

NOTAS CIENTIFICAS

INTERSEXUALIDAD EN PORCINOS: II. UN CASO DE FREE-MARTIN

Por:

Luis Jair Gómez G.*

RESUMEN

En una cerda preñada de matadero, se encontró un caso de anastomosis vascular entre dos fetos, macho y hembra de 72 días de gestación. Las anastomosis estaban presentes en la mayoría de los vasos placentarios. Ambos fetos estaban dentro de una sola membrana carioalantoidea, pero cada uno en su respectiva vesícula amniótica. Se hizo análisis de cromatina sexual del epitelio lingual por el método de fucsina fenicada y se comprobó la presencia de chimerismo en ambos fetos. En consecuencia es éste un caso de freemartinismo en porcinos.

SUMMARY

A pregnant sow, at the slaughter house, showed a vascular anastomoses, between two foetus, male and female, which had 72 days of gestation. Theses anastomoses were present in most of the placental vessels. Both foetus were into a chorioallantoic membrane, but each one had its amniotic vesicule. A tongue epithelial smear was made and stained by the method of basic fuchsin in orden to look for sex chromatine. Chimerism in both foetus was found thus indicating a case of swine freemartin.

* Profesor Asociado Facultad de Ciencias Agrícolas, Universidad Nacional - Medellín

INTRODUCCION

La intersexualidad ha sido un tema ampliamente discutido, pero que sin embargo presenta algunas lagunas en cuanto a interpretación e integración orgánica de los distintos elementos que participan en la determinación del sexo. En animales ha sido objeto de especial atención, a partir de los trabajos de Lillie (1916, 1917) y de Keller y Tandler (1916). Estos autores fundamentan su teoría del Freemartin en una anastomosis vascular de gemelos dicigóticos, macho y hembra, por la cual ocurre una trans-fusión, en un estado precoz de desarrollo, de andrógenos producidos por las gónadas masculinas, que con base en estudios histológicos se ha probado, son endocrinológicamente activos mucho antes que el ovario. (Jost, 1970). A partir de esta teoría se ha creído por mucho tiempo que las hormonas son los factores de mayor peso en la determinación del sexo. En esencia se ha admitido que la diferenciación de las estructuras genitales en el embrión está controlada por una hormona u hormonas producidas por las gónadas embrionarias. Aunque se propusieron después de Lillie, algunas variantes, su esencia seguía siendo igual, hasta que Jost (1950)) empezó a cuestionarla con base en resultados experimentales en conejos y en 1970 propuso una nueva hipótesis de trabajo que ha cambiado en gran medida el antiguo concepto hormonal y ha involucrado la citología genética misma. Dicha hipótesis la expresa el investigador de la siguiente manera: "...el testículo fetal es el diferenciador corporal sexual. Imprime masculinidad en un organismo que de otra manera sería femenino. La presencia de ovarios en la hembra no es de significado en el establecimiento de las estructuras corporales femeninas"*. Después de una serie de experimentos el mismo Jost y con apoyo en trabajos de Picon (1969) agrega que: "la testosterona tiene solamente el efecto masculinizante pero no inhibe los conductos de Müller. Esto sugiere que el testículo fetal produce tanto un inhibidor de los conductos de Müller como una hormona masculinizante"*°. Esta teoría de Jost, ha recibido el respaldo experimental del trabajo de Elger, *et al.*, (1970) mediante la utilización del acetato de ciproterona, (CPA) un fuerte antiandrógeno, que al ser inyectado a madres gestantes produce como efecto, la falta completa de conductos tanto de Müller como de Wölff, perdiendo así las gónadas su conexión canular con el tracto urinario, en pre-

* ...The foetal testis is the body sex differentiator. It impresses masculinity on an organism which otherwise becomes feminine body structures". Jost (1970). The presence of ovaries in females is of no significance in the establishment of feminine.

** "...testosterone has only the masculinizing effect but it does not inhibit the Müllerian ducts. This may suggest that the foetal testis produces both a Müllerian inhibitor and a masculinizing hormone". (Jost 1970).



Fig. N° 1. Anastomosis vasculares entre un feto macho y un feto hembra en porcinos.

(Foto R. Vélez)

Fig. N° 2. Células del epitelio bucal de feto macho, cromatino sexual positivas.

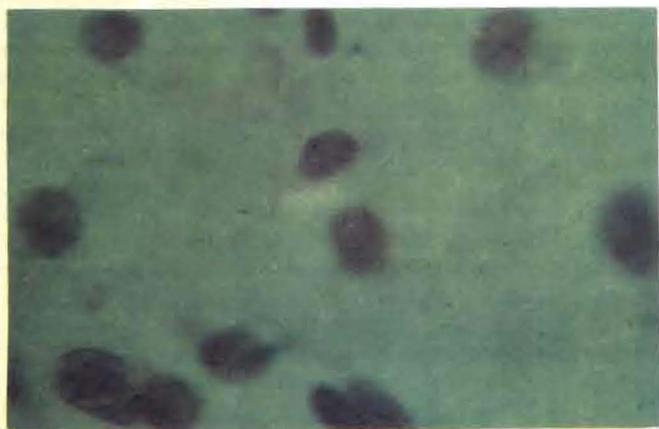
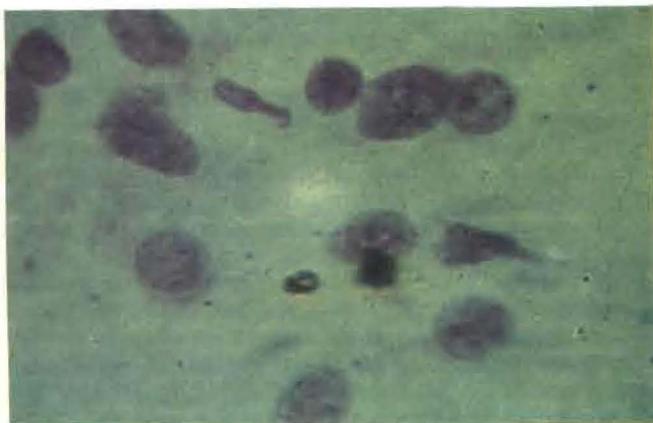


Fig. N° 3. Células del epitelio bucal de feto hembra, cromatino sexual negativas y positivas.

sencia de testículos esencialmente normales. Por lo demás, no pudieron observar dichos investigadores ningún efecto, de este antiandrógeno, en la diferenciación gonadal, ni en la regresión de los conductos de Müller, pero sí en los genitales externos y en los conductos de Wölff, reconocidos como estructuras efectoras de andrógenos, si se tiene en cuenta que mediante la aplicación de éstos es posible lograr modificaciones sustanciales de los mismos.

Es pues ya de gran fuerza científica, la proposición de que el sexo básico en vertebrados es el homogamético, esto es la hembra (XX). Tal como lo expresa Beatty (1968) "... un mamífero es esencialmente hembra a menos que intervengan factores especiales". En efecto, cuando se analiza con detenimiento la lista de factores que afectan el sexo, resalta el hecho de que la mayoría son masculinizantes.

Por lo demás en la década pasada empezó a tomar amplia aceptación el concepto de que no existen pruebas suficientes que señalen al cromosoma X como parte específica en la determinación del sexo de la gónada por lo menos en mamíferos y que además, en general, el cromosoma Y es el determinante de la masculinidad, mientras los autosomas y los cromosomas X son los determinantes de feminidad. En una revisión sobre el tema de la función del cromosoma Y en el hombre, los animales y las plantas, Dronamraju (1965) acopió un buen número de reportes que dan bases serias a dicha conceptualización y ya anteriormente Miller (1963) había llegado a la conclusión de que los factores genéticos son importantes en la etiología de muchos tipos de diferenciación anormal a través de sus efectos en el metabolismo de los esteroides. Fehheimer (1968) ha indicado que hay un buen cuerpo de evidencias que señalan que el cromosoma Y de muchos mamíferos no contiene muchos genes distintos a aquellos que influyen en la diferenciación testicular; así, Short (1972) anota que el único gene no sexual de asiento en el cromosoma Y es el que controla la presencia de pelos en el pabellón de la oreja en humanos. Sin embargo, Short (1972) hace énfasis en la afirmación de que ambos cromosomas X permanecen activos en las células germinales de la hembra y que una vez que se restablece el balance genético del embrión en fases tempranas de desarrollo, haciendo que sólo un cromosoma X permanezca funcional, se alcanza un estado apropiado para la diferenciación sexual, función ésta que en buena parte es delegada en las hormonas. Este fenómeno de delegación sexual en hormonas es típico de mamíferos y su más clara demostración es el efecto de los andrógenos sobre la no ciclicidad en la liberación de hormonas hipotalámicas en machos mamíferos. Es de anotarse, sin embargo, que el efecto de hormonas exógenas es mayor en especies inferiores que en especies superiores, así Yamamoto (1958 y 1959) pudo deducir inversión funcional completa del sexo en un pez de agua dulce, el medaka (*Oryzias latipes*) en machos y hembras genotípicos, ésta fue exitosa por dos generaciones consecutivas, Mikamo y Witshi (1963) lograron un efecto similar, pero valiéndose de implantes testiculares, en hembras del sapo *Xe-*

* "... a mammal is essentially female unless special factors intervene". (Beatty, 1968).

nopus laevis y sin embargo, en otros anfibios y en vertebrados más superiores en la escala zoológica, no ha sido posible obtener un efecto similar, aunque se ha logrado provocar inversión de las células germinales, genéticamente óvulos a espermatozoides, en ratones (Turner y Asakawa, 1964). Estas dos últimas pruebas experimentales dan gran soporte científico a la teoría de las sustancias inductoras propuesta por Jost (1970), y que ya había sido sugerida hace varias décadas por Witschi (1932).

El presente trabajo constituye la primera descripción en la literatura científica mundial, hasta donde el autor tiene conocimiento, de un caso de anastomosis placentaria en dos gemelos dicigóticos, macho y hembra, en una cerda de matadero, en los cuales se hizo análisis de cromatina sexual del epitelio lingual.

DESCRIPCION DEL CASO

En un estudio sobre aspectos reproductivos en cerdos de matadero, se encontró una cerda preñada que albergaba 4 fetos en el cuerno derecho y 5 en el izquierdo. Los fetos segundo y tercero del lado izquierdo, de la bifurcación hacia el extremo anterior del cuerno, estaban incluidos en una sola membrana corioalantoidea, pero en diferentes vesículas amnióticas. Se hizo un examen visual directo detallado de la orientación y dirección de los vasos sanguíneos placentarios, del sexo fenotípico de los fetos, tamaño (longitud corona-anca) y edad aproximada de acuerdo al método de Ullrey y colaboradores (1965). Posteriormente se hicieron raspados del epitelio lingual de ambos fetos y se tiñeron por el método de fucsina básica, para recuento posterior de células cromatinosexual positivas, para cada feto.

El examen macroscópico revela un caso de gemelos dicigóticos, macho y hembra, con una edad fetal aproximada de 72 días de acuerdo a la fórmula de Ullrey *et al.*, (1965).

Ambos fetos estaban incluidos cada uno en su respectiva membrana amniótica, pero en una membrana corioalantoica única. Fenotípicamente el uno era macho y el otro hembra.

Al observar cuidadosamente la formación y ramificación de los vasos sanguíneos placentarios, se nota fácilmente gran cantidad de anastomosis en vasos de distinto tamaño y posición, lo que implica un amplio intercambio sanguíneo entre ambos fetos (Ver foto 1).

En vista del posible intercambio de células sanguíneas entre ambos fetos, se hicieron raspados de epitelio lingual y se tiñeron por el método de fucsina básica. El recuento de células con cromatina de Barr (Barr y Bertram, 1949) dio un porcentaje de 35% para el macho (Ver microfotografías N° 2 y 3).

DISCUSION

El sexo del neonato es el producto de tres mecanismos sucesivos embrionarios a saber: a) determinación sexual, b) gonadogénesis y c) diferenciación de los genitales externos (Hafez y Jainudeen, 1966). El balance y funcionamiento oportuno adecuado de cada uno de estos mecanismos, será el determinante del sexo y capacidad reproductiva del animal adulto; cualquier alteración o imbalance en uno o varios de estos mecanismos provoca anomalías en la diferenciación, morfogénesis y comportamiento sexual.

Si bien el sexo genético del cigoto se determina al momento de la fertilización, pueden ocurrir inversiones en la diferenciación de los gametos (Turner y Asakawa, 1964) o aún inversión funcional completa en animales genotípicamente machos o hembras (Yamamoto, 1958 y 1959).

La gónada indiferenciada es potencialmente bisexual y tiene todos los elementos necesarios para desarrollarse como testículo o como ovario. Según Jost, (1970) esta orientación hacia testículo, verdadero diferenciado sexual en mamíferos, se determina mediante la secreción de sustancias inductoras, diferentes a los andrógenos.

Esta hipótesis ha recibido el respaldo experimental de Picon (1969) y de Turner y Asakawa (1964) entre otros.

La morfogénesis de las vías tubulares depende de dos tipos de hormonas: de un lado los andrógenos que son estimuladores activos del desarrollo de los conductos de Wölff y responsables de la masculinización de los genitales externos, y de otro lado una sustancia, aún no conocida, inhibidora activa del desarrollo de los conductos de Müller. Ambas hormonas son producidas por el testículo fetal. En ausencia de testículos, por castración o porque las gónadas sean ovarios, las vías tubulares se desarrollarán como en una hembra, esto es, la masculinidad es dominante, mientras que el ovario fetal es completamente pasivo en cuanto a desarrollo de vías tubulares.

Short (1972) puntualiza, con base en los experimentos de Jost, que la inhibición de las trompas de Fallopio y del útero y la estimulación del epidídimo y tubos deferentes son efectos ejercidos por el testículo de manera mayormente local, mientras que la masculinización de los genitales externos es ejercida por los andrógenos circulantes.

Con base en estos tres mecanismos fundamentales es posible lograr una explicación plausible del fenómeno del freemartinismo que ofrece diferentes grados de intersexualidad: ovotestis con diferente proporción de ambos tejidos, desde casi completamente testículos hasta ovarios hipoplásicos, sin mayor proporción de tejido testicular; conductos de Müller en distintos grados de desarrollo, con o sin desarrollo parcial paralelo de conductos de Wölff. En efecto, desde el descubrimiento del chimerismo en la médula ósea y gónadas de gemelos dicigóticos bovinos por Ohno, *et al.*, (1962), se ha estudiado ampliamente la distribución de células machos (XY) y hembras (XX) en freemartin y su macho mellizo y se ha encontrado

que existe una amplia variación en las proporciones entre las distintas parejas. Según Basrur y Kanagawa (1969), algunos de los factores responsables de estas variaciones pueden ser el estado de desarrollo fetal al cual se establece la anastomosis vascular, el sitio exacto de anastomosis en las membranas fetales y probablemente la posición de la implantación en el útero puede también ser un factor que afecte la transferencia de células. Es pues sugerible que las características en cuanto a tiempo de desarrollo embrionario, tamaño de vasos anastomosados y posición de los fetos en el útero sean factores que determinen, el grado de intersexualidad presente en la hembra freemartin.

En el presente caso, el único estudio citológico realizado fue el de la cromatina sexual, que de acuerdo a Onuma y Nishikawa (1963) son pruebas suficientes del sexo genético. La proporción fue de 35% de células positivas a la cromatina de Barr, en el macho, lo que indica que existía ya un chimerismo muy claro, también presente en la hembra.

En consecuencia, dada la clara anastomosis vascular placentaria y el chimerismo en ambos miembros dicigóticos, se demuestra que el caso corresponde claramente a un freemartinismo en formación.

El autor quiere agradecer la decidida colaboración de la profesora Sonia de Greiff por su valiosa ayuda en la preparación e interpretación de los cortes histológicos.

BIBLIOGRAFIA

- Barr, M. L. y E. G. Bertram. 1949. A morphological distinction between neurones of male and female, and the behaviour of the nucleolar satellite during accelerated nucleoprotein synthesis. *Nature*. London, 163: 676.
- Basrur, P. y H. Kanagawa, 1969, Parallelism in chimeric ratios in heterosexual cattle twins. *Genetics*, 63: 419.
- Beatty, R. A. 1968. Discussion. (Acerca de las conferencias de Fehheimer y Mints, en el "VIII Biennial Symposium on Animal Reproduction") *J. Animl. Sci.*: 27: 69 Suppl I.
- Dronamraju, K. R. 1965. The function of the Y-chromosome in man, animals and plants. *Adv. Genet.*, 13: 227.
- Elger, W., F. Neumann, H. Steinbeck, y J. D. Hahn, 1970. The significance of hormones in mammalian sex differentiation as evidenced by experimentes with synthetic androgens and antiandrogens. En "Mammalian Reproduction". Edit. por H. Gibian y E. J. Plotz. Springer-Verlag. Berlin-Heidelberg. Pp. 33-44.
- Fehheimer, N. S. 1968. Consequences of chromosomal aberrations in mammals. *J. Anim. Sci.*, 27: Suppl. I.
- Hafez, E. S. E. y M. R. Jainudeen. 1966. Intersexuality in Farm Animals. *Anim. Breed. Abstr.*, 34: 1 (Review).
- Hutt, F. B. 1930. Bovine Quadruplets. (Including twins apparently momozygotic) *J. Hered.*, 21: 339.

- Jost, A. 1950. Sur le controle hormonal de differenciacion sexuelle du lapin Arch. Anat. Microscop. et morphol. expér., 39: 577.
- Jost, A. 1970. General outline about reproductive physiology and its developmental background. En "Mammalian Reproduction". Edit. por H. Gibian y E. J. Plotz. Springer-Verlag Berlin-Heidelberg. Pp. 5-32.
- Keller, K. y J. Tandler. 1916. Wien Tierärztl. Wchnschr., 3: 513. Citados por Burns, R. K. Role of the hormones in the differentiation of sex. En "Sex and Internal Secretions". Edit. Por W. C. Young. The Williams and Wilkins Co. Baltimore. Pp. 76-158.
- Lillie, F. R. 1916. The theory of the freemartin. Science, 43: 611.
- Mikamo, K. y E. Witshi 1963. Functional sex-reversal in genetic females of *Xenopus laevis*, induced by implanted testes. Genetics. 48: 1411.
- Miller, O. J. 1963. Sex determination, sex differentiation and sex chromosome aberration in man. Acta Cytol., 7: 148.
- Moore, N. W. y L. E. A. Rowson. 1958. Freemartin in sheep. Nature. London, 182: 1754.
- Ohno, S., J. M. Trujillo, C. Stenius, L. C. Christian, y R. L. Teplitz 1962. Possible germ cell chimeras among newborn dizygotic twin calves (*Bos taurus*) Cytogenetics., 1: 258.
- Onuma, H. y Y Nishikawa 1963. The sex chromatin of domestic animals. I. Observations on the sex chromatin nerve cell nuclei. II. Effects of the gonadectomy and sex hormone administration on the nuclear morphology. III. On the genetic sex of bovine freemartin and goat intersex. Anim. Breed. Abstr., 32: 28.
- Owen, R. D. 1945. Immunologic consequences of vascular anastomoses between bovine twins. Science, 102: 400.
- Picon, R. 1969. Action du testicule foetal sur le developpement *in vitro* des canaux de Müller chez le rat. Arch. Anat. micr. Morphol. expér., 58: 1.
- Short, R. V. 1972. Sex determination and differentiation. En "Reproduction in Mammals". 2º Vol. Edit. por C. R. Austin y R. V. Short. Cambridge University Press. Pp. 43-71.
- Turner, C. D. y H. Asakawa 1964. Experimental reversal of germ cells in ovaries of fetal mice. Science, 143: 1344.
- Ullrey, D. E., J. I. Sprague, D. E. Becker y E. R. Miller. 1965. Growth of the swine Fetus. J. Anim. Sci., 24: 711.
- Witschi, E. 1932. Sex deviations, inversions, and parabiosis. En "Sex and internal secretions". Ist. ed. Edit., E. Allen. The Williams and Wilkins Co. Baltimore.
- Yamamoto, T. 1958. Artificial induction of functional sex reversal in genotypic females of the medaka (*Oryzias latipes*) J. Exptl. Zool. 137: 227.
- Yamamoto, T. 1959. A further study on induction of functional sex reversal in genotypic males of the medaka (*Oryzias latipes*) and progenies of sex reversals. Genetics. 44: 739.