
DETECCIÓN DE QUIMERISMO CELULAR EN FREEMARTIN POR BANDEO RBG

Juan B. López O¹.; María E. Márquez F.¹; Edna J. Márquez F.¹

RESUMEN

En el presente trabajo se utilizó el bandeo cromosómico RBG (R-Bromodeoxiuridina-Giemsa) para detectar quimerismo celular XX/XY en fenotipo freemartin bovino. Se analizaron los patrones replicativos de células XX y XY tanto en bovinos normales como freemartin. Las células XX mostraron un cromosoma de replicación temprana y uno de replicación tardía, contrario a la teoría de replicación temprana de ambos cromosomas X bovinos, propuesta por Giannelli en 1970. Las células XY mostraron un cromosoma X activo y un cromosoma Y con un brazo corto activo y un brazo largo completamente inactivo. Este patrón replicativo difiere del observado en el cromosoma Y humano el cual presenta sólo una región inactiva en la parte distal de su brazo largo. Todos estos patrones replicativos fueron también observados en el fenotipo freemartin.

El bandeo RBG facilita la visualización de los cromosomas sexuales debido a sus patrones de replicación característicos, lo cual agiliza la clasificación de mitosis XX o XY y permite que personas no diestras en la evaluación de cariotipos, puedan detectar este tipo de quimeras celulares. Adicionalmente se evidencia el flujo de células en ambos sentidos entre los fetos, contrario a la creencia de un flujo unilateral del macho a la hembra, planteado por otros investigadores.

Palabras clave: Freemartin, quimera genética, hembra masculinizada

ABSTRACT

CELULAR CHIMERISM IN FREEMARTIN DETECTED BY RBG BANDS.

in this work, Replicative Bromodeoxyuridine Giemsa (RBG) banding was used for detecting the presence of cellular XX/XY chimera in bovine freemartinism. Replicative patterns in XX and XY cells were analyzed for both normal and freemartin bovines. XX cells showed one early and one late X chromosome, which argues against the presence of two early replicating X chromosome in bovines as proposed by Giannelli (1970). In XY cells there was an active chromosome and Y chromosome exhibiting an active short arm and a completely inactive long arm. This replicative pattern differs from the one observed in human Y chromosome which has an inactive region only in its distal long arm.

All these replicative patterns were also observed in five pairs of twins studied which permit the easy

1

Profesores Asistentes. Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín. Facultad de Ciencias. Laboratorio de Genética y Biología Molecular. Apartado 3840.
e-mail: nemarkue@perseus.unalmed.edu.co

.....

visualization of sexual chromosomes. Therefore, RBG banding constitutes an excellent method for easy and fast detection of XX/XY chimerism in a high number of cells and it can be used by personal with little experience in karyotype evaluation.

We also report the presence of XX/XY chimerism in heterosexual twins. Both male and female twins showed XX/XY chimeras in peripheral blood which represent evidence that cellular interchange is occurring. This finding is not in agreement with other report which suggest the unilateral flux of cells from the male to the female based on the absent XX/XY chimerism in the male gonade.

Key words: Freemartin, genetic chimerism, male-masculinized female.

INTRODUCCIÓN

El *Freemartinismo* es una de las dos formas más severas de anomalía congénita que causa infertilidad en la hembra gemela bovina producto de la concepción biovular de dos embriones de distinto sexo (Hunter, 1979). Un *freemartin*, genéticamente es una hembra que sufre problemas del desarrollo del aparato reproductor, a causa de la influencia de las hormonas producidas por el gemelo macho. El fenotipo puede diagnosticarse mediante un examen de fusión de membranas placentarias o un examen físico simple en el momento del nacimiento (clítoris engrandecido, profundidad vaginal y pelo extravulvar entre otros), o un examen de sangre en el que se determina la presencia de células XX y XY en la hembra, como indicador definitivo de la enfermedad.

La apariencia externa de un *freemartin* puede variar desde un fenotipo normal hasta altamente masculinizado, pero los órganos internos reproductivos están caracterizados por masculinización de gónadas, desarrollo retardado de los ductos derivados paramesonéfricos (Mullerianos) y mesonéfricos (Wolfianos).

A pesar de que una gemelaridad en un ganado de leche, puede ser benéfico para la producción de dos vacas en vez de una, si no se diagnostica una hembra *freemartin* a tiempo, el criador aumentará sus costos de producción, alimentación, tiempo y manejo de esa hembra infértil que no puede ser utilizada con fines reproductivos. El *freemartinismo* representa un factor de pérdidas económicas considerable en la producción ganadera, si se tiene en cuenta que la incidencia de gemelaridad es de 0.5% (1 par de gemelos: 227 nacimientos) en ganado de carne y 1.04% (1 par de gemelos: 96 nacimientos) en ganado de leche (Lyon, 1995). De esos nacimientos entre el 0.5-1.0% son gemelos heterosexuales los cuales dan origen a hembras *freemartin* en el 90% de los casos.

La causa del *Freemartinismo* no se ha entendido bien y hasta el momento se han postulado dos teorías. La *teoría hormonal* propone que las células intersticiales de las gónadas del feto macho se desarrollan más temprano que las de la hembra y las hormonas masculinas que las diferencian, afectan los genitales de la hembra antes que ella secrete sus propias hormonas, las cuales son necesarias para su diferenciación (Salisbury y Lodge, 1978). Por otro lado, la *teoría celular*, plantea que las células germinales primordiales del macho, se transfieren a través de los vasos placentarios anastomosados, previniendo el desarrollo de los ovarios (Salisbury y Lodge, 1978). También se ha reportado la transferencia de las células sanguíneas por la misma vía (Rice, Andrews; Warwick y Legates, 1970).

Ambas teorías, actualmente tienen objeciones prácticas, La *hormonal* tiene en contra el hecho de que al inyectar andrógeno a una vaca preñada, no se altera el desarrollo del ovario fetal (Mason, Bone, Bogart y Krueger, 1958; Jost, chodkiewicz y Mauleon, 1963; Jainudeen y Hafez, 1965) pero

se puede masculinizar el feto. La *teoría celular* tiene como principal objeción no haber demostrado la presencia de células XX en la gónada del macho.

En el presente trabajo, se utilizó el bandeo RBG para determinar los patrones de replicación de los cromosomas sexuales bovinos y explorar su utilidad en la determinación de quimerismo XX/XY en la sangre periférica de los gemelos biovulares heterosexuales en cinco casos de *fremartinismo* bovino en Antioquia. Adicionalmente se reporta la presencia de células XY y XX (quimeras genéticas XX/XY) en los casos estudiados. La presencia de los dos tipos celulares XX y XY tanto en el macho como en la hembra, muestra claramente la migración de células en ambos sentidos entre los fetos, lo cual constituye una evidencia citogenética de intercambio celular entre los gemelos.

METODOLOGÍA

Se tomaron muestras de sangre periférica heparinizada de cada uno de los gemelos bovinos heterosexuales en cinco casos evaluados. Los linfocitos fueron cultivados y estimulados con fitohemaglutinina a 37BC en medio F-12 suplementado con 10% de suero bovino fetal, 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomycin. El mismo procedimiento fue utilizado para cultivar linfocitos de animales normales de ambos sexos que fueron usados como control.

Se utilizó el bandeo RBG para determinar los patrones de replicación de los cromosomas sexuales bovinos y explorar su utilidad en la determinación de quimerismo XX/XY en la sangre periférica de los gemelos biovulares heterosexuales. Para el efecto, se utilizó marcaje terminal con 5-Bromo-2'-deoxiuridina (20 µg/ml) durante 6 horas y se adicionó Colcemid (0.07 µg/ml) al medio de cultivo, 30 minutos antes de procesar las muestras. Para la obtención de extendidos cromosómicos cada cultivo se centrifugó a 200 x g durante 5 minutos, se descartó el sobrenadante y el precipitado se sometió a tratamiento hipotónico con citrato de sodio (0.024M) a 37BC por 10 min y posteriormente se centrifugó a 200 xg durante 7 min. Luego se descartó el sobrenadante, se fijó con metanol-ácido acético fresco (3: 1) y se dejó 20 min a temperatura ambiente.

El lavado de la muestra con fijador, el goteo en las placas y la coloración de las preparaciones cromosómicas se realizaron de acuerdo con los procedimientos descritos por López, Márquez y Hoyos (1997).

El análisis microscópico se hizo con ayuda de un objetivo de inmersión 100X. Para la evaluación del quimerismo se determinó la presencia de mitosis XX y XY en un rango de 183 a 300 mitosis de acuerdo con el índice mitótico obtenido en cada individuo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Tabla 1 se muestran el número y porcentaje de mitosis XX y XY en las cinco parejas de gemelos heterosexuales evaluados en el presente estudio.

El marcaje terminal con BrdU muestra un patrón de bandas para cada par homólogo. En las mitosis XX, los cromosomas X son los de mayor tamaño y uno de ellos se presenta totalmente pálido o con una banda oscura en la parte media del brazo largo (Figura 1a). Esto demuestra que uno de los dos X de hembras de bovino, se replica en la parte terminal de la fase S, es decir presenta

replicación tardía lo cual estaría en contra de los conceptos de Giannelli (1970), quien sugiere que los dos cromosomas X de vaca comienzan su replicación al principio de la fase S.

El cromosoma Y es uno de los más pequeños del genoma bovino, en el que el brazo corto se visualiza como una sola banda oscura (Figura 1b), lo cual evidencia replicación temprana y el brazo largo se observa como una sola banda clara indicativo de replicación tardía (Figura 1b).

Este comportamiento difiere del patrón de replicación del cromosoma Y humano el cual presenta replicación tardía solamente en la región distal del brazo largo.

La técnica de bandeo RBG utilizada en este trabajo, permite la evaluación rápida de células XX y XY debido a que el patrón replicativo característico de los cromosomas sexuales permite diferenciarlos fácilmente sin necesidad de tener destreza en la evaluación de cariotipos. Por lo tanto permite el conteo rápido de un número grande de mitosis requeridos para la detección de quimerismo críptico.

Los resultados obtenidos muestran que en los cinco casos estudiados, ambos gemelos presentan quimerismo XX/XY (Figura 1a y 1b). Claramente se observa variabilidad en el porcentaje de células XX en los machos (2.0 - 16.0%) y de células XY en las hembras (22.8- 63.7%), siendo el quimerismo mayor en estas últimas (Tabla 1). Este resultado podría explicar la variabilidad en el grado de masculinización en *freemartin*.

A pesar de que los resultados obtenidos en este estudio muestran un mayor quimerismo XY en la sangre periférica de las hembras de los casos estudiados, comparada con el porcentaje de células XX del macho, no consideramos que este número de casos sean suficientes para afirmar que esta observación sea un fenómeno generalizado en todos los eventos de gemelos *freemartin* que puedan ocurrir. Por lo tanto, se requiere evaluar un mayor número de gemelos antes de plantear una hipótesis al respecto.

En el presente trabajo se detectó quimerismo en la sangre periférica de ambos gemelos heterosexuales. Resultados similares fueron reportados para 129 nacimientos en los que se detectó quimerismo XX/XY en 124 hembras y 93 machos (Marcum, 1974).

La presencia de quimerismo en ambos gemelos heterosexuales evidencia el flujo de células en ambos sentidos, entre los fetos. Esta evidencia contrasta con la creencia de que existe un flujo unilateral de células del macho a la hembra debido a que no se han detectado células XX en la gónada masculina. El hecho de encontrar las células XX en la sangre periférica del gemelo macho es una evidencia de que efectivamente hay intercambio de células entre los dos fetos gemelos.

El porqué no existe este quimerismo en la gónada masculina podría deberse más bien a un problema de muestreo en el que no se detectó quimerismo críptico. Este planteamiento está basado en el hecho de que las células del sistema hematopoyético y las células del aparato genital interno tienen el mismo origen embriológico en el mesodermo (Michel y Schwarte, 1970). Si el intercambio celular se da a nivel mesodérmico y antes de que se forme el testículo, no existe razón para pensar que un tejido presente el quimerismo y el otro no, siendo que ambos tienen el mismo origen.

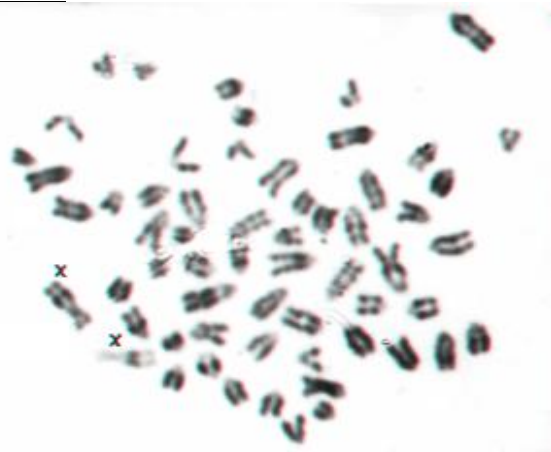


Figura 1. Detección de quimerismo celular en sangre periférica de cinco casos de gemelos biovulares heterosexuales que exhiben *freemartin*. a. Mitosis 60 XX, bandas RBG donde se señalan los dos cromosomas X. b. Mitosis 60XY, bandas RBG donde se señalan los cromosomas sexuales, X, Y.

Una explicación alternativa es que la formación del testículo se da antes del intercambio celular entre los fetos, lo cual explicaría la ausencia de células XX en la gónada masculina.

El quimerismo XX/XY en sangre periférica en *freemartin* refleja su importancia en el origen de esta anomalía congénita y su utilidad como marcador celular de diagnóstico citogenético de freemartinismo.

Se considera que tanto el quimerismo XX/XY en la hembra (teoría celular) como el efecto hormonal ocasionado ya sea por el macho sobre su hermana o por la producción de andrógenos por la hembra misma, generan el fenotipo *freemartin*, ya que no es incompatible considerar los dos efectos complementarios.

Queda por demostrar si el porcentaje de células XY presenta una verdadera correlación con el grado de masculinización a pesar de que se ha reportado lo contrario. Además debería estudiarse con una muestra mayor de gemelos heterosexuales, cuál es el número mínimo de células XY causantes del *freemartinismo* para determinar si una sola célula XY es capaz de generar esterilidad en la hembra o si con la presencia de una célula del sexo opuesto es suficiente para generar esterilidad. La importancia práctica de este trabajo es mostrar que la detección de la presencia de quimera celular XX/XY en ambos gemelos heterosexuales a nivel prenatal o a temprana edad, daría luces al criador sobre las estrategias a seguir en el manejo de estas hembras, las cuales pueden generar costos económicos de sostenimiento y reproducción que podrían ser consideradas más bien pérdidas en la producción.

AGRADECIMIENTO

Los autores del presente artículo agradecen al estudiante de Zootecnia de la Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín Francisco José Valencia Alaix por su colaboración técnica en uno de los casos estudiados. Además de su colaboración en la revisión bibliográfica por Internet.

BIBLIOGRAFÍA

GIANNELLI, T. Human Chromosomes DNA synthesis- Monographs- *En*: KARGER, S. Human Genetic. No 5. (1970); p.

HUNTER, J. Account of the *freemartin*. *En*: Philos. Trans. R. Soc. London. Vol. 69 (1979); p.279-293.

JAINUDEEN, M.R. and HAFEZ, E.S.E. Attempts to induce bovine freemartinism experimentally. *En*: Journal Reprod. Fertil. Vol. 10 (1965); p.281-283.

JOST, A.M.; CHODKIEWICZ, M. and MAULEON, P. intersesualité du foetus de veau produite par des androgenes. Comparaison entre l=hormone foetale responsable du free-martinisme et l=hormone testiculaire adulte. *En*: C.R. Hebd.Seances Academy Science. Vol. 256 (1963); p. 274-276.

LYON, L.A. The Causes and effects of freemartinism cattle. In: AMSTRONG, J. y BENIOT, A. eds. Reproduction, lactation and behavior of domestic animals. (INTERNET, 1995).

LÓPEZ, J. B., MÁRQUEZ, M.E. and HOYOS, D. Cariotipo Citogenético de la guagua (*Agoutí paca*). *En*: Revista Facultad Nacional de Agronomía. Medellín. Vol. 50, No. 2 (1997); p. 5-18.

MASON, R.W.; BONE, J.F.; BOGART, R. and KRUEGER, H. Urogenital anomalies in a calf born to beef cow treated with testosterone during pregnancy. *En: Journal of Pharmacology*. Vol. 122 (1958); p. 49A-50A

MARCUM, J. B. The *Freemartin* Syndrome. *En: Animal Breeding Abstracts*. Vol. 42 (1974); p.227-242.

MICHEL, G. and SCHWARTE, E. Compendio de Anatomía Veterinaria-Embriología. 1ed. Barcelona: Acribia, 1970. Tomo VI.

RICE, ANDREWS, WARWICK and LEGATES J. Breeding and improvement of farm animals. New York: Mc Graw Hill, 1970.

SALISBURY, V.D and LODGE, J.R. Physiology of reproduction and artificial insemination of cattle. San Francisco: Freeman and Company, 1978.

Recibido: Diciembre 14 de 1998

Aceptado: Marzo 1 de 1999

