

7.3
20



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES "CUAUTITLÁN"

CONTRIBUCION AL ESTUDIO DEL DIAGNOSTICO
PRENATAL DEL SEXO EN BOVINOS HOLSTEIN
FRIESIAN, MEDIANTE LA DETERMINACION DE LA
FETOPROTEINA SERICA POR EL METODO DE
FIJACION EN SUPERFICIE Y LA MORFOLOGIA DE
LA GLANDULA MAMARIA.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

P R E S E N T A :

MANUEL MARTINEZ GUERRERO

Asesores: M. V. Z.

LUIS FERNANDEZ DE CORDOVA DE LA B.
FRANCISCO ORTEGA





UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

C O N T E N I D O

	PAG.
RESUMEN.....	1
INTRODUCCION.....	2
OBJETIVOS.....	6
MATERIAL Y METODOS.....	7
RESULTADOS.....	13
DISCUSION.....	18
CONCLUSIONES.....	21
LITERATURA CITADA.....	23

RESUMEN.

El presente estudio se realizó en el Centro-Agropecuario Industrial de Tizayuca, Hgo. (CAIT), - donde se trabajó con 157 vacas Holstein Friesian a las cuales se les trató de determinar el sexo de la cría antes de su nacimiento en base a dos técnicas: La de Fijación en Superficie y de acuerdo a la Morfología que presenta la Glándula Mamaria. Los resultados demuestran que la técnica de fijación en su superficie es más efectiva y confiable ya que se obtuvo un 90% de exactitud, a diferencia de un 68% - por morfología de la glándula mamaria.

I N T R O D U C C I O N

Desde tiempos remotos se han ensayado diferentes pruebas encaminadas a predecir el sexo de las crías antes de su nacimiento, sin embargo no tuvieron éxito, sino hasta principios de este siglo, en que empezó a aplicarse metodología científica (17,22).

Dentro de las muchas técnicas para pruebas prenatales del sexo se menciona como las más fidedignas, la basada en el estudio de las células de descamación de las secreciones vaginales en los últimos meses de embarazo (15). Pruebas intradérmicas con extractos testiculares (10,22). La prueba practicada en Brasil en la que se inyectaron ranas con la orina de mujeres embarazadas en las últimas semanas del embarazo (8,9). La que utiliza inoculaciones de orina de mujeres embarazadas en los genitales de conejos con testículos aún retenidos en los canales inguinales, en caso de que el producto sea de sexo masculino se produce desarrollo testicular pasadas 48 hrs., de la inoculación, en caso de que el producto sea femenino no hay cambio aparente en-

los testículos. (12). Otras pruebas son las que se realizan midiendo los niveles del 17β Hidrogenoandrogeno concentrado en el líquido amniótico entre 90 a 150 días de embarazo los cuales varían de acuerdo al sexo del feto, y cuya variación de alta a baja es para macho y hembra respectivamente (5). También se realiza la detección de hormonas en la saliva de mujeres embarazadas, entre el sexto y séptimo mes de gestación, presentando este método un 97.3% de efectividad (18). Obtención de líquido amniótico en mujeres embarazadas de 70 a 100 días donde determinaron el sexo mediante la diferente distribución de la cromatina nuclear, que indica si el producto es de sexo masculino o femenino, obteniendo un 90% de efectividad (1,3,4,6,7,11,14,22,25,26,27,). Detección de la testosterona concentrada en el líquido alantóideo entre los 90 a 150 días de gestación en el ganado, la cual puede ser usada para determinar el sexo fetal (5).

Otros autores mencionan que mediante la reacción antígeno-anticuerpo de tejidos y sueros fetales contra suero materno, es posible reconocer el sexo llamándole a esta técnica de fijación en su superficie (F.S.) y retención de colorante (19,20,21,

22,23,24). Si los resultados fueran dudosos con este método, se realiza una segunda prueba con la misma técnica pero teniendo como control, suero sanguíneo de mujeres que en sus respectivos partos hayan mostrado títulos altos para las correspondientes fetoproteínas (22,23,24). Los mismos autores mencionan que este método podría aplicarse en medicina veterinaria.

El método de diagnóstico prenatal por morfología de la glándula mamaria no ha sido muy estudiado, la acción hormonal de la suprarrenal y las hormonas sexuales del feto por su íntima relación han hecho suponer su participación en la diferenciación sexual del individuo (13). Puede ser atribuible el hecho de que la suprarrenal actúa únicamente en acción virilizante entrando en función cuando en la determinación sexual ha sugerido el sexo masculino; por el contrario, cuando se trata de la determinación femenina, las suprarrenales no participan, dejando libre la acción a los estrógenos placentarios (13). De esta manera cuando en el diagnóstico de sexo prenatal se sugiere el sexo masculino, los cuartos anteriores se presentan más edematosos y ligeramente caídos, en relación a los posteriores, -

ésta podría ser influencia de las hormonas masculinas. Con respecto a la hembra sería lo contrario, - los cuartos posteriores sufrirían el cambio y los - cuartos anteriores se mantendrían intactos.

En 1964 Negrete (17) reportó que en vacas - con siete meses de gestación hasta término, se de - terminó al sexo prenatal mediante los cambios morfo lógicos de la vulva. Esta prueba según el autor - tiene un 92% de efectividad.

O B J E T I V O S .

Lograr determinar el sexo de la cría antes de su nacimiento, mediante la prueba de fijación en superficie y retención del colorante en vacas Holstein Friesian de diferente No. de partos; realizando además en estas vacas el análisis morfológico de glándula mamaria para conocer los posibles cambios que se puedan observar en ésto, por influencia del sexo de la cría, comparandolo con el resultado obtenido en la determinación de la fetoproteína.

MATERIAL Y METODOS

El presente estudio se llevó a cabo en el Centro Agropecuario Industrial de Tizayuca, Hgo., (CAIT), que se encuentra ubicado en el km. 48 de la carretera Federal # 85 (Limite Norte del Area Urbana de la ciudad de México en 1995) y el km. 130 de la misma carretera (limite noroeste del Distrito de riego 03 Mixcahuala, Hgo.), se localiza geográficamente entre los paralelos $19^{\circ} 50'$ y $20^{\circ} 20'$ de latitud norte y $98^{\circ} 39'$ y $99^{\circ} 25'$ de longitud oeste, a 2109 mts. de altura sobre el nivel del mar, con una oscilación de precipitación media anual de 600.5 mm, con una máxima en 24 hrs., de 60 mm, y una temperatura media anual de 14.9°C , con una oscilación de temperatura máxima promedio 35.5° y una mínima de -2.5 a -4.5°C , con un clima C (Wo) b (e) g. (2). El complejo cuenta con una población promedio de 18500 cabezas de ganado Holstein Friesian, en explotación intensiva, siendo motivo del presente estudio, 16 establos que cuentan con un promedio de 180 vacas, en donde se trabajó con un total de 157 vacas, con un mismo sistema de manejo y alimentación, a las cuales se realizará la predicción prenatal del sexo en base a:

I. Determinación de la fetoproteína por el método de fijación en superficie (F.S.) y retención del colorante, a partir de los ocho meses de gestación, aún conociéndose que mediante esta técnica se puede realizar el diagnóstico prenatal del sexo desde los 60 días de gestación.

II. Conformación de la glándula mamaria, la cual se observó desde los 8 meses de gestación hasta el momento del parto, considerando las vacaciones reportadas por Pérez y Pérez (13).

Se consultaron los registros de estados reproductivos para anotar en una hoja tipo: número de establo, número de la vaca, período de la gestación número de parto, sexo predominante en partos anteriores, diagnóstico presuncional del sexo mediante la prueba de determinación de la fetoproteína, como la forma que presenta la glándula mamaria.

Mediante la prueba de proporciones se comparó la efectividad de ambos procedimientos. También se aplicó la prueba de ji cuadrada para examinar si hay dependencia o no entre el resultado obtenido y-

el número de partos de la vaca. (16).

Se procedió a obtener en cada una de las 157 vacas una muestra de sangre a partir de la vena co-cigea, auxiliándonos de un tubo vacutainer sin coagulante y aguja del No. 22 x 23 mm. ambas estériles para obtener el suero materno y realizar la técnica de fijación en superficie y retención del colorante utilizándose el siguiente material;

a) Lámina de vidrio; b) Tiras de papel filtro LKB 6834 Linthess Blotter Strips Sheleicher - Scheel No. 2043 B Mgl; c) Asa de 2 mm. de diámetro; d) Antígeno antimasculino y antifemenino, que se obtuvieron mediante la recolección de fetos de cada sexo en el rastro, los cuales fueron sometidos a lavados con agua de la llave para retirar el exceso de sangre, el producto fue reducido a pedazos pequeños y sumergido en alcohol industrial del 96 durante 24 hrs., se pulverizó en una licuadora agregándole 50 ml., de solución salina isotónica y 5 ml., de merthiolate 1:1000 dejándolo durante varios días en refrigeración a 4°C y por centrifugación se colectó el sobrenadante; e) Suero sanguíneo materno problema; f) Solución salina isotónica; g) Solución al 2%

de azul de bromofenol; h) Acido acético al 10% en alcohol etílico al 50% i) Agua corriente de la llave.

La técnica de fijación en superficie se realizó de la siguiente manera:

- a) Preparación de los reactivos. En una lámina de vidrio y auxiliándonos con asas de 2 mm. de diámetro se preparan las mezclas para obtener la primera impresión en el papel filtro LKB de suero antifemenino, en un extremo de la lámina se pone una gota de suero problema y se le agrega suero antifemenino, se mezcla obteniendo el reactivo, en el otro extremo de la lámina se hace lo mismo pero agregando antimascu lino.
- b) A cada uno de los reactivos se le agrega una gota de solución salina isotónica con una pipeta capilar.
- c) Sobre tiras de papel especial LKB se iden tifican dos columnas una de suero problema a macho y otra a hembras, formando pequeños círculos de unos cinco mm. de diámetro.

- d) Procedimientos de tinción las tiras se su mergen en solución de azul de bromofenol al 2% durante 3 min.
- e) Etapa de fijación, la misma tira se intro duce en alcohol ácido (ácido acético al 10% en alcohol etílico al 50%), durante 5 min.
- f) Lavado de la tira, se efectúa con agua corriente de la llave en donde las muestras preparadas con ambos sueros antife tales mostrarán cambios a la fijación del colorante o decoloración al mismo, ésta nos indicaría que las inmonoglobulinas ba jo la acción del antígeno, sufren alteraciones que se manifiestan por adherirse al papel en que se depositan las mezclas así como retener el colorante empleado pa ra revelarlas.
- g) Según la columna del suero que muestra ma yor coloración la lectura será para macho o hembra, en caso de que en ambas columnas se observará poca coloración se proce dería al siguiente paso:

- h) Se utilizan sueros de mujeres que en sus respectivos partos, hayan mostrado títulos altos de anticuerpos para las correspondientes fetoproteínas (macho ó hembra) que actúan como antígeno, y se procede a realizar la técnica anterior, obteniendo el resultado confirmatorio de las muestras dudosas, (19, 22, 23, 24).

Posteriormente se observó la conformación de la glándula mamaria en cada una de las 157 vacas para predecir el sexo mediante los cambios que muestra, en caso de que se tratara de macho los cuartos anteriores se presentarían más edematosos y ligeramente caídos en relación a los posteriores sufrirían el cambio.*

* Comunicación personal del MVZ. Francisco Ortega - en el C.A.I.T.

R E S U L T A D O S

Los resultados obtenidos en el estudio de las 157 vacas, demostraron que por la técnica de fijación en superficie, 142 sueros obtenidos del total de la muestra presentaron reacción positiva a esta técnica lo cual corresponde al 90% cuadro 1. Tomando en cuenta el total de la muestra de 157 sueros, de los que 76 correspondieron a vacas con gestación de feto macho a la hora del diagnóstico, en el momento de corroborar al parto 87 nacieron machos por lo tanto acertamos en un 87.3% al sexo macho. En el caso de las gestaciones con feto hembra de 70 vacas que parieron hembra, presentaron reacción positiva a la prueba 66 que equivale al 94.2% de aciertos al sexo hembra. Las muestras negativas que corresponden al 10% no presentaron reacción o su interpretación fué errónea, por lo cual el diagnóstico fué fallido.

En el caso del diagnóstico prenatal por el método de la conformación de la glándula mamaria, se puede mencionar que de las 157 vacas estudiadas 107 presentaron reacción positiva a la prueba, lo cual corresponde al 68% de aciertos en el diagnósti

co cuadro 2. Con respecto a los aciertos por sexo - y corroborando a la hora del parto, para el sexo -- masculino obtuvimos el total de las vacas muestrea- das 83 que parieron macho, en donde fueron positi - vas 58 que equivale el 69.8%. Ahora en cuanto al - sexo femenino del total de la muestra 74 parieron- hembra, en donde acertamos en 49 que equivale al - 66.2%. Con un mayor grado de error a consecuencia - de datos confusos al momento del diagnóstico como - un edema mamario muy pronunciado, problemas clíni - cos que hayan sufrido la vaca en su lactancia, etc.

Mediante la prueba de proporciones se compa- ró la efectividad del método 1 (p_1 =prueba de fija - ción en superficie, F.S.) y método 2 (p_2 =conforma - ción de glándula mamaria, G.M.).

Donde:

P_1 = proporción de aciertos en método 1. -
(prueba de F.S.).

P_2 = proporción de aciertos en método 2. --
(conformación de G.M.)

Donde:

Hipótesis nula, H_0 : $P_1 = P_2$ ó lo que es lo mis -
mo $P_1 - P_2 = 0$

Hipótesis alternativa, $H_a: P_1 \neq P_2$ ó lo que es lo mismo $P_1 - P_2 \neq 0$

De acuerdo a la muestra obtenida:

$$P_1 = 0.90$$

$$P_2 = 0.68$$

Al realizar la prueba de diferencia de proporciones con un 95% de confiabilidad, comparamos el valor obtenido de Z con -1.96 ya que éstos son los valores críticos. Como el valor obtenido fué -6.8111 que es menor a 1.96 , concluimos aceptando la H_a , ya que hay suficiente evidencia estadística para afirmar que la diferencia entre ambas proporciones es significativa. Mostrando ser el método F.S., el más efectivo, ya que presenta un 90% de efectividad.

Cuadro No. 1
Prueba de fijación en superficie

Parto	Aciertos	Erróneo	Total
1 - 2	54*(54.2675)	6*(5.7324)	60
3 o más	88*(87.7324)	9*(9.2675)	97
Total	142	15	157

Cuadro No. 2
Conformación de la glándula mamaria.

Parto	Aciertos	Erróneo	Total
1 - 2	36*(40.8917)	24*(19.1082)	60
3 o más	71*(66.1082)	26*(30.8917)	97
Total	107	50	157

* Los valores entre paréntesis corresponden a los valores esperados.

Se realizó una prueba de ji cuadrada, χ^2 , bajo las hipótesis:

Ho: El número de partos y la efectividad del método son: INDEPENDIENTES.

Ha: El número de partos y la efectividad del método son: DEPENDIENTES.

El valor calculado de ji cuadrada, χ^2 , para el método 1 fué 3.5688. y el método 2 = de 2.9739.- Como es menor a: $\chi^2_{\alpha} = 3.84146$ que es el valor crítico, para un 95% de confiabilidad y un grado de libertad, no se tiene suficiente evidencia estadística para aceptar H_a . por lo tanto, sostenemos que la efectividad del método no varía según el número de partos de la vaca.

D I S C U S I O N

Los métodos descritos encaminados al diagnóstico prenatal del sexo, han sido practicadas en el humano y presentan inconvenientes como son:

Los resultados variables de diferentes investigadores al realizar la prueba de la saliva, además de necesitar reactivos y tiempo fijo para su lectura. (18).

El inconveniente de inyectar orina de mujeres embarazadas a conejos con testículos aún retenidos en canal inguinal. (12)

La dificultad que presenta la recolección de líquido amniótico estéril y el riesgo para la madre y el feto, además de necesitar de equipo especial. (4,25).

Para la predicción del sexo mediante la vulva, tiene el inconveniente de que al acercarse el momento del parto el grado de edematización que sufre la vulva en ese momento dificulta los signos de ángulo y rugosidad de la misma que son factores determinantes en el diagnóstico del sexo prenatal. (17)

Mediante la prueba de fijación en superficie

se obtuvo un 90% de efectividad para la predicción del sexo en todos los casos estudiados en animales, a diferencia de lo que reporta Ruiz Castañeda, que, en sus pruebas de determinación de fetoproteína obtuvo un 100% de efectividad (23). Siendo un 68% de efectividad para la observación de la glándula mamaria en este trabajo.

Los problemas que se tuvieron en el método de fijación en superficie son:

- A).- Trabajar con una muestra hemolizada altera la reacción inmunológica.
- b).- La persistencia de anticuerpos para macho o hembra en los partos anteriores, por lo que es necesario realizar una prueba confirmatoria a todas aquellas muestras que resultaron dudosas.

La dificultad que se tuvo en la observación de la glándula mamaria para predecir el sexo se debió a lo siguiente:

- A).- Vaquillas a primer parto mayor grado de edematización, a diferencia de vacas de tres partos en adelante.

- B).- En vacas de más de cinco partos y si -- son altas productoras se tuvo el inconveniente de la relajación del tejido de sostén de la glándula mamaria.
- C).- La observación de la conformación de la glándula mamaria se realizó desde los - ocho meses de gestación hasta el momento del parto resultando grado variable de edematización y por consiguiente datos confusos en el diagnóstico.

C O N C L U S I O N

El diagnóstico prenatal del sexo es más acertado realizarlo por el método de fijación en superficie ya que presenta un 90% de exactitud, a diferencia del diagnóstico por conformación de la glándula mamaria que solo tuvo una exactitud del 68%.

El diagnóstico prenatal del sexo por el método de fijación en superficie es una técnica laboriosa, de resultados confiables, aunque debe evitarse un inadecuado manejo de la muestra desde su recolección hasta la realización en el laboratorio del procedimiento, debiendo de realizarse la repetición de esta técnica tantas veces como sea posible para casos dudosos, antes de establecer un diagnóstico o resultado definitivo.

Esta técnica se puede realizar desde una época temprana de gestación con buenos resultados, y con la ventaja de poder llevar a cabo esta técnica fácilmente a nivel de campo y con un costo comercial muy accesible, de \$200.00 por vaca aproximadamente.

El método de diagnóstico de glándula mamaria

es un procedimiento de diagnóstico relativamente fá
cil de realizar con el cual se obtienen rápidamente
resultados del pronóstico, este método tiene la des
ventaja de que es más acertado entre más cerca se -
realice la determinación del sexo al momento del -
parto, ésto deberá confirmarse con investigaciones-
futuras, debido a que no existen bases científicas-
con respecto a determinación de sexo en bovinos por
este método. Un factor de error fué la mala confor-
mación de la glándula mamaria ya sea por procesos -
patológicos en los pezones con telitis, además la -
distención del aparato suspensorio de la glándula--
mamaria.

L I T E R A T U R A C I T A D A

- 1.- Ashley, D.J.B. and Jones, C.H.: Discrepancies - in the Diagnosis of Genetic sex by Leucocyte -- Morphology, Lancet., 1:240 (1958)
- 2.- Banco Nacional Agropecuario S.A. Fideicomiso - PRODEL "Anteproyecto del Programa" Cap. I. Méxi co D.F., (1974).
- 3.- Barr, M.L. y Bertram, L.F.: Morphology of nerve cells nucleus according to sex. Anat. Rec., 107 283 (1952).
- 4.- Bongso, T.A. and Basrur, P.K.: Prenatal Diagnosi s of sex in cattle by amniocentesis. Vet. Rec. 96 : 124-127 (1975).
- 5.- Bongso, T.A. and Basrur, P.K.: Prediction of fe tal sex in cattle by testosterone levels in -- allantoic fluid. J. Reprod. Fert. (46) 2: 441-- 442, (1976).
- 6.- Bongso, T.A., Wellimuny, S.G., de S., Edirisin ghe, R. y Kumaratileke, L.: Determination of fe tal sex in cattle by Cytologic Examination of - amniotic fluid. Am. J. Vet. Res., 39 (9): 1545- 1546-1776 (1978).

- 7.- Castro, N.M.: Sex Diagnosis by the nuclear structure of the Cells of human urinary Sediment. - Lancet., 2:565 (1957).
- 8.- Castro, B.N.: Diagnóstico Prenatal do sexo do feto Revista Brasileira de medicina., XI (4): Abril- (1954).
- 9.- Castro, B.N.: Diagnóstico Prenatal do sexo do feto., Revista Brasileira de Medicina., XI (8): Agosto (1954).
- 10.- Davis, H.: New Method of Prediction of sex foetus by Intradermal inyection of testicular extracts., New Engl. J. Med., 2: 10 (1934).
- 11.- Dewhurst.: Diagnosis of the sex before birth. - Landet., 270 (6821); 471-473 (1956).
- 12.- Dorn, J.E. y Sugarman, E.L.: Method of Prediction of sex in Newborn. Effect of urine from Pregnants on tests of rabbits. J.A.M.A., 99: 659 (1932).
- 13.- Pérez y P.F.: Fisiopatología de la Reproducción Animal. 1a. ed., Librería editorial Científico-Española. 1960.

- 14.- Fuchs, F. y Riis, P.: Antenatal sex Determination. Nature., London, 177:330 (1956).
- 15.- Greenblatt, R. and Nieburgs, H.E.: Specific Strogenic and androgenic Smears in relation to the fetal sex During Pregnancy. Obst. Gin., # 57 Feb. (1949).
- 16.- Mc Clave., J.T. and Dietrich, F.H.: Statistics Dellen Publishing Company, San Francisco, California, 1979.
- 17.- Negrete, G.G.: Diagnóstico de sexo del feto en vacas Preñadas. Tesis de Licenciatura. Fac. de Med. Vet. y Zoot. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F., 1964.
- 18.- Raap, W. y Richardson, G.C.: Saliva test for Prenatal sex Determination. Science. 115:265 (1952).
- 19.- Ruiz, C.M.: Reacciones Inmunológicas sobre papel filtro. Fijación en Superficie. Academia Nacional de Medicina Mex., Primer Centenario tomo 2:199 (1964).
- 20.- Ruiz, C.M.: Investigación de anticuerpos Ambientales por Fijación en Superficie. Gac. Med. Vet. 110-121 (1975).

- 21.- Ruiz, C.M., De la Torre y Aubanel, M.: Investigación de antígenos circulantes en amibiasis invasora. Gac. Med. Mex., 112:395 (1976).
- 22.- Ruiz, C.M.: Investigación de Reacciones provocadas por intercambio materno-fetales. Su aplicación al Diagnóstico Prenatal del sexo. Gac. Méd. Mex., 115 (11) Nov. (1979).
- 23.- Ruiz, C.M. y Vázquez, N.J.: Diagnóstico Prenatal del sexo en bovinos. XV Reunión Anual INIP 1979, 396-397.
- 24.- Ruiz, C.M. y Vázquez, N.J.: Método para la Determinación Prenatal del sexo en el ganado bovino. VIII Congreso de Buiatría., 1980, 125-127, ed Hospital Infantil de Mex.
- 25.- Sachs, L., Serr, D.M. y Danon, M.: Prenatal Diagnosis of sex using cells from the amniotic fluid. Science. 123:548 (1956).
- 26.- Seppala, M. y Ruoslahti, E.: Radioimmunoassay of maternal serum alpha fetoprotein during pregnancy and delivery. Amer. J. Obstet. Gynecol. 112:208 (1972).
- 27.- Vargas, A.S.: Estudio del sexo Cromatinico en bovinos. Tesis de Licenciatura. Fac.de Med.Vet y Zotec. Universidad Nacional Autónoma de México, D.F. 1964.