



UNIUNEA EUROPEANĂ



GUVERNUL ROMÂNIEI
MINISTERUL MUNCII, FAMILIEI ȘI
PROTECȚIEI SOCIALE
AMPOSDRU



Fondul Social European
POS DRU 2007-2013



Instrumente Structurale
2007-2013



MINISTERUL
EDUCAȚIEI
CERCETĂRII
ȘI SPORTULUI
OIPOSDRU



USAMV
IAȘI

REZUMAT

Cuvinte cheie: *hermafrodit, pseudohermafrodit, porc, ovotestis, cariotip, cromatină, citogenetică, microscopie electronică, SEM, TEM.*

Teza de doctorat intitulată „*Morfologia aparatului genital la suinele intersexe*” a fost elaborată în cadrul Școlii Doctorale a Universității de Științe Agricole și Medicină Veterinară „*Ion Ionescu de la Brad*” din Iași, pe parcursul a patru ani de studii, în perioada 1 octombrie 2008 – 1 octombrie 2012 și este structurată, în conformitate cu prevederile legale actuale, în două părți principale: partea I-a intitulată „*Stadiul cunoașterii*”, cuprinde 52 pagini și reprezintă 31% și partea a II-a denumită „*Cercetări proprii*”, este extinsă pe 120 pagini și reprezintă 69%.

În **partea I-a**, structurată în patru capitole, sunt prezentate succint informații din literatura de specialitate consultată, referitoare la subiectul tezei, informații ce au fost folosite ulterior pentru interpretarea datelor obținute în partea a doua. Această parte este ilustrată de 7 figuri selectate ca fiind sugestive pentru a detalia informațiile sintetizate.

În primul capitol – „*Morfologia aparatului genital la suine*” este prezentată morfologia normală a aparatului genital; în subcapitolul ce prezintă morfologia aparatului genital mascul s-a insistat pe structura testiculului datorită faptului că la acest nivel apar cele mai importante modificări în fenomenul de intersexualitate.

Capitolul II – „*Determinismul sexelor și diferențierea sexuală*” tratează organogeneza aparatelor genitale din punct de vedere morfologic și genetic, punctând unele aspecte ce duc la apariția anomaliilor de dezvoltare a organelor implicate în reproducție – un important subcapitol al capitolului II este subcapitolul 2.3 în care sunt prezentate etapele cronologice în dezvoltarea normală a aparatului genital mascul și femel la suine.

Capitolul III – „*Citogenetica și cariotipul normal la suine*” prezintă date generale referitoare la structura și rolul cromatinei X și a cromozomilor, dar și cariotipul normal la suine, stabilit în 1988 de către *Comitetul de Standardizare a Cariotipului Porcului Domestic* sub conducerea lui Gustavsson.



UNIUNEA EUROPEANĂ



GUVERNUL ROMÂNIEI
MINISTERUL MUNCII, FAMILIEI ȘI
PROTECȚIEI SOCIALE
AMPOSDRU



Fondul Social European
POS DRU 2007-2013



Instrumente Structurale
2007-2013



MINISTERUL
EDUCAȚIEI
CERCETĂRII
ȘI SPORTULUI
OIPOSDRU



USAMV
IAȘI

În capitolul IV – „*Intersexualitatea la suine*” este tratat subiectul intersexualității la suine din punct de vedere morfologic și genetic, în toate formele sale de manifestare întâlnite în literatura de specialitate.

Partea a II-a este structurată în 7 capitole (cap. V - XI) și cuprinde: cap. V – „*Scop și obiective*”, cap. VI – „*Morfologia aparatului genital la suinele intersexe*”, cap. VII – „*Aspecte ecografice în intersexualitatea suină*”, cap. VIII – „*Histologia și histochimia aparatului genital în intersexualitatea suină*”, cap. IX – „*Aspecte ultramicroscopice în intersexualitatea suină*”, cap. X – „*Aspecte de citogenetică în intersexualitatea suină*” și cap. XI – „*Cariotipul suinelor intersexe*”, **concluziile finale** încheind această parte.

Lucrarea a fost efectuată pe cazuistica oferită de fermele particulare și din gospodăriile populației din județele Iași și Neamț, România, precum și din abatoarele din zona Gent, Belgia (în perioada 1 martie 2011 – 1 iunie 2011).

În capitolul V - „*Scop și obiective*” este motivată alegerea temei. Principalul scop al cercetării îl constituie descrierea morfologiei aparatului genital la suinele intersexe din punct de vedere anatomo-clinic, ecografic, morfologic, de ultrastructura și de citogenetică. Această nevoie de creare a unei monografii, o reprezintă lipsa datelor complete pe un număr mare de cazuri, articolele existente fie axându-se pe un caz și abordată problema prin maxim două aspecte, fie mai multe cazuri analizate dintr-un singur punct de vedere.

Astfel, obiectivele principale și activitățile corespunzătoare ale tezei au fost prestabilite în comun acord cu conducătorul științific al tezei de doctorat și au fost reprezentate de:

- descrierea fenotipică a animalelor și modul prin care acestea pot fi identificate într-un efectiv și eliminați de la reproducție;
- încercarea de stabilire a unui diagnostic rapid și corect a intersexualității prin utilizarea examenului ecografic;
- descrierea anatomică a aparatului genital în toate formele de manifestare a intersexualității;
- evidențierea unor aspecte histologice și histochimice ale gonadelor și ale căilor genitale prin efectuarea de preparate histologice permanente, atât pe secțiuni la parafină cât și pe secțiuni la gheață;
- descrierea unor aspecte de ultrastructură ale gonadelor și unele segmente ale căilor genitale, aspecte ce nu au fost regăsite în literatura de specialitate consultată;
- stabilirea sexului genetic al unor astfel de indivizi prin teste rapide (testul cromatinei X) ce poate fi efectuat și în condiții de teren dar și prin efectuarea cariotipului.

Capitolele din partea II-a încep cu descrierea materialului de lucru și a metodelor utilizate

pentru realizarea cercetărilor, și toate fotografiile părții a două sunt originale, realizate în cadrul laboratoarelor unde s-au efectuat cercetările.

Pentru realizarea capitolului VI – „*Morfologia aparatului genital la suinele intersexe*” cazuistica a provenit atât de la fermele de porci din județele Iași și Neamț precum și din abatoare, și a fost reprezentată de animale vii, respectiv de aparate genitale.

Porcii vii au fost crescuți în sistem semi-intensiv, în cadrul Clinicilor de „*Reproducție*” și „*Medicală*” de la Facultatea de Medicină Veterinară Iași. Din cele 15 cazuri de aparate genitale provenite de la porci intersecși, 7 au fost hermafrodiți adevărați și 8 au fost pseudohermafrodiți de tip mascul. Din cele 7 cazuri de hermafrodiți adevărați, 4 s-au demonstrat a fi hermafrodiți adevărați bilaterali și 3 hermafrodiți adevărați alterni. Ca metode de lucru s-a folosit inspecția ce a constat în observarea animalelor și a semnelor clinice; și palpația, ce constă în perceperea tactilă a suprafeței inghinale, scrotale și vulvare a acestora.

Toate cazurile studiate din punct de vedere anatomic au fost clasificate ca fiind hermafrodiți adevărați și pseudohermafrodiți de tip mascul. Unul dintre subiecții vii de hermafrodiți adevărați a prezentat o hernie bilaterală, vulva și orificiului vulvar bine evidențiat și funcțional, dar și două pungi scrotale cu rafeu median vizibil. La palpația scrotumului, nu s-a observat prezența testiculele ci o masă fluctuantă de lichid, evidențiindu-se mai apoi la examenul ecografic aceeași acumulare de lichid. La sacrificarea animalului, s-a observat că aparatul genital era format din două formațiuni cu un ușor aspect muriform ce ar corespunde gonadelor, atașate de aparatul genital prin două canale lungi și subțiri, ce ar corespunde macroscopic coarnelor uterine, uterului și cervixului.

Următoarele cazuri de hermafrodiți adevărați bilaterali au fost reprezentate de aparatele genitale provenite de la două cazuri din crescătorii particulare din Belgia și au fost observate ca anomalii la sacrificare. Un caz a fost reprezentat de gonadele și unele segmente ale aparatului genital de la un subiect în vârstă de 7 luni recoltate în condiții de teren, numai pentru examen histopatologic, aspectul macroscopic neputând fi prezentat. Ambele aparate genitale recoltate din abatoare erau alcătuite din gonade, coarne uterine specifice scroafelor, uter, cervix, vagin și vestibul vaginal cu clitoris mai mult sau mai puțin dezvoltat.

În ceea ce privește tipul de hermafroditism adevărat altern, cazurile au fost reprezentate doar de aparate genitale provenite din abatoare. Acestea erau alcătuite din căi genitale femele și ca gonade într-o parte prezentau ovar și în partea cealaltă prezentau testicul, de diferite mărimi și forme. Legătura dintre testicul și aparatul genital se realiza la nivelul epididimului cu pavilionul trompei uterine.

Primele trei cazuri de suine pseudohermafrodite de tip mascul au fost reprezentate de

subiecți vii proveniți din ferme de suine de pe raza Județului Iași. Pe aceștia s-au realizat studii anatomoclinice, ecografice, genetice și histopatologice.

Primul caz de pseudohermafrodit a avut aspectul clasic al aparatului genital pentru această stare de intersexualitate (testicule drept gonade și căi genitale femele), celelalte două cazuri fiind atipice. Un caz a prezentat două testicule mici acoperite de epididim, foarte dezvoltat în comparație cu țesutul testicular. De la cele două testicule porneau două canale deferente, ce scădeau în diametru, și care pe măsură ce se apropiau de vestibulul urinar tindeau să se unească. La acest caz s-a remarcat și un rudiment de glandă accesorie masculină. Celălalt caz prezenta fenotipul diferit comparativ cazurilor anterioare de animale vii, prin prezența la exterior a unui scrotum în poziție normală, bine dezvoltat, ce la palpare prezenta formațiuni asemănătoare testiculelor. Între cele două testicule, pe linia mediană a scrotumului era prezenta vulva cu piele moale și zbârcită, cu aspect peniform, clitorisul exteriorizat lipsind. Următoarele cazuri de pseudohermafrodiți de tip masculin au fost analizate histologic în cadrul Facultății de Medicină Veterinară din Gent, Belgia și au fost reprezentate de aparate genitale provenite din abatoare, structurate din testicule drept gonade și căi genitale orientate spre sexul femel, în unele cazuri existând și rudimente de glande accesorii masculine.

Cazul de suin intersex tineret a fost obținut de la o fermă de suine din Județul Iași. Aparatul genital era compus din căi genitale femele, rectilinii și se uneau într-un uter scurt iar gonadele erau reprezentate de două formațiuni ovale, mici, acoperite de țesut conjunctiv, și de o structură asemănătoare epididimului, nefiind posibilă o demarcație clară între acesta și testicul.

Capitolul VII – “*Aspecte ecografice în intersexualitatea suină*” a fost realizat în încercarea de a determina tipul stării de intersexualitate, de a observa ecografic morfologia aparatelor genitale în cazul suinelor intersexe dar și evoluția topografiei acestora la tineretul suin. Examenul ecografic s-a realizat pentru trei cazuri, cu ajutorul ecografului *Aloka Prosound 2* în cadrul clinicilor de „*Medicală*” și „*Reproducție*” a Facultății de Medicină Veterinară, Iași.

Cazul ce prezenta hernie abdominală, la examenul ecografic, traiectul inghinal prezenta aceeași acumulare de lichid ca și pungile testiculare. Aceeași cantitate însemnată de lichid s-a semnalat și în bursele testiculare în locul testiculelor acesta având aspect anecogen. În zona herniei abdominale s-au observat două formațiuni cu o structură muriformă asemănătoare ecografic ovarului.

La toate celelalte cazuri, ecografic, parenchimul testicular apare omogen redând o imagine de o ecogenitate medie. Testiculele au apărut înconjurate de o linie hiperecogenă reprezentând albuginea. Tot la ecografierea gonadelor s-a observat și prezența plexului pampiniform atât în apropierea testiculului, atașat de acesta, cât și atașat coarnelor uterine.

Pentru capitolul VIII – „*Histologia și histochimia aparatului genital în intersexualitatea suină*” cercetările au fost realizate pe aparatele genitale a 13 cazuri de suine intersexe adulte.

Activitatea de cercetare s-a desfășurat în cadrul laboratorului de „*Biologie celulară, histologie și embriologie*”, al Facultății de Medicină Veterinară, Iași și „*Departamentului de Morfologie*” din cadrul Facultății de Medicină Veterinară Gent, Belgia.

Preparatele au fost examinate în cadrul Laboratorului de cercetare „Victoria Zinca” din cadrul Disciplinei de „*Biologie celulară, histologie și embriologie*”, Facultatea de Medicină Veterinară Iași, la microscopul optic *Motic B1-211A* cu camera video *Moticam 1000* atașată și la microscopul *Olympus BX61* cu cameră *Olympus DP50* atașată, din cadrul „*Departamentului de Morfologie*” de la Facultatea de Medicină Veterinară, UGent, Belgia.

În cadrul hermafroditismului adevărat altern și bilateral, s-a observat că ovarul este acoperit la exterior de tunica albuginee, reprezentată de țesut conjunctiv delicat și că acesta își îndeplinește funcția exocrină, prin prezența în zona corticală a foliculilor ovarieni în diferite stadii de dezvoltare – de la foliculi primari până la corpi luteali în curs de formare sau deja formați. Zona medulară a ovarului era formată din țesut conjunctiv, bogat în fibre elastice și fibre de reticulină și conținea vase sangvine de diferite calibre. Cavitățile foliculare s-au observat pline cu lichid în cantitate scăzută, astfel că pereții foliculari nu sunt ținuți sub tensiune creându-se astfel foliculi plisați. Ei apar cu un lumen neregulat, cu celulele tecii interne hipertrofiate și spațiu bine delimitat între teaca internă și teaca externă. Ca semne ale atreziei foliculare s-au remarcat foliculi rămași în diferite faze de dezvoltare. După ovulația foliculului, în zona corticală a ovarului se evidențiază corpul luteal, cu aspect glandular.

Din punct de vedere histologic, testiculul din hermafroditismul adevărat altern și pseudohermafroditismul de tip masculin este înconjurat de o albuginee groasă, vascularizată, formată din țesut conjunctiv ce trimite în interior septele fine conjunctivo-vasculare, ce împart testiculul în lobi și lobuli. Testiculul conținea atât compartimentul exocrin cât și compartimentul endocrin. Compartimentul exocrin este reprezentat de tubi seminiferi, de diferite mărimi și forme în secțiunile histologice. În ceea ce privește structura epiteliului seminal acesta este format numai din celule Sertoli, cu nucleu ovalar sau rotund. Pentru a demonstra acest lucru, s-au utilizat două colorații specifice (Feulgen și Lillie), ce indică activitatea mitotică din celulele în diviziune și anume din celulele liniei seminale. La aceste colorații, reacția epiteliului seminal a ieșit negativă, nu s-au observat aceste celule seminale, evidențiindu-se doar nucleul celulelor Sertoli, pe lamina bazală. Datorită lipsei celulelor seminale din tubii seminiferi, aceștia prezintă un spațiu tridimensional, amplu, unde citoplasma celulelor Sertoli apare vacuolizată.

Compartimentul endocrin reprezentat de glanda Leydig, s-a remarcat bine individualizat,

printre tubii seminiferi, format din celule poligonale cu nucleii veziculoși printre care se găsesc și capilare sangvine de tip sinusoid.

La cazul VII s-au observat atât macroscopic cât și microscopic porțiuni eractice ale testiculului. Acestea erau reprezentate de zone testiculare dezvoltate în afara tunicii albuginee și acoperite la rândul lor de o capsulă subțire formată din țesut conjunctiv. Tubii seminiferi erau situați imediat sub tunica albuginee ce îi învelea și erau formați la rândul lor doar din celule Sertoli.

Pentru confirmarea faptului că tubii seminiferi conțin numai celule Sertoli, în cadrul Laboratorului de cercetare de *Biologie celulară, histologie și embriologie* de la FMV Iași s-au efectuat secțiuni la gheață, cu grosimea de 10 μm și colorarea acestor. Lipidele secretate de celulele Sertoli reprezintă produsul cel mai important cu rol în nutriția celulelor liniei seminale și în procesul de spermatogeneză și s-au evidențiat în toate cele trei colorații utilizate (Sudan IV, Red Oil și Nile Blue).

În cazurile de hermafrodiți adevărați bilaterali, foliculii ovarieni cavitari sunt separați de structura testiculară de o albuginee groasă. La toate cazurile zona testiculară era net mai dezvoltată comparativ cu zona ovariană.

În cadrul tubilor seminiferi din zona testiculară a ovotestisului, s-a evidențiat vacuolizarea intensă a citoplasmei celulelor Sertoli. Celulele Leydig prezintă un polimorfism accentuat și sunt localizate sub formă de plaje în spațiul angular delimitat de tubii seminiferi. La acestea se remarcă marcajul sexual de tip heterocromatina facultativă gonozomică X, aspect ce oferă indicii asupra sexului genetic al indivizilor.

În cazurile de intersexualitate, unde în locul ovarelor au existat testicule sau ovotestisuri, joncțiunea dintre acestea și căile genitale s-a realizat la nivelul epididimului cu salpinxul, iar de la nivelul cozii epididimului, canalul deferent pornea cu traiect paralel cu coarnele uterine.

Calibrul canalului deferent atât macroscopic cât și microscopic s-a remarcat a fi de diferite dimensiuni.

Coarnele uterine, cu aspect intestiniform din punct de vedere macroscopic, prezentau endometru gros al cărui epiteliu era structurat din celule secretoare și puține celule ciliate. Mucoasa cervixului a apărut cu pliuri de diferite înălțimi, imprimând lumenului un aspect dantelat. În interiorul lumenului nu s-a remarcat secreție sau filamente de mucus semn, al unei activități secretorii reduse din partea celulelor caliciforme granulate. Glandele cervicale din lamina propria erau rudimentare, fără activitate secretorie.

Clitorisul prezintă două zone bine delimitate, una vasculară cu numeroase vase sangvine ce irigă clitorisul și una senzitivă cu terminații nervoase senzoriale și vegetative, corpusculi

senzitivi genitali (Meissner, Krause, Vater Paccini). Prepuțul clitoridian reprezintă continuarea mucoasei vestibulului vaginal și cuprinde corpusculi genitali și limfonoduli.

Glandele seminale au fost observată macroscopic și histologic doar la două cazuri, în grosimea mucoasei vaginale și cervicale. Celulele secretoare prezintă nucleu veziculos iar țesutul conjunctiv dintre cavități este foarte intens vascularizat împărțind glanda în lobi. Citoplama celulelor este clară semn al unei activități secretorii scăzute.

Din cele 13 cazuri analizate histopatologic, glanda prostată a fost întâlnită macroscopic ca rudiment al glandei masculine în două cazuri (caz IX și X). Histologic, glanda a apărut împărțită în lobuli de septe de țesut conjunctiv fin și leiocite, spațiul angular dintre aceștia apărând intens vascularizat. Acinii prostatici s-au evidențiat cu lumen larg și neregulat, cu aspect de labirint, formați din epiteliu simplu cu celule bazale (de înlocuire) și celule secretoare prismatice.

Glandele bulbouretrale s-au observat macroscopic numai la cazul al X lea, înconjurând vestibulul vaginal, fiind la rândul lor înconjurate de către mușchiul bulbouretral. Glanda era împărțită în lobuli prin septe de țesut conjunctiv fin. Acinii erau în diferite stadii de secreție fiind astfel de diferite mărimi. Cel de-al doilea caz unde s-a sesizat prezenta glandei bulbouretrale a fost tot un pseudohermafrodit de tip mascul – cazul VIII, iar aceasta s-a prezentat histologic în grosimea mucoasei vaginale, sub forma de insule, structurate în lobi cu acini glandulari de diferite mărimi ce ar indica fazele secreției .

Pentru un studiu morfologic cât mai exact, la două cazuri (VI și IX) s-au efectuat examene de ultramicroscopie, rezultatele fiind prezentate în capitolul IX – „*Aspecte ultramicroscopice în intersexualitatea suină*”, pentru a se observa ultrastructura în hermafroditismul adevărat cât și în pseudohermafroditismul de tip mascul. Piesele destinate realizării investigațiilor electrono-microscopice au fost prelucrate în cadrul laboratorului de „*Anatomie patologică*” al Facultății de Medicină Veterinară Iași. Investigațiile ultramicroscopice au fost efectuate cu ajutorul microscopului în baleiaj *Jeol JSM 5600 – Scanning Electron Microscope* din cadrul „Departamentului de Morfologie” al Facultății de Medicină Veterinară, Gent, Belgia și cu ajutorul microscopului electronic cu transmisie *Jeol Jem 1010 – Electron Microscope* din cadrul „Centrului de Microscopie Electronică” UBB, Cluj-Napoca și preluate cu ajutorul programului *AnalySIS Soft Imaging Software*.

În microscopia în baleiaj pe hermafrodiți adevărați s-a remarcat faptul ca stratul muscular aferent coarnelor uterine este mai dezvoltat decât în cazul uterului. Mucoasele celor două structuri sunt compuse din celule ciliate și celule secretorii, suprafața mucoasei oviductului fiind mai bogată în celule ciliate și celule secretorii neciliate (față de mucoasa uterină). Unele dintre

celulele secretorii ale uterului au fost surprinse în faze diferite ale secreției, astfel încât suprafața unor celule prezintă o decapitare cu eliminarea veziculelor secretorii.

Ultrasecțiunile prin testicul au demonstrat faptul că glanda Leydig este mai dezvoltată, în detrimentul tubilor seminiferi. Glanda interstițială este formată din celule poligonale, cu nuclei în diferite faze. În celulele Leydig normale, în secțiunile ultrafine, s-a distins un reticul endoplasmic neted (agranular) abundent, în totalitatea masei citoplasmice apărând ca anastomoze de formațiuni tubulare și veziculoase.

Ultrastructural, se reconfirmă faptul că tubii seminiferi, în intersexualitatea suină sunt alcătuiți dintr-un singur tip de celule – celulele Sertoli. Citoplasma celulelor apare vacuolizată, cu vacuole de diferite mărimi – semn de degenerescență celulară. Ca organite, cel mai frecvent s-a observat reticulul endoplasmic rugos ce vehiculează substanțele necesare de aici rolul trofic important al celulelor Sertoli. În compartimentul bazal, în apropierea laminei bazale, în zona joncțiunii dintre două celule Sertoli s-au observat filamente de actină, filamente ce asigură legăturile strânse dintre cellule. Acestea se găsesc frecvent la periferia celulelor unde sunt ancorate prin diferite proteine astfel încât să se poată realiza joncțiunea dintre celule.

Pentru determinarea sexului genetic al unor astfel de indivizi s-a realizat un test rapid – testul cromatinei X – capitolul X – „*Aspecte de citogenetică în intersexualitatea suină*”. Cromatina X oferă informații privind numărul cromozomilor sexuali pentru stabilirea sexului genetic sau a anomaliilor numerice gonozomiale. Determinarea cromatinei X s-a realizat pe frotiuri, de pe mucoasa orală și vaginală, atât pe animalul în viață dar și imediat după sacrificare pentru a putea confirma diagnosticul inițial, și prin efectuarea de frotiuri din sânge pentru determinarea drumstick-ului. Colorarea și interpretarea lamelor a avut loc în cadrul laboratorului de „*Biologie celulară, histologie și embriologie*”, al Facultății de Medicină Veterinară, Iași și „*Departamentului de Morfologie*” din cadrul Facultății de Medicină Veterinară Gent, Belgia.

La toate cazurile la care s-a efectuat testul cromatinei X, prin cele trei metode descrise, acesta a ieșit pozitiv, atât în celulele mucoaselor bucale și vaginale cât și în celulele neutrofile din frotiurile sangvine - fapt ce sugerează existența a doi cromozomomi X dar nu exclude existența cromozomilor Y.

Pentru a confirma faptul că nu există cromozomul Y în plus, în capitolul X – „*Cariotipul suinelor intersexe*” s-a efectuat cariotipul atât prin colorarea uniformă a cromozomilor cât și prin bandarea „G”. Acest test a demonstrat că sexul tuturor cazurilor de intersecși este femel, cu o constituție cromozomială de 38,XX.