

GM 17. VENTAJAS DE LA DETECCIÓN PRECOZ DEL FREEMARTIN MEDIANTE ANÁLISIS CARIOLÓGICO

M. Tirado, O. Vera, A. Fernández, V. Bermúdez y G. Muñoz

Universidad Central de Venezuela. ¹Facultad de Veterinaria, Instituto de Reproduccion Animal e Inseminacion Artificial (IRAIA), Maracay 2101. Estado Aragua. Venezuela. ²Universidad Simon Bolivar. Departamento de Biología de Organismos. Apartado 89000. Caracas. Estado Miranda. Venezuela.

Abstract

Freemartin early detection by means of kariologic analysis

Freemartins are XX/XY chimeras that develop as a consequence of fusion of the chorioallantoic circulation in pregnancy of heterosexual cotwins. The external appearance of a freemartin may vary from an apparently normal female to a somewhat masculinized individual. With the purpose to know the degree of chimerism and its relationship with the masculinization and developmental aberration of reproductive organs, which varies from animal to animal, chromosomal analysis was performed in peripheral blood cells of three females born cotwins with a male, one of them was 2 years old and the other two were 4 months old. The oldest was sacrificed, because had been demonstrated that it was sterile. The macro and microanatomy were performed to know the degree of masculinization of the female organs. It was recognized ovotestes, uterus, seminal vesicle, deferent duct, vagina, clitoris and vulva. The three females exhibited XX/XY chimerism in the lymphocytes analyzed. 30, 45 and 60 % of XY lymphocytes were observed in the female 2 years old and in both 4 months old respectively. These results demonstrated that is convenient to perform early the chromosomal diagnosis in all the heifers born heterosexual cotwins. This conclusion is supported since the females 4 month old apparently normal were sterile, which was confirmed when they were 2 years old. Usually the farmer waits until the cow demonstrated to be sterile to decide her sacrifice. The premature diagnosis of the chimerism XX/XY is a good orientation about the future cow reproductive efficiency.

Palabras claves: Freemartin, masculinizacion, kariologia en mosaico, esterilidad.

Key words: Freemartin, masculinization, mosaic kariology, sterility.

Introducción

El freemartinismo fue descrito por primera vez por Hunter en 1779. Se define como un freemartin una novilla proveniente de un nacimiento gemelar con un macho, en la cual el desarrollo de los órganos sexuales ha sido suprimido o alterado, debido al intercambio de células sanguíneas constitutivas del gemelo macho y sus factores de diferenciación sexual. El factor anti-Mulleriano y la testosterona ejercen su efecto sobre el tracto reproductivo femenino. Varios grados de masculinización del tracto reproductivo femenino se han observado, lo cual puede estar en relación con el grado de quimerismo o mosaico cromosómico presente (Herchler and Ferchheimer, 1967; Marcum y col., 1972).

El mosaico cromosómico se ha demostrado en los linfocitos circulantes en vacas nacidas de gemelos heterosexuales. Se ha demostrado que cuando esto ocurre la hembra es estéril, conocida como freemartin (Eldridge y Blasak, 1976). Aproximadamente el 92 % de las hembras nacidas de este tipo de nacimiento son estériles (Kastli and Hall, 1978; Marcum, 1974). Herchler y Fechheimer (1967) propusieron que el freemartinismo es debido a la presencia de células XY en la circulación. Vigier *et al.* (1984), postulan que el mosaico XX/XY no es la causa de los cambios tempranos en el desarrollo fetal, porque si los gemelos son separados en el día 37 y 45, después que se ha establecido la anastomosis vascular y el quimerismo, las hembras gemelas con el macho tenían células XY en el hígado pero no mostraban anomalías sexuales en el día 60. Estas observaciones permitirían proponer que la hormona antiMulleriana sería la causa de la supresión del desarrollo sexual femenino normal.

El propósito de este trabajo fue analizar la kariología y la anatomía macro y microscópica de dos vacas provenientes de dos nacimientos gemelares heterosexuales. La mayor de estas hembras fue sacrificada debido a que era estéril, la segunda tenía 4 meses de edad y su fertilidad no había sido probada.

Materiales y métodos

Animales. Se realizó el análisis cromosómico de las dos hembras, mediante el cultivo de linfocitos periféricos. Una hembra tenía 2 años y la otra 4 meses.

Cultivo de sangre periférica para la obtención de cariotipo. Células sanguíneas periféricas fueron cultivadas por 72 horas en medio RPMI 1640, tamponado con Heps y suplementado con suero fetal de bovino al 20 %, Concanavalina A (0.03 microgramos /mL), 1 % L-Glutamina (200 mM) y 0.02 % de penicilina Streptomycin (10.000 U.I.). Las células fueron incubadas con demecolcina (0.05 microgramos/mL) durante 1 h antes de terminar el tiempo de incubación y recoger el cultivo. Los cultivos fueron expuestos a una solución hipotónica en 4 mL de citrato de sodio (0.85 %) durante 30 minutos a 37 °C y fijados por 2.5 h en etanol: ácido acético (3:1 volúmenes), a la temperatura ambiente. La suspensión celular fue luego goteada en portaobjetos fríos e inmediatamente pasados por la llama de mechero a alcohol. Una semana más tarde las preparaciones fueron teñidas con Giemsa, para realizar el análisis cromosómico. Las preparaciones fueron observadas bajo microscopio de campo claro, 100 metafases fueron examinadas, fotografiadas y diagnosticadas de acuerdo a la Segunda Conferencia para la Estandarización de Cariotipos de Animales Domésticos (Di Bernardino y col., 1990)

Examen macro y microscópico del tracto reproductivo de las hembras. Se examinó el tracto reproductivo de la hembra estéril de dos años de edad. Las gónadas, útero, vesículas seminales y vías genitales fueron obtenidas, observadas y fijadas para el estudio histológico. Se obtuvieron cortes de 5-6 micrómetros de grosor y se tiñeron con hematoxilina-eosina, según la técnica descrita por Drury y col. (1967).

Resultados

La apariencia externa de la hembra freemartin fue completamente normal, presentó una vulva, un clítoris y una vagina de tamaño normal. Los órganos internos fueron caracterizados por una masculinización de las gónadas, un desarrollo retardado de los derivados de los conductos paramesonefricos y mesonefricos. En resumen, es posible reconocer ovotestes, útero, vesículas seminales, conducto deferente, vagina, clítoris y vulva.

Las características histológicas de los órganos reproductivos fueron las siguientes: ovotestes, exhibiendo un estroma fibroso ovárico (sin ovocitos), entre el estroma se observaron túbulos seminíferos delineados por células de Sertoli y rodeados por tejido intersticial. Útero hipoplásico, presentando un epitelio cuboidal. Vesículas Seminales con abundante tejido conectivo fibroso y escaso tejido glandular. Además se observó un conducto deferente inmaduro.

Ambas hembras presentaron cariotipo en mosaico XX/XY en los linfocitos analizados. Al menos 100 metafases fueron observadas, provenientes del cultivo. En la hembra de 2 años se observó 30 % de linfocitos XY y en la hembra de 4 meses 60 %.

Discusión

Los cariotipos de ambas hembras obtenidos en este estudio demostraron que la anastomosis vascular ocurrió durante el desarrollo fetal. Es importante observar al menos 100 metafases para determinar la proporción de metafases XX y XY, para conocer el alcance que pudo tener el intercambio de células sanguíneas, lo cual daría una idea del paso de factores. Es sabido que el grado de masculinización del tracto reproductor femenino varía ampliamente en estos casos (Horton y col., 1980). En efecto el análisis del tracto de la hembra demostró un alto grado de masculinización. Aunque se ha sugerido que no hay asociación entre el grado de anomalías en el tracto femenino y el porcentaje de células XY (Vigier y col., 1984; Horton y col., 1980), se ha propuesto que la conexión vascular entre gemelos, podría provocar el intercambio de células portadoras del antígeno H-Y, lo que podría significar instrucciones para orientar la diferenciación y organización de la gónada femenina en testículo (Ohno y col., 1976). Actualmente existen evidencias que demuestran que esta patología no se debe solo al efecto de la testosterona o de la hormona antiMulleriana sobre el tracto reproductivo femenino. Ohno (1979) ha propuesto la hipótesis que atribuye a una sustancia semejante al antígeno H-Y, la cual actúa *in vitro* sobre el ovario de bovino transformándolo en testículo. A pesar de las numerosas investigaciones realizadas durante este siglo no ha sido posible identificar el factor o los factores que alteran la diferenciación del ovario, probablemente se requiere de mas investigaciones. Es importante destacar que el análisis cromosómico de los animales provenientes de nacimientos gemelares, en particular las hembras, es altamente recomendable para obtener un diagnostico precoz de la cariología en mosaico y predecir sus posibles efectos en la fertilidad de las hembras, de esta manera se evitaría la espera infructuosa hasta que se demuestre que la hembra es estéril. Todo nacimiento gemelar heterosexual representa el riesgo de producir una hembra estéril.

Literatura citada

- Di Berardino, D., H. Hayes, R. Fries and S. Long. 1990. International system for cytogenetic nomenclature of domestic animals 2nd International Conference on Standardization of domestic Animal Karyotypes. *Cytogenet. Cell. Genet.* 53:65-79.
- Drury, R.A.B., E.A. Wallington and S.R. Cameron. 1967. In: Carleton's Histological Technique. Oxford University Press. pp:128-129
- Elridge, F.E. and W.F. Blasak. 1976. Chromosomal analysis of fertile female heterosexual twins in cattle. *J. Dairy Sci.* 60:458-463
- Herchler, M.S. and N.S. Fechheimer. 1967. The role of sex chromosomes chimerism in altering sexual development in mammals. *Cytogenet.* 6:204-212.
- Horton, M.B., G.B. Anderson, R.H. BonDurant and P.T. Cupps. 1980. Freemartins in beef cattle twins induced by embryo transfer. *Theriogenology* 14(6):443-451.
- Kastli, F. and J.G. Hall. 1978. Cattle twins and freemartin diagnosis. *Vet. Rec.* 102:80-83
- Lillie, F.R. 1916. The theory of freemartin. *Science* 43:611-613
- Marcum, J.B., J.F. Lasley and B.N. Day. 1972. Variability of sex chromosome chimerism in cattle from heterosexual multiple birth. *Cytogenet.* 11:388-389.
- Marcum, J. B. 1974. The freemartin syndrome. *Anim. Breed. Abst.* 42:227-242.
- Ohno, S., L.C. Christian, S.S. Wachtel and G.C. Koo. 1976. Hormone like role of H-Y antigen in bovine freemartin gonad. *Nature* 261:597-599.
- Ohno, S. 1979. Major sex-determining genes. Springer-Verlag. Heidelberg.
- Vigier, B., D. Tran, L. Legeai, J. Bezard and N. Josso. 1984. Origin of anti-Mullerian hormone in bovine freemartin fetuses. *J. Reprod. Fert.* 70:473-479.