

Diagnóstico molecular, citogenético y anatomohistopatológico del Síndrome Freemartin en hembras bovinas en Colombia

Molecular, cytogenetic and anatomohistopathologic diagnostic of freemartin syndrome on females cattle in

*Ximena Cardona Lopera**, *Juan Fernando Vásquez Cano***, *Juan Bautista López Ortiz****,
*Lina María Correa Estrada*****

DOI: 10.15446/rev.colomb.biote.v18n2.61524

Resumen

El síndrome Freemartin es un estado de intersexualidad de muchas de las hembras bovinas provenientes de parto múltiple heterossexual (macho – hembra). Éste se origina en la vida fetal entre los 30 y 40 días de gestación producto del intercambio transplacentario de células mediante anastomosis vasculares, presentándose fenómenos de quimerismo 60XX/XY en varios tejidos, y esterilidad consecuente. En el presente trabajo se tomaron 106 muestras de sangre de terneras provenientes de parto múltiple heterossexual, se realizó extracción de ADN de leucocitos y se buscó la amplificación del gen SRY asociado al cromosoma “Y” mediante PCR y lectura en gel de agarosa. 90 terneras (84.9%) de las 106 amplificaron SRY, verificando el quimerismo 60XX/XY, y 16 terneras (15.1%) que no amplificaron el gen, libres del síndrome quimérico y por lo tanto, aptas reproductivamente. El análisis citogenético realizado mediante cultivo de linfocitos demostró la presencia del cromosoma “Y” en linfocitos de hembras positivas a SRY y la ausencia del quimerismo en hembras SRY negativas. El análisis anatómico post mortem de tractos reproductivos de hembras positivas a SRY detectó anomalías características del síndrome tales como, clítoris hipertrofiados y atresias ductales cervicales. El análisis histopatológico de placas de gónadas de estos animales evidenció la presencia de ovotestículos. El presente estudio confirma la utilidad de las técnicas de biología molecular como herramientas diagnósticas del síndrome, para el aprovechamiento de hembras de reemplazo al servicio del ható bovino.

Palabras clave: cariotipo, genotipificación, intersexualidad, quimerismo, SRY.

Abstract

Freemartin syndrome is a intersexuality condition developed in many of the female calfs born from heterosexual multiple calvings (male female). This originates in the fetal development between 30 and 40 days of gestation with transplacental exchange of cells through vascular anastomosis, occurring 60XX/XY chimerism in various tissues, and consequent sterility. In this paper was took blood samples from 106 female calves born from a multiple heterosexual calving. DNA was extracted from leucocytes and searched the SRY gene amplification associated with the Y chromosome by PCR and reading in agarose gel. 90 of 106 samples (84.9%) was amplified the SRY gene, verifying the 60XX/XY chimerism, and 16 samples (15.1%) that did not amplify the gene. Cytogenetic analysis using lymphocytes cell cultures showed the presence of Y chromosome in samples positive for SRY and absence of chimerism in SRY negative samples. The postmortem analysis of female reproductive tracts of SRY positive calves, shows anatomical abnormalities such as clitoris hypertrophy and cervical atresia. Histological examination of gonads of these animals confirmed the presence of ovotestis. This study confirms the usefulness of molecular biology techniques as diagnostic tools of the syndrome, for the use of replacement females in cattle.

Keywords: cariotype, chimerism, intersexuality, genotypification, SRY.

Recibido: agosto 10 de 2015

Aprobado: noviembre 1 de 2016

* Bióloga, Universidad de Antioquia, MSc en Ciencias Agrarias. Grupo BIOGEM. Facultad de Ciencias Agrarias Universidad Nacional, sede Medellín. Asistente Técnico, Cooperativa Colanta Ltda. ximenacl@colanta.com.co

** Médico Veterinario, MSc en Ciencias Animales Universidad de Antioquia. Grupo de investigación Biogénesis, Facultad de Ciencias Agrarias. Asistente Técnico, Cooperativa Colanta Ltda. jufevaca@gmail.com

*** Biólogo, MSc en Biología Docente, Escuela de Biociencias. Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín. jblopez@unal.edu.co

**** Ingeniera Biológica, Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín

Introducción

El síndrome Freemartin es el fenómeno de intersexualidad de mayor frecuencia de presentación en bovinos, aunque también se ha documentado en ovinos, caprinos, ciervos, porcinos y camélidos (Padula, 2005). El síndrome de Freemartin se puede definir como un animal estéril proveniente de un parto mellizo heterosexual, es decir un macho y una hembra. En las gestaciones múltiples bovinas, el desarrollo simultáneo de dos o más embriones posibilita la fusión de las membranas fetales con formación de anastomosis vasculares a nivel del alanto-corion (Ayala *et al.*, 2007), que permiten intercambiar en forma bidireccional células madre hematopoyéticas resultando en quimerismo permanente de los mellizos, y paso de hormona antimülleriana del macho a la hembra que resulta en atrofia de los conductos paramesonéricos del feto con las lesiones anatómicas características del síndrome (Pessa-Morikawa *et al.*, 2004). Las Freemartin también pueden ser producto de nacimiento de hembras únicas, como consecuencia de la muerte fetal precoz y reabsorción del mellizo macho en el útero después del establecimiento de la anastomosis vascular (Smith *et al.*, 1977, Parkinson *et al.*, 2001). Varios estudios han medido la frecuencia de estas fusiones en diferentes partes del mundo, reportando la presencia del síndrome entre el 85 y el 95% de las hembras provenientes de parto múltiple heterosexual (Romagnano *et al.*, 1988; Ayala *et al.*, 2007).

Fenotípicamente, la apariencia y los genitales externos de una Freemartin indican sexo femenino; en algunos casos puede presentarse hipertrichosis en el vértice de la comisura vulvar como signo masculinizante (Grunert, 1988); a nivel de los órganos reproductores internos se observan diferentes grados de subdesarrollo (vaginas ciegas, ovarios hipoplásicos, agenesia total o parcial de cuernos uterinos, etc.) o bien puede observarse desarrollo de órganos reproductores masculinos incipientes (epidídimos, vesículas seminales, tejido testicular, etc.) (Wilkes *et al.*, 1980), o tejido mixto, llamado ovotestis (Valencia *et al.*, 2005). A medida que la edad de estas hembras aumenta, se puede observar un cambio conformacional del cuerpo que la lleva a presentar aspecto de macho (tabla del cuello ancha, cuernos gruesos, frente ancha, musculatura desarrollada, predominancia del diámetro torácico sobre el abdominal, escaso desarrollo mamario, etc.). El clítoris puede hipertrofiarse llegando a adquirir el tamaño y la forma de un pequeño pene (Bonnevaux & Baptista, 1982).

A nivel genético a las hembras Freemartin son quimeras. Esto se refiere a individuos que presentan poblaciones celulares provenientes de cigotos diferentes (Chu *et al.*, 1964). En el caso concreto del síndrome Freemartin se trata de quimerismo de los cromosomas sexuales, donde una población celular será 60/XX y otra 60/XY. Este fenómeno se puede presentar en tejidos de origen mesodérmico como la sangre, gónadas,

riñón e hígado y en tejidos de origen endodérmico como pulmón, pero no en tejidos de origen ectodérmico como la piel (Kanagawa *et al.*, 1965). El cariotipo de linfocitos cultivados ha sido una técnica citogenética de amplia utilización para detectar el quimerismo XX/XY (Padula, 2005). Mediante esta técnica se ha encontrado que el quimerismo XX/XY oscila entre el 2 y 96% de las células analizadas. Una hembra con bajo porcentaje de células XY es tan infértil e improductiva como otra con alto porcentaje de éstas (Wilkes *et al.*, 1980). El quimerismo XX/XY puede presentarse de manera concomitante con otras anomalías cromosómicas como son fusiones de cromosomas, translocaciones y trisomías XXY (Padula, 2005).

Durante los últimos años, las técnicas de biología molecular han permitido profundizar en el estudio del síndrome Freemartin. La amplificación de secuencias nucleotídicas específicas del cromosoma "Y" mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) han permitido comprobar la presencia de quimerismo en muestras de sangre de mellizas dicigóticas. La sensibilidad de la prueba permite la detección de células quiméricas en niveles inferiores al 0.05%. Esto se suma a otras ventajas de la prueba, como son su alta especificidad, rapidez y bajo costo. La literatura reporta la utilización de algunos de los genes asociados al cromosoma "Y" para el diagnóstico, tales como ZFY/ZFX (Ayala *et al.*, 2007), AMX/Y, BOB97M, BRY.1, BRY-4a, btDYZ-1 y SRY (Ennis *et al.*, 1999, Padula, 2005). SRY (Sex-determining Region Y - Región Y determinante del sexo) es un gen requerido en machos para iniciar procesos de diferenciación testicular e inhibir vías de diferenciación femenina. La falla en la expresión de este gen desencadena deterioro en la morfogénesis gonadal y permite desarrollo de estructuras foliculares que dan lugar a los ovotestis (Payan-Carreira *et al.*, 2008).

El presente trabajo pretende conocer algunas características del síndrome Freemartin en los bovinos en Colombia y el desarrollo de las herramientas de biología molecular complementadas con el análisis citogenético y anatomopatológico para su diagnóstico.

Materiales y métodos

Población. Los animales analizados fueron hembras bovinas nacidas de parto múltiple heterosexual reportadas por ganaderos proveedores de la Cooperativa Colanta a su Departamento de Asistencia Técnica entre enero de 2009 y diciembre de 2012. Estos animales provinieron principalmente de sistemas de lechería especializada y doble propósito del norte y oriente Antioqueño.

Toma de muestras. A cada una de las hembras reportadas se le realizó desinfección de la piel con alcohol etílico y toma de muestra de sangre entera mediante punción en la vena yugular o caudal. La sangre fue colectada en tubos de 4 ml de capacidad que contienen 7,2 mg de EDTA (Vacutainer® - BD Franklin Lakes NJ

USA). Cada muestra se tomó por duplicado y fue transportada en cava con refrigerante a 4 °C hasta el laboratorio de Genética Animal de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Antioquia.

Análisis molecular. Se realizó extracción de ADN nuclear de leucocitos mediante el método de *Salting Out* (Miller *et al.*, 1988) y precipitación de ADN con isopropanol. El material obtenido fue resuspendido en 200 µL de buffer TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA) y almacenado en tubos eppendorf a -20 °C. Mediante la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa PCR se amplificó el gen SRY. Los primers utilizados contenían la siguiente secuencia de nucleótidos: F-5´- TTCATTGTG-TGGTCTCGTGA - 3´; R-5´- GTAGTCTCTGTGCCTCCTC - 3´ (López y Vásquez, 2004). La PCR fue realizada en un volumen final de 25µL que contenía: 2 µL de ADN; 2.5 µL de Buffer 10X; 25 mM de MgCl₂; 2 mM dNTPS, 0.5 µM Primers y 5 U Taq ADN polimerasa (Fermentas®). La PCR se realizó en un termociclador Bio-Rad Termal cyler C1000®. Se realizó un ciclo inicial de desnaturalización de 94 °C por 3 minutos. A continuación 31 ciclos en las siguientes condiciones: 94 °C por 1 minuto para desnaturalización, 53 °C por 1 minuto para anelizing y 72°C por 1 minuto para extensión. Adicionalmente, un ciclo final de extensión a 72 °C durante 9 minutos. Los productos de amplificación fueron separados por electroforesis en geles de agarosa de bajo punto de fusión al 3% y teñidos con bromuro de etidio (10 mg/mL) en buffer TBE 1X. Los productos fueron analizados en presencia de luz ultravioleta en un equipo de fotodocumentación (BioDocAnalyze). Todo diagnóstico incluyó la amplificación del gen SRY en un control positivo (ADN macho bovino) y la ausencia de amplificación del gen SRY en un control negativo (ADN hembra normal bovina). Adicionalmente, para verificar la calidad del ADN, se amplificó un fragmento del gen β - lactoglobulina presente en el cromosoma 11 del genoma bovino. Al no estar asociado a cromosomas sexuales, todas las muestras lo debieron amplificar.

Análisis citogenético. A partir de los resultados moleculares se seleccionaron dos terneras: una diagnosticada como Freemartin y otra libre del síndrome. En cada una se rasuró la zona del cuello a la altura de la vena yugular y se desinfectó la piel con alcohol etílico y yodo. A continuación, se realizó punción en la vena yugular con una jeringa de 10 mL que contenía 0.1 mL (100 µL/ 10 mL) de heparina y se extrajo 10 mL de sangre entera. Las muestras fueron transportadas bajo refrigeración a 4 °C hasta el laboratorio de Biotecnología Animal de la Universidad Nacional sede Medellín. A continuación, se realizó cultivo de linfocitos preparando una solución que incluye 9 mL de medio RPMI 1640 completo, 1 mL de Suero Fetal Bovino - SFB, 100 µL de Fitoheaglutinina y 1 mL de muestra de sangre. Esta mezcla fue incubada a 37 °C durante 72 horas. Seis horas antes de finalizar la incubación, se adicionó 25 µL de 5-Bromo-2-deoxiuridina a una concentración de 5µg/mL y una hora antes de finalizar se incorporó

100 µL de colchicina al 0.04% para lograr extendidos prometáfásicos de alta resolución combinado con un alto número de mitosis. Este cultivo se centrifugó y se descartó el sobrenadante; luego se adicionó una solución hipotónica de KCL 0.075 M durante 10 minutos. Las muestras se fijaron con una preparación de metanol y ácido acético en proporción (3:1) y se agitaron vigorosamente. Luego se realizó el goteo de extendidos mitóticos en placas limpiadas previamente con etanol para finalmente sellar las placas con 0.3-0.5 mL de fijador fresco. Las metafases obtenidas se observaron en un microscopio a 100X con ayuda del aceite de inmersión buscando la presencia de quimerismo XX/XY y midiendo el porcentaje de extendidos que portaron el cromosoma "Y".

Análisis anatomopatológico. Dos terneras diagnosticadas SRY (+) fueron enviadas a las instalaciones de FrigoColanta en el municipio de Santa Rosa de Osos (Antioquia). Allí fueron beneficiadas, posteriormente evisceradas y sus tractos reproductivos fueron separados y fotografiados para análisis anatomopatológico. De éstas se sacaron muestras de ovario y oviducto con bisturí no mayores a 5mm y se transportaron en tubos plásticos con formol al 10% al laboratorio de histopatología de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad de Antioquia. Allí las piezas fueron teñidas con hematoxilina-eosina y fijadas en placa con parafina. Las placas se observaron en microscopio a 100 y 400x y se fotografiaron para el análisis histopatológico.

Resultados

Análisis molecular. Se realizó diagnóstico molecular para síndrome Freemartin mediante PCR de un total de 106 muestras de sangre proveniente de terneras mellizas nacidas de parto heterosexual entre enero de 2009 y diciembre de 2012 (tabla 1). Se obtuvo un amplificado de 151 pb correspondiente a un fragmento de gen SRY en 90 muestras de ADN provenientes de hembras mellizas las cuales se diagnosticaron como positivas para el síndrome Freemartin. Entre tanto, 16 muestras no presentaron amplificados por lo tanto se diagnosticaron como hembras libres del síndrome.

Por raza, del total de terneras analizadas, el 75.5% (80 casos) fue holstein, 6.6% (6 casos) jersey, 2.8% simmental y holstein x jersey con 3 casos cada uno, 1.9% (2 casos) holstein x ayrshire; y 0.9% gyr x holstein, jersey x holstein, angus, jersey x simmental x holstein, brahman x holstein, rojo sueco, jersey x holstein x rojo sueco x ayrshire, holstein x angus, holstein x rojo sueco y pardo suizo x holstein, con un caso cada uno.

La figura 1 enseña los resultados encontrados en un gel de agarosa para las muestras # 2, 5, 7, 10, 15, 21 y 28.

De izquierda a derecha: carril 1: Marcador de peso molecular 50 pb. Carril 2: control positivo (ADN de

Tabla 1. Resultados obtenidos del análisis molecular del gen SRY de 106 muestras de terneras nacidas por parto múltiple heterosexual en Colombia.

# MUESTRA	RAZA	MUNICIPIO	RESULTADO*	# MUESTRA	RAZA	MUNICIPIO	RESULTADO*	# MUESTRA	RAZA	MUNICIPIO	RESULTADO*
1	ANGUS	ANGOSTURA	NORMAL	37	HOLSTEIN	YARUMAL	FREEMARTIN	73	HOLSTEIN	ENTRERRÍOS	NORMAL
2	HOLSTEIN	MEDELLÍN	FREEMARTIN	38	HOLSTEIN	YARUMAL	FREEMARTIN	74	HOLSTEIN	SANTA ROSA	FREEMARTIN
3	HOLSTEIN	SAN PEDRO	FREEMARTIN	39	HOLSTEIN	ENTRERRÍOS	FREEMARTIN	75	HOLSTEIN	ENTRERRÍOS	FREEMARTIN
4	HOLSTEIN	SAN PEDRO	FREEMARTIN	40	HOLSTEIN	SANTA ROSA	FREEMARTIN	76	HOLSTEIN	ENTRERRÍOS	FREEMARTIN
5	HOLSTEIN	ENTRERRÍOS	FREEMARTIN	41	HOLSTEIN	SANTA ROSA	FREEMARTIN	77	HOLSTEIN	ENTRERRÍOS	FREEMARTIN
6	HOLSTEIN	SAN PEDRO	FREEMARTIN	42	JERSEY	ENTRERRÍOS	FREEMARTIN	78	HOLSTEIN	LA UNIÓN	NORMAL
7	ROJO SUECO	SAN PEDRO	NORMAL	43	HOLSTEIN	SAN PEDRO	FREEMARTIN	79	SIMMENTAL	YARUMAL	FREEMARTIN
8	HOLSTEIN	SAN PEDRO	NORMAL	44	HOLSTEIN	CAROLINA	FREEMARTIN	80	HOLSTEIN	SANTA ROSA	FREEMARTIN
9	HOLSTEIN	SAN PEDRO	FREEMARTIN	45	HOLSTEIN	SANTA ROSA	FREEMARTIN	81	HOLSTEIN	ENTRERRÍOS	NORMAL
10	JERSEY	SAN PEDRO	FREEMARTIN	46	HOLSTEIN	BELMIRA	FREEMARTIN	82	HOLSTEIN	ENTRERRÍOS	NORMAL
11	CE x HO	BELMIRA	FREEMARTIN	47	HOLSTEIN	SANTA ROSA	FREEMARTIN	83	HO x R SUECO	SAN PEDRO	FREEMARTIN
12	HOLSTEIN	BELMIRA	FREEMARTIN	48	HOLSTEIN	SANTA ROSA	FREEMARTIN	84	HOLSTEIN	COPACABANA	FREEMARTIN
13	HOLSTEIN	ENTRERRÍOS	FREEMARTIN	49	SIMMENTAL	CAROLINA	FREEMARTIN	85	HOLSTEIN	FRONTINO	FREEMARTIN
14	HOLSTEIN	ENTRERRÍOS	FREEMARTIN	50	HOLSTEIN	MEDELLÍN	FREEMARTIN	86	JERSEY	BELMIRA	FREEMARTIN
15	HOLSTEIN	CAROLINA	FREEMARTIN	51	HOLSTEIN	ENTRERRÍOS	FREEMARTIN	87	JERSEY	BELMIRA	NORMAL
16	HOLSTEIN	BELMIRA	FREEMARTIN	52	HOLSTEIN	SANTA ROSA	FREEMARTIN	88	JERSEY	BELMIRA	NORMAL
17	HOLSTEIN	ENTRERRÍOS	FREEMARTIN	53	HOLSTEIN	ARMENIA	FREEMARTIN	89	HOLSTEIN	ENTRERRÍOS	FREEMARTIN
18	HOLSTEIN	ENTRERRÍOS	FREEMARTIN	54	HOLSTEIN	BELLO	FREEMARTIN	90	HOLSTEIN	ENTRERRÍOS	FREEMARTIN
19	HOLSTEIN	ARMENIA	FREEMARTIN	55	HOLSTEIN	SAN PEDRO	FREEMARTIN	91	JERSEY	SAN PEDRO	FREEMARTIN
20	HOLSTEIN	CAROLINA	FREEMARTIN	56	HOLSTEIN	BELMIRA	FREEMARTIN	92	HOLSTEIN	SAN PEDRO	FREEMARTIN
21	HOLSTEIN	BELMIRA	FREEMARTIN	57	HOLSTEIN	SANTA ROSA	FREEMARTIN	93	HOLSTEIN	ENTRERRÍOS	FREEMARTIN
22	HOLSTEIN	ENTRERRÍOS	FREEMARTIN	58	HOLSTEIN	ENTRERRÍOS	FREEMARTIN	94	SIMMENTAL	SANTA ROSA	FREEMARTIN
23	HOLSTEIN	ENTRERRÍOS	FREEMARTIN	59	HOLSTEIN	SAN JOSÉ	FREEMARTIN	95	HOLSTEIN	BELMIRA	FREEMARTIN
24	GYR x HO	SAN PEDRO	FREEMARTIN	60	HOLSTEIN	SANTA ROSA	FREEMARTIN	96	HOLSTEIN	BELMIRA	FREEMARTIN
25	JE x HO	SAN PEDRO	FREEMARTIN	61	HOLSTEIN	SANTA ROSA	FREEMARTIN	97	HOLSTEIN	SANTA ROSA	FREEMARTIN
26	HOLSTEIN	ENTRERRÍOS	FREEMARTIN	62	HOLSTEIN	SAN PEDRO	FREEMARTIN	98	HO x JE	SANTA ROSA	FREEMARTIN
27	JEXHOxR5xAYR	BELMIRA	FREEMARTIN	63	HOLSTEIN	SAN PEDRO	FREEMARTIN	99	HO x JE	SANTA ROSA	NORMAL
28	HOLSTEIN	SANTA ROSA	NORMAL	64	HOLSTEIN	SAN PEDRO	NORMAL	100	HO x JE	SANTA ROSA	NORMAL
29	HOLSTEIN	SAN PEDRO	FREEMARTIN	65	HOLSTEIN	BELMIRA	FREEMARTIN	101	HOLSTEIN	ENTRERRÍOS	FREEMARTIN
30	HOLSTEIN	COPACABANA	NORMAL	66	HO x ANG	SANTA ROSA	FREEMARTIN	102	JERSEY	LA CEJA	FREEMARTIN
31	JE x SIMM x HO	YARUMAL	FREEMARTIN	67	HOLSTEIN	ENTRERRÍOS	FREEMARTIN	103	PARDO X HO	POPAYÁN	FREEMARTIN
32	HO x GYR	BELLO	NORMAL	68	HOLSTEIN	ENTRERRÍOS	FREEMARTIN	104	HOLSTEIN	SAN PEDRO	FREEMARTIN
33	HO x AYR	DON MATÍAS	FREEMARTIN	69	HOLSTEIN	SANTA ROSA	FREEMARTIN	105	HOLSTEIN	SANTA ROSA	FREEMARTIN
34	HO x AYR	GUARNE	FREEMARTIN	70	HOLSTEIN	SANTA ROSA	FREEMARTIN	106	HOLSTEIN	SANTA ROSA	NORMAL
35	HOLSTEIN	SAN PEDRO	FREEMARTIN	71	HOLSTEIN	ENTRERRÍOS	FREEMARTIN				
36	HOLSTEIN	GUARNE	FREEMARTIN	72	HOLSTEIN	CAROLINA	FREEMARTIN				

*Se registra como freemartin toda muestra de ADN de sangre de ternera que amplificó el gen SRY.

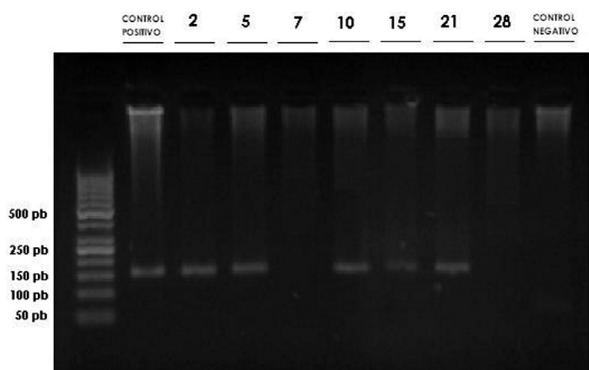


Figura 1. Electroforesis en gel de agarosa B.P.F. al 3% en 7 muestras de amplificadas para SRY de sangre de terneras nacidas por parto múltiple heterosexual en Colombia.

macho bovino). Carriles 3,4,6,7 y 8 :Muestras N° 2,N° 5, N°10, N°15, N° 21. Amplificado de 151 pb, fragmento SRY (Freemartin positivas). Carriles 5 y 9: Muestras N° 7 y N° 21, no presentaron amplificado (Freemartin negativas). Carril 10: Control negativo, (ADN vaca parida).

A la ternera que corresponde la muestra N° 28 con diagnóstico molecular SRY (-) se le realizó análisis citogenético buscando identificar sus cromosomas sexuales en linfocitos cultivados. En ninguna de las 14 placas montadas y 250 metafases analizadas, se encontró un complemento cromosómico 60XY, descartando la presencia de un quimerismo hematopoyético 60XX/60XY en este animal. (figura 2A)

La ternera identificada con muestra N° 10 fue diagnosticada como SRY (+) (Freemartin). En el cariotipo realizado, se encontró quimerismo hematopoyético con aproximadamente 60% de células con complemento cromosómico 60XY en un total de 110 metafases analizadas en 4 placas, confirmando el quimerismo he-

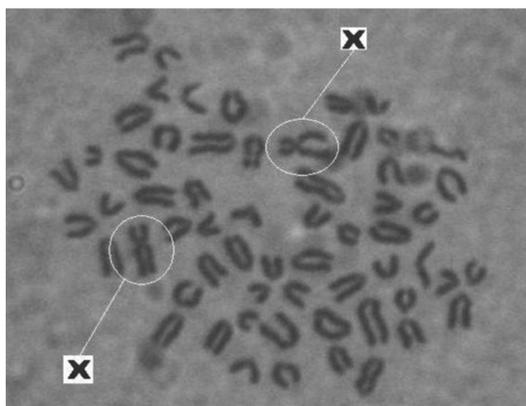
matopoyético característico del síndrome Freemartin. (figura 2B)

Las terneras # 11 y 12 de 20 días de edad fueron diagnosticadas como SRY positivas y se remitieron a las instalaciones de FrigoColanta para su beneficio. Uno de los animales recién nacidos presentó aspecto de sus genitales aparentemente normal. En la otra se pudo ver hipertrofia del clítoris con hipertriosis de la comisura vulvar. Las figuras 3A y 3B pertenecen al tracto reproductivo de la ternera # 11. La figura 3A muestra el aspecto bilobulado de los ovarios con un tejido de color claro principal, y un sector periférico adyacente de color rojizo (señalado por la flecha), en donde después el análisis histopatológico determinó la presencia de túmulos seminíferos incipientes (figura 4), lo que demuestra que la estructura encontrada corresponde a un ovotestis bilateral. La figura 3B muestra la misma pieza estirada, tomada de los extremos del ligamento ancho. En ella se puede ver la falta de continuidad del cuerpo del útero al cérvix y éste a su vez a la vagina. Apenas se visualiza un cordón fibroso sostenido por el mesometrio (ver flecha). Estos hallazgos son compatibles con atresia ductal cervical.

Anormalidades anatómicas de la ternera 11, diagnosticada como SRY (+)

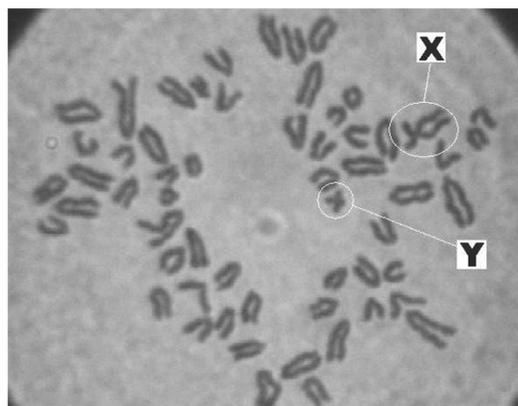
Discusión y conclusiones

Para el síndrome Freemartin se han utilizado históricamente diferentes técnicas diagnósticas como lo son la “prueba de tolerancia a homoinjerto” que consiste en transplantar piel del hermano macho a su hermana. Si la hembra es Freemartin, es decir, si se dio la anastomosis vascular entre los fetos, compartirán antígenos y por lo tanto la hembra será altamente tolerante al trasplante de piel del mellizo. Esta prueba de tolerancia es complicada y el macho no siempre está disponible. Otras pruebas diagnósticas realizadas son la



Cariotipo Ternera No. 28

Figura 2A



Cariotipo Ternera No. 10

Figura 2B



Figura 3A



Figura 3B

“Prueba del lapicero” o “Prueba de fondo de vagina”, que consiste en introducir un lápiz a través de la vulva de la ternera y si este no ingresa más de 15 centímetros es síntoma del síndrome Freemartin. Esta prueba es subjetiva pues el desarrollo del tracto vaginal dependerá de la edad y raza de la ternera.

Ante la inexactitud y subjetividad de éstas pruebas diagnósticas, desde la década de los noventa se comenzaron a realizar diagnósticos a partir de estudios moleculares mediante la detección de genes asociados al cromosoma “Y” y citogenéticos mediante la observación directa de los cromosomas (Padula, 2005).

La literatura ha reportado que el Freemartinismo se ha presentado entre rangos que oscilan entre el 85 y el 95% de las hembras provenientes de parto múltiple heterosexual (Ayala *et al.*, 2007). En nuestro estudio, el 84.9% de los animales fueron positivos al síndrome. Estos resultados fueron inferiores al 88% reportado por McFeely *et al.*, 1967, David, 1976 y Potter & Blackshaw, 1980; e inferiores a los citados por Marcum, 1974 (> 90%), Romagnano *et al.*, 1988 (90%) y Ayala *et al.*, 2007 (95%). Tanto los resultados reportados por la literatura como los arrojados por el presente trabajo confirman la alta frecuencia del síndrome en mellizas heterosexuales. La frecuencia de presentación medida como porcentaje de animales Freemartin por cada

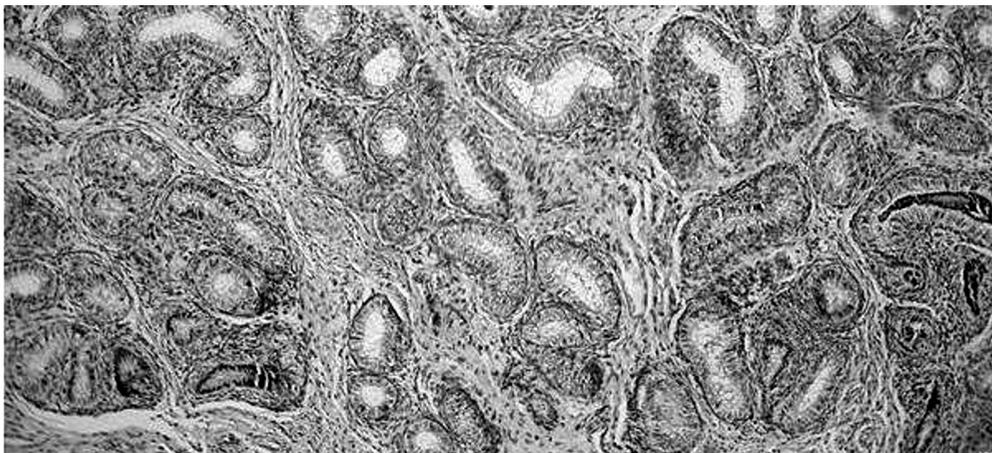


Figura 4. Corte histológico del tejido gonadal extraído a la ternera # 11. Vista a 40x

100 partos múltiples no ha diferido significativamente entre estudios durante los últimos 39 años, independientemente del sistema de diagnóstico utilizado. Lo que sí se ha incrementado durante los últimos años es la frecuencia de los partos múltiples; producto al parecer, del incremento en la selección para producción lechera (Wiltbank *et al.*, 2000) y mejor manejo nutricional de la vaca (Çobanoğlu, 2011). La explicación a este fenómeno puede estar dada por el hecho de que las vacas de alta producción lechera son altas productoras de factor de crecimiento insulinoide tipo 1 (IGF-1, por sus siglas en inglés). Las altas concentraciones de IGF-1 se han asociado a mayor reclutamiento folicular y mayor diámetro folicular ovárico. Vacas que presentan partos múltiples presentan 47% mayor concentración de IGF-1 en sangre periférica y mayor concentración en fluido folicular en los dos folículos más grandes durante una onda de desarrollo folicular, lo que parece ser un factor asociado a mayor presentación de ovulación múltiple en estos animales (Çobanoğlu, 2011). El hecho de que se presenten más partos múltiples, incrementa la tasa de descarte de hembras o el levante de animales infértiles, donde el costo del levante de una hembra bovina en Colombia en 2009 fue de \$3 697.786 (López & Vásquez, 2009). En Colombia no disponemos de reportes de incidencia de partos múltiples en bovinos, pero por ejemplo, para el caso de Norteamérica, se reporta una frecuencia de éstos del 4.75% en 24.000 partos de vacas holstein (Çobanoğlu, 2011). Si aplicamos nuestros resultados a estos estudios, asumimos que la mitad de estos partos múltiples serían heterosexuales (macho-hembra), es decir el 2.37%; y que un 84.9% de éstos producirían animales Freemartin; es decir, el 2.02% de los partos totales daría lugar a hembras Freemartin, estériles y las pérdidas económicas que esto implica.

Al parecer, el factor racial por sí mismo no es determinante en la presentación del síndrome. Si bien en nuestro estudio 78.9% de las hembras Freemartin pertenecieron a la raza holstein, esta es la raza predominante en la mayoría de las fincas muestreadas. Lo que sí han reportado algunos autores (Çobanoğlu, 2011) que la frecuencia de partos múltiples en la raza holstein es la mayor de todas las razas lecheras, lo que indirectamente hace que se puedan presentar más casos de Freemartinismo.

El análisis citogenético para el diagnóstico de Freemartinismo permite evidenciar la condición quimérica (XX/XY) de los cromosomas sexuales y medir la proporción de células con complemento cromosómico XY en hembras con el síndrome. La literatura ha reportado variación en la cantidad de células quiméricas XX/XY, en un rango entre el 2% y el 96%. (Wilkes *et al.*, 1980). En nuestro estudio el cariotipo realizado en una hembra SRY (+) presentó el 60% de linfocitos XY en 110 metafases analizadas procedentes de 4 placas. Estos resultados demuestran la enorme actividad de paso de células precursoras de linfocitos entre las placen-

tas, y la tolerancia del sistema inmune a éstas durante toda la vida del individuo. Por otro lado, se confirmó la ausencia del síndrome en una hembra SRY (-), al no encontrar presencia del cromosoma "Y" en 14 placas montadas y 250 metafases analizadas. Esta observación permite concluir que en un bajo porcentaje de partos múltiples heterosexuales no se desarrolla anastomosis placentaria, por lo que no hay paso de células entre fetos y por lo tanto las hembras no desarrollan quimerismo. Hay que recordar que la PCR permite detectar niveles tan bajos de quimerismo como 0.05% en un grupo de células (Ennis *et al.*, 1999). Como se ha demostrado que la presencia del síndrome genera un mínimo de 2% de leucocitos quiméricos (Wilkes *et al.*, 1980), descartamos la posibilidad de que las hembras SRY (-) puedan estar afectadas por el síndrome.

Las hembras Freemartin contienen en el genoma de algunos grupos celulares el cromosoma "Y". La expresión de muchos de sus genes, incluyendo SRY, sumado al paso de hormona antimülleriana entre placentas puede contribuir al desarrollo irregular de las estructuras reproductivas internas con lesiones tales como vaginas ciegas, ovarios hipoplásicos, agenesis total o parcial de cuernos uterinos, atresias ductales, etc. o bien puede observarse desarrollo de órganos reproductores masculinos como epidídimos, vesículas seminales y tejido testicular. (Wilkes *et al.*, 1980) En nuestro estudio, la mayoría de las hembras se muestrearon en los primeros 60 días de vida; en este momento existen pocos signos de masculinización evidente. En algunas hembras se encontraron genitales externos aparentemente normales, pero el diagnóstico molecular confirmó el síndrome. En otras se visualizaron algunos indicios de la presencia de Freemartinismo, en características como hipertriosis en labios y comisura vulvar, y desarrollo hipertrófico del clítoris, pero no se evidenciaron otros defectos reportados por la literatura tales como las bolsas escrotales. (Ayala *et al.*, 2007). Posiblemente este tipo de afecciones son más visibles en las hembras conforme crecen, y no son fáciles de diagnosticar en terneras recién nacidas.

Por otro lado el análisis anatomopatológico permitió ver lesiones internas reportadas por la literatura como la atresia ductal cervical (Wilkes *et al.*, 1980) y la presencia de tejidos mixtos en la zona ovárica, los cuales presentaron tejido reproductor masculino incipiente denominado ovotestis (Valencia *et al.*, 2005) confirmado por examen histopatológico. El apoyo de técnicas diagnósticas como la histopatología ha permitido determinar lo complejo del estado de intersexualidad generado por el síndrome, y explica en parte el compromiso del síndrome en la fertilidad del animal.

La invención de la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y el uso de secuencias específicas para el cromosoma "Y" de ADN sintético constituyen un significativo avance en la detección de hembras bovinas Freemartin de forma precisa, oportuna y rápida

(la prueba demora 6 horas en su realización) a partir de un volumen pequeño de sangre (200 µL, mínimo). La prueba es altamente sensible, lo que permite producir grandes cantidades de copias exactas de un fragmento de ADN específico de longitud definida a partir de pequeñas cantidades de ADN.

La importancia de determinar oportunamente la presencia del síndrome Freemartin en terneras mellizas heterosexuales radica en poder conocer de manera precisa y temprana el estado de fertilidad del animal, ahorrando tiempo y dinero en la cría y levante de animales infértiles. Así mismo facilita el uso de hembras positivas en actividades como detección de celos, donde se ha reportado que las Freemartin poseen líbido superior a hembras normales (tan alta como la de un toro) (Ayala *et al.*, 2000) y con menos riesgos de accidentes en instalaciones, operarios y otros animales generados por el uso de toros.

La incursión de tecnologías tales como la PCR ha posibilitado el diagnóstico de múltiples enfermedades genéticas e infecciosas del bovino. Su sensibilidad, especificidad, rapidez y bajo costo están incrementando sus aplicaciones en beneficio de la producción pecuaria.

Agradecimientos

Los autores agradecen a los asociados productores de leche y al personal del Departamento de Asistencia Técnica de la Cooperativa Colanta por su desinteresada colaboración en el reporte de los casos y la toma de muestras de sangre, respectivamente. De igual manera, al Laboratorio de Genética Animal de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Antioquia por el préstamo de sus instalaciones para la realización de las pruebas.

Referencias bibliográficas

Ayala, M., Villagómez, D., Galindo, J., Sánchez, D., Avila, D., Taylor, J., Merlos, M., & Guerrero, L. (2007). Estudio anatomopatológico, citogenético y molecular del síndrome freemartin en el bovino doméstico (*Bos taurus*). *REDVET, Revista electrónica de Veterinaria*, 8 (9), 1 - 15.

Ayala, M., Villagomez, D., & Schweminski, S. (2000). Estudio citogenético y anatomopatológico del síndrome freemartin en bovinos (*Bos taurus*). *Veterinaria México*, 4, 313-320.

Bonnevaux, J., & Baptista, J. (1982). Anomalias congénitas en el bovino, descripción de tres tipos de Freemartin. *Veterinaria (Uruguay)*, 18, 51-54.

Chu, E., Thuline, H., & Norby, D. (1964). Triploid-diploid chimerism in a male tortoiseshell cat. *Cytogenetics*, 3, 1 - 18.

Çobanoğlu, Ö. (2011). Physiological mechanisms of multiple ovulations and factors affecting twin calving rates in cattle. *Uludağ University Journal of the Faculty of Veterinary Medicine*, 20 (1), 73-82.

David, J. S. E. (1976). The incidence of freemartins in heifer calves purchased from markets. *Veterinary Record*, 22, 417-422.

Ennis, S., Vaughan, L., & Gallagher, T. F. (1999). The diagnosis of freemartinism in cattle using sex-specific DNA sequences. *Research in Veterinary Science*, 67, 111 - 112.

Grunert, G., Berchtold, M. (1988). Infertilidad de la vaca. Argentina. Editorial Hemisferio Sur. 475 p.

Kanagawa, H., Kawata, K., Ishikawa, T., Muramoto, J., & Ono, H. (1965). Sex-chromosome chimerism (XX/XY) in heterosexual bovine triplets. *Japanese Journal of Veterinary Research*, 13, 121 - 126.

López, A., & Vásquez, S. (2009). Costos de producción lechera en Colombia, problemas y oportunidades (Tesis de pregrado). Escuela de Administración. Departamento de Economía. Universidad Eafit. Medellín. Recuperado de https://repository.eafit.edu.co/bitstream/handle/.../Andres_LopezRamirez_2009.pdf?..

López, E., & Vásquez, N. (2004). Genotipificación del gen de la kappa caseína y determinación del sexo en embriones bovinos mediante PCR. *Revista Colombiana De Ciencias Pecuarias*, 17, 231 - 240.

Marcum, J. B. (1974). The freemartin syndrome. *Animal Breeding Abstracts*, 42, 227-242.

McFeely, R. A., Hare, W. C. D., & Biggers, J. D. (1967). Chromosome studies in 14 cases of intersex in domestic mammals. *Cytogenetics*, 6, 242-253.

Miller, S. A., Dykes, D. D., & Polesky, H. F. (1988). A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research*, 16, 1215.

Padula, A.M. (2005). The freemartin syndrome: an update. *Animal Reproduction Science*, 87, 93 - 109

Parkinson, T. J., Smith, K. C., Long, S. E., Douthwaite, J. A., Mann, G. E., & Knight, P. G. (2001). Inter-relationships among gonadotrophins, reproductive steroids and inhibin in freemartin ewes. *Reproduction*, 122, 397-409.

Payan-Carreira, R., Pires, M., Quaresma, M., Chaves, R., Adegá, F., Guedes, H., Colaço, B., & Villar, V. (2008). A complex intersex condition in a Holstein calf. *Animal Reproduction Science*, 103, 154 - 163

Pessa-Morikawa, T., Niku, M., & Livanainen, A. (2004). Persistent differences in the level of chimerism in B versus T cells of freemartin cattle. *Developmental and Comparative Immunology*, 28, 77 - 87.

Potter, W. L., & Blackshaw, A.W. (Junio, 1980). Sex chromosome constitution in male and female cattle in relation to reproductive function. 4 th european colloquium of cytogenetics of domestic animals, Uppsala, Sweden. Department of animal breeding and genetics faculty of veterinary medicine, Swedish University of Agricultural Sciences: 69 - 77.

Romagnano, A., Tiemann, M., Niar, A., Helie, O., & King, W. A. (1988). Freemartinism in domestic animals. *Medecin Veterinaire du Quebec*, 18 (2), 79 - 84.

Smith, G., Vancamp, S., & Basrur, P. (1977). A fertile female co-twin to a male calf. *The Canadian Veterinary Journal*, 18, 287 - 289.

Valencia, F., Johnson, F., & Duque, A. (2005). Identificación anatómica, citogenética y molecular de un caso de síndrome de Freemartin. *Revista Iasallista de investigación*, 2 (2), 45 - 49.

Wilkes, P., Wijeratne, W., Munro, I. (1980). A study of the cytogenetics and reproductive anatomy of freemartin heifers. 4 th european colloquium of cytogenetics of domestic animals, Uppsala, Sweden. Department of animal breeding and genetics faculty of veterinary medicine, Swedish University of Agricultural Sciences: 104 - 117.

Wiltbank, M. C., Fricke, P. M., Sangsritavong, S., Sartori, R., & Ginther, O. J. (2000). Mechanisms that prevent and produce double ovulation in dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, 83, 2998 - 3007.