

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS

DIVISION DE CIENCIAS VETERINARIAS



POSGRADO INTERINSTITUCIONAL EN CIENCIAS PECUARIAS

**ESTUDIO CITOGÉNICO Y MOLECULAR DEL SÍNDROME FREEMARTIN
EN EL BOVINO DOMÉSTICO (*Bos taurus*)**

**TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS PECUARIAS
P R E S E N T A**

M.V.Z. MIGUEL ANGEL AYALA VALDOVINOS

**DIRECTOR DE TESIS
Ph. D. DANIEL A. F. VILLAGOMEZ ZAVALA**

LAS AGUJAS, NEXTIPAC, ZAPOPAN, JALISCO. SEPTIEMBRE DE 2002.



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS DIVISIÓN DE CIENCIAS VETERINARIAS COORDINACIÓN DE POSGRADO

COORDINACIÓN DE POSGRADO DE LA
DIVISIÓN DE CIENCIAS VETERINARIAS
DE LA UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
PRESENTE.

Por este conducto nos permitimos enviar la **VERSION FINAL DE LA TESIS** que desarrolló el pasante de Maestría en el Posgrado Interinstitucional en Ciencias Pecuarias de la Universidad de Guadalajara, **M.V.Z. Miguel Angel Ayala Valdovinos**, cuyo título es:

"Estudio citogenético y molecular del síndrome freemartín en el bovino doméstico (*Bos taurus*)"

Trabajo dirigido por: **Dr. Daniel Andrés Fablán Villagómez Zavala.**

Los que suscriben la presente avalan esta versión, la cual fue revisada y reúne los requisitos teóricos y metodológicos necesarios.

ATENTAMENTE

Las Agujas, Nextipac, Zapopan, Jal. a 15 Julio del 2002

REVISOR

Dr. Enrique Silva Peña

REVISOR

Dr. Jacinto Bañuelos Pineda

REVISOR

Dr. Daniel A. Villagómez Zavala

REVISOR

Dr. Clemente Lemus Flores

REVISOR

Dra. Anne Santerre Lucas

c.c.p. Archivo

“ Paréceme que yo he sido como un niño que jugara en la playa, y que me divirtiera cuando hallaba alguna piedrecilla muy pulida o una concha más bonita que las comunes; mientras el gran océano de la verdad permanecía ante mi totalmente desconocido ”

Isaac Newton

“ A mis padres, Luis y María, por darme la vida, su cariño e invaluable ayuda a lo largo de todos estos años de mi formación ”.

“ A mis hermanos (as), M^a Rayito, Gabriela, Esther, Alberto y Antonio, por tantas experiencias fraternas compartidas y por la confianza que han depositado en mi persona ”.

“ A mis sobrinos (as), Berenice, Mariana, Gabriela, Jesús, Juan Pablo y Kevin, por la esperanza y alegría que me inspiran ”.

“ A Margarita Miranda Alvarez, en quien he encontrado el verdadero amor al compartir juntos sentimientos, dudas, temores, ambiciones, sueños, penas y alegrías, para ella, que le ha dado sentido a mi vida ”.

Los estudios de este trabajo fueron realizados en el **Centro de Biotecnología Animal del Rancho Cofradía de la Universidad de Guadalajara.**

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi sincera gratitud especialmente a las siguientes personas:

Ph. D. Daniel A. F. Villagómez Zavala, quien con su extraordinaria calidad profesional, realizó la dirección del presente estudio, en el cual nuevamente están manifiestos parte de sus invaluable conocimientos y su valiosa orientación para la realización del mismo, así también, por su gran ejemplo de constancia y desarrollo en el ejercicio profesional, para todos los que hemos tenido la oportunidad de conocerlo.

M. en C. Jorge Galindo García, administrador general del Rancho Cofradía de la Universidad de Guadalajara, por permitir y fomentar el desarrollo de esta y muchas otras investigaciones del área agropecuaria, en dicha posta zootécnica.

M. en C. Ana Isabel Vásquez Velásquez, del área de Citogenética del Centro de Investigaciones Biomédicas de Occidente (CIBO) del IMSS, por su sincera y desinteresada ayuda al compartir su tiempo y sus valiosos conocimientos profesionales con quienes tenemos la dicha de ser sus amigos.

M. V. Z. José de Jesús Carlos Fregoso Aguayo, por su valiosa y desinteresada ayuda al remitir animales de interés de este estudio, así como por su actitud siempre de verdadero amigo.

A los colaboradores del Centro de Biotecnología Animal del Rancho Cofradía de la Universidad de Guadalajara: **M. C. David R. Sánchez Chiprés, M. C. Antonio Orozco Sánchez, M. C. Luis A. Guerrero Quiroz, M. V. Z. Sergio L. Schweminski Benitez y Biol. Dánae Cabrera Toledo**, por su amistad, sus atenciones y por compartir amablemente parte de sus conocimiento y experiencias.

A mis amigos, M. V. Z.: **Ana Laura Cañedo Parra, Héctor Gustavo Pérez Burgos, Pedro Manzano Valencia, Raúl Pelayo Ramírez, Alejandro Bayardo Uribe, Hesiquio Rentería Zúñiga, Juan Carlos Gómez Reyes, Francisco Ulloa Godínez, Jacob Montoya Gaxiola,** y al **Ing. Juan Carlos Granja Verduzco,** por su grandiosa y desinteresada amistad establecida desde el inicio de nuestros estudios de licenciatura, y como toda verdadera amistad, vigente años después de concluida nuestra carrera.

A los representantes de mi Honorable jurado académico: **Dra. Anne Santerre Lucas, Dr. Enrique Silva Peña, Dr. Clemente Lemus Flores, Dr. Jacinto Bañuelos Pineda y Dr. Daniel Villagómez Zavala,** quienes con su estupenda calidad profesional realizaron valiosas aportaciones en la revisión del presente trabajo.

Contenido	Página
Índice de Contenido	i
Siglas	iii
Resumen	iv
Introducción	1
Mecanismos de Determinación Sexual	2
Determinación Sexual Ambiental	2
Determinación Sexual Gonosómica	4
Composición Celular de la Gónada de los Mamíferos	5
Las Células Germinales Primordiales	6
Diferenciación Sexual Primaria y Secundaria	8
El Factor de Determinación Testicular	12
<i>El cromosoma Y</i>	12
<i>El antígeno H-Y</i>	12
<i>El gen ZFY</i>	13
<i>El gen SRY</i>	14
<i>Otros genes de la diferenciación sexual</i>	16
Trastornos de la Diferenciación Sexual	18
Intersexualidad y Hermafroditismo	18
Los Cromosomas del Bovino Doméstico	21
Mosaisismo y Quimerismo	22
Intersexualidad en el Bovino Doméstico	22
Síndrome Freemartin en el Bovino Doméstico	24
Etimología del Término Freemartin	24
Etiología del Síndrome Freemartin	24
Frecuencia del Síndrome Freemartin en el Bovino Doméstico	25
Freemartinismo y Concepciones Múltiples Heterosexuales	27
Frecuencia de Gemelaridad en el Bovino Doméstico	28
Proporción de Células XX/XY en el Freemartin y su Posible Efecto en Masculinización	29
Producción de Andrógenos en el Freemartin	31
Tracto Reproductor del Freemartin	32
El Macho Quimérico (XX/XY)	34
Síndrome Freemartin en otras Especies	36
Cabra	36
Oveja	37
Cerdo	38

Caballo	38
Aves	39
Búfalo	39
Ciervo	39
Carnero	40
Técnicas de Diagnóstico del Síndrome Freemartin en Bovinos	41
Examen clínico	41
Prueba de Tolerancia a Homoinjerto y Análisis de Grupos Sanguíneos	41
Análisis Citogenético	42
Análisis Molecular (PCR)	42
Planteamiento del Problema	44
Justificación	44
Hipótesis	44
Objetivos	45
Objetivo General	45
Objetivos Particulares	45
Material y Métodos	46
Cultivo de Linfocitos	46
Análisis Citogenético	46
Extracción de DNA de Células Sanguíneas	46
Análisis Anatomopatológico	47
Extracción de DNA de Tejido Incluido en Parafina	47
Análisis Molecular (PCR-RFLP)	48
<i>Amplificación de DNA Genómico (PCR)</i>	48
<i>Análisis de Fragmentos de Restricción de Longitud Polimórfica</i> (RFLP)	48
Resultados	49
Discusión	64
Conclusiones	69
Bibliografía	70

Siglas

CGP	Células Germinales Primordiales.
ESD	Determinación Sexual Ambiental (del inglés; Environmental Sex Determination).
FISH	Hibridación In Situ Fluorescente (del inglés; Fluorescence In Situ Hybridization).
GSD	Determinación Sexual Genotípica (del inglés; Genotypic Sex Determination).
HMG	Proteína del Grupo de Alta Movilidad (del inglés; High Mobility Group)
IA	Inseminación Artificial
MIS	Sustancia Inhibidora de los Conductos de Müller (del inglés; Müllerian Inhibitory Substance).
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa (del inglés; Polymerase Chain Reaction).
PMSG	Gonadotropina del Suero de Yegua Preñada (del inglés; Pregnant Mare Serum Gonadotropin).
RFLP	Fragmentos de Restricción de Longitud Polimórfica (del inglés; Restriction Fragment Length Polymorphism).
SRY	Gen Región de Determinación Sexual de Cromosoma Y (del inglés; Sex-Determining Region Y).
TDF	Factor de Determinación Testicular (del inglés; Testis Determining Factor).
TSD	Determinación Sexual Dependiente de Temperatura (del inglés; Temperature-Dependent Sex Determination).

**ESTUDIO CITOGENÉTICO Y MOLECULAR DEL SÍNDROME FREEMARTIN
EN EL BOVINO DOMÉSTICO (*Bos taurus*)**

RESUMEN

El presente trabajo analiza los fenómenos reportados del desarrollo y manifestación de la entidad intersexual más frecuente en el ganado bovino doméstico (*Bos taurus*), el síndrome freemartin. A través del análisis citogenético utilizando la presencia de los cromosomas sexuales como marcadores, y mediante el análisis molecular (PCR-RFLP), se diagnosticaron con la condición intersexual, síndrome freemartin, 13 individuos seleccionados de un total de 22 bovinos (*Bos taurus*) que tenían el antecedente de proceder de partos múltiples heterosexuales; asimismo, se estudiaron anatomopatológicamente cuatro de estos individuos, enfatizando en las características del tejido gonadal (ovárico y/o testicular) presente. Se realizó la identificación molecular (PCR-RFLP) de células masculinas en tejido gonadal de dos bovinos diagnosticados como freemartin que anatomopatológicamente evidenciaron pseudohermafroditismo masculino.

Los cultivos de linfocitos de sangre periférica fueron realizados acorde a la técnica convencional de Moorhead (1960). Las preparaciones cromosómicas fueron tratadas con tinción de Giemsa al 5% en buffer de fosfatos y para la identificación de los cromosomas sexuales se consideraron las recomendaciones de la Primera Conferencia Internacional para la Estandarización de Cariotipos en Animales Domésticos (1976). En tanto que para el análisis molecular por PCR se emplearon oligonucleótidos iniciadores (P1-5EZ y P3-3EZ) que permiten amplificar un fragmento de 447 pb dentro de los genes *Zfx* y *Zfy* del bovino.

La presencia de quimerismo cromosómico (60,XX/60,XY) caracterizó a los animales estudiados, excepcionalmente un individuo mostró tan sólo células con complemento cromosómico 60,XY. Mediante la técnica de PCR se amplificó un producto de 447 pb, el cual después de ser digerido por la enzima de restricción *Pst* I, permitió identificar los dos genotipos posibles para los loci *Zfx* y *Zfy*, hembras normales que carecen del sitio de corte de la enzima, presentaron una banda (447 pb) de DNA en geles de agarosa al 3% teñidos con bromuro de etidio; mientras que machos normales y hembras quiméricas (freemartin) presentaron tres bandas (447pb, 344pb y 103pb).

Después del sacrificio de los animales, se recolectó su tracto reproductor, los cuales subsecuentemente fueron fotografiados, diseccionados y preservados para su análisis histopatológico bajo técnicas estándar de histología. Los hallazgos anatomopatológicos de dos de los cuatro freemartins estudiados hasta su sacrificio exhibieron masculinización del tracto reproductor con únicamente tejido testicular en las gónadas, en las cuales se identificó (PCR-RFLP) la presencia de quimerismo (XY/XX). Los dos restantes presentaron una marcada hipoplasia del tracto reproductor sin gónadas diferenciadas como tales.

INTRODUCCION

Cada una de las especies animales tiene un número constante de cromosomas (**estado diploide, $2n$**), agrupados en pares homólogos (**autosomas**) y en un par de no homólogos (**gonosomas**). La separación de estos pares cromosómicos en la meiosis, origina gametos (**óvulo o espermatozoide**) que contienen un juego de cromosomas (**estado haploide, $1n$**), y su fusión en la fertilización originará un nuevo cigoto diploide, producto de la variabilidad genética que llega a ser infinita considerando la segregación, la recombinación y el entrecruzamiento meióticos, más la variación agregada por las mutaciones genéticas espontáneas (Elejalde y Opitz, 1978; Tamassia, 1991).

En muchos sistemas biológicos simples, la reproducción puede ser lograda por un individuo único, sin embargo, en muchos sistemas complejos la reproducción requiere la interacción de dos individuos diferentes respecto al sexo (Naftolin, 1981). La reproducción sexual con algún grado de dimorfismo gamético es casi universal entre los organismos eucariotas. Los gametos del macho y de la hembra pueden ser producidos por el mismo individuo (**Monocia o Cosexualidad**) o por individuos separados (**Diocia o Gonocoria**). Muchas de las especies animales terrestres son dioicos (unisexuales), *v. gr.* los animales vertebrados, pero la cosexualidad esta difundida entre invertebrados marinos y plantas terrestres (Charlesworth, 1991).

En mamíferos el organismo homogamético (**XX**) corresponde al sexo femenino y el heterogamético (**XY**) al masculino. En aves, reptiles, y algunos peces y anfibios el organismo homogamético (**ZZ**) corresponde al macho y el heterogamético (**ZW**) a la hembra. No obstante en algunos peces y anfibios el mecanismo de determinación sexual es **XX / XY** como en los mamíferos, es decir, **XX** para hembras y **XY** para machos (Mittwoch, 1988; Cuevas y Kofman, 1990).

El proceso de la diferenciación sexual comienza con la fecundación, en donde, en mamíferos, el espermatozoide del macho heterogamético, fecunda un óvulo de la hembra homogamética (**determinación singámica del sexo**), y el cigoto se diferenciará como hembra o como macho, dependiendo del sexo cromosómico respectivo, siempre y cuando el resto de los factores de la diferenciación sexual sean normales (McFeely *et al.*, 1967; Wilson *et al.*, 1981).

Debido a que en aves el sexo heterogamético pertenece a la hembra, en ellos el sexo no es determinado en la fertilización, pues todos los espermatozoides portan un mismo cromosoma sexual, sino que es determinado en la ovulación (**determinación progámica del sexo**) con la liberación de un óvulo portador de un gonosoma **Z** o **W** (Tamassia, 1991).

Así pues, la diferenciación sexual permite la perpetuación de las especies que se reproducen sexualmente y evolutivamente asegura una mayor variabilidad genética, y con ello una más ventajosa adaptación al medio ambiente (Tamassia, 1991).

MECANISMOS DE DETERMINACION SEXUAL

La regulación del dimorfismo sexual en las especies animales está controlada por diferentes factores según la escala evolutiva. El primer factor de la diferenciación sexual es el control ambiental a través de hormonas sexuales, como en algunos anfibios, reptiles y peces; el siguiente factor es la relación cromosómica gonosomas-autosomas, tal es el caso de las moscas, donde el cromosoma Y no es determinante de la masculinidad pero es necesario para la espermatogénesis; otro factor importante es el mecanismo gonosómico de determinación sexual de los mamíferos, en donde el cromosoma Y determina la formación de tejido testicular independientemente del número de cromosomas X presentes en el genoma (Cuevas y Kofman, 1990; Therman y Susman, 1993).

En los vertebrados amnióticos la diferenciación gonadal es controlada por uno de dos mecanismos: determinación sexual ambiental (ESD; del inglés Environmental Sex Determination) o determinación sexual genotípica (GSD; del inglés Genotypic Sex Determination). Después de la diferenciación la gónada fetal produce hormonas sexuales esteroides, las cuales gobiernan el desarrollo de otros componentes de la sexualidad. Así la determinación sexual primaria sólo opera como un gatillo que inicia la cascada de eventos que culminan en la diferenciación sexual adulta (Gutzke y Crews, 1988).

DETERMINACIÓN SEXUAL AMBIENTAL

El fenómeno de determinación sexual ambiental (ESD) presente en reptiles fue dado a conocer por Charnier (1966) en el lizard *Agane agana*. Aunque la ESD no es gamética, es finalmente controlada por genes. Organismos con ESD tienen el potencial para ser hembras o machos, ya que algunas características ambientales condicionan cuales genes serán encendidos, determinando el sexo (Tamassia, 1991).

En reptiles, sólo en algunas especies se han identificado cromosomas sexuales, y en éstos hay especies en que los machos o las hembras son heterogaméticos. En otras especies, los cromosomas sexuales están aparentemente ausentes. En anfibios y peces se ha reportado morfología cromosómica sexual distinguible en una minoría de especies, aun más, los mecanismos de la determinación sexual son conocidos en pocas especies carentes de cromosomas sexuales visiblemente detectables (Mittwoch, 1988).

En reptiles el sexo lo determina la temperatura de incubación (TSD; del inglés Temperature-Dependent Sex Determination). En muchas especies, un rango de temperatura de incubación produce sólo machos y otro rango produce sólo hembras, sin embargo, mientras temperaturas cálidas producen principalmente machos y temperaturas frescas producen preferentemente hembras en algunos

lagartos y cocodrilos, el patrón opuesto se observa en muchas especies de tortugas; y aun en otras especies, las hembras son producidas en los extremos de la temperatura de incubación, cálidas altas y frescas bajas, desarrollándose los machos en las temperaturas intermedias (Bull *et al.*, 1990; Viets *et al.*, 1993).

Gutzke y Crews (1988), observaron en el gecko leopardo, que el comportamiento reproductivo y la fisiología endocrina del adulto son influenciados por la temperatura experimentada en el embrión, así la percepción de una hembra para el cortejo del macho es influenciada por la temperatura de incubación. Las hembras de incubación fría (cold females) exhiben receptibilidad sexual (comportamiento homotípico) cuando el macho las corteja, y las hembras de incubación cálida (hot females), responden frecuentemente al cortejo del macho, como si ellas mismas fueran el macho (comportamiento heterotípico), mostrándose agresivas ante el macho ya sea en la propia jaula o en un sitio neutro, además, ninguna de las hembras de 32°C puso huevos durante el estudio de 2 años. Los niveles de hormonas esteroides fueron medidos por radioinmunoensayo mostrando que los andrógenos fueron más altos y los de estradiol más bajos en hembras que experimentaron una temperatura de incubación que produjo principalmente machos (32°C). Esto indica que en la temperatura de incubación en esta especie, el determinante primario del sexo, tiene efectos diferenciales en la sexualidad adulta.

Una consecuencia de la ESD en el gecko leopardo es que en hembras de incubación caliente, hasta el 20% de las que experimentaron temperaturas altas, pueden ser funcionalmente estériles (Gutzke y Crews, 1988).

Los efectos morfológicos, fisiológicos y de comportamiento sexual, de la temperatura experimentada durante la incubación en el gecko leopardo, pueden ser similares a los efectos de las hormonas perinatales en los mamíferos, ya que en las especies placentarias el ambiente hormonal del feto varía con la posición intrauterina del individuo: hembras desarrolladas entre dos machos tienen más andrógenos y menos estrógenos que las no desarrolladas contiguas a un macho, además de ser más lentas para alcanzar la pubertad, tener pocos ciclos reproductivos y más cortos, comportamiento sexual agresivo, y ser menos atractivas para los machos (Gutzke y Crews, 1988).

DETERMINACIÓN SEXUAL GONOSÓMICA

En la determinación sexual gonosómica, los factores ambientales no afectan la diferenciación gonadal. De esta manera en los mamíferos no se ha logrado la reversión sexual gonadal con hormonas esteroides, excepto en marsupiales que nacen en una etapa muy temprana de su desarrollo (Gordon y Ruddle, 1981; Kofman *et al.*, 1982).

El cromosoma X y el Y han llegado a ser altamente especializados, aparentemente debido a una pérdida de genes por el cromosoma Y, y a la concomitante reposición de éstos por el X, este proceso a hecho al cromosoma X esencial para la viabilidad, y así la presión evolutiva tiende a mantenerlo intacto (Gordon y Ruddle, 1981).

Los estudios en cromosomas sexuales muestran que al menos es necesario un cromosoma X para la viabilidad del individuo y que un cromosoma Y es usualmente necesario para el desarrollo de tejido testicular en la gónada indiferenciada. En el humano la mayoría de los individuos con genotipo XO mueren antes del nacimiento. La frecuencia de este complemento al nacimiento es de 1 en 2,500 recién nacidas vivas. A la concepción es mucho mayor, pero el 99% son abortados en forma espontánea y se pueden identificar cromosómicamente entre los abortos del primer trimestre, donde 10% son monosómicos para el gonosoma X. La presencia de un segundo cromosoma X es necesaria para un desarrollo sexual normal (Salamanca, 1992).

Jost (1970), demostró que la extirpación gonadal en conejos en una fase temprana del desarrollo embrionario (día 19), cuando el tracto reproductivo está aún en estadio indiferenciado, independientemente del sexo cromosómico, siempre conduce al desarrollo de hembras fenotípicas (apoyando el concepto de inactividad endócrina del ovario fetal), carentes de los conductos derivados de Wolff pero con cuernos uterinos, una vagina y genitales externos femeninos. La administración de andrógenos exógenos resultó en la retención y desarrollo de los conductos de Wolff en epidídimo y vasos deferentes, así como en la masculinización de los genitales externos; sin embargo, los derivados de Müller fueron inhibidos.

Jost (1970), concluyó que todas las características sexuales secundarias masculinas son controladas por las hormonas sexuales producidas por el testículo. Para los marsupiales los últimos estudios sugieren que este principio no es totalmente verdadero, ya que algunas diferencias morfológicas entre machos y hembras en el canguro wallabie (*Macropus eugenii*), han sido detectadas antes de la diferenciación gonadal (Wilson *et al.*, 1981).

En marsupiales, como en mamíferos euterios, el cromosoma Y es el determinante del testículo. Sin embargo, en los marsupiales el desarrollo inicial del escroto, la bolsa y la glándula mamaria parece no estar controlado por hormonas gonadales (Bogan y Page, 1994).

Wai-Sum *et al.* (1988), mediante un estudio histológico en canguros (*Macropus eugenii*) embriones y en recién nacidos tomados del marsupio, concluyeron que la diferenciación del escroto, glándulas mamarias, gubernaculum y processus vaginalis, toman lugar antes de la diferenciación gonadal, por lo que no son hormona-dependientes. En soporte a esto la administración de andrógenos en hembras de marsupio en la zarigüeya de Virginia (*Didelphis virginiana*) y de canguro wallabie (*Macropus eugenii*), no causó estimulación escrotal, ni inhibió a la glándula mamaria o el desarrollo del marsupio. En la zarigüeya verde (*Monodelphis domestica*), la administración de benzonato de estradiol en machos neonatos inhibió el desarrollo testicular y la masculinización del tracto reproductor, pero no inhibió el desarrollo escrotal. Esto contrasta con los mamíferos placentarios, donde el desarrollo escrotal y la inhibición mamaria son eventos andrógeno-dependientes seguidos de la diferenciación testicular.

La primera distinción morfológica e histológica entre los futuros machos y hembras es el desarrollo de la cresta gonadal hacia testículo o hacia ovario (Mittwoch, 1988).

COMPOSICION CELULAR DE LA GONADA DE LOS MAMIFEROS

Desde el punto de vista embriológico la gónada se forma por dos tipos de células: células somáticas de origen mesodérmico y células germinales primordiales (**CGP**), que se diferencian tempranamente en el endodermo del saco vitelino (Haseltine y Ohno, 1981; Kofman *et al.*, 1982).

La gónada de mamíferos está conformada por células germinales y tres tipos de células somáticas. La proporción de células somáticas está compuesta por células de soporte (células de Sertoli en el macho y células foliculares en la hembra, las cuales se considera derivan de una línea progenitora común), células esteroideogénicas (células de Leydig en el macho y de la teca interna en la hembra) y células de tejido conectivo (Bogan y Page, 1994).

Las células germinales se reconocen tempranamente en la ontogénesis, son más grandes que las células somáticas, de citoplasma claro, núcleos grandes y redondos, con un contenido alto de glucógeno y fosfatasa alcalina. Además muestran ciertas peculiaridades: origen extragonadal, capacidad de migración, habilidad de establecer contacto con células somáticas y capacidad de proliferación (Kofman *et al.*, 1982). Las CGP extragonadales son consideradas como células sexuales predeterminadas antes de que ellas alcancen el primordio gonadal, es decir, invaden la gónada porque son células germinales y no que llegan a ser células germinales por que han entrado a la gónada. En esta interacción crítica para la futura fertilidad, los elementos somáticos proveen un ambiente donde las células germinales pueden madurar (Haseltine y Ohno, 1981).

LAS CÉLULAS GERMINALES PRIMORDIALES

Las células germinales primordiales (CGP) están situadas en la pared superior del epitelio del saco vitelino y en la pared ventral del intestino que se encuentra en desarrollo (Figura 1).

En el humano se ha fundamentado el sitio de la primera aparición de CGP a los 22 días de vida embrionaria en el endodermo del alantoides. Durante el plegamiento del embrión, la parte dorsal del saco vitelino es incorporada dentro de éste. Así, cerca de los 30 días después de la fertilización, las CGP inician su migración por la pared posterior del saco vitelino (mesenterio dorsal), desde el endodermo del intestino (Figura 1) a la región en la que están desarrollándose los riñones (mesonefros) y de ahí al primordio (cresta o esbozo) gonadal adyacente en donde toman una colocación cortical o medular hacia la 6ª semana. No todas las células sexuales alcanzan las crestas gonadales, algunas parecen perderse durante la migración mientras que otras degeneran en el camino. Mas aun, en algunos trastornos cromosómicos, como en la monosomía X0, las CGP o sus derivados degeneran después de terminar su migración (Kofman *et al.*, 1982; Moore, 1988).

Si las CGP en su migración, no llegan a las crestas genitales, las gónadas no se desarrollan, manteniéndose en estado indiferenciado. Por ello las CGP tienen una influencia inductora sobre el desarrollo de la gónada hacia ovario o testículo (Kofman *et al.*, 1982).

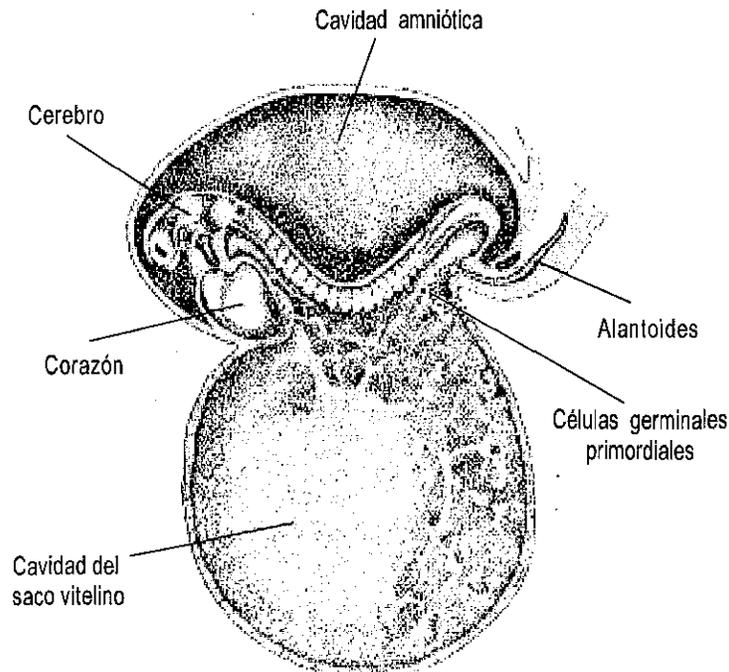


Figura 1. Dibujo de un embrión humano de tres semanas. Las células germinales primordiales (puntos negros) están agrupadas en la pared superior del epitelio del saco vitelino y en la pared ventral del intestino que se encuentra en desarrollo. (Modificado de E. Witschi, *Contr. Embriol.* 32, 69, 1948).

Las CGP, las cuales son primero observadas en el mesodermo extraembrionario, migran a la gónada primitiva de los 10.5 - 12 días post coito (d.p.c.) en el ratón (Bogan y Page, 1994).

La migración de las células CGP se realiza por translocación pasiva y por desplazamiento ameboide activo, posiblemente por acción quimiotáctica. El primero ocurre cuando dichas células aparecen entre las células epiteliales del saco vitelino, las cuales están en continuidad con el epitelio del intestino posterior a través del alantoides. Se ha visto que durante el crecimiento del embrión parte del epitelio del saco vitelino se incorpora al intestino, de manera que las CGP ahora se encuentran localizadas en el epitelio del intestino posterior. Mediante su propia capacidad de movimientos ameboides, las células germinales primitivas abandonan este sitio, migrando lateralmente hacia las regiones urogenitales (Haseltine y Ohno, 1981).

Algunos estudios indican que por lo menos algunas CGP pueden viajar ocasionalmente de manera pasiva por la corriente sanguínea y llegar a la cresta gonadal. Esta migración es común en las aves y en los reptiles primitivos, y puede presentarse en algunos mamíferos, *v. gr.*, bovinos, suinos, ovinos y caprinos. Esta migración permite el intercambio de las células germinales entre gemelos dicigóticos en los que la circulación placentaria se fusione antes de que las células alcancen los primordios gonadales por lo que los embriones se vuelven quimeras no sólo en relación a grupos sanguíneos sino también en relación a células germinales (Ohno y Gropp, 1965).

La posición de las células germinales dentro de la gónada indudablemente afecta su desarrollo, las células germinales femeninas que penetran en la médula por lo general degeneran o permanecen en estado latente; no hay evidencia en los mamíferos de que se transformen en células masculinas. De igual manera los gonocitos que penetran en la corteza, es imposible que se transformen a oocitos. Estos hechos contrastan con lo que sucede en los vertebrados inferiores, en los cuales las células germinales se transforman en espermatoцитos u oocitos de acuerdo con el sexo genético de la gónada en que se instalan; en estos animales es factible la reversión sexual con la administración de esteroides o con factores del medio ambiente, como los cambios de temperatura (Ohno y Gropp, 1965; Haseltine y Ohno, 1981).

Las quimeras XX/XY experimentales de ratón, hechas por agregar un complemento cromosómico XX a un embrión XY, usualmente se desarrollan como macho y la proporción equitativa de células XX y XY en las células de Leydig es similar a aquélla vista fuera de la gónada. En contraste muchas células de Sertoli pero no todas, son XY, por lo que probablemente esta línea contenga al Factor de Determinación Testicular (**TDF**; del inglés Testis Determining Factor); (Bogan y Page, 1994). Mintz (1968), observó en estos animales que no hubo evidencia de que células XX llegaran a formar espermatozoides e identificó un ratón macho quimera con un mínimo de 95% de sus células somáticas conteniendo células XX, mientras las células germinales todas fueron XY.

DIFERENCIACION SEXUAL PRIMARIA Y SECUNDARIA

La embriogénesis del dimorfismo sexual de los mamíferos, ha sido dividida en la etapa de diferenciación de la gónada bipotencial (diferenciación sexual primaria) y la evocativa etapa consecuente de efecto hormonal (diferenciación sexual secundaria). Este modelo no puede aplicarse a marsupiales, ya que en éstos el desarrollo inicial del escroto, bolsa, y glándula mamaria parece no estar controlada por hormonas gonadales (Bogan y Page, 1994).

En la gónada indiferenciada o bipotencial, el sexo está bajo el control del desarrollo femenino, pero el cromosoma Y acciona el mecanismo para el desarrollo testicular, mediante la diferenciación de los cordones sexuales primarios hacia túbulos seminíferos y su condensación y extensión dentro de la médula, donde mediante ramificación y anastomosis forman la rete testis. La rete testis se continúa con 15 a 20 tubos mesonéfricos que llegan a constituir los conductos eferentes, los cuales se conectan con el ducto mesonéfrico, que llegan a ser el ducto del epidídimo, y entonces el testículo dirige el desarrollo en dirección masculina, ya que causa el arresto del desarrollo de los genitales externos femeninos y dirige la complejión de los ductos internos masculinos y forja los genitales externos masculinos, después la secreción gonadal determina la estructura genital y la función en el adulto. El papel de los ovarios parece estar restringido al desarrollo postnatal del sistema reproductor femenino y las características sexuales secundarias (Naftolin, 1981; Mittwoch, 1988; Tamassia, 1991).

Las células germinales primordiales (CGP) que llevan el cromosoma Y, inducen la diferenciación de la porción medular de la cresta gonadal para formar el testículo, el que causa la involución de los conductos de Müller por acción de una hormona glucoproteica formada por las células de Sertoli; la Sustancia Inhibidora de los Conductos de Müller (MIS; del inglés Müllerian Inhibitory Substance, también conocida como Factor Inhibidor de los conductos de Müller, MIF), en tanto que por acción de la testosterona producida por las células de Leydig (Figura 2), se induce el desarrollo de los conductos de Wolff, que originan los conductos deferentes, el epidídimo y las glándulas accesorias (Winter y Pfeffer, 1977; Haseltine y Ohno, 1981; Hutson, 1994).

La diferenciación de las células de Sertoli y de las células de Leydig ocurre tempranamente. En las células de Sertoli se desarrolla notablemente el retículo endoplásmico rugoso, que caracteriza a las células con capacidad de secretar polipéptidos. Las células de Leydig que aparecen en el estroma después del establecimiento de los cordones seminíferos se caracterizan por el gran desarrollo del retículo endoplásmico liso y la presencia de crestas tubulares en sus mitocondrias, estructuras típicas de células activas en la secreción de esteroides (Kofman *et al.*, 1982).

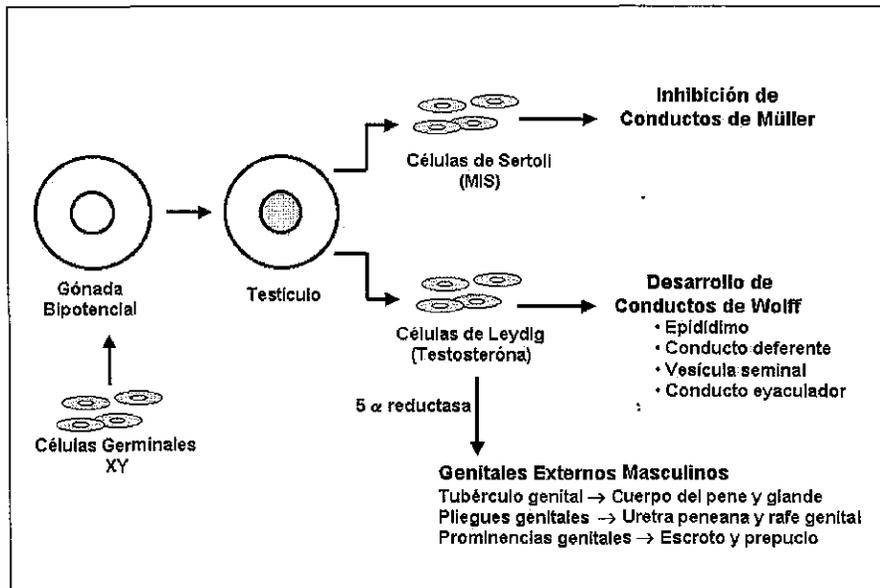


Figura 2. Esquema de la diferenciación gonadal y fenotípica en el macho. (Modificado de F. Salamanca, *Citogenética Humana*. Ed., Panamericana, México 1990).

Mientras la formación y liberación de gametos esta confinada a la vida adulta, la producción y liberación de hormonas están confinadas desde el testículo fetal (Mittwoch, 1988). En el humano los órganos genitales externos quedan completamente diferenciados hasta la 12^a semana de gestación (Moore, 1988).

En mamíferos el primer signo morfológico de dimorfismo sexual en las gónadas, es el desarrollo de las células primordiales de Sertoli (que cercan y nutren a las células germinales), y su diferenciación está correlacionada con el inicio de la actividad Anti-Mülleriana testicular. En humanos esto ocurre entre la 6^a y la 7^a semana de gestación y en el bovino cerca de lo 40 días postfertilización. El ovario fetal no muestra características de desarrollo hasta cerca de la 10^a semana de vida intrauterina. Las células de Leydig aparecen posteriormente en el intersticio y su diferenciación está correlacionada con el comienzo de la estereidogénesis (Tran, 1977; Long, 1980). La testosterona de origen testicular ejerce su efecto en forma local promoviendo la maduración de los túbulos espermatogénicos y es secretada a la circulación fetal sistémica (Mittwoch y Burgess 1991).

La testosterona fetal sistémica se une a proteínas circulantes como la globulina transportadora de hormonas esteroides sexuales, mediante una unión no covalente, lo cual le permite una disociación rápida y posteriormente penetrar por difusión a las células andrógeno sensibles o dependientes (Figura 3). En el interior la testosterona es convertida en 5 α -dihidrotestosterona. Así, ambas ejercen su acción en los órganos blanco, por unión a una macromolécula que se encuentra en la fracción soluble de la célula (George *et al.*, 1988; Darnell *et al.*, 1993). El andrógeno se une en el citoplasma en forma no covalente y específica al receptor de andrógenos, una macromolécula de

naturaleza proteica presente en los órganos andrógeno sensibles o dependientes. Este receptor citoplasmático está regulado por un gen localizado en el cromosoma X. Posteriormente el complejo andrógeno-receptor es trasladado al núcleo donde interacciona con la cromatina a través de aceptores nucleares y de esta interacción se genera una secuencia de eventos que incluyen el incremento en la síntesis de RNA polimerasas (I, II y III) y RNA mensajeros específicos (Figuras 3 y 4), culminando en la síntesis ribosomal de proteínas, expresando de esta forma su efecto androgénico (Wilson *et al.*, 1981; Kofman *et al.*, 1982).

En el bovino hacia los 80 días de gestación, las células de Leydig del testículo en desarrollo, comienzan a secretar testosterona, la cual es distribuida sistémicamente por vía sanguínea como la MIS (Long, 1980).

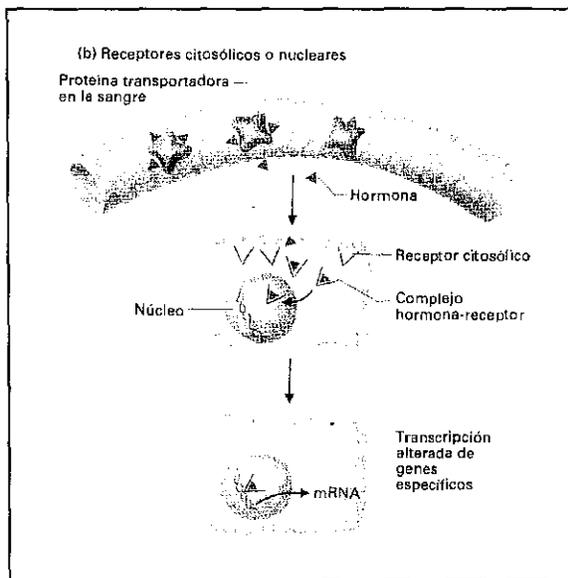


Figura 3. Representación esquemática de proteínas sanguíneas transportadoras de hormonas esteroides y de proteínas citoplasmáticas y nucleares receptoras para hormonas esteroides. (Tomado de Darnell *et al.*, *Biología Celular y Molecular*, Ed., Omega, España. 1993).

Mientras la testosterona induce la virilización de los conductos de Wolff, la dihidrotestoterona estimula el desarrollo de los primordios de los genitales externos: el tubérculo genital se desarrolla y origina el cuerpo del pene y el glande, las prominencias (eminencias) genitales y los pliegues genitales, cada uno de ellos localizados a uno y a otro lado de la línea media, se fusionan y originan las bolsas escrotales y el prepucio, y el rafe genital y la uretra peneana, respectivamente. Esta conversión metabólica es mediada por la presencia de la 5α -esteroide reductasa, enzima de localización citoplasmática y nuclear con regulación génica autosómica (Figuras 2 y 4). En tanto que el seno urogenital dará lugar a la próstata y a la uretra prostática (Wilson *et al.*, 1981, Kofman *et al.*; 1982, George *et al.*, 1988).

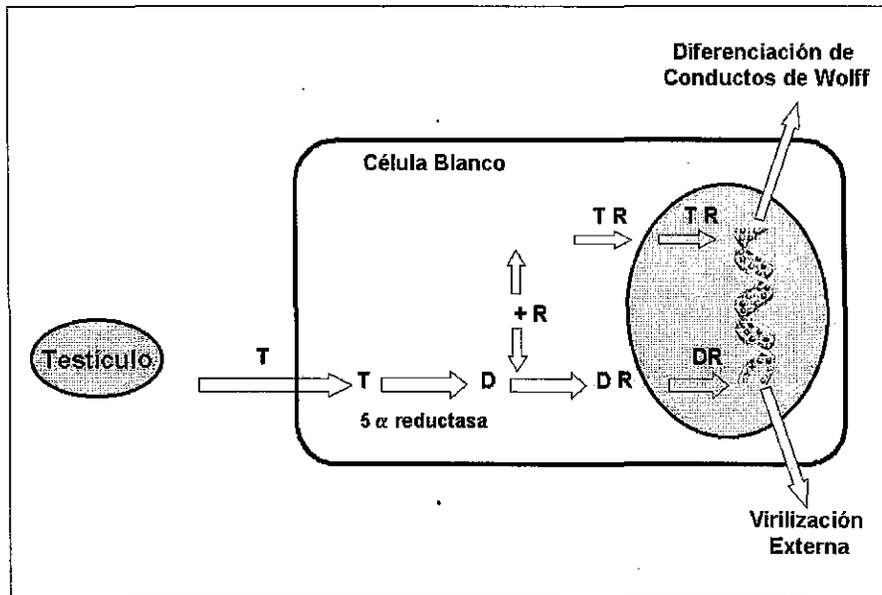


Figura 4. Esquema de la acción androgénica en el embrión masculino. (T) Testosterona; (D) dihidrotestosterona; (R) receptor de andrógenos. (Modificado de E. Knobil and J. Neill, *The Physiology of Reproduction*. Ed., Raven Press, E. U. 1988).

En ausencia del cromosoma Y, las células germinales primordiales con dotación cromosómica XX, inducen el desarrollo de la porción cortical de la gónada indiferenciada que se transforma en ovario (Figura 5). En ausencia de tejido testicular, los conductos Wolffianos involucionan al no existir estímulo (testosterona) para su desarrollo y por ende se desarrollan libremente los conductos Mülllerianos al no existir la MIS, los cuales originan las trompas uterinas, el útero y el tercio superior de la vagina (Behringer *et al.*, 1990; Hutson, 1994).

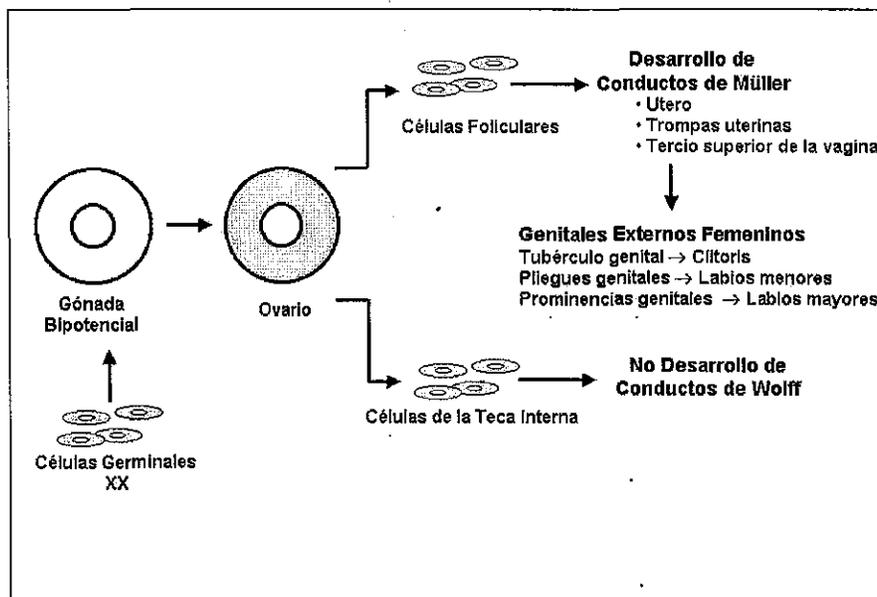


Figura 5. Esquema de la diferenciación gonadal y fenotípica en la hembra. (Modificado de F. Salamanca, *Citogenética Humana*. Ed., Panamericana, México 1990).

En la hembra normalmente los primordios de los genitales externos no reciben influencia androgénica, el tubérculo genital origina el clítoris, en tanto que las prominencias genitales y los pliegues genitales permanecen separados a uno y a otro lado de la línea media, originando los labios mayores y menores, respectivamente (Figura 5). El seno urogenital da lugar a la porción anterior de la vagina y a la uretra (George *et al.*, 1988).

En el bovino la diferenciación sexual de la hembra comienza cerca de los 60 días de gestación iniciando la elongación de la parte uterina de los conductos de Müller. En la becerro a los 70 días de gestación, comienza la meiosis ovárica y la regresión de los conductos de Wolff cerca del día 79 (Long, 1980).

EL FACTOR DE DETERMINACIÓN TESTICULAR

El cromosoma Y

En 1959, el cromosoma Y, fue sugerido por primera vez como el determinante masculino en el hombre y el ratón, diferentes estudios hacen claro que este cromosoma codifica para un mediador de la determinación sexual, necesario y específico para el desarrollo de la gónada masculina, por lo que se le llamó **Factor de Determinación Testicular (TDF;** del inglés Testis Determining Factor); referido como TDY en humanos y Tdy en ratones (Hodgkin, 1989; Bogan y Page, 1994). Siete años después la investigación en humanos fue enfocada al brazo corto de este cromosoma. El descubrimiento de una secuencia repetida de DNA altamente conservada, específica-sexual en serpientes, y representada en el cromosoma Y del ratón, dirigió mucha especulación en su posible papel en la determinación sexual. Pero esta secuencia demostró ser apenas representativa en el cromosoma Y humano (McLaren, 1990).

El descubrimiento de ratones hembras XO, y subsecuentemente los ratones machos XXY y los varones con cuatro cromosomas X y un Y, demostraron que en estos organismos el cromosoma Y determina la masculinidad (Gordon y Ruddle, 1981).

De acuerdo a la teoría del origen filogenético de los cromosomas sexuales, se asume que el cromosoma X y el cromosoma Y han evolucionado de un par de cromosomas homólogos. El cromosoma Y es generalmente más pequeño que el X debido a que muchos de los genes ajenos al Y han permanecido en el X a cambio de la pérdida de los genes inherentes al sexo masculino localizados en el Y (Kofman *et al.*, 1982; Cuevas y Kofman, 1990).

El antígeno H-Y

A mediados de los años 70's y por casi diez años, el antígeno H-Y, el cual codifica para un sistema inmunológico proteico establecido sólo en machos, fue considerado ser el TDF, pero éste fue

subsecuentemente abandonado (Ohno 1976). Simpson *et al.* (1987), reportaron mediante hibridación de DNA, seis varones 46,XX antígeno H-Y negativos y dos mujeres 46,XY antígeno H-Y positivas. Anteriormente, McLaren *et al.* (1984), habían descubierto un ratón mutante que carecía completamente del H-Y siendo indiscutiblemente macho y desarrollando testículos. Finalmente, dos genes localizados en el brazo corto del cromosoma Y humano fueron postulados como candidatos para TDF, descartando aun más al antígeno H-Y, ya que éste se localiza en el brazo largo del cromosoma Y (Mittwoch, 1988; McLaren, 1990).

El gen ZFY

Page *et al.* (1987), reportaron una mujer con complemento cromosómico XY, con pérdida de un segmento de 140 kb del cromosoma Y humano, que contiene un gen que codifica una proteína con varios dedos de zinc (giros de aminoácidos formados por cationes de zinc, "zinc-finger", por lo que es llamado ZFY), considerándolo candidato para ser el TDF, concluyendo que sus secuencias se han conservado en el cromosoma Y de mamíferos y muestran homología con secuencias localizadas en el cromosomas X.

El ZFY tiene dos genes homólogos, ZFY-1 y ZFY-2 (Zfy-1 y Zfy-2 en el ratón). El Zfy-1 pero no el Zfy-2 es expresado durante la diferenciación embrionaria del testículo en el ratón, sin embargo, ninguno de los dos genes es expresado en el testículo embrionario del ratón mutante W^e / W^e , el cual carece de células germinales. Estas observaciones excluyen al Zfy-1 y al Zfy-2 como candidatos para el TDF del ratón (Burgoyne, 1989; Koopman *et al.*, 1989).

El ZFY como candidato a ser el TDF, fue también descartado con el reporte de Palmer *et al.* (1989), con base en pruebas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR; del inglés Polymerase Chain Reaction) en tres varones XX y un individuo intersexo XX, quienes, aunque portaban secuencias de DNA derivadas del cromosoma Y (región 1A1) en uno de sus cromosomas X, carecían del gen ZFY (Erickson *et al.*, 1989; Palmer *et al.*, 1989).

El gen Zfy en el ratón demostró estar asociado con la presencia de las células germinales, las cuales se cree no juegan una parte en la determinación testicular (McLaren, 1990). Además, la expresión del Zfy está claramente asociada con células germinales en testículos adultos, porque su transcripción no fue detectable en material testicular adulto carente de células germinales (Koopman *et al.*, 1989).

Hay otros argumentos para descartar el gen ZFY como TDF. El descubrimiento que secuencias homólogas para el ZFY humano, no están establecidas en los cromosomas sexuales de marsupiales (son mas bien autosómicas), en los cuales parece que también tienen un mecanismo de diferenciación sexual dependiente del Y. En adición, resultados iniciales en varias especies de reptiles, algunos de los cuales tienen determinación sexual por temperatura, muestran una

ausencia de diferencias sexuales en patrones de hibridación, discutiendo contra la localización de secuencias homólogas en sus cromosomas sexuales. Además, el Zfy-1 y el Zfy-2 parecen ser expresados en una línea de ratón genéticamente mutante en el Tdy. Finalmente, pacientes varones XX poseen secuencias del Y, pero no se les ha detectado secuencias de ZFY (Erickson *et al.*, 1989; Koopman *et al.*, 1989).

Mardon y Page (1989), no establecieron evidencia de transcripción de Zfy-1 en RNA preparado de testículo de ratón recién nacido. Koopman *et al.* (1989), no encontraron evidencia de transcripción de este mismo gen en RNA preparado de cresta gonadal en el momento inicial de la determinación sexual.

Los análisis de amplificación de DNA de ratón confirman el comienzo de la expresión del Zfy-1 hacia el día 10 d.p.c. En adición, el decremento de los niveles de expresión fue establecido entre los 14 y 17 d.p.c. Por contraste, transcripciones del Zfy-2 fueron detectadas en testículos adultos pero no en gónadas embrionarias de ratón, concluyendo así, que el Zfy-2, tampoco es el TDF (Koopman *et al.*, 1989).

El gen SRY

Sinclair *et al.* (1990), aislaron otro gen en la región Yp, llamado **SRY** (del inglés; Sex-Determining Region Y), actualmente candidato para el elusivo TDF. Pero si este gen es el TDF, debe ser expresado en la gónada embrionaria en el tiempo de la diferenciación testicular, lo cual parece fue probado por los trabajos de Gubbay *et al.* (1990), quienes clonaron la secuencia de DNA correspondiente al SRY humano de la región de determinación testicular del cromosoma Y de ratón. Este mostró 80% de homología con la secuencia humana sobre 237 pb.

El gen SRY se localiza en el cromosoma Y, y su posición ha sido definida por análisis de los genomas de varones XX y mujeres XY, generado por intercambio genético anormal entre los gonosomas en la meiosis masculina, delimitándolo a 35 kb en la región cercana al límite pseudoautosómico (Figura 6). El SRY es tan conservado evolutivamente como el cromosoma Y en varios mamíferos estudiados (Cherfas, 1991; Payen *et al.*, 1993).

En el ratón el Tdf está en el diminuto brazo corto del cromosoma Y, lejos de la región pseudoautosómica, la cual se encuentra al final del brazo largo del mismo cromosoma (Erickson y Verga, 1989).

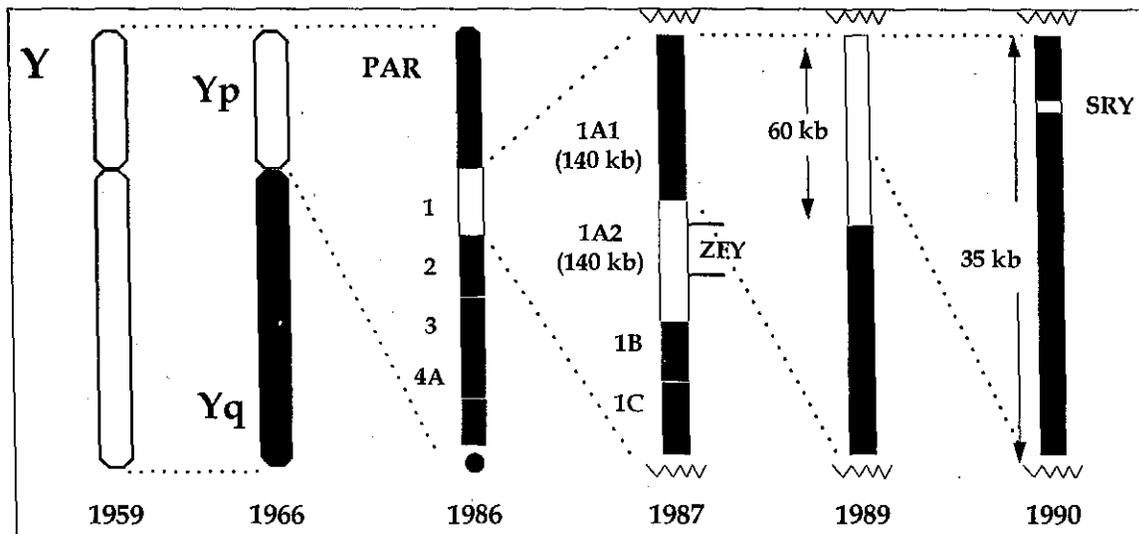


Figura 6. Treinta y un años en la búsqueda del Factor de Determinación Testicular. La región cromosómica blanca incluye al elusivo factor. La investigación se ha centrado de 30 - 40 millones de bases (1959) a menos de 250 bases que codifican al SRY (1990). Tomado de McLaren, A. *Nature*, 346: 216 - 217 (1990).

Goodfellow y Lovell-Badge (1993), no estuvieron plenamente convencidos con el encuentro del SRY hasta que obtuvieron la prueba más definitiva; el nacimiento de ratones transgénicos, los cuales contenían el complemento cromosómico normal XX más 14 kb del cromosoma Y portando el Sry. Algunas de estas hembras cromosómicas se desarrollaron como machos con testículos normales y comportamiento masculino cuando se enjaularon con hembras receptoras.

En el ratón, el primer signo visible de desarrollo masculino, la formación de testículos de las crestas gonadales indiferenciadas, ocurre dentro de las 24 horas posteriores a los 11.5 días post coito (d.p.c.), con el alineamiento de las células de Sertoli, así cualquier gen candidato para el Tdy debería ser expresado en esta cresta genital en o antes de este estado de desarrollo (Koopman *et al.*, 1990).

Koopman *et al.* (1990), analizaron RNA mediante la técnica PCR para la presencia de transcritos del Sry en embriones de ratón. No se detectó expresión de Sry en los 7.5, 8.5 y 9.5 d.p.c. Los transcritos fueron detectados en la cresta genital a los 10 d.p.c., y presentes en niveles similares a los 11.5 d.p.c. y fueron menos abundantes a los 12.5 d.p.c. No fueron detectados en el testículo de los 13.5 d.p.c. a los 17.5 d.p.c. Aparentemente la expresión del Sry corresponde precisamente con el comienzo de la diferenciación testicular.

Koopman *et al.* (1990), también analizaron RNA de tejido fetal a los 11.5 d.p.c., observando que en vísceras, cabeza y fracciones de cadáveres no hubo expresión de Sry. Asimismo, analizando expresión en fetos de ratones homocigóticos para el locus dominante white (W), en los cuales se desarrolla el testículo a pesar de la falta de células germinales, también fue detectada expresión de

Sry. Al analizar la expresión en testículo de ratones adultos determinaron que en contraste con el embrión, la expresión de Sry en el ratón adulto es dependiente de las células germinales, entonces, siendo la expresión fetal y adulta física y funcionalmente diferentes, es probable que un número de genes tienen el papel de dirigir eventos de desarrollo en el embrión y muestran reactivación en el testículo adulto. Como el Sry no depende de la presencia de células germinales, éste debe de ser expresado en una de las líneas celulares somáticas presentes en el desarrollo gonadal.

La rápida interrupción de transcripción del gen Sry después de la formación del cordón testicular sugiere que el Sry inicia una cascada de expresión génica, pero no es requerido para el mantenimiento de la actividad de genes en el desarrollo testicular (Koopman *et al.*, 1991).

El SRY codifica para una proteína miembro del grupo de alta movilidad (HMG; del inglés High Mobility Group) de proteínas ligadas al DNA. Hasta ahora, todas las mutaciones en el gen SRY asociadas con reversiones sexuales han sido localizadas en la caja HMG. Ninguno de los puntos de mutación de SRY en mujeres XY está fuera del dominio de la HMG (Payen y Cotinot, 1993; Bogan y Page, 1994).

Foster *et al.* (1992), encontraron, mediante una sonda de SRY humano para identificar y clonar genes relacionados en el cromosoma Y de dos especies de marsupiales, *Sminthopsis macroura* y *Macropus eugenii*, dentro de 79 aminoácidos de la caja HMG, que ambos genes de marsupiales muestran extensa homología para la secuencia humana. El *S. macroura* mostró 65% de similitud y la secuencia del *M. eugenii* 70%. Por lo anterior es esperado que el Sry marsupial sea necesario para la formación del testículo.

Payen y Cotinot (1993), demostraron la gran homología dentro de la caja HGM en la secuencia del gen Sry del humano y otras especies, el DNA genómico de machos y hembras de la familia *Bovidae* fue amplificado por PCR, posteriormente los fragmentos amplificados (200 pb) fueron secuenciados. La comparación de ácidos nucleicos reveló un alto grado de conservación del SRY-HMG dentro de la familia *Bovidae*: entre las 3 subfamilias (*Bovinae*, *Caprinae*, *Ovinae*), se observó más del 97% de homología. Respecto a las secuencias de aminoácidos, la homología es igual entre la oveja y la cabra y tres residuos son diferentes en la región Sry de la HMG bovina.

Otros genes de la diferenciación sexual

Una batería de genes del cromosoma Y, probablemente incluyendo el SRY y el ZFY, posiblemente actúan en el crecimiento del rudimento gonadal el cual es también afectado por ciertos genes de otros cromosomas (Mittwoch y Burgess, 1991; Capel, 2000).

Berkovitz *et al.* (1992), estudiaron 5 individuos hermafroditas verdaderos con cariotipo 46,XX, mediante pruebas de PCR y de Southern blot para identificar el gen SRY. Sólo en uno de ellos se

identificaron secuencias correspondientes al SRY. Los sujetos 46,XX sin SRY, quizá tengan una mutación en un gen autosómico o del cromosoma X, que permita la determinación testicular en ausencia del TDF. Evidentemente el SRY tampoco es esencial ni suficiente para la diferenciación testicular.

De la Chapelle (1988), ha reportado que del 10 - 20% de los varones XX no tienen copia del TDF, y que muchas mujeres XY presentan una copia de éste.

En la mosca del vinagre (*Drosophila melanogaster*) y el nemátodo (*Caenorhabditis elegans*), muchos de los genes involucrados en la determinación sexual están localizados en autosomas. Es probable que el mismo mecanismo ocurra en mamíferos, suposición soportada por la mayoría de mujeres XY, en quienes parece estar intacto el SRY y se sospecha de una mutación autosómica o en genes determinantes sexuales ligados al X, asimismo, una minoría de varones XX, parecen no portar el gen SRY (Bogan y Page, 1994).

Las secuencias asignadas al TDF están presentes en los varones XX y ausentes en las mujeres XY, de esta manera el sexo estaría finalmente determinado por la interacción de secuencias homólogas de los gonosomas para las que German (1988) propuso la denominación de *locus* de la diferenciación gonadal (LDG), siendo su transcripción activa, tanto en el cromosoma X como en el Y, y por efecto de dosis en el individuo XY, la diferenciación sería masculina, en tanto que en la mujer debido a la inactivación del X sólo uno de los *loci* sería activo conllevando la diferenciación femenina (Cuevas y Kofman, 1990; Tamassia, 1991).

El gen *WT1*, primeramente identificado por su papel en un tipo de cáncer del riñón infantil (**tumor de Wilms**), al parecer también participa en el desarrollo gonadal, ya que humanos XY heterocigotos para ciertas mutaciones en este gen (síndrome Denys-Drash), comparten marcadamente características fenotípicas con humanos XY mutantes en el gen SRY, *v. gr.*, desordenes histológicos gonadales, persistencia de derivados de Müller, y parcial o completa feminización de los genitales externos (Bogan y Page, 1994; Capel, 2000).

TRASTORNOS DE LA DIFERENCIACION SEXUAL

La diferenciación sexual es una secuencia de procesos que comienzan con el establecimiento del sexo cromosómico en la fertilización, seguido por el desarrollo de la gónada (sexo gonadal) y culminando en la formación del sexo fenotípico. Cada evento de este proceso depende de uno precedente y bajo circunstancias normales, el sexo cromosómico coincide con el sexo fenotípico. Sin embargo, ocasionalmente, el sexo cromosómico y el sexo fenotípico no se relacionan, o el fenotipo sexual puede ser ambiguo (Wilson *et al.*, 1981; Tamassia, 1991).

Las anomalías de la diferenciación sexual surgen como resultado de cambios o mutaciones de los genes o por alteraciones estructurales o numéricas de los cromosomas. Las anomalías sexuales génicas se transmiten con patrones de herencia mendeliana simple, autosómica dominante, autosómica recesiva o ligada al cromosoma X y se relacionan con algunos procesos de interacción entre genes, hormonas, receptores hormonales, diferenciación celular y morfogénesis. Como ocurre en el humano en la hiperplasia suprarrenal congénita y el síndrome de feminización testicular (Salamanca, 1992).

Las alteraciones del cromosoma Y ocasionan grandes fallas a nivel de la diferenciación gonadal y un amplio espectro de manifestaciones clínicas. Asimismo, se considera que las anomalías de los gonosomas se pueden dividir en cuatro grupos (Gustavsson, 1979; Salamanca, 1992):

- Uno de los gonosomas, ya sea el X o el Y, es estructuralmente anormal.
- Mosaicos gonosómicos.
- Combinación de 1 y 2.
- Quimerismo.

INTERSEXUALIDAD Y HERMAFRODITISMO

Un intersexo es definido como un animal con variaciones anatómicas congénitas que confunden el diagnóstico del sexo por presentar diferentes grados de variación en la diferenciación de los órganos reproductivos, o por ser genéticamente de un sexo y fenotípicamente del otro (McFeely *et al.*, 1967; Rhoades, 1977).

El término hermafrodita fue introducido por los griegos: **Hermafrodito**, bello hijo de **Hermes** (Mercurio) y de **Afrodita** (Venus). La ninfa Salmacis se enamoró de Hermafrodito a orillas de un lago y trató en vano de seducirlo. Cuando él se arrojó desnudo al agua para bañarse, la ninfa, también desnuda, lo abrazó suplicando a los dioses que jamás los separasen. Atendiendo a este ruego de Salmacis, los dioses los unieron en un ser de doble naturaleza: hombre-mujer (González, 1976).

Klebs (1876), introduce una clasificación de hermafroditas en el humano, la cual aún es usada en animales domésticos. En esta se definía a un hermafrodita verdadero como un animal con gónadas o tejido gonadal de ambos sexos; un pseudohermafrodita es el que tiene gónadas de un sexo pero otros órganos reproductivos con algunas de las características del sexo opuesto, el término va seguido de la palabra "masculino" o "femenino" acorde al sexo de la gónada presente (Winter y Pfeffer, 1977).

El hermafroditismo verdadero se puede presentar de una de las siguientes maneras (Berkovitz *et al.*, 1992):

- Bilateral: ovotestis en ambas gonadas.
- Unilateral: ovotestis en una gónada y tejido testicular u ovárico en la otra.
- Lateral o Alterno: tejido testicular en una gónada y tejido ovárico en la otra.

El grado de masculinización de las estructuras de Wolff y de Müller, así como de los genitales externos, probablemente depende de la cantidad de tejido testicular funcional presente (Berkovitz *et al.*, 1992).

La incompleta determinación testicular en pacientes con hermafroditismo verdadero y complemento cromosómico 46,XX y secuencias del SRY, puede ser explicado por (Berkovitz *et al.*, 1992):

- Rearreglo o mutación en el *locus* SRY que ocurrió durante la translocación.
- Disminución de la expresión del gen SRY debido a secuencias flanqueadas en el sitio de la translocación del Y.
- Ausencia de secuencias de Y, diferentes al SRY, las cuales pueden ser importantes para la determinación testicular.
- Localización o extensión de inactivación del cromosoma X, involucrando al X translocado.

Se ha observado que la diferenciación genital hacia el fenotipo masculino es incompleta como resultado de alguna de las siguientes anomalías (Wilson *et al.*, 1981; Salamanca, 1992):

- Deficiencia enzimática que bloquea la síntesis de testosterona.
- Deficiencia de 5 α -reductasa, enzima encargada de la reducción de testosterona a dihidrotestosterona.
- Ausencia completa o parcial así como alteraciones funcionales, de los receptores de andrógenos en las células blanco.

La síntesis de testosterona a partir de colesterol requiere de la presencia de ocho sistemas enzimáticos, cada uno de los cuales tiene regulación génica autosómica diferente (Kofman *et al.*, 1982).

Presumiblemente, algunas veces la recombinación entre los gonosomas produce la transferencia de genes de la diferenciación sexual del Y al X, ocasionando reversiones sexuales masculinas con complemento cromosómico XX y femeninas con XY (158). Además, algunos varones XX podrían resultar de translocaciones de la punta del cromosoma Y sobre la punta del cromosoma X, con alguna duplicación de la región pseudoautosómica (Erickson y Verga, 1989).

Aproximadamente 1 en 20,000 hombres, es un varón XX, al ser estéril es consecuentemente identificado por su presentación en clínicas de fertilidad (Payen y Cotinot, 1993).

Recientemente se ha encontrado en el humano y en el ratón, que las hembras XY carecen de la región asignada al TFD, localizadas en el brazo corto del cromosoma Y; mientras los machos XX contienen parte del cromosoma Y, usualmente agregado a una punta de un X, o algunas veces a otro cromosoma con el que tuvo intercambio meiótico (Berta *et al.*, 1990; Jäger *et al.*, 1990).

Los ratones transgénicos machos XX difieren de sus hermanas por la adición de un segmento de DNA, 14 kb del cromosoma Y incluyendo al gen Sry, pero carecen de espermatogonias, aunque parece que tienen una función hormonal normal ya que exhiben una diferenciación sexual secundaria y comportamiento de apareamiento normales. En contraste las ratonas XY difieren de los machos XY normales sólo por la delección de un fragmento de DNA del Y, 11 kb incluyendo el Sry, estas hembras son fértiles y pueden transmitir el cromosoma Y mutante a su descendencia (Bogan y Page, 1994).

Los varones XX no producen espermatozoides pero tienen genitales externos e internos masculinos normales, así en muchas instancias el fenotipo de los ratones transgénicos XX es similar al observado en humanos. Sin embargo, cuando pequeños fragmentos (35 kb) de DNA del Y son translocados, los individuos resultantes XX+SRY invariablemente tienen anomalías genitales, algunas veces a pesar de aparente histología gonadal normal. Estas anomalías pueden incluir genitales externos sexualmente ambiguos (incompleta fusión de los pliegues escrotales resultando en escroto bifido o abertura uretral desplazada), no descendimiento testicular, u ovotestis con persistencia de estructuras femeninas derivadas de los conductos de Müller (Bogan y Page, 1994).

En contraste con las ratonas XY, las mujeres XY son estériles, tales individuos fallan para desarrollar gónadas maduras y en su lugar forman gónadas pobremente diferenciadas sin clara histología masculina o femenina. Debido a que las gónadas carecen de la función hormonal masculina, las estructuras de Müller persisten y la diferenciación sexual secundaria femenina continúa. La infertilidad puede resultar en parte por la monosomía X, a diferencia de las ratonas X0, que pueden ser fértiles, las mujeres X0 son estériles (Bogan y Page, 1994).

En el caso de "deficiencia de 5 α -reductasa", los individuos afectados son genéticamente varones con testículos, los genitales externos son predominantemente femeninos pero tienen derivados de las estructuras de Wolff (epidídimo, conductos deferentes, vesículas seminales y conducto eyaculador) que terminan en una vagina. El desorden es debido al estado homocigótico para un gen autosómico recesivo que causa desarrollo sexual anormal sólo en varones (Wilson *et al.*, 1989).

LOS CROMOSOMAS DEL BOVINO DOMESTICO

Krallinger (1927) fue el primero en reportar que el número de cromosomas en células diploides del bovino doméstico europeo es 60, hallazgo que posteriormente fue confirmado con el mismo número de cromosomas para el *Bos indicus* (Sasaki y Makino, 1962). Sin embargo, la información más precisa acerca de los cromosomas de los bovinos se obtuvo a partir de los años 60's cuando Melander aplicó las nuevas técnicas de cultivo celular (Potter y Upton, 1979).

Hasta 1960 los recuentos cromosómicos de las células de bovino fueron realizados en preparaciones histológicas de tejido testicular. En enero de 1960, Chiarelli *et al.*, publicaron los resultados de sus experimentos en cultivo de tejido renal de terneros machos y hembras. Así confirmaron el número cromosómico del *Bos taurus* de $2n = 60$, describiendo a todos los cromosomas como telocéntricos excepto al cromosoma X, el cual fue definido como submetacéntrico, mientras el Y tiene una morfología variada (Potter y Upton 1979). Crossley y Clarke (1962), describen el cromosoma Y en el *Bos taurus* como submetacéntrico fácil de identificar, sin embargo, Kieffer y Carwright (1968), en observaciones en el *Bos indicus* y Brahmán Americano, señalan al gonosoma Y como un telocéntrico, difícil de distinguir de los autosomas más pequeños.

Los pares cromosómicos del bovino se enumeran del 1 al 29 en orden de tamaño decreciente, con descripción de los cromosomas sexuales al final. El X es uno de los cromosomas más largos, en magnitud relativa con el primero y segundo autosoma, mientras el Y se aproxima en tamaño a los autosomas más pequeños y es positivamente heteropicnótico en metafase (Sasaki y Makino, 1962).

La morfología del cromosoma Y del bovino doméstico ha sido utilizada como un recurso para rastrear la filogenia de las razas bovinas (Pathak y Kieffer, 1979).

Algunos polimorfismos han sido reportados en el cromosoma Y del ganado *Bos taurus*. La posición del cromosoma Y, considerando su tamaño, es similar a los cromosomas del par 25 al 29, según la especie (*taurus* o *indicus*), la raza o el híbrido interespecífico resultante. El *Bos indicus* y las razas derivadas de toros *Bos indicus* tienen un cromosoma Y telocéntrico, mientras que en el *Bos taurus*

y las razas derivadas de estos toros tienen un Y submetacéntrico. Sin embargo, la raza Jersey muestra un cromosoma Y metacéntrico (Eldridge y Blazar, 1977; Potter y Upton, 1979).

MOSAISISMO Y QUIMERISMO

Las alteraciones en el número cromosómico surgen por no disyunción cromosómica, dando origen a las aneuploidías, que pueden ocurrir en células gaméticas y que por consiguiente todas las células del individuo poseen la alteración, o en células somáticas en donde si ocurre en los estadios tempranos de la diferenciación y desarrollo ocasionan los mosaicos o mixoploidías (Salamanca, 1992).

Así pues, se define como mosaicismo a la condición en la que en un individuo uno o más tejidos tienen dos o más líneas celulares derivadas de un cigoto único pero genéticamente diferentes debido a mutación postcigótica o por no disyunción, en tanto que el quimerismo, es un individuo compuesto por células que se originaron a partir de dos cigotos (Halnan, 1977; Gustavsson, 1979).

El quimerismo puede estar presente en todos los tejidos del organismo cuando es debido al desarrollo conjunto de dos líneas celulares después de que el óvulo y el segundo cuerpo polar han sido fertilizados, o cuando dos óvulos son fertilizados y se fusionan en un sólo cigoto durante los primeros estadios de la división mitótica (**quimerismo dispérmico**). Por otra parte la fusión intrauterina del corión y el desarrollo de la anastomosis vascular entre gemelos heterosexuales conlleva al **quimerismo hematopoyético**, el cual no esta presente en todos los tejidos del individuo (Gustavsson, 1979; Thompson, 1991).

INTERSEXUALIDAD EN EL BOVINO DOMESTICO

Existen tres condiciones generales de intersexualidad descritas en el bovino, el **síndrome freemartin**, la **disgenesia gonadal XY** y el **síndrome de feminización testicular**. De éstas, el freemartinismo es la condición intersexual más común en el bovino doméstico (Marcum, 1974; Long, 1981).

El fenotipo en las tres condiciones de intersexualidad del bovino es femenino y pueden diferenciarse con base a la anatomía reproductiva interna, la histología gonadal y el complemento cromosómico (Long, 1980; Farin *et al.*, 1993).

En la disgenesia gonadal XY no hay gónadas, sino unas bandas de tejido fibroso; el síndrome de feminización testicular es caracterizado por un genotipo XY, fenotipo femenino y testículos abdominales; mientras en síndrome freemartin existe un genotipo XX/XY (Long, 1981).

Kawakura *et al.* (1996), estudiaron seis animales (4 raza Holstein-Freisan, 1 Japanese Black y 1 Jersey) de 22-25 meses de edad, femeninos en apariencia y en órganos genitales, sin conducta alguna de celo; en los cuales citogenéticamente encontraron únicamente complemento cromosómico 60,XY sin mostrar mosaicismo con complemento 60,XX en muestras de sangre y fibroblastos (piel, bazo y riñón). En el estudio molecular se utilizó la técnica de PCR para identificar genes específicos del cromosoma Y del bovino (BC 1.2 y Sry), detectando en tres de las seis hembras 60,XY el fragmento del gen BC 1.2, más no el segmento del gen Sry. Posteriormente, Kawakura *et al.* (1997), observaron en estas tres hembras XY, mediante la técnica de FISH empleando una sonda molecular para el gene BC 1.2, un cromosoma Y estructuralmente anormal definiéndolo como una duplicación (isocromosoma) del brazo corto del cromosoma Y (iYp), carente del gen Sry, el cual ha sido mapeado en el bovino en la región proximal del telómero del brazo largo del cromosoma Y (Yq12) por Xiao *et al.* (1995).

El síndrome de feminización testicular es un estado de intersexualidad causado por un gen ligado al cromosoma X (X^{Tfm}), esta condición ha sido demostrada en el humano, el ratón y el bovino. La intersexualidad es debida a una falla en la habilidad del receptor de andrógenos del citosol de las células blanco, ocasionando insensibilidad de éstas para responder a los andrógenos. El desarrollo de los conductos de Müller es suprimido ya que las células de Sertoli producen sustancia inhibidora Mülleriana (MIS). El seno urogenital, llega a ser incapaz de responder a la testosterona y aún no llega a ser blanco para la MIS, y simplemente se desarrolla en una vagina corta cranealmente ciega. No se presenta útero, cuernos uterinos ni ovarios. En humanos las pacientes con este padecimiento presentan desarrollo de senos como una mujer normal pero con pezones rudimentarios; además, el bello axilar, facial y púbico está ausente o escaso y buscan consejo médico por amenorrea primaria. Los testículos están localizados en el abdomen, a lo largo del curso del canal inguinal o en el labio mayor. El cariotipo es 46,XY. En algunos pacientes, como en el ratón, el receptor puede estar ausente o ser anormal (Long, 1981; Wilson, 1981).

Long (1981), reportó una vaca Ayrshire con feminización testicular, de 2 ½ años de edad, nacida única, hermana de un ternero macho normal y de otro ternero cuyo sexo no fue recordado. Esta vaca presentó las siguientes características: tracto reproductor en la misma posición de un útero normal; testículos abdominales con epidídimo, en posición ovárica y contiguos a cuernos uterinos; estructura similar al mesovario, de la cual suspendían las gónadas; ligamento ancho; ausencia de cérvix y en la región donde en condiciones normales está, presentó dos estructuras como pequeñas vesículas seminales; vagina cranealmente ciega; vulva ligeramente más pequeña de lo normal; y uretra muscular que abría dentro de una vagina ciega.

En el estudio histológico las gónadas contenían gran número de túbulos seminíferos pequeños rodeados sólo de células de Sertoli, un pequeño número de células de Leydig y tejido conectivo fibroso intratubular. Las vesículas seminales y la cola del epidídimo tenían una estructura irregular. Los niveles de testosterona en el plasma estaban dentro del rango para los toros normales 870 *pg/ml* en la examinación inicial y 1230 */ml* en el momento de la matanza. El cariotipo encontrado fue 60,XY en linfocitos, piel, bazo, gónadas y peritoneo. El comportamiento del animal fue masculino, el cual puede ser atribuido al alto nivel de testosterona circulante (Long, 1981).

SINDROME FREEMARTIN EN EL BOVINO DOMESTICO

ETIMOLOGÍA DEL TERMINO FREEMARTIN

El termino *freemartin* aparece impreso por primera vez en el s. XVII, pero ya había estado en uso común varios años antes. El vocablo *Martin* fue usado en Inglaterra y Escocia y apareció en un documento de 1593, proviene de la palabra gaélica *mart* aplicada a vaca o vaquilla: el 11 de Noviembre, día de San Martín, era costumbre realizar la matanza para que la carne pudiera ser preparada para el invierno. *Free* al parecer es la contracción de *farrow*, usada en Escocia para designar a un animal infecundo, no gestante o que no está en lactación, o tal vez deriva del anglosajón, *fearr* o *fear*, o del alemán *farre* que significa toro. Por lo tanto *farro-mart* designa a una vaca o vaquilla estéril, o a una hembra que parece buey o toro, tal como lo designa el Latín *taura* que significa *hembra-toro* (Marcum, 1974).

ETIOLOGÍA DEL SÍNDROME FREEMARTIN

A pesar de que el examen anatómico de los freemartins se ha realizado desde 1692, no fue sino hasta comienzos del s. XX que la anastomosis vascular entre gemelos, fue revelada como un fenómeno correlacionado de la condición freemartin (Kästli y Hall, 1978).

Presumiblemente el desarrollo del freemartin es atribuido a los efectos que ejercen la sustancia inhibidora Müllariana (MIS) y la testosterona del gemelo macho en la cogemela, debido a la anastomosis vascular placentaria establecida por la fusión de las membranas fetales coriónica y alantoidea de los fetos bovinos entre los días 30 y 40 de gestación (Figura 7), es decir, antes del dimorfismo sexual. En este proceso que conlleva a la gemela a un estado intersexual, el grado de inhibición de las estructuras de Müller (derivados femeninos) y la estimulación de las de Wolff (derivados masculinos), aparentemente depende del momento en el cual esta fusión toma lugar (Long, 1990).

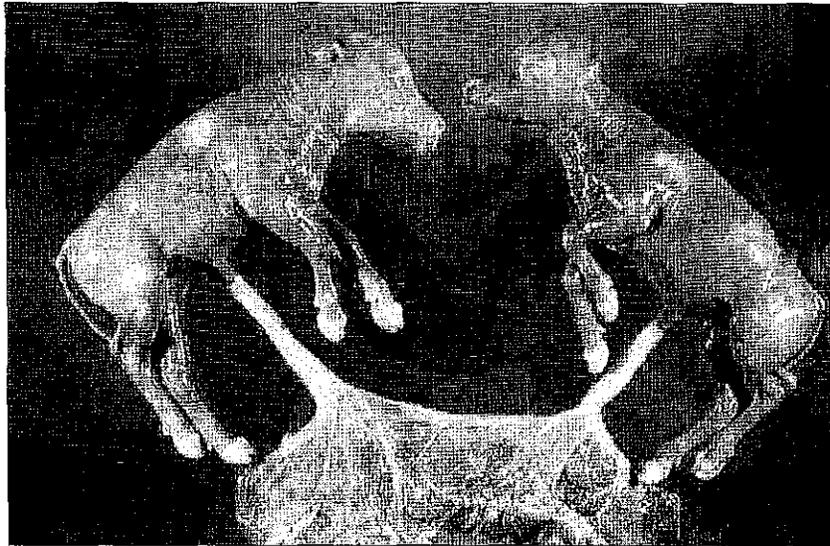


Figura 7. Anastomosis vascular coriónica de fetos bovinos (Tomado de Robert A. Foster, Department of Pathobiology, Ontario Veterinary College, University of Guelph).

Asimismo, ha sido demostrado que la fusión de las membranas fetales también dirige el intercambio de células precursoras sanguíneas, de un feto a otro causando quimerismo en el tejido hematopoyético de los gemelos (Smith *et al.*, 1977).

FRECUENCIA DEL SÍNDROME FREEMARTIN EN EL BOVINO DOMÉSTICO

Hunter (1779), anatomista escocés, señaló que los freemartins fueron reconocidos desde los antiguos tiempos romanos y publicó un breve reporte de tres casos intersexuales en el ganado bovino, siendo el primero en correlacionar el fenómeno de freemartinismo con gemelaridad. El sexo de los animales afectados fue debatido hasta principios del s. XX cuando Lillie (1916), sugirió, con base en el proporción esperada de hembras y de machos en gemelos dicigóticos, que el freemartin es una hembra genética.

Es conocido que el 92% de las terneras nacidas con un becerro macho presentan masculinización del sistema reproductor interno y preferentemente son estériles. La virilización de la ternera la conlleva a un estado de intersexualidad (freemartin) en donde el grado de intersexualidad es muy variable (Gustavsson, 1979; Long, 1990).

La frecuencia de freemartinismo expresada en la proporción en partos gemelares heterosexuales, presenta un rango de 80.% a 97.2%. De un estudio de 532 hembras cogemelas con un macho, 489 (91.9%) fueron freemartins (Cuadro 1).

Cuadro 1. Frecuencia de freemartinismo entre gemelos heterosexuales bovinos

Investigador	Número de animales			Freemartin (%)	Método de Diagnóstico
	Normal	Freemartin	Total		
Keller and Tandler (1916)	6	85	91	93.4	Anatomía fetal
Lillie (1917)	3	21	24	87.5	Anatomía fetal
Lillie (1923)	3	12	15	80	Anatomía fetal
Bissonnette (1924)	1	35	36	97.2	Hallazgos anatómicos
Boenig (1938)	8	131	139	94.2	Gestación
Swett et al. (1940)	2	15	17	88.2	Hallazgos anatómicos
Stone et al. (1952)	8	66	74	89.2	Tipos sanguíneos
Lazear et al. (1953)	3	34	37	91.9	Tipos sanguíneos
Billingham and Lampkin (1957)	2	25	27	92.6	Tolerancia de homoinjerto
Herschler (1964)	3	27	30	90.0	Quimerismo XX/XY
Muramoto et al. (1965)	2	13	15	86.7	Quimerismo XX/XY
Vigier et al. (1972)	1	7	8	87.5	Anatomía fetal y quimerismo XX/XY
Marcum et al (1972)	1	18	19	94.7	Quimerismo XX/XY
Totales	43	489	532		
Promedio				91.9	

Marcu, J. B. (1974).

Parte de la alta incidencia de freemartin encontrada en los establos, se debe al bajo número de hembras de propósito lechero, sacrificadas para el abasto de carne comparado con el número de machos de este mismo propósito. Esto implica que muchas hembras son conservadas para reemplazos del hato lechero. David *et al.* (1976), analizaron la frecuencia de freemartins en dos establos que adquirirían becerras y vaquillas, encontrando las siguientes frecuencias:

- Vaquillas de 2 años, 17 freemartins (28.33%) en un grupo de 60 animales.
- Vaquillas de 1 año, 14 freemartins (21.53%) en un grupo de 65 animales.
- Vaquillas de hasta 6 meses, 5 freemartins (9.61%) en un grupo de 52 individuos.
- Becerras de 1 semana a vaquillas de 1 ½ año, 10 freemartins (17.24%) en un grupo de 58 individuos.
- Becerras de 1 semana a vaquillas de 1 ½ año, 16 freemartins (22.85%) en un grupo de 70 animales.

En aproximadamente el 8% de las concepciones de gemelos heterosexuales, las circulación común no se establece y la hembra es capaz de desarrollarse normalmente (Smith *et al.*, 1977).

Además, probablemente, la comunicación vascular entre los gemelos heterosexuales bovinos, no resulta invariablemente en esterilidad para la hembra, y quizá el ovario de la hembra, en sí mismo inactivo durante la diferenciación gonadal inicial, puede ser sensible al efecto de virilización sólo por un período relativamente corto durante la gestación. Además, es posible que en algunas ocasiones la anastomosis de las membranas fetales ocurra después de la migración de células germinales y probablemente después de un período crítico de diferenciación del ovario fetal (Smith *et al.*, 1977).

El sustento anterior es fundamento de diferentes reportes de vacas fértiles cógemelas con un macho y con quimerismo hematopoyético (XX/XY). Smith (1977), reportó una vaca de 2 años de edad madre de un ternero, cogemela de un toro y quimérica, se le realizaron cultivos a partir de sangre periférica antes y después del parto, los cuales mostraron complementos cromosómicos XX y XY. La distribución de células fue en favor de los complementos XX y la muestra colectada durante la gestación mostró mayor porcentaje de células XX.

FREEMARTINISMO Y CONCEPCIONES MÚLTIPLES HETEROSEXUALES

Aunque los freemartins son generalmente considerados miembros de partos gemelares heterosexuales, también pueden ocurrir en otros partos múltiples si por lo menos un individuo macho está presente (Marcum, 1974). Además, en estos casos las vacas pueden llevar gemelos a término, sin embargo, cuando el número de fetos excede de dos, muchas gestaciones son terminadas por muerte embrionaria temprana y/o aborto (Britt, 1979).

Herschler y Fechheimer (1966), reportaron el análisis de bovinos triates, encontrando la translocación 1/29 en las células de origen masculino de los tres animales. La hembra fue una freemartin con malformación del tracto reproductivo y los dos terneros fueron aparentemente normales.

Potter y Blackshaw (1980), realizaron un estudio de 17 nacimientos múltiples heterosexuales: 6 juegos de gemelos, 1 de triates (2 hembras y 1 macho), y 2 animales machos de diferente parto gemelar. Solamente una de las hembras del parto triple fue fértil y presentó un cariotipo 60,XX. El resto de las hembras presentaron quimerismo hematopoyético 60,XX/60XY y fueron infértiles con malformaciones uterinas y una de ellas carecía del ovario izquierdo. Todos los toros fueron fértiles con quimerismo hematopoyético.

Hasta 1977 se definía a una freemartin como una ternera estéril nacida gemela con un ternero normal. No obstante ya se había sugerido que éstos podrían producirse en nacimientos de hembras únicas, como consecuencia de la muerte fetal precoz y reabsorción del gemelo macho en el útero después del tiempo de la diferenciación sexual y del establecimiento de la anastomosis vascular. Posteriormente los análisis cromosómicos revelaron la presencia de quimerismo hematopoyético en terneros machos nacidos únicos (Smith *et al.*, 1977; Wilkes *et al.*, 1980).

Sysa *et al.* (1980), realizaron un estudio en 15 bovinos (becerras y vaquillas) de 2 a 38 meses de edad con anestro clínico, evidentes anomalías clínicas del sistema reproductivo o con problemas de fertilización, clasificándolas en tres grupos; 1) nacidas de parto único (n = 5); 2) nacidas de parto heterosexual (n = 4); 3) animales de los que se tenía información incompleta (n =

6). El cariotipo 60,XX/60,XY se determinó en 3 animales del 1er grupo, en todos los del 2do grupo, y en 3 del 3er grupo.

Lojda y Poláček (1984), reportaron quimerismo hematopoyético en el bovino doméstico en 8 pares de gemelos heterosexuales, 4 partos de triates (de un total de 5), 3 partos cuádruples y 1 parto de quíntuples.

FRECUENCIA DE GEMELARIDAD EN EL BOVINO DOMÉSTICO

Si bien, el síndrome freemartin no es heredable, la propensión a engendrar gemelos sí lo es. Como lo refieren Kästli y Hall (1978), la incidencia de partos gemelares varía ampliamente entre las razas bovinas; en la raza Simmental se informan tasas de 2.4% a 4.6%, en la Holstein-Friesian del 0.5% al 4.2% y en la Charolais de 2.5% a 3.2%. Muchos de los partos de gemelos son dicigóticos, y entre el 2% a 10% son descritos como monocigóticos (gemelos idénticos). Aparentemente los partos gemelares son menos frecuentes en las razas de ganado de carne que en las de ganado lechero, en una muestra de 22,949 partos en el ganado cebú, hubo únicamente 50 nacimientos de gemelos (0.22%). Los partos múltiples de más de dos individuos ocurren en el ganado bovino, pero son raros (Marcum, 1974).

Existen tres posibilidades respecto al sexo genético de los productos originados de concepciones gemelares: ambos animales pueden ser machos, los dos pueden ser hembras, o se trata de gemelos heterosexuales (Van Haeringen, 1984).

En hembras uníparas el desprendimiento de dos o más óvulos durante el mismo período de celo, siendo fertilizados por espermatozoides del mismo macho origina los gemelos dicigóticos (divitelinos), y la fecundación de un sólo óvulo y su bipartición en etapas tempranas, origina los gemelos monocigóticos también llamados monovitelinos o idénticos (Johansson y Rendle, 1972).

Al parecer si una vaca pare gemelos, la posibilidad de partos gemelares posteriores es de 3 a 4 veces mayor que para el promedio de la población (Johansson y Rendle, 1972).

Johansson y Rendle (1972), trabajando con gemelos bovinos de raza sueca, publicó un cálculo de la frecuencia de monocigosis en esta especie, según el cual el 11.4% de todos los gemelos del mismo sexo, son monocigóticos. El Cuadro 2 muestra la frecuencia de gemelos y el cálculo de la frecuencia de gemelos monocigóticos en algunas razas de ganado bovino lechero.

Cuadro 2. Frecuencia de nacimientos gemelares y de gemelos monocigóticos en algunas razas de ganado bovino lechero

Raza	No. total de nacimientos	% de gemelos nacidos	Pares de gemelos monocigóticos en % de pares de igual sexo
Simmental	12,625	4.61	6.00 ± 7.43
Holstein Freisian (USA)	18,736	3.08	8.60 ± 7.62
Frisona Sueca (SLB)	24,670	3.32	6.81 ± 3.19
Mocha Sueca	53,554	1.85	11.05 ± 3.31
Jersey (Nueva Zelanda)	3,751	1.81	26.78 ± 10.06
Mocho Sueco (SKB)	87,926	1.02	16.60 ± 6.06

Johansson, I. / Rendel, J. (1972).

Los gemelos dicigóticos pueden ser inducidos por selección, superovulación, transferencia de dos embriones y transferencia de un embrión a una vaca preñada (Hainan, 1989).

Así pues, como la heredabilidad de la ovulación múltiple es baja, alrededor del 5%, un incremento en la tasa de partos gemelares puede ser logrado mediante el uso de hormonas inductoras de ovulaciones múltiples, o mediante transferencia de embriones (Hainan, 1989).

Sólo el 12.5% de las vacas que reciben transferencia de dos embriones en un mismo cuerno uterino, paren gemelos, y en estas circunstancias, normalmente no hay migración embrionaria con la consecuente competición por los nutrientes y el posible resultado de pérdida embrionaria. Sin embargo, en la transferencia de un embrión a cada cuerno uterino, ha sido observado un 73% de partos gemelares, esto puede ser aplicado al ganado de propósito de carne, ya que finalmente el ternero irá para el abasto y no importa la alta frecuencia de freemartinismo en concepciones gemelares heterosexuales (Rowson, 1971).

PROPORCIÓN DE CÉLULAS XX/XY EN EL FREEMARTIN Y SU POSIBLE EFECTO EN MASCULINIZACIÓN

Herschler y Fechheimer (1967), examinaron 13 freemartins de diferente edad en las que encontraron un promedio de 58% de células XY, con un rango de 3% al 100%. Encontraron, asimismo, un grado de masculinización del sistema reproductivo correlacionado positivamente ($r=0.70$) con el porcentaje de células XY en el cultivo de sangre periférica. Por el contrario, Marcum *et al.* (1972), en 29 freemartin no hallaron relación alguna entre la proporción de células XY y el grado de masculinización.

Kieffer y Sorensen (1971) y Marcum *et al.* (1972), reportan que el porcentaje de XX/XY no es un indicador del grado de anomalías producidas en freemartins.

Marcum (1972), demostró que cerca del 8% de las freemartins tienen menos de 10% de células XY y de éstas, menos de la mitad tienen una frecuencia menor al 3%.

Greene *et al.* (1977), observaron en becerras freemartins, que la profundidad vaginal, el desarrollo del clítoris y el desarrollo de órganos reproductivos internos no están correlacionados con el porcentaje de cromosomas XY en la edad de 1 a 24 semanas, ya que animales con altos porcentajes de cromosomas XX fueron masculinizados.

Green *et al.* (1977), señalan que la elongación del clítoris de freemartins al nacimiento, es indicativo de secreción androgénica prenatal. La administración de testosterona postnatalmente, pero no la de estroneo o estradiol, causó desarrollo del clítoris, lo cual indica una respuesta del clítoris al andrógeno. Ninguna de las freemartins produjo suficiente testosterona para inducir una detectable masculinización. Las determinaciones de testosterona en el plasma (Green, 1975), revelaron bajos niveles, generalmente en el rango de 40 a 90 pg/ml, concentraciones que no fueron correlacionadas con el porcentaje de células XY, por lo que presumiblemente la principal fuente de andrógeno sea el macho cogemelo.

Lojda y Poláček (1984), analizaron la estabilidad de células XX : XY en seis freemartin por 3 años, observando que en estos individuos las células con cromosomas XX tendían a incrementar, mientras aquellas del sexo opuesto tendían a decrecer en número conforme avanzaba su edad. Asimismo, no encontraron correlación entre la proporción de células masculinas y el grado de masculinización de los genitales de las freemartins.

Greene *et al.* (1977), examinaron 19 terneras de la raza Holstein-Friesian, nacidas de partos dicigóticos heterosexuales, de las cuales una fue juzgada como una hembra normal con complemento cromosómico XX en el 100% de los linfocitos analizados. No obstante una ternera típica freemartin tenía cariotipo con 100% de células con complemento cromosómico XX en 300 células examinadas en tres edades. Las 18 terneras freemartins fueron sometidas a estudio citogenético en las semanas 1^a, 24^a y 52^a de edad para determinar el porcentaje de cromosomas sexuales XY corelacionado con la edad y con el grado de anormalidades de los órganos reproductivos, juzgando por profundidad de la vagina y desarrollo del clítoris a estas edades, y la examinación por palpación rectal a las 54 semanas de edad. El porcentaje de cromosomas sexuales XY en las semanas 1, 24 y 54 tuvo un rango de 0 a 98, 0 a 98 y 0 a 97, respectivamente, en donde los respectivos promedios fueron de 60.7%, 57.9% y 55.5%, estos resultados fueron sometidos a análisis de varianza el cual reveló que no hubo cambios significativos ($p > 0.05$) en el porcentaje de cromosomas sexuales, los coeficientes de correlación para estos porcentajes entre las semanas 1 y 24 y 1 y 52 fueron de 0.97 y 0.93, respectivamente.

Wilkes *et al.* (1980), encontraron una alta correlación entre los porcentajes de quimerismo observado en leucocitos de vaquillas a los 15 meses y 2 años de edad, que indica que la proporción de células XY de leucocitos permanecen relativamente constantes. Asimismo, no parece haber correlación entre el grado de masculinización y el porcentaje de células masculinas encontradas.

PRODUCCIÓN DE ANDRÓGENOS EN EL FREEMARTIN.

Saba *et al.* (1975), realizaron mediciones por radioinmunoensayo, de las concentraciones plasmáticas de androstenodiona y testosterona en seis freemartins, seis vaquillas cíclicas y cuatro vaquillas acíclicas, todas de la raza Holstein-Friesian y de 10 - 12 meses de edad. El promedio de androstenodiona en las freemartins fue de 28 *pg/ml* a los 10 - 12 meses de edad, significativamente más bajo que el promedio de 58 *pg/ml* para las vaquillas acíclicas y 61 *pg/ml* de las vaquillas normales de la misma edad. A la edad de 24 meses la concentración promedio de esta hormona en las freemartins aumentó significativamente a 65 *pg/ml*. Se realizaron de 16 - 18 mediciones de testosterona de cada freemartin, de las cuales muchas fueron inferiores a los 10 *pg/ml* y la máxima registrada fue de 22 *pg/ml* para un individuo.

Los hallazgos para las concentraciones de androstenodiona reportados por Saba *et al.* (1975), son consistentes con los encuentros de Short *et al.* (1969), sin embargo, las concentraciones de testosterona contrastan, ya que Short *et al.*, encontraron un incremento de ésta entre los 11 - 15 meses de edad. Probablemente esta diferencia fue debida a que los freemartins de Short fueron de tipo masculino con tejido testicular y epidídimo, mientras los seis freemartins de Saba *et al.* (1975), presentaban características anatómicas que indicaban un tipo femenino.

Cabe señalar que el efecto androgénico que se presenta en la ternera de parto múltiple heterosexual, no ocurre en otras especies de mamíferos (*v. gr.*, humano, mono, caballo), en donde se ha reportado quimerismo hematopoyético (XX/XY), más no la condición freemartin. Tal es el caso del mono tití en el cual los gemelos dicigóticos se producen invariablemente y ocurre intercambio de células sanguíneas entre ellos, pero el desarrollo del sexo es normal. Probablemente la placenta del tití tiene habilidad para convertir la androstenodiona-4-C₁₄ (hormona masculina) a estrona (hormona inactivada), mientras la placenta bovina no realiza esta conversión (Hafez, 1978).

TRACTO REPRODUCTOR DEL FREEMARTIN

En el freemartin los genitales externos preferentemente son femeninos en apariencia y el grado de afección de los genitales internos es muy variado, es característica la hipoplasia gonadal, represión de los derivados de los conductos de Müller, masculinización de las gónadas y estimulación de los derivados de los conductos de Wolf (6-10). El desarrollo de las características masculinas en los freemartins, cuando se presenta, ocurre después que en un macho normal. Los ovarios y los conductos de Müller son afectados al mismo tiempo, 49 a 52 días de gestación, pero esto no es así para las estructuras de Wolff (Kastli y Hall, 1978; Wilkes *et al.*, 1984).

Los genitales externos de una becerria freemartin casi son normales. La vulva generalmente es más pequeña que la de las vaquillas normales y una borla de pelos puede surgir de la comisura vulvar inferior. El clítoris es largo y puede protuir. Los pezones son rudimentarios. Los genitales internos generalmente son caracterizados por hipoplasia gonadal, represión de los derivados de los conductos de Müller y sobredesarrollo de los derivados del sistema de Wolff. La vagina es más corta que en las vaquillas normales y ciega cranealmente. El cérvix suele estar ausente. El desarrollo del útero puede variar grandemente de ausencia total a una longitud normal de los cuernos uterinos, aunque éstos usualmente están representados sólo por una estrecha banda de tejido. Los vasos deferentes y las vesículas seminales pueden estar presentes (Kastli y Hall, 1978; Long, 1990).

Las gónadas están presentes en el sitio normal de los ovarios. Algunas veces una, principalmente la izquierda, puede descender el canal inguinal (Arthur, 1959), pero carece de las características de ovario y muestra diferenciación hacia testículo, esta transformación varía de un grado pequeño (gónadas pequeñas sin epidídimo y la región del cordón sexual pobremente organizada) a un medio grado en el cual las gónadas son más largas, la región del cordón sexual bien organizada y en las conexiones existen los cordones sexuales, el rete y el epidídimo, en el mayor grado de transformación las gónadas estarán conectadas a los tubos del rete, y éstos a los conductos deferentes. El epidídimo algunas veces es normal (Wilkes *et al.*, 1984).

Los freemartin usualmente tienen una vagina corta y de terminación ciega, el cérvix esta ausente y pueden faltar varias partes del útero. Habitualmente hay dos pequeñas vesículas. Las gónadas son pequeñas y generalmente están situadas en la posición del ovario, sin embargo, algunas veces pueden estar establecidas cerca de la parte interna del anillo inguinal y en estos casos la gónada puede estar formada por tejido testicular hipoplásico con túbulos seminíferos estériles (Harvey, 1976; Long, 1990).

Hare (1976), reportó síndrome de freemartin en un ternero Holstein de aproximadamente 1 año de edad. El individuo presentaba genitales externos parecidos a los de un freemartin pero se

desconocían sus antecedentes. Tras el sacrificio del animal se encontraron testículos cercanos al anillo inguinal externo, epidídimos, conductos deferentes, vesículas seminales y un pene subdesarrollado enroscado subcutáneamente en el peritoneo y terminando en una fosa profunda a nivel del arco isquiático. No se encontró evidencia de conductos de Müller ni de vagina. El estudio histopatológico no reveló signos de espermatogénesis, en tanto que el epidídimo y las vesículas seminales fueron aparentemente normales pero sin espermatozoides formados. Los análisis cromosómicos revelaron células XY en sangre, mientras que en fibroblastos de testículo y vesícula seminal el cariotipo fue 60,XX / 61,XX+c.

Guanti y Minola (1978), describieron, en un estudio citogenético de un grupo de bovinos gemelos heterosexuales, un caso de translocación Robertsoniana 1/29 y quimerismo, con 57% de células 59, XX y 63% de 60,XY en un bovino Pardo Suizo de 7 meses de edad, con una conformación normal masculina, pero un poco más pequeño en tamaño comparado con el promedio de su edad. El animal desde muy joven mostró un comportamiento agresivo y en la examinación postmortem no reveló malformaciones macroscópicas internas.

Wilkes *et al.* (1980), diagnosticaron citogenéticamente freemartinismo en 19 becerras de un total de 46 compradas para crianza, encontrando en el estudio macroscópico, una con órganos genitales femeninos y un ovario funcional conteniendo un cuerpo lúteo, todos los demás casos poseían tracto reproductivo con estructuras masculinas y femeninas con un grado de masculinización considerablemente variado. Citogenéticamente el rango de quimerismo fue muy amplio con 2% a 96% células XY en leucocitos de sangre periférica y de 8% a 96% células XY en médula ósea. De 41 cultivos celulares de diferentes órganos, 8 de éstos mostraron quimerismo cromosómico sexual en un nivel del 2.5% o menos, de los cuales 5 fueron procedentes de bazo, 2 de gónada y 1 de pulmón.

Edwards *et al.* (1994), reportaron atresia uretral con uroperitoneo en un bovino freemartin cogemelo de un macho normal producidos por la cruce Charolais x Brangus. El animal fue donado para la necropsia a los 4 días de edad. Poseía una abertura uretral semejante a un orificio uretral posicionado a 20 cm abajo del ano y posterior a los pezones, además de un pliegue cutáneo parecido a un saco escrotal primitivo abajo de cada canal inguinal. Los testículos no fueron palpables, sin embargo, en el canal inguinal se encontraron éstos de tamaño pequeño (0.6 x 0.5 x 0.3 cm), con cordones seminíferos forrados de células semejantes a las de Sertoli pero carentes de epitelio germinal y con epidídimo. Los epidídimos, ámpulas y vesículas seminales estaban hipoplásicos. El examen cromosómico de linfocitos y fibroblastos de piel reveló: 181 células XX y 19 XY, y 200 células XX y cero XY, respectivamente.

EL MACHO QUIMÉRICO (XX/XY)

El quimerismo XX/XY ha sido reportado en tejido testicular fetal de bovinos machos cogemelos de una hembra (Ohno *et al.*, 1962; Teplitz *et al.*, 1967; Ford y Evans, 1977), pero no ha sido confirmado por otros investigadores (Goodfellow *et al.*, 1965; Dun *et al.*, 1968; Short *et al.*, 1969; Kieffer y Sorensen, 1971; Vigier *et al.*, 1973).

A diferencia de las freemartins, las cuales son estériles y tienen un amplio grado de diferencias de virilización del tracto reproductivo, los toros quiméricos muestran un ancho rango de desempeño reproductivo, pero muy poca variación del tracto reproductivo (Dunn, 1979).

Betancourt *et al.* (1974), en un estudio citogenético de 363 toros usados para inseminación artificial (IA) en tres provincias de Cuba, encontraron una fusión céntrica y un caso de quimerismo sexual. El semental quimérico perteneció a la raza South Devon con un porcentaje de 61.7% XY y 38.3% XX, siendo de parto único. La calidad de semen de este toro fue inferior a la del resto de toros usados en IA de la misma raza y de las mismas condiciones de manejo (motilidad 43.53 ± 16.91 vs. 80.90 ± 13.96 y densidad 58.14 ± 18.47 vs. 83.55 ± 11.53). Asimismo, se comparó el porcentaje de fertilidad de este toro con dos de la misma raza y con un Holstein-Friesian donde se observó un porcentaje de preñez inferior tras la primera IA (25.40%, 36.0%, 54.54%, y 52.60%, respectivamente). Al final del estudio se detectó una hipoplasia bilateral en el toro quimérico, por lo que probablemente la disminución de la fertilidad puede estar en relación con su quimerismo.

Dunn *et al.* (1979), señalan que existe una marcada reducción de la condición reproductiva en muchos toros cogemelos de freemartins, basándose en un estudio que realizaron en 12 toros quiméricos (11 Holstein-Friesian y 1 Ayrshire) nacidos de parto gemelar heterosexual y un toro quimérico Guernsey registrado como nacido de parto único, comparado con 128 controles de la misma edad y raza agrupados en unidades control de 3-22 toros, en un centro de IA, concluyeron que:

- Hay un 58% de oportunidad de que un toro quimérico sea elegido por pobre desempeño reproductiva en los primeros 10 años de su vida, comparado con el 5% para un toro no quimérico.
- No hay asociación entre el porcentaje de células XX recibidas por el toro quimérico, y su condición reproductiva. Un toro con 77% XX fue superior en producción espermática y fertilidad a un toro con 5% de células XX, y la más pobre calidad de semen fue producida por un toro con 13% de células XX y uno con 60% XX, mientras que la fertilidad de toros con proporciones celulares del 24% XX, 77% XX, y 85% XX, fue esencialmente igual.
- Todos los toros tenían grados variables de degeneración testicular como fue mostrado por los túbulos deficientes en células germinales. Los toros con buen desempeño reproductivo tenían

solamente pocas áreas focales y pequeñas de túbulos seminíferos deficientes en células germinales, mientras que los toros con pobre actuación reproductiva tenían áreas focales de degeneración testicular más largas y numerosas.

La eliminación de células XX en testículos de toros quiméricos XX/XY fue descrita por Weiss y Hoffmann (1969). La presencia de este tipo de células fue reportada en quimeras artificiales de ratón, en etapa fetal, por McLaren (1972), quien mencionó que no hay observación de meiosis XX en este tipo de ratones en estado adulto.

Fejér y Kovács (1980), realizaron en diferentes granjas un estudio de la proporción del sexo de terneros hijos de cuatro toros quiméricos XX/XY (3 Holstein-Friesian y 1 Simmental), y de cuatro toros controles, cromosómicamente normales (de las razas y edades respectivas), en el cual de un total de 4,138 partos del grupo de quiméricos, 48.6% fueron hembras (51.4% machos); y en el grupo control de 3,566 partos, 48.7% terneras (51.3% terneros), por lo tanto la desviación encontrada de - 0.1% no fue significativa.

Lojda y Poláček (1984), examinaron la proporción del sexo en la descendencia de tres toros quiméricos utilizados para IA. En uno de estos individuos el estudio citogenético de sangre y médula ósea reveló 23% células con cromosomas XY y 73% con complemento XX, en tanto que la proporción del sexo en 885 descendientes de este individuo fue de 59% hembras : 41% machos. En los descendientes de los otros dos toros quiméricos no se encontraron diferencias en la proporción del sexo. El toro con variación en la proporción del sexo de la descendencia fue responsable para predisposición de un defecto hereditario (cérvix uterino doble) por lo que eventualmente se concluyó que otro mecanismo quizá estaría involucrado en este fenómeno.

Upadhyay y Zamboni (1982), con base en un estudio que realizaron en células germinales ectópicas en el ratón albino suizo, consideraron que la diferenciación potencial de las células germinales de mamífero es predominantemente femenina y es una propiedad autónoma que estas células aparentemente pierden en el tejido testicular.

Rejduch *et al.* (2000), reportaron quimerismo XY/XX en células germinales (espermatogonias) mediante fluorescencia en hibridación *in situ* (FISH) en dos de tres toros de parto gemelar heterosexual, raza Polaca Negra y Blanca de 12-15 meses de edad, debido al intercambio de células germinales en etapa embrionaria. Sin embargo, no encontraron indicadores de que espermatogonias fueran capaces de entrar en el proceso de diferenciación celular. El quimerismo hematopoyético (XY/XX) fue corroborado en los tres animales del estudio.

SINDROME FREEMARTIN EN OTRAS ESPECIES

El síndrome freemartin también ocurre en otras especies como la cabra, la oveja, el cerdo, el venado rojo y el carnero de las rocosas, pero en estas especies la incidencia es mucho más baja que en el bovino, esto refleja indudablemente la baja incidencia de anastomosis vascular placentaria en estas especies, en tanto que el quimerismo XX/XY es común en caballos pero no está asociado con esterilidad. El fenómeno de freemartin también ocurre en pollos gemelos de diferente sexo, de huevos de doble yema, pero en este caso es el macho quien resulta afectado, por lo que llama la atención que tanto en mamíferos como en aves el sexo afectado es el homogamético. El quimerismo hematopoyético también es asociado con concepciones gemelares en monos y raramente en el humano (Basrur y Kanagawa, 1971; Stewart-Scott *et al.*, 1990; Kenny *et al.*, 1992).

Cabra

Los partos múltiples son comunes en las cabras, pero no lo es la anastomosis vascular u ocurre después del período crítico de diferenciación sexual. Los estudios indican que aproximadamente el 6% de los intersexos caprinos pueden ser freemartins (Smith y Dunn, 1981).

BonDurant (1980), reportó una cabra acorne raza la Mancha Americana, de 18 meses de edad, nacida con dos machos, la cual fue examinada por anestro. Presentó una vulva más pequeña comparada con las de sus compañeras de parto. Sus gónadas no pudieron ser palpadas subcutáneamente. En la laparotomía exploratoria la porción tubular y gonadal del tracto reproductivo no pudieron ser vistas. En el estudio citogenético de un total de 30 metafases con 60 cromosomas 12 fueron XX y 18 XY. Probablemente se trató de un caso de freemartinismo, pero lamentablemente no fue posible obtener un cariotipo de tejido no hematopoyético para su corroboración.

Smith y Dunn (1981), reportaron un cabrito intersexo de la raza Nubia de 4 meses de edad, nacido de parto cuádruple. Tenía el pelo cervical erecto típico de macho caprino, además del clítoris elongado. En cada lado de la región inguinal fue palpado un tejido de 1 cm de diámetro abajo de la piel. El estudio histopatológico reveló la presencia de testículos y epidídimo inmaduros, tubos seminíferos con aparentes células de Sertoli, y ausencia de células germinales. Citogenéticamente se analizaron 57 metafases de células sanguíneas (50 células, 60 XY y siete células 60 XX), se realizaron cultivos de fibroblastos de piel y gónada, analizando 50 células de cada tejido, todas fueron 60,XX.

Bongso *et al.* (1982), reportaron una cabra con intersexualidad en un parto cuádruple, asociada a la condición cromosómica XX/XY. El intersexo presentaba cuernos, barba, crin y balido de macho, glándulas mamarias vestigiales, genitales externos de hembra, clítoris peniforme elongado y una

distancia anogenital de 2.5 cm. Exudaba un punzante olor a macho, presentó celo cada 21 días y durante el estro montaba hembras en celo. El estudio anatomopatológico reveló ovotestis en el lado derecho, cuyo tejido testicular esférico (1.0 cm) estaba adjunto a un ovario bien desarrollado (1.5 cm) con un folículo prominente y en el lado izquierdo un testículo esférico (1.0 cm) con remanentes de epidídimo. Presentó segmentos de cuernos uterinos ciegos, cérvix, vagina, vulva y un clítoris de 2 cm con glándulas penéneas en su terminación distal, pero ausencia de oviductos. Histológicamente ambos testículos mostraron túbulos hipoplásicos con células de Sertoli, de Leydig y espermatogonias. El estroma ovárico consistía de grueso tejido conectivo y estaban presentes dos folículos de Graff maduros con pocos folículos primarios y un oocito. El análisis cromosómico reveló poblaciones celulares 60 XX/XY en sangre, médula osea y piel.

Oveja

Dain (1971), estudio 161 partos de gemelos heterosexuales con el propósito de determinar la frecuencia de quimerismo hematopoyético en la oveja. Sólo en dos (1.2%) se encontraron productos quiméricos.

Wilkes *et al.* (1978), reportaron un caso de freemartinismo en una oveja de 16 meses de edad en la raza Dorset con cuernos, el individuo fue producto de una concepción de triates. Poseía genitales externos femeninos con un clítoris elongado, y genitales internos masculinos con testículos inguinales con túbulos seminíferos principalmente inactivos con dos capas de células con aparentes espermatogonias y células de Sertoli. El epidídimo, conductos deferentes y vesículas seminales estaban presentes. No se encontraron restos uterinos pero sí la porción caudal de la vagina. El análisis cromosómico de leucocitos reveló un cariotipo 54,XX/54,XY, mientras el de fibroblastos de gónadas, riñones, piel, pulmón y bazo, fue 54,XX. En el útero, la posición uterina del freemartin fue anterior y en el cuerno derecho junto con un feto macho momificado que ocupaba la parte posterior, en tanto que otro macho que sobrevivió ocupaba el cuerno izquierdo y mostró un cariotipo 54,XY.

Long (1980), en un estudio que comprendió 276 ovejas, divididas en grupos de 25 para ser apareadas por monta natural e investigar la mortalidad embrionaria; encontró 3 ovejas con anestro, en las cuales se observó cierto grado de desarrollo de los conductos de Wolff e inhibición de los conductos de Müller típica de la condición freemartin. Las tres ovejas aparentemente tenían una vulva normal sin clítoris elongado. En el estudio citogenético de células sanguíneas se encontró un cariotipo 54,XX/54XY en cada animal. Se pudo realizar cultivo de fibroblastos de piel de dos animales encontrando un cariotipo 54,XX.

Smith *et al.* (2000), estudiaron en diferentes razas 23 ovejas que presentaban falla reproductiva o algunas características asociadas con freemartinismo. Encontraron 21 ovejas con esta

intersexualidad mediante el análisis citogenético a través del quimerismo hematopoyético (XX/XY). Las dos ovejas restantes fueron identificadas como pseudohermafroditas masculinos 54,XX.

Cerdo

McFeely *et al.* (1967), realizaron análisis cromosómico en cerdos intersexos caracterizados por vulva y vagina pero con tracto reproductivo de macho, revelando una relación de células 90 (XX) : 10 (XY), los testículos fueron localizados en la posición normal. A la necropsia observaron una vagina ciega y una estructura semejante a un clítoris.

Vogt (1982), reportó un cerdo Hampshire intersexo con quimerismo hematopoyético, 45 (94%) células XX y tres (6%) XY, con una estructura semejante a una vulva situada en la posición correspondiente al pene y una vagina estrecha. El cuerpo y cuernos uterinos estaban presentes y aparentemente normales, la gónada derecha evidentemente fue un ovario funcional, e incluso el animal había presentado calor en dos ocasiones, además de observar numerosos cuerpos lúteos y cuerpos albicans, únicamente en este lado tenía un oviducto aparentemente normal. La gónada izquierda era una masa gruesa de tejido, no propiamente un ovario o un testículo.

Villagómez (1984), encontró un complemento cromosómico de $2n= 38,XX/38XY$ (57.14% XX y 42.28% XY), en una cerda importada de Canadá, producto de la cruce Landrace x York, con 7 meses en la granja y 13 meses de edad, la cual no presentaba estros y tenía genitales infantiles.

Thomsen y Poulsen (1993), aislaron DNA de tejido gonadal (ovotestis) de cinco cerdos intersexos para analizar la presencia de los marcadores ZFY y DYZ1 (fragmento específico del macho porcino, asignado a la heterocromatina de Yq). Los animales tenían características externas de hembras normales, excepto por un clítoris elongado; los tractos genitales contenía un útero normal, vagina y estructuras vestibulares de apariencia juvenil. En cuatro casos no se detectaron secuencias específicas del macho, mientras un individuo exhibió por Southern blot una banda con la sonda ZFY del humano y mostró un producto específico del macho con PCR con oligonucleótidos iniciadores DYZ1, indicando un posible estado quimérico XX/XY en tejido gonadal. Desafortunadamente no se pudo obtener el cariotipo de estos individuos.

Caballo

Bouters y Vandeplassche (1972), examinaron la placenta de 51 gestaciones gemelares en yeguas observando anastomosis vascular en el 50% de los casos. El quimerismo cromosómico sexual y el análisis de grupos sanguíneos verificó las observaciones macroscópicas, sin embargo, aparentemente en ninguno de los casos las gónadas ni el tracto genital fueron anormales. Estos investigadores reportaron 5 yeguas quiméricas nacidas cogemelas con un macho, las cuales exhibieron ciclos ovulatorios normales, tres de éstas parieron un potrillo normal. Fue sugerido que

probablemente la anastomosis vascular ocurrió después de un periodo crítico para la inducción de anormalidades sexuales.

Aves

Lutz y Lutz-Ostertag (1959), reportaron 14 casos de freemartinismo en el gallo doméstico (*Gallus gallus*), estos fueron observados de 16 pares de embriones heterosexuales de más de 500 huevos de doble yema. Los conductos de Müller de los embriones hembras tenían regresión parcial y no comunicaban con la cloaca, las gónadas de los embriones machos exhibieron feminización. Owen (1965), también observó quimerismo cromosómico ZZ/ZW en dos machos de pares heterosexuales de embriones de pollo en huevos de doble yema.

Una característica del desarrollo gonadal fetal en mamíferos es que en el testículo es más avanzado que en el ovario en fetos de la misma edad. Por contraste, las hormonas producidas por los ovarios de embriones en las aves juegan un importante papel en el desarrollo del fenotipo femenino y en embriones de pollo de siete o más días de incubación, el crecimiento del ovario excede al del testículo (Mittwoch, 1988; Mittwoch y Burgess, 1991).

Búfalo

Deeb y Omar (1980), mediante un estudio anatomopatológico, reportaron freemartinismo en un feto de búfalo egipcio colectado de la sala de matanza. También colectaron al cogemelo, a una hembra y a un macho de edades similares para su posterior comparación. El freemartin presentó inhibición del desarrollo de los conductos de Müller, consistentes en una vagina relativamente más pequeña, presencia de un útero hipoplásico y ausencia de conductos uterinos. Además, se observó un clítoris un poco prominente. Por otra parte, las gónadas fueron más pequeñas que en el animal control, y presentaron pobre diferenciación de los cordones sexuales.

Ciervo

Stewart *et al.* (1990), analizaron siete hembras y un macho de ciervos rojos (*Cervus elaphus L.*), concebidos después de tratamientos hormonales con progesterona y gonadotropina sérica de yegua preñada (PMSG), de los cuáles dos hembras y un macho cogemelo fueron quiméricos con cariotipo 68,XX/68,XY (no estuvo disponible el otro macho cogemelo). A la examinación física las dos freemartin mostraron una vagina ciega.

Sysa y Kaluzinski (1984), estudiaron citogenéticamente dos hembras de venado corzo (*Capreolus capreolus*), productos de gestaciones múltiples, las cuales mostraron un cariotipo de hembra normal (70,XX). Esta especie de venado tiene una frecuencia de gemelaridad de alrededor del 82%. Para mantener la alta fertilidad de esta especie, ha sido sugerido que ciertos mecanismos biológicos han evolucionado de manera que la anastomosis vascular y el intercambio de células sanguíneas entre fetos es limitado o evitado.

El ciervo rojo en contraste con el ciervo corzo, presenta una frecuencia muy baja de partos gemelares, menor al 1.5%, y tal vez no ha evolucionado un mecanismo que impida el intercambio de células sanguíneas entre fetos del ciervo rojo (Stewart *et al.*, 1990).

Carnero

Kenny *et al.* (1992), reportaron el síndrome de freemartin en dos carneros de las rocosas (*Ovis canadensis*) mantenidos en cautiverio. Un individuo no tenía antecedentes de proceder de parto gemelar, poseía genitales externos femeninos y cuando alcanzó la madurez desarrolló una cornamenta masculina. Durante la estación de apareamiento éste se comportó como un carnero en competencia, daba coces, olfateaba los genitales de otras ovejas y ocasionalmente topaba con otro carnero. En el estudio citogenético reveló un cariotipo 54,XX/54,XY. Los niveles de testosterona fueron de 3.820 ng/ml en el individuo freemartin, mientras 4.830 ng/ml en un carnero normal y 0.057 ng/ml en una hembra control. En el examen histológico de la gónada, realizado a partir de una biopsia, se identificó tejido testicular fibrótico atrófico. El segundo individuo, cogemelo de un cordero, presentó un clitoris elongado y en el 5º mes de edad desarrollo cuernos similares a los de los machos. El análisis cromosómico reveló un cariotipo 54,XX/54,XY. A la palpación se identificaron dos masas oblongas en la región inguinal que tras la muerte de este animal se determinaron como testículos inmaduros y no hubo evidencia de tracto reproductor femenino.

TECNICAS DE DIAGNOSTICO DEL SINDROME FREEMARTIN EN BOVINOS

Las técnicas básicas tradicionalmente empleadas para el diagnóstico del síndrome freemartin han sido: la examinación clínica; la prueba de tolerancia de homoinjerto; la prueba de tipos sanguíneos; y el análisis citogenético. Sin embargo, actualmente la técnica de PCR nos ofrece una herramienta útil para el diagnóstico preciso y oportuno de esta entidad intersexual del bovino (Setiabudi, 1993).

EXAMEN CLÍNICO

En el freemartin hay algunos signos clínicos especialmente concernientes a los órganos genitales, sin embargo, algunas veces la apariencia de los órganos genitales externos de la ternera recién nacida es relativamente normal. Las becerras freemartins a menudo son más pequeñas porque son gemelas, pero robustas por la influencia de la testosterona del macho cogemelo, sin embargo, estas no son características diagnósticas consistentes (Long, 1990).

El diagnóstico puede realizarse por examinación en vaquillas de aproximadamente 1 año de edad, pudiéndose establecer el marcado arresto en el desarrollo de la vagina, cérvix, útero y gónadas. En los animales más jóvenes donde es imposible la examinación rectal, se debe insertar un tubo-prueba lubricado de $\frac{1}{2}$ a $\frac{3}{4}$ pulgada vía vaginal. Kästli (1979), observó que en vaquillas de 3 - 6 semanas de edad la longitud de la vagina en las freemartins era de 7.4 ± 2.5 cm. En terneras normales de la misma edad esta longitud fue de 14 ± 2.8 cm. En una vaca la longitud normal de la vagina es de 30 cm, mientras en una freemartin sólo de 8 - 10 cm y la examinación rectal confirmará la ausencia de cérvix. Algunas veces la freemartin presenta elongación del clitoris y una borla de pelos en la comisura inferior de la vulva, características inconsistentes no muy confiables (Van Haeringen y Van Nieuwenhuizen, 1980; Long, 1990).

PRUEBA DE TOLERANCIA A HOMOIJERTO Y ANÁLISIS DE GRUPOS SANGUÍNEOS

Durante el desarrollo embrionario las células precursoras de las células hematopoyéticas migran a la médula ósea vía sanguínea. Si la anastomosis vascular toma lugar en gemelos, éstos tendrán una mezcla de células sanguíneas, fenómeno conocido como quimerismo hematopoyético. En el caso de partos gemelares heterosexuales en el bovino, este quimerismo permite el diagnóstico del posible freemartinismo de la hembra, ya que ambos terneros presentarán los mismos antígenos de superficie y por lo tanto serán altamente tolerantes al trasplante de piel del cogemelo. Sin embargo, la prueba de tolerancia de homoinjerto es complicada y el macho cogemelo no siempre esta disponible, por lo que una prueba de laboratorio es necesaria (Kraay *et al.*, 1978; Long, 1990).

Dado que en la anastomosis vascular entre gemelos dicigóticos, ambos tendrán dos poblaciones de eritrocitos con diferente juego de antígenos de superficie. Esto puede ser detectado por prueba de hemólisis usando una serie de reactivos de grupos sanguíneos específicos. Una suspensión de células mostrará sólo hemólisis parcial para un reactivo, con el cual cada uno debería normalmente completar hemólisis o no tener reacción para un ternero nacido único. Con anastomosis vascular los determinantes antigénicos de los grupos sanguíneos de las células rojas de ambos terneros están presentes en cada uno de los gemelos. La prueba es una combinación de técnicas de hemólisis y absorción. Sin embargo, los mejores resultados son obtenidos cuando son conocidos los grupos sanguíneos del padre y de la madre y son usados un número máximo de reactivos (Spooner, 1981; Long, 1990).

ANÁLISIS CITOGENÉTICO

Aunque el estudio de tipos sanguíneos había sido usado como diagnóstico de rutina del freemartin, fue reemplazado por el análisis citogenético para la identificación de los cromosomas sexuales, pues en todo caso de intersexualidad y malformaciones de los órganos genitales, debe ser considerando en primera instancia un diagnóstico citogenético (Rieck, 1984).

En el método citogenético para el diagnóstico de freemartinismo se observa la posible condición quimérica (XX/XY) en cualquiera de los gemelos heterosexuales, sin embargo, lo recomendable es muestrear a ambos gemelos ya que el porcentaje de células tiende a ser similar en ambos, es decir, cuando la hembra tiene casi enteramente células XX, el macho estará muy similar en su proporción de células con complemento cromosómico XY. Estadísticamente 90 células XX tienen que ser contadas antes de que uno pueda estar 99% seguro de que no hay células XY presentes en la hembra en un nivel del 5% (Harvey, 1975; Long, 1990).

ANÁLISIS MOLECULAR (PCR)

Recientemente la invención de la técnica de "Reacción en Cadena de la Polimerasa" (PCR) y el uso de secuencias específicas de DNA del cromosoma Y, constituyen un significativo avance en la detección de freemartins, en especial cuando la ternera tiene pocas células con complemento cromosómico XY (White *et al.*, 1989; Setiabudi, 1993).

Setiabudi (1993), mediante la técnica de PCR y el análisis citogenético, diagnóstico el síndrome freemartin en nueve terneras nacidas con un ternero macho, mostrando con la técnica de PCR una banda específica de macho de 307 pb, y en el análisis citogenético entre 26% y 81% de células con

cromosomas XY. Los signos de las terneras no mostraron depender mucho con respecto al porcentaje de células XX/XY.

Olsaker *et al.* (1993), diagnosticaron el síndrome freemartin en tres animales con el método de PCR, utilizando un oligonucleótido iniciador (primer) derivado de la secuencia repetitiva BRY.4a específica del cromosoma Y del bovino, el cual da origen a un producto de 469 pb. Asimismo, estimaron el límite inferior para la detección de células XY, mediante la dilución de sangre de toro en sangre de novilla, previamente a la prueba de PCR, determinando que pueden ser detectados productos específicos del cromosoma Y en muestras que contienen tan poco como 0.1% de células XY si el primer BRY.4a es usado solo.

Ennis *et al.* (1999), diagnosticaron freemartinismo en 20 vaquillas con el método de PCR, utilizando tres pares de primers (BOV97M, BRY.1 y AMX/Y) específicos del cromosoma Y del bovino. Asimismo, estimaron el límite más bajo para la detección de células XY, mediante la dilución de sangre de toro en sangre de novilla, previamente a la prueba de PCR, determinando que pueden ser detectados productos específicos del cromosoma Y en un rango de dilución de 100% a 0.05%, en tanto que entre una dilución de 0.05% a 0.01% las bandas fueron más débiles particularmente con los *loci* AMX/Y y BOV97M.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los factores que alteran los mecanismos de la diferenciación sexual son múltiples y su estudio clínico, anatómico, citogenético y molecular está permitiendo una mejor comprensión de la diferenciación sexual normal y sus anormalidades (Salamanca 1992).

Aunque el principal foco de interés en el estudio de la diferenciación sexual, ha sido la especie humana, muchos aspectos del proceso han sido mejor estudiados en otras especies (Wilson *et al.* 1981). Diferentes investigaciones han tenido como parte central de estudio el fenómeno de freemartin desde 1779 recibiendo la atención de embriólogos, anatomistas, inmunólogos, citogenetistas y últimamente de biólogos moleculares.

JUSTIFICACION

El estudio de la intersexualidad en mamíferos domésticos es importante porque puede contribuir al conocimiento de los mecanismos implicados en la diferenciación sexual (McFeely *et al.* 1967). El presente trabajo pretende estudiar el síndrome freemartin en bovinos, a través del diagnóstico citogenético y molecular, el análisis anatomopatológico del tracto reproductor, y el análisis molecular en tejido gonadal de freemartins con hermafroditismo verdadero o pseudohermafroditismo masculino, para contribuir al posible entendimiento de esta anomalía sexual, ya que su manifestación no es plenamente conocida, además de ser una entidad patológica muy heterogénea entre individuos.

HIPOTESIS

La presencia de células masculinas observadas en casos de freemartinismo, en el bovino doméstico (*Bos taurus*), pudiera no solamente involucrar células sanguíneas (quimerismo hematopoyético) sino también la constitución del tejido gonadal de dichos animales intersexos.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Identificación molecular de células masculinas en tejido gonadal de bovinos citogenética y molecularmente diagnosticados como freemartins que anatomopatológicamente evidencien hermafroditismo verdadero o pseudohermafroditismo masculino.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Utilizar el análisis citogenético como método clínico en el diagnóstico de animales freemartin, a través del quimerismo hematopoyético, utilizando la presencia de los cromosomas sexuales como marcadores.
2. Optimizar la temperatura de la etapa de alineación del ciclo de PCR para oligonucleótidos iniciadores de los genes Zfx y Zfy del bovino doméstico.
3. Utilizar el análisis molecular como método clínico en el diagnóstico de animales freemartin, a través del quimerismo hematopoyético, utilizando oligonucleótidos iniciadores para el cromosoma Y del bovino.
4. Analizar anatomopatológicamente el tracto reproductor de los animales diagnosticados como freemartin, enfatizando en la estructura histológica del tejido gonadal (ovárico y/o testicular) presente.
5. Aplicar el análisis molecular en los individuos freemartin que histológicamente evidencien la presencia de tejido testicular en una o en ambas de sus gónadas, para identificar la posible presencia de quimerismo en células de este tejido, mediante la técnica de PCR.

MATERIAL Y METODOS

Se seleccionaron 22 bovinos (*Bos taurus*) que tenían el antecedente de proceder de partos múltiples heterosexuales (Cuadro 3). Se procedió con la historia clínica de cada individuo y después del examen respectivo, se realizó la toma de muestras sanguíneas por punción en la vena yugular con aguja vacutainer y tubos al vacío de 5 ml con heparina (14 U) o EDTA para el análisis citogenético y molecular, respectivamente.

Cultivo de linfocitos

Los cultivos de linfocitos de sangre periférica fueron realizados en condiciones de esterilidad bajo campana de flujo laminar y acorde a la técnica de Moorhead *et. al.*, (1960), con algunas modificaciones: aproximadamente 0.5 ml de células sanguíneas sedimentadas, fueron agregadas en tubos de cultivo que contenían 8 ml de medio de cultivo RPMI 1640 (Sigma®), 10% a 20% de suero fetal de ternero (Gibco®) o de plasma autólogo, 0.3 ml de fitohemaglutinina (Sigma®) y antibióticos (24.69 UI de penicilina, más 24.69 µg de estreptomina por ml de medio de cultivo). Se incubaron cerca de 72 horas a una temperatura de 37°C a 38°C. Para la cosecha de las células se adicionó colchicina (Sigma®) al medio de cultivo (100 µg/ml) por 30 minutos, posteriormente las células se incubaron por 20 minutos a 37°C - 38°C en una solución hipotónica de 0.075 M de KCl, subsecuentemente se fijaron en solución Carnoy (metanol:ácido acético en proporción 3 a 1), y se extendieron en portaobjetos previamente desengrasados (Crossler y Clarke, 1962; Smith *et al.*, 1976).

Análisis citogenético

Las preparaciones cromosómicas fueron tratadas con tinción de giemsa al 5% en solución amortiguadora de fosfatos. Se obtuvieron impresiones fotográficas tomadas al microscopio de luz bajo objetivo de inmersión. El análisis cromosómico se empleó para el diagnóstico de animales freemartin, a través del quimerismo hematopoyético, utilizando la presencia de los cromosomas sexuales como marcadores. Para la identificación de los cromosomas sexuales se consideraron las recomendaciones de la Primera Conferencia Internacional para la Estandarización de Cariotipos en Animales Domésticos (Ford *et al.*, 1980). Se pretendió analizar un total de 100 metafases para cada caso individual, determinando la proporción del complemento cromosómico sexual de las células.

Extracción de DNA de células sanguíneas

El DNA genómico fue obtenido a partir de muestras de sangre completa de todos los animales estudiados siguiendo protocolos estándares. Cada muestra de sangre (5 ml) se tomó en tubos vacutainer conteniendo EDTA, posteriormente en el laboratorio 100 µl de sangre fueron tratados con 900 µl de buffer A (sacarosa, 0.32 M; Tris HCl, 10 mM; pH 7.6; Mg Cl₂, 5 mM; Triton X - 100, 1%), hasta lograr un botón celular blanco. A continuación se incubó la muestra por una hora a 50°C

en una solución de Proteinasa K (8 mg/ml) en buffer D (KCl, 50mM; Tris HCl, 10 mM; MgCl₂, 2.5mM; NP-40, 0.455 Tween 20, 0.45%). La proteinasa K se inactivó incubando la muestra a 90°C durante 10 minutos (Kawasaki, 1990).

Análisis anatomopatológico

Para el estudio anatomopatológico, después del sacrificio de los animales, se recolectó su tracto reproductivo, los cuales subsecuentemente fueron fotografiados, diseccionados y preservados en solución fijadora de Bouin o formalina al 10% para su posterior estudio histopatológico. Los especímenes fueron procesados bajo técnicas estándar de histología con inclusión en parafina y tinción con hematoxilina y eosina.

En los individuos con presencia de tejido testicular en una o en ambas de sus gónadas (pseudohermafroditismo masculino) se utilizó la técnica de PCR con DNA extraído a partir de tejido incluido en parafina (Wright y Manos, 1990) con el fin de identificar la posible presencia de quimerismo en células de este tejido utilizando primers específicos para el cromosoma Y bovino y el análisis de fragmentos de restricción de longitud polimórfica (RFLP).

Extracción de DNA de tejido incluido en parafina

En los individuos diagnosticados como freemartin que anatomopatológicamente evidenciaron tejido testicular en sus gónadas (pseudohermafroditismo masculino), se obtuvo DNA a partir de tejido testicular montado en bloques de parafina, acorde a la técnica de Wright y Manos (1990): la parafina fue removida a partir de pequeñas secciones del bloque (4 – 5 μ m) y colocados en tubos eppendorf de 1.5 ml, para posteriormente agregar 1 ml de n-octano (Sigma[®]), mezclar durante 30 minutos y centrifugar por 5 minutos a 14,000 rpm para eliminar el n-octano en el sobrenadante.

Posteriormente se adicionó 0.5 ml de etanol absoluto (Aldrich[®]), se mezclaron y subsecuentemente fueron centrifugados a 10 000 rpm durante 20 minutos para descartar el etanol. A continuación las muestras fueron secadas en centrifuga de vacío hasta evaporar el etanol por completo. Después se agregaron dos gotas de acetona a cada tubo dejándolos destapados por 12 horas a 37°C en bloques térmicos para eliminar la acetona mediante evaporación.

Subsecuentemente se agregaron 100 μ l de buffer de digestión conteniendo 20 μ g de proteinasa K y se incubaron a 37 °C por 12 horas. Para la inactivación de la proteinasa K los tubos fueron colocados a 95 °C durante 10 minutos.

Análisis molecular (PCR-RFLP)

- **Amplificación de DNA genómico (PCR)**

De acuerdo a los datos de secuencia de DNA para los genes del Zfx y Zfy (Ashworth, *et al.*, 1989), se seleccionaron dos oligonucleótidos iniciadores (P1-5EZ: 5'-ATA ATC ACA TGG AGA GCA ACA AGC T- 3'. P3-3EZ: 5'-GAG CCT CTT TGG TAT CTG AGA AAG T- 3') para seguir un protocolo estándar (Bredbacka y Peippo, 1992), donde 100ng de DNA fueron amplificados en una reacción de 100 µl, conteniendo 100 pmol de cada iniciador, 200µM de dNTPs, y 2.5 U de enzima Taq polimerasa (Gibco®).

Los ciclos de amplificación se realizaron en un termociclador (Master-Gradient, Eppendorf®, Alemania), con 35 ciclos de desnaturalización a 94°C, 45 segundos; alineamiento a 54°C, 50 segundos y polimerización a 72°C por 60 segundos.

Primeramente 15 µl del producto de reacción de la PCR fueron evaluados por electroforesis en gel de agarosa al 3% (Gibco® ultrapura) teñido con bromuro de etidio en buffer TBE 1x, para determinar el tamaño del segmento amplificado.

- **Análisis de Fragmentos de Restricción de Longitud Polimórfica (RFLP)**

Para el análisis de RFLP's se tomaron 15 µl del producto de reacción de PCR y fueron digeridos por 3 horas con 10 unidades de la enzima de restricción Pst I (Gibco®). Posteriormente fueron analizados en electroforesis en gel de agarosa al 3% (Gibco® ultrapura) teñido con bromuro de etidio en buffer TBE 1x, subsecuentemente las bandas fueron observadas y fotografiadas bajo luz UV en un sistema de documentación de geles (UVP®).

RESULTADOS

El análisis citogenético permitió determinar el número cromosómico e identificar los cromosomas sexuales (Figura 8a-b) en 16 de los 22 animales estudiados. Observándose en seis de los 13 animales definidos como freemartin, en los cuales se analizaron 100 metafases, una variación en el grado de quimerismo cromosómico sexual desde 29% hasta 100% de células con complemento cromosómico 60,XY.

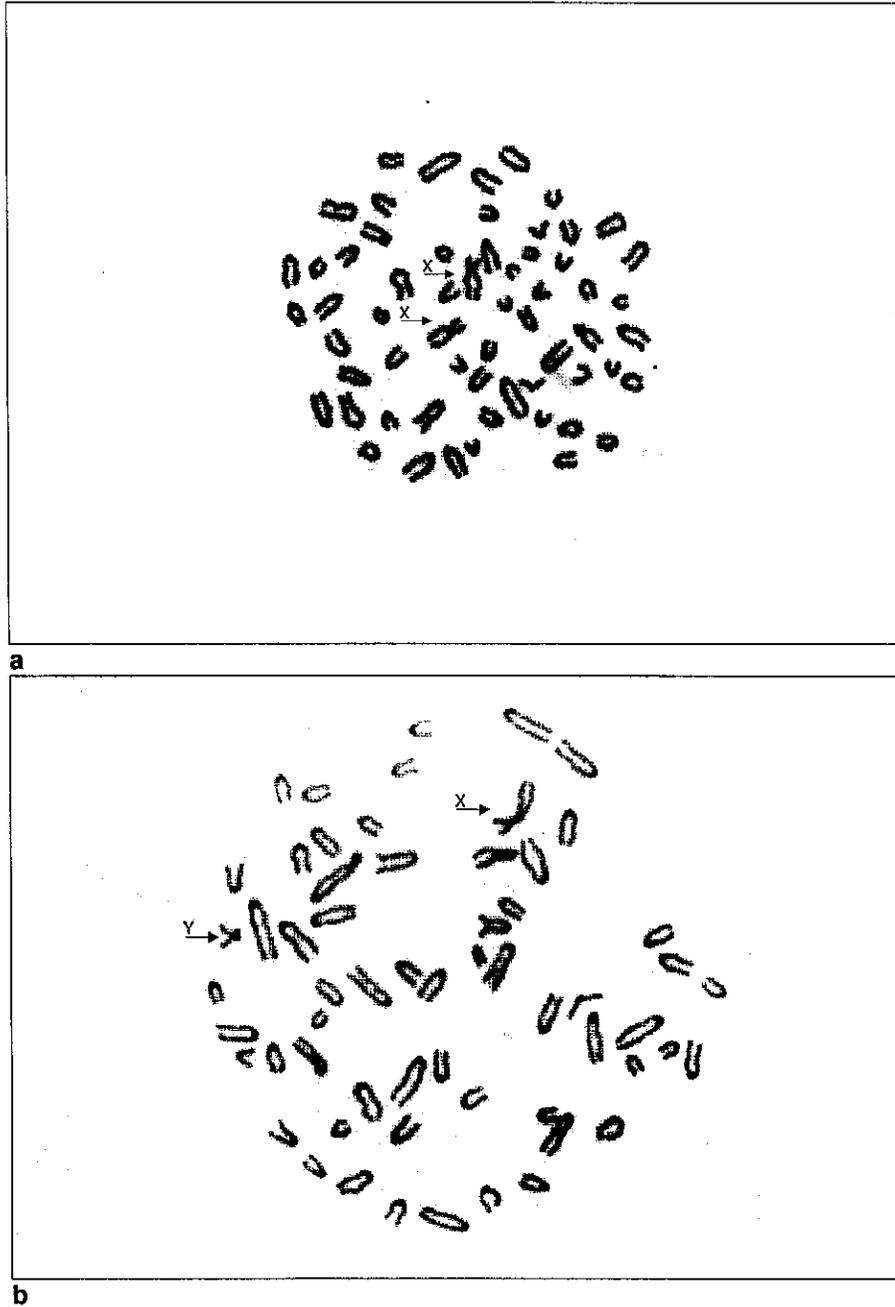


Figura 8a-b. Microfotografía de células en metafase mostrando diferente complemento cromosómico sexual correspondientes a una ternera freemartin. Nótese la presencia de cromosomas XX (figura a) y XY (figura b). Objetivo 100 X.

La temperatura óptima de alineación de los oligonucleótidos iniciadores (primers) pudo ser determinada mediante el "programa PCR gradiente" en un termociclador Mastercycler Gradient (Eppendorf®). En la siguiente imagen (Figura 9) se observan 12 muestras que contienen DNA del mismo animal (bovino macho control) las cuales fueron amplificadas con diferente temperatura (°C) de alineación de acuerdo al programa del equipo. Se observa el amplio margen de temperatura de alineación para los primers P1-5EZ y P3-3EZ (Figura 9, carriles 1 – 8). Con base en estos experimentos se consideraron 54°C como temperatura óptima de alineación para el diagnóstico de los animales del estudio (Figura 9, carril 4).

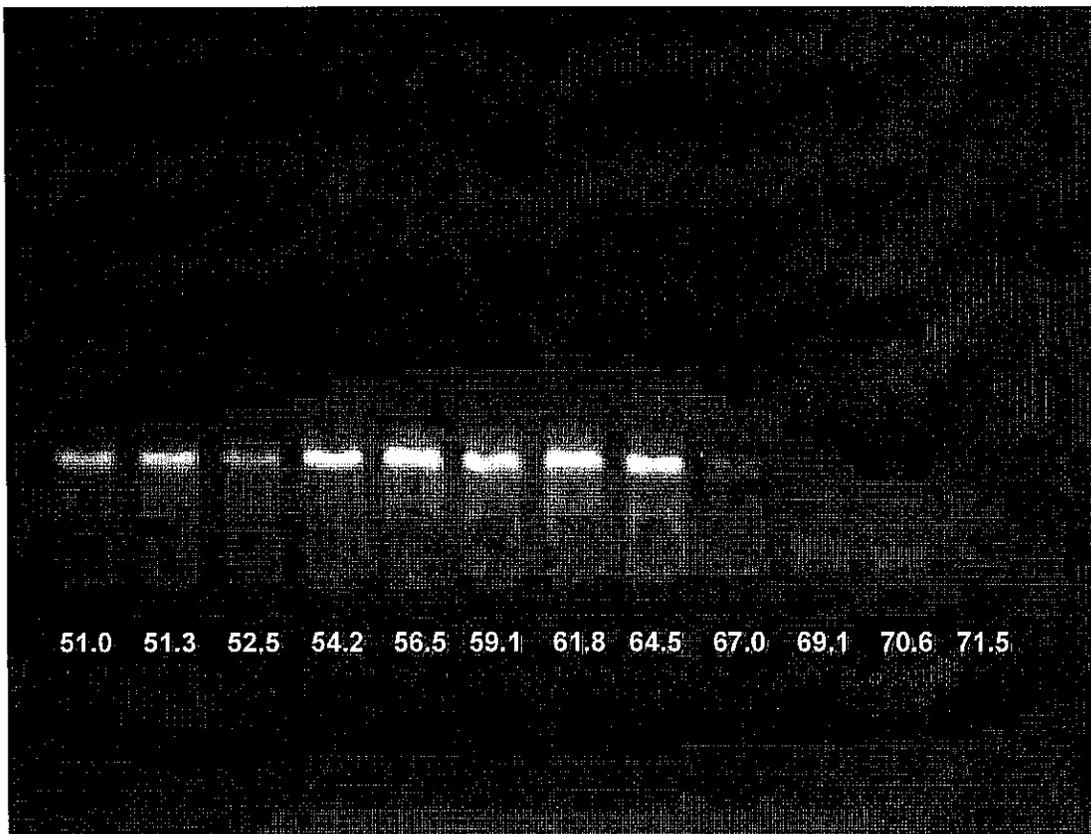


Figura 9. Electroforesis en agarosa de DNA bovino amplificado por PCR para determinar la temperatura óptima de alineación de los primers (P1-5EZ y P3-3EZ), mediante el programa PCR gradiente en termociclador Mastercycler Gradient (Eppendorf®). Carriles 1 – 12, muestras de DNA de acuerdo a las diferentes temperaturas (°C) de alineación del programa.

El análisis molecular (PCR-RFLP) permitió la amplificación de fragmentos de DNA genómico de 447 pares de bases correspondientes a los genes Zfy y Zfx de los 22 animales en estudio, así como de los animales controles. Los fragmentos de restricción de longitud polimórfica (RFLP) produjeron patrones de bandeo específico para bovino macho (447, 344 y 103 pb), para bovino hembra (447 pb) y para bovinos quiméricos (freemartin; 447, 344 y 103 pb) (Figuras 10-13). Excepcionalmente en el animal No. 22 el patrón de corrimiento electroforético reveló únicamente un patrón de bandeo específico para el cromosoma X del bovino (Figura 13, carril 7).

Región amplificada del gen Zfx del Bovino	Región amplificada del gen Zfy del Bovino
<p>aca accacctgga gagccacaag cttaccagca aggcgggagaa ggccattgaa tgcgatgagt gcggaaagca ttctctcat gctggggctt tgttactca taaaatggtg cataaggaaa aaggagctaa caaatgcac aaatgtaaat tctgtgaata cgagacagct gaacaagggt tactgaatcg ccaccttttg gcggtccata gcaagaactt tcctcatata tgcgtggagt gtgtaaagg tttctgcat ccatcagagc tcaaaaagca catcggaatc catactggcg agaagccgta ccagtgccag tactgcgaat taggtcgcg agactctct aacttgaana cgcattgaaa aactaagcat agtaaagaga tgccattcaa ggtgacatt tgtcttciga ctttctcaga taccaaaagag gtcc</p>	<p>atggagagcc acaagcttac cagcaagctcg gagaaggcca tgaatgta tgagtgcgga aagcatttct cccatgctgg ggctttgtc actcacaaaa tggtgcataa ggaaaaagga gccagcaaaa tgcataaatg taaattctgt gagtatgaga cagctgaact agggttatta aatgccacc tttggcagt ccacagcaag aacttcctc alatatgtgt agagtgtgtt aaagttttc gtcaccatc agagctcaa aagcacatgc gaatccatac tgagagaaa cgtaccaat gccagtact cgaatatagg tctgca gact ctctaattt gaagacgcat gtgaaaacta agcatagtaa agaattgtct tcaagtgtg acattgtct tctgacttc tcagatacca aagaagtgc</p>
<p>Simbología: Negritas = Regiones homologas de los oligonucleótidos iniciadores ccgcag = Sitio diferente al del gen Zfy (ctgcag) en sólo una base (c por t), por tanto, no reconocimiento de enzima de restricción <i>Pst</i> I</p>	<p>Simbología: Negritas = Regiones homologas de los oligonucleótidos iniciadores ctgcag = Sitio de reconocimiento de enzima de restricción <i>Pst</i> I ctgca .K.g = Sitio de corte de enzima de restricción <i>Pst</i> I</p>

Figura 10. Regiones amplificadas de los genes Zfy y Zfx del bovino doméstico (*Bos taurus*). Modificado de Sudou, S.; Sai, A. (1999); Kao, C.-H.; Tai, C.; y Shiue, Y.-L. (2001).

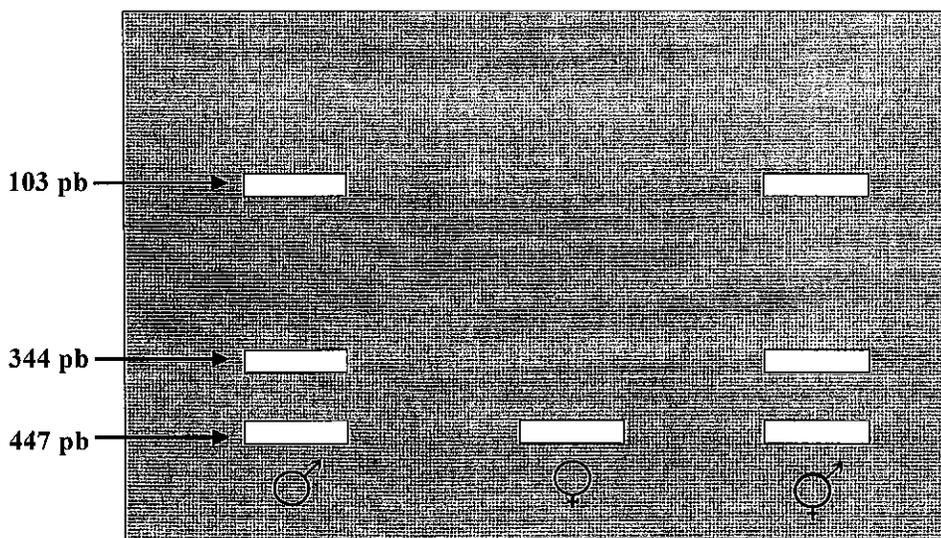


Figura 11. Representación esquemática de electroforesis de DNA bovino con amplificación de un fragmento de los genes Zfy y Zfx por PCR y digerido con la enzima de restricción *Pst* I. carril 1, macho control; carril 2, hembra control; carril 3, animal intersexo (freemartin).

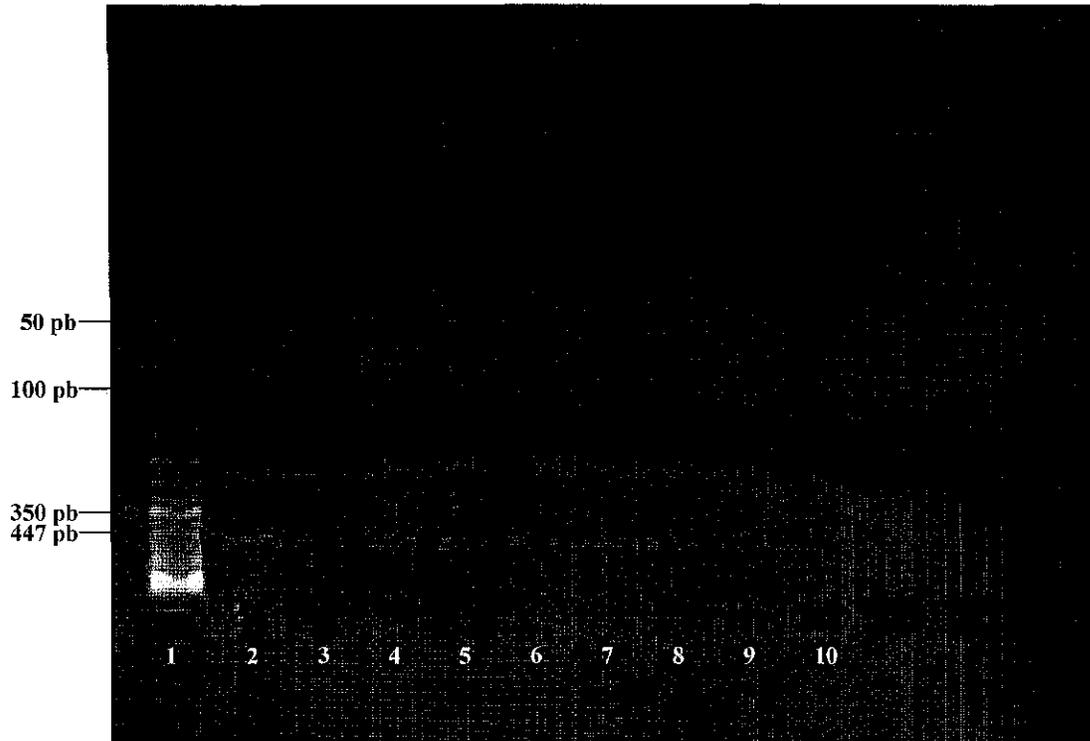


Figura 12. Electroforesis en agarosa de DNA bovino amplificado por PCR y sin digerir (447 pb). Carril 1, marcador molecular (50 pb Life Technologies®), carril 2, macho control; carril 3, hembra control; carril 4, macho quimérico; carriles 5 a 9, hembras freemartins; carril 10, muestra sin DNA.

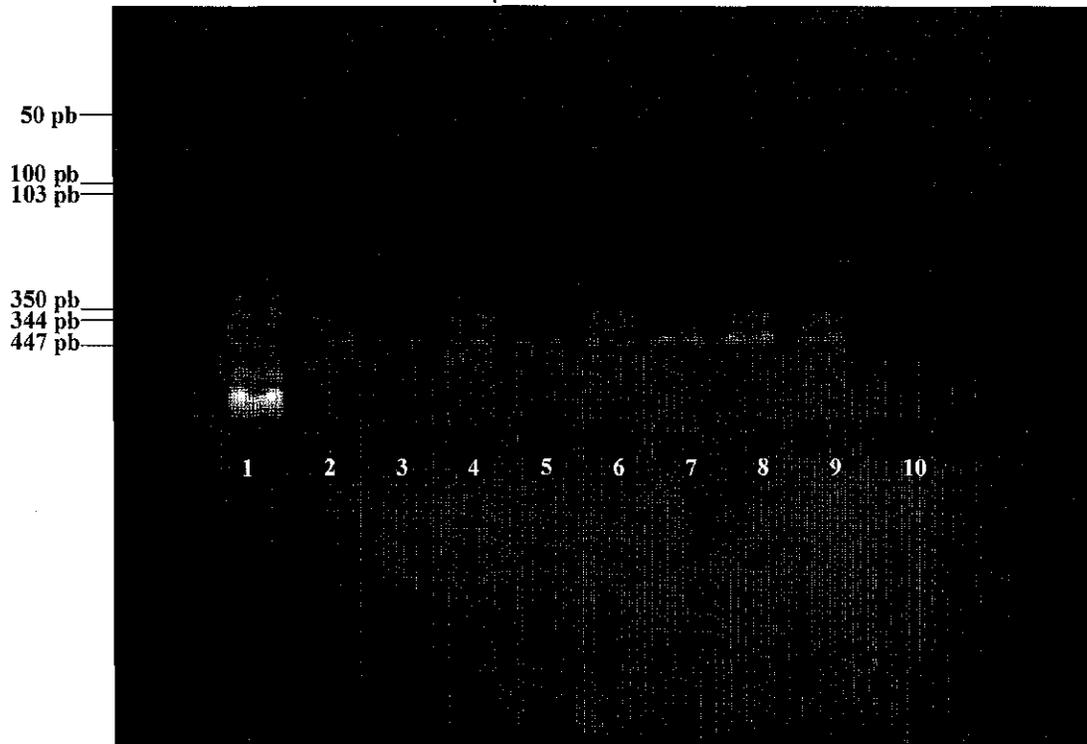


Figura 13. Electroforesis en agarosa de DNA bovino amplificado por PCR y digerido con la enzima de restricción Pst I. Carril 1, marcador molecular (50 pb Life Technologies®), carril 2, macho control; carril 3, hembra control; carril 4, macho quimérico; carriles 5 a 9, hembras freemartins; carril 10, muestra sin DNA. Las bandas de 103 pb correspondientes a uno de los productos de digestión del gen Zfy fueron débiles y no son visibles en la figura pero sí en el gel.

Los primeros cogemelos heterosexuales estudiados (animales No. 1 y No. 2) fueron de la raza Holstein-Friesian, éstos no mostraron anomalías externas aparentes de la diferenciación sexual a la edad de aproximadamente cuatro meses. El análisis citogenético y molecular reveló la presencia de quimerismo hematopoyético. De 100 células analizadas en cada individuo, la ternera, individuo No. 1, mostró 52% de células 60,XX y 48% 60,XY, mientras que en el ternero, animal 2, 23% de las células fueron 60,XX y 77% 60,XY. El análisis molecular practicado a estos gemelos heterosexuales corroboró el quimerismo hematopoyético a través de la amplificación y patrones de restricción para los genes Zfy/Zfx del bovino (Figura 13).

En los animales identificados como No. 3 y No. 4, productos de la cruce Holstein-Friesian x Simmental, de aproximadamente tres meses de edad, se observó un sexo fenotípico masculino aparentemente bien definido en el animal No. 4, mientras que el cogemelo presentó aparentes anomalías de la diferenciación sexual, que consistieron en un prepucio no bien diferenciado con orificio prepucial funcional, localizado en la región de las glándulas mamarias hipoplásicas (Figura 14). Este prepucio contenía una estructura peneana de implantación posterior y ventral al ano. El orificio uretral se localizaba a 43 cm del ano y estaba flanqueado por dos pliegues cutáneos que representaban las bolsas escrotales no bien diferenciadas (Figura 14). A la palpación de estos pliegues se evidenció una aparente criptorquidia. De un total de 100 células analizadas en este intersexo, se encontró un complemento cromosómico 60,XX/60,XY; 7% mostrando un complemento cromosómico 60,XX y 93% 60,XY; en tanto que en su cogemelo, de 45 células analizadas, tres (6.7%) fueron 60,XX y el resto (93.3%) 60,XY (Cuadro 3).

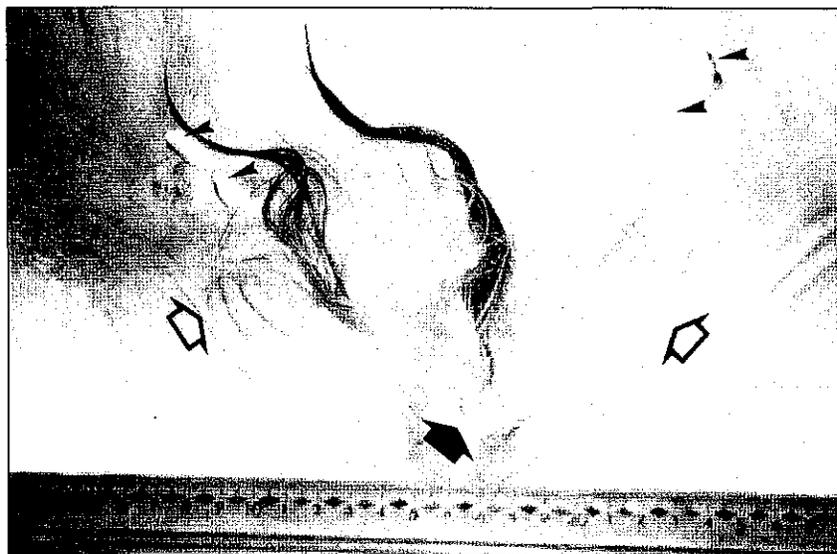


Figura 14. Vista de cúbito dorsal de la región pélvica del freemartin animal No. 3 de aproximadamente 1 año de edad. Orificio prepucial (flecha oscura) flanqueado por dos pliegues cutáneos que representan desarrollo de bolsas escrotales (flechas claras). Los pezones (puntas de flechas) de las glándulas mamarias hipoplásicas son similares a los de un macho normal de esa edad.

Aproximadamente al año y medio de edad, el freemartin animal No. 3 presentó una conformación física y un comportamiento sexual (libido) masculinos (Figura 15) pudiendo incluso utilizarse como celador.



Figura 15. Comparación de la conformación física de dos freemartin de aproximadamente 1½ años de edad. La freemartin No. 3 (izquierda) presentó una conformación física masculina y anatomopatológicamente fue clasificada como pseudohermafrodita masculino, en tanto que el intersexo No. 12 (derecha) presentó una conformación física típica de un freemartin y un tracto reproductor sumamente hipoplásico sin gónadas aparentes.

El estudio anatomopatológico de este freemartin demostró la presencia de dos gónadas intraabdominales con apariencia de testículos hipoplásicos y con un conducto con una semejanza epididimal (Figura 16), así como aparentes conductos deferentes, ampulas del conducto deferente, vesículas seminales, próstata y un pene hipoplásico (Figura 17). Las gónadas pesaron 15 g cada una y en ambas se observó únicamente la presencia de tejido testicular con túbulos seminíferos hipoplásicos carentes de células germinales, algunos de forma irregular y otros obliterados, así como evidentes células de Sertoli y de Leydig (Figura 18). Histológicamente fueron identificados el tejido eréctil y el conducto uretral de un pene subdesarrollado.

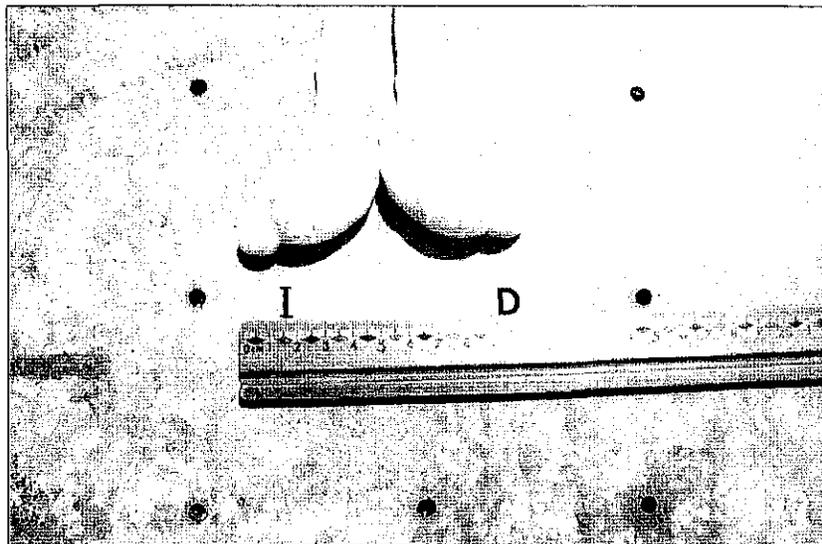


Figura 16. Gónadas hipoplásicas de apariencia testicular del freemartin caso No. 3: D = gónada derecha; I = gónada izquierda. Estas gónadas estaban localizadas en las bolsas escrotales hipoplásicas y pesaron 15 g cada una.

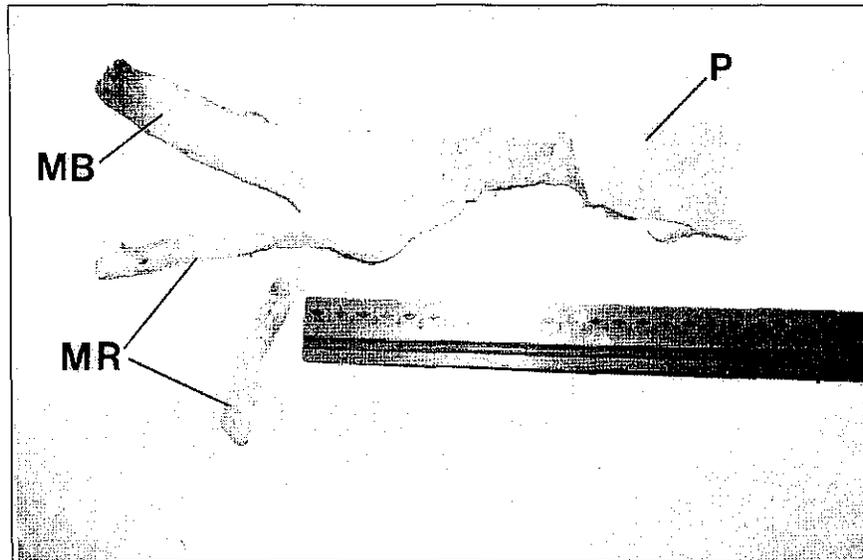


Figura 17. Vista lateral del pene hipoplásico del freemartin animal No. 3: MB = músculo bulboesponjoso; MR = músculos retractores del pene; P = prepucio.



Figura 18. Microfotografía del corte histológico de la gónada derecha del freemartin caso No. 3. Se observa hipoplasia de túbulos seminíferos (flechas), además de células de Sertoli y células de Leydig. El = espacio intersticial; TA = túnica albugínea.
H & E. X 100

El análisis molecular (PCR-RFLP) demostró la presencia de quimerismo hematopoyético en esta pareja de gemelos heterosexuales. Asimismo, al análisis molecular realizado en el tejido gonadal del animal No. 3 que evidenció pseudohermafroditismo masculino, demostró la presencia de quimerismo en células de este tejido (Figura 19).

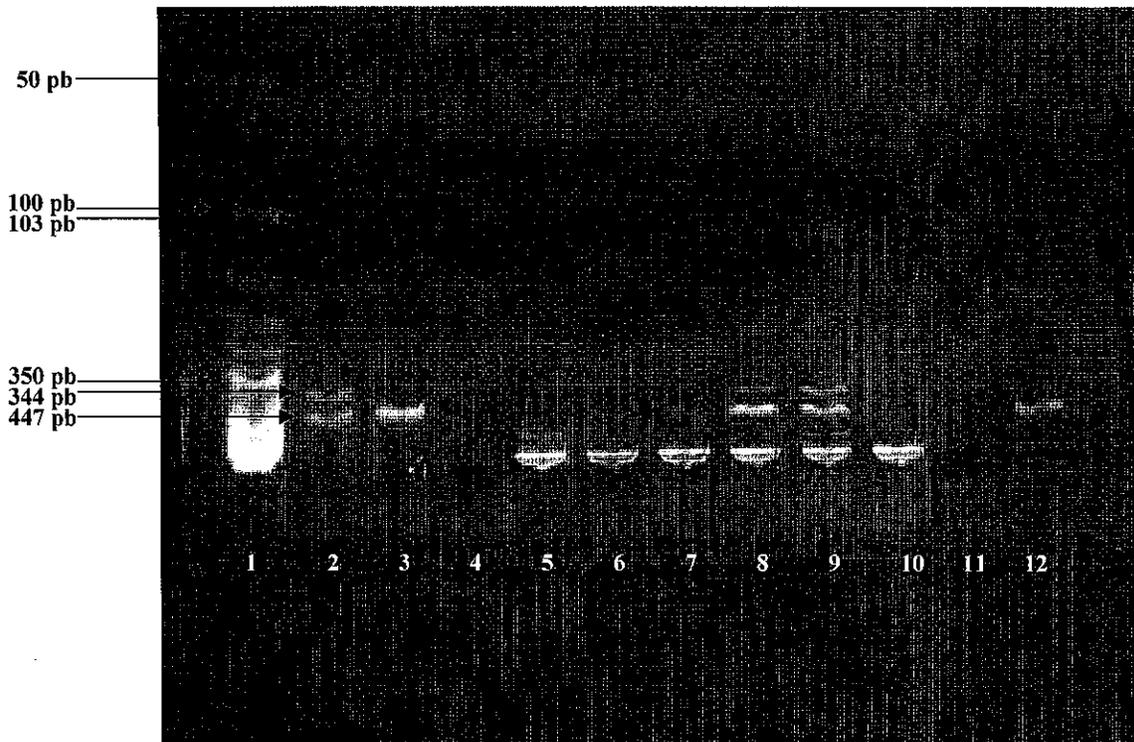


Figura 19. Electroforesis en agar de DNA de tejido gonadal de bovino amplificado por PCR y digerido con Pst I. Carril 1, marcador molecular (50 pb Life Technologies®), carril 2, macho control; carril 3, hembra control; carriles 4 - 10 y 12, tejido gonadal de freemartin; carril 11, muestra sin DNA. Las bandas de 103 pb correspondientes a uno de los productos de digestión del gen Zfy fueron débiles y no son visibles en la figura pero sí en el gel.

Otros dos cogemelos (animales No. 5 y No. 6) de raza Holstein-Friesian, no presentaron anomalías sexuales externas congénitas aparentes. El análisis citogenético y molecular que se practicó aproximadamente a los 15 días de edad de los terneros, demostró, en la ternera 5, la presencia de quimerismo hematopoyético con dos líneas celulares; de las 44 metafases observadas, 21 (47.72%) mostraron un complemento cromosómico 60,XX y 23 (52.27%) fueron 60,XY. De la muestra del cogemelo, animal 6, sólo se pudieron analizar tres metafases siendo su complemento cromosómico 60,XY. No fue posible realizar el estudio anatomopatológico de estos terneros debido a que el propietario del hato los vendió prontamente. El estudio molecular (PCR-RFLP) también permitió evidenciar quimerismo hematopoyético para estos gemelos, así como diagnosticar la condición freemartin para el gemelo No. 5.

Se estudiaron dos animales de aproximadamente dos años de edad (No. 7 y No. 8), productos de un parto de triates en la raza Pardo Suizo Americano. De acuerdo con el veterinario asesor del establo, el tercer animal era un macho que en el momento del estudio ya había sido sacrificado. El animal No. 8 a la palpación transrectal presentó un tracto reproductor femenino y de acuerdo con su récord había presentado celos regulares, en los cuales recibió servicio por monta natural o inseminación artificial (IA), sin lograr procrear. En el estudio citogenético se observó un complemento cromosómico 60,XX en 100 metafases analizadas. Después del sacrificio, la vaquilla

mostró un tracto reproductor con conductos aparentemente normales, gónadas a primera vista funcionales con folículos en desarrollo y un cuerpo lúteo en la gónada derecha (Figura 20). En los cortes histológicos de la gónada derecha se observaron escasos folículos primordiales y folículos primarios (Figura 21), además de un cuerpo lúteo, un cuerpo albo y quistes foliculares. En la gónada izquierda se contemplaron folículos primordiales, folículos primarios (Figura 22), células de la granulosa y células tecales (Figura 23), además de un cuerpo albo y un otro lúteo (Figura 24).

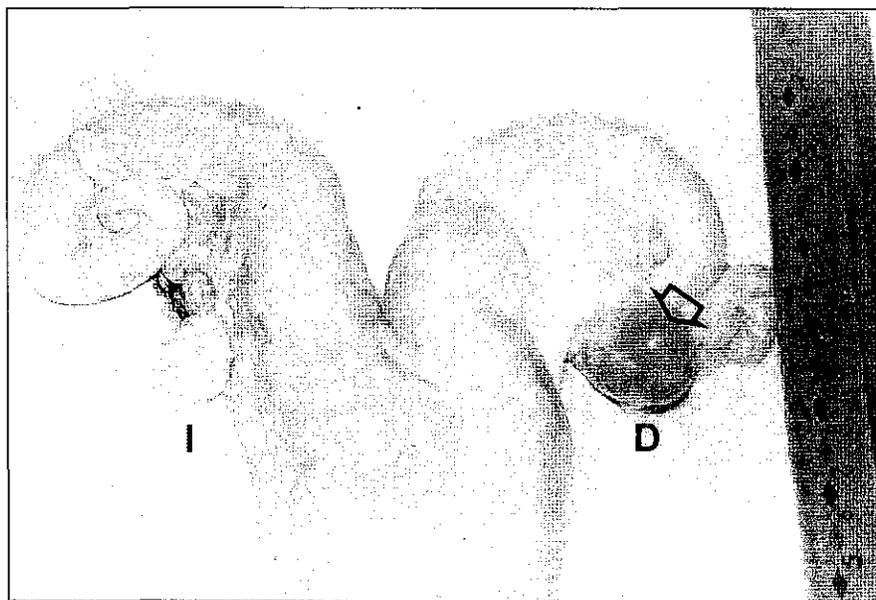


Figura 20. Disección del tracto reproductor de la vaquilla caso No. 8. D = ovario derecho; I = Ovario izquierdo. Nótese el folículo de Graaf en la gónada derecha (flecha).

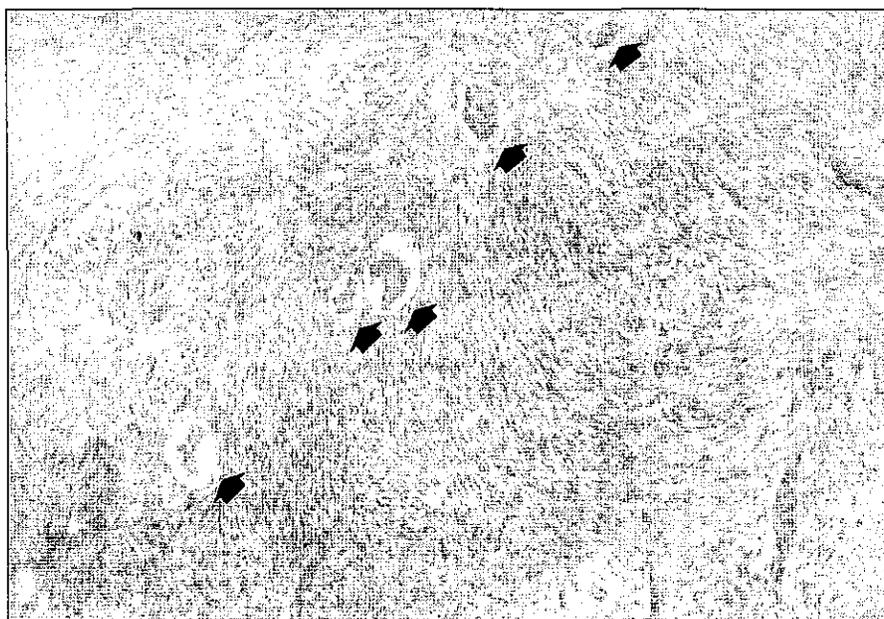


Figura 21. Microfotografía del corte histológico del ovario derecho de la vaquilla caso No. 8. Se observan folículos primordiales sin evidencia de óvulo en su interior (flechas). H & E. X 40.

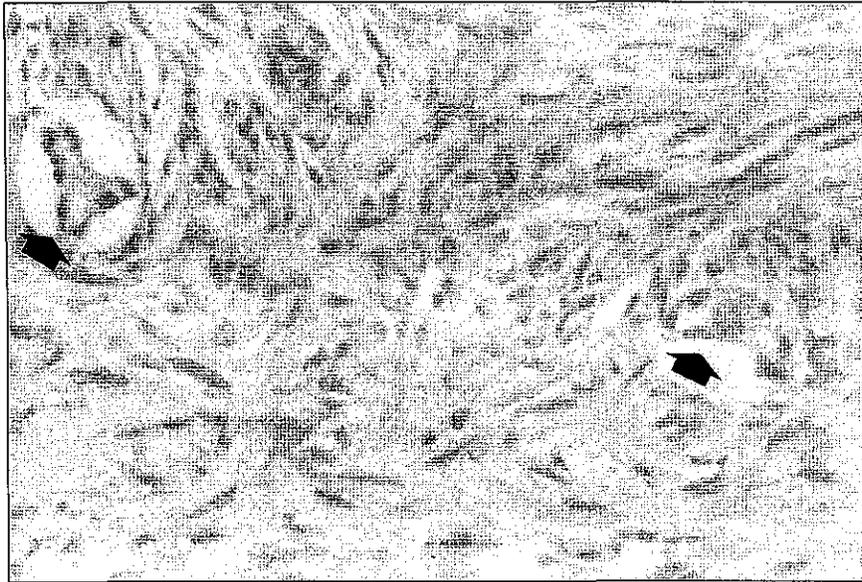


Figura 22. Microfotografía del corte histológico del ovario izquierdo de la vaquilla caso No. 8. Se observan folículos primarios (flechas). H & E. X 400.

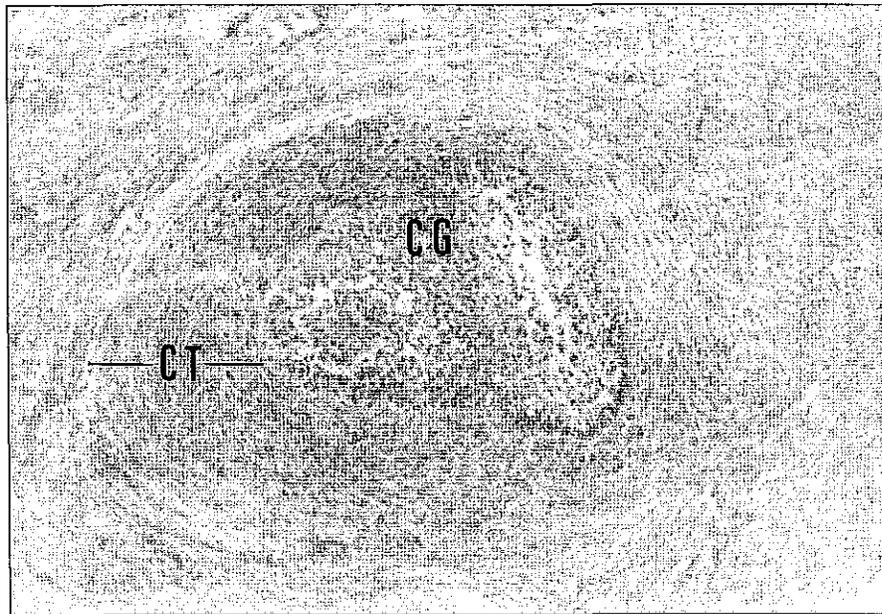


Figura 23. Microfotografía del corte histológico del ovario izquierdo de la vaquilla caso No. 8. Se observa un folículo en desarrollo. CG = células de la granulosa; CT = células tecales. H & E. X 40.

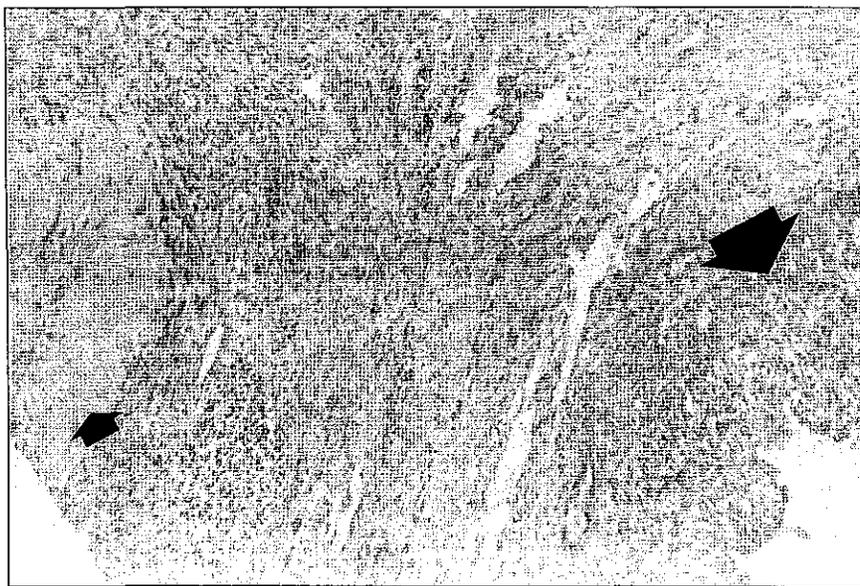


Figura 24. Microfotografía del corte histológico del ovario izquierdo de la vaquilla caso No. 8. Se observa parte del área correspondiente a un cuerpo lúteo (flecha grande) y a un cuerpo albo (flecha pequeña). H & E. X 40.

El animal No. 7 representó a un intersexo con apariencia externa típica de un freemartin; mostraba una vulva con un clítoris hipertrófico y una borla de pelos en la comisura vulvar inferior. Sin embargo, reveló un cariotipo 60,XY en 100 células observadas. El tracto reproductor de este individuo no pudo obtenerse completo en la sala de matanza, pero sí sus gónadas, en las cuales macroscópicamente se contempló un aspecto testicular con un aparente epidídimo, se observaron pesos de 6.7 g para la gónada derecha y de 5.0 g para la izquierda. En secciones histológicas la gónada derecha presentó túbulos seminíferos hipoplásicos carentes de células germinales y algunos con calcificación distrófica intraluminal. Sin embargo, en la gónada izquierda se evidenciaron algunos túbulos seminíferos bien delineados, células germinales con apariencia de espermatogonias y túbulos seminíferos obliterados. Los estudios histológicos de ambos epidídimos demostraron ausencia de células germinales, lo que aparentemente demuestra el arresto de maduración de células germinales en la gónada izquierda. Además fueron identificadas células somáticas masculinas en ambas gónadas.

El animal No. 9 constituyó una vaquilla Holstein-Friesian, nacida de parto gemelar con un macho, aunque este último no estuvo disponible para el estudio. De acuerdo con el médico veterinario encargado del hato, la vaquilla nunca presentó celos; además, a la palpación transrectal presentaba una vagina cranealmente ciega y ausencia de cérvix. El estudio citogenético y molecular corroboró el diagnóstico clínico de síndrome freemartin mediante la presencia de un cariotipo 60,XX/60XY y RFLP propios de un freemartin. De 44 metafases observadas 6 (13.63%) fueron XX y 38 (86.36%) XY.

El animal No. 10, una vaca adulta raza Holstein-Friesian, nació de parto dicigótico con un macho que no estuvo disponible para el estudio. Esta vaca tenía siete años de edad en el momento del estudio. De acuerdo con el propietario del hato y con el registro reproductivo del animal, esta vaca había parido tres terneros machos, dos mediante monta natural y uno por inseminación artificial (IA), su último parto se registró a la edad de 5 años. Además esta vaca había tenido una buena producción láctea. En el estudio citogenético se encontró un complemento cromosómico 60,XX/60,XY. De 100 células analizadas, 99% mostraron un complemento cromosómico 60,XX y 1% mostró complemento aparentemente 60,XY (Figura 25). Sin embargo, el análisis molecular mostró RFLP inherentes a un bovino hembra.

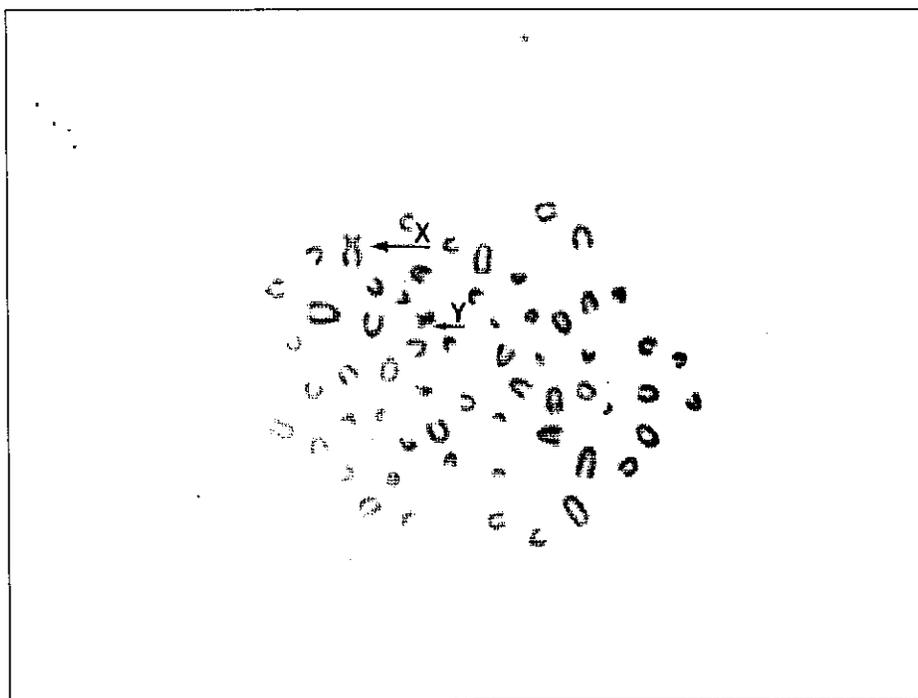


Figura 25. Microfotografía de células en metafase mostrando complemento cromosómico sexual 60,XY, correspondiente al animal No. 10. Objetivo 100 X.

El animal No. 11 fue una vaquilla de la raza Holstein Freisan, nacida de parto dicigótico con un macho, el cual murió momentos después del nacimiento. En el momento del estudio la vaquilla tenía 2 años de edad y mostraba una apariencia externa típica de algunos freemartin, esto es, una vulva con un clítoris hipertrófico y una borla de pelos. De acuerdo con el médico veterinario encargado del hato, ésta nunca presentó celos. Tras el sacrificio del animal se observó un tracto reproductor hipoplásico al igual que sus dos pequeñas gónadas de apariencia ovárica. En el estudio citogenético se encontró un complemento cromosómico 60,XX/60,XY. De 10 células analizadas, se observaron complementos 60,XX y 60,XY en siete y tres metafases, respectivamente. Molecularmente se corroboró el estado intersexual a través de RFLP propios de la condición freemartin.

El animal No. 12 fue una vaquilla de la raza Holstein Freisan, nacida de parto dicigótico heterosexual, cuyo ternero murió el día de su nacimiento. En el momento del estudio la vaquilla tenía 1 ½ años de edad y no había presentado celos, según el médico veterinario responsable del hato y los registros del mismo. Este individuo también mostró una apariencia externa típica de algunos freemartin, es decir, labios vulvares con un clítoris hipertrófico y una borla de pelos. En el momento del sacrificio del animal se observó un tracto reproductor marcadamente hipoplásico sin gónadas aparentes. En el estudio citogenético se encontró un complemento cromosómico 60,XX/60,XY. De 10 células analizadas, se observaron complementos 60,XX y 60,XY en seis y cuatro metafases, respectivamente. El análisis molecular corroboró que se trataba de un caso de síndrome freemartin.

Los animales No. 13 y No. 14 fueron dos terneros de la raza Holstein Freisan, nacidos de parto dicigótico heterosexual, que no presentaron anomalías sexuales externas congénitas aparentes. El análisis citogenético que se practicó aproximadamente a los 10 días de edad, mostró, en la ternera individuo No. 13, la presencia de quimerismo hematopoyético con dos líneas celulares; de las 100 metafases observadas 37% mostraron un complemento cromosómico 60,XX y 63% fueron 60,XY. En el cogemelo, individuo No. 14, de 100 metafases observadas 56% fueron XX y 44% XY. El estudio molecular demostró el fenómeno de quimerismo hematopoyético en ambos gemelos.

El animal No. 15 fue una ternera de la raza Holstein Freisan, nacida de parto gemelar heterosexual, cuyo ternero murió el día del parto. En el momento del estudio la ternera tenía 8 días. Este animal mostró una apariencia externa típica de una ternera normal de su edad. En el análisis citogenético se encontró un complemento cromosómico 60,XX/60,XY. De 100 células analizadas, se observaron complementos 60,XX y 60,XY en 71 y 29 metafases, respectivamente. El análisis molecular corroboró el estado intersexual a través de RFLP inherentes a la condición freemartin del bovino.

Los animales identificados como No. 16 y No. 17, fueron productos de parto dicigótico heterosexual de la cruce Holstein-Friesian x Pardo Suizo Americano, el estudio se realizó el día del nacimiento tomando la muestra sanguínea del macho vivo y del cadáver de la hembra que murió en el momento del parto. De un total de 100 células analizadas en el ternero, se encontró un complemento cromosómico 60,XX/60,XY; 14% mostraron un complemento cromosómico 60,XX y 86% 60,XY; en tanto que el análisis molecular (PCR-RFLP) practicado a la ternera demostró la presencia fragmentos tanto del cromosoma Y como del X, propios de un intersexo freemartin.

Los bovinos No. 18 y No. 19, fueron dos terneros producto de parto dicigótico heterosexual de la cruce Holstein-Friesian x Pardo Suizo Americano, los cuales no mostraron anomalías externas

aparentes de la diferenciación sexual en el momento del estudio el cual se realizó el primer día del nacimiento de los terneros. El análisis molecular (PCR-RFLP) practicado a los terneros demostró la presencia fragmentos tanto del cromosoma Y como del X en ambos individuos (quimerismo hematopoyético), propios de una anastomosis placentaria que generalmente conlleva a un estado de intersexualidad (freemartin) a la ternera concebida en una gestación múltiple heterosexual.

Los animales identificados como No. 20 y No. 21, fueron dos terneros producto de parto gemelar heterosexual de la raza Pardo Suizo Americano, los cuales no mostraron anomalías externas aparentes de la diferenciación sexual en el momento del estudio el cual fue realizado a los 8 días de edad de los terneros. El análisis molecular (PCR-RFLP) practicado a estos gemelos permitió inferir la condición de freemartin para la ternera a través de la identificación de la presencia de fragmentos de los cromosomas sexuales (X/Y) en ambos individuos (quimerismo hematopoyético).

El animal No. 22 constituyó una vaquilla de dos años de edad de la raza Pardo Suizo Americano, nacida de parto dicigótico heterosexual con un macho, el cual no estuvo disponible para el estudio. De acuerdo con el médico veterinario encargado del hato, la vaquilla nunca presentó celos; En el momento del estudio la vaquilla mostró una apariencia externa típica de algunos freemartin, es decir, una vulva con un clítoris hipertrófico y una borla de pelos en la comisura inferior. En el análisis molecular (PCR-RFLP) no fue posible identificar secuencias específicas del cromosoma Y, es decir, el patrón del corrimiento electroforético mostró únicamente bandas específicas para el cromosoma X del bovino (Figura 13, carril 7).

Cuadro 3. Diagnóstico, constitución cromosómica y proporción de líneas celulares (XX : XY) en los animales de parto múltiple heterosexual estudiados.

No. de parto	Tipo de parto	Raza	No. de animal	Sexo fenotípico*	Cariotipo	Células XX : XY	Método de Diagnóstico	Diagnóstico
I	Gemelar	Holstein-Friesian	1	Hembra	60,XX/60XY	XX= 52 : XY= 48 (n= 100)	Citogenético y Molecular	Freemartin
			2	Macho	60,XX/60XY	XX= 23 : XY= 77 (n= 100)		
II	Gemelar	Holstein-Friesian/ Simmental	3	Intersexo	60,XX/60XY	XX= 7 : XY= 93 (n= 100)	Citogenético y Molecular	Freemartin
			4	Macho	60,XX/60XY	XX= 3 : XY= 42 (n= 45)		
III	Gemelar	Holstein-Friesian	5	Hembra	60,XX/60XY	XX= 21 : XY= 23 (n= 44)	Citogenético y Molecular	Freemartin
			6	Macho	60,XX/60XY	XY= 3 (n= 3)		
IV	Triple	Pardo Suizo Americano	7	Intersexo	60,XY	XY= 100 (n= 100)	Clínico, Citogenético y Molecular	Freemartin
			8	Hembra	60,XX	XX= 100 (n= 100)		
V	Gemelar	Holstein-Friesian	9	Intersexo	60,XX/60XY	XX= 6 : XY= 38 (n= 44)	Citogenético y Molecular	Freemartin
VI	Gemelar	Holstein-Friesian	10	Hembra	60,XX/60XY	XX= 99 : XY= 1 (n= 100)	Citogenético	Quimerismo Hematopoyético
VII	Gemelar	Holstein-Friesian	11	Intersexo	60,XX/60XY	XX= 7 : XY= 3 (n= 10)	Citogenético y Molecular	Freemartin
VIII	Gemelar	Holstein-Friesian	12	Intersexo	60,XX/60XY	XX= 6 : XY= 4 (n= 10)	Citogenético y Molecular	Freemartin
IX	Gemelar	Holstein-Friesian	13	Hembra	60,XX/60XY	XX= 37 : XY= 63 (n= 100)	Citogenético y Molecular	Freemartin
			14	Macho	60,XX/60XY	XX= 56 : XY= 44 (n= 100)		
X	Gemelar	Holstein-Friesian	15	Hembra	60,XX/60XY	XX= 71 : XY= 29 (n= 100)	Citogenético y Molecular	Freemartin
XI	Gemelar	Holstein-Friesian/ Pardo Suizo Americano	16	Hembra			**Citogenético y Molecular	Freemartin
			17	Macho	60,XX/60XY	XX= 14 : XY= 86 (n= 100)	Molecular	
XII	Gemelar	Holstein-Friesian/ Pardo Suizo Americano	18	Hembra			Molecular	Freemartin
			19	Macho				
XIII	Gemelar	Pardo Suizo Americano	20	Hembra			Molecular	Freemartin
			21	Macho				
XIV	Gemelar	Pardo Suizo Americano	22	Hembra			Clínico y Molecular	Freemartin

* El sexo fenotípico de los individuos se refiere a las características anatómicas de los órganos reproductores externos al momento del estudio.

** Diagnóstico inferido del análisis citogenético practicado al macho cogemelo.

DISCUSION

El síndrome freemartin es la entidad intersexual más frecuente en el ganado bovino doméstico, estimándose en 92% en los partos gemelares heterosexuales, sin embargo, pueden presentarse en partos múltiples de dos o más productos, si por lo menos un individuo macho está presente (Marcum, 1974). Tal como en el parto de triates estudiado en este trabajo (Cuadro 3).

La variación en el grado de masculinización en el freemartinismo es particularmente importante en relación al diagnóstico, pues una proporción de freemartins puede poseer un tracto reproductivo muy similar a aquellos de las vaquillas normales y, en éstos, la exploración clínica no sería un método preciso de detección.

Dado el alto porcentaje de freemartinismo en las concepciones múltiples heterosexuales, y que además un freemartin usualmente es estéril y no tiene valor como productor lechero, en el ganado de aptitud lechera se requiere un diagnóstico preciso que rebase los problemas de las metodologías clásicas como el impreciso diagnóstico clínico y las limitantes del estudio de tipos sanguíneos. La técnica de PCR-RFLP nos ofrece, además de precisión, un diagnóstico oportuno (6 h) comparado con el análisis citogenético (72 h). Sin embargo, ocasionalmente puede ocurrir que en algunas freemartin los cromosomas propios (XX) tiendan a incrementar, mientras los del sexo opuesto (XY) tiendan a decrecer o posiblemente desaparecer en número conforme avanza su edad (Lojda y Poláček, 1984). Tal puede ser el caso del freemartin identificado como animal 22 el cual mostró únicamente un genotipo femenino (Zfx, 447 pb). De ahí la importancia de complementar el diagnóstico con evaluaciones clínicas que nos conduzcan a una mejor designación del probable fenómeno presente.

El diagnóstico molecular ofrece otras ventajas comparado con el diagnóstico citogenético, la técnica de PCR sólo se requiere un volumen pequeño de sangre, las muestras que han sido conservadas por varios días en refrigeración y aun estando contaminadas con microorganismos, dan resultados exactos, además de que si no hay tubos disponibles con anticoagulante, las gotas de sangre pueden ser preparadas y amplificadas posteriormente (White *et al.*, 1989; Setiabudi, 1993).

Los análisis moleculares (PCR-RFLP) realizados a partir de DNA aislado de células sanguíneas y el uso de los oligonucleótidos iniciadores P1-5EZ y P3-3EZ (Bredbacka y Peippo, 1992), nos permitieron identificar, en 12 de las 14 hembras procedentes de partos múltiples heterosexuales, un patrón electroforético igual al obtenido para la muestra del bovino macho control, es decir, Zfx, 447 pb; Zfy, 344 y 103 pb, lo que nos permite inferir la condición de quimerismo hematopoyético (XX/XY) propia de los freemartin.

Siendo tan alta la frecuencia de freemartinismo en los partos múltiples heterosexuales del bovino y tan baja en otras especies domésticas como caprinos (~ 1%), ovinos (~ 1.2%), cerdos y animales silvestres (*v. gr.*, venado rojo, carnero de las rocosas, etc.), probablemente existan ciertos mecanismos biológicos diferentes entre especies monótocas y polítocas, y aun dentro de las monótocas, que han evolucionado de manera que la anastomosis vascular y el intercambio de células y sustancias entre fetos es limitado o evitado (Wilkes *et al.*, 1980; Stewart-Scott *et al.*, 1990).

Como el freemartin originalmente es una hembra genética con cariotipo 60,XX, la presencia de células de macho (XY) en circulación, es característica diagnóstica. Sin embargo, en este estudio en el animal 7, con fenotipo externo de un típico freemartin y procedente de un parto múltiple heterosexual de triates, se observó un porcentaje de células XY muy desviado (100%). El animal compañero disponible de éste, fue una vaquilla estéril con cariotipo 60,XX (en 100 metafases analizadas) y tracto reproductor femenino con un ovario funcional, por lo que en este caso se obtuvo DNA para la posterior identificación de secuencias específicas del cromosoma Y mediante la técnica de PCR, obteniéndose RFLP de genotipo XX (Zfx, 447 pb). Lamentablemente no se dispuso del tercer individuo para complementar el estudio del fenómeno ocurrido, el cual, según el Médico Veterinario responsable del establo, fue un macho, motivo por el cual se puede considerar que posiblemente se estableció una anastomosis vascular entre el freemartin (animal 7) y el macho no disponible.

El análisis anatomopatológico y citogenético del freemartin 7, puede ser comparado con un informe similar. Hare (1976), reportó un freemartin con testículos, conductos deferentes, vesículas seminales, un pene subdesarrollado y sin evidentes conductos de Müller, ni vagina, con cariotipo 60,XY en 60 linfocitos analizados y 60,XX / 61,XX+c en fibroblastos. Respecto a la presencia de túbulos seminíferos con aparentes espermatogonias y células de Sertoli en la gónada izquierda, Wilkes *et al.* (1978), reportaron un caso de freemartinismo en una oveja con estos hallazgos gonadales, más calcificación distrófica similar a la de la gónada derecha del freemartin animal 7.

En los freemartins los casos extremos de masculinización de las gónadas pueden formar tejido testicular, aunque la espermatogénesis no es aparente. Tales fueron los animales 3 y 7 que presentaron pseudohermafroditismo masculino con conductos de semejanza epididimal y aparentes conductos deferentes. Por otro lado, en el grado menor de masculinización pueden desarrollar ambos tejidos en las gónadas, testicular y ovárico, e incluso solamente inhibir el desarrollo del tracto reproductor (Wilkes *et al.*, 1980), tal fue el caso de los animales 11 y 12, los cuales presentaron un tracto reproductor hipoplásico con dos pequeñas gónadas de apariencia ovárica en uno de los

animales (animal 11) y en el otro (animal 12) sin gónadas aparentes, teniendo en su lugar, dos pequeñas masas de apariencia fibrótica.

Aparentemente cuando el grado de masculinización del freemartin es muy extenso, el desarrollo de tejido testicular produce cantidades suficientes de hormona masculina para causar comportamiento sexual masculino y desarrollo de algunas de las características sexuales secundarias, ya que la producción de testosterona por las células de Leydig continua en el testículo no descendido, tal puede ser el caso del freemartin animal 3 que además de detectar hembras en celo desarrollo conformación física masculina.

Se postula que en los freemartins la masculinización activa de los conductos internos y externos muy probablemente depende enteramente de la cantidad de tejido testicular activo formado durante el proceso de reversión sexual (Haseltine y Ohno, 1981). Desafortunadamente, en estos cuatro freemartin estudiados hasta su sacrificio, no se obtuvieron los perfiles hormonales de los intersexos con tejido testicular (animales 3, y 7), ni de las freemartins con hipoplasia del tracto reproductor (animales 11 y 12), lo que sin duda permitiría una mejor comprensión del fenómeno involucrado.

Ahora bien, quizá el macho cogemelo del freemartin, se limite a masculinizar las gónadas del freemartin, y esto sería en turno, responsable de la regresión de los conductos de Müller propios; lo cual es fundamentado en algunos estudios como el de Vigier *et al.* (1981), en el que tracto reproductivo castrado, de ratas de 14.5 días de edad fetal expuesto a tejido gonadal indiferenciado de freemartin de 62 días de gestación (bioensayo de actividad Mülleriana), causo incompleta regresión Mülleriana. Así pues, la presencia de actividad anti-Mülleriana en la gónada indiferenciada de un freemartin de 62 días de edad, sugiere posibilidades más excitantes. El encuentro de que el desarrollo de la función anti-Mülleriana puede preceder a la formación de los tubos seminíferos, no es enteramente inesperada, pues Tran *et al.* (1977), ya habían reportado actividad anti-Mülleriana en gónadas indiferenciadas de fetos porcinos 38,XY de 27 días de edad.

La fase crítica para la adquisición de la actividad anti-Mülleriana por la gónada freemartin probablemente esté entre los 45 y 52 días de gestación, ya que la interrupción de la anatomosis vascular placentaria entre gemelos heterosexuales antes de los 45 días de gestación, previene la regresión de los conductos de Müller y la atrofia ovárica en la hembra, pero esto no confirma que la misma sustancia este involucrada en ambos efectos (Vigier *et al.*, 1983; Vigier *et al.*, 1984).

De esta manera, la aparición de la actividad anti-Mülleriana en el tiempo de la formación de los túbulos seminíferos en la gónada freemartin podría concebirse que contribuye a la regresión terminal de los conductos de Müller en el freemartin, pero no para su iniciación en el día 52. La misma restricción se aplica para la biosíntesis del andrógeno. Además, Vigier *et al.* (1984),

observaron en freemartins de una edad sobre los 90 días, una correlación positiva entre la presencia de túbulos seminíferos y la actividad anti-Mülleriana. Las gónadas que principalmente revelaron tejido fibroso y rete tubos, no inhibieron los conductos Müllerianos de rata.

Como mostraron Jost *et al.* (1972), la desfeminización del tracto genital del freemartin ocurre en dos estadios separados. El primer estadio de los 50 a 90 días de gestación es esencialmente una inhibición, marcada por el arresto del ovario en crecimiento y la regresión de los conductos de Müller. La masculinización de las gónadas y del tracto genital (desarrollo de túbulos seminíferos y estimulación de derivados de Wolff) ocurre posteriormente, después de los 90 días de gestación.

Existen muy pocos reportes de vacas fértiles cogemelas con un macho y con quimerismo de los cromosomas sexuales, Eldridge y Blazar (1977), y Smith *et al.*, (1977). En este estudio se identificó una vaca (animal No. 10) con quimerismo hematopoyético con 99% células XX y 1% células XY, madre de tres terneros.

Es posible que la anastomosis vascular y el consecuente paso de células sanguíneas, entre los gemelos heterosexuales bovinos, conlleve a un quimerismo hematopoyético, mas no resulte invariablemente en la esterilidad de la ternera, ya que la futura gónada femenina puede ser sensible al efecto de virilización sólo por un periodo relativamente corto durante la gestación, y en algunas ocasiones la anastomosis de las membranas fetales pudiera ocurrir después de la migración de las células germinales y probablemente después de un periodo crítico de diferenciación del ovario fetal (Smith *et al.*, 1977). Para este caso se realizaron estudios moleculares (PCR-RFLP) para identificar el genotipo sexual, obteniéndose un patrón electroforético propio de una hembra (Zfx, 447 pb).

No se puede estar completamente seguro que al encontrar 100% de células con complemento cromosómico 60,XX (en sangre periférica) de terneras nacidas con un macho, la hembra no es un freemartin, ya que podría interpretarse que con la anastomosis vascular la mezcla XX/XY no siempre se establece. Tal podría ser el caso del animal No. 22, en el cual a pesar de tratarse de una vaquilla procedente de parto gemelar heterosexual y clínicamente diagnosticada como freemartin, el análisis molecular (PCR-RFLP) reveló un patrón electroforético propio de una hembra (Zfx; 447 pb). Posiblemente exista una membrana que impida la llegada de células de intercambio, pero que sea permeable a agentes capaces de inducir la condición freemartin (Greene *et al.*, 1977).

Al parecer la posición de las células germinales dentro de la gónada afecta su desarrollo, las células germinales femeninas que penetran en la médula por lo general degeneran o permanecen en estado latente. De igual manera los gonocitos que penetran en la corteza es imposible que se transformen a oocitos (Ohno y Gropp, 1965; Dunn *et al.*, 1979). Mintz (1968), no encontró en

ratones quiméricos, evidencia de que células XX llegaron a formar espermatozoides e identificó un ratón macho quimera con un mínimo de 95% células somáticas XX y todas las células germinales XY.

Ohno y Gropp (1965), detectaron células germinales XX en los testículos de dos terneros quiméricos recién nacidos, posteriormente Teplitz *et al.* (1967), identificaron espermatogonias y espermatoцитos primarios XX en especímenes testiculares de tres toros quiméricos de 2, 10 y 11 meses de edad. Sin embargo, lo anterior no fue confirmado por otros investigadores (Short *et al.*, 1969; Kieffer y Sorensen, 1971; Vigier *et al.*, 1973).

Los análisis moleculares (PCR-RFLP) realizados en este estudio a partir de DNA aislado de tejido testicular montado en bloques de parafina y el uso de los oligonucleótidos iniciadores para los genes Zfx y Zfy del bovino (P1-5EZ y P3-3EZ), permitieron identificar, en los intersexos pseudohermafroditas masculinos (animales 3 y 7) un patrón electroforético igual al obtenido a partir de DNA de células de sangre periférica.

Así pues, la presencia de patrones de bandeo moleculares específicos para el macho bovino y freemartin (Zfx, 447; Zfy 344 y 103 pb), encontrados en los intersexos 3 y 7, nos sugieren una probable condición de quimerismo de células de tejido gonadal en éstos. Condición recientemente demostrada en toros adultos (12-15 meses de edad) quiméricos (XY/XX) de parto gemelar heterosexual (Rejduch *et al.*, 2000). Sin embargo, se sugieren estudios moleculares posteriores (FISH) en tejido testicular de animales freemartin para identificar la(s) línea(s) celular(es) probablemente involucradas en el quimerismo de la gónada.

Una forma de inferir en la eliminación de células XX en toros quiméricos cogemelos con una freemartin lo constituye el cálculo de la proporción del sexo en un gran número de descendientes de estos individuos, Fejér y Kovács (1980), en 4,138 partos de 4 toros quiméricos encontraron 48.6% hembras (51.4% machos) y en 3,566 partos de 4 toros controles cromosómicamente normales, 48.7% terneras (51.3% terneros), por lo que la desviación encontrada de - 0.1% no fue significativa. Lojda y Poláček (1984), estudiando tres toros quiméricos utilizados para IA, reportaron de 885 descendientes de uno de los individuos, 59% hembras y 41% machos, mientras que en los otros dos toros no encontraron diferencias en la proporción del sexo.

CONCLUSIONES

1. El presente trabajo complementa el análisis citogenético con el análisis molecular para el diagnóstico preciso y oportuno de la entidad intersexual más frecuente en las gestaciones múltiples heterosexuales (92% en partos gemelares) del ganado bovino doméstico, el síndrome freemartin, resaltando las ventajas (precisión y oportunidad) que tiene sobre el análisis citogenético, el análisis molecular (PCR).
2. La técnica de PCR aunada sólo en uno de los casos, a la evaluación clínica, permitió diagnosticar 13 estados intersexuales de 14 candidatos de un total de 22 animales procedentes de partos múltiples heterosexuales, mediante el uso de oligonucleótidos iniciadores universales para los genes Zfx y Zfy (P1-5EZ Y P3-3EZ).
3. Este estudio permitió identificar 13 (92.85%) bovinos freemartin a través del análisis clínico citogenético y molecular (PCR), lo que sin duda resalta la alta frecuencia (92%) de este síndrome reportada en la literatura, cuando se presenta un parto múltiple heterosexual en esta especie.
4. Los hallazgos anatomopatológicos de dos de los animales freemartins estudiados hasta su sacrificio, exhibieron masculinización del tracto reproductor con únicamente tejido testicular en las gónadas, asimismo, otros dos freemartins presentaron un tracto reproductor femenino con una marcada hipoplasia, grados de afección similares a los reportado en la literatura para vaquillas freemartin.
5. La presencia de quimerismo (XY/XX) en células gonadales reportada previamente en toros procedentes de partos múltiples heterosexuales; es propuesta en los dos casos de síndrome freemartin con pseudohermafroditismo masculino de este estudio.

BIBLIOGRAFIA

1. Aasen E, Medrano JP. Amplification of the ZFY and ZFX for sex identification in humans, cattle, sheep and goats. *Biotechnology* 1990;8:1279-1281.
2. Ashworth A, Swift S, Affara N. Sequence of cDNA for murine Zfy-1, a candidate for Tdy. *Nucleic Acids Res* 1989;17:2864.
3. Basrur PK, and Kanagawa H. Sex anomalies in pigs. *J Reprod Fert* 1971;26:369-371.
4. Behringer RR, Cate RL, Froelick GL, Palmiter RD, Brinster RL. Abnormal sexual development in transgenic mice chronically expressing Müllerian inhibiting substance. *Nature* 1990;345:167-170.
5. Berkovitz GD, Fechner PY, Marcantonio SM, Bland G, Stetten G, Goodfellow PN, Smith KD, Migeon CJ. The role of the sex-determining region of the Y chromosome (SRY) in the etiology of 46,XX true hermaphroditism. *Hum Genet* 1992;88:411-416.
6. Berta P, Hawkins JR, Sinclair AH, Taylor A, Griffiths BL, Goodfellow PN, Fellous M. Genetic evidence equating SRY and the testis-determining factor. *Nature* 1990;348:448-450.
7. Betancourt A, Guitierrez C, Sánchez A. Importancia del estudio cromosómico en bovinos seleccionados como reproductores. 1er. Congreso Mundial de Genética Aplicada a la Producción Ganadera. Ed. Garsi. Madrid. 1974;213-218.
8. Bishop MWH. Genetically determined abnormalities of the reproductive system. *J Reprod Fert (Suppl)* 1972;15:51-78.
9. Bogan J, Page DC. Ovary? Testis? - A mammalian dilemma. *Cell* 1994;76:603-607.
10. BonDurant RH. Probable freemartinism in a goat. *J Am Vet Med Assoc* 1980;177:1024-1025.
11. Bongso TA, Thavalingam M, Mukherjee TK. Intersexuality associated with XX/XY mosaicism in a horned goat. *Cytogenet Cell Genet* 1982;34:315-319.
12. Bouters R, Vandeplassche M. Twin gestation in the mare: the incidence of placental vascular anastomoses and their influence on the reproductive performance of heterosexual equine twins. *Abst. in J Reprod Fert* 1972;29:149
13. Bredbacka P, Peippo J. Diagnosis of ovine and bovine embryos by enzymatic amplification and digestion of DNA from the Zfy/Zfx locus. *Agric Sci Finl* 1992;2:233-238.
14. Britt JH. Prospects for controlling reproductive processes in cattle, sheep, and swine from recent findings in reproduction. *Dairy Sci* 1979;62:651-665.
15. Bull JJ, Wibbels T, Crews D. Sex-determining potencies vary among female incubation temperatures in a turtle. *J Exp Zool* 1990;256:339-341.
16. Burgoyne PS. Mammalian sex determination: thumbs down for zinc finger?. *Nature* 1989;342:860-862.
17. Capel B. The battle of the sexes. *Mech Dev* 2000 15;92:89-103.
18. Crossley R, Clarke G. The Application of tissue-culture techniques to the chromosomal analysis of *Bos taurus*. *Genet Res Camb* 1962;3:167-168.
19. Cuevas SA, Kofman SH. El cromosoma Y humano. *Rev Invest Clin* 1990;42:290-297.
20. Charlesworth, B. The evolution of sex chromosomes. *Science* 1991;251:1030-1033.
21. Charnier M. Action of temperature on the sex ratio in the *Agama agama* (Agamidae, Lacertilia) embryo. *C R Seances Soc Biol Fil* 1966;160:620-622.
22. Cherfas J. Sex and the single gene. *Science* 1991;252:782.
23. Chiarli B, de Carli I, Unzo F. Analisi morfometrica dei cromosomi de *Bos taurus*. *Caryologia* 13, No.3. Citado por Crossley R, Clarke G. The Application of tissue-culture techniques to the chromosomal analysis of *Bos taurus*. *Genet Res Camb* 1962;3:167-168.
24. Dain A. The incidence of freemartinism in sheep. *J Reprod Fert* 1971;24):91-7.
25. Darnell J, Lodish H, Baltimore D. *Biología Celular y Molecular*. 2a edición. Ediciones Omega, S. A.: 1993;763-820. Barcelona, España.
26. David JSE. The incidence of freemartins in heifer calves purchased from markets. *Vet Rec* 1976;22:417-422.
27. De la Chapelle A. The complicated issue of human sex determination. *Am J Hum Genet* 1988;43:1-3.
28. Deeb P, Omas MA. Freemartinism in buffalo. *Indian Vet* 1980;57:200-204.
29. Dunn HO, McEntee K, Hall CE, Johnson RH, Stone WH. Cytogenetic and reproductive studies of bulls born co-twin with freemartins. *J Reprod Fert* 1979;57:21-30.

30. Edwards JF, Gallagher DS, Prakash B. Urethral atresia with uroperitoneum in a newborn bovine freemartin. *Vet Pathol* 1994;31:117-119.
31. Eldridge F, Blazak WF. Comparison between the Y chromosomes of Chianina and Brahma crossbred steers. *Cytogenet Cell Genet* 1977;18:57-60.
32. Eldridge FE, Blazak WF. Chromosomal analysis of fertile female heterosexual twins in cattle. *Dairy Sci* 1977;60:458-463.
33. Elejalde BR, Opitz JM. Clinical cytogenetics. *Postgrad Med*. 1978;63:207-212.
34. Ennis S, Vaughan L, Gallagher TF. The diagnosis of freemartin in cattle using sex-specific DNA sequences. *Res Vet Sci* 1999;67:111-112.
35. Erickson PR, Verga V. Is Zinc-Finger Y the sex-determining gene? *Am J Hum Genet* 1989;45:671-674.
36. Farin PW, Estill CT. Infertility due to abnormalities of the ovaries in cattle. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 1993;9:291-308.
37. Fejér T, Kovács A. Offsprings sex-ratio of XX/XY chimaeric bulls. 4th European Colloquium Cytogenetics of Domestic Animals; 1980 June 10-13; Uppsala, Sweden. Uppsala, Sweden: Department of Animal Breeding and Genetics, Faculty of Veterinary Medicine, Swedish University of Agricultural Sciences, 1980:94-98.
38. Foley CW, Lasley JF, Osweller GD. Abnormalities of Companion Animals: analysis of heritability. 1st. edition.: 1979;129-133. USA.
39. Ford CE, Evans EP. Cytogenetic observations on XX/XY chimaeras and a reassessment of the evidence for germ cell chimaerism in heterosexual twin cattle and marmosets. *J Reprod Fertil* 1977;49:25-33.
40. Ford CE, Pollock DL, Gustavsson I. Proceeding of the First Conference for the Standardisation of Banded Karyotypes of Domestic Animals; 1976 august 2nd - 6th; Reading, England. *Hereditas* 1980; 92:145-162.
41. Foster JW, Brennan FE, Hampikian GK, Goodfellow PN, Sinclair AH, Lovell-Badge R, Selwood L, Renfree MB, Cooper DW, Marshall JA. Evolution of sex determination and the Y chromosome: SRY-related sequences in marsupials. *Nature* 1992;359:531-533.
42. George FW, Peterson KG, Frenkel PA, Wilson JD. The androgen receptor in the fetal epididymis is similar to that in the mature rabbit. *Proc Soc Exp Biol Med* 1988;188:500-503.
43. Goodfellow PN, Lovell-Badge R. SRY and sex determination in mammals. *Annu Rev Genet* 1993;27:71-92.
44. Goodfellow SA, Strong SJ, Stewart JSS. Bovine freemartins and true hermaphroditism. *Lancet* 1965;i:1040-1041.
45. Gordon JW, Ruddle FH. Mammalian gonadal determination and gametogenesis. *Science* 1981;211:1265-1271.
46. Greene WA, Dunn HO, Foote RH. Sex-chromosome ratios in cattle and their relationship to reproductive development in freemartins. *Cytogenet Cell Genet* 1977;18:97-105.
47. Guanti G, Minola P. A robertsonian translocation in the female cell of a bull, co-twin to a freemartin. *Cornell Vet* 1978;68:94-97.
48. Gubbay J, Collignon J, Koopman P, Capel B, Economou A, Munsterberg A, Vivian N, Goodfellow P, Lovell-Badge R. A gene mapping to the sex-determining region of the mouse Y chromosome is a member of a novel family of embryonically expressed genes. *Nature* 1990;346:245-250.
49. Gustavsson I. Chromosome aberrations and their influence on the reproductive performance of the domestic animals. *Z Tierzüchtg Züchtgsbiol* 1979;97:176-195.
50. Gutzke WH, Crews D. Embryonic temperature determines adult sexuality in a reptile. *Nature* 1988;332:832-834.
51. Hafez ESA. Reproducción de los animales de Granja. 2a. edición. Ed Herrero S. A. 1978;531-551. México, D. F., México.
52. Halnan CRE. An improved technique for the preparation of chromosomes from cattle whole blood. *Res Vet Sci* 1977;22:40-43.
53. Halnan CRE. Cytogenetics of Animals. C. A. B. International. 1989;221-234, United Kingdom.
54. Halnan CRE. Chromosomes of cattle: present clinical status and promise. *Vet Rec* 1975;96:148-151.

55. Hare WCD. Congenital retroflexion of the penis and inguinal cryptorchidism in a presutive bovine twin with a 60,XY/60,XX/61,XX+cen chromosome constitution. *Can J Comp Med* 1976;40:429-433.
56. Harvey MJA. Veterinary cytogenetics. *Vet Rec* 1976;98:479-481.
57. Haseltine FP, Ohno S. Mechanisms of gonadal differentiation. *Science* 1981;211:1272-1278.
58. Herschler MS, Fechheimer NS. Centric fusion of chromosomes in a set of bovine triplets. *Cytogenetics* 1966;5:307-312.
59. Herschler MS, Fechheimer NS. The role of sex chromosome chimerism in altering sexual development of mammals. *Cytogenetics* 1967;6:204-212.
60. Hodgkin J. Developmental genetics. Everything you always wanted to know about sex ... *Nature* 1988;331:300-301.
61. Hunter J. Account of the freemartin. *Philosophical Transactions of the Royal Society* 1779;69:279-293. Citado por Marcum JB. The freemartin syndrome. *Anim Breed Abstr* 1974;42:227-242.
62. Hutson JM. Testicular descent: the first step towards fertility. *Int J Androl* 1994;17:281-288.
63. Jackson DP, Hayden JD, Quirke P. Extraction of nucleic acid from fresh and archival material. In: McPherson MJ, Quirke P, Taylor GR. *PCR 1: A Practical Approach*. Oxford University Press; 1996:29-50. Oxford, England.
64. Jäger RJ, Anvret M, Hall K, Scherer G. A human XY female with a frame shift mutation in the candidate testis-determining gene SRY. *Nature* 1990;348:452-454.
65. Johansson I, Rendel J. *Genética y Mejora Animal*. 1972;159-183, Acribia, Zaragoza, España.
66. Jost A, Vigier B, Prepin J. Freemartins in cattle: the first steps of sexual organogenesis. *J Reprod Fert* 1972;29:349-379.
67. Jost A. Hormonal factors in the sex differentiation of the mammalian foetus. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 1970;259:119-130.
68. Kästli F, Hall JG. Cattle twins and freemartin diagnosis. *Vet Rec* 1978;102:80-83.
69. Kawakura K, Miyake YI, Murakami RK, Kondoh S, Hirata TI, Kaneda Y. Deletion of the SRY region on the Y chromosome in bovine gonadal hypoplasia (XY female) by PCR. *Cytogenet Cell Genet* 1996;72:183-184.
70. Kawakura K, Miyake YI, Murakami RK, Kondoh S, Hirata TI, Kaneda Y. Abnormal structure of the Y chromosome detected in bovine gonadal hypoplasia (XY female) by FISH. *Cytogenet Cell Genet* 1997;76:36-38.
71. Kawasaki ES. Sample preparation from blood, cells, and other fluid. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ, eds *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. Academic Press; 1990:146-152. San Diego, Cal. USA.
72. Kenny DE, Cambre RC, Frahm MW, Bunch TD. Freemartinism in a captive herd of Rocky Mountain bighorn sheep (*Ovis canadensis*). *J Wildl Dis* 1992;28:494-498.
73. Kieffer NM, Cartwright TC. Sex chromosome polymorphism in domestic cattle. *J Hered.* 1968;59:34-36.
74. Kieffer NM, Sorensen AM Jr. Some cytogenetic aspects of intersexuality in the bovine. *J Anim Sci* 1971;32:1219-228.
75. Klebs E. *Handbuch der pathologischen anatomie*, Berlin 1876. Citado por Baramki TA. Sex chromosomal disorders. *Obstet Gynecol Annu* 1972;1:29-63.
76. Kofman SA, Merchant HL, Pérez GP. Diferenciación Sexual. *Rev Invest Clín* 1982;34:349-359.
77. Koopman P, Gubbay J, Collignon J, Lovell-Badge R. Zfy gene expression patterns are not compatible with a primary role in mouse sex determination. *Nature* 1989;342:940-942.
78. Koopman P, Gubbay J, Vivian N, Goodfellow P, Lovell-Badge R. Male development of chromosomally female mice transgenic for Sry. *Nature* 1991;351:117-121.
79. Koopman P, Münsterberg A, Capel B, Vivian N, Lovell-Badge R. Expression of a candidate sex-determining gene during mouse testis differentiation. *Nature* 1990;348:350-352.
80. Kraay GJ, Giebelhaus ED, Colling, DT. A case of unrelated twins in cattle. *Can Vet J* 1978;19:279-283.
81. Krallinger 1928. Citado por Gustavsson I. Cytogenetics, distribution and phenotypic effects of a translocation in Swedish cattle. *Hereditas* 1969;63:168-169.
82. Lillie FR. The theory of the freemartin. *Science* 1916;43:611-613. Citado por Marcum JB.

- The freemartin syndrome. *Anim Breed Abstr* 1974;42:227-242.
83. Lojda L, Poláček J. Age-dependent changes in the 60,XX:60, XY cell ratio in chimaeric cattle. 6th European Colloquium Cytogenetics of Domestic Animals; 1984 July 16-20; Zurich, Switzerland. Zurich, Switzerland: Institute of Animal Production, Animal Breeding Section, Federal Institute of Technology, 1984:295-302.
 84. Long SE. Testicular feminisation in an Ayrshire cow. *Vet Rec* 1981;8:116-118.
 85. Long SE. Development and diagnosis of freemartinism in cattle. *In Pract* 1990;12:208-210.
 86. Long SE. Some pathological conditions of the reproductive tract of the ewe. *Vet Rec* 1980;106:175-176.
 87. Lutz H, Lutz-Ostertag Y Free-martinisme spontané chez les oiseaux. *Biology* 1959;1:364-376 Citado por Marcum JB. The freemartin syndrome. *Anim Breed Abstr* 1974;42:227-242.
 88. Marcum JB, Lasley JF, Day BN. Variability of sex-chromosome chimerism in cattle from heterosexual multiple births. *Cytogenetics* 1972;11:388-399.
 89. Marcum JB. The freemartin syndrome. *Anim Breed Abstr* 1974;42:227-242.
 90. Mardon G, Page DC. The sex-determining region of the mouse Y chromosome encodes a protein with a highly acidic domain and 13 zinc fingers. *Cell* 1989;56:765-70.
 91. McFeely RA, Hare WCD, Biggers JD. Chromosome studies in 14 cases of intersex in domestic mammals. *Cytogenetics* 1967;6:242-253.
 92. McLaren A, Chandley AC, Kofman-Alfaro S. A study of meiotic germ cells in the gonads of foetal mouse chimaeras. *J Embryol Exp Morphol* 1972;27:515-524.
 93. McLaren A, Simpson E, Tomonari K, Chandler P, Hogg H. Male sexual differentiation in mice lacking H-Y antigen. *Nature* 1984;312:552-555.
 94. McLaren A. What makes a man a man?. *Nature* 1990;346:216-217.
 95. Mintz B. Hermaphroditism, sex chromosomal mosaicism and germ cell selection in allophenic mice. *J Anim Sci Suppl* 1968;27:51-60.
 96. Mittwoch U, Burgess AMC. How do you get sex?. *Journal of Endocrinology*, 1991;128:329-331.
 97. Mittwoch U. Y chromosome and sex determination. *Lancet* 1988;2:52-53.
 98. Moore KL. *The Developing Human. Clinically Oriented Embryology*. 4th edition. W. B. Saunders Company: 1988;262-285. Philadelphia, USA.
 99. Moorhead PS, Nowell PC, Mellman J, Battips DM, Hungerford DA. Chromosome preparations of leucocytes culture from peripheral blood. *Exp Cell Res* 1960;20:613-616.
 100. Murakami R, Miyake Y, Kaneda Y. Cases of XY female, single-birth freemartin and trisomy (61, XX, +20) observed in cytogenetical studies on 18 sterile heifers. *Nippon Juigaku Zasshi* 1989;51:941-945.
 101. Mystkowska, E. T. and Tarkowski, A. K. Observations on CBA-p/CBA-T6T6 mouse chimaeras. *J Embryol Exp Morph* 1968;20:33-52.
 102. Naftolin F. Understanding the bases of sex differences. *Science*. 1981;211:1263-1264.
 103. Ohno S, Christian IC, Wachtel SS, Koo GC. Hormone-like role of H-Y antigen in bovine freemartin gonad. *Nature* 1976;261:597-599.
 104. Ohno S, Gropp A. Embryological basis for germ cell chimerism in mammals. *Cytogenetics* 1965;4:251-261.
 105. Ohno, S.; Trujillo, J. M.; Stenius, C.; Christian, L. C. and Teplitz, R. L. Possible germ cell chimeras among newborn dizygotic twin calves (*Bos taurus*). *Cytogenetics* 1962;1:258-265.
 106. Olsaker I, Jorgensen CB, Hellemann AL, Thomsen PD, Lie O. A fast and highly sensitive method for detecting freemartinism in bovine twins using immunomagnetic beads and Y-specific PCR primers. *Anim Genet* 1993;244:311-313.
 107. Owen JJ. Karyotype studies on *Gallus domesticus*. *Chromosoma*. 1965;16:601-608.
 108. Page DC, Mosher R, Simpson EM, Fisher EM, Mardon G, Pollack J, McGillivray B, De la Chapelle A, Brown LG. The sex-determining region of the human Y chromosome encodes a finger protein. *Cell*. 1987;51:1091-104.
 109. Palmer MS, Sinclair P, Berta P, Ellis NA, Goodfellow PN, Abbas NE, Fellous M. Genetic evidence that ZFY is not the testis-determining factor. *Nature* 1989;342:937-939.
 110. Pathak S, Kieffer NM. Sterility in hybrid cattle. *Cytogenet Cell Genet* 1979;24:42-52.
 111. Payen EJ, Cotinot CY. Comparative HMG-box sequences of the SRY gene between sheep, cattle and goats. *Nucleic Acids Res* 1993;21:2772.

112. Peñaloza-Plascencia M, Montoya-Fuentes H, Flores-Martínez SE, Fierro-Velasco FJ, Peñaloza-González JM, Sánchez-Corona J. Molecular identification of 7 human papillomavirus types in recurrent respiratory papillomatosis. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2000;126:1119-1123.
113. Potter WL, Blackshaw AW. Sex chromosome constitution in male and female cattle in relation to reproductive function. 4th European Colloquium Cytogenetics of Domestic Animals; 1980 June 10-13; Uppsala, Sweden. Uppsala, Sweden: Department of Animal Breeding and Genetics, Faculty of Veterinary Medicine, Swedish University of Agricultural Sciences, 1980:69-77.
114. Potter WL, Upton PC. Y chromosome morphology of cattle. *Aust Vet J* 1979;55:539-541.
115. Rajakosky E, Hafez ESE. Derivatives of cortical cords in adult freemartin gonads of bovine quintuplets. *Anatomical Record* 1963;147:457-497.
116. Rejduch B, Słota E, Gustavsson I. 60,XY/60,XX chimerism in the germ cell line of mature bulls born in heterosexual twinning. *Theriogenology* 2000;54:621-627.
117. Rhoades JD, Foley CW. Cryptorchidism and Intersexuality. *Vet Clin North Am* 1977;7:789-794.
118. Rieck GW. Veterinary Medicine and Citogenetics. 6th Eur. Colloq. Cytogenet. Domest. Anim. 6th European Colloquium Cytogenetics of Domestic Animals; 1984 July 16-20; Zurich, Switzerland. Zurich, Switzerland: Institute of Animal Production, Animal Breeding Section, Federal Institute of Technology, 1984;20-34.
119. Rowson LEA. The role of reproductive research in animal production. *J Reprod Fert* 1971;26:113-126.
120. Saba N, Cunningham NF, Millar PG. Plasma progesterone, androstenedione and testosterone concentrations in freemartin heifers. *J Reprod Fert* 1975;45:37-45.
121. Salamanca, F. Citogenética Humana. 1a. edición. Ed. Médica Panamericana, 1990:83-187. México, México.
122. Salamanca F. Transtornos genéticos de la diferenciación sexual en el humano. *Gac Méd Méx* 1992;128: 57-79.
123. Sánchez, D.R. Tesis de Maestría., Comportamiento productivo de líneas genéticas terminales de cerdos con especial referencia al gen del halotano. U de G. CUCBA, 2000
124. Sasaki MS, Makino, S. Revised study of the chromosomes of domestic cattle and the horse. *Jour Hered* 1962;53:157-162.
125. Setiabudi R. Application of the Polimerase Chain Reacion (PCR) Technique for Determination of Sex on the Cellular Nivel, Licentiate Thesis, Swedish University of Agricultural Sciences, Department of Animal Breeding and Genetics; Uppsala, Sweden. 1993.
126. Short RV, Smith J, Mann T, Evans EP, Hallett J, Fryer A, Hamerton JL. Cytogenetic and endocrine studies of a freemartin heifer and its bull co-twin. *Cytogenetics* 1969;8:369-88.
127. Simpson E, Chandler P, Goulmy E, Disteché CM, Malcolm A, Ferguson-Smith A, Page DC. Separation of the genetic loci for the H-Y antigen and for testis determination on human Y chromosome. *Nature* 1987;326:876-878.
128. Sinclair AH, Berta P, Palmer MS, Hawkins JR, Griffiths BL, Smith MJ, Foster JW, Frischauf AM, Lovell-Badge R, Goodfellow PN. A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature* 1990;346:240-244.
129. Smith AL, Weathersbee PS, Lodge JR. Whole blood leukocyte culture technique for mammalian cytogenetic analysis. *Lab Anim Sci* 1976;26:936-938.
130. Smith GS, Van Camp SD, Basrur PK. A fertile female co-twin to a male calf. *Can Vet J* 1977;18:287-289.
131. Smith KC, Parkinson TJ, Long, SE, Barr FJ. Anatomical, cytogenetic and behavioural studies of freemartin ewes. *Vet Rec* 2000;146:574-578.
132. Smith MC, Dunn HO. Freemartin condition in a goat. *J Am Vet Med Assoc* 1981;178:735-737.
133. Speicher MR, Jauch A, Walt H, Du Manoir S, Ried T, Sulser T, Cremer T. Correlation of microscopic phenotype with genotype in a formalin-fixed, paraffin-embedded testicular germ cell tumor with universal DNA amplification, comparative genomic hybridization, and

- interphase cytogenetics. *Am J Pathol* 1995;146,6:1332-1340.
134. Spooner RL. Diagnosing wrong parentage, freemartins, translocations and mannosidosis. *Br Vet J* 1981;137:2-7.
 135. Stewart-Scott IA, Pearce PD, Moore GH, Fennessy PF. Freemartin in red deer (*Cervus elaphus* L.). *Cytogenet Cell Genet* 1990;54:58-59.
 136. Sundberg, J. P. A case of true bilateral hermaphroditism in a dog. *Vet Med Small Anim Clin* 1979;477-482.
 137. Sysa PS, Kaluzinski J. Possibility of freemartinism in roe deer. *Acta Theriol* 1984;29:133-137.
 138. Sysa PS, Slawomirski J, Remiszewski J. Chromosomal analysis of heifers with anomalies of the reproductive system. 4th European Colloquium Cytogenetics of Domestic Animals; 1980 June 10-13; Uppsala, Sweden. Uppsala, Sweden: Department of Animal Breeding and Genetics, Faculty of Veterinary Medicine, Swedish University of Agricultural Sciences, 1980:63-67.
 139. Tamassia, M. Prenatal sex determination. Intern Seminar., 1991;May 24:1-18.
 140. Teplitz RL, Moon YS, Basur PK. Further studies of chimerism in heterosexual cattle twins. *Chromosoma* 1967;22:202-209.
 141. The Y chromosome and sex determination. *The Lancet* 1988;8592:973-974.
 142. Therman E, Susman M. *Human Chromosomes: Structure, Behavior, and Effects*. 3th edition. Springer - Verlag 1993:203-209. New York, USA.
 143. Thompson MW, McInnes RR, Willard HF. *Genetics in Medicine*. 15th edition. W.B. Saunders Company: 1991;428-429. Philadelphia, USA.
 144. Thomsen PD, Poulsen PH. Analysis of the gonadal sex of five intersex pigs using Y chromosomal markers. *Hereditas* 1993;119:205-207.
 145. Tran D. Anti-Müllerian hormone is a functional marker of foetal Sertoli cells. *Nature* 1977;269:411-412.
 146. Upadhyay S, Zamboni L. Ectopic germ cells: natural model for the study of germ cell sexual differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1982;79:6584-6588.
 147. Van Haeringen H, Van de Nieuwenhuizen J. Twins and freemartins in cattle. 4th European Colloquium Cytogenetics of Domestic Animals; 1980 June 10-13; Uppsala, Sweden. Uppsala, Sweden: Department of Animal Breeding and Genetics, Faculty of Veterinary Medicine, Swedish University of Agricultural Sciences, 1980:100-102.
 148. Van Haeringen H. An unusual set of quadruplets. 6th European Colloquium Cytogenetics of Domestic Animals; 1984 July 16-20; Zurich, Switzerland. Zurich, Switzerland: Institute of Animal Production, Animal Breeding Section, Federal Institute of Technology, 1984:250-252.
 149. Viets B, Tousignant A, Ewert M, Nelson C, Crews D. Temperature-Dependent Sex Determination in the Leopard Gecko, *Eublepharis macularis*. *J exp Zool* 1993;265:679-683.
 150. Vigier B, Picard J, Bézard J, Josso N. Anti-Müllerian Hormone: a local or long-distance morphogenetic factor? *Hum Genet* 1981;58:85-90.
 151. Vigier B, Prepin J, Jost A. Absence of XX/XY chimerism in somatic tissues of freemartin calf fetuses and their male twins. *Ann Genet* 1973;16:149-155.
 152. Vigier B, Tran D, Buisson F, Heyman Y, Josso N. Use of monoclonal antibody techniques to study the ontogeny of bovine anti-müllerian hormone. *J Reprod Fert* 1983;69:207-214.
 153. Vigier B, Tran D, Legeai L, Bézard J, Josso N. Origin of anti-müllerian hormone in bovine freemartin fetus. *J Reprod Fert* 1984;70:473-479.
 154. Villagómez DAF. *Análisis Citogenético en Cerdos con Problemas Reproductivos*, Tesis de Licenciatura, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad de Guadalajara. 1984, Guadalajara, Jalisco, México.
 155. Vogt DW. Sex chromosome mosaicism in a swine intersex. *J Hered* 1982;166-167.
 156. Wai-Sum O, Short RV, Renfree MB, Shaw G. Primary genetic control of somatic sexual differentiation in a mammal. *Nature* 1988;331:716-717.
 157. Weiss, E. and Hoffmann, R. Elimination of XX cells in the testes of heterosexual bovine twins with XX/XY chimaerism. *Cytogenetics* 1969;8:68-73.
 158. White TJ, Arnheim N, Erlich HA. The polymerase chain reaction. *Trends Genet* 1989;5:185-189.
 159. Wilkes PR, Munro IB, Wijeratne WVS. Studies on a sheep freemartin. *Vet Rec*

- 1978;102:140-142.
160. Wilkes PR, Wijeratne WVS, Munro IB. A study of the cytogenetics and reproductive anatomy of freemartin heifers. 4th European Colloquium Cytogenetics of Domestic Animals; 1980 June 10-13; Uppsala, Sweden. Uppsala, Sweden: Department of Animal Breeding and Genetics, Faculty of Veterinary Medicine, Swedish University of Agricultural Sciences, 1980:104-117.
 161. Wilson JD, George FW, Griffin JE. The hormonal control of sexual development. *Science* 1981;211:1278-1284.
 162. Winter H, Pfeffer A. Pathogenic classification of intersex. *Vet Rec* 1977;100:307-310.
 163. Wright DK, Manos MM. Sample preparation from paraffin-embedded tissues. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ, eds *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. Academic Press; 1990:153-158. San Diego, Cal. USA.
 164. Xiao C, Kato Y, Sato S, Sutou S. Mapping of bovine SRY gene on the distal tip of the long arm and murine Sry on the short arm of the Y chromosome by method of fluorescence in situ hybridization (FISH). *Anim Sci Technol* 1995;66:441-444.