

**FACTORES QUE AFECTAN EL DESARROLLO EMBRIONARIO GONADAL
DEL TRACTO REPRODUCTIVO EN HEMBRAS BOVINAS
FREEMARTIN Y SUS DIAGNÓSTICOS- REVISIÓN**



Autor(a):

Sandra Milena Duran Arandia

Universidad Antonio Nariño

Facultad de Medicina veterinaria

Sede Bogotá, Colombia

2021

**FACTORES QUE AFECTAN EL DESARROLLO EMBRIONARIO GONADAL Y
DEL TRACTO REPRODUCTIVO EN HEMBRAS BOVINAS FREEMARTIN Y
SUS DIAGNÓSTICOS- REVISIÓN**



Sandra Milena Duran Arandia
Código estudiantil: 10511613917

Trabajo de grado presentado como requisito para optar al título de;

Médico Veterinario

En modalidad de pasantía de investigación en la Unidad de Citogenética y de
Genotipificación de Animales Domésticos UGA de la Universidad Nacional de Colombia
Sede Bogotá

Director(a): Dra. Ligia Jiménez Robayo

Médica Veterinaria MSc PhD
Directora Unidad de Citogenética y de Genotipificación de Animales Domésticos UGA
Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia
Universidad Nacional de Colombia Sede Bogotá

Dr. Francisco J. Vargas,
MV, MSc, PhD director UDCI
Facultad de Medicina Veterinaria
Universidad Antonio Nariño

Universidad Antonio Nariño
Facultad de Medicina veterinaria
Sede Bogotá, Colombia
2021

*Dedico este trabajo a mi padre que murió
antes de poder verme graduada,
siempre confió en mí, me apoyo y puso todo de
sí para brindarme buenas energías siempre para que continuara .*

AGRADECIMIENTOS

Mi trabajo se lo agradezco a mis padres por la dedicación ,credibilidad en mis esfuerzos y conocimiento. A mis hijos que siempre han sido un motor para continuar, a mis profesores por el apoyo y por último a la doctora Ligia Jiménez .R , el doctor Carlos Sánchez de la Universidad Nacional de Colombia por la oportunidad de aprendizaje dentro del campo de la genética.

Contenido

Tabla de ilustraciones.....	7
Resumen.....	8
Abstract.....	9
Introducción.....	10
Identificación del problema.....	11
Justificación.....	12
Objetivos.....	13
5.1 Objetivo general.....	13
5.2 Objetivos específicos.....	13
Marco teórico.....	14
Placentación bovina.....	16
Frecuencia de presentación.....	17
Anatomía embrionaria: Desarrollo gonadal, diferenciación gonadal y tracto reproductor embrionario.....	18
El macho bovino.....	18
La hembra bovina.....	19
Descripción anatómica de hembras de parto gemelar heterosexual.....	20
Freemartin en otras especies.....	21
Ovinos.....	21
Equinos.....	23
Porcinos.....	23
Cervidae.....	24
Metodología.....	26
Resultados y discusión.....	28
Factores que afectan el desarrollo embrionario de las gónadas y del tracto reproductor de las hembras bovinas nacidas de parto gemelar heterosexual.....	28

Tasa de ovulación.....	28
Anastomosis placentaria.....	28
Hormonas	29
Células hematopoyéticas	29
Diagnóstico en bovinos	30
Examen clínico.....	30
Análisis Citogenético	31
Método molecular	43
Métodos Hormonales	44
Conclusiones	45
Referencias bibliográficas.....	46

Tabla de ilustraciones

Ilustración 1. Flujograma de cultivo y siembra de linfocitos	32
Ilustración 2 Siembra y preparación de cultivo.	34
Ilustración 3. Incubadora estándar de microbiología, en inicio de siembra.....	35
Ilustración 4. Aplicación de solución hipotónica	36
Ilustración 5 .Descarte de sobrenadante y aplicación de Carnoy.....	37
Ilustración 6. Recambio de fijador Carnoy y resuspension de botón celular.	37
Ilustración 7. Ultimas aplicaciones de Carnoy y limpieza.....	38
Ilustraciones 8 y 9. Retiro de sobrenadante final y resuspension celular para goteo.	38
Ilustración 10 y 11. Goteo y flameado de láminas con preparados	39
Ilustración 12. Secado y marcado de láminas.....	40
Ilustración 13. Aplicación de tinción.....	40
Ilustración 14. Tinción y tiempo de exposición.....	40
Ilustración 15. Tiempo de secado posterior a la tinción	40
Ilustración 16. Metafase #1. de una hembra bovina con $2n=60$ (58 acrocéntricos/ XY).....	42
Ilustración 17. Metafase número #2. Con $2n=60$ (58 acrocéntricos/XX).....	42

Resumen

El síndrome de freemartin es la patología que afecta en gran porcentaje a los bovinos, pudiendo presentarse en otras especies, en menor proporción, la literatura agrupa extensos trabajos de investigación que han ido a través del tiempo recopilando historia de factores relacionados al mal desarrollo gonadal, alteraciones anatómicas presentes en este síndrome revelando los efectos en genitales internos como lo es la hipoplasia gonadal, el incorrecto desarrollo de los derivados de conductos de Müller y la presencia de derivados de Wolff (Ayala et al, 2000).

En el presente trabajo el objetivo general es realizar la recopilación de factores que afectan el desarrollo embrionario de las gónadas del tracto reproductor en hembras nacidas de parto gemelar heterosexual y sus diagnósticos. Al término de la recopilación de datos se pudo concluir que las causas del freemartin son anastomosis vascular resultando en quimeras XX, XY acompañado del cruce de hormonas masculinas causando grandes pérdidas económicas, el método de diagnóstico más accesible y rápido es el análisis citogenético mediante cultivo de linfocitos acompañada de un examen clínico previo.

Palabras clave: Freemartin, bovinos, factores, gemelares, heterosexuales, Müller, Wolff, citogenético, linfocitos.

Abstract

Freemartin syndrome is the pathology that affects cattle in a large percentage, and may occur in other species, to a lesser extent, the literature groups extensive research works that have gone through time compiling history of factors related to poor gonadal development, Anatomical alterations present in this syndrome revealing the effects on internal genitalia such as gonadal hypoplasia, incorrect development of Müllerian duct derivatives and the presence of Wolff derivatives (Ayala et al, 2000).

In the present work the general objective is to carry out the compilation of factors that flourish the embryonic development of the gonads of the reproductive tract in females born from heterosexual twin birth and their diagnoses. At the end of the data collection, it was possible to conclude that the causes of freemartin are vascular anastomosis resulting in XX, XY chimeras accompanied by the crossing of male hormones that caused great economic losses, the most accessible and rapid diagnostic method is cytogenetic analysis by culture of lymphocytes accompanied by a previous clinical examination.

Keywords: Freemartin, cattle, factors, twins, heterosexuals, Müller, Wolff, cytogenetics, lymphocytes.

Introducción

El síndrome de freemartin es una de las patologías reproductivas dentro de las cuales su afectación es mayor en la especie bovina, afectando a las hembras provenientes de gestaciones heterosexuales (Lillie, 1916; Lopera et al, 2016; Padula, 2005). La presentación de este síndrome tiene como consecuencia una disminución en la eficiencia reproductiva en la ganadería, presentándose en un 2 % de las gestaciones totales del hato, afectando la economía para los productores teniendo en cuenta la sumatoria de pérdidas por otras patologías (Esteves et al, 2012; Lopera et al, 2016), este síndrome es generado por la anastomosis vascular entre los dos embriones produciendo circulación de sustancias entre los gemelos durante su vida fetal, el paso de sustancias masculinizantes afectan directamente al embrión femenino, causando que se dé un desarrollo anormal de su tracto gonadal y reproductivo (Roa et al, 2012; Lillie, 1917).

La presentación del freemartin en bovinos puede darse en un aproximado del 92% de las hembras de nacimientos gemelares heterosexuales o nacimientos múltiples (Marcum et al, 1972). Especies como el bovino las cuales son típicamente uníparas y la placentación pueden ofrecer la posibilidad de las fusiones coriónicas dando como resultado las afectaciones del freemartin, tienen mayor probabilidad de que se presente este síndrome en casos de gestaciones múltiples heterosexuales (Hughes, 1927).

Los métodos diagnósticos que son citados por Zorrilla et al, (1963) basados en el freemartin, son variados y explicados a grande rasgo sin hacer una explicación detallada de cada uno, dejando a criterio propio el uso de cualquiera de estos, claro está que se hace la documentación específica de dos métodos indicando así sus beneficios y pasos a seguir de la técnica usada con su respectivo análisis y resultado. Dentro de la variedad de diagnósticos

que se pueden usar encontramos: Análisis citogenético, Método molecular, Examen clínico, Métodos Hormonales entre otros.

Identificación del problema

El freemartin se ha definido a través del tiempo como una afectación directa en hembras bovinas que provienen de partos gemelares con un macho, en la medicina veterinaria y la ganadería se conocen una variedad de patologías donde se afectan a los bovinos en su desarrollo normal, sin embargo, a la hora de saber el porqué del síndrome de freemartin son varias las hipótesis que se plantean (Padula, 2005; Lopera et al, 2016). La falta de conocimiento hace que mitigar las pérdidas económicas no sea precisa, no se puede tener un consenso claro, teniendo en cuenta que no se realizan las técnicas diagnósticas existentes, por ejemplo: las técnicas de citogenética para el análisis cromosómico, el análisis molecular mediante reacción en cadena polimerasa (PCR), la tolerancia al homoinjerto, entre otras, herramientas que brindan adecuada diagnosis (Lopera et al, 2016).

El manejo que se ofrece a los casos de Freemartinismo en gran parte es el descarte de las hembras, sin tener la certeza y el conocimiento de los efectos que tiene este síndrome causando pérdidas económicas de gran magnitud. En la literatura la información tiende a enfocar el diagnóstico y a los resultados de estos, pero no brinda una información unificada de los efectos en el desarrollo embrionario, ni una visión específica de la afectación en el tracto reproductivo de la hembra con Freemartinismo, lo cual si se unificara podría brindar una guía para un dictamen preciso.

La pregunta planteada es *¿Qué factores están relacionados en el desarrollo embrionario de las gónadas y del tracto reproductor de las hembras bovinas nacidas de parto gemelar heterosexual?*

Justificación

En la medicina veterinaria y la ganadería los conocimientos de patologías reproductivas bovinas tienen un amplio manejo disminuyendo pérdidas económicas, sin embargo, a la hora de mitigar estas pérdidas el síndrome de freemartin no ha tenido resultados satisfactorios lo que lleva a que en la mayoría de los casos los ejemplares sean descartados sin el análisis diagnóstico adecuado, debido a su presentación y manejo. En Colombia no hay un registro en donde se analice con exactitud los casos presentes, claro, en razón a que hay un mínimo número en el cual se hace uso de los recursos para la diagnosis (Lopera et al, 2016).

En este orden de ideas, el desarrollo de esta recopilación literaria permitirá hallar información fundamental para la síntesis teórica del tema sobre los efectos causados en el freemartin desde el punto del desarrollo embrionario gonadal y del tracto reproductor de las hembras que provienen de partos gemelares heterosexuales, apoyando la orientación en la medicina veterinaria en tener un mayor conocimiento de este síndrome desde el análisis embrionario y diagnóstico.

Objetivos

5.1 Objetivo general

Revisar los factores que afectan el desarrollo embrionario de las gónadas y del tracto reproductor en hembras nacidas de parto gemelar heterosexual y sus diagnósticos.

5.2 Objetivos específicos

- Realizar una revisión literaria, relacionada con la presencia de hormonas y/o células hematopoyéticas masculinas y sus efectos en las hembras bovinas nacidas de parto gemelar heterosexual.
- Efectuar una búsqueda de literatura, en relación con los métodos diagnósticos en las hembras bovinas nacidas de parto gemelar heterosexual.

Marco teórico

El término freemartin ha sido designado a la hembra de gemelos heterosexuales de ganado (Lillie, 1916), a través de la historia se han escrito numerosos datos de la procedencia del término freemartin y sus efectos, así como el escrito realizado por Swett et al. (1940) donde indica que la definición del freemartin, proviene y se conoce desde la antigüedad, antes del establecimiento del imperio romano. Se describen las definiciones asignadas a la hembra de parto gemelar heterosexual, entre las primeras y conocidas esta la establecida por Varro, un escritor el cual falleció el 28 a.C. quien refirió a la vaca estéril y le llamo “Taura”, partiendo, así como una de las primeras definiciones para esta patología, claro está que sin ser la única.

El término "freemartin" tiene un origen oscuro, teniendo en cuenta al desglosar la palabra (free) en español "libre" significaba "dispuesto" o "listo para funcionar” como se suponía que era Martin un trabajador especialmente dispuesto o propuesto de que la palabra "libre" se utilizara para significar la excepción de reproducción (estéril), estas y otras tantas definiciones han sido otorgadas a la hembra que nace de parto gemelar heterosexual a través de la historia (Swett et al, 1940). Aunque hay una gran variedad de historia en base al significado de este síndrome, no se puede establecer quien fue el autor principal en designar a esta patología “freemartin”.

La causalidad de este síndrome al igual que la historia ha sido descrita por varios autores quienes han aportado grandes investigaciones de este síndrome entre las que se encuentra Frank R. Lillie (1916) quien hace referencia a varios de los estudios previos sobre hembras freemartin, comparándolos con el estudio realizado por el indicando que la información ya establecida, solo se relaciona la estadística de presentación en bovinos y otras

especies, claro está que él hace una profundización de la causalidad de este síndrome, indicando que el freemartin distingue dos efectos, como lo es el factor cigótico que determina el sexo en los mamíferos y los factores hormonales que diferencian el sexo, concluyendo que la hembra es esterilizada al comienzo de la diferenciación sexual, o antes de que aparezcan evidencias morfológicas, y las hormonas masculinas circulan en su sangre durante un largo período a partir de entonces, debido a la circulación fetal común, instaurada por la anastomosis vascular que se desarrolla entre los coriones de los dos embriones durante la gestación y como regla general indica que es estéril.

La determinación de sexo cigótico en los mamíferos y de la participación hormonal en la diferenciación sexual de cada especie, ha permitido ahondar en las alteraciones y los puntos en la falla del desarrollo, ejemplificando la afectación por el freemartin, pautando causas en lo que respecta a las gestaciones gemelares de macho y hembra, donde comúnmente a la hembra se le define como freemartin (Lillie 1917).

Freeman (2007) analiza las publicaciones realizadas por Lillie (1917) y la previa publicación a estas que ya se había divulgado, que hablaba de la causalidad del freemartin comunicadas por los autores Tandler y Keller en 1911, quienes informaron por primera vez la explicación correcta del fenotipo freemartin en el gemelo femenino de un par hembra-macho en el ganado, basados en las gónadas rudimentarias asexuales o un testículo estéril presente en la hembra; sufriendo modificaciones en su diferenciación sexual normal. Freeman instaura este análisis con el fin de establecer quienes fueron los primeros en hablar de las causas del freemartin aclarando que la publicación realizada por los autores Tandler y Keller en 1911 fue realizada en una revista de poca circulación el campo científico y por esta

razón se brindó el crédito de la causalidad a Lillie (1917) quien conto con un mayor reconocimiento en este campo.

Placentación bovina

La formación de la placentación hace parte fundamental de la vida fetal compuesta por otras membranas extraembrionarias y la circulación, permitiendo el intercambio de sustancias entre la madre y el embrión. Además, de poseer la capacidad de secretar hormonas y producir una barrera entre ambos sistemas inmunes facilitando la supervivencia del feto en el útero (Roa et al, 2012; Lenis & Rodriguez-osorio, 2014).

La placentación en los bovinos se encuentra clasificada como sinepiteliocorial, que inicialmente esta placentación tenía una denominación de sindesmocorial por el epitelio uterino parecía haber desaparecido, desistiendo del trofoblasto en asociación directa con el tejido conectivo endometrial, lo que tiempo más tarde fue corregido demostrándose la formación de sincitios en medio de las células gigantes de trofoblasto bovino, las cuales son conocidas como binucleadas fusionándose con las células epiteliales uterinas, formando las células maternas trinucleares dando la clasificación sinepiteliocorial (Aquad et al, 2019).

Para la clasificación placentaria se tienen en cuenta criterios como: el tipo de relación que se establece entre la madre y el feto según el origen vascular. Otro criterio es el anatómico y un tercero es el histológico. En los bovinos la placentación cotiledonaria es donde las vellosidades coriales se agrupan en rosetas llamadas cotiledones que se relacionan con las carúnculas endometriales del útero. Las estructuras uterinas y coriónicas en conjunto conforman una estructura llamada placentoma (Roa et al, 2012).

La placentación en el desarrollo embrionario cumple casi que el papel más importante en este síndrome, teniendo en cuenta que el freemartin casi siempre causa anastomosis vascular de los vasos placentarios embrionarios de los gemelos, más concretamente de las arterias, causando el paso de sangre entre los gemelos durante la vida fetal (Lillie,1917). En las gestaciones gemelares de los bovinos es común la presentación de la anastomosis vascular placentaria (PVA) debido a que el corion contacta con el tejido conectivo materno, falta la capa epitelial, esta falta puede permitir una fusión vascular y coriónica (anastomosis) entre las placentas de los gemelos en desarrollo, permitiendo la circulación sanguínea entre los fetos dando lugar a animales leucoquiméricos (Young & Kirkpatrick, 2018).

Frecuencia de presentación

La prevalencia del síndrome de Freemartin en el ganado bovino puede estar directamente relacionado con la tasa de gestaciones gemelares y no solo porque es la patología reproductiva más frecuente de las gestaciones gemelares en ganado bovino (Esteves et al, 2012). En Colombia no se lleva a cabo un registro de la incidencia de estos partos múltiples en el ganado bovino, por lo que se asume que la mitad de estos partos múltiples serían heterosexuales (macho-hembra), es decir, el 2.37%; y un 84.9% de éstos producirían animales Freemartin. Estos análisis permiten calcular que el 2.02% de los partos totales da lugar a hembras Freemartin estériles causando pérdidas económicas de gran magnitud (Lopera et al, 2016).

El momento en el cual la diferenciación sexual embrionaria se ve afectado en las hembras de parto gemelar heterosexual radica en la inhibición de lo que serían los ovarios y conductos de Müller. Sin embargo, en algunas ocasiones (menos del 10%), las anastomosis

vasculares ocurren más tarde del período normal y aunque presentan un quimerismo sanguíneo, la ternera femenina se desarrolla con bastante normalidad (Esteves et al, 2012).

Anatomía embrionaria: Desarrollo gonadal, diferenciación gonadal y tracto reproductor embrionario

El desarrollo embrionario sexual normal del cual carecen las hembras freemartin, se origina durante el período en el que se forman los principales tejidos, órganos y sus sistemas (Winters et al, 1942). Ayala et al, (2000) cita a varios autores los cuales describen el intercambio de células (quimerismo hematopoyético) y sustancias plasmáticas como hormonas entre los embriones gemelos heterosexuales, generando una condición intersexual que es caracterizada por genitales externos que son esencialmente apariencia femenina, y genitales internos afectados con diversos grados.

En el desarrollo normal de los bovinos los conductos fetales de Wolff (conductos excretorios del riñón mesonéfrico transitorio) originarán los vasos deferentes, epidídimos y las vesículas seminales en los machos, mientras que los conductos fetales de Müller originarán los oviductos y el útero en las hembras (Jost, 1985). La inhibición del crecimiento de la gónada normal se aproxima al tiempo de 49 a 52 días de gestación, tiempo que se estima se da la anastomosis vascular afectando el normal desarrollo gonadal de la hembra (Jost et al, 1972).

El macho bovino

En el macho bovino, al ser XY, puede generar dos tipos de espermatozoides: la mitad llevara un cromosoma X y la otra mitad un cromosoma Y (Roberto & Salinas, 2017). El gen SRY regula una serie de otros genes que impulsan colectivamente la diferenciación de la gónada indiferente para convertirse en un testículo (McGowan et al, 2018). Se cree que el

papel principal de SRY es iniciar la diferenciación de las células de Sertoli, aunque sorprendentemente, incluso en las células de Sertoli, el requerimiento de SRY no es absoluto normalmente (Brennan & Capel, 2004).

La gónada que se encuentra en diferenciación secreta hormona antimülleriana y testosterona, que directamente o mediante metabolitos específicos influyen sobre el embrión indiferenciado (Ford & Klindt, 1989).

La diferenciación testicular en el embrión macho ocurre en respuesta del gen SRY el cual contiene la proteína SRY también conocida como factor determinante testicular (Ross et al, 2009). Este factor determinante testicular es responsable de que las células germinales de los órganos genitales del embrión empiecen a formar los testículos, aunque el gen SRY se transcribe solo en el desarrollo embrionario y exclusivamente en células que van a formar los testículos (Roberto & Salinas, 2017). La expresión de este gen inicia en el día 37 y alcanza su punto máximo el día 39 en el feto bovino (Ross et al, 2009), la gónada cambia de indiferenciada en el momento en que los cordones de las células epiteliales de los túbulos mesonéfricos y la capsula glomerular en regresión hacen una penetración en la mesénquima de la cresta genital dando forma a los cordones sexuales primitivos (McGowan et al, 2018).

La hembra bovina

las hembras bovinas es XX, cada uno de sus gametos tiene un solo cromosoma X (Roberto & Salinas, 2017) el ovario, se desarrolla más tardío, con una aproximación del día 48 de la gestación, al igual los órganos tubulares, formándose debido a la falta o ausencia de exposición endocrina gonadal masculina la cual está mediada por el antígeno HY, el factor testicular (hormona antimülleriana) se ausenta y se favorece el desarrollo femenino y el

ovario junto los conductos de Müller (Sequeira, 2013). La función en el desarrollo gonadal de los conductos paramesonéfricos de Müller es de formar los tubos uterinos, el útero y el tercio superior de la vagina, el sexo femenino, resultante de la regresión de los conductos de Wolff y en una feminización de los genitales externos (Rey,2001).

Descripción anatómica de hembras de parto gemelar heterosexual

Las gestaciones múltiples consiguen ser monocigotas o idénticas y dicigotas o fraternales. Los dicigóticos provienen de cigotos separados, es decir de dos o más óvulos fertilizados por espermatozoides diferentes y se conocen como mellizos o fraternales. Lo que atañe a los gemelos de sexos iguales puede que el desarrollo embrionario y de su tracto reproductivo sea perfectamente normal, pero se ha indicado que, en las gestaciones gemelares heterosexuales es más probable que la hembra sea definida como freemartin y dado que como regla general indica que es estéril (Lillie, 1917).

El nivel de afectación que hay en los genitales internos puede ser muy variado, lo más común, es la hipoplasia gonadal, incorrecto desarrollo de los derivados de conductos de Müller y la presencia de derivados de Wolff (Ayala et al, 2000) inclusive, se indica que hay baja masculinización de los genitales externos, a diferencia de lo que ocurre con los genitales internos (Jost et al, 1972).

La descripción de casos de freemartin con alteraciones de los genitales externos, revelan una vulva generalmente más pequeña que lo normal con presencia de un mechón de pelos que puede salir de la comisura vulvar inferior, así como puede hallarse la presencia de un clítoris largo que puede protruir (Ayala et al, 2000).

Eldridge & Blazak (1977) trazaron la suposición sobre la presentación de hembras que no exhiben problemas reproductivos, aunque provengan de parto gemelar heterosexual, suponiendo que la gónada femenina en desarrollo después de 49 días, no genera una respuesta a los agentes causantes de la supresión en la diferenciación del tracto reproductivo femenino, esto a casusa de que la fusión de los coriones y la anastomosis vascular puede ocurrir en un período de tiempo posterior al desarrollo gonadal de la hembra.

Algunas de estas opiniones son controversiales debido a que los primeros efectos de freemartin ocurren casi en la misma etapa del desarrollo femenino normal, siendo que la presentación de la anastomosis vascular se aproxima entre los 49 a 52 días en todos los presuntos freemartin (Jost et al, 1972).

Freemartin en otras especies

Ovinos

Marcum y colaboradores (1972) indicaron que la presentación de freemartinismo en las ovejas generalmente es de una incidencia baja (alrededor del 1%) sin tener mayor relevancia, sin embargo, la identificación de casos es mayor cuando la gestación es de cuatro o más embriones (Padula, 2005). En camadas múltiples es común en esta especie donde nacen machos y hembras sin presentar alteraciones, como está indicado por autores como Smith et al. (2003) y Parkinson et al. (2001), la presentación del freemartin en ovinos está generando una tendencia a aumentar el número de casos. El porcentaje de las presentaciones en los ovinos es variado entre especies las razas de ovinos más prolíficas como lo son Merino Booroola y Rideau Arcott que tienden a ser mucho más propensas a presentar el freemartin (Brace et al, 2008).

El planteamiento según un estudio realizado por Iwona szatkowska y Marek Switonskt (1996) donde asocian una probable existencia de un componente genético ligado al padre, el cual supone que la causa de presentación de anastomosis vascular es mayor, esto basados en el estudio en un rebaño de 1500 hembras y 68 cárneos, 22 de los cuales fueron casos de gemelos heterosexuales y un triplete heterosexual con quimerismo de cromosomas sexuales leucocitarios (XX / XY), todos estos asociados a descendencia similar, es decir, casi todos provenientes de los mismos carneros. Además, se realizó el cálculo de los coeficientes de endogamia para todas las camadas quiméricas.

Esta presentación de anastomosis vascular es más común en la población bovina que en la ovina, bajo las pequeñas diferencias en la placentación, donde hay una variación en la cantidad de placentomas lo que explica la diferencia observada en la prevalencia de quimerismo y freemartinismo en embarazos de nacimiento múltiple heterosexuales en estas especies (Brace et al, 2008).

El autor Eldridge (1985) expone en su trabajo que el cariotipo es el método diagnóstico más exacto a la hora confirmar la presencia del quimerismo 54 XX/54 XY. El síndrome de freemartin es una patología conocida en la industria ovina a pesar de su baja presentación en nacimientos múltiples y esto tiene una incidencia significativa en los rebaños de alta prolificidad, lo cual hace que sea importante un diagnóstico previo en el momento de realizar la selección de una hembra nacida de gestación múltiple con machos, evitando que sea usada para reproducción y tener grandes pérdidas económicas (Marí & Casellas, 2018).

Equinos

En la especie equina en el estudio de Bouters y Vandeplassche (1972) demostraron la presentación de anastomosis vascular en el 50 % de los casos examinados, siendo que el freemartinismo es poco común en los caballos y cuestionable (Padula, 2005). La placentación en el equino es difusa y epiteliocorial, por esta razón se establece una relación 1:1 donde se proveer un funcionamiento normal y nutrición adecuada al feto en desarrollo. En los equinos son muy pocos los casos de mellizos que logran llegar al término de la gestación y sobrevivir, generalmente en este tipo de gestaciones gemelares no se evidencia la presentación de anastomosis vascular, en las cuales las muertes son a causa de que en la superficie de empalme entre la placenta y el útero se genere una disminución del espacio en la región donde el corion de ambas placentas contacta, en la cual no existe vello coriónico causando menor aporte nutricional a ambos fetos. No obstante, son mínimos los reportes de estos casos debido a que estas gestaciones gemelares pueden causar abortos, o el nacimiento de un solo ejemplar donde el mellizo nace muerto o momificado (Gonzales del pino, 2010).

Porcinos

Los estudios en esta especie muestran la identificación de algunos casos de quimerismo en porcinos intersexuales compatibles con freemartinismo (Padula, 2005). En el documento de Reinartz et al, (2001) se indica que las especies pluríparas como el cerdo, en donde la placentación tiene una cercanía de embriones podría permitir la fusión de las cubiertas coriónicas y por ende el flujo de células indiferenciadas entre embriones vecinos.

Dado que la anastomosis vascular presente en los bovinos y ovinos es distinta que la observada en los cerdos, esto debido a que la vasculatura de la placenta es diferente y rara vez se encuentra la anastomosis de los vasos, dejando a la condición de freemartin en una

presentación más baja que la que hay en los bovinos. En la placentación en los cerdos los dos ápices de la vesícula coriónica no ingresan en formación de la placenta, el corion es delgado en estas zonas, estirada por la dilatación del alantoides en el interior, prácticamente carentes de vasos sanguíneos, permaneciendo durante todo el período de gestación delgados y necróticos, lo que podría acarrear que algunas de estas áreas se adhieran estrechamente o se invaginen con zonas de vesículas adyacentes (Hughes, 1927).

El caso registrado por Gómez (1974) de intersexualidad en porcinos realizado en una cerda preñada proveniente de un matadero permitió la identificación de 4 fetos, los cuales dos eran gemelos macho y hembra, encontrándose cada uno en su respectiva membrana amniótica, pero en una sola membrana corioalantoica exhibiendo la fusión de las cubiertas coriónicas, implicando un intercambio sanguíneo entre ambos fetos resultado de quimerismo XX, XY.

Cervidae

Aunque está descrita una baja presentación de freemartinismo en venados, wapití y renos la reproducción artificial y técnicas de sincronización creó un aumento en la frecuencia en la que se presenta el freemartin. En estas especies en particular el venado, a menudo conducen a gestaciones gemelares causando alteraciones reproductivas como hipoplasia gonadal, ausencia de tetillas e infertilidad (Haigh, 2007).

El manejo en la reproducción en venados en cautiverio está encaminado a ayudar y lograr el aumento de la prolificidad de esta especie a pesar de no encontrarse en su estado natural, en cautiverio es menor la reproducción, por ende, se trabaja la reproducción artificial que de manera secundaria lo que causa gestaciones gemelares, consecuentemente abortos y

partos distócicos. Aun cuando los gemelos puedan llegar a finalizar la gestación y supervivencia, éstas presentan un crecimiento y productividad menor que aquellas procedentes de gestaciones únicas (García et al, 2001).

Metodología

Se realiza una revisión literaria mediante una lectura analítica, haciendo uso de información enfocada al síndrome de Freemartinismo, sus efectos, teorías expuestas, herramientas diagnósticas y documentación básica acerca de la anatomía embrionaria y desarrollo normal de la especie bovina, toda esta información recolectada dará vía a la creación de un documento unificado que permite el conocimiento, manejo y diagnóstico de este síndrome.

Esta recopilación de publicaciones contiene un periodo cronológico desde el año 1914 con intervalos de tiempo hasta el 2019.

Bases de datos: NCBI, Google académico, artículos de revistas científicas, tesis, libros de embriología veterinaria, Microsoft Academic, Scielo.

Documentos de investigación: Se acopió información de gran variedad en tiempo, debido a que fueron relevantes para la documentación, teniendo en cuenta la historia establecida del tema teniendo en cuenta que los artículos de manera que se hallan con un orden cronológico y algunos con mínimas variaciones.

La recopilación es de publicaciones nacionales e internacionales en diferentes idiomas como inglés, portugués y español.

Palabras clave: Se tuvieron en cuenta distintas palabras en la búsqueda en distintos idiomas como son freemartin, bovinos, causal factors, diagnostic, cattle, hematopoietic, chimerism, leucoquimeras, vaca estéril.

La revisión se realizó de manera minuciosa permitiendo que, mediante las diferentes bases de datos, NCBI, Elsevier, Science Direct, Google Academic, Microsoft Academic, Scielo se hallaran más de 90 documentos que fueron relacionados al freemartin. No toda la información encontrada fue usada debido a su contenido teniendo en cuenta a lo que refiere el propósito del documento o simplemente no cuenta con aspectos relevantes, así mismo se analizó y se descartaron para tener una base de datos menos extensa con la cual se trabajó obteniéndose una información precisa acorde a los objetivos del trabajo.

Un total de 58 documentos fueron usados para la revisión por su precisión y calidad de contenido tratando de unificar al máximo todos los datos recolectados, aclarando los puntos de la investigación y poder resolver la pregunta planteada. Se desarrollan y concluyen cada uno de los objetivos de la revisión bibliográfica resultando en un documento completo.

Resultados y discusión

Factores que afectan el desarrollo embrionario de las gónadas y del tracto reproductor de las hembras bovinas nacidas de parto gemelar heterosexual.

Tasa de ovulación

Ginther et al, (1997) indica que la selección del folículo dominante, es el proceso que ocurre durante la onda ovulatoria, estableciendo la tasa de ovulación en el ganado y este proceso esta caracterizado por la desviación en la tasa de crecimiento entre el folículo dominante y los folículos subordinados de la onda, siendo así la desviación del diámetro (López et al, 2005), las ovulaciones múltiples se generan en una gran proporción (20 % vs 1 % en vaquillas), indicándose que los bovinos de alta producción lechera tienen una mayor probabilidad de presentar gestaciones gemelares, esta afirmación es hecha sin conocerse la causa específicamente, a causa de falta de estudios, aunque se supone que esto es causado a los altos niveles de la hormona FSH, que puede causar el aumento de ondas foliculares y consecuentemente una alta cantidad de folículos dominantes (Hernández Cerón, 2016).

Anastomosis placentaria.

La fusión que se presenta entre los vasos placentarios embrionarios de los gemelos, por anastomosis de las arterias y venas, pero más concretamente de las arterias, hace que exista un paso de sangre entre los dos gemelos durante la vida fetal. El fenómeno de esterilidad que se registra en la hembra podría estar ligado a esta anastomosis vascular placentaria, dando lugar al flujo sanguíneo en común (Lillie,1917). La inhibición del crecimiento de la gónada normal se puede dar aproximadamente a los 49 a 52 días de gestación, que es el tiempo aproximado donde se da la anastomosis vascular generando como

resultado presuntas freemartin, siempre y cuando la anastomosis vascular ocurra antes del desarrollo gonadal de la hembra (Jost et al, 1972).

Hormonas

La teoría hormonal en el Freemartinismo se basa, en que debido a la anastomosis vascular hay una circulación sanguínea compartida entre los embriones gemelos heterosexuales, generando una alteración en el desarrollo embrionario normal, condición que ha sido descrita en mamíferos, pero con énfasis en la especie bovina, que es en la que se presenta frecuentemente (Drago, 2014). La diferenciación sexual del embrión macho se relaciona en las alteraciones causadas en el desarrollo gonadal normal de la hembra, debido a que su diferenciación ocurre antes que la hembra, acompañado de la anastomosis vascular placentaria, causando una circulación de hormonas masculinas entre las cuales se encuentran testosterona y hormona antimulleriana (Lillie, 1917, Sequeira, 2013, Freeman, 2007).

Células hematopoyéticas

Adicionalmente a la circulación compartida durante la gestación gemelar heterosexual, también se reporta el paso de células hematopoyéticas dando origen al quimerismo (Pessa-Morikawa et al, 2004). Las células precursoras hematopoyéticas migran a la médula ósea y a otros órganos del cuerpo a través de la sangre, debido a la anastomosis entre los gemelos, dando como resultado la presencia de células masculinas y femeninas en la sangre (Long, 1990). Solo mediante el análisis cromosómico para el diagnóstico de Freemartinismo se puede evidenciar la condición quimérica (XX/XY) y medir la proporción de células con complemento cromosómico XY en hembras con este síndrome (Lopera et al, 2016).

Uno de los estudios realizados por Jost y colaboradores (1972) permitieron demostrar que las hembras freemartin no se presentan por exposición a andrógenos sintéticos esto mediante pruebas realizadas a varias vacas preñadas haciendo la aplicación de estos andrógenos y aunque el resultado del tratamiento condujo a la masculinización de los genitales externos en la descendencia femenina, no indujo la conformación de ovotestis, cómo si ocurre en las terneras freemartin (Saal, 1989).

La presentación de algunos casos reporta hembras freemartin procedentes de partos fetales únicos, haciendo que se presuma la muerte del gemelo macho durante la gestación o momificación del gemelo macho, lo cual se puede confirmar mediante el análisis cromosómico mostrando el quimerismo (Szczerbal et al, 2019).

Diagnóstico en bovinos

Examen clínico

En una ternera freemartin generalmente el examen clínico es la primera herramienta donde se inspecciona la conformación de la comisura vulvar es el primer paso (Ayala et al, 2000). El examen clínico ya en la porción interna se hace mediante palpación rectal y puede estar acompañado por un vaginoscopio que permite una mejor visualización, diferenciando la base de la longitud de la vagina y la presencia o ausencia de cérvix (Long, 1990).

La ultrasonografía consigue usarse en algunos casos en el ganado bovino en donde se indica una gestación gemelar o complicación que pueda ser visualizada, llevándose a cabo el método bidimensional de imágenes de ultrasonido en tiempo real (modo B), rectalmente,

usando una sonda de transductor múltiple, identificando los órganos reproductivos bovinos y la visualización fetal (Almeida & Resende, 2012).

Análisis Citogenético

El análisis cromosómico puede realizarse instantáneamente después de partos gemelares heterosexual haciendo una detección temprana de hembras freemartin (Zorrilla et al, 1963). Jiménez (2000) indico mediante su trabajo realizado en el laboratorio de la Universidad Nacional de Colombia sede Bogotá la estandarización del análisis cromosómico en bovinos para estudios en este laboratorio, para cada una de las técnicas de cultivo y bandedo cromosómico.

El análisis cromosómico en un freemartin revela un diagnóstico preciso realizado mediante el cultivo de linfocitos para detectar el quimerismo 60, XX/ 60, XY (Moncaleano et al, 2006).

Este análisis y su proceso se ha implementado en varias de las investigaciones de casos probables de hembras freemartin, en donde el proceso inicia haciendo la toma aséptica de una de una muestra de sangre entera, mediante punción en la vena yugular o caudal, esta sangre es incorporada en tubos los cuales contienen en su interior 0.1ml de heparina sódica, posterior a la toma se mantiene la muestra a una temperatura de 4 C°, las muestras son transportadas al laboratorio donde se llevan a un proceso de cultivo siguiendo la técnica establecida; consecutivamente de obtener las metafases se analizan en un microscopio óptico y para posteriormente ser fotografiadas (Corredor & Páez, 2009, Lopera et al, 2016, Moncaleano et al, 2006).

Las muestras sanguíneas enteras no son las únicas que determinan el quimerismo, también se puede hallar en células XY de órganos como lo son pulmón, medula ósea, riñón y tejidos conectivos del posible freemartin (Auli 1988, Moncaleano et al, 2006).

El método directo: a partir de cultivos celulares: cultivo de sangre completa por linfocitos T.

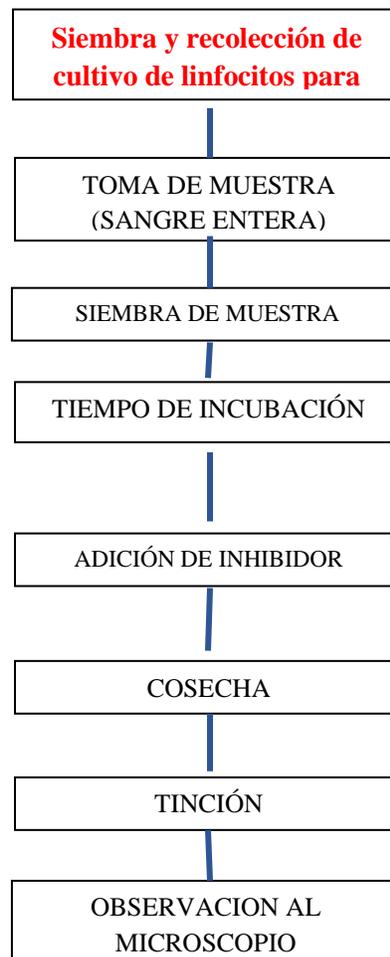


Ilustración 1. Flujograma de cultivo y siembra de linfocitos

Toma de muestra:

la toma de la muestra se debe realizar por Médico veterinario del vaso sanguíneo indicado(En bovinos: directa de la vena yugular), teniendo en cuenta la asepsia necesaria evitando contaminar la muestra. La concentración del anticoagulante usado más utilizado es la heparina sódica (Liquemine®). Lo ideal en el procedimiento es heparinizar el tubo, en el caso de bovinos se agrega 0,1 ml de Liquemine®, tomado con una jeringa de tuberculina.

Otros anticoagulantes como el EDTA o el citrato, no permiten una adecuada estimulación de los linfocitos T para la obtención de extendidos cromosómicos de buena calidad. Por lo tanto, no se deben utilizar para la obtención de extendidos cromosómicos en mamíferos. El estandar de la concentración de la heparina varia según cada especie debe evitarse altas concentraciones ya que pueden resultar citotóxicas y las bajas concentraciones pueden causar coagulación de la muestra y seran desechadas (Jiménez & Sánchez, 2017).

Siembra de la muestra:

Para asegurar el éxito de un cultivo celular in vitro, es necesario cumplir las normas de higiene que se deben aplicar a todo laboratorio de experimentación. El proceso de siembra del cultivo debe llevarse a cabo con materiales específicos para obtener resultados favorables estos materiales son:

1. Cabina de flujo laminar o cámara estéril.
2. Incubadora
3. Frascos estériles para cultivo de vidrio
4. Tapones para frascos estériles.
5. Pipetas de vidrio

6. Medio de cultivo M199 O RPMI 1640
7. Suero fetal
8. Fitohemaglutinina

(Ortega et al, 2018).

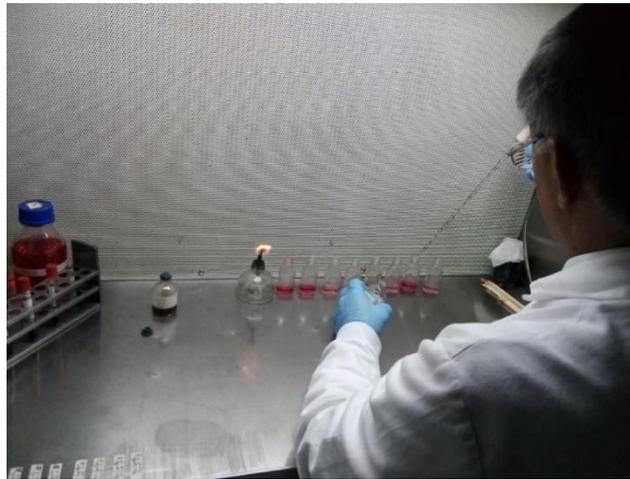


Ilustración 2 Siembra y preparación de cultivo.

Los protocolos de la siembra siempre inician con la preparación previa de cada uno de los frascos que se usaran para la preparación del cultivo, su primer paso es exponer al calor del mechero la boquilla de los frascos para obtener la esterilidad de los mismos, el siguiente paso marcar y agregar el medio de cultivo que se va usar, pueden usarse dos tipos de cultivos diferentes distribuyendo 2 frascos con un medio y los otros 2 con otro medio, generalmente se preparan los frascos según la cantidad de individuos (2 por cada individuo con los medios de cultivo 1-RPMI-1640, 2- M199M) (Jiménez & Sánchez, 2017).

En la siembra el medio de cultivo se encarga de proveer nutrientes esenciales balanceados cuantitativamente Se incluye toda la materia prima necesaria para la síntesis de macromoléculas celulares, sustrato para el metabolismo (energía), vitaminas y trazas de minerales cuya función primaria es catabólica, y una cantidad de iones inorgánicos con

función metabólica , asegurando el alimento celular (Mudry & Bressa, 2014). En el laboratorio de la universidad Nacional se implementan 2 tipos de medio de cultivo los cuales son RPMI-1640, M199, que previamente se les ha agregado antibiotico al 2% (contiene 5000 Unidades de penicilina y 5000 μg de estreptomycin) estos presentan una buena estimulacion y asepcia (Jiménez & Sánchez, 2017).

Continuando con el proceso se añade, 1 ml de suero bovino el cual se agrega a los medios basales definidos para estimular la multiplicación e interactúa con cada una de las otras variables del sistema (Mudry & Bressa, 2014).Se agrega 0.5ml fitohemaglutinina mitógeno, sustancia estimuladora de la división celular y por último agregar la cantidad de sangre según los requerimientos por especie.

Incubacion:



Ilustración 3.Incubadora estándar de microbiología, en inicio de siembra.

Se procede a llevar a incubadora por un tiempo de 68 horas a 38.5 °C ,la temperatura y el tiempo puede variar según la especie que se este trabajando. Faltando 1 hora para que se cumpla el tiempo de incubación se debe añadir 0.2 ml de colchicina (concentracion 0.016%), la colchicina debe ser agregada dentro de la incubadora para evitar el cambio de temperatura (Jiménez & Sánchez, 2017).



Ilustracion 3. Momento de la aplicación de la colchicina en la hora 67 de incubacion.

La colchicina o Colcemid son sustancias toxicas que inhibe el ciclo celular de celulas proliferativas en la fase de mitosis, este agente antimitotico permitio mejorarm y aumentar el numero de celulas en metafase (Lopez & Marquez, 2002).

Cosecha:



Ilustración 4. Aplicación de solución hipotónica .

Posterior a la incubacion se procede a pasar a tubos de ensayo cada preparacion, para llevar a cabo la centrifugacion a 1200 rpm durante 10 minutos permitiendo la separacion de la sangre y lograr obtener el boton celular. Se procede a descartar el sobrenadante con una pipeta Pasteur, el paso a seguir es mediante golpes suaves lograr resuspender el boton celular y adicionar 8ml de solucion hipotonica de cloruro de potasio (0.075M) esta preparacion debe estar precalentda a 37.5° C por 15 a 30 minutos (Jiménez & Sánchez, 2017).



Ilustración 5 .Descarte de sobrenadante y aplicación de Carnoy.



Ilustración 6 . Recambio de fijador Carnoy y resuspension de botón celular.

Continuando con el proceso seguidamente de terminar la solución hipotónica, debe realizarse la fijación con Carnoy 3:1 que contiene tres partes de alcohol metílico por una parte de ácido acético, se lleva a centrifugar nuevamente a 1200 rpm por 10 minutos y se descarta el sobrenadante, se resuspenden las células y se añaden 8 ml de Carnoy refrigerando la muestra en la nevera por 30 min antes de proceder a realizar los procesos de limpieza, este proceso se debe realizar de manera que se cambie el fijador Carnoy hasta que el botón quede limpio, sin sedimentos o detritos de glóbulos rojos (Ortega et al, 2018; Jiménez & Sánchez, 2017).



Ilustración 7. Últimas aplicaciones de Carnoy y limpieza



Ilustraciones 8 y 9. Retiro de sobrenadante final y resuspensión celular para goteo.

En el ultimo lavado al momento de retirar el sobrenadante debe dejarse una porcion de este aproximadamente 0,5ml del fijador para lograr la resuspension del boton celular. Teniendo este resultado se procede a relizar la tecnica de goteo (3 o 4 gotas) sobre las laminas tratando de lograr que sea centrada a una distancia permitida por el brazo sobre la lamina, las laminas deben estar previamente enfriadas, la distancia del goteo permite obtener un extendido homogeneo (Jiménez & Sánchez, 2017).



Ilustración 10 y 11. Goteo y flameado de láminas con preparados .

Inmediatamente de gotear las láminas se debe realizar un flameado suave de cada lamina y se dejan secar las láminas a temperatura ambiente.

Tinción:

Después de que las láminas se encuentren secas y marcadas se puede teñir, empleando tinción de Giemsa, se deben ubicar las láminas en una superficie la cual permita que la preparación empape las láminas, para cada lamina se hace uso de 4.6ml de agua destilada, 0,2 ml de Buffer Giemsa y 0,2 ml de colorante recién filtrado esta preparación se deja por 15

min y seguido debe realizarse un lavado con agua destilada. Después de la coloración se dejan secar al aire para proceder a su observación (Jiménez & Sánchez, 2017).



Ilustración 12. Secado y marcado de láminas



Ilustración 13. Aplicación de tinción.

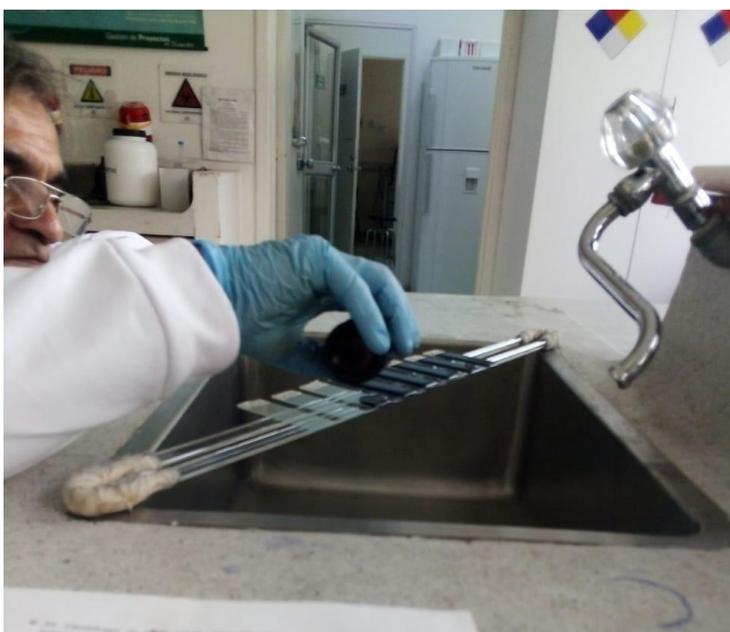


Ilustración 14. Tinción y tiempo de exposición



Ilustración 15. Tiempo de secado posterior a la tinción

Observación microscópica:

el método de observación puede variar según la coloración usada, en el caso del laboratorio, la técnica más usada es la tinción homogénea con Giemsa por lo cual solo se requiere del microscopio compuesto normal. La técnica de tinción de Giemsa permite la evaluación del cultivo de linfocitos donde se realiza un conteo de manera minuciosa de toda la lámina, se realiza un barrido de punta a punta de abajo arriba de forma vertical, contando la cantidad de células transformadas, células no transformadas y metafases (Lopez & Marquez, 2002; Jiménez & Sánchez, 2017; Mudry & Bressa, 2014).

En este paso se realiza el análisis del Índice Mitótico (IM), la Eficiencia Mitótica, en relación con los resultados de los preparados, la cantidad de metafases permite la identificación de cromosomas esto se refleja la buena aplicación de la técnica de siembra y cosecha.

$$IM = \frac{\# \text{ células metafase}}{\# \text{ células totales}} \times 100$$

$$EM = \frac{\# \text{ Células en metafase} + \# \text{ de células transformadas}}{\# \text{ Células totales}} \times 100$$

Los micro preparados se examinan por medio de un microscopio de luz brillante bajo un aumento de 10X y 100x, logrando la identificación de metafases, número cromosómico, estructura y morfología cromosómica permitiendo la identificación de alteraciones estructurales o numéricas de cada individuo (Corredor & Jiménez, 2005).

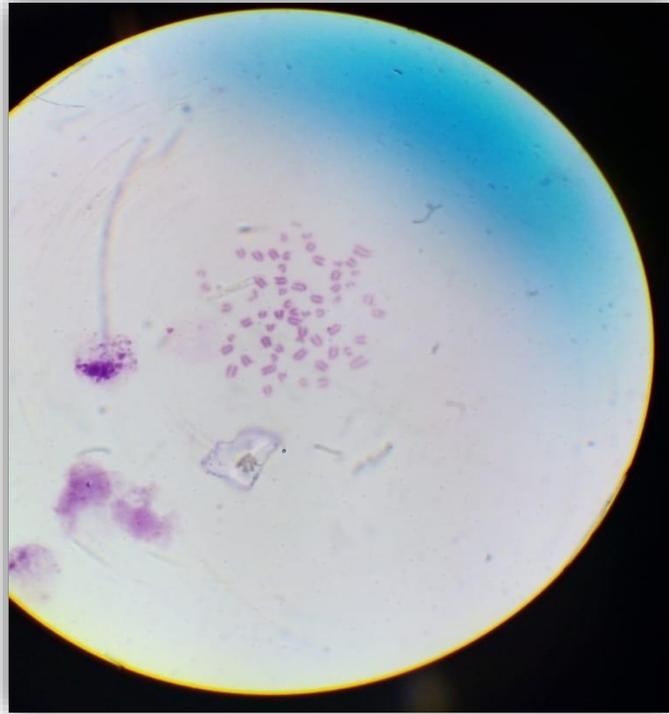


Ilustración 16. Metafase #1. de una hembra bovina con $2n=60$ (58 acrocéntricos/XY).

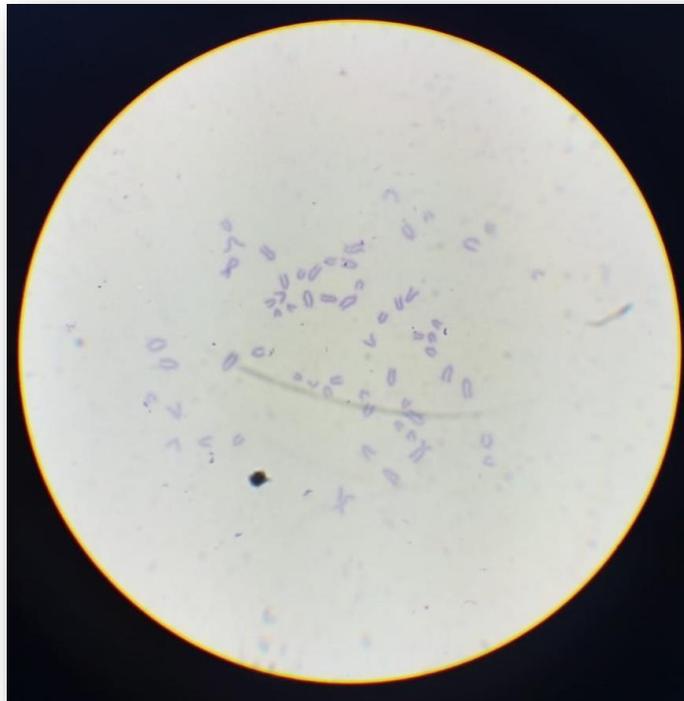


Ilustración 17. Metafase número #2. Con $2n=60$ (58 acrocéntricos/XX)

Posterior a la identificación de las células en metafase y realizar el cálculo del IM y ME , se procede a seleccionar las metafases que se encuentren completas y con la identificación de los cromosomas XX/XY, estas serán ubicadas en la lámina blanca para su posterior fotografía .

De esta manera se realiza el diagnostico de freemartin bajo la tecnica de cultivo celular citogenetico con tincion de Giemsa, siendo el proceso mas usado debido a su economia y rapidez.

Método molecular

Mediante el método molecular PCR reacción en cadena polimerasa genera la amplificación de secuencias nucleotídicas específicas presentes en el cromosoma Y permitiendo evidenciar la presencia del quimerismo en muestras de sangre de hembras nacidas con un gemelo macho, el porcentaje de sensibilidad de la prueba de 0.05% permite la detección de células quiméricas (Lopera et al, 2016).

Los estudios en el que se trabaja el gen SRY están indicados debido a que este es uno de los precursores en machos para iniciar procesos de diferenciación testicular y la inhibición de las vías de diferenciación sexual femenina. Este gen presente en la hembra puede generar desperfecto en la morfogénesis gonadal normal y por consiguiente un desarrollo de estructuras foliculares dando lugar a la ovotestis común en el Freemartinismo (Payan-Carreira et al, 2008). El gen SRY no es el único implementado para estudios de freemartin, igualmente puede encontrarse acompañado del uso del gen de la caseína K, que ha permitido su aplicación en la determinación del sexo y genotipificación de este gen en embriones bovinos (López et al, 2005, Cervantes et al,2007).

Métodos Hormonales

La medición hormonal en aproximación diagnóstica en los casos de hembras de freemartin, se ha hecho solo de manera experimental en un intento de que tenga utilidad, lo cual no ha sido exitoso debido a que solo se ha logrado corroborar la función endocrina del tejido gonadal como predicción de fertilidad, calculando los niveles de FSH hormona folículo estimulante, estradiol (E2) y estrógenos, adicionalmente los niveles elevados de testosterona tratando de establecer presencia de hormonas masculina , resultando en que esta prueba hormonal carece de especificidad (Padula, 2005).

Conclusiones

Los factores relacionados en el desarrollo embrionario de las gónadas y del tracto reproductor de las hembras bovinas nacidas de parto gemelar heterosexual, son la anastomosis vascular resultando en quimeras XX, XY, acompañado del cruce de hormonas masculinas generando las alteraciones en la diferenciación sexual normal de la gemela hembra.

El síndrome de freemartin repercute en grandes pérdidas en la producción y economía de la explotación ganadera, en donde el establecer las causas del síndrome de freemartin es fundamental, permitiendo identificar de manera adecuada cuál debe ser la direccionalidad por seguir en el momento del uso de métodos diagnósticos generando un dictamen preciso en este síndrome.

Las herramientas diagnósticas en el freemartin tienen una amplia gama de técnicas, que dan opciones de selección de acuerdo con su agilidad, especificidad e incluso costos, cada una de estas son usadas conforme al criterio veterinario y a los conocimientos de cada método a usar.

El método adecuado para el diagnóstico en el síndrome de freemartin por su agilidad, accesibilidad y economía basándonos en una precisión sería el análisis citogenético teniendo en cuenta el previo examen clínico realizado por el profesional veterinario, esto permite que sea exacto evitando diagnosis errada, accediendo así a dar vía libre al manejo que se requiere tomar con el animal.

Referencias bibliográficas

- Almeida, J. de, & Resende, O. A. (2012). Freemartinismo em bovinos : revisão de literatura
Freemartins in cattle : a review. *Revista Portuguesa De Ciências Veterinárias*, 107,
133–141. https://www.academia.edu/12561728/Revisao_freemartin_port_II.
- Auad, J., Cerutti, J., Cooper, L., Lozano, N., Deltrozzo, J., Trezza, C., Ponzio, M., &
Lozano, A. (2019). Estructura de la placenta y su impacto en la transferencia de la
inmunidad materno-fetal. Revisión en mamíferos domésticos. Método. Investigación
Aplicada a Las Ciencias Biológicas, 4(2). [https://doi.org/10.22529/me.2019.4\(2\)06](https://doi.org/10.22529/me.2019.4(2)06).
- Auli. (1988). Chimerism in a bull calf. *Journal of Sex Research*, 25(3), 426–432.
<https://doi.org/10.1111/j.1601-5223.1974.tb01188.x>
- Ayala, M. Á., Villagómez, D. A. F., & Benítez, S. L. S. (2000). Estudio citogenético y
anatomopatológico del síndrome freemartin en bovinos (*Bos Taurus*). *Vet. Méx*, 31(4),
315–322. <https://doi.org/10.22201/fmvz.24486760e.2000.4.25>.
- Bouters, R., Vandeplassche, M., 1972. Twin gestation in the mare: the incidence of
placental anastomoses and their influence on reproductive performance of
heterosexual equine twins. *J. Reprod. Fertil. (Abstr.)* 29, 149.
- Brace, M. D., Peters, O., Menzies, P., King, W. A., & Nino-Soto, M. I. (2008). Sex
chromosome chimerism and the freemartin syndrome in Rideau Arcott sheep.
Cytogenetic and Genome Research, 120(1–2), 132–139.
<https://doi.org/10.1159/000118752>.
- Brennan, J., & Capel, B. (2004). One tissue, two fates: Molecular genetic events that
underlie testis versus ovary development. *Nature Reviews Genetics*, 5(7), 509–521.
<https://doi.org/10.1038/nrg1381>.

- Cervantes, P., Luna, M., Hernández, A., Pérez-Gil, F., Ponce, P., & Uffo, O. (2007). Genetic Polymorphism in the Kappa-Casein Locus in Cows of Different Breeds and Crossbreeds in the Mexican Tropic. *Revista de Salud Animal*, 29(2), 78–84.
http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0253-570X2007000200002
- Corredor Camargo, E. S., & Jiménez Robayo, L.M. (2005). Efecto de las anomalías cromosómicas sobre la fertilidad en bovinos. *Orinoquia*, 9(1),56- 63.
<https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=896/89690106>.
- Corredor, E., & Páez, E. M. (2009). Freemartinismo o quimerismo XX/XY en bovinos: Revisión. *Revista de Investigación Agraria y Ambiental*, 1(1), 7.
<https://doi.org/10.22490/21456453.894>.
- Drago, M. (2014). Frank Rattray Lillie’s Study of Freemartins (1914-1920). *the Embryo Project Encyclopedia* (pp. 1–5). Arizona State University. School of Life Sciences. Center for Biology and Society. [fecha de Consulta 15 de junio de 2020]. ISSN: 1940-5030 <http://embryo.asu.edu/handle/10776/7644>.
- Eldridge F.E. 1985. Cytogenetics in livestock. Westport AVI Publishing company.
- Eldridge, F. E., & Blazak, W. F. (1977). Chromosomal Analysis of Fertile Female Heterosexual Twins in Cattle. *Journal of Dairy Science*, 60(3), 458–463.
[https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(77\)83888-5](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(77)83888-5).
- Esteves, A., Båge, R., & Payan-Carreira, R. (2012). Freemartinism in cattle. *Ruminants: Anatomy, Behavior and Diseases*, 100–112.
https://www.researchgate.net/publication/256293263_Freemartinism_in_Cattle
- Ford, J. J. O. E., & Klindt, J. (1989). Sexual Differentiation and the Growth Process. In: Champion D.R., Hausman G.J., Martin R.J. (eds) *Animal Growth Regulation* (pp. 317–336). Springer, Boston, MA. https://doi.org/10.1007/978-1-4684-8872-2_14.

- Freeman, G. (2007). Explaining the Freemartin: Tandler and Keller vs. Lillie and the Question of Priority. *Journal of Experimental Zoology, Evol.* 2007;308(2):105-112. doi:10.1002/jez.b.21151.
- García, A. Landete-Castillejos, T., Gómez, J. A., Albñana, B., Garde, J. J., & Gallego, L. (2001). Aumento de la prolificidad en ciervo ibérico (*Cervus elaphus hispanicus*) mediante tratamientos hormonales. ITEA. Producción, Albacete, España. http://www.aida-itea.org/aida-itea/files/jornadas/2001/comunicaciones/2001_Rep_13.pdf
- Ginther, O. J., D. R. Bergfelt, M. A. Beg, and K. Kot. 2001. Follicle selection in cattle: Role of luteinizing hormone. *Biol. Reprod.* 64:197–205.
- Gomez, L. J. (1974). Notas científicas: Intersexualidad en porcinos II. Un caso de Freemartin. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Universidad Nacional de Medellin, XXIX*, 47–54. <https://revistas.unal.edu.co/index.php/refame/article/view/30253>.
- González del Pino, Francisco Javier (2010). Aborto en una yegua debido a mellizos, ¿porque conviene reducirlos manualmente?: reporte de un caso. *REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria*, 11(12),1-12. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=636/63616936013>.
- Haigh, J. C. (2007). Other Reproductive Diseases of Deer and Bison. *Current Therapy in Large Animal Theriogenology* (pp. 1030–1032). Elsevier. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780721693231501446?via%3Dihub>.
- Hernández Cerón, J. (2016). Fisiología Clínica de la Reproducción de Bovinos Lecheros. *Fisiología Clínica de la Reproducción de Bovinos Lecheros* (Primera). Facultad de

Medicina Veterinaria y Zootecnia.

http://www.fmvz.unam.mx/fmvz/publicaciones/archivos/Fisiologia_Clinica.pdf

Hughes, W. (1927). Sex-Intergrades in fetal pigs. *The Biological Bulletin*, 52(2), 121–136.

<https://doi.org/10.2307/1537053>.

Jiménez L.M. 2000. La citogenética en medicina veterinaria. Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá, FMVZ, Laboratorio de citogenética.

Jiménez, L., & Sánchez, C. (2017). guía de prácticas de laboratorio asignatura citogenética (No. 2017111). Unidad de Citogenética y de Genotipificación de Animales Domésticos UGA.

Jost, A. (1985). Sexual Organogenesis. In *Reproduction* (vol 7, Issue 5, pp. 3–19). © Plenum Press. https://doi.org/10.1007/978-1-4684-4832-0_1.

Jost, A., Vigier, B., & Prepin, J. (1972). Freemartins in cattle: The first steps of sexual organogenesis. *Reproduction*, 29(3), 349–379. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0290349>

Lenis, Y., & Rodríguez-osorio, N. (2014). Conceptos básicos de desarrollo embrionario en la vaca. Reproducción de la vaca manual didáctico sobre la reproducción, gestación, lactancia y bienestar de la hembra bovina.

https://www.researchgate.net/publication/263389285_Conceptos_basicos_de_desarrollo_embionario_en_la_vaca.

Lillie, F. R. (1916). The theory of the Freemartin. *Japanese Circulation Journal*, 43, 611. <https://doi.org/doi:10.1126/science.43.1113.611>.

Lillie, F. R. (1917). Sex-Determination and Sex-Differentiation in Mammals. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 3(7), 464–470. <https://doi.org/10.1073/pnas.3.7.464>

Long, S. E. (1990). Development and diagnosis of freemartinism in cattle. *In Practice*,

12(5), 208–210. <https://doi.org/10.1136/inpract.12.5.208>.

Lopera, X. C., Vásquez, J. F., López, J. B., & Correa, L. M. (2016). Diagnóstico molecular, citogenético y anatómico histopatológico del Síndrome Freemartin en hembras bovinas en Colombia. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 18(2), 82.

<https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v18n2.61524>.

Lopez, H., Caraviello, D. Z., Satter, L. D., Fricke, P. M., & Wiltbank, M. C. (2005). Relationship Between Level of Milk Production and Multiple Ovulations in Lactating Dairy Cows. *Journal of Dairy Science*, 88(8), 2783–2793.

[https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(05\)72958-1](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(05)72958-1).

Lopez, J., & Marquez, M. (2002). Modelo experimental para el estudio cromosómico en células de mamíferos [Universidad Nacional de Colombia] UNAL sede Medellín.

<http://www.bdigital.unal.edu.co/12239/1/juanbautistalopezortiz.2014.pdf>

Marcum, J. B., Lasley, J. F., & Day, B. N. (1972). Variability of sex-chromosome chimerism in cattle from heterosexual multiple births. *Cytogenetic and Genome Research*, 11(5), 388–399. <https://doi.org/10.1159/000130205>.

Marí, P., & Casellas, J. (2018). Freemartinism in replacement ewe-lambs of the Ripollesa sheep breed. *Journal of Veterinary Science*, 19(6), 858.

<https://doi.org/10.4142/jvs.2018.19.6.858>.

McGowan, M., Holland, M. K., & Boe-Hansen, G. (2018). Review: Ontology and endocrinology of the reproductive system of bulls from fetus to maturity. *Animal*, 12(s1), s19–s26. <https://doi.org/10.1017/S1751731118000460>.

Moncaleano, J.S., & Jiménez, L.M., & Sánchez, C.A. (2006). Quimerismo leucocitario en hembras bovinas nacidas de parto gemelar heterosexual. *Orinoquia*, 10(2), 37-44.

<https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=896/89610205>.

- Mudry, M., & Bressa, M. (2014). Citogenética Guía De Trabajos Prácticos. In Departamento de Ecología, Genética y Evolución Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. <http://www.ege.fcen.uba.ar/wp-content/uploads/2014/05/Guia-de-CITOGENETICA-2014.pdf>
- Ortega, M. Torres, J. y Osorio, J. (2018). Fundamentos de citogenética humana y animal (UNAD). <https://doi.org/https://doi.org/10.22490/9789586516518>
- Padula, A. M. (2005). The freemartin syndrome: An update. *Animal Reproduction Science*, 87(1–2), 93–109. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2004.09.008>.
- Parkinson, T.J., Smith, K.C., Long, S.E., Douthwaite, J.A., Mann, G.E., Knight, P.G., 2001. Inter-relationships among gonadotrophins, reproductive steroids and inhibin in freemartin ewes. *Reproduction* 122, 397–409.
- Payan-Carreira, R., Pires, M. A., Quaresma, M., Chaves, R., Adegá, F., Guedes Pinto, H., Colaço, B., & Villar, V. (2008). A complex intersex condition in a Holstein calf. *Animal Reproduction Science*, 103(1–2), 154–163. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2007.04.013>.
- Pessa-Morikawa, T., Niku, M., & Iivanainen, A. (2004). Persistent differences in the level of chimerism in B versus T cells of freemartin cattle. *Developmental & Comparative Immunology*, 28(1), 77–87. [https://doi.org/10.1016/S0145-305X\(03\)00104-6](https://doi.org/10.1016/S0145-305X(03)00104-6).
- Reinartz, M., Márquez, M. E., Ramírez, L. A., & López, J. B. (2001). Relación entre quimerismo XX/XY y el fenotipo pseudohermafrodita masculino en porcinos. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, 54(1 y 2), 1159–1167. <https://revistas.unal.edu.co/index.php/refame/article/viewFile/24204/24829>
- Rey, R. (2001). Diferenciación sexual embrio-fetal: de las moléculas a la anatomía. *Revista Chilena de Anatomía*, 19(1).

https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0716-98682001000100012&lng=es.

Roa, I., Smok, S. C., & Prieto, G. R. (2012). Placenta: Anatomía e histología comparada. *International Journal of Morphology*, 30(4), 1490–1496.

<https://doi.org/10.4067/S0717-95022012000400036>.

Roberto, M., & Salinas, P. (2017). fundamentos fisiologia.pdf (2017 RIL editores (ed.)).

Ediciones Universidad Santo Tomás.

https://www.academia.edu/42069596/Fundamentos_de_Fisiología_y_Endocrinología_Reproductiva_en_Animales_Domésticos.

Ross, D. G. F., Bowles, J., Hope, M., Lehnert, S., & Koopman, P. (2009). Profiles of gonadal gene expression in the developing bovine embryo. *Sexual Development*, 3(5), 273–283.

Saal, F. S. vom. (1989). Sexual Differentiation in Litter-Bearing Mammals: Influence of Sex of Adjacent Fetuses in Utero. *Journal of Animal Science*, 67(7), 1824.

[doi:10.2527/jas1989.6771824x](https://doi.org/10.2527/jas1989.6771824x)

Sequeira, T. (2013). Compendio Sobre Reproducción Animal (Universidad). Universidad Nacional Agraria. <https://cenida.una.edu.ni/textos/nl53t683c.pdf>

Smith, K.C., Parkinson, T.J., Pearson, G.R., Sylvester, L., Long, S.E., 2003.

Morphological, histological and histochemical studies of the gonads of ovine freemartins. *Vet. Rec.* 152, 164–169.

Swett, W. W., Matthews, C. A., & Graves, R. R. (1940). Early recognition of the freemartin condition in heifers twinborn with bulls. *Journal of Agricultural Research*, 61 N°8.

<https://naldc.nal.usda.gov/download/IND43969521/PDF>.

Szatkowska, I., & Świtoński, M. (1996). Evidence on hereditary occurrence of placental

anastomoses in heterosexual twins in sheep. *Hereditas*, 124(2), 107–110.

<https://doi.org/10.1111/j.1601-5223.1996.t01-1-00107.x>

Szczerbal, I., Nowacka-Woszek, J., Albarella, S., & Switonski, M. (2019). Technical note: Droplet digital PCR as a new molecular method for a simple and reliable diagnosis of freemartinism in cattle. *Journal of Dairy Science*, 102 N° 11.

<https://doi.org/10.3168/jds.2019-17021>.

Tandler, J., & Keller, K. (1911). The chorion in differently sexed twin pregnancy of the cow and the morphology of the female animals which result. *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift*, 19, 148.

Winters, L. M., Green, W. W., & Comstock, R. E. (1942). *Prenatal Development of the Bovine*.

https://conservancy.umn.edu/bitstream/handle/11299/204085/mn1000_agexpstn_tb_151.pdf?sequence=1%0A.

Young, A. S., & Kirkpatrick, B. W. (2016). Frequency of leukochimerism in Holstein and Jersey twinsets1,2. *Journal of Animal Science*, 94(11), 4507–4515.

doi:10.2527/jas.2016-0623.

Zorrilla, J. C., Cázares, J. M. L., & Cuevas, F. R. (1972). Comparación de técnicas citológicas para el diagnóstico de freemartinismo. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 21, 12–16. <https://academic.oup.com/jas/article-abstract/94/11/4507/4702762>.