

RELACION ENTRE QUIMERISMO XX/XY Y EL FENOTIPO PSEUDOHERMAFRODITA MASCULINO EN PORCINOS

Mónica Reinartz E.¹; María Elena Márquez F.²;
Luz Adriana Ramírez A.³; Juan Bautista López O.⁴

RESUMEN

La causa genética del pseudohermafroditismo no está bien dilucidada, sin embargo se han reportado distintos casos de pseudohermafroditas masculinos los cuales en la mayoría de los casos se han tratado de explicar por efectos hormonales sobre las gónadas en formación durante el desarrollo embrionario. Además se ha explorado poco la relación de este fenotipo con la constitución genómica de los organismos que presentan la disfunción sexual. En el presente trabajo se encontró una fuerte relación entre el quimerismo cromosómico XX/XY y el fenotipo pseudohermafrodita masculino exhibido por dos ejemplares de porcinos Landrace X Largewhite similar a lo encontrado en freemartinismo de bovinos.

Palabras claves: Pseudohermafroditismo, quimerismo, cariotipo, diferenciación sexual.

ABSTRACT

¹ Profesora. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias Agropecuarias. A.A. 1779 Medellín.

² Profesora. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias. A.A. 3840 Medellín

³ Auxiliar de Investigación. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias. A.A. 3840 Medellín.

⁴ Profesor. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias. A.A. 3840 Medellín.

RELATION BETWEEN CHIMERISM XX/XY AND THE MALE PSEUDHERMAFRODITE PHENOTYPE IN SWINES

The genetical cause of the pseudohermafroditism has not been clarified, but different cases of male hermafroditism have been reported. Most of them have been explained as a cause of hormonal effects on the gonads during the embryonic development. The relation between the phenotype and genomic constitution of the organisms showing sexual disfunction has not been widely explored. In this report a strong relation between the chromosomal chimerism XX/XY and the male pseudohermafroditism of two Landrace x Largewhite swines, like in the bovine freemartinism was found.

key words: Pseudohermafroditism, chimerism, cariotype, sexual differentiation.

INTRODUCCIÓN

En el proceso de diferenciación sexual de mamíferos, el dogma central se refiere al proceso secuencial en el cual se establece primero el sexo cromosómico, luego se desarrolla el sexo gonadal y por último se expresa el sexo fenotípico, el cual involucra el desarrollo de los órganos sexuales externos y la aparición de las características sexuales secundarias.

El sexo cromosómico (XX para hembra o XY para macho) se determina en el momento de la fertilización de un oocito (X) por un espermatozoide (X o Y), mientras que el sexo gonadal comprende el desarrollo y migración de células germinales para formar primero una gónada bipotencial de la cual se puede diferenciar el testículo o el ovario. Por

último, el sexo fenotípico incluye el desarrollo anatómico y la capacidad reproductiva del aparato reproductor masculino o femenino, lo cual depende de la presencia o ausencia de señales hormonales específicas (George *et al*, 1992).

Durante cada una de las etapas de diferenciación sexual se pueden presentar alteraciones, por ejemplo en la primera etapa se pueden dar aneuploidías sexuales como la monosomía X (XO), trisomías (XXX, XXY o XYY) y también se pueden generar mosaicos (XO/XY) o quimeras celulares tipo XX/XY.

Algunas veces se pueden observar diferentes órganos de ambos sexos en un mismo individuo, a lo cual se le denomina intersexo. Los intersexos pueden ser

ambiglandulares cuando el organismo posee ovarios y testículos separados o fusionados en una sola estructura llamada ovotestis. Además los intersexos ambiglandulares se pueden clasificar como alternos si hay una glándula

En otra categoría de intersexo se pueden clasificar los pseudohermafroditas masculinos o femeninos con órganos genitales externos del sexo opuesto, por ejemplo en el pseudohermafroditismo masculino se ha manifestado la presencia de testículos con vulva pequeña, clítoris amplio en el que en ocasiones se abre el canal uretral. El pseudohermafroditismo se ha reportado en diferentes especies incluyendo la porcina, en la cual se ha detectado hasta un 20% en algunas camadas (Muñoz, 1992), o puede llegar a tener una prevalencia entre 0,2 y 0,6% en varios países (Lehman *et al*, 1986).

El origen del pseudohermafroditismo no está bien dilucidado, no obstante se le ha atribuido a factores genéticos. En un caso de cerdo pseudohermafrodita masculino que mostró una quimera celular XX/XY, se planteó un mecanismo que induce la formación de individuos a partir de células procedentes de dos cigotos diferentes previamente fusionados (Henaó *et al*, 1997). En otro caso, en un macho y una hembra vecinos en su implantación se reportó el intercambio celular a través de anastomosis vascular de las membranas cariónicas de embriones heterosexuales en etapas tempranas del desarrollo (Gómez, 1974), como en el caso de freemartinismo.

Este último planteamiento es factible en

diferente en cada lado o en unilateral si las glándulas están localizadas al mismo lado o bilateral si en cada lado hay un testículo y un ovario.

especies pluríparas como el cerdo en el que la cercanía de embriones podría permitir la fusión de envolturas cariónicas y por ende el flujo de células indiferenciadas entre embriones vecinos.

En este trabajo se muestra la evaluación anatómica, histológica y citogenética de dos casos de pseudohermafroditismo masculino detectados en porcinos de la raza Landrace x Largewhite en la Granja San Pablo de la Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín.

METODOLOGÍA

En la Granja San Pablo de la Universidad Nacional de Colombia, ubicada en el municipio de Rionegro (Antioquia) a 2150 msnm y en una zona ecológica de bh-T, con 25 hembras de cría, se presentaron dos casos de pseudohermafroditismo en 1999.

Los dos casos fueron sometidos a estudio citogenético, pero sólo a uno de ellos se le realizó estudio anatómico e histológico de las muestras de vulva, clítoris, cérvix y cuernos uterinos obtenidos durante la necropsia.

A los cerdos evaluados, de la raza Landrace x Largewhite de 4,5 meses de edad, se les efectuó observaciones anatómicas externas y se les tomaron muestras de sangre periférica para realizar la evaluación cromosómica, la cual

también se le realizó a dos cerdos fenotípicamente normales.

Para la evaluación citogenética se colectó sangre utilizando jeringa estéril heparinizada (5000 U/ml) con aguja No. 21. De cada muestra obtenida se sembraron tres cultivos por individuo y a cada cultivo se le adicionó 1 ml de sangre y 9 ml de medio RPMI-1640 suplementado con 10% de suero bovino fetal, 100 U de penicilina, 100 ug/ml de Estreptomicina y 0,1 ml de Fitohemaglutinina. Todos los cultivos se incubaron a 37,5 °C durante 66 horas.

Cinco horas antes de iniciar la cosecha se le añadió a cada cultivo 0,1 ml de 5-Bromo-2'-deoxiuridina (2ug/ml) y 30 minutos antes, se le adicionó 0,1 ml de Colcemid (10 ug/ml). La cosecha de los cultivos se realizó de acuerdo al protocolo convencional de Moorhead (1960), utilizando KCl (0,075 M) como solución hipotónica y haciendo un pregoteo con fijador fresco antes de gotear la muestra sobre los portaobjetos.

Se realizó la técnica de bandeo R replicativo (Camargo y Cervenka, 1982), modificada por López *et al.*(1997). Se sumergieron los portaobjetos con las

muestras goteadas en solución Hoechst 33258 (0,3 ug/ml) durante 10 minutos, luego se enjuagaron con agua destilada y se expusieron durante 30 minutos a iluminación con una lámpara Capsylite 75w, cubiertos con 0,3 ml de 2 x SSC y con cubreobjetos de 22 x 60 mm. Después de remover el 2 x SSC las preparaciones se colorearon con solución de Giemsa al 5% en agua destilada durante cinco minutos, y después de lavarlos se flamearon suavemente para luego hacer un montaje permanente con permount.

La observación al microscopio se hizo

con objetivo de inmersión 100X y el análisis se efectuó clasificando de cada individuo 150 mitosis como XX o XY. Por último las microfotografías se realizaron con microscopio Olympus BMK 40, con sistema automático, usando película Kodalith Orthofilm 6556, se revelaron con revelador D-19 y se llevaron a positivas utilizando papel Forte FPS1.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Observación macroscópica. La observación anatómica reveló en ambos individuos (Figura 1) la presencia de testículos de forma y ubicación normal en la cavidad escrotal, vulva con clítoris hipertrofiado y ausencia de pene.

La disección del tracto reproductivo mostró internamente y en ubicación caudo-oral la vagina, una estructura amorfa que normalmente correspondería al cérvix, el útero y sus cuernos formados de

La muestra tomada por ubicación como de cérvix revela una uretra peneana y una próstata difusa, con un epitelio de revestimiento de tipo transicional sostenido en una lámina propia submucosa con abundante tejido eréctil (cuerpos cavernosos) y glándulas difusas (próstata difusa), luego apareció una capa de músculo estriado esquelético y en la superficie externa una adventicia típica.

La descripción macroscópica de la anatomía externa (Figura 1) y las observaciones internas realizadas en la necropsia (Figuras 2 y 3) permiten clasificar al organismo como intersexo

membranas delgadas y transparentes con formaciones quísticas y en su interior un líquido espeso de coloración amarillenta. No presentaba ovarios.

Observación macroscópica. En la muestra de clítoris se observó un epitelio plano estratificado húmedo sostenido por tejido conectivo abundante en el cual se evidenció tejido vascular eréctil difuso, terminaciones nerviosas y nódulos linfoides, estos últimos en íntimo contacto con el epitelio.

En la muestra de útero se observaron estructuras quísticas de gran tamaño recubiertas por un epitelio cilíndrico simple, con abundante líquido proteico en su interior, lo cual se diagnosticó como hidrómetra.

tipo pseudohermafrodita masculino, a

pesar de que los hallazgos histológicos revelaron que la clasificación morfológica del cérvix uterino no corresponde con el estudio histológico, el cual revela una uretra peneana acompañada de una próstata difusa. La evaluación cromosómica (Figura 4), de 150 mitosis por individuo mostró para cada caso la presencia de dos poblaciones celulares XX/XY en proporción 2:1 en el primer organismo y 1:2 para el segundo (Tabla 1).

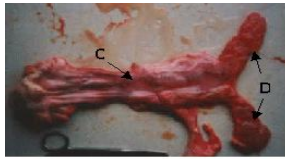


Figura 1. Testículos (A) y vulva (B) de un cerdo de 15 días de edad.

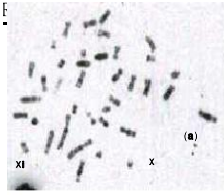
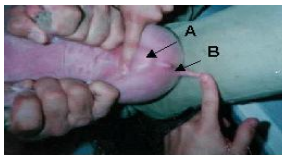


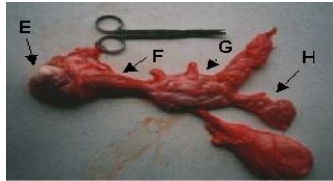
Figura 2. Disección del tracto reproductivo de un pseudohermafrodita masculino, la cual muestra estructuras quísticas en cuello (C) y cuernos uterinos (D).

Figura 3. Tracto reproductivo de un cerdo pseudohermafrodita masculino, donde se



aprecia la vulva con clítoris hipertrofiado (E), vagina (F), cuello uterino (G) y cuernos quísticos (H).

Figura 4. Cromosomas sexuales de metafases $2n=60$, XX (a) y XY (b) encontradas en



dos casos de cerdos pseudohermafroditas.

Tabla 1. Registro de células XX y XY de cerdos pseudohermafroditas y fenotípicamente normales.

Individuo	Células XX	Células XY
Caso 1	100	50
Caso 2	50	100
Macho control	--	200
Hembra control	200	--

Estos resultados muestran una fuerte relación entre el quimerismo cromosómico XX/XY y el fenotipo pseudohermafrodita masculino observado,

similar a lo detectado en freemartinismo en bovinos (López *et al.*, 1999). Las posibles explicaciones del origen de estos organismos quiméricos XX/XY podrían ser: una por la fusión en etapas tempranas de dos cigotos heterosexuales y otra por el intercambio celular a través de anastomosis vascular temprano de las membranas coriónicas de dos embriones de diferente sexo cromosómico (Salisbury and Lodge, 1978).

Estas posibilidades podrían ser factibles en especies pluríparas como los porcinos, en la que se podrían fusionar cigotos antes de implantarse el embrión o se podría realizar intercambio celular entre embriones implantados cercanamente.

La distinta proporción hallada de células XY en los cerdos pseudohermafroditas, podría reflejar por un lado la capacidad genética del tejido para producir o recibir señales hormonales capaces de inducir la relativa diferenciación de estructuras müllerianas o wolffianas durante la formación del aparato reproductor. De otro lado, el desarrollo de un organismo quimera XX/XY podría ser similar a lo observado en organismos normales de sexo cromosómico XY, con la diferencia de que aquellos órganos o tejidos que no presentaron o en los que se encuentren células XY en proporciones bajas, podrían mostrar respuesta diferencial al factor inhibidor de Müller (FIM), el cual puede detener el desarrollo del aparato

Para corroborar lo anterior sería

reproductor masculino.

La presencia de estructuras completas derivadas de Müller como el útero, podría indicar la ausencia de células XY en ellos lo cual debería evaluarse en otros tejidos de diferente origen embriológico al tejido sanguíneo analizado. Por lo tanto, estas estructuras pueden considerarse insensibles al MIF o insuficientes en receptores de este factor para inducir diferenciación histológica completa como lo demuestra el cérvix clasificado a nivel morfológico, pero que histológicamente corresponde a una estructura wolffiana como la uretra peneana la cual se puede considerar más un pene rudimentario que un clítoris hipertrofiado. Además, explicaría la presencia de testículos en apariencia normal y localizadas en la cavidad escrotal.

Todo lo anterior, permite plantear que las quimeras celulares XX/XY podrían dar origen a cerdos pseudohermafroditas masculinos y tal vez a otros síndromes intersexos como el freemartin en organismos mamíferos y que los casos sólo XX reportados (Hunter and Greve, 1996) pueden deberse más a la no detección de las proporciones crípticas de la otra línea celular XY o a que el tejido analizado es derivado únicamente de una (XX) de las dos.

recomendable incrementar el número de

mitosis analizadas con una confianza del 95% que permita descartar poblaciones celulares menores del 1%, lo cual se puede lograr utilizando el bandeo R replicativo usado en este estudio. Este procedimiento permite clasificar sin lugar a dudas y rápidamente las células XX ó XY por la presencia de un cromosoma X inactivo (pálido) en hembras de mamíferos. Además, esta técnica de bandeo permitirá detectar otro tipo de anomalías cromosómicas visibles al microscopio y comparar los organismos intersexos con los fenotípicamente normales. En este estudio no se observan anomalías cromosómicas en los cerdos pseudohermafroditas analizados.

Por último, estos resultados son el primer reporte de dos casos de cerdos pseudohermafroditas masculinos cuya dotación genética son quimeras celulares XX/XY.

AGRADECIMIENTOS

Expresamos nuestros agradecimientos al Centro de Producción Agropecuaria de la Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín (CEAGRO) por facilitar los animales y al Laboratorio de Histopatología Veterinaria de la Universidad de Antioquia, Medellín, por la colaboración prestada en el procesamiento de las muestras.

BIBLIOGRAFÍA

BUNCH, T.D. *et al.* True hermaphroditism in a wild sheep: a clinical report. *Err.* Theriogenology. Vol. 36, No. 2 (Aug, 1991); p.185-190.

CAMARGO, M. and CERVENKA, J. Patterns of DNA replication of human chromosomes. Part 2: replication map and replication model. *Err.* American Journal of Human Genetic. Vol. 34 (1982); p.757-780.

GEORGE, Frederik, and WILSON, Jean. Embriology of the genital tract. *Err.* WALSH S., Patrick; RETIK, Alan B.; STAMEY, Thomas; VAUGHAN, Darracott. Campbell's urology. 6ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 1992. p.1496-1508.

GÓMEZ, L.J. Intersexualidad en porcinos: II un caso de freemartin. *Err.* Revista Facultad Nacional de Agronomía. Vol. 29, No. 2 (1974); p.47-54.

HENAO, F.; GÓMEZ, G.; CARMONA, J.U. y CASTAÑO, G. Evaluación citogenética e histopatológica de un cerdo intersexo. *Err.* Porcicultura Colombiana No. 52 (nov.-dic., 1997); p.32-36.

HUNTER, H.F. and GREVE, T. Intersexuality in pigs: clinical, physiological and practical considerations. *Err.* Acta Veterinaria Scand. Vol. 37, No. 1 (1996); p.1-12.

LEHMAN A.D. *et al.* Diseases of swine. 6ed. Iowa: Iowa State University, 1986. 712p.

LÓPEZ, J.B.; MARQUEZ, M.E. y HOYOS, D. Cariotipo citogenético de la guagua (*Agouti pacá*). *Err.* Revista Facultad Nacional de Agronomía. Vol. 50, No. 2 (1997); p.5-18.

LÓPEZ, J.B.; MARQUEZ, M.E y MÁRQUEZ, E.J. Detección de quimerismo celular en freemartin por bandeo RBG. *En: Revista MOORHEAD, P.S. et al.* Chromosome preparation of leukocytes cultures from human peripheral blood. *En: Experiment Cell Research.* Vol. 210 (1960); p.613-616.

MUÑOZ, D. Un caso de hermafroditismo porcino. *En: Zootecnia de la Habana.* Vol. 2, No. 3-4 (jul.-sep., 1992); p.91-96.

Aprobado para su publicación:
Septiembre 20 de 2001

Facultad Nacional de Agronomía. Vol. 51,
No. 1 (1999); p.529-547.

SALISBURY, V. D. and LODGE, J.R. Physiology of reproduction and artificial insemination of cattle. San Francisco: Freeman and Company, 1978. p.42-51.