

## COMPARACIÓN DE TÉCNICAS CITOLÓGICAS PARA EL DIAGNÓSTICO DE FREEMARTINISMO <sup>z</sup>

M.V.Z. JOSÉ CORTÉS ZORRILLA <sup>2</sup>  
DR. JESÚS M. LEÓN CAZARES <sup>3</sup>  
M.V.Z., M.S. Fco. ROGELIO CUEVAS C. <sup>2</sup>

### Resumen

Se comparan dos técnicas citogenéticas para el diagnóstico de freemartinismo y se recomienda su uso, en forma rutinaria, en los laboratorios de diagnóstico clínico.

La técnica que utiliza una parte a la que se le practicó una biopsia de médula ósea, ofrece un ahorro tanto en costo como en tiempo, lo que le da ventaja sobre la que utiliza sangre periférica.

La forma de placentación en los bovinos hace que sea inevitable la fusión coriónica y la anastomosis vascular entre los gemelos dicigóticos, durante los primeros estadios de vida embrionaria. Cuando los gemelos son de sexo diferente, el becerro macho es normal al nacer, pero la hembra es modificada y se convierte en una "freemartin" (Lillie, 1917).

La anastomosis vascular tiene como resultado un intercambio de células progenitoras, las que son precursoras de las células eritropoyéticas (Owen, 1945) y las leucopoyéticas (Ohno *et al.*, 1962). Este quimerismo induce tolerancia inmunológica entre gemelos dicigóticos (Anderson *et al.*, 1951), la cual no es completa (Stone *et al.*, 1965).

Para el diagnóstico del freemartinismo se han utilizado los siguientes procedimientos:

Examen clínico (buscando anomalías anatómicas). Estudio de la cromatina sexual. Reacciones inmunológicas, como son la identificación de los grupos sanguíneos y rechazo a injerto de la piel (Hafez, 1968).

A partir del descubrimiento de quimerismo en médula ósea y gónadas de bovinos (Ohno *et al.*, 1962) se han utilizado métodos citogenéticos. (Herschler, Fehheimer y Gilmore, 1966; Kanagawa y Basrur, 1968).

Por otra parte, como no todas las hembras nacidas en parto gemelar heterosexual son freemartin y la ausencia de quimerismo cromosómico ha sido observada a partir de cultivos de leucocitos procedentes de estos animales, se recomienda examen cromosómico de todos aquellos individuos nacidos en parto gemelar o múltiple heterosexual (Kanagawa *et al.*, 1965).

El objetivo del presente trabajo, es la adaptación y comparación de dos técnicas citogenéticas para la detección de células masculinas en animales hembras nacidas con machos.

### Material y métodos

#### TÉCNICA A

Para este estudio se utilizó sangre desfibrinada proveniente de una vaquilla de la raza Suizo Pardo, de aproximadamente un año de edad, nacida en parto gemelar heterosexual.

Los cultivos de sangre periférica se hicieron por medio de la microtécnica convencional (Arakaki y Sparkes, 1963), utilizando sangre desfibrinada, extraída por punción de

<sup>1</sup> Este trabajo fue utilizado como tesis profesional del primer autor.

<sup>2</sup> Instituto Nacional de Investigaciones Pecuarias. Departamento de Reproducción Animal. Km. 15½ Carretera México-Toluca, Palo Alto, D.F.

<sup>3</sup> Laboratorio de Genética Animal. Instituto de Biología. U.N.A.M., Ciudad Universitaria.

la vena yugular que se obtuvo mediante un dispositivo consistente en un frasco que contenía perlas de vidrio y una cánula de tubo látex, conectada a una aguja.

Se utilizó medio para cultivo de tejidos TC-199 (Difco),<sup>1</sup> al cual se le agregó suero fetal de bovino (B.B.L.)<sup>2</sup> previamente inactivado a 56°C durante 30 minutos, en una proporción de 20%. Sobre 5 ml de esta preparación, contenida en frascos ampula de 100 ml, se sembró un mililitro de sangre desfibrinada, cerrándose los frascos con tapones de hule. Se añadió como estimulante mitótico, 0.5 ml de Fitohemaglutinina "M" (Difco),<sup>1</sup> agregando 0.25 ml de Penicilina-Estreptomicina (Difco).<sup>1</sup>

Se procedió a incubar los cultivos a 37°C, por un período de 72 horas transcurridas, las cuales, se agregó a cada frasco 0.1 ml de Colcemid (Giba)<sup>3</sup> en una dilución de dos microgramos por ml, dejándose nuevamente en incubación a 37°C durante 6 horas. Transcurrido el tiempo de exposición al mitostático, se procedió a cosechar la muestra para lo cual se utilizó la técnica de Basur y Gilman (1964) que incluye tratamiento hipotónico y fijación en alcohol acético.

Una vez fijadas las células, se hicieron frotis que fueron secados al aire y más tarde teñidos con una mezcla de Giemsa y Leishman diluidos en agua, posteriormente fueron lavadas en alcohol al 50% y en agua.

## TÉCNICA B

Para llevar a cabo esta técnica, se utilizaron dos becerros que nacieron en parto gemelar heterosexual, se les extrajo una parte de médula ósea para practicarle una biopsia siguiendo este procedimiento:

Primeramente fueron tranquilizados con un preparado comercial a base de Clorhidrato de propiopromazina (Abbot),<sup>4</sup> posteriormente se les sujetó y se preparó la región esternal, rasurando y aplicando antisépticos locales.

<sup>1</sup> Difco, Laboratories Detroit Michigan, U.S.A.

<sup>2</sup> B.B.L. División of Bioquest, Cockeysville, Maryland 21030, U.S.A. División of Becton, Dickinson.

<sup>3</sup> Giba Laboratories.

<sup>4</sup> Abbot, Laboratorios de México, S.A. Av. Coyacán 1622.

La punción del esternón, se realizó a la altura de la articulación con la 3ª o 4ª costilla, por su cara ventral, para lo cual se utilizó una aguja de calibre Núm. 16 X 2", cuyo conducto fue ocupado con un mandril.

Se colocó 0.5 ml de muestra en un frasco que contenía 3 ml de solución salina fisiológica bufferada ( $6.6 \times 10^{-3}$  M de fosfatos, pH 7), en la cual había en suspensión Colchicina (K. & K. Laboratories, Inc.)<sup>5</sup> en concentraciones variables, de 3µg a 100µg, debido a que no hay referencias que indiquen las cantidades necesarias para esta especie. Por el mismo motivo, el tiempo de cosecha, se hicieron diferentes ensayos en cuanto al tiempo de exposición a la solución hipotónica, los cuales variaron de 10 a 50 minutos (cuadro 1).

Las células se fijaron en alcohol acético, haciéndose las preparaciones por el método de secado al aire descrito por Tjio y Whang (1962) y fueron teñidas con Giemsa.

Las preparaciones así obtenidas se revisaron minuciosamente. Para localizar las figuras mitóticas se empleó un microscopio óptico común. Se observaron las laminillas con un aumento de 100 diámetros para localizar las figuras y con un aumento de 1,000 diámetros, aproximadamente, para contar y reconocer los cromosomas sexuales.

## Resultados

### TÉCNICA A

En este estudio se localizaron un total de 150 figuras mitóticas, de las cuales fueron analizables 114 (fotografías 1 y 2).

Se encontró que el 50% de las células tenían cromosomas X y Y, y el otro 50% eran células femeninas.

### TÉCNICA B

En la técnica que utilizó médula ósea, se hicieron variaciones en la concentración y tiempo de exposición a la colchicina, deduciéndose de esto que, las muestras deben de-

<sup>5</sup> K. & K. Laboratories, Inc. Painview, New York.

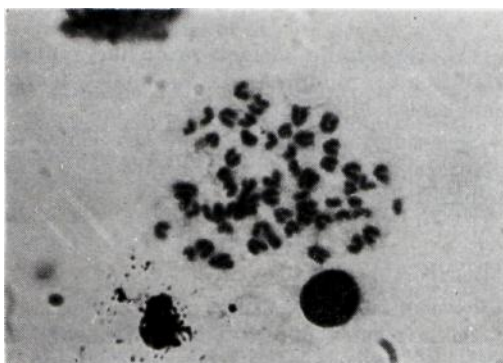
**CUADRO 1**

Variaciones en el tiempo de exposición a Colchicina y solución hipotónica  
en relación a la obtención de células en mitosis

Concentración de Colchicina $\mu^g$	Tiempo de exposición a la Colchicina. En hs.	Tiempo de exposición a la Sol. hipotónica en min.		Resultados
		KCL	H <sub>2</sub> O	
3	6	10	10	No se observaron mitosis
4	3	10	10	No se observaron mitosis
	6	10	10	No se observaron mitosis
4	6	20	30	No se observaron mitosis
4.5	6	10		No se observaron mitosis
6	6	10		No se observaron mitosis
9	6	45		No se observaron mitosis
22	6	45		No se observaron mitosis
60	6	45		No se observaron mitosis
85	6	50		Se observaron mitosis
100	6	45		No se observaron mitosis

jarse durante seis horas en una solución de colchicina que contenga 85  $\mu g$  por 3 ml de la solución salina fisiológica bufferada, debiéndose hacer posteriormente un tratamiento con la solución hipotónica por un período de 50 minutos (cuadro 1)

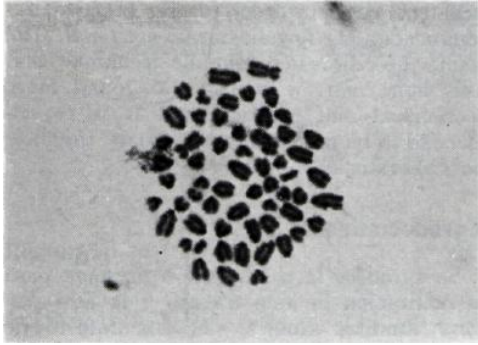
En esta parte del trabajo se localizaron 160 figuras mitóticas analizables, 90 en el macho y 70 en la hembra. Se encontró en el caso del macho un 75% de células masculinas y el 25% restante de células femeninas. En la hembra se encontró un 60% de células feme-



**Fotografía 1.** Mitosis de célula masculina de becerra "Freemartin", obtenida por la técnica de sangre periférica. Nótese el cromosoma Y encerrado en un círculo. El cromosoma X no se aprecia claramente.



**Fotografía 2.** Mitosis de célula femenina de becerra "Freemartin", obtenida por la técnica de sangre periférica. En el círculo, los cromosomas X.



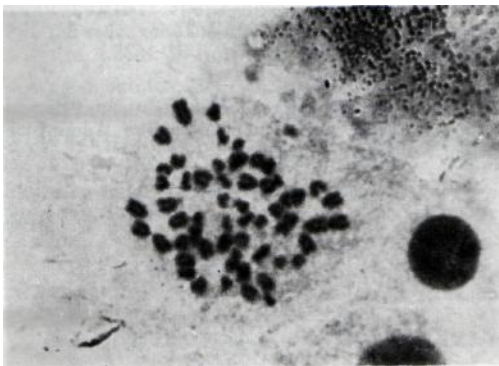
**Fotografía 3. Mitosis de célula femenina en el becerro. Técnica de médula ósea.**

ninas y un 40% de células masculinas (fotografías 3, 4 y 5)

## Discusión

Los animales estudiados fueron diagnosticados como freemartin en el caso de las dos hembras. En el macho se observó la presencia de quimerismo.

Las técnicas utilizadas tienen aplicación en la clínica veterinaria, ya que al emplearlas oportunamente, esto es, inmediatamente después de nacer el animal en parto gemelar heterosexual, permiten detectar a los animales que desarrollarán anomalías en los

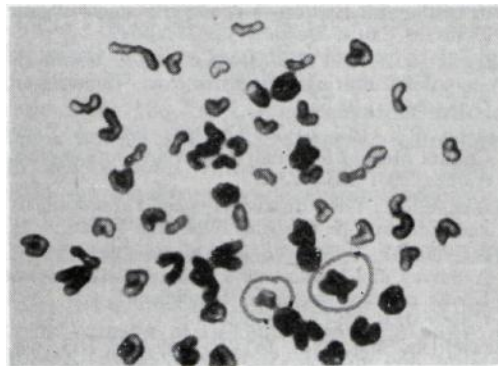


**Fotografía 4. Mitosis de célula masculina en el becerro. Técnica de médula ósea.**

órganos reproductores al alcanzar la madurez sexual. La detección de estos animales tiene repercusiones económicas en la explotación pecuaria, ya que al identificar a los animales con problemas de infertilidad, podrán ser desechados del hato reproductor y sustituidos por otros normales, evitando de esta manera gastos de alimentación y manejo.

Otro aspecto importante derivado del empleo de esta técnica de diagnóstico sería la recuperación de un 10% de animales que, siendo normales, tradicionalmente son eliminados con base en prácticas meramente empíricas (Lazear, Ferguson y Ely, 1953).

Con respecto a la elección de las dos técnicas que se emplearon, en base a los resultados, se recomienda el empleo del segundo procedimiento, ya que el costo del material es  $\frac{1}{3}$  del costo de la técnica en que se utiliza sangre periférica (aproximadamente \$5.00)



**Fotografía 5. Mitosis de célula masculina en la becerro. Encerrados en círculos los cromosomas sexuales (X y Y). Técnica de médula ósea.**

Además, se ahorra tiempo, ya que en el primer caso debe esperarse más de 72 horas, mientras que en el segundo solamente seis horas.

Estas técnicas no solamente sirven para detectar problemas como los anteriormente descritos, sino que también son de utilidad en estudios cromosómicos que ayuden a descifrar otras entidades patológicas, como hermafroditismo (McFeelly, Hare y Biggers, 1967) y leucemias (Hare, Yang y McFeelly, 1967)

## Conclusiones

Se recomienda la utilización de las técnicas citogenéticas en forma rutinaria en los laboratorios de diagnóstico clínico cuando se desee saber las posibilidades reproductivas de un animal que haya nacido en parto gemelar heterosexual.

La técnica que utiliza una biopsia de médula ósea ofrece un ahorro, tanto en costo como en tiempo, lo que da ventaja sobre la técnica que utiliza sangre periférica.

## Summary

Two cytological procedures for the study of chromosomes in heterosexual bovine twins

were compared in order to give practical recommendations for diagnostic purposes. The results are discussed and the technique that uses bone marrow biopsy was found more economical and practical and it is recommended to be used at the Veterinary Diagnostic Laboratories.

## Agradecimientos

Se agradece la colaboración prestada para la realización de este trabajo a la Dra. Susana Ramírez Robles, del Laboratorio de Pruebas Especiales del I.S.S.S.T.E., en donde se realizó parte de este trabajo. Asimismo, nuestro agradecimiento al Dr. José M. Beruecos por sus sugerencias.

## Literatura citada

- ANDERSON, D., R.E. BILLIGHAM, G.H. LAMPIK and P.B. MEDAWNAR, 1951, The Use of Skin Graftin to Distinguish Between Monozygotic and Dizygotic Twins in Cattle, *Heredity*, 5: 379-397.
- ARAKAKI, D.T. and R.S. SPARKES, 1963, Microtechnique for Culturing Leucocytes from Whole Blood, *Cytogenetics*, 2: 57
- BASRUR, P.K. and J.P.W. GILMAN, 1964, A Blood Culture Method for Study of Bovine Chromosomes. *Nature*, 204: 1335-1337
- HAFEZ, E.S.E., 1968, Reproducción in Farm Animals. 2nd Ed., *Lea & Febiger*, Filadelfia.
- HARE, W.C.D., T. YANG and R.A. Mc FEELLY, 1967, A Survey of Chromosome Findings in 47 cases of bovine Lymphosarcoma (Leukemia), *J. Nat. Cáncer Inst.*, 38(3): 383-387.
- HERSCHLER, M.S., N.S. FECHHEIMER and L.O. GILMORE, 1966, Identification of Freemartins by Chromosomal Analysis, *J. Dairy Sci*, 49: 113-114.
- KANAGAWA, H., K. KAWATA, T. ISHIKAWA, J. MURAMOTO and H. ONO, 1965, Sex Chromosomes Chimerism (XX/XY) in Heterosexual Bovine Triplets, *Jap. J. Vet. Res.*, 13: 121-126.
- KANAGAWA, H. and P.K. BASRUR, 1968, The leucocyte culture Method in the Diagnosis of freemartinism, *Can. J. Comp. Med.* 32: 583-586.
- LAZEAR, E.J., L.C. FERGUSON and F. ELY, 1953, The Frequency of in Útero Vascular Anastomosis in Bovine Twins as Determined by Blood typing, *J. Dairy Sci.*, 36: 596.
- LILLIE, F.R., 1917, The freemartin: A Studies of the Action of Sex Hormones in the Foetal Life of Cattle, *J. Exp. Zool.*, 23: 371-452.
- MCFEELLY, R.A., W.C.D. HARE and J.D. BIGGERS, 1967, Chromosome Studies in 14 cases of ínter sex in Domestic Mammals, *Cytogenetics*, 6: 242-253.
- OWEN, R.D., 1945, Immunogenetic Consequences of Vascular Anastomoses Between Bovine Twins, *Science*, 102: 400-401.
- OHNO, S., TRUJILLO, J., C. STENIUS, L.C. CHRISTIAN and R. TEPLITZ, 1962, Possible Germ cell Chimeras Among Newborn Dizygotic Twin Calves (*Bos taurus*), *Cytogenetics*, 1: 258-265.
- STONE, W.H., R.G. CRAGLE, E.W SWANSON and D.G. BROWN, 1965, Skin Grafts: Delayed Rejection Between Pairs of Cattle Twins Showing Erythrocyte chimerism, *Science*, 148, 1335.
- TJIO, J.H. and J. WHAN G., 1962, Chromosome Preparations of Bone Marrow Cells Without Prior In-Vitro Culture or In-Vivo Colchicine Administration, *Stain Technology*, 37: 17-20.