

Freemartinismo o quimerismo XX/XY en bovinos: Revisión

Emma Sofía Corredor Camargo & Edwin Manuel Páez Barón¹

sofinata@gmail.com; ¹edwmanuel@gmail.com

¹Escuela de Ciencias Agrícolas, Pecuarias y del Medio Ambiente.
Universidad Nacional Abierta y a Distancia CEAD Tunja, Colombia

Resumen.- Realizamos una revisión bibliográfica actualizada sintetizando los resultados y conclusiones de investigaciones originales sobre la fisiopatología y los métodos diagnósticos para la identificación de la anomalía conocida como quimerismo XX/XY o freemartinismo en bovinos. El freemartinismo afecta las hembras nacidas en aproximadamente el 92% de los partos de gemelos macho-hembra, debido a la transferencia de células y hormonas del macho a la hembra causando grados variables de supresión del desarrollo del sistema reproductivo femenino y permitiendo el desarrollo de partes reproductivas masculinas, generando hembras infértiles. El diagnóstico de esta anomalía es de gran importancia en los sistemas productivos de bovinos y por esta razón se han implementado varias técnicas efectivas para detectarla.

Palabras clave: anomalía cromosómica, bovinos, diagnóstico, freemartinismo

Abstract.- This is a literature review in which we present, in a narrative form, the results and conclusions of original research on the pathophysiology and diagnostic methods for the identification of XX/XY chimerism or freemartin anomaly in cattle. Freemartinism affects up to 92% of the pregnancies involving different sex twins. Exchange and transfer of cells and hormones from the male to the female cause suppression of the female's reproductive system development and lead to the development of a masculine reproductive system that produces infertile females. Since diagnosing this anomaly is important to stockbreeders, efficient detection techniques have been developed.

Key words: chromosome anomalies, cattle, diagnosis, freemartins

Introducción

Durante la fase embrionaria de los rumiantes puede generarse la anomalía conocida como freemartinismo, a partir de la cual se produce una hembra usualmente infértil proveniente de gestación gemelar con un macho. El desarrollo de los órganos reproductivos femeninos se ve suprimido en diferentes grados, dando paso al desarrollo del tracto reproductivo masculino y de un fenotipo generalmente masculinizado (Brace *et al.* 2008). Los individuos freemartin son el resultado de la anastomosis de los vasos placentarios, que conlleva a una circulación común entre los embriones que permite que la diferenciación sexual del macho, anterior a la de la hembra, interfiera con el desarrollo

normal del tracto reproductivo de ésta (Moncaleano *et al.* 2006).

En la presente revisión se resaltan los diversos sucesos que ocurren en la generación de individuos freemartin, los cuales pueden utilizarse para detectar esta anomalía y se relacionan con los diferentes métodos diagnósticos que se utilizan en la actualidad, incluyendo el examen clínico, el análisis citogenético (Peretti *et al.* 2008), las pruebas serológicas, la hibridación fluorescente *in situ* (Sohn *et al.* 2007) y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Brace *et al.* 2008).

El término freemartin se aplica a una vaca estéril concebida en una gestación múltiple

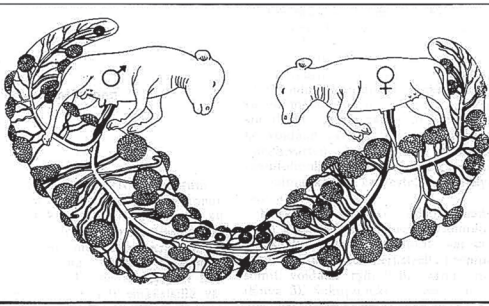


Figura 1. Anastomosis placentaria en la gestación gemelar de un macho y una hembra bovinos. Tomado de Wilkes (1981)

que involucre individuos de ambos sexos, en la que en más del 92% de los casos se presenta anastomosis vascular placentaria (Fig. 1) antes de la diferenciación sexual, entre los 30 y 40 días de gestación, originando un intercambio de células (quimerismo hematopoyético) y sustancias plasmáticas (*v. gr.* hormonas) que llevan a la hembra a un estado intersexual, en donde los genitales externos son morfológicamente femeninos y los genitales internos presentan un grado de afectación variado, en donde es característica la hipoplasia gonadal, la represión de los conductos de Müller, la masculinización de las gónadas y la estimulación de los conductos de Wolf. (Ayala *et al.* 2007).

Para que se genere freemartinismo en los bovinos son necesarios diversos sucesos. Primero que dos óvulos sean fertilizados generando gemelos dicigotos; segundo, que uno de los embriones sea homogamético (XX) y el otro heterogamético (XY), y por último que se produzca fusión placentaria durante la gestación temprana, llevando a la anastomosis de vasos sanguíneos corio-alantoideos, entre los dos embriones (Hunter 1995). Esta anastomosis ocurre antes del inicio o durante la diferenciación sexual, permitiendo el intercambio de células sanguíneas precursoras entre los gemelos y generando quimerismo cromosómico, ya que cada gemelo posee células procedentes de cigotos diferentes tanto XX como XY. En este punto la hormona anti-mulleriana (HAM), producida por las gónadas del macho, se transfiere a la hembra. Teniendo en cuenta esta transferencia celular

y hormonal, se han generado dos hipótesis para la inhibición del desarrollo normal del conducto de Müller o paramesonéfrico en el tracto reproductivo de la hembra gemela (Hinrichs *et al.*, 1999).

La teoría hormonal de Lillie (James & Dove 1996) demostró la unión del sistema circulatorio entre dos embriones bovinos, postulando que las hormonas procedentes del macho eran las responsables de la inhibición del desarrollo sexual de su hermana gemela. Durante la diferenciación sexual, el tracto genital masculino empieza a desarrollarse en el día 40 de gestación, es decir, más tempranamente que el de la hembra que empieza a diferenciarse hacia el día 60. Este hecho permite que la HAM secretada por las células de Sertoli, desarrolladas en el macho, sea transportada por la circulación común de los gemelos hasta las células mesenquimales localizadas junto al conducto de Müller, en las cuales actúa un gen que se expresa como receptor específico de esta hormona, generando regresión del tracto genital femenino. Cabianca y colaboradores (2007) demostraron que las gónadas masculinizadas en las hembras freemartin tienen un papel activo en la producción de la hormona antimulleriana, por lo que el efecto de inhibición del conducto de Müller se da tanto por la HAM procedente del gemelo macho como por la producida por las gónadas de la misma hembra freemartin.

Por otra parte, la teoría celular propone que la presencia del quimerismo cromosómico en los animales freemartin demuestra que además de hormonas se intercambian células entre los gemelos dicigotos (James & Dove 1996). Es así como después de numerosos experimentos (Wachtel *et al.* 1975 en McFeely 1990, Onho *et al.* 1976 en McFeely 1990) postuló la hipótesis del origen celular del freemartinismo refiriéndose a la transferencia de células masculinas portadoras del cromosoma Y del macho a su gemela, debido a que en este cromosoma se encuentra el gen Sry (región Y de determinación sexual). Según Cavaliere & Farin (1999) en este cromosoma también se encuentra el gen que codifica al antígeno H-Y (Ag H-Y), el cual actúa como iniciador de la diferenciación testicular; este Ag H-Y fue relacionado con el desarrollo testicular debido a que está presente en machos y en animales freemartin y por el contrario no se encuentra en hembras normales, lo cual

sugiere que la formación del tracto genital masculino requiere la presencia del H-Y y el tracto femenino se desarrolla en ausencia de este (McFeely 1990).

Por otra parte se debe tener en cuenta que en la pareja de gemelos no solo la hembra se ve afectada por la anastomosis placentaria, ya que en machos quiméricos se reporta disminución de la fertilidad y una menor concentración y motilidad espermática, las cuales han sido relacionadas con disminución de la actividad de los túbulos seminíferos causada posiblemente por transmisión de la línea de células germinales XX provenientes de su hermana gemela (Rejduch *et al.* 2000).

Diagnóstico de animales freemartin

Teniendo en cuenta el efecto adverso que tiene la circulación común entre gemelos de diferente sexo, el diagnóstico de bovinos con quimerismo cromosómico es de especial interés para los productores de leche, debido a que esto permite proceder a la eliminación de los animales estériles o subfértiles, mientras que en los hatos de ceba el diagnóstico debe realizarse para decidir el destino de los animales (Jiménez 2000). La identificación de una hembra freemartin se realiza mediante la aplicación de métodos diagnóstico que van desde el examen clínico hasta pruebas moleculares de identificación de ADN.

En más del 80% de los casos, los animales normales y freemartin pueden ser diferenciados con base en los hallazgos de un examen clínico mediante palpación rectal. Sin embargo la gran variabilidad en la estructura anatómica del tracto reproductivo de las hembras freemartin, que puede ir desde un fenotipo femenino de conformación corporal aparentemente normal, con una vagina ciega o un poco más corta de lo normal, estructuras uterinas y ovarios, hasta acercarse a un fenotipo totalmente masculino con presencia de prepucio primordial, hemipene o testículos (Peretti *et al.* 2008). Cuando el grado de masculinización es muy extenso, el desarrollo del tejido testicular produce cantidades suficientes de hormona masculina, para generar algunas características secundarias y comportamiento sexual masculino, produciendo hembras que son comúnmente utilizadas para detectar celo (Ayala *et al.* 2007). Esta variabilidad, que depende del momento de desarrollo embrionario en que se produce la anastomosis vascular, puede hacer que en algunos casos los diagnósticos sean equivocados, ya que pueden encontrarse gemelos heterosexuales que no presentaron anastomosis vascular de placentas y que siendo fértiles se eliminan, con la consecuente pérdida de potencial genético (Jiménez 2000).

Existe también una prueba serológica que, aunque es poco utilizada, es posible

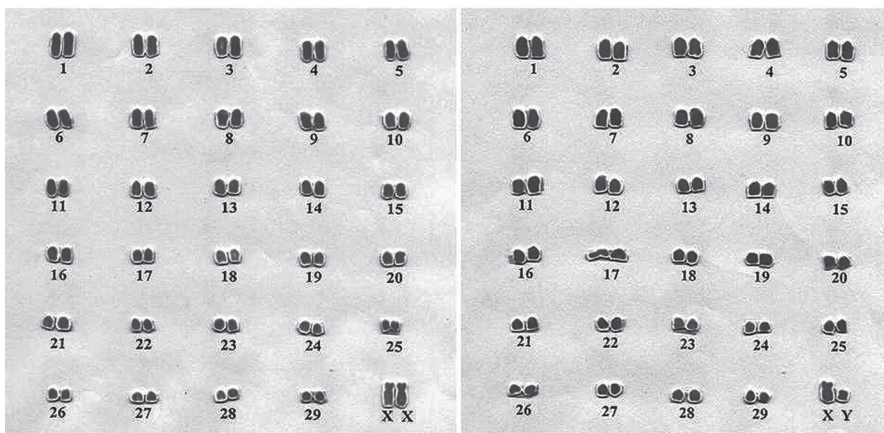


Figura 2. Cariotipo 2n=60 XX/XY en una vaca freemartin de raza Holstein Friesian
Fuente: Laboratorio citogenética UN FMVZ

debido a que si se produce la anastomosis vascular los gemelos tendrán poblaciones de eritrocitos procedentes de dos tipos de células precursoras, cada una con diferentes antígenos de superficie; tal intercambio sanguíneo durante el desarrollo embrionario temprano genera tolerancia inmunológica (James y Dove 1996); y aunque no hay producción de anticuerpos contra las células del hermano gemelo, sus antígenos de superficie pueden ser detectados por pruebas hemolíticas utilizando marcadores de grupos sanguíneos específicos. Estas pruebas solo pueden ser realizadas después de que los portadores tienen un mes de edad, ya que la maduración antigénica de los glóbulos rojos puede no ser completa hasta entonces (Long 1990).

En una evaluación citogenética, el examen cromosómico tiene un 98% de probabilidades de éxito y, puede realizarse desde el momento mismo del nacimiento de la ternera. La presencia de células tanto XX como XY en la sangre (Fig. 2), establece que hubo anastomosis vascular entre los gemelos y se asume que la hembra en cuestión, es un animal freemartin (Jiménez 2000). Existe una proporción variable de células XY en cada caso (Ayala *et al.* 2007), reportándose muestras de hembras con el 100% de células XY y, en el otro extremo, freemartin típicas con menos del 5% de células XY (Marcum 1974 en Jiménez *et al.* 1999, Hinrichs *et al.* 1999). La proporción de células XX/XY no parece estar relacionada con los diferentes grados de alteraciones en el tracto reproductor. Greene y sus colaboradores (1977) reportaron una freemartin con constitución cromosómica 60XX en todas las células evaluadas y varias freemartin con diferentes porcentajes de células XX y XY sin encontrar constantes entre estos porcentajes y las anomalías de los órganos reproductivos.

Según James & Dove (1996), el quimerismo cromosómico persiste durante toda la vida, manteniéndose relativamente constante, debido al intercambio de precursores de células sanguíneas; así, el examen citogenético es útil para identificar un freemartin neonato o uno adulto. Cavalieri & Farin (1999) reportaron el caso inusual de una ternera freemartin que compartió el útero con un feto macho con el síndrome del equistosoma (*Schistosomus reflexus*) y aunque los órganos reproductivos de este feto no eran identificables, el

complemento cromosómico 60XX/60XY en los gemelos, demostró que la condición de freemartinismo puede ser inducida por un feto macho con anomalías congénitas que impiden la sobrevivencia de este último.

El desarrollo de pruebas moleculares como la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y el uso de secuencias específicas de ADN del cromosoma Y, constituyen un significativo avance en la detección del freemartinismo, en especial cuando se presenta una ternera que tiene pocas células con complemento cromosómico XY, ya que la PCR es un método *in vitro* altamente sensible que permite producir grandes cantidades (millones o billones) de copias exactas de un fragmento de ADN específico de longitud definida a partir de pequeñas cantidades de ADN. A pesar de que la proporción de células XY sea diferente en cada caso (Tabla 1), los métodos moleculares permiten diagnosticar el individuo freemartin. Esta técnica permite detectar la presencia de alelos relacionados con la determinación sexual en el ADN del individuo afectado, ofreciendo una alta confiabilidad, dado que puede detectarse la presencia de una secuencia en una célula afectada dentro de la muestra (Valencia *et al.* 2005). Para la aplicación de este método sólo se requiere un volumen pequeño de sangre y los resultados son exactos con muestras que han sido conservadas por varios días en el refrigerador, aun si presentan contaminación con microorganismos. Además, si no hay tubos disponibles con EDTA o heparina, las gotas de sangre pueden ser preparadas y amplificadas posteriormente permitiendo obtener un diagnóstico preciso y oportuno.

Por otra parte, las técnicas de citogenética han sido mejoradas con el uso de moléculas de ADN marcadas con diversos fluorocromos y la posibilidad de que cualquier fragmento individual de ADN pueda ser revelado en células en metafase e interfase por hibridación *in situ* por fluorescencia (Moreno *et al.* 2007). En los últimos años se han realizado reportes de quimerismo XY/XX realizando esta técnica en diferentes tipos celulares como en espermatogonias de toros de partos gemelares heterosexuales (Rejduch *et al.* 2000), o en linfocitos en interfase (Sohn *et al.* 2007)

La incidencia de gemelación en ganado lechero va del 2.5 al 5.8%, con una variación que va

desde el 1% en el primer parto, hasta casi el 10% en las gestaciones posteriores. El efecto del número de partos en la tasa de gemelación no se entiende con claridad pero se puede explicar por una habilidad incrementada de vacas mayores para soportar gemelos durante la gestación, un aumento en la tasa de doble ovulación o una interacción de ambos factores. Además, la incidencia de la doble ovulación en las vacas lecheras en lactancia es de aproximadamente el 14% (Fricke *et al.* 1998). Proporcionar dietas de mayor energía a las vacas de alta producción lechera puede incrementar la incidencia de doble ovulación y por lo tanto la tasa de gemelación (Kinsel *et al.* 1998). Teniendo en cuenta que en la actualidad el mejoramiento genético animal tiende a una mayor producción láctea sería posible que también aumentarían los casos de partos gemelares y con estos la presentación de freemartinismo.

Discusión y conclusiones

Cada vez existen más herramientas para diagnosticar este tipo de anomalías. La utilización de secuencias específicas del cromosoma Y y algunas secuencias nucleotídicas de los cromosomas sexuales X/Y, han permitido identificar la presencia de quimerismo y aneuploidías de los cromosomas sexuales. Mediante la técnica de PCR, ahora es posible la amplificación en bovinos de los genes ZFX/ZFY, que son identificados mediante un polimorfismo en el largo de los fragmentos de restricción (RFLP). Esta técnica es más sensible que el análisis citogenético para la detección de células XY (McNiel *et al.* 2006) Por otro lado, (Setiabudi 1993), utilizando el juego de primers BRY1, consigue amplificar un segmento nucleotídico específico del cromosoma Y bovino de 307 pb de ADN extraído a partir de muestras sanguíneas de hembras freemartin (Ayala-Valdovinos *et al.* 2008).

El freemartinismo se presenta debido al tipo de placentación de los ruminantes, pues para que esta patología se dé es necesario que se produzca una doble ovulación y una fertilización que lleve a la generación de embriones de diferente sexo; durante el desarrollo embrionario se establece la unión de las placentas de los gemelos y con esto se produce la circulación sanguínea común que conlleva a la masculinización de la hembra y a

anomalías fisiológicas en la reproducción del macho (disminución de la fertilidad). Se han propuesto dos teorías sobre la masculinización del tracto reproductor del animal freemartin; en primer lugar la teoría hormonal, que explica la anomalía con base en el aumento en los niveles de hormona antimuleriana en la circulación de la hembra y en segundo lugar la teoría celular, en la que cobra importancia la presencia de células somáticas XY provenientes del macho en desarrollo. Tanto los cambios anatómicos y celulares en la freemartin han hecho posible la aplicación de diversos métodos diagnósticos para la identificación de los animales freemartin, estas pruebas incluyen la evaluación anatómica, serológica y citogenética, con los avances en la biotecnología molecular en la actualidad se utilizan técnicas más sensibles, incluyendo la reacción en cadena de la polimerasa y la hibridación *in situ* por fluorescencia, estas técnicas son exactas y se pueden realizar desde el día del parto lo cual es de gran importancia para poder descartar los animales de forma temprana.

Agradecimientos.- A la Dra. Ligia Mercedes Jiménez Robayo y el Dr. Carlos Arturo Sánchez Isaza. Al Laboratorio de citogenética de la facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional de Colombia.

Referencias

- Ayala, MA, D Villagómez, J Galindo, D Sánchez, D Ávila & L Guerrero. 2007. Estudio anatomopatológico, citogenético y molecular del síndrome freemartin en el bovino doméstico (*Bos taurus*). REDVET. 8
- Ayala-Valdovinos MA, DAF Villagómez, J Galindo-García & D Sánchez-Chiprés. 2008. Diagnóstico molecular (pcr-multiplex) del estado intersexual síndrome freemartin en el bovino doméstico (*Bos taurus*). Instituto de Biotecnología Animal, Departamento de Producción Animal, Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Universidad de Guadalajara.
- Brace, MD, O Peters, P Menzies, WA King & MI Nino-Soto. Sex chromosome chimerism and the freemartin syndrome in Rideau Arcott sheep. Cytogenet Genome Res. 120:132-139
- Cabianca, G, A Rota, B Cozzi & C Ballarin. 2007. Expression of AMH in female fetal intersex gonads in the bovine. Anat. Histol. Embryol. 36:24-6

- Cavalieri, J & PW Farin. 1999. Birth of a Holstein freemartin calf co-twinning to a schistosomus reflexus fetus. *Theriogenology* 52:815-826
- Fricke PM, JN Guenther & MC Wiltbank. 1998. Efficacy of decreasing the dose of GnRH used in a protocol for synchronization of ovulation and timed AI in lactating dairy cows. *Theriogenology* 50:1275-1284.
- Greene WA, HO Dunn & RH Foote. 1977. Sex-chromosome ratios in cattle and their relationship to reproductive development in freemartins. *Cytogenet. Cell Genet.* 18: 97-105
- Hinrichs K, LC Buoen & G Ruth. 1999. XX/XY chimerism and freemartinism in a female llama co-twin to a male. *Scientific Record.* 215: 1140-1141
- Hunter RHF. 1995. Sex determination differentiation and intersexuality in placental mammals. Cambridge. University press.
- James F & FW Dove. 1996. Cattle twins and immune tolerance. *Genetics.* 144: 855÷859
- Jiménez, LM. 2000. La citogenética en medicina veterinaria. Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá, FMVZ, Laboratorio de citogenética.
- Jiménez LM, & CA Sánchez. 1999. Utilidad de la evaluación citogenética para el diagnóstico temprano del Freemartin. *Veterinaria al día.* p. 27-29.
- Kinsel, ML, WE Marsh, PL Ruegg, WG Etherington 1998. Risk factors for twinning in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 81: 989-993.
- Long SE. 1990. Development and diagnosis of freemartinism in cattle. In *Practice* 12:208-210
- Mc Feely, R. (Ed.) 1990. *Advances in Veterinary Science and Comparative Medicine: Domestic Animal Cytogenetics.* Advances in Veterinary Medicine. Vol. 34. Academic Press. NY.
- McNiel EA, NJ Madrill, AE Treeful & LC Buoen, AF Weber. 2006. Comparison of cytogenetics and polymerase chain reaction based detection of the amelogenin gene polymorphism for the diagnosis of freemartinism in cattle. *J Vet Diagn Invest.* 18:469-72
- Moncaleano, JS, LM Jimenez & CA Sanchez. 2006. Quimerismo leucocitario en hembras bovinas nacidas de parto gemelar heterosexual. *Orinoquia* 10 N° 2.
- Moreno, Y, P Piqueres, JL Alonso, A Jiménez, A González & MA Ferrús. 2007. Survival and viability of *Helicobacter pylori* after inoculation into chlorinated drinking water. *Water Res.* 41: 3490-3496.
- Peretti, V, F Ciotola, S Albarella, O Paciello, C Dario, V Barbieri & L. Iannuzzi 2008. XX/XY chimerism in cattle: clinical and cytogenetic studies. *Sex Dev.* 2: 24-30
- Rejduch, B, E Slota & I Gustavsson. 2000. 60,XY/60,XX chimerism in the germ cell line of mature bulls born in heterosexual twinning. *Theriogenology.* 54: 621-627
- Setiabudi, R. 1993. Application of the polymerase chain reaction (PCR) technique for determination of sex on the cellular level. Licenciata Thesis. Swedish University of Agricultural Sciences. Department of Animal Breeding and Genetics. Sveriges Lantbruksuniv. Uppsala, Sweden
- Sohn, SH, EJ Choa, WJ Sonc & CY Leeb. 2007. Diagnosis of bovine freemartinism by fluorescence in situ hybridization on interphase nuclei using a bovine Y chromosome-specific DNA probe. *PubMed.* 68: 1003-1011
- Valencia, A, J Navarro & E Duque. 2005. Identificación anatómica, citogenética y molecular de un caso de síndrome de Freemartin. *Revista lasallista de investigación* 2: 45-49
- Wilkes PR, WVS Wijeratne & IB Munro. 1981. Reproductive anatomy and Cytogenetics of freemartin heifers. *The veterinary record.* 108: 349-353
- Zhang T, Buoen L.C., Seguin B.E., Ruth G.R. & Weber A.F. 1994. Diagnosis of freemartinism in cattle: The need for clinical and cytogenetic evaluation. *JAVMA.* 204 (10): 1672-1675

Recibido: 19 de mayo de 2009

Aceptado: 30 de noviembre de 2009