



Citogenética clássica aplicada ao monitoramento de germoplasma bovino

Classic cytogenetic applied to the monitoring of bovine germplasm

H.S. Luna

Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, CPTL, Três Lagoas, MS, Brasil

Correspondência: helder.luna@ufms.br

Resumo

Com a evolução das biotecnologias da reprodução, o avanço dos programas de melhoramento genético animal e a necessidade de conservação de raças em risco de extinção, o monitoramento do material genético bovino é de fundamental importância. Entre os meios de monitoramento de germoplasmas, a citogenética constitui uma das ferramentas acessíveis para grande parte dos laboratórios ligados à reprodução animal. O presente trabalho busca mostrar a relevância da citogenética no monitoramento de germoplasma bovino.

Palavras-chave: cariótipo, cromossomos, gado.

Abstract

With the evolution of reproduction technologies, advancement of animal breeding programs and the need for conservation of breeds in dangers of extinction, the monitoring of bovine genetic material is fundamental importance. Among the means to monitor these germplasms, the cytogenetic constitutes one of tools available for most laboratories engaged in animal reproduction. The present work shows the relevance of cytogenetics in the monitoring of bovine germplasm.

Keywords: cattle, chromosomes, karyotype.

Introdução

O número cromossômico diploide dos bovinos é de 60 cromossomos. Os cromossomos autossômicos são todos acrocêntricos e, no caso dos pares sexuais, o cromossomo X é submetacêntrico, sendo um dos maiores, e o Y é acrocêntrico nos zebuínos (*Bos taurus indicus*) e submetacêntrico nos taurinos (*Bos taurus taurus*), sendo um dos menores do conjunto cromossômico. Ainda em taurinos, Jorge (1974) identificou na raça Jersey o cromossomo Y com morfologia metacêntrica. Desta forma, o cromossomo Y pode ser considerado um marcador diferencial das duas subespécies (Jorge et al., 2006). Provavelmente a origem deste polimorfismo seja uma inversão pericêntrica do cromossomo Y, a qual envolve o centrômero, originando um cromossomo com centrômero em posição diferenciada (Tambasco, 1976). A padronização do cariótipo nesta espécie é realizada pelo sistema internacional de nomenclatura para cromossomos de bovídeos domésticos (ISCNDB, Di Bernardino et al., 2001).

A citogenética apresenta importante papel na área da veterinária, e por meio dela diferentes animais são estudados, destacando-se aqueles utilizados como fonte de alimento para o homem, como os suínos e os bovinos (Basrur e Stranzinger, 2008), sendo imprescindível sua contínua reprodução. Neste sentido, após conhecimento do número e da morfologia dos cromossomos dos bovinos, diversas cromossomopatias foram relatadas. Estas anormalidades (numéricas ou estruturais) podem levar a casos de subfertilidade ou esterilidade (Swartz e Vogt, 1983). Desta forma, a integridade genética avaliada pelo estudo dos cromossomos dos rebanhos bovinos é de fundamental relevância para o sucesso de programas de reprodução (Adam et al., 2005).

Segundo Gustavsson (1977), as alterações cromossômicas em bovinos podem ser subdivididas em três categorias, dependendo do grau das manifestações fenotípicas:

- anomalias cromossômicas com graves efeitos conformacionais e/ou de fertilidade, ex.: trissomias em cromossomos autossômicos, *freemartinismo* e síndrome de Klinefelter (XXY);
- polimorfismos cromossomais com pequenos efeitos fenotípicos e/ou redução de fertilidade, ex.: translocação 1/29 e outras fusões cêntricas;
- anomalias cromossômicas secundárias, ex.: quebras e deleções.

A prevalência de aberrações cromossômicas em bovinos com fenótipo normal é inferior a 1% (Gustavsson, 1980), entretanto grandes variações podem ocorrer entre as raças e sua localização geográfica. Neste sentido, Pinheiro et al. (1980) e Moraes et al. (1982) relatam prevalências de 4,4 e 6,4%, respectivamente. Ainda, estudo realizado por Tambasco (1976) mostra que, em animais normais, a prevalência é de 4,4%, e entre os animais fenotipicamente anormais de 21,7%.



Em relação à discussão sobre o fator idade em bovinos, alguns pesquisadores sugerem que animais de idade ≥ 9 anos apresentem maiores chances de não disjunções cromossômicas, no entanto o risco não é maior que 1% (Schmutz, 2003). Os trabalhos nesta linha de pesquisa em bovinos ainda são escassos e não conclusivos.

Atualmente, diferentes biotecnologias de reprodução são aplicadas com objetivo de conservação e propagação do material genético bovino. Assim, o monitoramento citogenético, aliado a outras ferramentas, como a biologia molecular, faz-se de grande importância a fim de garantir a integridade do germoplasma bovino transmitido a gerações futuras desta espécie.

Estudo citogenético do cromossomo Y

Quando a América foi colonizada, diversas raças foram introduzidas e se adaptaram às condições ambientais locais. Neste sentido, as raças ibéricas trazidas pelos colonizadores espanhóis e portugueses são consideradas como naturalizadas (locais ou crioulas). Já os bovinos importados, a partir do final do século XIX e início do século XX, são considerados como raças exóticas. Por cruzamentos absorventes, estas raças exóticas causaram uma rápida substituição e erosão genética nas raças locais, e apresentam níveis de produção mais baixos, mas distinguem-se destas por estarem totalmente adaptadas aos trópicos – onde sofreram uma longa seleção natural (Egito et al., 2002).

O estudo citogenético do cromossomo Y tem sido utilizado como uma importante ferramenta de análise das “contaminações” por zebuínos em raças naturalizadas. Espera-se, nos animais naturalizados, encontrar a morfologia submetacêntrica do cromossomo Y, característica da subespécie *Bos taurus taurus*. Issa et al. (2006) estudaram 12 touros da raça Pantaneiro (Tucura) e encontraram três (25%) touros com cromossomos Y submetacêntricos e nove (75%) acrocêntricos. Outro estudo com 75 touros da raça local Curraleiro (Pé-duro) foi realizado por Britto e Mello (1999), os quais observaram que 24 (32%) eram submetacêntricos e 51 (68%) acrocêntricos. Na raça Caracu, também considerada uma raça local, de 43 touros estudados, 12 (30%) apresentaram Y submetacêntricos e 31 (70%) acrocêntricos (Pinheiro, 1984a). Issa et al. (2009) observaram que, nas raças naturalizadas Crioulo Lageano (dois animais) e Junqueira (quatro animais), todos os animais apresentavam a morfologia submetacêntrica do cromossomo Y. Ainda, no mesmo trabalho, 12 touros da raça Pantaneiro, oriundos da região norte do Pantanal, apresentaram a morfologia acrocêntrica do Y. Como visto pelos estudos acima, ocorreram cruzamentos absorventes com zebuínos, fato que não inviabiliza os esforços de preservação destes germoplasmas extremamente adaptados; ao contrário disso, tais estudos mostram a necessidade de se fazer trabalhos para uma “descontaminação” racial com uso de animais que possuam ancestralidade taurina (Britto e Mello, 1999).

Outras raças introduzidas na América têm sido estudadas. A raça Crioula Uruguaiana foi estudada por Postiglioni et al. (1996) em 99 animais (73 fêmeas e 26 machos). Em todos os machos foi encontrada a morfologia metacêntrica do cromossomo Y, confirmando a origem taurina. No mesmo estudo, relatou-se uma frequência de 6% de fraturas no cromossomo X, relacionadas ao sítio frágil Xq3.1. Os autores discutem que esta alta frequência poderia estar ligada a processo de endogamia, em razão da redução do número de animais desta raça. Esta fragilidade cromossômica tem sido associada a problemas de fertilidade na espécie bovina (Rincón et al., 1997).

Por outro lado, em relação à formação de raças sintéticas, encontra-se a Santa Gertrudis (5/8 taurino/Shorthorn; 3/8 zebuino/Brahman), da qual se espera, pelo cruzamento clássico, a observação do cromossomo Y submetacêntrico. Entretanto, Issa et al. (2004), ao estudarem oito machos não aparentados, encontraram em todos os animais a morfologia acrocêntrica do cromossomo Y, sugerindo, então, que a obtenção desta raça sintética não tenha sido pelo sistema clássico. Estudos históricos sobre a origem da raça Santa Gertrudis levam ao touro *Monkey* que foi considerado o fundador da raça e utilizado em estreita endogamia, o qual era filho de um touro Brahman de nome Vinotero. Assim, a origem do Y acrocêntrico deve ser proveniente deste animal. Estes achados já haviam sido confirmados por Moraes (1978). Na raça sintética Canchim, formada por cruzamentos entre a raça Charolesa com zebu, Tambasco (1976) observou que 100% dos animais de seu estudo apresentavam Y submetacêntrico, igualmente observado na raça Pitangueiras (Pinheiro, 1979). Já na raça Ibagé foi observado polimorfismo do cromossomo Y (Moraes 1978; Pinheiro, 1979), assim como no gado tropical leiteiro oriundo do cruzamento orientado das raças Holandesa e Jersey *versus* as raças Gir e Sindi (Pires et al., 1994).

Em relação ao estudo do cromossomo Y e sua relação com a fertilidade, ganham destaque os casos de fêmeas bovinas estéreis que apresentam constituição cromossômica 60,XY. Kawakura et al. (1996) relataram em seis novilhas estéreis o cariótipo 60,XY. Estas novilhas não possuíam o gene SRY, analisado por técnica de PCR; devido a este fenômeno, mostravam-se aparentemente como fêmeas normais. Em outro estudo, em uma novilha com ovários e útero com conformações aparentes normais porém sem manifestação de cio até os 23 meses de idade, Kondoh et al. (1992) também relataram a constituição cromossômica 60,XY.



Mosaicismo cromossômico: diferentes linhagens celulares quanto ao cariótipo em um mesmo indivíduo

Em bovinos, diferentes complementos cromossômicos têm sido relatados. Pires et al. (1999), ao estudarem 51 vacas da raça Nelore e 12 do tipo Tropical, encontraram em um animal Nelore o mosaicismo 59,X0(1,23%)/60,XX (97,85%)/61,XXX (0,92%). Esta vaca apresentava ciclo estral normal e iniciou cinco prenhez, produzindo três bezerros viáveis, um natimorto e, na última gestação, um feto mumificado de aproximadamente seis meses. Os autores discutem que a origem desse mosaicismo possa ter ocorrido por um erro mitótico durante a embriogênese tardia e ainda que este complemento cromossômico não ocorra de forma exclusiva em fêmeas estéreis.

Tambasco (1976) observou dois casos interessantes de mosaicismo: uma vaca Charolesa estéril de 12 anos de idade, sem alterações fenotípicas, apresentando mosaicismo 60,XX e 61,XX + 13 (em 18% das células analisadas) e um touro Nelore considerado normal com complementos cromossômicos 60,XY e 61,XY + 10 (em 5,7% das células analisadas). Como, de um modo geral, a trissomia autossômica leva à morte embrionária ou a deformações fenotípicas graves, estes achados sugerem mosaicismo não representativo nos animais (Pinheiro, 1984).

Associação de hidroalantoide com malformações fetais e cromossômicas tem sido relatada. Esper et al. (1984) analisaram um feto com quadro de hidroalantoide, oriundo de um parto por cesariana de vaca mestiça normal. O feto apresentava hidrocefalia e bicefalia parcial e veio a óbito uma hora após o procedimento. Antes de sua morte, foi colhido sangue para cariotipagem assim como da mãe. A vaca apresentava constituição cromossômica 60,XX, e a bezerra mosaicismo 60,XX e 59,XX + t (?), provavelmente a 10/14. Das 22 metáfases analisadas, sete (31,8%) eram translocadas. Os autores discutem as possibilidades da origem desta anomalia, sendo uma por fecundação do óvulo por um espermatozoide X e concomitantemente fecundação do segundo corpúsculo polar por outro espermatozoide, este carregando a translocação. Outra hipótese seria a ocorrência de uma alteração em uma linhagem de células que daria origem à fusão cêntrica e, finalmente, ainda se especula a possibilidade de um quimerismo, em que se formariam dois embriões, um normal e um translocado, seguido da união dos embriões.

Um estudo em nove bovinos da raça *Japanese Black* revelou a ocorrência da constituição cromossômica 60,XY(76,5%)/61,XY (23,5%) em um dos animais, o qual não apresentava conformação fenotípica anormal aparente. Este animal era castrado, fato que não permitiu análises detalhadas sobre sua capacidade reprodutiva. Entre as hipóteses sugeridas, uma seria a não disjunção pós-zigótica em um embrião XY, a favor da trissomia XY com exclusão da linhagem de células X0, e outra a troca de células entre gêmeos por meio de anastomoses de vasos, em que um seria anormal XY e morreria posteriormente, resultando, assim, em um caso de quimerismo (Hanada e Muramatsu, 1981).

Quimerismo cromossômico: o caso de gêmeos de diferentes sexos em bovinos

A designação *freemartin* refere-se a uma fêmea estéril concebida de uma gestação gemelar entre um macho (XY) e uma fêmea (XX) em que, por anastomoses vasculares placentárias, as quais ocorrem em mais de 90% dos casos, há trocas celulares (quimerismo cromossômico) e hormonais antes da diferenciação sexual da fêmea (30-40 dias de gestação; Camargo e Barón, 2009). Ainda, um ponto importante a ser referenciado é o efeito do quimerismo celular no macho, uma vez que estes indivíduos podem apresentar redução de fertilidade pela diminuição da atividade dos túbulos seminíferos (Rejduch et al., 2000).

As fêmeas *freemartin* podem apresentar diferentes graus de variabilidade das estruturas anatômicas, desde uma conformação feminina aparentemente normal até um fenótipo totalmente masculinizado (Peretti et al., 2008). Da mesma maneira, o grau de quimerismo cromossômico XX/XY é bastante variado entre os casos relatados. Diferentes raças bovinas já foram reportadas em relação ao quimerismo XX/XY. Tambasco (1976) relatou uma fêmea Canchim *freemartin* com 80% das suas células analisadas constituição cromossômica XY e somente 20% de XX. Uma vaca da raça Holandesa apresentou 26,7% de células XY e em outra 50% (Moraes et al., 1985). Pires et al. (2010) analisaram quatro fêmeas da raça Pardo-Suíça, nascidas de partos gemelares com machos, em que três destas apresentavam quimerismo, sendo uma com 25,8% de células XX e 74,2% de XY; outra com 10% de células XX e 90% de XY; e a terceira com 50% de células de cada tipo. Estas fêmeas apresentavam masculinização dos órgãos genitais e foram diagnosticadas como *freemartin*. Por outro lado, na quarta fêmea foram encontradas apenas células tipo XX e ela foi considerada normal.

Em machos, Pinheiro et al. (1981b) observaram um touro Nelore com 24% de células XX e um touro Gir com 30%, ambos envolvidos em programas de teste progênie. Estas linhagens (XY e XX) em machos geram ainda discussões entre pesquisadores, em razão da grande variabilidade do quimerismo nas gônadas, sendo importante o uso de refinadas técnicas citogenéticas para adequado diagnóstico e prognóstico (Basrur e Stranzinger, 2008).

Pinheiro et al. (1984b), em um estudo mais amplo, analisaram animais da raça Holandesa Branca e Preta oriundos de gestação gemelar heterossexual e relataram as diferentes frequências de quimerismo XX/XY. Na Tab. 1, nota-se que não foram encontradas células XY no animal 8, o qual apresentou normal fertilidade.



Tabela 1. Distribuição das células XX e XY nos animais quiméricos.

| | Número de células analisadas | | | | Fenótipo |
|---|------------------------------|-----|-------|----|-------------------|
| | 60,XX | % | 60,XY | % | |
| 1 | 09 | 30 | 21 | 70 | <i>Freemartin</i> |
| 2 | 08 | 32 | 25 | 68 | <i>Freemartin</i> |
| 3 | 09 | 36 | 16 | 64 | Macho normal |
| 4 | 12 | 48 | 13 | 52 | <i>Freemartin</i> |
| 5 | 13 | 65 | 07 | 35 | <i>Freemartin</i> |
| 6 | 11 | 73 | 04 | 27 | <i>Freemartin</i> |
| 7 | 17 | 85 | 03 | 15 | <i>Freemartin</i> |
| 8 | 186 | 100 | - | - | Fêmea normal |

Fonte: Pinheiro et al. (1984b).

Atualmente, existem vários métodos para diagnosticar uma fêmea *freemartin* como exame clínico, análise citogenética, provas sorológicas, uso da técnica de hibridização *in situ* e reação em cadeia da polimerase (Soh et al., 2007; Brace et al., 2008; Peretti et al., 2008).

O termo *free* é uma simplificação do escocês *farrow* que significa infertilidade. Em relação a *martin*, existem duas hipóteses, uma que possa ser derivado do gaélico *mart*, que significa vaca, ou de *Saint Martin*, o dia no qual, na Europa, sacrificava-se o gado para armazenar a carne para o inverno (Otto, 1997).

Alterações cromossômicas estruturais: o caso da translocação robertsoniana 1/29 em bovinos

A translocação robertsoniana é um rearranjo estrutural dos cromossomos envolvendo a fusão cêntrica de dois cromossomos acro(telo)cêntricos para formar um único cromossomo meta(sub)metacêntrico. O cromossomo translocado possui a maior parte dos dois cromossomos que lhe deram origem e, assim, o animal pode ser chamado de balanceado. Este nome de translocação foi dado em homenagem a Robertson, que, em 1916, deu ênfase a este tipo de translocação ao estudar a evolução de insetos (Jorge et al., 2006). Esta translocação inicialmente foi chamada por pesquisadores da área de “Anomalia de Gustavsson” (Basur, 1994), em razão do nome do pesquisador que a relatou pela primeira vez em bovinos (Gustavsson e Rockborn, 1964).

Em bovinos, a translocação robertsoniana 1/29 é a mais comum onde o animal apresenta um fenótipo normal, porém uma redução na fertilidade de 3-5%. Estudos em ovócitos de vacas translocadas mostram aumento de metáfases II com anomalias citogenéticas (Bonnet-Garnier et al., 2008). Os dados existentes sobre a formação de gametas de um animal translocado parecem indicar a existência de seleção contrária à formação dos gametas aneuploides (Jorge et al., 2006). Em relação a prejuízos econômicos, o governo sueco estimou que a translocação 1/29 gerou uma perda anual de mais de 300 mil dólares, antes de se iniciar um programa de erradicação (Otto, 1997).

As translocações 1/29 têm sido relatadas apenas na subespécie *Bos taurus taurus*, fato que poderia sugerir maior estabilidade genética do gado zebuino, que se estenderia à sua constituição cromossômica, entretanto salienta-se que os animais taurinos sofreram maior pressão de seleção artificial e, também, que é necessário que o número de animais zebuínos cariotipados aumente (Pinheiro, 1984). Em diferentes raças taurinas já foi identificada a translocação 1/29, a exemplo das raças Chianina, Parda-Suíça, *Red Poll*, *Blond d'Aquitaine* e Marchigiana (Pinheiro et al., 1984b; Moraes et al., 1985).

Um estudo realizado por Pinheiro et al. (1981a) na raça Pitangueiras (5/8 *Red Poll* x 3/4 zebu) mostrou uma elevada taxa de animais translocados; de um total de 240 animais analisados entre machos e fêmeas, 54 touros (28,3%) e 12 vacas (24,5%) apresentaram de forma heterozigota a translocação 1/29. Ainda, em um macho observou-se a constituição cromossômica 58,XY, -1, -1, -29, -29 + t(1;29) + t(1;29). A origem desta translocação se deve aos animais da raça taurina *Red Poll*. Os autores pontuam que doses de sêmen deste último animal citado poderiam ser distribuídas para centros de pesquisas para avaliações dos efeitos das aneuploidias em embriões ou mesmo direcionadas para análises da constituição 58,XY para fins de estudos evolutivos. Em um lote de 38 novilhas, filhas de um touro translocado da raça Marchigiana, Pinheiro et al. (1984b) observaram um número médio de serviço por concepção igual a 6,7 – o qual é considerado excessivamente alto.

Por outro lado, em um estudo realizado com as raças Chianina (54 fêmeas e 1 macho), Charolês (15 fêmeas e 5 machos), Marchigiana (15 fêmeas e 12 machos), Simental (5 machos), Pardo-Suíça (3 machos), Pitangueiras (3 machos), Limousin (3 machos) e Piemontês (1 macho), Amarante et al. (2000) não encontraram nenhum caso da translocação 1/29. Entre as hipóteses dos resultados, os autores discutem o tamanho da amostra e o trabalho de associações de criadores, no caso da raça Chianina, e a participação de centrais de inseminação artificial, no caso da raça Marchigiana, no sentido de ajudar a prevenir a disseminação desta anomalia. Em outro trabalho, com um plantel de animais da raça Pardo-Suíça, Pires et al. (2010) relatam o sucesso alcançado em um programa de erradicação da translocação 1/29, por análises citogenéticas realizadas, entre as gerações, ao longo dos anos.



Em raças naturalizadas introduzidas na colonização, também tem sido relatada a translocação 1/29. Neste sentido, existem registros nas raças Crioula Argentina (Schifferli et al., 2003), Crioula Venezuelana (Muñoz et al., 1994), Crioula Uruguaiana (Postiglioni et al., 1996) e Caracu (Issa et al., 2008).

Em relação aos efeitos do sêmen oriundo de touros heterozigotos para a translocação 1/29, King et al. (1980) avaliaram embriões bovinos coletados de 17 vacas com fertilidade comprovada inseminadas com sêmen de dois touros heterozigotos após o primeiro (2 células), terceiro (8 células) e sétimo dias (120 células) de inseminação. Os autores observaram que dos 29 embriões analisáveis de um total de 65 coletados, 18 (62%) apresentavam constituição cromossômica normal, nove (31%) a translocação balanceada e dois (6,9%), um no estágio de oito células e outro no estágio de 120 células, a trissomia do cromossomo 1.

Diversos rearranjos estruturais dos cromossomos já foram relatados em bovinos, podendo-se citar como exemplos: t(14;20; Schmutz, 1997); t(16;20; Rubes et al., 1999); t(7;21; Geshi et al., 1996); t(8;23; Bitueva et al., 1994); t tan(1;18; Hansen, 1969); inv(14; Popescu, 1976); inv(X; Switonski, 1987); inv(Y; Iannuzzi et al., 2001); rcp(11;21; q28;q12; Molteni et al., 2007); rcp(11;25; q11;q14-21; Perucatti et al., 2011); entre outros.

Alterações cromossômicas numéricas

Aneuploidias

Embriões aneuploides podem surgir pela união de gametas alterados por uma não disjunção cromossômica na meiose, em razão de um par de cromossomos homólogos não se separar na anáfase I ou as cromátides irmãs de um cromossomo não se separarem na anáfase II, gerando gametas com 31 cromossomos (trissômicos) ou 29 cromossomos (monossômicos; Schmutz, 2003). As aneuploidias em cromossomos autossômicos em bovinos são detectadas em baixa frequência, uma vez que estes embriões, de um modo geral, são eliminados ainda no útero ou apresentam malformações somáticas ao nascerem, com alta mortalidade perinatal, assim reduzem as possibilidades de passarem estas aberrações para gerações futuras (Moraes et al., 1985).

Coates et al. (1988) analisaram 30 indivíduos entre fetos abortados, natimortos e neonatos não viáveis, com múltiplos defeitos conformacionais. Destes, 18 animais foram cariotipados, utilizando-se fibroblastos do pericárdio, dos quais três foram trissômicos (61,XY,+27; 61,XX,+21; 61,XY,+?), um apresentou mosaïcismo de células com monossomia (59,XY,-?/60,XY) e um apresentou quimerismo (60,XX/60,XY). O estudo estimou que 2% dos casos de abortos ou natimortos podem apresentar anormalidades cromossômicas, caracterizadas por aneuploidias. Todos os animais estudados pertenciam à subespécie *Bos taurus taurus*. Em bovinos, a trissomia do cromossomo 17 tem sido associada à síndrome da braquignatia letal (Herzog et al., 1977). Em uma bezerra que apresentava deformação fenotípica, incluindo alteração nos membros posteriores e anteriores, opistótomo, cegueira bilateral e ausência de genitália externa, Lioi et al. (1995) constataram trissomia, provavelmente do cromossomo 20, em todas as células analisadas, associada a uma considerável taxa de instabilidade cromossômica.

Um caso raro e intrigante de trissomia foi relatado em uma bezerra da raça *Austrian Fleckvieh*, a qual apresentava constituição cromossômica 61,XX + 22 em todas as células analisadas (29 metáfases de linfócitos de sangue periférico e 15 fibroblastos da pele) e, como defeitos, manifestava apenas hérnia umbilical, fistula úraco e leve braquignatia, pesando 221 kg com apenas um ano de idade. Na ocasião do estudo, a mãe deste animal somava nove anos de idade e apresentava cariótipo normal (Mayr et al., 1985).

Em relação às alterações numéricas, nos cromossomos sexuais, estudos mostram que elas não são letais, mas reduzem a fertilidade ou levam à esterilidade, com exceção da constituição 59,Y, a qual induz ao aborto, uma vez que o cromossomo X carrega muitos genes fundamentais à sobrevivência do feto. Por outro lado, a monossomia do cromossomo X (síndrome de Turner) gera uma fêmea estéril. Já a constituição cromossômica 61,XXY (síndrome de Klinefelter) produz um macho com hipoplasia gonadal com variado grau de problemas reprodutivos; geralmente este animal também é estéril. Schmutz et al. (1994) descreveram um caso de macho da raça Charolesa apresentando azoospermia com a constituição cromossômica 60,XXY + t(1;29). Este animal foi castrado, e análises histológicas de amostras do testículo mostraram alterações (parcial colapso) dos túbulos seminíferos e reduzida quantidade de células de Sertoli. Logue et al. (1979) e Dunn et al. (1980) também reportaram azoospermia em touros Holandês (61,XXY) e Hereford (61,XXY), respectivamente. Mais recentemente, a técnica de FISH tem sido empregada para diagnóstico desta trissomia (Slota et al., 2003).

No caso de fêmeas com trissomia do cromossomo X (61,XXX), observa-se redução da fertilidade ou mesmo esterilidade. Entretanto, elas podem gerar bezerras com cariótipo 61,XXY ou mesmo normais (Schmutz et al., 1994; Schmutz, 2003). Um caso de fêmea bovina da raça Pitangueira com constituição cromossômica 60,XXX + t(1;29) foi reportado por Pinheiro et al. (1987); ao exame por palpação retal, revelou-se a genitália interna, incluindo os ovários, com aspectos de novilhas pré-púberes.



Poliploidias

A poliploidia é um fenômeno que leva à amplificação do conteúdo genético, sendo originado principalmente por uma mitose anormal em que há divisão das cromátides na anáfase sem migração para os polos e sem divisão citológica (cariocinese sem citocinese). Ainda, a fusão de células seria outra possibilidade (Cribiu e Popescu, 1977). A endorreduplicação (endomitoses) dos cromossomos é outra forma de origem das poliploidias, e pode ocorrer em células sem indução, com indução ou de origem cancerosa. Em mamíferos, a poliploidia está relacionada a específicos tipos de tecidos, implicados na amplificação genética. Neste sentido, sua ocorrência tem sido relatada em células do miocárdio, pâncreas, células gliais, megacariócitos e células trofoblásticas. Estas ampliações genômicas têm sido associadas a células altamente especializadas de natureza secretora (D'Amato, 1989).

Em bovinos, células do trofotoderma embrionário manifestam células binucleadas produzidas por endorreduplicação e secretam hormônios como o lactogênio placentário (Nakano et al., 2002). Entretanto, fora das células que podem manifestar o fenômeno de amplificação genética como mecanismo fisiológico, deve-se monitorar a ocorrência de poliploidia e investigar os possíveis indutores desta manifestação.

Choques térmicos, além de drogas adicionadas ao meio de cultivo, são fatores que podem induzir à poliploidia, uma vez que células poliploides são encontradas em culturas de tecidos (Fechheimer, 1972). Pinheiro et al. (1981b) relataram cinco animais zebuínos da raça Guzerá com ocorrência de poliploidia, sendo que dois deles apresentavam uma frequência de 10%. Os autores sugerem que este fenômeno pode ser atribuído a distúrbios na cultura ou até mesmo por infecção virótica, como, por exemplo, a leucose bovina, fato que não foi investigado. Neste sentido, Tambasco et al. (1998) estudaram 49 vacas da raça Holandesa Preta e Branca, sendo 24 soropositivas para o vírus da leucose enzoótica bovina e 25 soronegativas. Os autores não encontraram diferença significativa em relação às quebras e poliploidias entre os dois grupos. Entretanto, os animais infectados apresentaram uma frequência menor de poliploidia (5%) do que os animais não infectados (8,27%). É plausível a realização de mais estudos que relacionem infecções virais e poliploidia na espécie bovina.

Luna et al. (2010) estudaram 28 fêmeas bovinas (sete da raça Simental e 21 da raça Nelore) onde foram analisadas 2800 metáfases (obtidas de linfócitos de sangue periférico) das quais 86 (3,07%) apresentaram poliploidia. Em relação às observações individuais, as maiores frequências foram encontradas em três fêmeas senis da raça Nelore (7-9%) e um animal jovem da raça Simental (8%).

Linhagens de células bovinas têm sido estabelecidas, as quais podem ser utilizadas para diferentes finalidades, sendo importante a rotina de análises de seu cariótipo após procedimentos de isolamento, cultivo e congelamento-descongelamento (Hu et al., 2009). Donato e Loroño (2002) estudaram os complementos cromossômicos de duas linhagens de células bovinas estabelecidas (JEW38 e COW56) e encontraram 5% de células poliploides, 2% de separação precoce das cromátides irmãs, 1% de endorreduplicação dos cromossomos, além de outras anormalidades, como micronúcleos. Estas anormalidades poderiam ter sido induzidas pela droga bromodeoxiuridina usada no experimento, fator que os autores discutem mas não acreditam ser a causa, ou por substâncias presentes ao meio de cultivo. Caso contrário, estas alterações, em particular a poliploidia, são estabelecidas após várias divisões celulares e podem ser um fenômeno que ocorra nestas células *in vivo*. Ainda, tais autores discutem que os micronúcleos encontrados podem estar relacionados ao processo de apoptose de células envelhecidas. Em humanos, Therman e Susman (1993) relataram frequências de 3-5% de poliploidia em linhagens de fibroblastos.

Ademais, a polispermia, a fecundação de um óvulo diploide (digênia) ou a fecundação por um espermatozoide diploide (diândria) levam, obviamente, à formação de embriões totalmente poliploides (Lechiniak et al., 1996).

Citogenética de embriões bovinos produzidos *in vitro*

Anomalias cromossômicas têm sido relatadas em embriões bovinos produzidos *in vitro* (Viuff et al., 2000), e há relatos que indicam maior incidência dessas anormalidades em tais embriões do que em embriões produzidos *in vivo* (Viuff et al., 1999, 2001). Entretanto, antes mesmo das análises cromossômicas dos embriões, alerta-se para o monitoramento citogenético dos gametas manipulados *in vitro* para sua produção (Luna et al., 2008).

Em relação aos embriões bovinos, Ulloa Ulloa et al. (2008) relacionaram qualidade embrionária *versus* anormalidades cromossômicas e verificaram que embriões bovinos obtidos por fecundação *in vitro* (FIV) no dia dois com cinco a oito células apresentavam menor incidência de haploidia, mixoploidia e poliploidia quando comparados a embriões com números menores (duas a quatro) ou maiores (>8) de células. Ainda, os autores relataram que embriões de melhores qualidades no dia oito apresentaram as menores taxas de anormalidades cromossômicas quando comparados aos embriões de qualidades inferiores. Jakobsen et al. (2006), ao estudarem 155 embriões produzidos *in vitro* com sondas dos cromossomos 6 e 7, encontraram aumento de poliploidias em embriões classificados como bons e pobres, quando comparados aos embriões excelentes, mas não observaram diferenças em relação à incidência de mixoploidias. Os autores observam que estas alterações não apresentam



influência dos espermatozoides, uma vez que verificaram, com as mesmas sondas, taxa de dissômia de apenas 0,1% por cromossomo.

Na mesma linha de estudo, Booth et al. (2003) encontraram uma relação entre a qualidade de embriões clonados (analisados por número de blastômeros) e a poliploidia uma vez que todos os embriões, puramente poliploides, apresentavam médias iguais ou inferiores a 91 núcleos/embrião no dia sete, comparados aos melhores, que apresentaram médias de até 168,3 núcleos/embrião. Estes autores concluem que a porcentagem de erros na ploidia é inversamente proporcional à quantidade de núcleos; que embriões mixoploides representam a maioria dos embriões clonados; que existe a ocorrência de embriões totalmente poliploides; e, finalmente, que a poliploidia não tem origem nas células doadoras, as quais, no caso do estudo, foram células da granulosa.

A tecnologia de injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) é uma excelente forma de aproveitamento de espermatozoides, visto que eles podem ser extraídos das gônadas antes mesmo da ejaculação ou até após a morte do animal. Espermatozoides mortos por congelação-descongelação ou liofilizados têm sido usados com apoio da ICSI. Neste sentido, Keskinetepe et al. (2002) avaliaram embriões bovinos obtidos de espermatozoides mortos com ativação ovocitária pelo uso da ionomicina associado ao DMAP. Os autores estudaram 60 blastocistos, sendo 30 oriundos de espermatozoides liofilizados e 30 de espermatozoides congelados-descongelados e encontraram frequências de 13,3 e 10% de tetraploidia e 73,3 e 80% de diploidia, respectivamente. Estes dados mostram que o uso de espermatozoides mortos apresenta grande potencial para conservação de germoplasma bovino.

A maioria dos estudos em embriões bovinos é realizada na subespécie *Bos taurus taurus*. Por outro lado, em zebuínos, Pires et al. (2005) realizaram estudo pioneiro em 107 embriões FIV da raça Nelore e encontraram 32 (29,9%) com anormalidades cromossômicas representadas somente por poliploidias e mixoploidias. Como controle, analisaram 23 embriões produzidos *in vivo*, dos quais três (13%) foram anormais. Apesar de a incidência de anormalidades ser maior nos FIV, não houve diferença estatística entre os grupos. Ainda, verificaram o efeito das fases de desenvolvimento embrionário (duas; quatro; seis; oito; dezesseis células e mórula compacta) na incidência de anormalidades cromossômicas. Dos resultados obtidos, concluíram que aproximadamente um terço dos embriões zebuínos FIV apresenta anomalias cromossômicas e que sua incidência independe do estágio de desenvolvimento. A avaliação dos embriões produzidos por FIV é de fundamental relevância para o avanço desta tecnologia em bovinos, e devem ser desenvolvidos critérios objetivos e confiáveis que proporcionem o aumento da viabilidade embrionária pós-transferência (Sugimura et al., 2012).

Como exposto, o monitoramento citogenético do germoplasma bovino, *in situ* ou *ex situ*, é uma importante ferramenta e merece atenção especial pelos pesquisadores da área, garantindo a qualidade do material genético a ser utilizado em programas de reprodução animal – seja no melhoramento de raças comerciais exóticas ou na recuperação de raças naturalizadas ameaçadas de extinção.

Referências

- Adam ML, Campos JT, Torres RA.** Cromossomos e genética bovina atestam a qualidade do plantel. Rev Nel, v.118, p.130-132, 2005.
- Amarante MRV, Tsuribe PM, Jorge W, Rocha GP.** Análise cromossômica em bovinos e equinos. Braz J Vet Res Anim Sci, v.37, p.296-298, 2000.
- Basrur PK.** Contributions of cytogenetics to animal reproduction: past, present and future. Rev Bras Reprod Anim, v.18, p.153-175, 1994.
- Basrur PK, Stranzinger G.** Veterinary cytogenetics: past and perspective. Cytogenet Genome Res, v.120, p.11-25, 2008.
- Biltueva L, Sharshova S, Sharshov A, Ladygina T, Borodin P, Raphodatsky A.** A new Robertsonian translocation 8/23, in cattle. Genet Sel Evol, v.26, p.159-165, 1994.
- Bonnet-Garnier A, Lacaze S, Beckers JF, Berland HM, Pinton A, Yerle M, Ducos A.** Meiotic segregation analysis in cows carrying the t(1;29) Robertsonian translocation. Cytogenet Genome Res, v.120, p.91-96, 2008.
- Booth PJ, Viuff D, Tan S, Holm P, Greve T, Callesen H.** Numerical chromosome errors in day 7 somatic nuclear transfer bovine blastocysts. Biol Reprod, v.68, p.922-928, 2003.
- Brace MD, Peters O, Menzies P, King WA, Nino-Soto, MI.** Sex chromosome chimerism and the freemartin syndrome in Rideau Arcott sheep. Cytogenet Genome Res, v.120, p.132-139, 2008.
- Britto CMC, Mello MLC.** Morphological dimorphism in the Y chromosome of “Pé-duro” cattle in Brazilian State of Piauí. Genet Mol Biol, v.22, p.369-373, 1999.
- Camargo ESC, Barón EMP.** Freemartinismo o quimerismo XX/XY en bovinos: revisión. Rev Invest Agr Amb, v.0, p.7-12, 2009.
- Coates JM, Schmutz SM, Rousseaux CG.** A survey of malformed aborted bovine fetuses, stillbirths and nonviable neonates for abnormal karyotypes. Can J Vet Res, v.52, p.258-263, 1988.
- Cribiu EP, Popescu CP.** L'aneuploidie et al polyploide chez lês bovin dans Le culture de cellules bovines. Ann Gen Sel Anim, v.9, p.275-282, 1977.
- D'Amato F.** Polyploidy in cell differentiation. Caryologia, v.42, p.183-211, 1989.



- Di Berardino D, Di Meo GP, Gallagher DS, Hayes H, Iannuzzi L.** ISCNDB 2000: International system for chromosome nomenclature of domestic bovinds. *Cytogenet Cell Genet*, v.92, p.283-299, 2001.
- Donato MD, Loroño M.** Anormalidades citogenéticas de líneas estables de fibroblastos bovinos. *Rev Cient*, v.12, p.388-394, 2002.
- Dunn HO, Lein DH, McEntee K.** Testicular hypoplasia in a Hereford bull with 61,XXY karyotype: the bovine counterpart of human Klinefelter's syndrome. *Cornell Vet*, 1980; v.70, p.137-146, 1980.
- Egito AA, Mariante AS, Albuquerque MSM.** Programa brasileiro de conservação de recursos genéticos animais. *Arch Zootec*, v.51, p.39-52, 2002.
- Esper CR, Pinheiro LEL, Toniolo GH, Souza WM, Andrade EF.** Hidroalantoide em bovino associado a malformações fetal e cromossômica. *Rev Bras Reprod Anim*, v.8, p.97-100, 1984.
- Fechheimer NS.** Causal basis of chromosome abnormalities. *J Reprod Fertil Suppl*, n.15, p.79-98, 1972.
- Geshi M, Sakaguchi M, Yonai M, Nagai T, Suzuki O, Hanada H.** Effects of the 7/21 Robertsonian translocation on fertilization rates and preimplantation development of bovine oocyte in vitro. *Theriogenology*, v.46, p.893-897, 1996.
- Gustavsson I.** Chromosome aberration and their influence on the reproductive performance of domestic animals – a review. *Z Tierzuchtg Zuchtgabiol*, v.97, p.176-195, 1980.
- Gustavsson I.** Cytogenetic analysis of cattle chromosomes; current utilization and speculation of future applications. *Ann Genet Sel Anim*, v.9, p.453-462, 1977.
- Gustavsson I, Rockborn G.** Chromosome abnormality in three cases lymphatic leukemia in cattle. *Nature*, v.203, p.990, 1964.
- Hansen, KM.** Bovine tandem fusion and infertility. *Hereditas*, v.63, p.453-454, 1969.
- Hanada H, Muramatsu S.** A phenotypically normal cattle with 60, XY/61, XYY karyotype. *Jpn J Genet*, v.56, p.519-522, 1981.
- Herzog A, Hohn H, Riek GW.** Survey of recent situation of chromosome pathology in diferente breeds of German cattle. *Ann Genet Sel Anim*, v.9, p.471-491, 1977.
- Hu H, Wang J, Bu D, Weil H, Zhoul L, Li F, Looor JJ.** In vitro culture and characterization of a mammary epithelial cell line from chinese Holstein Dairy Cow. *PLoS ONE*, v.4, p.1-8, 2009.
- Iannuzzi L, Di Meo GP, Perucatti A, Eggen A, Incarnato D, Sarubbi F, Cribiu E.** A pericentric inversion in the cattle Y chromosome. *Cytogenet Cell Genet*, v.94, p.202-205, 2001.
- Issa EC, Fioravante MCS, Carvalho TB, Elston LB, Storck DE, Jorge W, Camargos MF, Sanches RL, Sereno JRB.** Caracterização cromossômica da raça Caracu. In: Simpósio Nacional Cerrado, 9; Simpósio Internacional Savanas Tropicais, 2, 2008, Brasília. Anais... Brasília: [s.n.], 2008. 1CD.
- Issa EC, Jorge W, Egito AA, Sereno JRB.** Cytogenetic analysis of the Y chromosome of native brazilian bovine breeds: preliminary data. *Arch Zootec*, v.58, p.93-101, 2009.
- Issa EC, Jorge W, Sereno JRB.** Cytogenetic and molecular analysis of the Pantaneiro cattle breed. *Pesq Agropec Bras*, v.41, p.1609-1615, 2006.
- Issa EC, Jorge W, Silva RG.** O cromossomo Y do gado Santa Gertrudis (*Bos taurus taurus*). In: Simpósio da Sociedade Brasileira de Melhoramento Animal, 5, 2004, Pirassununga, SP. Anais... Pirassununga: SBMA, 2004. Resumo.
- Jakobsen AS, Thomsen PD, Avery B.** Few polyploid blastomeres in morphologically superior bovine embryos produced in vitro. *Theriogenology*, v.65, p.870-881, 2006.
- Jorge W.** Chromosome study of some breeds cattle. *Caryologia*, v.27, p.325-329, 1974.
- Jorge W, Issa EC, Sereno FTPS, Sereno JRB.** Caracterização genética de bovinos por meio de estudos do cromossomo Y e do DNA mitocondrial. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2006. 74p.
- Kawakura K, Miyake YI, Murakami RK, Kondoh S, Hirata TI.** Deletion of SRY region on the Y chromosome detected in bovine gonadal hypoplasia (XY female) by PCR. *Cytogenet Cell Genet*, v.72, p.183-184, 1996.
- Keskintepe L, Pacholczyk G, Machnicka A, Norris K, Curuk A, Khan I.** Bovine blastocyst development from oocytes injected with freeze-dried spermatozoa. *Biol Reprod*, v.67, p.409-415, 2002.
- King WA, Linares T, Gustavsson I, Bane A.** Presumptive translocation type trissomy in embryos sired by bulls heterozygous for the 1/29 translocation. *Hereditas*, v.92, p.167-169, 1980.
- Kondoh S, Miyake YI, Nakahori Y, Nakagome Y, Kaneda Y.** Cytogenetical and molecular biological studies on a bovine XY female. *J Vet Med Sci*, v.54, p.1077-1080, 1992.
- Lechniak D, Switonski M, Sosnowski M.** The incidence of bovine diploid oocytes matured in vitro. *Theriogenology*, v.46, p.267-277, 1996.
- Lioi M, Scarfi MB, Di Berardino D.** An autosomal trissomy in cattle. *Gen Sel Evol*, v.27, p.473-476, 1995.
- Logue DN, Harvey MJA, Munro CDA, Lennox B.** Hormonal and histological studies in a 61,XXY bull. *Vet Rec*, v.104, p.500-503, 1979.
- Luna HS, Ferrari I, Rumpf R.** Citogenética de ovócitos bovinos maturados *in vitro*. *Rev Bras Reprod Anim*, v.23, p.168-171, 2008.
- Luna HS, Ferrari I, Ferraz Filho PB, Rumpf R.** Poliploidia em bovinos Simental (*Bos taurus taurus*) e Nelore



- (*Bos taurus indicus*). Estudos, v.37, p.749-754, 2010.
- Mayr B, Krutzler H, Auer H, Schleger W, Sasshofer K, Glawischnig E.** A viable calf with trissomy 22. Cytogenet Cell Genet, v.39, p.77-79, 1985.
- Molteni L, Perucatti A, Iannuzzi A, Di Meo GP, De Lorenzi L, De Giovanni A, Incarnato D, Succi G, Cribiu E, Eggen A, Iannuzzi L.** A new case of reciprocal translocation in a young bull: rcp(11; 21)(q28;q12). Cytogenet Genome Res, v.116, p.80-84, 2007.
- Moraes JCF.** Estudos cromossômicos em diferentes raças do rebanho bovino do Rio Grande do Sul. 1978. 105f. Dissertação (Mestrado em Genética) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, rs, 1978.
- Moraes JCF.** Cytogenetic investigation in cattle and sheep in south Brazil. In: European Colloquium on Cytogenetics of Domestic Animals, 5, 1982, Milano-Gargnano. Proceedings... Milano: ECCDA, 1982. p.430-434.
- Moraes JCF, Pinheiro JEP, Poli JLEH, Vaz AK, Rasch ALC.** Constituição cromossômica em bovinos com fenótipo normal e portadores de malformações diversas. Rev Bras Reprod Anim, v.9, p.75-86, 1985.
- Muñoz MG, Ocanto D, Madriz ML, Medina R, Vera O.** Incidence of 1/29 translocation in Venezuelan Creole bulls. Theriogenology, v.41, p.379-382, 1994.
- Nakano H, Shimada A, Imai K, Takezawa T, Takahashi T, Hashizume K.** Bovine trophoblastic cell differentiation on collagen substrata: formation of binucleate cells expressing placental lactogen. Cell Tissue Res, v.307, p.225-235, 2002.
- Otto PG.** Genética básica para veterinária. 2.ed. São Paulo: Rocca, 1997. 227p.
- Peretti V, Ciotola F, Albarella S, Paciello O, Dario C, Barbieri V, Iannuzzi L.** XX/XY chimerism in cattle: clinical and cytogenetic studies. Sex Dev, v.2, p.24-30, 2008.
- Perucatti A, Genualdo V, Iannuzzi A, De Lorenzi L, Matassino D, Parma P, Di Bernardino D, Iannuzzi L, Di Meo GP.** A new and unusual reciprocal translocation in cattle: rcp(11;25)(q11;q14-21). Cytogenet Genome Res, v.134, p.96-100, 2011.
- Pinheiro LEL.** Considerações sobre a constituição cromossômica do gado zebu. Inf Agropec, v.10, p.69-71, 1984.
- Pinheiro LEL.** Estágio atual de desenvolvimento da genética médica veterinária no Brasil. In: Simpósio sobre Tópicos Avançados em Reprodução Animal, 1, 1980, Jaboticabal. Anais... Jaboticabal: [s.n.], 1980. p.7-14.
- Pinheiro LEL.** Estudos citogenéticos de algumas raças da subespécie *Bos taurus taurus*. 1979. 94f. Tese (Doutorado em Genética) - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, 1979.
- Pinheiro LEL, Almeida Jr IL, Garcia LM, Basrur PK.** Trisomy X and 1/29 translocation in infertile heifer. Theriogenology, v.28, p.891-898, 1987.
- Pinheiro LEL, Ferrari I, Ferraz JBS, Almeida Jr IL.** Heteromorfismo cromossômico na raça Caracu. Rev Bras Reprod Anim, v.8, p.17-20, 1984a.
- Pinheiro LEL, Ferrari I, Ferraz JBS, Lobo RB.** High frequency in of Robertsonian translocation in a Brazilian cattle breed. Braz J Genet, v.4, p.657-665, 1981a.
- Pinheiro LEL, Ferrari I, Lobo RB, Almeida Jr IL.** Ocorrência de aberrações cromossômicas em reprodutores e matrizes da subespécie taurina. Rev Bras Reprod Anim, v.8, p.230-234, 1984b.
- Pinheiro LEL, Ferrari I, Lobo RB, Becker WAP.** Cariotipagem de reprodutores e matrizes de algumas raças zebuínas envolvidas nos programas de teste de progênie e transferência de zigotos. Rev Bras Reprod Anim, v.5, p.15-20, 1981b.
- Pires RML, Alvarez RH, Liguori ACR, Coelho L, Martinez AC.** Anomalias cromossômicas no início do desenvolvimento de embriões zebuínos produzidos *in vitro*. Bol Ind Anim, v.62, p.135-140, 2005.
- Pires RML, Dib CC, Duarte KMR, Amaral JB, Miranda MS.** Análise citogenética de bovinos da raça Pardo-Suíça. Bol Ind Anim, v.67, p.151-155, 2010.
- Pires RML, Liguori ACR, Alvarez RH, Figueiredo LA, Maschio W.** Implicação reprodutiva do mosaicismo 59,X0/60,XX/61,XXX em bovinos. Bol Ind Anim, v.56, p.85-88, 1999.
- Pires RML, Oliveira JV, Castro TAMG, Ribeiro WR, Pires FL.** Estudos citogenéticos em bovinos do tipo tropical leiteiro e ecótipo Mantiqueira. Bol Ind Anim, v.51, p.165-168, 1994.
- Popescu CP.** New data on pericentric inversion in cattle (*Bos taurus L*). Ann Genét, v.11, p.262-264, 1976.
- Postiglioni A, Llambi S, Gagliardi R, de Bethencourt M.** Genetic characterization of uruguayan creole cattle. I Cytogenetic characterization of a sample of Uruguayan creole cattle. Arch Zootec, v.45, p.209-213, 1996.
- Rejduch, B, E Slota, I Gustavsson.** 60,XY/60,XX chimerism in the germ cell line of mature bulls born in heterosexual twinning. Theriogenology, v.54, p.621-627, 2000.
- Rincón G, Llambí S, Postiglioni A.** Expression of X chromosome fragility in Holstein-Friesian cattle: a preliminary study. Genet Sel Evol, v.29, p.395-401, 1997.
- Rubes J, Machatkova M, Jokesova E, Zudova D.** A potencial relationship between the 16;20 and 14;20 Robertsonian translocation and low in vitro embryo development. Theriogenology, v.52, p.171-180, 1999.
- Schifferli CA, Bonelli AM, Wevar C, Scilingo AM, Arruga MV.** Presumptive 1/29 Robertsonian translocation observed in the Argentinean Creole cattle breed. Anim Res, v.52, p.119-123, 2003
- Schmutz, SM.** Chromosome considerations in cattle... fertility: Chromosome anomalies affecting fertility and



abortion in cattle. 2 fev. 2003. Disponível em: <http://homepage.usask.ca/~schmutz/chromosome.html>. Acesso em: 10 set. 2010.

Schmutz SM, Barth AD, Moker JS. A Klinefelter bull with a 1;29 translocation born to a fertile 61,XXX cow. *Can Vet J*, v.35, p.182-184, 1994

Schmutz SM, Moker JS, Pawlyshyn IV, Haugenl B, Clark EG. Fertility effects of the 14;20 Robertsonian translocation in Swiss Simmental cattle. *Theriogenology*, v.47, p.815-823, 1997.

Slota E, Kozubska-Sobocińska A, Kooeciłny M, Danielak-Cizech B, Rejduch B. Detection of the XXY trisomy in a bull by using sex chromosome painting probes. *J Appl Genet*, v.44, p.379-382, 2003.

Soh SH, Cho EJ, Son WJ, Lee CY. Diagnosis of bovine freemartinism by fluorescence in situ hybridization on interphase nuclei using a bovine Y chromosome-specific DNA probe. *Theriogenology*, v.68, p.1003-1011, 2007.

Sugimura S, Akai T, Hashiyada Y, Somfai T, Inaba Y, Hirayama M, Yamanouchi T, Matsuda H, Kobayashi S, Aikawa Y, Ohtake M, Kobayashi E, Konishi K, Imai K. Promising system for selecting healthy in vitro-fertilized embryos in cattle. *PLoS ONE*, v.7, p.1-13, 2012.

Swartz HA, Vogt DW. Chromosome abnormalities as a cause of 4 reproductive inefficiency in heifers. *J Hered*, v.74, p.320-321, 1983.

Switonski M. A pericentric inversion in an X chromosome in the cow. *J Hered*, v.78, p.58-59, 1987.

Tambasco AJ. Contribuição ao estudo citogenético em bovino normais e em bovinos com problemas de reprodução. 1976. 97f. Tese (Doutorado em Genética) - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 1976.

Tambasco DD, Tambasco AJ, Oliveira MCS, Barbosa PF. Estudo citogenético em bovinos da raça Holandesa Preta e Branca infectados pelo vírus da leucose enzoótica bovina. *Arq Bras Med Vet Zootec*, v.50, p.91-93, 1998.

Therman E, Susman M (Ed.). Human chromosomes, structure, behavior and effects. New York: Springer-Verlag, 1993.

Ulloa Ulloa CM, Yoshizawa M, Yamashita A, Hama S, Mtsui A, Hashi C, Abe H, Hoshi H, Fukui E, Matsumoto H. Blastocyst production from *in vitro*-produced day-2 bovine embryos classified by cleavage stage, and cytogenetical evaluation of the resultant day-8 blastocysts. *J Reprod Dev*, v.54, p.465-472, 2008.

Viuff D, Hendriksen PJM, Vos PLAM, Hyttel P, Greve T, Thomsen PD. Bovine embryos developed in vivo have a lower polyploidy frequency at days 2-5 post ovulation than in vitro produced embryos. *Theriogenology*, v.55, p.323, 2001.

Viuff D, Rickords L, Offenbergh H, Hyttel P, Avery B, Greve T, Olsaker I, Williams JL, Callesen H, Thomsen PD. A high proportion of bovine blastocysts produced in vitro are mixoploid. *Biol Reprod*, v.60, p.1273-1278, 1999.

Viuff D, Torben G, Avery B, Hyttel, Brockhoff B, Thomsen P. Chromosome aberrations in in vitro-produced bovine embryos at days 2-5 post-insemination. *Biol Reprod*, v.63, p.1143-1148, 2000.
