

ANÁLISE CITOGENÉTICA DE BOVINOS DA RAÇA PARDO-SUIÇA¹

RITA MARIA LADEIRA PIRES², CRISTINA CORSI DIB², KEILA MARIA RONCATO DUARTE³, JACKSON BARROS DO AMARAL²,
MARIANA SANTOS DE MIRANDA⁴

¹Recebido para publicação em 13/09/10. Aceito para publicação em 30/12/10.

²Laboratório de Biotecnologia Aplicada à Produção Animal, Centro de Pesquisa e Desenvolvimento em Genética e Reprodução Animal (CPDGRA), Instituto de Zootecnia (IZ), Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios (APTA), Secretaria de Agricultura e Abastecimentos do Estado de São Paulo (SAA), Rua Heitor Penteadó 56, Centro, CEP 13460-000, Nova Odessa, SP, Brasil. E-mail: pires@iz.sp.gov.br

³Centro de Pesquisa e Desenvolvimento em Forragicultura e Pastagens, IZ, APTA, SAA, Rua Heitor Penteadó 56, Centro, CEP 13460-000, Nova Odessa, SP, Brasil.

⁴Centro de Análise e Pesquisa Tecnológica do Agronegócio de Bovinos de Leite (CAPTA - Bovinos de Leite), IZ, APTA, SAA, Rua Heitor Penteadó 56, Centro, CEP 13460-000, Nova Odessa, SP, Brasil.

RESUMO: Em 1985 o plantel de bovinos da raça Pardo-Suíça do Instituto de Zootecnia, da Secretaria da Agricultura e Abastecimento de São Paulo (SAA/SP), APTA, foi analisado citogeneticamente e verificado a presença de translocação Robertsoniana 1/29, anomalia está relacionada com a redução da fertilidade. Neste plantel foi detectado também quimerismo 60,XX/60,XY em fêmeas "freemartin" e em macho gêmeo. O presente estudo teve como objetivo analisar a incidência de anomalias cromossômicas, em animais da raça Pardo-Suíça, descendentes daqueles cariotipados anteriormente. Após 25 anos, 127 bovinos sendo 97 fêmeas e 30 machos, progênes do plantel anterior foram cariotipados através de metafases obtidas de cultura de linfócitos de sangue periférico. O número diplóide típico dos bovinos de $2n=60$ e o cariótipo constituído de 58 autossomos acrocêntricos e dois cromossomos X submetacêntricos foram confirmados em 94 fêmeas, e em 27 machos o complemento sexual formado por um cromossomo X e um Y, ambos submetacêntricos, mas de tamanhos diferentes. Quatro fêmeas nascidas de partos gemelares com machos foram cariotipadas, três apresentaram quimerismo 60,XX/60,XY em suas células sanguíneas (uma com 25,8% de células femininas (XX) e 74,2% de células masculinas (XY); outra 10% de células XX e 90% de XY e a terceira 50% de células de cada tipo), masculinização dos órgãos genitais, sendo diagnosticada como freemartismo e descartadas do plantel por serem consideradas estéreis. Seus três irmãos também apresentaram cariótipos 60,XX/60,XY. Duzentos e cinco células foram analisadas da outra fêmea gêmea, e apenas células tipo 60,XX foram encontradas, sendo diagnosticada como normal, seu irmão gêmeo apresentou somente células 60,XY. Análise citogenética é um método seguro para diagnóstico de freemartismo em fêmeas bovinas gêmeas com macho, fornecendo a oportunidade ao produtor de retirar portadores de quimerismo, do processo reprodutivo, diminuindo eventuais prejuízos com o manejo de animais estéreis. Translocação Robertsoniana não foi detectada em nenhum animal analisado.

Palavras-chave: anomalia cromossômica, bovinos gêmeos heterossexuais, cariótipo, quimerismo 60,XX/60,XY

BROWN SWISS CATTLE CYTOGENETIC ANALYSIS

ABSTRACT: At 1985, a Brown Swiss herd from the Institute of Animal Science and Pastures, APTA/SAA was cytogenetically analyzed and 1/29 Robertsonian translocation was observed. Such anomaly is related to fertility reduction. Quimeric abnormality such as 60,XX/60,XY in freemartin females. This study aimed to evaluate the incidence of chromosomal abnormalities in Brown Swiss animals, descending from herd karyotyped earlier. After 25 years, 127 animals (97 females and 30 males) from this herd were karyotyped by metaphases obtained from blood lymphocyte cultures. The typical diploid number $2n=60$, 58 acrocentric and two X submetacentric chromosomes were

confirmed in 94 females and in 27 males the sexual complement X and Y, both submetacentric, although from different sizes. Four females from gemelar parturition whit males were karyotyped. Three of them presented quimerism 60,XX/60,XY (one with 25.8% of female cells (XX) and 74.2% male cells (XY); one another with 10% of cells XX e 90% of XY and the third with 50% of each type) showing genital masculinization, diagnosed as freemartism and discarded from herd. Two hundred and five cells were analyzed from another female twins and only 60,XX cells were found, diagnosed as normal. His sister also were normal (60,XY). The another three males were also analyzed from gemelar heterosexual parturition, with karyotype 60,XX/60,XY. Cytogenetic analysis are a safe methodology for freemartin abnormalities identification in female bovine twins with male bovine, giving the opportunity of selecting fertile animals, avoiding loses in the management of sterile animals. Robertsonian's translocation was not observed in any of the animals analyzed.

Key words: chromosomal abnormalities, heterosexual bovine twins, karyotype, 60,XX/60,XY chimerism

INTRODUÇÃO

Na nossa pecuária são poucas as iniciativas que objetivam avaliar a integridade do material genético e relacioná-la com perdas gestacionais ou subfertilidade (ADAM *et al.*, 2005). A citogenética é a área da genética que permite avaliar os cromossomos, identificando possíveis anomalias estruturais ou numéricas, dando a oportunidade de descartar animais indesejáveis da produção animal. No caso específico dos bovinos, a constituição cromossômica exerce efeito marcante sobre a fertilidade. A ocorrência da translocação Robertsoniana 1/29 tem sido relacionada com redução da fertilidade, associada à morte embrionária.

A síndrome de freemartismo é provavelmente a mais frequente anomalia que afeta o desenvolvimento do aparelho genital das fêmeas bovinas, a qual ocorre quando o parto é gemelar heterossexual, e apresentam quimerismo 60,XX/60,XY em suas células sanguíneas e vários graus de masculinização (Pires *et al.*, 2009; Khan e Foley, 1994; Alaix *et al.*, 2005; Padula, 2005; Peretti *et al.*, 2008).

O freemartismo não é observado em espécies múltiparas, possivelmente devido ao tipo de placentação. Na fêmea bovina, a síndrome desenvolve-se devido a fusão dos córios e a ocorrência de anastomose vasculares entre os fetos, quando a gônada ainda apresenta caráter indiferenciado, devido a troca de células entre os gêmeos, que passam a apresentar constituição cromossômica quimérica (60,XX/60,XY) em ambos, em uma percentagem em torno de 90% dos partos gemelares (KHAN e FOLEY, 1994; GORDON, 1999; VALDOVINOS *et al.*, 2000).

Dentre os vários métodos que permitem ou auxi-

liam o diagnóstico de animais com freemartismo destacam-se exame clínico (Beane, 2007), cariotipagem (KANAGAWA *et al.*, 1965; Pires *et al.*, 2009); detecção do antígeno HY (WACHTEL *et al.*, 1980); por hibridização *in situ* de fluorescência -FISH (SOHN *et al.*, 2007); ou reação em cadeia de polimerase (FUJISHIRO *et al.*, 1995).

O presente estudo teve como objetivo avaliar a incidência de anomalias cromossômicas em um plantel de bovinos da raça Pardo-Suíça, do Instituto de Zootecnia, descendentes de animais cariotipados anteriormente.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram analisados cariótipos de 127 bovinos da raça Pardo-Suíça (97 fêmeas e 30 machos) pertencentes ao rebanho do Instituto de Zootecnia da Secretaria da Agricultura-APTA, Nova Odessa, SP. O estudo dos cariótipos foi realizado em metáfases obtidas de cultura de linfócitos de sangue periférico, de acordo com a técnica de MOORHEAD *et al.* (1960), com algumas modificações, como descrita a seguir:

Amostras de sangue foram coletadas assepticamente em tubos a vácuo estéreis e heparinizados com capacidade para 9 mL, por meio de punção da veia jugular. Após a coleta, os tubos foram centrifugados por 40 minutos a 400 rpm. A camada de glóbulos brancos formada foi retirada com o auxílio de seringa estéril acoplada a agulha. Em casos de amostras com pequena quantidade disponível, o procedimento foi realizado com sangue total. Vinte e duas gotas do creme leucocitário (ou do sangue total) foram distribuídas em frasco de cultura, preparado com 4 mL de meio MEM (EARLE), 1 mL de soro fetal bovino e 0,1 mL de

fitohemaglutinina e antibióticos. Dois frascos de cultura por animal foram incubados a 38°C. Após 71 horas, 0,1 mL de solução de 0,0016% de colchicina foi adicionada a cada frasco, que foi incubado por mais uma hora.

Posteriormente, o material foi centrifugado por 8 minutos a 800 rpm e o sobrenadante desprezado. A hipotonização das células foi feita pela adição de solução de 0,075 M de cloreto de potássio e incubação por oito minutos, seguida pela fixação com metanol: ácido acético (3:1) recém-preparado, pela centrifugação e descarte do sobrenadante até a obtenção de material convenientemente lavado e fixado. Finalmente, 0,5 mL de fixador foi acrescentado e o material mantido na geladeira por duas horas, antes do preparo das lâminas.

Sobre lâminas limpas, mantidas no congelador, foram pingadas 5 a 8 gotas de suspensão. As lâminas foram secas sobre a chama de uma lamparina e estocadas por, pelo menos, 24 horas. As preparações

citológicas foram coradas com uma solução de Giemsa a 3%, preparada com tampão fosfato pH 6,8, durante 8 minutos. Aproximadamente 28 metáfases foram analisadas por animal nascido de parto simples, em média de 100 para os gêmeos, ao microscópio óptico com objetiva de imersão (100X). Os cromossomos foram desenhados, observando-se seu número e morfologia. As melhores metáfases foram fotografadas e copiadas para montagem do cariótipo.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise dos cromossomos foi realizada em torno de 28 células por bovino da raça Pardo-Suíça, nascido de parto simples (119) perfazendo um total de 3329 células, oito bovinos nascidos de partos gemelares heterossexuais também foram analisado. Em 121 animais foi confirmado o número diplóide típico dos bovinos ($2n=60$), com a constituição 60,XX para as fêmeas (94) e 60,XY para os machos (27). Em seis animais nascidos de partos gemelares (3 fêmeas e 3 machos) foram observados quimerismo 60,XX/60,XY, Tabela 1.

Tabela 1. Ocorrência de anomalias cromossômicas em bovinos da raça Pardo-Suíça analisados nos períodos de 1980 a 1985 e 2005 a 2009

Ano	Animais cariotipados	Animais gêmeos	Animais com cariótipo normal (60,XX ou 60,XY)	Animais com anomalias cromossômicas	
				Quimerismo 60,XX/60,XY	tR1/29
1980 a 1985	80	3 (2f;1m)	75	3 (2f; 1m)	2
2005 a 2009	127	8 (4f; 4m)	121	6 (3 f ; 3 m)	0

f= fêmea m=macho tR1/29=translocação Robertsoniana 1/29

A porcentagem de gestações gemelares em bovinos depende da raça; nas leiteiras varia de 1,3% na raça Jersey, 3,4% na Holandesa, até 8,9% de incidência na Pardo-Suíça, segundo RUTLEDGE (1975), no plantel estudado considerando os nascimentos entre 1991 a 2009, em 413 partos ocorreram 3,2% de gemelares, Tabela 2. Nos Estados Unidos registraram-se, aproximadamente, 200000 nascimentos de gêmeos de bovinos, destes 93000 são gêmeos heterossexuais, o que origina cerca de 86000 casos de "freemartin" ao ano (DE LUCA e DULOUT, 2010).

Dos oito animais (quatro fêmeas e quatro machos) nascidos de partos gemelares heterossexuais analisados, três fêmeas apresentaram quimerismo 60,XX/60,XY (uma com 25,8% de células femininas (XX) e 74,2% de células masculinas (XY); outra com 10 % de XX e 90 %de XY e a terceira com 50% de células

de cada tipo), masculinização dos seus órgãos genitais, sendo diagnosticada como freemartismo e descartadas do plantel por ser estéreis. A síndrome do freemartismo é provavelmente a mais frequente anomalia do desenvolvimento do aparelho genital das fêmeas bovinas, ocorre em bovinos e raramente em outras espécies. Corresponde a fêmeas estéreis nascidas de partos gemelares heterossexuais, apresentando quimerismo 60,XX/60,XY nas células sanguíneas e vários graus de masculinização (KHAN e FOLEY, 1994; PADULA, 2005; SOHN *et al.*, 2007; PERETTI *et al.*, 2008; PIRES *et al.*, 2009). O freemartismo é raramente observado em outras espécies pluríparas, provavelmente devido ao tipo de placentação. Nestas espécies frequentemente há fusão dos envoltórios coriônicos, porém, as anastomoses são raras ou ocorrem após o período da diferenciação gonadal do feto e, assim, não provocam alterações fenotípicas (ENNIS *et al.*, 1999).

Tabela 2. Relação de nascimentos de partos gemelares e simples em um plantel da raça Pardo-Suíça no período de 1991 a 2009

Sexo	Partos gemelares (pg)			Total pg	Parto simples (ps)		Total ps	Total p
	m X m	f X f	m X f		m	f		
	2	7	4	13 (3,2%)	222(55,5%)	178(44,5%)	400(96,8%)	413

m= macho f=fêmea p=partos

Da outra fêmea gêmea foram analisadas duzentos e cinco células, e apenas células tipo 60,XX foram encontradas, sendo diagnosticada como normal, neste caso é esperado que apenas 10% das fêmeas bovinas nascidas de parto gemelar com macho sejam normais. Esta fêmea atingiu a maturidade, apresentando características de fêmea normal inclusive parindo com aproximadamente 30 meses de idade, sugerindo que anastomoses vasculares não ocorreram neste animal. Seu irmão, também, não apresentou quimerismo em análise de 145 células, somente células do tipo 60,XY.

Três machos irmãos das "freemartin" também apresentaram células femininas e masculinas. O efeito do quimerismo 60,XX/60,XY nos touros nascidos de gestação gemelar com fêmea é discutido, na maioria das vezes, as estruturas gonadais não são afetadas, mas há citações, de redução de fertilidade devido a diminuição da motilidade e concentração de espermatozoides, e também desequilíbrio na proporção de sexo na progênie, ou mesmo esterilidade (DUNN *et al.*, 1979; KHAN e KOLEY, 1994). Vale FILHO *et al.* (1983), observaram que o processo de espermatogênese em touros gêmeos dizigóticos é retardado quando comparados com animais nascidos de partos simples, estes autores observaram ainda a presença de células XX nas gônadas de tourinhos gêmeos heterossexuais, e que as mesmas eram capazes de entrar em processo de meiose.

A translocação Robertsoniana 1/29 (tR1/29) é constituída pela fusão de dois cromossomos acrocêntricos, pela região centromérica, originando um novo cromossomo submetacêntrico e consequente diminuição do número diplóide. Esta anomalia não afeta o fenótipo, mas vários autores fazem referência aos efeitos negativos sobre a redução da fertilidade, associando à mortalidade embrionária. Em 1985 o plantel de bovinos da raça Pardo-Suíça, do Instituto de Zootecnia, foi analisado citogeneticamente e verificado a presença de translocação Robertsoniana 1/29 (PIRES *et al.*, 1985). Diante desta situação um programa foi seguido: to-

dos os produtos de fêmeas portadoras de tR1/29 eram analisados citogeneticamente e os portadores descartados dias após o nascimento (década de 80 e 90), estes animais não foram considerados no presente estudo. Em análise recente (2005 a 2009) dos animais do plantel da raça Pardo-Suíça do Instituto de Zootecnia, não foi detectada a presença de translocação Robertsoniana (Tabela 1), indicado um bom manejo quanto a esta anomalia.

Translocação Robertsoniana e quimerismo 60,XX/60,XY são as anomalias cromossômicas encontradas mais frequentemente nos bovinos. Sendo importante o uso da análise citogenética como ferramenta auxiliar na verificação da integridade genética.

CONCLUSÕES

De acordo com os dados das análises citogenéticas, um programa bem executado ao longo dos anos, pode levar a erradicação ou diminuição de anomalias cromossômicas do tipo da translocação Robertsoniana 1/29.

A análise citogenética é um método eficaz de constatar freemartismo em fêmeas bovinas, o que permite diagnóstico precoce e oportunidade ao produtor de retirar estas fêmeas do processo reprodutivo, e, portanto, diminuição de eventuais prejuízos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAM, M.L.; CAMPOS, J.T.; TORRES R.A. Cromossomos e genética bovina atestam a qualidade do plantel. *Revista Nelore*, v.118, p.130-132, 2005.

ALAI, F.J.V.; NAVARRO, F.J.; ECHEVERRI, A.M.D. Identificación anatómica, citogenética y molecular de un caso de síndrome de Freemartin. *Revista Lasallista de Investigación*, v.2, n.2, p.45-49, 2005.

BEANE, T. Test those freemartin heifers. *American Agriculturist*, March, p.33, 2007.

- De LUCA, J.C.; DULOUT, F.N. Citogenética de los animales domésticos. <http://fvc.unlp.edu.ar/sitios-catedras/87./material./citogenetica>. 2010 16p. Acesso em 06/05/10.
- DUNN, H.O.; McENTEE, C.E.; HALL, C.E.; JOHNSON Jr., R.H.; STONE, W.H. Cytogenetic and reproduction studies of bulls born co-twin with freemartins. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.57, n.1, p.21-30, 1979.
- ENNIS, S.; VAUGHAN, L.; GALLAGHER, T.F. The diagnosis of freemartinism in cattle using sex-specific DNA sequences. **Research Veterinary Science**, v.67, n.1, p.111-112, 1999.
- GORDON, I. **Reproducción controlada del ganado vacuno y búfalos**. 1ªed. Zaragoza: Acribia S/A, 1999. 538p.
- KANAGAWA, H.; KAWATA, K.; ISHIKAWA, T. Chromosome studies on heterosexual twins in cattle: II significance of chromosome (XX/XY) in early diagnosis of freemartin. **Japanese Journal Veterinary Research**, v.13, n.2, p.43-49, 1965.
- KHAN, M.Z.; FOLEY, G.L. Retrospective studies on the measurements, karyotyping and pathology of reproductive organs of bovine freemartins. **Journal Comparative Pathology**, v.110, n.1, p.25-36, 1994.
- FUJISHIRO, A.; KAWAKURA, K.; MIYAKE, Y.I.; KANEDA, Y.A. A fast, convenient diagnosis of the bovine freemartin syndrome using polymerase chain reaction. **Theriogenology**, v.43, p.883-891, 1995.
- MOORHEAD, P.S.; NOWELL, P.C.; MELLMAN, P.C.; BATTIPS, D.M.; HUNGERFORD, D.A. Chromosome preparations of leukocytes cultured from human peripheral blood. **Experimental Cell Research**, v.20, p.613-616, 1960.
- PADULA, A.M. The freemartin syndrome: an update. **Animal Reproduction Science**, v.87, n.1-2, p.93-109, 2005.
- PERETTI, V.; CIOTOLA, F.; ALBARELLA, S.; PACIELLO, O.; DARIO, C.; BARBEIRI, V.; IANNUZZI, L. XX/XY chimerism in cattle: clinical and cytogenetic studies. **Sexual Development**, v. 2, n.1, p.24-30, 2008.
- PIRES, R.M.L.; POSSENTI, R.A.; ARCARO, JRP.; LOBÃO, A.O. Translocação Robertsoniana 1/29 e quimerismo em bovinos da raça Pardo-Suíça. **Boletim de Indústria Animal**, v.42, n.1, p. 107-113, 1985.
- PIRES, R.M.L.; PIRES, R.L.; MÉO, S. Quimerismo 60,XX/60,XY e freemartismo em bovinos nascidos de partos gemelares heterossexuais. **Boletim de Indústria Animal**, v.66, n.1, p.45-52, 2009.
- RUTLEDGE, J.J. Twinning in cattle. **Journal of Animal Science**, v.40, n.5, p.803-815, 1975.
- SOHN, S.H.; CHO, E.J.; SON, W.J.; LEE, C.Y. Diagnosis of bovine freemartinism by fluorescence *in situ* hybridization on interphase nuclei using a bovine Y chromosome-specific DNA probe. **Theriogenology**, v.68, n.7, p.1003-1011, 2007.
- VALDOVINOS, M.A.A.; GÓMEZ, D.A.F.V.; BENÍTEZ, S.L.S. Estudio Citogenético y anatomopatológico del síndrome freemartin en bonitos (*Bos taurus*). **Veterinária México**, v.31 n.4, p.315-322, 2000.
- VALE FILHO, V.R.; BARSUR, P.K.; PINHEIRO, L.E.L.; WILTON, J.W. Desenvolvimento testicular e quimerismo em touros gêmeos com novilha "freemartin" ou com outro touro. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.7, n.4, p.41-50, 1983.
- WACHTEL, S.S. Serum borne H-Y antigen in the fetal bovine freemartin. **Cell**, v.21, n.3, p.917-926, 1980.