

Estudios genéticos en freemartin bovinos de la raza Holando del Uruguay. Análisis del quimerismo XX/XY

Postiglioni, A.*, Llambí, S.*

RESUMEN

Se realizó un estudio citogenético en cuatro pares de mellizos heterosexuales bovinos y dos freemartins. Las muestras de células linfocitarias permitieron realizar un análisis del quimerismo sexual XX/XY. Las muestras XY entre los mellizos no mostraron diferencias significativas ($X^2=4.72$; $p<0.2$) planteándose variaciones paralelas entre ellas. Se establece una difusión total, bidireccional, de linfocitos a través de la anastomosis vascular. Se indica una distribución al azar de las células XY en cada sexo.

Palabras clave: FREEMARTIN, CITOGENETICA, BOVINOS

INTRODUCCION

La condición "freemartin" (anastomosis vasculares entre fetos de diferente sexo), es conocida como una forma de infertilidad asociada a defectos anatómicos en el tracto reproductivo de una hembra nacida melliza de un macho fértil (Marcum, 1974). Dentro de la población de mellizos heterosexuales bovinos, la incidencia de ese intersexo gonadal corresponde al 90% (Nicholas, 1987). Esta alta incidencia en los rodeos, justifica las revisiones que se han realizado en este material (Herschler y Feichleimer, 1967; Marcum, 1974).

El origen de los feemartin se debe a la fertilización de dos óvulos por dos espermatozoides que portan cromosomas sexuales diferentes (X e Y). Los cigotos formados pueden sufrir fusiones coriónicas y anastomosis vasculares, creándose una circulación sanguínea común

durante todo el desarrollo embrionario, con intercambio de células hematopoyéticas.

Dos teorías han tratado de explicar la causa de esta patología tan frecuente en bovinos: a) teoría hormonal, justificada por estudios de secreción diferencial entre ambos embriones; b) teoría celular, basada en un quimerismo leucocitario de células con cromosomas XX/XY, presente en ambos individuos (Marcum, 1974).

Eldridge (1985) asume una relación positiva entre el calibre de los vasos sanguíneos que forman parte de la anastomosis vascular, y el número de células linfocitarias que fluyen en ellos, basando sus presunciones en el principio físico de la difusión de elementos que fluyen a través de una membrana (en este caso, células linfocitarias que fluyen a través de vasos capilares). Investigaciones realizadas con este quimerismo leu-

SUMMARY

A Cytogenetic studies were performed in 4 pairs of heterosexual bovine twins and 2 freemartin. The cell samples permitted to analyze the sexual quimerism XX/XY. Samples of XY cells in the twins did not show significant differences ($X^2=4.72$; $p<0.2$), so a parallel variation is postulated.

A total bidirectional interchanged of lymphocytes through the vascular anastomosis is determined. A random distribution of XY cells in each case is shown.

Key Words: FREEMARTINS, CYTOGENETIC, CATTLE

cocitario han demostrado la existencia de un paralelismo entre los porcentajes de cada clase celular, (XX, XY) de mellizos heterosexuales.

A su vez, se ha encontrado una alta correlación en el quimerismo XX/XY, dentro de cada muestra celular (Herschler y Feichleimer, 1967; Marcum, 1974; Wilkies et al., 1981).

Por otro lado, Wilkies et al., (1981) estudian la distribución de células XY en 19 pares de mellizos heterosexuales, relacionados con 117 casos encontrados en la bibliografía. Los porcentajes obtenidos, representados en un histograma de frecuencias, indican una distribución entre 2 y 96%.

Con el propósito de analizar el quimerismo leucocitario XX/XY, encontrado en mellizos heterosexuales de la raza Holando, se realizó un estudio preliminar basado en los siguientes criterios:

* Cátedra de Genética y Zootecnia General. Facultad de Veterinaria Universidad de la República
Alberto Lasplaces 1550, CP 11 600 Montevideo

a) estudio de células metafásicas por macrocultivo de linfocitos; b) relación de células XX y XY en los mellizos estudiados; c) distribución de células XX/XY con respecto a lo encontrado en la población mundial (Wilkie *et al.*; 1981).

MATERIALES Y METODOS

Se estudiaron cuatro pares de mellizos heterosexuales de la raza Holando uruguayo, identificados en los registros del laboratorio como par I (Nº 12 y 13), par II (Nº 14 y 15), par III (Nº 17 y 18), par IV (Nº 20 y 21) Laboratorio de Citogenética de la Facultad de Veterinaria (L.C.F.V.). En cada par el primer número corresponde a la hembra y el segundo al macho. Se agregaron a este estudio dos hembras freemartins identificadas con los números 11 y 16. Sexo, porcentaje de células XY, número de metafases, fechas de nacimientos, toma de muestras y procedencia de los animales se presentan en la tabla 1. El análisis cromosómico se realizó por medio de la técnica estandarizada de cultivo de leucocitos (Moorhead, *et al.*, 1960) con modificaciones. Se utilizó como medio de cultivo RPMI 1640 (4 ml), complementando con suero fetal bovino (0,5 ml), fitohemaglutinina (0.05 ml), heparina (0,02 ml), penicilina (0.08 ml), estreptomycin (0.08 ml). Se aplicó el macrocultivo de sangre entera, cultivando 0.2 ml de sangre extraída de vena yugular en condiciones estériles, el tratamiento celular fue similar al descrito por Postiglioni y Llambí (1987).

La muestra sanguínea se cultivó a 38.5°C en baño de H₂O (Menmert), durante 72 horas, integrándose al cultivo 0.8 ml colchicina (4 ug/ml.) 2 hrs. antes de su procesamiento. Las células se sometieron a un choque hipotónico KCL =.075M

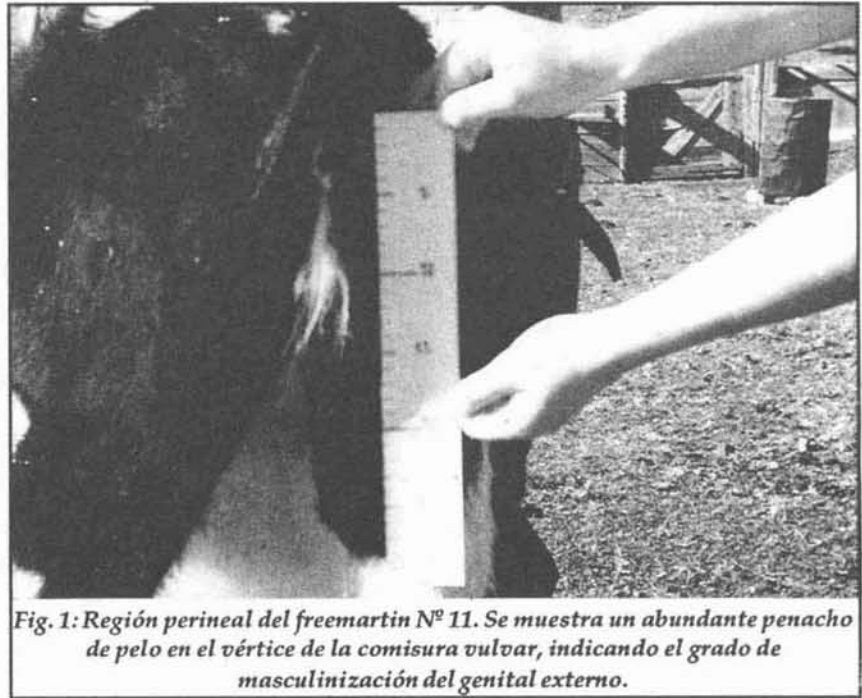


Fig. 1: Región perineal del freemartin Nº 11. Se muestra un abundante penacho de pelo en el vértice de la comisura vulvar, indicando el grado de masculinización del genital externo.

(20m), previo a su fijación en metanol-ácido acético (3:1), durante 30 minutos. A posteriori se realizaron 3 lavados en fijador (3:1) de aproximadamente 1 hr., a los efectos de eliminar toda sustancia amorfa.

Cada paso se realizó con previa centrifugación de la solución (800 rpm), conservando el pellet celular.

Las preparaciones se realizaron por goteo a la llama (metanol 70%). Se seleccionaron las mejores placas metafásicas, basadas en los siguientes criterios: metafases delimitadas, sin superposición cromosómica.

A efectos de estimar la relación existente entre las células XY en cada par de mellizos herterosexuales, se utilizó el test de X² para una sola muestra (Siegel, 1956), teniendo como datos observados el número de metafases portadoras de cromosomas XY en el freemartin y como dato esperado aquellas portadoras de cromosomas XY del macho mellizo.

RESULTADOS

Se realizaron observaciones del fenotipo en hembras freemartins de 9 meses y recién nacidas. El fenotipo de la región perineal en la hembra freemartin Nº 11, con nueve meses de edad, mostró un abundante penacho piloso en el vértice de la comisura vulvar (Fig 1), mientras no se observó ninguna alteración permanente aparente en terneras freemartin recién nacidas (Nº 12, 14, 16, 17).

Se procedió a evaluar la población celular individual en los diez casos mencionados, obteniéndose metafases con cromosomas XX o XY. Se realizó el cariotipo (2n=60) representativo de las dos muestras celulares (Fig 2). Este consta de 29 pares de cromosomas acrocéntricos ordenados en tamaño decreciente, con un par sexual homomórfico de cromosomas submetacéntricos (XX), el cromosoma Y se presenta como un pequeño metacéntrico (Fig. 2). Se seleccionaron entre 40 y 87 células linfocitarias metafásicas

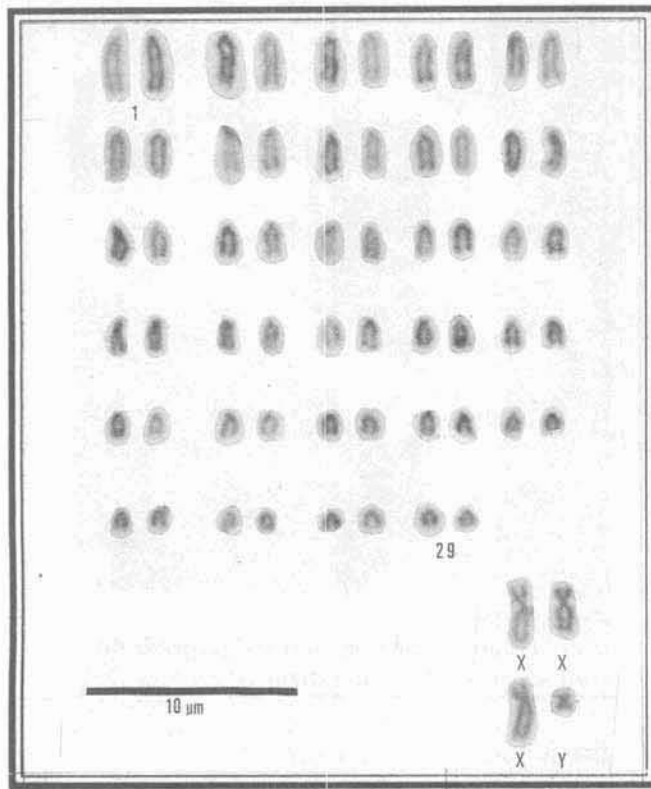


Fig. 2:
Cariotipo del
freemartin N°
11 (2n=60). Se
muestran los
dos pares de
cromosomas
sexuales
correspondientes
al quimerismo
XX/XY.

freemartins y las células XY de sus machos mellizos ($X_y=79$). A su vez, los promedios de las células XX, tanto en freemartins como en los machos mellizos, resultó ser la misma $X_x=98$). La distribución porcentuada de células XY entre pares de mellizos presentó el siguiente rango: 20 - 70% (Fig. 3). Esta distribución del porcentaje de células XY en freemartins y en sus machos mellizos se incorporaron a los encontrados en la bibliografía (Wilkies *et al.*, 1981). Con estas frecuencias se diagramó una gráfica de barras (Campbell, 1967). Para ello se relacionaron las frecuencias porcentuadas de células XY en función de los 260 casos conocidos de freemartin (Fig. 4) y 95 casos de machos mellizos con terneras freemartins (Fig. 5). El resultado de estas gráficas de barras muestran una distribución azarosa de las células XY. Se obtuvo 45% de células XY, en el estudio de 40 células metafásicas del macho N° 21. Este dato permitió introducir una nueva clase en la gráfica de barras (Fig. 5)

de diez individuos. el porcentaje de células XY en las terneras freemartin, osciló entre el 20% y 93.1% y en el caso de los machos entre el 35% y 70% (Tabla 1).

Las discrepancias encontradas en la diferencia entre el número de

células XY, dentro de cada par de mellizo heterosexual (Par I:31/33; par II:8/14; par III:17/14; par IV:23/18) no resultaron significativas ($X^2=4.72$; $p<0.2$) presentándose promedios iguales, entre las células XY de los

DISCUSION

La teoría celular, basada en el

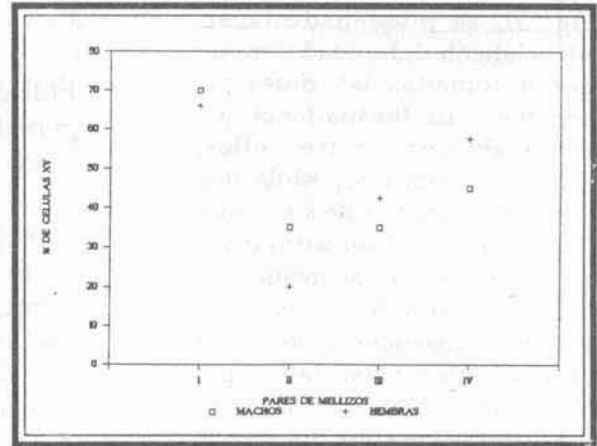
TABLA 1: DATOS CITOGENETICOS DE MELLIZOS BOVINOS

(H= hembra; M = macho)

Identificación del % Animal (L.C.F.V.)	Células XY	Nº metafases	Fecha nac.	Fecha toma muestra	Procedencia (Dpto)
PAR I H 12	66	47	5/89	5/89	San José
M 13	70	47	5/89	5/89	San José
PAR II H 14	20	40	5/89	6/89	San José
M 15	35	40	5/89	6/89	San José
PAR III H 17	42.5	40	8/89	8/89	San José
M 18	35	40	8/89	8/89	San José
PAR IV H 20	57.5	40	1/89	10/89	San José
M 21	45	40	1/89	10/89	San José
H 11	93.1	87	8/88	5/89	Lavalleja
H 16	67.5	40	7/89	8/89	San José

quimerismo encontrado entre células con cromosomas sexuales diferentes (XX/XY), trata de explicar la anastomosis vascular placentaria originada a nivel fetal en mellizos heterosexuales bovinos. (Marcum, 1974; Eldridge, 1985). Si relacionamos los resultados obtenidos en este trabajo: a) relación estrecha entre el número de células XY y entre las células XX, en cada par de mellizos heterosexuales; b) promedio idéntico entre las células XY de hembras freemartin y machos, así como entre las células XX de los 4 pares de mellizos; con los efectos de la difusión, es decir, la relación entre la permeabilidad de membrana y la diferencia creada entre concentraciones diferentes de los linfocitos que fluyen a través de los vasos capilares, podemos hacer las siguientes precisiones: a) que existe una alta permeabilidad, por donde se difunden libremente los linfocitos (anastomosis vascular), deducción lograda por la relación de 50% encontrada entre los porcentajes de células XY y entre células XX en cada par de mellizos heterosexuales. Este concepto se ve reforzado, dado que las

Fig.3: Representación gráfica de los porcentajes de células XY en los 4 pares de mellizos heterosexuales.



variaciones del número de células XY (y XX) son paralelas tanto en el macho como en la hembra de cada pareja (Fig.3).

De acuerdo a lo expresado, podemos considerar estas dos poblaciones como idénticas, con un flujo continuo, bidireccional, directamente relacionado con el equilibrio que se establece entre dos soluciones con gradiente de concentración similar. Se establecen así, fluctuaciones paralelas en un sistema sanguíneo común a ambos mellizos. b) Asumiendo lo recién mencionando es decir, un sistema circulatorio común para los linfocitos XY y los

linfocitos XX, se observa grandes variaciones entre las parejas, estableciéndose el predominio de un tipo celular. En este trabajo, las células XX fueron más numerosas que las XY, de lo que se desprende que las hembras aportarían más linfocitos al sistema circulatorio que los machos. Evidentemente, estas precisiones tendrán mayor validez al aumentar el número de pares de mellizos analizados. Eldridge (1985) sugiere algún tipo de "dominancia", de un tipo celular en mellizos con anastomosis vascular placentaria (XX ó XY).

Cuando se comparan las parejas de mellizos heterosexuales entre sí

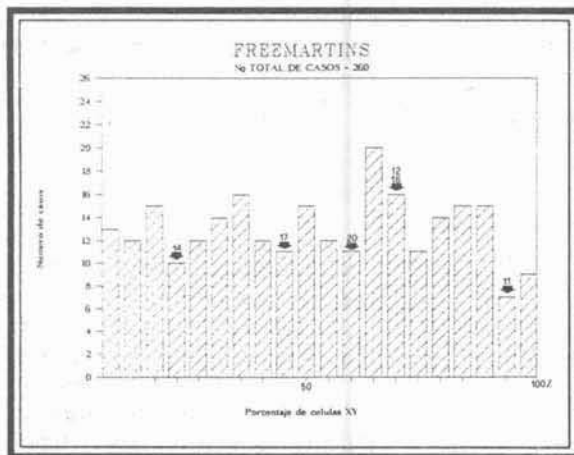


Fig. 4: Gráfica de barras correspondiente al porcentaje de células XY en freemartin. Se indican los casos estudiados en este trabajo.

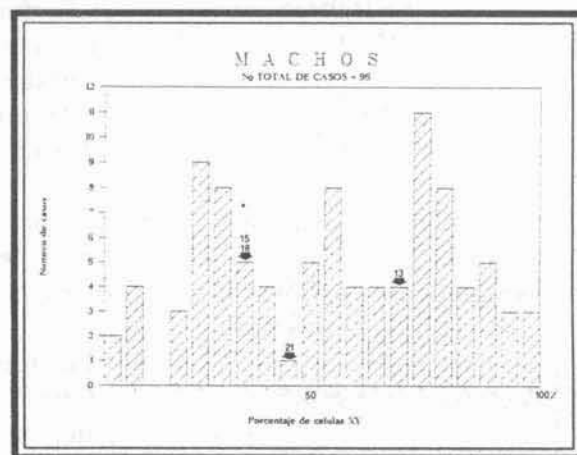


Fig. 5: Gráfica de barras correspondiente al porcentaje de células XY en los machos mellizos. Se indican los casos estudiados en este trabajo.

(Fig. 3), se pueden destacar, independiente de las edades en que fueron tomadas las muestras sanguíneas, las fluctuaciones que se establecen entre ellos, permitiendo entonces, postular una distribución azarosa de las células XY tanto para el freemartin como en el caso de su macho mellizo.

Estas conclusiones, se obtuvieron basándose, además, en los resultados presentados por Wilkies *et al.* (1981) al encontrar una distribución entre 2 y 96% de células XY en los freemartins registrados.

Por último, se destaca la técnica citogenética utilizada para analizar la relación del quimerismo leucocitario XX/XY, frente a la observación fenotípica efectuada a freemartins recién nacidos y aquellos de 9 meses de edad. Evidentemente, la técnica citogenética permite determinar el freemartinismo a edad temprana, no siendo costosa, y con una eficiencia en el diagnóstico del 100% (Wilkies *et al.*, 1981); Bonnevaux y Baptista, 1982).

El estudio comparativo de técnicas citogenéticas, inmunogenéticas y moleculares, serán discutidos en otro trabajo, con objetivos de diagnóstico.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Bonnevaux, J.; Baptista, J. (1982) Anomalías congénitas en el bovino: descripción de tres tipos de freemartin. *Veterinaria* 18(80):51-54.
2. Campbell, R.C. (1967) *Statistics for biologists*. Cambridge University Press. 242 p.
3. Eldridge, F. (1985) *Cytogenetics of livestock*. 291 p.
4. Herr, C.; Holt, N.; Mattaei, K.; Reed, K. (1990) Sex of progeny from bovine embryos sexed with a rapid Y chromosome deletion assay. *Theriogenology* 33(1):247.
5. Herschler, M.; Fechheimer, N. (1967) The role of sex chromosome chimerism in altering sexual development of mammals. *Cytogenetics* 6:204-212.
6. Marcum, J. (1974) The freemartin syndrome. *Anim. breed. abstr.* 42(6): 227-238.
7. Moorhead, P.; Nowell, P.; Mellman, J.; Battips, D.; Hunyerford, D. (1960) Chromosome preparations of leucocytes cultured in human peripheral blood. *Exp. cell res.* 20:613-616.
8. Nicholas, F. (1987) *Veterinary genetics*. Oxford University ed. 618 p.
9. Postiglioni, A.; Llambí, S. (1987) Control citogenético en bovinos Holando con problemas de fertilidad. In: *Jornadas Científico-Técnicas de Producción Animal*, Facultad de Veterinaria, Montevideo. p. D9.
10. Siegel, S. (1956) *Non-parametric statistics*. Mc Graw Hill. 303 p.
11. Wilkies, P.; Wijeratne, W.; Munro, I. (1981) Reproductive anatomy and cytogenetic of freemartin heifers. *Vet. rec.* 108:349-353.

AGRADECIMIENTOS

Los autores desean agradecer a las Dras. Elena de Torres, Lía Vilaró y a los Dres. Juan Antognaza, Patricia Mesa, Julio Lomando por habernos proporcionado el material de estudio.

Al Br. Pablo Rodríguez por el asesoramiento en los gráficos computarizados.

A la Dra. Nadir Brum-Zorrilla por la lectura crítica del manuscrito.

SUSCRIPCIONES A LA REVISTA VETERINARIA

ANTEL: 62 08 73 c/u S 10, anual (4) \$32. Las suscripciones no canceladas antes del 31 de diciembre de cada año se considerarán tácitamente renovadas para el año siguiente. Canje de Revista "VETERINARIA" a cargo del Departamento de Documentación y Biblioteca de la Facultad de Veterinaria