

# UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS

DIVISION DE CIENCIAS VETERINARIAS



ESTUDIO CITOGENETICO Y ANATOMOPATOLOGICO  
DEL SINDROME FREEMARTIN EN BOVINOS  
(*Bos taurus*)

TESIS PROFESIONAL QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA  
P R E S E N T A N

MIGUEL ANGEL AYALA VALDOVINOS  
HESQUIO RENTERIA ZUÑIGA

DIRECTOR DE TESIS  
DR. DANIEL A. F. VILLAGOMEZ ZAVALA

ASESOR DE TESIS  
M. V. Z. SERGIO L. SCHWEMINSKI BENITEZ

LAS AGUJAS, NEXTIPAC, ZAPOPAN, JAL. 1997.

" EN TANTO QUE EL HOMBRE ESTA SENTADO EN LA ALMOHADA DE LAS VENTAJAS, SE QUEDA DORMIDO; CUANDO ES EMPUJADO, ATORMENTADO, DERROTADO Y ACOSADO, TIENE LA OPORTUNIDAD DE APRENDER ALGO; DEPENDE DE SU INGENIO Y DE SU TENACIDAD. ADQUIERE HECHOS, APRENDE DE SU IGNORANCIA Y SE CURA DE LA LOCURA DE SU ORGULLO "

EMERSON

" A nuestros padres, con cariño "

## **AGRADECIMIENTOS**

Los estudios de esta tesis fueron realizados en el Laboratorio de Genética de la División de Ciencias Veterinarias del Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias de la Universidad de Guadalajara, con apoyo para su desarrollo en el Rancho Cofradía y en el Laboratorio de Patología Animal de la misma institución universitaria, así como en el Laboratorio de Citogenética del Centro de Investigaciones Biomédicas de Occidente del Instituto Mexicano del Seguro Social y en el Laboratorio de Anatomopatología del Hospital Civil de Guadalajara.

Nosotros queremos expresar nuestra sincera gratitud especialmente a las siguientes personas:

**PhD. Daniel A. F. Villagómez Zavala**, quien con su extraordinaria calidad profesional, realizó la dirección del presente estudio, en el cual están manifiestos parte de sus invaluable conocimientos y su valiosa orientación para la realización del mismo, así también, por la confianza que depositó en nuestra persona y por brindamos su amistad y respaldo.

**M. V. Z. Sergio L. Schweminski Benítez**, con profundo agradecimiento por fomentamos con su ejemplo la perseverancia y superación profesional, asimismo, por su valiosa colaboración, apoyo y tiempo que nos brindó en la asesoría de este trabajo, sin olvidar sus sabios consejos siempre de amigo.

**Dr. Rogelio A. Alonso Morales**, por su gran ejemplo de constancia y desarrollo en su ejercicio profesional, para todos los que hemos tenido la oportunidad de conocerlo y laborar en el Laboratorio de Genética de la ahora División de Ciencias Veterinarias del Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias de la Universidad de Guadalajara.

**M.V.Z. Jorge Galindo García**, administrador general del rancho **Cofradía** de la Universidad de Guadalajara, por permitir y fomentar el desarrollo de gran parte de esta y muchas otras tesis profesionales del área agropecuaria, en dicha posta zootécnica,.

**M.V.Z Luis A. Guerrero Quiroz**, y todas las personas que han participado históricamente en el sostenimiento y desarrollo del Laboratorio de Genética de la ahora División de Ciencias Veterinarias del Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias de la Universidad de Guadalajara.

**M. en C. Ana Isabel Vásquez Velásquez**, del área de Citogenética del Centro de Investigaciones Biomédicas de Occidente (CIBO), quien con su extraordinaria calidad humana nos brindó su amistad y realizó valiosas sugerencias para obtener las preparaciones cromosómicas de este estudio.

**Dr. Francisco Javier Perea Díaz**, del área de Genética del Centro de Investigaciones Biomédicas de Occidente (CIBO), por su sincera y desinteresada ayuda al compartir su tiempo y sus valiosos conocimientos profesionales con quienes tenemos la dicha de ser sus amigos.

**Dr. José de Jesús Torres Galván**, presidente de la Clínica de Alteraciones de la Diferenciación Sexual (CADS), del Hospital Civil de Guadalajara, quien con su extraordinaria calidad humana y profesional dirige estupendamente este grupo de especialistas.

**Dr. Felipe de Jesús de la Cerda Camacho**, jefe del área de servicio de Anatomopatología del Hospital Civil de Guadalajara, por sus valiosas aportaciones brindadas en el estudio histológico de esta tesis, compartiendo desinteresadamente su preciado tiempo, sus conocimientos y gran experiencia, en dicha parte de la investigación realizada.

A los integrantes de nuestro honorable jurado académico: **M. V. Z. Abel Buenrostro Silva**, **M. V. Z. Carlos Fregoso Aguayo**, y **Dr. Alfredo Corona Rivera**, quienes en el aula o fuera de ella nos han demostrado su estupenda formación profesional.

A nuestros **verdaderos maestros** que gracias a su talento y preparación profesional realmente son dignos de impartir docencia.

A todos nuestros compañeros de la **38ª Generación**, "Lic. José de Jesús González Gortazar" con quienes directa o indirectamente compartimos cinco años de preparación académica.

RESUMEN	i
INTRODUCCION	1
MECANISMOS DE DETERMINACION SEXUAL	3
<i>Determinación Sexual Ambiental</i>	4
<i>Determinación Sexual Gonosómica</i>	7
TRASTORNOS DE LA DIFERENCIACION SEXUAL PRIMARIA Y SECUNDARIA	23
<i>Intersexualidad en el Bovino Doméstico</i>	39
<i>Síndrome Freemartín en el Bovino Doméstico</i>	41
<i>Freemartinismo y otros Estados Intersexuales en Diferentes Especies</i>	53
TECNICAS DE DIAGNOSTICO DEL SINDROME FREEMARTIN EN BOVINOS	60
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	63
JUSTIFICACION	64
OBJETIVOS	65
MATERIAL Y METODOS	66
RESULTADOS	67
DISCUSION	91
CONCLUSIONES	97
BIBLIOGRAFIA	98

## RESUMEN

En el presente trabajo se analizan algunos fenómenos involucrados en el desarrollo y manifestación de una entidad intersexual del ganado bovino doméstico, el **síndrome freemartin**. A través del **análisis citogenético** se diagnosticaron como freemartins cinco individuos seleccionados de un total de 10 bovinos (*Bos taurus*) que tenían el antecedente de proceder de partos múltiples heterosexuales; asimismo, se estudiaron anatomopatológicamente dos de los individuos. La presencia de quimerismo cromosómico (60,XX/60,XY) caracterizó a los animales estudiados, excepcionalmente un individuo mostró tan sólo células 60,XY. En tanto que los hallazgos anatomopatológicos de los dos freemartins estudiados hasta su sacrificio exhibieron masculinización del tracto reproductor con únicamente tejido testicular en las gónadas.

## INTRODUCCION

La *Citogenética* surge como una ciencia híbrida de la *Citología* y la *Genética*, encargándose de estudiar la forma y particularidades de los cromosomas; el comportamiento cromosómico en mitosis y meiosis; las mutaciones cromosómicas, los factores que las determinan y su repercusión en el fenotipo (32, 73, 127).

La presentación convencional de las características numéricas y morfológicas de los cromosomas de una especie se denomina **cariotipo**. Este obtenido por estudio microscópico a partir de una preparación de células en división de un individuo (1, 71).

El perfeccionamiento de las técnicas para la obtención de cariotipos, como el descubrimiento del choque hipotónico por Hsu (1952); así como el cultivo de tejidos por Tjio y Levan (1956) y el cultivo de linfocitos de sangre periférica utilizando colchicina y fitohemaglutinina por Moorhead (1960), permitieron el auge del conocimiento de la estructura y número de cromosomas de diversas especies, incluyendo al hombre (5, 73).

El bandedo cromosómico es un grupo de técnicas que permite conocer con cierta precisión cada cromosoma, así como observar sus posibilidades reorganizacionales, ya que pueden romperse, perder fragmentos o cambiar segmentos con otros cromosomas; la identificación se logra gracias a que las bandas revelan zonas de cromatina que se tiñen de manera característica en cada cromosoma (**bandedo C, G, N, R, entre otros**). Estas técnicas surgen en 1971 y han resultado de importancia fundamental para los estudios citogenéticos, ya que a través de ellas ha podido establecerse una correlación clínico-patológica más adecuada (5, 26, 135).

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 (44, 157).

En muchos sistemas biológicos simples, la reproducción puede ser lograda por un individuo único, en muchos sistemas complejos la reproducción requiere la interacción de dos individuos diferentes respecto al sexo, ya que la presencia del dimorfismo sexual en las especies, ha sido regulada por diferentes factores según la escala evolutiva (111).

La reproducción sexual con algún grado de dimorfismo gamético es casi universal entre los organismos eucariotas. Los gametos de macho y hembra pueden ser producidos por el mismo individuo (**Monocia o**

**Cosexuality**) o por individuos separados (**Diocia o Gonocoria**). Muchas de las especies animales terrestres son dióicos (unisexuales), v. gr. los animales vertebrados, pero la cosexuality esta difundida entre invertebrados marinos y plantas terrestres (23, 126).

En mamíferos el organismo homogamético (**XX**) corresponde al sexo femenino y el heterogamético (**XY**) al masculino. En aves, reptiles, 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** (23, 25, 29, 108, 157).

El proceso de la diferenciación sexual comienza con la fecundación, en donde, en mamíferos, el macho heterogamético, fecunda un óvulo de la hembra homogamética (**determinación singámica del sexo**), y el cigoto se diferenciará como hembra o como macho, respectivamente, siempre y cuando el resto de los factores de la diferenciación sean normales (101, 106, 134, 176).

Debido a que en aves, reptiles y algunos peces y anfibios el sexo heterogamético pertenece a la hembra, el sexo en ellos no es determinado en la fertilización, pues todos los espermatozoides portan un mismo cromosoma sexual, sino es determinado en la ovulación (**determinación progámica del sexo**) de un gameto femenino portador de un gonosoma **Z o W**, (80, 106, 157).

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 (134).



## MECANISMOS DE DETERMINACION SEXUAL

La regulación del dimorfismo sexual en las especies 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 (29, 60, 134, 158, 159).

La diferenciación gonadal en los vertebrados amnióticos es controlada por uno de dos mecanismos: determinación sexual genotípica (GSD) o determinación sexual ambiental (ESD). 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 (68).

## DETERMINACION SEXUAL AMBIENTAL

El fenómeno de determinación sexual ambiental (ESD) presente en reptiles fue dado a conocer por Charmier (1966) en el lizard *Agane agana*. Aunque la ESD no es gamético, es finalmente controlado por genes. Organismos con ESD tienen el potencial para ser de cualquier sexo, algunas características ambientales determinan cuales genes están encendidos (157).

En reptiles, sólo en una proporción de especies se han identificado cromosomas sexuales y, en estos hay especies en que los machos o las hembras son heterogaméticos. En otras especies, los cromosomas sexuales están aparentemente ausentes (108).

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 (108).

La temperatura de incubación determina el sexo (TSD) en los reptiles. En muchas especies, un rango de temperatura de incubación produce sólo machos y otro rango produce sólo hembras. Sin embargo, mientras temperaturas cálidas producen preferentemente machos y temperaturas frescas producen preferentemente hembras en algunos lagartos y cocodrilos, el patrón opuesto se presenta en muchas 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 (20, 165).

En lagartos, temperaturas de incubación a 24°C producen hembras y a 32°C producen machos, mientras temperaturas intermedias producen machos y hembras. Los caimanes se parecen a los lagartos en la determinación del sexo, excepto que su rango de temperatura es un poco más alta (108).

En el gecko leopardo (*Eublepharis macularis*), el sexo gonadal y morfológico es determinado por la temperatura de incubación, con temperaturas relativamente calientes (32°C) resultan en su mayoría descendientes machos y en temperaturas relativamente frías (26°C) resultan preferentemente hembras (68).

Viets y col. (1993), en su investigación en el gecko leopardo reportaron que las hembras son producidas exclusivamente (26 - 28°C) o predominantemente (81% a 29°C; 71% a 30°C) en temperaturas de incubación frías. Los machos predominaron en temperaturas intermedias (31 - 33°C), con 31.5°C se produjeron mayormente machos (88.9%). En temperaturas cálidas las hembras predominaron otra vez (94% a 34°C) o exclusivamente (35°C). La temperatura de incubación letal máxima constante para esta especie parece ser arriba de 35°C.

Gutzke y Crews (1988), observaron que en el gecko leopardo 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 sitio neutro y ninguna de las hembras de 32°C puso huevos durante el estudio de 2 años. Los niveles de hormonas esteroides fueron medidos por Radioinmunoensayo (RIA) 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 (68).

Viets y col. (1993), reportaron en el gecko leopardo 12 hembras maduras de 14 nacidas de una incubación a 32.5°C, las cuales en edad reproductiva produjeron 35 descendientes viables. En adición, reportaron 5 hembras de 6 incubadas a 34°C, las cuales produjeron descendencia viable: 39 huevos fértiles, 20 descendientes viables y 19 huevos incubados hasta el momento de su investigación.

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 (68).

En la tortuga mapa (*Graptemys ouachitensis*), temperaturas altas (30.5°C o más cálidas) producen hembras, y temperaturas bajas (28°C o más frías) producen machos (20).

Una medición simple del potencial de una temperatura se obtiene del porcentaje de sexos observado en embriones incubados a lo largo del desarrollo en esa temperatura, sin embargo, si dos temperaturas producen 100% hembras, cualquier diferencia en potencia es obscura por que el porcentaje sexual tiene ganado su límite y no puede incrementarse más allá en respuesta a incrementar el potencial femenino (20).

Bull y col. (1990), incubaron huevos de tortugas mapa (*Graptemys ouachitensis*) a una temperatura inicial de 26°C por 31 días en etapa 18 ( $\pm 1$ ), que es cuando un embrión ha completado aproximadamente el 50% de su desarrollo y revela ya muchas características de tortuga, como caparazón, plastrón, extremidades y dígitos, posteriormente a algunos embriones se les cambió la temperatura a 31°C para completar su desarrollo, a otros se les cambió a 32.5°C, en tanto que otros se mantuvieron a 26°C (**determinación masculina**). Un segundo grupo se utilizó de control a 31°C (**determinación femenina**). Todos los productos que eclosionaron de 26°C (17) fueron machos al igual los del cambio de 26°C a 31°C (13), y los de 31°C (8) fueron hembras, sin embargo, en los que tuvieron una segunda temperatura de 32.5°C el 77.8% (14) fueron hembras y el 22.2% (4) machos. Con esto determinaron un particular efecto cuantitativo de expresión génica en la temperatura de incubación en la determinación sexual en un reptil, ya que el cambio de temperatura para machos (26°C) a temperatura para hembras (32.5°C), tienen un efecto de determinación femenina mayor.

## DETERMINACION SEXUAL GONOSOMICA

Los factores ambientales no afectan la diferenciación gonadal de los mamíferos. De esta manera en 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. Así inversiones sexuales sólo se han logrado en la zarigüeya (3, 16, 63, 86).

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 X esencial para la viabilidad, y así la presión evolutiva tiende a mantener al X intacto. Sin embargo, en el pez *Oryzias latipes*, los embriones XY, con estrógenos pueden sufrir reversión sexual, resultando en hembras fértiles, pudiendo ser apareadas con machos XY y originando descendencia masculina YY viable, así es también demostrado que en este organismo el cromosoma X no es requerido para la viabilidad de estos peces. Claramente las funciones enzimáticas codificadas por el cromosoma X, están también representadas en el Y, hecho que fuertemente sugiere que los cromosomas sexuales surgieron de un cromosoma ancestral común (63).

Jost (1947), 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 o gonadal, 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 retenidos (15, 86, 108, 133, 176, 177).

Jost (1952), concluyó que todas las características sexuales secundarias masculinas son controladas por las hormonas sexuales producidas por el testículo (**diferenciación sexual secundaria**), 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 ualabi, han sido detectadas antes de la diferenciación gonadal (158, 176).

En marsupiales, como en mamíferos euterios el cromosoma Y es el determinante del testículo (32). Sin embargo, en los marsupiales el desarrollo inicial del escroto, la bolsa y la glándula mamaria parece no estar controlado por hormonas gonadales (15).

O Wai-Sum y col. (1988), mediante un estudio histológico en canguros embriones (*Macropus eugenii*) 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 en marsupio en la zarigüeya de Virginia (*Didelphis virginiana*) y de canguro wallabie (*Macropus eugenii*), no causa estimulación escrotal, ni inhibe glándula mamaria o 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.

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 genotipos XO mueren antes del nacimiento. La frecuencia de este complemento al nacimiento es de 1 en 2500 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 (134).

La primera distinción morfológica e histológica entre los futuros machos y hembras es el desarrollo de la cresta gonadal hacia testículo o hacia ovario (108).

Las células germinales constituyen un clon de células potencialmente especializadas, las cuales se diferencian muy tempranamente y necesitan un órgano adoptivo para desarrollarse. Las células germinales primordiales 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 (27).

Existe continuidad entre las líneas de células germinales del embrión y las del adulto. 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 (3).

Los elementos somáticos y las células germinales de la gónada madura surgen de diferentes tejidos embrionarios, aquellos de la cresta mesonéfrica y estos del vitelo del saco endodérmico (76).

Desde el punto de vista embriológico la gónada se forma por dos tipos de células: células somáticas de origen mesodérmico y células germinales primordiales, que por su temprana diferenciación pueden considerarse de origen autónomo (86).

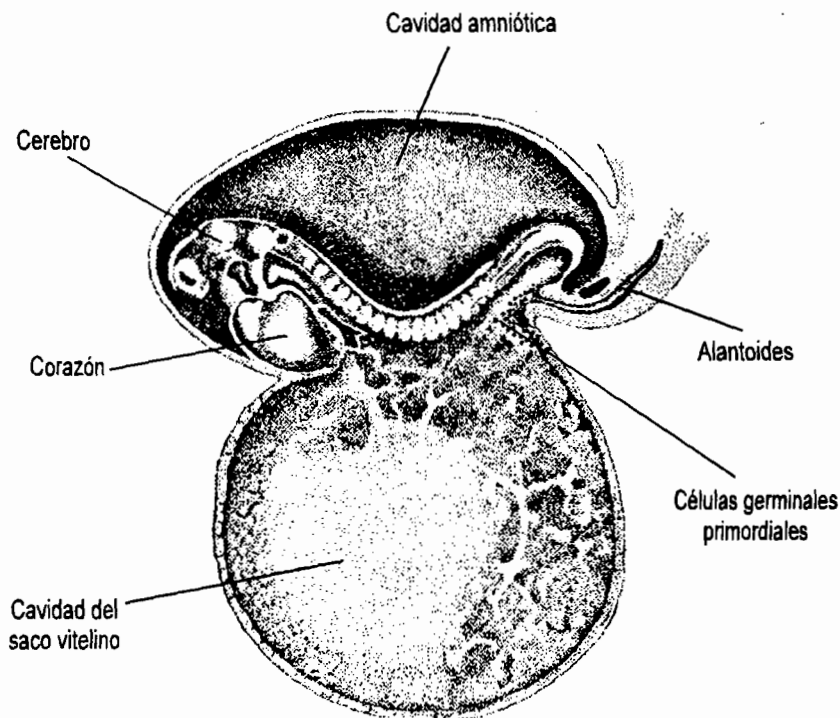


Fig. 1. Dibujo de un embrión humano de tres semanas. Las células germinales primordiales (puntos negros) están agrupadas en la pared superior del epitelio del saco vitelino y en la pared ventral del intestino que se encuentra en desarrollo. (Modificado de E. Witschi, *Contr. Embriol.* 32, 69, 1948).

La gónada de mamíferos está compuesta 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, de las cuales se piensa que derivan de una línea progenitora común), células esteroidogénicas (**células de Leydig** en el macho y **de la teca interna** en la hembra) y células de tejido conectivo (15).

La interacción entre las células germinales y los elementos somáticos de una gónada es crítica para el éxito de la fertilidad del animal. Los elementos somáticos proveen un ambiente donde las células germinales pueden madurar (76).

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 estragonadal, capacidad de migración, habilidad de establecer contacto con células somáticas y capacidad de proliferación (86).

En el humano se ha fundamentado el sitio de la primera aparición de células CGP que ocurre a los 22 días de vida embrionaria en el endodermo del alantoides (86, 109). Durante el plegamiento del embrión, la parte dorsal del saco vitelino es incorporada dentro de éste. Así, se sabe que cerca de los 30 días después de la fertilización, las células CGP inician su migración por la pared posterior del saco vitelino (mesenterio dorsal), desde el endodermo del intestino a la región en la que están desarrollándose los riñones (mesonefros) y de ahí al primordio (cresta o esbozo) gonadal adyacente y toman una colocación cortical o medular hacia la 6a. semana (3, 76, 109, 133, 86). 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 células CGP o sus derivados degeneran después de terminar su migración (3, 86).

Si las células CGP en su migración, no llegan a las crestas genitales, las gónadas no se desarrollan, manteniéndose en estado indiferenciado. Por ello las células CGP tienen una influencia inductora sobre el desarrollo de la gónada en ovario o testículo (132).

Las células 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 (15).

La migración de las células CGP se realiza por translocación pasiva y por desplazamiento amebode activo. 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 células 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. Es obvio que debe existir un sistema por el cual las células somáticas ubicadas en la región de las futuras crestas genitales poseen y/o emiten señales específicas que atraen y retienen a las células germinales (86).



La mayoría de las células germinales en mamíferos presenta una actividad amiboidea y posiblemente quimiotáctica (76). Algunos estudios indican que por lo menos algunas células 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 (3).

La migración de células germinales en la corriente sanguínea permite el intercambio de células germinales entre gemelos dicigóticos en los que la circulación placentaria se fusione antes de que las células germinales 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 (3).

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 que las células germinales se transforman en espermatozoides u oocitos de acuerdo con el sexo genético de la gónada en que se instalan; en estos animales es factible la inversión sexual con la administración de esteroides o con factores del medio ambiente, como los cambios de temperatura (3, 76).

Con las técnicas para la formación de ratones mosaicos genéticos (a menudo llamados ratones quimera), han sido producidas gónadas genéticamente mezcladas. Mintz, después de la examinación de la descendencia de un gran número de animales, observó que no hubo evidencia de que células XX llegaran a formar espermatozoides. También identificó un ratón macho quimera con un mínimo de 95% de sus células somáticas conteniendo células XX, mientras las células germinales todas fueron XY (76).

Las quimeras XX/XY experimentales de ratón, usualmente desarrollan como macho y en éstas la proporción equitativa de células XX y XY en las células de Leydig es similar a aquella 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 o TDF; del inglés Testis Determining Factor (15, 158).

La transformación de los conductos de Wolff en el aparato reproductivo del macho, comienza subsecuentemente al inicio de la regresión de los conductos de Müller (157).

En la gónada indiferenciada o bipotencial, el sexo está bajo el control de 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 (108, 109), y entonces la presencia de testículo dirige el desarrollo en dirección a macho, ya que causa el arresto del desarrollo de los genitales externos femeninos y dirige la complejión de los ductos internos masculinos como también el cierre perineal 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 (111, 157).

En el humano la formación de la cresta gonadal se inicia alrededor del día 32 de la gestación y 3 días más tarde se establece la formación de cordones epiteliales o sexuales. La diferenciación del testículo ocurre alrededor del día 40, en cambio la formación de los primeros folículos se inicia alrededor de la 21a. semana de gestación (86).

En el bovino la gónada comienza a diferenciarse hacia testículo cerca de los 40 días de gestación. Con este desarrollo las células de Sertoli secretan una hormona llamada Sustancia Inhibidora de los Conductos de Müller (95).

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 la agregación interna de cordones espermáticos en el testículo fetal (158). En humanos esto ocurre entre la 6a. a 7a. semana de gestación y en el bovino cerca de los 40 días postgestación (95, 134). El ovario fetal no muestra características de desarrollo hasta cerca de la 10a semana de vida intrauterina. Los órganos genitales externos quedan completamente diferenciados hasta la 12a. semana de gestación (109).

Las células 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 la Sustancia Inhibidora de los Conductos de Müller (MIS), e induce el desarrollo de los conductos de Wolff, que originan los conductos deferentes, el epidídimo y las glándulas accesorias por acción de la testosterona producida en las células de Leydig (79, 177, 133).

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 (86).

En mamíferos el primer estado de diferenciación testicular involucra el arreglo de las células de Sertoli alrededor de los gonocitos y su diferenciación esta correlacionada con el inicio de la actividad Anti-Mülleriana testicular. Las células de Leydig aparecen posteriormente en el intersticio y su diferenciación esta correlacionada con el comienzo de la estereidogénesis (162).

Tran y col. (1977), probaron la actividad Anti-Mülleriana testicular en fetos porcinos entre 27 y 34 días de gestación. El tejido testicular fue mantenido en cajas de Petri con medio de cultivo adicionándosele tractos reproductivos de rata de 14 días de edad sin gónadas, la prueba fue terminada después de 3 días por fijación, la actividad Anti-Mülleriana incrementó sostenidamente de niveles insignificantes en el día 27° a valores máximos en el día 33°.

La diferenciación gonadal de un número pequeño de células forman la gónada sexual específica mediante el mensaje genético que posteriormente es amplificado para la secreción específica de sustancias que causan la diferenciación en la línea sexual, sin embargo, los tejidos reservan la habilidad para responder a las hormonas sexuales, esta respuesta posteriormente mantiene y amplifica el mensaje genético en la sexualidad adulta (111).

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 le facilita penetrar por difusión a las células andrógeno sensibles o dependientes. En el interior la testosterona es convertida a su forma  $5\alpha$ -reducida, formándose la  $5\alpha$ -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 (15, 31, 79, 133, 176). 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 esta 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 culminando en la síntesis ribosomal de proteínas, expresando en esta forma su efecto androgénico (86, 130, 176).

CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS  
BIBLIOTECA CENTRAL

Mientras la testosterona induce la virilización de los conductos de Wolff, la dihidrotestosterona 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 prostática, respectivamente (133). Esta conversión metabólica es mediada por la presencia de la 5 $\alpha$ -esteroide reductasa, enzima de localización citoplasmática y nuclear dependiente de NADPH y con regulación génica autosómica. En tanto que el seno urogenital dará lugar a la próstata y a la uretra prostática (61, 86, 176).

En ausencia del cromosoma Y, las células CGP con dotación cromosómica XX, inducen el desarrollo de la porción cortical de la gónada indiferenciada que se transforma en ovario. En ausencia de testículo, los conductos Wolffianos involucionan al no existir estímulo para su desarrollo. Y por ende se desarrollan libremente los conductos Mülllerianos al no existir la MIS, los cuales originan las trompas, el útero y el tercio superior de la vagina (7, 79, 95, 133, 177).

La foliculogénesis se realiza por medio de una fragmentación de los cordones epiteliales, de manera que gradualmente cada ovocito va quedando envuelto por una capa de células epiteliales cubiertas por una delgada lámina basal, siendo frecuente encontrar folículos unidos por una lámina basal común. La etapa termina con la formación de las tecas en torno a la lámina basal de los folículos y en el seno del tejido estromático. Las primeras células esteroidogénicas aparecerán en la teca interna del ovario (86).

Los cordones sexuales primarios no llegan a ser prominentes en la gónada femenina, se extienden dentro de la médula y forman un rudimento, el rete ovarii, el cual junto con los cordones sexuales primarios normalmente degeneran y desaparecen (109).

El epitelio superficial de la gónada femenina, a diferencia de lo que ocurre con la masculina, continúa proliferando (132).

Los cordones sexuales secundarios usualmente llamados cordones corticales, se extienden del epitelio de superficie del ovario en desarrollo, incrementan de tamaño e incorporan células germinales primordiales. Posteriormente los cordones sexuales se dispersan en grupos aislados de células llamadas folículos primordiales, cada uno de los cuales consisten en una oogonia derivada de una célula germinal primordial, forrada por una capa de células foliculares planas derivadas de los cordones corticales. En el caso del humano esto ocurre hacia la 16a. semana de gestación (109).

La mitosis activa de las oogonias ocurre durante la vida fetal produciendo miles de estas células germinales primitivas. No existe reproducción de oogonias postnatalmente. Aunque muchas oogonias degeneran antes del nacimiento, más o menos 2 millones llegan a ser oocitos primarios. Cuando el oocito primario llega a estar cubierto por una capa de células cuboidales, la estructura es llamada folículo primario (109).

En el humano el número de oocitos alcanza su máximo ( $7 \times 10^6$ ) entre las semanas 18 a 22 de edad embrionaria, disminuyendo progresivamente, y al momento del nacimiento solamente existen 2 millones de células germinales de las cuales la mitad muestra signos de degeneración (86).

En la hembra normalmente los primordios de los genitales externos no reciben influencia androgénica, el **tubérculo genital** origina el clítoris, en tanto que las **prominencia** y los **pliegues genitales** permanecen separados a uno y a otro lado de la línea media, originando los labios mayores y menores, respectivamente. El seno urogenital da lugar a la porción anterior de la vagina y a la uretra (61, 133).

En el bovino la diferenciación sexual de la hembra comienza hasta cerca de los 60 días de gestación iniciando la elongación de la parte uterina de los conductos de Müller (95).

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 (95).

En 1959, el cromosoma Y, fue sugerido por primera vez como el determinante masculino en el hombre y el ratón, ya que aun los estudios de Jost (1959) hacen claro que el cromosoma Y codifica para un mediador de la determinación sexual, necesario y específico para el desarrollo de la gónada masculina, por lo que se llamó **Factor de Determinación Testicular**, TDY en humanos y Tdy en ratones (15, 103). Siete años después la investigación en humanos fué enfocada al brazo corto de este cromosoma. El descubrimiento de una secuencia repetida de DNA altamente conservada, específica-sexual en serpientes, se observó esta representada en el cromosoma Y del ratón, y dirigió mucha especulación en su posible papel en la determinación sexual. Pero esta secuencia demostró ser apenas representativa en el cromosoma Y humano (103).

El descubrimiento de ratones hembras X0, 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 (63).

En mamíferos el cromosoma Y posee una pequeña parte, quizá un solo gen, responsable de la inducción testicular en la gónada indiferenciada, gen conocido como factor de determinación testicular o TDF, correspondiente en el ratón al *Tdy* (87, 108, 134).

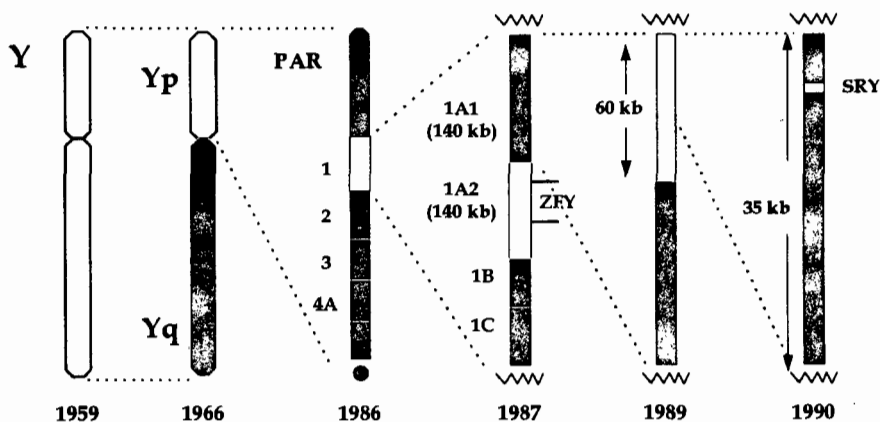


Fig. II. Treinta y un años en la búsqueda del Factor de Determinación Testicular. La región cromosómica blanca incluye al elusivo factor. La investigación se ha centrado de 30 - 40 millones de bases (1959) a menos de 250 bases que codifican al SRY (1990). Tomado de McLaren, A. *Nature*, 346: 216 - 217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

A mediados de los años 70's, por casi diez años, el antígeno H-Y, el cual codifica para un sistema inmunológico proteico establecido sólo en machos, fué considerado ser el agente primario de inducción testicular (86, 114, 158), pero éste al parecer fué subsecuentemente abandonado. Simpson y col. (1981), reportaron mediante hibridación de DNA, seis varones 46,XX antígeno H-Y negativos y dos mujeres 46,XY antígeno H-Y positivas (145). Posteriormente, en 1984 Anne McLaren descubrió un ratón mutante que completamente carecía del H-Y siendo indisputablemente macho y desarrollando testículos. En los pasados siete años, dos genes localizados en el brazo corto del cromosoma Y humano fueron postulados como candidatos para TDF (103, 108), descartando aún más al antígeno H-Y, ya que éste se localiza en el brazo largo del cromosoma Y (58, 158).

La mayoría de los machos son antígeno H-Y positivos y la mayoría de las hembras son antígeno H-Y negativas. Hembras XY con feminización testicular son positivas, pero hembras XY con disgenesia gonadal pueden ser negativas o positivas. Muchas hembras con síndrome de Turner (X0) son positivas, incluyendo a aquellas con condición cromosómica 45,X. En el ratón y en el lemming de la madera, los estados equivalentes son también positivos. Machos XX y hermafroditas verdaderos XX son positivos al igual que algunas madres de machos XX. Estos hallazgos podrían tomarse para indicar que el gen estructural para el antígeno H-Y no está localizado en el cromosoma Y (27).

Probablemente el gen antígeno H-Y este localizado cerca de la porción terminal del brazo largo del cromosoma X por las siguientes razones:

1. Presencia de antígeno H-Y en individuos 45,X.
2. Presencia de antígeno H-Y en hembras con una deleción que compromete sólo al extremo de Xp.
3. La ausencia del antígeno H-Y en presencia de un cromosoma Y, en una hembra con una duplicación de la misma región 46,Xp + Y (27).

Page y col. (1987), a partir de una mujer XY con pérdida de un segmento de 140 kb, reportaron el aislamiento en el cromosoma Y humano, de un gen que codifica una proteína con varios dedos de zinc (giros de aminoácidos formados por cationes de zinc, "zinc-finger", y por lo que es llamado ZFY), como 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 (24, 87, 108, 134).

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 en la diferenciación embrionaria del testículo en el ratón, sin embargo, ninguno de los dos genes es expresado en el testículo embrionario del mutante  $W^s / W^s$ , el cual carece de células germinales. Estas observaciones excluyen al Zfy-1 y al Zfy-2 como candidatos para el TDF del ratón (22, 87).

El ZFY como candidato a ser el TDF, fue también descartado con el reporte de Palmer y col. (1989), con base en pruebas de PCR (**Polymerase Chain Reaction**) y corrimientos de Southern 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 (45, 103, 108, 116).

La única discrepancia entre los hallazgos de Palmer y col. (1989), y la descripción de Page y col. (1987), es en una hembra con translocación t(Y;22) la cual debería incluir la región del lindero pseudoautosómico del cromosoma Y, pero es posible que la translocación fuera compleja o, alternativamente el TDF podría haber sido inactivado por efecto de posición (22, 116).

El 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 (103).

La expresión del Zfy esta claramente asociada con células germinales en testículos adultos, porque su transcripción no fue detectable en material testicular adulto carente de células germinales (87).

Hay varios argumentos en contra del ZFY como Factor de Determinación Testicular (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 (45, 87).

Mardon y Page (1989), no establecieron evidencia de transcripción de Zfy-1 en RNA preparado de testículo de ratón recién nacido. Lovell Badge (1989), no encontró evidencia de transcripción en RNA preparado de cresta gonadal en el momento inicial de la determinación sexual (45).

Los análisis de amplificación de DNA 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, no es el Tdy (87).

Sinclair y col. (1990), aislaron otro gen en la región Yp, llamado SRY. 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 y col. (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 (103, 108).

Este supuesto gen determinante del testículo se localiza en el cromosoma Y, y ha sido delimitado en el humano a 35 kb en la región cercana al límite pseudoautosomal. El gen SRY esta localizado en esa región y es tan conservado evolutivamente como el cromosoma Y en varios mamíferos estudiados (24, 118).

En el ratón el Tdf esta 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 (45).

La posición del TDF en el cromosoma Y humano ha sido definida por análisis de los genomas de varones XX y hembras XY, generado por intercambio genético anormal entre los gonosomas en la meiosis masculina. De esta forma el TDF ha sido localizado cerca de la región pseudoautosómica compartida por los cromosomas sexuales (116).



Goodfellow y Lovell-Badge (1991), 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 (no todas) se desarrollaron como machos con testículos normales y comportamiento masculino cuando se enjaularon con hembras receptoras (24).

El Sry, como se le designa en el ratón, es expresado en el testículo adulto, y en la cresta urogenital alrededor del 11.5 d.p.c., el periodo inmediatamente precedente a la diferenciación sexual, ya que en los días antecedentes las crestas gonadales del macho y de la hembra son indistinguibles (87, 89, 103.).

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 al 11.5 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 (89).

Koopman y col. (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 a los 13.5 d.p.c. a 17.5 d.p.c. Aparentemente la expresión del Sry corresponde precisamente con el comienzo de la diferenciación testicular.

Koopman y col. (1990), también analizaron RNA de tejido fetal a los 11.5 d.p.c., observando que de 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. Y al analizar 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. Y 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 de 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 (89).

El SRY codifica para una proteína miembro del grupo de alta movilidad (HMG) de proteínas ligadas al DNA (15). Hasta ahora, todas las mutaciones en el gen SRY asociadas con inversiones sexuales han sido localizadas en la caja HMG (118). Ninguno de los puntos de mutación de SRY en mujeres XY esta fuera del dominio de la HMG (15).

Foster y col. (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 aminiácidos de la caja HMG, que ambos genes de marsupiales muestran extensa homología para la secuencia humana. El *S. Macroura* mostró 65% de identidad y la secuencia del *M. Eugenii* 70% de identidad. Por lo anterior es esperado que el SRY marsupial sea necesario para la formación del testículo, pero la confirmación de está hipótesis requiere de estudios funcionales.

Payen y Cotinot (1993), demostraron que dentro de la caja HGM en la secuencia SRY del humano, el DNA genómico de machos y hembras de la familia *Bovidae* fue amplificado por PCR, posteriormente los fragmentos amplificados fueron secuenciados, los 200 pb de la secuencia de cada producto PCR fueron determinados. 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.

Del tiempo de la fertilización hasta después de la formación del blastocisto, el embrión macho tiene un sólo cromosoma X funcionando, mientras que la hembra tiene dos cromosomas X en función. Posteriormente en la hembra uno de los dos cromosomas sufre un proceso de inactivación. La inactivación de un segmento largo del cromosoma X posiblemente iguale la cantidad de material genético en ambos sexos. En las células somáticas la inactivación del X ocurre después de la formación del blastocisto y antes de la implantación de este en el pared uterina (76).

La inactivación de un cromosoma X en la hembra resulta en la formación de una partícula heterocromática adyacente a la membrana nuclear llamada cromatina X o corpúsculo de Barr. Este proceso mantiene el equilibrio génico en ambos sexos al igualar el contenido de DNA cromosómico activo (86).

Según la hipótesis de Lyon (1961), la inactivación del cromosoma X ocurre al azar, sin embargo, cuando uno de los cromosomas X es anormal, éste se inactiva preferentemente. De manera similar en polisomías del X, son inactivados los X supernumerarios (86, 139).

Es posible estudiar la duplicación cromosómica en el periodo *S* del ciclo celular, mediante la incorporación de timidina marcada con tritio. Algunos cromosomas replican tempranamente y muestran escasa incorporación de material radioactivo, y otros replican en forma tardía e incorporan cantidades apreciables de timidina tritiada. Se sabe que los segmentos heterocromáticos replican tardíamente, y al parecer corresponden a material genético que no participa directamente en la síntesis proteica (135).

El brazo Xp contiene genes que escapan a la inactivación. Análisis del cromosoma X han demostrado que deleciones en el brazo Xp del segundo cromosoma X ocasionan disgenesia gonadal típica de los fenotipos X0 en mujeres. Estas observaciones son congruentes con la proposición de Fergusen-Smith que una porción de Xp no esta sujeta a inactivación (63).

Schempp y Meer (1983), en un estudio de cromosomas prometáfásicos de replicación tardía en el humano, demostraron que las regiones Xp 22.13 → Xp 22.3 y Yp 11.2 → Yp 11.32 replican sincrónicamente, por lo que postularon una homología funcional en el extremo p terminal de los gonosomas. Además el hecho de que estas regiones repliquen temprana y sincrónicamente en ambos cromosomas X, sugiere que estas regiones escapan a la inactivación. También localizan un segmento de replicación temprana en el brazo largo del cromosoma X en Xq 13.1, el cual quizá este relacionado para la localización de genes en esta región responsable para el control de inactivación-X (centro de inactivación-X), y si los productos de estos genes son efectivos sólo en dosis doble los dos homólogos deberían estar necesariamente activos.

En términos evolutivos la homología de replicación temprana de las regiones Yp y Xp pueden interpretarse como un remanente conservado en el curso de la evolución de la diferenciación de los autosomas homomórficos originales hacia cromosomas heteromórficos sexuales (139).

Durante la meiosis femenina ambos cromosomas se requieren activos en las células germinales para asegurar la diferenciación ovárica y la fertilidad (86). En machos el cromosoma X parece ser inactivo en el espermatozoides primario, ya que la presencia de un cromosoma X activo interferiría la meiosis (76).

La ausencia de intercambio genético esta asociada con falta de homología genética entre las regiones relevantes de los cromosomas X y Y (23).

Es conocido que existe recombinación entre los gonosomas X y Y de placentarios, en forma término-terminal entre Xpter y Ypter en la meiosis masculina. Los *loci* aquí contenidos se denominan pseudoautosómicos, asumiéndoles una herencia igual a la de los autosomas (29, 116, 134, 157, 158). El gen "dedos de zinc" del cromosoma Y (ZFY) y el del cromosoma X (ZFX) humanos hibridizan fuertemente, quizá porqué ambos están cercanos a la región pseudoautosómica (45).

La homología existente entre las regiones terminales de los brazos cortos de los gonosomas es soportada por dos hallazgos citogenéticos:

1. Existen segmentos de apareamiento, que conducen a la formación de un complejo sinaptonemal en el paquiteno temprano de la espermatogénesis.
2. La sincronía en replicación temprana en estas regiones terminales en cromosomas sexuales prometafásicos, ha sido demostrada (139).

En el humano, el bovino y el cerdo, recombinación no homóloga entre gonosomas aparentemente ocurre abajo del lindero pseudoautosómico, lo cual no es sorpresa, pues el complejo sinaptonemal X:Y puede extenderse al centrómero del Y (45, 170).

## TRASTORNOS DE LA DIFERENCIACION SEXUAL PRIMARIA Y SECUNDARIA

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 sexual 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 (60, 157, 177).

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 (15).

En mamíferos, el cromosoma Y es el determinante masculino; individuos XY, XXY, XXXY, son machos, mientras que individuos X0, XX, XXX, son hembras. Asimismo, en la diferenciación sexual, a nivel secundario (extragonadal), las características sexuales parecen no ser reguladas por acción directa de los genes, sino por las hormonas sexuales producidas por las gónadas (15, 157).

Las gónadas de cada sexo también muestran considerables diferencias biosintéticas y secretoras; las secreciones primarias producidas por el ovario son estrógenos y progestágenos, mientras la principal secreción producida por el testículo son andrógenos. En cada sexo las secreciones gonadales causan cambios estructurales y de comportamiento que reflejan la función endocrina (111).

Si bien la diferenciación sexual se inicia con el sexo genético o cromosómico del cigoto que determina el sexo gonadal, la presencia de hormonas androgénicas a través de su acción sobre los órganos blanco define el sexo fenotípico, es decir, se desarrollan los genitales internos y externos acordes con el sexo genético y gonadal (101, 134).

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, incluyendo a la zarigüeya (*Monodelphis domestica*) y al humano (95, 107, 108).

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 (108).

Las causas por las que genéticamente surgen los trastornos de la diferenciación sexual se relacionan con algunos procesos de interacción entre genes, hormonas, receptores hormonales, diferenciación celular y morfogénesis (134).

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 como patrones de herencia mendeliana simple, autosómica dominante, autosómica recesiva o ligada al cromosoma X. Como ocurre en el humano en la hiperplasia suprarrenal congénita y el síndrome de feminización testicular (61, 134).

Un intersexo es definido como un animal con variaciones anatómicas congénitas que confunden el diagnóstico del sexo por diferentes grados de variación en la diferenciación de los órganos reproductivos, o por ser genéticamente de un sexo y fenotípicamente del otro (101, 123, 148).

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 (62).

Klebs (1876) introduce una clasificación de hermafroditas en el humano, la cual aún es usada en animales domésticos. En la cual un **hermafrodita verdadero** es 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 (54, 62, 101, 110, 177).

Moszkowicz (1936), eliminó el término de pseudo-hermafrodita, agrupó todos los estados intersexuales en tres formas: ambiglandular, testicular y ovárico. Esto fue justificado cuando los análisis cromosómicos revelaron que animales con un sólo tipo de gónada pueden ser intersexos (177).

El hermafroditismo verdadero se puede presentar de una de las siguientes maneras:

1. Bilateral: ovotestis en ambas gónadas.
2. Unilateral: ovotestis en una gónada y tejido testicular u ovárico en la otra.
3. Lateral o Alterno: tejido testicular en una gónada y tejido ovárico en la otra (153).

Aunque patrones gonadales diferentes han sido observados en humanos hermafroditas verdaderos XX, la mayoría de los pacientes presentan un ovario de un lado del abdomen y un testículo u ovotestis en el otro (9).

En la especie humana, en una distribución de las gónadas en 120 hermafroditas verdaderos XX: 47 tenían un ovario y un ovotestis, 32 un ovario y un testículo, 23 ovotestis bilateral, y 12 un testículo y un ovotestis. Así de un total de 240 gónadas, 161 tenían tejido testicular, y 103 de estos fueron en el lado derecho y 58 en el lado izquierdo (107).

En un estudio de determinación de DNA contenido en ovario derecho e izquierdo en fetos de mujer: en cerca del 50% de los fetos (21/43) el DNA del ovario derecho excedió un 15% o más al del lado izquierdo, en el 50% restante la diferencia fue menor al 15%, y sólo en un feto se observó una diferencia del 15% en favor de la gónada izquierda, como el contenido de DNA es proporcional al número de células se puede concluir que la gónada derecha es significativamente más avanzada que la izquierda en los fetos humanos (107).

El grado de masculinización de las estructuras de Wolff y de Müller, así como de los genitales externos, depende de la cantidad de tejido testicular funcional presente (9).

Los mecanismos responsables para la determinación testicular en sujetos hermafroditas verdaderos 46,XX no son conocidos (9).

La incompleta determinación testicular en pacientes con hermafroditismo verdadero y complemento cromosómico 46,XX y secuencias del SRY, puede ser explicado por:

1. Rearreglo o mutación en el *locus* SRY que ocurrió durante la translocación.
2. Disminución de la expresión del SRY debido a secuencias flanqueadas en el sitio de la translocación del cromosoma Y.
3. Ausencia de secuencias de Y, diferentes al SRY, las cuales pueden ser importantes para la determinación testicular.
4. Localización o extensión de inactivación del X, involucrando al X translocado (9).

Ferguson-Smith (1966), propuso que la variación de la extensión de la inactivación del cromosoma X con secuencias del Y, podría resultar en sujetos con determinación testicular completa (machos XX con testículos en ambos lados y determinación sexual masculina), o con determinación testicular incompleta, v. gr. individuos XX con hermafroditismo verdadero (9).

Se ha observado que la diferenciación genital hacia el fenotipo masculino es incompleta como resultado de alguna de las siguientes anomalías:

1. Deficiencia enzimática que bloquea la síntesis de testosterona.
2. Deficiencia de  $5\alpha$ -reductasa que implica la reducción de testosterona a dihidrotestosterona.

3. Ausencia completa o parcial así como alteraciones funcionales, de los receptores de andrógenos en las células blanco (134, 176).

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).

Varones XX y hembras XY son aparentemente el resultado de intercambios cromosómicos en secuencias no homólogas entre el brazo corto del cromosoma X y el brazo corto del cromosoma Y, aunque 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 (45).

Aproximadamente 1 en 20,000 hombres, es un varón XX, al ser estéril es consecuentemente identificado por su presentación en clínicas de fertilidad. Muchos de los varones XX portan una pequeña parte del cromosoma Y. Contrariamente, algunas mujeres XY tienen una pequeña delección del Y (118).

La localización de los genes determinantes del testículo en el cromosoma Y, se ha correlacionado con el cariotipo y el fenotipo de pacientes con aberraciones estructurales del Y (86).

Algunos análisis de anomalías estructurales del cromosoma Y en el hombre han sugerido que el brazo Yp porta los genes que dirigen la formación de testículo:

1. En varios ejemplos de isocromosomas del Y en el brazo largo (iYq) se ha observado que resultan en fracaso del desarrollo testicular.
2. La simple ausencia del brazo corto del Y (Yp), resulta en una mujer fenotípica con rasgos gonadales característicos del cariotipo X0.
3. Cuando existe delección de Yq pero Yp permanece intacto, el tejido testicular está claramente presente.
4. Translocaciones de Yp hacia el cromosoma X han sido asociadas con el síndrome de masculinidad XX (63).

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 (10, 81, 157).

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, así juzgando por la histología gonadal y por la producción hormonal, la presencia o ausencia del Sry es determinante sexual en el ratón (15).

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 (15).

Existen varias posibles explicaciones de las diferencias entre humanos XX+SRY y los ratones machos transgénicos XX+Sry. Quizás la más probable es que la transcripción SRY es reducida en los humanos XX+SRY, lo cual podría resultar de extensión de inactivación del X enfrente o cerca del punto de translocación X;Y. El ratón transgénico Sry podría no estar sujeto a este efecto si el gen está insertado en un autosoma (15).

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, las mujeres X0 son estériles (15).

La condición masculina 46,XX y el hermafroditismo verdadero 46,XX son dadas por determinación testicular en individuos humanos con dos cromosomas XX y ausencia del cromosoma Y. En la primera condición los sujetos exhiben determinación testicular completa, con genitales externos masculinos normales y desarrollo de los conductos sexuales masculinos. Por contraste los individuos 46,XX hermafroditas verdaderos exhiben incompleta determinación testicular y el subsecuente desarrollo de ambos testículos y tejido ovárico. Estos individuos usualmente tienen ambigüedad de genitales externos y una mezcla de los derivados de los conductos de Wolff y los de Müller (51).

Palmer y col. (1989), estudiaron tres varones XX con criptorquidismo y/o hipospadias, carentes de células germinales pero con células de Sertoli, y dos de ellos mostraron células de Leydig; además de un

hermafrodita verdadero XX con ovotestis bilateral y un útero (103, 108, 116). Algunos varones XX carecen del SRY (140 kb) y muchas hembras XY tienen este gen. Muchos hermafroditas verdaderos también carecen del SRY. Evidentemente el SRY tampoco es esencial ni suficiente para la diferenciación testicular (108, 158).

Berkovitz y col. (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 autosomal o del cromosoma X, que permita la determinación testicular en ausencia del TDF.

Fechner y col. (1994), estudiaron un sujeto con hermafroditismo verdadero 46,XX, quien fué educado como mujer. Ella tenía ovotestis bilateral, estructuras de los derivados de Müller y ambigüedad de genitales. Su cariotipo fue 46,Xdel(X). El DNA contenía secuencias de la región distal del brazo corto del cromosoma Y incluyendo secuencias del límite pseudoautosomal y el SRY, de acuerdo a las pruebas de PCR y de fluorescencia en hibridación *in situ* (FISH).

Probablemente secuencias del cromosoma Y fueron translocadas al cromosoma X delecionado y la incompleta determinación testicular sería el resultado de inactivación del cromosoma X translocado, ya que presumiblemente la replicación tardía del cromosoma X ocurre en el cromosoma X inactivo y conllevaría a una expresión parcial del SRY. En este mismo estudio un varón 46,XX con testículos bilaterales y genitales externos masculinos normales, así como secuencias del cromosoma Y mostró una replicación tardía en sólo 21 de 47 células estudiadas, en tanto que el hermafrodita verdadero la mostró en los 100 linfoblastos analizados. La extensión del rearreglo y la deleción del cromosoma X translocado en el hermafrodita verdadero 46,XX fue mayor que en el varón 46,XX, por lo que se presume que probablemente la inactivación no sería casual sino esperada en la protección de la nulوسomía para un gene crítico del cromosoma X (51).

A. 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 (54).

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 (15, 108).

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 autosomal o en genes determinantes sexuales ligados al X, asimismo, una minoría de varones XX, parecen no portar SRY (15).

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 (29, 134, 157).

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 (15).

El complejo receptor-testosterona es responsable de la virilización de los conductos de Wolff. Mientras que el complejo receptor-dihidrotestosterona induce virilización del seno urogenital y de los genitales externos durante la embriogénesis, estos resultados fueron sustentados por estudios genéticos de pacientes humanos con una forma rara de desarrollo sexual anormal ahora conocido como "deficiencia de 5 $\alpha$ -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 (176).

Normalmente el efecto combinado de genes del cromosoma Y y de otros cromosomas, resultan en el desarrollo precoz de la gónada rudimentaria, y así capacitan tempranamente al feto para producir sus propias hormonas sexuales en oposición a las maternas que lo rodean (108).

Ha sido propuesto que el desarrollo testicular en mamíferos depende del umbral de desarrollo requerido por las células de Sertoli para ser formadas en un estadio particular del tiempo, con un suficiente desarrollo gonadal, en donde si falla, dicha gónada entrara en la diferenciación hacia ovario (108).

La evolución debe haber influenciado el proceso de diferenciación cromosómica, se ha propuesto que originalmente ambos cromosomas sexuales eran homólogos. Así, el dimorfismo se estableció a expensas de un sólo miembro del par que acumuló los factores necesarios para el desarrollo del sexo heterogamético (86).

En los mamíferos el cromosoma X se ha conservado durante la evolución, manteniendo las secuencias originales, mientras el cromosoma Y sólo ha preservado algunos genes (29).

Ohno (1965) en su teoría del origen filogenético de los cromosomas sexuales, asume que el cromosoma X y el Y han evolucionado de un par de autosomas. 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 (101).

El cromosoma X se ha conservado durante la evolución de los mamíferos placentarios, algunos de los genes originales del X primitivo sufrieron mutaciones durante la evolución, adquiriendo funciones diferentes, pero muchos genes se conservaron en diferentes especies; como el gen responsable de la G6PD presente en el X del hombre, el caballo, el asno y la liebre europea, o el de la hemofilia A y B, y el factor IX de la coagulación que se localizan igualmente en el X del hombre, el perro y el caballo (134, 45).

Las mutaciones en los *loci* de los gonosomas tienen dramáticas consecuencias que son fácilmente reconocidas como hermafroditismo, pseudohermafroditismo o infertilidad (63).

En general se reconocen tres posibilidades principales por las cuales el sexo fenotípico puede ser alterado:

1. El fenotipo es influenciado por agentes químicos, especialmente las hormonas esteroides y sus análogos.
2. El desarrollo alterado observado en el síndrome adrenogenital posiblemente sea causado por un incremento de andrógenos endógenos que actúan sobre el feto.
3. La ausencia de gónadas en el embrión, consecuentemente provoca que éste se desarrolle como una hembra, por lo que es concebido que la feminización de un feto macho podría surgir si el testículo fetal no es plenamente funcional (138).

Una somera revisión de la extensiva literatura en Teratología, indica que las hormonas sexuales han sido asociadas, cuando son usadas durante la gestación, con una amplia variedad de condiciones clínicas adversas. Cerca de 250 casos de pseudohermafroditismo femenino han sido reportados asociados al uso de hormonas con potencia androgénica, pero la masculinización observada con estrógenos en algunas mujeres puede representar pseudohermafroditismo por estimulación adrenal. La feminización de varones, por progestágenos, no ha sido demostrada hasta el presente (138).

Zander y Muller (1953), reportaron el primer caso de una infante masculinizada supuestamente debido a la administración de un andrógeno por parte de la madre durante la gestación. Wilkins y col. (1958), publicaron un número de casos de masculinización debido a progesterona tomada durante la preñez. Los progestágenos pueden ser convertidos a andrógenos en la madre y el feto (138).

La actual incidencia de pseudohermafroditismo femenino seguido de la administración de progestágenos no es alta y quizá se deba a que sólo ocurra cuando la madre metabolice o degrade la hormona en forma anormal. La androgenicidad de ciertos progestágenos en el feto esta asociada con las diferencias de metabolismo fetal. La acción quizá también sea debida al porcentaje de esteroides que cruzan la placenta y la sensibilidad individual que los fetos puedan tener ante este factor (138).

Los defectos con andrógenos y progestágenos son comúnmente diagnosticados como "pseudohermafroditismo femenino" o como "masculinización adrenal". La anomalía básica es caracterizada por elongamiento fálico (clítoris hipertrófico) con o sin fusión labio-escrotal (138).

El grado de masculinización parece estar directamente relacionado con la dosis de hormona administrada. El tiempo de tratamiento hormonal en la gestación está correlacionado con el tipo de anomalía observada, la fusión labio-escrotal es exhibida sólo en aquellas instancias en las que la hormona es administrada antes de la 13a. semana de gestación. Mas precisamente el grado de fusión está directamente relacionado con la cantidad de hormona que dá la madre entre la 8a. a 13a. semana de gestación. Esto porque la diferenciación de los genitales externos toma lugar de los 2 ½ - 3 meses durante el desarrollo fetal. Por otro lado, el elongamiento fálico puede resultar después del tratamiento hormonal en cualquier estado de la vida postnatal (138).

Notablemente, el tratamiento estrogénico en especies animales durante la gestación también resulta en masculinización de descendientes hembras; sus conductos de Wolff son parcialmente diferenciados, y el desarrollado del seno urogenital es parcialmente inhibido (138).

Aunque una relación etiológica entre la ingestión hormonal y la feminización del varón (o masculinización incompleta, por ejemplo: genitales ambiguos o hipospadias), no ha sido probada aún, cerca de 45 casos de feminización en varones han sido reportados, prácticamente todos de tratamiento con progestágenos (138).

Aparentemente los andrógenos simulan la acción de la secreción testicular fetal en el seno genital y los genitales externos, pero no ejercen efecto apreciable en la diferenciación de los conductos genitales o de la gónada. El efecto en el hombre es comparado con lo obtenido experimentalmente en animales (138).

Mientras la formación y liberación de gametos esta confinada a la vida adulta, la producción y liberación de hormonas esta confinada desde el testículo fetal (108).

La inducción fenotípica en mamíferos es masculina y las secreciones del testículo fetal son necesarias para el desarrollo masculino, dos sustancias producidas en el testículo fetal son esenciales para este desarrollo (7):

1. **Hormona Anti-Mülleriana (AMH):** también conocida como Factor o Sustancia Inhibidora de los conductos de Müller (**MIF** o **MIS**), hormona glucoproteica formada por las células de Sertoli en el testículo fetal y del neonato, así como en las células de la granulosa del ovario postnatal (se expresa desde estadios tempranos del desarrollo fetal), que causa la regresión de los conductos de Müller en el macho y en el freemartin, hormonas esteroideas parecen influenciar su acción. La persistencia de los conductos de Müller es usualmente acompañada de falla de descendimiento de testículos (7, 66, 108, 125, 167, 177).
2. **Testosterona:** androgéno esteroide formado por el testículo embrionario durante el desarrollo fenotípico masculino. La formación de testosterona en el testículo comienza después de iniciar la diferenciación de los cordones espermáticos y es concomitante con la diferenciación histológica de las células de Leydig (112, 157, 177).

Behringer y col. (1990), introducen en un ratón el gen estructural para la hormona identificada por Alfred Jost, y llamada por éste, el inhibidor Mülleriano, posteriormente fue llamada hormona Anti-Mülleriana (AMH), y en los nuevos reportes sustancia inhibidora Mülleriana (MIS) (102).

El gen MIS es autosomal en el humano y en el ratón (15).

La adición de MIS induce la formación de estructuras como cordones seminíferos y se pierden oocitos en ovarios fetales de rata *in vitro* y en el ratón XX transgénico para la MIS humana (7, 15). En experimentos de hibridación en el ratón la primera detección de expresión del Mis se da a los 12.5 d.p.c. en las células de Sertoli, aproximadamente 48 horas después de iniciar la transcripción del SRY. Esta observación es consistente con la posibilidad de que la proteína del Sry directamente active al Mis, aún el demorado comienzo de la expresión del Mis deja abierta la posibilidad de que otros eventos se interpongan (15).

La MIS es un miembro de la familia de productos génicos que incluyen la inhibina, el factor- $\beta$  de crecimiento, y otros, los cuales actúan como potentes reguladores del crecimiento y desarrollo (108).

La biosíntesis de novo de testosterona en el testículo fetal se realiza a partir del acetato utilizando al colesterol como un intermediario obligatorio. En el adulto es necesaria la conversión a nivel mitocondrial de colesterol a pregnenolona que requiere la presencia de hormona luteinizante (LH). En el testículo fetal la función de la LH es sustituida por una glicoproteína, la gonadotropina coriónica sintetizada por la placenta.

Tanto esta hormona placentaria como la LH, requieren la presencia de receptores membranales en las células de Leydig (86).

La síntesis de testosterona a partir de colesterol requiere de la presencia de 8 sistemas enzimáticos, cada uno de los cuales tiene regulación génica autosómica diferente (86).

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 (95). 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 (86).

El gen que codifica para la MIS ha sido clonado en el bovino, e inclusive ha sido clonado y mapeado en el humano en la punta del brazo corto del cromosoma 19 (66, 102, 112). Asimismo estos genes han sido expresados en células de hámster Chino, bajo el control de un promotor viral (66).

La MIS ha sido purificada de tejido testicular bovino. Las células de Sertoli producen MIS, al tiempo de la diferenciación testicular y a la iniciación de la pubertad. Después de la pubertad, restos de MIS son detectados en fluido de la rete testis y existe indicación de que la expresión de MIS no es totalmente reprimida en el testículo adulto. La MIS es también sintetizada por células de la granulosa postnatales, en cantidad similar a la producida por las células de Sertoli del individuo adulto (66).

Krallinger (1927, 1928, 1931) fué el primero en reportar que el número de cromosomas en células diploides del bovino doméstico europeo es 60, hallazgo que posteriormente fue confirmado por Makino (1944), quien determino el mismo número para el *Bos indicus* (71, 136).

La información más precisa acerca de los cromosomas de los bovinos se obtuvo a partir de los 60's cuando Melander aplicó las nuevas técnicas de cultivo celular (65, 71, 122).

Hasta 1960 los recuentos cromosómicos de las células de bovino fueron realizados en preparaciones histológicas de tejido testicular. En enero de 1960, Chiarelli y col., 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 fué definido como submetacéntrico, mientras el Y tiene una morfología variada (28, 122). Crossley y Clarke (1962) describen el cromosoma Y en el *Bos taurus* como submetacéntrico fácil de identificar, sin embargo, Kieffer y Carwright (1967-68) en observaciones en el *Bos indicus* y Brahmán Americano, señalan al gonosoma Y como un telocéntrico, difícil de distinguir de los autosomas más pequeños (11, 42, 71, 78, 117, 122).

Los pares cromosómicos del bovino se enumeran del 1 al 29 en orden de tamaño decreciente, con descripción de los cromosomas sexuales al final (37, 55). Los cromosomas sexuales en el *Bos taurus* poseen dos brazos mientras que los autosomas son telocéntricos. 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 (136).

Las secuencias de DNA altamente repetitivas están fuertemente correlacionadas con la heterocromatina constitutiva de los cromosomas, la cual es visualizada citológicamente como bandas-C. En el ganado (*Bos taurus L*) 10% del genoma contiene cuatro clases de DNA satélite, rico en bases de Guanina y Citocina, localizado en los centrómeros de los autosomas. La clase mayor, llamada DNA Satélite I, representa 6 - 7% del total de DNA, con unidades repetidas de 1,400 pb (36).

Las bandas-C, son marcadamente variables en tamaño y forma en muchas especies de mamíferos. En humanos, ciertos pares de cromosomas homólogos muestran considerable variación en tamaño de bandas-C, dentro de ambos cromosomas y entre individuos. Di Berardino y col. (1980), en un estudio de bandas-C de 10 bovinos Holstein-Friesian (seis hembras y cuatro machos), reportan pares heteromorfos en mínimo ocho pares de autosomas, de los cuales cuatro (5, 67, 70, 90) fueron comunes en una madre y su hija, y dos resultaron comunes entre dos hermanas. Asimismo el cromosoma Y se mostró enteramente heterocromático en 4 diferentes células de un mismo animal (36).

La morfología del cromosoma Y del bovino doméstico ha sido utilizada como un recurso para rastrear la filogenia de las razas bovinas (117).

Algunos polimorfismos han sido reportados en el cromosoma Y del ganado *Bos taurus*. La posición del cromosoma Y, considerando su tamaño, es de tamaño 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 Y metacéntrico (42, 117, 122).

Los primeros resultados de un cromosoma Y telocéntrico, fueron reportados por Kieffer y Cartwright (1968) en las razas Brahmán y Santa Gertrudis, ambas razas derivadas del *Bos indicus* tipo Cebú. La raza Brahmán fue desarrollada en USA de razas Hindúes, especialmente Guzerat, Nelore, Gir y Krishna Valley. La Santa Gertrudis tiene al Brahmán como macho ancestro, el cual contribuyó con el cromosoma Y telocéntrico (105).



Las razas bovinas indígenas del Sur de Africa han sido clasificadas como *Bos indicus* en importancia a su anatomía, fisiología y adaptabilidad, incluyendo tolerancia al calor, resistencia a enfermedades y robustez. Estas son consideradas para ser del tipo Sanga, con una joroba cervicotorácica más pequeña que la joroba torácica larga del tipo Cebú (105).

Meyer (1984), realizó un estudio en diferentes razas bovinas de la especie *indicus* (Afrikaner, Bonsmara, Caprivi, Drakensberger, Malawi Cebú, Nguni, Pedi, Tuli y Watusi) procedentes del Sur y Centro de Africa, comparando cromosomas sexuales con el *Bos taurus*. No se encontraron diferencias en el complemento cromosómico  $2n = 60,XX$  de las hembras de *Bos taurus*, *Bos indicus* (Sanga) y *Bos indicus* (Cebú), pues todas mostraron dos cromosomas X largos submetacéntricos. Sin embargo, el complemento de los machos,  $2n = 60,XY$ , tenía un pequeño cromosoma Y telocéntrico en el *Bos indicus* (Cebú), mientras el cromosoma Y en el *Bos taurus* y en el *Bos indicus* (Sanga) fue un pequeño cromosoma submetacéntrico.

Pathak y Kieffer (1979), en un estudio cromosómico de híbridos interespecies reportaron un cromosoma Y telocéntrico en un macho resultado de la cruce de *Bison bison* macho por *Bos taurus* hembra y un cromosoma Y metacéntrico en un macho de la cruce *Bos banteng* macho por *Bos taurus* hembra.

Eldridge y Blazak (1977), estudiaron cromosómicamente 22 novillos hijos de toros Chianina y 24 novillos hijos de toros Brahmán, y de madres Hereford o Angus, un cromosoma Y submetacéntrico se observó en todas las metafases analizadas de los novillos descendientes de sementales Chianina; mientras que en los novillos hijos de toros Brahmán ningún cromosoma Y fue submetacéntrico, excepto en dos novillos en los cuales, en cada dos células, una de cada animal, mostraron un pequeño cromosoma submetacéntrico, indistinguible del cromosoma Y del *B. taurus*. Es posible que haya ocurrido una inversión en cada uno de estos dos casos, lo que podría resultar en mosaicismo. Este pequeño cromosoma Y submetacéntrico pudo haber sido una inversión de un cromosoma Y telocéntrico o de un autosoma telocéntrico.

La presencia de un cromosoma con dos brazos en una metafase con bandeo C, no es absoluta prueba de que sería un Y, ya que un autosoma pequeño podría aparecer con un brazo corto y complicar la identificación (117).

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 (134).

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 (67, 70, 160).

Las alteraciones del cromosoma Y ocasionan grandes fallas a nivel de la diferenciación gonadal y un amplio espectro de manifestaciones clínicas (134).

Las anomalías de los gonosomas se pueden dividir en cuatro grupos:

1. Uno de los gonosomas, ya sea el X o el Y, es estructuralmente anormal.
2. Mosaicos gonosómicos.
3. Combinación de 1 y 2.
4. Quimerismo (67, 134).

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 está presente en todos los tejidos del individuo (48, 67, 70, 160).

Según Beatty (1957), los embriones quiméricos podrían originarse de huevos polinucleares, los cuales han sido reportados en mamíferos, reptiles y aves. Los huevos polinucleares ocurren en una alta frecuencia en el ratón inmaduro, pero alrededor de los 70 días de edad la frecuencia se mantiene en 0.5% en folículos primarios (48).

El quimerismo diploide-triploide ocurre espontáneamente en varias especies animales, incluyendo al hombre (Graham y col., 1981), ratón (Beatty, 1957), conejo (Beatty y Coulter, 1978), gato (Benirschke, 1972), cerdo (McFeely, 1967), bovino (Dunn y col., 1970), visón (Belyaev y col., 1978) y gallo (Fechheimer, 1981). Estos han sido observados en estudios de embriones en etapas tempranas, en recién nacidos con malformaciones, y en intersexos (48).

Gustavsson y Rockborn (1964), encontraron una fusión céntrica entre dos autosomas en tres bovinos con leucemia linfática. Subsecuentemente, Gustavsson (1969) reportó en bovinos normales de la raza Swedish Red and White la misma fusión céntrica. En el cariotipo un cromosoma submediano era más largo que el cromosoma X, siendo el número diploide 59, XX, t ó 59, XY, t para los heterocigotos y 58, XX, tt ó 58, XY, tt para los homocigotos. Interesante fué el enfoque en el papel de los cromosomas en la reproducción cuando Gustavsson (1969) describió la existencia de esta fusión céntrica, la cual está relacionada con baja tasa de concepción (71, 147).

Hultnas (1974) fue reconocido por su gran éxito en su programa realizado en Suecia para erradicar la fusión descrita por Gustavsson en 1969 (71).

Hansen (1969), describió una diferente forma de translocación autosómica, una fusión-tandem, en la cual fue formado un cromosoma largo subtelocéntrico. También se reportó una marcada infertilidad entre los portadores de esta translocación (71).

Rieck y col. (1969), encontraron la condición mosaico (60,XX/60,XY/61XXY) en un toro Fleckvieh de 22 meses de edad con hipogonadismo marcado. El cariotipo encontrado fue de 56.5% 61, XXY; 25.6% 60, XX; 17.9% 60, XY. Finger y col. (1969), reportaron otro caso de 61, XXY. Rieck y col. (1970), describieron una vaca Fleckvieh con cariotipo  $2n=61, XXX$  con una marcada xifosis, sistema reproductivo normal pero una tendencia a disturbios de la meiosis, la cual resulto estar emparentada con el toro Fleckvieh con sosaisismo 60,XX/60,XY/61XXY reportado por ellos mismo un año atrás (71).

Dunn (1970), describió un animal Holstein-Friesian con características de hermafrodita verdadero el cual presentaba pene, escroto vacío, ovario izquierdo con cuerpo lúteo y cuerno uterinos normales. La gónada derecha fue ovotestis. Las células de médula ósea mostraron 1.5% XXY. Pequeños porcentajes de células de cultivo de linfocitos mostraron 90, XXY y 90, XXX; el resto de las células fueron 60, XX (11, 40). Hare y Singh (1980) reportaron un embrión preimplantado, con cariotipo XY/XXY (48).

Dunn y col. (1979), reportaron el caso de un toro Hereford Polled que mostró buena libido, exhibiendo marcada hipoplasia testicular, azoospermia, y cariotipo 61, XXY (contraparte del síndrome de Klinefelter del humano) en leucocitos y material testicular. Su testículo izquierdo pesó 23.6 g, aproximadamente 10% del peso de un testículo normal en un Hereford. El histopatológico del mismo testículo reveló túbulos seminíferos pequeños en avanzada degeneración y muy pocas células de Sertoli. El número de células de Leydig fue desproporcionadamente grande en relación a los túbulos seminíferos (71).

La tetraploidía es relativamente frecuente en cultivos de abortos espontáneos y en varias líneas celulares neoplásicas, no obstante, escasamente se han reportado en humanos recién nacidos con una línea celular tetraploide, donde la mayoría fueron mosaicos tetraploides (137).

Zartman y Fechheimer (1967), señalaron que la incidencia de células poliploides es significativamente más alto entre terneros de ciertas líneas consanguíneas Hereford. Popescu (1968), observó que la incidencia de células tetraploides en la hipertrofia muscular del ganado Charolais fue mayor que en el ganado normal, aunque Vertessen (1970), no encontró tal correlación en otro estudio de animales hipertróficos. Herzog y

Hong (1971), no encontraron incidencia de células poliploides en terneros nacidos con anomalías del sistema nervioso central (71).

Galli y col. (1987), estudiaron cariotipos de linfocitos de bovinos afectados de leucosis viral bovina y establece una alta incidencia de poliploidía en animales afectados que no han tenido persistencia relativa de linfocitosis. Schmutz (1989), en un estudio realizado en 117 toros de 11 razas puras con tasas de concepción bajas en las vacas con que se apareaban, o con características asociadas con baja fertilidad (baja circunferencia escrotal y pobre calidad de semen) y otros aparentemente normales; encontró que 39 toros (33%) tenían células tetraploides. No se observaron diferencias significativas en la incidencia de tetraploidias entre el grupo de toros fértiles y el de subfértiles (140).

La incidencia de tetraploidías establecida en cultivos de linfocitos bovinos es marcadamente más alta que en cultivos de linfocitos humanos, donde esto es considerado una anomalía. Lo cual quizá sea un artefacto en respuesta a las condiciones de cultivo, tal como mayor sensibilidad de los linfocitos bovinos a los mitógenos o a la colcemide (140).

Halnan (1972), reportó en 8 animales con historia de infertilidad, hasta 60% de células mostrando autosomas con gaps o constricciones secundarias. Herzog y Hohn (1971) han descrito gaps similares en los cromosomas de terneros con paraqueratosis.

## INTERSEXUALIDAD EN EL BOVINO DOMESTICO

Existen tres condiciones generales de intersexualidad descritas en el bovino, síndrome freemartin (Marcum 1974), disgenesia gonadal XY (Henricson y Akesson 1967, Chapman y otros 1978) y el síndrome de feminización testicular (Nes 1966). El freemartinismo es la condición intersexual más común en el bovino doméstico (47, 94).

El fenotipo en las tres condiciones de intersexualidad del bovino es femenino y pueden ser diferenciadas en base a la anatomía reproductiva interna, la histología gonadal y el complemento cromosómico (94).

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 (94).

El síndrome de feminización testicular es un estado de intersexualidad causado por un gen ligado al cromosoma X ( $X^{Tm}$ ), esta condición no sólo ha sido demostrada para el humano sino que también ocurre en el ratón y en el bovino. La intersexualidad es debida una falla en la habilidad del receptor de andrógenos del citosol de las células blanco, ocasionando insensibilidad de estas para responder a los andrógenos. El desarrollo de los conductos de Müller es suprimido ya que las células de Sertoli producen sustancia inhibidora Müllleriana (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 es 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,XX. En algunos pacientes, como en el ratón, el receptor puede estar ausente o ser anormal (61, 94, 176).

Long (1981) reportó una vaca Ayrshire con feminización testicular, de 2 ½ años de edad, nacida única, madre de un ternero macho normal y otro ternero cuyo sexo no fué 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 cervix y en la región donde en condiciones normales está, presentó dos estructuras como pequeñas vesículas seminales; vagina cranealmente ciega; vulva levemente más pequeña de lo normal; y uretra muscular que abría dentro de una vagina ciega.

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 estructuras tubulares del ligamento ancho estaban compuestas de músculo longitudinal y circular envueltas con lumen irregular formado por epitelio cuboidal, y entre el músculo, envuelto tejido conectivo con glándulas de secreción mucosa. Las vesículas seminales y la cola del epididimo tenían una estructura similar al resto del sistema tubular. Los niveles de testosterona en el plasma etaban dentro del rango para los toros normales 870 *pg/ml* en la examinación inicial y 1230 */ml* en la matanza. El cariotipo encontrado fue 60,XY en linfocitos, piel, bazo, gónadas y peritoneo (94).

El comportamiento del animal fué masculino, el cual puede ser atribuído al alto nivel de testosterona circulante. Kieffer (1976), reportó un equino con comportamiento agresivo masculino similar en un caso de síndrome de feminización testicular (94).

## SINDROME FREEMARTIN EN EL BOVINO DOMESTICO

La palabra *freemartin* aparece impresa por primera vez en el s. XVII, pero ya había estado en uso común varios años antes. El vocablo Martín fué usado en Inglaterra y Escocia y apareció en un documento de 1593, viene de la palabra gaélica *mart* aplicada a vaca, buey o vaquilla castrada: el 11 de Noviembre, día de San Martín, era costumbre realizar la matanza para que la carne pudiera ser preparada para el invierno (99). *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 (69, 95). Por lo tanto *farro-mart* designa a una vaca o vaquilla estéril, o a un hembra que parece buey o toro, tal como lo designa el Latín *taura* que significa *hembra-toro*. (99).

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 de este siglo cuando Lillie, sugirió, basado en el proporción esperada de hembras y de machos en gemelos dicigóticos, que el freemartin es una hembra (99, 30).

El examen anatómico de freemartins se ha realizado desde 1692, pero no fue sino hasta comienzos de este siglo que la anastomosis vascular entre gemelos, fue revelada como un fenómeno correlacionado de la condición freemartin. Lillie (1916), supuso que la supresión del desarrollo del tracto reproductivo de la cogemela, es debido a la acción hormonal del macho cogemelo (30, 84).

Es conocido que del 92% de las terneras nacidas con un becerro macho presentan masculinización del sistema reproductor interno y son estériles. La virilización de la ternera la conlleva a un estado de intersexualidad conocido como "*freemartin*". En donde el grado de intersexualidad es muy variable (30, 67, 84, 95, 102, 125, 142, 147, 148).

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 (99).

Es generalmente reconocido que 11 de 12 vaquillas nacidas cogemelas de un macho son freemartin, pero con una tasa de parto gemelar de 2% a 3%, se esperaría que la incidencia de esta condición sería baja (32).

En aproximadamente el 8% de las concepciones de gemelos heterosexuales, las circulación común no se establece y la hembra es capaz de desarrollarse normalmente (86).

El síndrome freemartin no es heredable, pero la propensión a engendrar gemelos si lo es (70). 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 (99).

Hasta 1977 se definía a una freemartin como una ternera estéril nacida gemela de 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 (47, 148, 172, 175).

El término parto múltiple define a la descendencia producida en un nacimiento por un hembra unípara, ya sean gemelos, triates, cuádruples, etc. Y los individuos nacidos dentro de un parto múltiple son referidos como cogemelos. Estos términos son análogos de camada y hermanos de camada, respectivamente, usados en especies múltiparas (99).

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 (163).

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 (bivitelinos), y la fecundación de un sólo óvulo y su bipartición en etapas tempranas, origina los gemelos monocigóticos también llamados monovitelinos o idénticos (82).

La incidencia de partos gemelares varía grandemente entre las razas bovinas, en la raza Simmental se reportan tasas de 2.4% a 4.6% (Weber 1945, Ortavan y Thibault 1970), en la Holstein-Friesian del 0.5% al 4.2% (Johansson 1932, Weber 1945, Ortavan y Thibault 1970) y en la Charolais de 2.5% a 3.2% (Ortavant y Thibault 1970) (84). Muchos de los partos de gemelos son dicigóticos, y entre el 2 a 10% son reportados como monocigóticos. 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 dos o más individuos ocurren en el ganado bovino pero son raros (99).

Johansson (1932), trabajando con gemelos bovinos de raza sueca, publicó el primer cálculo de la frecuencia de monocigosis en esta especie, según la cual el 11.4% de todos los gemelos del mismo sexo, son monocigóticos. La tabla No. 1 muestra la frecuencia de gemelos y el cálculo de la frecuencia de gemelos monocigóticos en algunas razas de ganado bovino lechero.



TABLA No. 1. 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	12,825	4.81	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	1.05	11.05 ± 3.31
Jersey (Nueva Zelanda)	3,751	1.81	26.78 ± 10.06
Mocho Sueco (SKB)	87,928	1.02	16.60 ± 6.06

Autor según Johansson, I. / Rendel, J. (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 (82).

Los gemelos dicigóticos pueden ser inducidos por:

1. Selección.
2. Superovulación.
3. Transferencia de dos embriones.
4. Transferencia de un embrión a una vaca preñada (70).

Como la heredabilidad de la ovulación múltiple es baja, alrededor del 5% (Hendy y Bowman 1970), un incremento en la tasa de partos gemelares puede ser logrado mediante el uso de hormonas inductoras de ovulaciones múltiples, o mediante transplante de embriones (66, 84).

Intentos para inducir gemelaridad en el bovino han resultado en variabilidad de respuesta a tratamientos hormonales para provocar ovulación múltiple. Por otra parte, en muchos de los casos las vacas pueden llevar gemelos a término, pero cuando el número de fetos excede de dos, muchas gestaciones son terminadas por muerte embrionaria temprana y/o aborto (19).

Sólo el 12.5% de las vacas que reciben transplante 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 (129).

Algunos programas de mejoramiento tanto en bovinos con propósito lechero o cárnico, en Europa continental, tienen como meta una tasa de parto de 120 a 150% porque esto reduce el costo en un 30% por cada ternero (84).

Una consecuencia genética favorable en un incremento de partos gemelares, es que la selección puede ser concentrada en elegir individuos más uniformes al tener menos hembras progenitoras (84).

La incidencia esperada de feemartins en la población de hembras sería del 25% de todos los partos gemelares ya que el 50% de estos partos, serían de diferente sexo, y de estos la mitad serían hembras. De acuerdo con los datos suministrados por la Milk Marketing Board de Estados Unidos, la incidencia de partos gemelares en la raza Holstein-Friesian es de 2.8% en el segundo y el tercer parto, y la incidencia incrementa con la edad de la madre. Por esto el porcentaje esperado de freemartins podría ser de cerca de 1.4% para la población de bovinos Holstein-Friesian (32, 75).

Herschler y Fechheimer (1966), reportaron el análisis de bovinos triates, en el que encuentran 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 (65).

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 (32).

David y col. (1976), analizaron la frecuencia de freemartins en dos establos que adquirían becerras y vaquillas, encontrando las siguientes frecuencias:

1. Vaquillas de 2 años, 17 freemartins (28%) en un grupo de 60 animales.
2. Vaquillas de 1 año, 14 freemartins (21.5%) en un grupo de 65 animales.
3. Vaquillas de hasta 6 meses, 5 freemartins (10%) en un grupo de 52 individuos.
4. Becerras de 1 semana a vaquillas de 1 ½ año, 10 freemartins (17%) en un grupo de 58 individuos.
5. Becerras de 1 semana a vaquillas de 1 ½ año, 16 freemartins (22%) en un grupo de 70 animales.

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 (1977), describió, 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.

Sysa y col. (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.

Wilkes y col. (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% de leucocitos de macho y de 8% a 96% 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.

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.

Van Haeringen (1983), reportó un parto cuádruple (2 hembras y 2 machos) en una vaca de 9 años de edad de la raza Meuse Rhine IJssel, la vaca no había sido tratada con hormonas y fué servida por monta natural. Al nacimiento el peso promedio de los terneros fué de 20 kg. A partir del cultivo de linfocitos se analizaron 100 células por cada ternero, encontrando cromosomas XX en las terneras y XY en los dos becerros. En la medición de la profundidad de la vagina a los 10 días de edad se encontró una longitud de 13 cm. Por lo que se concluye que las terneras no fueron freemartins. Mediante electroforesis en gel de almidón se analizaron 4 polimorfismos bioquímicos: Amilasa, Anhidrasa Carbónica y Ceruloplasmina, resultaron idénticas, sin embargo, el locus de la Transferina mostró una variante para un macho y una hembra (AA) y otra variante diferente (AD<sub>1</sub>) para el otro ternero y la otra ternera.

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

Edwards y col (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 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, ampulas 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 0 XY, respectivamente.

Lojda y Poláček (1984), reportan dos casos de superfetación en el ganado bovino con un intervalo de concepción de 20 días en un caso y de 4 meses en el otro. Los terneros no mostraron evidencia de quimerismo cromosómico.

En la condición Freemartin (quimerismo XX:XY) la proporción de células 60,XX : 60,XY varía entre diferentes individuos freemartin como también entre un freemartin y su macho cogemelo. La observación original de Ohno (1962) ha sido confirmada por subsecuentes publicaciones, como Fechheimer (1963) y Short (1969). Kanagawa y col. (1965), demostraron que el quimerismo estaba también presente en médula ósea pero raramente en otros tejidos somáticos (71).

Fechheimer y Harper (1980), realizaron un estudio citogenético en 298 fetos colectados en rastros, productos de úteros grávidos de vacas de diferentes razas, y teniendo éxito en el cultivo (fibroblastos de piel o de pulmón) de 224 (76%). La edad calculada de los fetos fue muy variada (desde 55 días hasta 175). De los 224 fetos cariotipados, seis mostraron un cariotipo anormal: uno mostró 60,XX/59,XX,t y cinco 60,XX/60,XY, más un animal 60,X? (probablemente con Y telocéntrico de un padre *B. indicus*). En los cinco casos de quimerismo no fué establecida evidencia de gemelaridad, además el cultivo fué de fibroblastos, por lo que es más probable que deriven de una fusión de dos huevos fertilizados o de fertilización de un óvulo y un cuerpo polar y la fusión de éstos.

Herschler y Fechheimer (1967), examinaron 13 freemartin 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, Herzog (1969), en 34 freemartin y Marcum (1972),

en 29 de éstas no hallaron relación alguna entre la proporción de células XY y el grado de masculinización (64).

Kanagawa y col. (1967), Kieffer y Sorensen (1971) y Marcum (1972), reportan que el porcentaje de XX/XY no es un indicador del grado de anomalías producidas en freemartins (64).

Greene y col. (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. Según Ohno y col. (1977), pocas células de un macho cogemelo pueden diseminar suficiente antígeno H-Y para interactuar con las células XX huésped y colectivamente promover diferenciación de la gónada del freemartin hacia testículo (64).

Green y col. (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 estradiol 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.

Saba y col. (1975), realizaron mediciones por radioinmunoensayo, de las concentraciones plasmáticas de androstenediona 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 androstenediona en las freemartins fué 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 aumento significativamente a 65 pg/ml. Se realizaron de 16 - 18 mediciones de testosterona de cada freemartin, de las cuales muchas fueron inferiores a lo 10 pg/ml y la máxima registrada fué de 22 pg/ml para un individuo.

Los hallazgos para las concentraciones de androstenediona son consistentes con los encuentros de Short y col. (1969), sin embargo, las concentraciones de testosterona contrastan, ya que Short y col. 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 dos testículos y epidídimo, mientras los seis freemartins de Saba y col., presentaban características anatómicas que indicaban un tipo femenino (131).

Greene y col. (1977) examinaron 19 terneras de la raza Holstein-Friesian, nacidas de partos dicigóticos heterosexuales, de las cuales una fué juzgada como una hembra normal con cariotipo 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 1a, 24a y 52a de edad para determinar 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 clitoris 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 y col. (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 maculinas encontradas.

Marcum (1975), demostró que cerca del 8% de freemartins tienen menos de 10% de células XY y de éstas, menos de la mitad tienen una frecuencia menor al 3% (75).

El paso de hormonas de un feto a otro ocurre mediante la comunicación vascular establecida por la fusión de las membranas fetales coriónica y alantoidea de los fetos bovinos entre los días 30 y 40 de gestación, es decir, antes del dimorfismo sexual. 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. La modificación de la gónada y el tracto reproductivo de la freemartin ha sido atribuido al paso de hormonas de la gónada del macho cogemelo al ovario de la hembra durante el desarrollo fetal (14, 147).

Presumiblemente el desarrollo del freemartin es debido a los efectos que ejercen la sustancia inhibidora Mülleriana (MIS) y la testosterona del gemelo macho en la cogemela, debido a la anastomosis vascular placentaria. El grado de inhibición de las estructuras de Müller (derivados femeninos) y la estimulación de las de Wolff (derivados masculinos), depende del momento en el cual esta fusión toma lugar (95).

La modificación gonadal de los freemartins resulta en masculinización de los ovarios que frecuentemente contienen túbulos seminíferos estériles (76).

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 tener forma de un testículo pequeño (95).

Los gemelos dicigóticos se producen invariablemente en el tití y ocurre intercambio de células sanguíneas entre ellos, aunque el desarrollo del sexo es normal. La placenta del tití probablemente tiene habilidad para convertir la androstenediona-4-C<sub>14</sub> (hormona masculina) a estrona (hormona inactivada), mientras la placenta bovina no realiza esta conversión (69).

Se asume que la extensión de masculinización de la hembra freemartin es un reflejo del grado de quimerismo en el sistema hematopoyético de los gemelos. En base a esto ha sido propuesto que la presencia de células masculinas en una becerro nacida cogemela de un ternero, es una característica diagnóstica confiable de freemartinismo (147).

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 las complementos XX y la muestra colectada durante la gestación mostró mayor porcentaje de células XX.

Una vaca Dutch Belted de 2 años de edad, cogemela con un macho, mostró anestro; a la examinación clínica y rectal se observó una vagina pequeña y corta, el útero y los ovarios no fueron detectables. Sin embargo, tras la matanza, se observó una estructura uterina delgada y pequeña con gónadas difícilmente detectables. La prueba de grupos sanguíneos no tuvo reacción, quizá porque no hubo quimerismo de células rojas o porque casi el 100% de la población de células rojas de la hembra, llegaron del macho, en tanto que el estudio citogenético reveló 99 células XX y 3 células XY (163).

Una hembra Holstein-Friesian de parto único con ausencia de signos de celo, presentó una vagina corta tras la examinación clínica. Tras las absorciones específicas, con el conocimiento de los grupos sanguíneos de los padres, se observó para un factor una muy débil reacción, sin embargo, con el estudio citogenético se determinó un diagnóstico con 30 células XX y 20 XY (163).

En su investigación Smith (1977), postuló que la comunicación vascular entre los gemelos heterosexuales bovinos, no resulta invariablemente en esterilidad para la hembra, y que el ovario de la hembra, en sí mismo inactivo durante la diferenciación gonadal inicial, puede ser sensible a el efecto de virilización sólo por un período relativamente corto durante la gestación. 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 (147).

No se puede estar completamente seguro que al encontrar 100% de células con cromosomas sexuales XX (en sangre periférica) de terneras nacidas con un macho, la becerro no es un freemartin, ya que podría interpretarse que con anastomosis vascular la mezcla XX/XY no siempre se establece. Posiblemente exista una membrana que impida la llegada de células de intercambio, pero que sea permeable a otros agentes capaces de inducir la condición freemartin (64).

Los genitales externos de una becerro 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 del conducto de Müller y sobredesarrollo de los derivados del sistema de Wolff. La vagina es más corta que en las vaquillas normales y ciega cranealmente (Rieck, 1963). El cérvix está ausente. El desarrollo del útero puede variar grandemente de ausencia total a una longitud normal de los cuernos uterinos, aunque estos usualmente están representados sólo por una estrecha banda de tejido. Los vasos deferentes y las vesículas seminales pueden estar presentes (84).

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 (84).

El desarrollo de las características masculinas en freemartins, cuando se presenta, ocurre después que en un macho normal. Los ovarios (Rajokosky y Hafez 1964) 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 (84).

El quimerismo XX/XY ha sido demostrado en tejido testicular fetal de bovinos machos cogemelos de una hembra (Ohno y col., 1962; Kanagawa y col., 1965; Teplitz y col., 1967; Hoffmann y col., 1971; Wilkers y



col., Ford y Evans, 1977, pero no ha sido confirmado por otros investigadores (Goodfellow y col., 1965; Kanagawa y col., 1965 a; Dun y col., 1968; Short y col., 1969; Kieffer y Sorensen, 1971; Vigier y col., 1973; Ford y Evans, 1977).

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 (38).

Betancourt y col. (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 pertenecía 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  $43.53 \pm 16.91$  vs.  $80.90 \pm 13.96$  y densidad  $58.14 \pm 18.47$  vesícula.  $83.55 \pm 11.53$ ). 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 y col. (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, concluyendo que:

1. Hay un 58% de oportunidad de que un toro quimérico sea elegido por pobre actuación reproductiva en los primeros 10 años de su vida, comparado con el 5% para un toro no quimérico.
2. 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 (121).
3. Todos los toros tenían grados variables de degeneración testicular como fue mostrado por los túbulos deficientes en células germinales. Los toros con buena actuación reproductiva 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). El mismo fenómeno fue reportado en quimeras artificiales de ratón, en etapa fetal, por McLaren (1972). Según Mistkowska y Tarkowski (1966), y McLaren (1972), no hay observación de meiosis XX en este tipo de ratones en estado adulto (52).

Fejér y Kovács (1980), realizaron en diferentes granjas un estudio de la proporción del sexo de terneros hijos de 4 toros quiméricos XX/XY (3 Holstein-Friesian y 1 Simmental), y de 4 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 (cérvis uterino doble) por lo que eventualmente se concluyó que otro mecanismo quizá estaría involucrado en este fenómeno.

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.

## FREEMARTINISMO Y OTROS ESTADOS INTERSEXUALES EN DIFERENTES ESPECIES

El quimerismo XX/XY es común en caballos pero no está asociado con esterilidad (1). El freemartinismo también ocurre en la oveja, la cabra, 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 (1, 4, 22, 54). Es interesante que la hernia inguinal puede ser una indicación de quimerismo XX/XY en el cerdo (1). El quimerismo hematopoyético también es asociado con concepciones gemelares en monos y raramente en el humano. 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 el hecho de que tanto en mamíferos como en aves el sexo afectado es el homogamético (90, 152).

Los partos múltiples son comunes en las cabras, pero no lo es la anastomosis vascular u ocurre después del periodo crítico de diferenciación sexual. Los estudios indican que aproximadamente el 6% de los intersexos caprinos pueden ser freemartins. (99, 110, 148, 149).

BonDurant (1980), reportó una cabra acorne raza La Mancha Americana, de 18 meses de edad, nacida con dos machos, la cual fué examinada por anestro. En la examinación clínica el espejo vaginal no pudo ser introducido más de 2 cm, la vulva era más pequeña comparada con las de sus compañeras de parto. Las gónadas no pudieron ser palpadas subcutáneamente en las regiones inguinal y perineal. 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 fué posible obtener un cariotipo de tejido no hematopoyético para corroboración.

Smith y col. (1981), reportaron un cabrito de la raza Nubia de 4 meses de edad con condición intersexual, nacido de parto cuádruple. Tenía el pelo cervical erecto como es típico de un macho caprino; vulva a una distancia normal del ano pero proyectada caudalmente, y el clitoris elongado. En cada lado de la región inguinal fue palpada una masa 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 sustentaculares (Sertoli), no habiendo evidencia de espermatogénesis. 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 60 XX).

Bongso y col. (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, clitoris peniforme elongado y una distancia anogenital

de 2.5 cm. Exudaba un punzante olor a macho, presentaba 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 un testículo esférico (1.0 cm) en el lado izquierdo con remanentes de epidídimo. Presentó segmentos de cuernos uterinos ciegos, cérvix, vagina, vulva y un clítoris de 2 cm con glándulas peneanas en su terminación distal, pero ausencia de oviductos. Histológicamente ambos testículos mostraron túbulos de tamaño reducido y epitelio germinal hipoplásico con sólo espermatogonias. Las células de Sertoli y un intersticio bien definido con numerosas células de Leydig estaban presentes. El estroma ovárico consistía de grueso tejido conectivo y estaban presentes dos folículos de Graaf maduros con pocos folículos primarios y un oocito. El análisis cromosómico reveló poblaciones celulares 60 XX/XY en sangre, médula osea y piel.

En Estados Unidos la incidencia de intersexos en las razas Saanen y Toggenburg parece ser tan alta como de 11 y 6%, respectivamente. La frecuencia extrema se eleva a 20.4 a 22.1% entre la progenie de los cabrios de estas razas que han producido intersexos previamente, sugiriendo una fuerte tendencia familiar (110).

La mutación "acorne" (**polled**) de la cabra se hereda como un rasgo autosómico dominante, fácilmente reconocido en el heterocigoto por la ausencia de cuernos. Los homocigóticos son viables y similarmente afectados como los heterocigotos. Las hembras homocigóticas XX, sin embargo, desarrollan intersexualidad (83). El gen para la presencia de cuernos en las razas caprinas suizas, es recesivo (148).

El pseudohermafroditismo masculino es relativamente común entre las razas caprinas acornes. El gen autosómico dominante "polled" es responsable de intersexualidad en hembras genéticas y de infertilidad en machos genéticos y causa variación fenotípica de machos casi normales a hembras casi normales (18).

Las evaluaciones citogenéticas de caprinos intersexos muestran claramente que muchos de los intersexos acornes son XX, y el pedigree indica que los intersexos son homocigóticos para esta característica, la presencia de gónadas masculinas en estos intersexos homocigóticos (PP) con cariotipo XX, sugiere que ellos son hembras con reversión sexual. En un feto caprino femenino con genotipo PP, dos dosis del gen P alteran el proceso de la diferenciación sexual en dirección masculina pero tienen éxito sólo parcialmente quizá por los dos cromosomas XX. El corolario es que todos los acornes que son fértiles son heterocigóticos para el gen P (110).

En muchas instancias la reversión sexual parece ser incompleta como es indicado por la presencia de derivados de los conductos de Müller. En las cabras intersexos XX sin cuernos ha sido demostrado que las gónadas representan ovotestis en etapas tempranas del desarrollo embrionario y esto es sólo después que las estructuras ováricas desaparecen (83).

La diferenciación masculina de la gónada en las cabras acornes XX ocurre independientemente del cromosoma Y o de secuencias Sry (83).

La intersexualidad asociada con la condición corne en caprinos es extremadamente rara, se ha observado hermafroditismo en cabras con cuernos, pero la naturaleza cromosómica de estos intersexos no fué determinada (18).

Just y col. (1994), realizaron estudios moleculares con pruebas de hibridación para Zfy y Sry en un caprino acorne macho pseudohermafrodita XX (60,XX en 100 células) y análisis de PCR con secuencias específicas para caprinos, demostrando ausencia de secuencias del cromosoma Y. El animal presentaba genitales externos anormales caracterizados por una vulva pequeña y un clítoris elongado. La distancia anogenital fué aproximada a la esperada para las hembras. Además de estas anomalías genitales mostró hábitos de macho; comportamiento social masculino y libido; características sexuales secundarias masculinas como olor, belido, y pelo largo en la parte posterior del cuello. Los estudios anatomopatológicos revelaron un útero bicorne normal, testículos bilaterales con epididimitis bilateral y una vesícula seminal. Histológicamente la gónada estaba compuesta exclusivamente de tejido testicular carente de células germinales. La estructura fálica fué compatible con un clítoris elongado (83).

Stormont y otros (1953), estiman un porcentaje de freemartinismo en la oveja, del 0.8%; Kursonov (1960) y Dain (1971) lo estiman en 0.8 a 1.0% en gestaciones gemelares. Dain (1971), de una población que tenía el 54% de gemelaridad calculó un freemartin de cada 400 madres (175).

El quimerismo cromosómico sexual XX/XY en ovinos fué primero reportado por Gerneke (1965, 1967), quien observó una hembra cogemela con un macho, encontrando 41.5% de células XY y 58.5% con XX en muestras a partir de médula ósea (99).

Dain (1971), estudió 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 (99).

Wilkes y col. (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 ya que pocas áreas contenían 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,XX.

Dennis (1979), en un estudio las malformaciones urogenitales causantes de mortalidad perinatal en corderos, realizado mediante necropsia en el Oeste de Australia durante un periodo de 3 años, encontró que el sistema urogenital comprometió a 92 (22.9%) animales de 401 malformados; de los cuales 69 fueron malformaciones genitales y 23 malformaciones urinarias. Sesenta y ocho (73.9%) de los 92 corderos fueron asociados con defectos en otros órganos. El defecto externo más común del sistema genital masculino fue la abertura completa o parcial del escroto y el más ordinario de los genitales externos fue criptorquidismo (6 unilaterales y 12 bilaterales). En tanto que los defectos del sistema genital femenino incluyeron dos agenesias uterinas; cuatro atresias vaginales y un freemartin con una vagina corta y ciega con una marcada hipoplasia ovárica y uterina. El defecto urinario externo más común encontrado fue hipospadias y el interno más frecuente fue agenesia renal.

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.

Bunch y col. (1991), reportaron una oveja salvaje con hermafroditismo verdadero, producto de parto único que mostró apariencia externa femenina con un clítoris elongado, crecimiento más rápido que en hembras normales, comportamiento agresivo; tamaño, coloración y desarrollo de cuernos similar a los machos. El estudio histológico del aparato reproductor reveló túbulos seminíferos espermatogénicamente inactivos y tejido ovárico con estructuras foliculares; así como dos cuernos uterinos y un cérvix. La intersexualidad fue atribuida como un mosaico XX/XXY, con un número cromosómico diploide de 55 y 56 (21).

McFeely y col. (1966), 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 se observó una vagina ciega y una estructura como clítoris. Vogt (1968), también observó quimerismo XX/XY en un cerdo intersexo, no obstante, en este caso el tracto reproductivo fue típicamente femenino y el animal había sido observado en celo (99).

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, un

septum aumentado, elevado aproximadamente 2.0 cm con 0.5 cm de grueso, extendido de este orificio al ano, y una vagina estrecha. El cuerpo y cuernos uterinos estaban presentes y aparentemente normales, la gónada derecha evidentemente fué un ovario funcional, ya que 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 (gen aún no mapeado en el cerdo) y DYZ1 (fragmento específico del macho porcino, asignado a la heterocromatina de Yq) del cromosoma Y. 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 una banda por Southern blot con sonda ZFY de humano y mostró un producto específico del macho con PCR con oligonucleótidos iniciadores (primers) DYZ1, indicando un estado quimérico XX/XY en tejido gonadal. Desafortunadamente no se pudo obtener el cariotipo de estos individuos.

Scofield y col. (1969), analizaron el tracto reproductor de 200 cerdas Large White x Landrace después del apareamiento de éstas, y encontraron tres intersexos. Dos de éstos estaban gestantes en el momento de la matanza y el otro previamente había tenido una camada. Ninguno de los cerdos mostró signos externos de su condición intersexual. En cada caso el ovario de apariencia normal fué el izquierdo, en dos cerdos, la gónada derecha fué ovotestis mientras que en el otro sólo se identificó tejido testicular. En el estudio histológico la porción ovárica de cada ovotestis estaba separada del tejido testicular por una delgada capa de tejido conectivo, evidenciándose folículos normales y folículos atrésicos en varios estadios de desarrollo pero no hubo evidencia de que ocurriera ovulación.

Basur y Kanagawa (1971), realizaron un estudio anatomopatológico en tracto reproductivo y un análisis citogenético en células sanguíneas y de testículo, en tres cerdos intersexos. En dos cerdos identificaron un clítoris alargado, vagina, ovotestis bilateral, cuernos uterinos, genitales externos femeninos y complemento cromosómico XX, mientras que en el otro intersexo reconocieron un clítoris penil, glándulas sexuales accesorias masculinas rudimentarias, cuernos uterinos desiguales con ovotestis alterna, y un cariotipo XX/XY no sólo en los cultivos de los tejidos mencionados, sino también en cultivo de riñón, sugiriendo tratarse de un caso de quimerismo dispérmico.

Melander y col. (1971), encontraron un cariotipo 38,XX en cultivo de linfocitos y fibroblastos en siete cerdos intersexos de 2 a 5 meses de edad en la raza Landrace sueca. Todos los individuos tenían una apariencia externa femenina y poseían un clítoris elongado. Tras el sacrificio de cinco de estos animales, realizado a la edad de 6 - 7 meses, tres presentaron pseudohermafroditismo masculino sin gametogénesis activa y dos hermafroditismo verdadero únicamente con gametogénesis ovárica en una gónada de un individuo.

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 en 1970 reportaron 5 yeguas quiméricas nacidas cogemelas con un macho, las cuales exhibieron ciclos ovulatorios normales, tres de éstas parieron un potrillo normal. Fué sugerido que probablemente la anastomosis vascular ocurrió después de un periodo crítico para la inducción de anomalías sexuales (99, 100).

Lutz-Ostertag (1959), reportó 14 casos de freemartinismo en gallos, 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), observó quimerismo cromosómico ZZ/ZW en dos machos de pares heterosexuales de embriones de pollo en huevos de doble yema (99).

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, una hembra y a un macho de edad similar para su posterior comparación. El freemartin presentó inhibición del desarrollo de los conductos de Müller, consistentes en un clítoris un poco más prominente, una vagina relativamente más pequeña, presencia de un útero hipoplásico y ausencia de tubos uterinos. Además histológicamente se observó ausencia de corteza ovárica, extensión de la rete a ocupar una porción larga de la gónada, presencia de conductos mesonéfricos. Las gónadas fueron más pequeñas que el control, además de presentar pobre diferenciación de los cordones sexuales.

Tantawy y Ahmed (1957), estimaron una frecuencia de gemelaridad de 0.63% para el búfalo egipcio. Asker y El-Itriby (1957), observaron un porcentaje de gemelaridad de 0.2% en dos manadas de búfalo egipcio durante 1940 - 1954 (33).

Stewart y col. (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 cuales 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 (152).

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 (152).

Kenny y col. (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 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 atrofio. El segundo individuo fue cogemelo de un cordero que presentó un clítoris elongado y en el 5° 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

Cuatro diferentes técnicas han sido básicamente empleadas para el diagnóstico del síndrome freemartin: la examinación clínica; la prueba de tolerancia de homoinjerto; la prueba de tipos sanguíneos; y el análisis citogenético. Hay algunos signos clínicos en este síndrome 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. 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. Aunque el estudio de tipos sanguíneos había sido usado como diagnóstico de rutina, fué reemplazado por el analisis citogenético para la identificación de los cromosomas sexuales (142).

El diagnóstico de freemartin 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  $7.4 \pm 2.5$  cm. En terneras normales de la misma edad esta longitud fue de  $14 \pm 2.8$ . Algunas veces la ternera freemartin presenta elongación del clitoris y una borla de pelos en la vulva, características inconsistentes no muy confiables (95, 163).

Las becerras freemartins a menudo son más pequeñas porqué son gemelas, pero robustas por la influencia de la testosterona del macho cogemelo, sin embargo, estas no son características diagnósticas consistentes (95).

Según Arthur (1959), una hembra normal puede presentar resistencia cuando el tubo-prueba pasa mediante la región vulvo vaginal, pero luego pasará de 5 a 7 pulgadas en una vagina libremente dilatada (32).

En una vaca la longitud normal de la vagina es de 30 cm, mientras en una freemartin solo de 8 - 10 cm. Y la examinación rectal confirmará la ausencia de cérvix. Características tales como labios vulvares pequeños o elongación del clitoris, no son características consistentes (95).

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 (91, 95).

Cuando ha ocurrido anastomosis vascular en 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 (95, 150). 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. 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 (163).

En todo caso de intersexualidad y malformaciones de los órganos genitales, debe ser considerando en primer rango un diagnóstico citogenético (124).

En el método citogenético para diagnóstico de freemartinismo, 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 células con cromosomas XX (75, 95).

Estadísticamente 90 células XX tienen que ser contadas antes de que uno pueda estar 99% seguro de que no hay células XY presentes en un nivel del 5% (95).

Popescu y col. (1988), identificaron quimerismo hematopoyético en un freemartin bovino mediante una prueba de hibridación *in situ* específica para cromosoma Y.

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 cariotipo XY (142, 173).

Setiabudi (1993), mediante la técnica de PCR y el análisis citogenético, diagnóstico el síndrome freemartin en nueve terneras nacidas con un ternero macho, mostrando por 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 respecto al porcentaje de células XX/XY.

Olsaker y col. (1993), diagnosticaron el síndrome freemartin en tres animales con el método de PCR, utilizando un **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 más bajo para la detección de células XY, mediante la difusión de sangre de toro en sangre de novilla, previamente a la prueba de PCR, determinando que pueden ser detectados productos específicos de cromosoma Y en muestras que contienen tan poco como 0.1% de células XY si el primer BRY.4a es usado solo.

Con la técnica de PCR en el diagnóstico de freemartin sólo se requiere un volumen pequeño de sangre, las muestras que han sido conservadas por varios días en el refrigerador y aun son contaminadas con

microorganismos, dan resultados exactos, además de que si no hay tubos disponibles con EDTA o heparina, las gotas de sangre pueden ser preparadas y amplificadas después. La única desventaja actual que representa el uso de la técnica de PCR es el costo que es 2.5 veces más, comparado con el método citogenético (142, 173).

## 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 la mejor comprensión de la diferenciación sexual normal y sus anormalidades (134). El presente trabajo pretende estudiar citogenética y anatomopatológicamente animales bovinos freemartin para contribuir al posible entendimiento de esta anomalía sexual, ya que su manifestación es muy heterogénea entre individuos.

En las poblaciones silvestres, la fertilidad reducida o la esterilidad, entre otros rasgos, debe ser sometida a una presión de selección natural. En las especies domésticas, la intensidad de la selección artificial practicada por el hombre, a su vez desempeña un papel muy importante en forma análoga. De manera que se esperaría que las aberraciones cromosómicas con efectos adversos al desarrollo sexual y/o la fertilidad fueran prontamente eliminadas en las poblaciones animales, sin embargo, se debe hacer hincapié en la falta de diagnóstico de las causas de falla reproductiva en muchos de los casos en las especies domésticas (67).

Esta estimado que en bovinos, el 92% de las concepciones gemelares establecen fusión intrauterina del corión y desarrollan anastomosis vascular común, con el consecuente intercambio de células sanguíneas (*quimerismo hematopoyético*). En el caso de gestaciones múltiples heterosexuales, las terneras quiméricas freemartins, presentan distintos grados de virilización y son preferentemente estériles (99).

## JUSTIFICACION

Las investigaciones a nivel citogenético en animales domésticos, han tenido un desarrollo pobre y una difusión escasa en México, pese a los estudios realizados en otros países con ganadería desarrollada, los cuales demuestran la importancia de su aplicación en el diagnóstico de diversos estados patológicos tales como mortalidad embrionaria, malformaciones congénitas, esterilidad, subfertilidad e intersexualidad.

Tanto el desarrollo como la aplicación de estudios cromosómicos en las explotaciones pecuarias, serían igualmente esenciales como herramienta en los programas de mejoramiento genético; ya que son parte integral del diagnóstico de padecimientos que tienen efectos adversos en la fertilidad de los animales domésticos.

El estudio de la intersexualidad en mamíferos domésticos es importante porque puede contribuir al conocimiento de los mecanismos implicados en la diferenciación sexual, por lo que resulta indispensable la implementación de técnicas diagnósticas que identifiquen de manera eficiente estas anomalías (101).

En el diagnóstico de síndrome freemartin básicamente se pueden emplear 5 diferentes técnicas:

1. Examen clínico; con la desventaja de que algunas veces las características clínicas diagnósticas son inconsistentes.
2. Prueba de tolerancia a homoinjerto; la cual es complicada y además el macho cogemelo no siempre está disponible.
3. Prueba de tipos sanguíneos; esta práctica a menudo da resultados inconclusos debido a que la hemólisis no específica incrementa con la manipulación externa sufrida por los eritrocitos.
4. Método citogenético; en el que solamente cerca del 8% de los freemartins tienen la pequeña desventaja de tener menos de 10% de células XY, desventaja que se puede saldar con un conteo de metafases mayor a las 10 - 20 analizadas convencionalmente, o mediante el cariotipo del macho cogemelo en caso de disponer de éste.
5. Método de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR); que ofrece resultados rápidos y exactos con las desventajas de un costo 2.5 veces mayor al método citogenético y la disponibilidad del equipo (142, 173).

El grado de variación fenotípica del freemartin es particularmente importante en relación a su diagnóstico. Una proporción de freemartins poseen tractos reproductivos muy similares a los de las hembras normales. Además el estudio temprano de las becerras cogemelas con un macho es de importancia económica cuando se obtiene un diagnóstico más preciso sobre el futuro reproductivo de la hembra (174).

## **OBJETIVOS**

### **OBJETIVO GENERAL**

Estudiar citogenética y anatomopatológicamente animales bovinos (*Bos taurus*), que procediendo de partos múltiples heterosexuales, sean diagnosticados como individuos que presentan el síndrome freemartin.

### **OBJETIVOS PARTICULARES**

1. Emplear el uso del 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. Estudiar anatomopatológicamente el tracto reproductor de los animales diagnosticados como freemartin, enfatizando en las características del tejido gonadal (ovárico y/o testicular) presente.

## MATERIAL Y METODOS

Se seleccionaron 10 bovinos (*Bos taurus*) que tenían el antecedente de proceder de partos múltiples heterosexuales. Se abrió una historia clínica de cada caso 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 conteniendo 14 U de heparina.

En el laboratorio los cultivos de linfocitos de sangre periférica fueron realizados en condiciones de esterilidad bajo campana de flujo laminar, de la siguiente manera: aproximadamente 0.5 ml de células sanguíneas sedimentadas, fueron agregadas en tubos de cultivo que contenían 8 ml de medio de cultivo RPMI 1640, 10 - 20% de suero fetal de ternero o de plasma autólogo, 9.90 U. I. de fitohemaglutinina (SIGMA) por ml de medio de cultivo, y antibióticos (24.69 UI de penicilina más 24.69  $\mu$ g de estreptomicona por ml de medio de cultivo). Se incubaron cerca de 72 horas a una temperatura de 37 - 38°C. Para la cosecha de las células se adicionó colchicina al medio de cultivo (100  $\mu$ g/ml) por 30 minutos, posteriormente las células se incubaron por 20 minutos a 37 - 38°C en una solución hipotónica de 0.75 M de CIK, subsecuentemente se fijaron en solución Carnoy (Metanol : Acido Acético en proporción 3 a 1), y se extendieron en portaobjetos previamente desengrasados.

Las preparaciones cromosómicas fueron tratadas con tinción de Giemsa al 5% en buffer de fosfatos. Se obtuvieron impresiones fotográficas tomadas al microscopio de luz bajo objetivo de inmersión. Para la identificación de los cromosomas sexuales se consideraron las recomendaciones de la Segunda Conferencia Internacional para la Estandarización de Cariotipos en Animales Domésticos (Jouy-en-Josaas, France, 1989). Se pretendió analizar un total de 100 metafases para cada caso individual determinando la proporción de tipos celulares.

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 remisión al laboratorio de histopatología. Los especímenes fueron procesados bajo técnicas estándar de histología con inclusión en parafina y tinción de hematoxilina y eosina.



## RESULTADOS

El estudio citogenético permitió determinar el número cromosómico e identificar los cromosomas sexuales en los 10 animales considerados, en seis individuos se pudieron analizar 100 metafases, en dos de ellos 44, en uno 45, y en otro animal tan sólo se recuperaron tres metafases. Los resultados del análisis citogenético de los individuos se muestran en la **tabla No. 2**. Se observó un rango en el grado de quimerismo cromosómico sexual en los animales definidos como freemartin, desde 48 hasta 100% de leucocitos con complemento cromosómico 60,XY.

Los animales No. 1 y 2, cogemelos heterosexuales, de la raza Holstein-Friesian, no mostraron anomalías externas aparentes de la diferenciación sexual a la edad de aproximadamente cuatro meses. El estudio citogenético realizado reveló la presencia de quimerismo hematopoyético con un complemento cromosómico 60,XX/60,XY (**Fig. 1a-b y 2a-b**). De 100 células analizadas en cada individuo, en la ternera individuo No. 1, 52% de las células fueron 60,XX y 48% 60,XY, mientras que en el ternero individuo No. 2, 23% de las células fueron 60,XX y 77% 60,XY.

En el caso de los cogemelos heterosexuales No. 3 y No. 4, productos de la cruce Holstein-Friesian x Simmental y de aproximadamente tres meses de edad, se observó un sexo fenotípico masculino aparentemente bien definido en el animal identificado con No. 4, mientras que el individuo No. 3 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 (**Fig. 6**). Este prepucio contenía una estructura peneana (**Fig. 8**) 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 (**Fig. 6**). A la palpación de estos pliegues se evidenciaba una aparente criptorquidia bilateral. En el individuo No. 3 se encontró un complemento cromosómico 60,XX/60,XY (**Fig. 3a-b**); de un total de 100 células analizadas, el 7% mostraron un complemento cromosómico 60,XX y 93% 60,XY. En el individuo No. 4, también con complemento cromosómico 60,XX/60,XY, de 45 células analizadas, tres (6.7%) fueron 60,XX y el resto (93.3%) 60,XY.

El animal intersexo No. 3 fué mantenido hasta alcanzar aproximadamente 1 año de edad presentando libido de macho y pudiendo incluso utilizarse como celador. El estudio anatomopatológico al sacrificio del animal, demostró la presencia de dos gónadas intraabdominales con apariencia de testículos hipoplásicos y con un conducto con una semejanza epididimal (**Fig. 7**); así como aparentes conductos deferentes (**Fig. 9**), ampullas del conducto deferente (**Fig. 9**), vesículas seminales, próstata y un pene hipoplásico (**Fig. 8**). Ambas gónadas pesaron 15 g (**Tabla No. 3**). El estudio histológico (**Tabla No. 3**) reveló en ambas gónadas, únicamente la presencia de tejido testicular con túbulos seminíferos hipoplásicos carentes de células germinales (**Fig. 12, 13, 16, 17**), algunos de forma irregular y otros obliterados (**Fig. 11, 12, 13, 16, 17**); y

evidentes células de células de Sertoli (**Fig. 12, 13, 16, 17**) y de Leydig (**Fig. 12, 16**). Los cortes histológicos de los epidídimos evidenciaron azoospermia e hipoplasia, siendo claramente definido un epitelio cilíndrico simple ciliado (**Fig. 14, 15, 18, 19**). Además fueron identificadas células somáticas masculinas en ambas gónadas (**Tabla No. 3**). Histológicamente fué identificado el tejido eréctil y el conducto uretral de un pene subdesarrollado.

Los individuos No. 5 y No. 6 nacidos de parto gemelar heterosexual y de raza Holstein-Friesian, no presentaron anomalías sexuales externas congénitas aparentes. En el análisis citogenético que se practicó a los terneros aproximadamente a los 15 días de edad, se demostró, en la ternera individuo No. 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 (**Tabla No. 2**). De la muestra del cogemelo individuo No. 6, sólo se pudieron analizar 3 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.

Se estudiaron dos individuos aproximadamente de 2 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 individuo fue un macho que ya había sido sacrificado. El animal No. 7 fué un intersexo con una apariencia externa típica de un freemartin; mostraba un clitoris hipertrófico con una borla de pelos, además de una aparente criptorquidia bilateral. Sin embargo, el estudio citogenético reveló un cariotipo 60,XY en 100 células observadas (**Tabla No. 2**). El individuo No. 8 fué una vaquilla que a la palpación rectal presentó un tracto reproductor femenino y que de acuerdo al médico veterinario asesor del establo, 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 (**Fig. 4a**).

Una vez sacrificados los individuos, se realizó la disección del tracto reproductor. En la vaquilla, se observó un tracto reproductor con sus conductos aparentemente normales, gónadas a primera vista funcionales, con folículos en desarrollo y un cuerpo lúteo en la gónada derecha (**Fig. 10**). En los cortes histológicos de la gónada derecha se observaron escasos folículos primordiales, folículos primarios (**Fig. 28**), además de un cuerpo lúteo, un cuerpo albo y quistes foliculares. En la gónada izquierda se contemplaron folículos primordiales, folículos primarios (**Fig. 30**), células de la granulosa y células tecales (**Fig. 29**), además de un cuerpo albo y un cuerpo lúteo (**Fig. 31**).

El tracto reproductor del individuo No. 7 no pudo obtenerse completo en la sala de matanza, pero si sus gónadas, en las cuales macroscópicamente se contempló una aspecto testicular con un aparente epidídimo, observándose un peso de 6.7 g para la gónada derecha y un peso de 5.0 g para la izquierda (**Tabla No. 3**).

En secciones histológicas la gónada derecha presentó túbulos seminíferos hipoplásicos carentes de células germinales (Fig. 20, 22) y algunos con calcificación distrófica intraluminal (Fig. 22). Sin embargo en la gónada izquierda se evidenciaron algunos túbulos seminíferos bien delineados, células germinales con apariencia de espermatogonias (Fig. 25, 26) y túbulos seminíferos obliterados (Fig. 25). 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 (Tabla No. 3).

El individuo No. 9 fué una vaquilla Holstein-Friesian, nacida de parto gemelar 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, además, a la palpación rectal presentaba una vagina cranealmente ciega y ausencia de cérvix. El estudio citogenético corroboró el diagnóstico clínico de síndrome de freemartin mediante la presencia de un cariotipo 60,XX/60,XY. De 44 metafases observadas 6 (13.63%) fueron XX y 38 (86.36%) XY (Tabla No. 2).

El individuo No. 10 fué una vaca adulta raza Holstein-Friesian, nacida de parto dicigótico con un macho que no estuvo disponible para el análisis. En el momento del estudio citogenético la vaca tenía una edad de aproximadamente 7 años de edad. 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), registrándose su último parto 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 (Fig. 5a-b) De 100 células analizadas, 99% mostraron un complemento cromosómico 60,XX y 1% complemento aparentemente 60,XY.

**Tabla No. 2.** Constitución cromosómica mostrada y proporción de líneas celulares (XX : XY) en los animales de parto múltiple heterosexual estudiados.

No. DE PARTO	TIPO DE PARTO	RAZA	No. DE INDIVIDUO	SEXO FENOTIPICO *	CARIOTIPO	PROPORCION DE CELULAS XX : XY	DIAGNOSTICO
I	Gemelar	Holstein-Friesian	1	Hembra	60,XX/60XY	XX= 52 : XY= 48 (n= 100)	Freemartin
			2	Macho	60,XX/60XY	XX= 23 : XY= 77 (n= 100)	
II	Gemelar	Holstein/Simmental	3	Intersexo	60,XX/60XY	XX= 7 : XY= 93 (n= 100)	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)	Freemartin
			6	Macho	60,XX/60XY	XY= 3 (n= 3)	
IV	Triple	Pardo Suizo Americano	7	Intersexo	60,XY	XY= 100 (n= 100)	Freemartin
			8	Hembra	60,XX	XX= 100 (n= 100)	
V	Gemelar	Holstein-Friesian	9	Intersexo	60,XX/60XY	XX= 6 : XY= 38 (n= 44)	Freemartin
VI	Gemelar	Holstein-Friesian	10	Hembra	60,XX/60XY	XX= 99 : XY= 1 (n= 100)	Quimerismo Hematopoyético

\* El sexo fenotípico de los individuos se refiere a las características anatómicas de los órganos reproductores externos.

**Tabla No. 3.** Histología de las gónadas de los dos freemartins.

No. de Individuo	PESO DE LA GONADA (g)		ESTRUCTURAS CELULARES PRESENTES			
	Gónada Izquierda	Gónada Derecha	Túbulos Seminíferos	Células de Sertoli	Espermatogonias	Células de Leydig
3	15.0	15.0	++	++		++
7	5.0	6.7	++	++	+ <sup>i</sup>	++

++ Estructura presente en ambas gónadas.

+ Estructura presente en sólo una gónada.

<sup>i</sup> Gónada izquierda.

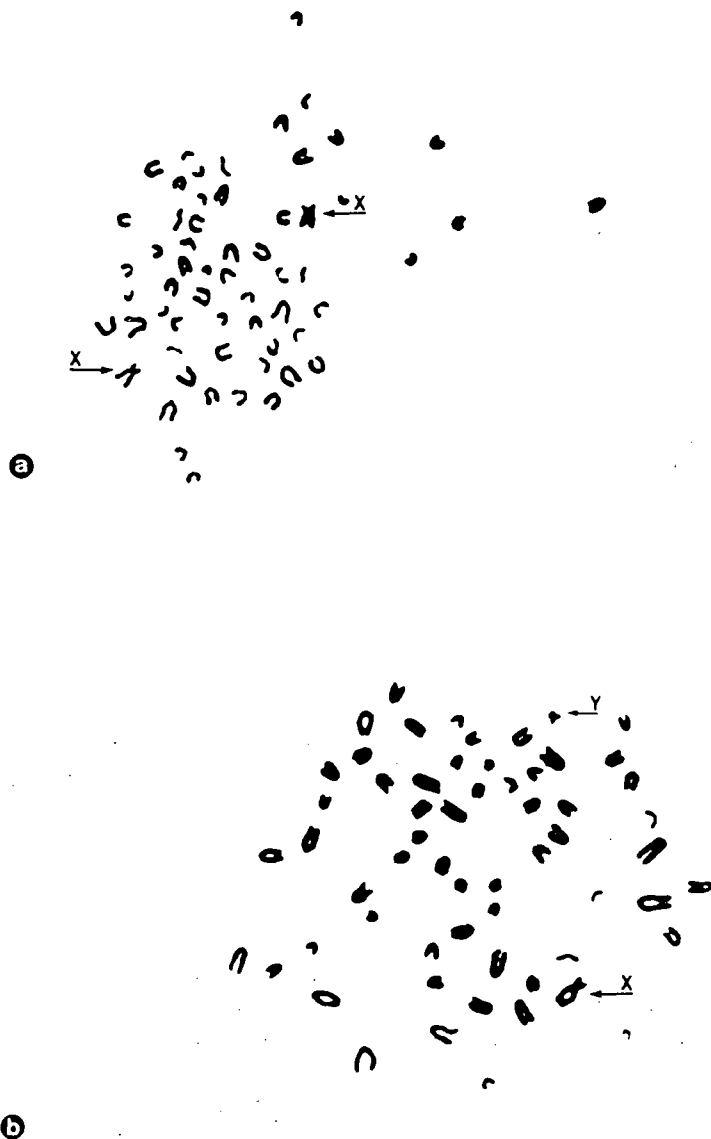
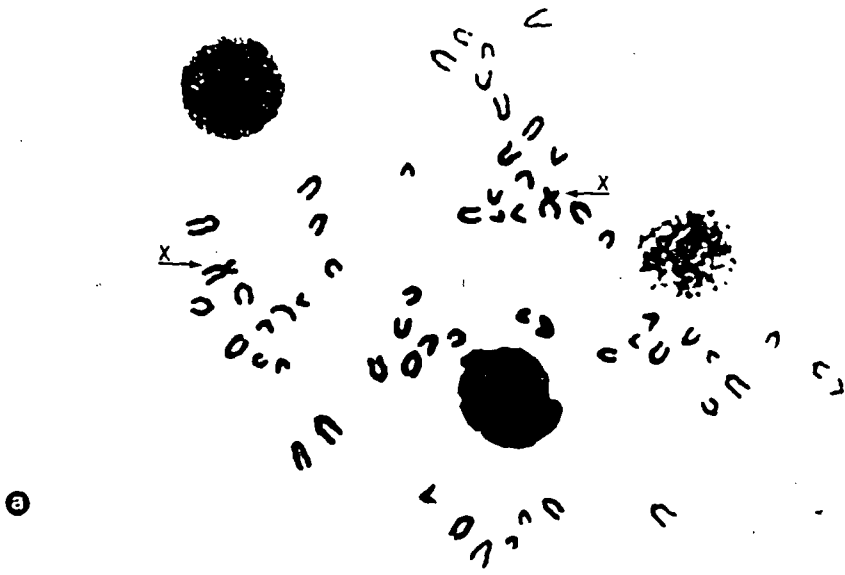
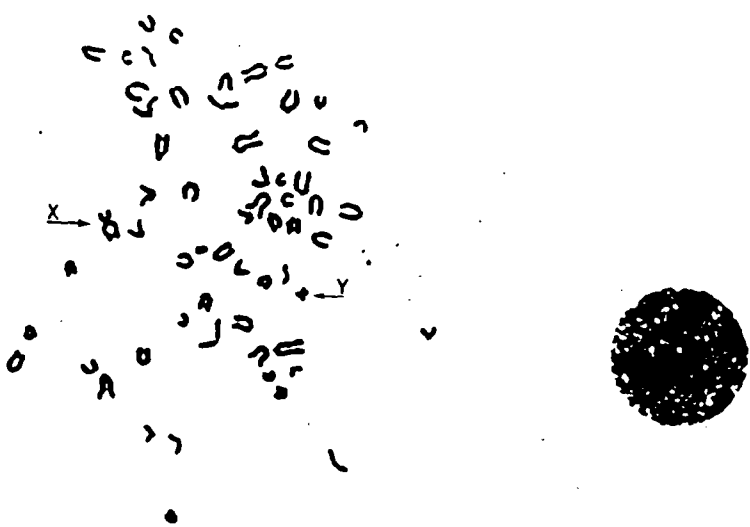


Fig. 1a-b. Microfotografía de células en metafase mostrando diferente complemento cromosómico sexual correspondientes al freemartin individuo No. 1. Nótese la presencia de cromosomas XX (fig. a) y XY (fig b).

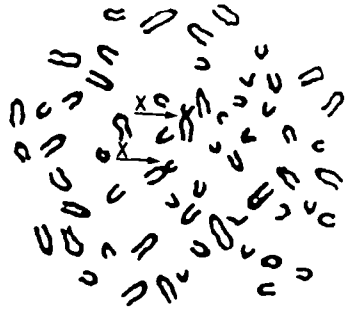


a



b

Fig. 2a-b. Microfotografía de células en metafase mostrando diferente complemento cromosómico sexual correspondientes al individuo No. 2, cogemelo del freemartin individuo No. 1. Nótese la presencia de cromosomas XX (fig. a) y XY (fig b).

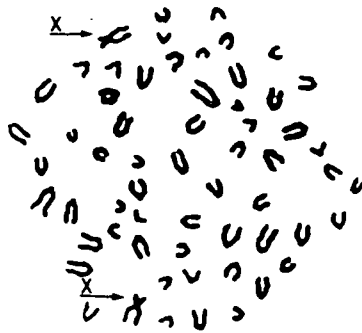


a



b

Fig. 3a-b. Microfotografía de células en metafase mostrando diferente complemento cromosómico sexual correspondientes al freemartin individuo No. 3. Nótese la presencia de cromosomas XX (fig. a) y XY (fig b).



a

Fig. 4a. Microfotografía de células en metafase mostrando complemento cromosómico sexual XX (fig. a) correspondiente a la vaquilla individuo No. 8.





a



b

Fig. 5a-b. Microfotografía de células en metafase mostrando diferente complemento cromosómico sexual correspondientes a la quimera individuo No. 10. Nótese la presencia de cromosomas XX (fig. a) y XY (fig b).



**Fig. 6.** Vista de cúbito dorsal de la región pélvica del freemartin individuo 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 son similares a los de un macho normal de esa edad.



**Fig. 7.** Gónadas hipoplásicas de apariencia testicular del freemartin individuo No. 3: D = gónada derecha; I = gónada izquierda. Estas gónadas estaban localizadas en las bolsas escrotales y pesaron 15 g cada una.

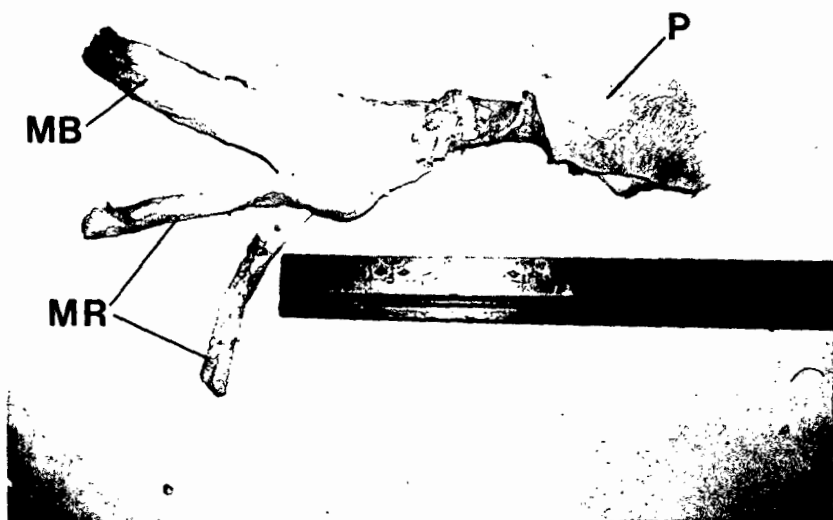


Fig. 8. Vista lateral del pene hipoplásico del freemartin individuo No. 3: MB = músculo bulboesponjoso; MR = músculos retractores del pene; P = prepucio.

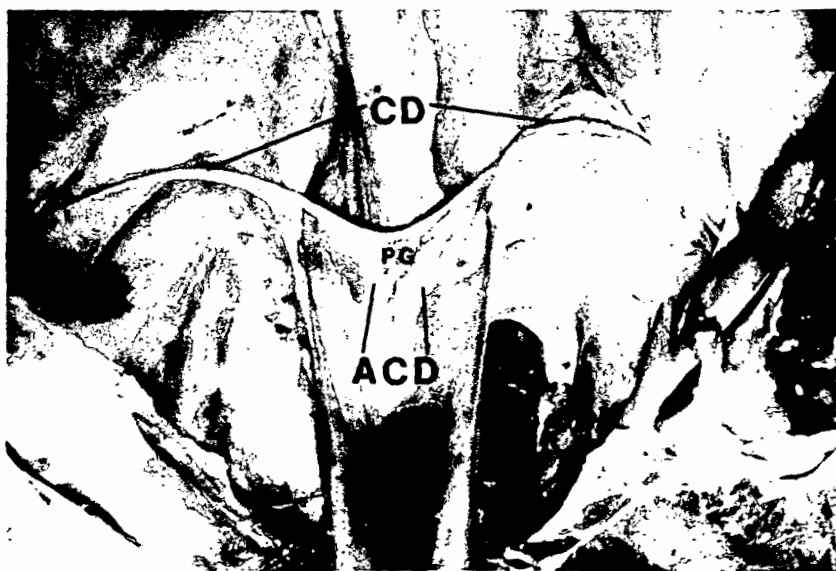
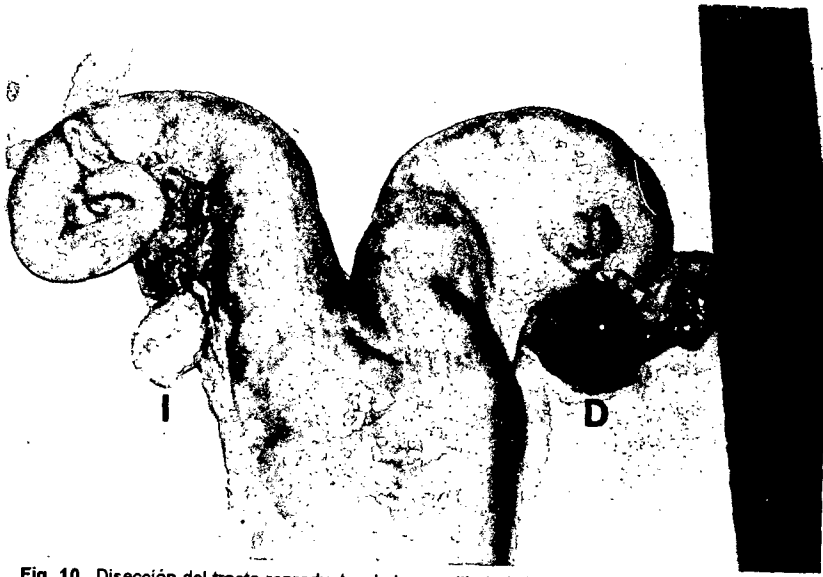


Fig. 9. Vista de cúbito dorsal del área pélvica, disección del freemartin individuo No. 3, en la que se observan partes del tracto reproductor: CD = conductos deferentes; PG = pliegue genital; ACD = ampulas de los conductos deferentes; V = vejiga.



**Fig. 10.** Disección del tracto reproductor de la vaquilla individuo No. 6. D = ovario derecho; I = Ovario izquierdo. Nótese el folículo de Graaf en la gónada derecha (punta de flecha).



**Fig. 11.** Microfotografía del corte histológico de la gónada derecha del freemartin individuo No. 3. Se observa hipoplasia de túbulos seminíferos (flechas). EI = espacio intersticial; TA = túnica albugínea. H & E. X 40.



**Fig. 12.** Microfotografía del corte histológico de la gónada derecha del freemartin individuo No. 3. Se observa un acercamiento de la hipoplasia de túbulos seminíferos (flechas) de la figura anterior. S = células de Sertoli; L = células de Leydig; TA = túnica albugínea. H & E. X 100.



Fig. 13. Microfotografía del corte histológico de la gónada derecha del freemartin individuo No. 3. Se observan túbulos seminíferos irregulares carentes de células germinales (flechas). S = células de Sertoli. H & E. X 400.



Fig. 14. Microfotografía del corte histológico del epidídimo de la gónada derecha del freemartin individuo No. 3. Se observan túbulos tortuosos carentes de células germinales y con contenido amorfo. H & E. X 100.



Fig. 15. Microfotografía del corte histológico del epidídimo de la gónada derecha del freemartin individuo No. 3. Se observan un acercamiento de los túbulos tortuosos carentes de células germinales y con contenido amorfo, de la figura 14. H & E. X 400.

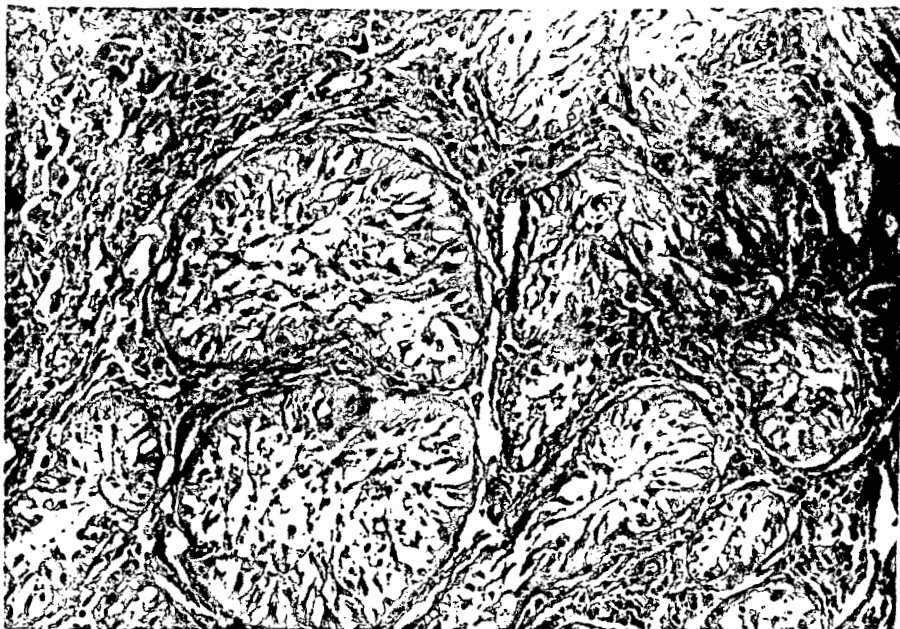


Fig. 16. Microfotografía del corte histológico de la gónada izquierda del freemartin individuo No. 3. Se observan túbulos seminíferos irregulares con células de Sertoli, y, espacio intersticial con células de Leydig. H & E. X 100.

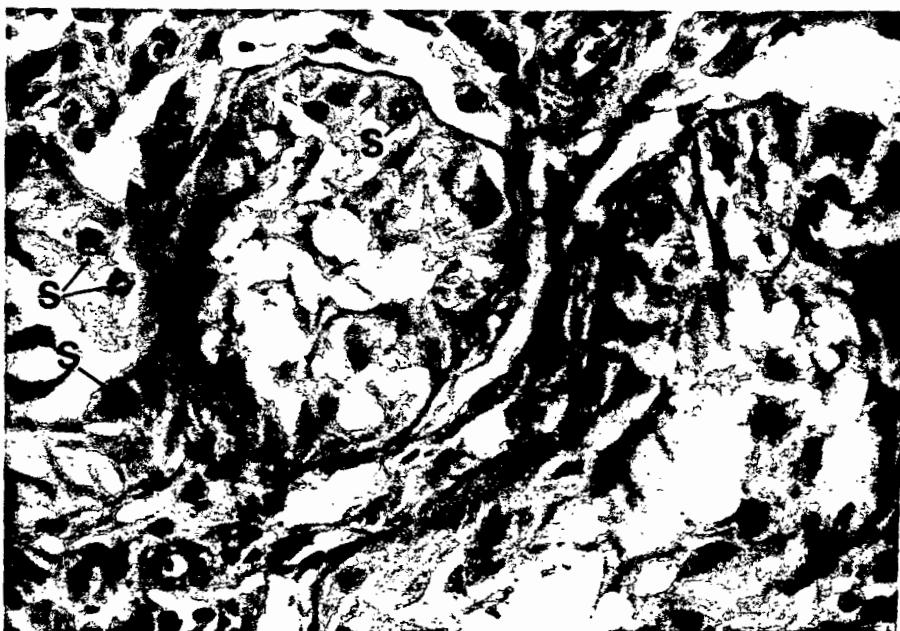


Fig. 17. Microfotografía del corte histológico de la gónada izquierda del freemartin individuo No. 3. Se observan túbulos seminíferos irregulares carentes células germinales. S = células de Sertoli. H & E. X 400.

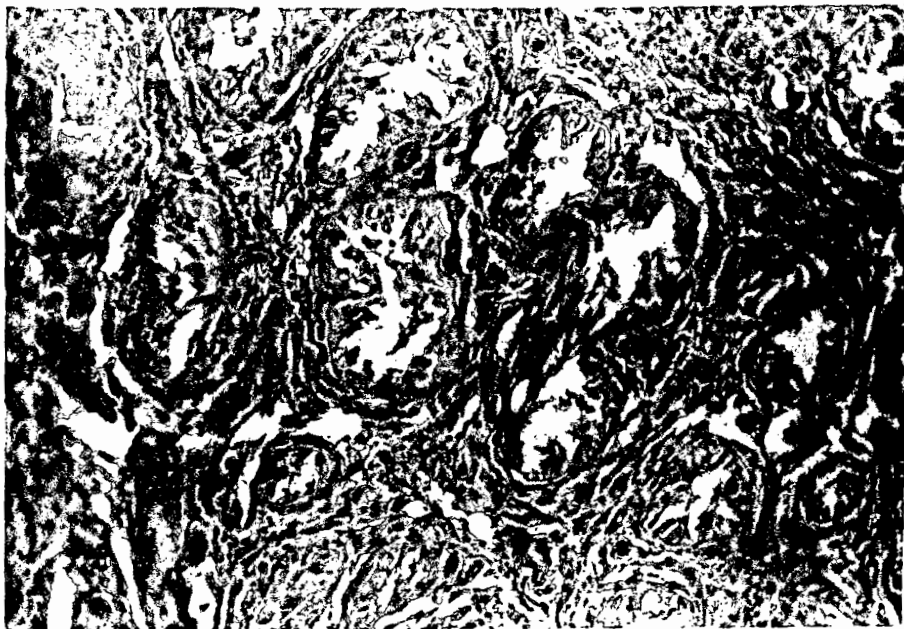




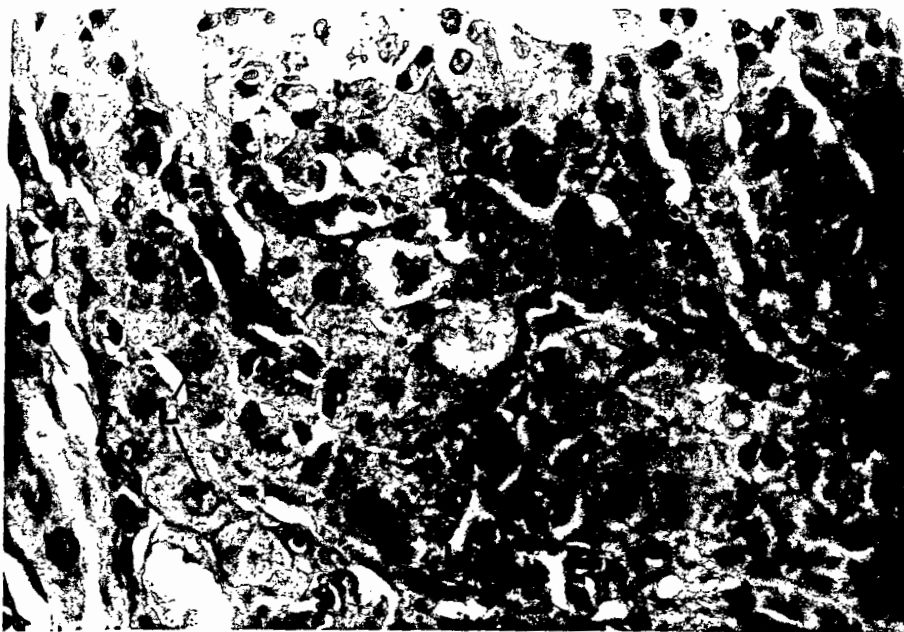
Fig. 18. Microfotografía del corte histológico del epidídimo de la gónada izquierda del freemartin individuo No. 3. Se observan túbulos tortuosos carentes de células germinales y con contenido amorfo. H & E. X 100.



Fig. 19. Microfotografía del corte histológico del epidídimo de la gónada izquierda del freemartin individuo No. 3. Se observan un acercamiento de los túbulos tortuosos carentes de células germinales y con contenido amorfo, de la figura 18. H & E. X 400.



**Fig. 20.** Microfotografía del corte histológico de la gónada derecha del freemartin individuo No. 7. Se observan túbulos seminíferos ligeramente irregulares carentes de células germinales. S = células de Sertoli. H & E. X 40



**Fig. 21.** Microfotografía del corte histológico de la gónada derecha del freemartin individuo No. 7. Se observa la abundante celularidad del espacio intersticial. L = células de Leydig. H & E. X 400.

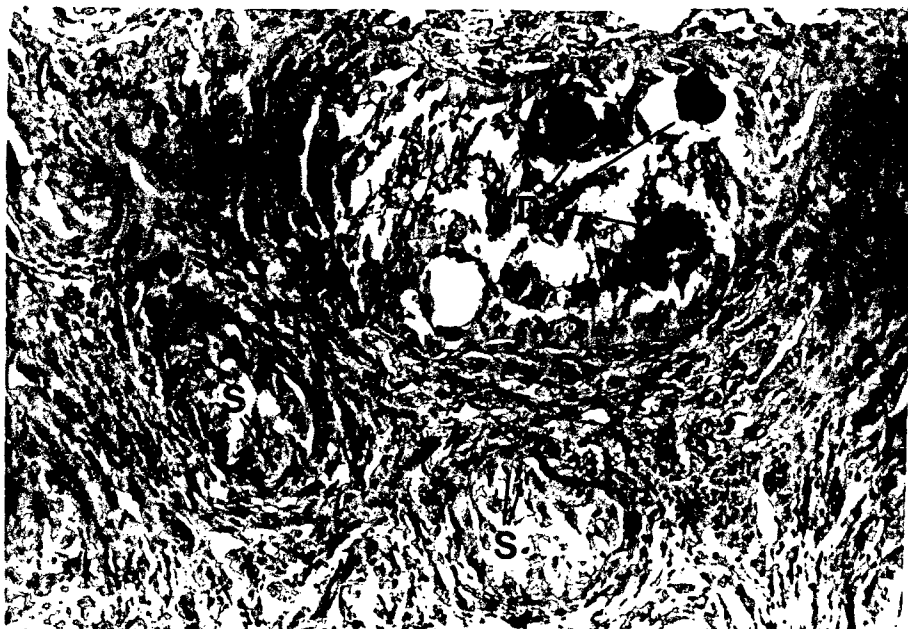


Fig. 22. Microfotografía del corte histológico de la gónada derecha del freemartin individuo No. 7. Se observan túbulos seminíferos carentes de células germinales y con calcificación distrófica. S = células de Sertoli; CD = calcificación distrófica. H & E. X 100.

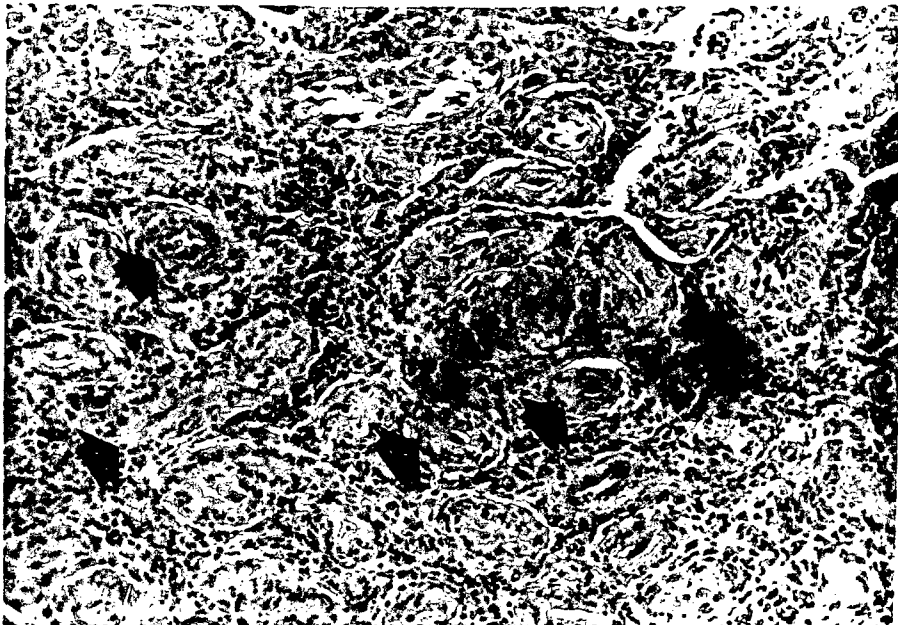


Fig. 23. Microfotografía del corte histológico de la gónada izquierda del freemartin individuo No. 7. Se observan túbulos seminíferos obliterados (flechas). H & E. X 40.

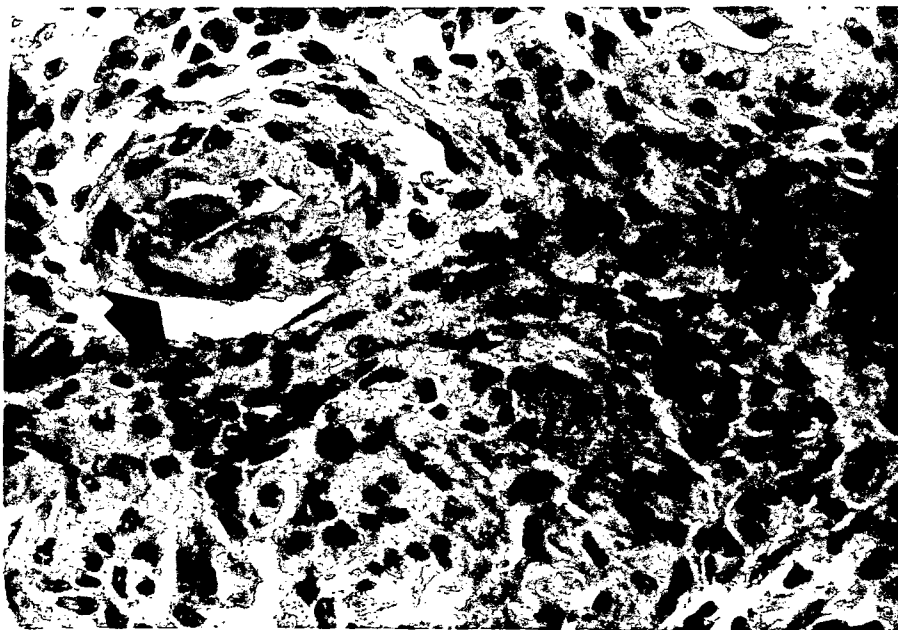


Fig. 24. Microfotografía del corte histológico de la gónada izquierda del freemartin individuo No. 7. Se observa un acercamiento a dos túbulos seminíferos obliterados (flechas). H & E. X 400.

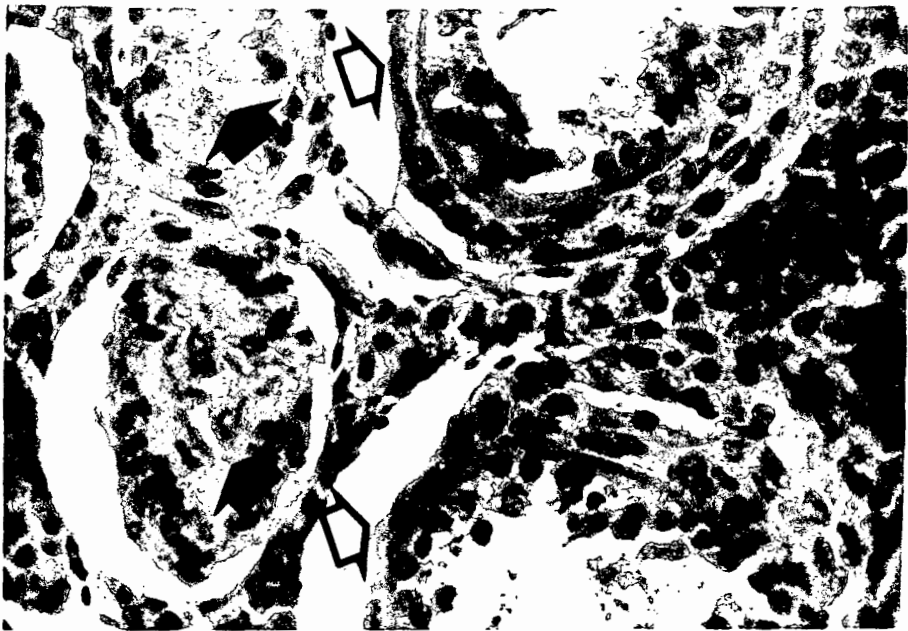


Fig. 25. Microfotografía del corte histológico de la gónada izquierda del freemartin individuo No. 7. Se observan dos túbulos seminíferos con aparentes espermatogonias y escasas células de Sertoli (flechas claras), y, dos túbulos seminíferos obliterados (flechas oscuras). H & E. X 400.

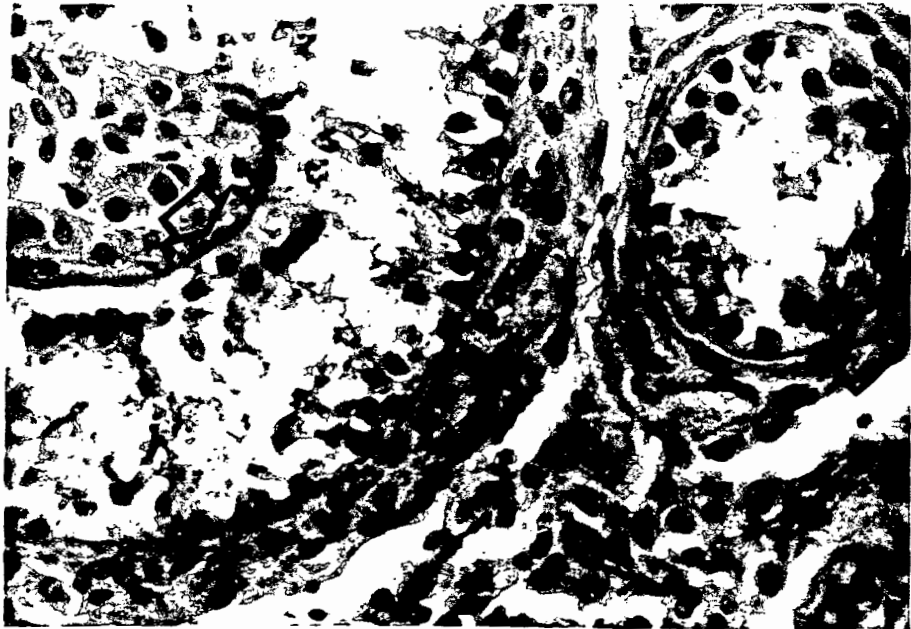


Fig. 26. Microfotografía del corte histológico de la gónada izquierda del freemartin individuo No. 7. Se observan dos túbulos seminíferos con aparentes espermatogonias y escasas células de Sertoli (flechas). H & E. X 400.



Fig. 27. Microfotografía del corte histológico del ovario derecho de la vaquilla individuo No. 6. Se observan células foliculares cúbicas (flecha) correspondientes a parte del área de la pared de un quiste folicular. SI = secreción intrafollicular. H & E. X 100.

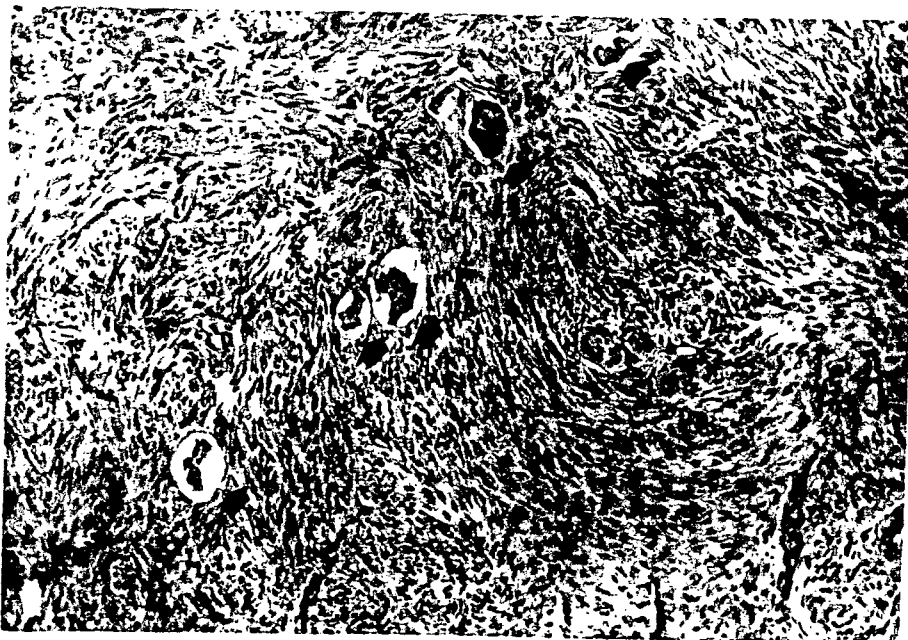


Fig. 28. Microfotografía del corte histológico del ovario derecho de la vaquilla individuo No. 6. Se observan folículos primordiales sin evidencia de óvulo en su interior (flechas). H & E. X 40.



Fig. 29. Microfotografía del corte histológico del ovario izquierdo de la vaquilla individuo No. 6. Se observa un folículo en desarrollo. CG = células de la granulosa; CT = células tecales. H & E. X 40.

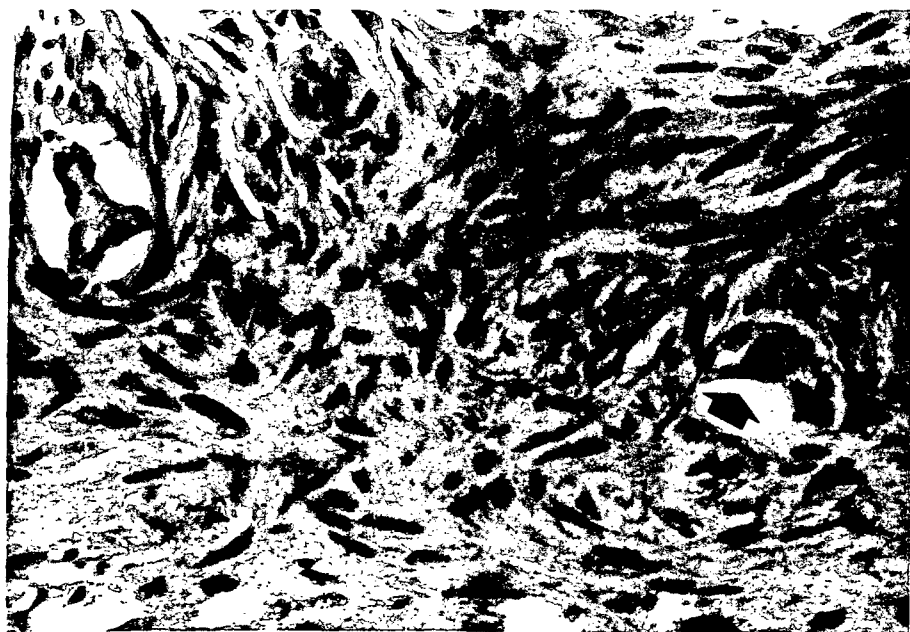


Fig. 30. Microfotografía del corte histológico del ovario izquierdo de la vaquilla individuo No. 6. Se observan folículos primarios (flechas). H & E. X 400.



**Fig. 31.** Microfotografía del corte histológico del ovario izquierdo de la vaquilla individuo No. 6. Se observa parte del área correspondiente a un cuerpo lúteo (flecha grande) y a un cuerpo albo (flecha pequeña) H & E. X 40.



## DISCUSION

Aunque el principal foco de interés en diferenciación sexual, ha sido la especie humana, muchos aspectos del proceso han sido mejor estudiados en otras especies (60). Diferentes investigaciones han tenido como parte central de estudio el fenómeno freemartin desde 1779 recibiendo la atención de embriólogos, anatomistas, inmunólogos, citogenetistas y últimamente de biólogos moleculares.

Etimológicamente la palabra freemartin designa a una vaca o vaquilla estéril (*farrow* = animal infecundo y *mart* = vaca o vaquilla), pero por extensión se aplica a una hembra genética concebida en un parto múltiple heterosexual con el consecuente establecimiento de la anastomosis vascular coriónica que resulta en una circulación fetal común con intercambio de células y sustancias plasmáticas, como hormonas, que en grado variable conlleva a un estado intersexual mediante la inhibición de la gónada femenina y la regresión de los conductos de Müller, y la posterior masculinización de las gónadas y de los conductos de Wolff.

Si bien el síndrome freemartin no es heredable, la tendencia a engendrar gemelos si lo es, con una frecuencia del 1 al 4%, presentando variaciones aun entre una misma raza, siendo más frecuente entre las razas de aptitud cárnica que entre las de potencial lechero. En el ganado cebú se reporto 0.22% de gemelaridad en 22,949. Los partos múltiples de más de dos terneros son raros (84, 99).

Como regla general cuanto más pronunciada es la tendencia a partos simples en una especie animal determinada, menor es la viabilidad de la descendencia en los partos múltiples que se puedan presentar. En muchos casos la vaca pare los terneros gemelos, pero cuando el número de fetos excede de dos, la mayoría de las gestaciones terminan en muerte embrionaria temprana y/o aborto (84, 66).

La frecuencia de freemartinismo ha sido estimada en 92% para los partos gemelares heterosexuales del bovino, sin embargo, pueden producirse en nacimientos de hembras únicas y en partos múltiples heterosexuales de más de dos productos, tal como en el parto de triates estudiado en este trabajo (Tabla No. 2).

Siendo tan alta la frecuencia de freemartinismo en los partos múltiples heterosexuales del bovino y tan baja en otras especies domésticas como caprinos (~ 6%), ovinos (~ 1%), cerdos y animales silvestres como el venado rojo y el carnero de las rocosas, probablemente ciertos mecanismos biológicos diferentes entre especies monótocas y polítocas, y aun dentro de las monótocas, han evolucionado de manera que la anastomosis vascular y el intercambio de células y sustancias entre fetos es limitado o evitado (99, 110, 152, 175).

La variación en el grado de masculinización en el freemartinismo es particularmente importante en relación al diagnóstico, pues una proporción de freemartins puede poseer tracto reproductivo muy similar a aquellos de las vaquillas normales y, en éstos, la exploración clínica no sería un método preciso de detección. Además, económicamente es importante un diagnóstico acertado que se realice tempranamente en las becerras nacidas en partos múltiples heterosexuales, tal como el análisis citogenético, para determinar el futuro reproductivo de la hembra.

Los genitales externos de las freemartins son femeninos en apariencia, pero los genitales internos comúnmente muestran masculinización. La vulva generalmente es más pequeña que la de las vaquillas normales y un mechón de pelos puede surgir de la comisura vulvar inferior. El clitoris es largo y puede protuir. Los pezones son rudimentarios. 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 y desarrollo de los derivados de Wolff. La vagina es más corta que en las vaquillas normales y ciega cranealmente, ya que tiene un doble origen, el tercio anterior deriva del conducto uterino y los dos tercios posteriores del seno urogenital. El cérvix puede estar ausente. El desarrollo del útero puede variar grandemente de ausencia total a una longitud normal de los cuernos uterinos, aunque estos usualmente están representados sólo por una estrecha banda de tejido. Los vasos deferentes y las vesículas seminales pueden estar presentes (84, 175).

En los freemartins los casos extremos de masculinización de las gónadas pueden formar tejido testicular. Tales fueron los animales No. 3 y No. 7 de este estudio, los cuales presentaron conductos con 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. El útero y los tubos de falopio pueden estar presentes aunque pobremente desarrollados mientras la vulva y la vagina pueden ser normales (175).

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 (76).

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 animal intersexo No. 3 que además de detectar hembras en celo desarrollo conformación física masculina.

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 individuo No. 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 individuo 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. Lamentablemente no se dispuso del tercer individuo para completar el estudio de fenómeno ocurrido, el cual, según el Médico Veterinario responsable del establo, fue un macho.

El caso del freemartin No. 7, puede ser comparado con dos reportes similares. Hohn y Wiedeking (1974), identificaron un freemartin con un escroto pequeño, testículos localizados en la parte más baja del canal inguinal, un pene de 26 cm en su longitud completa, con flexura sigmoidea y terminación en un prepucio inguinal, una uretra peneana y una vagina corta. La evaluación citogenética a los 10 meses de edad reveló 94% células XY en sangre y a los 22 meses 100% células XY en este tejido y 100% células XX en tejido de testículo y músculo. Asimismo, 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 encontrados en la gónada izquierda del freemartin No. 7 de este estudio, Wilkes y col. (1978) reportaron un caso de freemartinismo en una oveja con estos hallazgos gonadales, más calcificación distrófica, como en el caso de la gónada derecha de este freemartin No. 7.

Existen muy pocos reportes de vacas fértiles cogemelas con un macho y con quimerismo de los cromosomas sexuales, Eldridge y Blazar (1977); Smith y col. (1977) y Miyake y col. (1980). En este estudio se diagnosticó una vaca con quimerismo hematopoyético con 99% células XX y 1% células XY, madre de tres terneros. Para este caso se plantean estudios posteriores que incluirán amplificación de DNA utilizando secuencias de DNA específicas para el cromosoma Y. Asimismo, se obtuvo también DNA de uno de sus descendientes para realizarles una prueba de paternidad en caso de resultar positiva la prueba de PCR.

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 (100, 148).

Otro fenómeno interesante resalta de las terneras nacidas cogemelas con un macho, pero con complemento cromosómico 60,XX, que sin embargo, desarrollan el síndrome freemartin, de las cuales se pudiera interpretar que con anastomosis vascular la mezcla de células XX/XY no siempre se establece. Posiblemente exista una

membrana que impida la llegada de células de intercambio, pero que sea permeable a otros agentes capaces de inducir la condición freemartin (64).

Dado que los partos gemelares se presentan con mayor frecuencia en el ganado de aptitud lechera, 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, es pertinente un diagnóstico acertado de estos individuos. La **Bioteología Animal** nos ofrece una herramienta útil para un diagnóstico preciso y oportuno a través de la **Citogenética**, que rebasa los problemas de las metodologías clásicas como el impreciso diagnóstico clínico y las limitantes del estudio de tipos sanguíneos. Van Haeringen y Van de Nieuwenhuizen (1980), reportaron una vaca Dutch belted de 2 años de edad, cógema con un macho, y con anestro, que en la prueba de grupos sanguíneos no tuvo reacción, quizá porque no hubo quimerismo de células rojas o porque casi el 100% de la población de células rojas de la hembra, llegaron del macho, en tanto que el estudio citogenético reveló 90% de células XX y 3% XY.

Históricamente han sido propuestas varias hipótesis para la explicación del fenómeno freemartin, transferencia de: 1) células germinales primordiales y otras células, 2) promotor testicular antígeno H-Y, y 3) hormonas MIS y testosterona. Cada una de estas hipótesis fue aceptada en su momento como la causa actual de esta condición intersexual (30).

Respecto a la hipótesis celular, las quimeras XX/XY experimentales de ratón, usualmente se desarrollan como macho y en éstas 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 o TDF; del inglés Testis Determining Factor (15, 158).

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; 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 (39, 94). Mintz no encontró en ratones quiméricos, evidencia de que células XX llegaran a formar espermatozoides e identificó un ratón macho quimera con un mínimo de 95% células somáticas XX y todas las células germinales XY (76).

Wilkes y col. (1980), identificaron un complemento cromosómico XX/XY en gónadas de dos individuos de 19 becerras freemartins de un total de 46 compradas para crianza. En una freemartin se encontró un 2.5% de células XY en 150 células analizadas y en otra se encontró un 2% de metafases XY (79). Anteriormente Ohno y col. (1962), detectaron células germinales XX en los testículos de dos terneros quiméricos recién nacidos, posteriormente, Teplitz y col. (1967) identificaron espermatogonias y espermaticitos primarios XX

en especímenes testiculares de tres toros quiméricos de 2, 10 y 11 meses de edad (121). Sin embargo, lo anterior no ha sido confirmado por otros investigadores (Goodfellow y col., 1965; Kanagawa y col., 1965 a; Dun y col., 1968; Short y col., 1969; Kieffer y Sorensen, 1971; Vigier y col., 1973; Ford y Evans, 1977).

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 encontró 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 fué significativa. Lojda y Poláček (1984), realizaron un estudio en tres toros quiméricos, utilizados para I.A., reportando de 885 descendientes de un individuo, 59% hembras y 41% machos, mientras que en la descendencia de los otros dos toros no se encontraron diferencias en la proporción del sexo.

Ahora bien, quizá el macho cógemelo 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 y col. (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 edad gestación (bioensayo de actividad Mülleriana), causó 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 y col. (1977) ya habían reportado algo de actividad anti-Mülleriana en gónadas indiferenciadas de fetos porcinos 38,XY de 27 días de edad (166).

La fase crítica para la adquisición de la actividad anti-Mülleriana por la gónada freemartin probablemente este entre los 45 y 52 días, 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 (166, 167).

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 y col. (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 mostró Jost y col. (1972), la desfeminización del tracto genital del freemartin probablemente ocurre en dos estadios separados. El primer estadio de los 50 a 90 días 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 el tracto genital (desarrollo de túbulos seminíferos y estimulación derivados de Wolff) ocurre posteriormente, después de 90 días (166).

## CONCLUSIONES

El presente trabajo establece la utilidad de una herramienta moderna de *Biología Animal*, el *análisis citogenético*, para el diagnóstico más adecuado de la manifestación de una entidad de intersexualidad muy frecuente en las gestaciones múltiples heterosexuales (92% en partos gemelares) del ganado bovino doméstico, el *síndrome freemartin*.

Este estudio permitió identificar cinco (83 %) bovinos freemartin (v. gr. *quimerismo hematopoyético*) de un total de seis animales candidatos, lo que posiblemente resalta la alta frecuencia de este síndrome reportada en la literatura, cuando se presenta un parto múltiple heterosexual en esta especie.

Dado que el quimerismo hematopoyético al parecer en algunas ocasiones no está asociado al síndrome freemartin, se observa en el presente trabajo la necesidad de no sólo recurrir a técnicas que evidencian la anastomosis vascular entre los terneros, como el análisis citogenético, si no suplementar evaluaciones clínicas que nos conduzcan a una mejor designación del probable fenómeno presente.

Los hallazgos anatomopatológicos de los dos individuos freemartins estudiados hasta su sacrificio, exhibieron masculinización del tracto reproductor con únicamente tejido testicular en las gónadas, grado de virilización similar al reportado en la literatura para vaquillas freemartin.

## BIBLIOGRAFIA

1. Artur, G. H.; Noakes, D. E. y Pearson, H. (1991) Reproducción y Obstetricia en Veterinaria. 6a. edición. Ed. Interamericana Mc. Graw Hill, Madrid, 114 - 136, 621 - 622 España.
2. Ashley, T.; Lieman, J. and Ward, D. C. (1995) Multicolor FISH with a telomere repeat and Sry sequences shows that Sxr (*Sex reversal*) in the mouse is a new type of chromosome rearrangement. *Cytogenet Cell Genet*, 71: 217 - 222.
3. Austin, C. R. and Short, R. V. (1982) Procesos de Reproducción en los Mamíferos: desarrollo embrionario y fetal. La Prensa Médica Mexicana, S. A. 1 - 72 México.
4. Banks, W. J. (1990) *Histología Veterinaria Aplicada. 1a reimpresión. Ed. Manual Moderno: 606 - 657. México, D. F.*
5. Basrur, P. K. and Kanagawa, H. (1971) Sex anomalies in pigs. *J. Reprod. Fert.* 26: 369 - 371.
6. Basrur, P. K. (1974) Innovations in Cytogenetics and Applications to Domestic Animals. 1er Congreso Mundial de Genética Aplicada a la Producción Ganadera. Et. Garsi Madrid, España: 215 - 227.
7. Behringer, R. R.; Cate, R. L.; Froelick, G. L.; Palmiter, R. D. and Brinster, R. L. (1990) Abnormal sexual development in transgenic mice chronically expressing Müllerian inhibiting substance. *Nature*, 345: 167 - 170.
8. Benirschke, K.; Cohen, M. M.; Hall, J. G.; Lenz, W.; Lowry, R. B.; Opitz, J. M.; Pinsky, L.; Schwarzacher, H. G.; Smith, D. W. and Spranger, J. 1980 Recommendations of an International Committee on Nomenclature in Birth Defects June 8-11: 213 - 224.
9. Berkovitz, G. D.; Fechner, P. Y.; Marcantonio, S. M.; Bland, G., Stetten, G., Goodfellow, P. N.; Smith, K. D. and Migeon, C. J. 1992 The role of the sex-determining of the Y chromosome (SRY) in the etiology of 46,XX true hermaphroditism. *Hum. Genet.* 88: 411 - 416.
10. Berta, P.; Hawkins, J. R.; Sinclair, H.; Taylor, A.; Griffiths, B. L.; Goodfellow, P. N. and Fellous, M. (1990) Genetic evidence equating SRY and the testis-determining factor. *Nature*, 348: 448 - 450.
11. Betancourt, A.; Guitierrez, C. y Sánchez, A. (1974) Importancia del estudio cromosómico en bovinos seleccionados como reproductores. 1er. Congreso Mundial de Genética Aplicada a la Producción Ganadera. Ed. Garsi.: 213 - 218. Madrid.
12. Betancourt, A.; Guitierrez, C. y Sánchez, A. (1974) Los cromosomas del *Bos taurus*, *Bos indicus*, *Bison bonasus*, y sus híbridos. 1er. Congreso Mundial de Genética Aplicada a la Producción Ganadera. Ed. Garsi: 173 - 176. Madrid.
13. Bishop, M. W. H. (1972) Genetically determined abnormalities of the reproductive system. *J. Reprod. Fert., Suppl* 15: 51 - 78.
14. Blowey, R. W. y Weaver, A. D. (1992) Atlas en color de Patología del Ganado Vacuno. Ed. Interamericana Mc. Graw Hill. 163, Madrid, España.
15. Bogan, J. and Page, D. C. (1994) Ovary? Testis? - A mammalian dilemma. *Cell*. 76: 603 - 607.
16. Boitani, L. y Bartoli, S. (1985) Guía de Mamíferos. 1a. edición. Ed. Grijalbo, S. A. Barcelona, España.
17. BonDurant, R. H. (1980) Probable freemartinism in a goat. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 177: 1024 - 1025.
18. Bongso, T. A.; Thavalingam, M. and Mukherjee, T. K. (1982) Intersexuality associated with XX/XY mosaicism in a horned goat. *Cytogenet. Cell Genet.* 34: 315 - 319.
19. Britt, J. H. (1979) Prospects for controlling reproductive processes in cattle, sheep, and swine from recent findings in reproduction. *Dairy Sci.* 62: 651 - 665.
20. Bull, J. J.; Wibbels, T. and Crews, D. (1990) Sex-determining potencies vary among female incubation temperatures in a turtle. *J. Exp. Zool.* 256: 339 - 341.
21. Bunch, T. D.; Callan, R. J.; Maciulis, A.; Dalton, J. C.; Figueroa, M. R.; Kunzler, R. and Olson, R.E. (1991) Hermaphroditism in a wild sheep: a case report. *Proceedings, 7th Domestic Animal Cytogenetics & Gene Mapping, Pennsylvania USA: 57.*
22. Burgoyne, P. S. (1989) Thumbs down for zinc finger. *Nature*, 342: 860 - 862.
23. Charlesworth, B. (1991) The evolution of sex chromosomes. *Science*, 251: 1030 - 1033.
24. Chérfas, J. (1991) Sex and the single gene. *Science*, 252: 782.
25. Cooke, F. and Buckley, P. A. (1987) *Avian Genetics: a population and ecological approach.* Academic Press: 94 - 95. London, England.
26. Cortes, F. (1984) Bando de Cromosomas. *Investigación y Ciencia. Ediciones en Español de Scientific American* 97: 20 - 29. España.
27. Crosignani, P. G. and Rubin, B. L. (1982) Genetic Control of Gamete Production and Function:



- Proceedings of the Sero Clinical Colloquia on Reproduction. Academic Press / Grune & Stratton.: 1 - 13 Pavia, Italia.
28. Crossley, R.; and Clarke, G. (1961) The Application of tissue-culture techniques to the chromosomal analysis of *Bos taurus*. *Genet. Res., Camb.*, 3: 167-168.
  29. Cuevas, S. A. y Kofman, S. H. (1990) El cromosoma Y humano. *Rev. Invest. Clin.* 42: 290-297.
  30. Cukierski, M. A. (1989) John Hunter and the freemartin. Two centuries of intersex explanation. *Anatomical Record* 223: 29A.
  31. Damell, J.; Lodish, H. and Baltimore, D. (1993) *Biología Celular y Molecular*. 2a edición. Ediciones Omega, S. A.: 763 - 820. Barcelona, España.
  32. David, J. S. E. (1976) The incidence of freemartins in heifer calves purchased from markets. *The Veterinary Record*. 22: 417 - 422.
  33. Deeb, P. and Omas, M. A. (1980) Freemartinism in buffalo. *Indian Vet.* 57: 200 - 204.
  34. Dennis, S. M. (1979) Urogenital defects in sheep. *Veterinary Record*, 13: 344 - 347.
  35. Dewald, G.; Haymond, M. W.; Spurbeck, J. L. and Breannndan Moore, S. (1980) Origin of chi46,XX/46,XY chimerism in a human true hermaphrodite. *Science*, 207: 321-323.
  36. Di Bernardino, D.; Hayes, H.; Fries, R. and Long, S. (1990) International System for Cytogenetic Nomenclature of Domestic Animals (ISCNDA). Jouy-en-Josas, France. May 22 - 26 1989 *Cytogenet. Cell Genet.* 53: 65 - 79.
  37. Di Bernardino, D.; Iannuzzi, L.; Bettini, T. M. and y Matassino, D. (1980) Karyotype evolution in cattle (*Bos taurus*) and buffalo (*Bubalus bubalis*). 4th Eur. Colloq. *Cytogenet. Domest. Anim.*: 272 - 288 Uppsala, Sweden.
  38. Di Bernardino, D.; Iannuzzi, L.; Di Meo, G. P. y Zacchi, R. (1980) Constitutive heterocromatin polymorphism in chromosomes of cattle (*Bos taurus*). 4th Eur. Colloq. *Cytogenet. Domest. Anim.*: 438 - 457 Uppsaa, Sweden.
  39. Dunn, H. O.; Lein, D. H. and McEntee K. (1980) Testicular hypoplasia in a Hereford bull with 61,XXY kariotipe: the bovine counterpart of human Klinefelter's syndrome. *Comell Vet.* 70: 137 -146.
  40. Dunn, H. O.; McEntee, K.; Hall, C. E.; Johnson, R. H. and Stone, W. H. (1979) Cytogenetic and reproductive studies of bulls born co-twin with freemartins. *J. Reprod. Fert.* 57: 21 - 30.
  41. Edwards, J. F.; Gallagher, D. S. and Prakash, B. (1994) Urethral atresia with uropentoneum in a newborn bovine freemartin. *Vet. Pathol.*, 31: 117 - 119.
  42. Eldridge, F. and Blazar, W. F. (1977) Comparison between the Y chromosomes of Chianina and Brahma crossbred steers. *Cytogenet. Cell Genet.* 18: 57 - 60.
  43. Eldridge, F. E.; Koenig, J. L. F. and Harris, N. B. (1984) H-Y antigen negative, 60, XY, intersex calf. 6th Eur. Colloq. *Cytogenet. Domest. Anim.* 217 - 222 Zurich, Switzerland July 16 - 20.
  44. Elejalde, B. R. and Oplitz, J. M. (1978) *Clinical Cytogenetics*. *Postgraduate Medicine*, 63: 179 - 214.
  45. Erickson, P. R. and Verga, V. (1989) Minireview: Is Zinc-Finger Y the sex-determining gene? *Am. J. Hum. Genet.* 45: 671 - 674.
  46. Farag, T. I.; Al-Awadi, S.A.; Tippett, P.; El-Sayed, M.; Sundareshan, T. S.; Al-Othman, S. A. and El-Badramany, M. H. (1987) Unilateral true hermaphrodite with 46,XX/46,XY dispermic chimerism. *J. Med.* 24: 784 - 786.
  47. Farin, P. W. and Estill, C. T. (1993) Infertility due to abnormalities of the ovaries in cattle. *Vet. Clin. North. Am. Food. Anim. Pract.* 9: 291 - 308.
  48. Fechheimer, N. S. and Harper R. L. (1980) Karyological examination of bovine fetuses collected at an abattoir. 4th Eur. Colloq. *Cytogenet. Domest. Anim.*: 194 - 199. Uppsala, Sweden.
  49. Fechheimer, N. S. (1979) *Cytogenetics in Animal Production*. *J. Dairy Sci.*, 62: 844 - 853.
  50. Fechheimer, N. S.; Isakova, G. K. and Belyaev, D. K. (1983) Mechanisms involvel in the spontaneous occurrence of diploid-triploid chimerism in the mink (*Mustela vison*) and chicken (*Gallus domesticus*). *Cytogenet. Cell Genet.* 35: 238 - 243.
  51. Fechner, P. Y.; Rosenberg, C.; Stetten, G.; Cargile, C. B. Pearson, P. L.; Smith, K. D.; Migeon, C. J. and Berkovitz, G. G. (1994) Nonradom Inactivation of the Y-bearing X Chromosome in a 46,XX Individual: evidence for the etiology of 46,XX true hermaphroditism. *Cytogenet Cell Genet* 66: 22-26.
  52. Fejér, T. and Kovács, A. (1980) Offsprings sex-ratio of XX/XY chimaeric bulls. 4th Eur. Colloq. *Cytogenet. Domest. Anim.*: 94 - 98 Uppsala, Sweden.
  53. Fitzgerald, P. H.; Donald, R. A. and Kirk, R. L. (1979) A true hermaphrodite dispermic chimera with 46,XX and 46,XY karyotypes. *Clinical Genetics*. 15: 89 - 96.
  54. Foley, C. W.; Lasley, J. F. and Osweller, G. D. (1979) *Abnormalities of Companion Animals: analysis of heritability*. 1st. edition.: 129 - 133. USA.

55. Ford, C. E.; Pollock, D. L. and Gustavsson, I. (1980) Proceeding of the First Conference for the Standardisation of Banded Karyotypes of Domestic Animals. Reading, England. August 2nd - 6th 1976. *Hereditas* 92: 145 - 162.
56. Foster, J. W.; Brennan, F. E.; Hampikian, G. K.; Goodfellow, P. N.; Sinclair, A. H.; Lovell-Badge, R.; Selwood, L.; Renfree, M. B.; Cooper, D. W. and Marshall, J. A. (1992) Evolution of sex determination and the Y chromosome: SRY-related sequences in marsupials. *Nature* 359: 531 - 533.
57. Fryns, J. P.; Haspelslagh, M.; Vandebussche, E.; Goddeeris, P.; Eggemont, E. and Van den Berghe, H. (1980) Perinatal mortality and XY/XX mosaicism. *Hum. Genet.* 56: 225 - 226.
58. Ganong, W. F. (1991) *Physiology. Review of Medical Physiology.* 15th edition. Appleton & Lange. Connecticut, U.S.A..
59. Gencik, A.; Genciková, A.; Hrubisko, M. and Mergancová, O. (1980) Chimerism 46,XX/46,XY in a phenotypic female. *Hum. Genet.* 55: 407 - 408.
60. George, F. W. and Wilson J. D. (1988) Sex determination and differentiation. *The Physiology of Reproduction.* Raven Press, Ltd. 3 - 21 New York.
61. González, M. (1985) *Texto de Genética Clínica.* Ed. Salvat Mexicana de Ediciones, S. A. de C. V. 383 - 411. México.
62. González, R. (1976) *Introducción a la Citogenética Humana.* Ed. Aguilar S. A. de Ediciones.: 258 - 279. Madrid, España..
63. Gordon, J. W. and Ruddle, F. H. (1981) Mammalian gonadal determination and gametogenesis. *Science*, 211: 1265 - 1271.
64. Greene, W. A.; Dunn, H.O.; and Foote, R.H. (1977) Sex-chromosome ratios in cattle and their relationship to reproductive development in freemartins. *Cytogenet. Cell Genet.* 18: 97 - 105.
65. Guanti, G. and Minola, P. (1978) A robertsonian translocations in the female cell of a bull, co-twin to a freemartin. *Cornell Vet.*, 68: 94 - 97.
66. Guerrier, D.; Boussin, L.; Mader, S.; Josso, N.; Kahn, A.; and Picard, J. Y. (1990) Expression of the gene for anti-Müllerian hormona. *J. Reprod. Fert.* 88: 695 - 706.
67. Gustavsson, I. (1979) Chromosome aberrations and their influence on the reproductive performance of the domestic animals. *Z. Tierzüchtg. Züchtgsbiol.* 97: 176 - 179.
68. Gutzke, W. H. N. and Crews D. (1988) Embryonic temperature determines adult sexuality in a reptile. *Nature*, 332: 832 - 834.
69. Hafez, E. S. A. (1978) *Reproducción de los animales de Granja.* 2a. edición. Ed Herrero S. A.: 531 - 551. México, D. F., México.
70. Halnan, C. R. E. (1977) An improved technique for the preparation of chromosomes from cattle whole blood. *Research in Veterinary Science* 22: 40 - 43.
71. Halnan, C. R. E. (1989) *Cytogenetics of Animals.* C. A. B. International. 221 - 234, United Kingdom.
72. Halnan, C. R. E. (1975) Chromosomes of cattle: Present clinical status and promise. *Vet. Rec.*, 96: 148 - 151.
73. Hamerton, J. L. (1971) *Human Cytogenetics. General Cytogenetics.* Vol. 1 Academic Press.
74. Hare, W. C. D. (1976) Congenital retroflexion of the penis and inguinal cryptorchidism in a presuntive bovine twin with a 60,XY/60,XX/61,XX+cen. *Can. J. Comp. Med.* 40: 429 - 433.
75. Harvey, M. J. A. (1976) Veterinary cytogenetics. *Vet. Rec.* 98: 479 - 481.
76. Haseltine, F. P. and Ohno, S. (1981) Mechanisms of Gonadal Differentiation. *Science*, 211: 1272 - 1277.
77. Hodgkin, J. (1988) Everthing you always wanted to know about sex ... *Nature* 331: 330 - 331.
78. Hsu, T. C. and Benirschke, K. (1967) *Atlas of Mammalian Chromosomes.* Volume 1, Folio 44. Springer-Verlag, New York Inc., E. U.
79. Hutson, J. M. (1994) Testicular descent: the first step towards fertility. *International Journal of Andrology* 17: 281 - 288.
80. Hutt, F. B. (1958) *Genética Avícola.* 1a. edición. Ed. Saltat.: 499 - 541. Barcelona, España.
81. Jäger, R. J.; Anvret, M.; Hall, K. and Scherer, G. (1990) A human XY female with a frame shift mutation in the candidate testis-determining gene SRY. *Nature* 348: 452 - 454.
82. Johansson, I. y Rendel J. (1972) *Genética y Mejora Animal.* 159 - 183, Acribia, Zaragoza, España.
83. Just, W.; Cabral, C. D. A.; Goldshmidt, B. and Vogel, W. (1994) The male pseudohermaphrodite XX polled goat is Zfy and Sry negative. *Hereditas* 120: 71 - 75.
84. Kästli, F. and Hall. J. G. (1978) Cattle twins and freemartin diagnosis. *Veterinary Record* 102: 80 - 83.
85. Kenny, D. E.; Cambre, R. C.; Frahm, M. W. and Bunch, T. D. (1992) Freemartins in a Captive Herd of Rocky Mountain Bighorn Sheep (*Ovis canadensis*). *Journal of Wildlife Diseases.* 28(3): 494 - 498.

86. Kofman, S. A.; Merchant, H. L. and Pérez, G. P. (1982) Diferenciación Sexual. Rev. Invest. Cín. 34: 349 - 359.
87. Koopman, P.; Gubbay, J.; Collignon, J. and Lovell-Badge, R. (1989) Zfy gene expression patterns are not compatible with a primary role in mouse sex determination. Nature 342: 940 - 942.
88. Koopman, P.; Gubbay, J.; Vivian, N.; Goodfellow, P. and Lovell-Badge, R. (1991) Male development of chromosomally female mice transgenic for Sry. Nature, 351: 117 - 121.
89. Koopman, P.; Münsterberg, A.; Capel, B.; Vivian, N. and Lovell-Badge, R. (1990) Expression of a candidate sex-determining gene during mouse testis differentiation. Nature 348: 350 - 352.
90. Kraay, G. J.; Giebelhaus, E. D. and Colling, D. T. (1978) A case of unrelated twins in cattle. Can. Vet. J. 19: 279 - 283.
91. Laing, J. A.; Brinley, W. J. y Wagner, W. C. (1991) Fertilidad e Infertilidad en la Práctica Veterinaria. 1a. edición. Ed. Interamericana Mc. Graw Hill. 96 - 117, Madrid, España.
92. Lojda, L. and Poláček. (1984) Age-dependent changes in the 60,XX : 60, XY cell ratio in chimaeric cattle. 6th Eur. Colloq. Cytogenet. Domest. Anim. 295 - 302 Zurich, Switzerland July 16 - 20.
93. Long S. E. (1981) Testicular feminisation in an Ayrshire cow. The Veterinary Record. 8: 116 - 118.
94. Long, S. E. (1990) Development and diagnosis of freemartinism in cattle. In Practice: 208 - 210.
95. Long, S. E. (1980) Some pathological conditions of the reproductive tract of the ewe. Veterinary Record 106: 175 - 176.
96. MacLusky, N. J. and Naftolin, F. (1981) Sexual differentiation of the central nervous system. Science, 211: 1294 - 1302.
97. Mäkinen, A. and Valtonen, M. (1984) The XO syndrome in the silver fox (*Vulpes fulvus* Desm. ) 6th Eur. Colloq. Cytogenet. Domest. Anim. 228 - 242 Zurich, Switzerland July 16 - 20.
98. Marchi, M.; Carbonara, A. O.; Carrozzi, F.; Massara, F.; Belforte, L.; Molinatti, G. M.; Bisbocci, D.; Passarino, M. P. and Palestro, G. (1976) True hermaphroditism with XX/XY sex chromosome mosaicism: Report of a case. Clinical Genetics. 10: 265 - 272.
99. Marcum, J. B. (1974) The Freemartin Syndrome. Animal Breeding Abstracts, 42: 227 - 242.
100. McFeely, R. A. (1975) A review of cytogenetics in equine reproduction. J. Reprod. Fert., Suppl. 23: 371 - 374.
101. McFeely, R. A.; Hare, W. C. D. and Biggers, J. D. (1967) Chromosome studies in 14 cases of intersex in domestic mammals. Cytogenetics 6: 242 - 253.
102. McLaren, A. (1990) Of MIS and the mouse. Nature 345: 111.
103. McLaren, A. (1990) What makes a man a man?. Nature 346: 216 - 217.
104. Melander, Y.; Hansen-Melander, E.; Holm, L. and Somlev, B. (1971) Seven swine intersex with XX chromosome constitution. Hereditas. 69: 51 - 57.
105. Meyer, E. H. H. (1984) Classification of *Bos indicus* cattle breeds in Southern and Central Africa as Sanga or Zebu type by means of Y chromosome morphology. 6th Eur. Colloq. Cytogenet. Domest. Anim. 96 - 103 Zurich, Switzerland July 16 - 20.
106. Michel, G. y Schwarze, E. (1984) Compendio de Anatomía Veterinaria. Tomo VI.- Embriología. 3a. reimpression. Ed. Acríbia, 42 - 48. Zaragoza, España.
107. Mittwoch, U. and Burgess, A. M. C. (1991) How do you get sex?. Journal of Endocrinology, 128: 329 - 331.
108. Mittwoch, U. (1988) Y chromosome and sex determination. The Lancet, 52 - 53.
109. Moore, K. L. (1988) The Developing Human. Clinically Oriented Embryology. 4th edition. W. B. Saunders Company: 262 - 285. Philadelphia, USA.
110. Morrow, D. A. (1986) Current Therapy in Theriogenology. 2nd. edition. Ed W. B. Saunders Company.: 596 - 600. USA.
111. Naftolin, F. (1981) Understanding the bases of sex differences. Science., 211: 1263 - 1664.
112. Neibergs, L. H.; Gallaghers, S. D.; Dietz, B. A. and Womak, E. J. (1991) Bovine Genomic Mapping of Anti-Müllerian Hormone, Oxitocin, Arginine - Vasopressin and Inhibin - BA. Proceedings, 7th North American Colloquy on Domestic Animal Cytogenetics & Gene Mapp.: 107 - 111.
113. Wai-Sum; Short, R. V.; Renfree, M. B. and Shaw, G. (1988) Primary genetic control of somatic sexual differentiation in a mammal. Nature, 331: 716 - 717.
114. Ohno, S.; Christian, I. C.; Wachtel, S. S. and Koo G. C. (1976) Hormone-like role of H-Y antigen in bovine freemartin gonad. Nature, 261: 597 - 599.
115. Olsaker, I.; Jørgensen, C. B.; Hellemann, A. L.; Thomsen, P. D. and Lie, O. (1993) A fast and highly sensitive method for detecting freemartinism in bovine twins using immunomagnetic beads and Y-specific PCR primers. Anim. Genet. 24(4): 311 - 313.

116. Palmer, M. S.; Sinclair, P.; Berta, P.; Ellis, N. A.; Goodfellow, P. N.; Abbas, N. E. and Fellous, M. (1989) Genetic evidence that ZFY is not the testis-determining factor. *Nature* 342: 937 - 939.
117. Pathak, S. and Kieffer, N. M. (1979) Sterility in hybrid cattle. *Cytogenet. Cell. Genet.* 24: 42 - 52.
118. Payen, E. J. and Cotinot, C. Y. (1993) Comparative HMG-box sequences of the SRY gene between sheep, cattle and goats. *Nucleic Acids Research*, 21: 2772.
119. Plöen, L. (1989) On Spermatogenesis and the Structure and Function of Sertoli Cells in Mammals. *Dept. Anatomy and Histology, Fac. Vet. Med., Swed. Univ. Agr. Sci. Sci., Uppsala, Sweden*: 1 - 7.
120. Popescu, C. P.; Cotinot, C.; Boscher, J. and Kirszenbaum, M. (1988) Chromosomal Localization of a Bovine Male Specific Probe. *Ann. Genet.* 31: 39 - 42.
121. Potter, W. L. and Blackshaw. (1980) Sex chromosome constitution in male and female cattle in relation to reproductive function. *4th Eur. Colloq. Cytogenet. Domest. Anim.*: 69 - 77 Uppsala, Sweden.
122. Potter, W. L. and Upton, P. C. (1979) Y chromosome morphology of cattle. *Australian Veterinary Journal* 55: 539 - 541.
123. Rhoades, J. D. and Foley C. W. (1977) Cryptorchidism and Intersexuality. *Veterinary Clinics of North America*, 7: 789 - 794.
124. Rieck, G. W. (1984) *Veterinary Medicine and Cytogenetics*. 6th Eur. Colloq. Cytogenet. Domest. Anim. 20 - 34 Zurich, Switzerland July 20 - 34.
125. Rieger, R.; Michaelis, A. and Green, M. (1968) *A Glossary of Genetics and Cytogenetics (Classical and Molecular)*. 3th edition. Springer-Verlag. New York Inc.
126. Rioja, E.; Ruiz, M. y Larios, I. (1955) *Tratado Elemental de Zoología*. 3a. edición. Ed. Porrúa, S. A. 102 - 122 México.
127. Ronningen, K. (1980) Future Prospects of Cytogenetic in Animal Breeding. *4th Eur. Colloq. Cytogenet. Domest. Anim.* pp. 1 - 6 Uppsala, Sweden.
128. Rooney, D. E. and Czepulkowski, B. H. (1992) *Human Cytogenetics: Volume I Constitutional Analysis*. 2nd. edition. Irpress.: 1 - 30. London, Great Britain.
129. Rowson, L. E. A. (1971) The role of reproductive research in animal production. *J. Reprod. Fert.* 26: 113 - 126.
130. Ruckebusch, Y.; Phaneuf, L. and Dunlop, R. (1994) *Fisiología de Pequeñas y Grandes Especies*. 1a edición. Ed. El Manual Moderno, S. A. de C. V. 589 - 597 y 689 - 697 México.
131. Saba, N.; Cunningham, N. F. and Millar, P. G. (1975) Plasma progesterone, androstenedione and testosterone concentrations in freemartin heifers. *J. Reprod. Fert.* 45: 37 - 45.
132. Sadler, T. W. (1986) *Langman Embriología Médica*. 5a. edición. Ed. Médica Panamericana, 259 - 282. Buenos Aires, Argentina.
133. Salamanca, F. (1990) *Citogenética Humana*. 1a. edición. Ed. Médica Panamericana, 83 - 187, México, México.
134. Salamanca, F. (1983) Desarrollo de la metodología citogenética: contribuciones al conocimiento de la estructura cromosómica y sus aplicaciones en la clínica. *Metodología Citogenética*, 119: 315 - 324.
135. Salamanca, F. (1992) Transtornos genéticos de la diferenciación sexual en el humano. *Gac. Méd. Méx.*, 128: 57-79.
136. Sasaki, M. S. and Makino, S. (1962) Revised study of the chromosomes of domestic cattle and the horse. *Jour. Hered.* 53: 157 - 162.
137. Scarbrough, P. R.; Hersh, J.; Kukolich, M. K. and others. (1984) Tetraploidy: a report of three live-born infants. *American Journal of Medical Genetics*. 19: 29 - 37.
138. Schardein, J. L. (1980) Congenital abnormalities and hormones during pregnancy: a clinical review. *Teratology* 22: 251 - 270.
139. Schempp, W. and Meer, B. (1983) Cytologic evidence for three human X-chromosomal segments escaping inactivation. *Hum. Genet.* 63: 171 - 174.
140. Schmutz, M. S. and Moker, S. J. (1991) Mosaic Tetraploidy: a normal variant of bovine lymphocyte cultures. *Proceedings, 7th Domestic Animal Cytogenetics & Gene Mapping, Pennsylvania USA*: 48 - 52.
141. Scofield, A. M.; Cooper, K. J. and Laming, G. E. (1969) The distribution of embryos in intersex pigs. *J. Reprod. Fert.* 20: 161 - 163.
142. Setiabudi, R. (1993) 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.
143. Shanker, V. and Bhatia, S. (1983) Sex chromatin study of a bull and its freemartin co-twin.

- Veterinary Record 113 (1): 17 - 18.
144. Shore, L. and Shemesh, M. (1981) Altered steroidogenesis by the fetal bovine freemartin ovary. *J. Reprod. Fert.* 63: 309 - 314.
145. Simpson, E.; Chandler, P.; Goulmy, E.; Disteché, C. M.; Malcolm, A.; Ferguson-Smith, A. and Page, D. C. (1987) Separation of the genetic loci for the H-Y antigen and for testis determination on human Y chromosome. *Nature*, 326: 876 - 878.
146. Smith, A. L.; Weathersbee, P. S. and Lodge, J. R. (1976) Whole blood leukocyte culture technique for mammalian cytogenetic analysis. *Laboratory Animal Science* 26: 936 - 938.
147. Smith, B. P. (1990) *Large Animal Internal Medicine: diseases of horses, cattle, sheep and goats*. The C. V. Mosby Company.: 1374 - 1376. USA.
148. Smith, G. S.; Van Camp, S. D. and Basnur, P. K. (1977) A fertile female co-twin to a male calf. *Can. Vet. Jour.*, 18: 287 - 289.
149. Smith, M. C. and Dunn, H. O. (1981) Freemartin condition in a goat. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 178: 735 - 737.
150. Spooner R. L. (1981) Modern Diagnostic Methods in Practice: diagnosing wrong parentage, freemartins, translocations and mannosidosis. *Br. vet. J.* 137: 2 - 7.
151. Stalvey, J. R. D.; Erickson, R. P.; Dasouki, M.; Glover, T. and Shokir, M. (1988) Clarification of chromosomal abnormalities associated with sexual ambiguity by studied with Y-chromosomal DNA sequences. *Cytogenet Cell Genet* 47: 140 - 143.
152. Stewart-Scott, I. A.; Pearce, P. D.; Moore, G. H. and Fennessy, P. F. (1990) Freemartin in red deer (*Cervus elaphus L.*). *Cytogenet. Cell. Genet.* 54: 58 - 59.
153. Sundberg, J. P. (1979) A case of true bilateral hermaphroditism in a dog. *Veterinary Medicine Small Animal Clinician*. 477 - 482.
154. Suzuki, D. T.; Griffiths, A. J. F.; Miller, J. H. y Lewontin, R. C. (1992) *Introducción al Análisis Genético*. 1a edición. Ed. Interamericana Mc. Graw Hill.: 205 - 225. Madrid, España.
155. Swanson, C.; Merz, T. and Young, W. (1981) *Cytogenetics. The Chromosome in Division, Inheritance and Evolution*. 2th edition. Prentice-Hall, Inc. London, England.
156. Sysa, P. S.; Slawomirski, J. and Remiszewski, J. (1980) Chromosomal analysis of heifers with anomalies of the reproductive system. 4th Eur. Colloq. *Cytogenet. Domest. Anim.*: 63 - 67 Uppsala, Sweden.
157. Tamassia, M. (1991) Prenatal sex determination. *Intern Seminar.*, May 24: 1 - 18.
158. The Y chromosome and sex determination. (1988) *The Lancet*, 8592: 973 - 974.
159. Therman, E. and Susman, M. (1993) *Human Chromosomes: Structure, Behavior, and Effects*. 3th edition. Springer - Verlag.: 203 - 209. New York, USA.
160. Thompson, M. W.; McInnes, R. R. and Willard, H. F. (1991) *Genetics in Medicine*. 15th edition. W.B. Saunders Company: 428 - 429. Philadelphia, USA.
161. Thomsen, P. D. and Poulsen, P. H. (1993) Analysis of the gonadal sex of five intersex pigs using Y chromosomal markers. *Hereditas* 119: 205 - 207.
162. Tran D. (1977) Anti-Müllerian hormone is a functional marker of foetal Sertoli cells. *Nature*. 269: 411 - 412.
163. Van Haeringen, H. (1984) An unusual set of quadruplets. 6th Eur. Colloq. *Cytogenet. Domest. Anim.* 250 - 252 Zurich, Switzerland July 16 - 20.
164. Van Haeringen, H. and Van Nieuwenhuizen, J. (1980) Twins and freemartins in cattle. 4th Eur. Colloq. *Cytogenet. Domest. Anim.*: 100 - 102 Uppsala, Sweden.
165. Viets, B.; Tousignant, A.; Ewert, M.; Nelson, C. and Crews D. (1993) Temperature-Dependent Sex Determination in the Leopard Gecko, *Eublepharis macularis*. *J. exp. Zool.* 265: 679 - 683.
166. Vigier, B.; Picard, J.; Bézard, J. and Josso, N. (1981) Anti-Müllerian Hormone: a local or long-distance morphogenetic factor? *Hum. Genet.* 58: 85 - 90.
167. Vigier, B.; Tran, D.; Buisson, F.; Heyman, Y. and Josso N. (1983) Use of monoclonal antibody techniques to study the ontogeny of bovine anti-müllerian hormone. *J. Reprod. Fert.* 69: 207 - 214.
168. Vigier, B.; Tran, D.; Legeai, L.; Bézard, J. and Josso N. (1984) Origen of anti-müllerian hormone in bovine freemartin fetus. *J. Reprod. Fert.* 70: 473 - 479.
169. Villagómez, D. A. F. (1984) *Análisis Citogenético en Cerdos con Problemas Reproductivos*, Tesis de Licenciatura, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad de Guadalajara. Guadalajara, Jalisco, México.
170. Villagómez, D. A. F. (1993) *Synaptonemal Complex Analysis of Chromosome Translocations in Pigs and Cattle*, PhD Thesis, Swedish University of Agricultural Sciences, Department of Animal

Breeding and Genetics, Uppsala, Sweden.

171. Vogt, D. W. (1982) Sex chromosome mosaicism in a swine intersex. *The Journal of Heredity*, 166 - 167.
172. West, G. P. (1992) *Black's Veterinary Dictionary*. 17th edition. Barnes & Noble Books, Lanham, Maryland,.
173. White, T. J.; Amheim, N. and Erlich, H. A. (1989) The Polymerase Chain Reaction. *Trends in Genetics*. Vol., 5, No. 6: 185 -189.
174. Wilkes, P. R.; Munro, I. B. and Wijeratne, W. V. S. (1978) Studies on a sheep freemartin. *Veterinary Record*, 102: 140 - 142.
175. Wilkes, P. R.; Wijeratne, W. V. S. and Munro, I. B. (1980) A study of the cytogenetics and reproductive anatomy of freemartin heifers. 4th Eur. Colloq. Cytogenet. Domest. Anim.: 104 - 117 Uppsala, Sweden.
176. Wilson, J. D.; George, F. W. and Griffin, J. E. (1981) The hormonal control of sexual development. *Science*. 211: 1278 - 1284.
177. Winter, H. and Pfeffer, A. (1977) Pathogenic classification of intersex. *Vet. Rec.* 100: 307 - 310.