

Identificación anatómica, citogenética y molecular de un caso de síndrome de Freemartin*

Francisco José Valencia Alaix^{1/} Federico Johnson Navarro^{2/} Ángela María Duque Echeverri²

Línea de investigación: Biotecnología pecuaria. Semillero de Investigación en Biotecnología Pecuaria -BIPE-

Anatomical, cytogenetic and molecular identification of a Freemartin Syndrome Case

Resumen

Introducción: El síndrome Freemartin es una de las diferentes anomalías reproductivas que se pueden presentar en la cría del ganado bovino, y trae como consecuencia la disminución en la eficiencia reproductiva del hato y problemas en el rendimiento económico del mismo. Esta anomalía es un tipo de infertilidad que afecta principalmente a hembras del ganado bovino nacidas de partos gemelares heterosexuales, caracterizado por un subdesarrollo del tracto reproductivo. **Objetivo:** establecer el posible diagnóstico de síndrome Freemartin en una hembra nacida de un parto gemelar heterosexual. **Materiales y métodos:** el diagnóstico se realizó a partir de la evaluación anatómica de la hembra, el análisis cariotípico y de secuencias de ADN relacionadas con la determinación sexual. **Resultados:** la hembra bovina sufría de anomalías en su aparato reproductor que la caracterizaban como Freemartin, de igual forma mostró extendidos celulares con quimerismo cromosómico (60,XX/60,XY) y amplificó regiones específicas para el cromosoma Y. **Conclusión:** los tres métodos utilizados confirmaron el diagnóstico de la hembra como Freemartin.

Palabras clave: Intersexo. Quimerismo. Bovinos. Freemartin.

Abstract

Introduction: Freemartin syndrome is one of the different reproductive malformations that can come up in the cattle growing, and it produces consequences like a diminishing of the reproductive efficiency and economical losses due to that fact. This malformation is a kind of infertility that mainly affects cows which are born from heterosexual twin births, characterized by an underdevelopment of the reproductive tract. **Objective:** To establish the possible diagnosis for the Freemartin syndrome in a cow born in a heterosexual twin birth. **Materials and methods:** The diagnosis was made from an anatomical evaluation of the cow and the carioypical and DNA sequence analysis related to sexual determination. **Results:** The cow suffered from abnormalities of the reproductive apparatus which classified her as having the Freemartin syndrome, and she also showed cellular extensions with chromosomal quimerism (60,XX/60,XY) and amplified specific regions for the Y chromosome. **Conclusion:** The tree methods used confirmed the diagnosis of the cow as having Freemartin syndrome.

Key words: Intersex. Quimerism. Cattle. Freemartin.

* Investigación financiada con apoyo del Fondo de Fomento a la Investigación de la Corporación Universitaria Lasallista

¹ Zootecnista, Especialista en Biotecnología, Candidato a Magíster en Biotecnología Universidad Nacional de Colombia. Docente del Programa Industrias Pecuarias de la Corporación Universitaria Lasallista/ ² Estudiante de Industrias Pecuarias, Corporación Universitaria Lasallista

Correspondencia: Francisco Valencia Alaix. email: fjvalaix@lepm.net.co

Introducción

El síndrome Freemartin es una de las diferentes anomalías reproductivas, que se pueden presentar en la cría del ganado bovino y que trae como consecuencia la disminución en la eficiencia reproductiva del hato y problemas en el rendimiento económico del mismo.

Esta anomalía es un tipo de infertilidad que afecta principalmente a hembras del ganado bovino nacidas de partos gemelares heterosexuales, estando caracterizado por un subdesarrollo del tracto reproductivo.¹ Las alteraciones anatómicas provocadas por esta afección provocan: reversión gonadal hacia testículo, presencia de ovotestis (tejido propio de gónadas masculinas y femeninas) y desplazamiento de los genitales externos femeninos con características de genitales de macho. Dentro de las posibles causas de esta anomalía están: el intercambio de sangre a través una anastomosis vascular corioalantoidea de células germinales primordiales y hormonas (anti-Müllerianas) producidas por las células de Sertoli del embrión macho a su hermana hembra a partir del día 39 de gestación.^{1,2}

La incidencia del freemartinismo, depende de la incidencia de gestaciones gemelares, que varían de acuerdo a edad y raza del animal, siendo para Simmental del 2.4 - 4.6%, para Holstein Fresian del 0.5 - 4.2% y en Charolaise del 2.5 - 3.2%. Según Kästli, 1978, dentro de las gestaciones gemelares entre el 1 al 10% son Monocigóticas y el porcentaje restante son dicigóticas, representadas por un 25% de gestaciones macho-macho, otro 25% hembra-hembra y el 50% restante macho-hembra³ de estas entre el 91.9% y el 95.7% son Freemartin^{1,4}, el porcentaje restante pueden ser normales y funcionales²⁰. En partos individuales, también se han reportado anomalías intersexuales en las hembras, lo que hace pensar que cerca de un 2.9% de estas gestaciones habrían tenido un individuo macho que probablemente se reabsorbió en etapas tempranas de la gestación.³

El diagnóstico de este síndrome puede ser dado por la caracterización fenotípica de las hembras quienes poseen tamaños anormalmente mayores, cuernos gruesos, frente ancha, cuello corto y amplio, tronco grueso y musculatura

desarrollada; la vulva es corta, vello abundante y grueso y clítoris con diferentes tamaños.^{1,3,6} Los genitales internos presentan hipoplasia gonadal⁷, diferentes grados en la longitud vaginal y desarrollo del útero (rangos entre 1,2 hasta 21 centímetros).^{3,8}

En algunas hembras puede encontrarse órganos internos masculinos^{15,9,10} e incluso individuos con órganos con tejido ovárico, túbulos seminíferos y ovotestis.^{1,3,9} En cuanto a la posición las gónadas pueden presentar desplazamientos desde su sitio normal hasta descender en el canal inguinal.⁷ Algunos individuos pueden desarrollar testículos histológicamente normales pero no funcionales, es decir un testículo con túnica vaginal, túnica albugínea y túbulos seminíferos, separados por células intersticiales; ó individuos con ausencia total de gónadas³. A pesar que este método de diagnóstico es el más común y económico, requiere un desarrollo mínimo del individuo a evaluar (3 o 6 semanas de vida).

Una segunda alternativa para realizar el diagnóstico del síndrome Freemartin, es por medio de la técnica del cariotipo que caracteriza los cromosomas presentes en un individuo y determina la ocurrencia anomalías, con esta técnica se puede estudiar la presencia de quimeras leucocitarias o combinaciones anormales de cromosomas (60, **XX** / 60, **XY**)^{1,10}, lo cual es diferente al mosaico dado por el origen celular del mismo cigoto¹⁰. La técnica se basa en el cultivo de linfocitos tomados por muestras de sangre para aumentar su número, después de tratamientos químicos y mecánicos, se obtienen por goteo sobre la superficie de un portaobjetos cromosomas provenientes de células en metafase, que se analizan por tinción en busca de los cromosomas X y Y presentes en la muestra^{11,12}. Si se encuentra una célula con cromosomas X y Y se establece el quimerismo y así el individuo se considera como Freemartin⁷. La probabilidad de realizar un diagnóstico por cariotipo del Freemartin se da por la oportunidad de encontrar una mitosis XY en un individuo y esto varía con el número de células contadas, de acuerdo a lo anterior Eldrige y Balzac (1977) afirman que si un individuo posee un 5% de células con contenido cromosómico XY, se alcanzará un 92% de probabilidad en un conteo de 50 mitosis de encontrar una XY y se deberán contar al menos 168 mitosis en cada

individuo para lograr una probabilidad del 90% para encontrar una célula XY, mientras que Zhang y colaboradores en 1994, afirman que para lograr una probabilidad del 98% de hallar un quimerismo se deberá contar un total de 100 mitosis. Infortunadamente este sistema presenta inconvenientes en relación al tiempo de ejecución y seguridad en casos específicos frente a otros métodos de diagnóstico, ya que si un individuo posee baja proporción de células con cromosomas Y estos tendrán una baja probabilidad de ser detectados, debido a que el establecimiento de las mitosis sobre los portaobjetos es aleatorio además del proceso de ubicación y conteo de metafases, lo que podrá en un momento determinado provocar diagnósticos negativos falsos. Hasta el momento no se ha encontrado una correlación entre el porcentaje de células masculinas y la conformación anormal de la vagina, clítoris y órganos internos⁸.

La tercera forma de realizar el diagnóstico del freemartinismo es analizar la presencia de alelos relacionados con la determinación sexual en el ADN del individuo afectado^{5,13}, este método se basa en la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y ofrece una alta confiabilidad y sensibilidad dado que teóricamente puede detectarse la presencia de una secuencia en una célula afectada dentro de una muestra.

El objetivo de este estudio fue confirmar la hipótesis de que la hembra del parto gemelar era un caso de Freemartin, se plantearon tres formas de diagnóstico con diferentes grados de complejidad y aplicación.

Materiales y Métodos

Las muestras se obtuvieron a partir de tres animales (un par de hermanos gemelos y una hembra control), mantenidos en cautiverio en la Granja Santa Inés en el municipio de Caldas Antioquia. Los animales son un cruce comercial indeterminado entre individuos de las subespecies *Bos taurus* y *Bos indicus*. La descripción anatómica se realizó mediante evaluación física de los animales considerados, a los que se les inmovilizó para realizar una palpación externa de los órganos, así como de la profundidad de las estructuras vaginales. Se hizo registro fotográfico

de la anatomía. Las estructuras del aparato reproductor de la hembra se compararon con hembras con fertilidad probada. Para la evaluación cariotípica se hizo cultivo siguiendo el protocolo de López et al 1997¹², y se continuó con la técnica de citogenética convencional para el análisis cromosómico descrito por Moorhead¹⁴. En el análisis molecular del ADN se hizo según las recomendaciones del fabricante QUIAGEN.

Resultados

Durante la exploración anatómica de la hembra considerada como Freemartin, se pudo evidenciar la presencia de una distancia anogenital anormal de unos 32 cm (Foto 1), distancia que es superior a la encontrada en una hembra normal que es cercana a los 2.5 centímetros, la profundidad del conducto vaginal no superó los 2.5 cm y la abertura de la vulva tuvo una longitud de 1.9 centímetros, el orificio de entrada a la vagina no presentó labios vulvares definidos, ni clítoris pero si mostró un penacho de pelo grueso a nivel ventral, su contextura general externa mostró una apariencia masculinizada similar a la de su hermano gemelo.



Foto 1. Hembra Freemartin, donde se muestra el aumento de la distancia anogenital en forma anormal

La evaluación del cariotipo de los individuos muestreados, mostró en la hembra considerada como Freemartin, un quimerismo celular confor-

mado por mitosis con cromosomas X y Y (Foto 2), igualmente en el macho se pudo establecer la presencia en extendidos cromosómicos de mitosis con un par de cromosomas X, en la hembra utilizada como control no se evidenció la presencia de mitosis con cromosoma Y.

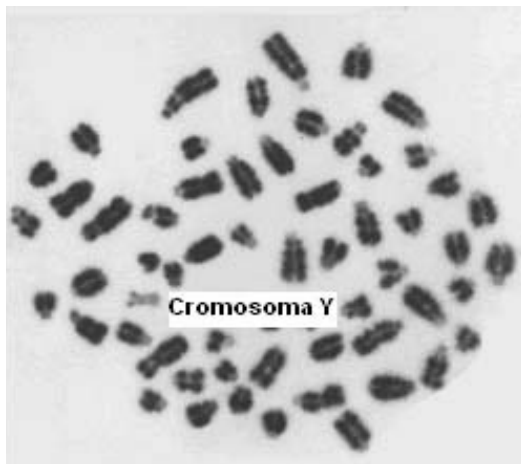


Foto 2. Metafase con tinción convencional Giemsa de la Hembra Freemartin, donde se muestran 60 cromosomas XY

Las evaluaciones de las pruebas con ADN de la hembra considerada como Freemartin, mostró la amplificación de las regiones: SRY con tamaños cercanos a las 400 pb y ZFX con tamaños cercanos a las 200 pb, de igual forma se presentó para el macho. La Hembra control solo presentó la amplificación de la región ZFX.

Discusión

El análisis de las observaciones fenotípicas realizadas a la hembra nacida del parto gemelar, mostró un desplazamiento anormal de la abertura vaginal, lo que permite suponer que la anastomosis vascular entre los hermanos, se pudo haber presentado temprano en la gestación, cerca del día 47 cuando se da el aumento de la distancia anogenital y diferenciación sexual como lo plantea la literatura, el análisis del cariotipo de esta hembra mostró en las mitosis evaluadas la presencia de cromosomas X y Y, hecho que sustenta el intercambio celular entre los gemelos

heterosexuales, de igual forma se pudo establecer la amplificación de las regiones XFX y SRY en la hembra, lo que sustenta la expresión de los genes relacionados con la determinación sexual y que trajeron como consecuencia la presentación de las anomalías fenotípicas descritas anteriormente. Los datos recolectados a partir del análisis de la anatomía, cariotipo y ADN de los individuos considerados en el trabajo, sugieren que bajo las condiciones del estudio, los tres métodos son contundentes para determinar el diagnóstico de la hembra como Freemartin.

Conclusión

En el estudio anatómico, citogenético y molecular de regiones determinantes del sexo en el ADN, en un par de gemelos criados en la Granja Santa Inés confirmaron el diagnóstico de la hembra como Freemartin. Los resultados se ajustan a las publicaciones consultadas.

Referencias

1. MARCUM, J. B. 1974. The freemartin syndrome. *Animal Breeding Abstracts*. 42: 227-242.
2. KHAN, M.Z.; G.L. FOLEY. 1994. Retrospective Studies on the measurements, Karyotyping and pathology of reproductive organs of bovine freemartins. *Journal of Comparative Pathology*. 110: 25-36.
3. WIJERATNE, W; I. MUNRO; P. WILKES. 1977. Heifer sterility associated with single-birth freemartinism. *The Veterinary Record*. 100: 333-336.
4. GREGORY, K.E.; S.E. ECHETERNKAMP; L. V. CUMDIFF. 1996. Effects of twinning on dystocia, calf survival, calf grow, carcass trails and cow productive. *Journal Animal Science*. 74: 1223-1233.
5. FUJISHIRO, A; K. KAWAKURA; V. MIYAKE; Y. KANEDA. 1995. A fast, convenient diagnosis of the bovine freemartin syndrome using polymerase Chain reaction. *Theriogenology*. 43: 883-891.

6. LUI, J.; H. TONHTT; P.A. TOSTA; M.A. GIANNONI; M. L. GIANNONI. 1987. Subfertilidade e esterilidade em bovinos holandeses com aberrações cromosômicas numéricas e estruturais. *Ars Veterinari*. 3: 227-234.
7. KÄSTLI, F. 1978. Cattle twins and freemartin, diagnosis. *The Veterinary Record*. 102: 80-83.
8. GREENE, W.A.; H. O. DUNN; R.H. FOOTE. 1977. Sex-Chromosome ratios in cattle and their relationship to reproductive development in freemartins. *Cytogenetics and Cell Genetics*. 18: 97-105.
9. WILKES, P. R.; W. WIJERATNE; I. MUNRO. 1981. Reproductive anatomy and cytogenetics of freemartins heifers. *The Veterinary Record*. 108: 349-353.
10. ELDRIDGE, F.E. 1985. Cytogenetics of Livestock. AVI Publishing Company. pp: 65-92.
11. HENAO, F.J.; J. C. QUINTERO; V. GIRALDO; G. GOMEZ; J. E. SÁNCHE. 1998b. Hallazgos histopatológicos en casos de Freemartinismo bovino diagnosticado citogenética y anatomopatológicamente. *Revista Veterinaria y Zootecnia de Caldas*. 10: 3-6.
12. LOPEZ J.B. y CAMARGO M. 1984. Estudio del efecto de una base análoga (Fd Urd) en la replicación cromosómica en linfocitos humanos. Medellín 120 p. Tesis (Magíster en Biología). Universidad de Antioquia. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales.
13. MOMMENS, G.; A. VAN ZEVEREN; L. PEELMAN. 1997. Kween detectie met behulp van een Y chromosoom specifieke DNA sequentie. *Vlaams Diergeneeskd Tijdschr*. 66: 88-92.
14. MOORHEAD P.S. 1960 Chromosome preparations of leukocytes cultures from human peripheral blood. En : *Experiment Cell Research*. Vol 210 ; p. 613-616.