

CROMOSOMAS EN *Bos taurus* REVELADOS POR TRATAMIENTO CON SOLUCIONES HIPOTÓNICAS PREVIO A LA FIJACIÓN *

J. POSTIGLIONI GRIMALDI **

Departamento de Citogenética del Instituto de Investigación de Ciencias Biológicas e Instituto de Anatomía de la Facultad de Veterinaria. Montevideo, Uruguay.

EXTRACTO

Con el fin de estudiar los cromosomas en testículos de toro y su comportamiento en la meiosis, fue utilizado un tratamiento de fijación con soluciones hipotónicas. Después de la fijación se procedió al aplastado del material y luego se trató con la reacción nuclear de Feulgen. Cuando se hizo necesario, se practicó una coloración adicional con hematoxilina férrica. Las soluciones Tyrode hipotónicas de 10 % a 20 % normal se prepararon de acuerdo a A. Hughes (1952); el tiempo de pretratamiento fue de 15 a 30 minutos; la fijación fue hecha en alcohol-acético (3/1) y las técnicas de aplastado y de Feulgen fueron usadas de acuerdo a la descripción 5 de Darlington y La Cour (1947). Los detalles morfológicos fueron bien conservados, pudiéndose obtener fácilmente fotomicrografías de los cromosomas bien esparcidos.

Los investigadores en estas disciplinas conocen bien las dificultades que se presentan para el estudio de los cromosomas de mamíferos cuando se utilizan técnicas clásicas, particularmente cuando se trata de animales con elevado número de cromosomas. Anteriormente al año 1952, cierto número de autores estudiaron los cromosomas en testículos de toro, utilizando material fijado y seccionado que luego tiñeron con colorantes de anilina.

Krallinger (1931) y Makino (1944) obtuvieron muy buenos resultados, particularmente el último, quien utilizó como fijadores el Cham-

* Traducido del original en inglés publicado en *Stain Technology*, vol. 31, Nº 4, julio 1956, pp. 173-178.

** Médico Veterinario, Director del Instituto de Anatomía de la Facultad de Veterinaria y Jefe de Servicio de Fomento Ganadero de la Dirección de Ganadería. Montevideo, Uruguay.

py y el Flemming sin ácido acético, y coloreó con hematoxilina férrica. Makino y Nishimura (1952) emplean la combinación de pretratamiento con agua, fijación acética y tinción con fucsina en 32 especies de invertebrados y 16 especies de vertebrados. Entre los 7 mamíferos que figuran en la lista de especies estudiadas, dichos autores mencionan a *Bos taurus* pero no mencionan los resultados de esa técnica en esa especie animal.

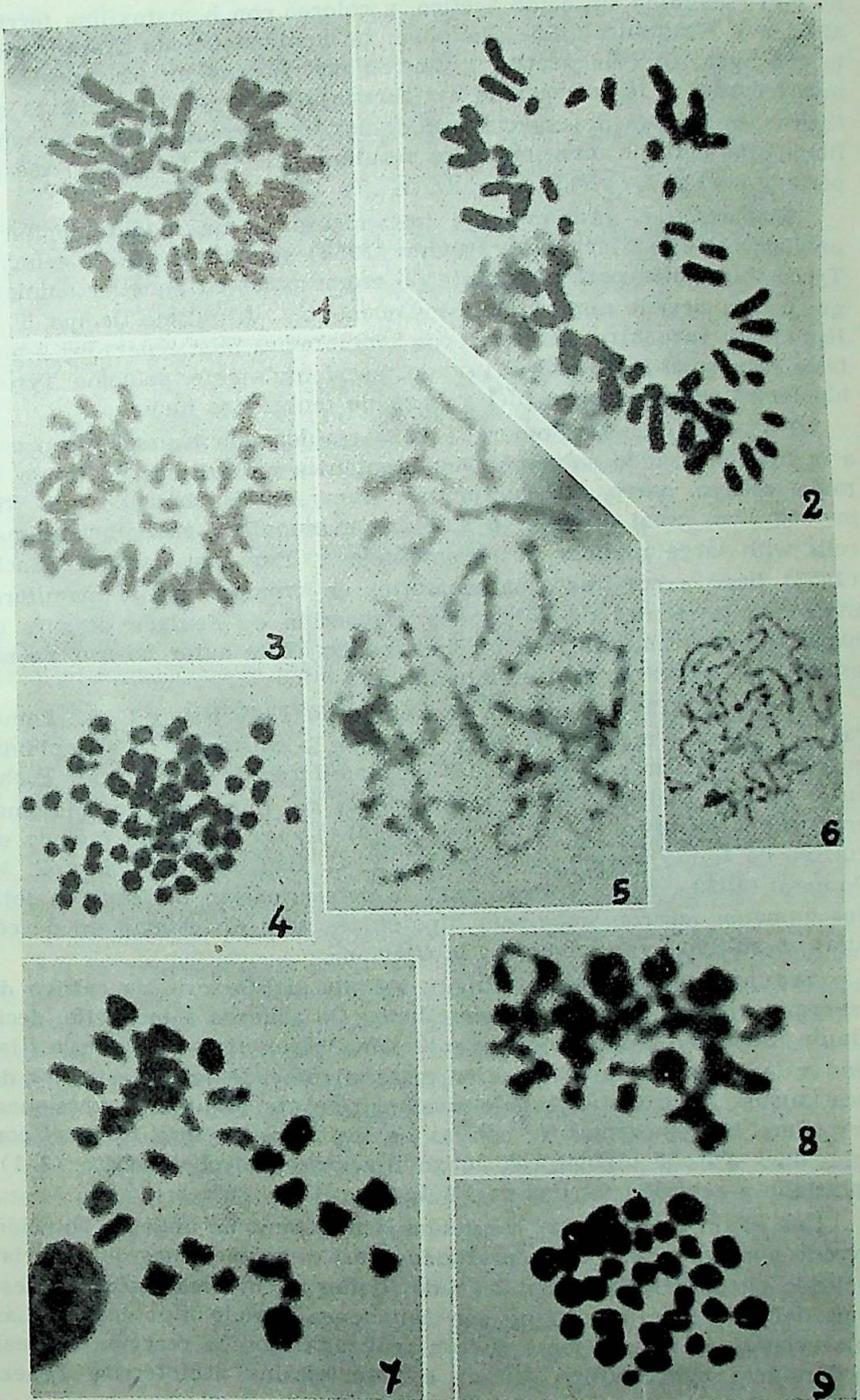
Empleando el principio del tratamiento en un medio hipotónico previamente a la fijación, A. Hughes (1952) sugiere el uso de solución Tyrode hipotónica para el conteo de cromosomas en aquellos animales que poseen elevado número de estos elementos. Al mismo tiempo, T. C. Hsu (1952) encuentra metafases con cromosomas bien separados y anafases semejantes a mitosis-C usando, accidentalmente, solución Tyrode hipotónica en cultivos de piel y bazo de embriones humanos.

T. C. Hsu y C. M. Pomerat (1953) emplean un tratamiento previo a la fijación usando solución Gey hipotónica en cultivos de tejido de ratón, cobayo, perro, etc., y tumores humanos, concluyendo que "the method gives great promise in studying mammalian, and other animal, cells with large number of chromosomes". Por otra parte, L. Sachs (1953) llegó a resultados satisfactorios en cromosomas de mamíferos utilizando la técnica de aplastados y reacción de Feulgen después de haber fijado el material con alcohol-acético. Este autor no usó, en ese estudio, la técnica de pretratamiento.

T. C. Hsu (1953 a) emplea el método de T. C. Hsu y C. M. Pomerat, mencionado más arriba, para verificar la existencia de aneuploidía en células somáticas de embriones de mamíferos de laboratorio. Dicho autor estudió también (1953 b) variaciones del número de cromosomas en cultivos de tejido y, últimamente (1954), usa el mismo método en cultivo de tejido neoplásico humano. T. C. Hsu, C. H. Hook y C. M. Pomerat (1953), en su trabajo para la determinación del sexo en tejidos humanos, usaron soluciones hipotónicas para el tratamiento de células en cultivos, previamente a la fijación.

Según mi conocimiento, ningún método satisfactorio de cultivo de espermatoцитos ha sido aún desarrollado. De acuerdo a todo ello, decidimos aplicar el tratamiento con soluciones hipotónicas antes de la fijación y la técnica de aplastados en material procedente de testículos de *Bos taurus*. El presente trabajo, acompañado por algunas ilustraciones, se refiere a cromosomas de células de testículos de toro tratadas con soluciones Tyrode hipotónicas, luego fijación en alcohol-acético (3/1), aplastado y reacción nuclear de Feulgen.

Con el fin de comparar resultados hemos también aplicado solución Tyrode normal y agua como prefijación, así como secciones de material incluido en parafina que habían sido fijados en diversas mezclas, después del pretratamiento o no con soluciones Tyrode hipotónicas. Las coloraciones de las secciones fueron realizadas con la reacción nuclear de Feulgen, hematoxilina férrica o hematoxilina acetoférrica (Sáez,



PLANCHA 1.

LEYENDA DE LA PLANCHA 1.

PLANCHA 1.—Fotomicrografías de cromosomas del ganado doméstico *Bos taurus*. Todas las preparaciones, excepto la mostrada en la figura 2, fueron obtenidas con la secuencia: solución Tyrode hipotónica; alcohol-acético (3/1); reacción nuclear de Feulgen y aplastado. La preparación de la figura 2 fue tratada con solución de NaCl hipotónica pero fue fijada y teñida de la misma manera que las otras y finalmente se coloreó con hematoxilina férrica.

Fig. 1.—Metafase espermatogonial. 2700 x.

Fig. 2.—Metafase espermatogonial. 2700 x.

Fig. 3.—Metafase espermatogonial. En el área interior de la placa ecuatorial se encuentran, presumiblemente, los cromosomas XY. 2700 x.

Fig. 4.—Espermatogonia B (de acuerdo a Knudsen, 1954) en metafase. 2700 x.

Fig. 5.—Cromosomas paquiténicos. En el centro, presumiblemente, el bivalente XY. 2700 x.

Fig. 6.—Cromosomas en profase. 1200 x.

Fig. 7.—Metafase de espermatocito primario. 2700 x.

Fig. 8.—Metafase de espermatocito primario. El elemento con forma de ? es, presumiblemente, el bivalente XY. 2700 x.

Fig. 9.—Metafase de espermatocito primario. Éste muestra los cromosomas casi esféricos y fuertemente contraídos. 2700 x.

1955). En ciertos casos, es decir, cuando la reacción nuclear de Feulgen resultó demasiado débil, nosotros la hemos hecho seguir de una tinción con hematoxilina férrica o hematoxilina acetoférrica.

MATERIAL Y MÉTODOS

1) *Material testicular*.—La mayoría de los testículos (77 testículos) fueron obtenidos en el Frigorífico Nacional de Montevideo, de toros de raza Hereford (de aproximadamente entre 8 meses y 6 años de edad). Los testículos fueron extraídos inmediatamente después del atontamiento y antes de la sangría del animal. Además, 3 testículos se obtuvieron por castración de 3 terneros (de 8, 9 y 18 meses de edad) en el Laboratorio de Biología Animal "Dr. Miguel C. Rubino" (Pando, Uruguay).

2) *Tratamiento previo a la fijación*.—Iniciamos nuestros estudios utilizando solución Ringer hipotónica y solución de NaCl hipotónicas, con excelentes resultados. Sin embargo, como no tuviéramos aún suficiente experiencia en los efectos de esas soluciones hipotónicas sobre las células y cromosomas, preferimos usar soluciones Tyrode hipotónica cuyos efectos sobre células en división fueron bien estudiados por Hughes (1952). En estos momentos estamos experimentando con soluciones de NaCl hipotónicas, con el fin de comparar resultados.

Las soluciones Tyrode hipotónicas fueron preparadas con solución Tyrode normal y solución Tyrode sin NaCl, de acuerdo a Hughes. Se emplearon soluciones Tyrode hipotónicas de 10, 15 y 20 % de la concentración normal. El pretratamiento se inició inmediatamente de extraído el material, cuyo espesor fue de 1 a 2 mm. El tiempo de pretratamiento fue de 10 a 30 minutos. La temperatura fue de 15 a 16° C.; en algunos casos, de 37° C.

3) *Fijación*.—La mayoría de las piezas pretratadas o no, fueron fijadas en la mezcla alcohol absoluto, tres partes, más ácido acético glacial, una parte, durante 5 a 60 minutos y luego lavado en agua durante doce a veinticuatro horas. Las demás piezas se fijaron en mezclas de Bouin-Allen, Zenker-Helly, Champy o La Cour, durante seis a veinticuatro horas, según la mezcla usada. Todas las piezas sirvieron para realizar aplastados y secciones en parafina o fueron conservadas en alcohol a 70 %.

4) *Hidrólisis*.—La hidrólisis fue realizada en ácido clorhídrico N/1. En cada caso particular, la temperatura de hidrólisis fue de 60° C., la cual fue controlada colocando el baño conteniendo el ácido en termóstato. El ácido clorhídrico N/1 fue colocado en recipiente de vidrio y herméticamente tapado; luego se le llevó al termóstato regulado a 60° C., y cuando la temperatura del ácido fue también de 60° C. sumergimos en él el material a estudiar. El tiempo de hidrólisis fue de 12 minutos.

5) *Reactivo de Schiff*.—El reactivo de Schiff fue preparado del modo corriente. Nosotros usamos fucsina básica de Grübler, Leipzig, 2.36, o de G. T. Gurr Ltd., London, 04485, y $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ de Baker. La solución de fucsina básica en agua destilada fue filtrada a través de papel de filtro pero no se usaron sustancias decolorantes.

6) *Reacción nucleal de Feulgen*.—El material hidrolizado fue tratado por el reactivo de Schiff de acuerdo a la técnica para aplastados consignada por Darlington y La Cour (1947) y las preparaciones fueron montadas en aceite de cedro. Las reacciones nucleales de Feulgen en secciones de materiales incluidos en parafina se realizaron de acuerdo a L. Lison (1953).

Cuando el material fue conservado durante largo tiempo (cuatro o más semanas) en alcohol a 70 %, la reacción resultó muy débil, a pesar de haberse variado el tiempo de hidrólisis de 12 a 10, 8 y 6 minutos. En estos casos, obtuvimos excelentes resultados coloreando con hematoxilina férrica o hematoxilina acetoférrica (Sáez) subsiguientes a la reacción nucleal de Feulgen. En la literatura nosotros encontramos que J. Schreiber (1954) había obtenido muy buenos resultados con el acetocarmín después de la reacción nucleal de Feulgen en cromosomas somáticos de salmón. No hemos encontrado otros datos concernientes a la coloración de cromosomas con colorantes de anilina u otros después de reacción nucleal de Feulgen. Nosotros consideramos la utilización de estas técnicas como altamente importantes, particularmente cuando la intensidad de la reacción de Feulgen es insuficiente.

VENTAJAS DE LA PRESENTE TÉCNICA

1) La separación de los cromosomas es producida primeramente por la hidratación de la célula en un medio hipotónico. La técnica de aplastado completa la separación de los cromosomas.

2) La hidrólisis para la reacción de Feulgen hace menos dificultosa la separación de las células en la manipulación del aplastado.

3) Es sabido que la reacción nucleal de Feulgen permite la detección del ácido desoxirribonucleico.

4) Cuando sea necesario, es posible teñir con acetocarmín (Schreiberg, 1954) o con hematoxilina férrica o hematoxilina acetoférrica, como se ha mencionado más arriba.

5) La presente técnica permite estudiar con relativa facilidad los cromosomas del toro en cuanto a número, morfología, estructura y comportamiento. Esta técnica puede, sin duda, ser aplicada también a otras especies de vertebrados que posean elevado número de cromosomas.

ADDENDUM

Mientras estábamos redactando el presente trabajo, tuvimos oportunidad de leer los trabajos de Y. Melander y O. Knudsen (1953) y O. Knudsen (1954). Estos autores han estudiado la espermiogénesis del toro en materiales fijados con alcohol acético (3/1) seguido de aplastado y secciones en parafina, los cuales fueron teñidos con hematoxilina de Gomori (de acuerdo a Y. Melander y K. G. Wingstrand, 1953). Los resultados obtenidos por estos autores fueron excelentes, y nosotros estamos ahora trabajando de acuerdo a dicha técnica para comparar sus resultados con los nuestros.

AGRADECIMIENTO

Yo deseo expresar mi gratitud al Prof. F. A. Sáez, Jefe del Departamento de Citogenética en el Instituto de Investigación de Ciencias Biológicas, por su inteligente guía científica en el presente trabajo.

REFERENCIAS

- DARLINGTON, C. D. and LA COUR, L. F. (1947).— *The handling of chromosomes*. G. Allen and Unwin Ltd., London.
- HSU, T. C. (1952).— Mammalian chromosomes "in vitro". I. The karyotype of man. *J. Hered.*, 43, 167-72.
- (1953a).— Mammalian chromosomes "in vitro". III. On somatic aneuploidy. *J. Morph.*, 93, 301-30.

- HISU, T. C. (1953b).—Variation on chromosome number in tissue culture. *Abs. Anat. Rec.*, 115, 325.
- (1954).—Mammalian chromosomes "in vitro". IV. Some human neoplasms. *J. Nat. Cancer Inst.*, 14, 905-34.
- and POMERAT, C. M. (1953).—Mammalian chromosomes "in vitro". II. A method for spreading the chromosomes of cells in tissue cultures. *J. Hered.*, 44, 23-9.
-; HOOKS, C. A. and POMERAT, C. M. (1953).—Opportunities for determining sex in human tissues. *Texas Rep. Biol. and Med.*, 11, 585-7.
- HUGHES, A. (1952).—Some effects of abnormal tonicity in dividing cells in chick tissue cultures. *Quart. J. Micr. Sci.*, 93, 207-19.
- KNUDSEN, O. (1954).—Cytomorphological investigations into the spermiogenesis of bulls with normal fertility and bulls with acquired disturbances in spermiogenesis. *Acta Path. et Microbiol. Scand. Suppl. CI*, p. 79. E. Munksgaard, Copenhagen.
- KRALLINGER, H. F. (1931).—Cytologische studien an einigen Haussäugertieren. *Arch. Tierernähr. Tierzucht, Abt. B*, 5.
- LISON, L. (1953).—*Histochimie et Citochimie Animales. Principes et Methodes.* Gauthiers-Villards, Paris.
- MAKINO, S. (1944).—Chromosome studies in domestic mammals. IV Karyotypes of domestic cattle. Zebu and domestic water-buffalo. *Cytologia*, 13, 247-64.
- and NISHIMURA Y. (1952).—Water-pretreatment squash technic. A new and simple practical method for the chromosome study of animals. *Stain Tech.*, 27, 1-7.
- MELANDER, Y. and KNUDSEN, O. (1933).—The spermatogenesis of the bull from a karyological point of view. *Hereditas*, 39, 505-17.
- and WINGSTRAND, K. G. (1953).—Gomori's hematoxylin as a chromosome stain. *Stain Tech.*, 28, 217-23.
- SACH, L. (1953).—Simple method for mammalian chromosomes. *Stain Tech.*, 28, 169-72.
- SAEZ, F. A. (1955).—Unpublished.
- SCHREIBER, J. (1954).—Staining plant and animal chromosomes by the Feulgen-aceto carmine sequence. *Stain Tech.*, 29, 285-91.