

Pretratamiento con soluciones hipotónicas y reacción nucleal de Feulgen-Rossenbeck, para el estudio de los cromosomas del toro (*Bos taurus*)

Prof. Dr. J. POSTIGLIONI—GRIMALDI

(Director del Instituto de Anatomía Normal, Jefe de Servicio de Fomento Ganadero de la Dirección de Ganadería)

Departamento de Citogenética, Instituto de Investigación de Ciencias Biológicas y Laboratorio de Histología y Embriología, Instituto de Anatomía Normal, Facultad de Veterinaria.

(Recibido para su publicación el 20 de Setiembre de 1956).

INTRODUCCION

El estudio de los cromosomas ha adquirido una importancia tan extraordinaria, que ya no es posible encarar una serie grande de problemas biológicos sin el conocimiento adecuado de esas formaciones fundamentales de los organismos. El destacado citogenetista compatriota, Prof. Fco. A. Sáez, —director del Departamento de Citogenética del Instituto de Investigación de Ciencias Biológicas—, expresa, al respecto, lo siguiente en la excelente obra de Citología General (1) de la cual es co-autor: “El gran interés despertado por el estudio de los cromosomas, radica en que son éstos entidades responsables, no sólo de los fenómenos de variación, herencia, mutación y evolución de los seres vivos, sino que también constituyen los instrumentos que controlan la morfogénesis de todos los organismos, y son indispensables para el mantenimiento del equilibrio de los procesos vitales. El progreso sorprendente a que ha llegado, en los últimos años, el

“estudio de su comportamiento y estructura ha conducido a encarar, bajo puntos de vista totalmente nuevos, numerosos problemas que significan una verdadera revolución dentro de las ciencias biológicas.”

Es evidente que el conocimiento de los cromosomas y de su comportamiento, en nuestras especies domésticas, es de fundamental importancia, dada la elevada posición, —que la mayoría de ellas—, ocupan en la industria ganadera del país. Si bien es cierto, que varios autores se han ocupado de estudiar los cromosomas en animales domésticos, pocos son los trabajos considerados y tenidos en cuenta por los investigadores más recientes; la razón principal de ello parece ser de orden técnico, como veremos.

En cuanto concierne al ganado vacuno, siete eran los autores que habían estudiado los cromosomas, al tiempo de iniciar el presente autor, diversas técnicas orientadas en ese sentido sobre la base de la reacción nucleal de Feulgen-Rossenbeck, no utilizada entonces, en esa especie animal. Los trabajos publicados hasta el año 1951 (2) sobre el asunto fueron debidos a K. von Bardeleben (1892), E. Schoenfeld (1902), L. Van Hoof (1913), K. Masui (1919), J. E. Wodsdalek (1920), H. F. Krallinger (1927, 1928, 1931) y S. Makino (1944). Todos estos autores efectuaron sus trabajos sobre materiales fijados, incluidos en parafina, seccionados con el micrótopo y coloreados con anilinas diversas.

Los resultados obtenidos por los primeros de los autores mencionados, se caracterizaron por las discrepancias, en especial modo, en cuanto al número de cromosomas que cada uno asignaba a la especie animal en cuestión. Así von Bardeleben (1892) llegó a contar 16 cromosomas como número diploide; Schoenfeld (1902) dió un número aproximado de 20-25 para el complejo diploide y 12 para el haploide; Van Hoof (3) encontró de 20 a 24 cromosomas, para el diploide y 12 para el haploide; Masui (4) cuenta 33 cromosomas diploides y observó un elemento impar que consideró como el cromosoma X; de acuerdo a Wodsdalek (5) el número diploide sería de 37 en el macho y 38 en la hembra, de donde deduce que los cromosomas sexuales de *B. taurus* respondían al tipo XO-XX. Al respecto de esos desacuerdos expresa S. Makino (6); “It is clear by reference to the recent studies that “these discrepancies and very low count of the chromosome number as reported by earlier authors may have arisen from observations with material of inadequate preservation. They all are very far from exactness, and therefore no appreciable at all “at the present time. The studies made by Krallinger (‘27, ‘28, ‘31) were quite remarkable and valuable in establishing very

“clearly the characteristic morphology of the cattle chromosomes. “He found 60 and 30 to be diploid and haploid number of domestic cattle respectively. He pointed out a V-shaped element of medium size as the X chromosome, because of the fact that it destitute of the homologous mate in the diploid complex, but his material proved to be entirely unfavourable to the study of the maturation division, due essentially to inadequate technique.” Krallinger (7), (8) y (9), utilizó la fijación con el Bouin-Allen y coloreó con hematoxilina férrica de Heidenhain. S. Makino (6) empleando el Champy y el Flemming sin ácido acético, luego coloración con hematoxilina férrica de Heidenhain, confirma los resultados de Krallinger, en cuanto al número de cromosomas en *B. taurus*; 60 en el diploide y 30 en el haploide; pero critica los resultados de aquel autor con respecto al cromosoma sexual, llegando a la conclusión de la existencia del tipo X-Y, el cual describe en la metafase I.

A fines de 1955, mientras estaba el presente autor redactando un trabajo sobre técnica para el estudio de los cromosomas del toro, aparecido recientemente (10), tuvo oportunidad de leer las publicaciones de Y. Melander y O. Knudsen (11) así como la de O. Knudsen (12), referentes a estudios cariológicos en la espermatogénesis del toro; dichos autores utilizan la fijación con alcohol-acético (3|1), la técnica de aplastados y además inclusión en parafina, coloreando con hematoxilina de Gomori de acuerdo a la técnica de Y. Melander y K. G. Wingstrand (13), para cromosomas. Los resultados obtenidos por estos autores son excelentes; ellos confirman el número diploide para los cromosomas del toro, señalado primeramente por Krallinger y luego Makino; además, hacen un detallado estudio del comportamiento de los cromosomas durante la espermatogénesis en esa especie animal.

Como el autor ha anunciado (10), estamos trabajando con las técnicas empleadas por Melander y Knudsen, y Knudsen, lo que será motivo de publicación en colaboración con el Bachiller Joaquín Rossi en estos Anales de la Facultad de Veterinaria; en dicho trabajo habremos de ocuparnos de los resultados obtenidos por los autores citados. En el presente trabajo solamente corresponde referirnos a la técnica a la cual hemos llegado para el estudio de los cromosomas del toro con el empleo de soluciones hipotónicas y la reacción nucleal de Feulgen - Rossenbeck, empleada por vez primera por el presente autor (10). Respecto al estudio cariológico de la espermatocitogénesis del toro con la técnica del autor, será motivo de próxima publicación.

Mientras tanto y, para mejor ilustración, mencionaremos los

siguientes antecedentes técnicos: es bien conocido que el estudio de los cromosomas en aquellos organismos que los poseen en elevado número y pequeñas dimensiones, ha presentado siempre serias dificultades técnicas. Los mamíferos en general, y el toro en particular, se encuentran entre los animales que mayores inconvenientes han presentado desde ese punto de vista. Matthey (14), en su fundamental obra sobre los cromosomas de los vertebrados, divide en tres períodos el desarrollo de las técnicas empleadas para el estudio de los cromosomas en mamíferos: el primer período lo constituye la era de los tanteos iniciales, y nada ha quedado de los trabajos realizados entonces; el interés de los mismos, —expresa el citado autor—, es puramente histórico. En el segundo período, se inician las contribuciones de los autores que utilizan como fijadores el Flemming acético y el Bouin - Allen; a partir de 1920, aparecen muchas numeraciones de cromosomas de diversos mamíferos, a menudo exactas. Desde principios de siglo, Winiwarter había preconizado el Flemming acético y con ello realiza obra de precursor. A partir de 1920 entra en voga el empleo del Bouin - Allen. Painter (1922 - 1930) establece la fórmula cromosómica de varios mamíferos y descubre la generalidad del esquema X - Y. Su técnica continuará siendo empleada por la escuela anglo - sajona. Sin embargo, ya en 1928, Minouchi abría nuevas perspectivas a la investigación, al emplear sus fijadores sin ácido acético, lo que constituyó una verdadera revolución en materia técnica y, a la vez, permitió a la escuela japonesa abordar, con excelentes resultados, innumerables investigaciones sobre cromosomas de numerosas especies animales, aún de aquellos con elevado número y pequeñas dimensiones. Como ya hemos hecho referencia, S. Makino estudió también los cromosomas del toro, para lo cual utilizó los fijadores de Minouchi y con ello aclaró una serie de nuestros conocimientos. La excelencia de los resultados obtenidos por la escuela japonesa con los fijadores de Minouchi, marca una época en el desarrollo de la técnica.

Según información que ha podido lograr el autor, es en el año 1952 que se inicia lo que el autor considera como un nuevo período en el aspecto técnico del estudio de los cromosomas de mamíferos, con la publicación debida al mismo Makino en colaboración con Nishimura (15), quienes emplean el pretratamiento con agua y la técnica de aplastados, a fin, —como dicen esos autores—, de simplificar la técnica de preparación de cromosomas, especialmente en testículos de insectos, aunque también la ensayen en diversos mamíferos. Al respecto es interesante reproducir las siguientes frases de los autores en dicha publicación: "Though

" a surprising advance has been made on the chromosome study
" of animals based on classical methods (fijación, inclusión en
" parafina, etc.), there seems to be little prospect for further
" progress. A new approach to the problem involved is through the
" application of the squash or smear technic, borrowed from plant
" cytology". La técnica preconizada por esos autores, consiste
esencialmente en el pretratamiento con agua, fijación acética,
coloración con fuchsina y aplastado del material. En la extensa
lista de animales utilizados para la aplicación de esa técnica, los
autores incluyen a *Bos taurus*; pero, ningún resultado es dado a
conocer, limitándose tan sólo a citar la especie animal.

En 1952, Hughes (16), estudiando los efectos de tonicidad
anormal sobre células en división procedentes de cultivos de tejido
de pollo, encontró que soluciones hipotónicas preparadas a partir
de solución Tyrode normal, podían ser utilizadas para el conteo
de los cromosomas en el pollo y sugirió la idea de su aplicación
también a otros animales con elevado número de cromosomas.

Al mismo tiempo, sin conocer el trabajo mencionado de
Hughes, y debido a un accidente en las manipulaciones, Hsu (17),
halla, en cultivos de tejidos de piel y bazo de embrión humano,
lavados con solución Tyrode hipotónica (en lugar de hacerlo con
la solución isotónica), placas metafásicas y anafásicas con sus
cromosomas esparcidos como para permitir el conteo de éstos.
En 1953, Hsu y Pomerat (18), utilizando la técnica de pretrata-
miento con soluciones hipotónicas en cultivos de tejidos de diver-
sos animales de laboratorio, así como de tumores humanos, con-
cluyen que el método puede dar buenos resultados en el estudio
de los cromosomas en aquellos animales que poseen elevado
número. En adelante, Hsu y Hsu y colaboradores, continuarán
empleando la técnica de cultivos de tejido y pretratamiento con
soluciones hipotónicas, creada por ellos para el estudio de cromo-
somas, aplicándola sobre todo a tejidos neoplásicos (19), (20), etc.

Información obtenida posteriormente a la remisión del tra-
bajo del autor (10) para su publicación, le han hecho conocer
que J. Wahrman y A. Zahavi (21) y (22), habían empleado solu-
ciones hipotónicas Tyrode, de acuerdo a Hughes, y también solu-
ciones hipotónicas de NaCl, en sus estudios sobre cromosomas de
roedores.

Según conocimiento del autor, ningún método satisfactorio de
cultivo de espermatozoides ha sido desarrollado aún, y como su
principal interés, —en estos momentos—, es el estudio de los
cromosomas en testículo de toro, es que se ha decidido por la
técnica motivo de este trabajo, empleando pretratamiento con

soluciones hipotónicas. La técnica que se describe más adelante, consiste esencialmente en recoger lo más rápidamente posible el material de testículo de bovino, someterlo inmediatamente al pretratamiento con soluciones hipotónicas, luego fijar en alcohol-acético (3|1), someterlo a la reacción nuclear de Feulgen - Rossenbeck y realizar, finalmente, aplastado del material, de acuerdo al proceder corriente.

Considera el autor, por la información que posee, que es la primera vez que se aplica a material de bovino el método de pretratamiento con soluciones hipotónicas y la reacción nuclear de Feulgen - Rossenbeck, así como por vez primera éste método es utilizado en células germinales de mamíferos.

Los motivos principales que han llevado al autor a lograr la técnica mencionada anteriormente han sido, por una parte, mejorar las técnicas para el estudio de los cromosomas del toro, así como de otras especies animales que presenten dificultades semejantes, como ya se ha señalado; y, por otra parte, poner en evidencia los cromosomas y detalles estructurales del mismo con el mejor método conocido actualmente para la detección del ácido desoxiribonucleico, componente fundamental de esas formaciones, lo que habrá de permitir, además, otros estudios relativos al mencionado ácido, en cuanto respecta a las diversas fases de la mitosis y estados del proceso meiótico.

MATERIAL Y METODOS

El material utilizado procedió de siete testículos de diferentes vacunos Hereford, entre 8 meses y 6 años de edad, recogidos en la playa de faenas del Frigorífico Nacional, inmediatamente después del golpe de marrón y antes de la sangría. Otros tres testículos fueron obtenidos por castración de tres bovinos de 8, 9 y 18 meses de edad, en el Laboratorio de Biología Animal "Doctor Miguel C. Rubino"; y otro testículo se obtuvo por castración de un ternero de unos 8 meses de edad, en el Instituto de Anatomía Normal de la Facultad. Ninguno de los animales mencionados presentó signos aparentes de enfermedad y los antecedentes, sobre todo de los cuatro últimos animales mencionados, eran de buena salud. En cuanto a los faenados en el establecimiento frigorífico, después de la extracción del material, no presentaron otras afecciones que las corrientes en esta especie animal (algunos de ellos con equinocosis, otros con equinocosis y distomatosis).

Pretratamiento. — Cuando el autor inició los ensayos de pretratamiento con soluciones hipotónicas, solamente conocía al res-

pecto, la publicación de Hsu y Pomerat (19), quienes trataron sus cultivos de tejido con solución hipotónica durante 20 a 30 minutos, luego fijaron con Zenker - Helly y colorearon con hematoxilina de Delafield. No expresándose, en dicha publicación, ni el tipo ni el grado de tonicidad de la solución hipotónica empleada, ensayé con una solución de Ringer hipotónica preparada a partir de una solución madre de Ringer (sin NaCl ni HNa_2CO_3), la cual diluí con solución fisiológica de NaCl, después de llevar 10 cc. de esa solución madre hasta 100 cc. por adición de agua destilada; 40 cc de esta dilución fueron agregados a 60 cc de solución fisiológica de NaCl. Por otra parte empleé solución hipotónica de NaCl, preparada a partir de solución fisiológica de NaCl, la que diluí con agua destilada de manera de obtener una concentración de 4,5 grs. de NaCl por mil de solución. El autor debe aclarar que en el trabajo de Hsu y Pomerat citado, estos autores mencionan los trabajos de Hughes (16) y Hsu y Pomerat (18); pero, el autor no los había podido obtener aún, lo que logró más tarde, gracias precisamente a la gentileza de Hsu.

Hsu y Pomerat (18) utilizan una solución salina de Gey, diluída con solución de Gey sin NaCl. Casi al mismo tiempo, tuvimos oportunidad de conocer la publicación de Hughes (16) y, atento al cuidadoso estudio llevado a cabo por este autor, resolví emplear las soluciones hipotónicas sugeridas por él. Las soluciones Tyrode hipotónicas fueron entonces preparadas de acuerdo a Hughes (16), es decir, a partir de solución Tyrode normal, la cual se diluye con solución Tyrode sin NaCl, de manera de obtener concentraciones en NaCl de 10, 15, 20, etc., por ciento de la solución normal.

Pequeños trocitos de cada material fueron sumergidos en las soluciones hipotónicas, inmediatamente de extraído el testículo del animal. La temperatura de las soluciones hipotónicas fué, en general, de 15 a 16 grados C. y, en ciertos casos, se la mantuvo a 37 grados C., auxiliado del baño maría. Otros trocitos pequeños de la misma procedencia que los anteriores, fueron fijados en diversas mezclas fijadoras, sin someterlos al pretratamiento, con el fin de ser utilizados en estudios comparativos o de otro orden.

Fijación. — Transcurrido el tiempo de pretratamiento, una parte de cada material fué fijado en alcohol - acético (alcohol absoluto; 3, ácido acético glacial: 1) durante 5 a 60 minutos; luego fueron lavados con agua durante 12 a 24 horas. El resto del material (pretratado o no) fué fijado en Bouin - Allen, Zenker-Formol, Champy, La Cour, Sanfelice - White, Smith, etc., con el fin de hacer aplastados e inclusiones en parafina para estudios comparativos u otros.

Cuando por motivos ajenos a la técnica, debimos demorar la confección de aplastados o la inclusión en parafina, entonces conservamos el material en alcohol a 70%.

Reacción nucleal de Feulgen - Rossenbeck. — Es sabido que ésta reacción consiste fundamentalmente en someter el material fijado a una hidrólisis moderada con HCl, durante un tiempo y temperatura determinados; luego, detener la hidrólisis con agua destilada y tratar el material así hidrolizado con el reactivo de Schiff.

La bibliografía existente sobre las ya numerosas variantes a la técnica original y al mecanismo de la reacción nucleal, es sumamente extensa y no siempre al alcance de los interesados, en nuestro medio. Una información sumaria puede encontrarse, — entre otras fuentes—, en la revista "Veterinaria" de la Asociación de Estudiantes de ésta Facultad (23) y (24), publicación del autor, a manera de apuntes.

El autor ha realizado la reacción nucleal en cuestión, manteniendo algunas de las condiciones de la técnica original, como ser la hidrólisis en ácido clorhídrico normal (D igual a 1,19) a la temperatura de 60 grados C. Esta temperatura fué controlada por el autor, colocando en tasmóstato eléctrico, al ácido clorhídrico contenido en recipiente herméticamente cerrado, y cuando la temperatura del ácido fué también de 60 grados C. se sumergió rápidamente la muestra del material a hidrolisar. El tiempo óptimo de hidrólisis encontrado por el autor para materiales de testículo de bovino fijados en alcohol - acético (3|1) fué de 12 minutos.

El reactivo de Schiff fué preparado en la siguiente forma: 1 a 1.5 grs. de fuchsina básica (Grübler; G. T. Gurr; etc.), fué finamente pulverizada en un mortero de vidrio y se la disolvió completamente con 200 cc de agua destilada. A veces tuvimos necesidad de filtrar la solución colorante. Luego se agregaron 30 cc de ácido clorhídrico normal y después 3 grs. de metasulfito de sodio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$) a la solución de fuchsina, y se cierra el recipiente herméticamente. El recipiente conteniendo el reactivo se mantiene cerrado y a la oscuridad. La decoloración se va produciendo progresivamente, estando el reactivo preparado y listo para ser usado, generalmente, a las 12 horas, aunque, en ciertos casos, en que la decoloración se ha producido más rápidamente, fué usado con éxito a las 4, 6 u 8 horas de preparado. Algunos autores indican utilizarlo recién a las 24 horas, otros después de las 12 horas de preparado. En ningún caso el autor utilizó sustancias decolorantes, como se ha aconsejado; y ello debido a que la mayor parte de los reactivos preparados por el autor, resultaron inco-

loros; en otros casos, eran con una tonalidad ligeramente amarillenta, lo cual no interfirió en el resultado de la reacción.

Técnica de los aplastados. — En general se siguió las indicaciones consignadas en Darlington y La Cour (25), excepto el tiempo de hidrólisis que, como se expresó, se adaptó al material en estudio. También se emplearon otros tiempos de acción del reactivo de Schiff que el indicado en la obra mencionada; es así como en general, se le hizo actuar durante 2, 3, 4 horas y, solamente en algunos casos, ese tiempo fué mayor. El montaje de las preparaciones permanentes se hizo en aceite de cedro.

La reacción nucleal de Feulgen - Rossenbeck en secciones de materiales incluídos en parafina, fué realizada de acuerdo a las indicaciones de Lisón (26). Se hicieron preparaciones testigos (de aplastados y secciones) a fin de controlar la especificidad de la reacción nucleal.

La recolección, pretratamiento, fijación y lavados del material fueron realizados por el autor en el mismo lugar donde se extrajeron los testículos (Servicio de Fomento Ganadero, en el Frigorífico Nacional y Laboratorio de Biología Animal "Dr. Miguel C. Rubino"); las restantes manipulaciones las realizó el autor en el Laboratorio de Histología y Embriología del Instituto de Anatomía Normal de la Facultad.

Fotomicrografías. — Las fotomicrografías fueron tomadas por el autor con un aparato Panphot Leitz, en el Laboratorio de Biología Animal "Dr. Miguel C. Rubino" de la Dirección de Ganadería, empleando oculares E. Leitz Periplan 5x y 12x; objetivo de inmersión 1|12, apert. 1.30, 100x. Se usó además un filtro verde amarillento.

RESULTADOS

El autor considera que mejor que una descripción detallada de los resultados obtenidos con la técnica expuesta, es la apreciación de las fotomicrografías que acompañan a este trabajo, ilustradas con sus respectivas leyendas.

DISCUSION

Para la discusión de los resultados el autor espera terminar el estudio comparativo de la técnica expuesta con otras mencionadas en esta publicación. De cualquier modo, la introducción del presente trabajo ha de servir de antecedente a la discusión que hagamos en la próxima publicación.

RESUMEN Y CONCLUSIONES

1. El A. describe una técnica para el estudio de los cromosomas del toro (*Bos taurus*) consistente en el pretratamiento del material con soluciones hipotónicas, previamente a la fijación; ésta última la realiza con alcohol-acético (3|1) para luego someterlo a la reacción nuclear de Feulgen-Rossenbeck y, finalmente, aplica la técnica de aplastados.
2. El A. resume el desarrollo de las técnicas empleadas para el estudio de cromosomas en mamíferos y, particularmente en el toro, concluyendo que con la técnica que se propone se salvan los inconvenientes de las técnicas clásicas, obteniendo resultados muy superiores y, permitiendo, además, la detección del ácido desoxiribonucleico durante la mitosis y meiosis en la espermatocitogénesis del toro. La técnica puede ser utilizada también en otros mamíferos.

SUMMARY AND CONCLUSIONS:

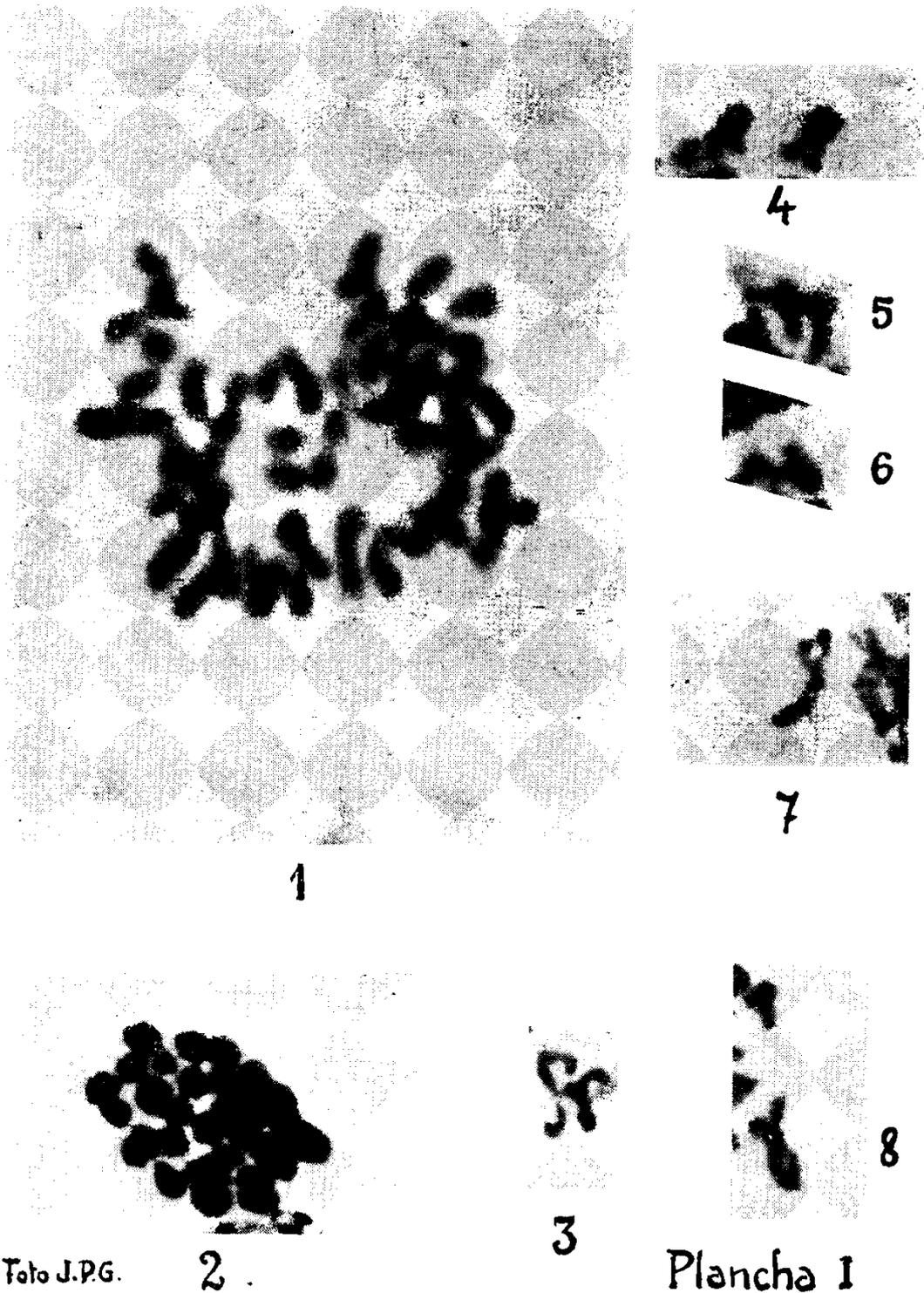
1. — The author describes a technic for the study of the chromosomes of the bull (*Bos taurus*), consisting in treating the material with hypotonic solutions before fixing with an alcohol-acetic acid (3|1) mixture, after which the Feulgen-Rossenbeck nuclear reaction is used. Finally squash technic is applied.
2. — The author reviews the development of the technics employed for the study of chromosomes in mammals and particularly in the bull, concluding that with the technic described the disadvantages of the classical procedures are overcome, much superior results are obtained and desoxiribonucleic acid can be detected during mitosis and meiosis in the spermatogenesis of the bull. The technic is usable with other mammals.

RESUME ET CONCLUSIONS:

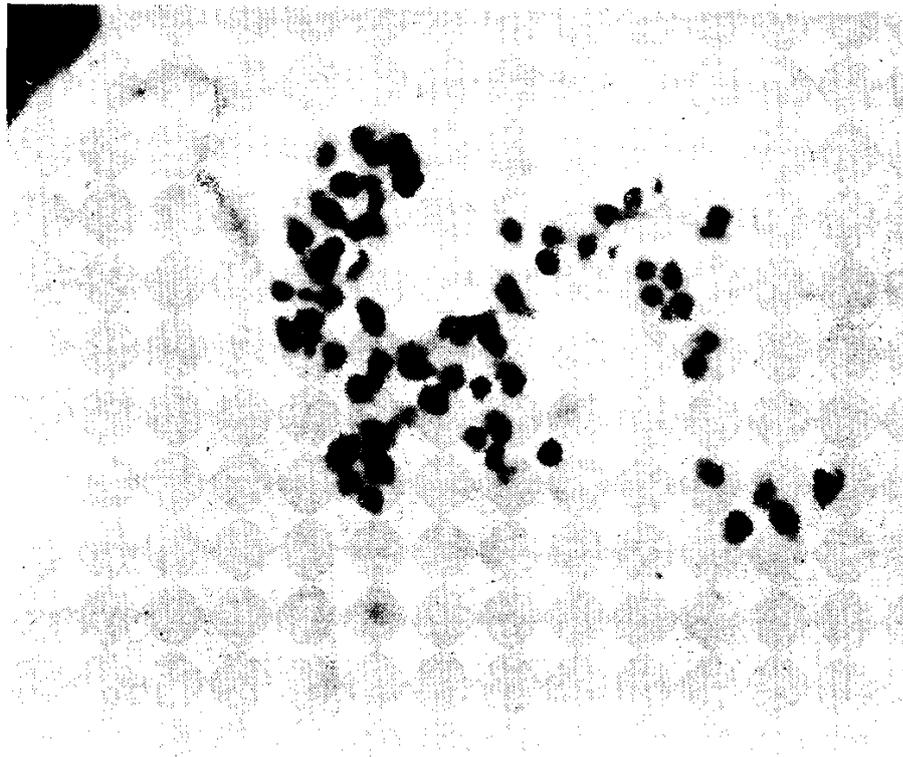
1. — L'auteur décrit une technique pour l'étude des chromosomes du taureau (*Bos taurus*) qui consiste en le pre-traitement du materiel avec des solutions hypotoniques avant de la fixa-

tion; cette dernière est réalisé par l'alcool acétique (3|1) pour le soumettre après a la reaction nucleal de Feulgen-Rossenbeck et, finalement il applique la technique des aplatis.

2. — L'auteur résume le developpement des techniques employés pour l'étude des chromosomes dans des mammifères et particulièrement dans le taureau, en concluant qu'avec la technique descrite se sauvent les inconvenients des techniques classiques en obtenant des résultats tres supérieurs et en permettant, en plus, la detection de l'acide désoxyribonucléique pendant la mitose dans la meiose du taureau. La technique peut aussi etre utilisée avec d'autres mammiferes.



1. — Cromosomas en la metafase espermatogonial A; 5810 X.
2. — Bivalentes en la metafase del espermatocito I; 2700 X.
3. — Dos bivalentes en la prometafase; 2700 X.
4 a 8 — Cromosomas en el diploténico, formando 1, 2 y 3 quiasmas. 2700 X



9

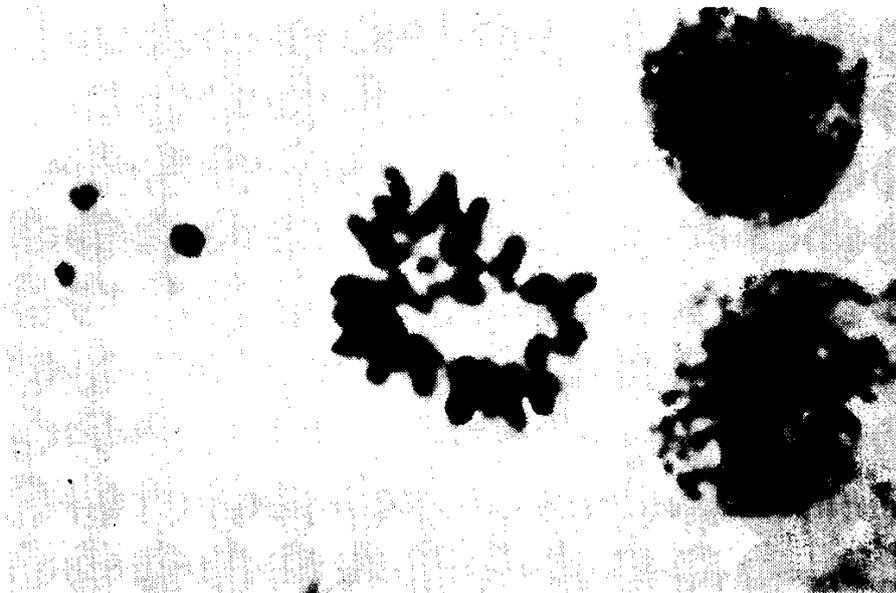


Foto J.P.G.

10

Plancha 2

9. — Cromosomas en la metafase espermatogonial B; 2700 X.
10. — Cromosomas en la metafase del espermatocito II. A la izquierda un núcleo de espermátida, y a la derecha dos núcleos en estados sucesivos de profase I. 2700 X.

AGRADECIMIENTOS

El autor se complace en dejar constancia de su gratitud al Director del Instituto de de Investigación de Ciencias Biológicas, Prof. Clemente Estable, por su desinteresada generosidad al permitirnos realizar técnicas en su Instituto; asimismo, al Director del Depto. de Citogenética de dicho Instituto, Prof. Francisco A. Sáez, cuyos consejos, sugerencias y dilatada experiencia en la materia, le hicieron posible al autor iniciar con éxito la solución del problema que le hubo planteado, respecto al estudio de los cromosomas del toro. A los bachilleres C. L. Solari y M. E. Drest, colaboradores del Prof. Sáez, por sus atenciones con el autor cada vez que éste concurrió al mencionado Departamento con motivo del presente trabajo.

Al Director de Ganadería, Dr. Pedro Anastasia y Jefes de División de Fomento Ganadero, doctores Ruben Lombardo y Fernando Rial, por las facilidades otorgadas al autor para que pudiera concurrir al Laboratorio de Biología Animal "Dr. Miguel C. Rubino"; al Director de éste Laboratorio, Prof. Dr. Líbero Rossi Lema, por su atención al permitirle al autor utilizar el Panphot de ese Laboratorio. A los doctores Magallanes, D. Escuder, Petrucci y Simoncini, técnicos del mismo Laboratorio de Biología Animal, por la intervención en las castraciones de los animales mencionados en este trabajo. Al Dr. Luis A. Barros, técnico de ese Laboratorio y de la Facultad de Veterinaria, por su atención en la confección de los positivos y las indicaciones que dieron al autor en la obtención de las fotos, revelado y fijación de las mismas.

Al Sr. Administrador del Frigorífico Nacional, Dcn Pedro Malagraba y demás autoridades del establecimiento, quienes facilitaron en todo momento la obtención de los materiales citados en este trabajo; al Sr. B. Oria y al ayudante sanitario Sr. Maure, por la ayuda en la recolección de los materiales en las condiciones de rigor que la técnica indicaba.

Al Prof. Dr. Juan A. Rodríguez García, Director del Instituto de Terapéutica y Medicina Experimental de nuestra Facultad, por su atención en la preparación de las soluciones Tyrode normales.

A la delegación de estudiantes, presidida por el Prof. Doctor Libertario Bregante, y particularmente a nuestro colaborador Bach. Joaquín Rossi y a la Bibliotecaria de la Facultad, Señorita Martha Juanicó Burzaco, quienes en su viaje por Europa obtuvieron y me hicieron llegar apartados de los trabajos citados de Melander y Knudsen y Knudsen. A nuestra ayudante de laboratorio, Srta. G. Pagalday, por la realización de secciones de mate-

rial incluido en parafina, y al ayudante técnico del Instituto, Bach. Emilio La Mata por la misma razón y la coloración con anilinas de algunos de esos materiales.

El autor aprovecha para expresar su agradecimiento a los destacados investigadores que tuvieron la gentileza de enviarnos apartados de sus publicaciones, sin los cuales nuestra información al respecto se hubiera demorado más aún; son ellos: el Dr. Sajiro Makino (Zoological Institute, Faculty of Science, Hokkaido, Imperial University, Sapporo, Japón); el Dr. T. C. Hsu (Tissue Culture Laboratory, University of Texas, Medical Branch, Galveston, Texas, U.S.A.) y el Dr. C. M. Pomerat, co - autor de uno de esos trabajos; el Dr. O. Knudsen (Royal Veterinary College Stockholm, Department of Obstetrics and Gynaecology); el Dr. Y. Melander (Institute of Genetics, University of Lund); el Dr. Allan Bane (Department of Obstetrics and Gynaecology, Royal Veterinary College, Stockholm and Animal Breeding Institute, Wiad, Eldtomta, Sweden); el Dr. P. Meschaks (Department of Obstetrics and Gynecology, Royal Veterinary College, Stockholm); el Dr. J. Wahrman (Department of Zoology, The Hebrew University of Jerusalem, Israel) y co - autor, Dr. A. Zahavi, del mismo Departamento; el Dr. Roger Daoust, Ph.D. (The Montreal Cancer Institute, Research Laboratories, Notre - Dame Hospital, Montreal, Canadá) y co - autor, Dr. Y. Clermont.

BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

1. De Robertis, E. P. D., Nowinski, W. W. y Sáez, F. A. — Cytología General 3ª. Ed. "El Ateneo". B. Aires 1955.
2. Makino, S. — An Atlas of the Chromosome Numbers in Animal. 2nd. Ed. The Iowa State College Press. Ames. Iowa. 1951.
3. Van Hoof, L. — La Spermatogénese dans les Mammiferes. III. Les spermatocytes leptoténes et amphoténes dans le Taureau. La Cellule, Vol. 30, pp. 7 - 25. 1913.
4. Masui, K. — The spermatogenesis of the domestic mammals. II. The spermatogenesis of cattle (*Bostaurus*). J. Coll. Agr. Imp. Univ. Tokyo. Vol. 3, pp. 357 - 403. 1919.
5. Wodsedalek, J. E. — Studies on the cells of cattle with special reference to spermatogenesis, etc. Biol. Bull. Vol. 30 pp. 290-316. 1920.
6. Makino, S. — Karyotypes of Domestic Cattle, etc. (Chromosome Studies in Domestic Mammals, IV). Cytologia, Vol. 13, pp. 247 - 264. 1944.

7. Krallinger, H. F. — Uber die Chromosomenzahl beim Rinde sowie allgemeine Bemerkungen uber die Chromosomenforschung in der Säugetierklasse. *Verh. Anat. Gessell.* Vol. 36, pp. 209 - 214. 1927.
8. Krallinger, H. F. — Gibt es einen Spermatoendimorphismus beim Hausrind? Zugliech eine Chromosomenstudie und ein Beitrag zur Kritik der Chromosomenlhre. *Arb. dtsh. Ges. Züchtgskde.* Vol. 40, pp. 1 - 43. 1928.
9. Krallinger, H. F. — Cytologische an einigen aussäugetieren. *Arch. Tierernähr. Tierzucht.* Vol. 5, pp. 127 - 187. 1931.
10. Postiglioni - Grimaldi, —. — Chromosomes in *Bos taurus* as revealed by prefixation treatment with hypotonic solutions. *Stain Tech.*, Vol. 31, 173-78. 1956.
11. Melander, Y. and Kanudsen, O. — The spermatogenesis of the bull from a Karyological point of view. *Hereditas*, Vol. 39, pp. 505 - 517. 1953.
12. Knudsen, O. — Cytomorphological investigations into spermiocytogenesis. of bulls with normal fertility, etc. *Act. Path. te Microbiol. Scand, Suppl. CI*, 79 págs. 1954.
13. Melander, Y. and Wingstrand, K. G. — Gomori's hematoxilin as a chromosome stain. *Stain Tech.*, Vol. 28, pp. 217 - 23. 1953.
14. Matthey, R. — *Les chromosomes des Vertébrés.* F. Rouge. Lausanne. 1949.
15. Makino, S. and Nishimura, I. — Water - Pretreatment Squash Technic. *Stain. Tech.* Vol. 27, pp. 1 - 7. 1952.
16. Hughes, A. — Some Effects of Abnormal Tonocity on Dividing Cells in Chick Tissues Cultures. *Quart. J. Micros. Sci.*, Vol. 93, pp. 207 - 219. 1952.
17. Hsu, T. C. — Mammalian Chromosomes in vitro. I. Karyotype of Man. *J. of. Hered.* Vol. 43, pp. 167 - 172. 1952.
18. Hsu, T. C. and Pomerat, C. M. — Mammalian Chromosomes in vitro. II. A Method for Spreading the Chromosomes of Cells in Tissue Culture. *J. of Hered.* Vol. 44, pp. 23 - 29. 1953.
19. Hsu, T. C. and Pomerat, C. M. — Mammalian Chromosomes in vitro. III. On somatic aneuploidy. *J. Morph.* Vol. 93, pp. 301 - 329. 1953.
20. Hsu, T. C. — Mammalian Chromosomes in vitro. IV. Some Human Neoplasms. *J. Nat. Cancer Inst.* Vol. 14, pp. 905 - 934. 1954.
21. Wahrman, J. and Zahavi A. — Intra - generic Difference in Chromosome Numbers of Spiny Mice (Rodentia: Murinae). *Bull. Res. Council of Israel.* Vil. 3. 265. 1952.

22. Wahrman J. and Zahavi, A. — Cytological Contributions to the Phylogeny and Classification of the Rodent Genus *Gerbillus*. *Nature*, Vol. 175, pp. 600. 1955.
23. Postiglioni - Grimaldi, J. — Nucleoproteidos y ácidos nucleicos con miras citoquímicas. *Veterinaria*. Año XII, 2ª época. Nº 3. pp. 111 - 143. 1954.
24. Postiglioni - Grimaldi, J. — Nucleoproteidos y ácidos nucleicos con miras citoquímicas (continuación). *Veterinaria*. Año XIII, 2ª época. Nº 4, 55. 1956.
25. Darlington, C. D. and La Cour, L. F. — *The Handling of Chromosomes*. G. Allen & Unwin Ltd. London. 1947.
26. Lison, L. — *Histochimie et Cytochimie Animales*. Gauthier-Villards, Ed. París. 1953.