

Com o primeiro passo deste trabalho pretendemos verificar a veracidade da hipótese de obtenção de dados mais precisos com o MET (microscópio electrónico de transmissão) do que com o MO, e justificar desta forma, logo á partida, a substituição da microscopia óptica pela electrónica.

Métodos para obtenção das preparações cromossómicas

Técnicas gerais

a) Técnica de cultura

A que nos pareceu dar resultados melhores e mais reprodutíveis foi a derivada de Moorhead *et al.* (1960) .

As culturas foram efectuadas no meio cuja constituição é a seguinte;

Meio TC 199 (Difco)	- 7,6 ml
Fitohemaglutinina M (Difco)	- 2.0 ml
Antibióticos (Streptomicina + Penicilina)	- 0.4 ml
água destilada estéril	- 70.0 ml
Plasma humano AB	- 20,0 ml
Solução de bicarbonato de sódio a 10% (Difco)	- qb para pH=7.2-7.4

Estas culturas são em suspensão e foram feitas pondo 16 gotas de sangue total em frascos contendo 5ml de meio. Os frascos foram depois colocados à temperatura de 37°C, em estufa de incubação, durante 72 horas.

b) Bloqueio das mitoses

A paragem das metafases foi feita adicionando 0.1 ml de uma solução de colquicina a 0.5 µg/ml durante as três últimas horas. Uma vez terminada a cultura, o meio foi retirado após centrifugação a 1200 rpm durante 5 minutos.

c) Tratamento hipotónico

Seguidamente o sedimento foi sujeito a um choque hipotónico por tratamento com uma solução de KCL 0.075 M, 15 minutos, a 37°C.

Preparação dos cromossomas para observação ao MO

a) Fixação

Após nova centrifugação, durante 5 minutos, a 1200 rpm e rejeitado o sobrenadante, os cromossomas foram fixados em 4 ml de metanol-acético, na proporção de 3:1. Este tratamente durou 30 minutos, a 4°C, e foi repetido três vezes. Finalmente o fixador foi retirado após centrifugação a 1200 rpm e as células ficaram em 0.5 ml de fixador.

b) Esfregaços

Foram feitos deixando cair uma gota de suspensão das células sobre lâminas de vidro, bem limpas e desengorduradas, nas quais imediatamente antes se tinham posto uma ou duas gotas de fixador, para permitir uma melhor dispersão dos cromossomas. As preparações foram deixadas secar ao ar.

c) Bandas G - técnica adaptada por Goyanes a partir da de Seabright (1971).

Usaram-se esfregaços com dois dias, no máximo, que se sujeitaram à acção de uma solução de Tripsina (Difco) 0.05% em água destilada, a 37°C, durante um período compreendido entre 5-20 segundos. Foram em seguida tratados com soro bovino fetal (Difco) a 5% em tampão fosfato, pH=6,88, durante 5 a dez segundos. Lavaram-se como mesmo tampão e coraram-se com Giemsa a 4% em tampão fosfato, durante 5 a 6 minutos. Retirou-se o corante lavando-se com água destilada tendo-se deixado depois secar ao ar.

d) Microfotografias

Utilizou-se película Kodak: Panatomic-X film, 35 mm x 100 ft (30.5 m) para fazer os negativos; os positivos foram feitos em papel Enebrom NBD1, duro, branco brilhante da marca Negra. O revelador e o fixador usados foram Eyval de Negra.

Preparação dos cromossomas metafásicos inteiros e isolados para observação ao ME

As grelhas estão para a ME como as lâminas de vidro para a MO. Por isso é pela sua preparação que começamos:

a) Lavagem das grelhas de ME

As que foram usadas (Polaron Equipment) tinham um número de retículos igual a 200 e eram de níquel, sendo as que melhor suportam os tratamentos que envolvem Ag NO3, como aqueles que serão citados mais adiante. Foram colocadas num cadinho de porcelana com acetona, durante mais de meia hora e depois secas na estufa a 60°C.

b) Filme de plástico

Obteve-se imergindo 1gr de filme para fotografia a preto e branco, 35 mm (ph film), em 100 ml de clorofórmio. O suporte de plástico do filme ficou dissolvido e a emulsão de prata foi rejeitada. Mergulharam-se lâminas, limpas e sem gordura, na solução do filme e retiraram-se de seguida lentamente, sendo postas a secar em posição vertical, sobre papel de filtro.

c) Deposição do filme de suporte sobre as grelhas

Depois das lâminas estarem secas, cortou-se com um bisturi a película de plástico que se formou sobre elas e fez-se flutuar esta num banho de água, mergulhando muito lentamente as lâminas que ainda a retinham, segundo um ângulo de 45°. Sobre a película flutuante foram postas as grelhas de níquel que, além de lavadas, tinham imediatamente antes sido mergulhadas durante 2 a 3 segundos numa solução feita com 4 a 6 cm de Tesa-Film e 2 ml de clorofórmio e deixadas quase secar. A sua deposição sobre o filme ainda húmidas, deve-se ao facto da solução lhes conferir uma certa viscosidade e por conseguinte, mais fácil aderência. As grelhas foram secas em estufa, a 60°C, durante 2 h, sendo depois guardadas em suportes próprios, até serem utilizadas.

d) Isolamento dos cromossomas inteiros (técnica de Gall, DuPraw e Bahr, 1971), adaptada por Goyanes (1985b)

Para este passo do método foi necessário preparar uma solução tampão isolante constituida por:

100 ml de água destilada
120 mg de $Mg\ Cl_2$
1 gr de ácido cítrico
1 ml de Triton X-100

e se mantém guardada no frigorífico a 4°C, só se devendo utilizar um dia depois de ser preparada. A técnica para obtenção dos cromossomas em metafase foi a mesma que se usou para a MO, até ao choque hipotónico. Logo após este tratamento, as células foram centrifugadas a 1200 rpm durante 5 minutos, sendo o sobrenadante rejeitado e o sedimento celular coberto com 2 ml de tampão isolante, previamente aquecido. Deixou-se actuar 30 minutos. Após nova centrifugação a 1200 rpm por 5 minutos e o tampão rejeitado, o sedimento foi ressuspendido em 0.3 ml de líquido isolante. Os cromossomas foram então isolados aspirando-se a suspensão com uma seringa do tipo das de insulina e fazendo-a passar por uma agulha de calibre 22 de que a seringa estava munida. Esta operação foi repetida 7-10 vezes. A qualidade do isolamento foi controlada por observação dos cromossomas ao MO, em contraste de fase. Quando se considerou o isolamento suficiente, juntou-se tampão até completar 1 ml e os cromossomas foram ressuspendidos.

e) Centrifugação dos cromossomas isolados, sobre as grelhas

Recobriu-se o fundo de cada um de vários recipientes cilíndricos de 2 cm de diâmetro, com um disco de papel de filtro e adicionaram-se 2 ml de tampão isolante fresco; sobre cada disco dispuseram-se 4 a 5 grelhas preparadas como foi indicado. Na superfície do líquido isolante depositou-se 1 ml da suspensão de cromossomas isolados e centrifugou-se a 2000 rpm durante 5 minutos. O tampão foi retirado por aspiração, tendo-se deixado apenas o suficiente para manter a humidade dos cromossomas depositados nas grelhas. Estas foram então retiradas, uma a uma, com pinças de ME e secas. A

operação de secagem foi feita soprando-se até que macroscopicamente a grelha não apresentasse qualquer humidade; é uma operação muito delicada sendo o controlo da secagem muito importante, uma vez que ultrapassado o ponto exacto a estrutura dos cromossomas fica alterada. Este controlo é tanto mais correcto quanto maior for a experiência de quem faz a secagem. Seguidamente cada grelha foi desidratada sendo para isso imersa, primeiro num banho de etanol a 50%, durante 2 minutos, seguido de 2 banhos de etanol a 75%, 5 minutos cada, 2 banhos de etanol a 100%, 5 minutos cada e finalmente passaram para 2 de acetato de amilo, 5 minutos em cada. Foram secas ao ar estando os cromossomas prontos agora para serem observados e fotografados, ou serem submetidos primeiro às técnicas que posteriormente iremos referindo, conforme a análise que se pretender fazer.

f) Microfotografia

O microscópio utilizado foi um Zeiss 109 Turbo, operado a 50 KV, sendo as microfotografias feitas com uma ampliação de 1200 X. Para os negativos usou-se a película Agfa-Ortho 25 e para os positivos o mesmo papel que se utilizou para a MO. O revelador e o fixador foram da marca Rodinal-Valca Universal.

Valorização estatística da análise qualitativa entre duas amostras.

Para os dados qualitativos do estudo comparativo das frequências com que aparecem cromossomas satelitizados, D e G, quando observados ao MO e ao ME, foram feitos os seguintes cálculos estatísticos:

- **Determinação da semi-amplitude da amostra para um grau de confiança de 95% .**

  χ^2 para comparação entre duas amostras.

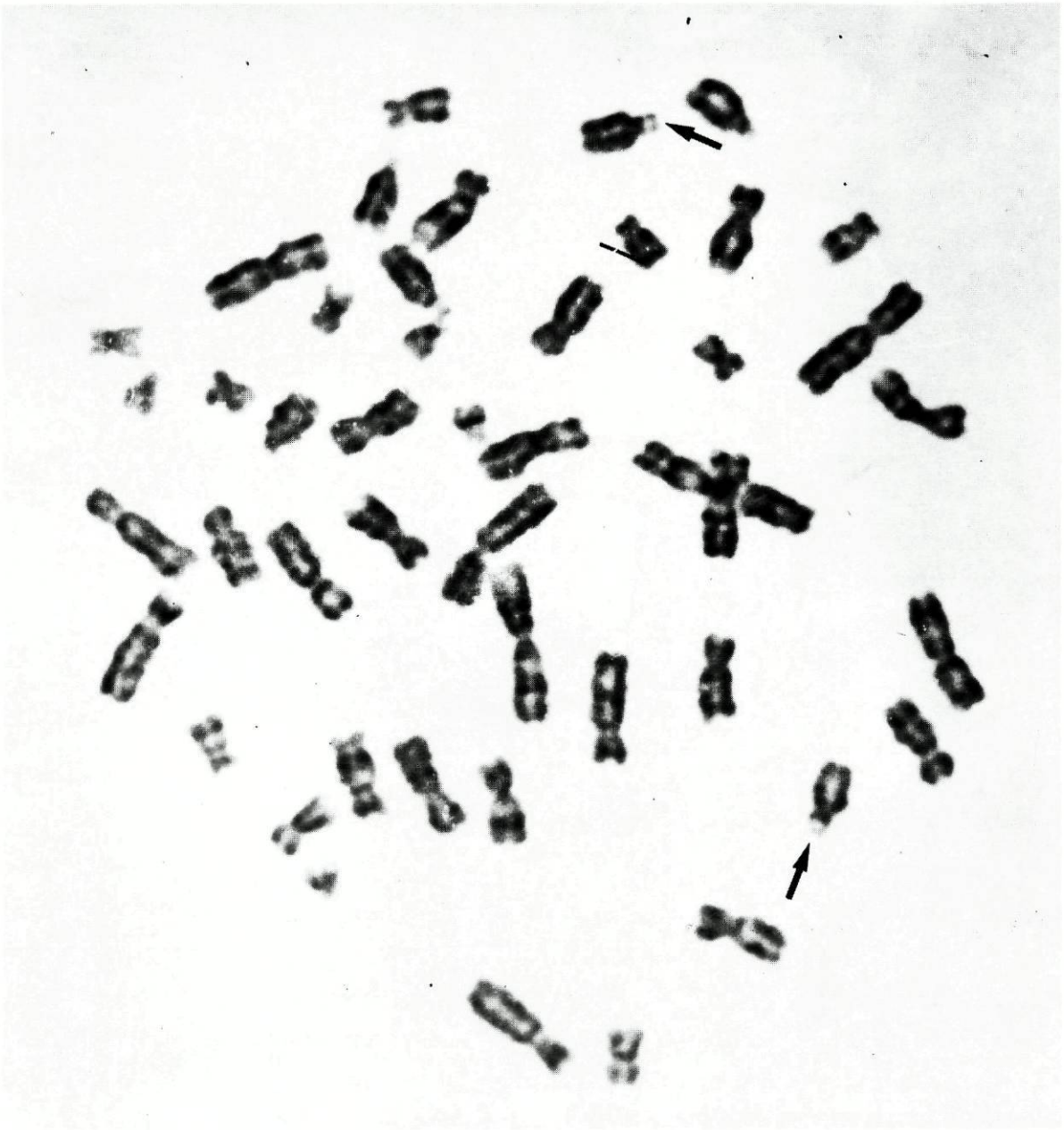


Fig.1 - Cromossomas em metafase marcados pelas bandas G, portadores de satélites (setas) observados ao MO.

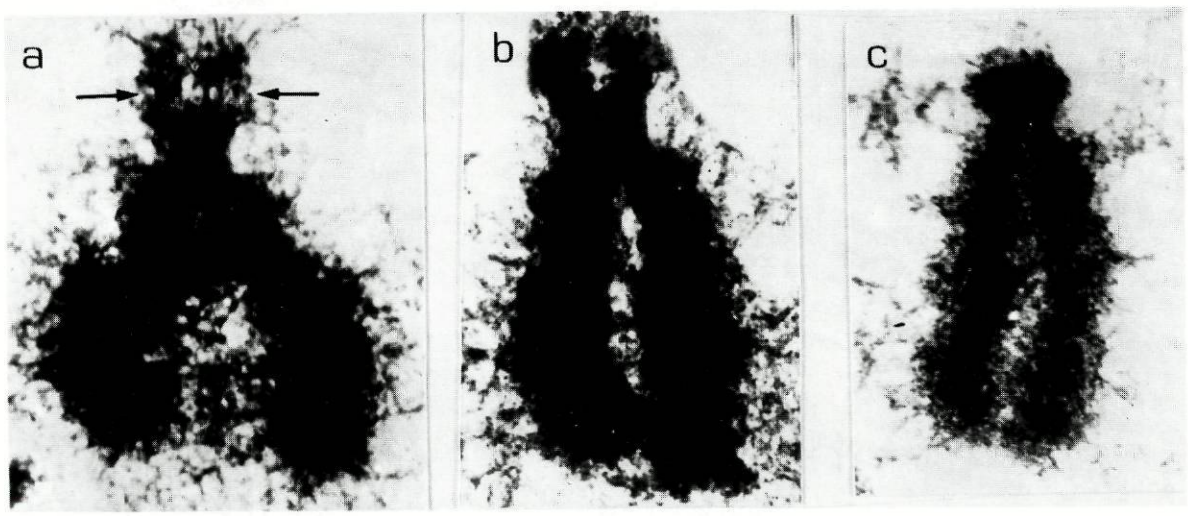


Fig. 2 - Variações ultraestruturais da região telomérica do braço curto dos cromossomas acrocêntricos humanos: cromatina telomérica organizada em satélites ligados aos braços curtos por uma zona filamentosa, a haste (**a**); ocasionalmente os satélites podem aparecer ligados directamente ao braço curto (**b**); mais frequentemente a ausência da haste envolve a não existência de satélites (**c**).

Uma vez obtidas as preparações quer para MO quer para ME, passou-se à análise das frequências dos cromossomas satelizados, que foi feita por observação directa dos cromossomas e sobre microfotografias correspodentes. Para a MO aproveitaram-se as preparações utilizadas para a confirmação da normalidade cromossómica das dadoras.

Através de um estudo desta natureza pode-se distinguir dois tipos de cromossomas acrocêntricos, dentro dos grupos D e G: um em que os braços curtos são portadores de satélites e outro sem satélites.

O critério que se usou para distinção destes dois tipos, em MO e ME, foi o seguinte:

- **um acrocêntrico é considerado como dotado de satélite, quando é visível a constrição secundária entre o braço curto e o satélite, o qual se situa numa posição telomérica** (Fig 1, 2a e b)

Os resultados obtidos estão resumidos nos Quadros seguintes:

Quadro 1 - Frequência de cromossomas acrocêntricos livres com satélites numa população de 14 indivíduos do sexo feminino; estudo feito em 871 cromossomas, observados ao MO.

Grupo de Cromossomas	Nº de Cromossomas		Frequência de s+
	Observados	c/ s+	
D	532	138	0.25939 ± 0.037240
G	339	102	0.30088 ± 0.048804
D + G	871	240	0.27554 ± 0.029660

χ^2 baseado em 2 grupos (D e G): $0.10 < P < 0.20$

$\chi^2 = 1.7851$ (não significativo)

Quadro 2 - Frequência de cromossomas acrocêntricos livres com satélites numa população de 14 indivíduos do sexo feminino; estudo feito em 167 cromossomas, observados ao ME.

Grupo de Cromossomas	Nº de Cromossomas		Frequência de s+
	Observados	c/ s+	
D	120	50	0.41667 ± 0.08828
G	47	25	0.53191 ± 0.14265
D + G	167	75	0.44910 ± 0.07543

χ^2 baseado em 2 grupos (D e G): $0.10 < P < 0.20$

$\chi^2 = 1.81099$ (não significativo)

Quadro 3 - Frequência de cromossomas acrocêntricos livres com satélites nas 2 populações: uma observada ao MO e outra observada ao ME.

Grupo de Cromossomas	Nº de Cromossomas		Frequência de s+
	Observados	c/ s+	
MO (D+G)	871	240	0.27554 ± 0.029660
ME (D+G)	167	75	0.44910 ± 0.07543
TOTAL	1038	315	0.30347 ± 0.027994

χ^2 baseado em 2 grupos (MO e ME): $P < 0.001$

$\chi^2 = 20.32787$ (altamente significativo)

Como se pode ver pelos Quadros apresentados, nem na população observada ao MO nem na observada ao ME existe uma diferença significativa das frequências de cromossomas satelizados livres, entre os grupos D e G.

Mas já é altamente significativa a diferença entre as frequências dos referidos grupos encontradas numa e noutra população, isto é, ao MO e ao ME.

A frequência de cromossomas D e G com satélites, ao ME, é praticamente o dobro da frequência encontrada ao MO.

* *

Na revisão bibliográfica que fiz não encontrei nenhum trabalho em que tivesse sido feita a avaliação da frequência de cromossomas com satélites, ao ME, e por consequência não parece provável haver algum que refira a comparação de frequências feita.

Relativamente à MO, encontrei apenas um trabalho, no qual foi feito um estudo da percentagem de cromossomas acrocêntricos (D e G) com satélites (Ferguson-Smith e Handmaker, 1961). O valor encontrado por estes dois investigadores foi de 68% ± 2.34; o nosso porém é, também ao MO, de 41,3% ± 3.3.

A diferença entre estes valores pode ser devida a utilização de critérios distintos relativamente à identificação dos cromossomas acrocêntricos satelizados. Para Ferguson-Smith um cromossoma com satélite era "quer aquele que apresentava uma constrição secundária com nós de cromatina projectados dos braços curtos e ligados a eles por um pedúnculo delgado (haste), quer aqueles que mostravam clara evidência de heteropicnose negativa nos extremos dos mesmos braços". Para o nosso trabalho, só são considerados portadores de satélites os cromossomas nos quais a constrição secundária e os nós cromatínicos estão perfeitamente diferenciados. Além disso a população de mulheres escolhida por Ferguson-Smith não era idêntica à nossa: era constituida por cinco, sendo três sãs e duas com aplasia gonadal; destas duas, uma tinha cromatina de Bahr positiva e outra negativa.

Quando fazemos a avaliação comparativa da frequência de satélites em cromossomas inteiros e isolados ao ME, ou ao MO, os cromossomas satelitizados são mais frequentemente detectados ao ME. Isto deve-se ao grande poder de resolução deste microscópio, que permite uma melhor diferenciação de regiões como os satélites que, estando no limite do poder de resolução do MO, podem ocasionalmente não ser visíveis.

Embora à MO, a presença da haste, ou zona filamentosa, seja necessária para identificar claramente o satélite na posição terminal, à ME não é indispensável a sua existência. Observando os cromossomas quer directamente ao ME quer depois de fotografados, podemos ver neste estudo que, embora na maioria dos casos o satélite esteja ligado ao respectivo braço curto por uma haste claramente reconhecível, alguns cromossomas apresentam os satélites directamente ligados ao braço.

ANÁLISE MORFOLÓGICA DOS SATÉLITES QUANDO OBSERVADOS AO ME.

Identificamos os satélites como estruturas teloméricas, irregularmente esféricas e morfologicamente distintas da parte restante do braço curto, com uma estrutura complexa, como se fossem constituidos por fibras de cromatina dispostas em alças girando sobre si mesmas, cujo percurso não é aliás possível seguir.

Na sua extremidade surgem algumas fibras, com diâmetro igual às que constituem a parte restante do cromossoma (24 nm, uma vez que sofreram a acção do soluto hipotónico), como que saindo do corpo do satélite e dobrando-se, regressam a ele contribuindo assim para a sua forma irregular. O mesmo foi verificado anteriormente nos telómeros e de uma forma geral, em todo o corpo dos cromossomas sempre que estes eram sujeitos a tratamentos de hipotonia, antes de serem fixados (DuPraw, 1965; DuPraw e Bahr, 1969; Bahr, 1970; Mouriquand *et al.*, 1972; Wolff *et al.*,1974; Schwarzacher, 1976; Goyanes, 1985a), os quais provocam, como foi dito na introdução, um certo relaxamento no enrolamento das fibras e espessamento das mesmas. Esse relaxamento traduz-se no aparecimento de alças da fibra que se projetam para fora do cromossoma (DuPraw, 1965; DuPraw *e Bahr, 1969; Bahr, 1970; Mouriquand et al.*, 1972; Schwazacher, 1976; Goyanes, 1985a) e dão-lhe o

aspecto cilíndrico irregular tão conhecido desde 1963/66 (Gall, 1963/66; DuPraw, 1965).

Na ausência da haste, os satélites aparecem-nos separados do braço curto apenas por uma constrição (a constrição secundária), a qual não apresenta o aspecto fibroso característico, com as fibras de cromatina numa disposição longitudinal, paralela ao eixo vertical do cromossoma. é esta disposição das fibras, cujo diâmetro parece ser de 5-7 nm (Hsu *et al.*, 1967; Matsui *et al.*, 1986), que define a haste (Colomb e Bahr, 1974; Schwarzacher, 1976; Goyanes, 1985a).

ESTUDO QUANTITATIVO DAS DIFERENTES REGIÕES DOS CROMATíDEOS DE CROMOSSOMAS ACROCÊNTRICOS, COM OU SEM SATÉLITES VISíVEIS (SATÉLITE, HASTE, BRAÇO CURTO, CENTRÓMERO E BRAÇO LONGO).

A análise consistiu na avaliação das áreas , em μ^2, das várias partes que constituem cada cromatídeo quer dos cromossomas do grupo D quer do grupo G (**q** = braço longo, **cent** = centrómero, **p** = braço curto, **h** = haste, **s** = satélite). Estes valores foram convertidos em áreas relativas, dividindo cada valor pela área total do cromatídeo. As determinações foram feitas em fotografias de cromossomas inteiros e isolados pelos métodos já descritos, e fotografados ao ME, com uma ampliação de 12.000×. Como termo de comparação, foram também fotografadas, nas mesmas condições, bolas de latex com um diâmetro padrão de 0.109 μ (suspensão comercializada E.F. Fullard Inc.).

Para calcular as áreas das diferentes partes dos cromatídeos, e uma vez que a sua forma era facilmente delineável, desenharam-se os contornos em papel milimétrico transparente. Sobre este desenho colocou-se uma matriz que consiste numa folha transparente sobre a qual existe um sistema de 1029 pontos equidistantes de 0.25 cm, dispostos em linhas horizontais e linhas verticais (49 x 21). Para o cálculo de **"q"** o sistema foi de 1161 pontos equidistantes de 0.5 cm, com disposição 27 x 43. A matriz foi colocada ao acaso sobre cada desenho e a partir da contagem dos pontos incluidos nas diferentes partes do cromatídeo, determinaram-se as suas áreas.

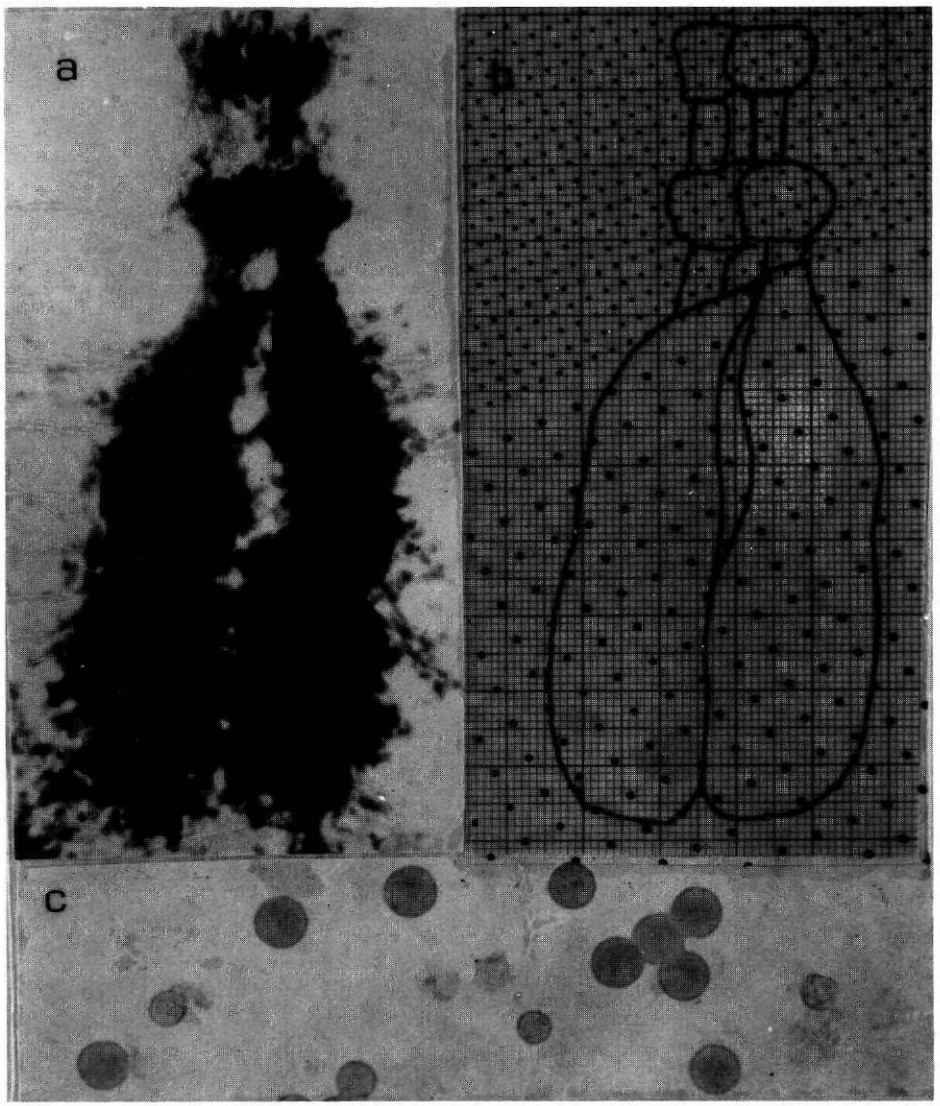


Fig.3 – Cromossoma fotografado ao ME com uma ampliação de 12,000x (a); matrizes colocadas sobre o desenho do cromossoma nas respectivas regiões - s, h, p e cent; Pontos (0,25 cm) (21 x 49) matriz (0,0625 cm^2) Total 1029 pontos; - para q; Pontos (0,5 cm) (29 x 43) matriz (0,25 cm^2) Total 1247 pontos (b); bolas de latex de 0,109 μ de diâmetro fotografadas com a mesma ampliação.

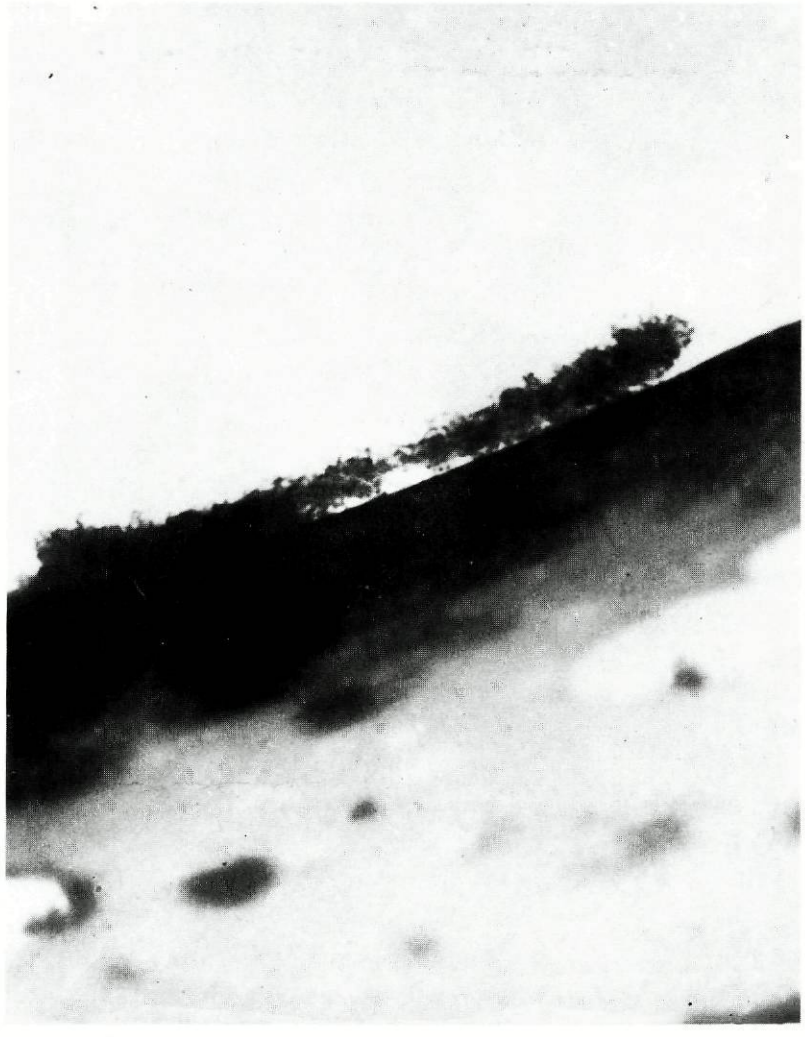


Fig.4 - Observação lateral de um cromossoma em metafase (metacêntrico), inteiro, preparado pelo método descrito neste trabalho com a sua estrutura tridimensional estabilizada.

Para expressar os seus valores reais (em μ^2), fez-se a conversão dos dados obtidos a partir das microfotografias usando os valores do diâmetro médio das bolas de latex cujo valor real se conhece (0.109μ) (Fig 3). Em adenda encontram-se as determinações realizadas para cada cromossoma.

Como neste estudo se pretende uma análise precisa das diferentes partes do cromossoma acrocêntrico, as amostras foram seleccionadas de forma que os cromossomas a estudar tivessem o mesmo grau de condensação.

Também pela mesma razão foram tiradas fotografias de cromossomas vistos lateralmente, ficando demonstrado que os métodos usados não alteravam a sua morfologia (Fig.4).

Valorização estatística da análise quantitativa entre duas amostras.

Os cálculos estatísticos, realizados para a valorização dos dados quantitativos, foram:

- **Determinação da semi-amplitude da amostra para um grau de confiança de 95% .**
- **Verificação da distribuição normal**
- **Teste F**
- **Teste t**

*

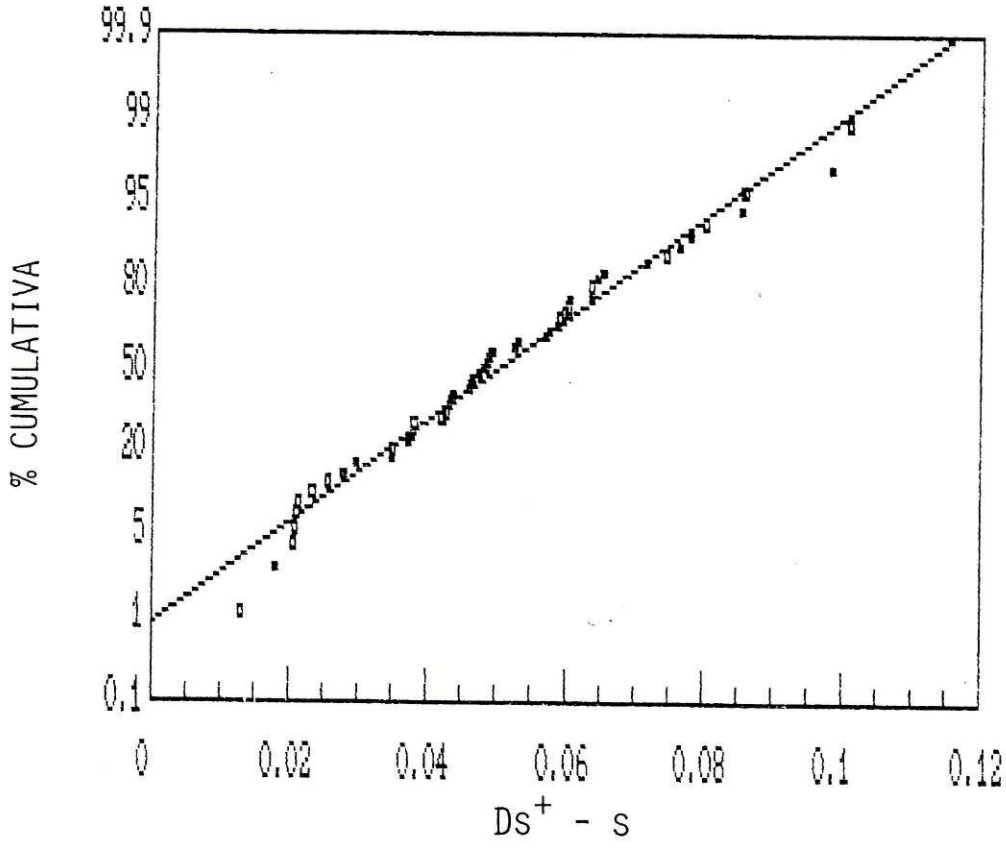
Os Quadros I e II representam, no seu conjunto e de forma resumida, a análise das diferentes regiões dos cromatídeos dos cromossomas acrocêntricos com ou sem satélites visíveis. As áreas relativas das várias partes que constituem os cromatídeos (Quadro II) foram calculadas a partir de amostras com uma distribuição normal (Figs. 5 a 22 - Diagramas de dispersão das áreas relativas).

			Área média relativa
Grupo D	s+	q	0.8597 ± 0.0071
		cent	0.0200 ± 0.0027
		p	0.0641 ± 0.0063
		h	0.0060 ± 0.0015
		s	0.0503 ± 0.0057
		p + h + s	0.1203 ± 0.0062
	s-	q	0.8653 ± 0.0082
		cent	0.0217 ± 0.0026
		p	0.1130 ± 0.0073
Grupo G	s+	q	0.7336 ± 0.0122
		cent	0.0350 ± 0.0031
		p	0.1231 ± 0.0110
		h	0.0116 ± 0.0016
		s	0.0967 ± 0.0090
		p + h + s	0.2314 ± 0.0120
	s-	q	0.7419 ± 0.0150
		cent	0.0345 ± 0.0049
		p	0.2237 ± 0.0130

Quadro I - Área média relativa das diferentes partes dos cromossomas acrocêntricos humanos calculadas em 4 amostras: cromatídeos D com satélite (n=51), sem satélite (n=37), cromatídeos G com satélite (n=59), e sem satélite (n=26).

DIAGRAMAS DE DISPERSÃO

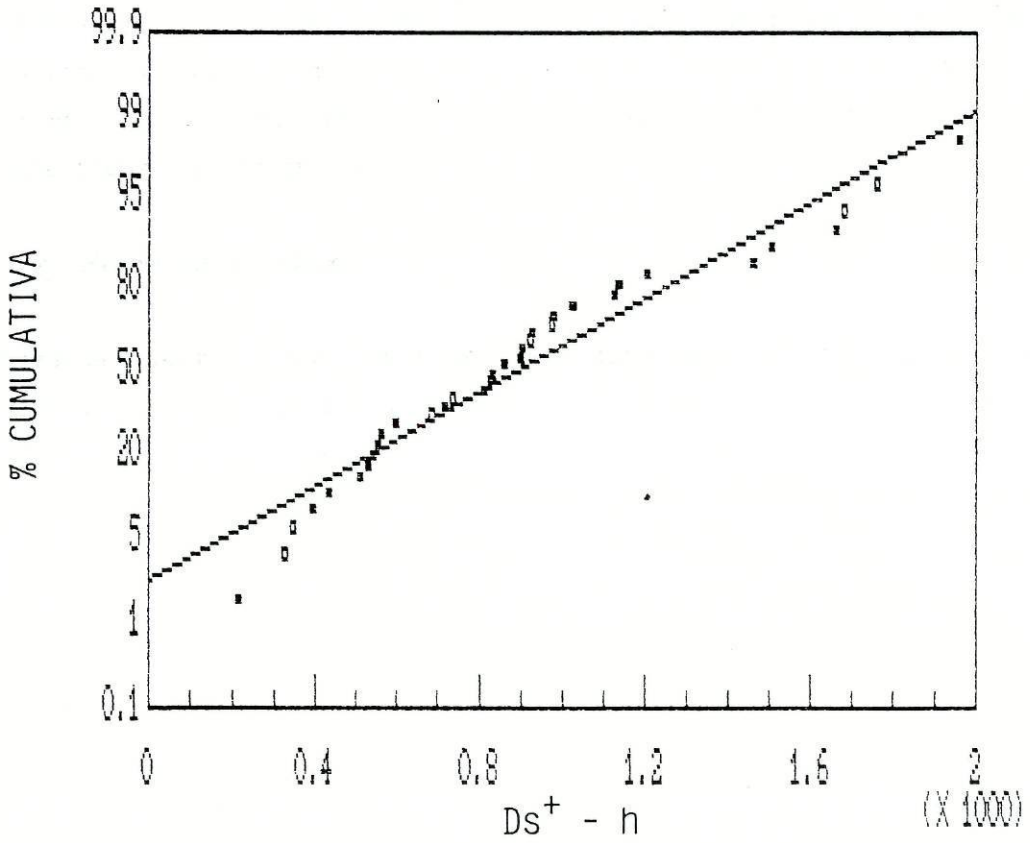
Fig.5



Teste Kolmogorov-Smirnov (1 amostra): 0.0878246

Nível de significância: 0.999986

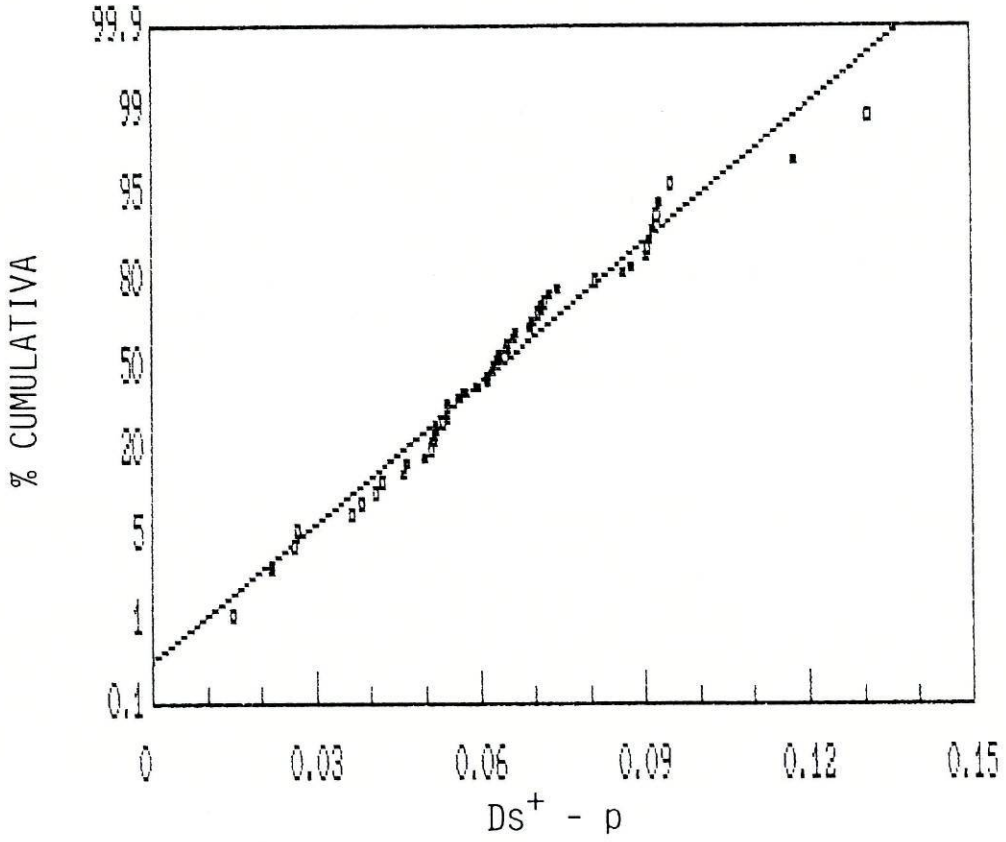
Fig.6



Teste de Kolmogorov-Smirnov (1 amostra): 0.135984

Nível de significância: 0.998767

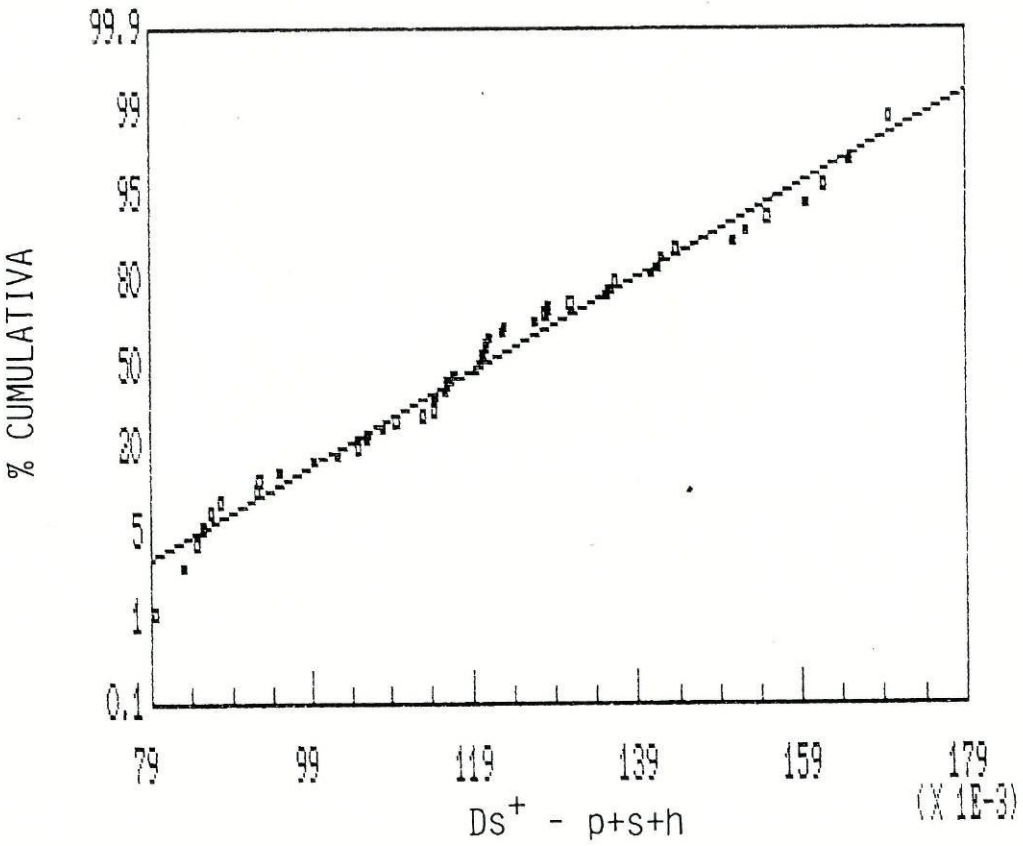
Fig.7



Teste Kolmogorov-Smirnov (1 amostra): 0.096035

Nível de significância: 0.999899

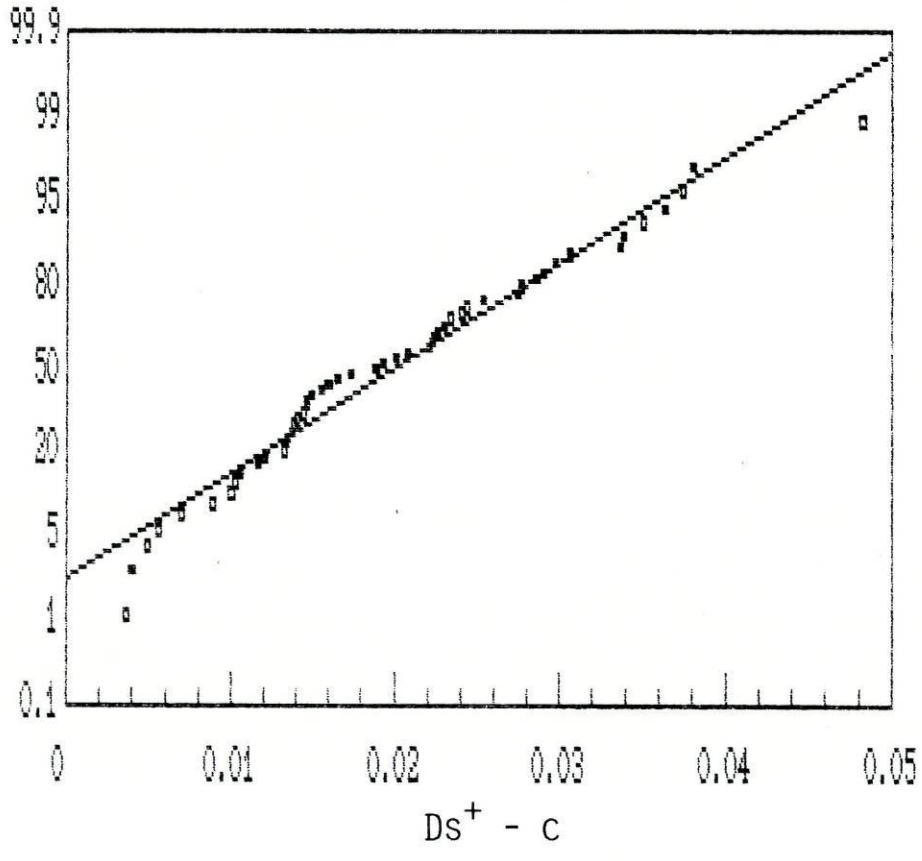
Fig.8



Teste Kolmogorov-Smirnov (1 amostra): 0.101045

Nível de significância: 0.999734

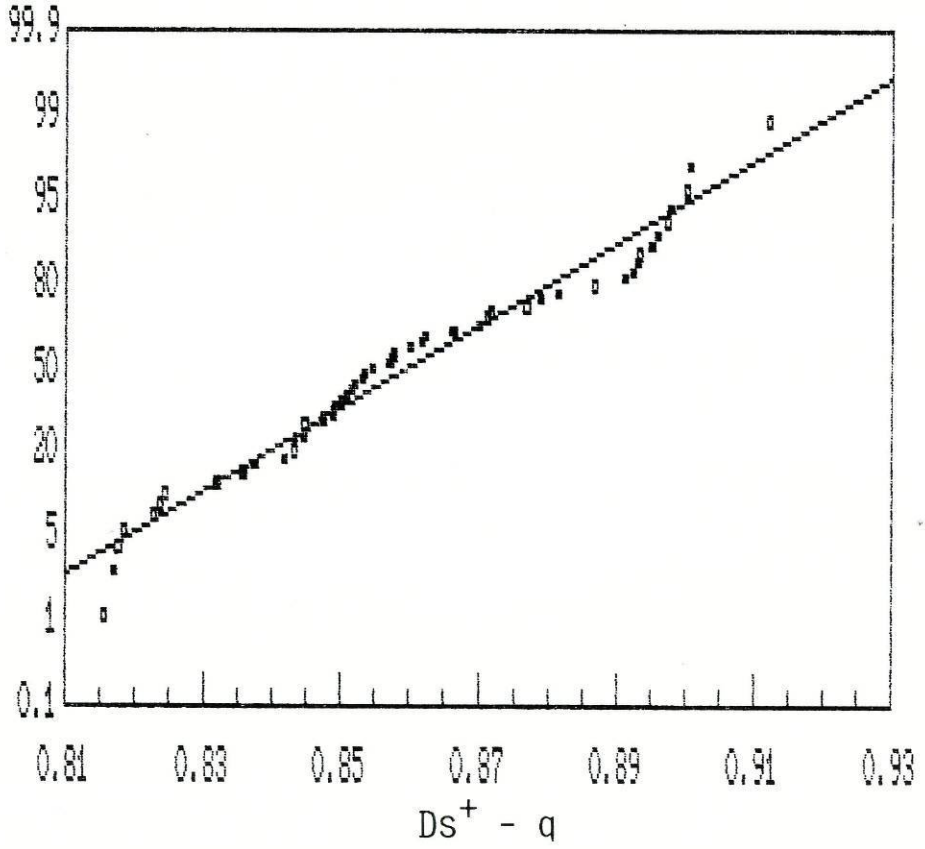
Fig.9



Teste de Kolmogorov-Smirnov. (1 amostra): 0,106798

Nível de significância: 0.99932

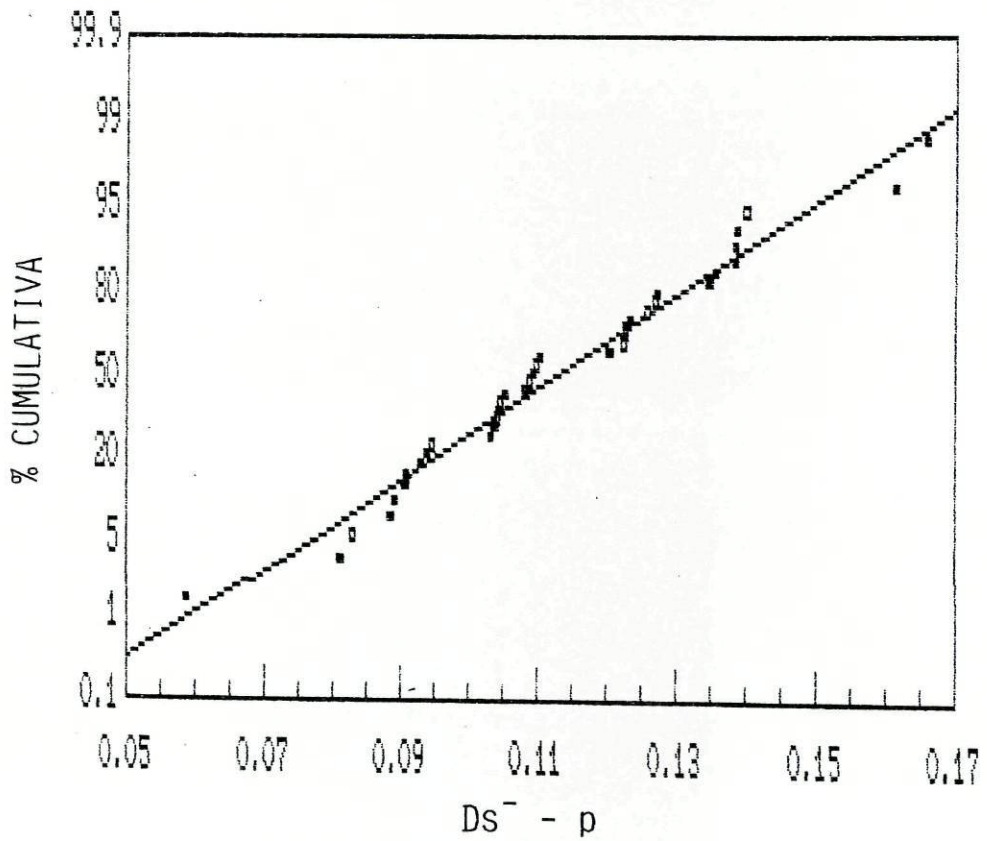
Fig.10



Teste de Kolmogorov-Smirnov. (1 amostra): 0,0981993

Nível de significância: 0.999592

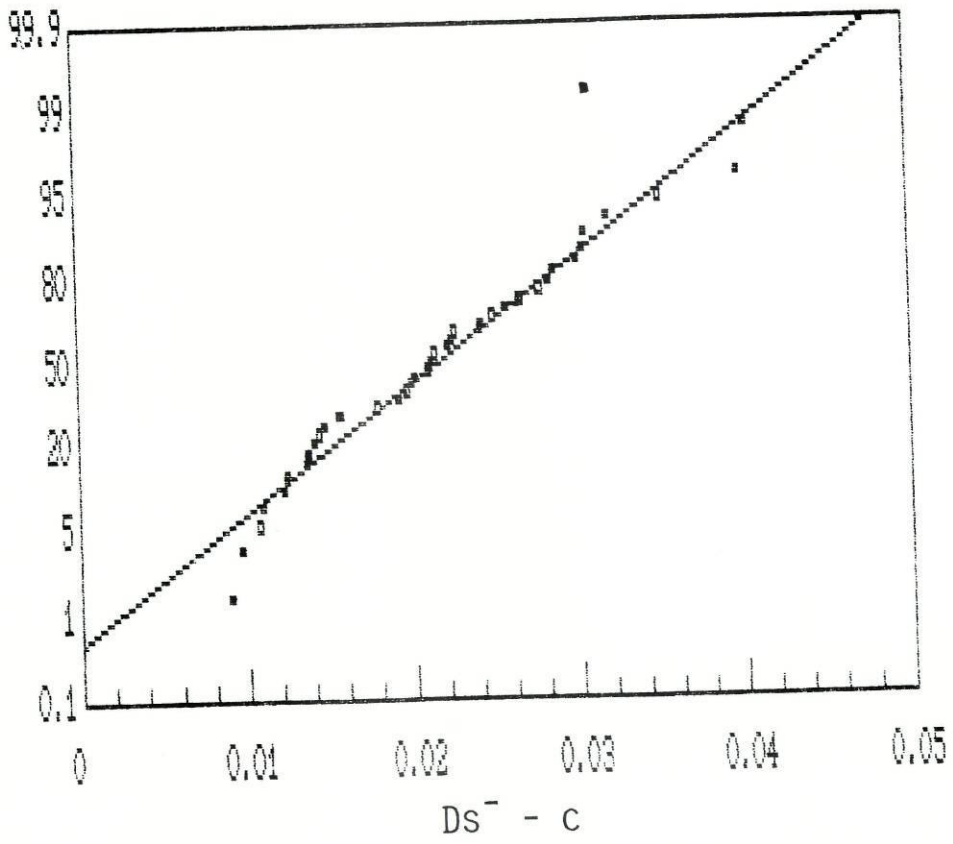
Fig.11



Teste de Kolmogorov-Smirnov. (1 amostra): 0.114606

Nível de significância: 0.99986

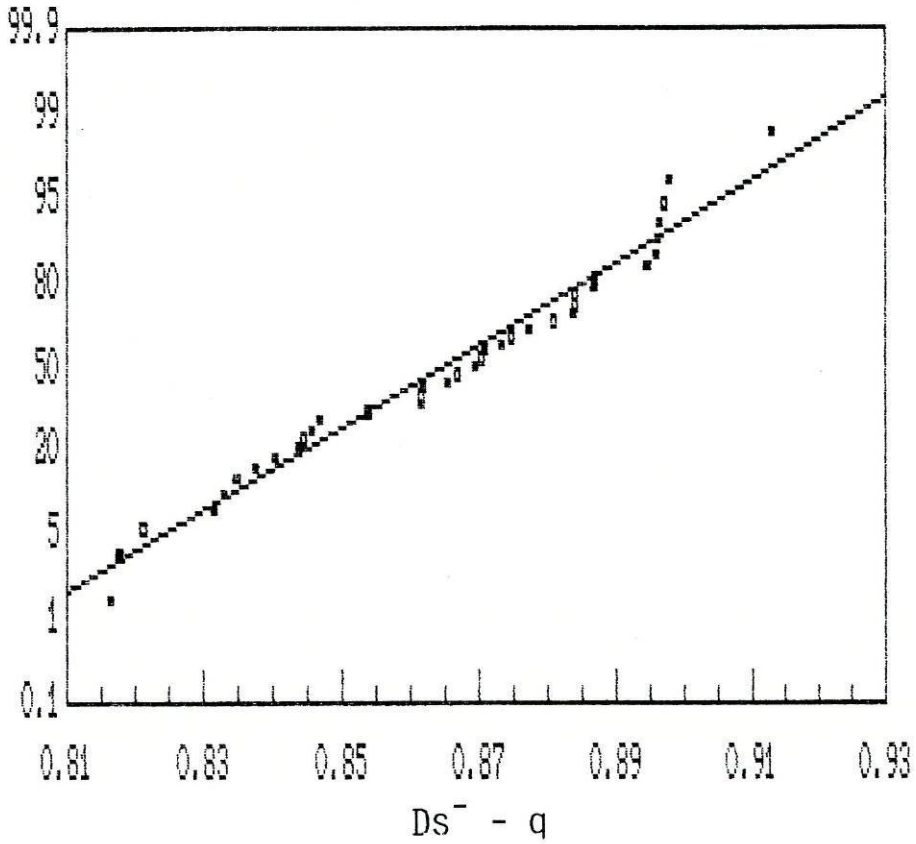
Fig.12



Teste de Kolmogorov-Smirnov. (1 amostra): 0.099201

Nível de significância: 0.999995

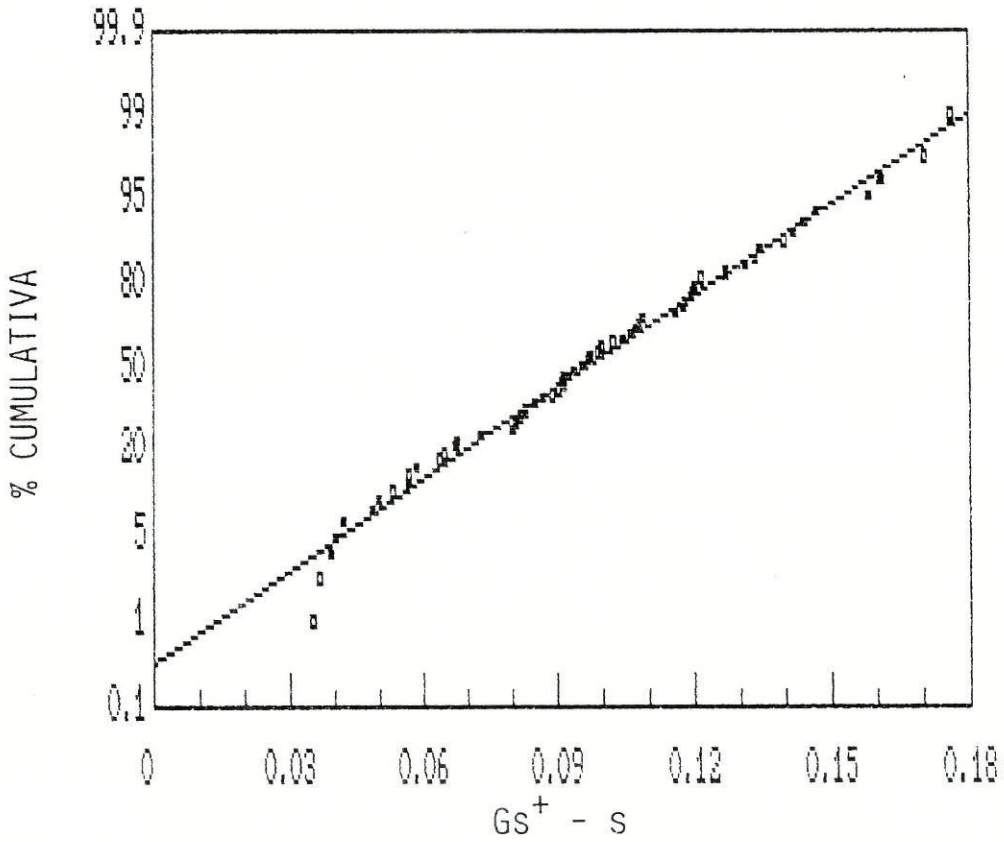
Fig.13



Teste de Kolmogorov-Smirnov. (1 amostra): 0.0895189

Nível de significância: 1,0

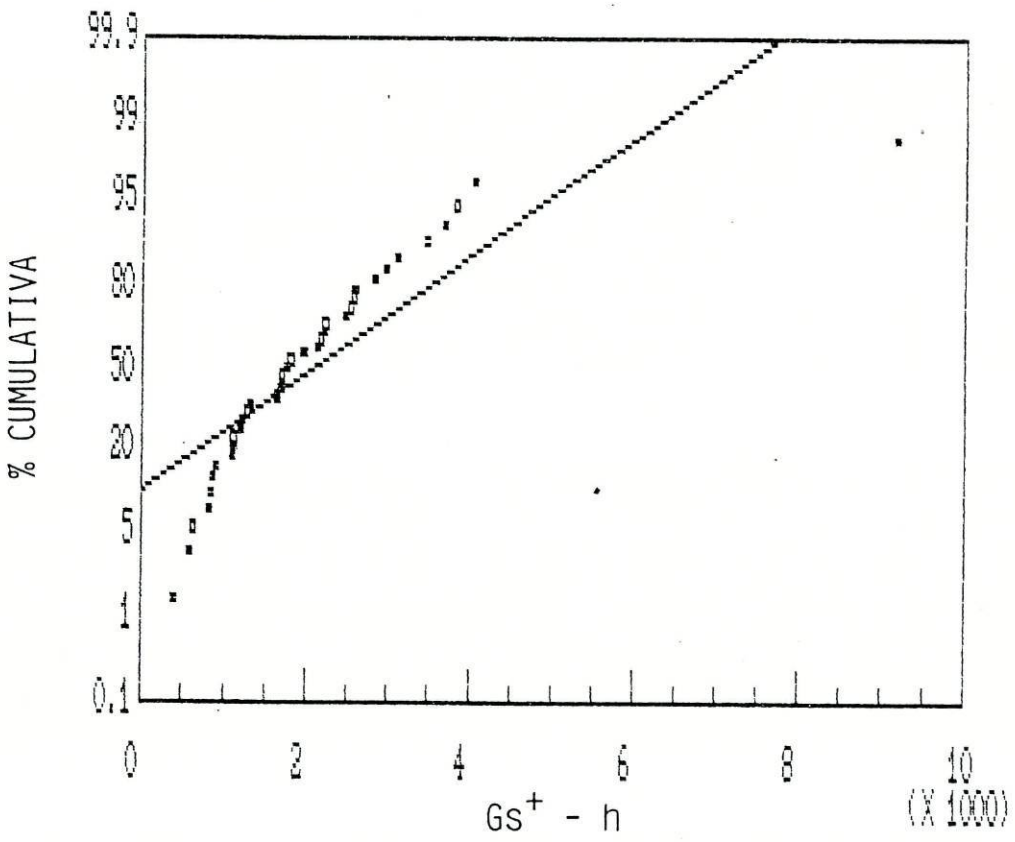
Fig.14



Teste Kolmogorov-Smirnov (1 amostra): 0.051465

Nível de significância: 1

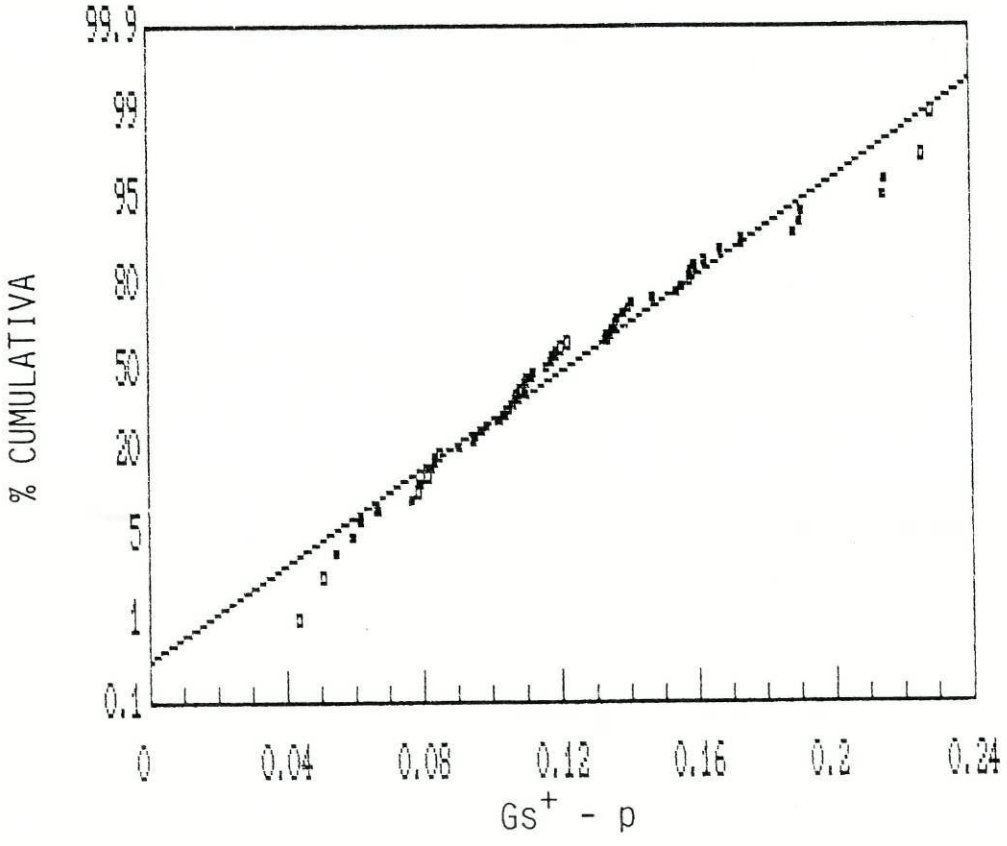
Fig.15



Teste Kolmogorov-Smirnov (1 amostra): 0.159661

Nível de significância: 0.30218

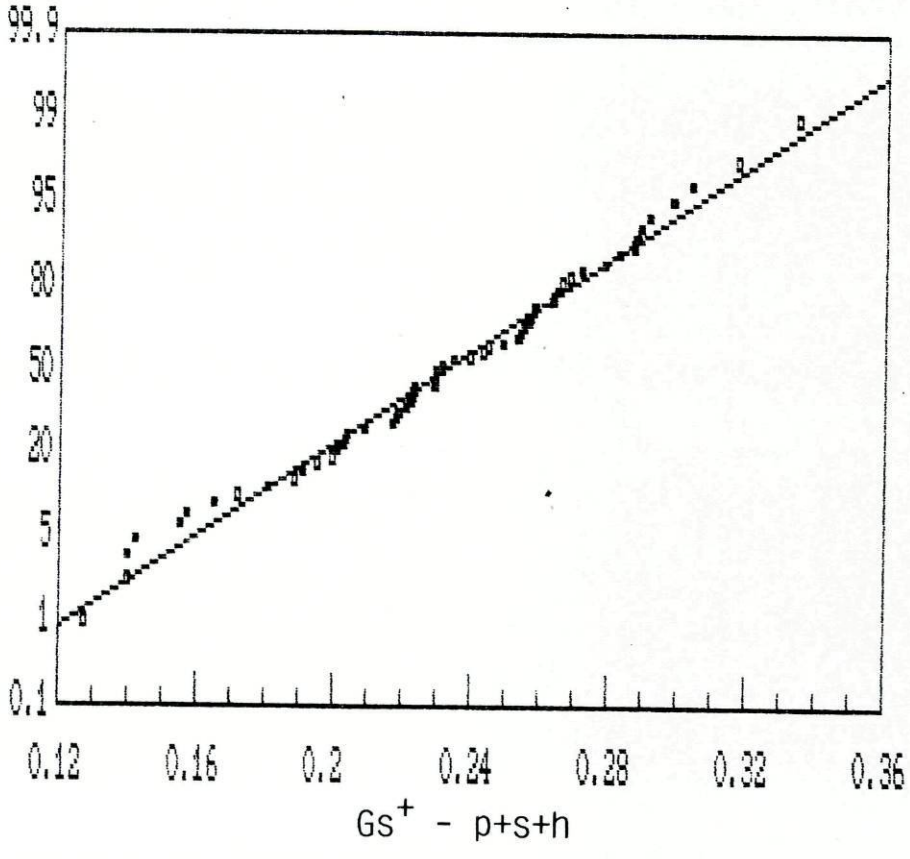
Fig.16



Teste Kolmogorov-Smirnov (1 amostra): 0.102428

Nível de significância: 0.998901

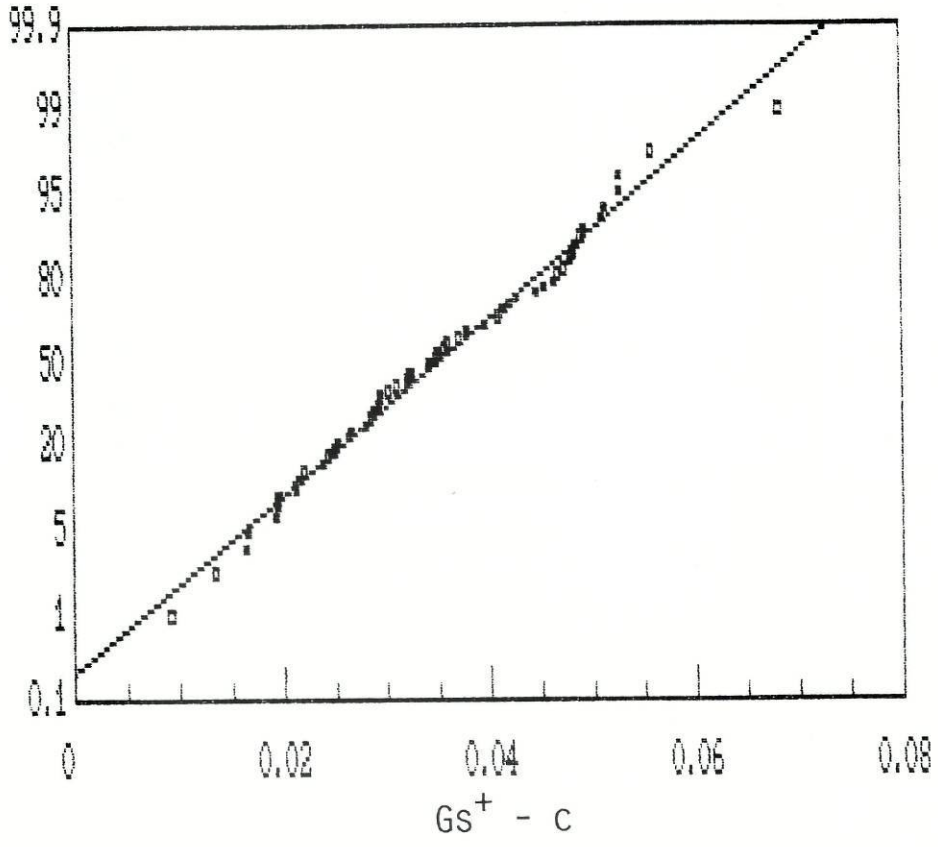
Fig.17



Teste de Kolmogorov-Smirnov. (1 amostra): 0,0470156

Nível de significância: 0,999999

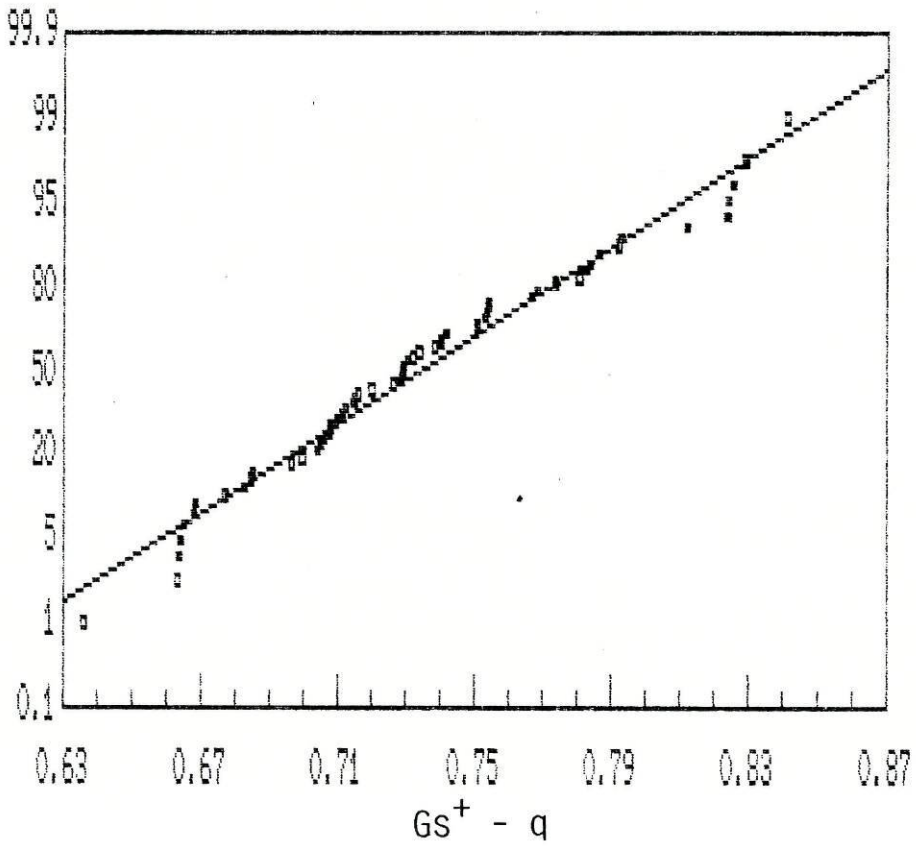
Fig.18



Teste de Kolmogorov-Smirnov. (1 amostra): 0,06779

Nível de significância: 1,0

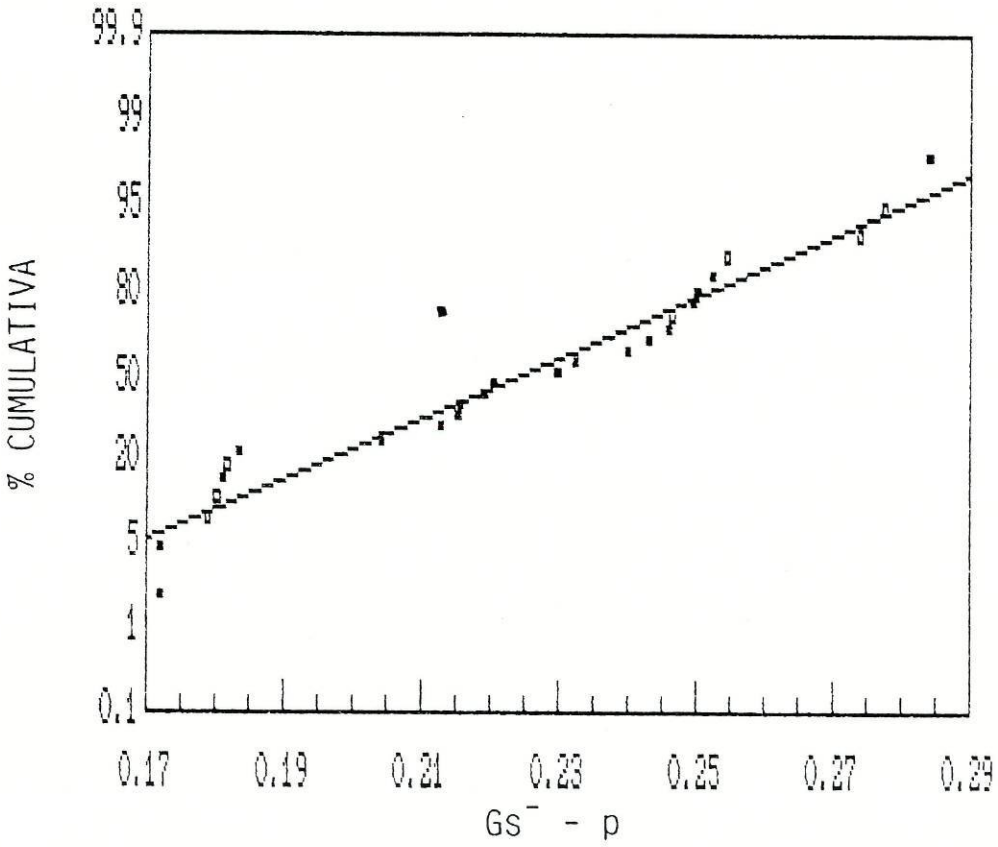
Fig.19



Teste de Kolmogorov-Smirnov. (1 amostra): 0,0800932

Nível de significância: 0.999991

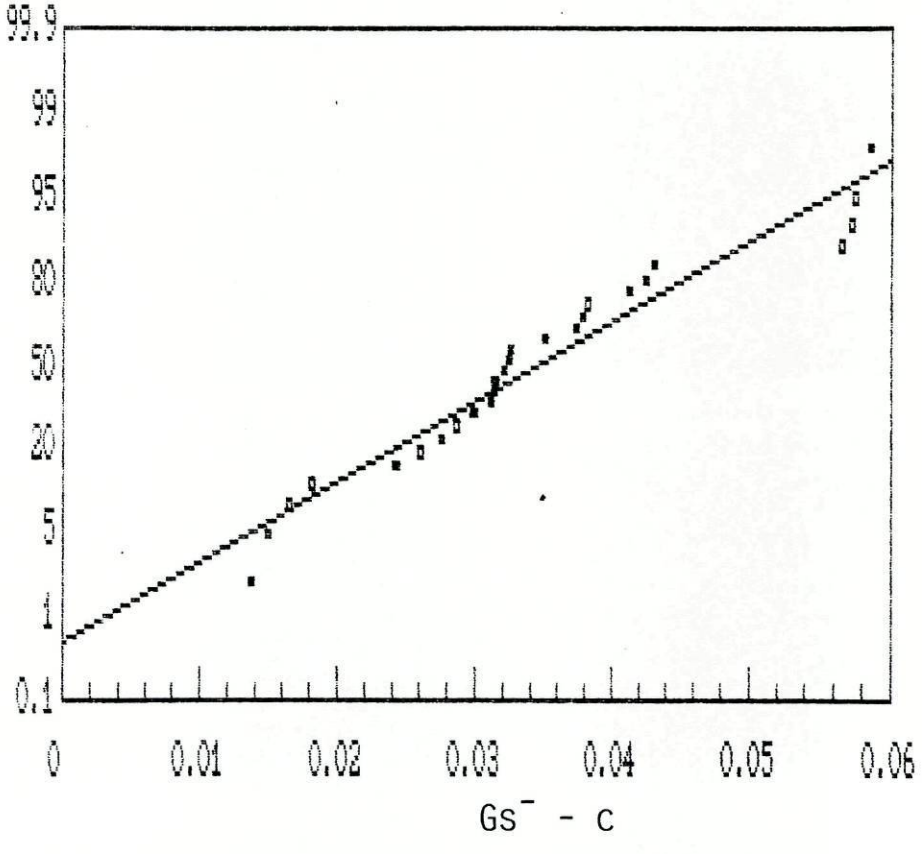
Fig.20



Teste Kolmogorov-Smirnov (1 amostra): 0.150151

Nível de significância: 0.999277

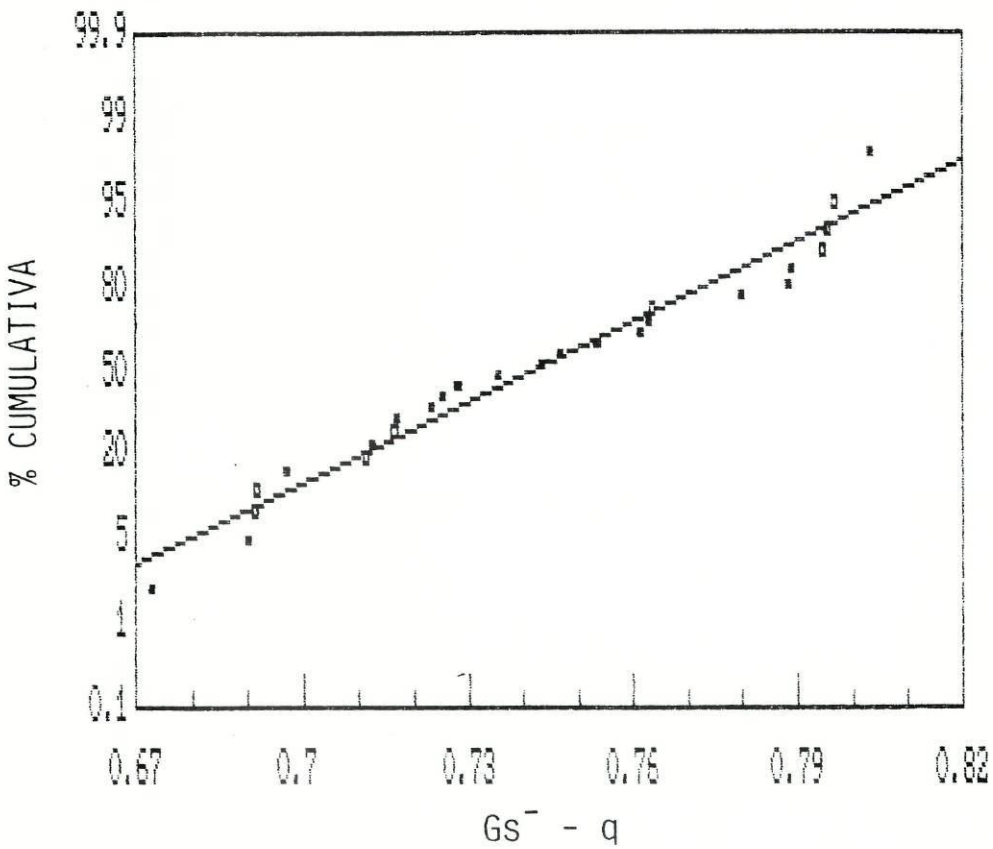
Fig.21



Teste de Kolmogorov-Smirnov. (1 amostra): 0,136523

Nível de significância: 0,999864

Fig.22



Teste de Kolmogorov-Smirnov. (1 amostra): 0,0998532

Nível de significância: 0.999998

	Séries comparadas (s+ vs s-)	Teste F	Teste t
Grupo D	q vs q	1.03077 *	1.02004 *
	cent vs cent	1.42847 *	0.86086 *
	p vs p	1.01961 *	10.09280 **
	p+h+s vs p	1.00000 *	1.51867 *
Grupo G	q vs q	1.49673 *	0.78104 *
	cent vs cent	1.06667 *	0.18796 *
	p vs p	1.67241 *	10.47905 **
	p+h+s vs p	1.66667 *	0.76564 *

* não significativo

** altamente significativo (P < 0.001)

Quadro II - Estudo comparativo das áreas médias relativas das diferentes partes dos cromatídeos dos cromossomas acrocêntricos entre 2 populações com satélite e sem satélite.

* *

O sistema de preparação dos cromossomas que usámos supõe um período de 20-30 minutos num isolante ácido, o qual estabiliza as alças de cromatina entre si, preservando deste modo a estrutura dos cromossomas que estão isolados e em suspensão. Quando são depositados nas grelhas, após centrifugação, mantêm a estrutura tridimensional que tinham nas células quando começou a estabilização. Deste modo podemos supor que as medidas estabelecidas por nós são razoavelmente aquelas que os cromossomas apresentam *in vivo*.

Os diagramas de dispersão mostram, no que se refere à haste, que a sua área relativa nem sempre tem uma distribuição normal, concretamente nos cromatídeos dos cromossomas G com satélite. Este resultado porém não nos surpreende, e pensamos que o mesmo se poderá verificar nos cromatídeos dos cromossomas D satelitizados em outras amostras. As razões que nos levam a pensar desta forma residem no facto de que a haste, tanto nos cromossomas D como nos G, é uma região com um grau de condensação diferente do resto do cromossoma (Hernandez-Verdun e Derenzini, 1983b; Derenzini *et al.*, 1983c; Goyanes, 1985a; Derenzini *et al.*, 1987) e cujo tamanho varia independentemente do grau de condensação deste (Sozansky *et al.* 1984). Como partimos do princípio que escolhemos cromossomas com um grau de condensação o mais próximo possível, a variação observada, que está de acordo com a hipótese de Sozansky, mostra que esta zona não obedece ao princípio por nós estabelecido. Por esta razão e porque se trata de uma região de dimensões reduzidas em grande parte dos casos observados, decidimos estudar o que se passava se considerássemos a sua área adicionada à do satélite e do braço curto. Pode ver-se também pelas curvas de dispersão, que os resultados obtidos desta forma, têm uma distribuição normal, como acontece com os dos cromossomas D. A variação em questão não é portanto significativa quando considerada no conjunto das áreas relativas do p+h+s.

Podemos concluir que o valor da área dos braços curtos adicionado dos valores correspondentes às áreas da haste e dos satélites, é equivalente ao valor da área dos braços curtos dos cromossomas que não apresentam satélites.

Assim os dados quantitativos permitem sugerir que as porções de cromatina que constituem o satélite e a haste estarão integrados nos braços dos cromossomas acrocêntricos não satelizados. Possivelmente a existência dos satélites como estruturas diferenciáveis dependerá da organização da cromatina que formando um estrangulamento (constrição secundária), ou uma zona filamentosa (a haste), separará o satélite do resto do braço curto. Se não existir esta diferenciação, a cromatina satélite constituirá o telómero do mesmo braço.

Além disso, dentro de cada grupo, aparentemente o braço curto dos cromossomas acrocêntricos com satélite é menor que o mesmo braço nos cromossomas sem satélites.

Ficamos com a impressão de que o comportamento da cromatina do filamento estaria em função de determinadas necessidades funcionais, nomeadamente a expressão do rDNA (NORs activas).

Determinação do diâmetro e área médios do satélite, e largura média do braço curto do respectivo cromossoma.

Continuando a análise quantitativa, os valores encontrados para os parâmetros referidos foram;

Área média do satélite = 0.037 μ^2 ± 0.003

Diâmetro médio do satélite = 0.215 μ ± 0.013

Largura média do braço curto = 0.213 μ ± 0.084

A bibliografia refere que os satélites podem apresentar frequentemente um diâmetro menor que a largura do braço (Goyanes, 1985a).
Podemos concluir porém, a partir dos nossos dados, que o braço curto tem uma largura equivalente ao diâmetro do satélite.

PESQUISA DE ASSIMETRIAS ENTRE CROMATÍDEOS IRMÃOS.

Quando comparámos os satélites do mesmo cromossoma, nos diferentes exemplares observados ao ME, de que nos servimos para o trabalho que estamos a apresentar, detectámos ocasionalmente uma assimetria clara entre eles.

Foram 3 os tipos diferentes de assimetria que encontrámos:

- satélites de tamanho diferente, no mesmo cromossoma (Fig 23a);

- cromossomas com um dos satélites ligado ao braço curto pela haste, e o outro ligado directamente (Fig 23b);

- no mesmo cromossoma, um dos cromatídeos era portador de satélite e haste e o outro não apresentava, pelo menos visíveis, nenhuma destas estruturas (Fig 23c).

* *

A pesquisa bibliográfica que fiz neste campo mostrou haver conhecimento de assimetrias laterais nas zonas onde se localiza a heterocromatina constitutiva - junto dos centrómeros e nos braços curtos dos cromossomas acrocêntricos (Kurnitt, 1979; Verma e Dosik, 1980; Babu e Verma, 1987).

Estas assimetrias parecem ser o reflexo citológico quer de *crossing-over* somático desigual, quer de replicação também desigual das sequências do DNA da heterocromatina constitutiva (Kurnitt, 1979; Babu e Verma, 1987).

A sua observação na população normal, porém é considerada pouco provável (Kurnitt, 1979; Babu e Verma, 1987), uma vez que uma replicação posterior do DNA levaria à formação de dois cromossomas heteromórficos entre si (Kurnitt, 1979).

Só foi possível a sua detecção ao MO, depois de evidenciados pelas bandas C, as quais marcam a heterocromatina constitutiva, ou, por exemplo, por tratamento das células *in vitro* com certas drogas como a Mitomicina D que,

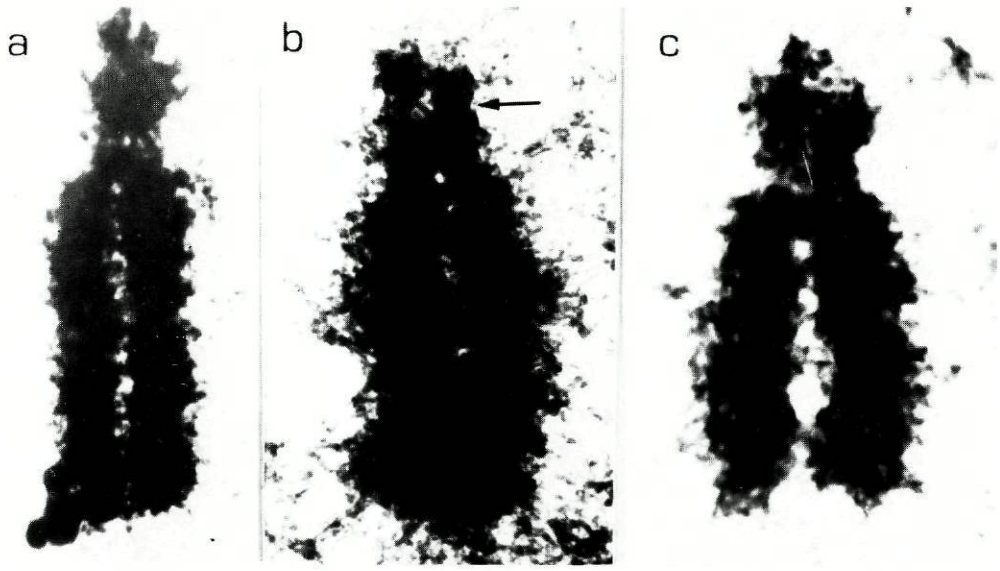


Fig.23 - Assimetria entre cromatídeos irmãos: satélites irmãos de tamanho diferente (a); cromossoma com um satélite e haste num cromatídeo e um satélite sem haste no outro (b); cromossoma com um cromatídeo apenas, portador de satélite e haste (c)

(Kurnitt, 1979; Babu e Verma, 1987), estimula a variabilidade somática da heterocromatina (Kurnitt, 1979).

Na revisão bibliográfica que fiz, não encontrei referência nem a detecção ou mesmo a pesquisa, ao ME, de heteromorfismos entre cromatídeos irmãos, em condições iguais ou diferentes daquelas em que este estudo foi feito.

Os heteromorfismos que encontramos traduzem-se numa variação morfólogica unilateral, claramente evidente, que pode afectar o tamanho de um dos satélites, ou o da haste a tal ponto que ele não seja visível, ou mesmo existir uma situação extrema em que ambos estão ausentes. em cromossomas que não sofreram qualquer tratamento nem as células de onde provieram.

Sendo o satélite uma região de heterocromatina constitutiva, tendo na região das NORs uma natureza estrutural e molecular particular, com centenas de genes idênticos dispostos lado a lado, isto é em tandem, e sendo desconhecida a natureza heteromórfica destes (Verma e Dosik, 1980; Babu e Verma, 1987), podemos pensar que os casos que observámos podem ter uma base molecular e origem semelhante aos descritos na literatura. Também podemos sugerir que sejam devidas a diferenças no comportamento da cromatina que constitui a haste.

A observação das assimetrias ao ME, que possibilita uma observação directa e eficaz, e permite prescindir neste caso de qualquer tratamento prévio dos cromossomas, confirma a sua existência real, ficando demonstrado que não são produto de alterações induzidas *in situ* pelos métodos de MO, acima referidos.

De uma forma sintética podemos concluir que:

- **A ME é o melhor método para analisar a frequência do aparecimento de cromossomas com satélite, devido ao seu elevado poder de resolução e ao tamanho reduzido desta região cromossómica.**

- é o método mais eficaz para estudar a estrutura das regiões dos braços curtos dos cromossomas humanos e sua variabilidade.

- Nos cromossomas portadores de satélites, o braço curto (p) é menor que nos cromossomas não satelitizados .

- A cromatina satélite faz parte integrante dos braços curtos. Quando há constrição secundária, ela aparece a constituir os satélites; quando não há, aparece como telómeros dos referidos braços. Não há portanto mais cromatina no cromossoma quando este apresenta satélites visíveis.

- O diâmetro médio do satélite tem um valor equivalente à largura do braço curto.

- Existem efectivamente assimetrias nos braços curtos de cromatídeos irmãos, observáveis mesmo em cromossomas acrocêntricos não tratados, e que se podem traduzir na existência de satélites de tamanhos diferentes, na presença de satélite e haste num dos cromatídeos e apenas satélite no outro, ou ainda, na presença de satélite e haste num dos cromatídeos e ausência destas duas estruturas no cromatídeo irmão.

* * *

A ME permitiu-nos observar certas regiões particulares, estruturalmente complexas e bem individualizadas, localizadas nos braços curtos dos cromossomas acrocêntricos humanos - os satélites e a zona descondensada ou haste, correspondente à constrição secundária onde se sabe estar localizado o rDNA, constituindo as NORs. Estas representam segundo Goyanes (1985a) uma certa especificidade na condensação da cromatina, composição e actividade.

Ajudou-nos também a adquirir dados novos, alguns dos quais referidos já no capítulo que acabamos de escrever e que nos levam a duvidar qual será no entanto, o grau de independência funcional de cada uma dessas regiões, cuja especificidade tem sido tão discutida.

Até que ponto estaremos mais próximos da verdade se as considerarmos em conjunto, como uma unidade anatómica e funcional do braço curto, embora com os resultados insuficientes de que dispomos nesse sentido, por dificuldades técnicas, apenas nos seja possível, por agora, fazer uma breve abordagem a problema tão complexo?

É nossa opinião que deve ser aproveitado todo o trabalho científico que nos permita tirar conclusões válidas, ainda que poucas, sobretudo quando a metódica de que se dispõe é deficiente. Por isso mesmo, apesar de ser uma abordagem e de dispormos de um número de dados que nos permitem apenas algumas conclusões seguras, parece-nos lícito incluí-las neste trabalho, pelo seu interesse na discussão.

III — NOR

ASSIMETRIAS NAS NORs ENTRE CROMATíDEOS IRMÃOS

Existem muito poucos estudos, ao ME, de NORs marcadas na metafase pela prata em cromossomas inteiros (Schwarzacher *et al.*, 1978; Schwarzacher e Wachtler, 1983; Goyanes, 1985a) e por consequência de assimetrias entre cromatídeos irmãos (Schwarzacher *et al.*, 1978).

PESQUISA DE ASSIMETRIAS LATERAIS QUANTITATIVAS DAS NORs

Começamos por tentar observar ao MO, se efectivamente no nosso material detectávamos qualquer tipo de assimetria. Para isso corámos pela prata as NORs de algumas das preparações cromossómicas feitas para o estudo comparativo da eficiência entre a MO e a ME, capítulo II, e que não tinham sido utilizadas.

Técnica de coloração das NORs pela prata, para preparações cromossómicas em lâminas de vidro (Howell e Hsu, 1979, modificada por Goyanes)

Para este método foram necessários os seguintes reagentes:

Formalina a 1%- que se preparou retirando 1 ml da formalina comercial (a 40%) e adicionou a 39 ml de água destilada. O pH é ajustado a neutro com acetato sódico a 10%.

1ª prata- constituido por 1 gr de prata dissolvido em 2 ml de água destilada.

2ª prata- constituido por 1 gr de prata dissolvida em 1.25 ml de água destilada mais 1.85 ml de amoníaco.

Puseram-se 3 gotas da 1ª prata sobre o esfregaço; colocou-se sobre elas um lamela e levaram-se as preparações para uma estufa a 60°C, durante 4 minutos; seguidamente lavaram-se com água da torneira. Secaram-se pressionando cuidadosamente a parte onde está situado o esfregaço contra papel de filtro. Foram postas de seguida 2 gotas de formalina mais duas gotas da 2ª prata, sobre as quais se colocou uma lamela. Controlou-se a coloração ao MO. Logo que esta foi suficiente as preparações foram lavadas e secas ao ar.

Técnica de coloração das NORs pela prata, para cromossomas isolados, em grelhas de ME (Goyanes e Schvartzman, 1983)

Algumas das grelhas com cromossomas isolados, preparadas para o estudo do capítulo anterior, foram colocadas em lâminas de microscópio e coradas numa câmara pelo carbonato de prata amoniacal (Goyanes, 1978).

O corante era composto por dois reagentes:

A - constituido por 2.5 gr de nitrato de prata, 4.5 ml de metanol a 50%, 3 ml de amoníco e 30 mg de carbonato de sódio

B - constituido por 0.4 ml de formaldeído e 9.6 ml de metanol a 50%

Juntaram-se 3 gotas de cada reagente sobre a grelha que foi colocada numa câmara feita do seguinte modo: a grelha pousada sobre a lâmina foi coberta com uma lamela cujos bordos assentavam em dois pedaços de outra lamela, colocados sobre a lâmina um de cada lado da grelha. O controlo da coloração foi feito ao MO, em contraste de fase. A coloração foi repetida em cada grelha por dois períodos de 6-7 minutos cada. Foram depois lavadas com reagente B e água destilada, e finalmente secas ao ar.

*

O exame feito ao MO mostrou-nos a assimetria lateral apresentada na Fig. 24, na qual nos pareceu haver uma diferença de tamanho entre as duas NORs.

Também observámos a existência de três depósitos de prata no mesmo cromossoma ao nível da NOR, podendo o depósito localizado entre os dois cromatídeos ser aparentemente menor que os laterais (Fig. 25).

Ao ME detectámos importantes depósitos de prata sobre a cromatina com rDNA, com claras assimetrias desta região cromossómica.

A Fig. 26a mostra uma diferença nítida de deposição de prata entre os cromatídeos irmãos, situação possívelmente semelhante à encontrada ao MO na Fig. 24. (Fig. 27)

A Fig. 26b indica uma ausência de NOR activa num dos cromatídeos.

Também se observaram cromossomas apresentando 3 estruturas simétricas (Fig. 26c), e outras contendo 3 NORs com uma delas de menor tamanho localizado lateralmente (Fig. 26d) ou ao centro (Fig. 26e). Também neste caso se pode pensar que a Fig. 26e pode ser a assimetria da Fig. 25 observada ao MO (Fig.27).

Em todos os cromossomas que apresentavam NORs marcadas pela prata puderam identificar-se satélites em posição terminal, com respeito à estrutura NOR.

* *

As assimetrias laterais das NORs são transmitidas às células filhas, nas divisões somáticas (Sozansky *et al.*, 1985), mas também o são , de uma geração para a outra, pelos gametas (Kaösaar, 1971).

Em divisão clonal, foi demonstrado que a variabilidade das NORs existente nas células mães se encontrava reproduzida nas células filhas, isto é, em todos os clones correspondentes.

A presença de um ou dois satélites e/ou duas NORs não está dependente do grau de condensação do cromossoma nas células em divisão, ao contrário do seu tamanho (Sozansky *et al.*, 1984).

Quando num indivíduo surgem linfócitos com um cromossoma marcador que apresenta um satélite (Kaösaar, 1971; Tsvetkova, 1980), aparecem também linfócitos com a outra variante, isto é, o mesmo cromossoma com os dois satélites (Sozansky *et al.*, 1984; Sozansky *et al.*, 1985). Portanto as duas formas existem independentemente em células diferentes, isto é, constituem subpopulações de linfócitos (Sozansky *et al.*, 1984). Além disso o padrão de variação mantem-se em tecidos diferentes, e ao longo de vários ciclos de divisão celular, o que leva a pensar que não se trata de uma característica específica dos linfócitos nem são o reflexo de graus diferentes de actividade dos genes ribossomais, à medida que se dá a transformação blástica (Sozansky *et al.*, 1985).

Embora o padrão de coloração das NORs pela prata observado ao MO, em cromossomas metafásicos, seja uma característica estável dentro de certos limites e transmissível (Mikelsaar *et al.*, 1977b; Marcovic *et al.*, 1978; Taylor e Martin de Leon, 1981; Zakharov *et al.*, 1982), há variações intracelulares e intercelulares que podem envolver um ou mesmo os dois NORs, mesmo em condições técnicas que impliquem o mínimo de alterações (Mikhelsaar *et al.*, 1977b; Schwarzacher *et al.*, 1978; Schwarzacher, 1983; Balicek e Zizka, 1980,1982; Verma e Dosik, 1980; Zakharov *et al.*, 1982; Sozansky *et al.*, 1984; Sozansky *et al.*, 1985; Verma e Rodriguez, 1985; Ferraro e Lavia, 1985; Babu e Verma, 1987).

O mecanismo que leva à formação dos heteromorfismos das NORs, em geral, não está ainda conhecido (Babu e Verma, 1987). Sabe-se no entanto que é possível induzir o seu aparecimento, nomeadamente de variantes entre cromátideos irmãos, tratando com 5-azacitidina uma população em crescimento durante um ou dois ciclos de divisão seguidos de um na ausência daquela (Ferraro e Lavia, 1983,1985). Como a 5-azacitidina é um análogo da citidina que difere porém na impossibilidade de metilação, estes dados sugerem um papel da metilação regulação da expressão dos genes rDNA (Ferraro e Lavia, 1983, 1985).

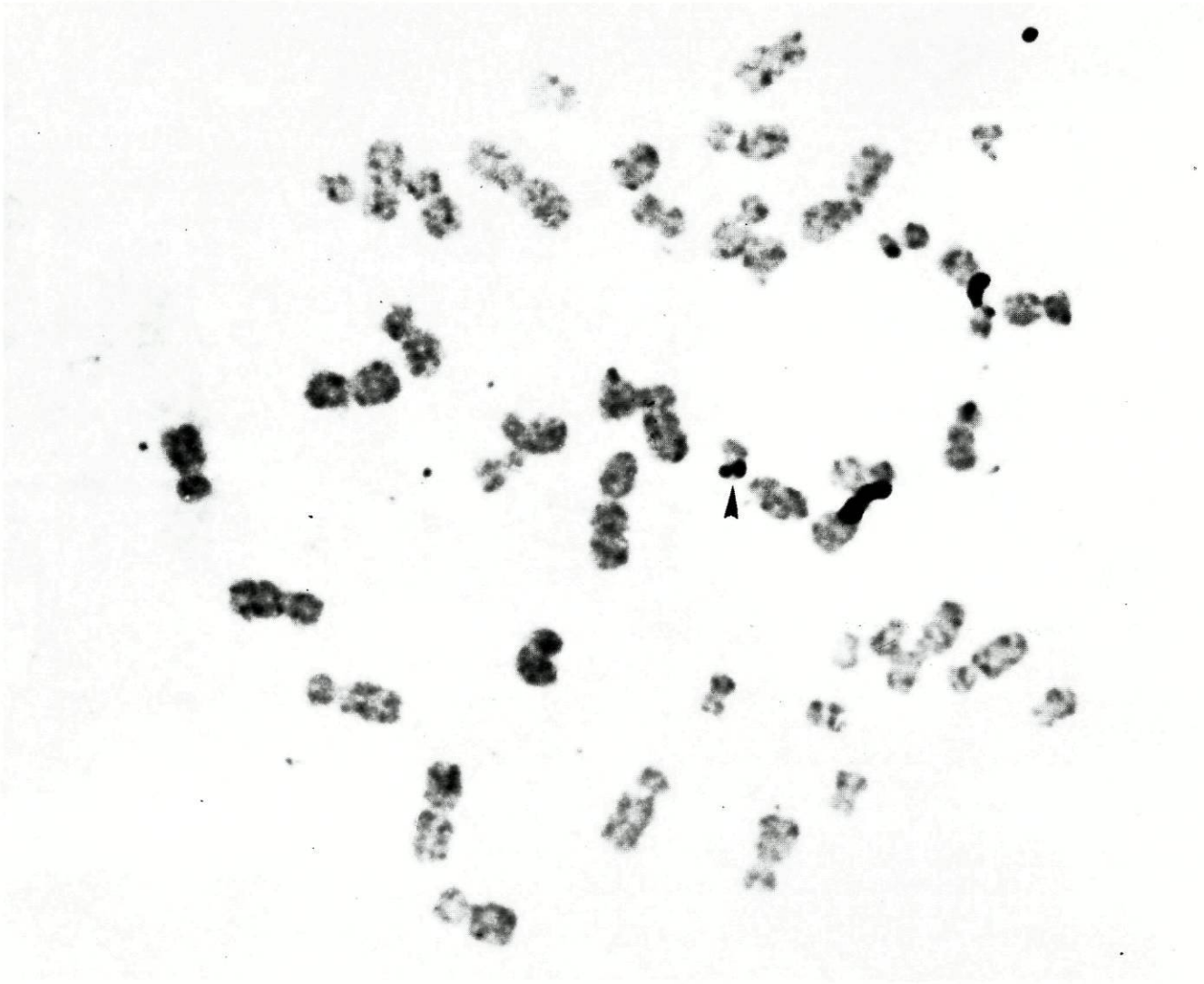


Fig.24 - Assimetria de NORs observada ao MO; cromatídeos irmãos com diferente marcação pela prata (seta).

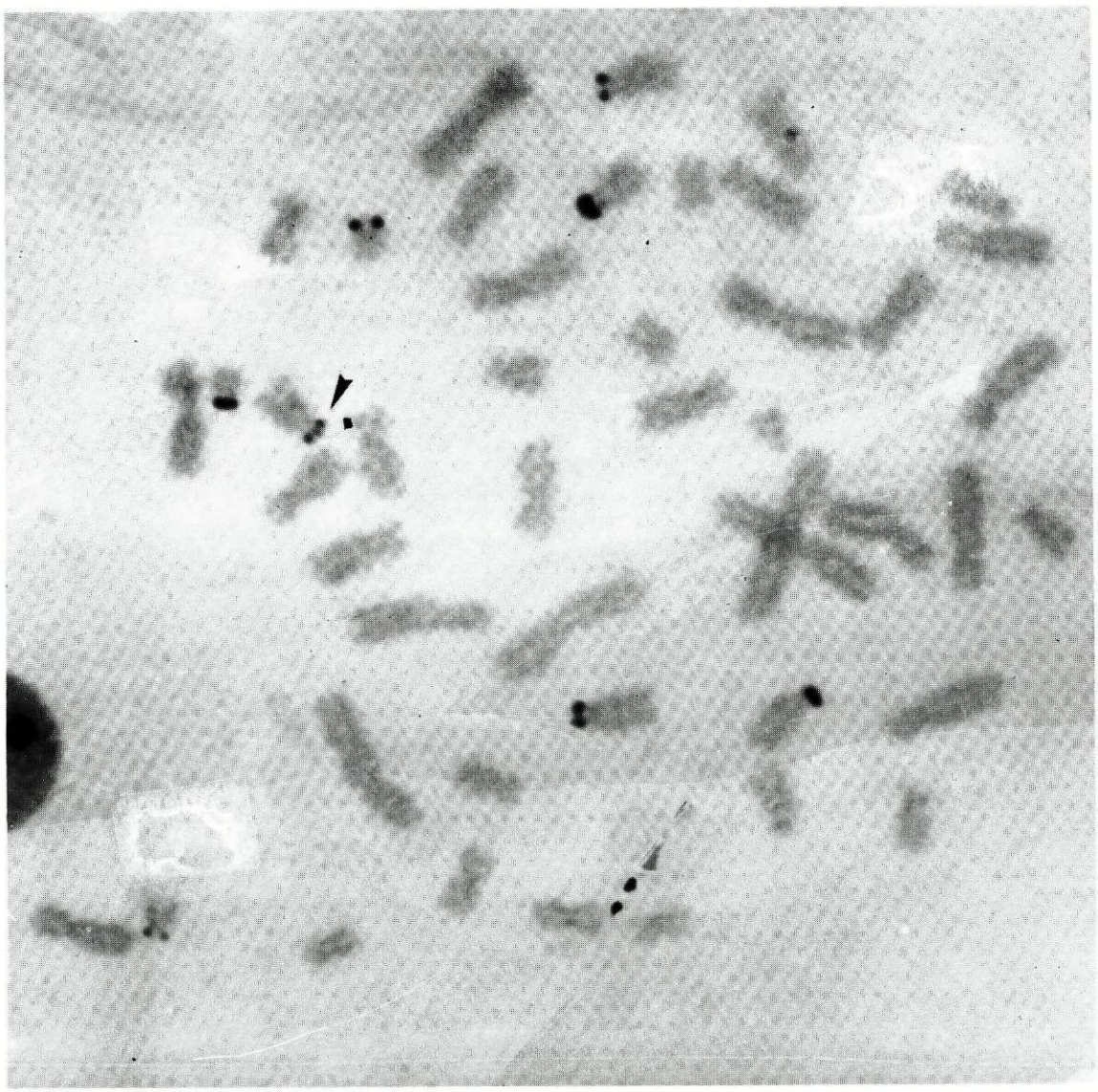


Fig. 25 - Assimetria de NORs observada ao MO; cromossomas irmãos com 3 depósitos de prata.

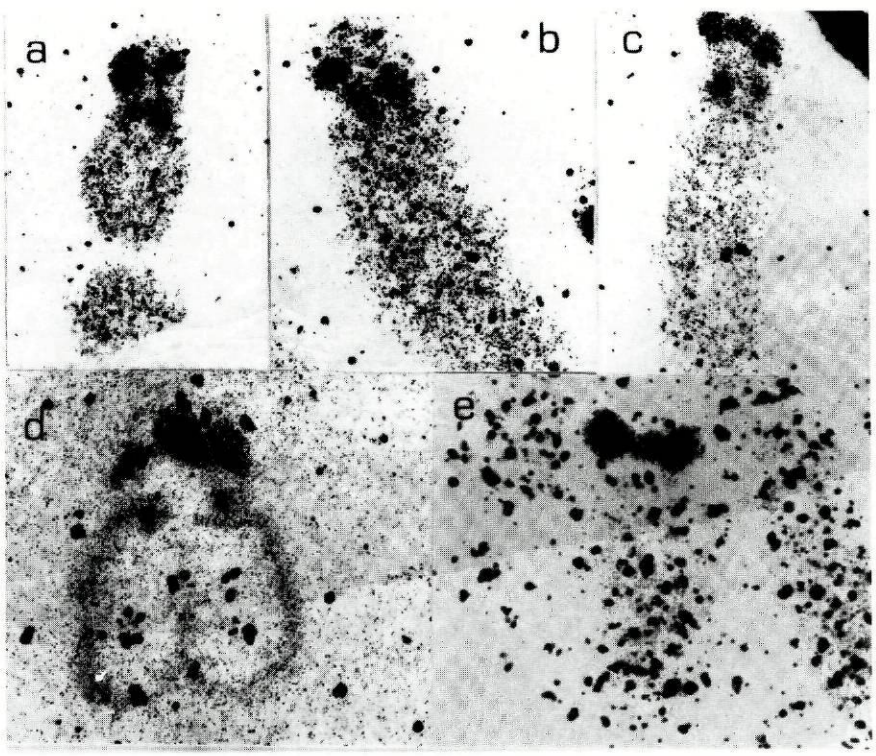


Fig. 26 - Assimetria de NORs observada ao ME: NORs irmãs com diferente marcação pela prata (a); ausência de actividade NOR num dos cromatídeos (b); existência de 3 estruturas marcadas pela prata num mesmo cromossoma, simétricas (c) ou não (d) e (e).

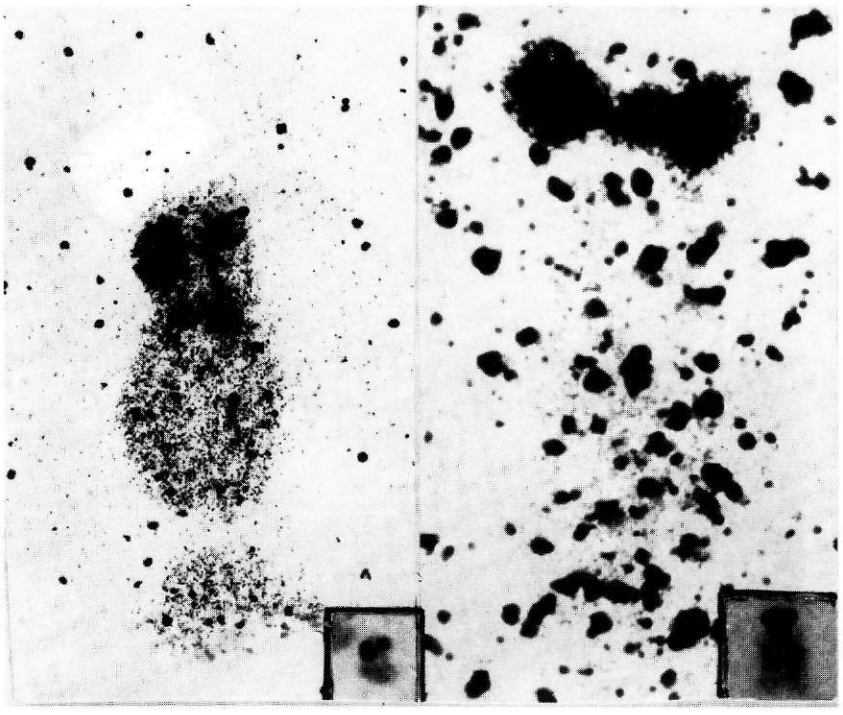


Fig.27 - Estudo comparativo das assimetrias encontradas ao MO (Figs.24 e 25) com as encontradas ao ME (Figs. 26a e d)

Também foram considerados, como possíveis mecanismos que levassem ao aparecimento de variantes quantitativas nas zonas heterocromáticas, os fenómenos de *crossing-over* somático desigual (Kurnitt, 1989; Babu e Verma, 1987). Em meiose, este mecanismo será pouco provável uma vez que a heterocromatina não emparelha por falta de formação de pontos de quiasma (Kurnitt, 1979; Rufas *et al.*, 1983; Babu e Verma, 1987). o que leva ao afastamento entre elas. Disto resultaria também uma dificuldade na formação dos mesmos pontos nas zonas do rDNA adjacentes, ficando desta forma assegurada a sua herança intacta de geração em geração (Rufas *et al.*, 1983); Babu e Verma, 1987).

Se efectivamente o *crossing-over* fosse o mecanismo de origem destes heteromorfismos, então eles não deveriam provavelmente existir *in vivo* (Kurnitt, 1979), uma vez que após um ciclo celular uma assimetria lateral deveria dar origem a dois cromossomas assimétricos entre si. Esta hipótese contraria, a nosso ver, a observação de transmissibilidade de mãe para filho encontrada por Kaösaar (1971).

Embora esta região faça parte dos braços curtos dos cromossomas acrocêntricos que são heterocromáticos e contenha DNA rico em sequências repetitivas, não apresenta outras características específicas da heterocromatina, pois é transcripcionalmente activa e apresenta um grau de condensação menor que aquela, como é já conhecido desde longa data (Schwarzacher *et al.*, 1978).

A natureza repetitiva do rDNA poderia ser explicada pela necessidade do alto índice de produção de rRNA (Medina *et al.*, 1986).

Outro mecanismo proposto para explicar a variabilidade do número de NORs num mesmo cromossoma (Ploton *et al.*, 1987) foi sugerido pela descoberta que os cromossomas nucleolares transportam em cada cromatídeo dois grupos de material corável pela prata, os quais tendem a unir-se e tomar a forma de um meio anel (Ploton *et al.*, 1987).

Todas estas observações foram feitas ao MO ou ao ME mas em cortes: encontrei apenas num trabalho referência a assimetrias laterais das NORs,

detectadas ao MET, em cromossomas metafásicos, inteiros e marcados pela prata (Schwarzacher *et al.*, 1978).

Tendo comparado os nossos dados com os que apresentámos, parece-nos que a presença de satélites em todas as NORs activas na nossa amostra, isto é, de não existirem NORs teloméricas nos cromossomas humanos, pode dever-se ao facto de o satélite citológico e a zona próxima do centrómero, ambas heterocromáticas, terem efectivamente um papel de protecção para a região do rDNA situada entre elas. Esta hipótese foi já referida para cromossomas nucleolares de plantas (Rufas *et al.*, 1983).

Relativamente às assimetrias que observámos, algumas das quais não encontrámos descritas nem ao MO nem ao ME, passaremos de imediato a expôr os mecanismos que nos parecem mais susceptíveis de explicar a sua possível origem.

Como foi já referido foram quatro os tipos de assimetrias que encontrámos:

- um cromossoma com um só satélite e haste
- um cromossoma com duas NORs, sendo uma menor que a outra
- um cromossoma com três NORs simétricas
- um cromossoma com três NORs, duas semelhantes e uma menor.

Dentro deste último tipo encontrámos cromossomas em que:

a NOR menor se encontra entre os dois cromatídeos

a NOR menor se encontra na posição exterior.

No que diz respeito ao primeiro tipo de assimetria esta poderia surgir como resultado de:

- inactivação do rDNA no cromatídeo que não possui satélite nem NOR;

- inexistência de genes ribossómicos como resultado de um *crossing-over* somático desigual, que teria levado a delecções a esse nível;

- diferença no comportamento da cromatina da zona filamentosa onde se situam as NORs, que se traduzia no aumento do grau de condensação, o qual seria acompanhado de uma inactivação dos genes rDNA.

No segundo tipo poder-se-ia pensar:

- na existência de um menor número de genes activos em um dos cromatídeos, como consequência também de um *crossing-over* mitótico desigual;

- organização da cromatina da NOR diferente do normal, apresentando -se também mais condensada, embora esta alteração abranja só uma parte da NOR, e inactivação dos genes existentes nessa zona; daí a coloração menor nesse cromatídeo.

Relativamente ao terceiro caso parece-nos resultar do relaxamento da cromatina na NOR e uma organização particular da fibra de cromatina em duas estruturas, o que levaria ao aparecimento de uma subdivisão aparente do cromatídeo ao nível da NOR.

Finalmente no quarto caso pensamos poder ter-se dado o mesmo fenómeno de organização especial da fibra de cromatina da NOR mas com repartição desigual da fibra de cromatina pelas duas subestruturas.

Outra hipótese que pensamos poderia explicar o terceiro e quarto caso é que o próprio rDNA de uma das NOR, não organizado em nucleossomas por isso mais distendido, pudesse alterar a sua organização ordinária e distribuir-se (igualmente ou não) por duas estruturas, com aparente subdivisão da NOR.

Este fenómeno poder-se-ia dar nos dois cromatídeos mas as NORs centrais ficariam possivelmente uma por trás da outra continuando a ser visível

apenas uma. Só a observação de cortes transversais destas assimetrias poderia responder a tal dúvida.

Analisando estas várias sugestões, parece-nos que o mecanismo mais provável (e que é também o único comum a todos os tipos de assimetrias encontradas por nós), é o que envolve alteração no comportamento da cromatina que constitui a zona filamentosa onde estão localizados os genes rDNA. Esta traduzir-se-ia numa alteração a nível ultraestrutural da organização da fibra e simultaneamente da actividade do rDNA.

Como foi referido antes, a coloração pela prata das NORs em cromossomas metafásicos não está directamente ligada à síntese do rRNA mas é um bom marcador desta actividade. Por outro, lado parece estar relacionada com proteínas que têm um importante papel no estado de condensação particular da cromatina nas NORs. As nossas hipóteses estão de acordo com estes factos. Assim, nos casos em que pusemos a hipótese de um maior relaxamento da fibra de cromatina e que será provavelmente acompanhado de mais genes activos, aparece-nos também um aumento dos depósitos da prata; em casos extremos aparecem duas zonas coradas no mesmo cromatídeo. Pelo contrário, se o grau de condensação aumenta e diminui o número de genes activos, então a coloração é menor; se a condensação for extrema pode levar á inactivação total dos genes e desaparecimento da coloração.

Se realmente considerarmos que a coloração e grau de condensação são dois factos interligados, então podemos pensar que o tipo de assimetria da NOR representado na Fig. 26b pode ser coincidente com as assimetrias dos cromatídeos irmãos apresentados no capítulo anterior nas Fig. 23b e 23c (Fig. 28). No caso das Fig. 26b e 23c a relação sugerida, e que nos parece bastante provável, poderia resultar de uma condensação extrema da cromatina das NORs que levaria à sua integração, bem como à da cromatina satélite, na parte restante do braço curto. Este não seria um mecanismo estranho, uma vez que demonstrámos quantitativamente, no capítulo anterior, que, quando não há satélite nem haste, a cromatina correspondente está incluida no braço curto respectivo. No entanto a verificação desta hipótese necessita de confirmação por hibridização *in situ*.

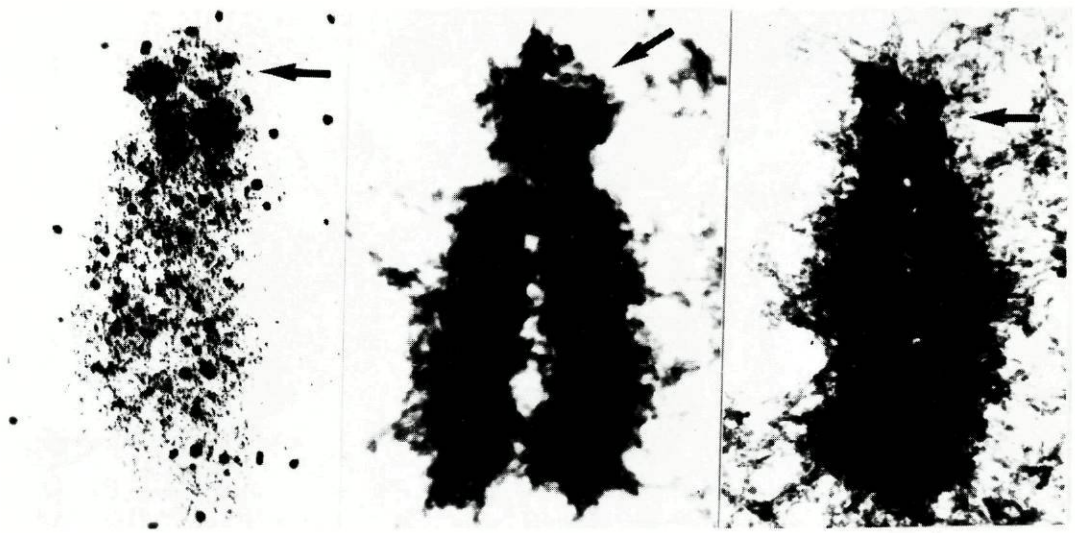


Fig.28 - Assimetrias das NOR, dos satélites e das hastes; possível relação entre estes três tipos de assimetrias encontradas em cromatídeos irmãos.

As assimetrias laterais da coloração das NORs para um dado indivíduo constituem uma característica regular, uniforme e transmissível. Portanto, certas assimetrias dos satélites que podem estar relacionadas com elas, segundo a nossa opinião, não serão um fenómeno raro ou mesmo improvável *in vivo* como referiu Kurnitt (1979). Refiro-me concretamente ao caso das variantes laterais em que há um só satélite e uma só haste ou dois satélites, um em cada cromatídeo mas uma só haste (Fig. 28).

Parece-nos que as assimetrias, juntamente com as restantes NORs marcadas do genoma, constituem o reflexo citológico da actividade necessária a cada célula de uma subpopulação, ainda que pequena, e não um fenómeno esporádico.

Dadas as suas características, as assimetrias de NORs entre cromatídeos irmãos têm um valor considerável nos estudos populacionais e diagnóstico pré-natal (Babu e Verma, 1985).

*

Resumindo, neste capítulo tiramos as conclusões seguintes;

- **Não existem NORs teloméricas. Em todos os cromossomas observados por nós as NORs marcadas ocupam uma posição sub-terminal.**

- **As assimetrias observadas ao MO não são artefactos. Elas são observadas também ao ME, em cromossomas isolados e sem tratamentos que se tenha conhecimento que as induzam, podendo ser do mesmo tipo ou de tipos diferentes.**

* * *

A conclusão de que a cromatina satélite e a zona filamentosa fazem parte integrante do braço curto, associada à inexistência de NORs teloméricas (ou seja, à presença constante dos satélites associados a NORs activas e às potencialmente activas), e à possível coincidência de certas assimetrias das NORs entre cromátideos irmãos com assimetrias de satélites do mesmo tipo, aponta para o facto de que o satélite e a NOR formam mais do que uma unidade anatómica independente.

Parece-nos que cada vez se torna mais evidente uma forte inter-relação entre estas duas regiões do braço curto dos cromossomas acrocêntricos que nos conduzirá á proximidade da certeza de que elas são uma unidade funcional.

Se assim fôr, e como o papel principal das NORs é activo, a síntese do rRNA e formação do nucléolo, para o que muitas vezes se associam, como se integram os satélites na função das NORs? Serão meramente protectores das múltiplas cópias dos genes rDNA, ou terão uma função mais directamente ligada à das NORs, nomeadamente nas suas associações?

IV — ASSOCIAÇÕES DE SATÉLITES

ULTRAESTRUTURA DAS ASSOCIAÇÕES DE SATÉLITES DE CROMOSSOMAS ACROCÊNTRICOS HUMANOS

As associações de satélites desde sempre foram consideradas como a imagem, em metafase, da fusão dos nucléolos na interfase precedente. Os nucléolos, por seu lado, são estruturas, visíveis em interfase, que se formam pela acção dos genes rDNA presentes nas NORs. Os cromossomas portadores das NORs podem deslocar-se pelo núcleo e concentrar-se no nucléolo, e depois dispersar-se um ou dois ciclos mais tarde sem perturbarem a ordem cromossómica (Schwarzacher e Wachtler, 1983). Há portanto uma ideia de forte dinamismo ligada ao significado destas figuras.

A literatura mostra que as associações foram praticamente sempre estudadas em função do seu papel, uma das características ligadas à actividade das NORs. Por isso decidimos fazer o estudo da sua estrutura e não propriamente da sua função, embora decerto não se possa desligar completamente uma da outra.

ANÁLISE ULTRAESTRUTURAL DAS ASSOCIAÇÕES DE SATÉLITES EM CROMOSSOMAS INTEIROS

Tal como se referiu anteriormente para as NORs, são raros os trabalhos ao ME onde se encontra referência a associações de satélites em cromossomas inteiros, e mesmo nestes os cromossomas estavam marcados pela prata (Schwarzacher *et al.*, 1978; Schwarzacher e Wachtler, 1983). Todavia, o estudo que apresentamos neste capítulo, não aparece ainda mencionado na literatura consultada.

ESTUDO COMPARATIVO DO ÍNDICE DE ASSOCIAÇÃO DE CROMOSSOMAS ACROCÊNTRICOS, DOS GRUPOS D / G, QUANDO OBSERVADOS AO MO E AO MET.

Começámos por verificar se a ME, também neste caso, era o método de análise mais preciso, como comprovámos que o era para os satélites.

Observação das AS ao MO

Esta foi feita directamente nas preparações cromossómicas obtidas pelos métodos referidos no capítulo II, a par com a observação das mesmas AS feita sobre microfotografias.

Neste caso, porém, os cromossomas não estavam marcados por bandas ou qualquer outro tipo de marcação, o qual só iria perturbar a observação em curso.

Os esfregaços foram submetidos, logo após secagem ao ar, à coloração pelo Giemsa a 4% em tampão fosfato pH 6.88, durante 7 minutos; em seguida foram lavados com o mesmo tampão e secos ao ar.

As microfotografias foram feitas nas mesmas condições e usando a mesma película, papel, revelador e fixador mencionados no capítulo II.

Critério usado para definir AS

O critério que adoptámos foi uma combinação de dois já indicados na literatura (Cohen e Shaw, 1967; Zang e Back, 1968). Assim, dois ou mais cromossomas foram considerados associados quando se verificavam as seguintes condições:

- **os cromossomas encontravam-se orientados para um ponto comum pelos satélites** (Cohen e Shaw, 1967);

- **a distância entre os extremos dos satélites não era superior ao comprimento do braço longo do maior dos cromossomas do grupo G, das mitoses observadas** (Cohen e Shaw, 1967);

- **a distância entre os satélites podia ser superior se os braços curtos estivessem ligados entre si por uma estrutura filamentosa, claramente visível** (Zang e Back, 1968);

- **distâncias superiores ao comprimento do braço longo de um cromossoma do grupo D foram aceites, se os cromossomas envolvidos na AS estivessem exactamente no mesmo eixo longitudinal** (Zang e Back, 1968);

- **os braços curtos do segundo cromossoma, ou dos outros associados se a AS é múltipla, estão apontados para os do primeiro cromossoma, e não se encontram abaixo da linha do centrómero do mesmo cromossoma** (Zang e Back, 1968).

Observação das AS ao ME

Utilizámos neste caso as preparações das grelhas a partir das quais foram estudados os satélites, no capítulo II. A contagem das AS foi feita directamente ao microscópio sobre cromossomas não marcados.

Critério adoptado para definir AS ao ME

Aqui fomos nós que estabelecemos o critério porque não encontrámos descrito qualquer trabalho em que houvesse uma definição própria de AS, para ME.

Adoptámos assim a definição que nos pareceu mais apropriada às circunstâncias:

- **os cromossomas estavam associados quando se apresentavam unidos por ligações físicas, perfeitamente visíveis.**

Valorização estatística da análise qualitativa entre duas amostras

Os cálculos estatísticos efectuados neste capítulo foram:

- **Determinação da semi-amplitude da amostra para um grau de confiança de 95%,**
- **χ^2 para comparação entre duas amostras**

*

Para a análise ao MO contaram-se 2.010 cromossomas acrocêntricos (D e G), dos quais 522 estavam associados.

Ao ME foram contados 280, 85 deles associados.

Esta diferença de tamanho entre as duas populações deve-se ao facto de o método de isolamento dos cromossomas inteiros, tal como ainda hoje é praticado, implicar uma certa perda de material. Sendo estes cromossomas de dimensões pequenas (em especial os G) e em menor número, são mais facilmente eliminados. No entanto o tamanho da população estudada ao ME foi provado ser estatisticamente válido.

No caso da avaliação das AS ao MO, esta foi feita como referido, directamente a partir das preparações cromossómicas e a partir de microfotografias das mesmas. A razão desta duplicação deve-se ao facto de, em alguns casos, não podermos garantir, apenas pela observação directa, se as distâncias entre os cromossomas estavam dentro dos limites estabelecidos no critério adoptado. Houve portanto que confirmá-las por medição sobre as fotografias.

A escolha do critério que fizemos pareceu-nos ser a que abrangia o maior número de situações possíveis de serem classificadas como AS, para além do facto de ambos os critérios que combinámos se referirem a cromossomas não marcados.

No caso da ME, o estudo foi feito directamente, uma vez que o critério por nós estabelecido não deixava dúvidas quanto às AS.

As Figs. 29 e 30 mostram alguns dos tipos de associação encontrados por nós ao MO. Como se pode ver na Fig. 29, os dois cromossomas G em qualquer dos casos não apresentam ligação entre si. No entanto a distância entre ambos cai dentro dos limites estabelecidos pelo nosso critério. No caso da Fig. 30 há ligação visível entre alguns dos cromossomas agrupados na associação múltipla apresentada.

Nas Figs. 31, e 32, tiradas ao ME, não há qualquer dúvida quanto á AS. Na Fig. 33, embora os cromossomas estejam muito próximos, é bem claro que não estão associados.

Para nos certificarmos de que para a MO, o critério que adoptámos e a subjectividade das nossas observações permitiam a obtenção de resultados coerentes com os que se encontram publicados sobre o assunto (Quadro III), fizemos uma primeira experiência determinando a percentagem de células com associações existente, em média, nas 14 mulheres que constituem a nossa população em estudo. O resultado obtido 84.0% ± 5.1

Quadro III - Percentagem de células com associações, determinada por vários autores

Fergusson-Smith e Handmaker (1961)	60.0 ± 6.1
Zellweger *et al* (1966)	14.7 ± 3.0
Zang e Back (1968)	87.1 ± 2.3
Nankin (1970)	86.2 ± 1.6
Liem *et al* (1977)	87.9 ± 4.6
Vormittag (1980)	90.6 ± 5.0
Kumagai (1982)	88.2 ± 6.1
M. I Malheiro (1988)	**84.0 ± 5.1**

Da comparação entre os valores da percentagem de células com associações, contidos no Quadro III, verificamos que o nosso resultado está próximo dos encontrados pelos vários autores, com excepção dos de Ferguson-Smith e Handmaker. Há que ter em conta que algumas das populações onde os cálculos foram feitos são constituidas por mulheres de idades um pouco diferentes das nossas, e esta é um factor relevante na variação da frequência de associação como referimos no capítulo I. A subjectividade do critério usado para a classificação das AS também não pode ser esquecido. Daí poderem surgir as pequenas diferenças observadas entre a maioria dos resultados..



Fig.29 - Associação de cromossomas acrocêntricos observadas ao MO; cromossomas associados segundo os critérios de proximidade adoptados mas sem ligações físicas visíveis (setas).



Fig.30 - Associação de cromossomas acrocêntricos observadas ao MO; associação múltipla com ligação clara entre alguns cromossomas (setas).

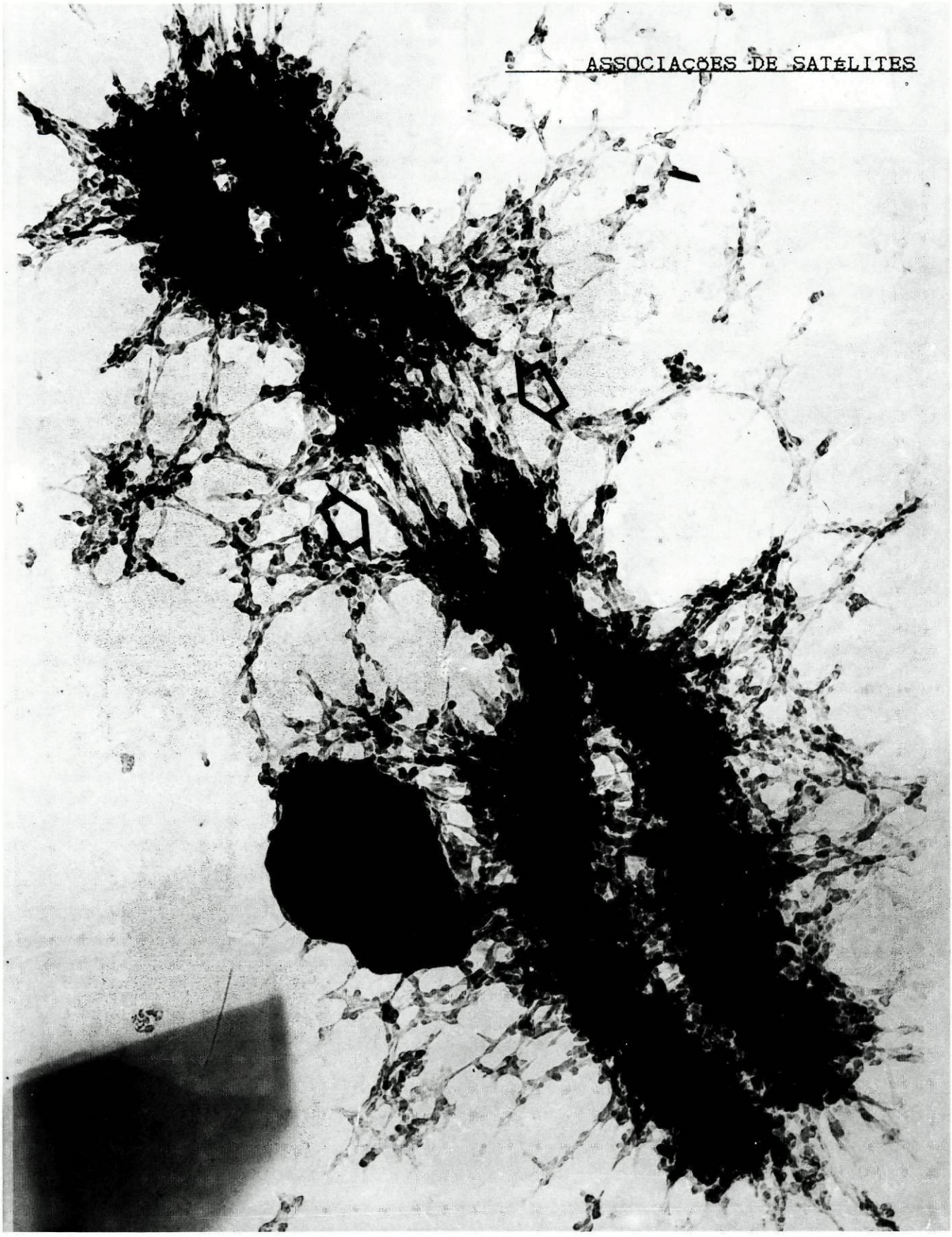


Fig.31 - Associação de cromossomas observada à ME; satélites ligados entre si por fibras de cromatina em associação cromossómica (setas)

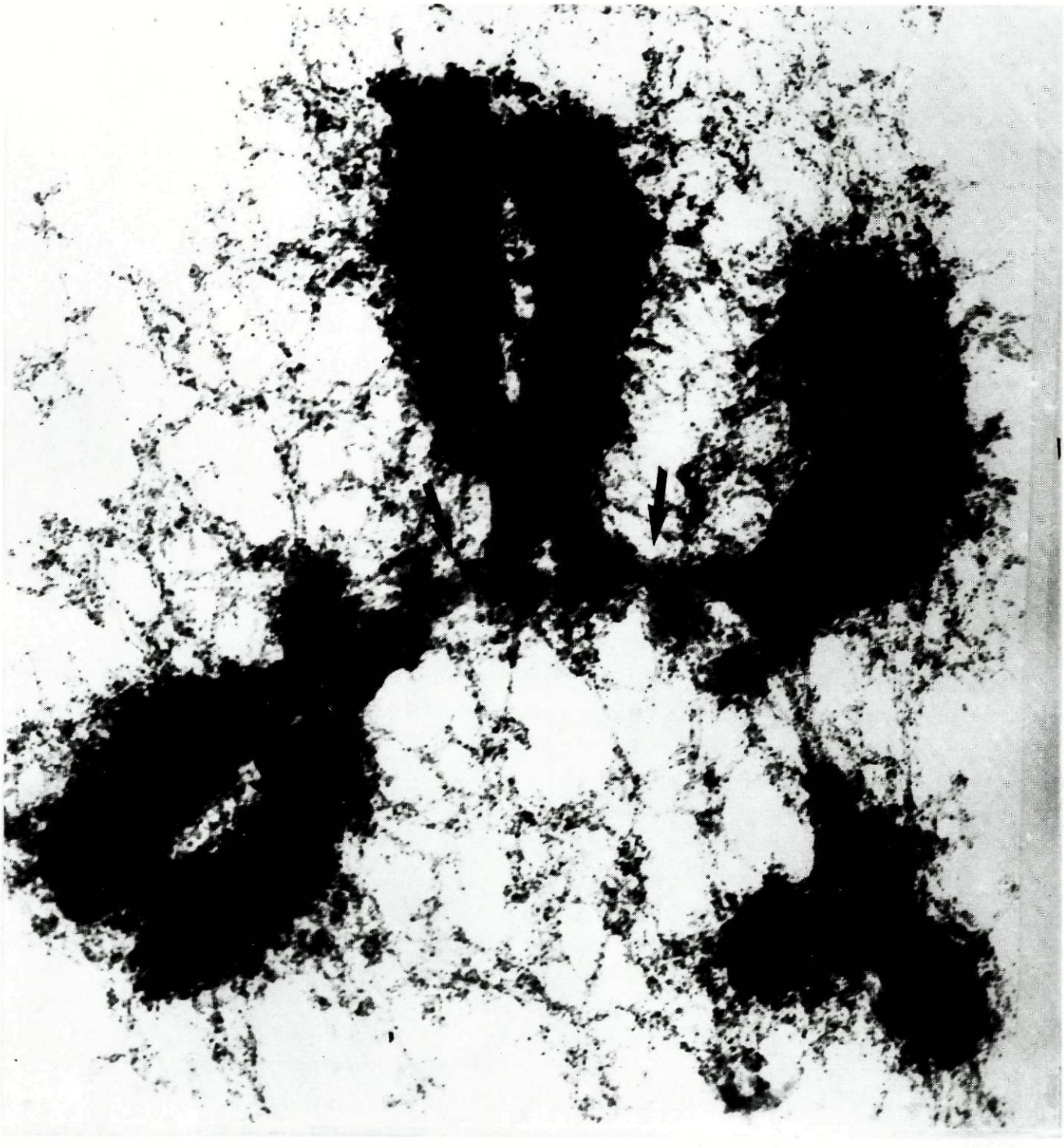


Fig.32 - Associação de cromossomas observada à ME; satélites ligados entre si por fibras de cromatina em associação cromatídica (setas)



Fig.33 - Falsa associação ou adjacência; cromossomas situados próximo um do outro mas não associados (setas).

ASSOCIAÇÕES DE SATÉLITES

Os resultados relativos à determinação do índice de associação avaliado ao MO, estão sintetizados no Quadro 4.

Quadro 4 - índice de associação de cromossomas acrocêntricos numa população de 14 indivíduos do sexo feminino; estudo feito em 2010 cromossomas observados ao MO.

Grupo de Cromossomas	Nº de Cromossomas		índice de Associação
	Observados	c/ Assoc.	
D	1206	300	0.24876 ± 0.02432
G	804	222	0.27612 ± 0.02530
D + G	2010	522	0.25970 ± 0.01920

χ^2 baseado em 2 grupos (D e G): $0.10 < P < 0.20$

$\chi^2 = 1.8787$ (não significativo)

Pelos resultados obtidos verificámos não haver diferença significativa entre o índice de AS dos cromossomas D e G.

O mesmo estudo, ao ME, forneceu os resultados mencionados no Quadro 5.

Quadro 5 - índice de associação de cromossomas acrocêntricos numa população de 14 indivíduos do sexo feminino; estudo em 280 cromossomas observados ao M.E.

Grupo de Cromossomas	Nº de Cromossomas		índice de Associação
	Observados	c/ Assoc.	
D	163	43	0.26380 ± 0.06761
G	117	42	0.35897 ± 0.14509
D + G	280	85	0.30357 ± 0.04411

χ^2 baseado em 2 grupos (D e G): $0.05 < P < 0.10$

$\chi^2 = 2.91603$ (não significativo)

Também aqui não encontramos diferença significativa nos dois índices.

Podemos então comparar as duas populações de AS, uma observada ao MO e a outra ao ME (Quadro 6).

Quadro 6 - Estudo comparativo do índice de associação dos cromossomas acrocêntricos em duas populações, uma observada ao M.O. e outra ao M.E.

Grupo de Cromossomas	Nº de Cromossomas		índice de Associação
	Observados	c/ Assoc.	
MO (D+G)	2010	522	0.25970 ± 0.01920
ME (D+G)	280	85	0.30357 ± 0.04411
TOTAL	2290	607	0.26507 ± 0.01807

χ^2 baseado em 2 grupos (MO e ME): $0.10 < P < 0.20$

$\chi^2 = 2.42719$ (não significativo)

De novo não encontrámos diferença significativa entre os índices.

* *

Os únicos trabalhos onde vimos a avaliação do índice de AS ao MO em condições mais ou menos semelhantes às nossas foram o de Nankin, em 1970, o de Vormittag, em 1980, e o de Kumagai, em 1982.

Analizando cada trabalho em si para verificar em que condições foi feita essa determinação, vimos que:

- no caso de Nankin, o valor encontrado, tal como o nosso, para 72 horas de cultura era 30.7 % ± 1.2; mas a população estudada compreendia mulheres cujas idades estavam compreendidas entre 18 e 54 anos.

- para Vormittag, o valor era de 39.3 ± 6.7, para idades compreendidas entre 15 e 20 anos, Neste caso devemos ter em linha de conta que o índice foi calculado numa população feminina dividida em classes etárias. Escolhemos esta classe porque é a mais próxima das idades da nossa população de mulheres (20-30 anos).

- Kumagai estudou 36 mulheres distribuidas também por grupos etários. Para a classe que engloba as idades compreendidas entre 16 e 30 anos, a mais adequada para a comparação, encontrou um índice de AS de 33.3 ± 6.1. Tendo feito em paralelo o estudo em 24 homens verificou que o índice de AS era inferior nas mulheres, em cada classe etária.

Pelo exposto podemos admitir que as diferenças observadas entre os resultados destes investigadores e os nossos podem resultar de factores influentes, tais como a percentagem de associações por célula, a subjectividade dos critérios de definição de AS escolhidos e/ou a idade da população sobre a qual a análise incidiu.

No que se refere ao índice de AS avaliado ao ME, não encontramos qualquer referência na bibliografia consultada.

Os valores que obtivemos ao MO e ao ME não mostram uma diferença significativa. Isto não quer dizer, porém, que seja indiferente fazer este tipo de análise por um ou outro método. Se pensarmos que:

- o critério que usámos para definir AS ao MO inclui não só cromossomas que estejam ligados entre si, como também os que sem estarem ligados mantenham uma distância entre eles que esteja dentro dos limites previstos no critério,

- para a ME só consideramos associados os cromossomas claramente ligados pelos seus satélites por uma zona com uma estrutura fibrosa,

é provável que estejamos a cometer um erro por excesso no caso da MO, incluindo no grupo dos cromossomas associados alguns que apenas estejam próximos, isto é, considerarmos como associações verdadeiras as que não passam de falsas associações ou adjacências. Esta classificação foi feita pela primeira vez por Ferguson-Smith quando, em 1961, detectou também pela primeira vez as figuras de AS.

Evidentemente há nos critérios de AS um forte grau de de incerteza. A prová-lo está o facto de que alguns cromossomas, que jazem lado a lado e que podem ser considerados como associados pelos critérios respectivos, vistos ao ME não o estão na realidade. como prova a Fig. 33. Esta proximidade pode estar relacionada com uma certa homologia das zonas pericentroméricas dos cromossomas acrocêntricos, como sugeriu Varley em 1977. Mas por outro lado torna-se muito difícil alcançar maior certeza porque só raramente as ligações são visíveis ao MO.

Outra hipótese poderia adiantar-se para a falta de diferenças nos valores dos índices ao MO e ao ME. Se na realidade ao MO houvesse mais AS do que as observadas ao ME, estas poderiam não ser reduzidas pela rotura das ligações entre os cromossomas durante a técnica de isolamento. Esta hipótese parece-nos pouco provável porque o tratamento sofrido pelos cromossomas, quando se fazem os esfregaços para a MO, será mais drástico do que o do isolamento.

Assim, consideramos que também para o estudo do índice de AS o ME é mais preciso e eficaz, sendo possível ver sem margem de dúvida quando dois ou mais cromossomas estão ou não ligados, o que significa dizer se estão ou não associados.

ESTUDO DA ULTRAESTRUTURA DAS AS

Para esta análise foram feitas várias microfotografias ao ME, e usaram-se a mesma película, papel, revelador e fixador citados no capítulo II para o estudo dos satélites a este nível.

Como referi já, apenas Schwarzacher *et al.* (1978), e Schwarzacher e Watchtler (1983), publicaram trabalhos onde encontrámos dados sobre AS ao ME, em preparações de cromossomas inteiros, embora corados pela prata. Não encontrámos qualquer trabalho no entanto, onde tivesse sido feita uma investigação sobre a ultraestrutura propriamente dita das AS, sem qualquer marcação auxiliar como considerámos que deve ser feita.

Ferguson-Smith e Handmaker, em 1961, sugeriram que os cromossomas se associavam pelos seus satélites, embora nessa altura só se tivessem baseado nos dados por eles colhidos ao MO.

No entanto, continuamente se tem afirmado que as ligações se estabelecem à custa das fibras de cromatina das NORs. Este conceito tem a reforçá-lo o facto de ter sido encontrado rDNA, por hibridização *in situ*, nas fibras que são consideradas as responsáveis pelas associações (Henderson *et al.*, 1973), as quais são marcadas pela prata quando sujeitas à coloração específica das NORs. Verma (1983c) definiu no seu estudo como associados os cromossomas que estivessem ligados fisicamente por zonas coradas pela prata e considerou que seria mais correcta a designação de *associação de NORs* ou *associação de cromossomas acrocêntricos* do que a tradicional **associação de satélites**.

Hayata, por seu lado, em 1977, explicava que as fibras de cromatina que continham rDNA podiam apresentar uma condensação em metafase diferente da do resto do cromossoma ou um atraso na condensação, devido ao emaranhado estabelecido com as fibras de outros cromossomas acrocêntricos que participavam na produção do rRNA no mesmo nucléolo. Encontrou também uma estrutura filamentosa ligando os satélites de dois cromossomas associados que para ele era o resíduo do referido emaranhado, levado ao extremo. Isto

implicaria a existência de uma grande quantidade de rDNA em alguns cromossomas acrocêntricos, acrescentava ele.

As nossas observações demonstram que as ligações entre os cromossomas associados se fazem realmente pelos satélites (Fig. 34, detalhe da Fig. 31). Como se pode ver, as ligações partem dos satélites dos cromatídeos de um cromossoma para os do que lhe fica oposto, tipo de associação que designaremos por **associação cromossómica** como acontece em casos semelhantes ao MO (Verma *et al.*, 1983c). Na Fig. 35, elas partem de um dos satélites de um cromossoma para o satélite do cromossoma vizinho e a estas chamaremos, pelas mesmas razões, **associação cromatídica** (Verma *et al.*, 1983c).

Em alguns casos, as fibras parecem formar uma rede como que reforçando as ligações que estão a estabelecer: é o que se pode observar nas Figs. 36, 37, 38 e 39 (detalhe da Fig. 38) em que do mesmo satélite partem fibras para satélites de diferentes cromossomas.

Como último exemplo de AS observado por nós temos o representado na Fig. 40. É também uma associação do tipo cromatídico. No entanto é difícil distinguir um dos satélites, parecendo antes que a associação se dá entre um satélite de um dos cromossomas e o braço curto do outro. Mas se observarmos com atenção vemos que no ponto de união a massa de cromatina parece pertencer aos dois cromossomas em simultâneo. Se as associações se dão como sempre se nos deparou então essa massa pode ser o resultado da fusão dos dois satélites associados.

Depois da exposição dos nossos dados não parece ser de aceitar a sugestão feita por Verma em 1983c, que a designação de **associação de NORs** é a mais aproprida, e deveremos, pelo contrário e justificadamente, continuar a falar **associação de satélites**.

A rede que une os satélites nas nossas fotografias é constituída por fibras do tipo das de 24 nm, descritas já no capítulo I em relação aos satélites e que constituem todo o corpo do cromossoma em metafase, com excepção da zona das NORs. É possível ver-se perfeitamente o seu aspecto cilíndrico



Fig.34 - Associações cromossómicas; os quatro satélites dos cromossomas em oposição estão ligados entre si.



Fig.35 - Associação cromatídica; cada cromossoma está ligado ao cromossoma vizinho por um dos satélites.

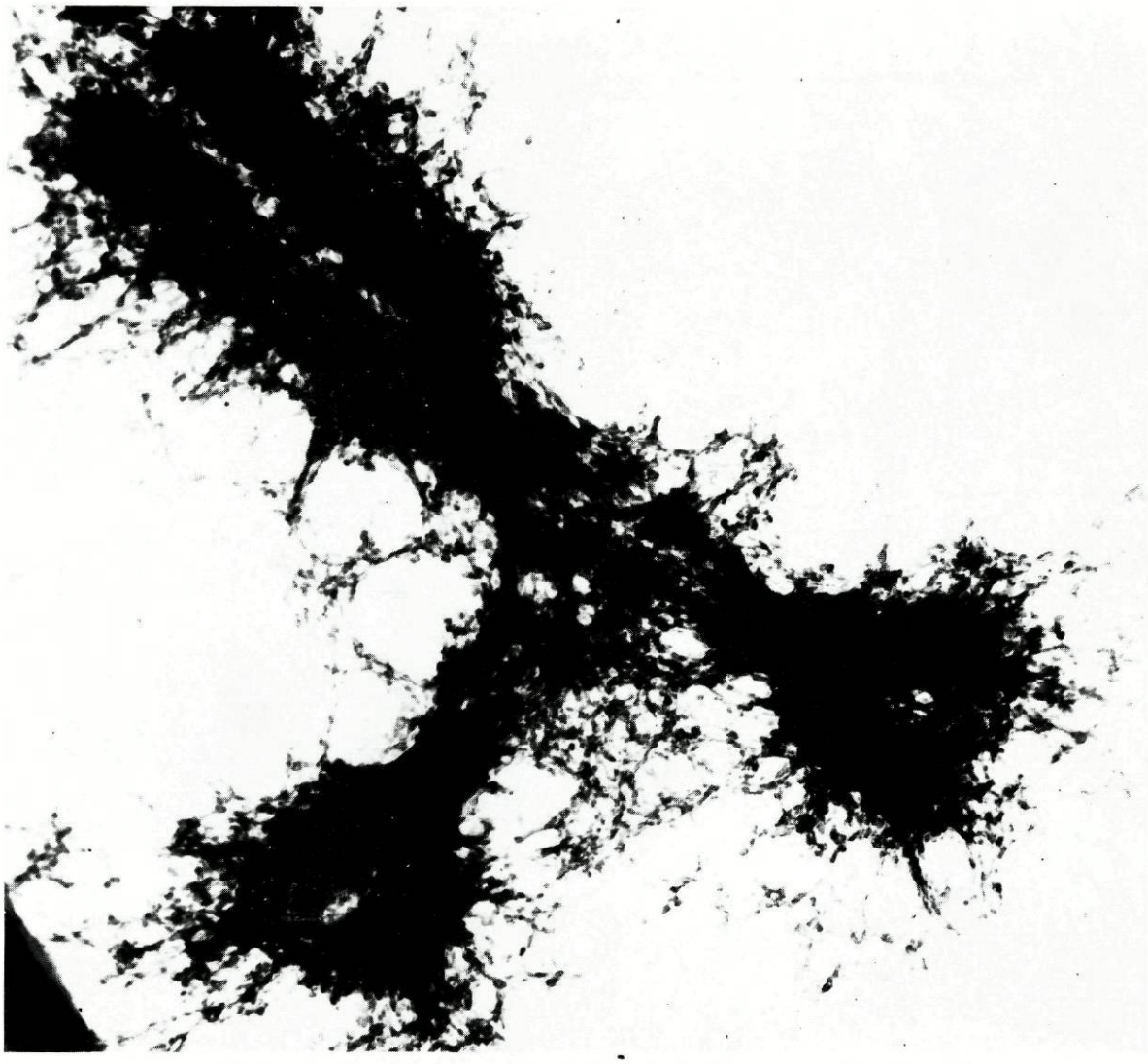


Fig.36 - Associações simultâneamente cromossómicas e cromatídicas; rede de fibras entre os cromossomas, aparentemente, a estabilizar a associação.

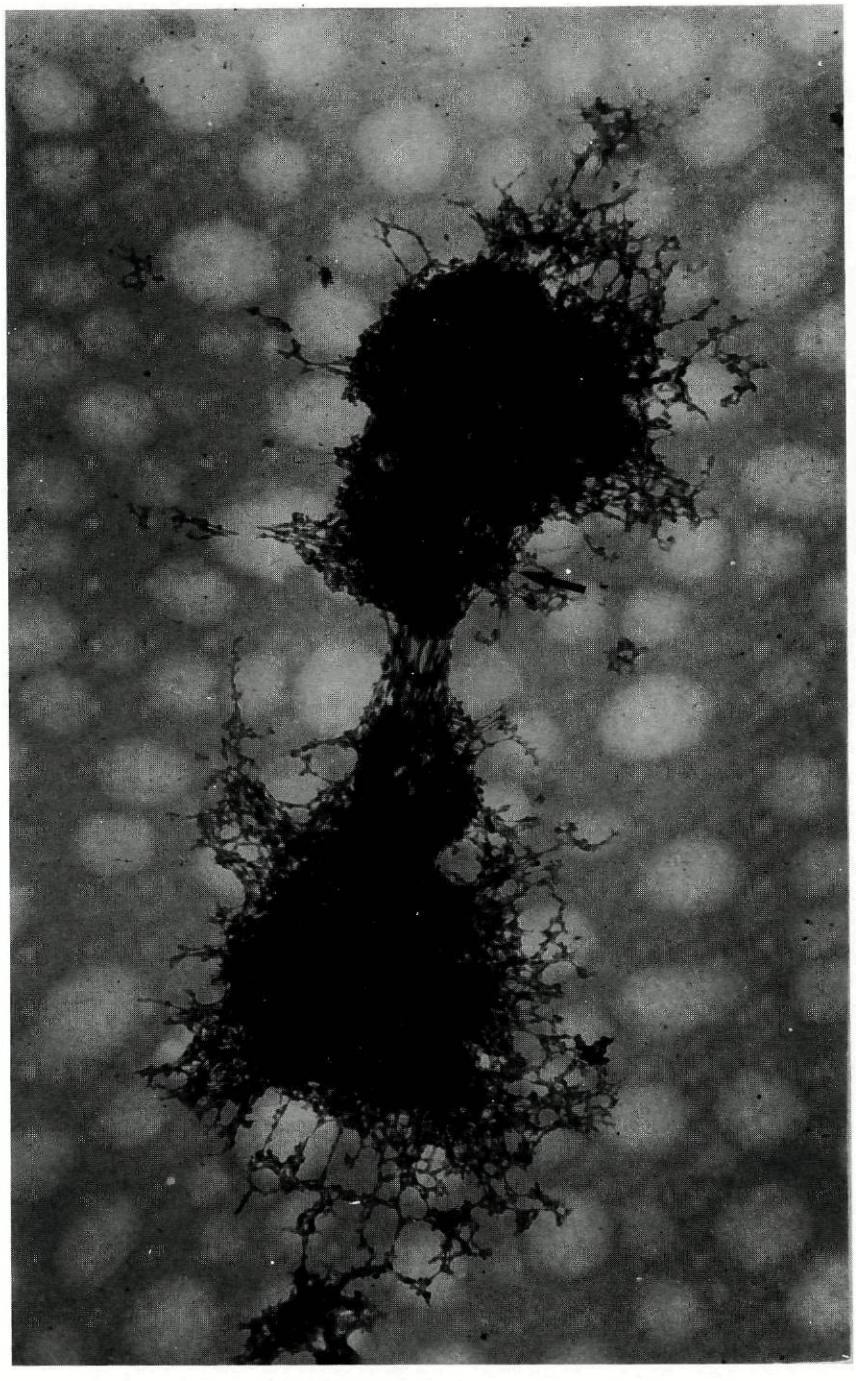


Fig.37 - Associação de satélites; a rede fibrosa liga dois satélites de um cromossoma ao satélite do cromossoma oposto ficando o outro livre (seta)

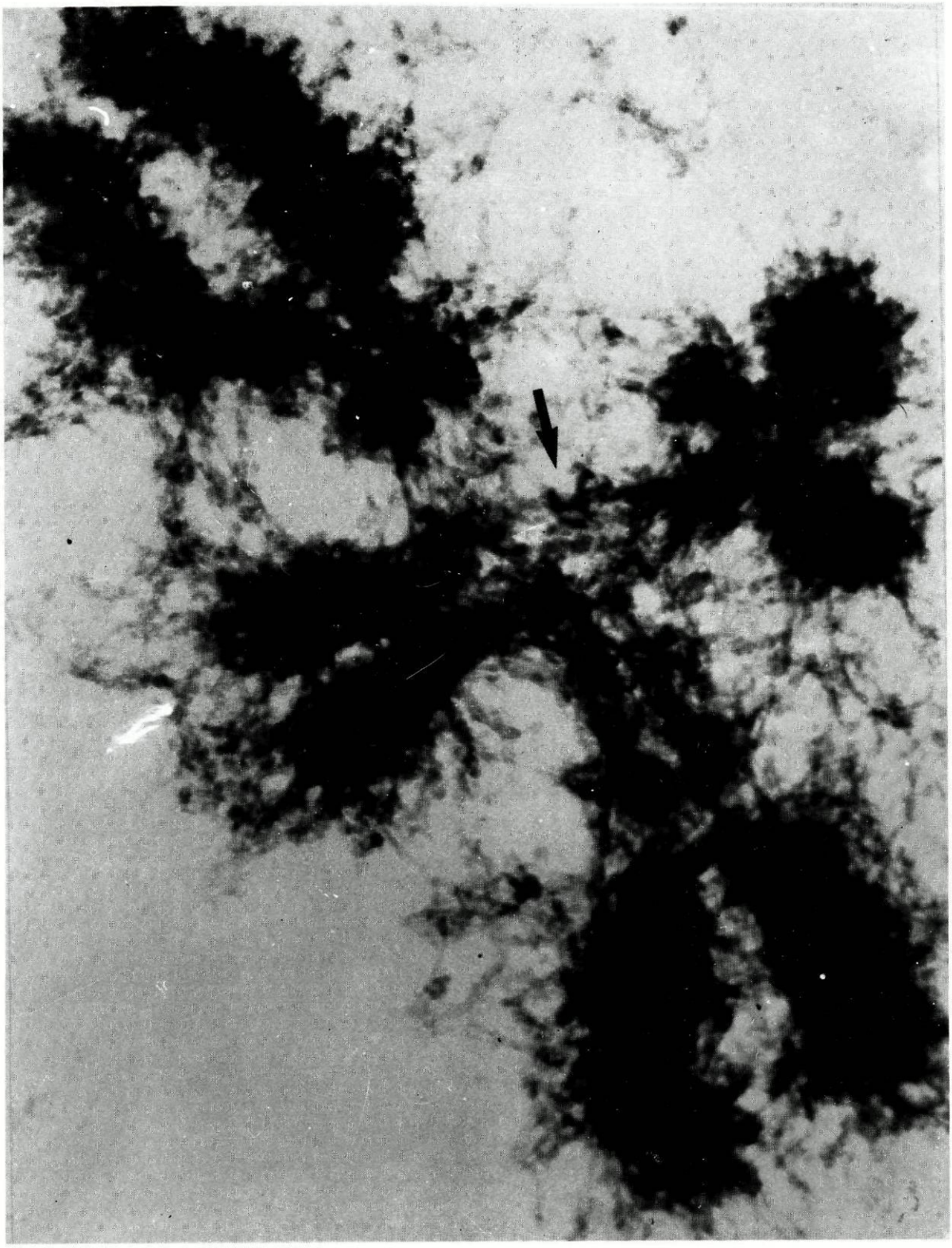


Fig.38 - Rede de fibras a interligarem vários satélites simultâneamente

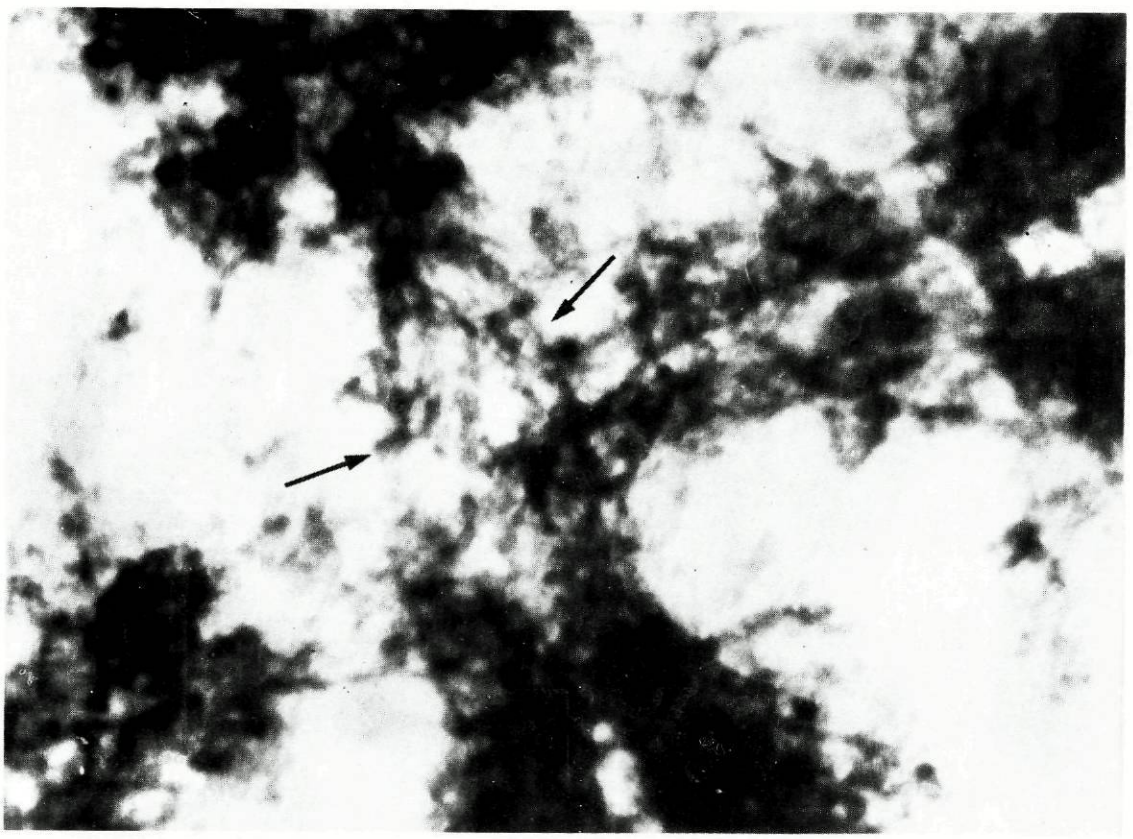


Fig.39 - Associação de satélites; detalhe da Fig.38 mostrando a forte ligação estabelecida entre satélites de vários cromossomas



Fig.40 - Associação cromatídica; os satélites associados não se encontram definidos. aparece uma massa de cromatina no ponto de ligação, provavelmente resultante da fusão dos dois satélites (seta)

irregular característico, que lhe é conferido pelos nódulos próprios da organização supernucleossómica, e não o aspecto de fibras finas estreitamente juntas que se observa na zona filamentosa das NORs. Estas não apresentam o aspecto nodoso, pois como foi dito anteriormente neste trabalho, também no capítulo I quando nos referimos às NORs, não têm uma organização nucleossómica. Este é mais um dado a corroborar a ideia de que as AS se não dão pelas NORs.

No entanto, isto não quer dizer que não possa haver uma disposição particular ao nível das fibras da cromatina das NORs, que sugira ligações entre cromossomas colocados lateralmente, dada a sua estrutura especial, não nucleossómica e distendida. Pode acontecer que algumas destas fibras se entrelacem, e daí a observação de fibras coradas pela prata a ligarem os cromossomas em associação quando jazem lado a lado.

Ligações como as que encontrámos entre os satélites foram já observadas por DuProw (1966,1970) e Abuelo e Moore, (1969) entre cromatídeos irmãos, mas Schwarzacher, em 1976, considerou que eram artefacto.

A existência de ligações extracentroméricas entre cromossomas irmãos (diplocromossomas) ou entre cromatídeos irmãos, no entanto, é visível ao ME e o seu aparecimento provavelmente não será ocasional. Quer num caso quer no outro parecem desempenhar o papel de mecanismo estabilizador, embora temporário, entre os cromossomas ou cromatídeos irmãos (Goyanes e Shvartzman, 1981; Goyanes e Mendez, 1982; Goyanes, 1985a).

Pensamos também que as ligações entre os satélites são bem reais e fortes, resistindo aos tratamentos drásticos a que são sujeitas quando se aplicam os métodos para preparação dos cromossomas a serem observados ao MO ou ao ME.

A sua existência, à semelhança das ligações descritas por Goyanes, sugere também uma actuação estabilizadora fortemente relacionada com a função das próprias associações. Se pensarmos que:

- os satélites apresentam nos seus telómeros alças de fibras de 24 nm de diâmetro, com uma estrutura supernucleossómica evidente ao ME, que parecem resultar da saída das fibras pelo satélite e regresso a ele;

- todas as NORs activas estão acompanhadas pelos respectivos satélites, como foi demonstrado por nós ao ME, neste trabalho;

- as NORs têm um papel muito importante nas associações,

maior é a certeza de que as pontes que encontramos entre os satélites são as verdadeiras ligações físicas responsáveis pela estabilização das associações, permitindo assim que os cromossomas envolvidos possam desempenhar a função para a qual se associaram.

Em conclusão do exposto neste capítulo, podemos afirmar que:

- O índice de AS avaliado ao ME não é significativamente diferente do obtido ao MO ;

- No entanto é mais preciso na definição de associação do que o MO porque permite ver claramente se os cromossomas estão ou não ligados entre si, o que significa estarem ou não associados, sem para tal necessitarem de qualquer marcação;

- A superior eficácia da ME demonstra-se além disso pela detecção de falsas associações, o que a MO não consegue fazer pelo seu menor poder de resolução, podendo por isso conduzir a resultados falseados;

- Graças ao ME é-nos possível estudar a estrutura das ligações e o tipo de fibras que as constituem em cromossomas associados e não marcados, possibilitando dessa forma concluir que é pelos satélites que realmente os cromossomas se ligam quando se associam;

- As ligações entre os satélites têm de ser reais e muito fortes, pois existem sistematicamente nos cromossomas associados, tratados pelos métodos drásticos de isolamento, incluidos na preparação dos cromossomas para observação ao ME;

- Finalmente foi-nos dado observar associações raras, ainda não descritas antes e que apontam para um reforço na estabilização das ligações nas AS.

* * *

CONCLUSÃO

E CONSIDERAÇÕES FINAIS

As conclusões que retiramos desta análise ultraestrutural dos satélites e suas associações, incluindo uma pequena abordagem ao estudo das assimetrias entre NORs de cromatídeos irmãos foram as seguintes:

- Sem dúvida o ME é o método mais indicado pela sua eficácia para estudos morfométricos e estruturais das diferentes regiões dos cromossomas inteiros, em metafase, e sua variabilidade.

- Nos cromossomas portadores de satélites o braço curto é menor que nos cromossomas não satelitizados, porque a cromatina satélite faz efectivamente parte do braço curto. Assim, quando há constrição secundária, ela constitui-se como satélite separando-se do braço pela haste ou zona filamentosa e tornando-o mais pequeno; quando não há, integra-se no braço e aparece a constituir o telómero.

- Não existem NORs teloméricas. Estas ocupam sempre uma posição subterminal.

- Existem assimetrias entre cromatídeos irmãos, quer no que se refere aos satélites quer às regiões das NOR, possivelmente relacionadas com estados funcionais particulares de algumas células que por sua vez levaram a níveis de organização particular da cromatina das NORs e, por arrastamento, também do satélite.

- Também para o estudo das associações a nível estrutural, o ME é o método mais preciso. Com ele provámos a existência de falsas

associações, observáveis ao MO como verdadeiras, bem como de tipos especiais, não descritos antes.

- O estudo ultraestrutural das AS que fizemos provou que estas se estabeleciam pelos satélites. Esta conclusão era de prever, uma vez que elas estão relacionadas com a actividade das NORs que, por sua vez, para estarem activas exigem sempre a presença do respectivo satélite.

***

Esta associação dos dados dos quatro capítulos parece-nos deixar bem clara a imagem da perfeita unidade que formam, quer anatomicamente quer funcionalmente, as regiões dos braços curtos dos cromossomas acrocêntricos humanos denominadas **satélites** e **regiões dos organizadores nucleolares** ou **NORs**.

A tradução perfeita dessa unidade está na sua participação conjunta e inseparável nas chamadas **associações de satélites**, cuja existência está ligada á formação e/ou fusão dos nucléolos.

Parece-nos portanto lógico que não se tenha encontrado um significado claro, biológico e clínico, para cada uma das regiões em separado, mas haja indícios fortes, como referimos, no que diz respeito às associações de satélites.

Embora estejamos em desacordo com a razão que foi apresentada, por alguns autores, para que fosse alterado o nome tradicional de **associações de satélites** para **associações de cromossomas acrocêntricos**, porque na realidade são aqueles que lhes dão corpo e estabilidade, não podemos no entanto deixar de concordar que a primeira designação está muito particularmente ligada a uma região dos referidos cromossomas enquanto que a segunda é mais genérica. Por isso, a partir do momento em que se

comprovou serem os satélites o suporte ultraestrutural das associações, pensamos que nada obsta a que se usem as duas designações como sinónimas.

Esperamos com este trabalho ter dado uma ideia clara da existência de uma verdadeira unidade funcional, satélite - NOR - associação de satélites. Ela vai continuar a ser o nosso objecto de estudo, estando em curso experiências com 5-azacidina, para esclarecimento sobre a existência real de uma relação directa entre a actividade das NORs e o índice de associação dos cromossomas acrocêntricos, feito ao ME.

* * *

Alea jacta est

JÚLIO CÉSAR

BIBLIOGRAFIA

ABUELO J. G. and Moore D. E. (1969). The human chromosome. Electron microscope observations on chromatin fiber organization. J. Cell Biol. *41*: 73-90.

ANGELIER N., Hernandez-Verdun D. and Bouteille M. (1982). Visualization of nucleolar Ag Nor proteins on nucleolar transcriptional units in molecular spreads. Chromosoma *86*: 661-672.

ANGELIER N., Hernandez-Verdun D. and Bouteille M. (1982). Visualization of nucleolar proteins at nucleolar level. Biology of the Cell vol.*45*: 198

ARDEN K.C., Pathak S., Frankel L. S. and Zander A. (1985). Ag-Nor stainning in human chromosomes† differential staining in normal and leukemic bone-marrow samples. Int. J. Cancer *36*: 647-649.

ARDITO G., Lamberti L. and Brøgger A. (1978). Satellite associations of human acrocentric chromosomes identified by trypsin treatment at metaphase. Ann. Hum. Genet. *41*: 455-462.

BALICEK P. and Zizka J. (1980). Intercalar satellites of acrocentric chromosomes as a cytological manifestation of polymorphism in GC-rich material? Hum. Genet. *54*: 343-347.

BALICEK P., Zizka J. and Skalská H. (1982). RHG-band polymorphism of the short arms of human acrocentric chromosomes and relationship of variants to satellite associations. Hum. Genet. *62*: 237-239.

BABU A., Macera M. J. and Verma R.S. (1986). Intensity heteromorphisms of human chromosome 15p by DA/DAPI technique. Hum. Genet. *73*: 298-300.

BABU K. A. and Verma R. S. (1985). Structural and functional aspects of nucleolar organizer regions (NORs) of human chromosomes. Int. Rev. of Cytol. vol *94* pp: 151-175.

BABU K. A. and Verma R. S. (1987). Chromosome structure: euchromatin and heterochromatin. Int. Rev. Cytolo. vol. *108* pp: 1-6.

BIBLIOGRAFIA

BAHR G. F. (1970). Human chromosome fiber considerations of DNA-proteins packing and of looping patterns. Exp. Cell Res. *62*: 39-49.

BAHR G. F. and Colomb H. M. (1974). Constancy of a 200 Å fiber in human chromatin and chromosomes. Chromosoma *46*: 247-254.

BELLOMO M. J. and Melle G. V. (1981a). Variability of nucleolar organizer activity in human lymphocytes via Ag-staining. Hum. Genet. *59*: 141-147.

BELLOMO M. J. and Melle G. V. (1981b). It is always the same NOR that is more active in a pair of acrocentrics with distinct Ag-staining? Hum. Genet. *59*: 185

BLOOM S. E., Goodpasture G. (1976). An improved technique for selective silver staining of nucleolar regions in human chromosomes. Hum. Genet. *34*: 199-206.

BOBROW M. and Heritage J. (1980). Nonrandom segregation of nucleolar organizing chromosomes at mitosis? Nature Vol.*288*: 79-81.

BÜHLER E. M. and Malik N. J. (1988). DA/DAPI heteromorphisms in acrocentric chromosomes other then 15. Cytogenet. Cell Genet. *47*: 104-105.

BUSCH H., Daskal Y., Gyorkey F. and Smetana K. (1979). Silver staining of nucleolar granulesin tumor cells. Cancer Res. *39*: 857-863.

BUYS C. M. and Osinga J. (1980). Abundance of protein-bound sulfhydryl and disulfide groups at chromosomal nucleolus organizing regions. A cytochemical study on the selective silver staining of NORs. Chromosoma *77*: 1-11.

BUYS C. and Osinga J. (1984). Selective staining of the same set of nucleolar phosphoproteins by silver and Giemsa. Chromosoma *89*: 387-396.

BUYS C. M., Osinga J. and Anders G. Y. P. A. (1979). Age-dependent variability of ribosomal RNA-genes activity in man as determined from frequencies of silver staining nucleolus organizing regions on metaphase chromosomes of lymphocytes and fibroblasts. Med. Ageing Develop. *II*: 55-75.

BUYS C., Osinga J., Gonw W. L. and Anders G. Y. P. A. (1978). Rapid identification of chromosomes carring silver staining nucleolus organizing regions. Application to a case of 21/21 Robertsonian translocation. Hum. Genet. *44*: 173-180.

CASPERSSON T. Lomakka G. and Zech I. (1971). The 24 fluorescence patterns of human metaphase chromosome distinguishing caracters and variability. Hereditas *67*: 89-102.

CLAVAGUERA A., Querol E., Coll D., Genesca J. and Egozcue J. (1983). Cytochemical studies on the nature of NOR (nucleolus organizer region) silver stainability. Cellular and Molecular Biology *29(3)*: 255-259.

CLAVAGUERA A., Querol E., Coll D. and Egozcue J. (1984). Is silver stainability of nucleolar organizer regions exclusively attributable to proteins? Cellular and Molecular Biology *30(3)*: 175-177.

CHAMBON P. (1978). The molecular biology of eukariotic genoma is coming of age. Cold Spring Harbor Syrup. Quant. Biol. *42*: 1209-1234.

CHEN T. R., Kao M. L., Marks J. and Chen Y. Y. (1981). Polymorphic variants in human chromosome 15. Am. J. of Med. Genet. *9*: 61-66.

CHENG D. M., Denton T. E., Liem S. L. and Elliot C. L. (1981). Variation in nucleolar organizer activity in lymphocytes of females with adenocarcinoma. Clin.Genet. *19*: 145-148.

COHEN M. M.and Shaw M. W. (1967). The association of acrocentric chromosomes in 1000 normal human male methaphase cells. Ann. Hum. Genet. *31*: 129-137.

COLOMB H. M., Bahr G. F. (1974). Electron microscopy of human interphase nuclei. Determination of total dry mass and DNA-packing ratio. Chromosoma *46*: 233-245.

COMINGS D. E. (1977). Mammalian chromosome structure. In: Chromosomes today. vol.*6*: 19-26. La Chapelle A. and Sorsa M. (eds.), Elsevier/North Holland Biomedical Press, Amsterdam.

COMINGS D. E. (1978). Mechanisms of chromosome banding and implication for chromosome stucture. Ann. Rev. Genet. *12*: 25-46.

COMINGS D. E. and Okada T. A. (1979). Chromosome scaffolding structure real or artifact? J. Cell Biol. *83*: 150 a

COOK P. (1971). Patterns of secondary association between the acrocentric autosomes of man. Chromosoma *36*: 221-240.

COOK P. (1972). Age-related variation in the number of secondary associations between acrocentric chromosomes in normal females and patients with Turner's syndrome. Hum. Genet. *17*: 29-35.

COOK P. and Curtis D. J. (1974). General and specific patterns of acrocentric associations in parents of mongol children. Hum. Genet. *23*: 279-287.

BIBLIOGRAFIA

COOPER H. L. and Hirschhorn K. (1962). Enlarged satellites as a familial chromosome marker. Am. J. Hum. Genet. *14*: 107-124.

CURTIS D. J. (1974). Acrocentric association in Mongol populations. Hum. Genet. *22*: 17-22.

DASKAL Y., Smetana K. and Busch H. (1980). Evidence from studies on segregated nucleoli that nucleolar silver staining proteins C23 and B23 are in fibrillar component. Exp. Cell Res. *127*: 285-291.

DeCAPOA A., Ferraro M., Lavia P., Pelliccia F. and Finazzi A. A. (1981). Relationship between selective staining and chemical structure of active nucleolus organizers. Atti Associazione Genetica Italiana vol.*XXVIII*: 143-144.

DeCAPOA A., Ferraro M., Lavia P., Pelliccia F.and Finazzi A. A. (1982). Silver staining of nucleolus organizer regions (NOR) requires clusters of sulfhydryl groups. The Journal of Histochemistry and Cytochemistry vol. *30* nº *9*: 908-911

DeCAPOA A., Ferraro M., Menendez F., Mostacci C., Pelliccia F. and Rocchi A. (1978). Ag-staining for the nucleolus organizer (NO) and its relationship to satellite association. Hum. Genet. *44*: 71-77.

DeCAPOA A., Felli M. P., Rocchi M., Archidiacono N., Alexandre C., Miller O. J. and Miller D.A. (1988). Relationship between the number and function of human ribosomal genes. Hum. Genet. *79*: 301-304.

DeLOZIER-BLANCHET C. D., Walt H. and Engel E. (1986). Ectopic nucleolus organizer regions (NORs) in human testicular tumors. Cytogenet. Cell Genet. *41*: 107-113.

DeLERNIA R., Crimando C. and Pacchetti G. (1982). The study of X-rays and TCDD effects on satellite associations may suggest a simple model for application in environmetal mutagenesis. Hum. Genet. *61*: 42-47.

DeLERNIA R., Riva M. L. and Ginelli E. (1980). Satellite association and silver staining in a case of multiple G and D variants. Hum. Genet. *53*: 237-240.

DERENZINI M., Hernandez-Verdun D., Farabegoli F., Pession A. and Novello F. (1987). Structure of ribosomal genes of mammalian cells *in situ*. Chromosoma *95*: 63-70.

DERENZINI M., Hernandez-Verdun D., Pession A. and Novello F. (1983b). Structural organization of chromatin in nucleolar organizer regions of nucleoli with a nucleolonema-like and compact ribonucleoprotein distribution. Journal of Ultrastructure Research *84*: 161-172.

DERENZINI M., Pession A., Betts-Eusebi C. M. and Novello F. (1983c). Relationship between the extended non-nucleosomal intranucleolar chromatin *in situ* and ribosomal RNA synthesis. Exp. Cell Res. *145*: 127-143.

DERENZINI M., Pession A., Licastro F. and Novello F. (1985). Electron microscopical evidence that ribosomal chromatin of human circulating lynphocytes is devoid of histones. Exp. Cell Res. *157*: 50-62.

DuPRAW E. J. (1965a). Macromolecular organization of nuclei and chromosomes - a folded fiber model based on whole-mount electron microscopy. Nature *206*: 338-343.

DuPRAW E. J. (1966). Evidence for a folded fiber organization in human chromosomes. Nature *208*: 577-581.

DuPRAW E. J. (1970). DNA and chromosomes. Holt, Rinehart and Winston, New York.

DuPRAW E. J. and Bahr G. F. (1969). The arrangement of DNA in human chromosomes, as investigated by quantitative electron microscopy. Acta Cytolo. *13*: 188-205.

EVANS H. J., Buckland R. A. and Pardue M. L. (1974). Localization of the genes coding for 18S and 28S ribosomal RNA in the human genome. Chromosoma *48*: 405-426.

FERGUSON-SMITH M. A. (1964). The sites of nucleolus formation in human pachytene chromosomes. Cytogenetics *3*: 124-134.

FERGUSON-SMITH M. A. and Handmaker S. D. (1961). Observations on the satellite human chromosomes. Lancet *25* March: 638-640.

FERRARO M., Archidiacono P., Pelliccia F., Rocchi M., Rocchi A. and De Capoa A. (1977). Secondary constriction and nucleolus organizer regions in man. Exp. Cell Res. *104*: 428-430.

FERRARO M. and Lavia P. (1983). Activation of human ribosomal genes by 5-azacitidine. Exp. Cell Res.*145*: 252-257.

FERRARO M. and Lavia P. (1985). Differential gene activity visualized on sister chromatids after replication in the presence of 5-azacytidine. Chromosoma *91*:
307-312.

FERRARO M., Lavia P., Pelliccia F. and DeCapoa A. (1981). Clonal inheritance of rRNA genes activity: cytological evidence in human cells. Chromosoma *84*: 345-351.

BIBLIOGRAFIA

FERRARO M. and Prantera G. (1988). Human NORs show correlation between transcriptional activity. DNAse I sensitity and hypomethylation. Cytogenet. Cell Genet. *47*: 58-61.

FINCH J. T. and Klug A. (1976). Solenoidal model for superstructure in chromatin. Proc. Nat. Acad. Sci.(USA) *73*: 1897-1901.

FUNAKI K., Matsui S. and Sasaki M. (1975). Location of nucleolar organizers in animal and plant chromosomes by means of an improved N-banding technique. Chromosoma *49*: 357-370.

GALL J. G. (1963). Chromosome fibers from an interphase nucleus. Science *139*: 120-121.

GALL J. G. (1966). Chromosome fibers studied by a spreading technique. Chromosoma *20*: 221-233.

GALPERIN-LeMAITRE H., Hens L. and Sele B. (1980). Comparison of acrocentric associations in male and female cells.Reationship to the active nucleolar organizers. Hum. Genet. *54*: 349-353.

GILLY C., Mouriquand C. and Jeunet E. (1976). Effects de la colchicine et de l'etalement sur le diametre de la fibre chromatidienne. Ann. Genet. *19*: 103-109.

GOODPASTURE C. and Bloom E. S. (1975). Visualization of nucleolar organizer regions in mammalian chromosomes using silver staining. Chromosoma *53*: 37-50.

GOSDEN J. L., Gosden C. M., Lawrie S. S. and Mitchell A. R. (1978). The fate of DNA satellite I, II , III and ribosomal DNA in a familial dicentric chromosome 13, 14. Hum Genet. *41*: 131-141.

GOSDEN J. R., Lawrie S S. and Gorden C. M. (1981). Satellite DNA sequencies in human acrocentric chromosomes: information from translocations and heteromorphisms. Am. J. Hum. Genet. *33*: 243-251.

GOSDEN J. R., Mitchell A. R., Bukand R. A., Clayton R.P. and Evans H. J. (1975). The location of human satellite DNAs on human chromosomes. Exp. Cell. Res. *92*: 148-158.

GOYANES V. J. (1985a). Electron microscopy of chromosomes. Towards an ultrastructural cytogenetics? Cancer Genet. Cytogenet. *15*: 348-367.

GOYANES V. J. (1985b). Staining,recognition and ultrastructure of the human Y chromosomes. The Y chromosome, part A: Basic characteristics of the Y chromosome, cap.*12*: 303-316. Alan,R.Liss.Inc.

GOYANES V. J. and Mendez J. (1982). Extracentromeric connections between sister chromatids demonstrated in human chromosomes induced to condense asymmetrically. Hum. Genet. *62*: 324-326.

GOYANES V. J. and Schvartzman J. B. (1983). Electron microscopy of sister chromatid exchanges. Cytogenet. Cell Genet. *36*: 612-616.

GRAU L. P., Azosin F., Subirana J. A. (1982). Aggregation of mono and dinucleosomes into chromatin like fibers. Chromosoma *87*: 437-445.

HAAPALA O. (1984). Macrocoiling of chromatids during chromosome compaction. In:Chromosomes today, vol.*VIII*: C.Croop (ed), G.Allen and Unwin, London.

HAAPALA O. (1985a). Structural concepts of chromosome axis. Chromosome scaffold and core within coiled mitotic chromatids. Hereditas *103*:23-31.

HAAPALA O. (1985b). Chromatid macrocoiling in human somatic mitosis: macrocoil progression towards metaphase. Hereditas *102*: 189-194.

HAAPALA O. and Nokkala S. (1982). Structure of human metaphase chromosomes. Hereditas *96*: 215-228.

HANSSON A. (1979). Satellite association in human metaphases. A comparative study of normal individuals, patients with Down syndrome and their parents. Hereditas *90*: 59-83.

HANSSON A., Mikkelsen M. (1974). An increased tendency to satellite association of human chromosomes 21: a factor in the etiology of Down's syndrome? IRCS (Anat. Pediat. Psychiat.) *2*: 1617

HANSSON A., Mikkelsen M. (1978). The origin of the extrachromosome 21 in Down syndrome. Studies of fluorescent variants and satellite associations in 26 informative familis. Cytogenet. Cell Genet. *20*: 194-203.

HARRISON C. J., Allen T. D., Britch M. and Harris R. (1982). High-resolution scanning electron microscopy of human metaphase chromosomes. J. Cell Sci. *56*: 409-422.

HARRISON C. J., Jack E. M., Allen T. D. and Harris R. (1985). Investigation of human chromosome polymorphysms by scanning electron microscopy. J. of Med. Genet. *22*: 16-23.

HASSOLD T., Jacobs P.A. and Pettay D. (1987). Analysis of nucleolar organizing regions in parents of trisomic spontaneous abortions. Hum. Genet. *76*: 381-384.

BIBLIOGRAFIA

HAYATA I., Oshimiva M., Sandberg A. A. (1977). N-band polymorphism of human acrocentric chromosomes and its relevance to satellite association. Hum. Genet. *36*: 55-61

HEITZ E. (1931). Die Ursache der gesetzmäßigen Zahl. Lage, Form und Größe pflanzlicher nucleolen. Planta *12*: 775-844.

HENDERSON A.S. and Atwood K. C. (1976). Satellite association frequency and rDNA content of a double satellited chromosome. Hum. Genet. *31*: 113-115.

HENDERSON A. S., Warburton D. (1972). Localization of ribosomal RNA in the human complement. Proc. Nat. Acad. Sci. *69*: 3394-3398.

HENDERSON A.S., Warburton D. and Atwood K. C. (1973). Ribosomal DNA connectives between human acrocentric chromosomes. Nature *245*: 95-97.

HENS L., Volders M. K., Arrighi F. E. and Susanne C. (1980). Relationship between measured chromosome distribution parameters and Ag-staining of nucleolus organizer regions. Hum. Genet. *53*: 363-370.

HERNADEZ-VERDUN D. (1983). The nucleolar organizer regions. Biol. Cell *49*: 191-202.

HERNANDEZ-VERDUN D., Derenzini M. (1983). Non-nucleosomal configuration of chromatin in nucleolar organizer regions of metaphase chromosomes *in situ*. Eur. J. Cell Biol. *31*: 360-365.

HERNANDEZ-VERDUN D., Derenzini M. and Bouteille M. (1982). The morphological relationship in electron microscopy between NOR-silver proteins and intranucleolar chromatin. Chromosoma *85*: 461-473.

HERNANDEZ-VERDUN D., Derenzini M. and Bouteille M (1984). Relationship between the Ag-NOR proteins and ribosomal chromatin *in situ* during drug-induced RNA synthesis inhibition. Journal of Ultrastructure Research *88*: 55-65.

HERNANDEZ-VERDUN D., Hubert J., Bourgeois C. A. and Bouteille M. (1980). Ultrastructural location of Ag-NOR staining proteins in the nucleolus during the cell cycle and in other nucleolar structures. Chromosoma *79*: 349-362

HöFGARTNER F.J., Kröne W., Jain K. (1979). Correlated inhibition of rRNA synthesis and silver staining by actinomycin D. Hum. Gent. *47*: 329-333.

HOUGTHON J. A. (1979). Relationship between satellite association and the occurrence of non-disjunction in man. Mut. Res. *61*: 103-114.

HOWELL W. M. (1982). Selective staining of nucleolus organizer regions (NORs). The cell nucleus vol *XI* pp: 90-142.

HOWELL M. W. and Black A. D. (1980). Controlled silver staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. Experientia *26*: 1014-1015.

HOWELL M. W. and Denton T. E. (1974). An ammoniacal silver stain technique specific for satellite III-DNA regions on human chromosomes. Experientia *30*: 1364-1366.

HOWELL M. W., Denton T. E., Diamond J. R. (1975). Differencial staining of satellite regions of human acrocentric chromosomes. Experientia *31*: 260-262.

HOWELL M. W. and Hsu T. C. (1979). Chromosome core structure revealed by silver staining. Chromosoma *73*: 61-66.

HUBBELL H. R., Lawrence I. R. and Hsu T. C. (1979). Identification of silver binding protein associated with the cytological silver staining of actively transcribing nucleolar regions. Cell Biollogy International Reports vol*3* nº*7*: 615-622.

HUBELL H. R., Law Y. F., Brown R. L. and Hsu T. C. (1980). Cell cycle analisis and drug inhibition studies of silver staining in synchronised HeLa cells. Exp. Cell Res. *129*: 139-147.

HSU T.C., Brinkley B. R. and Arrighi F. E. (1967). The structure and behavior of nucleolus organizer in mammalian cells. Chromosoma *23*: 137-153.

HSU T. C., Spirito S. E. and Pardue M. L. (1975). Distribution of 18S+28S ribosomal genes in mammalian genomes. Chromosoma *53*: 23-36.

IMAIZUNI K., Kajii T. and Niikawa N. (1981). 13s+. Giant satellits or *de novo rearrangement?. Hum. Genet. 59*: 266-268.

JACKSON-COOK C. K., Flannery D. B., Corey L.A., Nance W. E. and Brown J. A. (1985). Nucleolar organizer region variants as a risk factor for Down syndrome. Am. J. Hum. Genet. *37*: 1049-1061.

JACOBS P. A. and Mayer M. (1981). The origin of human trisomy: a study of heteromorphisms and satellite associations. Am. Hum. Genet. *45*: 357-365.

JACOBS P. A., Mayer M. and Morton N. E. (1976). Acrocentric association in man. Am. J. Hum. Genet. *28*: 567-576.

JACOBS P. A., Merville M. and Ratcliffe S. (1974). A cytogenetic survey of 11680 newborn infants. Ann. Hum. Genet. *37*: 359.

JACOBS P. A. and Morton N. E. (1977). Origin of human trisomies and polyploids. Hum Genet. *46*: 107-110.

BIBLIOGRAFIA

KAMEI T., Lee-Okimoto S. Sohda M. and Nïkawa (1986). A further improved method for identifying heteromorphism of acrocentric chromosomes. Hum. Genet. *73*: 368-371.

KAOSAAR M. E. (1971). On cases of the occurrence of marker chromosomes of 21/22 and 13/15 groups (Gp+ an Dp+). Genetika *7*: 114-121.

KORNBERG R. D. (1974). Structure of chromatin. Ann. Rev. Biochem. *46*: 931-954.

KUMAGAI M. (1982). Influence of ageing on satellite association in human chromosomes. Acta Scholae Medicinalis Universitis, in Gi Fu Vol. *30*, nº30: 494-510.

KURNIT D.M ., Neve R. L., Morton C. C., Bruns G. A. P., Ma N. S. F., Cox D. R. and Klinger H. P. (1984). Recent evolution of DNA sequence homology in the pericentromeric regions of human acrocentric chromosomes. Cytogenet. Cell Genet. *38*: 99-105.

KURNIT D. M. (1979). Satellite DNA and heterocromatin variants: the case for unequal mitotic crossing over. Hum Genet. *47*: 169-186.

LAEMMLI U. K., Cheng S. M., Adolph K. W., Paulson J. R., Brown J. A. and Baumbach W. R. (1978). Metaphase chromosome structure: the role of nonhistone proteins. Cold Spring Harbor, Symp. Quant. Biol. *42*: 351-360.

LAU Y. F., Wertelecki W., Pfeiffer R.A., Arrighi F.E. (1979). Cytological analysis of a 14p+ variant by means of N-banding and combination of silver staining and chromosome bandings. Hum. Genet. *46*: 75-82.

LEE GOULD S. and Martin-DeLeon P. A. (1987). BrDU-Giemsa labeling studies of satellite association in parents of children with trisomic 21 or 13. Am. J. of Med. Genet. *26*: 971-981.

LEJEUNE J., Gautier M. and Turpin R. (1959). Etude des chromosomes somatiques de neuf enfants mongoliens. Compt. Rend. *248*: 1721-1722.

LIEM S. L., Denton T. E. and Cheng K. M. (1977). Distribution patterns of satellite associations in human lymphocytes relative of age and sex. Clin. Genet. *12*: 104-110.

LINDENBAUM R. S., Hultén M., McDermott A. and Seabright M. (1985). The prevalence of translocations in parents of children with regular trisomy 21: a possible interchromosomal effect? J. of Med. Genet. *22*: 24-28.

LIVINGSTON G. K., Lockey J. E., Witt K. S. and Rogers S. W. (1985). An unstable giant satellite associated with chromosomes 21 and 22 in the same individual. Am. J. Hum. Genet. *37*: 553-560.

LISCHWE M. A., Smetana K., Olson M. O. J., Busch H. (1979). Proteins C23 and B23 are the major nucleolar silver staining proteins. Life Sciences *25*: 701-708.

LUBBS H. A. and Ruddle F. H. (1970). Applications of quantitative karyotypy to chromosome variation. Hum. Population Cytogenet. Pfizer Medical Monographis nº *5* pp: 119, Edinburgh Univ. Press.

MAMAEV N. N., Mamaev S. E., Grabovskaya I. L., Makarkina G. N., Kozlova T. V., Medvedeva N. V. and Marynets O. V. (1987). The activity of nucleolar organizer regions of human bone marrow cells studied with silver staining. II. Acute leukemia. Cancer Genet. Cytogenet. *25*: 65-72.

MARKOVIC V. D., Worton R. G., Breg J. M. (1978). Evidence for the inheritance of silver stained nucleolus organizer regions. Hum. Gent. *41*: 181-187.

MARSDEN M. P. and Laemmli V. K. (1979). Metaphase chromosome structure: evidence for a radial loop model. Cell *17*: 849-858.

MATSUI S., Fuke M., Chai L., Sandberg A. A., Elassouli S. (1986). N-band proteins of nucleolar organizers: chromosomal mapping, subnucleolar localization and rDNA binding. Chromosoma *93*: 231-242.

MATSUI S. and Sandberg A. A. (1985). Intranuclear compartmentalization of DNA-dependent RNA polymerases: association of RNA polymerase I with nucleolar organizing chromosomes. Chromosoma *92*: 1-6.

MATSUI S. and Sasaki M. (1973). Differencial staining of nucleolus organizers in mammalian chromosomes. Nature *246*: 148-150.

MATTEI J. F., Ayme S., Mattei M. G., Gouvernet J. and Giraud F. (1976). Quantitative and qualitative study of acrocentric associations in 109 normal subjects. Hum. Genet. *34*: 185-195.

MATTEI M. G., Mattei J. F., Aymes S. and Giraud F. (1979a). Origin of extrachromosome in trisomy 21. Hum. Genet. *46*: 107-110.

MATTEI M. G., Mattei J. F., Aymes S. and Giraud F. (1979b). Dicentric Robertsonian translocations in man: 17 cases studied by R, C and N-banding. Hum. Genet. *50*: 33-38.

MATTEVI M. S. and Salzano F. M. (1975). Effect of sex, age and cultivation time on number of satellite and acrocentric associations in man. Hum. Genet. *28*: 265-270.

McCLINTOCK B. (1934). The relation of a particular chromosome element to the developement of the nucleoli in Zea mays. Z. Zellforsch *21*: 294-328.

BIBLIOGRAFIA

McKENZIE W. H. and Lubs H. A. (1975). Human Q and C chromosomal variations: distribuition and incidence. Cytogenet. Cell genet. *14*: 97-115.

MEDINA F. J., Risueño M. C., Sanchez-Pina M. A. and Fernandez-Gomez M. E. (1983). A study on nucleolar silver staining in plant cells.The role of argyrophilic proteins in nucleolar physiology. Chromosoma *88*: 149-155.

MEDINA F. J., Solanilla E., Sanchez-Pina M. A., Fernandez-Gomez M. E. and Risueño M. C. (1986). Cytological approach to the nucleolar functions detected by silver staining. Chromosoma *94*: 259-266.

MIKELSSAR A. V. and Ilus T. (1979). Population polymorphisms in silver staining of nucleolus organizer regions in human acrocentric chromosomes. Hum. Genet. *51*: 281-285.

MIKELSAAR A. V., Schmid M., Krone W., Schwarzacher H. G. and Schnedl W. (1977a). Frequency of Ag-stained nucleolus organizer regions in the acrocentric chromosomes in man. Hum. Genet. *37*: 73-77.

MIKELSAAR A. V. and Schwarzacher H. G. (1978). Comparison of silver staining of nucleolus organizer regions in human lymphocytes and fibroblasts. Hum.Genet. *42*: 291-299.

MIKELSAAR A. V., Schwarzacher H. G., Schnedl W. and Wagenbichler P. (1977b). Inheritance of Ag-stainability of nucleolus organizer regions. Investigation in 7 families with trisomy 21. Hum. Genet. *38*: 183-188.

MIKKELSEN M., Basli A. and Poulsen H. (1980). Nucleolus organizer regions in translocations involving acrocentric chromosomes. Cytogenet. Cell Genet. *26*: 14-21.

MILLER D. A., Dev V. G., Tantravahi R., Miller O. J. (1976-a). Suppression of human nucleolus organizer activity in mouse-human somatic hybrid cells. Exp.Cell Res. *101*: 235-243.

MILLER O. J., Miller D. A., Dev V.G., Tantravahi R. and Croce C.M. (1976-b). Expression of the human and suppression of mouse nucleolus activity in mouse-human somatic cell hibrids. Proc. Natn. Acad. Sci. (USA) *73*: 4531-4535.

MILLER O. J., Miller D. A., Dev V. G., Tantravahi R. and Croce C. M. (1977). Frequency of satellite association of chromosomes is correlated with amount of Ag-staining of the nucleolus organizer regions. Am. J. Hum. Genet. *29*: 240-502.

MILLER O. J., Miller D. A., Tantravahi R. and Dev V. G. (1978). Nucleolus organizer activity and the origin of Robertsonian translocation. Cytogenet.Cell Genet. *20*: 40-50.

MOORHEAD P. S., Nowell P. C., Mellman W. J., Battips D. M. and Hungerford D. A. (1960). Chromosomes preparations of leucocytes cultured from human peripheral blood. Exp. Cell Res. *20*: 613-616.

MORIQUAND C., Gilly C. et Wolff C. (1974). Ultrastructure du chromosome: données fournies par l'observation du chromosome entier. Ann. Génét. *15* nº *4*: 249-256.

MUSILOVÁ J., Michalová K. and Hoffmanová H. (1983). Increased satellite association induced by 5'-bromodeoxyuridine treatment of phytohemaglutinin stimulated blood lymphocytes. Hum. Genet. *65*: 91-93.

NAKAGOME Y. (1973). G-group chromosomes in satellite association. Cytogenet. Cell Genet. *12*: 336-341.

NANKIN H. R. (1970). *In vitro* alteration of satellite association and nucleolar persistence in mitotic human lymphocytes. Cytogenet. *9*: 42-51.

NILSSON C., Hansson A. and Nilsson G. (1975). Influence of thyroid hormones on satellite association in man and the origin of chromosome abnormalities. Hereditas *80*: 157-166.

OCHS R. L. and Busch H. (1983a). Further evidence that phosphoprotein C23 (110 KD/pl 5,1) is the nucleolar silver staining protein. Exp. Cell Res. *152*: 260-265.

OCHS R. L., Lischwe M., O'Leary P. and Busch H. (1983b). Localization of nucleolar phosphoproteins B23 and C23 during mitosis. Exp. Cell Res. *146*: 139-149.

OHNO S., Trujillo J. M., Kaplan W. D. and Kinoshita R. (1961). Nucleolus organizers in the causation of chromosome anomalias in man. Lancet ii:123-126.

OKADA T. A. and Comings D. E. (1979). Higher order structure of chromosomes. Chromosoma *72*: 1-14.

OKAMOTO E., Mikker D. A., Erlanger B. F. and Miller O. J. (1981). Polymorphism of 5-metylcytosine-rich DNA in human acrocentric chromosomes. Hum. Genet. *58*: 255-259.

OLERT J., Saquatzki G., Kling H. and Gebaner J. (1979). Cytological and histochemical studies on the mechanism of the selective silver staining of nucleolus organiser regions (NORS). Histochemistry *60*: 91-99.

OLINS A. L. and Olins D. E. (1974). Spheroid chromatin units (V-bodies). Science *183*: 303-332.

BIBLIOGRAFIA

PARDUE M. L. and Hsu T. C. (1975). Location of 18S and 28S ribosomal genes in chromosomes in *Indian Muntjak*. J. Cell Biol. *64*: 251-254.

PARIS CONFERENCE (1971). Standardization in human cytogenetics. Birth Defects: Original Article Series *8*: 1-46. The National Foundation-March of Dimes, New York.

PARIS CONFERENCE SUPPLEMENT (1975). Birth Defects: Original Article Series *11*: 1-36. March of Dimes, New York.

PATAU K., Smith D. W. and Therman E. (1960). Multiple congenital anomaly caused by an extra autosome. Lancet *i*: 790-793.

PATIL S.R., Merrick S. and Lubs H. A. (1971). Identification of each human chromosome with a modified Giemsa stain. Science *173*: 821-822.

PAWELETZ N. and Risueño M. C. (1982). Transmission electron microscopic studies on the mitotic cycle of nucleolar proteins impregnated with silver. Chromosoma (Ber.) *85*: 261-273.

PEREZ-CASTILLO A., Martin-Lucas M. A. and Abrisqueta J. A. (1987). Evidence for lack of specificity of the DA/DAPI technique. Commentary Cytogenet. Cell Genet. 45-62.

PFEIFLE J., Boller K. and Anderer F. A. (1986). Phosphoprotein pp135 is essential component of the nucleolus organizer region (NOR). Exp. Cell Res. *162*: 11-22.

PLOTON D., Bobichon H. and Adnet J. (1982). Ultrastructural localization of NOR in nucleoli of human breast cancer tissues using a one step Ag-Nor staining method. Biol. Cell *43*: 229-232.

PLOTON D., Menager M. and Adnet J. J. (1985). Simultaneous ultrastructural localization of Ag-Nor (nucleolar organizer region) proteins and ribonucleoproteins during mitosis in human breast cancerous tissues. J. Cell Sci. *74*: 239-256.

PLOTON D., Menager M., Lepoint A. Adnet J. J. and Goessen G. (1987). Behaviour of nucleolus during mitosis. A comparative ultrastructural study of various cancerous cells lines using the Ag-NOR staining procedures. Chromosoma *95*: 95-107.

RATTNER J. B. and Hamkalo B. A. (1978a). Higher order structure in metaphase chromosomes. I. The 250 Å fiber. Chromosoma *69*: 363-372.

RATTNER J. B. and Hamkalo B. A. (1978b). Higher order structure in metaphase chromosomes. II. The relationship between the 250 Å fiber, super-beads and beads-on-string. Chromosoma *69*: 373-379.

RATTNER J. B. and Lin C. C. (1985). Radial loops and helical coils coexist in metaphase chromosomes. Cell vol *42*: 281-296.

RAY M. and Pearson J. (1979). Nucleolar organizing regions of human chromosomes. Hum. Genet. *48*: 201-210.

RIS H. (1978). Levels of chromosome organization. J. Cell Biol. *79*: 107-a.

RIS H. and Witt P. L. (1981). Structure of mammalian kinetocore. Chromosoma *82*: 153-170.

RUFAS J. S., Gonsalves J., Lopez-Fernandez C. and Cardoso H. (1983). Complete dependence betwween Ag-NORs and C-positive heterocromatin reveled by simultaneous Ag-NOR C-banding method. Cell Biol. Int. Rep. vol. *7* nº *4*: 275-281.

SATO Y., Abe S., Kubota K., Sasaki M. and Miura Y. (1986). Silver-staining nucleolar organizer regions in bone-marrow cells and peripheral blood lymphocytes of philadelphia chromosome positive chronic myelocytic leukemia patients. Cancer Genet. Cytogenet. *23*: 37-45.

SMIADY H., Münke M. and Sperling K. (1979). Ag-staining of nucleolus organizer regions on human prematurely condensed chromosomes from cells with different ribosomal RNA gene activity. Exp. Cell Res. *121*: 425-428.

SCHNEDL W. (1978). Structure and variability of human chromosomes analysed by a recent techniques. Hum. Genet. *41*: 1-9.

SCHWARZACHER H. G. (1976). Chromosomes in mitosis and interphase. Springer Verlag, Berlin Heidelberg, New York, pp: 32.

SCHWARZACHER H. G., Milkelsaar A. V., Schnedl W. (1978). 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 *20*: 24-39.

SCHWARZACHER H.G. and Wachtler F. (1983). Nucleolus organizer regions and nucleoli. Hum. Gent. *63*: 89-99.

SEABRIGHT M. (1971). A rapid banding technique for human chromosomes. Lancet *ii*: 971-972.

SEDAT J. and Manuelidis L. (1978). A direct approch to the structures of eukaryotic chromosomes. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. pp: 331-350.

BIBLIOGRAFIA

SIGMUND J., Schwarzacher H. G. and Mikelsaar A. V. (1979). Satellite association frequency and number of nucleoli depend on cell cycle duration and NOR-activity. Studies on first, second and third mitosis of lymphocytes culture. Hum. Genet. *50*: 81-91.

SOZANSKY O. A. (1983a). Technical factors in variability of silver staining of the nucleolus organizer regions of human chromosomes. Bulletin of Experimental Biology and Medicine, Vol.*95* nº*1*: 153-156.

SOZANSKY O. A. (1983b). Functioning of nucleolus organizing regions of chromosomes in human lymphocyte cultures. Experimental Genetics pp: 495-497.

SOZANSKY O. A., Zakharov A. F. and Benjush V. A. (1984). Intercellular NOR-Ag variability in man. I. Technical improvements and marker acrocentric chromosomes. Hum. Genet. *68*: 299-302.

SOZANSKY O. A., Zakharov A. F. and Terekhov S. M. (1985). Intercellular NOR-Ag variability in man. II. Search for determining factors, clonal analysis. Hum. Genet. *69*: 151-156.

STAHL A. (1981). The nucleolus and nucleolar chromosomes. In: The nucleolus, Jordan, E.G. and Cullis, C.A. (eds.), Cambridge University Press, Cambridge, U.K, pp: 1-24.

STAMBERG J., Shende A. and Lanzkowsky P. (1986). Somatic shift to homozyosity for a chromosomal polymorphism in a child with acute lympho blastic leukemia. Blood vol. *67* nº *2* pp: 350-353.

STENSTRAND K. (1978). Low dose X-radiation and acrocentric chromosome satellite associations in human lymphocytes. Hereditas *88*: 131-133.

STROBEL R. J., Pathak S. and Hsu T. C. (1981). NOR lateral assymetry and its effect on satellite association in BrdU-labeled human lymphocyte cultures. Hum. Genet. *59*: 259-262.

SUBIRANA J.A., Muñoz Guerra S., Martinez A. B., Perez-Grau L., Marcet X. and Fita I. (1981). The subunit structure of chromatin fibers. Chromosoma *83*: 455-471.

TANTRAVAHI R., Breg W. R., Wertelecki V., Erlanger B. F. and Miller O. J. (1981). Evidence for methylation of inactive human rRNA genes in amplified regions. Hum. Genet. *56*: 315-320.

TANTRAVAHI R., Miller D. A. and Miller O. J. (1977). Ag staining of nucleolus organizer regions of chromosomes after Q, C, G or R banding procedures. Cytogenet. Cell Genet. *18*: 364-369.

TAYLOR E. F. and Martin-de Leon P. A. (1981). Familial silver staining patterns of human nucleolus organizer regions (NOR). Am. J. Hum. Genet. *33*: 67-76.

TAYSI K. (1975). Satellite association: Giemsa banding studies in parents of Down's syndrome patients. Clin. Genet. *8*: 319-323.

TSVETKOVA T. G. (1980). Chromosome polymorphisms in married couples with reproductive failure. Cand. Thesis Moscow.

VARLEY J. M. (1977). Patterns of silver staining of human chromosomes. Chromosoma *61*: 207-214.

VERMA R. S., Benjamin C., Rodriguez J. and Dosik H. (1981). Population heteromorphisms of Ag-stained nucleolus organizer regions (NORs) in the acrocentric chromosomes of East Indians. Hum. Genet. *59*: 412-415.

VERMA R. S., Benjamin C. and Dosik H. (1983a). Expression of nucleolus organizer regions (NORs) in human acrocentric chromosomes by NSG, QFQ and RFA techniques: are they identical? Cytobios *37*: 157-162.

VERMA R. S. and Dosik H. (1980). Human chromosome heteromorphisms. Int. Rev Cytol. *62*: 361-383.

VERMA R. S., Dosik H. and Lubs H. A. (1977-a). Demonstration of colour and size polimorphisms in human acrocentric chromosomes by acridine orange reverse banding. J. Heredity *68*: 262-263.

VERMA R. S., Dosik H. and Lubs H. A, (1977b). Size variation of short arm of human acrocentric chromosomes determined by R-banding by fluorescence using acridine orange (RFA). Hum. Genet. *38*: 231-234.

VERMA R. S. and Lubs H. A. (1975a). A simple R banding technique. Am. J. Hum.Genet. *27*: 110-117.

VERMA R. S. and Lubs H. A. (1975b). Variation in human acrocentric with acridine orange reverse banding. Humangenetik *30*: 225-235.

VERMA R. S. and Lubs H. A. (1976). Aditional observation on the preparation of R-banded chromosomes with acridine orange. Can. J. Genet. Cyol. *18*: 45-50.

VERMA R. S., Rodriguez J., Shah J. V. and Dosik H. (1983a). Preferential association of nucleolar organising human chromosomes as revealed by silver staining technique at mitosis. Mol. Gen. Genet. *190*: 352-354.

VERMA R. S. and Rodriguez J. (1985). Structural organization of ribosomal cistrons in human nucleolar organizing chromosomes. Cytobios *44*: 25-28.

VERMA R. S., Shah J. V. and Dosik H. (1983b). Frequencies of chromosomes and chromatids types of associations of nucleolar human chromosomes demonstrated by the N-banding technique. Cytobios *36*: 25-29.

VERMA R. S., Shah J. V. and Dosik H. (1984). Expression of ribosomal cistrons of human chromosomes at high resolution. Stain Technology vol.*59*, nº*1*: 13-16.

VIEGAS-PEQUIGNOT E. and Dutrillaux B. (1978). Une méthode simple pour obtenir des prophases et des prometaphases. Ann. Génét.: 21-22

VORMITTAG W. (1980). Effect of age and cultivation time on acrocentric associations in females. Akt. Gerontol. *10*: 309-318.

WARBURTON D., Atwood K. C. and Henderson A. S. (1976). Variation in the number of genes for rRNA among human acrocentric chromosomes: correlation with frequency of satellite association. Cytogenet. Cell Genet. *17*: 221-230.

WARBURTON D. and Henderson A. S. (1979). Sequential silver staining and hybridization *in situ*on nucleolus organising regions in human cells. Cytogenet. Cell Genet. *24*: 168-175.

WACHTLER F. and Musil R. (1980). On the structure and polymorphism of the human chromosome 15. Hum. Genet. *56*: 115-118.

WERNER W and Herrman F. H. (1984). Analysis of a familial 15p+ polymorphism: exclusion of Y/15 translocation. Clin. Genet. *26*: 204-208.

WHITE M. J. D. (1945). Animal cytology and evolution. Cambridge Univ. Press.

WILLIAMS M. A., Kleinschmidt J. A., Krohne G. and Franke W. W. (1982). Argyrophilic nucleolar proteins of *Xenopus laevis* oocytes identified by gel electrophoresis. Exp. Cell Res. *137*: 341-351.

WOLFF C., Gilly C. and Mouriquand C. (1974). Collecting human chromosomes for whole-mount electron microscopy. Stain Tchnology vol. *42* nº *3* pp: 133-136.

WOODCOCK C. L. F., Frado L. L. and Rattner J. B. (1984). The higher-order structure of chromatin: evidence for a helical ribbon arrangement. The J. Cell Biol. vol. *99* pp: 42-52.

WOODRUFF K. M. and Martin De Leon A. P. (1982). Support for random alignment of mitotic chromatids in associating nucleolus organisers. Hum. Genet. *61*: 27-30.

WORCEL A., Strogartz S. and Riley D. (1981). Structure of chromatin and linking number of DNA. Proc. Natl. Acad. Sci., USA, *78* : 1461-1465.

YUNIS J. J. and Bahn G. F. (1979). Chromatin fiber organization of human interphase and prophase chromosomes. Exp. Cell Res. *122*: 63-72.

ZAKHAROV A. F., Davudov V. Z., Benjush V. A. and Egolina N. A. (1982a). Polymorphism of Ag-stained nucleolar organiser regions in man. Hum. Genet. *60*: 334-339.

ZAKHAROV A. F., Davudov V. Z., Benjush V. A. and Egolina N. A. (1982b). Genetic determination of NOR activity in human lynphocytes from Twins. Hum. Genet. *60*: 24-29.

ZANG K. D. and Back E. (1968). Quantitative studies on the arrangement of human metaphase chromosomes. I. Individual features in the association pattern of acrocentric chromosomes of normal male and female. Citogenet. : 455-470.

ZANG K. D. and Back E. (1969). Quantitative studies on the arrangement of human metaphase chromosomes.II.Influence of preparation techniques on the ssociation pattern of the acrocentric chromosomes. Cytogenet. *8*: 304-314.

ZANKL H. and Hahman S. (1978). Cytogenetic examination of the NOR activity in a proband with 13/13 translocation and in her relatives. Hum. Genet. *43*: 275-279.

ZANKL H., Mayer C. and Zang K. D. (1980). Association frequency and silver staining of nucleolus organizing regions in hipertyroid patient. Hum. Genet. *54*: 111-114.

ZANKL H. and Zang K. D. (1974). Quantitative studies on the arrangement of human metaphase chromosomes.IV. The association frequency of human acrocentric marker chromosomes. Humangenetik *23*: 259-265.

ZELLWEGER H., Abbo G. and Cuany R. (1966). Satellite association and translocation mongolism. J. Med. Genet. *3*: 186-189.

ADENDA

1. CROMOSSOMAS D COM SATÉLITE

SEGMENTO CROMOSSÓMICO	CROMATÍDEO	NÚMERO DE PONTOS	AREA RELATIVA
q	1	77	0,81698
	2	77	0,85081
cent	1	5	0,01327
	2	5	0,01382
p + h + s	1		0,16976
	2		0,13537
p	1	35	0,09284
	2	23	0,06354
h	1	2	0,00531
	2	3	0,00829
s	1	27	0,07161
	2	23	0,06354
AREA TOTAL	1	0,63690 μ^2	
	2	0,61157 μ^2	

SEGMENTO CROMOSSÓMICO	CROMATÍDEO	NÚMERO DE PONTOS	AREA RELATIVA
q	1	112,5	0,89100
	2	102	0,88662
cent	1	2	0,00396
	2	1,67	0,00363
p + h + s	1		0,10495
	2		0,10975
p	1	36	0,07129
	2	33,5	0,07281
h	1	2	0,00396
	2	1	0,00217
s	1	15	0,02970
	2	16	0,03477
AREA TOTAL	1	0,85314 μ^2	
	2	0,77741 μ^2	

ADENDA

SEGMENTO CROMOSSÓMICO	CROMATÍDEO	NÚMERO DE PONTOS	AREA RELATIVA
q	1	84	0,84316
	2	91,5	0,85017
cent	1	13,5	0,03388
	2	12,5	0,02904
p + h + s	1		0,12296
	2		0,12079
p	1	24,5	0,06148
	2	28,5	0,06621
h	1	6	0,01506
	2	3,5	0,00813
s	1	18,5	0,04642
	2	20	0,04646
AREA TOTAL	1	0,67322 μ^2	
	2	0,72728 μ^2	

SEGMENTO CROMOSSÓMICO	CROMATÍDEO	NÚMERO DE PONTOS	AREA RELATIVA
q	1	113	0,84328
	2	109,5	0,89296
cent	1	19,5	0,03638
	2	11	0,02242
p + h + s	1		0,12034
	2		0,08462
p	1	49	0,09142
	2	26,5	0,05404
h	1	3	0,00560
	2	2,5	0,00509
s	1	12,5	0,02332
	2	12,5	0,02549
AREA TOTAL	1	0,90551 μ^2	
	2	0,82865 μ^2	

SEGMENTO CROMOSSÓMICO	CROMATÍDEO	NÚMERO DE PONTOS	AREA RELATIVA
q	1	77	0,85201
	2	78,5	0,84750
cent	1	10	0,02766
	2	11	0,02968
p + h + s	1		0,12036
	2		0,12281
p	1	22,5	0,06244
	2	27,5	0,07423
h	1	2	0,00553
	2	2	0,00540
s	1	19	0,05256
	2	16	0,04319
AREA TOTAL	1	0,61071 μ^2	
	2	0,62591 μ^2	

SEGMENTO CROMOSSÔMICO	CROMATÍDEO	NÚMERO DE PONTOS	AREA RELATIVA
q	1	67	0,89333
	2	70	0,91204
cent	1	3,5	0,01166
	2	1,5	0,00490
p + h + s	1		0,09501
	2		0,08306
p	1	11,5	0,03834
	2	4,5	0,01465
h	1	2,5	0,00833
	2	3	0,00978
s	1	14,5	0,04834
	2	18	0,05863
AREA TOTAL	1	0,50681 μ^2	
	2	0,51865 μ^2	

SEGMENTO CROMOSSÔMICO	CROMATÍDEO	NÚMERO DE PONTOS	AREA RELATIVA
q	1	92,5	0,84475
	2	108,5	0,87149
cent	1	6	0,01370
	2	7	0,01406
p + h + s	1		0,14155
	2		0,11445
p	1	16	0,03653
	2	13	0,02610
h	1	3	0,00685
	2	6	0,01205
s	1	43	0,09817
	2	38	0,07630
AREA TOTAL	1	0,73995 μ^2	
	2	0,84131 μ^2	

SEGMENTO CROMOSSÔMICO	CROMATÍDEO	NÚMERO DE PONTOS	AREA RELATIVA
q	1	57,5	0,81560
	2	58,5	0,83569
cent	1	9,5	0,03369
	2	8	0,02858
p + h + s	1		0,15071
	2		0,13573
p	1	25,5	0,09043
	2	19,5	0,06964
h	1	–	–
	2	2	0,00715
s	1	17	0,06028
	2	16,5	0,05894
AREA TOTAL	1	0,47641 μ^2	
	2	0,47301 μ^2	

SEGMENTO CROMOSSÓMICO	CROMATÍDEO	NÚMERO DE PONTOS	AREA RELATIVA
q	1	93	0,61848
	2	88	0,65457
cent	1	7,5	0,01650
	2	6	0,01443
p + h + s	1		0,16502
	2		0,13100
p	1	31,5	0,06931
	2	27	0,06490
h	1	8	0,01761
	2	7	0,01683
s	1	35,5	0,07810
	2	20,5	0,04927
AREA TOTAL	1	0,76783 μ^2	
	2	0,70281 μ^2	

SEGMENTO CROMOSSÓMICO	CROMATÍDEO	NÚMERO DE PONTOS	AREA RELATIVA
q	1	71	0,85156
	2	79,5	0,84463
cent	1	4	0,01200
	2	5,5	0,01461
p + h + s	1		0,13644
	2		0,14076
p	1	14	0,04198
	2	19,5	0,05179
h	1	3	0,00900
	2	5,5	0,01461
s	1	28,5	0,08546
	2	28	0,07437
AREA TOTAL	1	0,56341 μ^2	
	2	0,63604 μ^2	

SEGMENTO CROMOSSÓMICO	CROMATÍDEO	NÚMERO DE PONTOS	AREA RELATIVA
q	1	92	0,84891
	2	96	0,89720
cent	1	16,5	0,03806
	2	10	0,02336
p + h + s	1		0,11303
	2		0,07944
p	1	40	0,09228
	2	28,5	0,06659
h	1	–	–
	2	–	–
s	1	9	0,02076
	2	5,5	0,01285
AREA TOTAL	1	0,79234 μ^2	
	2	0,72305 μ^2	

SEGMENTO CROMOSSÔMICO	CROMATÍDEO	NÚMERO DE PONTOS	AREA RELATIVA
q	1	56	0,89779
	2	61	0,86968
cent	1	2,5	0,01001
	2	2,5	0,00891
p + h + s	1		0,09219
	2		0,12122
p	1	13,5	0,05412
	2	11,5	0,04100
h	1	–	–
	2	–	–
s	1	9,5	0,03808
	2	22,5	0,08021
AREA TOTAL	1	0,42150 μ^2	
	2	0,47387 μ^2	

SEGMENTO CROMOSSÔMICO	CROMATÍDEO	NÚMERO DE PONTOS	AREA RELATIVA
q	1	85	0,85320
	2	78,5	0,86620
cent	1	8	0,02008
	2	7	0,01932
p + h + s	1		0,12672
	2		0,11448
p	1	24,5	0,06148
	2	18,5	0,05103
h	1	–	–
	2	–	–
s	1	26	0,06524
	2	23	0,06346
AREA TOTAL	1	0,67322 μ^2	
	2	0,61240 μ^2	

SEGMENTO CROMOSSÔMICO	CROMATÍDEO	NÚMERO DE PONTOS	AREA RELATIVA
q	1	74,5	0,81756
	2	76	0,87106
cent	1	10	0,02743
	2	8	0,02293
p + h + s	1		0,15501
	2		0,10601
p	1	33	0,09054
	2	18,5	0,05300
h	1	–	–
	2	–	–
s	1	23,5	0,06447
	2	18,5	0,05300
AREA TOTAL	1	0,61577 μ^2	
	2	0,58959 μ^2	

SEGMENTO CROMOSSÔMICO	CROMATÍDEO	NÚMERO DE PONTOS	AREA RELATIVA
q	1	76,5	0,82263
	2	82,5	0,84463
cent	1	"rectângulo"	0,01548
	2	"rectângulo"	0,01331
p + h + s	1		0,16189
	2		0,14206
p	1	18,5	0,04973
	2	18	0,04608
h	1	"rectângulo"	0,01135
	2	"rectângulo"	0,01024
s	1	37,5	0,10082
	2	33,5	0,08574
AREA TOTAL	1	0,65377 μ^2	
	2	0,68669 μ^2	

SEGMENTO CROMOSSÔMICO	CROMATÍDEO	NÚMERO DE PONTOS	AREA RELATIVA
q	1	73,5	0,83736
	2	80,5	0,88135
cent	1	"rectângulo"	0,01026
	2	"rectângulo"	0,01054
p + h + s	1		0,15238
	2		0,10811
p	1	46	0,13102
	2	32	0,08758
h	1	—	—
	2	—	—
s	1	7,5	0,02136
	2	7,5	0,02053
AREA TOTAL	1	0,61708 μ^2	
	2	0,64213 μ^2	

SEGMENTO CROMOSSÔMICO	CROMATÍDEO	NÚMERO DE PONTOS	AREA RELATIVA
q	1	83,5	0,86003
	2	77,5	0,84170
cent	1	"rectângulo"	0,02589
	2	"rectângulo"	0,03746
p + h + s	1		0,11458
	2		0,12084
p	1	27,5	0,07081
	2	26,5	0,07196
h	1	—	—
	2	—	—
s	1	17	0,04378
	2	18	0,04888
AREA TOTAL	1	0,68257 μ^2	
	2	0,64731 μ^2	

SEGMENTO CROMOSSÓMICO	CROMATÍDEO	NÚMERO DE PONTOS	AREA RELATIVA
q	1	71	0,82438
	2	66	0,85150
cent.	1	5,5	0,01596
	2	9,5	0,02992
p + h + s	1		0,15966
	2		0,13858
p	1	40,5	0,11756
	2	44	0,13858
h	1	1,5	0,00435
	2	—	—
s	1	13	0,07774
	2	—	—
AREA TOTAL	1	0,93532 μ^2	
	2	0,86201 μ^2	

SEGMENTO CROMOSSÓMICO	CROMATÍDEO	NÚMERO DE PONTOS	AREA RELATIVA
q	1	55,5	0,82374
	2	60,5	0,84912
cent.	1	13	0,04824
	2	10	0,03509
p + h + s	1		0,12802
	2		0,11590
p	1	24,5	0,09091
	2	27	0,09474
h	1	2,5	0,00928
	2	—	—
s	1	7,5	0,02783
	2	6	0,02105
AREA TOTAL	1	0,73170 μ^2	
	2	0,77378 μ^2	

SEGMENTO CROMOSSÓMICO	CROMATÍDEO	NÚMERO DE PONTOS	AREA RELATIVA
q	1	60	0,89220
	2	64,5	0,90054
cent.	1	1,5	0,00557
	2	2	0,00698
p + h + s	1		0,10223
	2		0,09248
p	1	16	0,05950
	2	15,5	0,05410
h	1	—	—
	2	1	0,00347
s	1	11,5	0,04275
	2	10	0,03491
AREA TOTAL	1	0,73933 μ^2	
	2	0,77777 μ^2	

SEGMENTO CROMOSSÓMICO	CROMATÍDEO	NÚMERO DE PONTOS	AREA RELATIVA
q	1	57	0,85335
	2	47,5	0,85778
cent	1	4,5	0,03060
	2	5	0,02258
p + h + s	1		0,11605
	2		0,11964
p	1	15	0,05615
	2	14	0,06320
h	1	3	0,01124
	2	2	0,00903
s	1	13	0,04866
	2	10,5	0,04741
AREA TOTAL	1	0,72540 μ^2	
	2	0,60138 μ^2	

SEGMENTO CROMOSSÓMICO	CROMATÍDEO	NÚMERO DE PONTOS	AREA RELATIVA
q	1	47	0,83186
	2	41,5	0,86233
cent	1	5,5	0,02433
	2	4	0,02076
p + h + s	1		0,14381
	2		0,11689
p	1	19,5	0,08628
	2	11	0,05715
h	1	—	—
	2	—	—
s	1	13	0,05753
	2	11,5	0,05974
AREA TOTAL	1	0,61359 μ^2	
	2	0,52264 μ^2	

SEGMENTO CROMOSSÓMICO	CROMATÍDEO	NÚMERO DE PONTOS	AREA RELATIVA
q	1	75,5	0,90014
	2	66	0,85713
cent	1	4,5	0,01342
	2	4,5	0,01461
p + h + s	1		0,08644
	2		0,12825
p	1	21	0,06260
	2	25	0,08117
h	1	2	0,00596
	2	3	0,00975
s	1	6	0,01788
	2	11,5	0,03733
AREA TOTAL	1	0,91089 μ^2	
	2	0,83623 μ^2	

SEGMENTO CROMOSSÓMICO	CROMATÍDEO	NÚMERO DE PONTOS	AREA RELATIVA
q	1	101	0,89578
	2	97	0,89504
cent	1	8,5	0,01885
	2	7,5	0,01730
p + h + s	1		0,08537
	2		0,08766
p	1	12	0,02661
	2	9,5	0,02191
h	1	7,5	0,01663
	2	8,5	0,01961
s	1	19	0,04213
	2	20	0,04614
AREA TOTAL	1	1,22445 μ^2	
	2	1,17695 μ^2	

SEGMENTO CROMOSSÓMICO	CROMATÍDEO	NÚMERO DE PONTOS	AREA RELATIVA
q	1	62,5	0,85762
	2	58,5	0,86188
cent	1	6,5	0,02230
	2	6	0,02210
p + h + s	1		0,05709
	2		0,12007
p	1	15	0,05146
	2	14	0,05157
h	1	2,5	0,00858
	2	2	0,00737
s	1	17,5	0,06003
	2	15,5	0,05709
AREA TOTAL	1	0,79143 μ^2	
	2	0,73712 μ^2	

SEGMENTO CROMOSSÓMICO	CROMATÍDEO	NÚMERO DE PONTOS	AREA RELATIVA
q	1	81	0,87876
	2	73	0,87667
cent	1	5,5	0,01491
	2	8	0,02402
p + h + s	1		0,10632
	2		0,09931
p	1	24	0,06509
	2	15,5	0,04653
h	1	"rectângulo"	0,00327
	2	"rectângulo"	0,00924
s	1	14	0,03797
	2	14,5	0,04354
AREA TOTAL	1	1,00102 μ^2	
	2	0,90431 μ^2	

2. CROMOSSOMAS D SEM SATÉLITE

SEGMENTO CROMOSSÓMICO	CROMATÍDEO	NÚMERO DE PONTOS	AREA RELATIVA
q	1	74	0,84449
	2	48	0,84026
cent.	1	7	0,01998
	2	4,5	0,01969
p	1	47,5	0,13553
	2	32	0,14005
AREA TOTAL	1	0,59212 μ^2	
	2	0,38600 μ^2	

SEGMENTO CROMOSSÓMICO	CROMATÍDEO	NÚMERO DE PONTOS	AREA RELATIVA
q	1	98	0,86154
	2	90,5	0,84679
cent.	1	13	0,02857
	2	13	0,03041
p	1	50	0,10989
	2	52,5	0,12281
AREA TOTAL	1	0,76867 μ^2	
	2	0,72220 μ^2	

SEGMENTO CROMOSSÓMICO	CROMATÍDEO	NÚMERO DE PONTOS	AREA RELATIVA
q	1	103,5	0,88367
	2	81,5	0,86932
cent.	1	12	0,02561
	2	8	0,02134
p	1	42,5	0,09072
	2	41	0,10934
AREA TOTAL	1	0,79147 μ^2	
	2	0,63353 μ^2	

SEGMENTO CROMOSSÓMICO	CROMATÍDEO	NÚMERO DE PONTOS	AREA RELATIVA
q	1	87	0,83754
	2	69,5	0,84371
cent.	1	11,5	0,02768
	2	10	0,03034
p	1	56	0,13478
	2	41,5	0,12595
AREA TOTAL	1	0,70194 μ^2	
	2	0,55565 μ^2	

SEGMENTO CROMOSSÓMICO	CROMATÍDEO	NÚMERO DE PONTOS	AREA RELATIVA
q	1	88	0,84559
	2	85,5	0,81623
cent	1	13,5	0,03183
	2	7,5	0,01790
p	1	52	0,12258
	2	69,5	0,16587
AREA TOTAL	1	0,71666 μ^2	
	2	0,70785 μ^2	

SEGMENTO CROMOSSÓMICO	CROMATÍDEO	NÚMERO DE PONTOS	AREA RELATIVA
q	1	105	0,91305
	2	88,5	0,88389
cent	1	13	0,02826
	2	14	0,03495
p	1	27	0,05869
	2	32,5	0,08116
AREA TOTAL	1	0,77711 μ^2	
	2	0,67660 μ^2	

SEGMENTO CROMOSSÓMICO	CROMATÍDEO	NÚMERO DE PONTOS	AREA RELATIVA
q	1	111,5	0,88668
	2	98,5	0,87458
cent	1	4,5	0,00894
	2	10	0,02219
p	1	52,5	0,10437
	2	46,5	0,10322
AREA TOTAL	1	0,84975 μ^2	
	2	0,76106 μ^2	

SEGMENTO CROMOSSÓMICO	CROMATÍDEO	NÚMERO DE PONTOS	AREA RELATIVA
q	1	77,5	0,87323
	2	69,5	0,88675
cent	1	8	0,02254
	2	7	0,02234
p	1	37	0,10423
	2	28,5	0,09091
AREA TOTAL	1	0,59974 μ^2	
	2	0,52963 μ^2	

ADENDA

SEGMENTO CROMOSSÓMICO	CROMATÍDEO	NÚMERO DE PONTOS	AREA RELATIVA
q	1	82,5	0,86161
	2	99	0,88393
cent	1	6	0,01567
	2	5,5	0,01227
p	1	47	0,12271
	2	46,5	0,10380
AREA TOTAL	1	0,64703 μ^2	
	2	0,75684 μ^2	

SEGMENTO CROMOSSÓMICO	CROMATÍDEO	NÚMERO DE PONTOS	AREA RELATIVA
q	1	63	0,87045
	2	61	0,86677
cent	1	7	0,02419
	2	7	0,02488
p	1	30,5	0,10536
	2	30,5	0,10835
AREA TOTAL	1	0,48908 μ^2	
	2	0,47557 μ^2	

SEGMENTO CROMOSSÓMICO	CROMATÍDEO	NÚMERO DE PONTOS	AREA RELATIVA
q	1	91,5	0,88086
	2	93	0,89636
cent	1	6	0,01445
	2	4	0,00964
p	1	43,5	0,10470
	2	39	0,09398
AREA TOTAL	1	0,70194 μ^2	
	2	0,70110 μ^2	

SEGMENTO CROMOSSÓMICO	CROMATÍDEO	NÚMERO DE PONTOS	AREA RELATIVA
q	1	90,5	0,89715
	2	63,5	0,89594
cent	1	5,5	0,01363
	2	6	0,02117
p	1	36	0,08922
	2	23,5	0,08289
AREA TOTAL	1	0,68166 μ^2	
	2	0,47894 μ^2	

SEGMENTO CROMOSSÓMICO	CROMATÍDEO	NÚMERO DE PONTOS	AREA RELATIVA
q	1	79,5	0,87724
	2	73,5	0,89772
cent	1	4,5	0,01241
	2	4,5	0,01374
p	1	40	0,11035
	2	29	0,08855
AREA TOTAL	1	0,61240 μ^2	
	2	0,55327 μ^2	

SEGMENTO CROMOSSÓMICO	CROMATÍDEO	NÚMERO DE PONTOS	AREA RELATIVA
q	1	81	0,83289
	2	81,5	0,82115
cent	1	15,5	0,03985
	2	16	0,04030
p	1	49,5	0,12726
	2	55	0,13854
AREA TOTAL	1	0,65718 μ^2	
	2	0,67069 μ^2	

SEGMENTO CROMOSSÓMICO	CROMATÍDEO	NÚMERO DE PONTOS	AREA RELATIVA
q	1	98,5	0,83475
	2	100	0,85380
cent	1	12,5	0,02649
	2	9	0,01920
p	1	65,5	0,13877
	2	59,5	0,12699
AREA TOTAL	1	0,79738 μ^2	
	2	0,79146 μ^2	

SEGMENTO CROMOSSÓMICO	CROMATÍDEO	NÚMERO DE PONTOS	AREA RELATIVA
q	1	82	0,89617
	2	81,5	0,89457
cent	1	"rectângulo"	0,01093
	2	"rectângulo"	0,01076
p	1	34	0,09290
	2	34,5	0,09468
AREA TOTAL	1	0,64327 μ^2	
	2	0,64050 μ^2	

SEGMENTO CROMOSSÓMICO	CROMATÍDEO	NÚMERO DE PONTOS	AREA RELATIVA
q	1	77	0,87091
	2	69	0,81760
cent	1	"rectângulo"	0,02022
	2	"rectângulo"	0,02097
p	1	38,5	0,10887
	2	54,5	0,16143
AREA TOTAL	1	0,62157 μ^2	
	2	0,59331 μ^2	

SEGMENTO CROMOSSÓMICO	CROMATÍDEO	NÚMERO DE PONTOS	AREA RELATIVA
q	1	82	0,86179
	2	83,5	0,86542
cent	1	"rectângulo"	0,01471
	2	"rectângulo"	0,01409
p	1	47	0,12350
	2	46,5	0,12049
AREA TOTAL	1	0,66893 μ^2	
	2	0,67832 μ^2	

3. CROMOSSOMAS G COM SATÉLITE

SEGMENTO CROMOSSÓMICO	CROMATÍDEO	NÚMERO DE PONTOS	AREA RELATIVA
q	1	62	0,75419
	2	59	0,73069
cent	1	"rectângulo"	0,04258
	2	"rectângulo"	0,04632
p + h + s	1		0,20323
	2		0,22300
p	1	27,5	0,08364
	2	27,5	0,08515
h	1	"rectângulo"	0,01314
	2	"rectângulo"	0,01091
s	1	35	0,10645
	2	41	0,12694
AREA TOTAL	1	0,55548 μ^2	
	2	0,54561 μ^2	

SEGMENTO CROMOSSÓMICO	CROMATÍDEO	NÚMERO DE PONTOS	AREA RELATIVA
q	1	27	0,73220
	2	32	0,71508
cent	1	7,5	0,05085
	2	10	0,05585
p + h + s	1		0,21695
	2		0,22907
p	1	16	0,10848
	2	25	0,13968
h	1	2,5	0,01694
	2	1,5	0,00837
s	1	13,5	0,09154
	2	14,5	0,08102
AREA TOTAL	1	0,24918 μ^2	
	2	0,30240 μ^2	

SEGMENTO CROMOSSÓMICO	CROMATÍDEO	NÚMERO DE PONTOS	AREA RELATIVA
q	1	36,5	0,70971
	2	22,5	0,66816
cent	1	"rectângulo"	0,04725
	2	"rectângulo"	0,06829
p + h + s	1		0,24304
	2		0,26355
p	1	32,5	0,15798
	2	29	0,21529
h	1	–	–
	2	–	–
s	1	17,5	0,08506
	2	6,5	0,04825
AREA TOTAL	1	0,34752 μ^2	
	2	0,22755 μ^2	

SEGMENTO CROMOSSÓMICO	CROMATÍDEO	NÚMERO DE PONTOS	AREA RELATIVA
q	1	30	0,66482
	2	33	0,72928
cent	1	9	0,05263
	2	8	0,04144
p + h + s	1		0,28255
	2		0,22928
p	1	34	0,19886
	2	26	0,14089
h	1	3	0,01106
	2	2	0,00827
s	1	15	0,06310
	2	14,5	0,08012
AREA TOTAL	1	0,30497 μ^2	
	2	0,30578 μ^2	

SEGMENTO CROMOSSÓMICO	CROMATÍDEO	NÚMERO DE PONTOS	AREA RELATIVA
q	1	51	0,73382
	2	46	0,75411
cent	1	6	0,02159
	2	4	0,01640
p + h + s	1		0,24459
	2		0,22949
p	1	38,5	0,13849
	2	29	0,11885
h	1	2,5	0,00899
	2	1,5	0,00614
s	1	27	0,09712
	2	25,5	0,10451
AREA TOTAL	1	0,46964 μ^2	
	2	0,41221 μ^2	

SEGMENTO CROMOSSÓMICO	CROMATÍDEO	NÚMERO DE PONTOS	AREA RELATIVA
q	1	48	0,75292
	2	43	0,70779
cent	1	7,5	0,02941
	2	7	0,02882
p + h + s	1		0,21766
	2		0,26339
p	1	34	0,13333
	2	24	0,09877
h	1	5	0,01961
	2	6	0,02470
s	1	16,5	0,06472
	2	34	0,13992
AREA TOTAL	1	0,43080 μ^2	
	2	0,41053 μ^2	

SEGMENTO CROMOSSÓMICO	CROMATÍDEO	NÚMERO DE PONTOS	AREA RELATIVA
q	1	32,5	0,77380
	2	27	0,70588
cent	1	4	0,02382
	2	4,5	0,02940
p + h + s	1		0,20238
	2		0,26471
p	1	18,5	0,11010
	2	22,5	0,14706
h	1	–	–
	2	–	–
s	1	15,5	0,09228
	2	18	0,11765
AREA TOTAL	1	0,28382 μ^2	
	2	0,25847 μ^2	

SEGMENTO CROMOSSÔMICO	CROMATÍDEO	NÚMERO DE PONTOS	AREA RELATIVA
q	1	57	0,84134
	2	48	0,82404
cent	1	4,5	0,01660
	2	4,5	0,01931
p + h + s	1		0,14206
	2		0,15665
p	1	29	0,10701
	2	28	0,12017
h	1	–	–
	2	–	–
s	1	9,5	0,03506
	2	8,5	0,03648
AREA TOTAL	1	0,45782 μ^2	
	2	0,39362 μ^2	

SEGMENTO CROMOSSÔMICO	CROMATÍDEO	NÚMERO DE PONTOS	AREA RELATIVA
q	1	23	0,71596
	2	23,5	0,74015
cent	1	4,5	0,03501
	2	6,5	0,05118
p + h + s	1		0,24903
	2		0,20867
p	1	24,5	0,19067
	2	15	0,11811
h	1	–	–
	2	–	–
s	1	7,5	0,05837
	2	11,5	0,09056
AREA TOTAL	1	0,21708 μ^2	
	2	0,21445 μ^2	

SEGMENTO CROMOSSÔMICO	CROMATÍDEO	NÚMERO DE PONTOS	AREA RELATIVA
q	1	45	0,82568
	2	36,5	0,78284
cent	1	2	0,00918
	2	2,5	0,01399
p + h + s	1		0,16514
	2		0,20376
p	1	9,5	0,04358
	2	11,5	0,06167
h	1	–	–
	2	–	–
s	1	26,5	0,12156
	2	26,5	0,14210
AREA TOTAL	1	0,36829 μ^2	
	2	0,31507 μ^2	

ADENDA

SEGMENTO CROMOSSÔMICO	CROMATÍDEO	NÚMERO DE PONTOS	AREA RELATIVA
q	1	34	0,66341
	2	24	0,71641
cent	1	4	0,01952
	2	5	0,03738
p + h + s	1		0,31707
	2		0,24627
p	1	44	0,21462
	2	33	0,24627
h	1	–	–
	2	–	–
s	1	21	0,10245
	2	–	–
AREA TOTAL	1	0,34638 μ^2	
	2	0,22638 μ^2	

SEGMENTO CROMOSSÔMICO	CROMATÍDEO	NÚMERO DE PONTOS	AREA RELATIVA
q	1	19	0,63602
	2	25	0,71685
cent	1	3,5	0,02927
	2	4	0,02868
p + h + s	1		0,33470
	2		0,25447
p	1	27	0,22593
	2	35,5	0,25447
h	1	–	–
	2	–	–
s	1	13	0,10878
	2	–	–
AREA TOTAL	1	0,20188 μ^2	
	2	0,23567 μ^2	

SEGMENTO CROMOSSÔMICO	CROMATÍDEO	NÚMERO DE PONTOS	AREA RELATIVA
q	1	42	0,73523
	2	44,5	0,71201
cent	1	8	0,03502
	2	5,5	0,02200
p + h + s	1		0,22975
	2		0,26600
p	1	52,5	0,22975
	2	38,5	0,15400
h	1	–	–
	2	1	0,00400
s	1	–	–
	2	27	0,10800
AREA TOTAL	1	0,38603 μ^2	
	2	0,42234 μ^2	

SEGMENTO CROMOSSÓMICO	CROMATÍDEO	NÚMERO DE PONTOS	AREA RELATIVA
q	1	37,5	0,72915
	2	31	0,66290
cent	1	"rectângulo"	0,03966
	2	"rectângulo"	0,04812
p + h + s	1		0,23119
	2		0,22899
p	1	20	0,09722
	2	19,5	0,10424
h	1	"rectângulo"	0,03676
	2	"rectângulo"	0,04042
s	1	20	0,09722
	2	27	0,14433
AREA TOTAL	1	0,36156 μ^2	
	2	0,32877 μ^2	

SEGMENTO CROMOSSÓMICO	CROMATÍDEO	NÚMERO DE PONTOS	AREA RELATIVA
q	1	36,5	0,71452
	2	33	0,68429
cent	1	"rectângulo"	0,02854
	2	"rectângulo"	0,02799
p + h + s	1		0,25693
	2		0,28772
p	1	25	0,12235
	2	21,5	0,11146
h	1	–	–
	2	–	–
s	1	27,5	0,13458
	2	34	0,17626
AREA TOTAL	1	0,35912 μ^2	
	2	0,33904 μ^2	

SEGMENTO CROMOSSÓMICO	CROMATÍDEO	NÚMERO DE PONTOS	AREA RELATIVA
q	1	35	0,69621
	2	33	0,73827
cent	1	"rectângulo"	0,02535
	2	"rectângulo"	0,03243
p + h + s	1		0,27844
	2		0,22931
p	1	46	0,22876
	2	34	0,19017
h	1	–	–
	2	–	–
s	1	10	0,04968
	2	7	0,03914
AREA TOTAL	1	0,35343 μ^2	
	2	0,31425 μ^2	

SEGMENTO CROMOSSÓMICO	CROMATÍDEO	NÚMERO DE PONTOS	AREA RELATIVA
q	1	33,5	0,70785
	2	33,5	0,68500
cent.	1	"rectângulo"	0,03592
	2	"rectângulo"	0,04662
p + h + s	1		0,25623
	2		0,26837
p	1	18	0,09510
	2	21,5	0,10992
h	1	–	–
	2	–	–
s	1	30,5	0,16113
	2	31	0,15846
AREA TOTAL	1	0,33271 μ^2	
	2	0,34381 μ^2	

SEGMENTO CROMOSSÓMICO	CROMATÍDEO	NÚMERO DE PONTOS	AREA RELATIVA
q	1	30,5	0,81226
	2	30	0,79218
cent.	1	"rectângulo"	0,04792
	2	"rectângulo"	0,05270
p + h + s	1		0,13982
	2		0,15512
p	1	10	0,06660
	2	9	0,05942
h	1	–	–
	2	–	–
s	1	11	0,07323
	2	14,5	0,09570
AREA TOTAL	1	0,26398 μ^2	
	2	0,26624 μ^2	

SEGMENTO CROMOSSÓMICO	CROMATÍDEO	NÚMERO DE PONTOS	AREA RELATIVA
q	1	31	0,76698
	2	29	0,75089
cent.	1	"rectângulo"	0,04452
	2	"rectângulo"	0,04843
p + h + s	1		0,18850
	2		0,20067
p	1	22	0,13606
	2	24,5	0,15860
h	1	"rectângulo"	0,01223
	2	–	–
s	1	6,5	0,04020
	2	6,5	0,04207
AREA TOTAL	1	0,27311 μ^2	
	2	0,26097 μ^2	

SEGMENTO CROMOSSÔMICO	CROMATÍDEO	NÚMERO DE PONTOS	AREA RELATIVA
q	1	75,5	0,78137
	2	68	0,75345
cent	1	7,5	0,01940
	2	9	0,02494
p + h + s	1		0,19923
	2		0,22161
p	1	30,5	0,07892
	2	34,5	0,09557
h	1	12	0,03105
	2	12,5	0,03463
s	1	34,5	0,08926
	2	33	0,09142
AREA TOTAL	1	1,04935 μ^2	
	2	0,98013 μ^2	

SEGMENTO CROMOSSÔMICO	CROMATÍDEO	NÚMERO DE PONTOS	AREA RELATIVA
q	1	58,5	0,78654
	2	63,5	0,76853
cent	1	12,5	0,04202
	2	13,5	0,04084
p + h + s	1		0,17144
	2		0,19063
p	1	27	0,09076
	2	37	0,11196
h	1	5	0,01681
	2	8,5	0,02572
s	1	19	0,06387
	2	17,5	0,05295
AREA TOTAL	1	0,80773 μ^2	
	2	0,89731 μ^2	

SEGMENTO CROMOSSÔMICO	CROMATÍDEO	NÚMERO DE PONTOS	AREA RELATIVA
q	1	68	0,78048
	2	67,5	0,79294
cent	1	8,5	0,02439
	2	9	0,02644
p + h + s	1		0,19513
	2		0,18062
p	1	36,5	0,10474.
	2	36,5	0,10720
h	1	3	0,00861
	2	2	0,00587
s	1	28,5	0,08178
	2	23	0,06755
AREA TOTAL	1	0,94619 μ^2	
	2	0,92447 μ^2	

SEGMENTO CROMOSSÓMICO	CROMATÍDEO	NÚMERO DE PONTOS	AREA RELATIVA
q	1	22	0,69952
	2	22	0,66767
cent	1	"rectângulo"	0,04532
	2	"rectângulo"	0,03415
p + h + s	1		0,25516
	2		0,29818
p	1	17	0,13515
	2	14	0,10622
h	1	"rectângulo"	0,01271
	2	"rectângulo"	0,02124
s	1	13,5	0,10780
	2	22,5	0,17072
AREA TOTAL	1	0,34155 μ^2	
	2	0,35784 μ^2	

SEGMENTO CROMOSSÓMICO	CROMATÍDEO	NÚMERO DE PONTOS	AREA RELATIVA
q	1	21,5	0,66389
	2	25,5	0,72637
cent	1	"rectângulo"	0,03227
	2	"rectângulo"	0,03420
p + h + s	1		0,30384
	2		0,23942
p	1	21	0,16213
	2	16,5	0,11751
h	1	"rectângulo"	0,02206
	2	"rectângulo"	0,02222
s	1	15,5	0,11965
	2	14	0,09970
AREA TOTAL	1	0,35170 μ^2	
	2	0,38125 μ^2	

SEGMENTO CROMOSSÓMICO	CROMATÍDEO	NÚMERO DE PONTOS	AREA RELATIVA
q	1	33,5	0,70403
	2	32	0,72779
cent	1	"rectângulo"	0,03783
	2	"rectângulo"	0,03784
p + h + s	1		0,25813
	2		0,23437
p	1	15,5	0,08143
	2	18	0,10235
h	1	"rectângulo"	0,02959
	2	"rectângulo"	0,03820
s	1	28	0,14711
	2	16,5	0,09382
AREA TOTAL	1	0,51675 μ^2	
	2	0,47750 μ^2	

SEGMENTO CROMOSSÓMICO	CROMATÍDEO	NÚMERO DE PONTOS	AREA RELATIVA
q	1	25	0,68269
	2	25	0,75073
cent	1	"rectângulo"	0,03017
	2	"rectângulo"	0,02854
p + h + s	1		0,28713
	2		0,22074
p	1	20	0,13654
	2	11	0,08259
h	1	"rectângulo"	0,01748
	2	"rectângulo"	0,01803
s	1	19,5	0,13312
	2	16	0,12012
AREA TOTAL	1	0,39769 μ^2	
	2	0,36165 μ^2	

SEGMENTO CROMOSSÓMICO	CROMATÍDEO	NÚMERO DE PONTOS	AREA RELATIVA
q	1	21,5	0,67672
	2	24,5	0,71117
cent	1	"rectângulo"	0,03211
	2	"rectângulo"	0,03483
p + h + s	1		0,29116
	2		0,25400
p	1	22	0,17312
	2	23	0,16692
h	1	-	-
	2	-	-
s	1	15	0,11605
	2	12	0,08708
AREA TOTAL	1	0,34503 μ^2	
	2	0,37419 μ^2	

SEGMENTO CROMOSSÓMICO	CROMATÍDEO	NÚMERO DE PONTOS	AREA RELATIVA
q	1	44,5	0,74185
	2	36	0,74043
cent	1	"rectângulo"	0,03568
	2	"rectângulo"	0,04104
p + h + s	1		0,22248
	2		0,21853
p	1	19	0,07919
	2	26	0,13369
h	1	"rectângulo"	0,01200
	2	5,5	0,02828
s	1	31,5	0,13128
	2	11	0,05657
AREA TOTAL	1	0,65144 μ^2	
	2	0,52802 μ^2	

SEGMENTO CROMOSSÓMICO	CROMATÍDEO	NÚMERO DE PONTOS	AREA RELATIVA
q	1	45,5	0,62390
	2	43	0,62915
cent	1	"rectângulo"	0,04869
	2	"rectângulo"	0,03104
p + h + s	1		0,12720
	2		0,13981
p	1	12	0,05432
	2	10,5	0,05062
h	1	"rectângulo"	0,01629
	2	4,5	0,02170
s	1	12,5	0,05659
	2	14	0,06749
AREA TOTAL	1	0,59975 μ^2	
	2	0,56320 μ^2	

SEGMENTO CROMOSSÓMICO	CROMATÍDEO	NÚMERO DE PONTOS (*)	AREA RELATIVA
q	1	12,5	0,70720
	2	13	0,72002
cent	1	"rectângulo"	0,02123
	2	"rectângulo"	0,02658
p + h + s	1		0,27157
	2		0,25340
p	1	11	0,15558
	2	11,5	0,15925
h	1	"rectângulo"	0,01698
	2	"rectângulo"	0,01107
s	1	7	0,09901
	2	6	0,08308
AREA TOTAL (*)	1	0,40512 μ^2	
	2	0,41382 μ^2	

SEGMENTO CROMOSSÓMICO	CROMATÍDEO	NÚMERO DE PONTOS (*)	AREA RELATIVA
q	1	19	0,72893
	2	20,5	0,70495
cent	1	"rectângulo"	0,04912
	2	"rectângulo"	0,03713
p + h + s	1		0,22195
	2		0,25792
p	1	8	0,07673
	2	13,5	0,11607
h	1	"rectângulo"	0,02582
	2	"rectângulo"	0,02578
s	1	12,5	0,11990
	2	13,5	0,11607
AREA TOTAL (*)	1	0,18324 μ^2	
	2	0,20444 μ^2	

(*) Ampliação do cromossoma e das bolas = 7.000 x

4. CROMOSSOMAS G SEM SATÉLITE

SEGMENTO CROMOSSÓMICO	CROMATÍDEO	NÚMERO DE PONTOS	AREA RELATIVA
q	1	42,5	0,77981
	2	36,5	0,69691
cent	1	9	0,04127
	2	12	0,05727
p	1	39	0,17891
	2	51,5	0,24582
AREA TOTAL	1	0,36828 μ^2	
	2	0,35392 μ^2	

SEGMENTO CROMOSSÓMICO	CROMATÍDEO	NÚMERO DE PONTOS	AREA RELATIVA
q	1	42	0,75396
	2	32	0,72520
cent	1	7	0,03140
	2	7,5	0,04250
p	1	48	0,21524
	2	41	0,23231
AREA TOTAL	1	0,37674 μ^2	
	2	0,29819 μ^2	

SEGMENTO CROMOSSÓMICO	CROMATÍDEO	NÚMERO DE PONTOS	AREA RELATIVA
q	1	38	0,76113
	2	35,5	0,69133
cent	1	"rectângulo"	0,02604
	2	"rectângulo"	0,03116
p	1	42,5	0,21283
	2	57	0,27751
AREA TOTAL	1	0,35099 μ^2	
	2	0,36100 μ^2	

SEGMENTO CROMOSSÓMICO	CROMATÍDEO	NÚMERO DE PONTOS	AREA RELATIVA
q	1	32	0,72317
	2	32,5	0,69148
cent	1	10	0,05651
	2	11	0,05850
p	1	39	0,22032
	2	47	0,25002
AREA TOTAL	1	0,31109 μ^2	
	2	0,33042 μ^2	

SEGMENTO CROMOSSÓMICO	CROMATÍDEO	NÚMERO DE PONTOS	ÁREA RELATIVA
q	1	24	0,71641
	2	27	0,69010
cent.	1	5	0,03733
	2	9	0,05751
p	1	33	0,24627
	2	39,5	0,25238
AREA TOTAL	1	0,22638 μ^2	
	2	0,27506 μ^2	

SEGMENTO CROMOSSÓMICO	CROMATÍDEO	NÚMERO DE PONTOS	ÁREA RELATIVA
q	1	50	0,78895
	2	42	0,73523
cent.	1	7	0,02761
	2	8	0,03502
p	1	46,5	0,18344
	2	52,5	0,22975
AREA TOTAL	1	0,44554 μ^2	
	2	0,38603 μ^2	

SEGMENTO CROMOSSÓMICO	CROMATÍDEO	NÚMERO DE PONTOS	ÁREA RELATIVA
q	1	22,5	0,67285
	2	25	0,71685
cent.	1	"rectângulo"	0,04305
	2	4	0,02868
p	1	38	0,28410
	2	35,5	0,25447
AREA TOTAL	1	0,23509 μ^2	
	2	0,23567 μ^2	

SEGMENTO CROMOSSÓMICO	CROMATÍDEO	NÚMERO DE PONTOS	ÁREA RELATIVA
q	1	44,5	0,79541
	2	44,5	0,78841
cent.	1	"rectângulo"	0,03254
	2	"rectângulo"	0,02989
p	1	38,5	0,17205
	2	41	0,18162
AREA TOTAL	1	0,39332 μ^2	
	2	0,39681 μ^2	

SEGMENTO CROMOSSÓMICO	CROMATÍDEO	NÚMERO DE PONTOS	AREA RELATIVA
q	1	42,5	0,72805
	2	35	0,71246
cent	1	7,5	0,03212
	2	7,5	0,03816
p	1	56	0,23983
	2	49	0,24937
AREA TOTAL	1	0,63395 μ^2	
	2	0,59350 μ^2	

SEGMENTO CROMOSSÓMICO	CROMATÍDEO	NÚMERO DE PONTOS	AREA RELATIVA
q	1	47,5	0,79665
	2	50	0,76336
cent	1	7,5	0,03144
	2	8,5	0,03244
p	1	41	0,17191
	2	33	0,20420
AREA TOTAL	1	0,41918 μ^2	
	2	0,46048 μ^2	

SEGMENTO CROMOSSÓMICO	CROMATÍDEO	NÚMERO DE PONTOS	AREA RELATIVA
q	1	45	0,79469
	2	42	0,74667
cent	1	5,5	0,02429
	2	8,5	0,03778
p	1	41	0,18101
	2	48,5	0,21555
AREA TOTAL	1	0,39809 μ^2	
	2	0,39545 μ^2	

SEGMENTO CROMOSSÓMICO	CROMATÍDEO	NÚMERO DE PONTOS	AREA RELATIVA
q	1	39	0,74328
	2	30,5	0,71111
cent	1	"rectângulo"	0,01372
	2	"rectângulo"	0,01492
p	1	51	0,24301
	2	47	0,27397
AREA TOTAL	1	0,36888 μ^2	
	2	0,30153 μ^2	

ADENDA

SEGMENTO CROMOSSÓMICO	CROMATÍDEO	NÚMERO DE PONTOS	ÁREA RELATIVA
q	1	39	0,80332
	2	37	0,76279
cent	1	"rectângulo"	0,01647
	2	"rectângulo"	0,01815
p	1	35	0,18022
	2	42,5	0,21906
AREA TOTAL	1	0,34131 μ^2	
	2	0,34101 μ^2	

NOTAS:

1. O número de pontos apresentado para cada região é a média de 3 contagens.

2. Para algumas regiões muito pequenas e muito irregulares fizeram-se medições directas no desenho em papel milimétrico, convertendo-se em superfícies rectangulares cuja área foi calculada pelo produto da média das bases pela média das alturas ("rectângulos").

3 O diâmetro das bolas de latex de referência foi calculado a partir da média da medida em 15 bolas.

4. Em cada sessão de fotografias de cromossomas foram também feitas fotografias da suspensão, diminuindo-se desta forma o possibilidade de introdução de erros devidos ao próprio M.E.

ERRATA

LEGENDA DA FIG. 25

Fig. 25 - Assimetria de NORs observada ao MO; cromatídeos irmãos com 3 depósitos de prata.