

QUIMERISMO 60,XX/60,XY E FREEMARTISMO EM BOVINOS NASCIDOS DE PARTOS GEMELARES HETEROSSEXUAIS¹

RITA MARIA LADEIRA PIRES², ROBERTO LADEIRA PIRES³, SIMONE CRISTINA MÊO⁴

¹Recebido para publicação em 20/10/07. Aceito para publicação em 25/05/09.

²Centro Pesquisa e Desenvolvimento em Genética e Reprodução Animal, Unidade Laboratorial de Referência em Produção Animal, Instituto de Zootecnia (IZ), Agência Paulista (APTA), Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo (SAA), Rua Heitor Penteado, 56, Centro, Caixa postal 60, CEP 13460-000, Nova Odessa, SP, Brasil. E-mail: pires@iz.sp.gov.br

³Médico Veterinário.

⁴Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária Pecuária Sudeste (EMBRAPA), Rodovia Washington Luiz, km 234, Fazenda Canchim, Caixa postal 339, CEP 13560-970, São Carlos, SP, Brasil.

RESUMO: Foram estudados citogeneticamente 42 bovinos nascidos de partos gemelares heterossexuais, sendo 10 casais, 19 fêmeas e três machos de várias raças, principalmente, Holandesa (17) e Pardo Suíça (11), pertencentes ao Instituto de Zootecnia-APTA, Nova Odessa, SP, e a produtores particulares de outras regiões do Estado. A análise citogenética foi realizada em metáfases obtidas após culturas de linfócitos. Em 90,5% (38) dos animais, foi observado o quimerismo 60,XX/60,XY com 1,8 a 90,2% de células femininas. Considerando todos os animais quiméricos, foram analisadas 3806 células, sendo 1268 XX (33,3%) e 2538 XY (66,7%). Em nove casais, as frequências de células femininas foram 24,8 e 21,5% e as de masculinas de 75,2 e 78,5% para fêmeas e machos, respectivamente. Em um casal, não foi evidenciada troca de células, e a fêmea apresentou somente células de linhagem feminina e o macho, de linhagem masculina. Três das fêmeas avaliadas eram adultas e foram abatidas. Seus aparelhos genitais apresentaram vários graus de masculinização como: aumento do clitóris, subdesenvolvimento da vagina, da cérvix (ausente em uma fêmea), do útero, das tubas uterinas, presença de glândulas vesiculares e gônadas ovotestis, (testículos e pênis rudimentares foram encontrados em uma fêmea). O cariótipo 60,XX foi observado em apenas três fêmeas das 29 analisadas: duas delas apresentaram todas as características de fêmea normal e inclusive pariram com aproximadamente 30 meses de idade; a outra fêmea ainda não atingiu a idade de reprodução, mas parece apresentar função reprodutiva normal. Dos 13 machos analisados, 12 apresentaram quimerismo 60,XX/60,XY e um apresentou cariótipo normal (60,XY). A análise citogenética é um meio eficaz e pouco oneroso de constatar freemartismo em fêmea bovina gêmea com macho, permitindo o diagnóstico precoce e a oportunidade de eliminação do processo reprodutivo os animais portadores de quimerismo, de maneira a baixar os custos com manejo e a diminuir a frequência desta anomalia nos rebanhos.

Palavras chave: anomalias cromossômicas, cariótipo, citogenética, esterilidade feminina

60,XX/60,XY CHIMERISM AND FREEMARTINISM IN HETEROSEXUAL BOVINE TWINS

ABSTRACT: In this study, 42 heterosexual bovine twins (10 co-borned couples, 19 females, and three males) were cytogenetically evaluated. These animals from several bovine breeds, mainly Holstein (17) and Brown Swiss (11), were herded in particular farms located in different regions of the State of São Paulo and from the Institute of Animal Science and Pastures (IZ), Nova Odessa, SP. Cytogenetic analysis were assessed in metaphases from cultured lymphocytes. The 60,XX/60XY chimerism were observed 90.5% of the animals and it varied from 1.8 to 90.2% of female cells. From all chimeric animals 3,806 cells were evaluated, among them 1,268 were XX cells (33.3%) and 2,538 were XY cells (66.7%). In nine co-borned couples, female cell rates ranged from 24.8 to 21.5% and male cell rates from 75.2 and 78.5% in males and females, respectively. In one couple, there was no evidence of cell exchange between twins with female presenting only female cells

and male only male cells. Three adult females were slaughtered and evaluated. Their reproductive tracts presented several degrees of masculinization, including clitoris enlargement, vagina, cervix, uterus and uterine tube subdevelopment, presence of vesicular gland and gonads ovotestis. One of these three females presented cervix absence. Among the 29 evaluated female, three presented the 60,XX karyotype. Two of them were normal females who delivery at 30 months old, while the other still have not achieved reproductive age, but it seems to have normal reproductive function. From 13 analyzed males, 12 presented 60,XX/60,XY chimerism and one presented normal karyotype (60,XY). Cytogenetic analysis is an efficient and a less expensive method to early diagnosis of freemartinism in bovine females born co-twin with males, which allows the chimeric animal to be eliminated from the reproductive process, decreasing management costs and reducing rates of such anomaly in commercial breedings.

Key words: chromosome abnormalities, cytogenetic, karyotype, female sterility

INTRODUÇÃO

A síndrome de freemartismo é provavelmente a mais freqüente anomalia de desenvolvimento do aparelho genital das fêmeas bovinas, ocorrendo ocasionalmente em outras espécies. Corresponde a fêmeas estéreis nascidas de partos gemelares heterossexuais e apresentam quimerismo em suas células sangüíneas, e variados graus de masculinização (VIGIER *et al.*, 1984; KHAN e FOLEY, 1994; VALDOVINOS *et al.*, 2000; ALAIX *et al.*, 2005; PADULA, 2005).

Na fêmea bovina, a síndrome desenvolve-se devido à fusão dos córions e à ocorrência de anastomoses vasculares entre os conceptos quando a gônada ainda apresenta caráter indiferenciado. Esse evento ocasiona troca de células entre os gêmeos, que passam a apresentar constituição cromossômica quimérica, ou seja, presença tanto de células masculinas (XY) quanto de células femininas (XX) em ambos (KHAN e FOLEY, 1994; GORDON, 1999; VALDOVINOS *et al.*, 2000). Este quimerismo pode ser detectado em vários tecidos como o sangue, na medula óssea e etc.

O freemartinismo não é observado em espécies multíparas, possivelmente devido ao tipo de placentação. Nessas espécies, freqüentemente há fusão dos envoltórios coriônicos, no entanto, as anastomoses são raras ou só ocorrem após a diferenciação gonadal e, assim, não provocam alterações fenotípicas (ENNIS *et al.*, 1999).

Nos machos, na maioria das vezes, as estruturas das gônadas não são afetadas, mas as implicações do quimerismo são contraditórias: se pode produzir efeitos negativos sobre a capacidade reprodutiva. DUNN *et al.* (1979) analisaram 22 touros nascidos com

freemartins e observaram diminuição da fertilidade, graves anomalias do sêmen e degeneração testicular, levando a subfertilidade. Por outro lado, SEGUIN *et al.* (2000) não detectaram relação negativa do quimerismo 60,XX/60,XY com a reprodução, em touros.

Dentre os vários métodos que permitem ou auxiliam o diagnóstico de animais freemartin destacam-se exame clínico, cariotipagem, avaliação de grupo sangüíneo, detecção do antígeno HY ou de DNA específico do cromossomo Y, por hibridização *in situ* de fluorescência (FISH) ou reação em cadeia da polimerase (PCR). O presente trabalho tem como objetivo realizar o estudo do cariótipo por coloração convencional, de bovinos nascidos de partos gemelares heterossexuais, visando ao diagnóstico do freemartinismo nas fêmeas e da ocorrência de quimerismo nos machos.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram analisados cariótipos de 42 bovinos (13 machos e 29 fêmeas) nascidos de partos gemelares heterossexuais, pertencentes ao rebanho do Instituto de Zootecnia-APTA, Nova Odessa, SP, e a criadores particulares de diferentes regiões do Estado. Foram analisados animais das raças Guzerá (2), Holandesa (17), Limousin (3), Pardo Suíço (11) e animais mestiços (9).

Exames clínicos foram realizados em várias fêmeas. Dos animais do Instituto de Zootecnia, três fêmeas adultas foram sacrificados, e os aparelhos reprodutivos foram dissecados, fotografados, fixados em formol a 10% e enviados ao laboratório de Anatomia Patológica - Instituto Biológico, para exame histopatológico. Nas fêmeas, geralmente recém-

nascidas, de rebanhos de produtores particulares, empregou-se apenas a análise citogenética.

O estudo dos cariótipos foi realizado em metáfases obtidas de culturas de linfócitos de sangue periférico, de acordo com a técnica de MOORHEAD *et al.* (1960), com algumas modificações. Amostras de sangue foram coletadas assepticamente em tubos a vácuo estéreis e com heparina, por meio de punção da veia jugular. Após a coleta, os tubos foram centrifugados por 40 minutos a 400rpm. 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 4mL de meio MEM (EARLE), 1mL de soro fetal bovino e 0,1mL de fitohe-maglutinina e antibióticos. Dois frascos de cultura foram incubados a 38°C. Após 71 horas, 0,1mL 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 800rpm e o sobrenadante desprezado. A hipotonização das células foi feita pela adição de solução de 0,075M de cloreto de potássio e incubação por oito minutos, seguida pela fixação com metanol: ácido acético (3:1) recém-preparado, pela centrifugação e pelo descarte do sobrenadante até a obtenção de material convenientemente lavado. Gotas de suspensão deste material (gelado) foram pingadas sobre lâminas de vidro. As lâminas foram secas sobre a chama de uma lamparina e estocadas por, pelo menos, 24 horas. As preparações foram coradas em solução de 3% de Giemsa em tampão fosfato. Cerca de 90 metáfases foram analisadas por animal ao microscópio óptico com objetiva de imersão (100X). As melhores metáfases foram fotografadas e copiadas para montagem do cariótipo.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nos últimos anos tem aumentado a incidência de partos gemelares devido à utilização da biotécnica de transferência de embriões em bovinos. No presente estudo, dos 42 animais gêmeos analisados, 22 foram oriundos de programas de transferência de embriões, enquanto 20 foram obtidos a partir de monta natural ou de inseminação artificial.

Dos gêmeos heterossexuais analisados (29 fême-

as e 13 machos), 90,5% apresentaram quimerismo 60,XX/60,XY (Figuras 1 e 2). Este índice de quimerismo é esperado, pois segundo CHAPMAN *et al.* (1978) e EDWARDS *et al.* (1994) a incidência desta patologia em gêmeos bovinos heterossexuais é de, aproximadamente, 90%. Entretanto, BUOEN *et al.* (1994) observaram taxas mais baixas de quimerismo (82,5%) após avaliação de 727 fêmeas bovinas nascidas de partos gemelares com machos. No presente estudo, a variação de células femininas foi de 1,8 a 90,2% e a de células masculinas, de 9,8 a 98,2%. WILKES *et al.* (1981) estudaram citogeneticamente 19 freemartins e, também, observaram grande variação na proporção de células: de 4 a 98% para células XX e de 2 a 96% para XY, resultados semelhantes (4,5% a 91,4 de células XX) foram observados por VALE FILHO *et al.* (1983) em tourinhos gêmeos com novilha freemartin. De todos os animais que apresentaram quimerismo, foram analisadas 3806 células, das quais 1268 foram XX (33,3%) e 2538 XY (66,7%). VALDOVINOS *et al.* (2000) e CAPUTO (2001) também encontraram maiores índices de células masculinas em comparação à quantidade de células femininas.

Na maioria das fêmeas, ao exame clínico, foi observado aumento de clitóris. Esta mesma característica foi detectada nas fêmeas freemartins estudadas por EDWARDS *et al.* (1994); KHAN e FOLEY (1994); ENNIS *et al.* (1999) e VALDOVINOS *et al.* (2000). Uma fêmea da raça Guzerá com, aproximadamente, sete anos de idade, com libido característico de macho, cariotipada (14,4% de células 60,XX e 85,6% de células 60,XY), foi abatida e necropsiada. O aparelho genital desta fêmea apresentou vários graus de masculinização como: subdesenvolvimento da vagina, da cérvix e do útero; presença de glândulas vesiculares; desenvolvimento de testículos localizado acima do úbere (Figura 3, 4, 5 e 6); e presença de um pênis sob a vagina. Os testículos e o pênis eram subdesenvolvidos. Características semelhantes de masculinização foram descritas por PIRES *et al.* (1985, 1994); KHAN e FOLEY (1994), VALDOVINOS *et al.* (2000) e ALAIX *et al.* (2005).

No exame histopatológico dos testículos subdesenvolvidos da fêmea mencionada anteriormente, notou-se acentuado polimorfismo dos túbulos seminíferos, com membrana de revestimento bem nítida, presença de células de Sertoli, que apresentaram acentuada hiperplasia e formaram, geralmente, verdadeiros cordões celulares de aspecto adenomatoso. Em outras áreas, os túbulos seminí-

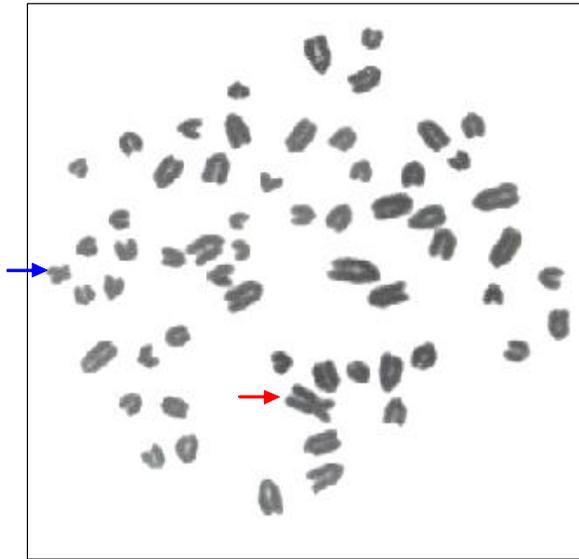


Figura 1. Célula $2n = 60,XY$ de uma fêmea freemartin bovina da raça Pardo Suíço, com coloração convencional. Seta vermelha: cromossomo X; seta azul: cromossomo Y



Figura 3. Vaca freemartin da raça Guzera com clitóris aumentado

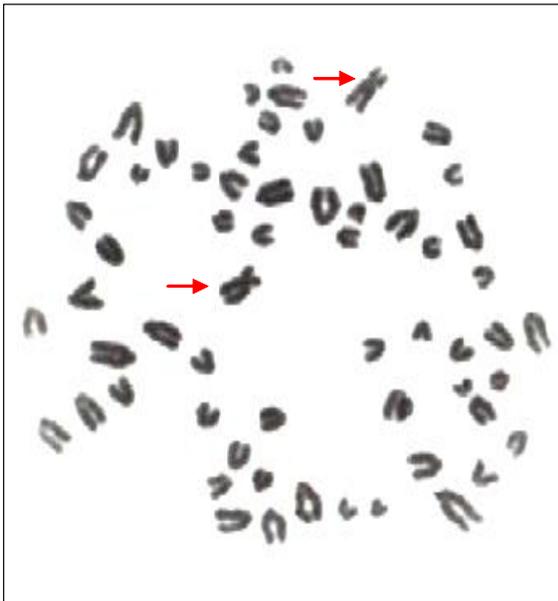


Figura 2. Célula $2n=60,XX$, do mesmo animal da Figura 1, com coloração convencional. Seta vermelha: cromossomo X

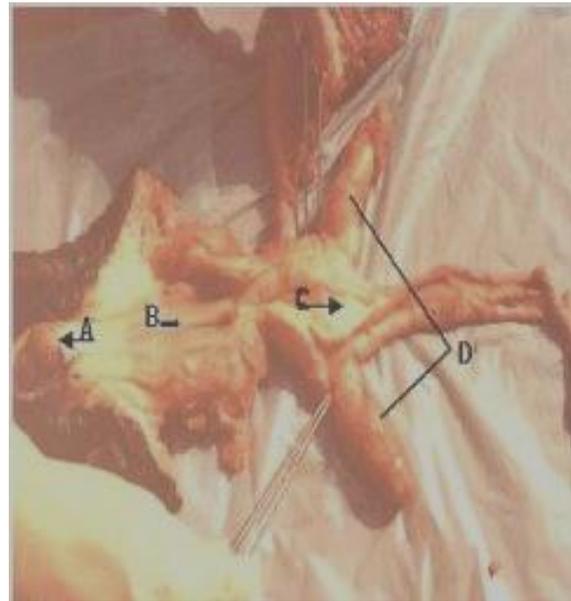


Figura 4. Aparelho reprodutivo da uma fêmea Guzera freemartin com vários graus de masculinização.: A) Clitóris hipertrofiado; B) Vagina e cérvix subdesenvolvidas; C) Útero subdesenvolvido; D) Glândulas vesiculares

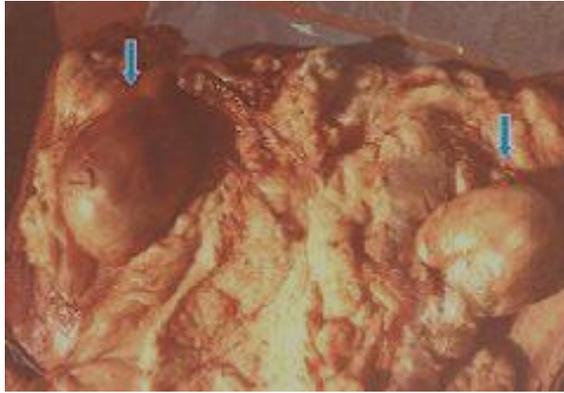


Figura 5. Testículos rudimentares da fêmea Guzerá



Figura 6. Atrofia do úbere da fêmea Guzerá

feros mostraram-se hipoplásicos ou somente resquícios. O epidídimo era constituído de um ou outro conduto excretor e acentuada proliferação de tecido conjuntivo intersticial. Foi verificada azoospermia em todos os cortes.

Outras duas fêmeas, da raça Suíça Parda (uma com 65% de células XX e 35% de XY, a outra com 43% de células XX e 57% de XY), foram abatidas e, também, apresentaram masculinização, mas em menor grau, nos exames de necropsia e histológico. Segundo GOODFELLOW *et al.* (1965); STRANZINGER *et al.* (1981) e DESAI *et al.* (1988), a intensidade da masculinização está diretamente relacionada à porcentagem de células masculinas na circulação sanguínea. Porém, EDWARDS *et al.* (1994) e KHAN e FOLEY (1994) acreditam que a variação da masculinização é atribuída ao estágio de desenvol-

vimento fetal em que a anastomose vascular ocorre e à quantidade do hormônio anti-mülleriano transferido do macho para a fêmea.

Os dados das análises citogenéticas dos dez casais de gêmeos mostraram que os co-gêmeos apresentaram porcentagem semelhante de células XX e XY entre o macho e a fêmea de cada parto gemelar (Figura 7). Resultados semelhantes foram descritos em bovinos e búfalos (OHNO *et al.*, 1962; DUNN *et al.*, 1979; PIRES *et al.*, 1999; IANNUZZI *et al.*, 2005). Inclusive, OHNO *et al.* (1962) mostraram porcentagens idênticas de células (76% de XX e 24% de XY) entre animais co-gêmeos. No presente estudo, observou contagem idêntica de células (9,8% de XX e 90,2% de XY) para o casal número sete. Para outros três casais (casais 1, 2 e 8), as porcentagens foram bem semelhantes e as diferenças não ultrapassaram 2% (Figura 7). Por outro lado, no casal 10, a fêmea apresentou apenas células femininas e o macho apenas células masculinas, indicando que não ocorreram anastomoses vasculares entre os gêmeos.

Dos 13 machos analisados citogeneticamente no presente estudo, 12 (92,3%) apresentaram quimerismo 60,XX/60,XY, como é esperado nos partos gemelares heterossexuais de bovinos. O efeito da presença de células 60,XX/60,XY nos touros nascidos de gestação gemelar com uma fêmea é discutido. Em um estudo com 22 touros quiméricos, sete animais foram descartados devido à baixa fertilidade, nos exames histológicos apresentaram áreas grandes e definidas de degeneração testicular (DUNN *et al.* 1979). A redução da fertilidade é manifestada pela diminuição da qualidade do sêmen ou mesmo esterilidade (DUNN *et al.*, 1979; BONGSO *et al.*, 1981; KHAN e FOLEY, 1994). Vale FILHO *et al.* 1983 estudaram o desenvolvimento testicular em touros gêmeos dizigóticos com novilha freemartin ou com outro touro, observaram que o processo de espermatogênese é retardado nos gêmeos dizigóticos, quando comparados com os animais nascidos de partos simples. Contudo, como a característica para potencial de gestação natural de gêmeos é hereditária, não é recomendável a utilização desses machos, (não os nascidos de transferência de embriões), na reprodução, pois suas filhas terão maior índice de gestações gemelares e, em consequência, maior ocorrência de abortos, natimortos, retenção de placenta, metrites e partos distócitos (ECHTERNKAMP e GREGORY, 2002).

Tem sido muito discutida a migração das célu-

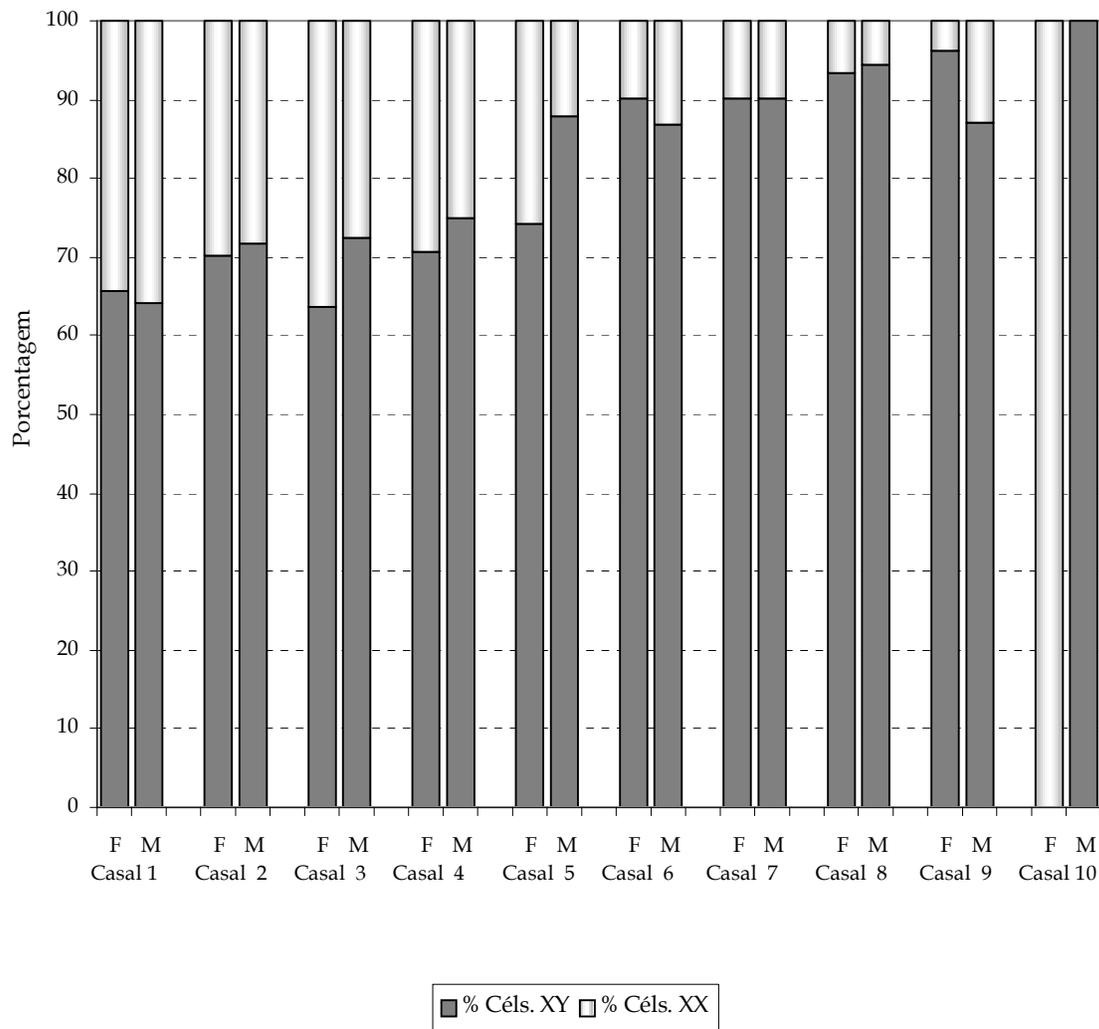


Figura 7. Porcentagens de células XX e XY observadas nos casais de gêmeos heterossexuais bovinos. F fêmea; M macho

las femininas até os testículos do macho, onde seriam capazes de produzir espermatozoides. De um lado, existem trabalhos em que os touros nascidos co-gêmeos de fêmeas são indicados como produtores de grande número de filhas (DUNN *et al.*, 1968). Neste trabalho, um macho com 27,4% de células femininas e 72,6% de células masculinas foi utilizado em programa de cruzamento e produziu seis descendentes fêmeas e nenhum macho. Entretanto, como o touro veio a óbito e o número da prole é muito pequeno, não é possível afirmar que o nascimento só de fêmeas seja devido ao quimerismo. VALE FILHO *et al.* (1983) observaram a presença de células XX nas gônadas e que as mesmas eram capazes de

entra em processo de meiose em tourinhos gêmeos heterossexuais. Por outro lado, o estudo das preparações testiculares de sete machos gêmeos com fêmeas e portadores de quimerismo XX/XY não identificou a presença de dois cromossomos X em nenhuma das espermatogônias primárias (FORD e EVANS, 1977). Assim, a possibilidade de que células germinativas XX contribuem para a produção de espermatozoide desses touros não está comprovada.

O cariótipo 60,XX foi observado em três fêmeas (10,3% das fêmeas) oriundas de gestações gemelares com machos. Dessas fêmeas, duas tornaram-se adul-

tas normais e, inclusive, apresentaram parições, aproximadamente, aos 30 meses de idade, sugerindo que, nesses animais, não ocorreram anastomoses vasculares. Uma outra fêmea ainda não atingiu a idade de reprodução, mas parece apresentar função reprodutiva normal. Outros autores descreveram situações semelhantes, porém VALDOVINOS *et al.* (2000) detectaram uma novilha, nascida de um parto gemelar, com cariótipo 60,XX, aparelho reprodutivo feminino, manifestação regular de estro, mas estéril.

CONCLUSÕES

A análise citogenética constitui um método seguro para diagnóstico de freemartismo em fêmeas bovinas, a partir do nascimento. Permitido a seleção, em manejo de criação de animais para reprodução.

As porcentagens de células XX e XY entre o macho e a fêmea de cada parto gemelar bovino, geralmente, são semelhantes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALAIX, 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.
- BONGSO, T.A.; JAINUDEEN, M.R.; LEE, J.Y.S. Testicular hypoplasia in a bull with XX/XY chimerism, **Cornell Veterinarian**, v. 71, n. 4, p. 376-382, 1981.
- BUOEN, Z.T. et al. Diagnosis of freemartinism in cattle: the need for clinical and cytogenic evaluation. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 204, n. 10, p. 1672-1675, 1994.
- CAPUTO, D.Z. **Diagnóstico citogenético de freemartismo em bovinos: -relato de caso.** 2001, 28 p. Monografia (Graduação em Medicina Veterinária) – Universidade de Santo Amaro, São Paulo, 2001.
- CHAPMAN, H.M.; BRUERE, A.N.; JAINE, P.M. XY gonadal dysgenesis in a Charolais heifer. **Animal Reproduction Science**, v. 1, n. 1, p. 9-18, 1978.
- DESAI, D.S. et al. Cytogenetic studies on heterosexual twins in cattle. **Indian Journal Dairy Science**, v. 41, n. 1, p. 21-23, 1988.
- DUNN, H.O. et al. Cytogenetic and reproductive studies of XX/XY chimeric twin bulls. In : 6th INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION AND ARTIFICIAL INSEMINATION, 1968, Paris. **Proceedings...** v. 2, p. 877-879, 1968.
- DUNN, H.O. et al. Cytogenetic and reproductive studies of bulls born co-twin with freemartins. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 57, n. 1, p. 21-30, 1979.
- ECHTERNKAMP, S.E.; GREGORY, K.E. Reproductive, growth, feedlot, and carcass traits of twin vs single births in cattle. **Journal Animal Science**, v. 80, suppl. 2, p. 64-73, 2002.
- EDWARDS, J.F.; GALLAGHER, D.S.; PRAKASH, B. Urethral atresia with uroperitoneum in a newborn bovine freemartin. **Veterinary Pathology**, v. 31, n. 1, p. 117-119, 1994.
- ENNIS, S.; VAUGHAN, L.; GALLAGHER, T.F. The diagnosis of freemartinism in cattle using sex-specific DNA sequences. **Research Veterinary**, v. 67, n. 1, p. 111-112, 1999.
- FORD, C.E.; EVANS, E.P. Cytogenetic observations on XX/XY chimaeras and a reassessment of the evidence for germ cell chimaerism in heterosexual twin cattle and marmosets. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 49, n. 1, p. 25-35, 1977.
- GOODFELLOW, S.A.; STRONG, S.J.; STEWART, J.S.S. Bovine freemartins and true hermaphroditism. **The Lancet**, v. 285, n. 7394, p. 1040-1041, 1965.
- GORDON, I. **Reproducción controlada del ganado vacuno y búfalos.** Tradução: Marino Illera Martin. 1^a ed. Zaragoza: 1999. 538p.
- IANNUZZI, L. et al. Freemartinism in river buffalo: clinical and cytogenetic observations. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 108, n. 4, p. 355-358, 2005.
- KHAN, M.Z.; FOLEY, G.L. Retrospective studies on the measurements, karyotyping and pathology of reproductive organs of bovine freemartins, **Journal of Comparative Pathology**, v. 110, n. 1, p. 25-36, 1994.
- MOORHEAD, P.S. et al. Chromosome preparations of leukocytes cultured from human peripheral blood. **Experimental Cell Research**, v. 20, p. 613-616, 1960.
- OHNO, S. et al. Possible germ cell chimeras among newborn dizygotic twin calves (*Bos taurus*). **Cytogenetics**, v. 1, p. 258-265, 1962.

- PADULA, A. M. The freemartin syndrome: an update. **Animal Reproduction Science**, v.87, n.1-2, p.93-109, 2005.
- PIRES, R.M.L. et al. Translocação robertsoniana 1/29 e quimerismo em bovinos da raça Suíça Parda. **Boletim de Indústria Animal**, v.42, n.1, p.107-113, 1985.
- PIRES, R. M. L. et al. Estudos citogenéticos em bovinos do tipo Tropical Leiteiro e ecotipo Mantiqueira. **Boletim de Indústria Animal**, v.51, n.1, p.165-168, 1994.
- PIRES, R.M.L; REICHERT, R.H; BARUSELLI, P.S. Quimerismo 50,XX/50,XY em búfalos da raça Murrah. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.23, n.3, p.255-257, 1999.
- SEGUIN, B. E. et al. Cytogenetic survey of Holstein bulls at a commercial artificial insemination company to determine prevalence of bulls with centric fusion and chimeric anomalies. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.216, p.65-67, 2000.
- STRANZINGER, G. et al. Some rare cases of chimerism in twin cattle and their proposed used in determining germinal cell migration. **Journal of Heredity**, v.72, n.5, p.360-362, 1981.
- VALDOVINOS, M.A.A.; VILAGÓMEZ, D.A.F.; BENITEZ, S.L.S. Estudio citogenético y anatomopatológico del síndrome freemartin en bovinos (*Bos taurus*). **Veterinária México**, v.31, n.4, p.315-322, 2000.
- VALE FILHO, *et al.* 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.
- VIGIER, B. et al. Origin of anti_Mullerian hormone in bovine freemartin fetuses. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.70, n.2, p.473-479, 1984.
- WILKES, P.R.; WIJERTINE, W.V.S.; MUNRO, I.B. Reproductive anatomy and cytogenetics of freemartin heifers. **Veterinary Record**, v. 108, n.16, p.349-353, 1981.