

ESTUDIO DE LA DISTRIBUCION METAFASICA MITOTICA DE TRES  
AUTOSOMAS Y DEL CROMOSOMA Y HUMANOS

CECILIA BE ROHDIS

Profesor patrocinante: Dr. Carlos Valenzuela Yuraidini

1 9 8 6

VCH-FC  
MAG-B  
B365

ESTUDIO DE LA DISTRIBUCION METAFASICA MITOTICA DE TRES  
AUTOSOMAS Y DEL CROMOSOMA Y HUMANOS

Tesis  
Entregada a la  
Universidad de Chile  
en cumplimiento parcial de los requisitos  
para optar al grado de  
Magister en Ciencias Biológicas con mención en Genética

Facultad de Ciencias

por

Cecilia Be Rohdis

Marzo, 1986

Patrocinante: Dr. Carlos Valenzuela Yuraidini



FACULTAD DE CIENCIAS  
UNIVERSIDAD DE CHILE

I N F O R M E   D E   A P R O B A C I O N

T E S I S   D E   M A G I S T E R

Se informa a la Comisión de Magister de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Magister presentada por la candidata

CECILIA BE ROHDIS

ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito para el grado de Magister en Ciencias con Mención en Genética, en el Examen de Defensa de Tesis rendido el día

PATROCINANTE DE TESIS

*C. Jorjani*  
Dr. Carlos Valenzuela Yuraidini

COMISION INFORMANTE DE TESIS

Madeleine Lamborot Ch

*He con H. Miranda?*  
Paul Bernardes - Barros  
YVES LAUSSIE S.

*M. Lamborot*  
.....  
.....  
.....  
*Ungue*  
.....

*A mi madre,*

*A la memoria de mi padre*

## AGRADECIMIENTOS

A los señores José Valenzuela, Erick Landgren y Omar Valenzuela que gentilmente cedieron su sangre utilizada en este estudio.

A mi tutor, Dr. Carlos Valenzuela Y., por su confianza y apoyo.

A los Dres. Ronald Youlton y Ricardo Cruz-Coke, por su generosa colaboración y observación crítica del texto.

Al señor Pedro Tapia por su valiosa ayuda técnica.

A todas aquellas personas que colaboraron en esta tesis.

Y por último, al Hospital Clínico de la Universidad de Chile y a la Clínica Las Condes, por permitir la realización de esta tesis.

## INDICE DE MATERIAS

	pág.
i DEDICATORIA	
ii AGRADECIMIENTOS .....	i
iii INDICE DE MATERIAS .....	ii
iv INDICE DE TABLAS .....	iv
v INDICE DE FIGURAS .....	vi
vi RESUMEN .....	1
vii ABSTRACT .....	4
INTRODUCCION .....	7
MATERIAL Y METODO .....	16
A. Muestra .....	16
B. Método para la obtención de mitosis .....	18
C. Métodos de bandeo C .....	22
D. Análisis de las metafases .....	24
E. Método para análisis de po- sición del cromosoma Y .....	27
F. Análisis estadísticos de los resultados .....	29

	pág.
RESULTADOS .....	31
DISCUSION .....	51
CONCLUSIONES .....	61
BIBLIOGRAFIA .....	63
APENDICE .....	76

INDICE DE TABLAS

	pág.
Tabla 1. Ordenes de ubicación (secuencias) de los cromosomas 1, 9 y 16 respecto del Y: Frecuencia (f) y probabilidad de ocurrencia (p) en los tres individuos...	36
Tabla 2. Secuencias que se apartan de lo esperado en cada uno de los individuos estudiados .....	41
Tabla 3. Distribución del número de repeticiones de las frecuencias en las 90 secuencias ajustadas a Poisson en los tres individuos .....	43
Tabla 4. Análisis de la posición del cromosoma Y mediante el sistema de círculos concéntricos .....	45



Tabla 5.	Análisis de las frecuencias acumuladas de las dos primeras posiciones de cercanía al cromosoma Y, en los tres individuos estudiados .....	42
Tabla 6.	Distribución de la cercanía entre sí de los cromosomas homólogos 1, 9 y 16 respecto del cromosoma Y en los tres individuos estudiados .....	48
Tabla 7.	Análisis del índice de correlación de las frecuencias observadas en las 90 secuencias entre los tres individuos estudiados .....	50

## INDICE DE FIGURAS

pág.

Figura 1.	Genealogías de los tres individuos estudiados señalando el grupo sanguíneo correspondiente a cada caso índice, su cónyuge y sus hijos .....	17
Figura 2.	Esquema de la técnica utilizada para la obtención de mitosis .....	20
Figura 3.	Metafase teñida para bandas C según la modificación de la técnica de Sumner (1972). (Individuo III) .....	23
Figura 4.	Metafase teñida para bandas C (individuo II). La secuencia de orden de los cromosomas respecto del "Y" es: 1 16 1 16 9 9 .....	26

Figura 5.	Método utilizado en la determinación de la posición del cromosoma "Y" en las figuras metafásicas; C = central; M = media; P = periférica .....	28
Figura 6.	Individuo: I Posición del "Y": Central Secuencia: 9 9 16 16 1 1 .....	32
Figura 7.	Individuo: II Posición del "Y": Periférica Secuencia: 9 1 1 16 16 9 .....	33
Figura 8.	Individuo: III Posición del "Y": Media Secuencia: 1 9 1 9 16 16 .....	34

## RESUMEN

Existen evidencias acerca de la existencia de un ordenamiento de los cromosomas en la figura mitótica metafásica humana, y en particular las reiteradas asociaciones de los cromosomas acrocéntricos y de la posición periférica del X.

En el presente estudio se analiza la posición del cromosoma "Y" en la placa metafásica de tres varones normales voluntarios (I, II, III) y la secuencia de orden de cercanía de los pares cromosómicos 1, 9 y 16 respecto del "Y".

Se realizó cultivo de linfocitos de 72 horas, estimulados con fitohemaglutinina; no se adicionó demecolcina al final del cultivo. Se prepararon láminas portaobjetos para el análisis de los cromosomas, las que fueron teñidas para la obtención de bandas C de acuerdo al método de Sumner, modificado por la autora. Se microfotografió y amplió un total de 360, 451 y 363 metafases de los individuos I, II y III respectivamente.

La ubicación del cromosoma "Y" en la figura metafásica se determinó mediante un sistema de tres círculos concéntricos: central, medio y periférico, cuyas áreas guardan una relación de 1:3:5. En las 1.161 metafases analizadas se encontró que el cromosoma "Y" tenía una posición central en 205, media en 524 y periférica en 432 de las metafases. Se aplicó una prueba de  $\chi^2$  calculando lo esperado a partir de la razón 1:3:5, lo que resultó significativo a una probabilidad inferior de 0.0001. Este hallazgo fue concordante en los tres individuos.

Se analizó las secuencias de orden de los pares cromosómicos 1, 9 y 16 respecto del "Y". El número de posibles secuencias asciende a 90. Una distribución cromosómica al azar en la figura metafásica haría que, con el número de metafases analizadas, cada una de estas secuencias se repita en cuatro oportunidades en los individuos I y III y en cinco en el individuo II. En los tres individuos se encontró que algunas de estas secuencias presentaban una frecuencia significativamente inferior o superior a la esperada. El análisis del índice de correlación de las frecuencias observadas en las 90 secuencias fue significativo entre los individuos I y III, que son hermanos.

Al estudiar la cercanía de los homólogos entre sí y respecto del "Y" se encontró que ésta era significativa sólo para el par cromosómico 16 y en los individuos I y II.

Los datos presentados permiten concluir que: a) el cromosoma "Y" tiende a ubicarse hacia el centro de la figura metafásica; b) la distribución de los cromosomas en metafase no ocurre al azar; c) esta distribución de los cromosomas obedecería a un patrón preestablecido, el que podría tener un componente hereditario y a su vez, una importante variación individual.

## ABSTRACT

The existence of a chromosomal order in the mitotic metaphase plate has been suggested and the repeated association of the acrocentric chromosomes and the peripheral position of the X chromosome have been widely demonstrated.

In the present study, the position of the "Y" chromosome in 1174 metaphase plates obtained from three normal volunteers (I, II, III) and the sequences of the order of distance of pairs 1, 9 and 16 respect to the "Y" are described.

Seventy two hours PHA stimulated lymphocyte culture were done without adding demecolcine before harvesting. C banding was obtained according to the method described by Sumner and modified by the author. A total of 360, 451 and 363 metaphases of individuals I, II and III respectively were microphotographed and enlarged.

The location of the "Y" chromosome in each metaphase plate was established using a three concentric rings method

which leave a central, a medial and an external area which have a ratio of 1:3:5. In the 1.161 metaphase plates the "Y" chromosome was centrally located in 205, medially located in 524 and peripherally located in 432 cells. The  $\chi^2$  method was used to compare the observed and the expected values; the probability was  $> 0.0001$ . This finding was consistent in the three individuals.

The sequence of the order of distance of chromosome pairs 1,9 and 16 respect to the "Y" was analyzed. The number of possible sequences amounts to 90. If chromosome distribution in the metaphase plate occurs at random, each sequence would be found four times in individuals I and III and five times in individual II. In the three individuals some of these sequences were found with a significantly lower or higher incidence than expected. The correlation index of the distribution observed in the 90 sequences was statistically significant between individuals I and II, who are brothers.

The study of the proximity of the homologous chromosomes of each pair among themselves and respect to the "Y" showed to be significant for pair 16 in individuals I and II.



These data lead to the following conclusions:

a) the "Y" chromosome has a tendency to lie towards the center of the mitotic metaphase plate; b) the distribution of the chromosomes in the metaphase plate does not occur at random; c) this chromosome distribution could occur according to a pre-established pattern which could have a hereditary component and at the same time, an important individual variation.

## INTRODUCCION

La idea de la existencia de un ordenamiento de los cromosomas tanto en el núcleo interfásico como en la figura mitótica metafásica ha sido desarrollada por diversos investigadores (Comings, 1968; Sele *et al.*, 1977; Horn and Walden, 1978; Rodman *et al.*, 1978; Comings, 1980; Bianchi, 1980; Fernández-Donoso, 1980; Dutrillaux *et al.*, 1981; Wollenberg *et al.*, 1982a; Wollenberg *et al.*, 1982b; Fernández-Donoso, 1982b). Durante el ciclo celular el material hereditario tiene un comportamiento diferente en sus diversas etapas, siendo posible considerar el núcleo interfásico y los cromosomas mitóticos como dos formas transitorias de organización de la cromatina (Fernández-Donoso y Berríos, 1985). En mitosis la fibra de cromatina se organiza dando origen a los cromosomas visibles en el microscopio óptico.

La hipótesis de una disposición espacial ordenada adoptada por los distintos tipos de cromatina en el núcleo interfásico estaría determinado por: 1) las características de las distintas familias de ADN; 2) características estructurales y funcionales de los diversos tipos de cromatina y

su distribución longitudinal en los cromosomas; 3) las propiedades estructurales y funcionales de la envoltura nuclear y, 4) la capacidad de asociación de los distintos tipos de cromatina entre sí o con la envoltura nuclear (Comings, 1968; Comings, 1980; Fernández-Donoso, 1982a).

En cromosomas mitóticos humanos se ha descrito diversos tipos de asociaciones o distribuciones no al azar (Hens *et al.*, 1976; Rodman *et al.*, 1978; Dutrillaux *et al.*, 1981; Wollenberg *et al.*, 1982a; Wollenberg *et al.*, 1982b). Siendo una de las asociaciones más constantes y reiteradas la de los acrocéntricos. Los cromosomas acrocéntricos humanos corresponden a los pares 13, 14, 15, 21 y 22, los que en sus brazos cortos presentan constricciones secundarias y a veces presencia de satélites (De Grouchy and Turleau, 1984). En estas regiones se localizan los genes que codifican para el ARN ribosomal y son las que en la etapa de interfase celular se asocian originando nucléolos comunes que corresponden a las regiones organizadoras del nucléolo (NOR) (Henderson *et al.*, 1972; Henderson *et al.*, 1973). Esta asociación observada en núcleos interfásicos persistiría durante todo el ciclo celular y se la ha descrito en el núcleo de los meiocitos de varias especies de mamíferos y en el hombre

(Ferguson-Smith, 1971; Fernández-Donoso, 1980; Fernández-Donoso, 1982a). Diversos autores han estudiado la asociación de los acrocéntricos metafásicos (Ferguson-Smith and Handmaker, 1961; Shaw, 1961; Patil and Lubs, 1971; Jacobs *et al.*, 1976; Mattei *et al.*, 1976; Miller *et al.*, 1977; Liem *et al.*, 1977) y han sugerido que este tipo de asociaciones reiteradas podrían ser determinantes de algunas aberraciones cromosómicas tales como las translocaciones Robertsonianas, que son los rearrreglos cromosómicos más frecuentemente observados en la patología humana (Ferguson-Smith, 1971; Jacobs *et al.*, 1976).

La posición del cromosoma X ha sido ampliamente analizada. Barton y col. (1964) concluyeron que tanto el X como el "Y" mostraban una posición periférica y Chandra y col. (1972) reportaron que el X que replica tardíamente en la mujer era periférico. Rodman y col. (1978) describieron que tanto el X del varón y los dos X de la mujer mostrarían una marcada posición periférica en linfocitos. En estas mismas células, Wollengerg y col. (1982) mostraron que los cromosomas X de la mujer están ampliamente separados uno del otro, y que su posición periférica dentro de la mitosis es la que se espera de acuerdo a su tamaño, según publicaciones previas

(Hoo and Cramer, 1971; Rodman *et al.*, 1980; Wollenberg *et al.*, 1982a). En un estudio realizado en mitosis de linfocitos y fibroblastos de mujeres, la posición de los cromosomas X se correlacionó con el estado de condensación que ellos presentaban. En linfocitos, constantemente, el menos condensado es el más periférico; en fibroblastos el X que replica tardíamente es siempre el más periférico sin importar su estado de condensación (Antoine *et al.*, 1982).

Los resultados de los estudios sobre la asociación entre cromosomas homólogos, obtenidos por los diversos investigadores, han sido inconsistentes, pero la mayoría estima que existiría una tendencia a la asociación entre los pares homólogos de menor tamaño, tendencia que disminuye a medida que aumenta el tamaño de los cromosomas (Comings, 1968; Sele *et al.*, 1977; Comings, 1980; Wollenberg *et al.*, 1982a).

Otro hecho que apoya la hipótesis de una distribución o asociación de los cromosomas a lo largo del ciclo celular es la distribución no aleatoria de puntos de roturas cromosómicas en reordenamientos binarios, eventos que necesariamente implican un encuentro entre las regiones de los cromosomas involucrados (Yu *et al.*, 1976; Boué, 1979; Valenzuela 1980a; Valenzuela, 1980b; Boué et Boué, 1981;

Dutrillaux *et al.*, 1981).

Los cromosomas de los eucariotes están constituidos por una fibra de cromatina. La cromatina es un complejo macromolecular compuesto por ADN, proteínas histónicas y no histónicas y pequeñas cantidades de ARN (Kornberg, 1977). Posee una organización fibrilar con distintos estados de condensación a través del ciclo celular, probablemente correlacionada con su función (Bak *et al.*, 1979). En el núcleo interfásico los estados de plegamiento de la cromatina le proporcionan distintas propiedades tintoriales, lo que ha dado origen a la clasificación en eucromatina, que es aquella que permanece en general decondensada y en heterocromatina, la que posee una estructura compacta y densa en la mayor parte del ciclo celular (Rieger *et al.*, 1968). La distribución de ambos tipos de cromatina en el núcleo interfásico está determinada por las asociaciones específicas entre cromosomas y de los cromosomas con la envoltura nuclear (Bianchi, 1980; Fernández-Donoso, 1980a; Fernández-Donoso, 1980b).

La heterocromatina puede ser de tipo constitutivo o facultativo. La primera se encuentra en forma equivalente en los dos cromosomas homólogos en contraposición con la

facultativa que puede comportarse en forma desigual entre los dos miembros de un par cromosómico (Bianchi, 1978). En el cariotipo humano se encuentra heterocromatina constitutiva en las regiones pericentroméricas de todos los cromosomas y en mayor cantidad en las constricciones secundarias de los pares cromosómicos 1, 9 y 16 y en la región distal del brazo largo del cromosoma "Y" (Arrighi, 1971; Miklos and John, 1979; Stahl, 1981). Con técnicas de tinción diferencial (bandeo C) es posible revelar las regiones de heterocromatina de estos cromosomas. El mecansmo del bandeo C aún no está totalmente esclarecido; se estima que existiría una extracción selectiva del ADN de las bandas C negativas (que se tiñen debilmente) y retencción del ADN de las bandas C positivas (intensamente teñidas) que corresponden a la heterocromatina constitutiva (Comings, 1977; Comings, 1978).

Mediante el método de ultracentrifugación en un gradiente de densidad, la mayor parte del ADN se acumula en una banda denominada principal, existiendo una o más bandas menores o secundarias, llamadas bandas satélites. El ADN que forma las bandas satélites se denomina ADN satélite (ADN sat) y está formado por secuencias de nucleótidos altamente o medianamente repetidos (Britten and

Kohne, 1968; Bianchi, 1978). Mediante el método de hibridación *in situ* del ADN se ha podido establecer una correlación entre el ADN sat y la heterocromatina constitutiva. Se han descrito varias familias de ADN satélites distintas denominadas por números romanos del I al IV. El ADN sat II está presente en mayor cantidad en los cromosomas 1 y 16; el ADN sat III está localizado predominantemente en el cromosoma 9; en el cromosoma "Y" existen ADN sat I y IV (Jones, 1973; Bianchi, 1978; Miklos and John, 1979). Estas regiones de ADN con secuencias altamente repetidas y compartidas conformarían una base material para sugerir una posible asociación de los cromosomas 1, 9 y 16 e "Y" durante el ciclo celular (Schmid *et al.*, 1975; Stahl et Hartung, 1981). Valenzuela y col. (1980c, 1980d, 1985), en un estudio poblacional realizado en escolares del área norte de Santiago, encontraron distorsiones segregacionales entre los sistemas sanguíneos ABO y Rh y el sexo de los individuos. Las anomalías consistieron en una menor frecuencia de varones del grupo O, incrementándose los de grupo A y B y una gran carencia de hermanos consecutivos con el genotipo CDe/CDe del sistema Rh. Las hipótesis adelantadas para explicar estas observaciones incluyen: la participación de la selección natural



a través de un mecanismo inmunológico relacionado con los sistemas ABO, Rh y sexo o una interacción entre estos sistemas en el momento de la segregación meiótica denominada segregación cromosómica asociada. Esta anomalía consistiría en que el cromosoma "Y" (o el X) segregaría preferencialmente con uno de los cromosomas homólogos 9, explicándose que padres BO segregaran hijos varones B e hijas O.

El locus ABO se encuentra en la región q34 del brazo largo del cromosoma 9 y los loci del sistema Rh están localizados en la región p32 → pter del brazo corto del cromosoma 1 (Mc Kusick, 1983). Si existe una asociación espacial y temporal entre cromosomas que comparten regiones de ADN con secuencias altamente repetidas como las regiones heterocromáticas de los cromosomas 1, 9 e "Y", esta asociación podría operar en la meiosis favoreciendo la segregación conjunta de estos cromosomas. De ocurrir así, se esperaría que en padres varones de grupo A o B cuyos hijos varones sean de grupo A o B y cuyas hijas sean de grupo O (familias con el tipo de segregación observada por Valenzuela y col.) uno de los cromosomas de los pares 1 y 9 estuvieran más próximos o asociados al cromosoma "Y" a lo largo del ciclo celular y esta proximidad podría ser detectada durante la metafase mitótica.

El cromosoma 16 que también comparte una región heterocromática podría participar en este tipo de asociaciones cromosómicas.

El presente estudio ha sido diseñado para el análisis de la distribución en la placa metafásica de los cromosomas 1, 9 y 16 e "Y" utilizando un método basado en órdenes de secuencia intercentromérica en un gran número de células de un mismo individuo.

La hipótesis nula es que los cromosomas se distribuyen, con excepción de su estructura lineal, aleatoriamente en la placa metafásica. La hipótesis alternativa es que existe algún tipo de asociación distribucional en la placa metafásica entre los cromosomas 1, 9, 16 y el "Y".

## MATERIAL Y METODOS

### A. Muestra

La muestra está formada por tres individuos varones sanos (I, II y III) cuyas genealogías y grado de parentezco se muestra en la Figura 1. Los individuos I y II corresponden a las familias con segregación asociada de grupo sanguíneo B y sexo masculino observado por Valenzuela y col. (1980c, 1980d, 1985).

El individuo I de 38 años de edad, grupo sanguíneo B, está casado con una mujer del grupo 0; tiene un hijo del grupo B y una hija del grupo 0.

El individuo II de 36 años de edad, de grupo sanguíneo B, casado con una mujer del grupo 0. Tiene dos hijos del grupo B y una hija del grupo 0.

El individuo III de 35 años de edad, de grupo sanguíneo 0, está casado con una mujer del grupo 0. Tiene tres hijas del grupo 0. Este individuo es utilizado como testigo.

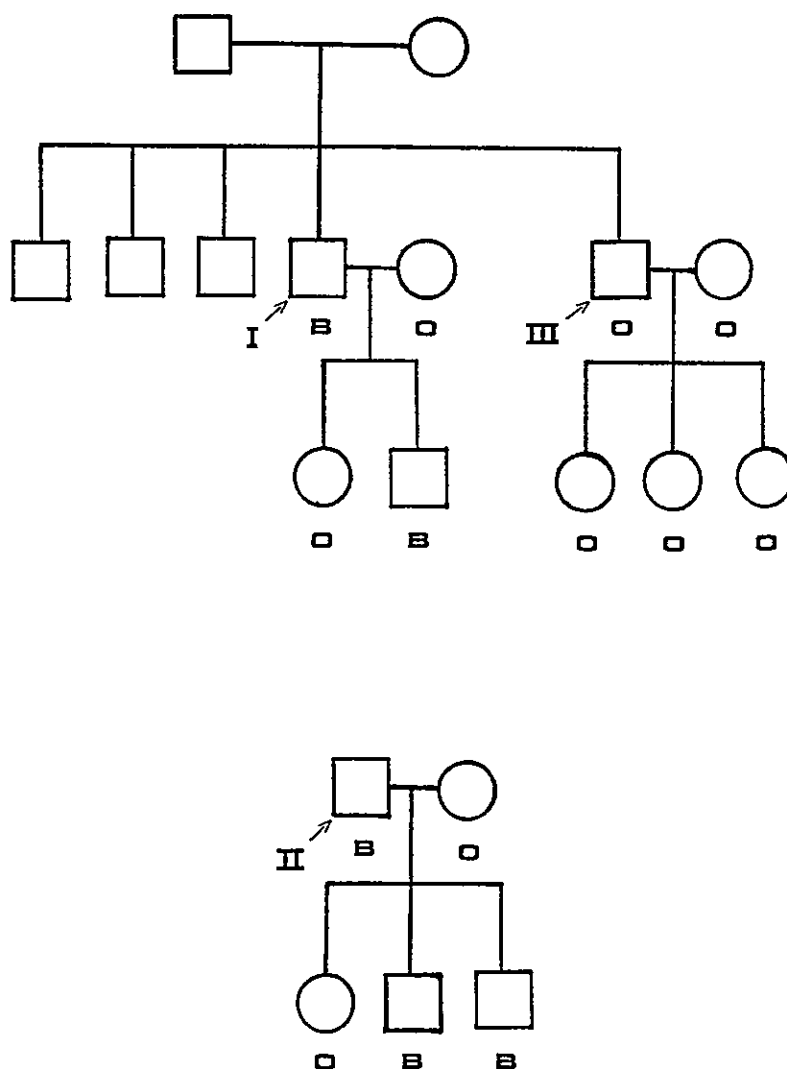


FIGURA 1. Genealogías de los tres individuos estudiados señalando el grupo sanguíneo correspondiente a cada caso índice, su cónyuge y sus hijos.

Todas las tipificaciones fueron realizadas en el Banco de Sangre del Hospital Clínico de la Universidad de Chile.

#### B. Método para la obtención de mitosis

A cada uno de los tres individuos se le extrajo una muestra de 20 ml de sangre periférica mediante punción venosa en una jeringa descartable que contenía 0.1 ml de heparina sódica (Organon 5.000 UI/ml). Ninguno de los individuos había sido sometido previamente a tratamiento con drogas, procedimientos radiológicos ni transfusiones.

Las muestras de sangre de los individuos I, II y III fueron extraídas el 12 de septiembre de 1983, el 7 de noviembre del mismo año y el 19 de marzo de 1984 respectivamente, y procesadas el mismo día de su extracción y todas en la misma forma que se describe a continuación.

La sangre se dejó sedimentar en la jeringa a temperatura ambiente hasta obtener 5 ml de plasma rico en leucocitos. Para cada muestra procedente de cada uno de los tres individuos se realizó paralelamente seis cultivos

de linfocitos: tres en medio Difco kit macrotest (tubos A, B y C) y tres en tubos estériles Falcon (D, E y F) con medio TC 199 Difco (5 ml) adicionado con suero AB humano obtenido de dadores sanos (1 ml), Fitohe<sup>u</sup>maglutinina M Difco (0.1 ml) y gentamicina Schering a una concentración final de 2 µgr/ml. En los tubos A, B y C se sembró 1 ml de plasma rico en leucocitos y en los tubos D, E y F 0.5 ml de plasma (Figura 2) (Yunis, 1965; De Grouchy and Turleau, 1984).

Los tubos de cultivo fueron tapados herméticamente e incubados a 37°C. Después de 72 horas se adicionó al frasco A, 0.5 ml de solución de demecolcina (Difco) y fue depositado nuevamente a 37°C por un lapso de 30 minutos; los cultivos B, C, D, E y F fueron retirados de la estufa dejándose a temperatura ambiente también durante 30 minutos. En seguida, todos los cultivos fueron centrifugados a 800 rpm<sup>1</sup>, retirándose el sobrenadante y agregando 3 ml de solución de Hanks (Difco). Luego de resuspender las células se centrifugaron, se retiró el sobrenadante y

---

<sup>1</sup> Todas las centrifugaciones posteriores fueron realizadas a 800 rpm.

EXTRACCION DE MUESTRA DE SANGRE VENOSA CON HEPARINA

SEDIMENTACION HASTA OBTENER 5 ml DE PLASMA

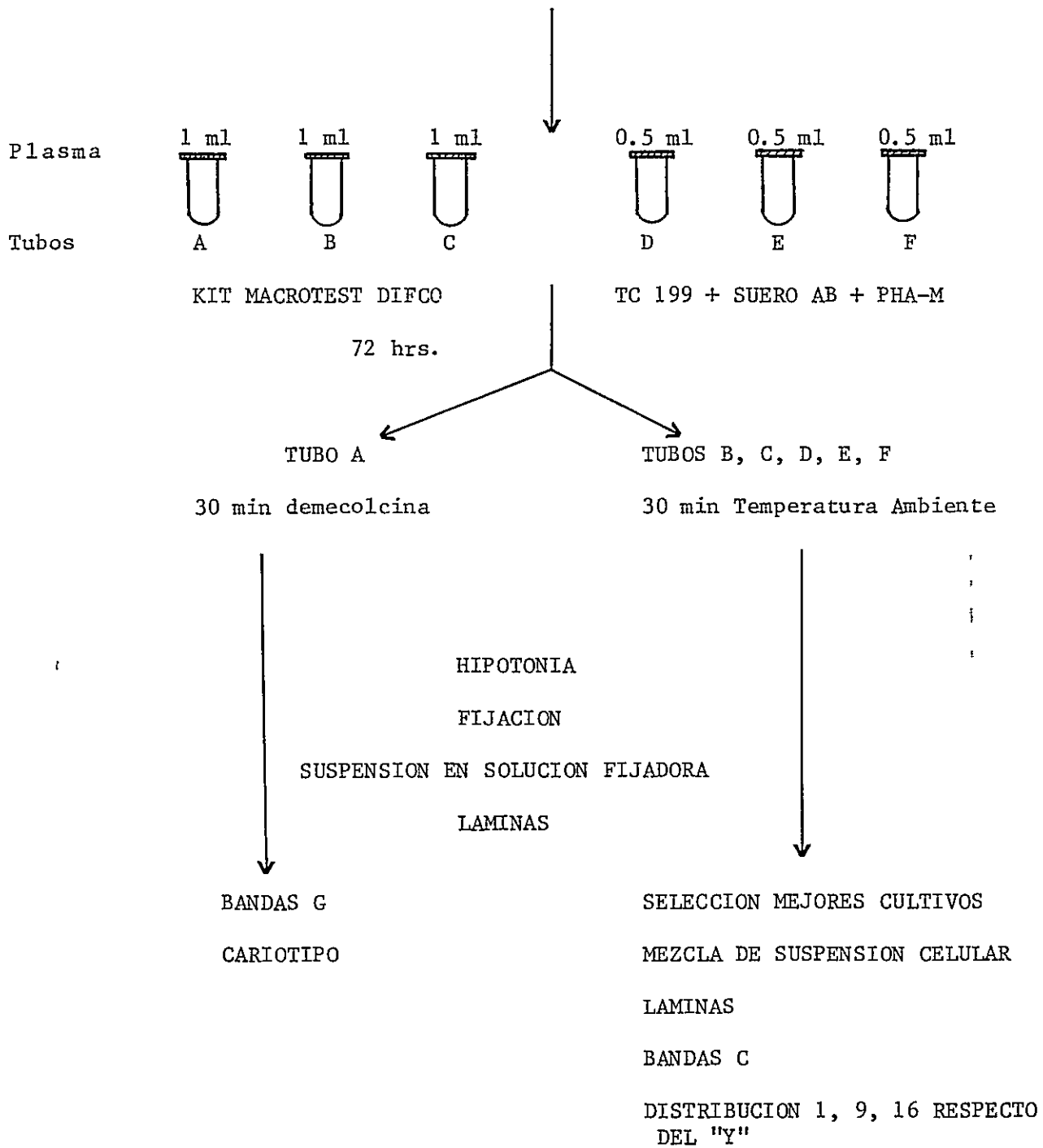


FIGURA 2. Esquema de la técnica utilizada para la obtención de mitosis.

se agregó 4 ml de solución de KCl 0.05 M durante 10 minutos a 37°C, agitándose suavemente. Se centrifugó y se retiró el sobrenadante. Se agregó 2 ml de solución acuosa de ácido acético glacial al 4% agitando vigorosamente (Ibraimov, 1983). Se centrifugó y se retiró el sobrenadante. Previamente había sido preparada una mezcla fijadora de metanol y ácido acético glacial en la proporción de 3:1 y mantenida a 4°C. Lentamente se agregó 1 ml de este fijador a cada tubo, para evitar la disrupción del sedimento celular, dejándolos a 4°C durante 30 minutos, al cabo de los cuales los tubos fueron agitados suavemente y centrifugados. Esto fue realizado en dos oportunidades para obtener una suspensión celular limpia. Luego se agregó aproximadamente 0.5 ml del fijador obteniéndose una concentración celular adecuada. Las láminas microscópicas se obtuvieron al dejar caer una gota desde una altura de 5 cm con el portaobjeto en posición horizontal. El cultivo del tubo A fue destinado para la preparación de láminas microscópicas a ser tratadas para la obtención de bandas G, mediante una modificación de la técnica descrita por Seabright (1971).

Se preparó una lámina microscópica de cada uno de los tubos B, C, D, E y F, que no habían recibido demecolcina, para estimar el índice mitótico. Se seleccionaron



los tubos con el mejor índice y la mejor calidad de figuras mitóticas. Las suspensiones celulares de los tubos seleccionados fueron mezcladas y esta mezcla sería utilizada posteriormente para la preparación de láminas a ser teñidas para bandas C.

Para los fines de este trabajo se utiliza la nominación de "figura metafásica" para denotar la distribución de los cromosomas una vez que han sido fijados y teñidos sobre la lámina portaobjeto.

#### C.- Método de bandeo C

El método utilizado para la obtención de bandas C se basó en el descrito por Sumner (1972). Esta técnica incluye el envejecimiento de las láminas por no menos de 10 días.

Se intentó diversas modificaciones al método con el objeto de obtener tinciones más contrastadas. La variante que dio los mejores resultados y más constantes fue aquella en la que la suspensión celular fijada fue envejecida a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante 15 días antes de la preparación de las láminas, las que fueron tratadas y teñidas

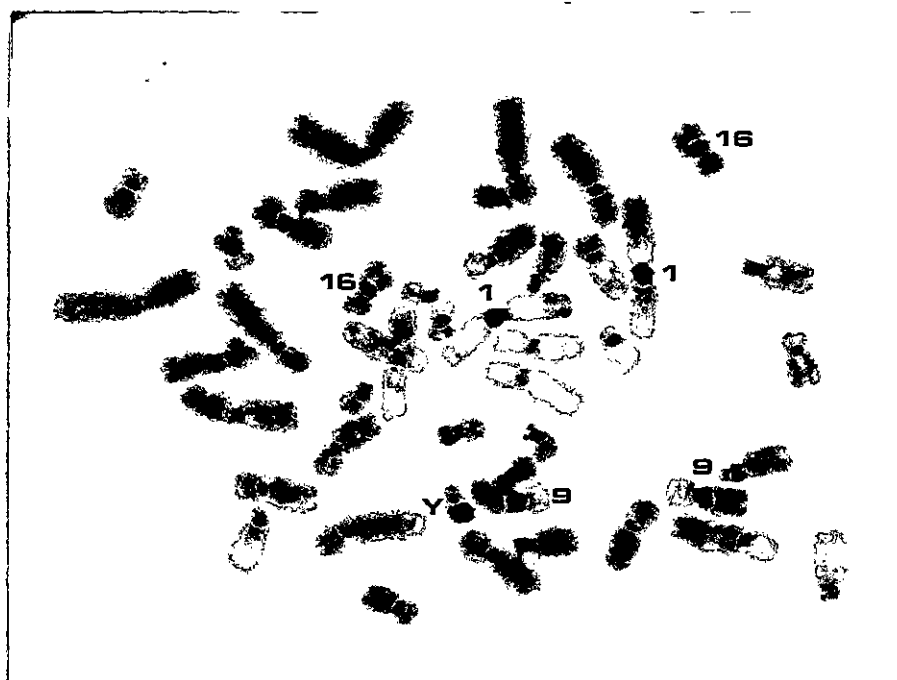


FIGURA 3. Metafase teñida para bandas C según la modificación de la técnica de Sumner (1972) (Individuo III).

al día siguiente (Figura 3)

#### D. Análisis de las metafases

Las láminas teñidas para bandeo G fueron revisadas, seleccionándose 30 mitosis en las que se hizo re-cuento cromosómico; cuatro de éstas fueron microfotografíadas y posteriormente ampliadas. El cariotipo fue analiza-do de acuerdo a criterios convencionales para asegurar la normalidad de los sujetos estudiados (Paris Conference, 1971).

Las láminas teñidas para bandeo G fueron uti-lizadas para la investigación de la distribución metafási-ca de los cromosomas 1, 9, 16 e "Y" (Fig. 3).

Las observaciones se realizaron en un microscpio Leitz, modelo Laborlux 12. Las mitosis fueron microfo-tografiadas con un sistema automático Wild Modelo MPS 45, utilizando un objetivo NPL flúotar de óptica plana 100 X.

Se seleccionaron figuras metafásicas con un complemento cromosómico normal donde su diámetro mayor no sobrepasaba los límites del recuadro de enfoque del ocular

microfotográfico. Se utilizó película Copex Pan Rapid (Afga) y papel fotográfico F-3 (Kodak) de un tamaño de 4.5 x 6 cm.

Del total de las ampliaciones obtenidas, se seleccionó un mínimo de 360 metafases, las que fueron analizadas como se describe a continuación. En cada metafase se procedió a identificar el centrómero del cromosoma "Y", y el de los pares 1, 9 y 16. Se examinó su distribución y se la calificó como la secuencia de la menor a la mayor distancia de los cromosomas 1, 9 y 16 con respecto del "Y" (Fig. 4). Dado que se compararon las cercanías relativas de tres pares de cromosomas con respecto del "Y", el número de posibles secuencias calculadas por análisis combinatorio es 90 (Tabla 1). Si se analizan 360 metafases se espera un promedio de 4 metafases coincidiendo con cada posibilidad. Si denominamos por "k" el número de veces que una secuencia de orden puede presentarse experimentalmente (Cavalli-Sforza and Bodmer, 1971), encontramos que tal variable podría ser descrita por una función de distribución poissoniana de parámetro  $\mu = 4$ :

$$k \sim P (\mu = 4) = \frac{e^{-4} 4^k}{k!} \quad ; \quad k = 1.2.....$$

(ver Apéndice)

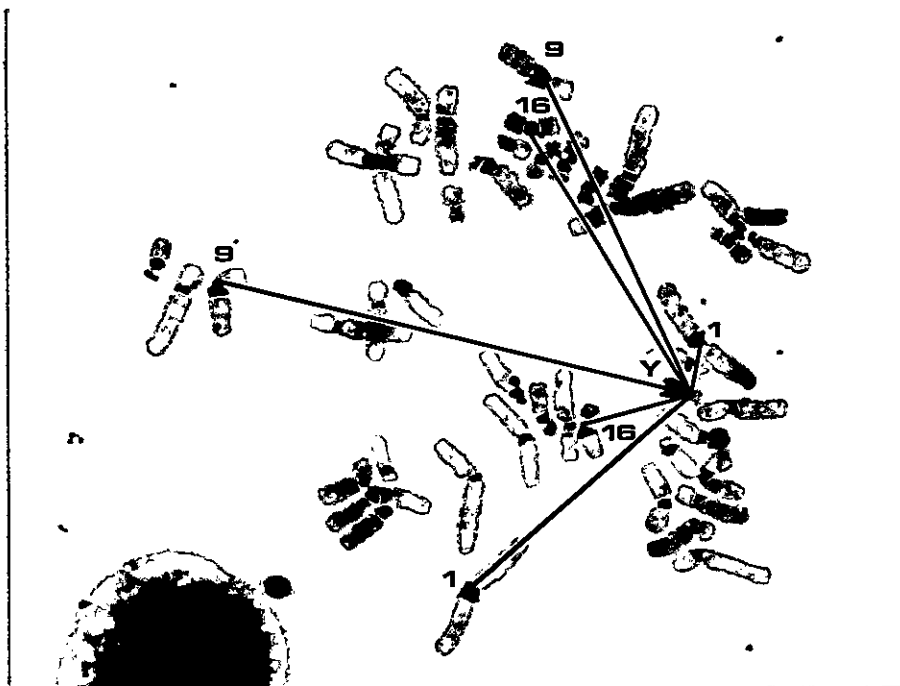


FIGURA 4. Metafase teñida para bandas C (individuo II). La secuencia de orden de los cromosomas respecto del "Y" es:  
1 16 1 16 9 9.

### E. Método para análisis de posición del cromosoma "Y"

En forma arbitraria se determinó la posición del cromosoma "Y" dividiendo el radio de una circunferencia imaginaria en tres segmentos iguales que incluye el extremo de los cromosomas más periféricos y cuyo centro es el centro aproximado de la mitosis, resultando tres circunferencias: central (C), media (M) y periférica (P) (Fig. 5), cuyas superficies tienen las áreas siguientes:

$$C = \pi \cdot r_1^2$$

$$M = \pi (2r_1)^2 = 4 \pi (r_1)^2$$

$$P = \pi (3r_1)^2 = 9 \pi (r_1)^2$$

Los sectores C, M y P se obtienen por la diferencia de áreas.

$$\text{Sector C} = \pi r_1^2$$

$$\text{Sector M} = 3 \pi r_1^2$$

$$\text{Sector P} = 5 \pi r_1^2$$

Luego, los sectores C, M y P están en la razón de 1:3:5.

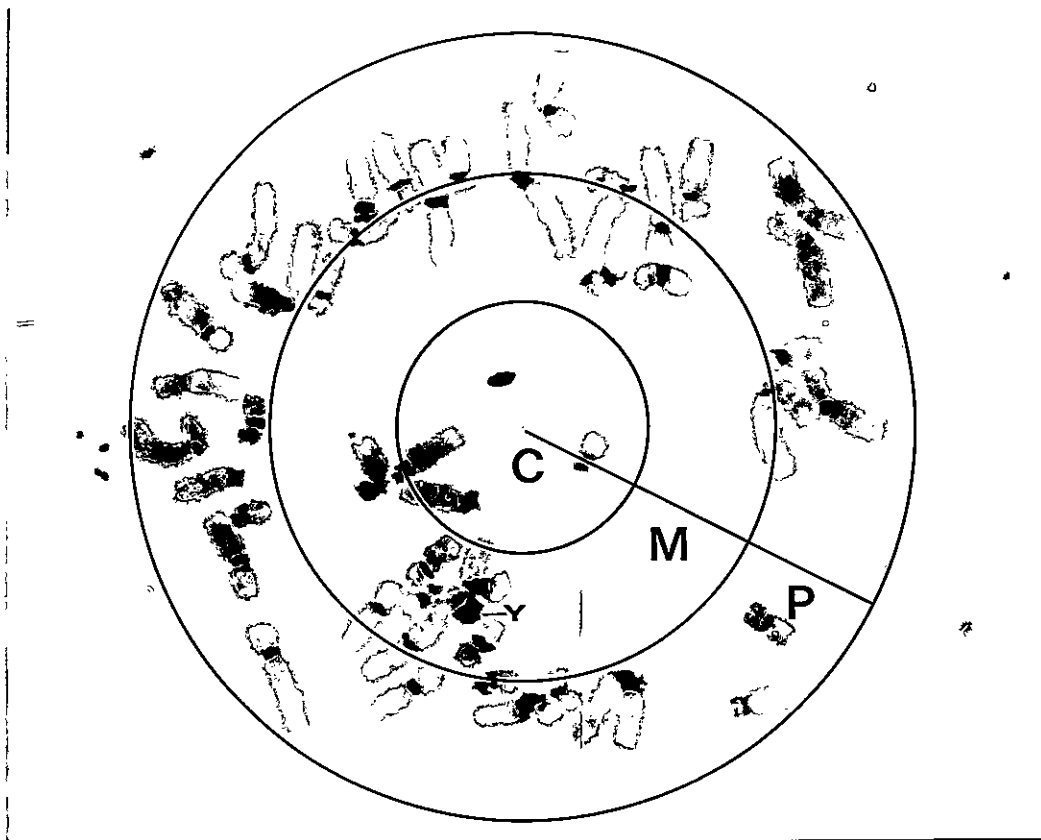


FIGURA 5. Método utilizado en la determinación de las posiciones del cromosoma "Y" en las figuras metafásicas. C = central; M = media; P = periférica.

Desde el punto de vista teórico si la ubicación del "Y" en la placa metafásica ocurre al azar, las probabilidades de encontrarlo en posición central, mediana o periférica guardarían una relación directa con la superficie de los sectores mencionados.

#### F. Análisis estadísticos de los resultados

En el análisis estadístico de los resultados se aplicaron pruebas de  $\chi^2$  y prueba t de Student (ver Apéndice) (Rohlf and Sokal, 1969).

En particular para el análisis de la proximidad entre los cromosomas homólogos (dada por aquellas secuencias en que el par homólogo está contíguo comparada con aquellas en que el par está separado por dos o más de los cromosomas restantes) fue utilizada una prueba de t-Student para muestras independientes, calculándose para cada caso el promedio y desviación standard asociados al número de figuras metafásicas con una distribución particular de entre las 90 (ver Apéndice).



Igualmente para el análisis de los índices de correlación de las frecuencias observadas en las 90 secuencias entre los tres individuos se utilizó una prueba de t-Student (ver Apéndice).

## RESULTADOS

El cariotipo de cada uno de los tres individuos analizados mediante bandas G es normal 46, XY (Paris Conference, 1971).

Las láminas tratadas para bandeado C según una modificación de la técnica de Sumner (71), que se describe en la sección Material y Métodos, fueron utilizadas en el análisis de la cercanía de los pares cromosómicos 1, 9 y 16 con respecto del cromosoma Y. El patrón de bandas C observado en los tres individuos es normal según los criterios internacionales (Paris Conference, 1971). En las Figuras 4, 5 y 6 se muestra una metafase de los individuos I, II y III respectivamente, señalando la secuencia y posición del Y correspondiente a esas mitosis.

En el individuo I se analizó un total de 360 metafases, en el II de 451 y en el III, de 363.

Las 90 posibilidades de secuencia de cercanía de los cromosomas 1, 9 y 16 con respecto del cromosoma Y se



FIGURA 6. Individuo I

Posición del "Y" central

Secuencia: 9 9 16 16 11 1



FIGURA 7. Individuo II

Posición del "Y": Periférica

Secuencia: 9 1 1 16 16 9



FIGURA 8. Individuo III

Posición del "Y": Media

Secuencia: 1 9 1 9 16 16

describen en la Tabla 1. Las columnas I, II y III, correspondientes a los respectivos individuos, señalan la frecuencia observada en cada una de estas secuencias y su probabilidad de ocurrencia. Las probabilidades marcadas con un asterisco corresponden a aquellas secuencias que presentan una frecuencia mayor o menor que la esperada, estadísticamente significativa. En la Tabla 2 se enumeran estas secuencias en cada uno de los individuos, separando aquellas que presentaban las frecuencias mínimas de las máximas, todas significativas a un nivel de probabilidad menor del 4%. Si se prueba la hipótesis de distribución al azar de las probabilidades de ocurrencia en cada una de las 90 alternativas de orden, se tiene que en cada individuo se esperan 4.5 alternativas con una probabilidad inferior al 5%. El individuo I presentó 9 alternativas significativas lo que según distribución de Poisson con  $\mu = 4.5$  da una probabilidad inferior a 0.04. En el individuo II las 12 alternativas significativas ocurren con probabilidad inferior a 0.003. En el individuo III las 8 alternativas significativas ocurren con probabilidad cercana a 0.1.

TABLA 1

ORDENES DE UBICACION (SECUENCIAS) DE LOS CROMOSOMAS 1, 9 Y 16 RESPECTO DEL "Y": FRECUENCIA (f) Y PROBABILIDAD DE OCURRENCIA (p) EN LOS TRES INDIVIDUOS

SECUENCIAS						INDIVIDUOS					
						I		II		III	
						f	p	f	p	f	p
1	1	9	9	16	16	7	0.059	3	0.14	4	0.19
1	1	9	16	9	16	5	0.15	4	0.17	2	0.14
1	1	9	16	16	9	4	0.19	7	0.10	7	0.59
1	1	16	9	9	16	3	0.19	3	0.14	0	0.018*
1	1	16	9	16	9	6	0.10	4	0.17	3	0.19
1	1	16	16	9	9	6	0.10	2	0.08	6	0.10
1	9	1	9	16	16	2	0.14	6	0.14	5	0.15
1	9	1	16	9	16	2	0.14	4	0.17	7	0.059
1	9	1	16	16	9	4	0.19	7	0.10	3	0.19
1	9	9	1	16	16	2	0.14	4	0.17	4	0.19
1	9	9	16	1	16	1	0.07	2	0.08	2	0.14
1	9	9	16	16	1	4	0.19	5	0.17	1	0.07
1	9	16	1	9	16	5	0.15	5	0.17	3	0.19
1	9	16	1	16	9	6	0.10	6	0.14	6	0.10
1	9	16	9	1	16	3	0.19	3	0.14	1	0.07
1	9	16	9	16	1	2	0.14	8	0.06	1	0.07

sírvase continuar página siguiente

1	9	16	16	1	9	6	0.10	10	0.018*	5	0.15
1	9	16	16	9	1	6	0.10	4	0.17	5	0.15
1	16	1	9	9	16	4	0.19	6	0.14	3	0.19
1	16	1	9	16	9	2	0.14	2	0.08	8	0.029*
1	16	1	16	9	9	2	0.14	5	0.17	2	0.14
1	16	9	1	9	16	4	0.19	0	0.006*	4	0.19
1	16	9	1	16	9	5	0.15	4	0.17	1	0.07
1	16	9	9	1	16	1	0.07	4	0.17	4	0.19
1	16	9	9	16	1	5	0.15	3	0.14	4	0.19
1	16	9	16	1	9	1	0.07	6	0.14	4	0.19
1	16	9	16	9	1	0	0.018*	3	0.14	6	0.10
1	16	16	1	9	9	9	0.013*	7	0.10	7	0.059
1	16	16	9	1	9	5	0.15	5	0.17	4	0.19
1	16	16	9	9	1	3	0.19	9	0.036*	4	0.19
9	1	1	9	16	16	4	0.19	5	0.17	4	0.19
9	1	1	16	9	16	2	0.14	5	0.17	5	0.15
9	1	1	16	16	9	6	0.10	3	0.14	4	0.19
9	1	9	1	16	16	9	0.013*	3	0.14	6	0.10
9	1	9	16	1	16	2	0.14	7	0.10	4	0.19
9	1	9	16	16	1	2	0.14	4	0.17	3	0.19
9	1	16	1	9	16	5	0.15	3	0.14	2	0.14
9	1	16	1	16	9	10	0.005*	5	0.17	7	0.059
9	1	16	9	1	16	2	0.14	6	0.14	4	0.19
9	1	16	9	16	1	3	0.19	2	0.08	0	0.018*

Sírvase continuar página siguiente



9	1	16	16	1	9	1	0.07	3	0.14	3	0.19
9	1	16	16	9	1	5	0.15	2	0.08	2	0.14
9	9	1	1	16	16	3	0.19	9	0.036*	6	0.10
9	9	1	16	1	16	2	0.14	3	0.14	2	0.14
9	9	1	16	16	1	1	0.07	5	0.17	2	0.14
9	9	16	1	1	16	6	0.10	4	0.17	4	0.19
9	9	16	1	16	1	7	0.059	10	0.018*	4	0.19
9	9	16	16	1	1	2	0.14	4	0.17	4	0.19
9	16	1	1	9	16	5	0.15	3	0.14	8	0.029*
9	16	1	1	16	9	2	0.14	9	0.036*	3	0.19
9	16	1	9	1	16	3	0.19	7	0.10	2	0.14
9	16	1	9	16	1	0	0.018*	4	0.17	4	0.19
9	16	1	16	1	9	3	0.19	3	0.14	8	0.029*
9	16	1	16	9	1	6	0.10	10	0.018*	2	0.14
9	16	9	1	1	16	4	0.19	2	0.08	7	0.059
9	16	9	1	16	1	4	0.19	7	0.10	6	0.10
9	16	9	16	1	1	4	0.19	9	0.036*	8	0.029*
9	16	16	1	1	9	3	0.19	3	0.14	7	0.059
9	16	16	1	9	1	7	0.059	5	0.17	2	0.14
9	16	16	9	1	1	3	0.19	7	0.10	2	0.14
16	1	1	9	9	16	4	0.19	8	0.06	3	0.19
16	1	1	9	16	9	5	0.15	2	0.08	2	0.14
16	1	1	16	9	9	1	0.07	7	0.10	1	0.07
16	1	9	1	9	16	1	0.07	4	0.17	3	0.19

Sírvase continuar página siguiente

16	1	9	1	16	9	6	0.10	6	0.14	3	0.19
16	1	9	9	1	16	6	0.10	5	0.17	2	0.14
16	1	9	9	16	1	3	0.19	4	0.17	5	0.15
16	1	9	16	1	9	4	0.19	9	0.036*	6	0.10
16	1	9	16	9	1	0	0.018*	3	0.14	2	0.14
16	1	16	1	9	9	7	0.059	5	0.17	4	0.19
16	1	16	9	1	9	6	0.10	8	0.06	5	0.15
16	1	16	9	9	1	6	0.10	4	0.17	5	0.15
16	9	1	1	9	16	4	0.19	5	0.17	6	0.10
16	9	1	1	16	9	4	0.19	4	0.17	5	0.15
16	9	1	9	1	16	6	0.10	5	0.17	4	0.19
16	9	1	9	16	1	3	0.19	1	0.033*	4	0.19
16	9	1	16	1	9	3	0.19	6	0.14	6	0.10
16	9	1	16	9	1	2	0.14	5	0.17	3	0.19
16	9	9	1	1	16	1	0.07	6	0.14	0	0.018*
16	9	9	1	16	1	5	0.15	5	0.17	7	0.059
16	9	9	16	1	1	7	0.059	2	0.08	3	0.19
16	9	16	1	1	9	3	0.19	5	0.17	7	0.059
16	9	16	1	9	1	1	0.07	5	0.17	4	0.19
16	9	16	9	1	1	4	0.19	1	0.033*	2	0.14
16	16	1	1	9	9	2	0.14	7	0.10	3	0.19
16	16	1	9	1	9	8	0.029*	6	0.14	4	0.19
16	16	1	9	9	1	9	0.013*	8	0.06	5	0.15

Sírvase continuar página siguiente

16	16	9	1	1	9	7	0.059	5	0.17	4	0.19
16	16	9	1	9	1	3	0.19	7	0.10	6	0.10
16	16	9	9	1	1	8	0.029*	10	0.018*	8	0.029*

---

\* indica las frecuencias con una probabilidad de ocurrencia estadísticamente significativa.

TABLA 2

SECUENCIAS QUE SE APARTAN DE LO ESPERADO EN CADA UNO DE LOS INDIVIDUOS ESTUDIADOS

Individuos	Frecuencia mínima						Frecuencia máxima					
	p < 0.04						p < 0.04					
I	1	16	9	16	9	1	1	16	16	1	9	9
	9	16	1	9	16	1	9	1	9	1	16	16
	16	1	9	16	9	1	9	1	16	1	16	9
							16	16	1	9	1	9
							16	16	1	9	9	1
							16	16	9	9	1	1
II	1	16	9	1	9	16	1	9	16	16	1	9
	16	9	1	9	16	1	1	16	16	9	9	1
	16	9	16	9	1	1	9	9	1	1	16	16
							9	9	16	1	16	1
							9	16	1	1	16	9
							9	16	1	16	9	1
							9	16	9	16	1	1
							16	1	9	16	1	9
							16	16	9	9	1	1
III	1	1	16	9	9	16	1	16	1	9	16	9
	9	1	16	9	16	1	9	16	1	1	9	16
	16	9	9	1	1	16	9	16	1	16	1	9
							9	16	9	16	1	1
							16	16	9	9	1	1

La frecuencia de las 90 secuencias enumeradas en la Tabla 1 en cada uno de los individuos, varió entre 0 y 10. Considerando el número de metafases analizadas en cada individuo y el número de posibles secuencias, el número esperado de veces que se repita una secuencia es un promedio de 4 para los individuos I y III y de 5 para el individuo II. La Tabla 3 muestra la aplicación de la d<sup>o</sup>cima de bondad de ajuste mediante una distribución  $\chi^2$  (ver Apéndice), encontrándose que las repeticiones acumuladas en cada frecuencia se ajustan a una distribución de Poisson de parámetro  $\mu = 4$  para los individuos I y III y  $\mu = 5$  para el individuo II.

TABLA 3

DISTRIBUCION DEL NUMERO DE REPETICIONES DE LAS FRECUENCIAS EN LAS 90 SECUENCIAS  
AJUSTADAS A POISSON EN LOS TRES INDIVIDUOS

Frecuencias observadas	I			II			III		
	Obs.	Repeticiones Esp.	$\chi^2$	Obs.	Repeticiones Esp.	$\chi^2$	Obs.	Repeticiones Esp.	$\chi^2$
0	3	1.65	1.11	1	0.61	0.25	3	1.65	1.10
1	9	6.59	0.88	2	3.03	0.35	5	6.59	0.38
2	15	13.19	0.25	8	7.58	0.02	15	13.19	0.25
3	14	17.58	0.73	14	12.63	0.15	13	17.58	1.19
4	14	17.58	0.73	15	15.79	0.04	22	17.58	1.11
5	10	14.07	1.18	18	15.79	0.31	9	14.07	1.83
6	13	9.38	1.40	9	13.16	1.32	10	9.38	0.04
7	6	5.36	0.08	10	9.40	0.04	8	5.36	1.30
8	2	2.68	0.17	4	5.88	0.60	5	2.68	2.00
9	3	1.19	2.75	5	3.26	0.93			
10	1	0.48	0.57	4	1.63	3.44			
TOTAL	90	89.75	9.85*	90	88.76	7.46*	90	88.08	9.21*

\* N.S.

La posición del cromosoma "Y" dentro de la figura metafásica fue determinada mediante el sistema de círculos concéntricos descrito en la metodología. En la Tabla 4 se muestra el número de veces que el cromosoma "Y" ocupó una de las posiciones: central, media o periférica que tienen una superficie equivalente a la razón de 1:3:5 respectivamente. El número esperado se calculó a partir de esta razón. En los tres individuos se observa un enriquecimiento en los casilleros de las posiciones central y media, con una disminución en el casillero de la posición periférica.

Todos los valores de  $\chi^2$  calculados en los distintos casilleros resultaron estadísticamente significativos con una probabilidad menor de 0.5%.

TABLA 4

ANALISIS DE LA POSICION DEL CROMOSOMA Y MEDIANTE EL SISTEMA DE CIRCULOS CONCENTRICOS

Posición	I		II		III	
	Nº obs.	Nº esp.	Nº obs.	Nº esp.	Nº obs.	Nº esp.
Central	67	38.77	73	50.10	65	40.1
Media	154	116.33	208	150.30	162	120.3
Periférica	128	193.9	170	250.60	134	200.6
Total	349	349	451	451	361	361
		$\chi^2$		$\chi^2$		$\chi^2$
		20.55**		10.47*		15.46*
		12.20*		22.15**		14.45*
		22.40**		25.92**		22.11**
		55.15**		58.50**		52.03**

\* p &lt; 0.005

\*\* p &lt; 0.0001



En la Tabla 5 se analiza el número acumulado de frecuencias según los primeros y segundos lugares de cercanía de los cromosomas 1, 9 y 16 respecto del "Y", observando que la secuencia en que el par homólogo 16 ocupa estos lugares presenta una frecuencia significativamente alta en los individuos I y II. En el individuo III esta diferencia no es significativa. Se utilizó para el análisis estadístico una prueba de  $\chi^2$ , calculando el número esperado según el número de secuencias estimadas en cada una de ellas.

Se estudió en forma igualmente separada la proximidad de los cromosomas homólogos 1, 9 y 16 entre sí y en relación a su cercanía al "Y". El análisis estadístico utilizado se describe en Material y Métodos. Como se observa en la Tabla 6, de los tres pares cromosómicos sólo el par 16 mostró una significativa tendencia a la proximidad entre homólogos. Esta diferencia se analizó mediante una prueba de t-Student, siendo significativa sólo en los individuos I y II, con una probabilidad menor del 2% para el primero y menor del 5% para el segundo.

TABLA 5

ANALISIS DE LAS FRECUENCIAS ACUMULADAS DE LAS DOS PRIMERAS POSICIONES DE CERCANIA  
AL CROMOSOMA Y, EN LOS TRES INDIVIDUOS ESTUDIADOS

Posiciones de cercanía "y"	INDIVIDUOS											
	I			II			III					
	obs.	N° esp.	$\chi^2$	obs.	N° esp.	$\chi^2$	obs.	N° esp.	$\chi^2$	obs.	N° esp.	$\chi^2$
1	31	24	2.04	23	30.06	1.66	22	24.2	0.2			
1	43	48	0.52	64	60.12	0.25	43	48.4	0.6			
1	41	48	1.02	54	60.12	0.62	51	48.4	0.14			
9	51	48	0.19	48	60.12	2.44	44	48.4	0.4			
9	21	24	0.38	35	30.06	0.81	22	24.2	0.2			
9	44	48	0.33	69	60.12	1.31	59	48.4	2.32			
16	49	48	0.02	65	60.12	0.40	41	48.4	1.13			
16	43	48	0.52	50	60.12	1.70	51	48.4	0.14			
16	37	24	7.04***	43	30.06	5.57**	30	24.2	1.39*			
Total	360	360		451	450.09		363	363				

\*\*\*  
p < 0.01\*\*  
p < 0.05\*  
N.S.

TABLA 6  
 DISTRIBUCION DE LA CERCANIA ENTRE SI DE LOS CROMOSOMAS HOMOLOGOS 1, 9 Y 16 RESPECTO  
 DEL CROMOSOMA // EN LOS TRES INDIVIDUOS ESTUDIADOS

Proximidad entre homólogos	Individuos		
	I	II	III
Diferencia entre 1 1 Y 1 - - 1 t <sub>cal</sub>	1.10	0.2	1.5
Diferencia entre 9 9 Y 9 - - 9 t <sub>cal</sub>	0.64	0.74	1.34
Diferencia entre 16 16 Y 16 - - 16 t <sub>cal</sub>	2.17***	1.85**	0.68*

\*\*\* p < 0.02

\*\* p < 0.05

\* N.S.

(1)

Se estudió la correlación de la distribución de las frecuencias en cada una de las secuencias, observadas y anotadas en la Tabla 1, en los tres individuos. Los índices de correlación entre los individuos I y II, I y III y II y III resultaron ser positivos y se muestran en la Tabla 7. El índice de correlación analizado mediante una prueba de t-Student con una probabilidad menor de 0.5%, fue significativo solamente entre los individuos I y III.

TABLA 7

ANALISIS DEL INDICE DE CORRELACION DE LAS FRECUENCIAS  
OBSERVADAS EN LAS 90 SECUENCIAS ENTRE  
LOS TRES INDIVIDUOS ESTUDIADOS

Indice de correlación	Prueba t de Student	
Entre individuo I y II $r = 0.157$	$t_{cal} = 1.597$	N.S.
Entre individuo II y III $r = 0.155$	$t_{cal} = 1.596$	N.S.
Entre individuo I y III $r = 0.24$	$t_{cal} = 2.586$	$p < 0.005$

## DISCUSION

Los datos obtenidos en el presente estudio en tres individuos cromosómicamente normales apoyan la idea de la existencia de un orden cromosómico en la figura metafásica, revelado por las diferencias estadísticamente significativas de algunas secuencias (Tablas 1 y 2). Si bien la distribución de los datos en conjunto se ajusta a una distribución de Poisson (Tabla 3), esta medida de resumen no refleja la heterogeneidad observada al analizar los datos por separado.

El actual estudio y los publicados previamente (Rodman *et al.*, 1978; Wollenberg *et al.*, 1982a; Wollenberg *et al.*, 1982b) referentes a distribución de cromosomas en el núcleo, han sido realizados en cromosomas metafásico, porque en esta etapa de la mitosis los cromosomas se presentan en un estado de condensación tal que facilita la obtención de tinciones diferenciales (bandeos cromosómicos). Aunque la distribución de los cromosomas metafásicos no es representativa de las distribuciones en todos los estados del

ciclo celular, el encontrar asociaciones preferenciales en esta etapa es sugerente de la existencia de una organización precedente y ulterior. Zorn y col. (1979) observaron en células parcialmente irradiadas para producir síntesis de ADN no programada con incorporación de timidina tritiada, que la marca autorradiográfica se concentraba en sitios específicos del núcleo. Al estudiarlo en cromosomas metafásicos la mayoría de los granos se concentraba en unos pocos cromosomas que habían permanecido adyacentes en una región de la figura metafásica. Estos hallazgos sugieren que no ocurrirían cambios drásticos en la posición relativa de los cromosomas durante el transcurso del ciclo celular.

El bandeo C (Sumner, 1972), utilizado en este estudio, permite individualizar los pares cromosómicos 1, 9, 16 y el "Y". Se introdujo una modificación de la técnica descrita por Sumner (1972), consistente en la preservación de las células en la mezcla fijadora de metanol y ácido acético a  $-20^{\circ}\text{C}$  por dos semanas, en consideración a que de esta forma los resultados de la tinción eran altamente reproducibles. Es posible que la mantención de las células en el fijador por un tiempo prolongado y a baja temperatura provoque una hidrólisis lenta que acentúe las

modificaciones físico-químicas que sufren los cromosomas produciéndose un mejor contraste tintorial.

La ubicación del cromosoma "Y" en el núcleo ha sido objeto de numerosos estudios. Varios autores han sugerido la existencia de una asociación entre este cromosoma y el nucléolo (Gagné *et al.*, 1972; Tishler *et al.*, 1974; Lamborot, 1976 y Stahl *et al.*, 1984). En el presente estudio se encontró que la posición del "Y" en la metafase es central o intermedia, lo que concuerda con lo descrito por otros investigadores que utilizaron métodos distintos (Spence *et al.*, 1973; Rodman *et al.*, 1978 y Wollenberg *et al.*, 1982a).

En la determinación de la ubicación del "Y" se utilizó un método de círculos concéntricos dividiendo el radio en tres segmentos iguales, que determinaron las áreas periféricas, media y central, que son de tamaño decreciente y guardan una relación constante. Cinco círculos concéntricos de superficies variables trazados de manera de incluir nueve cromosomas cada uno, fueron utilizados por Rodman y col. (1978) en el estudio de la ubicación y asociación de cromosomas metafásicos humanos. La utilización



de este método no fue considerada adecuada porque los radios de cada uno de los cinco círculos varía de una metafase a otra con lo que la información obtenida habría sido de difícil interpretación.

Círculos concéntricos con idénticas áreas fueron utilizados por Libbus (1985) para la medición de la distancia de los telómeros respecto del centro de la figura meiótica en el hamster chino. El método de tres áreas idénticas aplicado por Libbus (1985), genera un círculo central con un radio proporcionalmente mayor en relación a su área que el de los círculos medio y periférico, con lo cual el cromosoma "Y" estaría incluido mayoritariamente en el círculo central.

Para determinar la secuencia de ubicación de los pares 1, 9 y 16 respecto del "Y", fue necesario determinar previamente la posición del "Y" respecto del centro de la figura metafásica. La ubicación en una posición central o media del cromosoma "Y" otorga una mayor confiabilidad a la figura metafásica y facilidad de análisis de los resultados.

Se ha descrito una correlación positiva entre el menor tamaño cromosómico y la menor distancia entre cromosomas homólogos (Wollenberg *et al.*, 1982a). Los datos de las Tablas 5 y 6, sugieren una tendencia a la asociación homóloga del par cromosómico 16 sólo en los individuos I y II; en el individuo III no se observó este fenómeno. El hallazgo observado en los individuos I y II podría ser interpretado como originado por un patrón de distribución de los cromosomas en el núcleo compartido por estos individuos, quienes presentarían el fenómeno de segregación asociada entre grupo sanguíneo y sexo observado por Valenzuela y col. (1980c, 1980d, 1985).

Los resultados comunicados en publicaciones previas son de difícil interpretación (Mattei *et al.*, 1976; Sele *et al.*, 1977; Rodman *et al.*, 1978; Wollenberg *et al.*, 1982a) ya que, aunque el número de metafases estudiado sea elevado, estas corresponden a diferentes individuos, lo que introduce un factor de dispersión de los datos, en el caso de que existan órdenes individuales y distintos. Este problema ha sido obviado en el presente estudio. Los resultados apoyan la suposición que el orden cromosómico tendría un componente individual (Kirsch-Volders *et al.*, 1982).

El análisis del índice de correlación de las frecuencias observadas en las 90 secuencias, muestra que éste no es significativo entre los individuos I y II y II y III; sin embargo, es significativo entre los individuos I y III que son hermanos (Tabla 7). Este hallazgo podría ser interpretado como indicativo de la existencia de un componente heredable y variable en el patrón de distribución de los cromosomas, aunque el método utilizado y la variación observada entre los hermanos y entre las células de un mismo individuo hacen difícil precisar la existencia de un patrón hereditario de organización de los cromosomas en el núcleo metafásico.

El método para la obtención de cromosomas metafásicos implica tratamientos tales como el uso de demecolcicina, hipotonía, fijación y extendido de las células, factores que alteran la organización de los cromosomas presentes en el núcleo mitótico (Sele *et al.*, 1977; Rodman *et al.*, 1980; Wollenberg *et al.*, 1982b). Sin embargo, tanto en los trabajos anteriores (Jacobs *et al.*, 1976; Rodman *et al.*, 1978; Wollenberg *et al.*, 1982a; Wollenberg *et al.*, 1982b) como en éste, se han observado asociaciones o distribuciones preferenciales, lo que indicaría que cierto orden es conservado.

La demecolcina, un alcaloide sintético que se une a la tubulina impidiendo la formación de los microtúbulos, es utilizada rutinariamente para acumular mitosis en metafases, produciendo un acortamiento progresivo de los cromosomas que guarda relación con el tiempo y la concentración a que es utilizada. Aún no se ha establecido claramente si altera el patrón natural de distribución de los cromosomas. Rodman y col. (1980) observaron distorsiones producidas por la demecolcina consistentes en:

1) modificaciones en la ubicación de los cromosomas de acuerdo a su tamaño de manera que los pequeños tenderían a ser periféricos; 2) alteración en el alineamiento de los cromosomas en la figura mitótica; 3) disrupción en las atracciones intercentroméricas y 4) disminución de la alta capacidad de asociación de los cromosomas 21 y 22. A pesar de las distorsiones señaladas anteriormente, Wollenberg y col. (1982b) en su estudio con muestras tratadas y no tratadas con demecolcina observaron pocas diferencias entre ambas; no se alteraría la distribución y ubicación de los cromosomas en la figura metafásica, excepto la posición de algunos cromosomas. En las muestras tratadas con demecolcina los cromosomas 1, 16 y 22 serían los más centrales; en las muestras no tratadas los cromosomas 18, 21

e "Y" serían los más céntricos. Sin embargo, ambos autores concluyen que después del tratamiento con demecolcina persistiría la constante asociatividad de los acrocéntricos y la marcada posición periférica del "X".

La metodología empleada en el presente estudio evalúa las relaciones de orden de tres pares de cromosomas con respecto del "Y", presentando una posible ventaja con respecto de los que utilizan distancias entre cromosomas.

La relación cualitativa de orden aparece como menos variable y más informativa comparada con métodos que evalúan la distancia intercromosómica. Por ejemplo, la secuencia lineal "Y", 16, 1, 9, 9, 1, 16 da una distancia al "Y" igual para los tres pares de cromosomas, ignorando el orden definido entre ellos.

En la introducción se señaló que una interacción entre uno o más de los cromosomas de los pares 1 y 9 con el cromosoma "Y" podría ser el origen del fenómeno segregacional entre los grupos sanguíneos Rh y ABO y el sexo de los individuos observado por Valenzuela y col. (1980c, 1980d, 1985). Mediante el método ya descrito no se detectó ninguna asociación preferencial entre los pares

cromosómicos 1 y 9 con respecto del "Y". Esto podría deberse a varios factores: a) que el método utilizado no sea capaz de revelar una asociación entre estos cromosomas; b) que exista una asociación a nivel de gametos en la meiosis que no se manifieste en mitosis; c) que las causas del fenómeno tengan otro origen.

Se observó una tendencia a la asociación homóloga en el par cromosómico 16 y con respecto de su cercanía al "Y" en los individuos I y II. Ambos presentan el fenómeno en que sus hijos varones son de grupo B y sus hijas de grupo O.

Con los antecedentes descritos rechazamos la hipótesis nula apoyando la hipótesis alternativa, es decir, la que plantea la existencia de algún tipo de asociación distribucional de estos cromosomas en la figura metafásica.

No se encontró ninguna asociación preferencial en el individuo III lo que podría deberse a que el método de análisis no permita revelarlo o que exista algún tipo de asociación que involucre otros cromosomas.

La hipótesis de Valenzuela y col. (1980c, 1980d) sugiere que uno de los homólogos del par cromosómico 9 se asociaría preferencialmente al cromosoma "Y". Al no poder distinguir entre ambos homólogos esta hipótesis no pudo ser probada. Por lo tanto, el no haber encontrado una asociación significativa entre el cromosoma "Y" y el par cromosómico 9 no refuta la postulada segregación cromosómica asociada.

Este último aspecto podría ser llevado a la práctica con la metodología utilizada y modificada por la autora en individuos que presenten un dimorfismo a nivel de la heterocromatina del par cromosómico 9.

## CONCLUSIONES

1. Se analizó la secuencia de orden de cercanía al "Y" de los pares cromosómicos 1, 9 y 16 en tres individuos normales (I, II y III). Los cromosomas fueron obtenidos mediante cultivo de linfocitos. Los resultados indican que la distribución de los cromosomas en la figura metafásica no ocurriría al azar.
2. Mediante un sistema de círculos concéntricos con radio constante que deja tres áreas: central, media y periférica que tienen una relación de 1:3:5, se determinó que el cromosoma "Y" tiende a ubicarse hacia el centro de la figura metafásica en los tres individuos (I, II y III).
3. El par cromosómico 16 muestra una tendencia a la asociación homóloga y en relación a su proximidad al "Y" sólo en los individuos I y II, los que presentan el fenómeno de asociación entre grupo sanguíneo y sexo en sus hijos.



4. En los individuos I y III, que son hermanos, se observó una correlación positiva significativa en la distribución de las frecuencias, lo que apoyaría la idea de la existencia de un componente heredable y variable en el patrón de distribución de los cromosomas.

## BIBLIOGRAFIA

- Antoine, J.J., Couturier J. and Dutrillaux B. 1982. Position non aleatoire des chromosomes metaphasiques. II Effet de la condensation sur la position des chromosomes X. *Ann. Genet.* 25: 223-225.
- Arrighi, F.E. and Hsu, T.C. 1971. Localization of heterochromatin in human chromosomes. *Cytogenetics.* 10: 81 - 86.
- Bak, A.L., Bak, P. and Zeuthen J. 1979. Higher levels of organization in chromosomes. *J. Theor. Biol.* 76: 205-217.
- Barton, D.E., David, F.N. and Merrington M. 1964. The positions of the sex chromosomes in the human cell in mitosis. *Ann. Hum. Genet.* 28: 123 - 128.
- Bianchi, N. 1978. Duplicación cromosómica y heterocromatina a nivel molecular y citológico. Monografía N° 19 Serie Biológica. OEA. 98 pp.

- Bianchi, N.O. 1980. Organización supracromosómica. Evidencias, Significado. Actas IV Congr. Latinoam. Genética. 2: 121 - 131.
- Britten, R.J. and Kohne, D.E. 1968. Repeated sequences in DNA. Science 161: 529 - 540.
- Boué, A. 1979. Structural chromosomal aberration in the parents. Proceedings III European Conference on prenatal diagnosis of genetic disorders. Enke Publisher. Stuttgart. pp 34 - 46.
- Boué J. et Boué, A. 1981. Anomalies de la structure chromosomique et arrêts du développement. En: Genetique Medicale: Acquisitions et Perspectives. pp. 113 - 125 INSEM. Flammarion Medicine.
- Cavalli-Sforza, LL. and Bodmer, W.F. 1971. The genetics of human populations. W.H. Freeman and Co. San Francisco, pp. 809 - 811.
- Comings, D.E. 1968. The rationale for an ordered arrangement of chromatin in the interphase nucleus. Am. J. Hum. Genet. 20: 440 - 460.

- Comings, D.E. 1977. Chromosome banding and chromosomal proteins. III Latin-American Congress of Genetics. pp. 24-33.
- Comings, D.E. 1978. Mechanisms of chromosome banding and implications for chromosome structure. Ann. Rev. Genet. 12: 25 - 46.
- Comings, D.E. 1980. Arrangement of chromatin in the nucleus. Hum. Genet. 53: 131 - 143.
- Chandra, H.S., Narayana, A.K.A., Buche, V.V. and Hungerford, D.A. 1972. Peripheral location of the human late X and homologous associations of autosomes numbers one, two and three. J. Genet. Hum. 61: 78 - 83.
- De Grouchy, J. and Turleau, C. 1984. Clinical Atlas of human chromosomes. 2° Ed. A. Wiley. Medical Publication. New York.
- Departamento de Salud Pública y Medicina Social, Sede Santiago Norte, Universidad de Chile. 1974. Bioestadística para carreras del área de la Salud. Sección. Publicaciones Facultad de Medicina, Santiago Norte.

- Dutrillaux, B., Viegas-Péquignot, E., Aurias, A., Mouthuy, M. and Prieur, M. 1981. Non random position of metaphasic chromosomes: A study of radiation induced and constitutional chromosome rearrangements. Hum. Genet. 59: 208 - 210.
- Ferguson-Smith, M.A. and Handmaker, S.D. 1961. Observations on the satellited human chromosomes. Lancet 1: 638-640.
- Ferguson-Smith, M.A. 1971. Human chromosomes in meiosis. Proceedings IV International Congress Human Genetics. 250: 195 - 211. Excerpta Médica.
- Fernández-Donoso, R. 1980a. Organización del núcleo meiótico: cromosomas nucleares. Actas IV Congr. Latinoam. Genética. 2: 133 - 138.
- Fernández-Donoso, R. 1980b. Disposición espacial de los cromosomas. Arch. Biol. Med. Exp. 13: 135.

- Fernández-Donoso, R. 1982a. Asociaciones cromosómicas en el núcleo de los meiocitos y reordenamientos cromosómicos. Actas V Congr. Latinoam. Genética. pp. 105 - 114.
- Fernández-Donoso, R. 1982b. La arquitectura del núcleo y los reordenamientos cromosómicos en los mamíferos. Publicación Ocasional N° 38. Museo Nacional de Historia Natural. Santiago de Chile.
- Fernández-Donoso, R. y Berríos, M.S. 1985. La arquitectura nuclear y su injerencia en la variabilidad del cariotipo. En: "El Núcleo, los Cromosomas y la Evolución". Santiago, UNESCO.
- Gagné, R., Laberge, C. and Tanguay, R. 1972. Interphase association of human Y body with nucleolus. Johns Hopkins. Med. J. 130: 254 - 258.
- Henderson, A.S., Warburton, D. and Atwood, K.C. 1972. Location of ribosomal DNA in the human chromosome complement. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 69: 3394 - 3398.

- Henderson, A.S., Warburton, D. and Atwood, K.C. 1973.  
Ribosomal DNA connectives between human acrocentric  
chromosomes. *Nature* 245 (5420): 95 - 97.
- Hens, L., Kirsch-Volders, M. and Susanne, C. 1976. Analysis  
of centromere centre generalized distances in human  
lymphocytes. (Abstracts). V International Congress  
of Human Genetics 397: 129. *Excerpta Medica*.
- Hoo, J.J. and Cramer, H. 1971. On the position of chromosomes  
in prepared mitosis figures of human fibroblasts.  
*Hum. Genet.* 13: 166 - 170.
- Horn, J.D. and Walden, D.B. 1978. Affinity distance values  
among somatic metaphase chromosomes in maize.  
*Genetics* 88: 181 - 200.
- Ibraimov, A.I. 1983. Chromosome preparations of human whole  
blood lymphocytes: An improved technique. *Clin.  
Genet.* 24: 240 - 242.
- Jacobs, P.A., Mayer, M. and Morton, N.E. 1976. Acrocentric  
chromosome associations in man. *Am. J. Hum. Genet.*  
28: 567 - 576.

Jones, K.W. 1973. Satellite DNA. J. Med. Genet. 10: 273-281.

Kirsch-Volders, M., Hens, L., Van Der Berghe, H., Scholberg, B. and Susanne, C. 1982. Chromosome distribution studies in XXY karyotypes. J. Med. Genet. 19: 57-62.

Komberg, R. 1977. Structure of chromatin. Ann. Rev. Biochem. 46: 931 - 954.

Lamborot, M. 1976. Distribución ordenada de los cromosomas. (Abstrac) XIX Reunión Anual Sociedad de Biología de Chile. pp. 32-33.

Libbus, B.L. 1985. The ordered arrangement of chromosomes in the chinese hamster spermatocytes nucleus. Hum. Genet. 70: 130 - 135.

Liem, S.L., Deuton, T.E. and Cheng, K.M. 1977. Distribution patterns of satellite associations in human lymphocytes relative to age and sex. Clin. Genet. 12: 104-110.



Mc Kusick, V. 1983. Mendelian inheritance in man. Catalogs of autosomal dominant, autosomal recessive and X-linked phenotypes. The Johns Hopkins University Press. Baltimore. 6a. ed., pp. 65 y 72.

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 - 194.

Miklos, G.L.G. and John, B. 1979. Heterocromatin and satellite DNA in man: Properties and prospects. Am. J. Hum. Genet. 31: 264 - 280.

Miller, D.A., Tantravahi, R., Dev, V.G. and Miller, O.J. 1977. Frequency of satellite association of human chromosome is correlated with amount of Ag-staining of the nucleolus organizer region. Am. J. Hum. Genet. 29: 490 - 502.

Paris Conference 1971: Standardization in human cytogenetics. Birth defects: Original Article Series. 8(7): 1-46.

Patil, S.R. and Lubs Jr., H.A. 1971. Non random association of human acrocentric chromosomes. (Abstract). IV International Congress of Human Genetics. 233: 139. Excerpta Medica.

Rieger, R., Michaelis, A. and Green, M.M. 1968. A glossary of genetics and cytogenetics. Springer - Verlag, New York.

Rodman, T.C., Flehinger, T.J. and Squire, R. 1978. Patterns of associations in the human metaphase complement: Ring analysis and estimation of associativity of specific chromosome regions. Hum. Genet. 41: 19-34.

Rodman, T.C., Flehinger, B.J. and Rohlf, F.J. 1980. Metaphase chromosome associations: Colcemid distorts the pattern. Cytogenet. Cell Genet. 27: 98 - 110.

Rohlf, F.J. and Sokal, R.R. 1969. Statistical Tables. W.H. Freeman and Co., San Francisco.

Schmid, M., Vogel, W. and Krone, W. 1975. Attraction between centric heterochromatin of human chromosomes. Cytogenet. Cell Genet. 15: 66 - 80.

- Seabright, M. 1971. A rapid banding technique for human chromosomes. *Lancet* 2: 971 - 972.
- Sele, B., Jalbert, P., Van Cutsem, B., Lucas, M., Mouriquand, C. and Bouchez, R. 1977. Distribution of human chromosomes on the metaphase plate using banding techniques. *Hum. Genet.* 39: 39 - 61.
- Shaw, M.W. 1961. Associations of acrocentric chromosomes with the centromere region of chromosome N° 1. *Lancet* 1: 1351 - 1352.
- Spence, M.A., Francke, V. and Forsythe, A.B. 1973. Evidence against the peripheral location of the Y chromosome in human metaphase cells. *Cytogenet. Cell Genet.* 12: 49 - 52.
- Stahl, A. 1981. Heterochromatin (Abstract). *Clin. Genet.* 19: 538.
- Stahl, A. et Hartung, M. 1981. L'heterochromatine. *Ann. Genet.* 24 (2): 69 - 77.

- Stahl, A., Hartung, M., Devictor, M. and Bergé-Lefranc J.L.  
1984. The association of the nucleolus and the short arm of acrocentric chromosome with the XY pair in human spermatocytes: Its possible role in facilitating sex-chromosome acrocentric translocations. Hum. Genet. 68: 173 - 180.
- Sumner, A.T. 1972. A simple technique for demonstrating centromeric heterocromatin. Exp. Cell Res. 75: 304-306.
- Tishler, P.V., Rosner, B., Lamborot-Manzur, M. and Atkins, L. 1974. Studies on the location of the Y fluorescent body in human interphase nuclei. Humangenetik 22: 275 - 286.
- Valenzuela, C. 1980a. Encuentros, rearrreglos cromosómicos y arquitectura nuclear. Actas IV Congr. Latinoam. Genética. 2: 147 - 150.
- Valenzuela, C. 1980b. Distribución espacial del material hereditario: su importancia y sus consecuencias. Arch. Biol. Med. Exp. 13: 136.

- Valenzuela, C., Harb, Z., Avendaño, A. y Acuña, M. 1980c.  
Segregación asociada entre los cromosomas sexuales  
y el par 9 humanos (Abstract). Arch. Biol. Med.  
Exp. 13 (1): 144.
- Valenzuela, C., Avendaño, A., Harb, Z. y Acuña, M. 1980d.  
Grupos sanguíneos en escolares de un estudio lon-  
gitudinal: un extraño serendipismo. Rev. Chil.  
Pediatr. 51: 433 - 441.
- Valenzuela, C., Harb, Z. y Acuña, M. 1985. Distorsiones  
segregacionales de los sistemas ABO y Rh según el  
sexo en escolares del Area Norte de Santiago.  
Rev. Chil. Pediatr. 56: 73 - 75.
- Wollenberg, C., Kiefaber, M.P. and Zang, K.D. 1982a.  
Quantitative studies on the arrangement of human  
metaphase chromosomes. VIII. Localization of  
homologous chromosomes. Hum. Genet. 60: 239-248.
- Wollenberg, C., Kiefaber, M.P. and Zang, K.D. 1982b.  
Quantitative studies on the arrangement of human  
metaphase chromosomes. IX. Arrangement of  
chromosomes with and without spindle apparatus.  
Hum. Genet. 62: 310 - 315.

Yu, C.W., Borgaonkar, D.S. and Bolling, D.R. 1976.

Non random breakage in chromosomal rearrangements of human chromosomes. (Abstracts). V International Congress of Human Genetics 398: 170. Excerpta Medica.

Yunis, J.J. 1965. Human chromosome methodology. Academic Press, New York. pp. 21 - 49.

Zorn, C., Cremer, C., Cremer, T. and Zimmer, J. 1979.

Unscheduled DNA synthesis after partial UV irradiation of the cell nucleus. Distribution in interphase and metaphase. Exp. Cell Res. 124: 111 - 119.

## APENDICE

### DISTRIBUCION DE POISSON

Se escogió la distribución de Poisson bajo el su puesto que cada una de las 90 alternativas de orden cro m o s ó m i c o respecto al "Y" sucede con la misma probabilidad. Luego, cada alternativa se comportará como una distribu -  
ción binominal con una probabilidad de ocurrencia baja (1/90) la que se aproxima a una distribución de Poisson. Esta distribución está descrita por la fórmula:

$$e^{-\mu} \cdot \frac{\mu^K}{K!} \quad \text{donde}$$

e = base de logaritmo natural

$\mu$  = promedio para cada alternativa

K = número de ocurrencia de una alternativa

Si se analiza un total de 360 metafases  $\mu$  corres ponde r á a 4.

PRUEBA DE  $\chi^2$ 

Se utilizó una prueba de bondad de ajuste para comparar: 1) la distribución de Poisson esperada con la distribución observada en las 90 alternativas posibles; 2) la distribución esperada y observada de la ubicación central, media y periférica del cromosoma "Y" en la figura metafásica; 3) la distribución esperada con lo observado de las frecuencias acumuladas de las dos primeras posiciones de cercanía al cromosoma "Y". En todos ellos se aplicó la fórmula:

$$\chi^2 = \sum \frac{(f \text{ obs} - f \text{ esp})^2}{f \text{ esp}} \quad \text{donde}$$

f obs = frecuencia observada

f esp = frecuencia esperada

El valor de  $\chi^2$  se compara con el valor de  $\chi^2_{\text{crítico}}$  con los grados de libertad correspondiente a cada caso.



## PRUEBA T DE STUDENT PARA MUESTRAS INDEPENDIENTES

Esta prueba se utiliza para comparar promedios.

La fórmula aplicada es:

$$t_v = \frac{(\bar{x}_A - \bar{x}_B) - (\mu_A - \mu_B)}{S_C \sqrt{\frac{1}{n_A} + \frac{1}{n_B}}} \quad \text{donde}$$

$\bar{x}_A$  = promedio de A

$\bar{x}_B$  = promedio de B

$S_C$  = desviación standard combinada

$n_A$  = tamaño de muestra A

$n_B$  = tamaño de muestra B

$v$  = grados de libertad

dado por

$$v = n_A + n_B - 2$$

$$\text{si } \sigma^2_A = \sigma^2_B$$

$$\text{si } \sigma^2_A \neq \sigma^2_B$$

Calculando  $S_C$  como sigue:

$$s_c = \sqrt{\frac{(n_A - 1) S_A^2 + (n_B - 1) S_B^2}{n_A + n_B - 2}}$$

$S_A$  = desviación standard de A

$S_B$  = desviación standard de B

$n_A$  = tamaño de muestra A

$n_B$  = tamaño de muestra B

El valor de  $t_{\text{calculado}}$  se comparó con el valor de  $t_{\text{crítico}}$  con los grados de libertad correspondientes a cada caso.

#### INDICE DE CORRELACION

Se utilizó el coeficiente de correlación dado por la fórmula:

$$r = \frac{n \sum x_i y_i - \sum x_i \sum y_i}{\sqrt{[n \sum x_i^2 - (\sum x_i)^2] [n \sum y_i^2 - (\sum y_i)^2]}}$$

donde

r = coeficiente de correlación  
Σ = sumatoria  
x = variable x  
y = variable y  
n = número de pares de observaciones

Para determinar si el valor de r es estadísticamente significativo, se aplicó la prueba t de Student con n-2 grados de libertad que docima la hipótesis nula que es la ausencia de correlación. La fórmula aplicada es

$$t = \frac{r \sqrt{n-2}}{\sqrt{1-r^2}} \quad \text{donde}$$

r = coeficiente de correlación  
n = número de pares de observaciones