

ARTÍCULO ORIGINAL

Mosaicismo leucocitario asociado a infertilidad en cuatro yeguas

Mosaicism leucocitary associated to infertility in four mares

MONCALEANO, J.S.¹, JIMÉNEZ, L.M.²; SÁNCHEZ, C.A.³

¹MVZ, Grupo de Investigación en Reproducción y Genética Animal (GIRGA). Escuela de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad de los Llanos. ^{2,3}MV., MSc. Laboratorio de Citogenética Animal. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá.

Recibido: Mayo 16 de 2006. Aceptado: Marzo 12 de 2007.

RESUMEN

Se tomaron muestras de sangre periférica a cuatro yeguas de 19, 13, 10 y 4 años de edad, de raza Silla francesa, dos Criollas Colombianas y una Paso Fino Colombiano respectivamente, para realizar cultivo de linfocitos. Los animales fueron remitidos por la Clínica de Reproducción al Laboratorio de Citogenética Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia de la Universidad Nacional de Colombia por antecedentes de problemas reproductivos. A la palpación se detectaron órganos reproductivos subdesarrollados; ausencia de preñez, además abortos frecuentes y en algunos casos nacimiento de potros inmaduros o con defectos fenotípicos. La evaluación citogenética se realizó mediante análisis de cromosomas obtenidos a partir de cultivo de linfocitos, y teñidos con Giemsa. El complemento cromosómico en todos los animales estudiados fue 63, XO/64,XX; las células con monosomía del X, (63,XO) oscilaron entre el 25% y 63% de las células analizadas y las células normales (64,XX) entre el 37% y el 75%. Los resultados de estos análisis demostraron los beneficios de este tipo de diagnóstico para determinar fallas reproductivas que involucran anomalías cromosómicas en yeguas que fenotípicamente no presentaban alteraciones evidentes.

Palabras clave: monosomía, cromosomas sexuales, mosaicismo en yeguas

ABSTRACT

Heparinized blood samples for culturing leucocytes were taken from four mares that were 4, 10, 13, and 19 years old. They were of three different breeds. One was a French saddle horse, two were Colombian creoles, and the fourth was a fine stepping Colombian riding horse. The mares were remitted by the Clinic of Reproduction to the Animal Cytogenetic Laboratory of the School of Veterinary Medicine and Zootechnics of the National University of Colombia due to their history of reproductive failure. Rectal palpation revealed atrophic reproductive organs. Failure to conceive, frequent abortions, and birth of immature foals, or those born with phenotypic defects, were noted in the mares' histories. A cytogenetic evaluation was done by an analysis of the mares' chromosomes that were obtained by culturing the leucocytes and staining them with Giemsa. The chromosome complement was 63,XO/64,XX for all samples. The cells analyzed with X monosomy (63,XO) varied from 25% to 63%, and the normal cells (64,XX) varied from 37% to 75%. The results of this analysis demonstrated that this diagnostic tool is beneficial to determine reproductive failures due to chromosomal abnormalities in mares that didn't show any evident phenotypic abnormalities.

Key work: monosomy, sexual chromosome, mare mosaicism.

INTRODUCCIÓN

El número cromosómico diploide normal del *Equus caballus* es $2n = 64$: 26 metacéntricos o submetacéntricos y 36 acrocéntricos (Richer et al., 1990), el cromosoma X es el segundo submetacéntrico más grande del complemento y el cromosoma sexual Y es similar en tamaño al autosoma más pequeño (Ronne et al, 1993; Smith, 2001).

Una variación en el número o estructura de este cariotipo implica fallas en el comportamiento reproductivo de machos y hembras, razón para diagnosticar mediante análisis citogenético entidades cromosómicas relacionadas con infertilidad y pérdidas reproductivas (Jiménez, 1996).

La presencia de anomalías cromosómicas como el mosaico 63,XO/64,XX (presencia de dos o más tipos de líneas celulares presentes en un organismo, de origen pre-cigótico o pos-cigótico.(Jiménez, 1996)), disminuye el desempeño reproductivo de yeguas fenotípicamente normales porque afecta el desarrollo del tracto reproductivo: ovarios muy pequeños y/o quísticos, cuerpos lúteos persistentes, atrofia endometrial y/o flacidez cervical; lo que se hace evidente por la presentación de ciclos irregulares, anovulatorios o anestros prolongados (MacFeely, 1990).

Tanto en el hombre como en el equino, el mosaicismo se le atribuye a un proceso llamado No-disyunción que puede afectar a los cromosomas autosómicos o a los sexuales (Jiménez, 1996). Esta No-disyunción se debe a fallas en la supervisión de los puntos que controlan la correcta segregación de los cromosomas sexuales debido a un comportamiento univalente del cromosoma

implicado (LeMaire-Adkins et al, 1997; Lee et al, 2000).

MacFeely et al. (1990), reportan que el mosaicismo 64,XX/63,XO en yeguas es la tercera anomalía cromosómicas más frecuente después del síndrome de Turner o monosomía del X (63,XO) y el Síndrome de Sexo Reverso o disgenesia gonadal (64,XY).

Jiménez (1996), al efectuar estudios citogenéticos a 22 animales (16 hembras y 6 machos) PSI mayores de 10 años en criaderos de la Sabana de Bogotá (Colombia) basada en el historial reproductivo de los ejemplares, encontró una hembra fenotípicamente normal mosaico 64,XX/63,XO con proporción de 34.39% de células anormales, postulando la existencia de una relación entre el grado de expresión fenotípica del síndrome y el porcentaje de células anormales encontrado. Además se plantea la necesidad de realizar muestreos continuos dentro de la población equina para establecer los rangos de interacción.

Heno (2002), reporta un estudio citogenético de una yegua mestiza estéril con complemento cromosómico mosaico 63,XO/64,XX, con un 46% de células anormales y 54% de células 64,XX; la apariencia fenotípica y genitales externos de esta yegua eran normales y al análisis ecográfico presentó útero y ovarios pequeños pero activos.

El propósito de este trabajo fue determinar las causas de las fallas reproductivas en 4 yeguas de diferente raza remitidas a la clínica de Reproducción Animal de Universidad Nacional de Colombia.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se tomaron muestras de sangre heparinizada de cuatro yeguas de: 13, 19, 10 y 4 años edad, de raza Silla Francesa (código 0104), Criolla Colombiana (0204 y 0804) y Paso Fino Colombiano (0904) respectivamente, fenotípicamente normales a excepción de la yegua 0904 que presentó una alzada menor al estándar de la raza (Tabla 1).

Los ejemplares fueron remitidos debido a su historia reproductiva y subdesarrollo de los órganos del tracto reproductivo (tabla 1) de la Clínica de la Reproducción al Laboratorio de Citogenética Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad

Nacional de Colombia donde se realizó el cultivo de linfocitos a partir de siembra de sangre periférica heparinizada (5000 UI/ml), 0.3 ml, de los animales de acuerdo a técnicas estandarizadas previamente en el Laboratorio de Citogenética Animal de la misma Universidad para la obtención de metafases (Jiménez, 2000): Sangre entera, 2 ml; RPMI 1640, 8 ml; Fitohemaglutinina-P, 0.3 ml; SFB 20%, 1 ml. Los cultivos se incubaron por 70 horas a 38.5°C y fueron expuestos a colchicina (0.016%), 0.2 ml por dos horas antes de la cosecha y transferidos a tubos de punta cónica para centrifugarlos a 1200 rpm por 10 minutos, se descartó el sobrenadante y se sometió la suspensión

celular a solución hipotónica precalentada (KCl 0.075M), 8 ml por 30 minutos a 38.5°C. Se realizó una prefijación colocando 8 gotas de Carnoy fresco (metanol : ácido acético, 3:1) se homogenizó y centrifugó nuevamente por 10 minutos a 1200 rpm, se descartó el sobrenadante para fijar en Carnoy por 30 minutos a 4°C. Finalmente se hicieron de 3 a 5 lavados con Carnoy fresco hasta obtener botones celulares limpios. La concentración celular de los cultivos se dejó caer sobre láminas congeladas, que se

flamearon, rotularon y secaron a temperatura ambiente para luego hacer la coloración tradicional con Giemsa. Los micropreparados se examinaron con microscopio de luz en aumento de 10 y 100X, observando un número de metafases entre 20 y 100, evaluando el número cromosómico, la estructura y morfología para determinar anomalías estructurales o numéricas presentes en el complemento de los animales. Se fotografiaron las mejores metafases y se armaron los cariotipos.

RESULTADOS

Al análisis citogenético las cuatro yeguas presentaron mosaicismo sexual leucocitario 64,XX/63,XO en sus complementos cromosómicos. Figuras 1 y 2.

La yegua 0804 Criolla Colombiana de 10 años de edad, presentó el porcentaje de células anormales más bajo en la evaluación citogenética: 25% de células 63,XO con 59.78% de células 64,XX. Su condición fenotípica es normal, pero presenta celos irregulares luego de 2 años de haber parido su primera cría normal. Tabla 2.

La yegua 0104 Silla Francesa de 13 años y la Criolla Colombiano 0204 de 19 años de edad, presentaron porcentajes celulares anormales 63,XO de 30.61% y 43.47% con 69.38% y 56.53% de células 64,XX respectivamente. Son yeguas fenotípicamente normales que han presentado un historial reproductivo que incluye abortos y producción de crías inmaduras o con malformaciones que mueren o deben ser sacrificadas (tabla 1).

Tabla 1. Equinos experimentales y signos clínicos

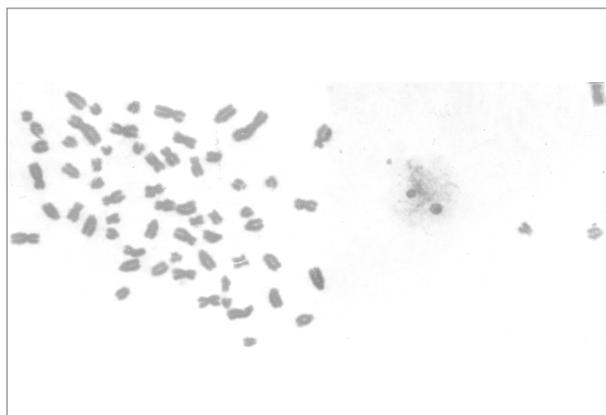
Código	Raza	Edad	Antecedentes clínicos
0104	Silla Francesa	13 años	Problemas para mantener preñez
0204	Criolla	19 años	Ha tenido 4 cría: primera normal, segunda y tercera sacrificadas por inmadurez, cuarta nace con laxitud de tendones y belfo
0804	Criolla	10 años	Una cría normal. Presentación irregular de celos, no ha vuelto a quedar preñada.
0904	Paso Fino Colombiano	4 años	Ovarios y aparato reproductor pequeños, menor alzada que la estándar

Tabla 2. Resultados de los análisis citogenéticos de los equinos experimentales.

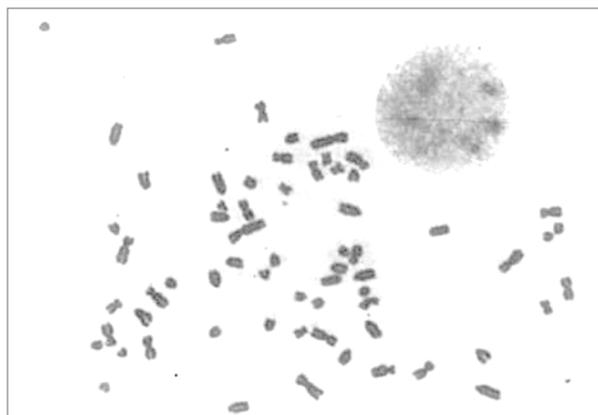
Código	Raza	Nº de Metafases	64,XX %	63,XO %	Diagnóstico
0104	Silla Francesa	49	69.38	30.61	Mosaicismo sexual leucocitario
0204	Criolla Colombiana	23	56.53	43.47	Mosaicismo sexual leucocitario
0804	Criolla Colombiana	92	59.78	25	Mosaicismo sexual leucocitario
0904	Paso Fino Colombiano	100	55	63	Mosaicismo sexual leucocitario

La yegua Paso Fino Colombiano 0904 presentó un 55% de células 64,XX y 63% de células anormales. Siendo este el porcentaje más alto de células 63,XO hallado en las cuatro hembras equinas. El fenotipo de esta

yegua corresponde a una alzada menor al estándar de la raza y presentación irregular de celos; a la palpación presentó ovarios y útero subdesarrollados (tabla 1).



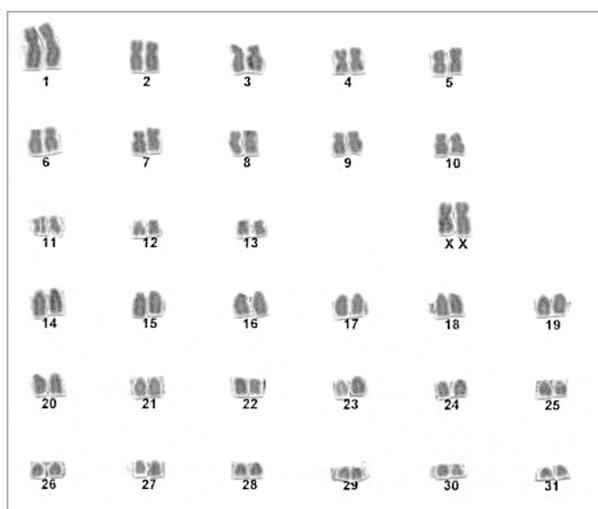
a



c



b



d

Figura 1. En (a), se observa una metafase en la que hace falta un cromosoma sexual X. La fotografía b es el cariotipo armado a partir de la primera metafase (a), en esta fotografía la fecha indica la ausencia de uno de los cromosomas sexuales (monosomía). La fotografía c() es de una de las metafases con complemento cromosómico completo, y (d) el Caripito que no presentó alteraciones numéricas ni estructurales con tinción con Giemsa. Las fotografías corresponden a una de las 4 yeguas en las que se diagnostico mosaicismo leucocitario 64XX/63,XO.

DISCUSIÓN

El mosaicismo sexual leucocitario (63,XO/64,XX) de las yeguas (ver tabla 1) no presentó un patrón fenotípico específico, convirtiéndose en un diagnóstico clínico difícil si no se realizan evaluaciones citogenéticas en individuos con índices reproductivos no satisfactorios, ocasionando pérdida económicas.

La relación entre el porcentaje de células anormales hallado en la evaluación cromosómica de cada una de las yeguas analizadas en relación con el grado de expresión fenotípica parece confirmar lo argumentado por Jiménez, (1996) ya que se observó que hay una correlación positiva, es decir, a mayor porcentaje de

células 63,XO, mayor expresión fenotípica del Síndrome de monosomía del X. Es el caso de la yegua 0409 que posee el mayor porcentaje de células anormales (63% de células 63,XO), el grado de afección observado en su fenotipo es muy semejante al expresado en yeguas con síndrome de Turner (100% de células 63,XO) es decir con ausencia total de uno de los dos cromosomas X en todas sus células.

En relación con el animal que posee el menor % de células 63,XO (25%), la yegua 0804, su descripción coincide con los patrones de presentación sugeridos por MacFeely (1990) en yeguas con este tipo de mosaicismo.

Finalmente en las yeguas que poseen un porcentaje intermedio de células anormales (30.61% y 43.47%), presentan abortos y producción de potros inviables, pero presentan una apariencia fenotípica y órganos reproductivos normales (MacFeely, 1990).

De esta forma, el comportamiento reproductivo en los animales domésticos es la característica de mayor importancia y a nivel individual la más sensible a los disturbios hereditarios según Giannoni (1988), por lo

tanto, las yeguas estudiadas que presentan alteraciones cromosómicas y fenotípicas en distinto grado son sensibles a exhibir alteración de sus parámetros reproductivos.

En cuanto al origen del mosaicismo, en los cuatro casos fue pos-cigótico, LeMaire-Adkins (1997) postula que el gran número de divisiones mitóticas que ocurren en etapas tempranas del clivaje embrionario, es muy vulnerable a errores de segregación cromosómica.

La viabilidad de estos cigotos es debida a la compensación de dosis génica que ocurre durante la etapa embrionaria en todas las hembras mamíferas, manifiesta por la inactivación de uno de los cromosomas X en forma aleatoria, convirtiéndose en la única monosomía viable en los animales mamíferos en general.

Las yeguas que fenotípicamente sean normales pero que lleguen a presentar fallas reproductivas, son susceptibles de evaluación citogenética debido a los hallazgos y para descartar entidades cromosómicas que conlleven a comportamientos de subfertilidad o esterilidad en animales seleccionados para programas de reproducción.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Giannoni M. L.; Lui J. F. 1988. Citogenética e sua aplicacao na selecao de reproductores equinos. JABOTICA-BAL.

Henao F.; Gomez G.; Villa F.; Uribe C. 2002. Estudio citogenético de una yegua mestiza estéril. Rev. MVZ vol.4 (1):28-33.

Jiménez R. L. M. 1996. Frecuencia de anomalías cromosómicas en equinos colombianos. Posgrados en Salud y Producción Animal. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá.

Jiménez R. L. 2000. La Citogenética en Medicina Veterinaria. Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia. Departamento de ciencias fisiológicas. Laboratorio de Citogenética. Universidad Nacional de Colombia. Sede Bogotá.

Macfeely R. A. 1990. Domestic Animal Cytogenetic. Vol 34. Academic Press. Inc.

Lee J.; Miyano T. and Moor R. M. 2000. Spindle formation and dynamics of alfa tubuline and nuclear mitotic apparatus protein distribution during meiosis in pig an mouse oocytes. Biology of Reproduction 62:1184-1192.

Lemaire-Adkins R. K. and Hunt P. A. 1997. Lack of checkpoint control at the metaphase/anaphase transitions a mechanism of meiotic nondisjunction in mammalian females. J. Cell. Biol. Vol, 139. Nº 7 dic 29.

Richer C. L.; Power M. M.; Klunder L. R.; Macfeely R. A. and Kent M. 1990. Standard karyotype of the domestic horse (*Equus caballus*). Hereditas 112:289-293.

Ronne M. Gyldenholm C. O. 1993. The RBG banded karyotype of *Equus caballus* at the 525 band stage. Hereditas 118:195-199.

Smith C. A. 2001. Theriogenology question of the month. Journal American Veterinary Medicine Animal, vol. 219 (6) sep 15.