

The Biologist (Lima), 2023, vol. 21 (1), 59-65.



The Biologist (Lima)



ORIGINAL ARTICLE / ARTÍCULO ORIGINAL

COMPARISON OF TWO STAINING METHODS FOR THE DETECTION OF NUCLEOLAR ORGANIZING REGIONS (NOR) OF ACROCENTRIC CHROMOSOMES

COMPARACIÓN DE DOS MÉTODOS DE TINCIÓN PARA LA DETECCIÓN DE REGIONES ORGANIZADORAS NUCLEOLARES (NOR) DE CROMOSOMAS ACROCÉNTRICOS

Berioska Rosas-Cartolin^{1*} & Ismenia Gamboa-Oré²

¹ Universidad Nacional Federico Villarreal (UNFV), Lima, Perú.

² Instituto Nacional Materno Perinatal (INMP), Lima, Perú.

* Corresponding author: berioska.biologia@gmail.com

Berioska Rosas-Cartolin: <https://orcid.org/0000-0003-2284-0994>

Ismenia Gamboa-Oré: <https://orcid.org/0000-0002-1664-8843>

ABSTRACT

This study aimed to compare two staining methods for detecting nucleolar organizing regions (NOR) of acrocentric chromosomes in the Cytogenetics Laboratory of INMP (“Instituto Nacional Materno Perinatal”), Lima, Peru. A total of 60 metaphases with normal karyotypes were analyzed, of which 30 were stained for each method: Kodama *et al.* and Howell & Black, respectively. The recognition efficiency and staining intensity of these regions were evaluated by each technique based on the count of NORs Ag (+); Likewise, the staining and integrity of the chromosomes were evaluated and the differences between these two methods were established. No significant differences were found regarding the number of stained regions with both techniques; however, in staining intensity and chromosomal quality, the Howell & Black method was superior. It is concluded that the Howell & Black method generates better results for the cytogenetic analysis of these regions.

Keywords: cytogenetics – heteromorphisms – NOR - satellites

ABSTRACT

El objetivo de este estudio fue comparar dos métodos de tinción para la detección de regiones organizadoras nucleolares (NOR) de los cromosomas acrocéntricos en el Laboratorio de Citogenética del INMP (Instituto Nacional Materno

Este artículo es publicado por la revista *The Biologist (Lima)* de la Facultad de Ciencias Naturales y Matemática, Universidad Nacional Federico Villarreal, Lima, Perú. Este es un artículo de acceso abierto, distribuido bajo los términos de la licencia Creative Commons Atribución 4.0 Internacional (CC BY 4.0) [<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.es>] que permite el uso, distribución y reproducción en cualquier medio, siempre que la obra original sea debidamente citada de su fuente original.

DOI: <https://doi.org/10.24039/rb20232111533>

Perinatal), Lima, Perú. Se analizó un total de 60 metafases con cariotipos normales, de las cuales 30 fueron teñidas para cada método: Kodama *et al.* y Howell & Black, respectivamente. Se evaluó la eficacia de reconocimiento e intensidad de tinción de estas regiones por cada método en función a la contabilización de NORs Ag (+); asimismo se evaluó la tinción e integridad de los cromosomas y se estableció las diferencias entre estos dos métodos. No se encontraron diferencias significativas en cuanto al número de regiones teñidas con ambos métodos; sin embargo, en la intensidad de tinción y calidad cromosómica el método de Howell & Black fue superior. Se concluye que el método de Howell & Black genera mejores resultados para el análisis citogenético de estas regiones.

Palabras claves: citogenética – heteromorfismos – NOR – satélites

INTRODUCCIÓN

Una parte importante del origen de problemas de fertilidad y abortos espontáneos recurrentes en parejas están relacionadas con la presencia de variantes heteromórficas halladas en los cromosomas observados en varias investigaciones (Madon *et al.*, 2005; De La Fuente *et al.*, 2009; Akbaş *et al.*, 2012; Cheng *et al.*, 2017; Dai *et al.*, 2018).

Las variantes heteromórficas se relacionan a diferencias en el tamaño de segmentos cromosómicos; por ejemplo, el incremento o disminución de la longitud del satélite en el brazo corto o en la longitud del tallo del brazo corto en los cromosomas acrocéntricos; asimismo, se han relacionado una mayor frecuencia de casos de satélites muy grandes en hombres infértiles y adultos con fallas reproductivas (Madon *et al.*, 2005; De La Fuente *et al.*, 2009; Akbaş *et al.*, 2012; Cheng *et al.*, 2017; Dai *et al.*, 2018; McGowan-Jordan *et al.*, 2020).

Estos heteromorfismos citogenéticos son detectados comúnmente con la técnica de tinción estándar (bandas G); sin embargo, en muchos estudios publicados se recomienda la utilización de técnicas de tinción diferenciales como bandas C, NOR, etc. (Madon *et al.*, 2005; De la Fuente *et al.*, 2009; Radhakrishnan *et al.*, 2010; Akbaş *et al.*, 2012; Dong *et al.*, 2013; Surech *et al.*, 2016; Zhu *et al.*, 2019).

La técnica de tinción NOR (regiones organizadoras nucleolares) permite la detección de estas variantes mediante la visualización de manchas oscuras debido a que estas regiones están localizadas en los tallos y satélites de los cromosomas acrocéntricos, además, de que se utiliza nitrato de plata, la cual tiene alta afinidad por los genes ribosómicos para la síntesis de ARN ribosomal presentes en estas regiones (Hernando, 2005). Esta técnica

presenta varios protocolos, pero hay dos en particular que se utilizaron para cromosomas humanos y tienen una metodología manejable, las cuales son de Kodama *et al.* (1980) y Howell & Black (1980). La diferencia entre estas dos radica en que la segunda utiliza un protector coloidal.

En el Perú no se han registrado estudios acerca de la implementación y aplicación de esta técnica para la detección de estos satélites en pacientes, además en el Laboratorio de Citogenética del INMP (“Instituto Nacional Materno Perinatal”), no se aplica esta metodología.

El objetivo del presente estudio fue comparar dos métodos de tinción para la detección de NOR de cromosomas acrocéntricos en el Laboratorio de Citogenética – INMP, Lima, Perú.

MATERIAL Y MÉTODOS

El estudio se realizó en 60 células metafásicas provenientes de cultivos de linfocitos de sangre periférica provenientes de pacientes derivados al Laboratorio de Citogenética del INMP durante el período de setiembre y octubre del 2019 con cariotipo normal. Fueron distribuidas 30 para cada método de tinción. En cuando a la tinción NOR, se describe en forma resumida la preparación de los diferentes métodos y sus respectivas modificaciones:

Método de Kodama *et al.* (1976)

Se colocaron ocho gotas de Nitrato de Plata al 50% sobre la lámina que contenía el preparado cromosómico. Luego, se incubó en cámara húmeda y oscura en estufa por tres h a 60°C para posteriormente lavar enérgicamente con agua destilada y dejar secar a temperatura ambiente.

Método de Howell & Black (1980)

Se colocaron gotas separadas de la solución de gelatina al 2% más ácido fórmico sobre la lámina que contenía el preparado cromosómico. Luego, se añadió sobre cada gota de la solución mencionada, dos gotas de Nitrato de Plata al 50% para luego homogenizar la mezcla suavemente con dos cubreobjetos colocándolos sobre una placa Petri e incubando en Baño María a 60°C por cinco min, chequeando hasta conseguir una coloración dorado café. Se lavó la lámina con agua destilada enérgicamente hasta retirar los cubreobjetos y se dejó secar a temperatura ambiente.

Para cada método, posteriormente, se coloreo las láminas con el protocolo de tinción GTG (Giemsa-Tripsina-Giemsa) del Laboratorio de Citogenética del INMP.

Para evaluar la presencia de los NORs, se evaluaron las metafases al azar, leyendo la lámina de cada muestra en zig-zag. Cada metafase se identificó a un aumento de 20X y posteriormente se evaluó solo a los cromosomas acrocéntricos a 100X utilizando los criterios de Sotelo (1982): para el conteo de los NORs se tomó en cuenta sólo la presencia o ausencia a la reacción a la plata, sin importar la forma del depósito sobre la región de los organizadores nucleolares. Si la positividad a la plata existió en al menos una metafase, se tomó como metafase Ag (+), contando cada cromosoma acrocéntrico como

unidad. El número mínimo de NORs Ag (+) por metafase sería de uno, y el máximo posible de 10.

Se utilizó la prueba de T student en el programa estadístico R (versión 3.6.0, año 2019) , con el objetivo de realizar comparación de medias y establecer si hay diferencias significativas en los resultados de los dos métodos aplicados.

Aspectos éticos: Esta investigación no requirió de consentimientos informados debido a que no se utilizó datos personales que comprometan la confidencialidad del paciente (ejemplo: nombres, dirección, teléfono, etc), asimismo no generó ningún riesgo debido a que solo se limitó a analizar las metafases con la tinción implicada.

RESULTADOS

Se analizaron un total de 60 metafases; 30 obtenidas con el método de coloración de Kodama *et al.* y 30 con el de Howell & Black. Considerando que el ser humano tiene cinco pares de cromosomas acrocéntricos asociados a NOR, se visualizaron en total 600 cromosomas acrocéntricos entre ambas coloraciones. El análisis estadístico no mostró diferencias significativas entre ambas coloraciones respecto al número de NORs coloreados (p=0,29) (Tabla 1).

Tabla 1. Total de NORs (regiones organizadoras nucleolares) teñidos en los cromosomas acrocéntricos por los dos métodos de comparación (Kodama *et al.* y Black & Howell).

Kodama <i>et al.</i>				Black & Howell			
NORs Ag (+)	%	NORs Ag (-)	%	NORs Ag (+)	%	NORs Ag (-)	%
214	36	86	14	227	38	73	12

Nota: 600 cromosomas acrocéntricos equivalen al 100%

La Figura 1 muestra dos placas metafásicas del mismo paciente, una de ellas coloreada con tinción NOR mediante el método de Howell & Black seguida de tinción GTG convencional para análisis citogenético, mientras que la segunda placa solo contiene la tinción NOR. En la Figura 2 se observan también dos placas metafásicas, una coloreada con tinción NOR mediante el método de Kodama *et al.* seguida de tinción GTG convencional para análisis citogenético, mientras que la segunda placa solo contiene la tinción NOR. En ambos casos, se pueden

visualizar las regiones organizadoras nucleolares mediante sedimentos de color oscuro señaladas con flechas.

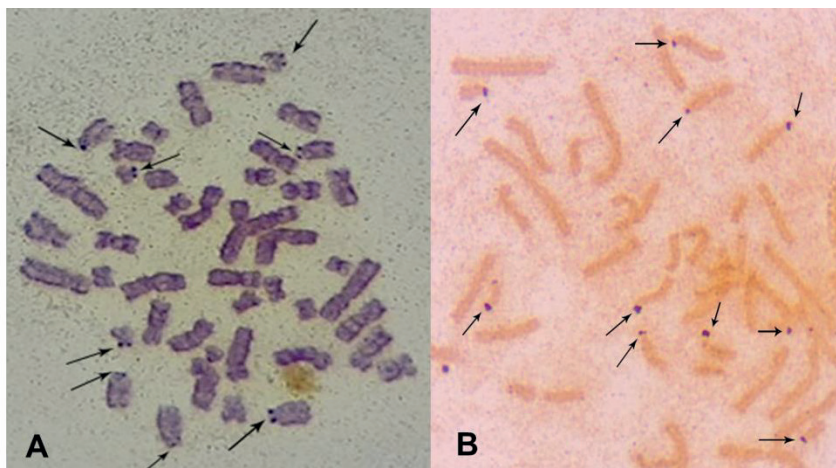


Figura 1. Cromosomas humanos teñidos por el método de Howell & Black. A: tinción NOR más tinción GTG y (B) sólo tinción NOR. Las flechas muestran las regiones organizadoras nucleolares (NOR) teñidas de plata. Aumento de 100X.

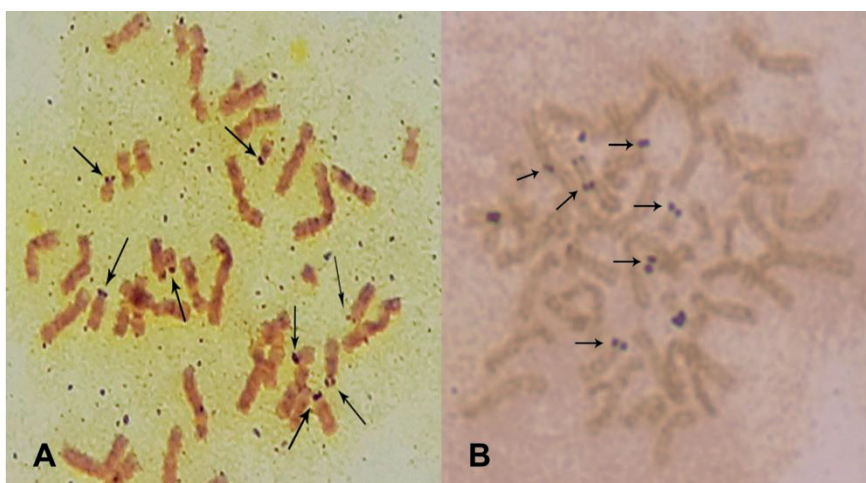


Figura 2. Cromosomas humanos teñidos por el método de Kodama *et al.* A: tinción NOR más tinción GTG y (B) sólo tinción NOR. Las flechas muestran las regiones organizadoras nucleolares (NOR) teñidas de plata. Aumento de 100X.

Los cromosomas acrocéntricos pueden ser considerados como grandes (pertenecientes al grupo D según el índice de proporcionalidad centromérica) y pequeños (pertenecientes al grupo G). En el grupo D se encuentran tres pares de cromosomas acrocéntricos y en el grupo G hay dos pares, lo que permite calcular que en el presente trabajo se visualizaron un total de 360 cromosomas del grupo D y 240 del grupo G. La Tabla 2 muestra los resultados del análisis de coloración NOR según los métodos de Kodama *et al.* y de Black & Howell para los cromosomas del grupo D y la Tabla 3 muestra los

resultados de coloración para los cromosomas del grupo G, observándose en ambos casos que los valores positivos y negativos para ambos métodos fueron similares ($p = 0,30$ a $0,59$).

Tabla 2. Total de NORs (regiones organizadoras nucleolares) teñidos en los cromosomas acrocéntricos del grupo D por los dos métodos de comparación (Kodama *et al.* y Black & Howell).

Kodama <i>et al.</i>		Black & Howell	
NORs Ag (+)	%	NORs Ag (-)	%
130	36,1	50	13,9

Nota: 360 cromosomas acrocéntricos equivalen al 100%.

Tabla 3. Total de NORs (regiones organizadoras nucleolares) teñidos en los cromosomas acrocéntricos del grupo G por los dos métodos de comparación (Kodama *et al.* y Black & Howell).

Kodama <i>et al.</i>		Black & Howell	
NORs Ag (+)	%	NORs Ag (-)	%
84	35	36	15

Nota: 240 cromosomas acrocéntricos equivalen al 100%

La tabla 4 menciona las diferencias encontradas entre ambos métodos de coloración, mostrando que, finalmente, el método de Howell & Black genera mejores

resultados en el aspecto de intensidad de tinción y calidad morfológica.

Tabla 4. Diferencias entre los dos métodos utilizados en el presente estudio.

Características	Kodama <i>et al.</i>	Howell & Black
Tiempo	Mayor	Menor
Calidad cromosómica	Menor	Mayor
Intensidad	Adecuado	Adecuado y se puede observar más NORs teñidos
Detección de NORs	Mayores posibilidades de mala detección (manchas inespecíficas)	Menores posibilidades de mala detección (menores manchas inespecíficas)
Eficacia con el bandeo GTG	Menor	Mayor
Equipo especial	No necesita	No necesita
Experiencia	No se requiere	No se requiere
Económico	Sí	Sí

DISCUSIÓN

Es de consideración importante realizar una adecuada estandarización de técnicas de tinción para el diagnóstico citogenético, mas aún cuando tienen que estar acordes con las condiciones del laboratorio. Con los dos métodos

empleados no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en cuanto al porcentaje de coloración positiva y negativa. No obstante, se pueden discutir ciertos aspectos importantes en un protocolo de tinción. El primero de estos es la intensidad de color de los NORs. Con ambos métodos se observó una adecuada intensidad

de tinción, pero en el método de Kodama *et al.* se visualizó una mayor cantidad de manchas inespecíficas alrededor y dentro de los cromosomas.

Factores como la temperatura, tiempo de coloración y fijadores empleados son los que principalmente afectan la estabilidad e intensidad de la impregnación de plata (Derenzini & Trere, 1991). Se ha reportado que cuanto mayor es la temperatura, menor es el tiempo requerido para una visualización selectiva de los NORs (Derenzini & Trere, 1991) y que un mayor tiempo de exposición genera depósitos de plata de tamaño grande y que se expanden en todo el núcleo (Derenzini *et al.*, 1992). Ello explicaría la razón de la mayor cantidad de manchas observadas en el método de Kodama *et al.* debido a que se emplearon tres horas de tinción. Por otra parte, en el protocolo original de Kodama *et al.* se empleó una tela de nylon como cubreobjetos lo cual favoreció una impregnación más uniforme y visible en toda la lámina, evitando así la reacción de tinción intensificada en la heterocromatina centromérica que puede dificultar la identificación correcta de los NORs.

Con respecto a la calidad morfológica de los cromosomas, se obtiene una menor distorsión del cuerpo cromosómico y una adecuada tinción GTG de los cromosomas con el método de Howell & Black frente al de Kodama *et al.* Por tal motivo al utilizar un protector coloidal y un agente reductor como el ácido fórmico en el método de Howell & Black, se evita una mayor precipitación de la plata sobre el portaobjetos y se puede obtener una mejor impregnación del bandejo GTG, lo que contradice lo mencionado por Bloom & Goodpasture (1976) quienes usaron nitrato de plata sin coloide y obtuvieron resultados óptimos tanto en la tinción de NOR y GTG.

No se puede aseverar entre este trabajo un número constante de NORs dentro de cada individuo debido a que solo se estudió un número limitado de pacientes. Sin embargo, ya se tiene evidencia que los patrones de tinción NORs-Ag, tanto en tamaño como distribución, son variables de un individuo a otro, pero que dentro de cada persona son característicos y constantes (Varley, 1977; van Sluis *et al.*, 2019).

Si bien en el Perú existen estudios citogenéticos realizados a madres con antecedentes de abortos espontáneos recurrentes, actualmente no se cuenta con un estudio similar en parejas. Esto permite generar futuras investigaciones más detalladas sobre los heteromorfismos cromosómicos y demostrar si estas variaciones presentan una asociación frente a estos episodios abortivos en

nuestra población, lo cual reafirmaría el uso beneficioso de este tipo de tinción con un menor costo de inversión.

Con ambos métodos se obtienen resultados similares, pero con el método Howell y Black se obtiene un mejor reconocimiento de las regiones NOR con mayor integridad y tinción de los cromosomas, además de requerir menor tiempo de revelación, aspecto muy importante en el área de citogenética.

Author contributions

BRC = Berioska Rosas Cartolin

IGO = Ismenia Gamboa Oré

Conceptualization: BCR, IGO

Data curation: BCR, IGO

Formal Analysis: BCR

Funding acquisition: IGO

Investigation: BCR

Methodology: BCR

Project administration: BCR, IGO

Resources: IGO

Software: BCR

Supervision: BCR, IGO

Validation: IGO

Visualization: BCR

Writing – original draft: BCR

Writing – review & editing: BCR, IGO

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Akbaş, H., İsi, H., Oral, D., Türkyılmaz, A., Kalkanlı-Taş, S., & Şimşek, S. (2012). Heteromorphisms are more frequent in couples with recurrent abortion. *Genetics and Molecular Research, 11*, 3847-3851.
- Bloom, S., & Goodpasture, C. (1976). An Improved Technique for Selective Silver Staining of Nuclear Organizer Regions in Human Chromosomes. *Human Genetics, 34*, 199-206.
- Cheng, R., Ma, Y., Nie, Y., Qiao, X., Yang, Z., Zeng, R., & Xu, L. (2017). Chromosomal polymorphisms are associated with female infertility and adverse reproductive outcomes after infertility treatment: a 7-year retrospective study. *Reproductive biomedicine online, 35*, 72-80.

- Dai, R., Pan, Y., Fu, Y., Liu, Q., Han, W., & Liu, R. (2018). Role of male genetic factors in recurrent pregnancy loss in Northeast China. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, 224, 6-11.
- De la Fuente, B., Cerda, R., Dávila, M., García, C., De la Rosa, R., & Cortés, E. (2009). Chromosomal abnormalities and polymorphic variants in couples with repeated miscarriage in Mexico. *Reproductive BioMedicine Online*, 18, 543-548.
- Derenzini, M., Farabegoli, F., & Trere, D. (1992). Relationship between interphase AgNOR distribution and nucleolar size in cancer cells. *Histochemical Journal*, 24, 951-956.
- Derenzini, M., & Trere, D. (1991). Importance of interphase nucleolar organizer regions in tumour pathology. *Virchows Archiv B*, 61, 1-8.
- Dong, Y., Jiang, Y., Du, R., Zhang, H., Li, L., & Liu, R. (2013). Impact of chromosomal heteromorphisms on reproductive failure and analysis of 38 heteromorphic pedigrees in Northeast China. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 2, 275-281.
- Hernando, D.C. (2005). *Caracterización de anomalías cromosómicas en diagnóstico prenatal y postnatal mediante técnicas de citogenética molecular (Tesis de Doctorado)*. Universidad Autónoma de Barcelona, España.
- Howell, W., & Black, D. (1980). Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. *Experientia*, 36, 1014-1015.
- Kodama, Y., Yoshida, M., & Sasaki, M. (1980). An improved silver staining technique for nucleolus organizer regions by using nylon cloth. *The Japanese Journal of Human Genetics*, 25, 229-233.
- McGowan-Jordan, J., Hastings, R., & Moore, S. (2020). *Sistema Internacional de Nomenclatura Citogénica Humana*, ed.
- Madon, P., Athalye, A., & Par, F. (2005). Polymorphic variants on chromosomes probably play a significant role in infertility. *Reproductive BioMedicine Online*, 11, 726-732.
- Radhakrishnan, Y., Chandra, N., & Gopinath, P. (2010). Satellite Associations in Down Syndrome. *International Journal of Human Genetics*, 10, 101-104.
- Sotelo, J. (1982). *Los Organizadores Nucleolares (NOR's) en cromosomas metafásicos humanos, y su posible relación con los mecanismos de envejecimiento celular (Tesis de Maestría)*. Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey.
- Surech, V., Pramod, C., Seema, R., Sharan, S., Shankari, M., & Kumar, M. (2016). Karyotyping: Current perspectives in diagnosis of chromosomal disorders. *Sifa Medica Journal*, 3, 35-40.
- van Sluis, M., Gailín, M. Ó., McCarter, J. G., Mangan, H., Grob, A., & McStay, B. (2019). Human NORs, comprising rDNA arrays and functionally conserved distal elements, are located within dynamic chromosomal regions. *Genes & Development*, 33, 1688-1701.
- Varley, J.M. (1977). Patterns of silver staining of human chromosomes. *Chromosoma*, 61, 207-214.
- Zhu, J. J., Qi, H., Cai, L. R., Wen, X. H., Zeng, W., Tang, G. D., Tang, G.D., Luo, Y., Meng, R., Mao, X.Q., & Zhang, S. Q. (2019). C-banding and AgNOR-staining were still effective complementary methods to identify chromosomal heteromorphisms and some structural abnormalities in prenatal diagnosis. *Molecular Cytogenetics*, 12, 1-11.

Received December 13, 2022.
Accepted January 25, 2023.