

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS MEDICAS
República de Guatemala, Centro América.



**DETERMINACION DE LA
CROMATINA SEXUAL EN EL
DIAGNOSTICO DEL INTER-SEXO**

TESIS:

**PRESENTADA A LA JUNTA DIRECTIVA
DE LA
FACULTAD DE CIENCIAS MEDICAS
DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS
DE GUATEMALA**

POR

**OSCAR ADOLFO BARRIENTOS V.
EN EL ACTO DE INVESTIDURA DE
MEDICO Y CIRUJANO**



Guatemala, Noviembre de 1962.

PLAN DE TESIS:

- I) Introducción.
- II) Características del Sexo, de acuerdo a los Atributos Primarios y Secundarios.
- III) Cromosomas y su Participación en la Herencia.
- IV) Características del Sexo, de acuerdo con los Cariotipos.
- V) Aplicación del Cromosoma Sexual en el Estudio del Inter-sexo.
- VI) Técnicas.
- VII) Material:
 - A: Estudio Citológico.
 - B: Casos.
- VIII) Conclusiones.

INTRODUCCION:

Cada día que pasa, el hombre en su afán de encontrar el por qué de una serie de sucesos y fenómenos, que se suceden a diario, va haciendo nuevos e interesantes descubrimientos de hechos que se tenían como definitivamente comprobados.

Muchos son los adelantos logrados últimamente en la herencia, cada uno motivo para ser estudiado y analizado con el fin de hacerlos realidad en el campo de la práctica. Muchas han sido las personas que han hecho realidad por medio de trabajos prácticos efectuados en nuestro medio y adaptados a nuestro ambiente, temas estudiados en otros países, habiendo sacado nuevas e interesantes conclusiones, que ya en la vida práctica han redundado en beneficio de la colectividad.

Tocome a mí en esta oportunidad, hacer un breve estudio sobre la Cromatina Sexual y su relación con el Inter-sexo.

La Cromatina Sexual, estudiada y llevada a la práctica por Moore y Barr desde sus publicaciones en 1953, ha constituido un adelanto en el estudio del sexo y sus anomalías. No pretendo en este trabajo descubrir nada nuevo, sino vertir los conceptos y estudios, hechos por científicos de otros países y hacer una comparación con lo que nosotros hemos podido efectuar en nuestro medio con los Doctores Alberto Viau y Julio Roberto Herrera, quienes desde un principio se interesaron en el tema, proporcionándome los mejores datos recabados por ellos y las distintas Técnicas a emplearse de las coloraciones que pudimos practicar. Elegimos para el trabajo la Fuchsina Carbólica o Fénica por encontrarla apropiada y haber obtenido buenos resultados con ella.

Antes de entrar en materia sobre los casos estudiados de Cromatina Nuclear, haremos un pequeño resumen en este trabajo de las características sexuales de los distintos cariotipos, así como de los trabajos realizados en coloraciones en células de frotos bucales.

Es nuestro primordial propósito interesar en nuestro medio el estudio de este capítulo, que creemos ayudará mucho a resolver casos de Patología relacionada con la genética.

II. CARACTERISTICAS DEL SEXO DE ACUERDO CON LOS ATRIBUTOS PRIMARIOS Y SECUNDARIOS

Para distinguir los caracteres morfológicos primarios y se-

cundarios, que hacen la diferenciación del sexo, creo oportuno hacer un pequeño esbozo de la embriología de dichos órganos.

En la primera semana de la vida de un embrión, los órganos genitales se encuentran no diferenciados y por decirlo así en una fase neutral, es decir sin sexo determinado.

Es en el pliegue urogenital donde se originarán los primeros indicios del sexo, representados por los conductos de Müller y los conductos de Wolff, cada uno de estos serán según su desarrollo posterior, los cuales se encargarán de dar forma y esencia a los distintos caracteres y atributos del sexo (1).

Los conductos de Müller para la mujer, serán los que formarán la sexualidad femenina y los de Wolff para el hombre serán los que le dotarán de los atributos masculinos. El desarrollo de cada uno de estos implica la atrofia y preponderancia del otro, con lo cual queda determinado el sexo que el individuo tendrá en el futuro (1).

Si el embrión debe ser del sexo masculino, el conducto de Wolff continúa desarrollándose formando el canal deferente y el epidídimo. Los conductos de Müller se atrofian y en el hombre al final quedan representados únicamente por el hidátide de Morgagni en el testículo y en la próstata el utrículo prostático (1).

Por el contrario, si el sexo por desarrollarse es el femenino, se atrofian los conductos de Wolff y se desarrollan los de Müller. El tercio superior de estos constituyen las trompas y los dos tercios inferiores constituyen el útero y los dos tercios superiores de la vagina (1).

Los conductos de Wolff se atrofian en la mujer, constituyendo estructuras vestigiales que se conocen con el nombre de para-ovarios u órganos de Rosen Müller y a la altura del útero los conductos llamados de Gardner (1).

Los genitales externos tienen un origen distinto. Ellos vienen de la capa endodérmica en la cloaca que constituye originalmente la parte terminal del intestino del embrión. Este termina en una membrana llamada cloacal, lugar a donde llegan a desembocar los conductos de Wolff y de Müller (1). En esta cloaca el lugar donde se originan los genitales externos: Órgano Viril o Pene y Escreto para el hombre, así como en el sexo opuesto sin órgano viril, la envoltura se constituye en la parte externa del receptáculo que más tarde constituirá la vulva y

tercio inferior de la vagina.

Esta cloaca que en un principio es única, es dividida por una membrana en dos partes, constituyendo una superior o seno urogenital y otra posterior que constituye el recto (1).

De este seno urogenital se originan el tercio inferior de la vagina y la vulva, recordando que los dos tercios superiores vienen de los conductos de Müller (1).

Por delante del seno urogenital hay un tubérculo que será quien originará el clitoris en la mujer y el pene en el hombre.

A los lados se encuentran los pliegues y eminencias genitales, cada uno de los cuales originará, respectivamente los labios menores y labios mayores en la mujer, dando origen la abertura al introito vaginal y la membrana cloacal al himen (1).

En el hombre el tubérculo genital da origen al pene, los pliegues genitales serán los bulbos cavernosos que envuelven la uretra, las eminencias genitales, el escroto y la abertura del seno urogenital dará la uretra penéana (1).

La próstata en el hombre se origina del seno urogenital, siendo su homóloga en la mujer las glándulas de Skene (1).

Las glándulas bulbo cavernosos o de Kuffer en el hombre, se originan también en el seno urogenital, estando representadas por las glándulas de Bartolin en el sexo opuesto (1).

En esta forma quedan constituidos los órganos genitales en ambos sexos en el feto. Siendo estos los órganos genitales externos únicamente los que en la práctica diaria sirven para indicar el sexo que el recién nacido presenta.

Cualquier anomalía en el desarrollo de estas delicadas estructuras, dará origen a dimorfismos que todo médico debe saber afrontar para determinar un futuro seguro a un niño cuyo feliz desenvolvimiento dependerá de un diagnóstico preciso y exacto por parte de quien determina por primera vez el sexo que deberá llevar durante toda su vida.

Los caracteres sexuales externos se han dividido para su mejor comprensión en primarios y secundarios. En los caracteres sexuales primarios se incluyen la morfología de los órganos genitales. Los caracteres sexuales secundarios que en los animales de la escala zoológica tienen una morfología bien definida, por ejemplo: la melena en el león, los cuernos en el ciervo, tam-

bién se encuentran representados en el hombre, pero no siempre son tan determinantes del sexo como en el resto de la escala zoológica...

Así tenemos la distribución del bello pubiano en forma triangular de base superior en la mujer, mientras que de forma romboidal en el hombre, la distribución del panículo adiposo, el crecimiento de las mamas, la morfología de la pelvis, la dirección del cabello en la nuca, la ausencia de barba y bigote en la mujer y la presencia de los mismos en el sexo opuesto, diámetro biacromial. (El diámetro biacromial es una medida que determina características somáticas sexuales y que se obtiene por la fórmula siguiente: $3 \times \text{diámetro biacromial en cm.} - 1 \times \text{diámetro hiliaco en cm.}$) y así otras muchas características secundarias de menos importancia que únicamente ayudan a cimentar el carácter sexual del individuo.

Los estudios llevados en la actualidad han llegado a conclusiones que no debemos confiarnos únicamente en las estructuras morfológicas externas, porque tales estructuras morfológicas pueden presentar anomalías congénitas difíciles de fijar y determinar el sexo de una persona al nacer, pues como trataremos de explicar más adelante, el sexo cromático también forma parte vital de esta delicada estructura y en el pleno desarrollo del individuo, la elaboración de hormonas determinan múltiples características, tanto morfológicas como psicológicas, que constituyen lo que se considera definitivamente como "El Status Sexual".

Creemos que si a todo recién nacido que presente anomalías congénitas en su estructura genital se le practica el estudio de su cromatina sexual, se ha agenciado el médico de un medio diagnóstico, que le ayudará en forma más efectiva a fijarle su sexo a este nuevo ser. Hemos de recordar que un error del médico o encargado de determinar su denominación llevará para la persona o su familia, consecuencias de incalculable fatalidad; si este es erróneo y su nombre determinado en posición equivocada. Recordemos que este nuevo ser será parte activa de una comunidad que cabe reconocer, es ingrata para tratar en la vida adulta a estos individuos ambiguos a quienes la ciencia médica probablemente les pudo haber ofrecido un futuro mejor, si se les hubiera estudiado más detalladamente su estructura sexual y corrigiendo a tiempo errores más tarde irreparables.

III. CROMOSOMAS Y SU PARTICIPACION EN LA HERENCIA

El cromosoma, estructura microscópica compleja ocupa en la reproducción de las células un papel esencial y de las estructuras vitales para la perpetuidad de caracteres hereditarios de padres a hijos.

Creo que bien vale hacer una pequeña síntesis de la forma como los cromosomas aparecen en la célula, pues estas estructuras solamente pueden apreciarse en su forma más detallada y característica en ciertas fases en que su presencia determina una forma de reproducción celular.

La estructura nuclear de toda célula, comprende dentro de su membrana, una finísima red cromática dentro de la cual además del jugo nuclear y el nucleolo se encuentran los corpúsculos finos de cromatina. Son estos los que en las fases sucesivas darán origen a los ya citados cromosomas.

La cromatina parece representar o tener una gran influencia sobre los caracteres propios del protoplasma de cada organismo. Su comportamiento en el proceso de la división cariocinética hace que se le atribuya un importante papel en la transmisión de los caracteres hereditarios de cada especie biológica. Esto se ha comprobado de la forma como se observa la distribución de la cromatina en la división celular. La división cariocinética determina una distribución equitativa e invariable de la cromatina entre las dos nuevas células que se constituyen (2).

En el núcleo en reposo, la cromatina se encuentra irregularmente distribuida en forma de gránulos incorporados a la red de Linina. Al constituirse el filamento nuclear las granulaciones de cromatina se agrupan y organizan uniformemente en toda la longitud del filamento. Esta disposición hace que cuando el filamento nuclear se segmenta en cromosomas cada uno de estos contenga la misma cantidad de cromatina (2).

Los cromosomas no tienen por lo común una estructura homogénea; se observa en ellos numerosos gránulos de cromatina colocados según una serie única. Se da a estos gránulos el nombre de Cromiolas o Cromómeros (2).

Al final de la metafase, cada cromosoma se divide en dos cromosomas hijos, la división de los cromosomas se hace longitudinalmente, lo que hace más probable la distribución en par-

tes exactamente iguales de la cromatina en los dos cromosomas hijos (2).

Cada cromosoma o gránulo de cromatina se divide en dos, de manera que en cada cromosoma hijo, se halla la mitad de cada cromómero del cromosoma original (2).

Esta distribución equitativa de la cromatina, hace que las dos células hijas presenten los mismos caracteres morfológicos y funcionales, se observa en efecto que en las cariocinesis anormales en que la cromatina se distribuye desigualmente, las células que resultan presentan caracteres distintos (2).

Cada cromosoma, parece mantener su individualidad a través de cariocinesis sucesivas, es decir, que en el momento de constituirse el filamento cromático, al iniciarse la cariocinesis, cada cromíolo pasa a ocupar un lugar determinado, por cuya razón va a formar parte del mismo cromosoma y en este ocupa el mismo lugar (2).

El número de cromosomas en que se divide el filamento nuclear, es el mismo que en todas las células de todos los individuos de una misma especie (2).

Múltiples descubrimientos introducidos últimamente en el estudio de la herencia, permiten hoy investigar mejor la estructura interna de los cromosomas. Estos avances se han perfeccionado por el estudio de los cultivos de tejidos de células humanas obtenidos de la mucosa bucal, médula ósea, piel y sangre.

Los cromosomas constituyen el elemento más pequeño de la herencia, pero con el descubrimiento de nuevos métodos de análisis de estas estructuras, se ha llegado a determinar, que los cromosomas son elementos completos, constituidos por otras estructuras más pequeñas a las que se ha denominado "Genes" y que hasta hoy constituyen en la nueva ciencia denominada *Genética*, la partícula o elemento que lleva determinada misión, para perpetuar características morfológicas, enzimáticas, etc., de cada célula, la cual reproduce y perpetúa con los mismos caracteres de la célula de la cual se originaron los genes.

Técnicas nuevas han logrado obtener datos más exactos al respecto de los cromosomas, como ser el cultivo de células de mamíferos que permite al Citólogo mantener estas indefinidamente sin el inconveniente de la desorganización cromosómica producida por los métodos antiguos. Asimismo mediante la Colchicina se ha podido obtener la mitosis antes de producirse la formación fusiforme. Si el medio de cultivo se hace hipotónico

antes de la fijación, los cromosomas se dispersan y pueden ser identificados (6). Finalmente las nuevas preparaciones microscópicas permiten el poder observar los cromosomas íntegros sin mutilaciones.

Por medio de estas técnicas se ha comprobado que el número de cromosomas en las células humanas asciende a 46, 2 menos de lo que antes se creía. El número de cromosomas que presenta cada especie biológica, es lo que se denomina número normal de cromosomas y este parece ser siempre par (6).

IV. CARACTERISTICAS DEL SEXO DE ACUERDO CON LOS CARIOTIPOS

Fuera de las características hereditarias derivadas del conocimiento de las leyes de Mendel, que encontraron ciertas anomalías que eran transmitidas por la madre a los hijos varones y que ella misma no las sufría, determinó originalmente el estudio de la herencia ligada al sexo.

Posteriormente al determinarse por los estudios histobiológicos, la morfología de estos cromosomas que presentaban figura de X y Y, se estableció que para que existiera sexo masculino los dos cromosomas sexuales debían de ser idénticos en X y que cuando existía una Y ligada a una X aparecía el sexo masculino.

Para explicar las características hereditarias ligadas al sexo, se usó X y Y minúscula (letras minúsculas) que asociadas a las anteriores daban origen de acuerdo con las leyes de Mendel a las siguientes condiciones de herencia:

Macho dominante XY. Macho Recesivo xY.

Hembra dominante XX. Hembra hetrosignótica Xx.

Que al combinarse siguen exactamente las leyes enunciadas por Gregorio Mendel y que cuando dos heterosigotes se conjugan: xY Xx, da lugar al apareamiento de la herencia ligada al sexo por la condición de haberse ligado los mismos.

El mejor ejemplo de la herencia ligada al sexo, es el apareamiento de una anomalía de coagulación sanguínea, que es transmitida por los portadores femeninos a la mitad de sus hijos varones y a la mitad de sus hijas como portadoras. Todas las hijas de un varón hemofílico son portadoras pero los hijos varones son normales y no llevan el carácter recesivo.

En conclusión la herencia ligada al sexo se produce cuando el gene dominante se localiza en el cromosoma x pero no está presente en el cromosoma y.

El origen de estos símbolos X Y fueron el resultado de haber podido por medio de un cultivo, separar los diferentes cromosomas que se originaban al colorear la fase anaplásica de algunas células animales.

La aplicación de las nuevas técnicas del cultivo de tejidos al estudio de los cromosomas humanos ha abierto un campo completamente nuevo en las investigaciones genéticas.

En 1958, Tjio J. H. y Puck T., en el estudio sobre los caracteres somáticos de los caracteres de los mamíferos, idearon una nueva técnica del cultivo y coloración de los mismos, que unida a la técnica de Ford C. C. y Hamerton J. C., en su estudio sobre los cromosomas del hombre, determinaron su número que provisionalmente fue establecido 48, es decir, 24 pares y más tarde se determinó que el número correcto era 46, es decir, 23 parejas.

La identificación de los cromosomas según el trabajo de Tjio y Puck sigue un proceso que resumiremos a grandes rasgos:

1º De un cultivo celular y particularmente en la presente técnica de Tjio, de piel, se colorean convenientemente para estudiar los pares de cromosomas.

2º De una microfotografía de una célula obtenida por cultivo y coloreada se obtienen 46 cromosomas perfectamente individualizables, los cuales son medidos cuidadosamente y apareados con sus homólogos, formándose una serie que va del 0 al 22 y que constituyen las parejas somáticas.

El último par de cromosomas puede o no ser idénticos lo que determina el sexo masculino y femenino, representados por XX o XY.

3º El cuadro resultante se determina Hionograma, y su clasificación más acertada es la que corresponde al siguiente esquema:

- 1er. Grupo: 1 al 3
- 2do. Grupo: 4 al 12
- 3er. Grupo: 13 al 22
- 4to. Grupo: XX o XY

El par de cromosomas se determina de acuerdo con su tamaño, y la posición en que se entrecruzan sus brazos y que constituye el centrómero.

La comparación de los cromosomas de acuerdo con su morfología que dos cromosomas sexuales en el hombre, tienen estructura idéntica. El cromosoma X es tres veces más grande que el cromosoma Y, sin embargo fuera de lo que aparentemente se podría creer, no todos los individuos tienen un sexo definido, existiendo individuos en los cuales las características sexuales son ambiguas, por el hecho de que los cromosomas que lo determinan, se han aglutinado en otros elementos cromáticos o no se han podido desligar cuando aparece la división binaria o cariocinética.

Por lo tanto podemos establecer de acuerdo con estas variantes, las siguientes que se unen al cuadro que a continuación reproducimos, del trabajo publicado en el Boletín Médico, tomo 19 N° 1, de los Laboratorios de Investigación de la casa Lilly.

Proceso Clínico	Sexo Cromatínico	Cromosomas Sexuales	Número de Autosomas	Nº total de Cromosomas
Mujer Normal	+	XX	44	46
Super Mujer	+	XXX	44	47
Síndrome de Klinefelter	+	XXY	44	47
Síndrome de Turner	—	X	44	45
Hombre Normal	—	XY	44	46

En resumen, cada célula femenina posee dos cromosomas X que tienen un volumen aproximado de un 4% mayor que el volumen del cromosoma del hombre, por lo cual probablemente se confiere a la mujer mayor capacidad genética.

Fuera de la supermujer de la que se habla, se ha determinado en la genética de las bacterias que también existen supermachos, que son las encargadas de la reproducción sexual de estos organismos y que mantienen en equilibrio biológico, las características morfológicas invariables de cada especie.

V. APLICACION DEL CROMOSOMA SEXUAL EN EL ESTUDIO DEL INTER-SEXO

A través de los miles de años que el hombre lleva poblando el globo terrestre, siempre existió desde un principio la idea de separar por una línea bien definida, la izquierda, la derecha; lo malo y lo bueno; lo negro y lo blanco, surgiendo en pocas ocasiones la tercer posición que podríamos llamar neutral o ambigua.

Esta postura que en algunas ocasiones al sujeto que decide optarla le ha reportado beneficios, no es del todo vista con un criterio favorable, y si analizamos los dos lugares en los cuales deben colocarse y clasificarse los hechos seres y cosas, creo que bien vale contestar con aquel predicado bíblico que dice: "Más valor tiene lo frío y lo caliente que lo tibio" y en el fondo, más vale lo perdido sin declinar postura que el quedar en los dos bandos tratando de halagar a las dos partes.

Si pudiéramos analizar detalladamente desde los primeros vestigios hidiográficos de los dibujos respastes en los cuales el hombre trató de grabar sus primeras experiencias en la vida diaria, nos encontraríamos con alguna frecuencia con la aparición de seres, los cuales se hicieron notorios por no tener un sexo bien definido, haberlos colocado la naturaleza ligados a una línea que no les permitía definir su posición como hombres verdaderos o presentarse definitivamente en el femenino, pues siempre hubo alguna tara, que los ligó al sexo opuesto, tara que la sociedad trató siempre de hacer resaltar, sea por curiosidad o por el simple hecho de crear una discriminación, a un individuo que por desgracia, la naturaleza no lo dotó de un sexo determinado.

No por el hecho de existir en todas las generaciones este tipo de personalidades, el hombre abandonó este tema, lejos de eso siempre hubo y ha habido alguien interesado en proporcionar la mejor solución posible, a cada uno de estos casos y actualmente con un conocimiento de causa, incorporarla al sexo que le corresponde.

Desde que Barr y Bertrand, en estudios realizados más o menos hace 12 años, descubrieron que en las células de diferentes tejidos, podía apreciarse indicios sexuales, principió una serie de investigaciones al respecto, tratando de confirmar y estudiar más a fondo tan interesante capítulo de la medicina. Es mucho

lo que se ha dicho al respecto y aunque aún no se ha resuelto en su totalidad tan intrincado problema, no cabe duda que la ciencia médica ha logrado un definitivo adelanto, pero con este descubrimiento el médico cuenta en la actualidad, con un medio diagnóstico que le puede ayudar a descifrar el delicado problema de las anomalías morfológicas del sexo. Ya en el capítulo anterior, mencionamos el hecho de que la mujer presenta entre sus cromosomas sexuales dos similares designado con las letras XX y que el hombre presenta un cromosoma X y otro más pequeño conocido con la letra Y.

En frotos coloreados en células de mujeres normales se ha encontrado un corpúsculo que se localiza cerca o en intimidad con la membrana nuclear, dicho corpúsculo, al cual se le ha denominado también cromatina de Barr en honor a su descubridor, se cree es formado por los cromosomas X. Cuando los núcleos de las células de los tejidos acusan la presencia de dicha mancha cromática, en cierto porcentaje que casi siempre sobrepasa el 10%, se dice que la persona es "Cromatino Positivo"; por el contrario el sexo masculino que presenta el cromosoma XY, debido al tamaño más pequeño del mismo, no es posible visualizarlo en las coloraciones salvo en raras ocasiones y en porcentaje casi siempre inferior al 4%, llamándose por esto a este espécimen "Cromatino Negativo".

En esta forma estudiado el sexo se le llamará sexo cromatínico positivo al femenino y sexo cromatínico negativo al masculino, el cual como se explicará en párrafos sucesivos puede ser investigado en diferentes tejidos. Muchos son los métodos empleados en el uso práctico del sexo cromatínico y como trataré de explicar en el capítulo siguiente, cada uno tiene sus ventajas, como también sus partes débiles que pueden merecer crítica; pero lo importante creemos es encontrar el más viable de realizarse como trataremos nosotros de hacerlo en el presente trabajo para obtener los mejores resultados al hacer su aplicación en clínica ginecológica y endocrinológica.

La determinación del sexo cromático puede aportar gran ayuda y creemos que su estudio puede ser útil en la determinación del inter-sexo o cuando el médico por características morfológicas de los órganos genitales no puede definir a primera vista el sexo del recién nacido.

Como referiré más adelante, tenemos el caso estudiado de una aparente niña vista en el Hospital Roosevelt, quien la ma-

dre la llevó a los cinco años de edad y que el estudio cromático negó y que por las características psicológicas que engendradas dentro del ambiente en que vive, se optó por confirmar su aparente sexo femenino.

Esta paciente, probablemente si se le hubiere atendido desde su nacimiento hubiera podido ofrecérsele un futuro mejor, pero desgraciadamente todos estos casos se presentan hasta la época del desarrollo y entonces quedan de por medio los factores psicológicos que a esta edad habrá que tomarlos muy en cuenta, así como características endócrinas, el estado de las gónadas y la anatomía de los órganos genitales. Por esta razón el sexo cromático en el recién nacido creemos que es de mucho valor con respecto a la determinación que se deberá tomar con el futuro sexual de cada caso ambiguo, cuando los caracteres sexuales externos no puedan determinarse.

No queremos decir con esto que sea el sexo cromático quien tenga la última palabra, pues el médico debe valorar todos los demás factores, por ejemplo: Ante una Agenesia del pene, el médico podría verse obligado a tomar una decisión en favor del sexo femenino, aunque el sexo cromático resultara negativo.

Habrà que tomar en cuenta antecedentes maternos durante el embarazo, pues es bien sabido que un feto femenino puede ser virilizado, si le somete a una gran cantidad de andrógenos endógenos, teniendo a veces órganos sexuales indiferenciados, el arrenoblastoma, que es un tumor virilizante ha sido también responsable de muchos casos de hipersexualidad.

Wilkins y colaboradores en un artículo publicado en el *Journal Clinical Endocrinology* 18-559, 1958, cita el caso de 21 recién nacidos, que nacieron con características sexuales masculinas con hipertrofia del falo, y diversos casos de fusión del pliegue labio-ecrotal, teniendo 15 de ellos el antecedente que las madres habían recibido tratamientos a base de progesterona por amenazas de abortos inminentes.

En resumen, debemos decir que la determinación del sexo cromático es un arma clínica útil de la cual el médico dispone para ayudarse en la designación del sexo de una persona, que presente anomalías o deformidades morfológicas, que impliquen una duda, recomendando no dejar el estudio de estos casos hasta la pubertad sino lo antes posible, si fuere mejor, en el momento de tener el clínico su primer encuentro con este nuevo ser ambivalente o ambiguo, en sus características externas.

La cromatina sexual además le será útil al clínico para el estudio de aquellos casos de agenesia de las gónadas o gónadas rudimentarias, antes de que estos alcancen la edad adulta y sea muy tarde para iniciar un tratamiento eficiente y sea poco lo que se les pueda ofrecer.

Vamos a resumir brevemente las condiciones en las cuales individuos de sexo definido pueden llegar a determinar estados de inter-sexo, causados por agenesia de las gónadas por falta de estímulo de las hormonas de la hipófisis provocando una deficiencia hormonal, los casos más clásicos para no citar más que ellos son: A) Síndrome de Turner. B) Síndrome de Klinefelter.

El síndrome de Turner fue identificado por los trabajos de Ford C. C., Jones K. W., Polari P., De Almeida S. C., Briggs J. H., quienes en 1959 identificaron este cuadro clínico con el recuento de cromosomas como se expuso anteriormente y cuyas características son las de: Cuello corto, Tórax ancho, baja talla amenorrea primaria, aspecto rechoncho, presentando además diversas anomalías congénitas como pliegues cutáneos, deformaciones esqueléticas y renales, coartación de la aorta, edema linfangiectásico de las extremidades distales y ocasionalmente retardo mental. Si se encuentra una constitución cromosómica sexual negativa se clasifica como evidencia presuntiva de diagnóstico.

En el caso del síndrome de Klinefelter también puede hacerse un diagnóstico precoz por medio del sexo cromático; recordemos que en este síndrome encontraremos ginecomastia, azoospermia, testículos pequeños acompañados de hialinización de los túbulos seminíferos, eunucoidismo, y elevada excreción de gonadotropina urinaria. El diagnóstico de ese síndrome rara vez se hace antes de la pubertad, lo cual se facilitará al encontrar un niño con testículos anormalmente pequeños, una cromatina positiva. Se llegó a la conclusión que la constitución genética corresponde a 47 cromosomas, por ligadura de un cromosoma X a la pareja cromática XY.

En la esterilidad la cromatina sexual ha demostrado su utilidad en manos del médico como un método para facilitar el estudio de estos casos. Se ha demostrado que una mujer que presente asociado a su esterilidad sexo cromatínico opuesto, tiene, o agenesia de sus gónadas, o estas si existen son incapaces de producir gametos, lo cual la condena a una esterilidad irre-

versible, evitándose el clínico más investigaciones que a la larga no cambiarán el estado de la paciente.

De igual manera se estudiará el sexo cromático en personas de sexo masculino con igual propósito el cual también deberá conformarse con su estado, si el estudio de su cromatina sexual nos dice como resultado final, la presencia de los mencionados núcleos cromáticos en un porcentaje que nos indique positividad y condición de inter-sexo que no puede dar origen a su estado normal masculino de capacidad fecundante.

Con todo esto no queremos decir que el médico debe confiarse única y exclusivamente al estudio de la cromatina sexual, pues como hemos hecho resaltar en párrafos anteriores, en cada caso hay múltiples factores que deben tomarse en cuenta, pero sí es un hecho que dicho descubrimiento representa un adelanto positivo, con el cual se cuenta para determinar el sexo real que en última instancia deberá ser establecido por la concurrencia del Endocrinólogo, Ginecólogo, Cirujano y Psiquiatra, dada la magnitud y responsabilidad que representan para la vida humana, de la familia y de la sociedad el fallo inapelable de un "Status Sexual".

VI. TECNICAS

Se han descrito muchas técnicas para el estudio de la cromatina sexual; concretándonos en este trabajo a comentar, los tres procedimientos, que pudimos realizar y transcribimos además la técnica de Guard, la cual aunque no pudimos incluirla como rutina de trabajo por no haber contado con el material suficiente, creemos que es una de las más apropiadas, dada la característica de presentar los núcleos cromáticos, contrastados en color con el resto de la célula.

La técnica de coloración que nosotros decidimos adoptar para nuestro trabajo por encontrarlo más adaptable a nuestro medio proporcionando los mejores datos fue la coloración de fuchsina fénica o básica.

Los frotos fueron tomados de raspado de mucosa bucal de las mejillas o carrillos, y mucosa vaginal, los cuales son tomados con una espátula o un bajalenguas de madera de los de uso rutinario en clínica.

El material recolectado es frotado en láminas portaobjetos, a las cuales se les ha puesto previamente una delgada capa de albúmina. Una vez extendido el frote se procede a su coloración

TECNICA DE LA PREPARACION DE LOS COLORANTES DE FUCHSINA FENICADA

Soluciones:

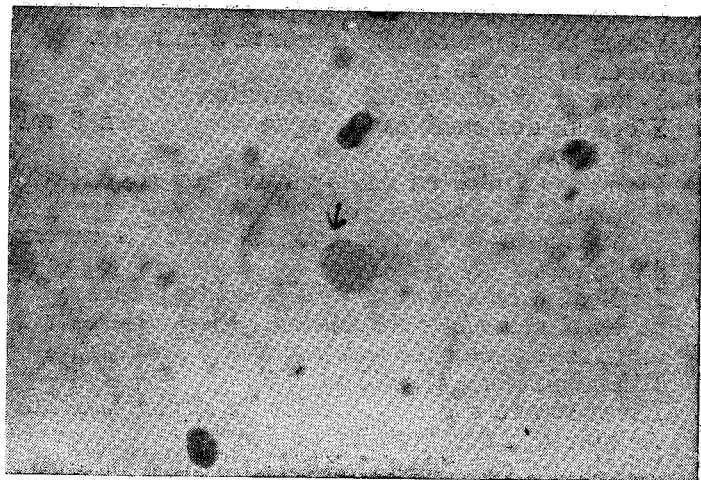
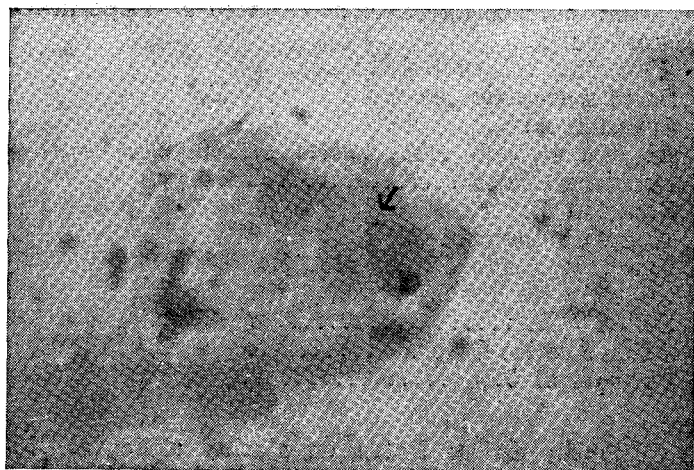
- 1º Celoidina al 2%.
Poner partes iguales de alcohol absoluto y éter más dos centímetros cúbicos de celoidina al 1%.
- 2º Acido Clorhídrico al 5%.
95 centímetros cúbicos en agua destilada
5 cm. cúbicos de ácido clorhídrico a temperatura ordinaria.
- 3º Fuchsina Básica o Fenicada.
Se preparan dos soluciones: A y B.
Solución A:
Alcohol al 70% 100 cc.
Fuchsina Básica 3 gr.
Solución B:
10 cc. de solución A.
90 cc. de Acido Fénico al 5%.
Solución de Trabajo:
Solución B. 45 cc.
Acido Acético Glacial 6 cc.
Formol al 37% 6 cc.

Técnica:

- 1º) Fijación de los frotos en alcohol etílico al 95%, un tiempo comprendido entre 15 y 30 minutos.
- 2º) Poner los frotos por 3 minutos en alcohol absoluto.
- 3º) Poner celoidina al 0.2% durante 2 minutos.
- 4º) Secar al aire 15 segundos.
- 5º) Poner en alcohol a 70% 5 minutos.
- 6º) Efectuar dos cambios en agua destilada a 5 minutos cada uno.
- 7º) Poner los frotos en ácido clorhídrico normal al 5% 5 minutos.
- 8º) Nuevamente lavar con agua destilada 2 cambios de 5 minutos.
- 9º) La lámina en este momento está lisa para ser coloreada en la solución de Fuchsina fenicada durante 5 o 10 minutos dependiendo del grosor del frote.
- 10º) Diferenciar con alcohol al 95%.
- 11º) Lavar rápido con dos cambios de alcohol absoluto.
- 12º) Aclarar con dos cambios de Xilol.
- 13º) La lámina extraída del Xilol está lista para ser montada en Permunt.

Luego de este procedimiento dejarlas secar por lo menos 24 horas, y la lámina estará lista para ser vista con el objetivo de inmersión.

Los núcleos celulares se verán color violeta y el punto cromático resalta por su coloración más oscura en la vecindad de la membrana nuclear; como se puede apreciar en la microfotografía tomada de uno de los frotos coloreados por nosotros y que a continuación reproducimos:



Microfotografía de frotis de cromatina sexual tomadas en el departamento de Anatomía Patológica por el Dr. Carlos Restrepo

Esta coloración fue con la que mejor resultados obtuvimos, habiendo analizado 100 casos de mujeres de los cuales encontramos un porcentaje que nunca bajó del 10%, no habiendo encontrado mayor de un 35%.

Probablemente al mejorar más la técnica y tener más práctica en dicho trabajo podremos igualar nuestro porcentaje con lo encontrado por otros investigadores, pues ellos dan para frotis bucales un porcentaje de 54% y para vaginales hasta 70%. Cabe agregar también que no encontramos ninguna variante en mujeres antes y después del desarrollo.

El conteo de estas células lo efectuamos en su mayoría en el laboratorio del Hospital Americano con el Dr. Julio Roberto Herrera. Los porcentajes encontrados en el sexo masculino nunca fueron mayores del 2%, dando en otros trabajos porcentajes de 4% como máximo.

El equipo empleado en esta coloración es accesible a pequeños laboratorios clínicos y ser montado en cualquier hospital sin mayores dificultades. A continuación reproducimos una fotostática de los implementos que nosotros empleamos en esta coloración.



Fotografía tomada en el departamento de Anatomía Patológica por el Dr. Ismael Guzmán

La técnica de coloración de Cresil Violeta la efectuamos pero no rutinariamente para nuestro trabajo por haber encontrado mejor resultado con la anterior.

La solución de Cresil Violeta se prepara de la manera siguiente:

Cresil Violeta al 5%.
 Cresil Violeta 5 gr.
 Agua destilada 100 cc.

Técnica:

La forma de tomar las muestras en la laminilla es exactamente que en el caso anterior, luego se principia con el proceso siguiente:

- 1º) Fijarla en alcohol éter 1 hora.
- 2º) Ponerla en alcohol al 70% 5 minutos.
- 3º) Ponerla en alcohol al 50% 5 minutos.
- 4º) Agua destilada 5 minutos.
- 5º) Cresil Violeta 5 minutos.
- 6º) Alcohol al 95% 1 paso.
- 7º) Alcohol absoluto 2 veces.
- 8º) Xilol 3 veces.
- 9º) Montar y ver al microscopio

Como dije, con esta técnica no tuvimos mejores resultados que con la anterior. También tuvimos oportunidad de efectuar coloraciones con la técnica de Seman, para teñir leucocitos. Esta técnica tiene como objeto, observar ciertos apéndices que existen en uno de los extremos del polimorfonuclear, al cual le se ha dado el nombre de apéndice o palillo de tambor de Seman.

La coloración permite una buena diferenciación, los leucocitos quedan coloreados en verde brillante en sus núcleos y el citoplasma y hematíes en un rojo ladrillo. Estos apéndices o palillos de tambor se observan únicamente en un 2% de los leucocitos, por lo que debe contarse un mínimo de 500 células. Además creemos que debe tenerse una práctica buena en reconocer dichas estructuras para no confundirlas con otras similares que podrían presentarse; por esta razón no la recomendamos como rutina, salvo si la persona que hace los recuentos tiene un buen entrenamiento para poder reconocer los casos positivos sin lugar a dudas.

Las soluciones se preparan de la manera siguiente:
 Verde de Metilo a 0.5%.

Verde de Metilo (purificado o no) .. 0.5 gr.
 Agua bi-destilada 100 cc.
 Bórax (Borato de Sodio) al 2%.
 Bórax 2.0 gr.
 Agua bi-destilada 100 cc.

Solución de Trabajo:

Verde de Metilo al 0.5% 5 partes
 Bórax al 2% 1 parte

Fuchsina de Zielh:

Fuchsina de Zielh 15 gotas
 Agua destilada 10 cc.

Técnica:

- 1º) Se hacen los frotos de sangre como un frote corriente, luego se fijan en alcohol metílico 3 minutos.
- 2º) Secar cuidadosamente.
- 3º) Colorear con solución de trabajo de Verde de Metilo y Bórax por 5 minutos.
- 4º) Lavar en agua destilada.
- 5º) Colorear con Fuchsina por 2 minutos.
- 6º) Lavar en agua destilada y secar al aire.

Los frotos están listos en cuanto están secos para observarlos al microscopio, teniendo las precauciones anotadas al principio, la coloración es buena, con buena práctica.

Las últimas dos coloraciones que anoto, no fue posible verificarlas. Los resultados que se obtienen son bastante aceptables por dar porcentajes altos y la forma de observar los núcleos cromáticos es fácil por estar contrastados en color con el resto del núcleo.

La primera solamente requiere de 2 a 4 horas para su diferenciación completa y poderla observar al microscopio.

La coloración que se usa en esta técnica es el Biebrich es-carlata—Fast green. La solución se prepara de la manera siguiente:

Biebrich Escarlata:

Biebrich escarlata 1 gr.
 Acido fosfotungstico 0.03 gr.
 Acido acético glacial 5 cc.
 Alcohol etílico al 50% 100 cc.

Fast Green:

Fast Green 0.5 gr.
 Acido fosfomolibdico 0.3 gr.
 Acido fosfotungstico 0.3 gr.
 Acido acético 5.0 cc.
 Alcohol al 50% 100 cc.

Técnica:

- 1º) Alcohol al 95% 2 minutos.
- 2º) Alcohol al 70% 2 minutos.
- 3º) Biebrich escarlata 2 minutos.
- 4º) Lavar en alcohol al 50%.
- 5º) Diferenciar en fast green de 1 a 4 horas. Durante este paso evaluar la diferenciación a intervalos de una hora. Cuando la célula revela el citoplasma verde un núcleo vesicular, también verde, la reacción es completa.
- 6º) Lavar en alcohol al 50% 5 minutos.
- 7º) Deshidratar en alcohol al 70%-95% y alcohol absoluto por 2 minutos cada uno.
- 8º) Aclarar en 3 cambios de xilol por 2 minutos cada cambio.
- 9º) Montar en permount.

Coloración Hematoxilina-Biebrich escarlata-Fast Green.

- 1º) Del alcohol al 95% pasar a alcohol absoluto al 70% 2 minutos cada uno.
- 2º) Colorear con solución diluida de hematoxilina por 15 segundos o sumergir las láminas en la solución 10 veces.
- 3º) Sin lavar, colorear con Biebrich escarlata por 2 minutos igual que en la técnica anterior.
- 4º) Lavar en alcohol al 50%.
- 5º) Diferenciar en fast green dejando las láminas de 18 a 24 horas. Este paso no requiere evaluar al microscopio la tinción como en el anterior.
- 6º) Deshidratar, aclarar y montar.

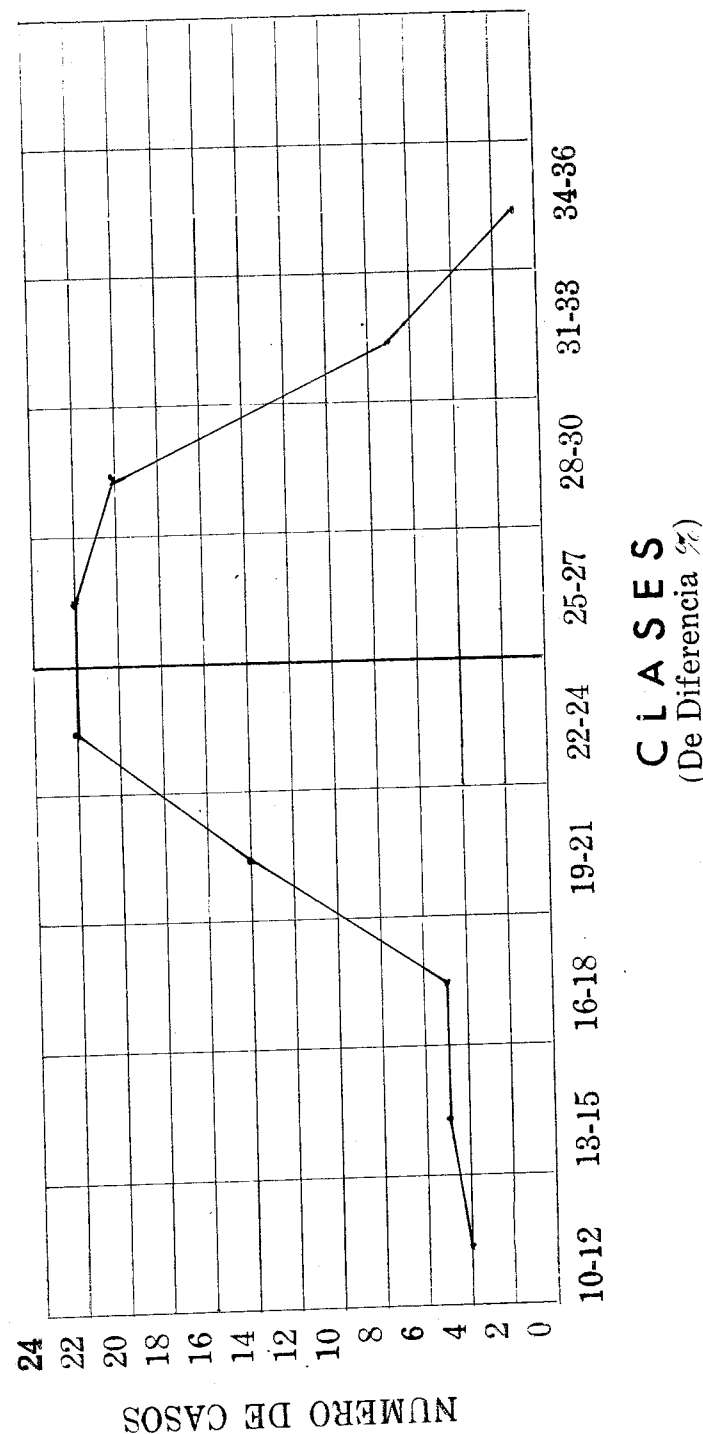
La ventaja de esta coloración estriba en que el núcleo cromático se observa en rojo, contrastando con el verde del resto de la célula, con lo cual el conteo se hace más fácil y más seguro.

Las distintas maneras de visualizar los núcleos cromáticos se describen de 4 formas:

- 1º) Núcleo cromático situado marginalmente, es decir, en la vecinda de la membrana nuclear.
- 2º) Núcleo situado en forma sub-marginal.
- 3º) Para-nucleolar, o sea en yuxtaposición con el nucleolo.
- 4º) Forma repartida o sea dos núcleos juntos o separados.

Se recomienda el conteo especialmente de la forma número uno o sea la marginal, lo cual es la que proporciona los datos más exactos.

Curva de la Distribución de la Frecuencia de los Casos de Cromatina Sexual en Sexo Femenino Investigados en el Hospital Americano y en el Roosevelt de GUATEMALA



Nosotros en nuestra coloración siempre contamos los núcleos marginales únicamente, probablemente a esto se debió que obtuvimos menores porcentajes, pero lo hicimos para estar seguros que contábamos formas precisas de cromatina sexual; y no obtener cifras de un valor objetable al contar formas dudosas.

Se recomienda hacer de preferencia frotos vaginales cuando fuere posible, pues es en la que se alcanza mayor porcentaje de positividad.

VII. MATERIAL

A: Estudio Citológico.

En este capítulo es poco lo que tenemos que comentar, dado que en los anteriores hemos hecho referencia, casi en su totalidad, de la forma como practicamos los distintos estudios citológicos en la coloración.

Originalmente tratamos de practicar tres coloraciones que fue con las que contábamos a la mano, siendo estas: La Fuch-sina Fenicada, El Cresyl Violeta y la coloración de Seman, para leucocitos; optando por hacer nuestro estudio sereado por el método de la Fuchsina Básica o Fenicada por haber resultado satisfactoria y definitiva.

Efectuamos raspados de mucosa vaginal, pero para el estudio sereado de nuestros casos, preferimos el bucal por ser más accesible la toma de las muestras, pues para exámenes vaginales no podíamos contar con clínicas de trabajo ginecológico y enfermos disponibles; no obstante los mejores resultados como anotamos anteriormente, son en este tipo por lo cual lo recomendamos.

Los frotos deben realizarse ni muy gruesos ni muy escasos, siendo preferible que hayan transcurrido algunas horas de la última comida para que no queden residuos alimenticios y la coloración muestre demasiados artefactos y manchas amorfas.

La forma de la enumeración celular se hace en igual forma que un recuento globular, anotando los casos positivos. Siempre optamos por contar solamente los núcleos con granulaciones cromáticas vecinas a la membrana nuclear para tener seguridad sobre cifras límites en el porcentaje, el cual nunca fue superior a 35% ni inferior de 10%.

Se realizó una práctica previa para familiarizarse con la técnica y distribución de las granulaciones cromáticas y al tener mejor práctica en nuestra coloración tuvimos oportunidad de contar 100 personas del sexo femenino y 100 del masculino, y hasta tener seguridad en nuestro trabajo procedimos a emitir resultados.

De los casos patológicos encontrados se seleccionaron dos que se resumen en el presente trabajo.

B: Casos.

Niña de cinco años de edad, originaria de Chiquimulilla, Escuintla, quien fue llevada al Hospital Roosevelt, por la madre, quien refirió que desde su nacimiento notó que la niña no tenía bien definidos sus órganos genitales.

Al examen físico era una niña con desarrollo normal fondo-estatural en relación a su edad; bien orientada, desarrollo mental satisfactorio. Al examen de órganos genitales se notó la presencia de grandes labios fusionados, no habiendo introito vaginal. En la parte superior hacía saliente un pequeño apéndice que a primera vista daba la impresión de un clitoris, pero que al examinarlo detenidamente, hacía sembrar la duda sobre su morfología, pues el meato uretral existía exactamente en la base, dando la impresión de un miembro viril con hipospadias, existiendo también un repliegue mínimo que dividía la parte distal.

Exámenes de laboratorio practicados: PBI igual 9.4 micgr.
17 Ketosteroides en una primera muestra de orina = 0.033 mg. en orina de 24 horas.
2ª muestra = 0.099 mg. en orina de 24 horas.

Tres exámenes sereados investigando Cromatina Sexual; leídos por diferente observador dieron resultado negativo para sexo femenino.

El día 9 de Enero de 1962 se le practicó Laparatomía exploradora en el mismo centro hospitalario habiendo encontrado Ausencia de órganos genitales internos de sexo femenino y además dos testículos rudimentarios que nunca llegaron a descender estando colocados en el orificio interno de los conductos inguinales, el cual se presentaba

casi obstruido; la pieza anatómica fue remitida al Departamento de Anatomía Patológica para su análisis histológico y comprobación del diagnóstico, habiéndose recibido el siguiente reporte: Testículos inmaduros infantiles con ligera fibrosis intersticial. El diagnóstico final del caso fue: Hipospadia, Criptorquidea bilateral, Pseudo hermafroditismo.

El presente caso se analizó desde varios puntos de vista, tanto morfológicos como psicológicos y endócrinos; considerando la edad de la paciente la junta de médicos especializados optó por dejarla con el sexo que sus padres le habían mantenido hasta el presente, es decir femenino, a pesar de que su sexo biológico fue definitivamente establecido como masculino.

Paciente de 26 años de edad, originaria de esta capital, consultó a facultativo por tener cuatro años de casada no habiendo podido hasta la fecha resultar embarazada.

Menarquia a los 13 años, irregular, 1-2-3/28-30-60 en ocasiones mínima; dismenorrea negativa presencia de orgasmo y lívido referido como normal.

Al examen físico paciente de constitución longilínea, mamas atroficas, vello pubiano en vértice hacia arriba, genitales externos relativamente normales.

Cromatina sexual dió como resultado 2% de positividad, compatible con sexo cromatínico negativo para sexo femenino.

Un útero-salpingograma reveló: Útero Hipoplásico. Confirmando dicho diagnóstico por Laparatomía exploradora efectuada en el Hospital Bella Aurora por el Doctor Oscar Soto Mora, quien reportó: Útero infantil, Anexos atroficos.

Con estos casos muy demostrativos, de los cuales estamos seguros, son suficientes para el objeto del trabajo; queremos hacer notar el valor diagnóstico con que debe apoyarse el clínico en el estudio de las anomalías sexuales, valor que no debe desdesharse dada la facilidad del procedimiento.

Es nuestro objeto al haber presentado este pequeño trabajo de tesis, el proporcionar y divulgar los distintos métodos con los que se cuenta actualmente, para el interesante capítulo de la Patología relacionada con el inter-sexo y la determinación definitiva del status sexual, tan importante para la ginecología, endocrinología, y demás personas encargadas de dar su fallo en este delicado tema.

VIII. CONCLUSIONES

- 1º) Dada la enorme responsabilidad que entraña el Status sexual, debe dársele mayor importancia al estudio de los caracteres sexuales del recién nacido, por parte de la persona encargada de determinar el sexo que éste deberá llevar durante su vida, por entrañar consecuencias imponderables para la familia y la sociedad.
- 2º) Cualquier anomalía por mínima que aparezca al nacimiento debe ser estudiada con los recursos actuales con que cuenta la ciencia médica, incluyendo obligadamente "La Determinación del Sexo Cromático".
- 3º) El estudio de la cromatina sexual no es un método difícil, que imposibilite al clínico de poder incluirlo entre los factores y procedimientos de rutina que ayudarán al diagnóstico, pues en cualquier laboratorio por pequeño que sea puede ser montado, no necesitándose de equipos e instrumental especial.
- 4º) La investigación de cromatina sexual debe ser incluida como examen de rutina, en los pacientes que consulten por esterilidad, o cualquier patología relacionada con problemas ginecológicos.
- 5º) Debe adiestrarse al personal técnico de los hospitales para llegar al perfeccionamiento de esta técnica, y de ser posible realizar cultivo de tejidos para un estudio más avanzado en este interesante campo.
- 6º) Debe elegirse uno de los métodos, pues creemos que la base estriba en una buena experiencia tanto del técnico como del microscopista.
- 7º) Cuando no se tenga la suficiente práctica, es recomendable tomar en cuenta en el conteo, únicamente los corpúsculos cromáticos situados en la vecindad de la membrana nuclear, pues son los que presentan las características morfológicas mejor distinguibles y que se prestan a menos causas de error.

BIBLIOGRAFIA

- 1º) Huffman J. W., Curtis A. H., Ginecología. Tercera edición. Salvat Editors, S. A. 1953. Pag 79.
- 2º) Bianchi Loschetti. Biología General. Décimo tercera edición. El Ateneo Editorial, Buenos Aires, 1956. Pag. 200.
- 3º) Harrison T. R. Medicina Interna. Segunda edición. La Prensa Médica, México. Editorial Fournier 1956. Pag 341.
- 4º) Herbert A. Lubs Jr. Discrepances between bone marrow and peripheral-blood. Chromosomal Constitution. The Lancet N° 7207, Vol. II, 14 de Oct. 1961. Pag. 574.
- 5º) Hernie R. Guard. A New Technic for Differential Staining of the Sex Chromatin and the Determination of Its Incidence in Exfoliated Vaginal Epithelial Cells. American Journal Clin. Path. August 1959, 32-145.
- 6º) Boletín Médico, tomo 8, N° 4. Laboratorios Lilly, 1960.
- 7º) Identificación del Sexo. Spectrum International Pfizer. Vol. VI, N° 2, Pag 23. Copyright 1956 por Chas Pfizer & Co., Inc.
- 8º) Dr. Susumu Ohno. X Chromosomas. The Lancet N° 2704, London Sat. September 1961. Vo. II, Pag. 723.
- 9º) Eric Engel M. D., Anne Forbe M. D. An Abnormal Medium-sized Metacentric Chromosomas in a Woman with Primary Gonadal Failure. The Lancet N° 7210. London Sat. 4 November 1961, Vol. II.
- 10º) D. H. Carr M. B., M. L. Barr, T. Lüers M. D. XX XXX Mosaicism in Relationship to Gonadal Dysgenesis in females The Journal of Clinical Endocrinology and metabolism. Vol. 22, N° 7. Julio 1962. Pag. 71.