

TÉCNICA DE CARIOTIPAGEM EM BOVINOS

ANTÔNIO JUNQUEIRA TAMBASCO

EMBRAPA - UEPAE de São Carlos
São Carlos - SP.

Os estudos cromossômicos em bovinos foram iniciados há 84 anos por BARDELEBEN (1892) e o número diplóide de cromossomos descrito por esse autor e demais autores, até 1920, variou entre 16 e 38. O número de 60 foi referido por KRALLINGER (1927) e confirmado por MAKINO (1944). Estes estudos foram realizados por método direto sem hipotonização em medula óssea e gônada, o que dificultava muito a contagem e a análise morfológica dos cromossomos.

Há 20 anos, foi realizado por TJIO & LEVAN (1956), a técnica de cultura de tecidos associada a pré-tratamento das células por *colchicina* e solução hipotônica. Isto permitiu a caracterização do cariótipo humano como tendo 46 cromossomos. A cultura temporária de linfócitos de sangue periférico após estímulo por fito-hemaglutinina, descoberta por NOWELL (1959), facilitou bastante o estudo do cariótipo dos mamíferos, por se tratar de método simples.

MELANDER (1959) foi o primeiro a utilizar a técnica de culturas de células em bovinos (células do pulmão de embriões), revendo os cromossomas da subespécie *Bos taurus taurus*. O autor descreve a morfologia dos 29 pares autossômicos e do par sexual, acrocêntricos e submetacêntricos, respectivamente. A cultura de sangue periférico, método mais rápido que o de cultura de células de outros tecidos, foi iniciada em bovinos por NICHOLS & cols. (1952).

TÉCNICA DE CULTURA DE LINFÓCITOS

Modificação da técnica de MOORHEAD & cols. (1960), pelo Laboratório de Citogenética Humana da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP.

Obtêm-se, aproximadamente, 15 ml de sangue colhido da jugular em seringa previamente esterilizada e heparinizada. Após a sedimentação do sangue, retira-se 1,5 ml de plasma sobrenadante e os distribui em 3 frascos contendo 5 ml de meio de cultura (TC 199), colocando-se em estufa a 37°C durante 72 horas. Após 70 horas de incubação, coloca-se 1 gota de solução de *colchicina* (160 mg de *colchicina* Alkaloide - Fischer Scientific Co., USA - em 100 ml de água destilada) $4 \cdot 10^{-3}$ M e completado o tempo de 72 horas, centrifuga-se a 800-1000 rpm durante 5 minutos. Retira-se o sobrenadante e ressuspendem-se as células em cerca de 10 ml de solução hipotônica de cloreto de potássio 0,75 M e coloca-se em estufa a 37°C por 5 minutos. Retira-se a solução hipotônica e procede-se à fixação em 5 ml de fixador recém-preparado (Metanol-Ácido acético - 3:1). Centrifuga-se durante 5 minutos a 800-1000 rpm. Retira-se o fixador e colocam-se novamente 0,5 ml de fixador para diluição adequada para o preparo das lâminas.

A técnica de coloração convencional por orceína, não possibilita o pareamento correto e a análise dos cromossomos homólogos, principalmente em espécies como *Bos taurus*, onde quase todos os cromossomos possuem centrômero terminal, têm tamanhos que decrescem linearmente e não é possível a separação em

grupos. Entretanto, CASPERSON & cols. (1968) introduziram a técnica de formação de bandas cromossômicas, pelo uso da quinacrina mustarda, proporcionando a identificação dos pares cromossômicos através de regiões fluorescentes, denominadas bandas "Q", que são características para cada par. Novas técnicas foram introduzidas para a identificação cromossômica através de marcação de regiões específicas, entre as quais a de bandas "G" (bandas pelo Giemsa), que tem sido usada em estudos cromossômicos de bovinos.

A partir do trabalhos de LEJEUNE (1959), que mostrou, no homem, que trissomia 21 estava relacionada com a Síndrome de Down, estabeleceu-se a relação cariótipo-fenótipo. Grande número de anomalias congênitas foram relacionadas com descrição de novas aberrações cromossômicas, contribuindo para o conhecimento da etiologia dessas patologias no homem.

Nos animais domésticos, várias anomalias cromossômicas foram descritas e, em bovinos, especificamente, vários trabalhos foram publicados relatando aberrações cromossômicas numéricas ou estruturais associadas ou não a anormalidades fenotípicas. GUSTAVSSON (1966) encontrou uma translocação na raça Suécia vermelha e branca com participação dos cromossomos 1 e 29. O mesmo autor, (GUSTAVSSON, 1969) em estudo de 1.173 animais dessa raça, encontrou 14% de heterozigotos e 0,34% de homozigotos para essa translocação que foi relacionada com morte embrionária no rebanho. Esta mesma translocação foi descrita em pelo menos mais onze raças. A segregação não balanceada desta translocação, na progênie de portadores equilibrados, provocará um desequilíbrio gênico que poderá ser acompanhado por manifestações fenotípicas.

Em alguns países, como por exemplo Suécia, Austrália e Inglaterra, já se usa a análise do cariótipo para aprovação do animal como reprodutor e para importação de animais.

Estas técnicas modernas, também deverão ser usadas para conhecimento melhor de nosso rebanho, para a eliminação de animais com aberrações cromossômicas e para seleção dos animais reprodutores.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BARDELEBEN, K. VON. 1892. Ueber Spermatogenese bei Saugetieren, besonders beim Menschen. *Anat. Anz.*, 7:202-208.
- CASPERSON, T., S. FARBER, G.E. FOLEY, L. KUDYNOWSKI, E.J. MODEST, E. SIMONSSON, U. WAGH & L. SECH. 1968. Chemical differentiation along metaphase chromosomes *Exp. Cell Res.*, 58:141-152.
- GUSTAVSSON, I. 1966. Chromosome abnormality in cattle. *Nature*, 211:865-866.
- GUSTAVSSON, I. 1969. Cytogenetics, Distribution and Phenotypic effects of a translocation in Swedish cattle. *Hereditas*, 63:68-169.
- KRALLINGER, H. 1927. Über die chromosomenzahl beim Rinde sowie einige allgemeine Bemerkungen über die chromosomenforschung in der Sangetierklasse. *Anat. Anz.* 63:209-214.
- LEJEUNE, J. 1959. Le mongolisme. Premier exemple d'aberration autosomique humaine *Ann. Génét.* 1:41-49.
- MAKINO, S. 1944. Karyotypes of domestic cattle, zebu and domestic waterbuffalo (Chromosome studies in domestic mammals, IV). *Cytologia*, 13:247-264.

- MELANDER, Y. 1959. The mitotic chromosomes of some cavicorn mammals (*Bos taurus* L., *Bison bonasus* L. and *Ovis aries* L.). Hereditas, 45:649-664.
- MOORHEAD, P.S., P.C. NOWELL, W.J. MELLMAN, D.M. BATTIPS and D.A. HUNGERFORD. 1960. Chromosome preparation of leukocytes cultured in human peripheral blood. Exp. Cell Res., 20:613-616.
- NICHOLS, W.W., A. LEVAN & W.C. LAWRENCE. 1962. Bovine Chromosomes by the Peripheral Blood Method. Brief Report. Hereditas, 48:536-538.
- NOWELL, P.C. 1960. Phytohemagglutinin: An initiator of mitosis in cultures of normal human leukocytes. Cancer Res., 20:462-466.
- TJIO, J.H. & A. LEVAN. 1956. The chromosome number of man. Hereditas, 42:1.