

CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO CITOGÊNÉTICO EM BOVINOS NORMAIS E EM  
BOVINOS COM PROBLEMAS DE REPRODUÇÃO

Tese apresentada ao Departamento  
de Genética e Matemática Aplica-  
da à Biologia da Faculdade de Me-  
dicina de Ribeirão Preto, USP,  
para obtenção do título de Dou-  
tor em Genética.

Antonio J. Tambasco

RIBEIRÃO PRETO  
1976

A Adriana, Daniella e Marina

A minha mãe

Aos meus irmãos

A Profa. Dra. Iris Ferrari,  
pela dedicação e in-  
centivo à pesquisa. ✓

## AGRADECIMENTOS

- À Profa. Dra. Iris Ferrari, pela orientação, apoio e incentivo constantes.
- Aos Professores Drs. Catarina S. Takahashi, Francisco A. de Moura Duarte, Amilton Ferreira, Jehud Bertolozzi e Marcos Antonio Giannoni, pelas sugestões na avaliação deste trabalho.
- À Profa. Lília Maria de Azevedo Moreira, pelas valiosas sugestões apresentadas.
- Ao Dr. Aliomar Gabriel da Silva, Chefe da UEPAE de São Carlos (EMBRAPA), pelo apoio dado na fase final deste trabalho.
- Aos Veterinários Vicente Ribeiro do Vale Filho (Agropecuária Lagoa da Serra Ltda.) e Prof. Walter E.P. Becker (Faculdade de Medicina Veterinária e Agronomia de Jaboticabal), pelo fornecimento de parte do material utilizado.

Aos técnicos Célia Lucia Cardoso, Lurdes Mitsuko Sumi, Maria Lucia Machado e Silvio Avelino dos Santos, pelo auxílio prestado durante a preparação do material.

- À Maria Helena Mamede da Costa, pelos serviços fotográficos
- Aos Senhores João Pio da Silva, João Merlotti e Guaracy Penna, pelo auxílio na colheita do material.

As seguintes instituições:

- Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP;
- Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA);
- Unidade de Execução de Pesquisa de Âmbito Estadual de São Carlos (UEPAE-EMBRAPA) - Fazenda Canchim.
- Faculdade de Medicina Veterinária e Agronomia de Jaboticabal;

- Agropecuária Lagoa da Serra Ltda., Sertãozinho, SP.
- Plano Integrado de Genética (PIG);
- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP);
- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq);
- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES);
- Organização dos Estados Americanos (OEA);
- Fundação Rockefeller.

# INDICE

	Pág.
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. MATERIAL E MÉTODOS	
2.1 Material .....	2
2.2 Métodos .....	2
2.2.1 Escolha dos animais .....	12
2.2.2 Estudo cariotípico .....	13
2.2.2.1 Colheita do sangue .....	13
2.2.2.2 Técnica de Cultura de Linfócitos.	14
2.2.2.3 Composição do meio de Cultura..	15
2.2.2.4 Preparo de Lâminas .....	16
2.2.2.5 Técnica de formação de bandas G	17
2.2.2.6 Análise das lâminas .....	17
2.2.2.7 Fotomicrografia .....	20
3. RESULTADOS .....	21
4. DISCUSSÃO .....	62
CONCLUSÕES .....	85
RESUMO .....	88
SUMMARY .....	89
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	90

## 1. INTRODUÇÃO

Os estudos cromossômicos em bovinos foram iniciados no século passado por Bardeleben (1892), seguidos pelos trabalhos de Schoenfeld (1902); Van Hoof (1919), Masui (1919) e Wodsdalek (1920). O número diplóide de cromossomos, descrito por esses autores, variou entre 16 e 38. O número diploide de 60 foi referido por Krallinger (1927, 1928, 1931) e confirmado por Makino (1944).

Tais estudos foram realizados em medula óssea e gônadas, por método direto sem hipotonização e isto dificultava muito a contagem e a análise morfológica dos cromossomos.

O pré-tratamento de células cultivadas por colchicina e solução hipotônica, realizado por Tjio e Levan (1956), abriu novas perspectivas para o estudo dos cromossomos permitindo a dispersão dos mesmos na célula com aparente manutenção da forma e do tamanho. A cultura temporária de linfócitos de sangue periférico após estímulo por fito-hemaglutinina, descrita por Howell (1960), por se tratar de método simples, facilitou ainda mais o estudo do cariótipo dos mamíferos.

Melander (1959) foi o primeiro a utilizar a técnica de cultura de células em bovinos, revendo os cromossomos da subespécie Bos taurus taurus, através de cultura de células do pulmão de embriões. O autor descreve a morfologia dos 29 pares autossômicos, como possuindo centrômero quase terminal, e dos cromossomos sexuais, como sendo sub-metacêntricos.

Sasaki e Makino (1962), em revisão dos estudos dos cromossomos da subespécie B. taurus taurus, utilizaram a téc-

nica de cultura de células de rim e de pele, e tentaram fazer o idiograma, pareando os 58 autossomos e os 2 sexuais e classificando, de acordo com Melander (1959) e Ohno e col. (1962) como cromossomos acrocêntricos e cromossomos submetacêntricos, respectivamente.

A cultura de sangue periférico de bovinos, que é método mais rápido do que a cultura de células de outros tecidos, foi iniciada por Nichols e col. (1962).

Por esse método, Jorge (1970, 1974) pode identificar a origem de algumas raças de bovinos através da identificação do cromossomo Y submetacêntrico da subespécie B. taurus taurus e do Y acrocêntrico da subespécie Bos taurus indicus.

A técnica de coloração convencional por orceína, todavia, não possibilitava o pareamento correto entre os homólogos e, o estudo dos cromossomos tornava-se difícil, principalmente em algumas espécies, como por exemplo B. taurus taurus e B. taurus indicus, onde quase todos os cromossomos são acrocêntricos, tem tamanhos que decrescem linearmente, não sendo possível a separação em grupos.

A introdução, por Caspersson e col. (1968), da técnica de formação de bandas, pelo uso da quinacrina mustarda, proporcionou a identificação dos pares cromossômicos através de regiões fluorescentes (bandas Q) características para cada par.

Pelo padrão de formação de bandas Q, Hansen (1971, 1972) descreveu os pares cromossômicos da subespécie B. taurus taurus.

Seguiram-se ao trabalho de Caspersson e col. (1968), outros que estabeleceram novas técnicas para identificação



cromossômica e marcação de regiões específicas. De grande importância foram as bandas G, bandas pelo Giemsa (Drets e Shaw; 1971), semelhantes às bandas Q mas apresentando a principal vantagem de serem observadas à microscopia comum e serem permanentes.

Essa técnica tem sido usada, com modificações, em estudos cromossômicos de bovinos (Schnedl, 1972; Hansen, 1973a; Popescu, 1973; Seth e Kunze, 1974; Schneid e Czaker, 1974; Eldridge, 1974, 1975; Diamond e col., 1975; Halnan, 1976).

A relação cariótipo-fenótipo foi estabelecida através do trabalho inicial de Lejeune (1959) que mostrou, no homem, que a anormalidade cromossômica, conhecida como trissomia 21, estava relacionada com a Síndrome de Down. No mesmo ano Jacobs e Strong (1959), mostraram que na Síndrome de Klinefelter os pacientes apresentavam 3 cromossomos sexuais e, Ford e col. (1959), descreveram na Síndrome de Turner, a ausência de um cromossomo sexual.

A partir destas descobertas, um grande número de anomalias congênitas foram relacionadas com a descrição de novas aberrações cromossômicas, contribuindo significativamente para o conhecimento da etiologia dessas patologias no homem.

Nos animais domésticos também foram descritas várias anomalias cromossômicas associadas ou não a condições anormais.

Thuline e Norby (1961), encontraram em gato, uma Síndrome com cariótipo XXY, semelhante à Síndrome de Klinefelter na espécie humana. Uma revisão do assunto foi feita por Centerwall e Benirschke (1975), mostrando que a patologia

testicular nesses animais era comparável à encontrada na espécie humana.

Translocações Robertsonianas associadas ou não a fertilidade foram demonstradas em carneiro ( Bruère, 1969 ; Bruère e Mills, 1971) e em porcos (Henricson e Backstrom, 1964; Akesson e Henricson, 1972).

Soller e col. (1966) encontraram, em cabras, fusão cêntrica com participação de dois cromossomos acrocêntricos em animais fenotipicamente normais.

Shive e col. (1965) encontraram em cão, uma translocação associada com anomalia congênita do coração.

Em bovinos, vários trabalhos foram publicados, referindo-se a aberrações cromossômicas.

Gustavsson(1966) encontrou uma translocação na raça sueca 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.

Essa mesma translocação foi descrita em várias raças bovinas (Herschler e Fechheimer, 1966; Rugiati e Fedrigo, 1967; Rieck e col., 1968; Amrud, 1969; Harvey, 1971; Popescu, 1971; Darre e col., 1972; Harvey, 1976). Eldridge(1975) estudando a raça inglesa branca, concluiu que os cromossomos participantes na translocação eram o 1 e o 27, mas admitiu ser a mesma translocação(1 e 29) identificada nas várias raças européias. A comprovação de que os cromossomos 1 e 29 eram os formadores desta translocação foi feita por Gustavsson e col. (1976a) e Gustavsson e Hageltorn (1976). Esta translocação foi

também associada com linfossarcoma (Basrur e col., 1964; Gustavsson e Rockborn, 1964; Hare e col., 1967).

Também foram descritas translocações com a participação de outros cromossomos: 2/4 (Pollock, 1972), 13/21 (Brüere e Chapman, 1973; Harvey, 1974) e 5 ou 6/15 ou 16 (Eldridge 1974).

Um caso de inversão pericêntrica no cromossomo número 14, foi descrita por Popescu (1972) em animal menos fértil que os normais.

Casos de trissomia autossômica foram relacionadas com a Síndrome da braquignatia (Herzog e Höhn, 1971) e várias malformações congênitas (Mori e col., 1969; Herzog e Höhn, 1971).

Também foram relatadas aberrações cromossômicas envolvendo os cromossomos sexuais.

Rieck e col. (1970) descreveram um animal com cariótipo 61 XXX, com sistema reprodutor normal mas com tendência familiar a distúrbios da meiose. Esta mesma aberração foi observada por Norberg e col. (1976) associada a subdesenvolvimento dos ovários.

Foi descrito por Dunn e col. (1970) um caso de hermafroditismo verdadeiro com cariótipo 60 XX, 90 XXY, 90 XXX. Outro mosaico 60 XX, 60 XY, 61 XXY foi descrito por Rieck e col. (1969) e Finger e col. (1969) (citados por Halnan, 1975) e os animais apresentaram acentuado hipogonadismo.

Especial atenção tem merecido o estudo da Síndrome de Freemartin (<sup>gêmeira</sup> mosaico XX-XY), principalmente após a descoberta de que entre gêmeos em bovinos há troca de células do sangue intra útero através de anastomoses coriovasculares (Owen,

1945) e que esta troca provocaria um <sup>guineensis</sup> ~~mosaicismo cromossômico~~ em ambos os animais (Ohno e col., 1962).

Várias hipóteses foram formuladas para explicar a esterilidade e as malformações que a fêmea de um par heterosexual de gêmeos apresenta.

Lillie (1916) acreditava que a supressão do desenvolvimento feminino em fêmea de parto gemelar heterosexual, substituído por órgãos masculinos, poderia ser interpretado como um caso de ação hormonal.

Williams (1933) postulou que o Freemartin resulta de um ovo imperfeito derivado de um ovário doente. Este ovo seria incapaz de se desenvolver independentemente mas poderia se tornar um parasita de um embrião normal com a relação de parasitismo estabelecida através de anastomoses vasculares.

Witschi (1939, 1965) sugeriu que a masculinização do trato reprodutivo do Freemartin deveria ser controlado pelas gônadas do Freemartin mais do que pelo macho co-gêmeo. Ele postulou que uma substância humoral que chamou "medularina" ou "antagonista medular" inibia o cortex da gônada feminina. Uma substância diferente liberada pelo testículo dos machos normais, ou indutora de tecido testicular em Freemartin, deveria controlar a regressão dos ovidutos e a diferenciação das características sexuais masculinas secundárias.

Herschler e Fechheimer (1967) observaram uma correlação estatisticamente significativa entre a proporção de células XY em Freemartin e o grau de virilização do trato reprodutivo, quando os órgãos eram classificados em quatro grupos de acordo com o grau de intersexualidade.

McFeely e col. (1967) e Hamerton (1968), acredita-

vam que a masculinidade nos mamíferos é devido a fatores de origem no cromossomo Y. Os autores sugeriram que os genes determinantes de masculinidade devem estar presentes no cromossomo X, mas são reprimidos na ausência do cromossomo Y.

Pierrepoint e col. (1969), achavam que nenhuma das teorias existentes explica suficientemente a etiologia da Síndrome de Freemartin. Estes autores sugeriram, por exemplo, que a pituitária fetal masculina não poderia ser eliminada como fonte indutora de hormônio. Eles também sugeriram que as células XY no interstício das gônadas do Freemartin deveriam ser o agente que dirigia o desenvolvimento da gônada na direção masculina, em resposta a esse hormônio indutor.

Jost e col. (1972) propuzeram o conceito de uma substância testicular inibidora do ovário e dos ductos Müllerianos. Isto explicaria a ocorrência simultânea de ambos os efeitos assim como a correlação entre seus graus de inibição. Eles sugeriram que a estimulação dos caracteres masculinos em ambos, macho e Freemartin, resultavam de outro hormônio testicular. Este hormônio teria sua origem no macho co-irmão durante os primeiros estágios e agiria também no Freemartin; posteriormente as gônadas do Freemartin continuariam a função.

Outro importante aspecto das aberrações cromossômicas é a sua atuação no processo de especiação.

Goin & Goin (1968) sugerem que no processo evolutivo dos vertebrados teria ocorrido um aumento ou redução na quantidade de DNA. Entretanto, em uma mesma classe animal, a tendência é manter a quantidade de material genético praticamente constante. Deste modo, os rearranjos estruturais dos cromossomos com pouca ou nenhuma perda de material, devem ter

sido de grande importância na especiação.

Na família Bovidae, Makino (1943) observou que os ovinos possuem 54 cromossomos sendo 48 acrocêntricos e 6 metacêntricos, enquanto que os bovinos mostram 60 cromossomos, sendo todos acrocêntricos, exceto o par sexual. O autor conclui que os 12 acrocêntricos que os bovinos apresentam a mais deram origem através de fusões Robertsonianas aos 6 cromossomos metacêntricos dos ovinos.

Koulischer e col. (1972), através do estudo de 15 espécies da Superfamília Bovoidea, sugerem que a especiação nesse grupo ocorreu sem mudanças no cariótipo ou através de translocações Robertsonianas. Os autores consideraram o número de braços cromossômicos (NBA) como um bom "indicador" para o estudo da evolução do cariótipo. Quanto aos cromossomos sexuais, os autores sugerem rearranjos tais como translocações de autossomos e/ou inversões pericêntricas.

Wurster e Benirschke (1968), estudando 50 espécies desta Superfamília, sugeriram o uso principal de fusão Robertsoniana na evolução cariotípica desse grupo.

Schnedl e Czaker (1974), analisando a heterocromatina centromérica e bandas G em bovinos, caprinos e ovinos, observaram que os padrões de bandas G de alguns cromossomos das três espécies apresentam forte semelhança, sugerindo identidade. Alguns braços dos cromossomos metacêntricos do carneiro doméstico, que foram formados através de fusões cêntricas, foram identificados por bandas G, como cromossomos inteiros da cabra e do boi. Os referidos autores também mostraram que entre os cromossomos sexuais dos grupos estudados, ocorrem diferenças morfológicas, provavelmente resultantes de inversão pe

ricêntrica.

Nadler e col. (1973), mostraram em diferentes espécies de carneiros selvagens, conjuntos cromossômicos idênticos através dos padrões de bandas G e comportamento meiótico em híbridos.

Nosso trabalho inclui o estabelecimento dos padrões de formação de bandas G em animais normais B. taurus taurus e B. taurus indicus e no Canchim que é originado de um cruzamento entre animais que apresentam 5/8 B. taurus taurus e 3/8 B. taurus indicus.

Existem algumas indicações que o cruzamento de B. taurus indicus com B. taurus taurus, associa certas qualidades como rusticidade e resistência a doenças do B. taurus indicus a maturidade precoce e produtividade do B. taurus taurus.

O Canchim, inteiramente desenvolvido no Brasil, foi iniciado há 35 anos pelo Zootecnista Antonio Teixeira Vianna (Vianna e col., 1962).

Desses animais, formados por raças das subespécies B. taurus taurus e B. taurus indicus, espera-se que reunam qualidades tais como: maiores índices de desenvolvimento ponderal, maior rendimento em carne, reduzida taxa de perdas, marcante capacidade de adaptação a diferentes condições de meio e elevados padrões de produtividade e de fertilidade.

Sabe-se que, não muito raro, ocorrem em rebanhos, casos de alterações no desenvolvimento sexual sendo a hipoplasia testicular unilateral ou bilateral uma das mais frequentes. Estas alterações poderiam sugerir uma analogia com a Síndrome de Klinefelter na espécie humana, em que ocorrem anoma-

lias nos cromossomos sexuais. Não se pode, entretanto, excluir a possibilidade do fator etiológico ser gênico.

Outro fator importante é a detecção de possíveis translocações cromossômicas que poderiam segregar em condição não balanceada na progênie de portadores em que tais alterações são equilibradas. Este fato provocaria um desequilíbrio gênico, quer por deleção total ou parcial, quer por trissomia parcial ou completa.

O objetivo principal deste trabalho é o estudo do cariótipo de animais que apresentam problemas de fertilidade e/ou de malformações genitais.

Através das técnicas de bandas G, torna-se fácil a detecção de cromossomos que participam de aberrações tais como: translocações, deleções, inversões, etc..

Estes estudos, além de permitir a eliminação de animais com cariótipos anormais dos rebanhos, poderão, entre outros fatores, permitir a redução de mortalidade de embriões e de fetos, devido à aberrações cromossômicas numéricas ou estruturais, e ajudarão na seleção de animais reprodutores.



N O T A

Consideramos neste trabalho o gado europeu e o zebu Afro-asiático como duas subespécies pertencentes a mesma espécie B. taurus, conforme os conceitos de Sinnot, Dunn e Dobzhansky (1961) de que:

"Espécies são grupos de populações que se cruzam e que se acham isoladas reprodutivamente de outros grupos semelhantes".

"Raças são populações mendelianas que diferem nas frequências relativas dos genes ou de estruturas cromossômicas" e

"Subespécies são raças geográficas".

Os animais aqui estudados apresentam a seguinte classificação taxonômica:

Classe	:	Mammalia
Ordem	:	Artiodactyla
Família	:	Bovidae
Sub-Família	:	Bovinae
Gênero	:	<u>Bos</u>
Espécie	:	<u>Bos taurus</u>
Subespécie	:	<u>Bos taurus taurus</u> <u>Bos taurus indicus</u>

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Material

Foram usados 20 animais da subespécie B. taurus taurus, 5 animais da subespécie B. taurus indicus e 33 animais mestiços dos quais 25 eram Canchim, num total de 58 animais. Estes animais foram fornecidos pelas seguintes instituições:

- UEPAE de São Carlos - EMBRAPA (Fazenda Canchim) São Carlos, SP; Faculdade de Medicina Veterinária e Agronomia de Jaboticabal, SP e Agropecuária Lagoa da Serra Ltda., Sertãozinho, SP.

### 2.2 Métodos

#### 2.2.1 Escolha dos animais

Foram escolhidos, para o estabelecimento do padrão de formação de bandas, animais fenotipicamente normais.

Todos os animais que apresentaram qualquer alteração, quer de genitália quer de reprodução (fertilidade), foram selecionados para o estudo cariotípico comparado com o padrão normal.

Para a seleção dos animais com baixa fertilidade, utilizamos os dados de Oliveira Filho (informação pessoal) que obteve a taxa de fertilidade com a razão.

$$t \% = \frac{\text{Nº de crias ou partos}}{\text{Total de vacas cobertas}} \times 100$$

nos vários períodos de monta. Somente foram usados animais com fertilidade abaixo de 50%.

## 2.2.2 Estudo cariotípico

O estudo cariotípico foi feito com metáfases obtidas através de cultura de sangue periférico, com a técnica de Moorhead e col. (1960), modificada para bovinos, pelo Laboratório de Citogenética Humana da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP, onde também já foi estabelecida a técnica de formação de bandas G.

### 2.2.2.1 Colheita do sangue

A colheita do sangue foi feita da seguinte maneira:

- a) Desinfetava-se parte da região do pescoço do animal onde se localiza a jugular;
- b) pressionava-se, contra essa veia, uma agulha fazendo jorrar o sangue;
- c) encaixava-se uma seringa previamente esterilizada e heparinizada (liquemine-Roche-5.000 U/ml) nessa agulha, colhendo aproximadamente 15 ml de sangue, que era transferido para o tubo de ensaio estéril.

O sangue era transportado para o laboratório e semeado no mesmo dia.

OBS.:- Da maioria dos animais, coletou-se sangue periférico mais de uma vez,

pois surgiram alguns problemas na técnica de cultura. O número total de culturas feitas foi de 160.

#### 2.2.2.2 Técnica de cultura de linfócitos

a) Após a sedimentação do sangue, retirava-se 1,5 ml de plasma sobrenadante e os distribuía em 3 frascos contendo 5 ml do meio de cultura (TC 199). Colocava-se os 3 frascos em estufa à temperatura de 37°C, durante 72 horas.

b) Após 70 horas de incubação, colocava-se uma gota de solução de colchicina em cada frasco homogeneizando-se. Solução de colchicina: 160 mg de Colchicina Alkaloid (Fischer Scientific Co., USA) em 100 ml de água destilada ( $4 \cdot 10^{-3}M$ ).

c) Completado o tempo de incubação (72 horas), agitavam-se os frascos para despregar as células aderidas ao fundo. Colocava-se o conteúdo de cada frasco em um tubo de centrifuga de 50 ml, agitando-o com uma pipeta de Pasteur. Centrifugava-se a 800-1000 rpm durante 5 minutos e retirava-se o sobrenadante com uma pipeta de Pasteur.

d) Ressuspendiam-se as células em cerca de 10 ml de solução hipotônica de

cloreto de potássio 0,075 M e colocava-se em estufa a 37°C, durante 5 minutos.

e) Centrifugava-se a 800-1000 rpm durante 5 minutos.

f) Retirava-se a solução hipotônica com uma pipeta de Pasteur, e procedia-se a fixação, colocando 5 ml de fixador recém preparado (Metanol e Ácido acético na proporção de 3:1). Agitava-se as células no fixador centrifugando em seguida, durante 5 minutos a 800-1000 rpm.

g) Retirava-se o fixador e colocava-se novamente mais ou menos 0,5 ml de fixador para se obter uma diluição adequada para o preparo das lâminas.

### 2.2.2.3 Composição do meio de cultura

O meio de cultura utilizado é constituído por:

a) Meio de Morgan, Morton e Parker, sintético, conhecido como TC 199 produzido pelo Gibco Laboratory sob a forma de pó desidratado para ser dissolvido na proporção de 55,5 g/5.000 ml de água destilada desionizada. Este meio é empregado em proporção correspondente a 78% do volume final.

b) Soro bovino esterilizado em fil—

tro Seitz EK e empregado na proporção de 20% do volume total.

c) Fito-hemaglutinina do Laboratório de Citogenética Humana da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP (Ferrari, 1968) e empregada na proporção de 2% do volume total (0,4 ml).

d) Penicilina cristalizada (100 u/20 ml) e estreptomicina (0,025 mg/20 ml).

Após o preparo, o meio é dividido em frações de 15 ml em frascos com tampas plásticas e guardados em congelador à temperatura de  $-20^{\circ}\text{C}$  para utilização posterior.

#### 2.2.2.4 Preparo de lâminas

O preparo das lâminas foi feito pingando-se uma gota do material fixado em uma lâmina perfeitamente limpa e estocada em água destilada gelada.

Para a coloração convencional (Orceína), enxugava-se o excesso de água e passava-se rapidamente a lâmina em uma chama de álcool até a secagem total. Para cada cultura preparamos de 5 a 10 lâminas. Para a obtenção de bandas G, depois de pingado o material na lâmina, esta era secada à temperatura ambiente. Foram prepara-

das de 10 a 30 lâminas de cada cultura.

#### 2.2.2.5 Técnica de Formação de Bandas G

A formação de bandas G cromossômicas foi obtida por digestão proteolítica pela tripsina e coloração posterior com Giemsa. A técnica usada foi uma modificação da proposta por Scheres (1972). O processo foi o seguinte:

- a) Colocava-se a lâmina em uma cuba contendo uma solução de tripsina a 1% em tampão fosfato pH 6,8, <sup>(Sörensen)</sup> por um tempo de 1 segundo e 4 minutos, dependendo da idade da lâmina.
- b) Lavava-se a lâmina em água destilada, colocando-a em um suporte horizontal.
- c) Recobria-se a lâmina com uma solução de Giemsa em tampão fosfato pH 6,8 (proporção 1:30), deixando por 4 minutos.
- d) Lavava-se a lâmina em água corrente, secando-a à temperatura ambiente.
- e) Montava-se em balsamo do Canadá ou Euparal.

#### 2.2.2.6 Análise das lâminas

A análise do material foi realizada em microscópio Zeiss de óptica comum e de contraste de fase, com objetivas Neofluar

e condensador VZ. A localização das metáfases na lâmina foi feita com a objetiva de aumento 16x e a análise das mesmas foi realizada com objetiva de aumento 100x

Como critério para exclusão de mosaicismismo foi usada a análise sequencial de Patau (Ferrari, 1968).

O método de amostragem proposto por Patau permite uma estimativa do limite máximo provável da frequência de estirpes celulares portadoras de cariótipo discrepante.

Analisava-se inicialmente 11 metáfases para cada caso. Se todas as células apresentassem o mesmo cariótipo, considerava-se o caso encerrado. Caso fosse observado algum cariótipo anormal, analisavam-se mais 6 células. Se no término da análise das 17 células não fosse encontrada mais nenhuma com cariótipo discrepante, o estudo era encerrado. Se, ao contrário, fosse observada mais uma célula apresentando cariótipo diferente, mas idêntico a anterior, outras 6 metáfases eram estudadas. O estudo era encerrado se ao completarmos 23 células analisadas, apenas 2 apresentassem cariótipo anormal. Entretanto, se no fim do estudo das 23 células,



uma terceira apresentasse as mesmas características das duas anteriores, outras 6 metáfases eram analisadas. O estudo era encerrado com um total de 29 metáfases analisadas e classificadas caso não se encontrasse mais nenhuma anormal. A análise, por este método, entretanto pode ser prosseguida para 100 ou 200 metáfases.

Na tabela I temos o resumo da sequência de alternativas na rotina de análise na qual ficam definidas as hipóteses I, II, III, IV e V pelas quais podem-se tirar conclusões sobre os níveis prováveis da frequência do cariótipo discrepante nos casos analisados.

TABELA I

Sequência de alternativas na Rotina de Análise

Nº de células analisadas	Nº de células apresentando o mesmo tipo de cariótipo discrepante	Decisão quanto ao estudo do caso
11	0 Hipótese I	Encerrado
	> 0	Análise de mais 6 metáfases
17	1 Hipótese II	Encerrado
	> 1	Análise de mais 6 metáfases
23	2 Hipótese III	Encerrado
	> 2	Análise de mais 6 metáfases
29	3 Hipótese IV	Encerrado
	> 3 Hipótese V	Análise de 100 ou 200 metáfases

Quando a frequência real do cariótipo anormal for de 28,9%, a probabilidade de ocorrência de cada uma, ou de qualquer uma das hipóteses I, II, III e IV é menor que 5%; sendo portanto, a probabilidade da hipótese V, maior que 95%. Desta forma, a frequência do cariótipo anormal em todos os casos em que se enquadra uma das quatro primeiras hipóteses é sempre inferior a 30%, o que exclui como verdadeiro um mosaicismo que não seja igual ou superior a esta percentagem.

Entretanto, para alguns animais (9-tabela III; 1, 52, 56 e 57 - tabela VI), não foi possível usar esse método devido a falta de número suficiente de metáfases. Para outros animais (23-tabela III; 5 e 42-tabela V) o número de células analisadas foi aumentado para confirmação da normalidade cariotípica, já que as metáfases não eram de boa qualidade. O animal nº 6 (Tabela III) apresentou uma célula anormal (trissomia autossômica) nas primeiras 11 metáfases analisadas e confirmada, pelo bandeamento, como trissomia 10. O número de análises foi aumentado para 35 numa tentativa de confirmar esse mosaicismo no sangue periférico desse animal normal.

#### 2.2.2.7 Fotomicrografia

As lâminas foram fotomicrografadas em um fotomicroscópio Zeiss de óptica comum e de contraste de fase, com objetiva de aumento 100x. O filme utilizado foi o Panatomic-X de 35 mm da Kodak

Para cada animal, foram fotomicrografadas 2 metáfases coradas com orceína e 4 metáfases bandeadas.

### 3. RESULTADOS

#### 3.1 Padrão de formação de bandas cromossômicas G nas subespécies B. taurus taurus e B. taurus indicus e no Canchim.

Os cromossomos apresentando bandas G são mostrados nas figuras 1 (B. taurus taurus), 2 (B. taurus indicus) e 3 (Canchim), respectivamente.

Na figura 4, são apresentados, esquematicamente, os padrões de formação das bandas G dos cromossomos das subespécies B. taurus taurus e B. taurus indicus e do Canchim.

Nos esquemas estão representados, aproximadamente, os tamanhos e as localizações das bandas G, pelo fato de não termos feito medidas das mesmas.

As bandas G destes cromossomos foram descritas (Tabela II) de acordo com a Conferência de Paris (1971, 1975) para cromossomos humanos, sendo que os braços curtos e longos foram denominados pelas letras p e q, respectivamente, de acordo com o estabelecido pela Conferência de Chicago (1966).

#### 3.2 Estudo do cromossomo Y nas subespécies B. taurus taurus, B. taurus indicus e no Canchim.

Foram analisados 13 animais da subespécie B. taurus taurus, 3 animais da subespécie B. taurus indicus e 6 animais da raça Canchim.

Os resultados confirmam que a subespécie B. tau-

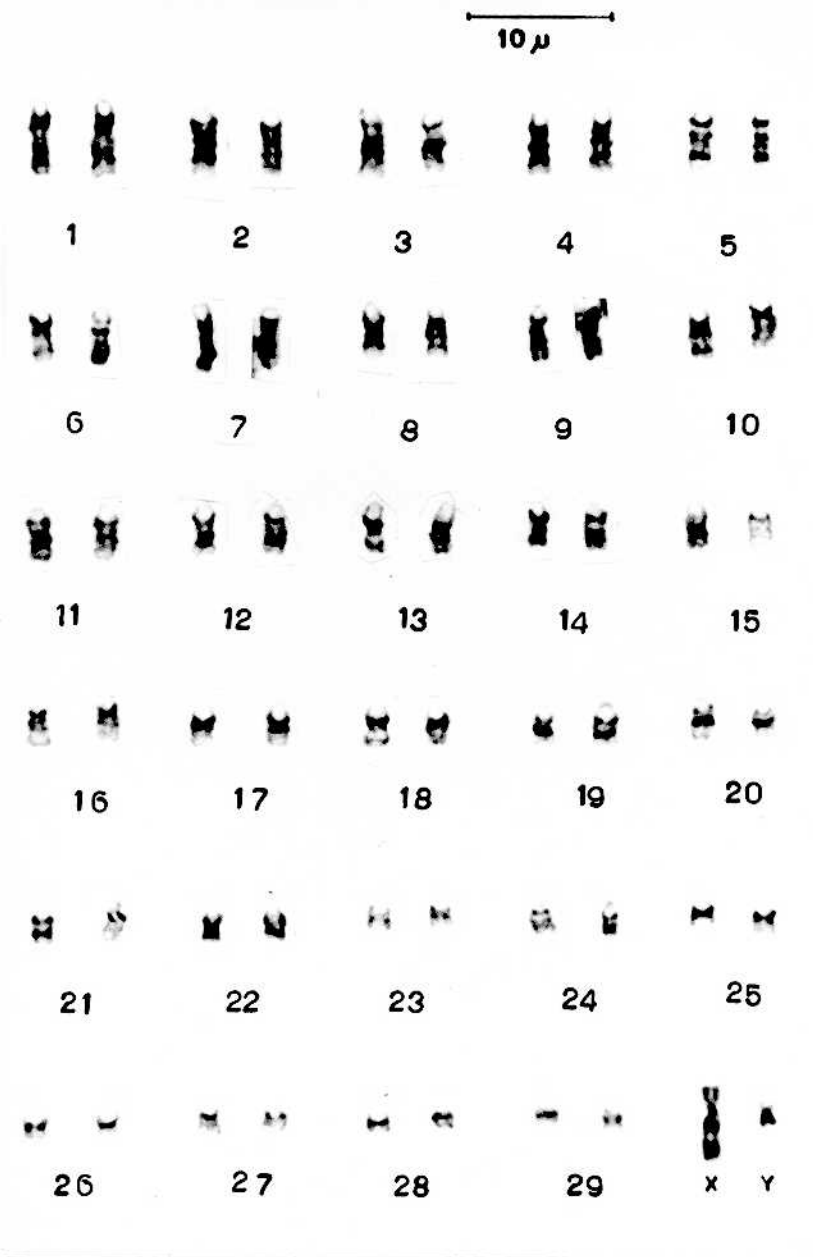


Figura 1 - Cromossomos metafásicos da subespécie B. taurus taurus (2n = 60), apresentando bandas G. Macho normal nº 19.

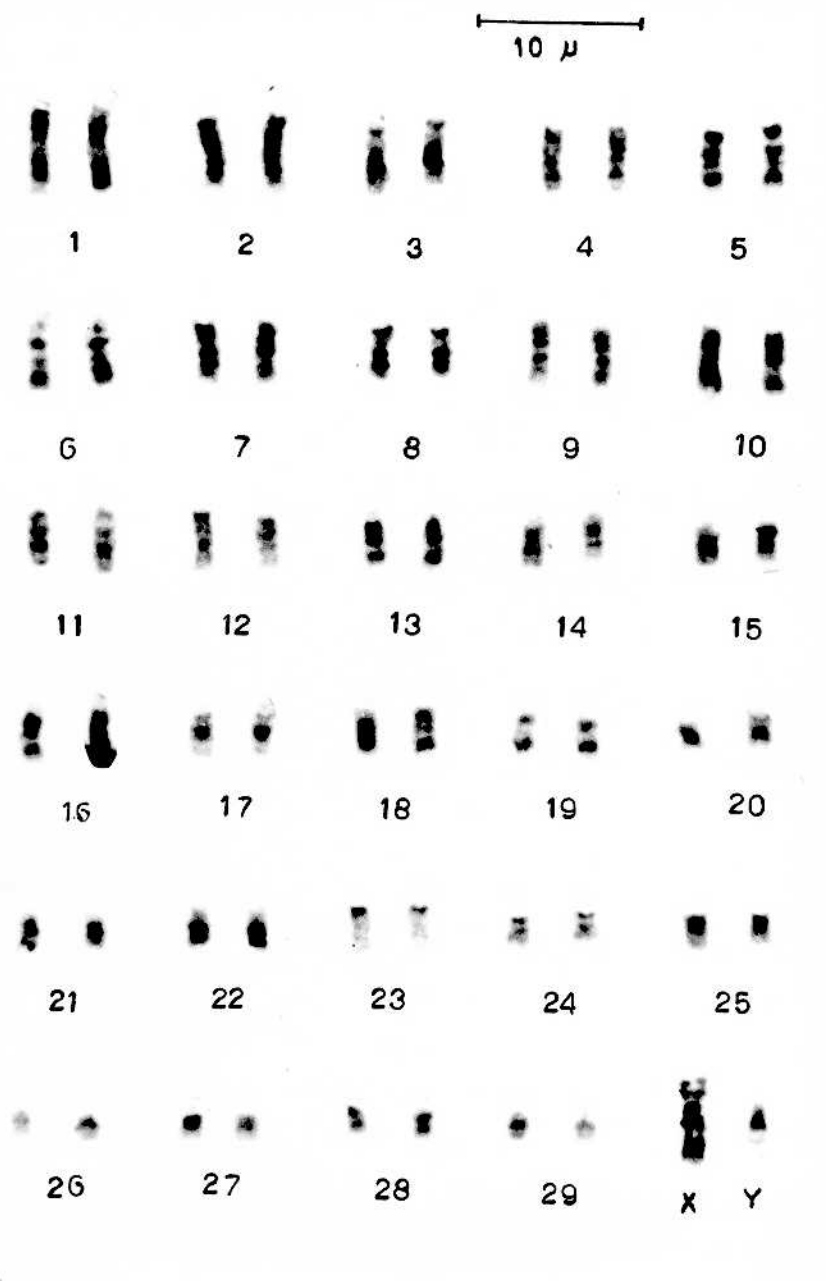


Figura 2 - Cromossomos metafásicos da subespécie B. taurus indicus ( $2n = 60$ ), apresentando bandas G. Macho normal nº 8.

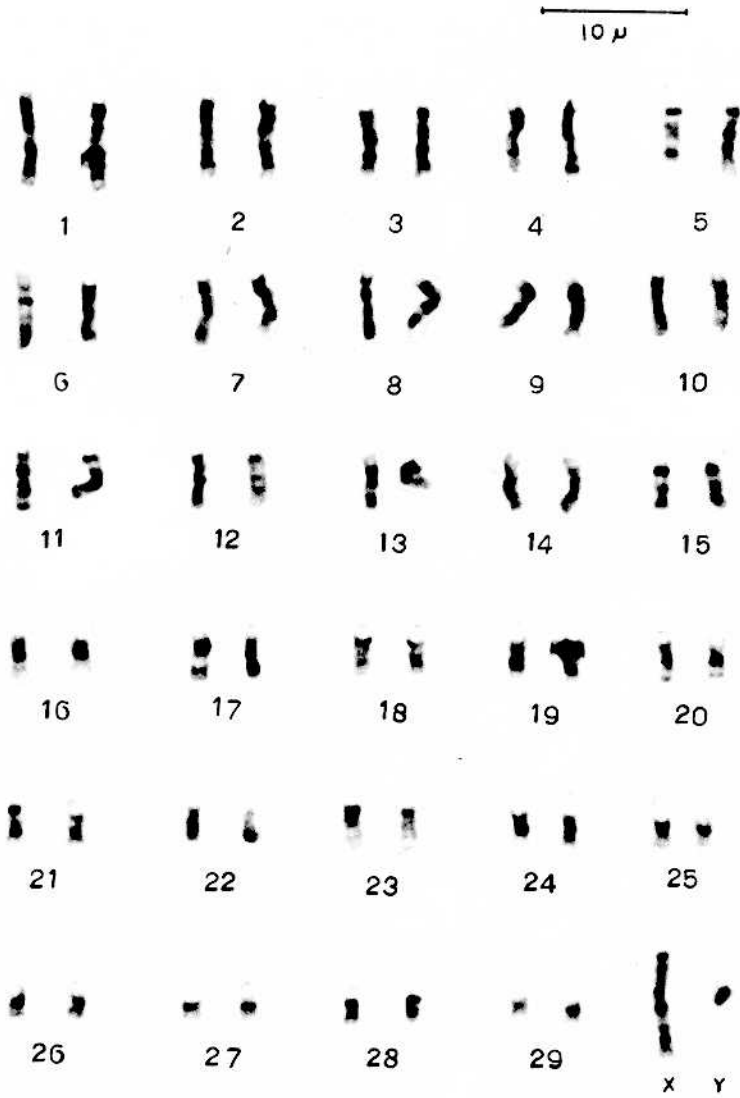


Figura 3 - Cromossomos metafásicos do Canchim ( $2n = 60$ ), apresentando bandas G.  
Macho normal nº 27

## TABELA II

DESCRIÇÃO DAS BANDAS CROMOSSÔMICAS G PARA AS SUBESPÉCIES B. taurus taurus E B. taurus indicus E  
PARA O CANCHIM

Cromosomas	DESCRICÃO DA BANDA						
	Braço	Região	Localização	Marcadora	Tipo	Tamanho	Denominação
1	p	1	proximal	+	neg	médio	1 p 11
			distal	+	neg	médio	1 p 12
2	q	1	proximal	+	pos	grande	1 q 11
			proximal		neg	pequeno	1 q 12
			proximal		pos	grande	1 q 13
			proximal		neg	médio	1 q 14
			mediana		pos	médio	1 q 15
			mediana		neg	grande	1 q 16
			mediana		pos	pequeno	1 q 21
			mediana		neg	grande	1 q 22
			mediana		pos	médio	1 q 23
			mediana		neg	pequeno	1 q 24
2	q	1	mediana		neg	médio	1 q 25
			distal		neg	médio	1 q 26
			distal		pos	médio	1 q 27
			distal		neg	pequeno	1 q 28
			distal		pos	médio	1 q 29
			distal		pos	médio	1 q 29

D E S C R I Ç Ã O D A B A N D A

Cromos  
somos

Braço	Região	Localização	Marcadora	Tipo	Tamanho	Denominação	
2	1	distal		neg	médio	1 q 210	
		distal	+	pos	pequeno	1 q 211	
	1	única	+	neg	médio	2 p 11	
		proximal	+	pos	grande	2 q 11	
		proximal		neg	médio	2 q 12	
		proximal		pos	médio	2 q 13	
		proximal		neg	médio	2 q 14	
		mediana		pos	médio	2 q 15	
		2	mediana	+	neg	grande	2 q 21
			mediana		pos	médio	2 q 22
mediana			neg	médio	2 q 23		
distal			pos	grande	2 q 24		
distal			neg	médio	2 q 25		
distal			facult.	pequeno	2 q 26		
distal		+	neg	grande	2 q 27		



D E S C R I Ç Ã O D A B A N D A

Cromos

somos

	Braço	Região	Localização	Marcadora	Tipo	Tamanho	Denominação
3	P	1	única	+	neg	médio	3 p 11
	q	1	proximal	+	pos	grande	3 q 11
			proximal		neg	grande	3 q 12
	2		proximal	+	pos	pequeno	3 q 21
			proximal		neg	médio	3 q 22
			mediana		pos	grande	3 q 23
			mediana		neg	médio	3 q 24
	3		mediana	+	pos	grande	3 q 31
mediana				neg	médio	3 q 32	
distal				pos	médio	3 q 33	
distal				neg	médio	3 q 34	
distal				facult.	pequeno	3 q 35	
distal				neg	grande	3 q 36	
4	P	1	única	+	neg	médio	4 p 11
	q	1	proximal	+	pos	grande	4 q 11
			proximal		neg	médio	4 q 12
			proximal		pos	médio	4 q 13
			proximal		neg	médio	4 q 14
			mediana		pos	grande	4 q 15
			mediana		neg	grande	4 q 21

D E S C R I Ç Ã O D A B A N D A

Cromos

somos	Braço	Região	Localização	Marcadora	Tipo	Tamanho	Denominação
3			mediana		pos	médio	4 q 22
			mediana		neg	médio	4 q 23
			distal	+	pos	médio	4 q 31
			distal		neg	médio	4 q 32
			distal		pos	pequeno	4 q 33
			distal	+	neg	grande	4 q 34
5	p	1	única	+	neg	médio	5 p 11
	q	1	proximal	+	pos	grande	5 q 11
			proximal		neg	grande	5 q 12
			mediana		pos	grande	5 q 13
2			mediana		neg	médio	5 q 14
			mediana		pos	médio	5 q 15
			mediana		neg	grande	5 q 16
			distal	+	pos	grande	5 q 21
			distal	+	neg	grande	5 q 22
	p	1	única	+	neg	médio	6 p 11
	q	1	proximal	+	pos	grande	6 q 11
			proximal		neg	médio	6 q 12
2			proximal	+	pos	grande	6 q 21
			mediana		neg	grande	6 q 22

D E S C R I Ç Ã O D A B A N D A

Cromos

somos

Braço	Região	Localização	Marcadora	Tipo	Tamanho	Denominação
		mediana		pos	médio	6 q 23
		mediana		neg	grande	6 q 24
		distal		pos	grande	6 q 251
		distal		neg	pequeno	6 q 252
		distal		pos	médio	6 q 253
		distal	+	neg	médio	6 q 26
7	1	única	+	neg	médio	7 p 11
	1	proximal	+	pos	grande	7 q 11
		proximal		neg	médio	7 q 12
		proximal		pos	médio	7 q 13
		mediana		neg	médio	7 q 14
	2	mediana	+	pos	médio	7 q 21
		mediana		neg	grande	7 q 22
		mediana		pos	médio	7 q 23
		mediana		neg	médio	7 q 24
		distal		pos	pequeno	7 q 25
		distal		neg	médio	7 q 26
		distal		pos	médio	7 q 27
		distal		neg	médio	7 q 28

DESCRICÃO DA BANDA							
Cromosomas	Braço	Região	Localização	Marcadora	Tipo	Tamanho Denominação	
8	p	1	única	+	neg	médio	8 p 11
			proximal	+	pos	grande	8 q 11
			proximal		neg	grande	8 q 12
			mediana		pos	médio	8 q 13
	q	1	mediana		neg	grande	8 q 14
			mediana		pos	grande	8 q 15
			distal		neg	grande	8 q 16
			distal		pos	grande	8 q 21
9	p	1	única	+	neg	médio	9 q 11
			proximal	+	pos	grande	9 q 11
			proximal		neg	grande	9 q 12
			mediana		pos	grande	9 q 13
	q	1	mediana		neg	médio	9 q 14
			mediana	+	pos	médio	9 q 21
			mediana		neg	médio	9 q 22
			distal		pos	médio	9 q 23
2	1	distal		neg	grande	8 q 16	
		distal		pos	grande	8 q 21	
		distal		neg	médio	8 q 22	
		distal		facult.	pequeno	8 q 23	

D E S C R I Ç Ã O D A B A N D A

Cromos

somos	Braço	Região	Localização	Marcadora	Tipo	Tamanho	Denominação
10	p	1	única	+	neg	médio	10 p 11
	q	1	proximal	+	pos	grande	10 q 11
			proximal		neg	pequeno	10 q 12
			proximal		pos	médio	10 q 13
			mediana		neg	pequeno	10 q 14
			mediana		pos	grande	10 q 15
		2	mediana	+	neg	grande	10 q 21
			distal		pos	médio	10 q 22
			distal		neg	médio	10 q 23
			distal		pos	grande	10 q 24
		distal		neg	pequeno	10 q 25	
11	p	1	única	+	neg	médio	11 p 11
	q	1	proximal	+	pos	grande	11 q 11
			proximal		neg	médio	11 q 12
			proximal		pos	grande	11 q 13
			mediana		neg	grande	11 q 14
			mediana		pos	médio	11 q 15
			mediana		neg	médio	11 q 16
		2	distal	+	pos	grande	11 q 21
			distal		neg	médio	11 q 22

DESCRIÇÃO DA BANDA

CROMOSOMOS

Braço	Região	Localização	Marcadora	Tipo	Tamanho	Denominação
12	p	distal		pos	médio	11 q 23
		distal	+	neg	pequeno	11 q 24
	q	única	+	neg	médio	12 p 11
		proximal	+	pos	grande	12 q 11
		proximal		neg	médio	12 q 12
		proximal		pos	pequeno	12 q 13
2		mediana		neg	grande	12 q 14
		mediana		pos	grande	12 q 15
	distal	distal	+	neg	médio	12 q 21
		distal		pos	médio	12 q 22
		distal	+	neg	grande	12 q 23
		única	+	neg	médio	13 p 11
p	proximal	+	pos	grande	13 q 11	
	proximal		neg	médio	13 q 12	
q	mediana		pos	grande	13 q 13	
	mediana	+	neg	grande	13 q 21	
	distal		pos	médio	13 q 22	
	distal		neg	médio	13 q 23	
distal	distal	+	pos	médio	13 q 24	

D E S C R I Ç Ã O D A B A N D A

Cronos

Crônios	Braço	Região	Localização	Marcadora	Tipo	Tamanho	Denominação
14	p	1	única	+	neg	médio	14 p 11
	q	1	proximal	+	pos	grande	14 q 11
		2	mediana	+	neg	grande	14 q 21
			mediana		pos	médio	14 q 22
			mediana		neg	pequeno	14 q 23
			distal		pos	médio	14 q 24
			distal		neg	médio	14 q 25
			distal		pos	médio	14 q 26
		distal		neg	pequeno	14 q 27	
15	p	1	única	+	neg	médio	15 p 11
	q	1	proximal	+	pos	grande	15 q 11
		2	proximal	+	neg	grande	15 q 21
			mediana		pos	médio	15 q 22
			mediana		neg	médio	15 q 23
			distal		pos	médio	15 q 24
			distal		neg	médio	15 q 25
			distal		pos	médio	15 q 26
16	p	1	única	+	neg	médio	16 p 11
	q	1	proximal	+	pos	grande	16 q 11
			proximal		neg	pequeno	16 q 12
			proximal		pos	médio	16 q 13

D E S C R I Ç Ã O D A B A N D A

Cromos

somos	Braço	Região	Localização	Marcadora	Tipo	Tamanho	Denominação
17	p	1	mediana		neg	pequeno	16 q 14
			mediana		pos	médio	16 q 15
			mediana		neg	grande	16 q 16
	q	1	distal		pos	pequeno	16 q 17
			distal		neg	grande	16 q 18
			distal	+	pos	médio	16 q 19
18	p	1	única	+	neg	médio	17 p 11
			proximal	+	pos	grande	17 q 11
			proximal		neg	médio	17 q 12
	q	2	mediana	+	pos	grande	17 q 21
			mediana		neg	grande	17 q 22
			mediana		pos	pequeno	17 q 23
18	p	1	distal		neg	grande	17 q 24
			distal	+	pos	médio	17 q 25
			única	+	neg	médio	18 p 11
	q	1	proximal	+	pos	grande	18 q 11
			proximal		neg	médio	18 q 12
			mediana		pos	médio	18 q 13
2		mediana	+	neg	grande	16 q 21	
		distal		pos	médio	18 q 22	
		distal	+	neg	grande	18 q 23	



D E S C R I Ç Ã O - D A B A N D A

Cromos

nomos	Braço	Região	Localização	Marcadora	Tipo	Tamanho	Denominação
19	p	1	única	+	neg	médio	19 p 11
			proximal	+	pos	grande	19 q 11
	q	1	proximal		neg	grande	19 q 12
			mediana		pos	pequeno	19 q 13
			mediana		neg	médio	19 q 14
20	p	2	distal		pos	médio	19 q 15
			distal	+	neg	pequeno	19 q 21
	q	1	distal		pos	médio	19 q 22
			distal	+	neg	grande	19 q 23
			única		neg	médio	20 p 11
21	p	1	proximal	+	pos	médio	20 q 11
			proximal		neg	médio	20 q 12
	q	1	mediana		pos	médio	20 q 13
			mediana		neg	pequeno	20 q 14
			mediana		pos	médio	20 q 15
	2	1	distal		neg	grande	20 q 16
			distal	+	pos	médio	20 q 17
21	p	1	única	+	neg	médio	21 p 11
			proximal	+	pos	grande	21 q 11
	q	2	mediana	+	neg	grande	21 q 21
			mediana		pos	médio	21 q 221

D E S C R I Ç Ã O D A B A N D A

Cromos-  
somos

Braço	Região	Localização	Marcadora	Tipo	Tamanho	Denominação
22	p	mediana		neg	pequeno	21 q 222
		mediana		pos	médio	21 q 223
		distal	+	neg	grande	21 q 23
22	p	única	+	neg	médio	22 p 11
		proximal	+	pos	médio	22 q 11
	q	proximal		neg	médio	22 q 12
		mediana		pos	grande	22 q 13
		mediana		neg	grande	22 q 14
		distal		pos	grande	22 q 15
		distal	+	neg	médio	22 q 16
23	p	única	+	neg	médio	23 p 11
		proximal	+	pos	grande	23 q 11
	q	mediana		neg	médio	23 q 12
		mediana		pos	médio	23 q 13
		mediana		neg	pequeno	23 q 14
		mediana		pos	médio	23 q 15
		distal		neg	grande	23 q 16
		distal	+	facult.	médio	23 q 17
24	p	proximal	+	neg	médio	24 p 11
		distal	+	pos	médio	24 p 12
	q	proximal	+	pos	grande	24 q 11

D E S C R I Ç Ã O D A B A N D A

Cromosomas	Braço	Região	Localização	Marcadora	Tipo	Tamanho	Denominação	
25	p	1	mediana		neg	grande	24 q 12	
			mediana		pos	médio	24 q 13	
	q	1	mediana		neg	pequeno	24 q 14	
			distal		pos	médio	24 q 15	
			distal	+	neg	médio	24 q 16	
26	p	1	única	+	neg	médio	25 p 11	
			proximal	+	pos	grande	25 q 111	
	q	1	proximal	+	neg	pequeno	25 q 112	
			proximal	+	pos	grande	25 q 113	
			distal		neg	grande	25 q 12	
				distal	+	facult.	médio	25 q 13
				única	+	neg	médio	26 p 11
27	p	1	proximal	+	pos	grande	26 q 111	
			proximal	+	neg	pequeno	26 q 112	
	q	1	proximal	+	pos	médio	26 q 113	
			distal		neg	grande	26 q 12	
			distal	+	pos	médio	26 q 13	
			única	+	neg	médio	27 p 11	
			proximal		pos	grande	27 q 11	
			mediana		neg	médio	27 q 12	

D E S C R I Ç Ã O . D A B A N D A

Cromosomas

Braço	Região	Localização	Marcadora	Tipo	Tamanho	Denominação
28	p	mediana		pos	médio	27 q 13
		distal		neg	médio	27 q 14
		distal	+	facult.	médio	27 q 15
	q	proximal	+	neg	médio	28 p 11
		distal	+	pos	médio	28 p 12
		proximal	+	pos	grande	28 q 11
29	p	mediara		neg	médio	28 q 12
		distal		pos	médio	28 q 13
		distal	+	neg	pequeno	28 q 14
		única	+	neg	médio	29 p 11
X	p	proximal	+	neg	pequeno	29 q 11
		proximal		pos	grande	29 q 12
		distal		neg	grande	29 q 13
		distal	+	facult.	médio	29 q 14
X	p	proximal	+	pos	médio	X p 11
		proximal		neg	grande	X p 12
		mediara		pos	médio	X p 13
		distal		neg	médio	X p 14
X	p	distal	+	pos	médio	X p 15

D E S C R I Ç Ã O D A B A N D A

Cromos-  
somos

	Braço	Região	Localização	Marcadora	Tipo	Tamanho	Denominação
	q	1	proximal	+	pos	médio	X q 11
			proximal		neg	médio	X q 12
			proximal		pos	médio	X q 131
			proximal		neg	pequeno	X q 132
			proximal		pos	médio	X q 133
	2		mediana	+	neg	grande	X q 21
			distal		pos	médio	X q 221
			distal		neg	pequeno	X q 222
			distal		pos	médio	X q 223
			distal		neg	médio	X q 23
BINY	p	1	proximal	+	pos	pequeno	BINY p 11
			distal	+	neg	médio	BINY p 12
			proximal	+	pos	grande	BINY q 11
	q	1	distal		neg	grande	BINY q 12
			distal		pos	médio	BINY q 13
			proximal	+	pos	pequeno	BTAY p 11
BTAY	p	1	mediana		neg	grande	BTAY p 12
			distal	+	pos	médio	BTAY p 13
	q	1	proximal	+	pos	grande	BTAY q 11
			distal	+	neg	médio	BTAY q 12

rus taurus e o Canchim apresentam o cromossomo Y submetacêntrico enquanto que a subespécie B. taurus indicus apresenta o Y acrocêntrico o que pode ser visto na Fig. 4, onde estão esquematizados os dois tipos de cromossomo Y.

### 3.3 Estudo cariotípico em animais fenotipicamente normais

Pelas análises cromossômicas nas subespécies B. taurus taurus e B. taurus indicus e no Canchim, todos os autosomos poderão ser classificados como acrocêntricos. Na subespécie B. taurus taurus (Fig. 5) e no Canchim, os cromossomos sexuais (X e Y) são classificados como submetacêntricos e na subespécie B. taurus indicus (Fig. 6) somente o X é submetacêntrico sendo o Y um acrocêntrico de tamanho pequeno.

Na Tabela III, temos a relação dos machos fenotipicamente normais. Dos 23 machos analisados, 2 apresentaram mosaïcismo cromossômico. O animal de nº 6 (B. taurus indicus) apresentou 5,7% das células com cariótipo  $60,XY+10$  (Fig. 7). O animal de nº 49 (mestiço 5/8 charolês 3/8 zebu) apresentou em nove células analisadas, 4 com cariótipos  $61,XY+mar$  (Fig. 8). Os demais animais analisados apresentaram cariótipos normais, ou seja,  $60,XY$ .

Na Tabela IV temos a relação das fêmeas fenotipicamente normais. Das 12 fêmeas normais analisadas, 11 apresentaram cariótipos normais, ou seja,  $60,XX$ .

A fêmea de nº 36 (Canchim), apresentou duas células com intervalo acromático em um dos cromossomos X (Figs. 9 e 10).

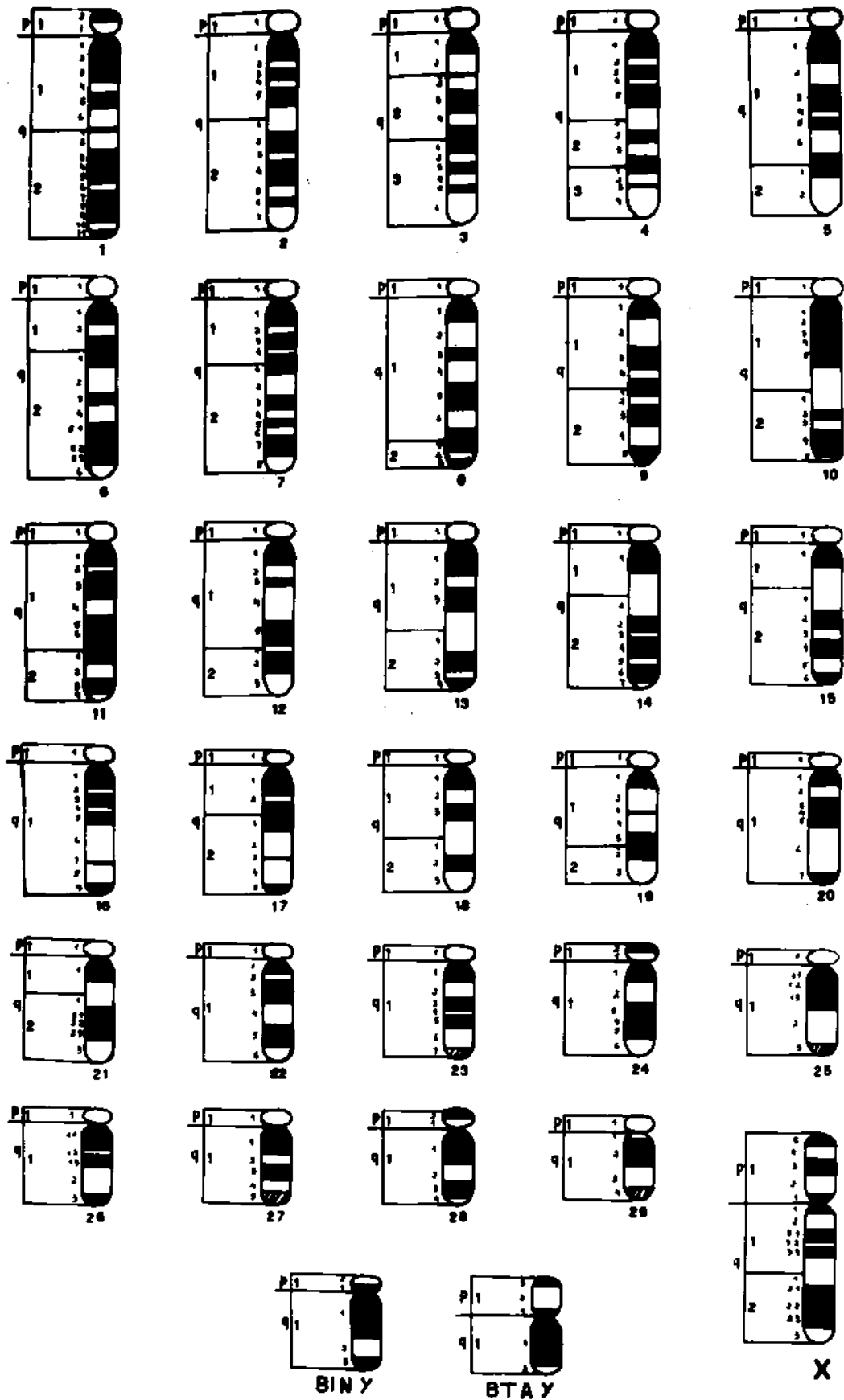


Figura 4 - Esquema dos padrões de formação de bandas G dos cromossomos das subespécies B. taurus taurus (BTA) e B. taurus indicus (BIN) e do Canchim.

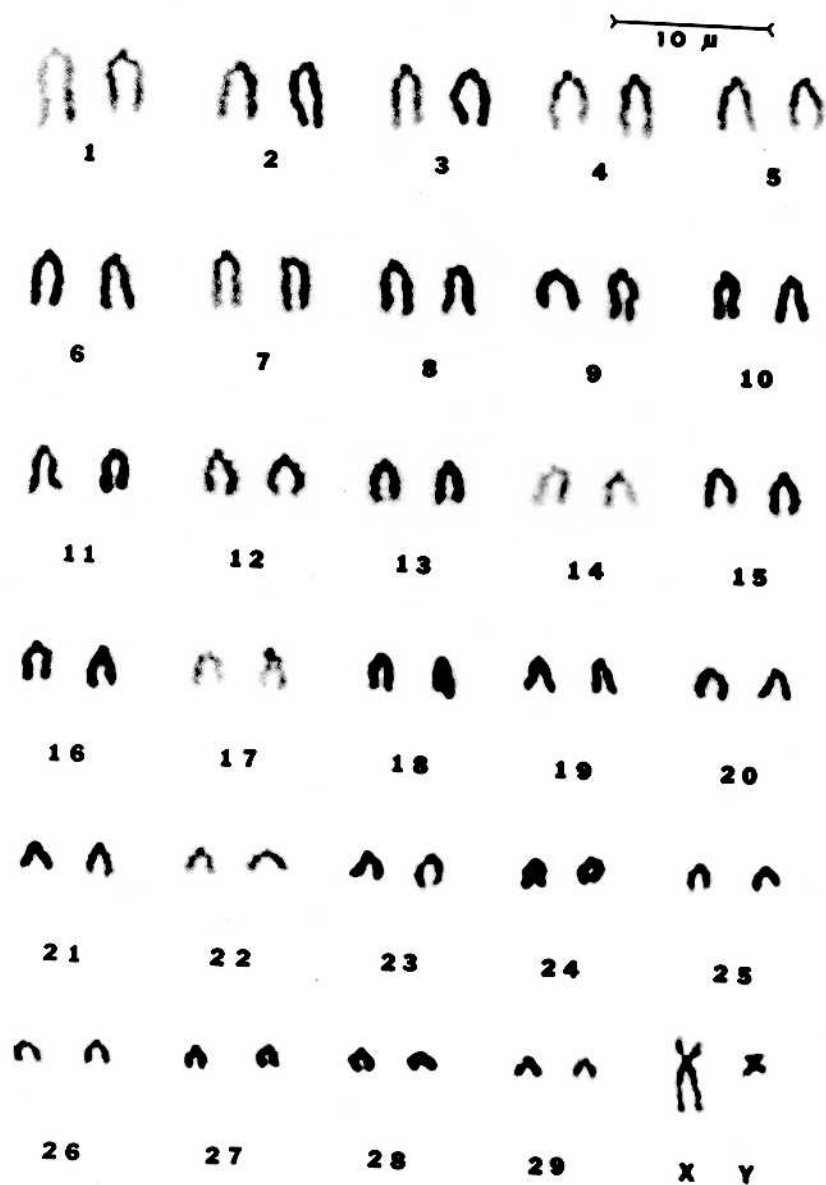


Figura 5 - Cromossomos metafásicos da subespécie B. taurus.  
taurus. Cariótipo normal - 60,XY. Orceína acética.  
Macho normal nº 13.



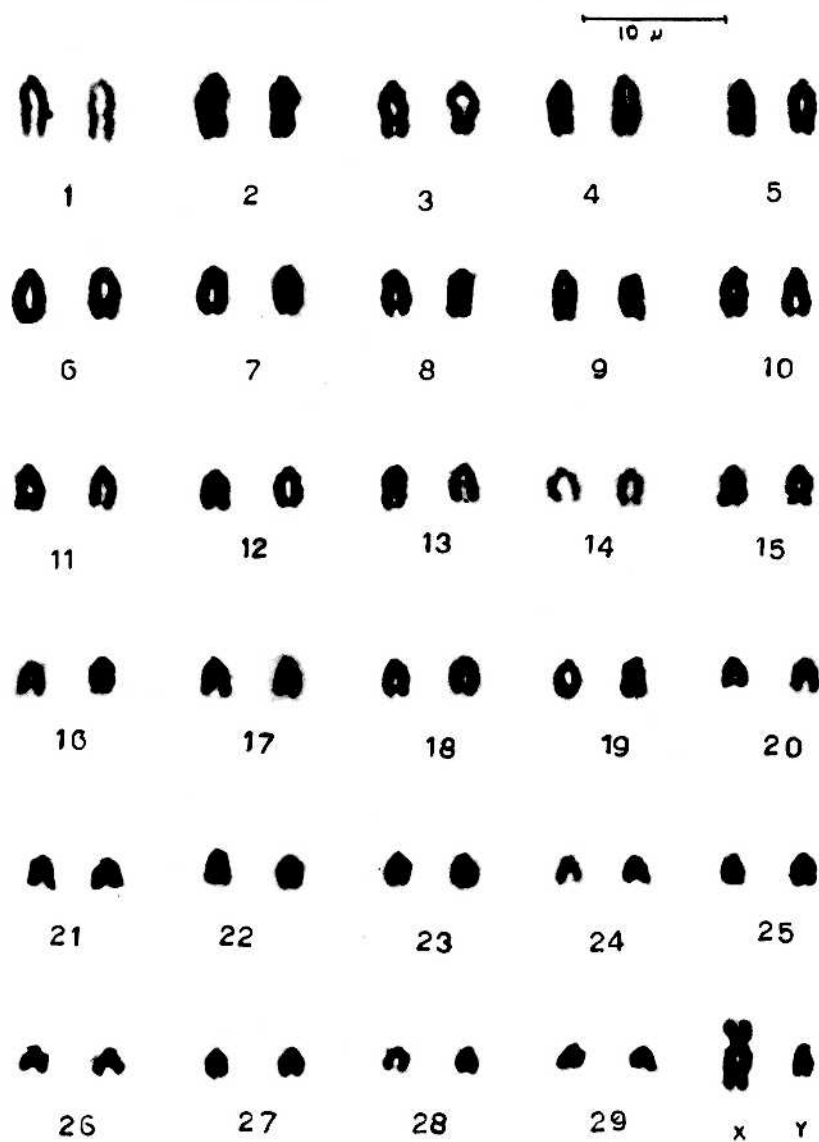


Figura 6 - Cromossomos metafásicos da subespécie B.taurus indicus. Cariótipo normal. 60,XY. Orceína acética. Macho normal nº 7.

- TABELA III

Machos fenotipicamente normais. Análise cromossômica

Número de cultura	Espécie	Nº de cél. analisadas	Resultados
6	<u>B. taurus indicus</u>	35	33 - 60,XY (94,3%) 2 - 61,XY+10 (5,7%)
7	"	11	60,XY
8	"	11	60,XY
9	<u>B. taurus taurus</u>	11	60,XY
10	"	11	60,XY
11	"	11	60,XY
12	"	11	60,XY
13	"	11	60,XY
14	"	11	60,XY
15	"	11	60,XY
16	"	11	60,XY
19	"	11	60,XY
20	"	11	60,XY
21	"	11	60,XY
22	"	11	60,XY
23	"	29	60,XY
24	Canchim	11	60,XY
25	"	11	60,XY
26	"	11	60,XY
27	"	11	60,XY
28	"	11	60,XY
48	"	11	60,XY
49	<u>B. taurus taurus</u>	9	5 - 60,XY 4 - 61,XY+mar

TABELA IV

Fêmeas fenotipicamente normais. Análise cromossômica

Nº cultura	Espécie	Nº células analisadas	Resultados
17	Canchim	11	60,XX
18	Canchim	11	60,XX
29	Mestiço+	11	60,XX
30	Mestiço+	11	60,XX
31	Mestiço+	11	60,XX
32	Mestiço+	11	60,XX
33	<u>B. taurus</u>	11	60,XX
34	Mestiço+	11	60,XX
35	Mestiço+	11	60,XX
36	Canchim	11	60,XX-intervalo a-cromático em 1 dos X.
37	Canchim	11	60,XX
38	Canchim	11	60,XX

+ Animais 3/4 B. indicus<sup>x</sup>; 1/4 B. taurus<sup>x</sup>

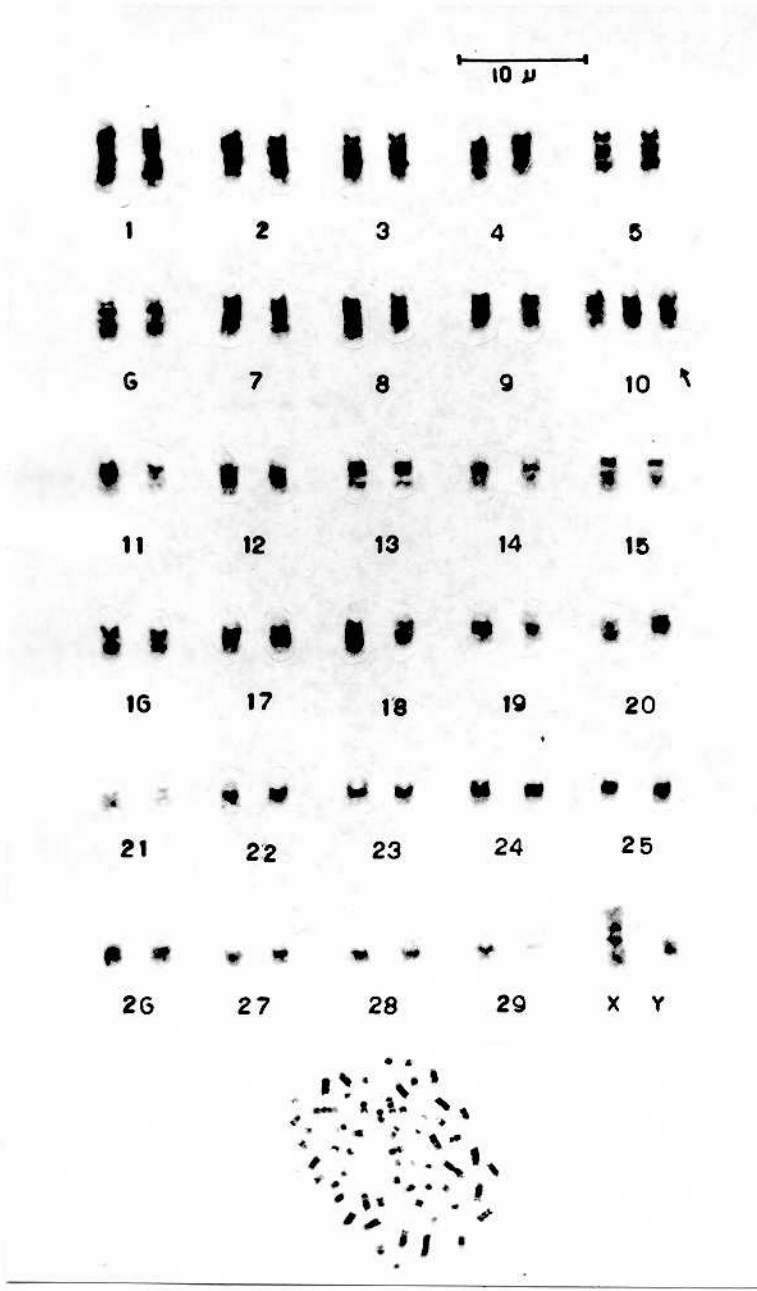


Figura 7 - Cromossomos metafásicos apresentando bandas G, de animal fenotipicamente normal (macho nº 6). Cariótipo 60,XY+10. Animal mosaico 60,XY/60,XY+10.

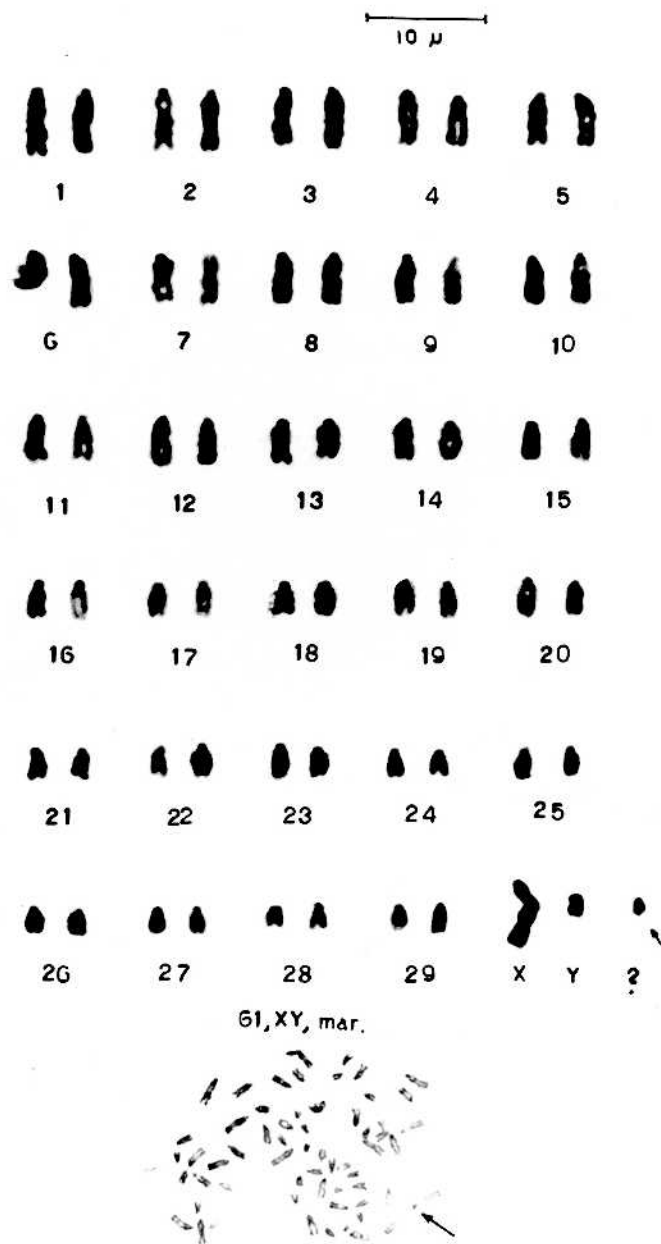


Figura 8 - Cromossomos metafásicos de animal fenotipicamente normal (macho nº 49) apresentando cariótipo 61, XY+mar.

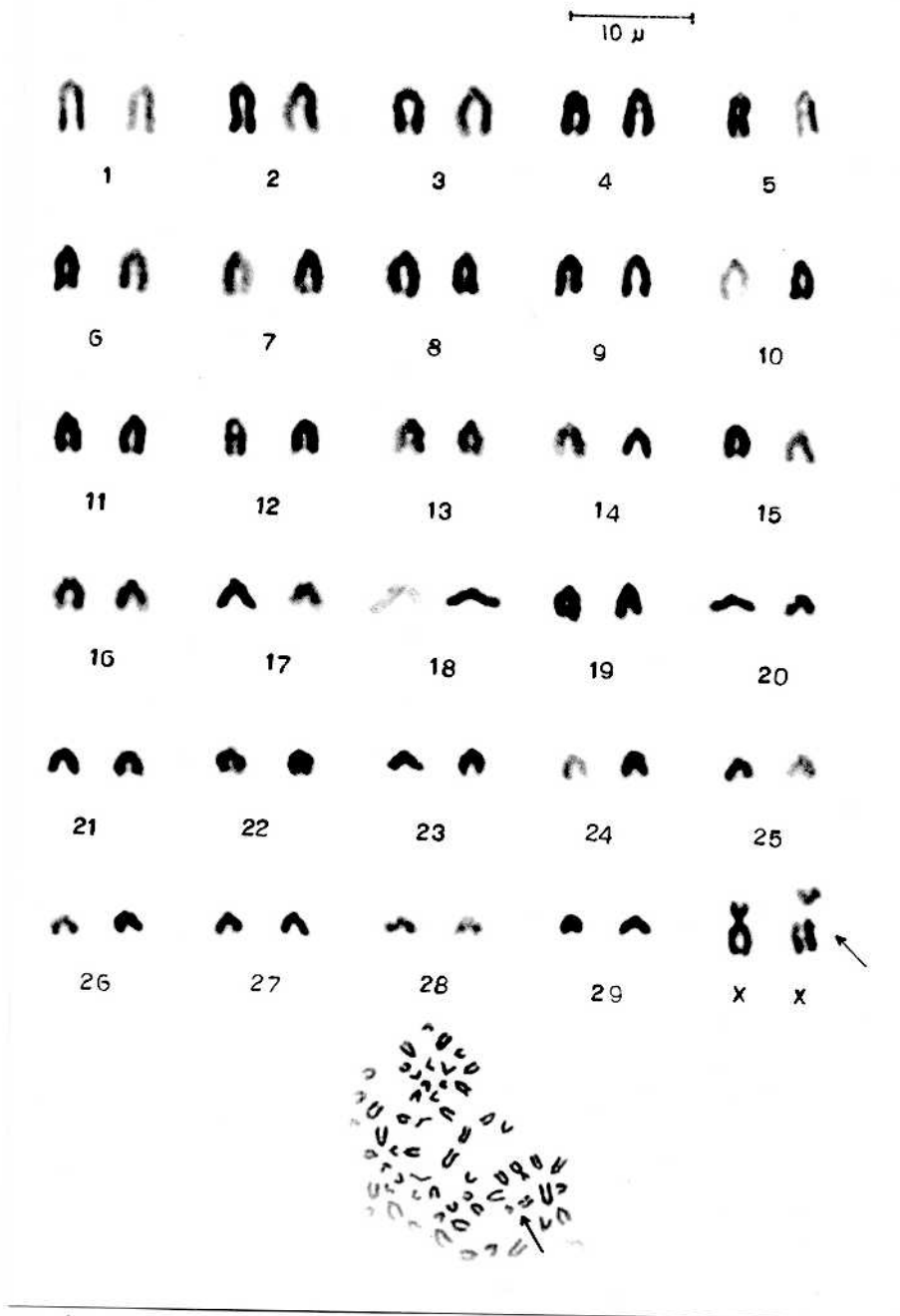


Figura 9 - Cromossomos metafásicos de animal fenotipicamente normal (fêmea nº 36). Orceína acética. A seta mostra intervalo acromático em 1 cromossomo X.

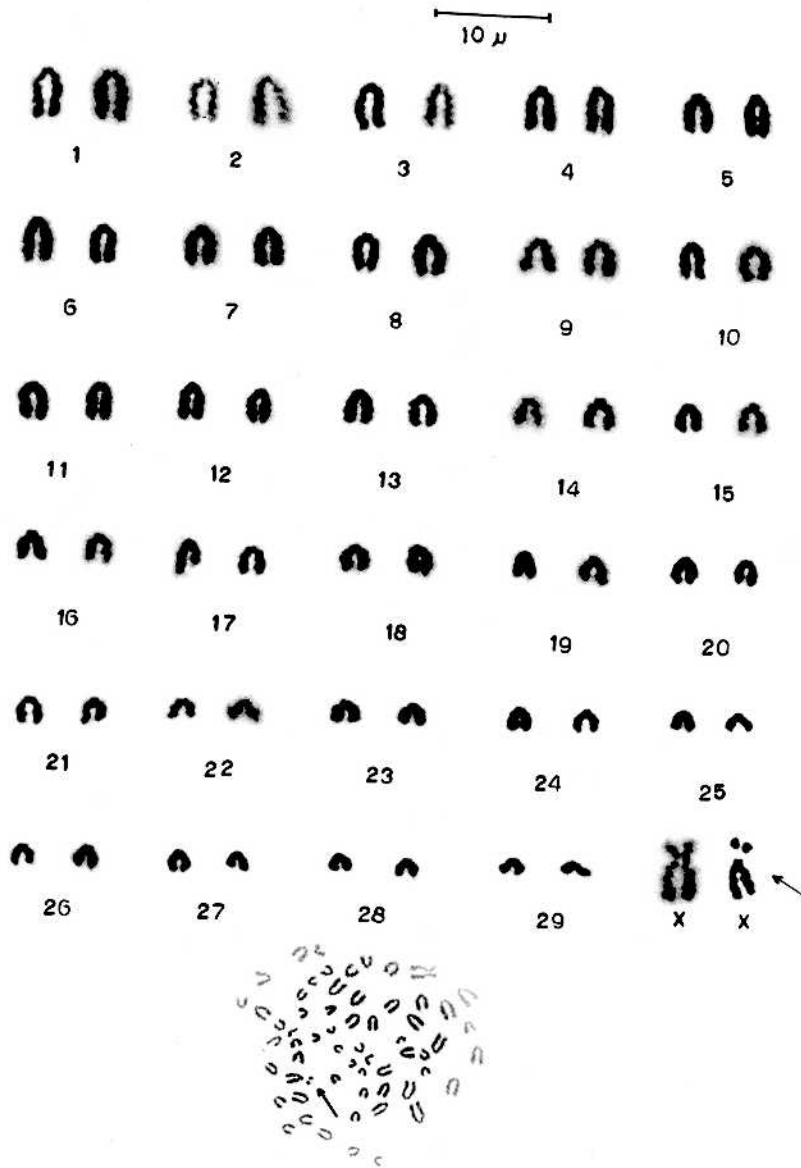


Figura 10 - Cromossomos metafásicos de animal fenotipicamente normal (fêmea nº 36). Orceína acética. A seta mostra intervalo acromático em 1 cromossomo X.

### 3.4 Estudo cariotípico em animais fenotipicamente anormais

Na tabela V, temos a relação dos machos fenotipicamente anormais, onde estão resumidos os dados clínicos e a análise cromossômica. Dos 13 animais estudados, 1 apresentou anormalidade no cariótipo. Os demais apresentaram cariótipos normais 60, XY.

Dos quatro animais com hipoplasia testicular, um apresentou cariótipo anormal (nº 4), com translocação no cromossomo 16 de cromossomo não identificado (Figs. 11 e 12). Todos os animais classificados como tendo baixa fertilidade, apresentaram cariótipos normais, ou seja, 60, XY. O animal nº 3 que apresentou duas células hipodiplóides, foi considerado cariotipicamente normal. A hipodiploidia deveu-se, provavelmente, a falha de técnica, não sendo, portanto, o cariótipo aqui apresentado.

A Tabela VI resume os dados clínicos e a análise cromossômica das fêmeas fenotipicamente anormais. Dos 10 animais estudados, 4 apresentaram cariótipos anormais. As demais fêmeas estudadas apresentaram cariótipos normais 60, XX. Dos 7 animais, classificados como estéréis (nºs 53, 54 e 57) ou com baixa fertilidade (nºs 51, 55, 58 e 59), somente o animal nº 57 (estéril) da subespécie B. taurus taurus, apresentou cariótipo mosaico 60,XX/61,XY+13 com porcentagem de 18,1% de células 61, XX+13 (Figs. 13 e 13a).

Os 3 animais (nºs 1, 52 e 56) classificados como sendo Freemartin, apresentaram cariótipo mosaico, sendo dois 60,XX/60,XY (Figs. 14, 15, 16 e 17) e um 60,XX/61,XXY (Fig. 18).



TABELA V

Machos fenotipicamente anormais. Dados clínicos e análise cromossômica

Nº cultura	Espécie	Anomalia	Nº cels. analisadas	Resultados
3	<u>B.taurus taurus</u>	Hipogonadismo	34	32- 60,XY 2- 59,XY
4	<u>B.taurus indicus</u>	Hipoplasia testicular unilateral discreta	11	60,XY t(?/16)
5	<u>B.taurus indicus</u>	Criptorquidia	29	60,XY
39	Canchim	Baixa fertilidade	11	60,XY
40	Canchim	"	11	60,XY
41	Canchim	"	11	60,XY
42	Canchim	"	21	60,XY
43	Canchim	"	11	60,XY
44	Canchim	"	11	60,XY
45	Canchim	"	11	60,XY
46	Canchim	"	11	60,XY
47	Canchim	"	11	60,XY
50	Canchim	Hipogonadismo	11	60,XY

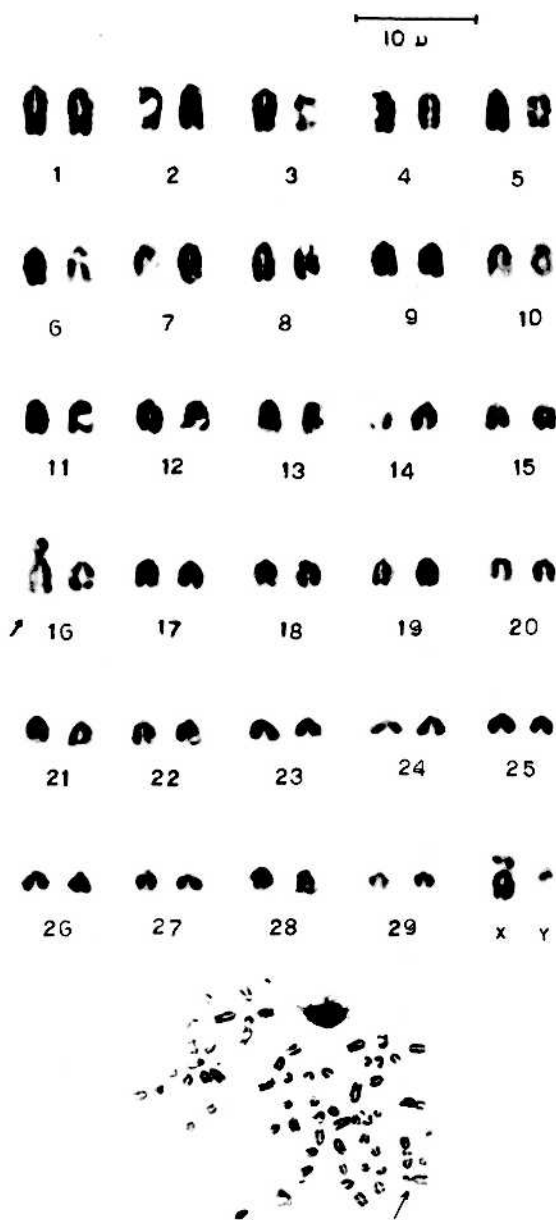


Figura 11 - Cromossomos metafásicos de animal com hipoplasia testicular (nº 4), apresentando translocação de cromossomo não identificado em cromossomo 16. 60,XY t(?/16). Orceína acética.

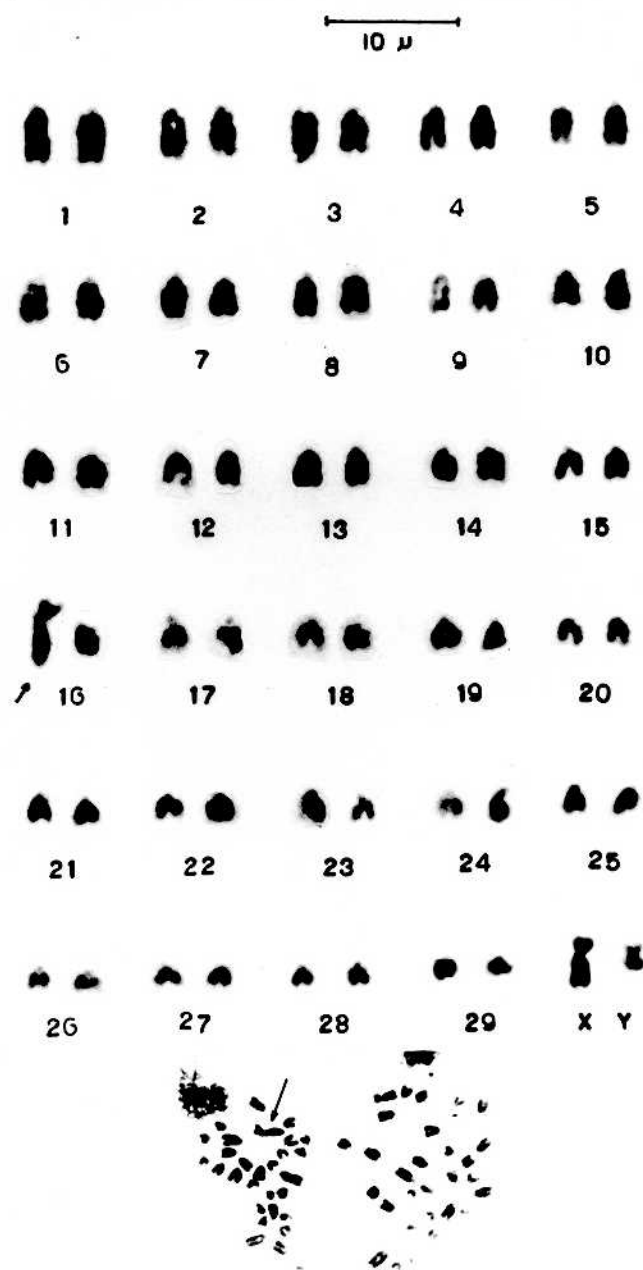


Figura 12 - Cromossomos metafásicos com bandas G de animal com hipoplasia testicular ( $n=4$ ), apresentando translocação de cromossomo não identificado em cromossomo 16.  $60, XY t(?/16)$ .

TABELA VI

Fêmeas fenotipicamente anormais. Dados clínicos e análise cromossômica.

Nº cultura	Espécie	Anomalia	Nº cels. analisadas	Resultados
1	<u>B. taurus taurus</u>	Freemartin	20	17- 60,XY (85%) 3- 60,XX (15%)
51	<u>B. taurus taurus</u>	Baixa fertilidade	11	60,XX
52	Canchim	Freemartin	30	24- 60,XY (30%) 6- 60,XX (20%)
53	<u>B. taurus taurus</u>	Esterilidade	11	60,XX
54	Canchim	Esterilidade	11	60,XX
55	Mestiço <sup>+</sup>	Baixa fertilidade	11	60,XX
56	Canchim	Freemartin	21	16- 60,XX 5- 61,XXY
57	<u>B. taurus taurus</u>	Esterilidade	11	9- 60,XX 2- 61,XX+13
58	Mestiço <sup>+</sup>	Baixa fertilidade	11	60,XX
59	Canchim	Baixa fertilidade	11	60,XX

+ Animal 5/8 B. taurus taurus; 3/8 B. taurus indicus

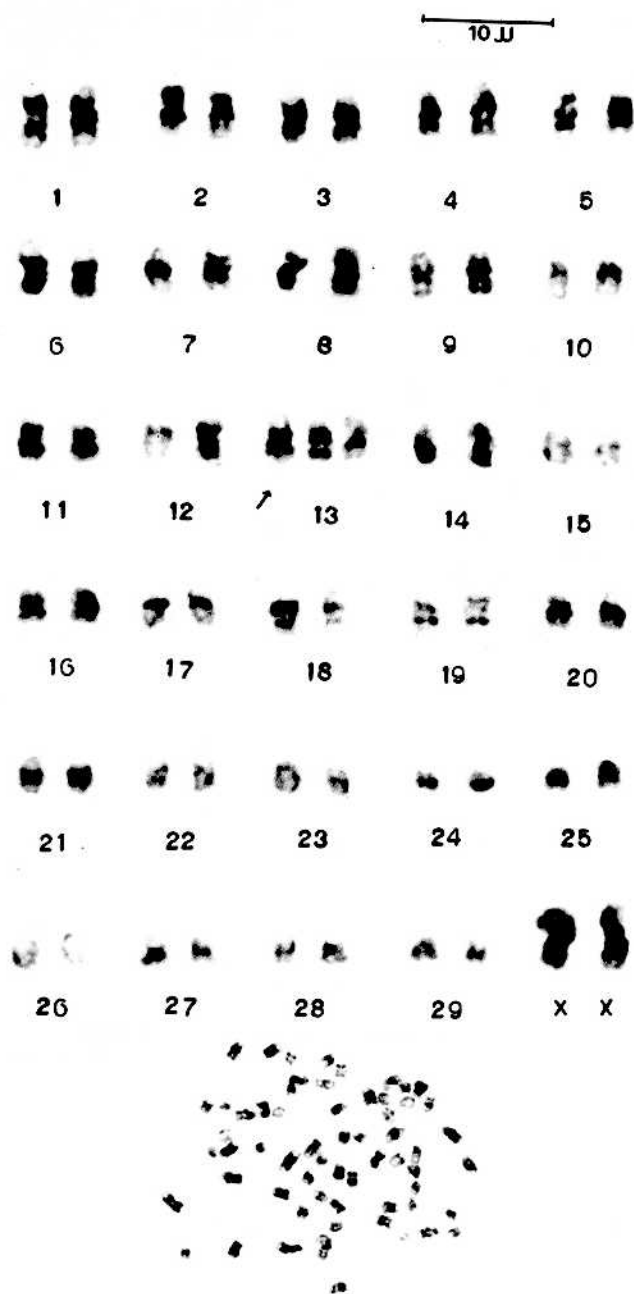


Figura 13 - Cromossomos metafásicos com bandas G de fêmea estéril (nº 57), apresentando 61,XX+13. O cariótipo determinado foi 60,XX/61,XX+13, em mosaicismo.

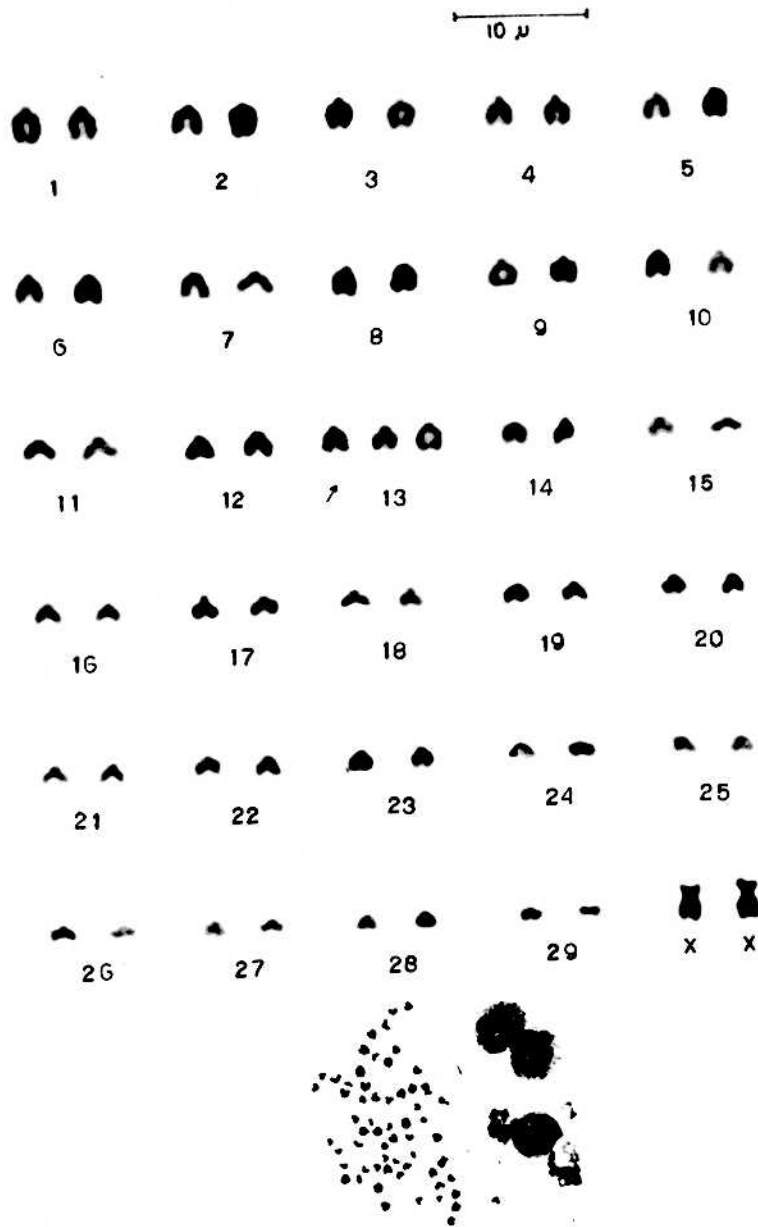


Figura 13a - Cromossomos metafásicos de fêmea estéril (nº 57), apresentando 61,XX+13. O cariótipo determinado foi 60,XX/61,XX+13, em mosaicismo. Orceína acética.

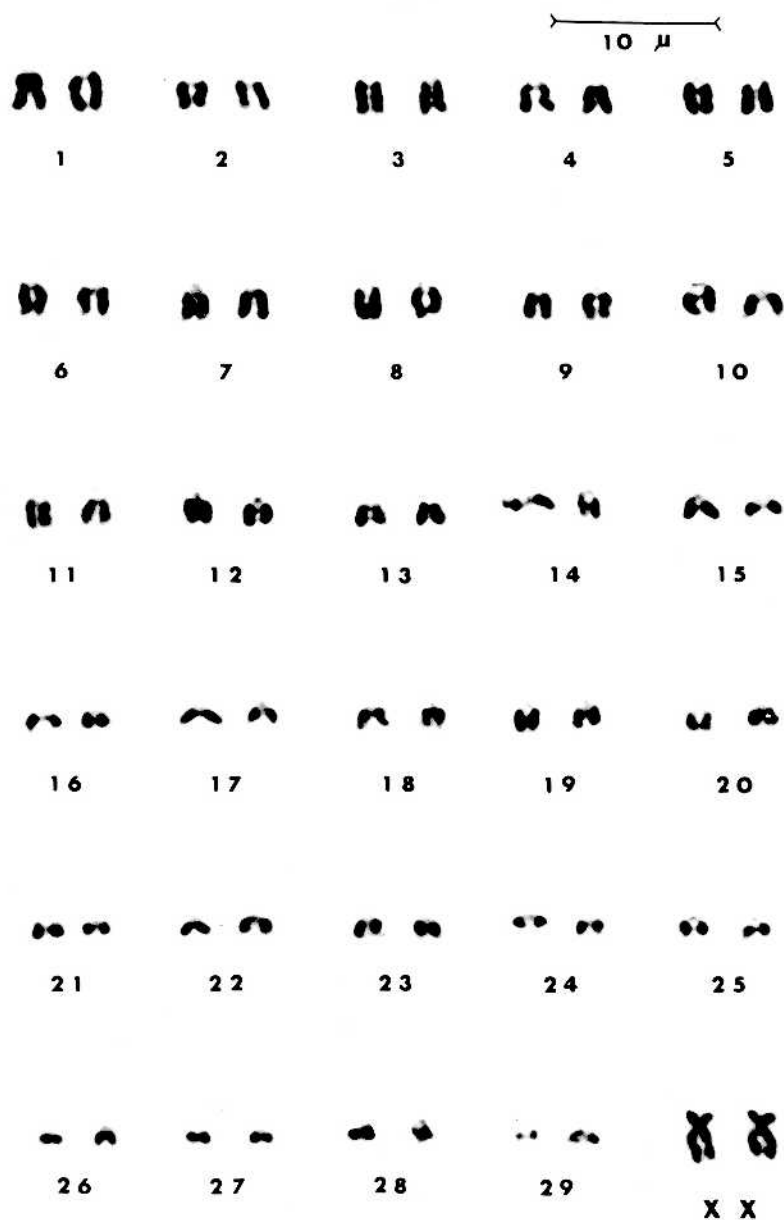


Figura 14 - Cromossomos metafásicos de animal Freemartin (nº 1), apresentando complemento sexual XX. Animal com quimerismo 60,XX/60XY. Orceína acética.

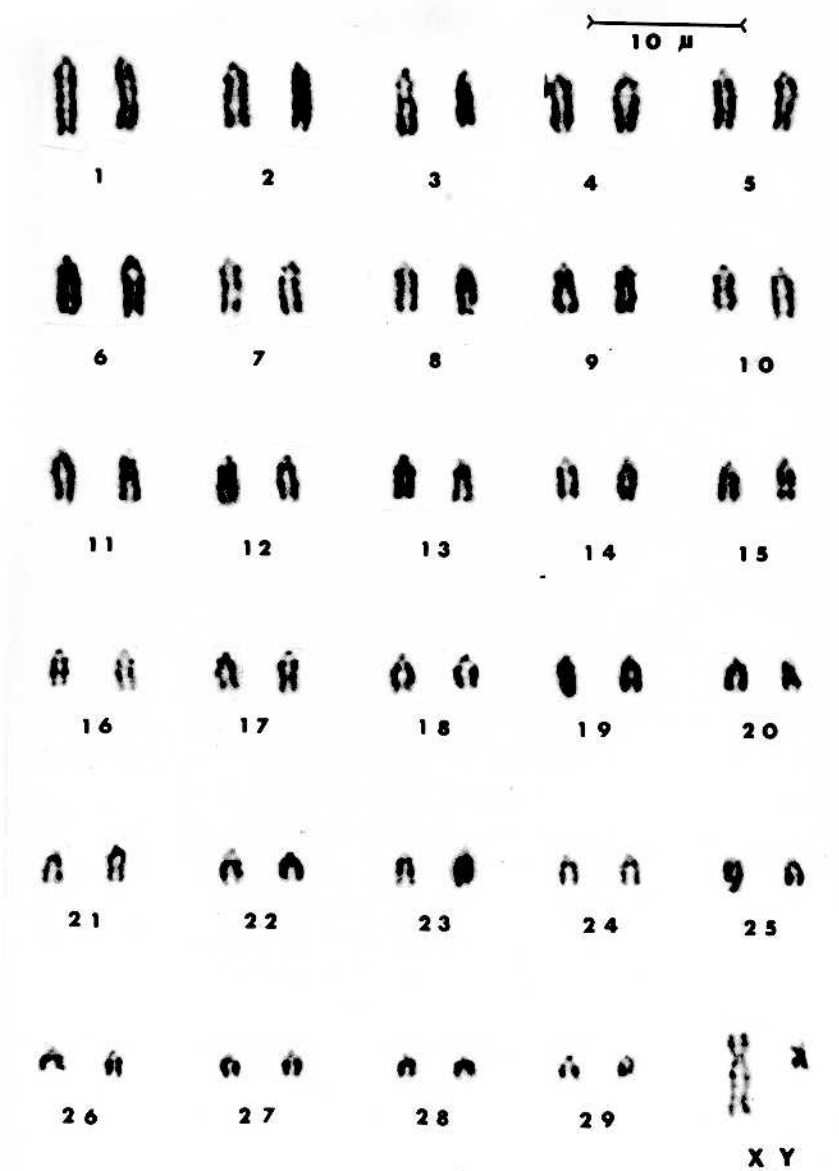


Figura 15 - Cromossomos metafásicos de animal Freemartin (nº 1), apresentando complemento sexual XY. Animal com quimerismo 60,XX/60,XY. Orceína acética.



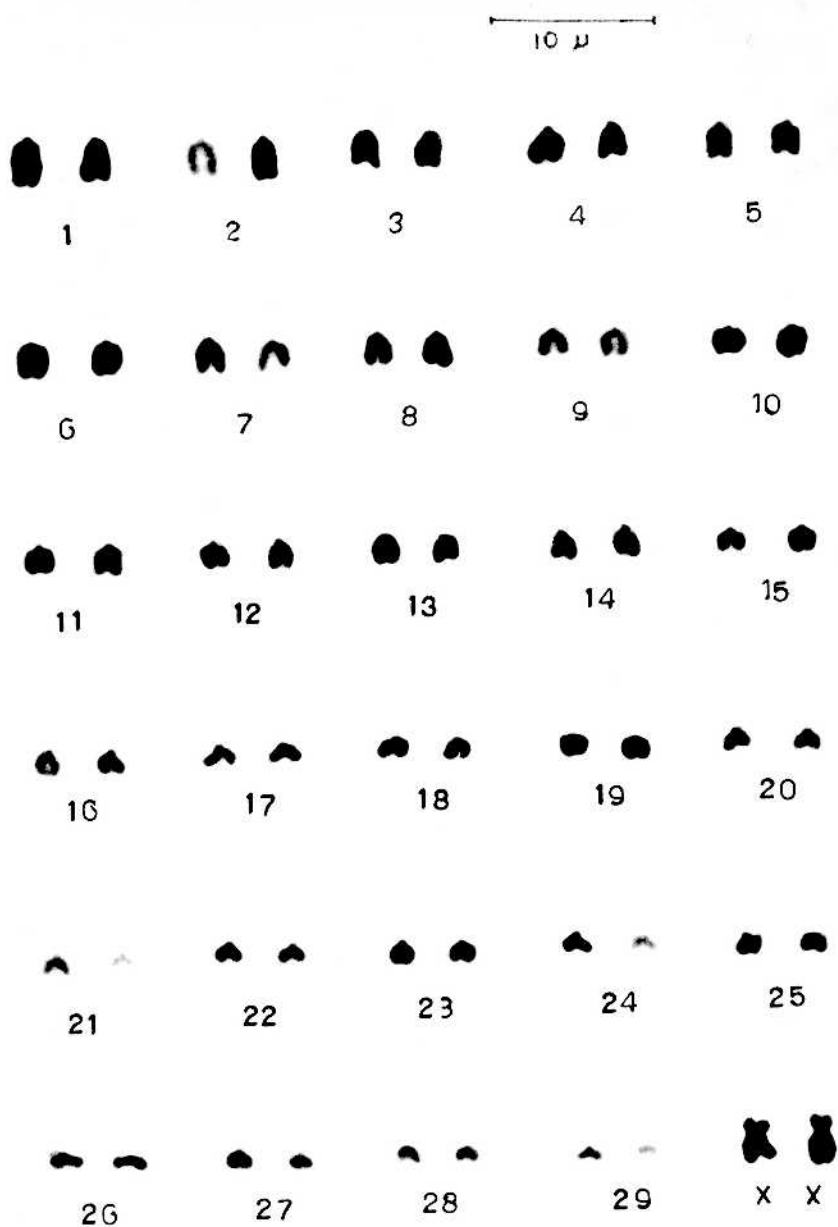


Figura 16 - Cromossomos metafásicos de animal Freemartin (nº 52), apresentando complemento sexual XX. Animal com quimerismo 60,XX/60,XY. Orceína acética.

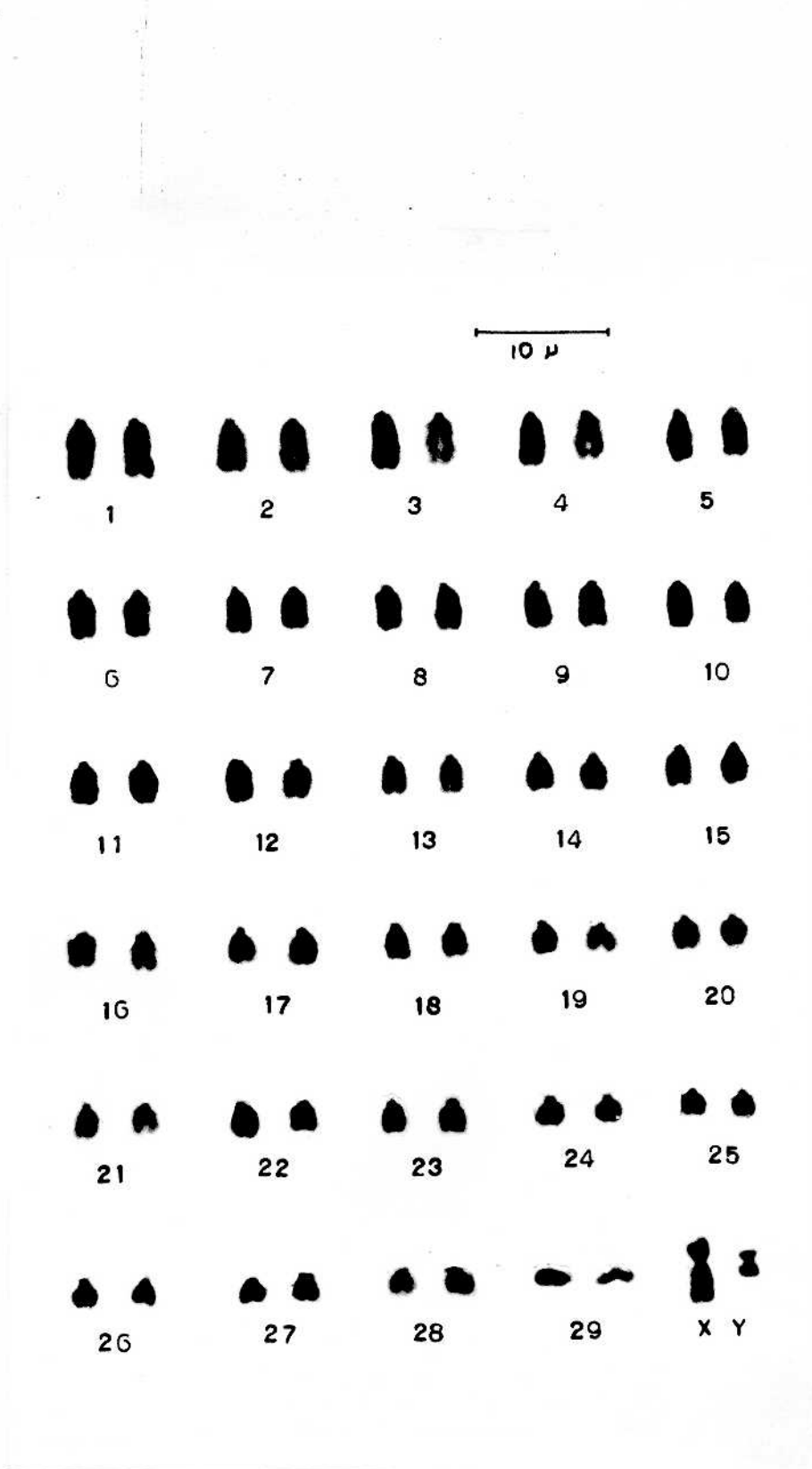


Figura 17 - Cromossomos metafásicos de animal Freemartin (nº 52), apresentando complemento sexual XY. Animal com quimerismo 60,XX/60,XY. Orceína acética.

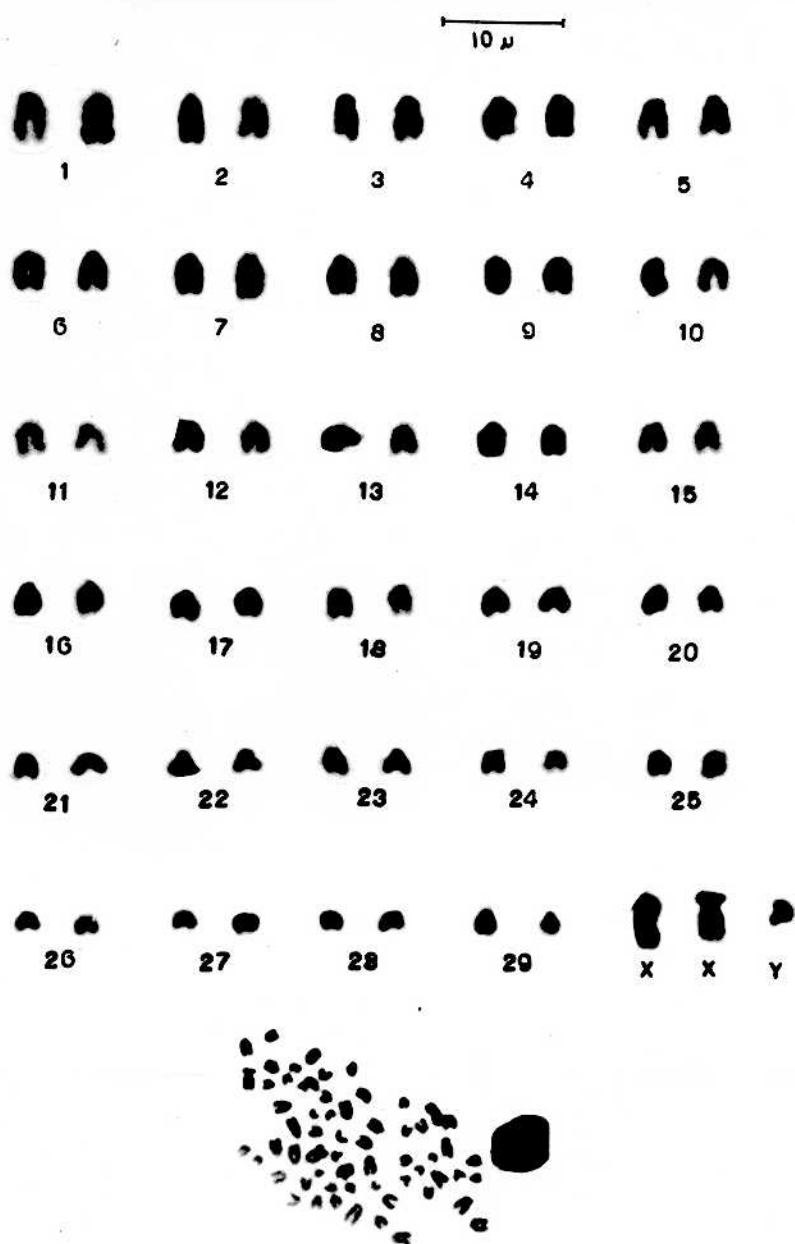


Figura 18 - Cromossomos metafásicos de animal Freemartin (nº 56), apresentando complemento sexual XXY. Animal com provável mosaicismo ou quimerismo 60,XX/61,XXY. Orceína acética.

#### 4. DISCUSSÃO

De acordo com os conceitos de espécie, raça e subespécie de Sinnot, Dunn e Dobzhansky (1961), consideramos o zebu afro-asiático (B. taurus indicus) e o gado europeu (B. taurus taurus) como sendo duas subespécies. O estudo cariotípico, por meio de formação de bandas G, veio confirmar a identidade dos cromossomos dessas duas subespécies com exceção do cromossomo Y. O trabalho de Jorge (1970) já dava uma indicação dessa identidade cariotípica nas diferentes raças de bovinos.

Murster e Benirschke (1968) e Koulischer e col. (1972) mostraram que o mecanismo principal da evolução do cariótipo na superfamília Bovoidea, foi o de translocação Robertsoniana.

Algumas espécies da superfamília Bovoidea nas quais as translocações Robertsonianas ocorreram, apresentam cruzamentos interespecíficos com F1 total ou parcialmente férteis (Murster e Benirschke, 1968).

A mesma identidade cariotípica de número e de bandas Q foi encontrada entre as subespécies B. taurus taurus e Capra hircus. Ambas possuem 60 cromossomos, sendo os cromossomos sexuais a única diferença marcante entre essas duas espécies das subfamílias Bovinae e Caprinae (Hansen, 1973b).

Na Capra hircus o X é representado por um acrocêntrico grande e na B. taurus taurus por um submetacêntrico. O cromossomo Y, que é submetacêntrico nas duas espécies, em relação ao X, tem tamanho aproximado de 1,0% na Capra hircus e 1,7% na B. taurus taurus.

Entre os mamíferos, o cromossomo X tende a ser um dos maiores cromossomos do complemento em espécies que apresentem número muito alto de cromossomos enquanto que em espécies com número pequeno de cromossomos, ele tende a ser o menor. Portanto, o tamanho absoluto do X tende a ser uniforme em diversas espécies de mamíferos placentários (Ohno, 1969).

O cromossomo X submetacêntrico da subespécie B. taurus taurus foi medido e constitui cerca de 5% do lote haplóide (Ohno, 1969). Na espécie Capra hircus, o cromossomo X acrocêntrico também representa aproximadamente 5% do lote haplóide (Hansen, 1973b).

É possível se obter o cromossomo X da subespécie B. taurus taurus a partir do cromossomo X da Capra hircus, através de dois eventos que devem ter ocorrido na evolução cariotípica dessas duas espécies.

Assim, a identidade dos cariótipos de ambas as subespécies fica configurada sem que hajam outros tipos de identidades fenotípicas ou cruzamento interespecífico e permite a suposição que tanto a Capra hircus como o B. taurus taurus provieram de um ancestral comum.

Observações em aves, anfíbios e mamíferos, são consistentes com a hipótese de que as modificações evolutivas nos sistemas reguladores, isto é, modificações na expressão gênica, proveem as bases para a evolução anatômica e para a perda de potencial de hibridização (Prager e Wilson, 1975; Wilson e col., 1974a; Wilson e col., 1975; Bush, 1975).

Desta forma, apesar da identidade cariotípica das espécies Capra hircus e B. taurus taurus, os sistemas regulado-

res dos genes não devem ser os mesmos.

Embora não sejam conhecidas as barreiras moleculares ao desenvolvimento de um zigoto interespecífico, o fenômeno de repressão alélica que ocorre em híbridos extremos (Witt e col. 1973) mostra que as barreiras regulatórias são muito importantes. A perda da habilidade de duas espécies se hibridizarem, provavelmente resulta do acúmulo de incompatibilidades entre dois sistemas para regular a expressão dos genes durante o desenvolvimento embriológico (Wilson e col., 1974b).

Pelo padrão de formação de bandas cromossômicas G (Figs. 1, 2 e 3), vimos que os padrões de bandas dos autosossomos e dos cromossomos X são iguais entre essas duas subespécies e portanto, também no Canchim.

O cromossomo X é bem semelhante ao de outros mamíferos, apresentando uma banda na região centromérica que se estende para os braços curtos e longos. O braço curto apresenta duas bandas e o braço longo, dois conjuntos de duas bandas que são separados por uma banda clara marcadora (Fig. 4).

A diferença encontrada na morfologia do cromossomo Y, pode ser explicada através dos padrões de bandas G, como resultante de uma inversão pericêntrica (Fig. 19), processo já sugerido por Kieffer e Cartwright (1968), que postularam a provável identidade entre os cromossomos Y das duas subespécies B. taurus taurus e B. taurus indicus, uma vez que não havia barreira entre elas.

Esta inversão pericêntrica, provavelmente teria ocorrido no Y submetacêntrico da B. taurus taurus resultando o Y acrocêntrico da B. taurus indicus (Fig. 19).

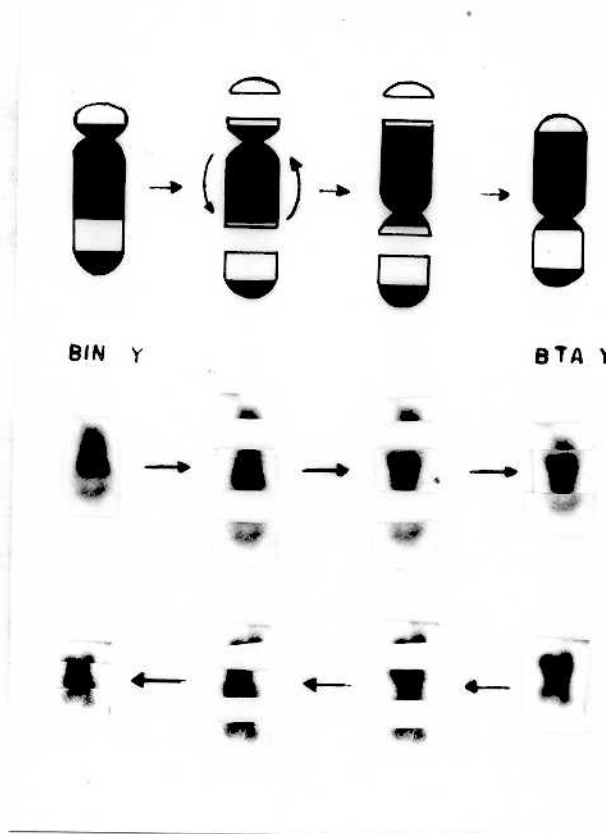


Figura 19 - Representação esquemática da inversão pericêntrica no cromossomo Y acrocêntrico da subespécie B. taurus indicus (BIN) resultando o Y submetacêntrico da B. taurus taurus (BTA). Montagem dos cromossomos sugerindo evolução nos dois sentidos.

Não existe qualquer indicação sobre a característica do cromossomo Y do Bos primigenius, a provável origem dessas duas subespécies (Melander, 1959). O padrão primitivo ou fundamental seria um cariótipo com 58 autossomos acrocêntricas (Wurster e Benirschke, 1968).

A hipótese de que o cromossomo Y acrocêntrico dos B. indicus tenha se originado através da inversão pericêntrica de submetacêntrico, se fundamenta no trabalho de Hansen (1973b) que considerou o cariótipo de Capra hircus  $2n = 60$  como sendo o mais próximo do ancestral comum do B. taurus taurus e B. taurus indicus.

Embora o cromossomo Y da Capra hircus seja menor em tamanho do que o Y do B. taurus taurus, não se pode excluir a possibilidade de que essa diferença esteja constituída por DNA repetitivo encontrado no braço curto do Y da B. taurus taurus (Popescu, 1973; Schnedl e Czaker, 1974). O trabalho de Pathack e col. (1973), permite a formulação dessa hipótese, uma vez que mostrou através de bandas C, que a diferença de tamanho de cromossomos em duas espécies do gênero Peromyscus se devia a um aumento de DNA repetitivo em um cromossomo maior de uma das espécies.

Recentemente, Gustavsson e col. (1976b), utilizando técnicas de bandas Q e G, esquematizaram os cromossomos da subespécie B. taurus taurus, identificando, através do padrão de formação dessas bandas, os 29 pares autossômicos e o par sexual.

Entretanto, os autores classificam os autossomos como telocêntricos, não considerando os braços curtos dos mesmos.



Apesar de poucos cromossomos apresentarem os braços curtos bandeados (pares 1, 24 e 28, figura 4), os braços curtos são bem evidentes, principalmente quando utilizamos para a análise, preparações coradas pela técnica convencional com orceína (Figura 20).

Além disso, a banda clara representada por aqueles autores na região proximal do braço longo de todos os autossomos, corresponde, pelas nossas observações, <sup>à região centromérica</sup> ~~ao centrômero~~, o que foi observado por Schnedl (1972), Hansen (1973a,b), Schnedl e Czaker (1974) e Diamond e col. (1975).

Diamond e col. (1975) usando a técnica da prata amoniacal (Howell e col., 1975), observou na região centromérica de quase todos os autossomos e nos telômeros dos braços longos de alguns, regiões densamente coradas.

Em nossas preparações, com a técnica de bandas G, observamos que na região centromérica parecia haver um vacúolo circundado por algum material fracamente corado e que corresponde a banda C descrita por Diamond e col. (1975).

Nos cromossomos sexuais, observamos as regiões centroméricas coradas, diferindo dos demais cromossomos, confirmando os achados de Schnedl (1972).

Apesar da identidade cariotípica e da provável identidade de regulação gênica das subespécies B. taurus taurus e B. taurus indicus, algumas expressões fenotípicas caracterizam essas duas subespécies. As raças melhoradas da subespécie B. taurus taurus caracterizam-se pelo rendimento elevado, em clima frio, das produções de carne e leite e pela precocidade dessas produções, enquanto que as raças da subespécie B. taurus

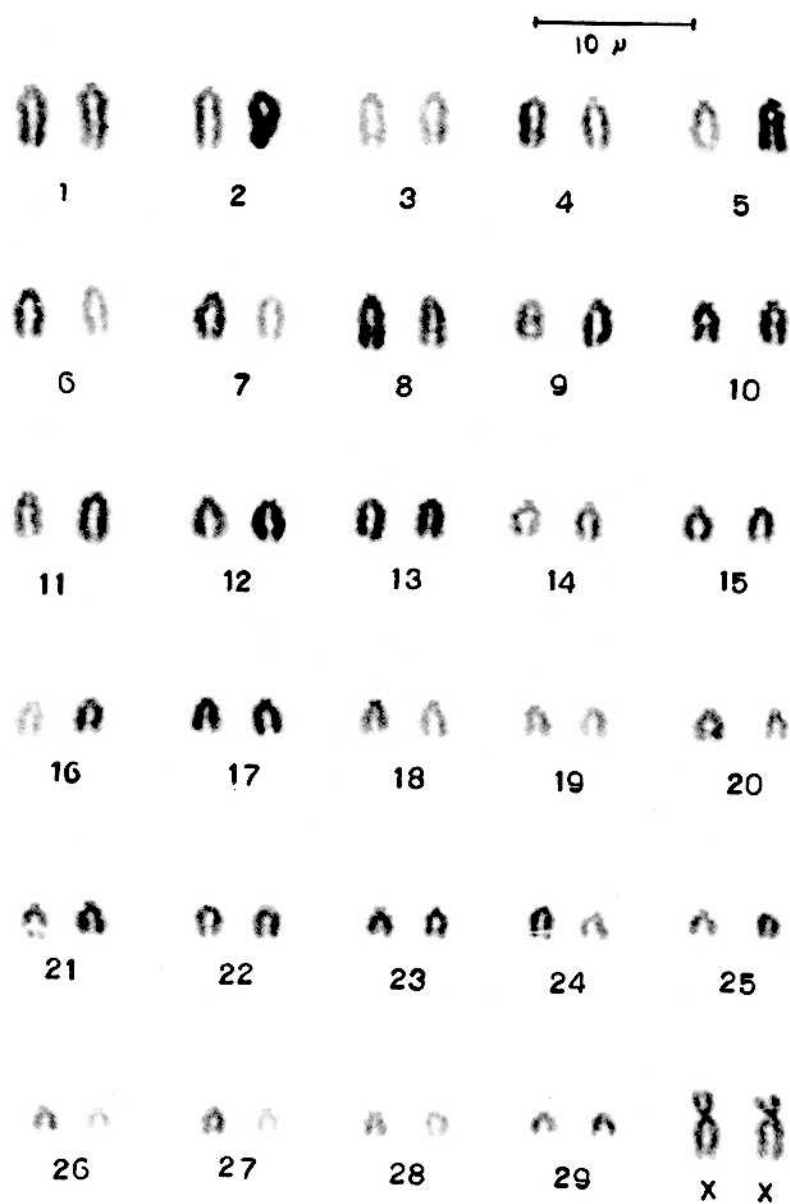


Figura 20 - Cromossomos metafásicos de fêmea normal da raça Canchim (nº 18). Cariótipo 60,XX.

indicus caracterizam-se, principalmente, pela resistênciã aos diversos fatores do ambiente tropical. Nos países tropicais, a adaptaçãõ de raças que apresentem as qualidades dessas duas subespécies, é extremamente desejável.

Pretende-se que o Canchim, produto do cruzamento do B. taurus taurus e B. taurus indicus, apresente a precocidade e o rendimento econômico da B. taurus taurus e a rusticidade e adaptabilidade da B. taurus indicus.

O esquema para a formação desta raça (Fig. 21) faz com que os machos apresentem no cariótipo o Y da espécie B. taurus taurus e haja predominância dessa espécie (5/8 de B. taurus taurus e 3/8 de B. taurus indicus). Isto foi confirmado pelas nossas observações, pois todos os machos analisados apresentaram o Y submetacêntrico.

No programa inicial da formação desta raça, estava também proposto o esquema inverso, onde predominaria a subespécie B. taurus indicus (5/8 B. taurus indicus e 3/8 B. taurus taurus). Entretanto, esse esquema foi abandonado por não ter proporcionado bons resultados (Vianna e col., 1962). Muitos fatores deverão ter contribuído para o insucesso desse esquema de formação do gado mestiço.

Vale Filho (1974) em estudo de 628 touros reprodutores, encontrou 53,34% com baixa fertilidade ou estéréis. O autor concluiu que nas raças da subespécie B. taurus taurus criadas no Brasil, há maior número de genes indesejáveis condicionadores de baixa fertilidade que nas raças da subespécie B. taurus indicus. É possível que mais estudos permitirão o conhecimento de que além de genes indesejáveis, a morfologia do cro-

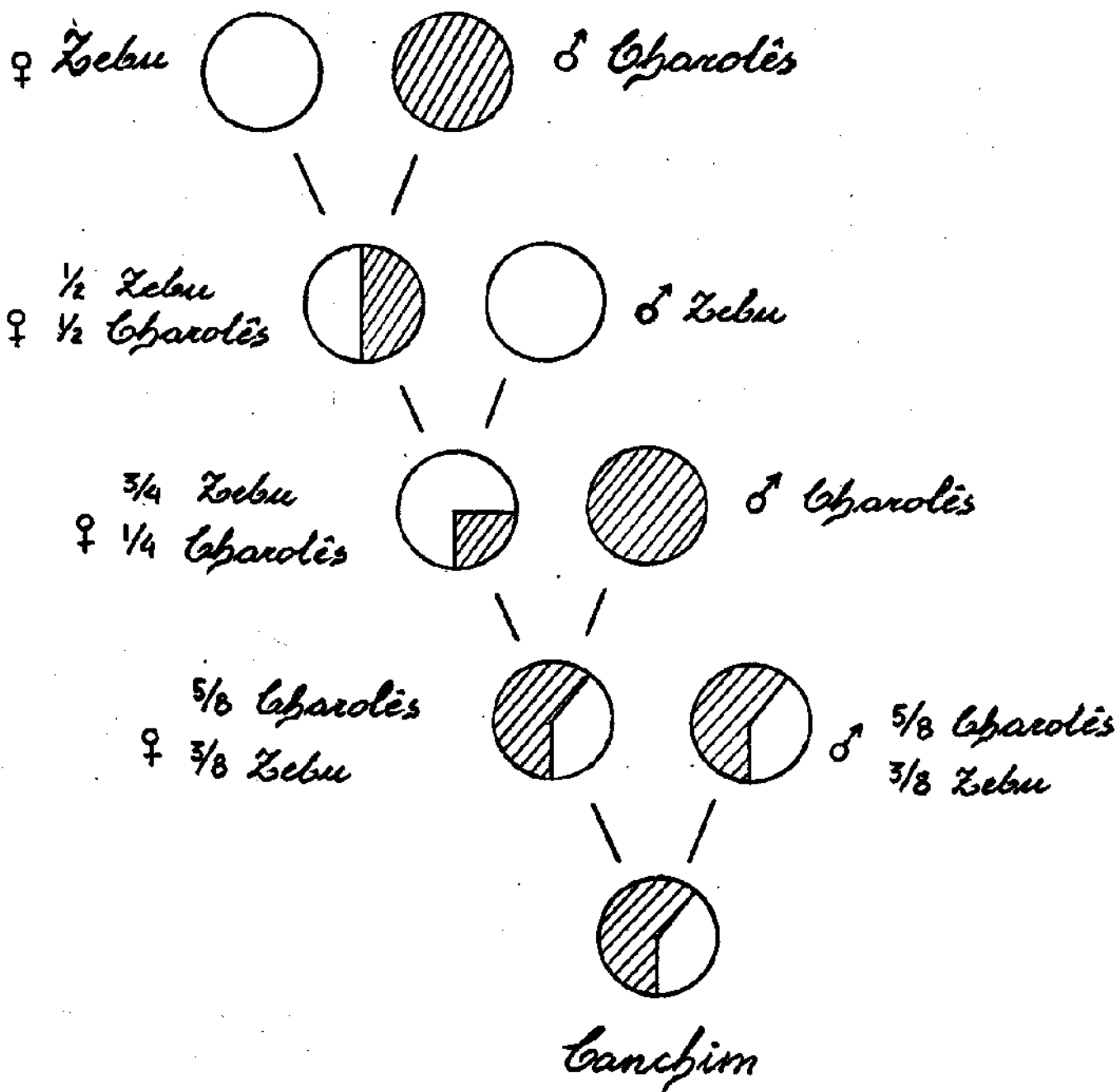


Figura 21 - Esquema para formação da raça Canchim. (Segundo Vianna e col., 1962).

mossomo Y nas raças de B. taurus taurus, B. taurus indicus ou mestiços, influencia na fertilidade.

Na tabela VII, vemos que de 35 animais fenotípicamente normais, 3 apresentaram aberrações cromossômicas: 2 por não disjunção (nº 6, fig. 7; nº 49, fig. 8) e um por apresentar intervalo acromático em 1 X (nº 36, figs. 9 e 10). Um deles, um exemplar B. taurus indicus (nº 6), apresentou em 35 células analisadas, 2 com trissomia do cromossomo 10 (Fig. 7).

A literatura sobre o estudo do cariótipo em bovinos tem demonstrado numerosos casos que apresentam aberrações cromossômicas numéricas (não disjunção) associadas a anormalidades físicas múltiplas ou a anormalidades de desenvolvimento sexual (Herzog e Höhn, 1968; Mori e col., 1969).

Trabalhos realizados em populações humanas tem demonstrado que a medida que o indivíduo avança em idade, podem aparecer aneuploidias por não disjunção em normais (Jacobs & Brown, 1961). Infelizmente no presente estudo não conseguimos obter as idades dos animais. Apesar de não se conhecer a idade do animal nº 6, não se pode excluir a possibilidade de se tratar de um caso de não disjunção ocorrendo ao acaso em um indivíduo idoso cariotípica e fenotípicamente normal.

O segundo animal normal que apresentou aberrações cromossômicas, tratava-se de uma fêmea Canchim, que apresentou um intervalo acromático em um cromossomo X de duas metáfases das onze analisadas. As culturas de sangue periférico de outros animais colhidos no mesmo dia não mostraram quebras ou intervalos acromáticos cromossômicos o que não permite entretanto, a exclusão de falha técnica para o caso.

TABELA VII

Frequência de aberrações cromossômicas em animais fenotipicamente normais.

	Espécie	Número de Animais	CARIÓTIPO	
			Normal	Anormal
MACHOS	<u>B.taurus taurus</u>	14	13	1
	<u>B.taurus indicus</u>	3	2	1
	Canchim	6	6	0
	Outros Mestiços	0	0	0
	Sub-total	23	21	2
FÊMEAS	<u>B.taurus taurus</u>	1	1	0
	<u>B.taurus indicus</u>	0	0	0
	Canchim	5	4	1
	Outros Mestiços	6	6	0
	Sub-total	12	11	1
	TOTAL	35	32	3

Existem condições de patologia humana que são acompanhadas de quebras cromossômicas como na Síndrome de Fanconi, Síndrome de Bloom, Ataxia e Telangiectasia (Schroeder e col., 1964; German, 1964; Hecht e col., 1966). Ainda no xeroderma pigmentoso, um defeito enzimático de reparo de DNA leva ao aparecimento de múltiplas quebras cromossômicas nas culturas. Todos estes casos, entretanto, são acompanhados de patologias variadas nos afetados. É possível que situações semelhantes poderão ser encontradas também em bovinos, mas certamente os animais afetados não serão normais.

Há registro na literatura de animais que apresentaram quebras cromossômicas múltiplas ou intervalos acromáticos associados a problemas de reprodução (Halnan, 1975), nos quais as causas de tais aberrações não estão bem definidas.

O terceiro caso de animal normal apresentando aberração cromossômica é um touro Canchim (nº 49) que apresentou em 9 células analisadas, 4 com cariótipo 61, XY+mar e 5 células 60, XY (Fig. 8). A origem deste cromossomo marcador menor do que o menor acrocêntrico autossômico não pode ser identificada nem mesmo com técnicas de formação de bandas G. Nas células em que o marcador não era encontrado ou mesmo nas metáfases onde estava presente, o estudo dos cromossomos pelo método convencional ou por bandas G não mostrou qualquer anormalidade estrutural.

Os estudos citogenéticos humanos que são mais desenvolvidos por estarem sendo feitos há mais tempo, têm revelado alguns casos de anormalidades cromossômicas aparentemente inócuas, principalmente relacionados com cromossomos marcadores.

Fröland e col. (1963) descreveram um primeiro caso de presença de cromossomo marcador em criança com anormalidades físicas múltiplas. O mesmo fato foi encontrado também por outros pesquisadores em diferentes estudos (Gustavson e col. (1964), Ishmael e Laurence (1968), Mukherjee e col. (1968), Armentares e col. (1971); Finley e col. (1971), Ferrari e col. (1968). Entretanto, estudos citogenéticos realizados em recém-nascidos consecutivos em diferentes países, tem revelado que muitas vezes cromossomos marcadores são encontrados em indivíduos normais e mesmo em membros de várias gerações de uma mesma família sem apresentarem quaisquer anormalidades (Smith e col., 1965; Pfeiffer e col., 1967; Abbo e Zellweger, 1970; Hoehn e col., 1970; Nielsen e col., 1971).

Teoricamente um cromossomo marcador poderia ter algum efeito fenotípico dependendo do conteúdo gênico nele presente. No caso de sua presença em homens normais em várias gerações poderia ser uma indicação de que este cromossomo extra-numerário seria formado apenas de heterocromatina constitutiva que contem poucos ou praticamente nenhum gene estrutural. O mesmo fato poderia estar ocorrendo no presente caso e a confirmação desta hipótese poderia ser feita com o estudo do cariótipo dos descendentes desse animal e o encontro do cromossomo marcador em alguns deles.

Na Tabela VIII vemos que de 23 animais fenotipicamente anormais, 5 apresentaram aberrações cromossômicas. Entre estes 23 animais, podemos subdividir em quatro grupos distintos: A) 3 casos de fêmeas Freemartin; B) 13 casos de fertilidade baixa; C) 3 casos de esterilidade; D) 4 casos de hipoplasia



TABELA VIII

Frequência de aberrações cromossômicas em animais fenotipicamente anormais

	Espécie	Número de Animais	CARIÓTIPO	
			Normal	Anormal
MACHOS	<u>B. taurus taurus</u>	1	1	0
	<u>B. taurus indicus</u>	2	1	1
	Canchim	10	10	0
	Outros mestiços	0	0	0
	Sub-total	13	12	1
FEMEAS	<u>B. taurus taurus</u>	4	2	2
	<u>B. taurus indicus</u>	0	0	0
	Canchim	4	2	2
	Outros mestiços	2	2	0
	Sub-total	10	6	4
	TOTAL	23	18	5

TABELA IX

Frequência de cariótipos normais e anormais dos animais fenotipicamente anormais distribuídos em grupos referentes às anormalidades.

Grupo	Anormalidade	Sexo	Número de Animais	CARIÓTIPO	
				Normal	Anormal
A	Freemartin	F	3	0	3
B	Baixa Fertilidade	M	9	9	0
		F	4	4	0
C	Esterilidade	F	3	2	1
D	Hipoplasia testicular	M	4	3	1
TOTAL		M	13	12	1
		F	10	6	4

testicular uni ou bilateral, conforme tabela IX.

A) Freemartin

Os cariótipos de 3 animais fêmeas estéreis, com diagnóstico de Freemartin, apresentaram em dois, quimerismo cromossômico com células XX/XY e em um, quimerismo <sup>ou mosaic</sup> XX/XXY. O problema do Freemartin tem preocupado há muito, os pesquisadores de reprodução animal. A descoberta de Owen (1945) de que a gestação gemelar heterossexual em gado levava a troca sanguínea "intra útero", através de anastomoses venosas placentárias, permitiu uma justificativa para a condição muito frequente de fêmea estéril e com características masculinas bem acentuadas.

A análise do cariótipo de alguns desses animais, realizada por Ohno e col. (1962), veio confirmar a presença na medula óssea destes animais, de duas estirpes celulares com cromossomos sexuais diferentes, uma XX e outra XY. O mesmo fenômeno era encontrado no par masculino desta fêmea.

Os possíveis mecanismos de formação de quimeras humanas foram analisados por Ford (1969) a partir dos trabalhos realizados em grupos sanguíneos e muitas vezes confirmados por estudos citogenéticos. Postula o autor que podem ser distinguidos dois grupos de quimeras,<sup>1</sup> de dois atos separados de singamia, e outro da associação de células derivadas de dois zigotos independentes. Os dois grupos podem ser subdivididos e agrupados em 9 tipos, que incluem três teoricamente possíveis, mas ainda não encontrados.

Em quatro tipos a dispermia está presente e leva ao aparecimento de linhagens celulares potencialmente distin-

tas. Outro tipo está representado pela fusão da célula filha do núcleo do zigoto ( $2n$ ) com o núcleo do segundo corpúsculo polar ( $n$ ) e resulta em químera  $2n/3n$ . Nos quatro mecanismos restantes participam dois zigotos independentes e variam desde a fusão de embriões até a transfusão artificial ou o transplante; tres destes quatro tipos já foram identificados. O mais comum está representado pela troca de células através da circulação placentária entre gêmeos dizigóticos, já demonstrado em bovinos.

Estudos anteriores com grupos sanguíneos, já haviam permitido a confirmação de troca sanguínea mesmo em partos gemelares iso-sexuais em bovinos.

Dados da literatura (Marcum, 1974) indicam que no quimerismo XX/XY de 124 fêmeas e 93 machos de 129 gêmeos heterossexuais, 73 fêmeas apresentaram frequência de células XY acima de 40%. Os seus co-gêmeos apresentaram a mesma proporção de células XY. Apenas 2 fêmeas apresentaram 99% de células analisadas do tipo XX. Um dos animais (nº 1) que apresentou cariótipo <sup>mosaico</sup> XX/XY (Figs. 14 e 15), classificado neste trabalho como Freemartin, nasceu de parto não gemelar. A princípio, suspeitou-se de que se tratasse de um hermafrodita verdadeiro, já que apresentava características tanto de macho como de fêmea.

Consideremos os mecanismos já relatados na literatura, referentes a dois atos separados de singamia. Caso dois espermatozoides, um X e um Y, venham fecundar o óvulo  $n$  e o segundo corpúsculo polar, também  $n$ , que tenha permanecido neste óvulo, o zigoto resultante terá parte de suas células XX e parte XY. Podemos também explicar as duas linhagens de células XX

e XY, considerando que o animal em questão tenha sido formado pela fusão de dois embriões de sexos diferentes num estágio em briológico inicial.

Embora tenhamos informações de que o animal nº 1 teria nascido de parto não gemelar, não poderemos eliminar a hipótese de que poderia ter ocorrido a morte do seu co-gêmeo após a troca de células "intra útero" (Wijeratne e col. 1976).

O caso número 52 trata-se de um Canchim também com diagnóstico clínico de fêmea Freemartin. Neste caso, 80% das células analisadas mostraram constituição cromossômica 60, XY e apenas 20% eram 60,XX (Figs. 16 e 17). Há referência para este caso de ter nascido de parto gemelar heterossexual, embora o exame de seu co-gêmeo não tivesse sido realizado.

Em revisão de Marcum (1974) de trabalhos citogenéticos realizados por diferentes autores sobre a porcentagem dos tipos de células encontradas nos Freemartin, nos quais a anastomose coriovascular foi confirmada, foi estudada a relação paralela entre a porcentagem de células XY em Freemartins e seus respectivos co-gêmeos. Esta relação parece não existir apenas entre pares de gêmeos, mas também em nascimentos múltiplos. Alguns autores encontraram uma alta correlação positiva entre a porcentagem de células XY nas fêmeas quiméricas e nos machos co-gêmeos dessas fêmeas. Entretanto a análise de células de fígado fetal de prenhez gemelar com diagnóstico de Freemartin não mostrou a mesma relação (Vigier e col., 1972).

Parece que fatores como extensão de fusão vascular, tempo de início das anastomoses e proximidade entre os fetos masculino e feminino devem ser excluídos como fatores de-

terminantes da variação da frequência que ocorre em Freemartin pelo menos nos casos que apresentam variabilidade XX/XY. A percentagem de células XX ou XY tem permanecido constante pelo menos por períodos mais prolongados que um ano (Kanagawa e col., 1967).

O terceiro caso de fêmea Freemartin, trata-se de um exemplar Canchim (nº 56), apresentando cariótipo 60,XX/61,XXY (Fig. 18) nas frequências de 76,2% XX e 23,8% XXY, nascido de parto gemelar com co-gêmeo masculino que morreu em idade precoce e não há referências sobre suas características fenotípicas.

A literatura em citogenética humana apresenta numerosos casos de portadores de anormalidades sexuais em casos de mosaicismos de cromossomos sexuais.

O presente caso pode tratar-se de um indivíduo 61,XXY que na primeira divisão da célula ovo tivesse perdido o cromossomo Y de uma das células. Duas populações diferentes se desenvolveriam então. Se esta anormalidade atingisse estruturas responsáveis pelo desenvolvimento gonadal a intersexualidade poderia se exteriorizar. É preciso no entanto lembrar que fenotipicamente este animal é muito semelhante aos outros dois e ainda acresce que o seu co-gêmeo era de sexo masculino.

Se este caso se tratar de quimerismo, certamente o seu co-gêmeo deveria representar um bovino que cariotipicamente se assemelha à condição humana conhecida como Síndrome de Klinefelter, representada por indivíduo de sexo masculino apresentando dois cromossomos X no cariótipo.

Dunn e col. (1970), descreveram um caso semelhan-

te a este, em animal hermafrodita verdadeiro, não em condição de quimerismo, que apresentava XXY em todas as metáfases analisadas.

### B) Baixa Fertilidade

Os 13 animais com baixa fertilidade apresentaram os cariótipos e o padrão de bandas normais. A baixa fertilidade geralmente está condicionada por fatores genéticos interagindo com fatores ambientais como manejo, alimentação, infecções viróticas, etc.. Vale Filho (1974) verificou que a maior incidência de processos degenerativos nos testículos dos animais B. taurus taurus, era devido a manejo e alimentação inadequados e condições ambientais desfavoráveis.

O fato de não termos encontrado nenhuma aberração cromossômica nos animais subfêrteis, reforça a hipótese da ação poligênica e/ou de ambiente como causadores de baixos índices de fertilidade nos rebanhos.

### C) Esterilidade

Das 3 fêmeas estudadas, 1 apresentou cariótipo mosaico 60,XX/61,XX+13 (nº 57, figura 13 e 13a) e as outras duas apresentaram cariótipos normais, ou seja, 60,XX.

Dos estudos cariotípicos em bovinos, casos foram descritos em que animais com malformações múltiplas e problemas de desenvolvimento sexual, apresentaram trissomias (Halnan, 1975).

Translocações cromossômicas em homozigose, causavam infertilidade em bovinos das raças Charolês e Simental

(Harvey, 1972). Entretanto, nenhum trabalho na literatura relaciona trissomia autossômica com esterilidade em animal fenotipicamente normal.

A fêmea da raça Charolês (nº 57) descrita neste trabalho, atualmente com 12 anos, apresentou-se estéril em toda sua vida, apesar dos exames clínicos indicarem normalidade nos órgãos reprodutivos.

Na literatura, 2 casos de trissomia X foram relatados (Rieck e col., 1970; Norberg e col., 1976). O animal descrito por Rieck e col. (1970) apresentava cifose acentuada, tendência familiar a distúrbios na meiose e entretanto, apresentava sistema reprodutivo normal. O único animal com trissomia relacionada com esterilidade, foi descrito por Norberg e col. (1976), e apresentava 100% das células 61,XXX. O animal era fenotipicamente normal mas depois de sacrificado apresentou os ovários subdesenvolvidos ao exame histológico.

A fêmea descrita neste trabalho, apresentou somente 18,1% das células 61,XX+13. O desequilíbrio gênico causado por essa trissomia em parte das células, provavelmente veio afetar o animal somente quanto a fertilidade, não causando outras anomalias físicas como ocorrem nas trissomias descritas na espécie humana.

Pela idade do animal, não podemos eliminar a hipótese de que tenha ocorrido uma não disjunção em uma linhagem de células somáticas detectável em cultura de sangue periférico e o achado ser apenas casual.



#### D) Hipoplasia Testicular

Quatro machos com anormalidades testiculares foram estudados e um apresentou cariótipo anormal. Um animal da subespécie B. taurus taurus (nº 3), com hipogonadismo, apresentou em 34 células analisadas, 2 com cariótipo 59,XY. Neste caso, a perda de um cromossomo, somente nestas duas células, provavelmente se deva a falha técnica. O único animal com cariótipo anormal foi um touro da subespécie B. taurus indicus (nº 4), que apresentou, como quadro clínico, hipoplasia testicular unilateral discreta. A análise cariotípica revelou 100% das células como sendo 60,XY t(?/16) (Figs. 11 e 12).

Na espécie humana casos de hipoplasia testicular tem sido descritos na Síndrome de Klinefelter e alguns casos de anormalidades de cromossomos sexuais (Ferguson-Smith e col. 1960).

Na evolução do cariótipo das espécies tem havido descrições de casos de porções cromossômicas representadas por DNA repetitivo sem grande importância gênica (Pathak e col., 1973).

A hipoplasia gonadal em bovinos foi relacionada por Lagerlof e Settergren (1953), com um gene autossômico recessivo de penetrância incompleta com graus de penetrância de 43% para machos e 57% para fêmeas.

É possível que esta translocação não seja a responsável pelo distúrbio gonadal do animal e poderemos estar diante de um caso de translocação como muitos já descritos na literatura (Gustavsson, 1966, 1969; Herschler e Fechheimer, 1966; Rugiati e Fedrigo, 1967; Rieck e col. 1968; Amrud, 1969;

Harvey, 1971; Popescu, 1971; Darre e col. 1972; Pollock, 1972; Bruère e Chapman, 1973; Eldridge, 1974, 1975; Harvey, 1974, 1976). Evidentemente isto dependeria da composição gênica da porção translocada.

Embora constrição secundária em determinado cromossomo relacionada com hipoplasia testicular, fosse referida em 20,6% dos 97 touros examinados da raça Hereford (Galloway & Norman, 1976), nos 4 animais do presente trabalho não foi encontrada.

## CONCLUSÕES

Nas condições em que o trabalho foi feito, podemos tirar as seguintes conclusões:

- a) O padrão de formação de bandas cromossômicas G é o mesmo para as subespécies B. taurus taurus e B. taurus indicus e, conseqüentemente, para o Canchim.
- b) A diferença na morfologia dos cromossomos Y destas duas subespécies, foi causada provavelmente, por uma inversão pericêntrica ocorrida no Y submetacêntrico da B. taurus taurus resultando o Y acrocêntrico da B. taurus indicus.
- c) A presença de 21,7% de casos de aberração cromossômica em 23 animais anormais estudados, demonstra que tais alterações são fatores importantes na etiologia de malformações congênitas em bovinos. Certamente casos de aberração cromossômica se concentram entre os animais que apresentam anormalidades de diferenciação sexual e/ou casos de esterilidade.
- d) A ausência de alterações cromossômicas nos animais de baixa fertilidade, reforça a hipótese da ação poligênica e/ou de ambiente como causadores de baixos índices de fertilidade nos rebanhos.
- e) Entre os 35 animais normais, 2 (5,7%) apresentaram alterações cromossômicas por não disjunção. Enquanto em um caso

pode se tratar de cromossomo marcador sem importância gênica, no outro caso pode se tratar de anormalidade devido a não disjunção somática em indivíduo de idade mais avançada.

- f) Os dados obtidos indicam a necessidade do exame cariotípico em animais reprodutores.

## RESUMO

O estudo do cariótipo e do padrão de bandas G, mostrou identidade entre as subespécies Bos taurus taurus e Bos taurus indicus. O cromossomo Y acrocêntrico de Bos taurus indicus resultou da inversão pericêntrica do Y submetacêntrico de B. taurus taurus. A análise dos cariótipos de 23 animais anormais revelou alta frequência (21,7%) com aberrações cromossômicas numéricas, estruturais e quimerismo. Dois animais Free martin apresentaram quimerismo XX/XY e um animal, apresentou quimerismo ou mosaicismo XX/XXY. Uma fêmea apresentou mosaicismo cromossômico 60,XX / 61,XX+13. Um animal hipogonádico apresentou translocação de porção de cromossomo não identificado no cromossomo 16. Em frequência baixa (5,7%), os animais normais também apresentaram aberrações cromossômicas. Um apresentou em mosaicismo, trissomia do cromossomo 10 e outro, em 50% das células, apresentou 1 cromossomo marcador. Os cariótipos de 13 animais subfêrteis foram normais.

## SUMMARY

Studies of karyotype and G banding chromosomes in B. taurus taurus and B. taurus indicus showed that there is numerical and structural identity between the two subspecies. The acrocentric Y chromosome of B. taurus indicus was the result of pericentric inversion of the submetacentric Y of B. taurus taurus. Chromosome analysis of 23 abnormal animals showed a high frequency (21,7%) having numerical and structural chromosome aberrations and chimerism. XX/XY chimerism was found in two Freemartin animals, and XX/XXY chimerism or mosaicism was found in one animal. Chromosomal 60,XX/61,XX+13 mosaicism was found in a sterile female. Translocation of a portion of unidentified chromosome into chromosome 16 was found in a hypogonadic animal. Chromosomal aberrations were found also in normal animals, but at a low frequency (5,7%). Mosaicism and trisomy of chromosome 10 was found in one of these animals, and 1 marker chromosome was found in 50% of peripheral blood cells in another. The karyotypes of 13 subfertile animals were normal.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbo, G. & Zellweger, H. The syndrome of the metacentric microchromosome. Helv. Paediat. Acta 25:83-94 (1970).
- Akesson, A. & Henricson, B. Embryonic death in pigs caused by unbalanced karyotype. Acta Vet. Scand. 13:151-160 (1972).
- Armendares, S., Buentello, L., Salamanca, F. An extra small metacentric autosome in a mentally retarded boy with multiple malformations. J. Med. Genet. 8: 378-380 (1971).
- Amrud, J. Centric fusion of chromosomes in Norwegian Red Cattle (NRF). Hereditas 62:293-302 (1969).
- Bardeleben, K. von. Ueber Spermatogenese bei Säugetieren, besonders beim Menschen. Anat. Anz. 7:202-208(1892).
- Basrur, P.K., Gilman, J.P.W. & McSherry, B.J. Cytological observations on a bovine lymphosarcoma. Nature 201: 268-371 (1964).
- Bruère, A.N. Male sterility and an autosomal translocation in Romney Sheep. Cytogenetics 8:209-218 (1969).
- Bruère, A.N. & Mills, R.A. Observations on the incidence of Robertsonian translocations and associated testicular changes in a flock of New Zealand Romney sheep. Cytogenetics 10:260-272 (1971).
- Bruère, A.N. & Chapman, H.M. Autosomal translocations in two exotic breeds of cattle in New Zealand. Vet. Rec. 92: 615-618 (1973).
- Bush, G.L. Modes of animal speciation. Annual Review of Ecology and Systematics. 6:339-364 (1975).
- Casperson, T., Farber, S., Foley, G.E., Kudynowski, L., Modest, E.J., Simonsson, E., Wagh, U. & Zech, L. Chemical differentiation along metaphase chromosomes. Exp. Cell Res. 58:141-152 (1968).
- Centerwall, W.R. & Benirschke, K. An Animal Model for the XXY Klinefelter's Syndrome in Man: Tortoiseshell and Calico Male Cats. Am. J. Vet. Res. 36(9):1275-1280. (1975).
- CONFERÊNCIA DE CHICAGO. Standardization in human cytogenetics. Birth Defects: Original Articles series II: 2. The National Foundation, New York (1966).
- CONFERÊNCIA DE PARIS. Standardization in human cytogenetics.

Birth Defects: Original Article series VIII(7). The National Foundation, New York (1971).

CONFERÊNCIA DE PARIS (suppl.). Standardization in human cytogenetics. Birth Defects. Original Article series XI (9). The National Foundation, New York (1975).

Darre, R., Queinnec, G. & Berland, H.M.. La translocation 1-29 des bovins. Étude générale et importance du phénomène dans le Sud-Ouest. Rev. méd. Vet. 123:477-494(1972).

Diamond, J.R., Dunn, H.O. & Howell, W.M. Centromeric and telomeric staining regions in the chromosomes of cattle (*Bos taurus*). Cytogenet. Cell Genet. 15:332 (1975).

Drets, M.E. & Shaw, M.W. Specific banding patterns of human chromosomes. Proc. Nat. Sci. 68:2073-2077 (1971).

Dunn, H.O., McEntee, K. & Hansel, W. Diploid-triploid chimerism in a bovine true hermaphrodite. Cytogenetics 9: 245-259 (1970).

Eldridge, F.E. A Dicentric Robertsonian Translocation in a Dexter Cow. J. Hered. 65:353-355 (1974).

Eldridge, F.E. High frequency of a Robertsonian translocation in a herd of British White Cattle. Vet. Rec. 96:71-73 (1975).

Ferguson-Smith, M.A., Lennox, B., Stewart, J.S.S. & Mack, W.S. Klinefelter's Syndrome. In C.R. Austin (Ed.). Symposium on Sex Differentiation and Development: Memoir n° 7, Society for Endocrinology, New York, Cambridge University Press (1960).

Ferrari, I. Estudo das alterações cromossômicas em pacientes portadores de anormalidades físicas múltiplas e retardo mental. Tese de Doutorado. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP (1968).

Ferrari, I., Braga, T. & Moura Ribeiro, V. Anormalidades físicas múltiplas associadas à presença de um cromossomo extra pequeno. Ciência Cult. 20:177 (1968).

Finley, W.H., Finley, S.C. & Monsky, D. An extra small metacentric chromosome in association with multiple congenital abnormalities. J. Med. Genet. 8:381-383 (1971).

Ford, C.E. Mosaics and Chimaeras. Brit. Med. Bull. 25: 104-109 (1969).

Ford, C.E., Jones, K.W., Polani, P.E., Almeida, J.C. & Briggs J.H. A sex chromosome anomaly in a case of gonadal dysgenesis (Turner's syndrome). Lancet 1:711 (1959).

Fröland, A., Holst, G. & Terslev, F. Multiple anomalies associated with an extra small autosome. Cytogenetics 2:



99-106 (1963).

- Galloway, D.B. & Norman, J.R. Testicular hypoplasia and autosomal secondary constrictions in bulls. VIII Intern. Congr. Reprod. Anim. Artif. Insem. 86, Krakow (1976).
- German, J. Cytological evidence for crossing over in vitro in human lymphoid cells. Science 144:298 (1964).
- Goin, O.B. & Goin, C.J. DNA and the evolution of the vertebrates. The Amer. Mid. Nat. 80:289-298 (1968).
- Gustavson, K.H., Atkeirs, L. & Patricks, I. Diverse chromosomal anomalies in two siblings. Acta Paediatrica(Stockholm) 53:371-387 (1964).
- Gustavsson, I. & Rockborn, G. Chromosome abnormality in three cases of lymphatic leukaemia in cattle. Nature 203:990 (1964).
- Gustavsson, I. Chromosome abnormality in cattle. Nature 211:865-866 (1966).
- Gustavsson, I. Cytogenetics, Distribution and Phenotypic effects of a translocation in Swedish cattle. Hereditas 63:68-169 (1969).
- Gustavsson, I. & Hageltorn, M. Staining technique for definite identification of individual cattle chromosomes in routine analysis. Jorn. Hered. 67:175-178 (1976).
- Gustavsson, I., Hageltorn, M. & Zech, L. Identification of the 1/29-translocation in the Swedish Red and White (SRB) cattle breed by utilization of new staining techniques. Hereditas 82:260-262 (1976a).
- Gustavsson, I., Hageltorn, M. & Zech, L. Recognition of the cattle chromosomes by the Q and G banding techniques. Hereditas 82:157-166 (1976b).
- Halnan, C.R.E. Chromosomes of cattle: Present clinical status and promise. Vet. Rec. 96:148-151 (1975).
- Halnan, C.R.E. Chromosome banding: A modified method for consistent G-banding in cattle, horses and buffaloes. Vet. Rec. 98:358 (1976).
- Hamerton, J.L. Significance of sex chromosome derived hetero chromatin in mammals. Nature 219:910-914 (1968).
- Hansen, K.M. Identification of bovine chromosomes by the quinacrine mustard fluorescence technique. Hereditas 69:295 (1971).
- Hansen, K.M. Bovine chromosomes identified by quinacrine mustard and fluorescence microscopy. Hereditas 70:225-234 (1972).

- Hansen, K.M. Heterochromatic (C-bands) in bovine chromosomes. Hereditas 73:65-70 (1973a).
- Hansen, K.M. Q-band karyotype of the goat (Capra hircus) and the relation between goat and bovine Q-bands. Hereditas 75:119-130 (1973b).
- Hare, W.C.D., Yang, T.J. & McFeely, R.A. A survey of chromosome findings in 47 cases of bovine lymphosarcoma (Leukaemia). J. Nat. Cancer Inst. 38(3):383-392 (1967).
- Harvey, M.J.A. An autosomal translocation in the Charolais breed of cattle. Vet. Rec. 89:110-111 (1971).
- Harvey, M.J.A. Chromosome analysis of cattle in Great Britain VIII Intern. Congr. Anim. Reprod. Art. Insem. 1100-3, Munique 1100 pp. (1972).
- Harvey, M.J.A. Chromosome analysis of cattle populations. Vet. Rec. 94:227 (1974).
- Harvey, M.J.A. Veterinary cytogenetics. Vet. Rec. 98:479-481 (1976).
- Hecht, F., Koler, R.D., Rigas, D.A., Dahnke, G.S., Case, M.P., Tisdale, V. & Miller, R.W. Leukaemia and lymphocytes in ataxia-telangiectasia. Lancet 2:1193 (1966).
- Henricson, B. & Backstrom, L. Translocation heterozygosity in a boar. Hereditas 52:166-170 (1964).
- Herschler, M.S. & Fechheimer, N.S. Centric fusion of chromosomes in a set of bovine triplets. Cytogenetics 5:307-312 (1966).
- Herschler, M.S. & Fechheimer, N.S. The role of sex chromosome chimerism in altering sexual development of mammals. Cytogenetics 6: 204-212 (1967).
- Herzog, A., Höhn, H. Autosomal trisomie bei einem Kalb mit Brachygnathia inferior und Ascites congenitus. Dtsch tierärztl. Wschr. 75: 604-605 (1968).
- Herzog, A. & Höhn, H. Autosomale Trisomie bei der letalen Brachygnathie des Rindes. Cytogenetics 10:347 (1971).
- Hoehn, H., Reinwen, H. & Enfel, W. Genetic studies on a minute centric fragment transmitted through three generations. Cytogenetics 9: 186-198 (1970).
- Howell, W.M., Denton, T.E. & Diamond, J.R. Differential staining of the satellite regions of human acrocentric chromosomes. Experientia 31: 260-262 (1975).
- Ishmael, J. & Laurence, K.M. An extra small metacentric chromosome in a mentally retarded boy. J. Med. Genet. 5:

335-340 (1968).

- Jacobs, P.A. & Brown, C. Distribution of human chromosomes - counts in relation to age. Nature 191:1178 (1961).
- Jacobs, P.A. & Strong, J.A. A case of human intersexuality having a possible XXY sex-determining mechanism. Nature 183:302-303 (1959).
- Jorge, W. Cariologia comparada de algumas raças de B. taurus taurus (L), B. taurus indicus (L) e de seus cruzamentos. Tese de Mestrado. Universidade de São Paulo. Botucatu, SP (1970).
- Jorge, W. Chromosome study of some breeds of cattle. Caryologia 27:325-329 (1974).
- Jost, A., Vigier, B., Prépin, J. Freemartins in cattle: the first steps of sexual organogenesis. J. Reprod. Fert. 29:349-379 (1972).
- Kanagawa, H., Kawata, K., Ishikawa, T. & Inone, T. Chromosome studies on hetero sexual twins in cattle. IV Long-term observations of sex-chromosome chimera ratio in cultured leukocytes. Jap. J. Vet. Res. 15:31-36 (1967).
- Kieffer, N.M. & Cartwright, T.C. Sex chromosome polymorphism in domestic cattle. J. Hered. 59:35 (1968).
- Koulischer, L., Tijskens, J. & Mortelmans, J. Chromosomes and speciation in the Superfamily Bovoidea. Genen Phaenen 15(2-3):65-72 (1972).
- Krallinger, H. Über die chromosomenzahl beim Rinde sowie einige allgemeine Bemerkungen über die chromosomenforschung in der Säugetierklasse. Anat. Anz. 63:209-214 (1927).
- Krallinger, H. Gibt es einen Spermatozoendimorphismus beim Haus rind? Zugleich eine chromosomenstudie und ein Beitrag zur Kritik der Chromosomenlehre. Arb. Deutsch. Gesellsch. Zuchtungskunde 40:1-43 (1928).
- Krallinger, H. Cytologische Studien an einigen Haussäugetieren. Arch. Tiererfahr. Tierzucht 5:127-187 (1931).
- Lagerlof, N. & Settergren, I. Results of seventeen's year control of hereditary hypoplasia in cattle of Swedish Highland breed. Cornell Vet. 43:52 (1953).
- Lejeune, J. Le mongolisme. Premier exemple d'aberration autosomique humaine. Ann. Génét. 1:41-49 (1959).
- Lillie, F.R. The theory of the Freemartin. Science 43: 611-613 (1916).

- Makino, S. The chromosome complexes in goat (*Capra hircus*) and sheep (*Ovis aries*) and their relationship (Chromosome studies in domestic mammals, II). Cytologia 13:39-54 (1943).
- Makino, S. Karyotypes of domestic cattle, zebu and domestic waterbuffalo (Chromosome studies in domestic mammals, IV). Cytologia 13:247-264 (1944).
- Marcum, J.B. The Freemartin Syndrome. Animal Breeding Abstr. 42(6):227-242 (1974).
- Masui, K. The spermatogenesis of domestic mammals. II. The spermatogenesis of cattle (*Bos taurus*). J. Coll. Agr. (Tokyo) 3:377-403 (1919).
- McFeely, R.A., Hare, W.C.D. & Biggers, J.D. Chromosome studies in 14 cases of intersex in domestic mammals. Cytogenetics 6:242-253 (1967).
- Melander, Y. The mitotic chromosomes of some cavicorn mammals (*Bos taurus*, *Bison bonassus* L and *Ovis aries* L). Hereditas 45:649-664 (1959).
- Moorhead, P.S., Nowell, P.C., Mellman, W.J., Battips, D.M. & Hungerford, D.A. Chromosome preparation of leukocytes cultured in human peripheral blood. Exp. Cell. Res. 20: 613-616 (1960).
- Mori, M., Sasaki, M., Ishikawa, T. & Kawata, K. Autosomal trisomy in a malformed new born calf. Proc. Japan Acad. 45:955-959 (1969).
- Mukherjee, A.B., Partington, M.W., Simpson, N.E. & Walmsley, K. A. Multiple anomalies associated with a small extra metacentric autosome. J. Med. Genet. 5:329-334 (1968).
- Nadler, C.F., Hoffmann, R.S. & Woolf, A. G-band patterns as chromosomal markers, and the interpretation of chromosomal evolution in wild sheep (*Ovis*). Experientia 29:117-119 (1973).
- Nichols, W.W., Levan, A. & Lawrence, W.C. Bovine Chromosomes by the peripheral blood method. Brief Report. Hereditas 48:536-538 (1962).
- Nielsen, J., Friedrich, U. & Tsuboi, T. Father and son with karyotype 47,XY ? Yq-. Hum. Genet. 11:247-252 (1971).
- Norberg, H.S., Refsdal, A.O., Garm, O.N. & Nes, N. A case report on X-trisomy in cattle. Hereditas 82:69 (1976).
- Nowell, P.C. Phytohemagglutinin: An initiator of mitosis in cultures of normal human leukocytes. Cancer Res. 20: 462-466 (1960).

- Ohno, S. Evolution of sex chromosomes in mammals. Ann. Rev. Genet. 3:495-524 (1969).
- Ohno, S., Trujillo, J.M., Stenius, C., Christian, L.C. & Teplitz, R.L. Possible germ cell chimeras among newborn dizygotic twin calves (Bos taurus). Cytogenetics 1:258-265 (1962).
- Oliveira Filho, E.B. Informação pessoal (1976).
- Owen, R.D. Immunogenetic consequences of vascular anastomoses between bovine twins. Science 102:400-401 (1945).
- Pathak, S., Hsu, T.C. & Arrighi, F.E. Chromosomes of Peromyscus (Rodentia, Cricetidae) IV. The role of heterochromatin in karyotypic evolution. Cytogenet. Cell Genet. 12:315-326 (1973).
- Pfeiffer, R.A., Dieckmann, L. & Bauchner, H. Familial occurrence of a small metacentric extra chromosome with satellites on both ends. Ann. Génét. 10:124-130 (1967).
- Pierrepoint, C.G., Stewart, J.S.S. & Rack, J. Patterns of steroid biosynthesis in the gonads of freemartins and their male co-twins. J. Repr. Fert.(suppl.) 7: 63-72 (1969).
- Pollock, D. A chromosome abnormality in Friesian Cattle in Great Britain. Vet. Rec. 90:309-310 (1972).
- Popescu, C.P. Deux cas nouveaux de fusion centrique chez les bovins. Ann. Génét. Sél. anim. 3:521-526 (1971).
- Popescu, C.P. Un cas possible d'inversion péricentrique chez les bovins. Ann. Génét. 15(3):197-199 (1972).
- Popescu, C.P. L'hétérochromatine constitutive dans le caryotype bovin normal et anormal. Ann. Génét. 16(3): 183-188 (1973).
- Prager, E.M. & Wilson, A.C. Slow evolutionary loss of the potential for interspecific hybridization in birds. A manifestation of slow regulatory evolution. Proc. Nat. Acad. Sci. 72(1):200-204 (1975).
- Rieck, G.W., Höhn, H. & Herzog, A. Familiäres vorkommen der zentromeren chromosomenfusion beim Rind. Zuchthyg. 3: 177-182 (1968).
- Rieck, G.W., Höhn, H. & Herzog, A. X-trisomie beim Rind mit Anzeichen familiärer Disposition für Meiosestörungen. Cytogenetics 9:401-409 (1970).
- Rugiati, S., Fedrigo, M. Alterazione cromosomica riscontrata in un toro acondroplastico di razza Remagnola. L'Ateneo Parmense. Acta Bio-Med. 38:3-7 (1967).

- Sasaki, M.S. & Makino, S. Revised study of the chromosomes of domestic cattle and the horse. J. Hered. 53(4):157-162 (1962).
- Scheres, J.M.J.C. Human chromosome banding. Lancet 1:849(1972).
- Schnedl, W. Giemsa banding, Quinacrine fluorescence and DNA-replication in chromosomes of cattle (Bostaurus). Chromosoma (Berl.) 38:319-328 (1972).
- Schnedl, W. & Czaker, R. Centromeric heterochromatin and comparison of G-banding in cattle, goat, and sheep chromosomes (Bovidae). Cytogenet. Cell Genet. 13:246 (1974).
- Schoenfeld, H. La spermatogénèse chez le taureau et chez les mammifères en général. Arch. Biol. 18:1-72 (1902).
- Schroeder, T.M., Anschütz, F. & Knopp, A. Spontane chromosome naberrationen bei familiärer Panmyelopathie. Humangenetik 1:194 (1964).
- Seth, P.M. & Kunze, W.P. Differential chromosomal staining in Bostaurus (cattle). Cytologia 39:373-378 (1974).
- Shive, R.J., Hare, W.C.D. & Patterson, D.F. Chromosome studies in dogs with congenital cardiac defects. Cytogenetics 4:340-348 (1965).
- Sinnot, E.W., Dunn, L.C. & Dobzhansky, T. Principios de Genética. 5a. Ed. Barcelona. Ediciones Omega S/A. pp 356-363 (1961).
- Smith, K.D., Steinberger, E., Steinberger, A. & Perloff, W. H. A familial centric chromosome fragment. Cytogenetics 4:219-226 (1965).
- Soller, M., Wysoki, M. & Padeh, B. A chromosomal abnormality in phenotypically normal saanen goats. Cytogenetics 5:88-93 (1966).
- Thuline, H.C. & Norby, D.E. Spontaneous occurrence of chromosome abnormality in cats. Science 134:554-555 (1961).
- Tjio, J.H. & Levan, A. The chromosome number of man. Hereditas 42:1 (1956).
- Valle Filho, V.R. Aspectos genéticos da subfertilidade e infertilidade dos touros. I Simp. Nac. Repr. Anim. (Belo Horizonte) 267p (1974).
- Van Hoof, L. La spermatogénèse dans les mammifères. III. Les spermatoctes leptotènes et amphotènes dans le taureau. La Cellule 30:7-26 (1919).

- Vianna, A.T., Santiago, M. & Gomes, F.P. Formação do gado de Canchim pelo cruzamento Charolês-Zebu. Estudos Técnicos nº 19. Ministério da Agricultura. 176p (1962).
- Vigier, B., Prépin, J., Jost, A. Absence de corrélation entre le chimérisme XX/XY dans le foie et les premiers signes de Freemartinism chez le foetus de veau. Cytogenetics 11: 81-101 (1972).
- Whitt, G.S., Childers, W.F. & Cho, P.L. Allelic expression at enzyme loci in an intertribal hybrid sunfish. J. Hered. 64:55-61 (1973).
- Wijeratne, W.V.S., Munro, I.B. & Wilkes, P.J. Sterility associated with singlebirth freemartinism. VIII International Congr. of Animal Reprod. and Artificial Inseminat. Krakow. 339p (1976).
- Williams, W.L. A clinical study of bovine twins and freemartins. Ind. Vet. J. 10:90-107 (1933).
- Wilson, A.C., Sarich, V.M. & Maxson, L.R. The importance of gene rearrangement in evolution: Evidence from studies on rates of chromosomal, protein, and anatomical evolution. Proc. Nat. Acad. Sci. 71(8):3028-3030 (1974a).
- Wilson, A.C., Maxson, L.R. & Sarich, V.M. Two types of molecular evolution. Evidence from studies of interespecific hybridization. Proc Nat. Acad. Sci. 71:2843-2847 (1974b).
- Wilson, A.C., Bush, G.L., Case, S.M. & King, M.C. Special structuring of mammalian populations and rate of chromosomal evolution. Proc. Nat. Acad. Sci. 72(12):5061 (1975).
- Witschi, E. Modification of the development of sex in lower vertebrates and in mammals. In sex and internal secretions. Ed. E. Allen. Baltimore, Williams & Wilkins Ed. 2:145-226 (1939).
- Witschi, E. Hormones and embryonic induction. Archives d'Anatomie Microscopique et de Morphologie Experimental 601-611 (1965).
- Wodsedalek, J.E. Studies on the cells of cattle with special reference to spermatogenesis, oögonia, and sex-determination. Biol. Bull. Woods Hole 38:290-317 (1920).
- Wurster, D.H. & Benirschke, K. Chromosome studies in the superfamily Bovoidea. Chromosoma 25:152-171 (1968).