

88 - 010405

UES BIBLIOTECA CENTRAL



INVENTARIO: 10123034

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR  
FACULTAD DE MEDICINA  
ESCUELA DE TECNOLOGIA MEDICA-LABORATORIO CLINICO



**"ESTUDIO COMPARATIVO DE DOS METODOS DE TINCION PARA LA  
INVESTIGACION DEL CUERPO DE BARR (CROMATINA SEXUAL)"**

SEMINARIO DE GRADUACIÓN

PRESENTADO POR:

T.M. ANA CRISTINA MENDOZA SERRANO  
T.M. BERTA LETICIA PÉREZ RUÍZ  
T.M. CELIA AYALA DOMÍNGUEZ  
T.M. MARÍA CONCEPCIÓN MELGAR HERRERA

PREVIO A LA OPCIÓN DEL TÍTULO DE :  
LICENCIADO EN LABORATORIO CLINICO

FEBRERO/1988.



SAN SALVADOR

EL SALVADOR

CENTRO AMERICA

T  
574.8732

E82

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

FACULTAD DE MEDICINA  
ESCUELA DE TECNOLOGIA MEDICA - LABORATORIO CLINICO

"ESTUDIO COMPARATIVO DE DOS METODOS DE TINCION PARA  
LA INVESTIGACION DEL CUERPO DE BARR (COMATINA SEXUAL) "

SEMINARIO PRESENTADO ANTE EL JURADO CALIFICADOR DE  
LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR  
EN SATISFACCION PARCIAL DE LOS REQUERIMIENTOS PREVIOS A  
LA OBTENCION DEL TITULO DE

LICENCIADO EN LABORATORIO CLINICO

ASESOR:

DRA. LEONOR ISABEL MURILLO DE LINARES

FEBRERO DE 1988

SAN SALVADOR

EL SALVADOR

CENTRO AMERICA

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

RECTOR:

LIC. LUIS ARGUETA ANTILLON

FACULTAD DE MEDICINA:

DECANO EN FUNCIONES:

DR. RAFAEL MONTERROSA ROGEL

SECRETARIO:

T.M. MARIA ANTONIA DE INTERIANO

DIRECTOR DE ESCUELA DE MEDICINA:

DR. JOSE ADAN NIETO

DIRECTORA DE ESCUELA DE TECNOLOGIA MEDICA:

DRA. ENA CORDON DE MIRON

DIRECTORA DE CARRERA DE LABORATORIO CLINICO:

LIC. ALCIRA DE RUANO

NUESTRO ESPECIAL AGRADECIMIENTO A LA  
ASESORA DEL PRESENTE TRABAJO,  
DRA. LEONOR ISABEL MURILLO DE LINARES,  
POR SU VALIOSA Y DECISIVA ORIENTACION  
PARA LA REALIZACION DE ESTE SEMINARIO.

MIEMBROS DEL JURADO:

DRA. LEONOR ISABEL MURILLO DE LINARES

DRA. MARIA LEONOR CALLEJAS

LIC. ANA BERTA ARGUMEDO DE GONZALEZ

\*\*\*

NUESTRO AGRADECIMIENTO A:

DR. JUAN RAMON ALVARENGA  
LIC. ANA GUADALUPE LOPEZ DE MORENO  
BR. MARIA TERESA DE GARCIA  
BR. MARIA LUISA ACOSTA  
BR. RIGOBERTO GRANDE VALLE  
LIC. ROBERTO ANTONIO BARAHONA  
DR. ADALBERTO A. GONZALEZ A.  
LIC. MABEL DE PEÑA  
DRA. ANA LETICIA ZA VALETA DE AMAYA  
SRA. MARIA ISABEL M. DE GUERRA

A LA DIRECCION Y AL PERSONAL DEL:

- CENTRO DE EDUCACION ESPECIAL.
- LABORATORIO CENTRAL DEL MINISTERIO DE SALUD PUBLICA Y ASISTENCIA SOCIAL.
- HOSPITAL DE MATERNIDAD.
- DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA, FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR.

POR LA COLABORACION PRESTADA PARA LA  
REALIZACION DEL PRESENTE TRABAJO.

Y A TODAS LAS PERSONAS QUE COLABORARON CON  
NOSOTROS EN UNA U OTRA FORMA, QUE SIN SU  
AYUDA NO HUBIERA SIDO POSIBLE LA ELABORACION  
DE ESTE TRABAJO.

**ANA CRISTINA, DEDICA ESTE SEMINARIO:**

**A DIOS TODOPODEROSO:**

Por haberme iluminado el camino y dado el -  
entendimiento y fuerza espiritual para al--  
canzar esta meta.

**A MIS PADRES:**

Dr. Tobías Mendoza y Paz Serrano de Mendoza,  
que con mucho amor y consejos hicieron posible  
que alcanzara esta aspiración.

**A MIS HERMANOS CON CARIÑO:**

Margarita María de Leiva, Tobías, Rodolfo  
Humberto y Francisco José Mendoza Serrano.

**A MIS CUÑADOS:**

Angel Omar, Mabel del Carmen, Lya Marina y  
Carmen Elizabeth,  
por su ánimo y comprensión.

**A MIS QUERIDOS SOBRINOS:**

Omarcito, Maricela, Tobías José, Alvarito,  
Lya Cristina, Gabriela C., E. Ruth, Francisco  
José, Rodrigo A. y Diego F.

**A MIS COMPAÑERAS DE TRABAJO DE SEMINARIO:**

Con especial cariño.

**A MIS FAMILIARES Y AMIGOS.**

BERTA LETICIA, DEDICA ESTE SEMINARIO

A DIOS TODOPODEROSO.

A MIS PADRES:

Ricardo Pérez  
Rosa Ruiz de Pérez.

A MIS HERMANOS:

Elsa Olivia  
Clara Luz  
Vilma Luz  
Ana Edalia  
Alfredo Eugenio  
Yanira Margarita.

A MIS QUERIDOS SOBRINOS.

A MIS COMPAÑERAS DE TRABAJO DE SEMINARIO.

A MIS FAMILIARES Y AMIGOS.



CELIA, DEDICA ESTE SEMINARIO

A DIOS TODOPODEROSO.

A MIS PADRES:

Wenceslao Ayala  
Felícita Domínguez de Ayala.

A MIS HIJOS:

Jaime Antonio  
Juan Carlos  
José Roberto.

A MI ESPOSO:

José Antonio Zelaya

A MIS HERMANOS:

David, Isaías, Carlos y Raúl  
Ayala Domínguez.

A MIS SOBRINOS.

A MIS COMPAÑERAS DE TRABAJO DE SEMINARIO.

A MIS FAMILIARES Y AMIGOS.

MARIA CONCEPCION, DEDICA ESTE SEMINARIO

A DIOS TODOPODEROSO:

Por haberme iluminado el camino y darme el entendimiento y fuerza espiritual necesarias para continuar adelante.

A MIS PADRES:

Rutilio Melgar Santamaría y Amanda Herrera de Melgar, Valiosos pilares que con sus esfuerzos y consejos hicieron posible la consecución de este logro.

A MI HIJO:

Hugo Fernando,  
Que con su amor, apoyo, sacrificio, paciencia y comprensión hizo que llegara a esta etapa de mi vida.

A MIS HERMANOS:

Lic. María Teresa Melgar  
Lic. Celina Amanda Melgar  
Rutilio Melgar (Q.D.D.G.)  
Mirna Marlene Melgar de López  
Lic. Nelson Gerardo Melgar y Sara Ortiz de Melgar,  
Con fraternal cariño.

A MIS SOBRINOS:

Gerardo José Melgar  
Celeste Amabel García  
Glenda Cossette, Manuel y Francisco Javier López  
Francisco Javier Melgar.  
Con mucho amor y cariño.

A MIS COMPAÑERAS DE TRABAJO DE SEMINARIO:

Por la paciencia y comprensión que me tuvieron durante la elaboración del presente trabajo.

A MIS FAMILIARES Y AMIGOS:

Que en todo momento me alentaron a seguir adelante.

"ESTUDIO COMPARATIVO DE DOS METODOS  
DE TINCION PARA LA INVESTIGACION DEL CUERPO DE BARR  
(CROMATINA SEXUAL) "

\*\*\*

## I N D I C E

I.	RESUMEN .....	1
II.	INTRODUCCION .....	2
III.	OBJETIVOS .....	10
IV.	METODO .....	11
V.	TECNICA DE TOMA DE MUESTRA .....	13
VI.	RESULTADOS .....	19
VII.	GRAFICAS Y CUADROS .....	22
VIII.	DISCUSION .....	30
IX.	RECOMENDACIONES .....	35
X.	APENDICE .....	36
XI.	BIBLIOGRAFIA .....	41

## I. RESUMEN

Se hizo un estudio comparativo de dos métodos de tinción: fucsina fenicada y violeta de cresilo, para detectar el cuerpo de Barr en 1.600 frotis de mucosa oral. Se tomaron las muestras de ambos carrillos a 400 personas, 322 -- del sexo femenino y 88 del masculino. Las edades variaron entre 3 y 97 años. El cuerpo de Barr fue claramente visible en los núcleos de las células epiteliales teñidas con fucsina fenicada, pudiendo apreciarse mejor que en las células teñidas con violeta de cresilo. Los porcentajes de positividad para el cuerpo de Barr en los individuos estudiados fueron bajos, comparados con los reportados por --- otros autores. En el caso de los retrasados mentales se - observó baja positividad a cuerpos de Barr. Los frotis de casos con diagnóstico específico dieron resultados similares a los observados en los individuos normales.

## II. INTRODUCCION

### CUERPO DE BARR - (CROMATINA SEXUAL)

#### HISTORIA

Barr y Berthram, en 1949, estudiaban los cambios en el citoplasma de algunas neuronas de gatos, cuando las fibras que salían de ellas eran estimuladas. Sin embargo, el núcleo pálido, voluminoso en estas neuronas, ayudó a que enfocaran la atención en un cuerpo basófilo, redondo, pequeño en el núcleo de dichas neuronas de los primeros gatos que estudiaron (14, 20). Al observar que, este cuerpo basófilo, parecía cambiar de sitio en distintas condiciones experimentales, aumentó el interés. Al continuar los experimentos, siguieron buscando este cuerpo y se sorprendieron al advertir que no lo observaban en algunos gatos que estudiaron después, en tanto que en otros eran tan manifiestos como en los primeros. Desorientados, como buenos científicos que eran, acudieron a los registros cuidadosos que llevaban y descubrieron que el cuerpo diminuto se presentaba únicamente en el núcleo de las neuronas de las gatas (14).

En investigaciones posteriores, Barr encontró cuerpos de cromatina sexual en las células de la mayoría de los tejidos de las hembras en muchas especies de animales, incluyendo los humanos (20). El cuerpo de Barr puede ser observado en varios tipos de células, pero el epitelio de la mucosa oral es el más conveniente (24, 38), porque en lugar de tener que extirpar fragmentos de tejidos (como piel) de un individuo y hacer cortes, todo lo que se necesita para obtener número comparativo grande de células es rasparlas del interior de los carrillos, lo cual puede hacerse sin molestias (14). Es fácilmente observable en todos los núcleos que poseen un patrón de cromatina abierto y vesicular, por ejemplo, los núcleos de las células epiteliales que forman el estrato basal (39). El cuerpo de Barr se presenta como una masa de cromatina adosada a la membrana del núcleo; usualmente tiene una forma plana-convexa y un tamaño de 1.2 por 0.7 micras aproximadamente (8). Ocasionalmente aparece partido en dos o en forma de pirámide invertida (3, 39).

#### CARACTER DEL CUERPO DE BARR

Inicialmente se llamó cromatina sexual de la célula porque se consideraba que los dos cromosomas X de la célula en interfase formaban en conjunto una masa voluminosa

de cromatina. En la actualidad se ha comprobado que el cuerpo de Barr representa únicamente uno de los cromosomas X de la célula femenina (14). La causa de que sea visible en la interfase, es que permanece condensado en lugar de extenderse parcialmente como el otro cromosoma X y los demás cromosomas en el núcleo.

Este descubrimiento fue muy importante, porque para entonces se sabía que el DNA brindaba la información para la síntesis de proteína en el citoplasma.

Mary Lyon postuló en 1961: 1) Que en las células somáticas de las hembras el cromosoma X condensado que se presenta en forma de cuerpo de Barr está inactivado dejando tan sólo un cromosoma X activo. 2) Que el cromosoma X inactivado puede ser de origen tanto paterno como materno. 3) Que la inactivación se produce en el momento de la implantación del embrión en el útero y es completamente aleatoria (1, 33, 39). Sin embargo, una vez que ha tenido lugar el proceso de inactivación, todas las descendientes de cada célula concreta tendrán el mismo cromosoma X inactivado. La inactivación del cromosoma X se refleja morfológicamente por una heterocromatinización (3, 6, 18). En la interfase y en la profase precoz, es más -



corto, se tiñe más oscuramente y está más condensado que su recíproco activo.

La no observación del cuerpo de Barr en las células de individuos del sexo masculino se debía a que éstos sólo tienen un cromosoma X, el cual siempre está activo y por consiguiente extendido y no visible en las células en reposo. El cromosoma X guarda relación con el sexo, y además posee más de 50 genes que son importantes para las funciones biológicas humanas. De lo anterior se hizo evidente que el nombre de cromatina sexual, no era adecuado para el cromosoma X condensado inactivo, por lo cual se aceptó en general llamar a este pequeño -- cuerpo con el nombre de su descubridor, y hoy se conoce -- como cuerpo de Barr (14).

#### PORCENTAJE DE POSITIVIDAD EN LA POBLACION

Generalmente el porcentaje de cuerpo de Barr positivo en frotis de la mucosa oral procedente de mujeres normales (XX), varía del 15 al 90% según la experiencia ---- de varios autores (4, 39).

Las variaciones de tales porcentajes deben ser interpretadas con reserva considerable. Las elevaciones de --

porcentaje de células con cuerpo de Barr positivo en el frotis son raros y no tienen significado especial. Las reducciones de magnitud significativa (o la mitad de los niveles usuales observados o menos), pueden ser clínicamente significativos. Tales reducciones en el porcentaje de células con cuerpo de Barr positivo pueden reflejar un mosaicismo cromosómico sexual (9).

En 1955 Moore y Barr introdujeron la técnica del frotis de la mucosa oral para la detección del cuerpo de Barr en células epiteliales. Esta técnica junto a otras, llegaron a ser aceptadas y rápidamente aplicadas para la investigación de todo desorden concebible del desarrollo del sexo en el hombre (11, 26).

#### INTERPRETACION DE LA PRUEBA DEL CUERPO DE BARR

Si dentro del núcleo de una célula somática existe más de un cromosoma X, se encuentran todos inactivos menos uno. Por lo tanto, el número de masas de cromatina X (m) se puede predecir utilizando la fórmula  $m = n - 1$ , donde "n" es el número de cromosomas X que tiene la célula.

Los varones que tiene un solo cromosoma X, no muestran ninguna masa de cromatina X ( $1 - 1 = 0$ ). Las hembras normales --

que tienen dos cromosomas X poseen una sola masa de cromatina X ( $2-1=1$ ). Las hembras con trisomía X tienen dos masas de cromatina X en sus núcleos ( $3-1=2$ ), y así sucesivamente (39).

#### IMPORTANCIA DE LA PRUEBA DEL CUERPO DE BARR

El estudio del cuerpo de Barr, ha sido de gran valor en la determinación de la constitución cromosomal en casos de ambigüedad sexual (5, 17, 29), especialmente en el hermafroditismo, en el síndrome de Turner y el síndrome de Klinefelter (20).

#### PROCEDIMIENTOS PARA EL ESTUDIO DEL CUERPO DE BARR

El cuerpo de Barr se tiñe con cualquier tinción nuclear. Entre éstas tenemos las tinciones de hematoxilina-eosina y Papanicolaou, así como tinciones especiales, como orceína, violeta de cresilo, fucsina fenicada, tionina, tinción de Feulgen, tinción de Guard (30, 31), etc. Probablemente, la mejor tinción para detectar el cuerpo de Barr es la fucsina fenicada (39). Almendares (1) menciona que se usa gran variedad de tinciones para el cuerpo de Barr y que el escoger una u otra depende de la propia experiencia ya que todas dan resultados semejantes. Las más usadas son las de violeta de cresilo, de tionina y de acetato de orceína (34, 35, 37). Guard, en 1959, intro--

dujo una nueva técnica que es muy útil porque el cuerpo - de Barr se tiñe de rojo y el fondo de verde. Este método ha dado excelentes resultados, según refiere el autor, pero es muy complicado.

La técnica de violeta de cresilo es menos específica para el cuerpo de Barr (34), pero es relativamente rápida y ha sido muy empleada. Tiene el inconveniente de teñir las bacterias y los restos celulares, lo que puede dificultar la observación en caso de un frotis grueso.

Además, existe el inconveniente de que ciertos lotes de colorantes no son satisfactorios (22).

Quizá la mejor técnica de tinción para el cuerpo de Barr, sea la de fucsina fenicada, porque es un método sencillo que da excelentes resultados (22).

#### ANTECEDENTES DE INVESTIGACION DEL CUERPO DE BARR EN EL SALVADOR

En El Salvador, en 1960, Soto J.A. (36), hizo estudios sobre el cuerpo de Barr en células del líquido amniótico humano para diagnóstico prenatal del sexo, utilizando la coloración de violeta de cresilo.

En 1963, Berríos y colaboradores (5) investigaron el cuerpo de Barr y cariotipo en diversos tipos de anomalías congénitas.

Conociendo la utilidad del estudio del cuerpo de Barr, se evaluaron dos técnicas para realizar su investigación: la de violeta de cresilo y la de fucsina fenicada. Estas técnicas fueron seleccionadas por ser sencillas, rápidas y porque los reactivos que se utilizan en ellas son fáciles de preparar y más accesibles, es decir, están disponibles para la mayoría de las personas que trabajan en Laboratorio Clínico.

### III. OBJETIVOS

1. Investigar la presencia del cuerpo de Barr en los -- frotis de mucosa oral, de ambos carrillos, obtenidos en 400 personas, utilizando las coloraciones de violeta de cresilo y fucsina fenicada.
2. Comparar la sensibilidad de ambas técnicas para la - detección de cuerpos de Barr.
3. Determinar los porcentajes de positividad para el -- cuerpo de Barr en los individuos estudiados, tomando en cuenta sexo y variaciones en su fenotipo.
4. Correlacionar los resultados de positividad para el cuerpo de Barr con la historia clínica de los individuos estudiados.

#### IV. METODOS

##### POBLACION ESTUDIADA

Se tomaron muestras de mucosa oral a cada una de las 400 personas: dos del carrillo derecho y dos del carrillo izquierdo, las cuales fueron obtenidas personalmente por las investigadoras en los siguientes lugares: en el Laboratorio Central del Ministerio de Salud Pública y --- Asistencia Social, Hospital de Maternidad, Centro de Educación Especial y Facultad de Medicina. Entre la pobla-- ción estudiada se incluyeron 235 mujeres y 51 hombres nor-- males, una mujer con amenorrea primaria, 98 niños (24 va-- rones y 74 hembras) con retraso mental, dos mujeres esté-- riles, 1 hombre estéril, 10 mujeres con múltiples abortos, 1 hombre con sospecha de Síndrome de Klinefelter, 1 hombre con translocación genética.

A cada persona se le tomaron datos sobre edad, sexo, uso de fármacos, número de hijos, menarquía, menstruación, número de abortos, etc., utilizando para esto un formula-- rio preparado a propósito, del cual se adjunta un ejemplar, logrando con ello separar los diferentes grupos estudiados. Se correlacionó el número de masas de cuerpo de Barr obser--

vados en cien células de mucosa oral con la historia clínica del paciente.



## V. TECNICA DE TOMA DE MUESTRA

MUESTRA: MUCOSA ORAL

Se le indicó al paciente hacerse un enjuague previo de la boca con agua corriente, para disminuir la cantidad de restos inespecíficos y de bacterias (11, 22).

Se utilizó un bajalenguas estéril, raspando la superficie interna de la mejilla, se limpió el bajalenguas en una gasa estéril y se repitió la maniobra (12). En esta segunda maniobra se frotó con fuerza la superficie interna de la mejilla, con el objeto de obtener células de los estratos más profundos, puesto que son las que tienen los núcleos vesiculares deseados (39). Luego se extendieron las células sobre un portaobjetos de vidrio limpio, hasta obtener un frotis homogéneo, de grosor intermedio, ya que si las extensiones son muy finas, ésto puede hacer que -- las células resulten difíciles de examinar (39).

Las muestras fueron obtenidas de ambos carrillos, de recho e izquierdo, la muestra correspondiente al lado derecho la extendimos inmediatamente a la identificación de la lámina y la del izquierdo en el otro extremo.

#### FIJACION DE LAS MUESTRAS:

Este tipo de muestra , requiere de una fijación de la célula. Actualmente se cuenta con los métodos alternativos de fijación siguiente (40, 28).

1. La fijación por spray.
2. Alcohol metílico.
3. Secado al aire.
4. Glicerina.
5. Solución de Carnoy's.

Al inicio, se fijaron 20 frotis por inmersión en alcohol metílico en un coplin por 12 a 24 horas, como la técnica lo indica, pero los resultados no fueron satisfactorios porque el frotis se lavaba; también se probó con spray observándose que las células se desprendían a cualquier distancia que éste fuese aplicado. Por lo expuesto anteriormente, experimentamos dejando secar los frotis al aire (28, 40) procediendo a continuación a la tinción con lo que obtuvimos mejores resultados.

LOS PASOS DE LA COLORACION DE FUCSINA FENICADA FUERON LOS SIGUIENTES:

1. Solución diluida de fucsina básica ... 10 minutos
2. Alcohol etílico al 95% ... 1 minuto

- |    |                                |     |           |
|----|--------------------------------|-----|-----------|
| 3. | Alcohol absoluto               | ... | 1 minuto  |
| 4. | Alcohol absoluto               | ... | 1 minuto  |
| 5. | Xilol                          | ... | 5 minutos |
| 6. | Xilol                          | ... | 5 minutos |
| 7. | Se montó en Bálsamo del Canadá |     |           |

El frotis se introduce en la solución diluida de fucsina básica para la coloración del cuerpo de Barr. Luego se pasa por una serie de alcoholes que van del 95% al absoluto, los cuales realizan una deshidratación del tejido y a la vez eliminan el exceso de colorantes; los frotis se aclaran en dos baños sucesivos de xilol.

LOS PASOS DE LA COLORACION DE VIOLETA DE CRESILO SE DETALLAN A CONTINUACION:

- |    |                          |     |            |
|----|--------------------------|-----|------------|
| 1. | Alcohol al 95%           | ... | 15 minutos |
| 2. | Alcohol al 70%           | ... | 5 minutos  |
| 3. | Alcohol al 50%           | ... | 5 minutos  |
| 4. | Agua destilada           | ... | 5 minutos  |
| 5. | Agua destilada           | ... | 5 minutos  |
| 6. | Violeta de cresilo al 2% | ... | 20 minutos |
| 7. | Alcohol al 95%           | ... | 2½ minutos |
| 8. | Alcohol al 95%           | ... | 2½ minutos |
| 9. | Alcohol absoluto         | ... | 2½ minutos |

10. Alcohol absoluto ... 2½ minutos
11. Xilol ... 2½ minutos
12. Se montó en Bálsamo del Canadá.

El frotis una vez seco es sometido a una hidratación por medio de una serie de pasos por alcoholes que van del 95%, 70% y 50% para terminar en dos baños de agua destilada (11, 22), luego el frotis es sumergido en el colorante por 20 minutos. Posteriormente, al extraer el frotis del colorante pasa a una serie de alcoholes en las concentraciones que van del 95% al absoluto, en los cuales se realiza una deshidratación y a la vez elimina el exceso del colorante.

Se utilizó esa técnica con las primeras 20 muestras pero fue difícil la identificación del cuerpo de Barr, -- con el microscopio de luz por estar débilmente teñido. - En vista de eso se varió el período que pasa el frotis en el colorante, ya que el lote que se utilizó resultó insatisfactorio (22, 7): se probó con diferentes tiempos cada vez más largos, hasta tener un resultado más satisfactorio a los 50 minutos. Además, se eliminó el paso número ocho, en alcohol al 95% porque consideramos que omitiéndolo, las células del frotis retendrían más el colorante,

con lo que se podrían observar más fuertemente teñidas, debido a que éste (alcohol al 95%) actúa como deshidratador y decolorante (11, 22).

Finalmente, las láminas se aclararon con xilol y algunas se montaron en Bálsamo del Canadá.

Debido a limitaciones en la obtención del material se omitió el montaje en Bálsamo del Canadá, de 250 láminas en ambos métodos.

Después de haberse realizado las coloraciones de los frotis con los dos métodos de tinción a comparar, se procedió a examinar las 1.600 muestras al microscopio de luz, con el objetivo de 10X para localizar los núcleos, luego con el objetivo de inmersión para determinar la presencia del cuerpo de Barr. A cada una de las muestras se les hizo un recuento de 100 núcleos, buscando los más adecuados o sea los vesiculares (12). A cada sujeto se le analizaron 200 núcleos (100 de cada carrillo) con cada una de las coloraciones, es decir un total de 400 núcleos por persona.

Es importante hacer notar que en el presente trabajo se tomaron en cuenta como cuerpo de Barr, aquellas masas hiperpicnóticas (12, 27) adheridas a la superficie interna

de la membrana nuclear (36, 2). Los resultados obtenidos fueron correlacionados con las características observables del paciente.

## VI. RESULTADOS

La positividad de cuerpos de Barr en los núcleos de las células obtenidas de mucosa oral, coloreadas con fucsina fenicada, varió de 1 a 42% en mujeres normales (ver gráfica 1). La mayoría presentaron de 11 a 20% de células con cuerpo de Barr. En cambio con la coloración de violeta de cresilo los resultados variaron de 0 a 30% (ver gráfica 1), observándose que la mayoría de mujeres tenían porcentajes más bajos de positividad a cuerpos de Barr que con la coloración de fucsina fenicada.

La gráfica 2, demuestra que el 100% de los frotis coloreados con la técnica de fucsina fenicada fueron teñidos satisfactoriamente, mientras que con la de violeta de cresilo solamente fue en un 82.5%. Setenta frotis teñidos con esta técnica no se colorearon adecuadamente, por lo cual no se incluyeron en las gráficas de los distintos grupos estudiados; en el grupo de mujeres normales fueron 50, en el de niñas retrasadas mentales 14, hombres normales 1, mujeres con múltiples abortos 4, hombre con sospecha de Síndrome de Klinefelter 1.

En cuanto a los resultados obtenidos en los hombres normales, el mayor porcentaje de individuos fue negativo a cuerpos de Barr con ambas coloraciones (ver gráfica 3). Cuando se obtuvieron resultados positivos, el mayor porcentaje se observó con la coloración de fucsina fenicada.

Los valores encontrados en retrasados mentales del sexo femenino, con la coloración de fucsina fenicada, oscilan entre el 0 a 29% cuerpos de Barr, obteniéndose el mayor porcentaje entre 1 a 5% (ver gráfica 4). Con la coloración de violeta de cresilo los valores variaron de 0 a 10% cuerpos de Barr, observándose el mayor porcentaje de individuos con valores bajos de positividad.

La gráfica 5, correspondiente a valores obtenidos en retrasados mentales del sexo masculino, nos indica un porcentaje de individuos negativos al cuerpo de Barr; aunque en los pocos casos en que éste fue detectado se trataba de láminas coloreadas con fucsina fenicada.

Los resultados obtenidos en los frotis de mujeres -- con múltiples abortos coloreados con fucsina fenicada --- (gráfica 6), representan valores que oscilan entre 10 a 49% cuerpos de Barr, obteniéndose la máxima positividad a cuerpos de Barr entre 20 a 29%; en cambio con la coloración



ción de violeta de cresilo, variaron de 0 a 19%, obteniéndose el mayor porcentaje de 0 a 9% cuerpos de Barr.

Por comunicación personal con el Dr. Juan Antonio Pérez, la representación esquemática de las gráficas 1 a 6, es válida. Octubre de 1987.

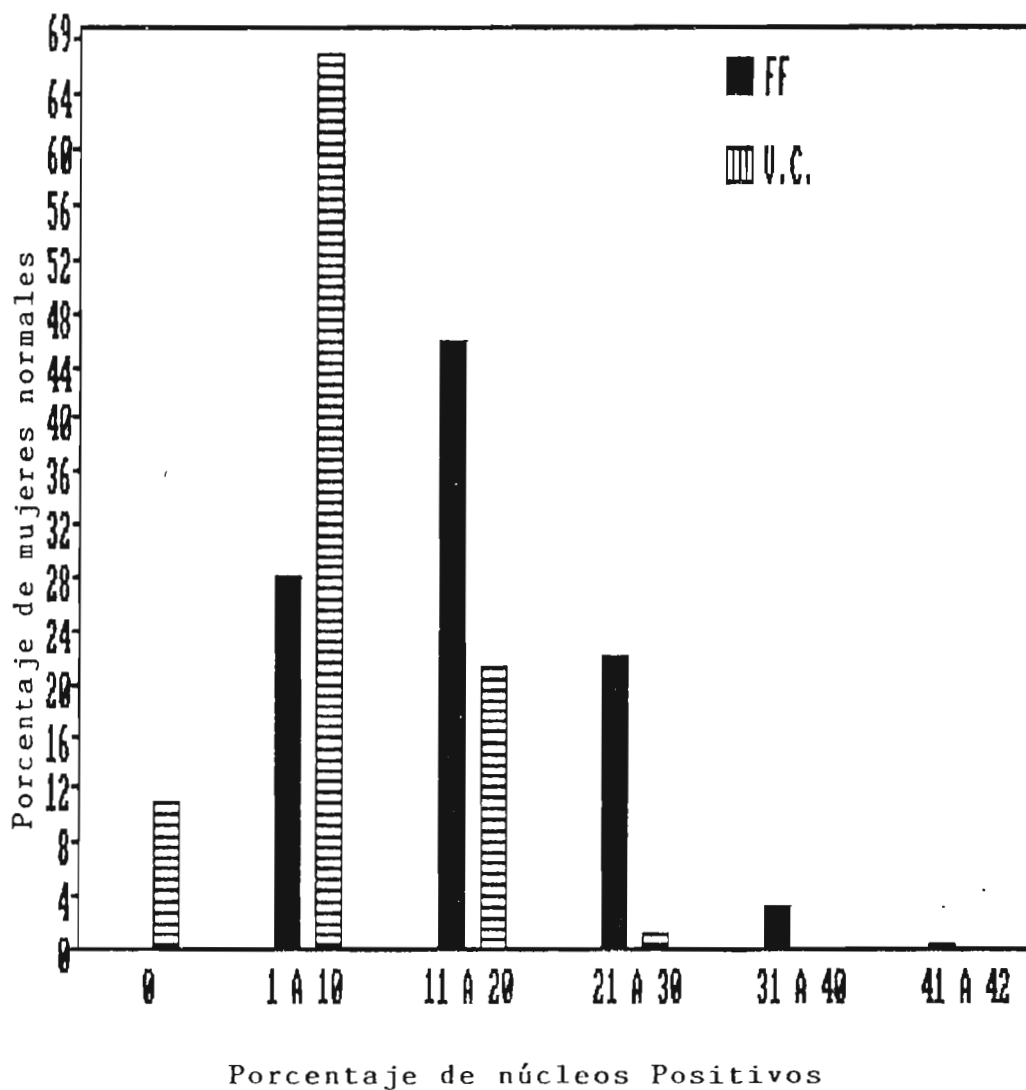
En el cuadro 1, se presentan los hallazgos de individuos con diagnóstico específico. Observamos que la positividad fue similar a la encontrada en sujetos normales.

Los datos obtenidos de positividad al cuerpo de Barr de los frotis, de ambos carrillos de un mismo individuo en una misma coloración, coincidieron.

**VII. GRAFICAS Y CUADROS**

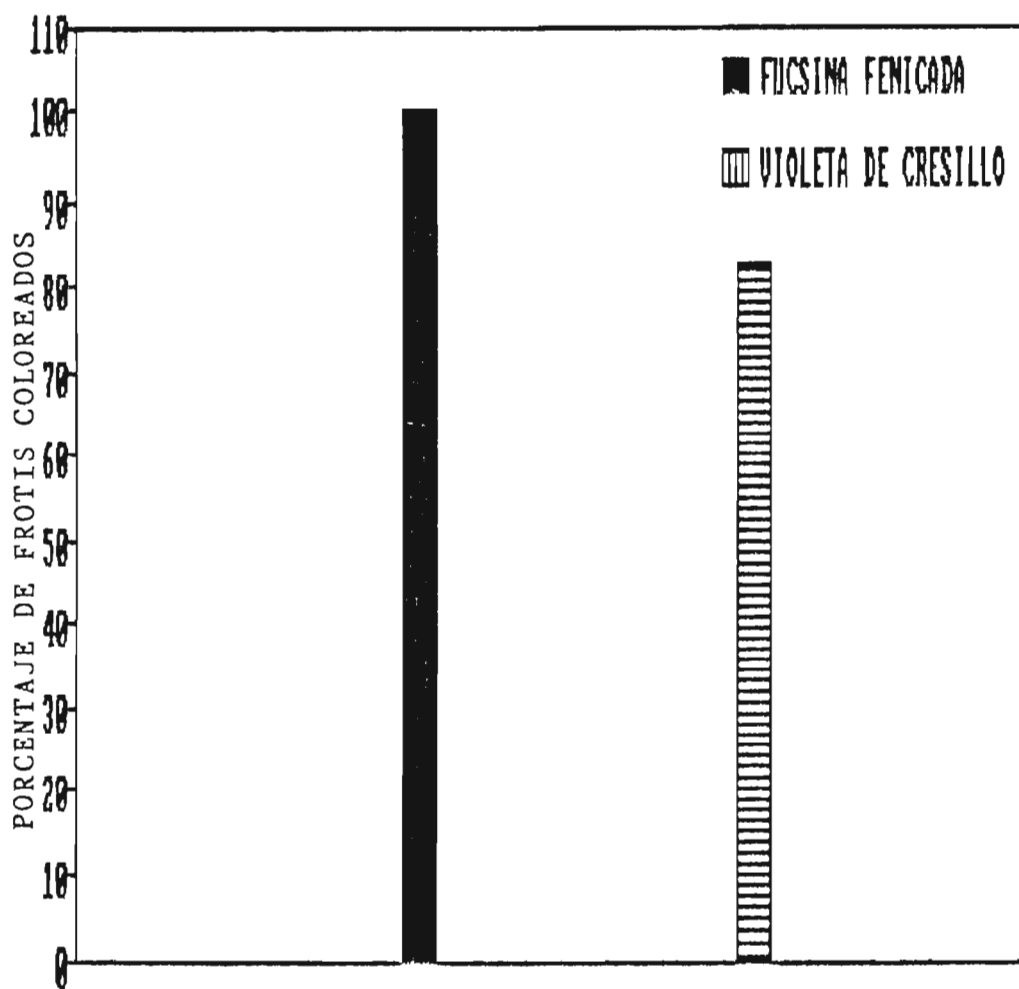
GRAFICA No. 1

Porcentaje de positividad al cuerpo de BARR en frotis de mucosa oral de 235 mujeres normales coloreados con Fucsina Fenicada (FF) y Violeta de Cresillo (V.C.)



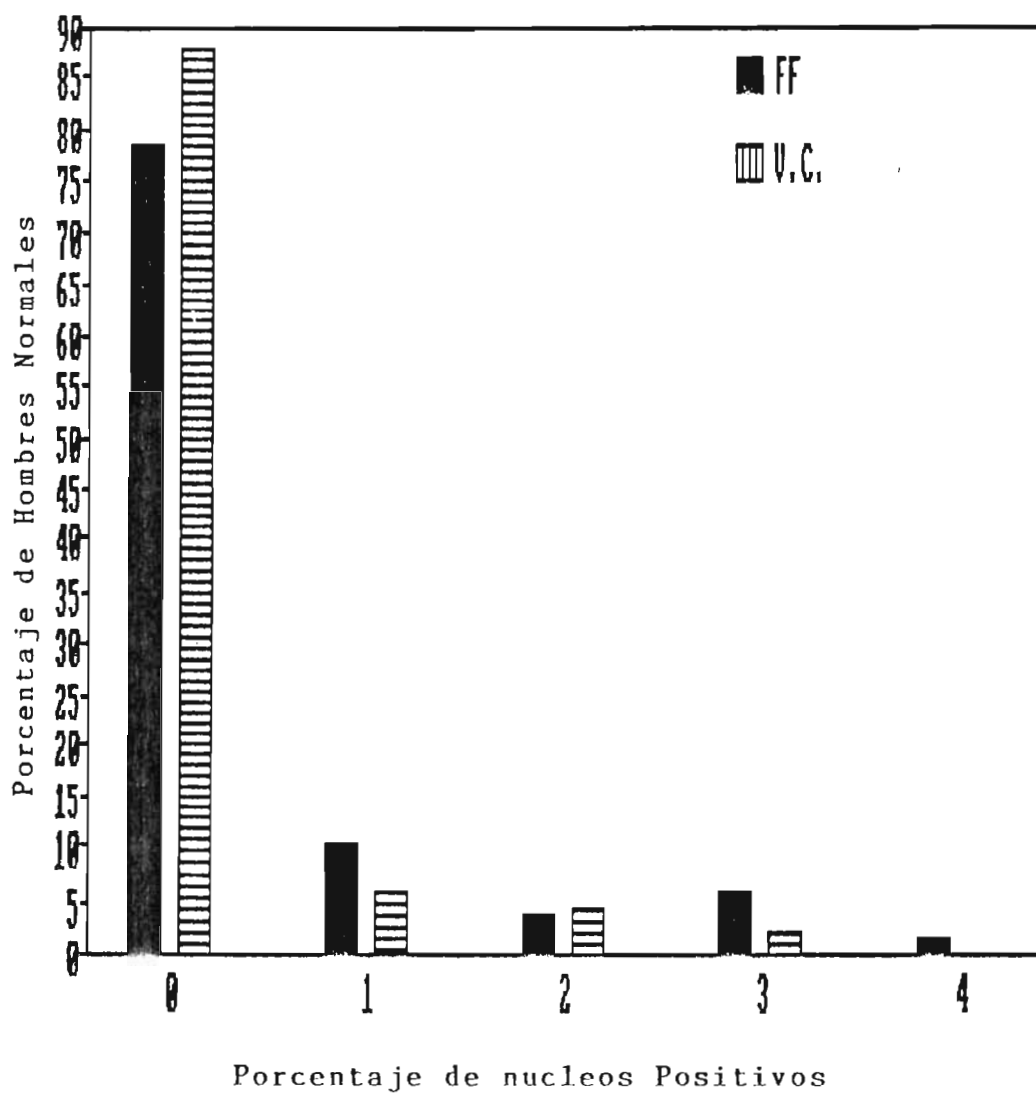
GRAFICA No. 2

GRAFICA REPRESENTATIVA DE PORCENTAJE DE FROTIS  
COLOREADOS SATISFACTORIAMENTE.



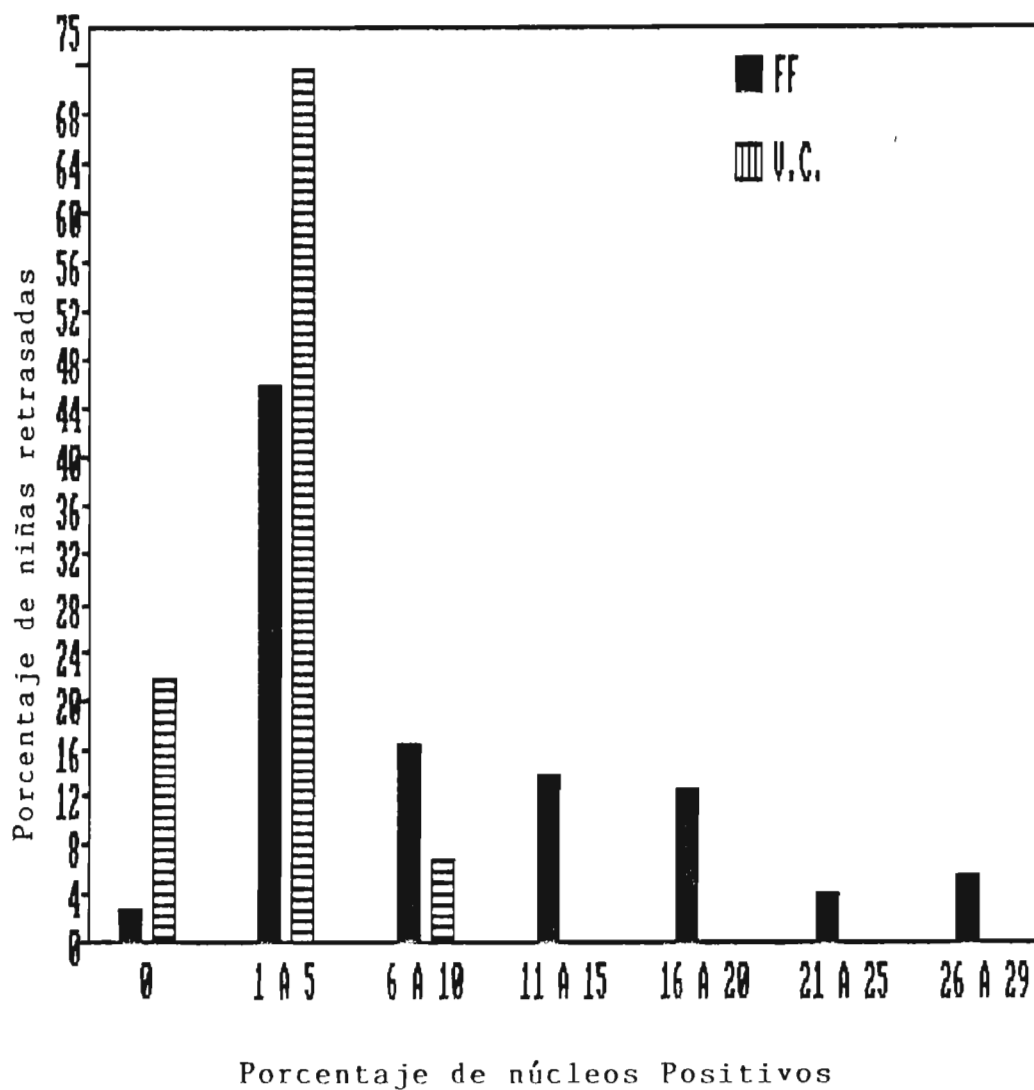
GRAFICA No 3

Porcentaje de positividad al cuerpo de BARR en frotis de mucosa oral de 51 hombres normales coloreados con Fucsina Fenicada (FF) y Violeta de Cresillo (V.C.)



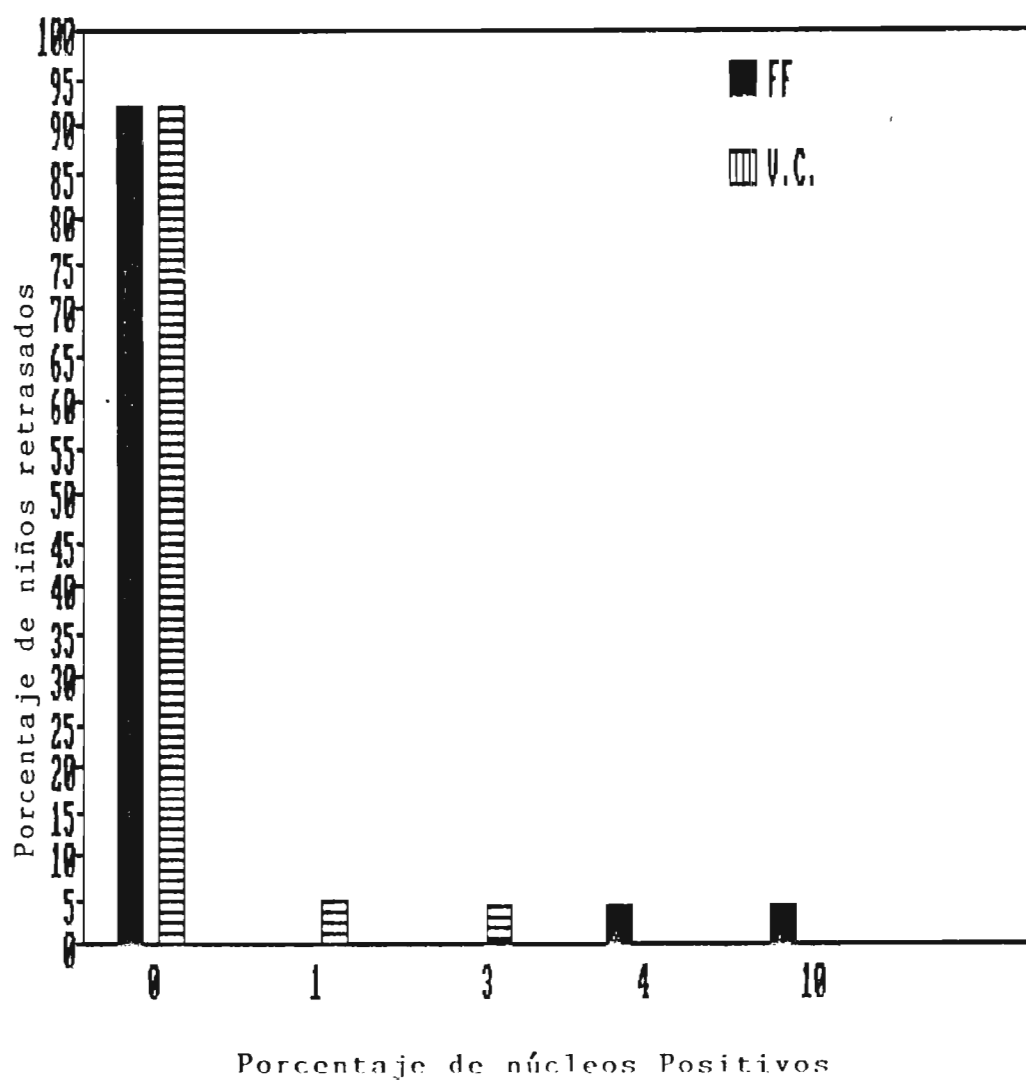
GRAFICA No 4

Porcentaje de positividad al cuerpo de BARR en frotis de mucosa oral de 74 niñas retrasadas mentales coloreados con Fucsina Fenicada (FF) y Violeta de Cresillo (V.C.)



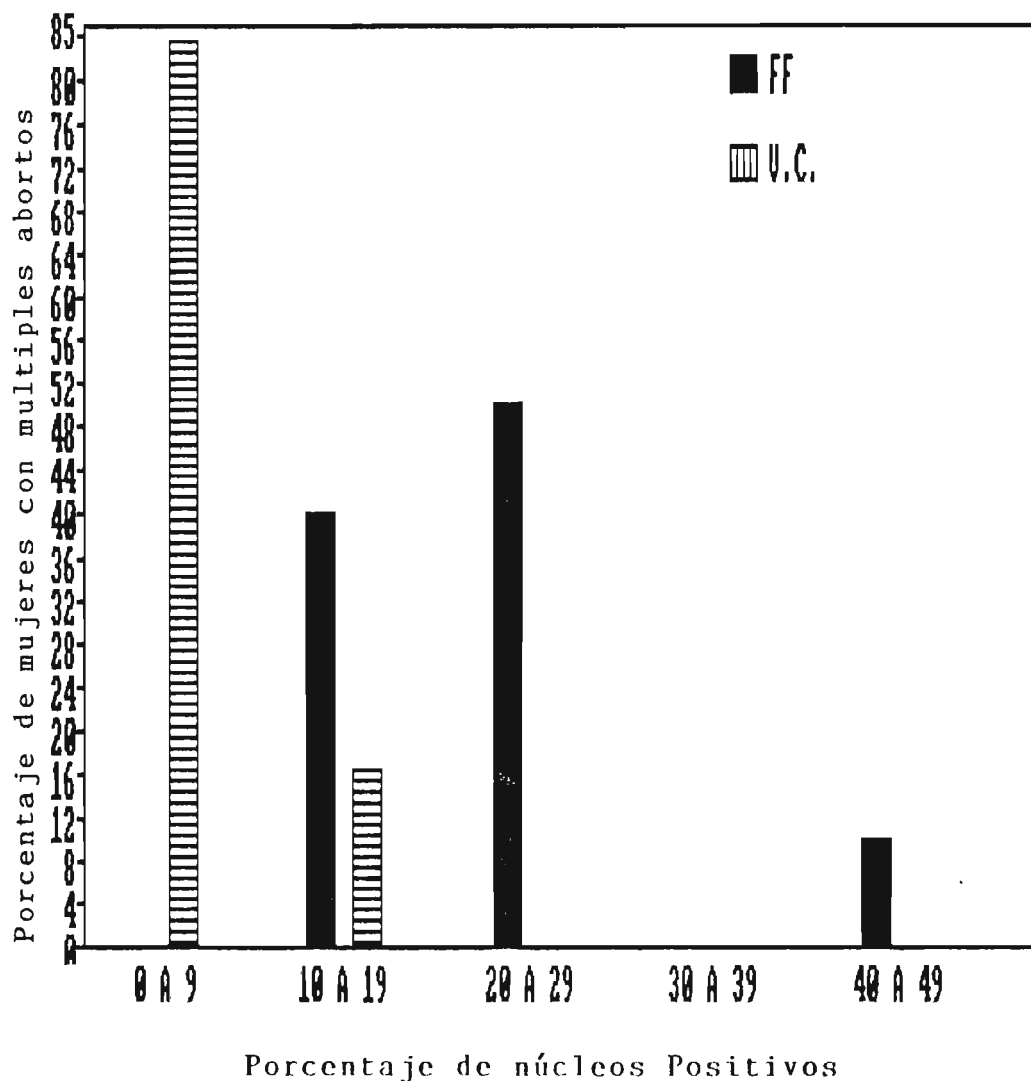
GRAFICA No. 5

Porcentaje de positividad al cuerpo de BARR en frotis de mucosa oral de 24 niños retrasados mentales coloreados con Fucsina Fenicada (FF) y Violeta de Cresillo (V.C.)



GRAFICA No. 6

Porcentaje de positividad al cuerpo de BARR en frotis de mucosa oral de 10 mujeres con multiples abortos coloreados con Fucsina Fenicada (FF) y Violeta de Cresillo (V.C.)





C U A D R O    N°   1

PORCENTAJE DE CUERPOS DE BARR ENCONTRADO EN SEIS SUJETOS CON DIAGNOSTICO ESPECIFICO.			
DIAGNOSTICO		Porcentaje de células con cuerpos de Barr	
		Fucsina fenicada	Violeta de Cresilo
1	Amenorrea primaria	20	2
1	Hombre con sospecha de Síndrome de Klinefelter	1	Insatisfactorio
1	Mujer estéril	28	22
1	Mujer estéril	38	0
1	Hombre estéril	0	0
1	Hombre con translocación genética	0	0

## VIII. DISCUSION

La coloración con fucsina fenicada para la investigación del cuerpo de Barr dio mejores resultados que la coloración de violeta de cresilo.

Este resultado podría explicarse en base a las diferencias de la composición de ambos colorantes (21).

### COMPOSICION QUIMICA DE LOS COLORANTES

NOMBRE DE LA TECNICA DE COLORACION	NOMBRE DEL COLORANTE	GRUPO AMINO			SOLUBILIDAD	
		Primario NH <sub>2</sub>	Secund. NHR	Terc. NR <sub>2</sub>	AGUA	ALCOHOL
FUCSINA FENICADA	Rosanilina, fucsina (anhidra)	3	-	-	0.39	8.16
VIOLETA DE CRESILO	Violeta de Cresilo	1	-	1	0.38	0.25

El colorante de la técnica de coloración de fucsina - fenicada se fija más fuertemente al cuerpo de Barr, debido a que posee tres radicales catiónicos (grupos aminos primarios NH<sub>2</sub><sup>+</sup>) los cuales se unen a los grupos aniónicos (residuos de ácidos fosfóricos) del DNA; además es más soluble en agua y en alcohol; en cambio la violeta de cresilo sólo

posee un radical catiónico primario y un terciario y por ello tiene menos afinidad por DNA; además es menos soluble en agua y en alcohol. Estos grupos aminos primarios, llamados auxocromos, en griego "aumentadores", actúan como donadores de electrones para el cromóforo y ayudan a fijar el colorante a los tejidos, intensificando su color. De acuerdo a esto, un colorante con más grupos catiónicos (aminos primarios), como el de la técnica de fucsina fenicada, posee mayores oportunidades de combinarse con los grupos aniónicos de la estructura del tejido a observar, formando un conjugado más fuerte, lo cual da una coloración más intensa y más estable que permite, por lo tanto, la identificación con mayor nitidez del cuerpo de Barr.

Otro factor que podría influir en este resultado es la composición del reactivo usado para la coloración (ver apéndice); la solución diluida de fucsina fenicada incluye además de la solución concentrada de fucsina básica, fenol al 5% en agua destilada, ácido acético glacial y solución de formol al 40%; puede apreciarse que combina de una sola vez: hidratantes (fenol), diferenciador (ácido acético glacial) y fijador (formol) (22). En cambio en la técnica de coloración de violeta de cresilo la solución del colorante se prepara solamente con agua destilada.

Además podría influir en la mayor eficacia de la técnica de fucsina fenicada comparada con la de violeta de cresilo para colorear el cuerpo de Barr, la secuencia de pasos en ambas técnicas, ya que en la técnica de fucsina fenicada una vez se ha secado el frotis, se introduce directamente en la solución diluida del colorante, en cambio en la técnica de violeta de cresilo, antes de colorearse el frotis, es sometido a una hidratación.

La técnica de fucsina fenicada resultó ser más fácil porque una vez preparados los reactivos, los pasos a seguir son seis y la de violeta de cresilo, once.

También resultó que el de fucsina fenicada es más rápido, ya que los pasos seriados se realizaron durante 23 minutos; en cambio el de violeta de cresilo se llevó a cabo en una hora con cuarenta y cinco minutos. Los reactivos de fucsina fenicada son más baratos y consumen menor cantidad de alcoholes.

Las técnicas mejoraron cuando los frotis se dejaron fijar a temperatura ambiente en vez de hacerlo con otros métodos.

Se constató que no se observó diferencia alguna en cuanto a la identificación del cuerpo de Barr, en las láminas que no fueron montadas con Bálsamo del Canadá, con las que se realizó el montaje, esto fue ventajoso, pues disminuyó el costo de las técnicas.

El porcentaje de positividad para el cuerpo de Barr en mujeres normales, resultó bajo comparado con el reportado por otros autores (9, 14, 15, 19, 22, 39), los cuales reportan datos entre el 15 al 90% en las células de mujeres cromosómicamente normales y en aproximadamente el 10% de las células de varones normales (14, 25).

Al analizar la gráfica 3, perteneciente a hembras con retraso mental, se obtuvieron algunos valores negativos y el mayor porcentaje bajo; hacemos notar que en este grupo se incluyeron en su mayoría niñas. Este resultado sugiere que el estado anormal de esas niñas podría tener relación con la baja positividad o negatividad al cuerpo de Barr. Esa aseveración podría comprobarse auxiliándose con otros análisis más concluyentes, similares a trabajos reportados por Maclean y colaboradores (23).

Con relación a los otros casos con diagnóstico específico, no podemos afirmar que exista relación alguna entre

el hallazgo o no del cuerpo de Barr y el estado patológico del individuo. Algunos autores han reportado que existe una relación entre casos patológicos como disgenesia gonadal (10), problemas mentales (13), amenorrea primaria (16), muerte de recién nacidos (32), y la observación de anomalías en calidad o en número del cuerpo de Barr. Sin embargo, para concluir en estos casos se necesitan estudios cromosómicos más completos como el cariotipo.

## IX. RECOMENDACIONES

Tomando en cuenta los resultados anteriores se recomienda:

1. Utilizar la coloración de fucsina fenicada como una técnica auxiliar para el diagnóstico en pacientes - con hermafroditismo y pseudohermafroditismo sobre cuyo sexo se tienen dudas.
2. Por la actual crisis económica que atraviesa el país, es aconsejable fijar las muestras por el simple método de secado al aire, con lo cual se obtienen buenos resultados disminuyendo el costo de la prueba.

## X. APENDICE

REACTIVO DE LA COLORACION DE FUCSINA FENICADA.

### SOLUCION CONCENTRADA:

Fucsina básica (CF-41, Colleman y Bell) ... 3 gr.

Alcohol etílico al 70% ... 100 ml.

Se mezcla y se filtra. Puede conservarse por tiempo indefinido a temperatura ambiente, en frasco ámbar hermético.

### SOLUCION DILUIDA:

Solución concentrada de fucsina básica ... 10.0 ml.

Fenol al 5% en agua destilada ... 90.0 ml.

Acido acético glacial ... 10.0 ml.

Solución de formol al 40% ... 10.0 ml.

Se mezcla y se deja en un frasco ámbar hermético durante 24 horas cuando menos. Debe volverse a preparar cada mes o con mayor frecuencia si se tiñe gran cantidad de frotis conservándolo a temperatura ambiente.



**REACTIVO DE LA COLORACION DE VIOLETA DE CRESILO:**

Violeta de cresilo o acetado de cresilo ... 2 gr.  
(resistente)

Agua destilada ... 100.0 ml.

Se deja reposar de 24 a 48 horas en un frasco ámbar y se filtra antes del uso. Es estable a temperatura ambiente por varios meses.

## MATERIAL UTILIZADO:

- Microscopio
- Autoclave
- Balanza analítica
- Incubadora
- Alcoholímetro
- Cronómetro
- Embudos
- Papel filtro
- Beaker de 250 ml.
- Probetas de 1000 y 100 ml.
- Canastillas o cubetas de vidrio
- Portaobjetos 3" x 1" por 1.0 mm grosor
- Agitadores
- Cubreobjetos 22 x 50 mm.
- Frascos ámbar de 1 litro
- Bajalenguas
- Gasa
- Vasos descartables
- Cajas para guardar láminas
- Alcohol al 95%
- Alcohol absoluto
- Alcohol al 50%

- Alcohol al 70%
- Agua destilada
- Violeta de cresilo al 2%
- Xilol
- Bálsamo del Canadá
- Fucsina básica (CF-41 Colleman)
- Alcohol etílico al 70%
- Acido acético glacial
- Solución de formol al 40%
- Contómetro
- Reloj marcador
- Albúmina
- Alcohol-eter
- Vasos de Coplin
- Aceite de inmersión

Fecha: \_\_\_\_\_ Expediente No. \_\_\_\_\_  
 NOMBRE: \_\_\_\_\_ EDAD: \_\_\_\_\_ ESTADO CIVIL: \_\_\_\_\_  
 OCUPACION: \_\_\_\_\_ LUGAR DE NACIMIENTO: \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_ FECHA: \_\_\_\_\_ NUMERO DE FICHA: \_\_\_\_\_  
 DIRECCION: \_\_\_\_\_ TELEFONO: \_\_\_\_\_  
 PESO: \_\_\_\_\_ ALTURA: \_\_\_\_\_.

## HISTORIA FAMILIAR.

HIPERTENSION \_\_\_\_\_ CANCER \_\_\_\_\_ CARDIOPATIA \_\_\_\_\_  
 DIABETES \_\_\_\_\_ EPILEPSIA \_\_\_\_\_ GELERA \_\_\_\_\_  
 ANOMALIAS CONGENITAS \_\_\_\_\_.

## HISTORIA PERSONAL.

ANTECEDENTES PERSONALES: DIETA \_\_\_\_\_ PESO PREVIO \_\_\_\_\_ LBS. TIPO SANG. \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_  
 ALERGIA \_\_\_\_\_ ALCOHOL \_\_\_\_\_ CIGARRO \_\_\_\_\_ DROGAS \_\_\_\_\_  
 FARMACOS \_\_\_\_\_ CAFE \_\_\_\_\_ CIRUGIA \_\_\_\_\_ RUBECOLA \_\_\_\_\_  
 TRANSFUSIONES \_\_\_\_\_.

ANTECEDENTES PATOLOGICOS: TORCH \_\_\_\_\_ IVU \_\_\_\_\_ CANCER \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_  
 CARDIOPATIA \_\_\_\_\_ DIABETES \_\_\_\_\_  
 HIPERTENSION \_\_\_\_\_ EPILEPSIA \_\_\_\_\_

ECOLOGICO SOCIAL: VIVIENDA \_\_\_\_\_ HIGIENE \_\_\_\_\_ EDUCACION \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_

DATOS SOBRE EL MARIDO: EDAD \_\_\_\_\_ OCUPACION \_\_\_\_\_ PESO \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_  
 ALTURA \_\_\_\_\_ ESTADO DE SALUD \_\_\_\_\_  
 SEROLOGIA \_\_\_\_\_.

## HISTORIA GINECO-OBSTETRICA.

ANTECEDENTES GINECOLOGICOS: MENARQUIA \_\_\_\_\_ RITMO MENSTRUAL \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_  
 LEUCORREA \_\_\_\_\_  
 VENEREAS \_\_\_\_\_ SIFILIS \_\_\_\_\_  
 CONTROL CITOLOGICO \_\_\_\_\_.

ANTECEDENTES OBSTETRICOS: PARIDAD: G \_\_\_\_\_ P \_\_\_\_\_ P \_\_\_\_\_ A \_\_\_\_\_ V \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_

Descripcion de cada uno de los embarazos, partos y puerperio

P1: FECHA \_\_\_\_\_ AMENORREA \_\_\_\_\_ VIA \_\_\_\_\_  
 NACIO VIVO \_\_\_\_\_ APGAR \_\_\_\_\_ LORO AL NACER \_\_\_\_\_  
 CIANOSIS \_\_\_\_\_ ICTERICIA \_\_\_\_\_ TAMANO \_\_\_\_\_  
 PESO \_\_\_\_\_ TALLA \_\_\_\_\_ COMPLICACIONES \_\_\_\_\_

DESCRIPCION DE OTROS EMBARAZOS, PARTOS Y PUERPERIO \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_.

## XI. BIBLIOGRAFIA

1. Almendares, S. "Citogenética Humana Normal y Patológica", 1a. Ed. Editorial Interamericana., 68-85, 1968.
2. Barr, M.L.: The significance of the sex chromatin. Int. Rev. Cytol., 19: 35-89, 1966.
3. Barr, M.L.: Sex Chromatin, Science., 130: 1302, 1959.
4. Barr, M.L.: Sex Chromatin and Phenotype in man. Science., 130: 679-685, 1959.
5. Berríos, J.H.; Alvarenga, J.R.; Arita Lara, D.L.: Reporte Preliminar de la Citología de los cromosomas. Memoria X Congreso Médico Centroamericano y IV Congreso Latinoamericano de Anatomía Patológica; 324-331, 1963.
6. Bloom and Fawcett.: "A textbook of Histology" 11a. Ed. W.B. Saunders Company, Philadelphia; 35-43, 1986.
7. Cormarck, D.H.: "Fundamentos de Histología". 8a. Ed. Harla, S. A. de C. V., 8-10, 1986.
8. Dykstra, P.C.: The morphology of the sex chromatin in the smear of human oral mucosa. Am. J. Clin. Path., 30: 224-227, 1958.

9. Eggen, R.R.: "Chromosome Diagnostic in Clinical Medicine". Charles C. Thomas, Springfield, III., 63-76, 203-225, 252-278, 1965.
10. Ford, C.E.; Jones, K.W.: A Sex-chromosome anomaly - in a case of gonadal dysgenesis (Turner's Syndrome), Lancet., 1:711, 1959.
11. Greenblatt, R.B.; Mateo de Acosta, O.; Vásquez, E., and Mullins, D.F., Jr.: Oral mucosal smears in ---- detection of genetic sex, J.A.M.A., 161: 683-685, 1956.
12. Grob, H.S. and Kupperman, H.S.: Experiences with Technics of cromatin sex determination, Am. J. Clin. Path., 36: 132-138, 1961.
13. Gunnar Hambert, H.F.: Incidence of Klinefelter's syndrome among mental patiens. Lancet., 1: 1327, 1963.
14. Ham, A.W.; Cormark, D.H : "Tratado de Histología" 8a. Ed. Editorial Interamericana. 96-105, 1983.
15. Jacobs, P.A.; Baikie, A.G.; Court Brown, W.M.: Evidence for the existence of the human "Super female", Lancet., 2: 423-425, 1959.
16. Jacobs, P.A.; Harden, D.G.; Bucton, K.E. et al.: Cytogenetic studies in primary amenorrhoea. Lancet., 1: 1183-1188, 1961.
17. Junqueira, L.C ; Carneiro.: "Histología Básica". 2a. Edición. Salvat Editores, 1-15, 31-51, 1981.

18. Keith Moore.: "Clinically Oriented Anatomy" Williams and Wilkins, 415, 1983.
19. Leeson, C.R.; Leeson, T.S.: "Histología" 3a. Ed. Nueva Editorial Interamericana, S. A. de C. V. 16-59, 1977.
20. Leopold, G.; Koss, M.D.: "Diagnostic Cytology and its Histopathologic Bases" 2a. Ed. J.B. Lippincott Company, 82-92, 1968.
21. Lillie.: Histopathologic technic and practical histochemistry, 3a. Ed., Mc Graw-Hill, 107-144, 1965.
22. Lynch, M.J.; Raphael, S.; Mellor, L.D.; Spare, P.D.; Inwood, M.J.: "Métodos de Laboratorios" 2a. Ed. Editorial Interamericana, México, 1378-1426, 1972.
23. Maclean, N.; Mitchell, J.M. et al.: A survey of sex-chromosome abnormalities among 4514 mental defectives. Lancet., 1: 293-296, 1962.
24. Manni, D.S.: The use of the smear in sex determinations. Am. J. Med. Technol., 26: 291-293, 1960.
25. Marberger, E.; Boccabella, R.A. and Nelson, W. A.: Oral smear as a method of chromosomal sex detection. Proc. Soc. Exper. Biol. Med., 89: 488-489, 1955.
26. Moore, K.L. and Barr, M.L. Smear from the oral mucosa in the detection of chromosomal sex. Lancet., 2: 57, 1955.

27. Mundal, S.: Origin of the barr body. *Lancet.*, 2: 1384-1385, 1962.
28. Organización Panamericana de la Salud, OPS,: Manual de Normas y Procedimientos para el control del cáncer de Cuello uterino. Serie Poltex para ejecutores de programas de Salud, 11-14, 1985.
29. Olmsted, E.G.: Sequential analysis in the assignment of chromatin patterns in smear of oral mucosa. *Am. J. Clin. Path.*, 32: 346-349, 1959.
30. Pansegrau, D.G.; Peterson, R.E.: Improved staining of sex chromatin. *Am. J. Clin. Path.*, 47: 266, 1964.
31. Passmore, R.; Robson, J.S.; Tratado de enseñanza integrada de la medicina, la. Ed. en español. Editorial Científico Médico, Tomo I: 12-16, 12-17, Tomo II: 31-17 a 31-24, 1971.
32. Robinson, A.: Neonatal deaths and sex-chromosome -- anomalies. *Lancet.*, 1: 1233, 1974.
33. Robbins, S.L.: "Patología estructural y funcional". 1a. Ed. Nueva Editorial Interamericana, S. A. de C.V., 176-180, 1975.
34. Sanderson, A.R.: Rapid Nuclear sexing. *Lancet.*, 1: 1252, 1960.



35. Smith, D.W.; Marden, R.M.; McDonald, M.J. and ----  
Speckhard, M.: Lower incidence of sex chromatic in  
bucal smears of newborn females. *Pediatrics.*, 30:  
707-711, 1962.
36. Soto, J.A.: Diagnóstico prenatal del sexo por la  
cromatina sexual de células del líquido amniótico  
humano. Tesis No. 602, ejemplar 3, 23-42, 1960.
37. Thuline, H.C.: A technique for nuclear sexing, *Lan-  
cet.*, 2: 1310-1311, 1961.
38. Thompson y Thompson.: "Genetic in Medicine", 3a. Ed.  
W.B. Saunders: 168 - 80, 1980.
39. Todd, Sanford, Davidsohn.: " Diagnóstico y tratamien-  
to Clínico para el laboratorio" John Bernard Henry,  
7a. Edición, Salvat Editores, S. A., 819-822, 1984.
40. Zuher, M.N.: Exfoliative Cytopathology. 2a. Edición,  
by Little, Brown and Company., 493-494, 1976.