

TEMA SEMINARIO

DETERMINACION CROMATINICA DE SEXO EN LA ESPECIE CANIS DOMESTICA

(Empleando la Técnica de Barr)

HERMINIA OLGA REYNOSO

INTRODUCCION

El presente trabajo tiene por objeto comprobar si en la especie *Canis doméstica* se puede realizar la diferenciación cromática del sexo, empleando la técnica de Barr, relacionándola con la que corresponde a la especie humana.

Fue realizado en el Instituto de Endocrinología de Salta, bajo la dirección y asesoramiento del Dr. Antonio Montesana, jefe de Trabajos Prácticos de la Facultad de Medicina de la U. N. T. y Jefe del Laboratorio Hormonal del citado Instituto. Deseo dejar expresa constancia de mi agradecimiento por su valiosa guía y colaboración que ha permitido cumplir mi cometido.

Agradezco también al Dr. Dardo Escalante, Jefe de Trabajos Prácticos de Anatomía Patológica, que con desinteresada cordialidad ha realizado las microfotografías adjuntas a este trabajo.

Mi reconocimiento al Dr. Arturo Oñativia, Director del Instituto, que ha puesto a mi disposición la bibliografía existente sobre el tema.

Y por último a todas las personas que de una u otra manera han colaborado con el mismo.

GENERALIDADES

Fue el histólogo Santiago Ramón y Cajal, el primero en describir un corpúsculo cromatínico adyacente a la membrana nuclear en su parte interna, en célula de origen ectodérmico; posteriormente, los trabajos de Barr y Bertran, Barr, Bertran y Lindsay, Moore y Barr en 1949 y 1953, relacionaron la presencia de este corpúsculo con la determinación del sexo, realizando biopsias de piel y raspado de mucosa bucal, creando un método práctico para la determinación cromatínica del sexo en la especie humana.

En 1954 Davidson y Smith describen en los leucocitos polinucleares de la sangre, de origen mesodérmico, una manifestación de la cromatina sexual que se presenta como un elemento individual que se proyecta fuera del núcleo en el citoplasma, pero unida siempre a la cromatina nuclear.

Los investigadores argentinos ETCHEVERRY y CAGNONI confirmaron en el año 1956 lo sostenido por Davidson y Smith, vinculando a esta formación cromatínica como una expresión de la presencia de los cromosomas sexuales XX determinantes del sexo femenino, encontrándose en raspado bucales en un porcentaje por arriba del 7% en el sexo femenino y en un porcentaje del 0 al 4% en el sexo masculino.

En el macho la fusión del cromosoma X con el pequeño cromosoma Y no daría una masa destacable sobre el resto de la cromatina, como sucede en la fusión de los cromosomas X X, de allí la diferencia destacable en el porcentaje anteriormente citado.

ETCHEVERRY y GRIGNASCHI en el año 1956 demostraron que lo anteriormente descrito no era privativo de la especie humana, sino que se extendía a otra especie de mamíferos, así se tiene citas de trabajos realizados por GRIGNASCHI en las hembras de diversas especies: monas, zorras, ratas, conejos, cobaya y llamas.

Careciendo de bibliografías específicas en especies animales, el presente trabajo tendrá como guía las bibliografías existentes sobre determinación cromatínica del sexo en la especie humana, y la finalidad del mismo será comprobar si las manifestaciones descritas en las mismas, se cumplen en la especie *Canis doméstica*, ob-

jeto de este trabajo y las analogías y diferencias con la misma encontradas.

Se ha trabajado con un lote de 50 ejemplares *Canis* doméstica, de sexo femenino y 50 ejemplares de sexo masculino, realizando por cada ejemplar dos frotis bucal y su posterior observación microscópica.

MATERIAL EMPLEADO Y SU TECNICA EN LA RECOLECCION DE LAS MUESTRAS

El frotis bucal fue realizado con una lanceta de metal de bordes romos, extrayendo el material de la mucosa bucal por medio de un suave raspado de la misma, tratando de no provocar lesión sino simplemente de realizar una excitación de la mucosa con el fin de obtener una descamación del epitelio.

Generalmente la primera extracción debe ser rechazada limpiando la lanceta con una gaza, a fin de evitar el exceso de secreciones salivales que dificultaría la visibilidad de la observación microscópica.

Una vez obtenido el material se lo extiende sobre un porta objeto tratando de realizar un extendido de poco espesor, para facilitar mediante esto, la distribución aislada de las células evitando la acumulación de las mismas, pues ello dificultaría la observación correcta del núcleo.

Inmediatamente se sumerge el preparado hasta cubrir totalmente el extendido en el líquido fijador de Davidson, dejándolo en el mismo por espacio de no menos una hora (se puede prolongar este tiempo hasta doce horas, sin que se note variante en la coloración).

Esta fijación húmeda es sumamente necesaria para la correcta observación de la cromatina sexual.

TECNICA EMPLEADA PARA LA COLORACION

Con respecto a la técnica, se ha seguido la de Barr empleando como colorante la Hematoxilina de Harris. A continuación se describe la misma:

Fijado el preparado en el líquido de Davidson se realiza dos pases sucesivos de alcoholes de 70° y 95° cada pase de dos minutos de duración.

Se lava bajo chorro de agua corriente y se procede a su coloración, sumergiéndose hasta cubrir bien el preparado en Hematoxilina de Harris durante cinco minutos, (colorante nuclear no electivo de la cromatina sexual, que tiñe por igual a la hetero cromatina como a la eucromatina).

Una vez cumplido este tiempo, se saca el preparado, se lava nuevamente con agua corriente con lo que se provoca el viraje del color rojizo que da la hematoxilina al violeta; se puede provocar mayor intensidad del viraje mediante una solución diluida de bicarbonato de sodio.

Una vez observado un correcto viraje, se lleva nuevamente al preparado por un pase de alcohol de 90° durante dos minutos.

Se lava el extendido con xilol y se procede a su montaje con bálsamo de Canadá para ser observado con lente de inmersión.

FORMULA DEL LIQUIDO FIJADOR DE DAVIDSON

| | |
|-----------------------------|-------|
| Alcohol 95° | 30 cc |
| Formol | 20 cc |
| Acido acético glacial | 10 cc |
| Agua | 30 cc |

FORMULA DE LA HEMATOXILINA DE HARRIS

| | | |
|-------------------------------------|------|----|
| A) Hematoxilina | 1 | gr |
| Alcohol 100° | 10 | cc |
| B) Alumbre de Potasio | 20 | gr |
| Agua destilada | 400 | cc |
| c) Oxido amarillo de mercurio | 0,50 | gr |

Observaciones Realizadas:

Como se dijo anteriormente, el colorante no es específico de la cromatina sexual, sino que tiñe por igual a la cromatina sexual que a la somática por lo tanto, la diferenciación de la primera sólo se realizará por los siguientes caracteres:

En lo referente a las características celulares lo más notorio es la falta de los típicos bordes irregulares de las células humanas, en el género estudiado estos son más regulares. Hay también una pequeña diferencia en su tamaño siendo en la especie *Canis doméstica* de menor tamaño y redondeadas.

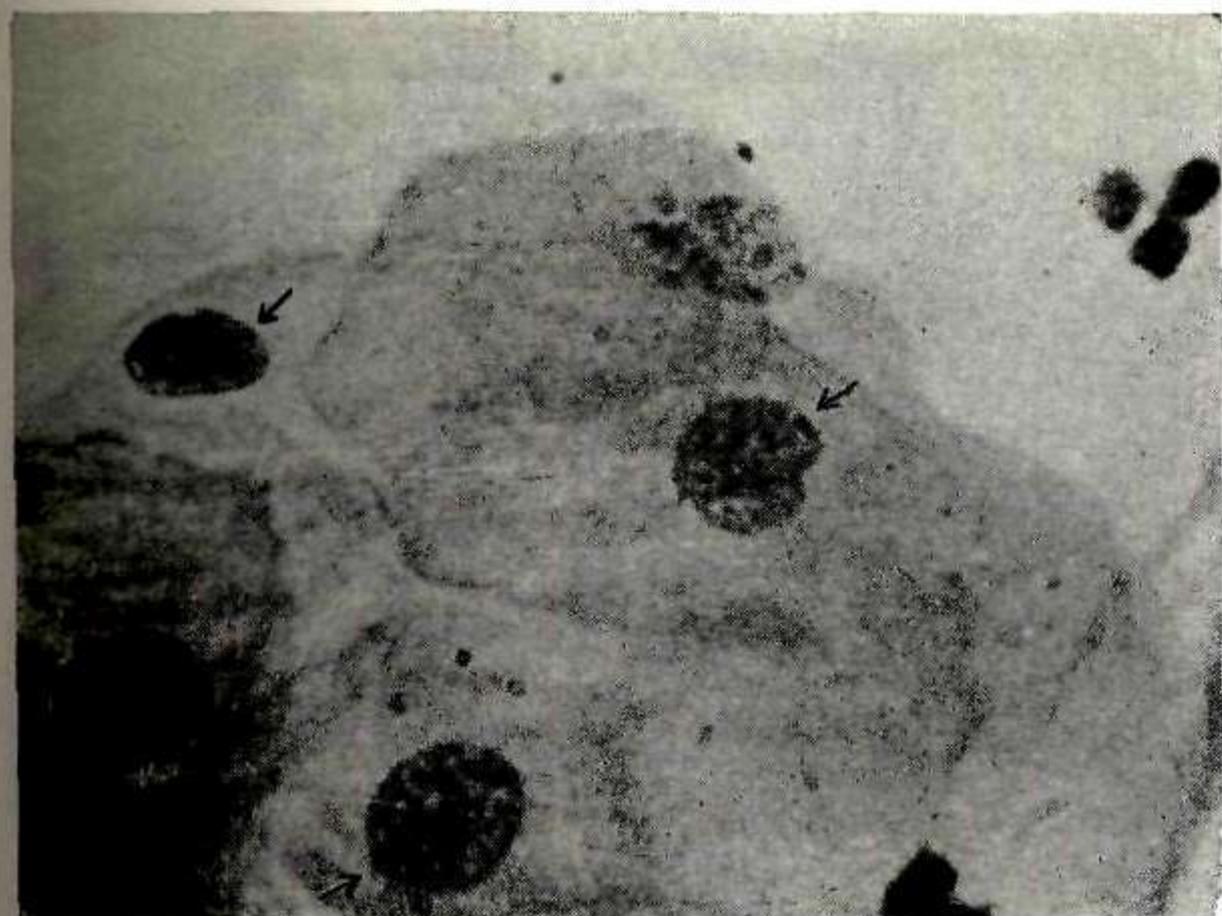
Para una cabal interpretación en los cuadros números 1 y 2 consta los casos estudiados teniendo en cuenta el porcentaje de acumulaciones en cada uno de ellos, la edad aproximada, sexo y raza.

CONCLUSIONES

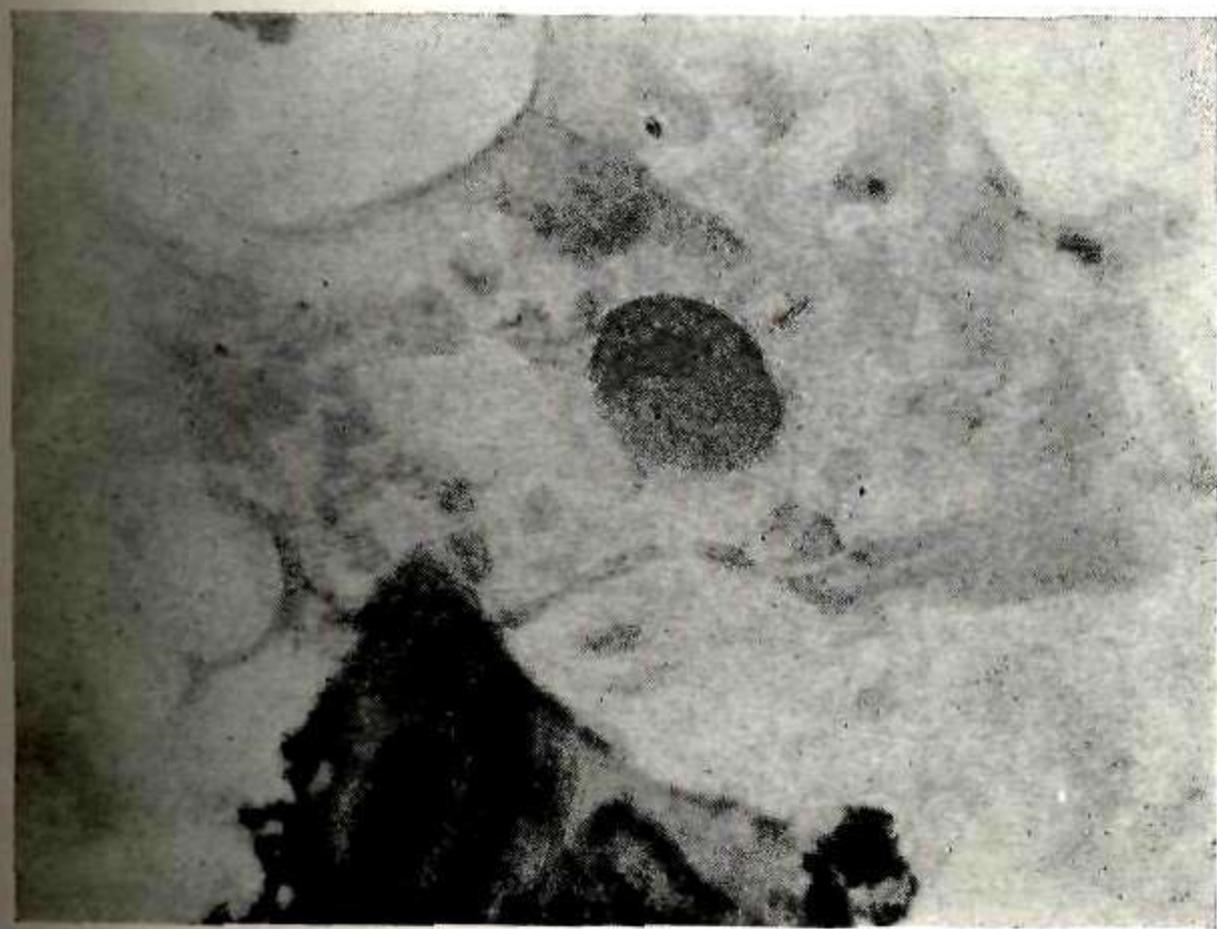
En la especie animal estudiada puede hacerse la diferenciación sexual genética empleando las mismas técnicas que para la especie humana, haciendo la salvedad que debe tenerse presente el sistema de acumulación cromatínica en la forma descripta.

Cuadro porcentaje de acumulaciones cromatínicas adosadas a la membrana nuclear. (Frotis bucal de hembras).

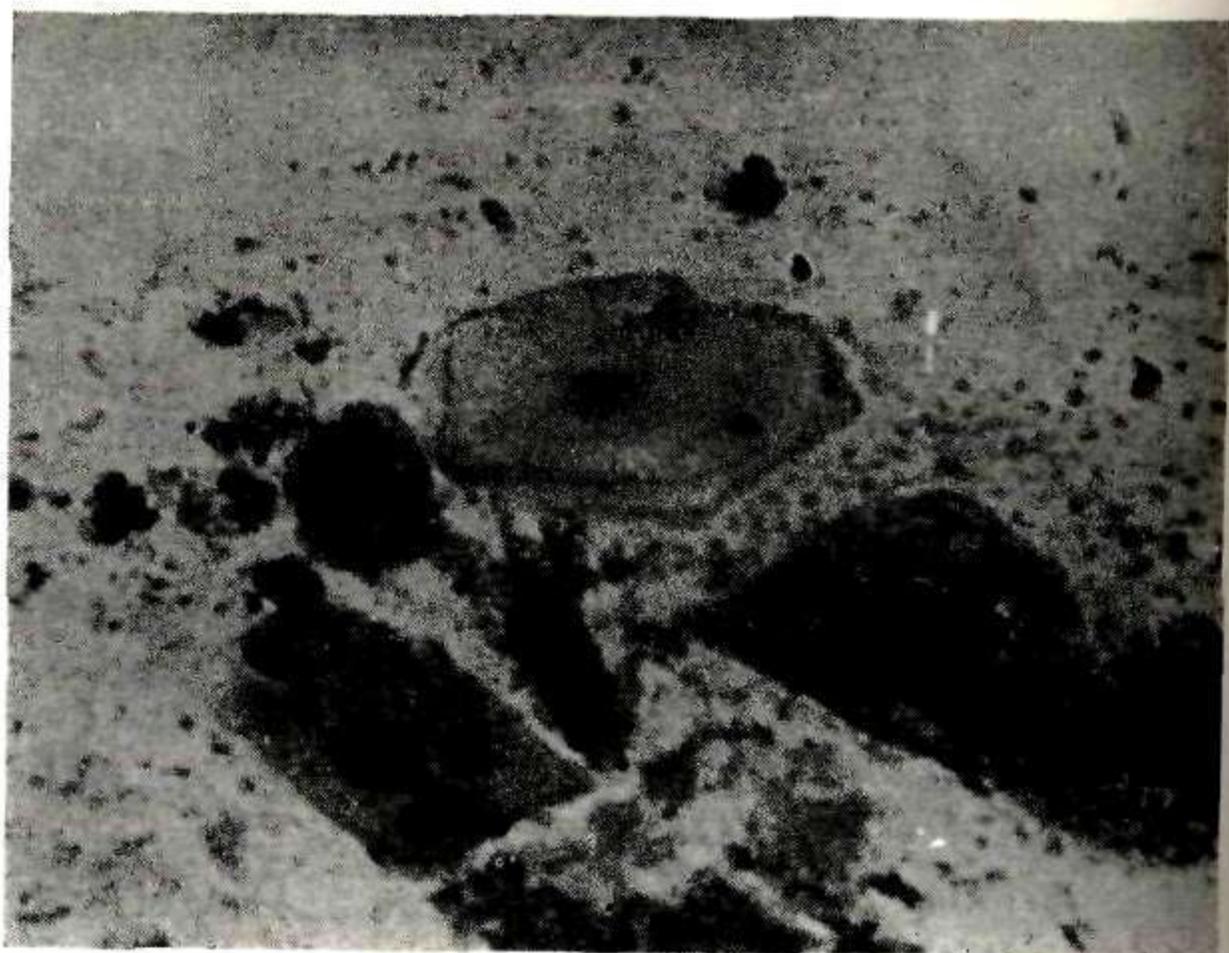
Cuadro porcentaje de acumulaciones cromatínicas adosadas a la membrana nuclear. (Frotis bucal de machos).



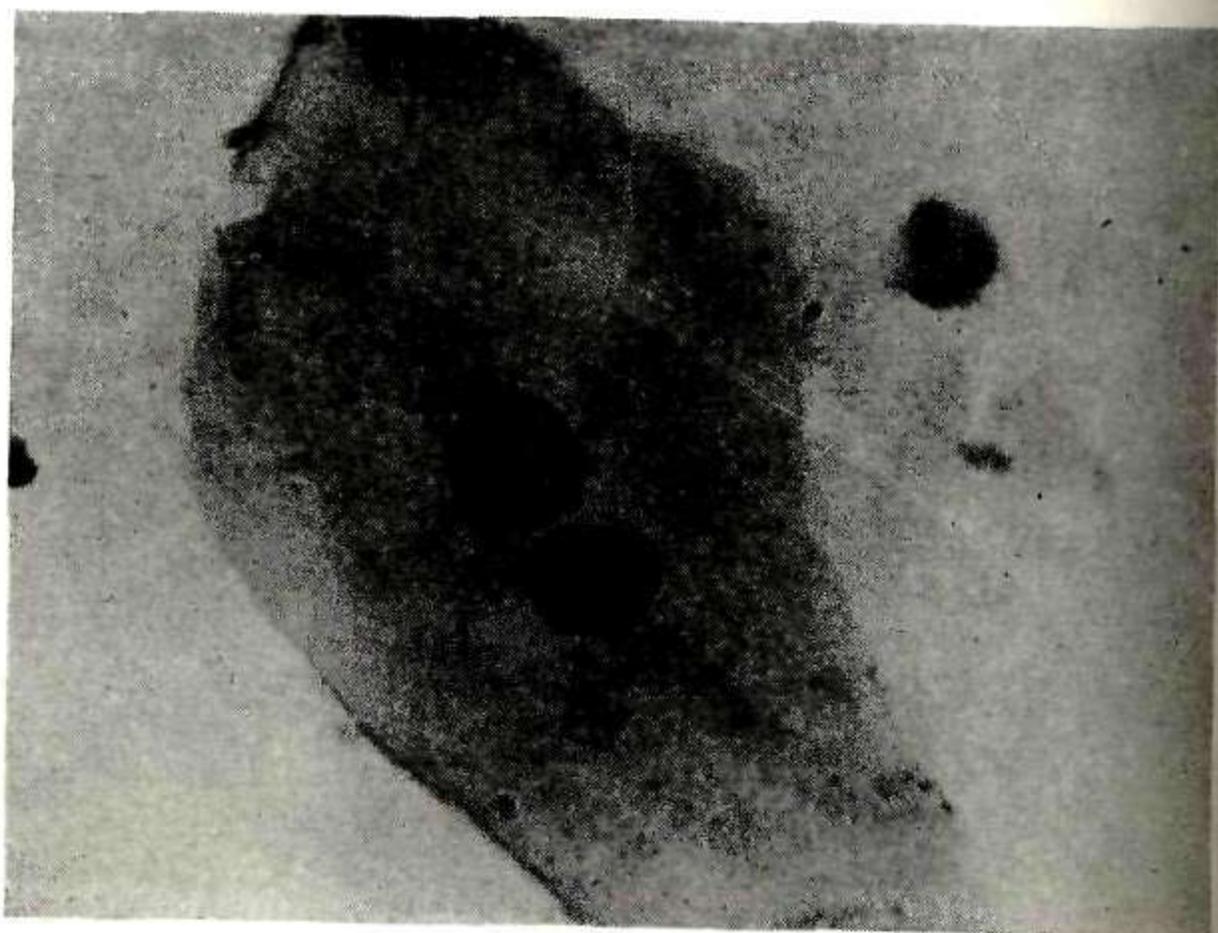
Células en las que se observan las acumulaciones cromatínicas adosadas a la membrana nuclear



Célula con la clásica acumulación cromatínica



- Células de un frotis bucal, especie *Canis doméstica* (macho)



Células de un frotis bucal, especie *Canis doméstica* (hembra)

CUADRO Nº 1

Cuadro porcentaje de acumulaciones cromatínicas adosadas a la membrana nuclear. (Frotis bucal de hembras)

| Nº orden | Nº de frotis | Edad | Raza | Porcentaje |
|----------|--------------|---------|-----------|------------|
| 1 | 1 | 1 año | mestizo | 20 % |
| 2 | 4 | 2 años | policía | 15 % |
| 3 | 6 | 5 " | mestizo | 10 % |
| 4 | 10 | 10 " | " | 20 % |
| 5 | 13 | 1 año | " | 10 % |
| 6 | 15 | 9 años | " | 15 % |
| 7 | 16 | 4 " | " | 23 % |
| 8 | 20 | 2 " | " | 20 % |
| 9 | 21 | 3 " | " | 14 % |
| 10 | 22 | 5 " | " | 13 % |
| 11 | 23 | 3 " | " | 10 % |
| 12 | 24 | 1 año | policía | 18 % |
| 13 | 25 | 2 años | ovejero | 15 % |
| 14 | 39 | 3 " | mestizo | 20 % |
| 15 | 41 | 1 año | pomerania | 22 % |
| 16 | 44 | 1 " | pila | 18 % |
| 17 | 45 | 3 años | mestizo | 15 % |
| 18 | 48 | 1 año | policía | 13 % |
| 19 | 51 | 2 años | mestizo | 22 % |
| 20 | 52 | 3 " | " | 15 % |
| 21 | 53 | 2 " | " | 20 % |
| 22 | 54 | 2 " | " | 11 % |
| 23 | 55 | 3 meses | " | 13 % |
| 24 | 56 | 2 años | " | 18 % |
| 25 | 57 | 3 " | " | 11 % |
| 26 | 58 | 2 " | " | 22 % |
| 27 | 62 | 3 meses | " | 14 % |
| 28 | 63 | 1 año | " | 15 % |
| 29 | 64 | 2 años | ovejero | 20 % |
| 30 | 65 | 5 meses | " | 13 % |
| 31 | 66 | 1 año | " | 15 % |
| 32 | 68 | 3 años | pomerania | 15 % |
| 33 | 69 | 2 " | mestizo | 18 % |
| 34 | 70 | 4 " | " | 12 % |
| 35 | 72 | 2 " | " | 16 % |
| 36 | 73 | 3 " | " | 18 % |
| 37 | 75 | 6 meses | ratonero | 15 % |
| 38 | 78 | 2 " | policía | 10 % |
| 39 | 79 | 10 años | mestizo | 20 % |
| 40 | 83 | 15 días | " | 12 % |
| 41 | 84 | 9 meses | " | 18 % |
| 42 | 88 | 1 año | " | 10 % |
| 43 | 91 | 6 meses | " | 11 % |
| 44 | 95 | 10 años | policía | 20 % |
| 45 | 96 | 3 " | mestizo | 11 % |
| 46 | 97 | 1 año | " | 11 % |
| 47 | 98 | 2 años | " | 20 % |
| 48 | 94 | 1 año | " | 18 % |
| 49 | 99 | 2 años | policía | 15 % |
| 50 | 100 | 1 año | " | 22 % |

CUADRO N° 11

Cuadro porcentaje de acumulaciones cromatínicas adosadas a la membrana nuclear. (Frotis bucal de machos)

| N° orden | N° de frotis | Edad | Raza | Porcentaje |
|----------|--------------|----------|-------------|------------|
| 1 | 2 | 3 meses | mestizo | 3 % |
| 2 | 3 | 6 " | ovejero | 1 % |
| 3 | 5 | 1 mes | pomerania | 1 % |
| 4 | 7 | 1 " | mestizo | 2 % |
| 5 | 8 | 2 años | " | 4 % |
| 6 | 9 | 3 " | " | 3 % |
| 7 | 11 | 10 " | policía | 2 % |
| 8 | 12 | 3 " | mestizo | 2 % |
| 9 | 14 | 1 " | " | 4 % |
| 10 | 17 | 3 " | " | 3 % |
| 11 | 18 | 4 " | policía | 2 % |
| 12 | 19 | 1 año | mestizo | 0 % |
| 13 | 26 | 2 años | ovejero | 1 % |
| 14 | 27 | 2 " | mestizo | 2 % |
| 15 | 28 | 4 " | pomerania | 4 % |
| 16 | 29 | 10 " | mestizo | 4 % |
| 17 | 30 | 3 meses | " | 2 % |
| 18 | 31 | 3 años | " | 1 % |
| 19 | 32 | 5 " | " | 3 % |
| 20 | 33 | 1 año | " | 4 % |
| 21 | 34 | 3 meses | " | 1 % |
| 22 | 35 | 1 año | " | 2 % |
| 23 | 36 | 3 meses | " | 3 % |
| 24 | 37 | 1 año | " | 0 % |
| 25 | 38 | 2 años | " | 2 % |
| 26 | 40 | 10 meses | " | 2 % |
| 27 | 42 | 7 " | " | 1 % |
| 28 | 43 | 7 " | " | 3 % |
| 29 | 46 | 3 años | " | 3 % |
| 30 | 47 | 3 " | " | 1 % |
| 31 | 49 | 2 " | " | 3 % |
| 32 | 50 | 7 " | " | 2 % |
| 33 | 59 | 6 " | " | 1 % |
| 34 | 60 | 5 " | " | 1 % |
| 35 | 61 | 10 " | policía | 2 % |
| 36 | 67 | 7 " | fox-terrier | 0 % |
| 37 | 71 | 11 " | mestizo | 1 % |
| 38 | 74 | 5 " | " | 1 % |
| 39 | 76 | 1 año | " | 2 % |
| 40 | 77 | 1 " | " | 1 % |
| 41 | 80 | 6 meses | ovejero | 2 % |
| 42 | 81 | 1 año | mestizo | 3 % |
| 43 | 82 | 1 mes | " | 1 % |
| 44 | 85 | 4 años | bull-dog | 0 % |
| 45 | 86 | 4 " | mestizo | 2 % |
| 46 | 87 | 10 " | " | 4 % |
| 47 | 89 | 3 " | policía | 0 % |
| 48 | 90 | 1 año | " | 1 % |
| 49 | 92 | 2 años | mestizo | 1 % |
| 50 | 93 | 2 " | ovejero | 3 % |

BIBLIOGRAFIA

- GRIGNASCHI, V. J., SPERPERATO, A., CONFORTI, O. y SCHWARZ, H., Diagnóstico citológico del sexo por observación de la cromatina. Rev. de la Asociación Médica Argentina. Vol. LXXIV, N° 9, pág. 529, 9/60.
- ETCHEVERRY, M. A. y WAIS, S., Cromatina sexual de los neutrófilos sanguíneos y estados intersexuales. Rev. de la Asociación Médica Argentina. Vol. LXXI, N° 10-10/57.
- WARREN O. NELSON, Diferencias sexuales en los núcleos humanos, especialmente en el "Síndrome de Klinefelter", Agencia gonadal y otros tipos de Hermafroditismo. Rev. Argentina de Endocrinología y Metabolismo. Vol II, N° 4, pág. 329, 12/56.
- ETCHEVERRY, M. A., CAGNONI, A. y WAIS, S., Diferencia sexual morfológica en el núcleo. Rev. Argentina de Endocrinología y Metabolismo. Pág. 370, 12/56.
- Estudios genéticos en el Síndrome de Klinefelter. Rev. Clínica Española. Pág. 270, 28/2/59.
- MAKINO SAJIRO, SUSUMU OHNO, The single X nature of sex chromatin in man. The Lancet. N° 7168, 14/61.