

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias
División de Ciencias Veterinarias



Diagnóstico Molecular del Estado Intersexual Síndrome Freemartin en el Bovino Doméstico (*Bos taurus*), por Medio de la Técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

TESIS DE LICENCIATURA PARA OBTENER EL TÍTULO DE MEDICO
VETERINARIO ZOOTECNISTA
PRESENTA

KARINA VANESSA VERDUZCO SÁNCHEZ

DIRECTOR DE TESIS
M.C. MIGUEL ANGEL AYALA VALDOVINOS

ASESOR DE TESIS
Ph. D. DANIEL A. F. VILLAGÓMEZ ZAVALA

LAS AGUJAS, NEXTIPAC, ZAPOPAN, JAL. JULIO 2004.



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS

DIVISIÓN DE CIENCIAS VETERINARIAS



**H.COMITE DE TITULACION DE LA
DIVISION DE CS. VETERINARIAS
UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
P R E S E N T E**

Por este conducto nos permitimos enviar la *versión final* de la *Tesis* titulada: **Diagnóstico Molecular del Estado Intersexual Síndrome Freemartin en el Bovino Doméstico (Bos taurus), por Medio de la Técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).**

Presentado por el Pasante **C. Karina Vanessa Verduzco Sánchez.**

Dirigido por el **M.C. Miguel Ángel Ayala Valdovinos.**

Los que suscriben la presente avalan esta versión la cual fue revisada en forma colegiada y reúne los requisitos metodológicos indispensables.

**ATENTAMENTE
“PIENSA Y TRABAJA”**

Las agujas, Zapopan, Jal., a 30 de Junio de 2004.


M.C. Juan Moreno Martínez

Presidente


M.C. Sergio L. Schwemiuski Benítez

Secretario


M.C. Martín Ruiz Castañeda

Vocal

AGRADECIMIENTOS

Mis Maestros

M.C. Miguel Angel Ayala Valdovinos.

Por enseñarme las bases de la disciplina más interesante, La Genética y sus aplicaciones en el campo experimental, Por su gran apoyo y sobre todo su paciencia y confianza.

Ph. D. Daniel A. F. Villagómez Zavala.

Por su asesoría y grandes consejos que me ayudaron a encausar mi vida profesional.

Dr. David Ávila Figueroa.

Por sus grandes enseñanzas, por su apoyo y confianza incondicional.

Ing. Francisco Delgadillo.

Por sus palabras que me encausaron por el camino correcto.

“LA CIENCIA ES UN CALLEJON SIN SALIDA.....TOMALO ;”

Contenido

Índice de Contenido	i, ii
Lista de Cuadros	iii
Lista de Figuras	iii, iv
Siglas	v
Resumen	vi
Introducción	1
Etapas Biológicas de la Diferenciación Sexual	2
Diferenciación Cromosómica	2
Diferenciación Gonadal	2
Diferenciación Fenotípica	4
El Factor de Determinación Testicular	5
El Cromosoma Y	5
El gen Zfy	5
El gen Sry	6
Trastorno de Diferenciación Sexual	7
Hermafroditismo	7
Intersexualidad en Bovinos	7
Freemartinismo	8
Quimerismo	11
Métodos de Diagnóstico de Intersexualidad en Bovinos	12
Examen Clínico	12
Pruebas de Tipos Sanguíneos	12
Análisis Citogenético	12
Técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa	13

Principio de la Técnica de PCR.....	13
Etapas del ciclo de PCR.....	13
PCR-RFLP de los genes Zfy/Zfx y su aplicación en el diagnóstico molecular del síndrome freemartin en el bovino	15
Planteamiento del Problema	16
Justificación	17
Hipótesis.....	18
Objetivos.....	19
General	19
Particulares	19
Material y Métodos	20
Resultados.....	23
Discusión	29
Conclusiones	32
Bibliografía.....	33

Lista de Cuadros

Cuadro 1.	Diagnóstico molecular mediante la técnica de PCR de los Bovinos de parto múltiple heterosexual estudiados	28
------------------	---	----

Lista de Figuras.

Figura 1.	Corte transversal de la región caudal de un embrión de rata de 10 días de gestación	3
Figura 2.	Micrografía electrónica de la cresta germinal primordial tomada de un embrión de 10 días.....	3
Figura 3.	Anastomosis vascular coriónica de fetos de bovinos.....	9
Figura 4.	Región amplificada del gen Zfy	21
Figura 5.	Región amplificada del gen Zfx.....	22
Figura 6.	Representación esquemática de Electroforesis de DNA de bovino con amplificación de los genes Zfy y Zfx por PCR y digerido con la enzima de restricción Pst1.....	24
Figura 7.	Electroforesis en agarosa de DNA bovino amplificado por PCR para determinar la temperatura optima de alineación de oligonucleótidos iniciadores (P1-5EZ y P3-3EZ).....	24
Figura 8.	Electroforesis en agarosa de DNA de bovinos gemelos heterosexuales amplificados por PCR sin digestión, mediante el programa PCR Zfy en termociclador Mastercycler Gradient (Eppendorf).....	25
Figura 9.	Electroforesis en agarosa de DNA de bovinos gemelos heterosexuales amplificados por PCR y digerido con la enzima Pst1	25

- Figura 10.** Electroforesis en agarosa de DNA de bovinos gemelos heterosexuales amplificados por PCR sin digestión, mediante el programa PCR Zfy en termociclador Mastercycler Gradient (Eppendorf)..... 26
- Figura 11.** Electroforesis en agarosa de DNA de bovinos gemelos heterosexuales amplificados por PCR y digerido con la enzima Pst1 26

RESUMEN

La mayoría de las terneras (92%) nacidas de parto gemelar heterosexual (macho y hembra) son freemartin estériles, de manera que resulta importante que esta condición sea diagnosticada a temprana edad ya que las freemartin no tienen el potencial para ser utilizadas como hembras de reemplazo. Las técnicas básicas tradicionalmente empleadas para el diagnóstico del síndrome freemartin han sido: la examinación clínica; la prueba de tolerancia de homoinjerto; la prueba de tipos sanguíneos; y el análisis citogenético. Sin embargo, actualmente la técnica de PCR nos ofrece una herramienta útil para el diagnóstico preciso y oportuno de esta entidad intersexual del bovino. A través del análisis molecular (PCR-RFLP), empleando oligonucleótidos iniciadores para los genes *Zfy* y *Zfx* del bovino doméstico, se diagnosticaron con la condición intersexual, síndrome freemartin, 13 individuos (*Bos taurus*) procedentes de un total de 15 partos múltiples heterosexuales (14 partos gemelares; 1 parto triple). El producto de PCR-RFLP fue analizado mediante electroforesis en gel de agarosa al 3% teñido con bromuro de etidio permitiendo identificar los genotipos de los animales estudiados, machos normales (447 pb, 344 pb y 103 pb), hembras normales (447 pb), así como bovinos quiméricos (freemartin 447 pb, 344 pb y 103 pb). El uso de esta metodología (PCR-RFLP) mostró ser una herramienta útil para el diagnóstico preciso y rápido (6 h) de estos animales que no tendrían valor reproductivo.

INTRODUCCIÓN

En el área biomédica, el uso del análisis molecular ha posibilitado el desarrollo de nuevas estrategias diagnósticas, basadas en la detección de secuencias específicas de ácidos nucleicos, lo cual ha permitido una mejor comprensión del proceso de diferenciación sexual (White, Arnheim, Erlich, 1998; Salamanca 1983).

En los mamíferos la diferenciación sexual normal se inicia con el establecimiento del sexo genético, es decir, la constitución sexocromosómica (XX o XY) del cigoto que a su vez determina el sexo gonadal (ovario o testículo). Posteriormente, la presencia de las hormonas a través de su acción sobre los órganos blancos define el sexo fenotípico, es decir, se desarrollan los genitales internos y externos acorde con el sexo genético y gonadal. La diferenciación sexual constituye un fenómeno biológico trascendental, ya que permite la perpetuación de las especies que se reproducen sexualmente, a lo largo del proceso evolutivo, asegurando una mayor variabilidad genética en los individuos de una especie y, por tanto una más ventajosa adaptación al medio ambiente (Tamassia, 1991; Carnevale, 1992; Salamanca, 1992).

En muchos sistemas biológicos complejos la reproducción requiere la interacción de dos individuos diferentes respecto al sexo (Naftolin, 1981). La reproducción sexual con algún grado de dimorfismo gamético es casi universal entre los organismos eucariotas (Charlesworth, 1991); en los mamíferos el sexo homogamético (XX) corresponde al sexo femenino y el heterogamético (XY) al masculino (Mittwoch, 1998; Cuevas y Kofman, 1990).

La regulación de la diferenciación sexual en las especies animales está controlada por diferentes factores según la escala evolutiva; un 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 (Cuevas y Kofman 1990; Therman E, Susman 1993).

Etapas Biológicas De Diferenciación Sexual

El dimorfismo sexual es el resultado de una secuencia de eventos que ocurre en las fases más tempranas de la vida con alto grado de precisión en sus mecanismos de regulación y se realiza en tres etapas sucesivas I) Cromosómica, II) Gonadal, III) Fenotípica (Kofman et al.; 1982).

Diferenciación Cromosómica

En los mamíferos la diferenciación cromosómica inicia en el momento de la fecundación, en donde un espermatozoide que posee un cromosoma X o un cromosoma Y fertiliza al óvulo que sólo aporta un cromosoma X. De esta manera la hembra tiene un complemento cromosómico XX y el macho XY. El mecanismo subsecuente dependerá de la presencia de factores determinantes de la diferenciación sexual localizados tanto en autosomas y gonosomas (Kofman et al.; 1982).

Diferenciación Gonadal

Las gónadas son formadas por dos tipos de células somáticas de origen mesodérmico, células de soporte (células de Sertoli en el macho y células foliculares en la hembras), otras de la células somáticas son las esteroideogénicas (las células de Leydig en el macho y de la teca interna en la hembra), así como las de tejido conectivo; para la formación de las gónadas es fundamental la participación de las células germinales primordiales (CGP) que se consideran como células sexuales predeterminadas antes de que alcancen el primordio gonadal (**fig 1**). El dimorfismo sexual gonadal es evidente en el humano hasta la sexta o séptima semana de vida intrauterina (Haseltine y Ohno, 1981; Bogan y Page, 1994)

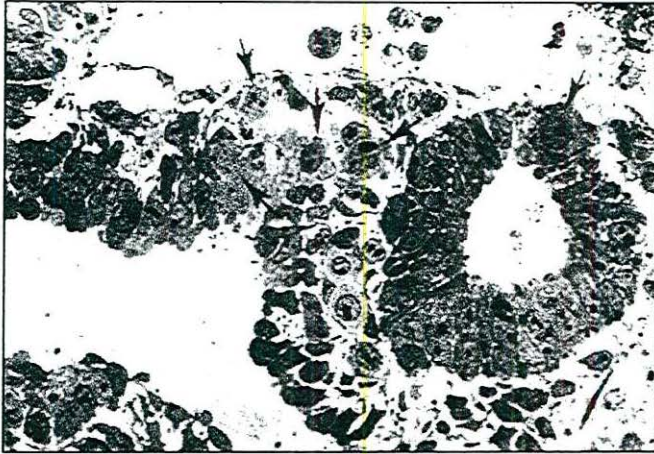


Fig. 1. Corte transversal de la región caudal de un embrión de rata de 10 días de gestación. Se observan varias células germinales primordiales (flechas) migrando hacia la región de las futuras crestas genitales. Una de las CGP se encuentra entre las células epiteliales del intestino primitivo (Tomado de Kofman et al. Rev. Invest. Clin. 34: 349-359,1982).

Alrededor de la cuarta semana de vida intrauterina en el humano las CGP inician su migración desde el endodermo del intestino y el epitelio dorsal del saco vitelino a través del mesenterio dorsal.

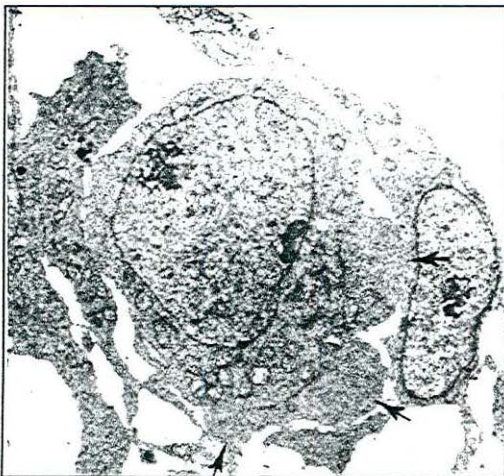


Fig.2. Micrografía electrónica de una cresta germinal primordial tomada de un embrión de rata 10 días. Su aspecto es típico de una célula con capacidad ameboide por presencia de prolongaciones pseudopódicas (Tomado de Kofman et al. Rev. Invest. Clin. 34: 349-359,1982).

Diferenciación Sexual Fenotípica

El control directivo en la formación del sexo fenotípico reside en la acción de tres factores de origen fetal: 1) Acción de la Sustancia Inhibidora Mulleriana (MIS), que suprime en los embriones masculinos los conductos de Muller evitando así el desarrollo del útero y las trompas de Falopio; 2) la testosterona hormona que promueve la virilización del tracto genital, estimulando por una parte los conductos de Wolf para que se forme el epidídimo, los conductos deferentes y la vesícula seminal, por último la acción de la prohormona dihidrotestosterona, ésta se forma en el tracto urogenital por reducción enzimática (5α reductasa) sobre la testosterona y actúa en el seno urogenital para inducir la formación de la próstata; a partir del tubérculo genital, pliegues genitales y engrosamiento labioescrotales se origina la formación de los genitales externos (González-Ramos, 1995; Wilson et al., 1981; George et al., 1988).

El mecanismo de diferenciación sexual es complejo y se puede alterar por anomalías de los cromosomas sexuales y por mutaciones genéticas que se heredan en forma mendeliana, que se relacionan con algunos de los procesos de interacción entre genes, hormonas, y receptores hormonales (Carnevale, 1992).

Algunos estudios indican que por lo menos algunas células germinales primordiales pueden viajar ocasionalmente de manera pasiva por la corriente sanguínea y llegar a la cresta gonadal. Esta migración es común en las aves y puede presentarse en algunos mamíferos como en bovinos, ovinos y caprinos. Esta migración permite el intercambio de las células germinales entre gemelos en los que la circulación placentaria se fusione antes que las células alcancen los primordios gonadales por lo que los embriones se vuelven quimeras no sólo en relación a grupo sanguíneo sino también, en relación a las células germinales (Ohno y Group, 1962).

Factor De Determinación Testicular (TDF).

Diferentes estudios han demostrado que el cromosoma Y codifica para un mediador de la diferenciación sexual, necesario y específico para el desarrollo de la gónada masculina, llamado Factor de Determinación Testicular (TDF; del inglés Testis Determining Factor); y Tdy en ratones (Hodgkin 1989, Bogan y Page 1994).

El Cromosoma Y

En el humano el cromosoma Y es pequeño y presenta dos grandes regiones, una eucromática localizada en todo el brazo corto y la región proximal del brazo largo, y la otra heterocromática inerte, ubicada en la región distal de su brazo largo. Hasta la fecha alrededor de 10 genes que participan en el desarrollo somático y sexual han sido asignados al cromosoma Y, sin embargo, el único efecto bien establecido es su papel dominante en la diferenciación masculina. Asimismo se ha sugerido que además de su participación en la determinación testicular, el cromosoma Y posee genes que regulan otros procesos tales como la espermatogénesis, el crecimiento corporal, la maduración ósea y dental y la prevención de manifestaciones somáticas del síndrome de Turner (Kofman, Merchant-Larios, Pérez-Palacios, 1982; Cuevas-Covarrubias y Kofman-Alvaro, 1990; Salamanca-Gonzalez, 1992).

El Gen Zfy

Page *et al.* (1987), reportaron una mujer XY con la pérdida de un segmento de 140 kb del 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", por lo que es llamado ZFY), como candidato para ser el Factor Determinante Testicular (TDF), concluyendo que sus secuencias se han conservado en el cromosoma Y de mamíferos y muestran homología con secuencias localizadas en el cromosoma X (Burgoyne 1989, Koopman *et al.*, 1989).

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 ratón mutante W^e/W^e , el cual carece de células germinales. Estas observaciones excluyeron al *Zfy-1* y al *Zfy-2* como candidatos para el TDF del ratón (Burgoyne 1989, Koopman *et al.*, 1989).

El Gen Sry

En los mamíferos, la presencia del cromosoma Y se asocia con la diferenciación del testículo, y la ausencia de éste con el ovario, estudios previos proponen que el factor determinante del testículo es un gen denominado SRY en el humano y otros grupos de vertebrados. En el humano este gen se localiza en el brazo corto del cromosoma Y y se encuentra presente en una sola copia en el núcleo de los mamíferos. Las investigaciones realizadas en los mamíferos han demostrado que el gen SRY tiene una alta homología en la secuencia de nucleótidos e identidad en los aminoácidos con las proteínas HMG1 y HMG2, que se sabe funcionan como factores de transcripción, se ha propuesto que éste gen desencadena una cascada de expresión de genes, así como la expresión y la síntesis de la hormona inhibidora de los conductos de Müller; asimismo, la expresión de la enzima que interviene en la biosíntesis de esteroides sexuales gonadales como la testosterona u hormona masculina y el 17β estradiol u hormona femenina (Villalpando y Sánchez, 1997; Gubia *et al.*, 1990).

Como se ha mencionado, en la diferenciación testicular intervienen otros genes como el gen SOX9, el cual se detecta su expresión en la cresta genital y en las células de Sertoli del testículo embrionario; Además, este gen esta activo también en las células cercanas al conducto de Müller, en el epidídimo y en el mesonefros. Esto gen sugiere que tiene un papel muy importante en la diferenciación sexual (Vaiman, Schibler, Oustry-Vaiman, Paihoux *et al.*, 1999; Villalpando y Sánchez, 1997).

Trastornos De Diferenciación Sexual

Un intersexo se define como un individuo que posee características anatómicas congénitas de ambos sexos, con diferentes grados de variación en los órganos reproductivos, o por ser genótipicamente de un sexo y fenotípicamente de otro (Trigo, 1998; Ayala et. al., 2000, Blowey y Weaver, 1992). Estas anomalías están fundamentadas en los cromosomas sexuales y en mutaciones génicas que se heredan en forma mendeliana (Salamanca, 1990; *et. al.*, Carnevale, 1992; Kofman, 1982; Tran, Picard, Campargue y Josso 1987).

Hermafroditismo

Klebs (1876), introdujo una clasificación de hermafroditismo en el humano, la cual hoy en día es usada en animales domésticos. En ésta se define a un hermafrodita verdadero como un animal con gónadas o tejido gonadal de ambos sexos; así como un pseudohermafrodita es aquel que tiene gónadas de un sexo pero otros órganos reproductivos con algunas características del sexo opuesto, el término va seguido de la palabra "masculino" o "femenino" acorde al tipo de tejido gonadal presente.

El hermafroditismo verdadero se puede presentar de forma bilateral, es decir ovotestis en ambas gónadas; y unilateral que presenta ovotestis en una gónada y tejido testicular u ovárico en la otra; lateral o alterno, tejido testicular en una gónada y tejido ovárico en otra (Sundberg 1979).

Intersexualidad En Bovinos

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

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

Freemartinismo

La condición de freemartin ocurre comúnmente en hembras de ganado bovino cuando en la gestación se presenta una anastomosis vascular con un macho gemelo. Donde los órganos reproductores de la hembra se presentan más alterados, el problema surge por la anastomosis de las circulaciones placentarias de los gemelos. La sangre se intercambia entre los fetos como se muestra en la **Fig. 3**, (puntos de fusión) y cada uno es colonizado por sustancias plasmáticas del otro, entre los días treinta y cuarenta de la gestación, es decir, antes de la fase de diferenciación sexual; la patología se da por los efectos que ejercen la sustancia inhibidora Müllerianna (MIS) y la testosterona del gemelo macho, Debido a que la diferenciación del embrión macho tiene lugar antes que en la hembra (Lainy et al., 1991, Blowey y Weaver, 1992).

La frecuencia de freemartin en estudios realizados, sugieren que provienen del 90 por ciento de partos gemelares heterosexuales, o bien de partos múltiples si un macho está presente (Marcum, 1974).

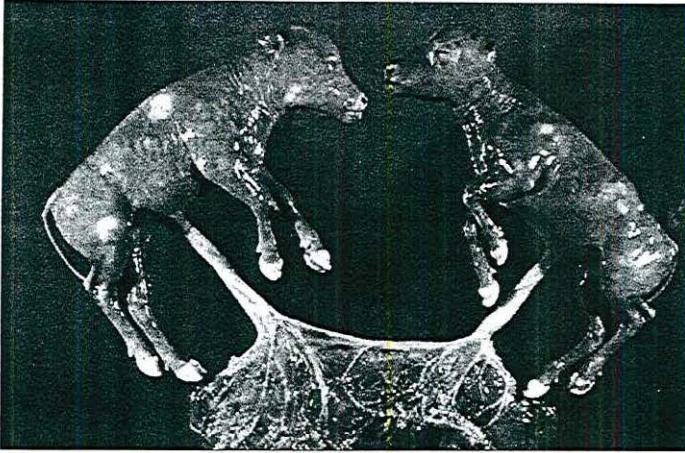


Fig. 3. Anastomosis vascular coriónica de fetos bovinos (Tomado de Robert A. Foster, Department of Pathobiology, Ontario Veterinary College, University of Guelph).

En las freemartin los defectos en el sistema tubular genital varían en gravedad, en la mayoría de los casos no hay comunicación entre el útero y la vagina. Las glándulas vesicales de tamaño variable están casi siempre presentes y el himen imperforado ocluye la vagina hipoplásica. Se debe considerar que la vagina de un freemartin generalmente es más corta de lo normal (Blowey y Weaver, 1992).

Se ha observado en esta condición que los ovarios se encuentran poco desarrollados y ocasionalmente contienen tubulos seminíferos. La vagina caudal y las glándulas vesiculares están presentes, pero el resto del tracto tubular es incompleto. Algunas freemartin presentan fallas en el estro así como pequeños ovarios, glándulas vesiculares, y aplasia en el útero. Esta condición se puede usualmente detectar a través de palpación o por medio de ultrasonografía en el tracto genital (Farin y Estill, 1993).

En el freemartin los genitales externos preferentemente son femeninos en apariencia y el grado de afección de los genitales internos es muy variado, es característica la hipoplasia gonadal, represión de los derivados de los conductos de Müller,

masculinización de las gónadas y estimulación de los derivados de los conductos de Wolf (Kastli y Hall, 1978; Wilkes *et al.*, 1984).

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

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

El síndrome freemartin también ocurre en otras especies como la cabra, la oveja, el cerdo, el venado rojo y el carnero de las rocosas, pero en estas especies la incidencia es mucho más baja que en el bovino, esto refleja indudablemente la baja incidencia de anastomosis vascular placentaria en estas especies, en tanto que el quimerismo XX/XY es común en caballos pero no está asociado con esterilidad. El quimerismo hematopoyético también es asociado con concepciones gemelares en

monos y raramente en el humano (Basrur y Kanagawa, 1971; Stewart-Scott *et al.*, 1990; Kenny *et al.*, 1992).

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

Quimerismo

El quimerismo se define como un individuo compuesto por células que se originaron a partir de dos cigotos, éste 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 solo 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 (Gustavsson, 1979; Thompson, 1991).

Métodos De Diagnósticos De Intersexualidad En Bovinos

Para el diagnóstico de estados intersexuales se han empleado métodos como el examen clínico, la prueba de tipos sanguíneos y el análisis citogenético (Long 1990).

Examen Clínico

En el primero consiste en la observación de los órganos genitales, sin embargo, la apariencia de los órganos genitales externos en la recién nacida es relativamente normal, este examen se realiza al año de edad, en los animales mas jóvenes donde es imposible la examinación rectal, se debe insertar un tubo prueba lubricado de $\frac{1}{2}$ a $\frac{3}{4}$ de pulgada vía vaginal. (Van Haeringen y Van Nieuwenhuizen 1980; Long, 1990)

Pruebas De Tipos Sanguíneos

Dado que en la anastomosis vascular entre gemelos dicigóticos, ambos tendrán dos poblaciones de eritrocitos con diferente juego de antígenos de superficie. Esto puede ser detectado por prueba de hemólisis usando una serie de reactivos de grupos sanguíneos específicos. Una suspensión de células mostrará sólo hemólisis parcial para un reactivo, con el cual cada uno debería normalmente completar hemólisis o no tener reacción para un ternero nacido único. Con anastomosis vascular los determinantes antigénicos de los grupos sanguíneos de las células rojas de ambos terneros están presentes en cada uno de los gemelos. (Spooner, 1981; Long, 1990).

Análisis Citogenético

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

Técnica De Reacción En Cadena De Polimerasa

En la actualidad la técnica molecular de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, del inglés Polymerase Chain Reaction) es útil en el diagnóstico y detección de diversas patologías, es óptima en sensibilidad, velocidad y versatilidad, su aplicación se ha utilizado para el diagnóstico de enfermedades genéticas e infecciosas (virus, bacterias, hongos, parásitos), detección de mutaciones, secuenciación directa de secuencias amplificadas, ciencias forenses y pruebas de paternidad (Charlieu, 1994; Taylor, 1996; Innis *et. al.*, 1990; White, 1989; Arnheim y Erlich, 1989).

Principio De La Técnica De PCR

La técnica PCR esta basada en la amplificación enzimática (DNA polimerasa) de un fragmento de DNA que es flanqueado por dos oligonucleótidos iniciadores (primers, en inglés). El iniciador proporciona un extremo 3' OH libre para que las enzimas DNA polimerasas prosigan la síntesis de DNA. Finalmente los iniciadores son eliminados y reemplazados por secuencias de DNA, permitiendo así la síntesis de DNA utilizando dNTP (desoxinucleotidos trifosfato; dATP, dGTP, dCTP, dTTP), como precursores para la polimerización de DNA (Charlieu, 1994; Taylor, 1996; Michael, Innis *et. al.*, 1990; White, 1989; Arnheim y Erlich, 1989).

Etapas Del Ciclo De PCR

Se realizan repetidos ciclos (~30) de desnaturalización del templado (DNA), en esta fase se calienta la reacción a una temperatura de 90-95°C durante 5 minutos, con lo que permite la separación de las cadenas del DNA molde a amplificar, generándose las correspondientes cadenas sencillas debido a la rotura de los puentes de hidrógeno intercatenarios (Griffin 1994, Charlieu 1994; Taylor 1996; Innis *et. al.*, 1990; White, 1989; Arnheim y Erlich 1989)

Para la alineación (hibridación) entre el iniciador y la hebra templado la temperatura desciende a una temperatura entre 40 y 60°C, de modo que cada iniciador se alinea con le extremo correspondiente de una de las cadenas del molde a través de

puentes de hidrógeno. Cada iniciador exige una serie de estudio experimentales para determinar su temperatura de alineación específica ya que si la temperatura es muy baja la unión será de forma inespecífica y si es muy alta no se producirá una unión completa (Griffin, 1994; Charlieu, 1994; Taylor, 1996; Innis *et. al.*, 1990; Mcpherson y Quirke, 1996).

En la extensión de los iniciadores, la *Taq polimerasa* incorpora nucleótidos en el extremo 3' del iniciador, utilizando como molde la cadena DNA previamente desnaturalizada. Este proceso se lleva a cabo a 72°C, temperatura a la que la *Taq polimerasa* alcanza su máxima actividad. Normalmente una extensión de 20 segundos es suficiente para fragmentos mayores a 500 pb y 40 segundos para fragmentos menores a 1.2 kb. (Griffin, 1994; Charlieu, 1994; Taylor, 1996; Innis *et. al.*, 1990; Mcpherson y Quirke, 1996).

Dado que la extensión del producto de cada iniciador puede servir como platilla (molde), para el otro iniciador, cada ciclo esencialmente duplica la cantidad de fragmento de DNA producido en el ciclo previo. Esto teóricamente resulta en la acumulación logarítmica del fragmento blanco específico hasta varios millones en pocas horas *v.gr.* 10⁶ copias de cada hebra blanco serían sintetizadas en 20 ciclos (Griffin, 1994; Charlieu, 1994; Taylor, 1996; Innis *et. al.*, 1990; Mcpherson y Quirke, 1996).

Recientemente, el desarrollo de la técnica de PCR y el uso de secuencias específicas de DNA del cromosoma Y, constituyen un significativo avance en la detección de estados intersexuales, tanto en el humano como en los animales domésticos (Sertiabudi, 1993; White, 1989; Amheim y Erlich, 1989).

Así pues, esta técnica de análisis molecular permite utilizar oligonucleotidos iniciadores para diagnosticar estados intersexuales en los bovinos (*Bos taurus*), mediante la amplificación y restricción de fragmentos de DNA genómico correspondiente a genes localizados en los gonosomas.

En el diagnóstico con la técnica de PCR sólo se requiere un volumen pequeño de tejido (v.gr. sangre), algunas de las muestras que se conservan en refrigeración se preparan y amplifican después dando resultados óptimos, además, con las muestras en el laboratorio, el diagnóstico se obtiene en un tiempo corto, en menos de 6 horas.

PCR-RFLP de los Genes Zfy/Zfx y su Aplicación en el Diagnóstico Molecular del Síndrome Freemartin en el Bovino

El empleo de la PCR ha hecho posible la amplificación de regiones específicas de DNA que incluyan el sitio del gen de interés, asimismo, una de las herramientas comúnmente empleadas en el estudio molecular de los genes es el análisis de Fragmentos de Restricción de Longitud Polimorfa (**RFLP**; del inglés Restriction Fragment Length Polymorphism). Los RFLP son fragmentos de DNA de diferentes longitudes obtenidos con enzimas de restricción que permiten distinguir diferencias (polimorfismo) en secuencias de nucleótidos entre alelos en un gen (McPherson *et al.*, 1996).

El diagnóstico preciso del síndrome freemartin se puede realizar a través de la técnica de PCR-RFLP mediante el uso de oligonucleótidos iniciadores que permitan amplificar un segmento específico de los genes Zfy/Zfx y el posterior empleo de enzimas de restricción para obtener el polimorfismo que permita identificar animales machos, hembras y freemartin (Ayala *et al.*, 2001).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

En las especies domésticas la selección artificial desempeña un papel importante a favor de rasgos productivos y reproductivos, de manera que se esperaría que los animales con efectos adversos al desarrollo sexual y/o fertilidad reducida fueran rápidamente eliminados en las poblaciones, sin embargo, éstos no son detectados en muchos de los casos, debido a la falta de un diagnóstico eficiente de las causas de falla reproductiva.

Los factores que alteran los mecanismos de la diferenciación sexual son múltiples, y el análisis molecular, esta permitiendo la mejor comprensión de este fenómeno. El presente trabajo pretende diagnosticar molecularmente (PCR-RFLP) anomalías sexuales de animales bovinos (*Bos taurus*), lo que a su vez permitirá a los productores identificar en edad temprana a los animales con trastornos de diferenciación sexual, y evitar la manutención de estos.

JUSTIFICACIÓN.

El análisis molecular (PCR-RFLP) de la intersexualidad de los bovinos (*Bos taurus*), nos ofrecería una herramienta útil para el diagnóstico preciso y oportuno de animales que no tendrían valor reproductivo o productivo; esta metodología ayuda a obtener el diagnóstico de estados de intersexualidad en un menor lapso de tiempo.

La técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), nos permitirá amplificar *in vitro* grandes cantidades de una secuencia concreta de DNA; en particular, se logrará la amplificación selectiva de un segmento específico de DNA de los genes Zfy y Zfx, al conocer las secuencias que la flanquean, por medio de dos oligonucleótidos iniciadores apropiados.

HIPÓTESIS

La presencia de quimerismo hematopoyetico (60XX/60XY), característica de los animales freemartin, podría ser identificada mediante un polimorfismo molecular (PCR-RFLP) que permite identificar el complemento genotípico sexual de los bovinos, lo cual de manera inherente resultaría ser una herramienta de diagnóstico clínico precisa y oportuna de la entidad intersexual mas frecuente en el bovino doméstico, el síndrome freemartin.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

- Diagnosticar el estado intersexual síndrome Freemartin en el bovino doméstico (*Bos taurus*), empleando el análisis molecular (PCR-RFLP) a través de la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa utilizando oligonucleótidos iniciadores para los cromosomas XY, mediante la amplificación y restricción de fragmentos de longitud polimorfica de DNA genómico correspondientes a los genes Zfy y Zfx.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Adoptar un protocolo de PCR-RFLP para la amplificación y restricción de segmentos específicos de los genes Zfy y Zfx (P1-5EZ y P3-3EZ) en el bovino doméstico.
- Diagnosticar animales bovinos intersexos (Freemartin) utilizando oligonucleótidos iniciadores para los cromosomas XY, mediante la amplificación (PCR) y restricción de fragmentos (RFLP) de DNA genómico correspondientes a los genes Zfy y Zfx.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se seleccionaron 24 bovinos (*Bos taurus*) con el antecedente de proceder de partos múltiples heterosexuales (gemelos o triates). Se elaboró una historia clínica de cada animal y posterior al examen respectivo se procedió a la toma de muestras sanguíneas por punción en la vena yugular con aguja vacutainer y tubos al vacío de 5 ml con EDTA como anticoagulante.

Extracción de DNA de Células Sanguíneas

El DNA genómico fue obtenido a partir de muestras de sangre completa de todos los animales estudiados siguiendo protocolos estándares. Cada muestra de sangre (5 ml) se tomó en tubos vacutainer conteniendo EDTA, posteriormente en el laboratorio 100 μ l de sangre fueron tratados con 900 μ l de buffer A (sacarosa, 0.32 M; Tris HCl, 10 mM; pH 7.6; Mg Cl₂, 5 mM; Triton X - 100, 1%), hasta lograr un botón celular blanco. A continuación se incubó la muestra por una hora a 50°C en una solución de Proteinasa K (8 mg/ml) en buffer D (KCl, 50mM; Tris HCl, 10 mM; MgCl₂, 2.5mM; NP-40, 0.455 Tween 20, 0.45%). La proteinasa K se inactivó incubando la muestra a 90°C durante 10 minutos (Kawasaki, 1990).

Análisis Molecular (PCR-RFLP)

Amplificación de DNA Genómico (PCR)

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

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

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

Análisis de Fragmentos de Restricción de Longitud Polimórfica (RFLP)

Para el análisis de RFLP's se tomaron 15 µl del producto de reacción de PCR y fueron digeridos por 2 horas con 10 unidades de la enzima de restricción Pst I (Gibco®). Posteriormente fueron analizados en electroforesis en gel de agarosa al 3% (Gibco® ultrapura) teñido con bromuro de etidio en buffer TBE 1x, subsecuentemente las bandas fueron observadas y fotografiadas bajo luz UV en un sistema de documentación de geles (UVP®).

Primer P1-5EZ

atggagagcc	acaagcttac	cagcaagtcg	gagaaggcca	ttgaatgtga
tgagtgcgga	aagcatttct	cccatgctgg	ggctttgttc	actcacaaaa
tggtgcataa	ggaaaaagga	gccagcaaaa	tgcataaatg	taaattctgt
gagtatgaga	cagctgaact	agggttatta	aatcgccacc	ttttggcagt
ccacagcaag	aactttcctc	atatatgtgt	agagtgtggt	aaaggttttc
gtcaccatc	agagctcaaa	aagcacatgc	gaatccatac	tagagagaaa
ccgtaccaat	cgcagtactg	cgaatatagg	tctgca/gact	cttetaattt
gaagacgcat	gtgaaaacta	agcatagtaa	agaaatgtct	ttcaagtgtg
acatttgtct	tctgactttc	tcagatacca	aagaagtgc	

Primer P3- 3MZ

Fig. 4. Región amplificada del gen Zfy del bovino doméstico (*Bos taurus*). Modificado de Kao, C.H. and Shine Y.L.; (2001).

Negritas: Regiones homologas de los oligonucleotidos iniciadores.
ctgcag: Sitio de reconocimiento de enzima de restricción Pst 1.
ctgca/g: Sitio de corte de enzima de restricción Pst 1.


```

aca accacctgga gagccacaag cttaccagca agtcggagaa ggccattgaa
tgtgatgagt gcgaaaagca tttctcccat gctggggctt tgttcaactca
caaaatggtg cataaggaaa aaggagccag caaaatgcat aaatgtaaat
tctgtgagta tgagacagct gaactagggt tattaatcg ccaccttttg
gcagtccaca gcaagaactt tcctcatata tgtgtagagt gtggtaaagg
ttttcgtcac ccatcagagc tcaaaaagca catgcgaatc catactagag
agaaaccgta ccaatcgag tactgcgaat ataggtccgc agactcttct
aatttgaaga cgcattgtgaa aactaagcat agtaaagaaa tgtctttcaa
gtgtgacatt tgtcttctga ctttctcaga taccaaagag gtcc

```

Fig.5. Región amplificada del gen Zfx del bovino doméstico (*Bos taurus*). Modificado de Sudou, S. and Sai A.; (1999).

Negritas: Región homologa de los oligonucleotidos iniciadores.

ccgcag: Sitio diferente al gen Zfy (**ctgcag**) en solo una base (c por t), por tanto, no reconocimiento de enzima restricción Pst 1.

RESULTADOS

La temperatura óptima de alineación de los oligonucleótidos iniciadores (primers) pudo ser determinada mediante el programa PCR gradiente. En la siguiente figura se observa el corrimiento electrofético con DNA de bovino control (**fig 5**), el cual fue amplificado con diferentes temperaturas (°C) de hibridación para su análisis molecular; de esta manera es posible identificar la temperatura óptima para la alineación de los primers (carriles 1-8). Con base en esta prueba se consideraron 54°C como la temperatura de alineación óptima para los oligonucleótidos empleados el diagnóstico de los animales a estudio.

El análisis molecular a través de la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (**PCR**), permitió diagnosticar los estados intersexuales (freemartin) utilizando oligonucleótidos iniciadores para los cromosomas XY del bovino doméstico (*Bos taurus*), mediante la amplificación y restricción de fragmentos de DNA genómico correspondientes a los genes *Zfy* y *Zfx*.

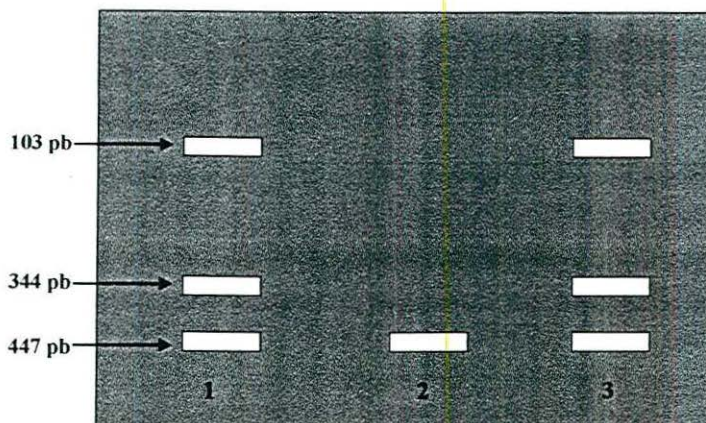


Fig. 6. Representación esquemática de electroforesis de DNA de bovino con amplificación de los genes Zfy y Zfx por PCR y digerido con la enzima de restricción Pst 1. Carril 1, macho control; carril 2, hembra control; carril 3, animal intersexo (freemartin).

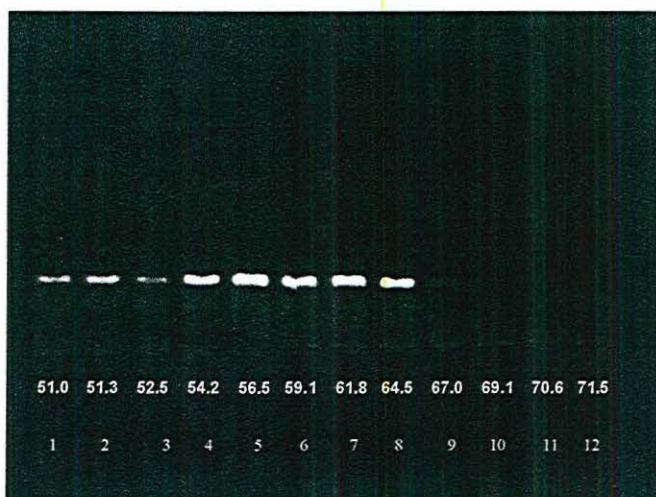


Fig. 7. Electroforesis en agarosa de DNA bovino amplificado por PCR para determinar la temperatura óptima de alineación de los primers (P1-5EZ y P3-3EZ), mediante el programa PCR gradiente en termociclador Mastercycler Gradient (Eppendorf). Carriles 1-12, muestras de DNA de acuerdo a las diferentes temperaturas (°C) de alineación del programa.

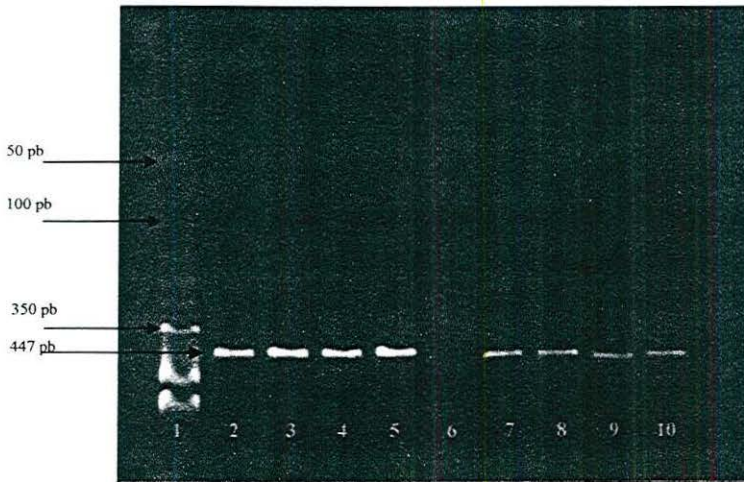


Fig. 8. Electroforesis en agarosa de DNA de bovinos gemelos heterosexuales amplificados por PCR sin digerir. Carril 1 marcador de peso molecular (50 pb), carril 2 macho control, carril 3 hembra control, carriles 4, 5, 7, 8, 9 y 10 bovinos estudio, carril 6 muestra blanco.

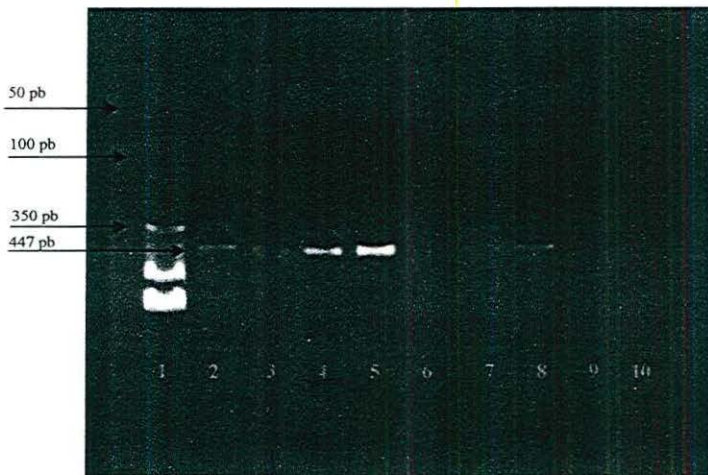


Fig. 9. Electroforesis en agarosa de DNA de bovinos gemelos hetesexuales amplificados por PCR y digerido con la enzima Pst 1. Carril 1 marcador de peso molecular (50 pb), carril 2 bovino macho control, carril 3 hembra control, carriles 4, 5, 7, 8, 9 y 10 bovinos intersexo, carril 6 muestra blanco. Las bandas de 103 pb corresponden a uno los productos de digestión del gen Zfy, éstas se presentan débiles y no son visibles en la figura pero sí en el gel.

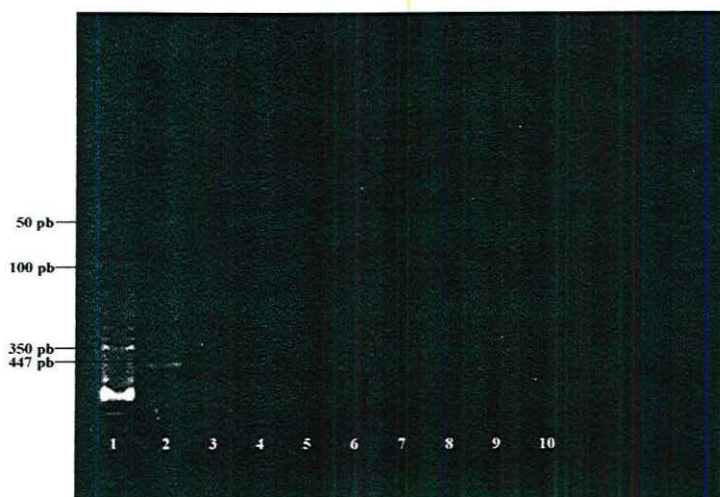


Fig. 10. Electroforesis en agarosa de DNA de bovinos gemelos heterosexuales amplificados por PCR sin digerir, Carril 1 marcador de peso molecular (50 pb), carril 2 macho control, carril 3 hembra control, carriles de 4-9 bovinos con posibles trastorno de diferenciación sexual, carril 10 blanco.

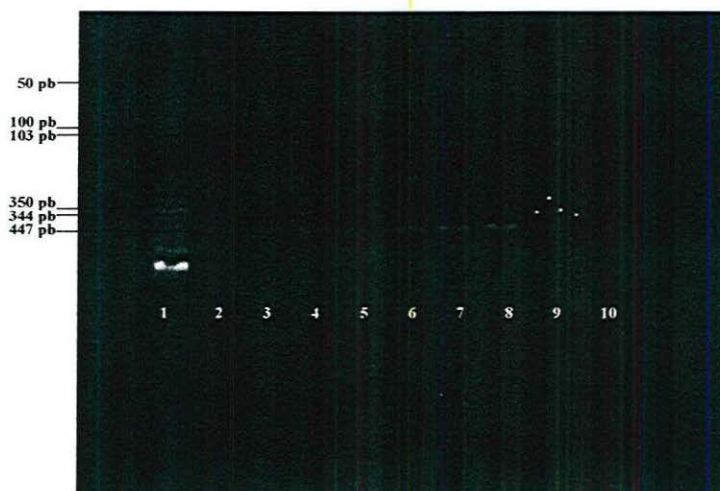


Fig. 11. Electroforesis en agarosa de DNA de bovinos gemelos heterosexuales amplificados por PCR digerido con la enzima Pst 1, Carril 1 marcador de peso molecular (50 pb), carril 2 macho control, carril 3 hembra control, Carril 4-9 bovinos freemartin, carriles 10 muestra blanco. Las bandas de 103 pb corresponden a los productos de digestión del gen Zfy, éstas se presentan débiles y no son visibles en la figura pero sí en el gel.

La técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa permitió amplificar el DNA genómico de los 24 animales estudiados y sus respectivos controles, en estos animales se identificó mediante electroforesis un fragmento de 447 pb que corresponde a los genes Zfy y Zfx (**Fig. 6 y 8**); a partir del producto amplificado los fragmentos de restricción de longitud polimórfica (RFLP) produjeron un patrón de bandas de DNA específico para animales control (macho 447 pb, 344 pb y 103 pb; hembra, 447 pb) y para diagnosticar animales intersexo (Freemartin 447 pb, 344 pb y 103 pb), en geles de agarosa al 3 % teñidos con bromuro de etidio (**Fig. 7 y 9**).

Este polimorfismo se debe a que el bovino hembra control carece del sitio de corte de la enzima de restricción, debido aun cambio de base nitrogenada (c por t). Para el bovino macho control los patrones de bandeo se obtienen gracias a que la enzima de restricción Pst 1 reconoce y corta (103 pb) un fragmento que corresponde al gen Zfy (**Fig. 7 y 9**).

Cuadro I. Diagnóstico Molecular Mediante La Técnica De PCR De Los Bovinos De Parto Múltiple Heterosexual Estudiados.

No de parto	Tipo de parto	Raza	No de animales	*Sexo fenotípico	Diagnóstico
I	Gemelar	Holstein-Friesian	1	Hembra	Freemartin
			2	Macho	
II	Gemelar	Holstein-Friesian/Simmental	3	Intersexo	Freemartin
			4	Macho	
III	Gemelar	Holstein-Friesian	5	Hembra	Freemartin
			6	Macho	
IV	Triple	Pardo Suizo Americano	7	Intersexo	Freemartin
			8	Hembra	
V	Gemelar	Holstein-Friesian	9	Intersexo	Freemartin
VI	Gemelar	Holstein-Friesian	10	Hembra	Hembra
VII	Gemelar	Holstein-Friesian	11	Intersexo	Freemartin
VIII	Gemelar	Holstein-Friesian	12	Intersexo	Freemartin
IX	Gemelar	Holstein-Friesian	13	Hembra	Freemartin
			14	Macho	
X	Gemelar	Holstein-Friesian	15	Hembra	Freemartin
XI	Gemelar	Holstein-Friesian/Pardo Suizo Americano	16	Hembra	Freemartin
			17	Macho	
XII	Gemelar	Holstein-Friesian/Pardo Suizo Americano	18	Hembra	Freemartin
			19	Macho	
XIII	Gemelar	Pardo Suizo Americano	20	Hembra	Freemartin
			21	Macho	
XIV	Gemelar	Pardo Suizo Americano	22	Hembra	Freemartin
XV	Gemelar	Holstein-Friesian	23	Hembra	Hembra
			24	Macho	

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

DISCUSIÓN

El síndrome freemartin es la entidad intersexual más frecuente en el ganado bovino doméstico, estimándose en 92% en los partos gemelares heterosexuales, sin embargo, pueden presentarse en partos múltiples de dos o más productos, si por lo menos un individuo macho está presente (Marcum, 1974). Tal como en el parto de triates estudiado en este trabajo (Cuadro 1).

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

Dado el alto porcentaje de freemartinismo en las concepciones múltiples heterosexuales, y que además un freemartin usualmente es estéril y no tiene valor como productor lechero, en el ganado de aptitud lechera se requiere un diagnóstico preciso que rebase los problemas de las metodologías clásicas como el impreciso diagnóstico clínico y las limitantes del estudio de tipos sanguíneos. La técnica de PCR-RFLP nos ofrece, además de precisión, un diagnóstico oportuno (6 h) comparado con el análisis citogenético (72 h).

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

Los análisis moleculares (PCR-RFLP) realizados a partir de DNA aislado de células sanguíneas y el uso de los oligonucleótidos iniciadores P1-5EZ y P3-3EZ (Bredbacka

y Peippo, 1992), nos permitieron identificar, en 13 de las 15 hembras procedentes de partos múltiples heterosexuales, un patrón electroforético igual al obtenido para la muestra del bovino macho control, es decir, Zfx, 447 pb; Zfy, 344 y 103 pb, lo que nos permite inferir la condición de quimerismo hematopoyético (XX/XY) propia de los animales freemartin.

Lamentablemente en el parto de triates no se dispuso del tercer individuo para complementar el estudio del fenómeno ocurrido, el cual, según el Médico Veterinario responsable del establo, fue un macho, motivo por el cual se puede considerar que posiblemente se estableció una anastomosis vascular entre el freemartin (animal 7) y el macho no disponible, dado que el otro animal (No. 8) analizado fue una hembra.

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

No se puede estar completamente seguro que al encontrar un genotipo femenino en las terneras nacidas con un macho, estas hembras no sean freemartin, ya que podría interpretarse que con la anastomosis vascular la mezcla XX/XY no siempre se establece. Tal podría ser el caso del animal No. 23, en el cual a pesar de tratarse de una ternera procedente de parto gemelar heterosexual, el análisis molecular (PCR-RFLP) reveló un patrón electroforético propio de una hembra (Zfx; 447 pb). Posiblemente exista una membrana que impida la llegada de células de intercambio,

pero que sea permeable a agentes capaces de inducir la condición freemartin (Greene *et al.*, 1977).

CONCLUSIONES

El trabajo realizado permitió implementar la técnica de análisis molecular Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), como una herramienta de gran utilidad, rápida y eficiente en el diagnóstico para identificar el estado intersexual, síndrome Freemartin, en los bovinos (*Bos taurus*), mediante el uso de oligonucleótidos iniciadores universales para los genes Zfx y Zfy (P1-5EZ y P3-3EZ), resaltando las ventajas (especificidad, sensibilidad y rapidez) que tiene sobre el análisis citogenético, el análisis molecular (PCR).

Este estudio permitió identificar 13 (86.66%) bovinos freemartin a través del análisis molecular (PCR-RFLP) mediante el uso de oligonucleótidos iniciadores para los genes Zfy y Zfx, lo que sin duda resalta la alta frecuencia (92%) de este síndrome reportada en la literatura.

BIBLIOGRAFÍA

1. Aasen E, Medrano JP. Amplification of the ZFY and ZFX for sex identification in humans, cattle, sheep and goats. *Biotechnology* 1990; 8: 1279-1281.
2. Ashworth A, Swift S, Affara N. Sequence of cDNA for murine Zfy-1, a candidate for Tdy. *Nucleic Acids Res* 1989; 17: 2864.
3. Ayala MA, Villagómez AF, Schweminski SL. Estudio citogenético y anatomopatológico del síndrome freemartin en bovinos (*Bos taurus*). *Vet Méx* 2000; 31: 315-321.
4. Ayala MA, Villagómez AF, Fregoso AJJC. Estudio molecular de estados intersexuales en bovinos, ovinos y caprinos. *Memorias del XXV Congreso Nacional de Buiatria*; 2001 agosto 16-18; Veracruz (Mexico). *Asociacion Mexicana de Médicos Veterinarios Especialistas en Bovinos, AC*, 2001. 107.
5. Blowey, R.W y Weaver, A. D. Atlas en color de patología del ganado vacuno. McGraw-Hill Interamericana. España, Madrid 1992: 155-163.
6. Bogan, J. and Page, D.C. Ovary? Testis?-A mammalian dilemma. *Cell* 1994; 76: 603-607.
7. BonDurant, R. H. Probable freemartinism in a goat. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 1980; 177: 1024-1025.
8. Bongso TA, Thavalingam M, Mukherjee TK. Intersexuality associated with XX/XY mosaicism in a horned goat. *Cytogenet Cell Genet* 1982; 34: 315-319.
9. Bredbacka P, Peippo J. Diagnosis of ovine and bovine embryos by enzymatic amplification and digestion of DNA from the Zfy/Zfx locus. *Agric Sci Finl* 1992;2:233-238.

10. Bruere AN, Marshall RB, Ward DP. Testicular hypoplasia and XXY sex chromosome complement in two rams: the ovine counterpart of Klinefelter syndrome in man. *J Reprod Fertil* 1969; 19: 103-108.
11. Burgoyne, P.S. Thumbs down for zinc finger. *Nature* 1989; 342: 860-862.
12. Carnevale A. Defectos mendelianos de la diferenciación sexual. *Gaceta medica de México* 1992;128: 171-179.
13. Chermas J. British scientists find that all it takes to make a man is a tiny fragment of DNA. *Science* 1991; 252: 782.
14. Crisponi L, Deiana M, Loi A, Chiappe F, Uda M, Amati P, Bisceglia L, Zelante L, Nagaraja R, Porcu S, Ristaldi MS, Marzella R, Rocchi M, Nicolino M, Lienhardt-Roussie A, Nivelon A, Verloes A, Schlessinger D, Gasparini P, Bonneau D, Cao A, Pilia G. The putative forkhead transcription factor FOXL2 is mutated in blepharophimosis/ptosis/epicanthus inversus syndrome. *Nature Genetic* 2001; 27: 159-166.
15. Cuevas S, Kofman S. El cromosoma Y humano. *Investigación clínica* 1990;42: 290-297.
16. David JS, Long SE, Eddy R. The incidence of freemartins in heifer calves purchased from markets. *Vet Rec* 1976; 98: 417-422.
17. Ennis S, Vaughan L, Gallagher TF. The diagnosis of freemartinism in cattle using sex-specific DNA sequences. *Res Vet Sci* 1999; 67: 111-2.
18. Erickson P R and Varga V. Minireview: Is Zinc-Finger Y the sex-determining gene? *Am. J. Hum. Genet* 1989; 45: 671-674.

19. Farin P W and Estill C T. Infertility due to adnormalities of the ovaries in cattle. *Vet. Clin. North. Am. Food. Anim* 1993; Pract. 9: 291-308.
20. Feter W, Fatin DVM, Charles T, and Estill VMD. Infertility due to abnormalities of the ovarios in cattle. *Veterinary clinics of north america: food animal practice* 1993; 9; 291-308.
21. George FW, Peterson KG, Frenkel PA, Wilson JD. The androgen receptor in the fetal epididymis is similar to that in the mature rabbit. *Proc Soc Exp Biol Med* 1988;188:500-503.
22. González-Ramos M. Texto de genética clínica. Estados intersexuales. México: Salvat Mexicana de Ediciones S.A. de C.V,1985.
23. Greene WA, Dunn HO, Foote RH. Sex-chromosome ratios in cattle and their relationship to reproductive development in freemartins. *Cytogenet Cell Genet* 1977;18:97-105.
24. Griffin HG, Griffin AM, PCR technology current innovations. PCR as a technique used daily in molecular biology. In: Charlieu JP. *United States of America: CRC press, Inc, 1994: 1-4.*
25. Gubbay J, Collignon J, Koopman P, Capel B, Economou A, Munsterberg A, Vivian N, Goodfellow P, Lovell-Badge R. A gene mapping to the sex-determining region of the mouse Y chromosome is a member of a novel family of embryonically expressed genes. *Nature* 1990;346:245-250.
26. Gustavsson I. Chromosome aberrations and their influence on the reproductive performance of the domestic animals. *Z Tierzuchtg Ziichtgsbiol* 1979; 97: 176-195.

27. Halnan C. R. E. An improved technique for the preparation of chromosomes from cattle whole blood. *Research in veterinary science* 1977; 22: 40-43.
28. Harvey MJA. Veterinary cytogenetics. *Vet Rec* 1976; 98: 479-481.
29. Haseltine FP, Ohno S. Mechanisms of gonadal differentiation. *Science* 1981; 211: 1272-1277.
30. Hodgkin J. Everthing you always wanted to know about sex. *Nature* 1988; 331: 330-331.
31. Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ. PCR protocols a guide to methods and applications. Optimization of PCRs. London: Academic Press, 1981.
32. Kao, C. h. And Shine Y. L. Bos taurus Zing Finger protein ZFy gene, partila cds; 2001 GenBank: <http://www.ncbi.nih.gov/Genbank/af35591>.
33. Kastli F, Hall JG. Cattle twins and freemartin diagnosis. *Vet Rec* 1978; 102: 80-83.
34. Kofman S, Merchant L, Pérez G. Bases biológicas del dimorfismo sexual. *Investigación clínica* 1982; 34:349-359.
35. Koopman P, Gubbay J, Collignon J and Novell-Badge R. Zfy gene expression patterns are not compatible with a primary role in mouse sex determination. *Nature* 1989; 342: 940-942.
36. Kraay GJ, Giebelhaus ED, Colling, DT A Case of unrelated Twins in cattle. *Can Vet J* 1978; 19: 279-283.

37. Lainy JA, Brinley Morgan WJ, Wagner WC. Fertilidad e infertilidad en la practica veterinaria. 4nd ed. España: McGraw-Hill Interamericana, 1991.
38. Long, S. E. Testicular feminisation in an Ayrshire cow. *Veterinary Record* 1981;8: 116–118.
39. Long S.E. Development and diagnosis of freemartinism in cattle. In *Pract* 1990; 12: 208-210.
40. Marcum JB. The freemartin syndrome. *Anim Breed abstr* 1974; 42: 227-242.
41. Mcfeely RA, Hare WCD, Biggers JD. Chromosome studies in 14 cases of intersex in domestic mammals. *Cytogenetics* 1967;6:242-253.
42. McLanren A. Of MIS and the mouse. *Nature* 1990; 345: 111.
43. McLanren A. What makes a man a man?. *Nature* 1990; 346: 216-217.
44. Mcpherson MJ, Quirke P, Taylor GR. PCR1. Polymerase chain reaction: basic principles and automation. In: Taylor G. U.K: IRL press, 1996: 1-3.
45. Wilson JD, George FW, Griffin JE. The hormonal control of sexual development. *Science* 1981;211:1278-1284.
46. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research* 1998; 16: 1215.
47. Mittwoch, U. Y chromosome and sex determination. *The Lancet* 1988; 52-53.
48. Ohno, S.; Trujillo, J. M.; Stenius, C.; Christian, L. C. and Teplitz, R. L. Possible germ cell chimeras among newborn dizygotic twin calves / *Bos taurus*/. *Cytogenetics* 1962;1:258–265.

49. Olsaker I, Jorgensen CB, Hellemann AL, Thomsen PD, Lie O. A fast and highly sensitive specific PCR primers. *Anim Genet* 1993; 244: 311-313.
50. Palmer M S, Sinclair P, Berta P, Ellis NA, Goodfellow PN, Abbas N E and Fellous M. Genetic evidence that ZFY is not the testis- determining factor. *Nature* 1989; 342: 937-939.
51. Rickwood D, Hames BD. *Gel Electrophoresis of nucleic acids. Second edition. The Practical Approach Series.* Oxford 1990: 1-309.
52. Rieck, G. W. *Veterinary Medicine and Citogenetics. 6th Eur. Colloq. Cytogenet. Domest. Anim. 20 - 34 Zurich, Switzerland July 1984: 20 - 34.*
53. Salamanca Gómez, F. *Citogenética humana. Primera Serie editorial medica panamericana. México, D.F 1990: 107-128.*
54. Salamanca F. *Desarrollo de la metodología citogenética: contribuciones al conocimiento de la estructura cromosómica y sus aplicaciones en la clínica. Metodología Citogenética 1983; 119: 315 - 324.*
55. Setiabudi, R. *Application of the Polimerase Chain Reacion (PCR) Technique for Determination of Sex on the Cellular Nivel, Licentiate Thesis, Swedish University of Agricultural Sciences, Departament of Animal Breeding and Genetics, Uppsala, Sweden, 1993.*
56. Spooner RL. *Diagnosing wrong parentage, freemartins, translocations and mannosidosis. Br vet J 1981; 137: 2-7.*
57. Suodo, S. And Sai A. *Bovine mRNA for ZFx proteirin, complete cds 1999. Gen bank: <http://www.ncbi.nih.gov/Genbank/E142776>.*

58. Tamassia, M. Prenatal sex determination. Intern Seminal 1991; May 24: 1-18.
59. Therman, E. and Susman, M. Human chromosomes: Estructure, Behavior, and Efects. 3th edition Springer-Verlag. New York, USA 1993: 203-209.
60. Thompson M W, McInnes R R and Willard H F. Genetics in Medicine. 15th edition. W. B. Saunders Company. Philadelphia, USA 1991: 428-429.
61. Tran D, Picard JY, Campargue J, Josso N. Immunocytochemical detection of anti-Mullerian hormone in Sertoli cells of various mammalian species including human. The Journal of Histochemistry and Cytochemistry 1987; 35: 733-743.
62. Trigo Tabera, Francisco J. Patología sistémica veterinaria. Tercera. Serie McGraw-Hill Interamericana. México, D.F 1998: 160-161.
63. Van Haeringen H, Van de Nieuwenhuizen J. Twins and freemartins in cattel. 4th European Colloquium Cytogenetics of Domestic Animal Breeding and genetics. Faculty of Veterinary medicine, Swedish University of Agricultural Sciences, 1980: 100-102.
64. Villalpando I, Sánchez G. La diferenciación sexual en las aves, bases fisiológicas y moleculares. Ciencia y Desarrollo 1997; Enero: 49-53.
65. White TJ, Arnheim N, Erlich HA. The polymerase chain reaction. Elseveir Science Publisher Ltd 1989;5: 185-188.
66. Winter H, Pfeffer A. Pathogenic classification of intersex. Vet Rec 1977; 100: 307-310.