

67
24

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA



ANORMALIDADES CROMOSOMALES EN
CERDOS ADULTOS CON HIPOGONDISMO

T E S I S

PRESENTADA ANTE LA
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

DE LA
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

PARA LA OBTENCION DEL TITULO DE
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

P O R

LAZARO BERNABE CHAVARRIA MARTINEZ

Asesores: M.V.Z. Joaquín Becerril Angeles
M.V.Z. Elizabeth Morales Salinas



MEXICO, D. F.

FALLA DE ORIGEN

1991



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

CONTENIDO

	Página
RESUMEN	1
INTRODUCCION	2
MATERIAL Y METODOS	6
RESULTADOS	10
DISCUSION	19
LITERATURA CITADA	24
CUADROS	23

RESUMEN

CHAVARRIA MARTINEZ LAZARO BERNABE. Anormalidades cromosomales en cerdos adultos con hipogonadismo testicular (bajo la dirección de Joaquin Becerril Angeles, Elizabeth Morales Salinas).

La finalidad de este trabajo fue determinar las anormalidades cromosomales en cerdos adultos con hipogonadismo. Para llevar a cabo este experimento, se utilizaron 2 cerdos de raza Landrace de 16 meses de edad con hipoplasia testicular y un cerdo testigo de 7 meses de edad normal.

Se encontró una diferencia significativa entre el peso testicular de los animales afectados y del normal, con excepción del conducto del epidídimo.

Los estudios histopatológicos revelaron que los animales afectados presentaron poca o nula actividad espermatogénica y abundancia de células de Leydig, el epidídimo no mostró alteraciones. El estudio del mapeo cromosómico analizado por Microfotografías reveló que los animales con hipoplasia testicular presentaron en su mayor porcentaje de células estudiadas un cromosoma (X) adicional dando la constitución (39 xxy).

Por lo que se concluye que la presencia de un cromosoma (X) adicional se asocia a la falta de desarrollo testicular.

INTRODUCCION

Debido a la actual situación económica mundial y a la escasez de proteína de origen animal, principalmente en los países en desarrollo, se ha hecho necesario elaborar programas, selección y mejoramiento genético, ya que algunas de las principales causas de infertilidad en los cerdos se asocia a problemas reproductivos de origen genético, como en el caso de la hipoplasia testicular (1).

El estudio de los cromosomas de los animales domésticos, se inicio a fines del siglo XIX y se continuo durante la primera mitad del XX con la investigación de cromosomas normales, así como de nuevas técnicas de cultivo y la descripción de los cariotipos en mamíferos. En la última década se progresó hasta evaluar el bandeo cromosómico, la aplicación de técnicas para este fin y el empleo de mapas cromosómicos (10).

Existen pocos trabajos publicados en Mexico y en otros países sobre anomalías genéticas en animales domésticos, asociado a problemas reproductivos, como el hipogonadismo bilateral, a pesar de que la citogenética ha sido aplicada en numerosos estudios en el humano, entre ellos el diagnóstico de anomalías cromosómicas (10).

La reducción bilateral en el tamaño de los testículos sin anomalía aparente en el fenotipo, se asocia algunas veces con aberraciones cromosomales en toros, perros, gatos y cerdos. La asociación más común es un cromosoma sexual complementario aneuploide (e.g. $2N+1$, XXY) o variante (e.g. $2NXY/2N+1$, XXY). En el hombre tales cromosomas sexuales aneuploides se asocian con el Síndrome de Klinefelter (2,5,7).

El complejo masculino anormal conocido como Síndrome de Klinefelter está asociado con una trisomía cromosómica, esta condición aparece en uno de cada 500 nacimientos en humanos y se caracteriza por la disgenesia testicular (desarrollo defectuoso de los testículos), los individuos con este síndrome son fenotípicamente masculinos con tendencia hacia la feminidad que se reconoce en sus características secundarias, como agrandamiento de senos, poco desarrollo de pelo en el cuerpo, testículos pequeños y generalmente se reconoce también el retardo mental (5,11).

En el cerdo el hipogonadismo testicular tiene su origen en alteraciones cromosómicas, se hace necesario establecer la relación causa-efecto si se tratara de una relación genética, ya que permitiría prever su desarrollo, identificando a los animales poseedores de la anomalía cromosomal y con ello contribuir a una buena selección de sementales, eliminando aquellos que tuvieran

el factor, además del ahorro económico y comercial que representa.

HIPOTESIS

El cultivo de linfocitos in vitro de cerdos con hipogonadismo clínico, permite demostrar aberraciones cromosómicas, características de este padecimiento.

OBJETIVO

Relacionar anomalías cromosómicas en cerdos adultos con hipogonadismo bilateral, diagnosticado clínica e histológicamente mediante el cultivo de linfocitos in vitro.

MATERIAL Y METODOS

Este trabajo se realizó en la Granja Experimental Porcina de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM situada en el Pueblo de Zapotitlán, D.F., Delegación Tláhuac.

Para el desarrollo de esta investigación se utilizaron dos machos puros enteros, raza Landrace, con un promedio de 16 meses de edad, que fueron detectados clínicamente con hipogonadismo bilateral, en la misma granja (Foto 1).

Como animal testigo se incluyó un macho entero raza Landrace, con 7 meses de edad, sin manifestaciones clínicas de hipogonadismo, comparando su cariotipo, así como también el procesado de las muestras para histología.

El experimento se inició con la obtención de sangre, tanto en los animales con hipogonadismo bilateral como en el testigo, empleando jeringas con 0.2 ml de heparina y se obtuvieron las muestras del golfo de la yugular para obtener paquete celular (8).

A partir de este paquete se realizó un cultivo de linfocitos de la siguiente manera para determinar la cantidad de cromosomas que existen por célula, para ello las muestras de sangre se pesaron cada una de ellas en

una balanza de precisión y se centrifugaron durante 10 minutos a 1,500 rpm. Al obtener el paquete celular centrifugado, se tomó la línea blanca y se introdujo dentro del tubo estéril de siembra que contiene 8 ml de medio de cultivo Ham 6 F-10; se agregó 0.5 ml de fitohemaglutinina para cada muestra, además de penicilina G potásica 500 UI y estreptomocina de 8 mcg, se agitó suavemente, se identificaron y se metieron a incubar en la estufa a 37°C durante 72 horas. Tres horas antes de que termine el tiempo de incubación, se agregó una gota de colchicina de una solución al 0.04% de cada muestra; se agitaron suavemente hasta completar las 72 horas (7,8).

Al sacar las muestras de incubación, se centrifugaron durante 10 minutos a 1,500 rpm para obtener el paquete celular, se le agregó 2 ml de cloruro de potasio al 0.075M por muestra y se metieron a incubar nuevamente durante 20 minutos para ocasionar un choque hipotónico, se sacaron de la estufa, se pesaron nuevamente en la balanza de precisión, se centrifugaron durante 5 minutos, se les quitó el sobrenadante inmediatamente y se agregó 5 ml de una dilucion de 3:1 de alcohol etílico absoluto, ácido acético al 4% para dar un choque hipertónico, con el fin de que esta solución entre y salga de la célula a través de la membrana celular, se agitaron vigorosamente y se taparon los tubos que

contenia el paquete celular, se metieron al refrigerador durante 30 minutos, se pesaron en la balanza de precisión, nuevamente se centrifugaron durante 5 minutos a 1,500 rpm, se quitó el sobrenadante, se agregó nuevamente la dilucion en alcohol etílico y ácido acético, se agitaron vigorosamente, se taparon los tubos y nuevamente se metieron al refrigerador durante 30 minutos. Este paso se realizó 5 veces más, hasta obtener el paquete celular completamente lavado, se prepararon con agua fría destilada, se dejó caer una gota sobre el portaobjetos y rápidamente se pusieron en contacto con la flama, se agitaron para que se seicara rápidamente; se procedió a teñir con Giemsa y se observó en el microscopio óptico, una vez localizados los cromosomas, se tomaron fotografías con un rollo Kodalithortho tipo III Canon F-1 Exp. Iso 20 inmersión 100 X iluminación Kooler y con el propósito de conocer el número de cromosomas que presenta cada célula de metafase, las fotografías se amplificaron en papel para determinar el mapeo cromosómico. Obtenidos los cultivos se castraron los cerdos con hipogonadismo, así como el testigo normal, se tranquilizaron con azaperona (stresnil), la dosis utilizada fue de 0.1 ml/20 kg de peso vivo, posteriormente se lavó, se desinfectó y se incidió el escroto en la parte inferior (5 ml de longitud aproximadamente), se retrajo el escroto hacia la base, se extrajo el testículo, se separó la túnica que envuelve el

plexo pampiniforme, conducto deferente y músculo cremaster; se hizo doble ligadura con catgut del No. 1, se cortó el paquete vascular y el músculo cremaster aparte. Una vez realizada la castración, se empapo con Tintura básica, se aislaron los animales y se vigiló la evolución de la herida hasta la cicatrización.

Procesamiento de muestras para Histopatología.

Los testículos de cada animal se pesaron en una báscula de precisión y se realizaron cortes de medio centímetro cúbico de la cabeza, cuerpo y cola del epidídimo, así como de tres secciones de cada testículo.

Las muestras se fijaron en solución Bouin 72 horas y posteriormente se cambiaron a alcohol de 96%; así permanecieron hasta ser procesadas por técnicas histopatológicas en donde fueron deshidratadas a través de diferentes concentraciones de alcoholes incluidas en parafina y cortadas a 3 micras de grosor y teñidas con hematoxilina y eosina.

Una vez preparadas se realizó la descripción histopatológica a través del microscopio óptico.

RESULTADOS

Los resultados del peso testicular obtenido tanto del testigo como los sometidos a estudio. Se muestran a continuación (Cuadro 1):

	Derecho	Testículo	448 g
		Epidídimo	57 g
Testigo normal			
	Izquierdo	Testículo	134 g
		Epidídimo	66 g
	Derecho	Testículo	112 g
		Epidídimo	56 g
Caso 1 con Hipogonadismo			
	Izquierdo	Testículo	134 g
		Epidídimo	66 g
	Derecho	Testículo	81 g
		Epidídimo	55 g
Caso 2 con Hipogonadismo			
	Izquierdo	Testículo	116 g
		Epidídimo	54 g

Foto (1).

Hallazgos Histopatológicos:

Caso No. 1: En el parénquima testicular se observaron escasos y pequeños túbulos seminíferos,

caracterizados por presentar poca o nula actividad espermatogénica, la mayoría de ellos sólo presentaban una capa de células de Sertoli, su membrana basal estaba engrosada y de aspecto hialino, el tejido conectivo peritubular era abundante, las células intersticiales también abundantes y ocupaban la mayoría del intersticio.

El conducto del epididimo en sus tres porciones (cabeza, cuerpo, cola) se apreció sin cambios morfológicos.

Diagnostico: Hipoplasia testicular total bilateral.

Foto (2)

Caso No. 2: En el parénquima testicular se apreciaron escasos y pequeños túbulos seminíferos, algunos mostraban actividad espermatogénica y otros carecían de ella, la mayoría estaban recubiertos por una capa de células de Sertoli y otras además por una capa de espermatogonias, el intersticio se apreció poblado por un gran número de células intersticiales.

El conducto del epididimo al igual que en el caso anterior en sus tres porciones, no presentaron cambios en su estructura.

Diagnostico: Hipoplasia testicular parcial bilateral moderada. Foto (3).

Diagnóstico: Hipoplasia testicular parcial
bilateral moderada.

Foto (3).



Cerdos donde nos permiten observar la notable disminución
del tamaño de los testículos (Foto 1).



Microfotografía de testículo de un cerdo de 16 meses de edad hipoplásico, donde se aprecia escasez de células de Sertoli (Flecha 1) y nula actividad espermatogénica; nótese la abundancia de células de Leydig (Flecha 2) HE 40 X (foto 2).



Microfotografía de testículo de un cerdo de 16 meses de edad hipoplásico, en donde se aprecia nula actividad espermatogénica y un material proteináceo en su lugar. Las células de Leydig son abundantes (Flecha 3) HE 40X (Foto 3).

Resultado del estudio cromosómico analizado por microfotografías:

El porcentaje de células examinadas de un cerdo normal y los sometidos a estudio, se resumen en el cuadro 1.

Testigo normal:

De un total de 80 células, el 94% contenían 38 cromosomas, el 2% 39 cromosomas y el 4% 40 cromosomas, lo que representa un cerdo normal genotípicamente.

Caso 1:

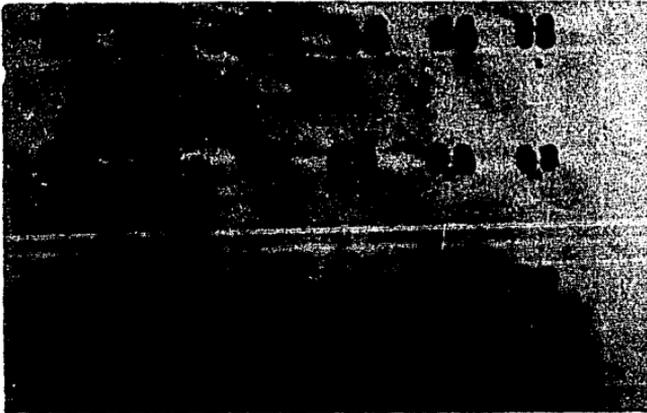
Se analizaron 120 células de las cuales el 10% contenían 38 cromosomas, el 87% 39 cromosomas y el 3% presentaron 40 cromosomas, nótese que el mayor porcentaje de células contienen 39 cromosomas (Fotos 6 y 7).

Caso 2:

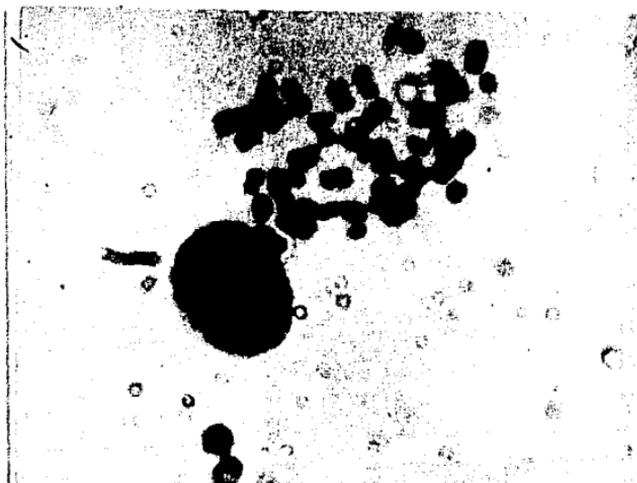
Se examinaron 115 células de las cuales el 9% contenían 38 cromosomas, el 89% 39 cromosomas y el 2% 40 cromosomas, el mayor porcentaje de células muestran 39 cromosomas (Fotos 8 y 9).



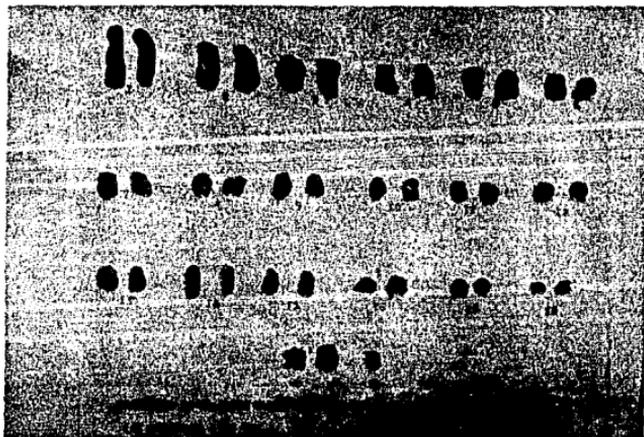
Microfotografía de un linfocito en metafase de un cerdo normal. Giemsa 100 X (Foto 4).



Cariotipo de un cerdo macho normal 38 xy Giemsa 100 X
(foto 5)



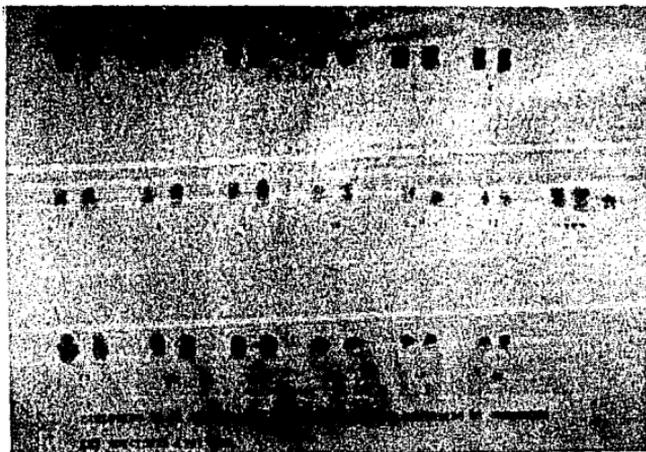
Microfotografía de un linfocito en metafase de un cerdo problema. Giemsa 100 X (Foto 6) Caso 1.



Cariotipo de un cerdo macho mostrando un cromosoma (x) adicional 39 xxy (Foto 7) Caso 1.



Microfotografía de linfocitos en metafase Giemsa X (Foto 8) Caso 2.



Cariotipo de un cerdo macho mostrando un cromosoma (x) adicional 39 xxy (Foto 9) Caso 2.

ESTA TESIS NO DEBE SALIR DE LA BIBLIOTECA

DISCUSION

De acuerdo a los resultados obtenidos se demuestra que los cerdos sometidos a estudio citogenético presentan un cromosoma "x" adicional, lo que coincide con los hallazgos de Harvey (8) 1968, quien encontró la composición 39 xxy y 40 xxy usando sangre periférica de un cerdo macho con linfosarcoma y Hancock (7) 1981 quien encontró una composición cromosómica 39 xxy en un cerdo con hipoplasia testicular.

Los hallazgos hitológicos nos permiten confirmar que las gónadas de estos animales presentan escasos y pequeños túbulos seminíferos con poca o nula actividad espermatogénica al igual que los estudios realizados por Breeuwsna 1968 citado por Hancock (7) quien encontró un cariotipo (xxy) en un cerdo Landrace Danes, el cual fue descrito como un intersexo.

Los estudios citogenéticos pueden aclarar algunos casos como la disgenesia gonadal e hipoplasia ovárica. En estos estudios además de la utilización de linfocitos sanguíneos puede utilizarse otros tejidos como piel, membranas mucosas, médula ósea y anexando una historia clínica completa.

El análisis de cromosomas puede también determinar la diferencia entre hipogonadismo y disgenesia gonadal en las hembras, ésta última se caracteriza por vulva y

vagina normales y un útero subdesarrollado, acompañadas con una historia completa de anestro, con inactividad de las gonadas y ausencia de folículos, responsables de producción de hormonas. En los estudios cromosómicos revelan la ausencia de un cromosoma sexual femenino complementario como en el caso del Síndrome de Turner en el humano, y en la cerda la hipoplasia ovarica 37 X. Son hembras que en su historia clínica revelan estros irregulares y en un exámen de los genitales internos, los ovarios se encuentran planos y los folículos no son palpables, al exámen histológico los ovarios tienen un número reducido de folículos, en el estudio de cromosomas revelan un cromosoma accesorio como en la yegua 65 XXX (3).

Los resultados del peso testicular muestran una marcada diferencia como se muestra en el Cuadro I entre el animal testigo y los animales problema, esto puede explicarse claramente, ya que el estudio histopatológico revela el pobre desarrollo testicular manifestandose como gonadas pequeñas y por lo tanto de poco peso.

Por otro lado se puede apreciar que no existe una diferencia significativa entre el peso del epididimo de estos dos grupos de animales, así como tampoco hubo diferencia morfológica al estudio histopatológico; por lo que puede concluirse que la falta de desarrollo solo afecta al tejido gonadal.

CONCLUSIONES

En el presente estudio se concluye que:

- 1) El cultivo de linfocitos en metafase de cerdos con hipogonadismo nos permitió demostrar que existe un cromosoma "X" adicional en el cariotipo.
- 2) Los estudios cromosómicos son de gran utilidad para diagnosticar oportunamente alteraciones genéticas que pueden repercutir en la reproducción de los animales como en el caso de la hipoplasia testicular, lo que permite eliminar animales portadores de tal alteración.
- 3) Existe una semejanza en el Síndrome de Klinefelter en el hombre y la hipoplasia testicular en el cerdo, ya que en ambos se demuestra asociación con una trisomía cromosómica, en el caso del hombre además de la hipoplasia testicular se aprecia poco desarrollo del pelo en el cuerpo, pequeñas glándulas prostáticas, retardo mental, tendencia a la feminidad y muerte a temprana edad.
- 4) La falta de desarrollo sólo se presenta en el tejido gonadal y no en el conducto del epididimo.

- 5) Es necesario hacer futuras investigaciones con técnicas más especializadas, lo que nos ayudaría a determinar con mayor precisión no sólo el número de cromosomas por célula, sino también alteraciones en la estructura cromosómica como en hermafroditismo, hipoplasia testicular y pseudohermafroditismo.

- 6) Indiscutiblemente los estudios cromosómicos son de gran utilidad por lo anteriormente expuesto, sin embargo, es notable la falta de personal capacitado, así como de material y equipo para realizar estudios más especializados.

Cuadro 1. Presencia de células normales y anormales con base en el número de cromosomas.

	Número de cromosomas por célula.			Total células examinadas.
	38	39	40	
Porcentaje de células examinadas en un cerdo normal	93	2	5	80
Porcentaje de células examinadas en cerdos bajo estudio				
Caso 1	10	87	3	120
Caso 2	9	89	2	115

LITERATURA CITADA

- 1.- Alba, J.: Alimentación del ganado en América Latina. 2ª. ed. Ed. Prensa Médica Mexicana. Mexico, 1977.
- 2.- Borje, K.G.: Testicular and Ovarian Pathology in Swine. In: Current Therapy in Theriogenology. Edited: Morrow, D.A. 1099-1100. W.B. Saunders Philadelphia, 1980.
- 3.- Bullard, J.F.: Operaciones que Afectan el Testículo y al Canal Inguinal: Enfermedades del Cerdo. Editado por: Dunne, H.W., 836-845. Unión Tipográfica Editorial Hispano Americana, México, D.F., 1976.
- 4.- Cartella, I.: Su alcune anomalie congenite riscontrate in "Sus Scrofa domesticus". Univ. D.S. Mess. Cat. Pat. Chirur. Vte. Pod. 17:101-108 (1980).
- 5.- Eldon, J.G.: Principios de Genética. 2ª. ed. Editorial LIMUSA, México, D.F., 1974.
- 6.- Gunther, S.S.: Genética Molecular. Ediciones OMEGA, S.A., Barcelona, 1973.

- 7.- Hancock, J.L. and Daker, M.G.: Testicular hipoplasia in a Boar with abnormal sex chromosome constitution (39 XXY). J. Reprod. Fert. 61:395-397 (1981).
- 8.- Harvey, M.J.A.: Amale Pig with an XXY/XXXXY sex chromosome complement. J. Reprod. Fert. 17:319-324 (1968).
- 9.- Ladds, P.W.: The Male Genital System In: Pathology of Domestic Animals. Jubb, P.K.V. and Kennedy, C.N.P. 3:420-424. Academic Press, London, 1985.
- 10.- Márque, K.V.: Memorias del curso Citogenética e Inmunología. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia - UNAM 1982. 2-B Fac. de Med. Vet. y Zoot. México, D.F (1982).
- 11.- Osterhoff, D.R.: Chromosome aberrations in domestic animals. J.S. African Vet. Ass. 47:133-136 (1976).
- 12.- Rostein, E. y Gutiérrez, D. P.: Prontuario de Productos: Prontuario de Especialidades Veterinarias. 11ª. ed. Editado por: Centro Profesional de Publicaciones. México, D.F, 1988.