

## IMPLICAÇÃO REPRODUTIVA DO MOSAICISMO 59,X0/60,XX/61,XXX EM BOVINOS<sup>1</sup>

RITA MARIA LADEIRA PIRES<sup>2</sup>, ANA CRISTINA REGIS LIGUORI<sup>2,3</sup>, RAFAEL HERRERA ALVAREZ<sup>2</sup>, LEOPOLDO ANDRADE DE FIGUEIREDO<sup>4</sup>, WAGNER MASCHIO<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup> Projeto IZ 14-019/97. Financiado pela FAPESP (Processo n°97/4943-2)

<sup>2</sup> Centro de Genética e Reprodução Animal, Instituto de Zootecnia, Rua Heitor Penteadado, 56, Centro, Caixa postal 60, 13460-000- Nova Odessa, SP.

<sup>3</sup> Bolsista TT3 da FAPESP

<sup>4</sup> Estação Experimental de Zootecnia de Sertãozinho, Instituto de Zootecnia, Rodovia Carlos Tonnani, km 94, Caixa postal 63, 14160-000- Sertãozinho, SP.

**RESUMO:** Diferentes aberrações cromossômicas numéricas e estruturais têm sido observadas em bovinos. Muitas dessas anomalias cromossômicas estão associadas a problemas reprodutivos, entre elas quimerismo XX/XY, trissomia do X, mosaicism e translocação Robertsoniana. O presente trabalho objetivou caracterizar a incidência de alterações cromossômicas em vacas utilizadas como doadoras de embriões. Foram analisados os cariótipos de 63 vacas, sendo 51 da raça Nelore e 12 do tipo Tropical, com diferentes idades e parições, mantidas em condições uniformes de manejo. O estudo do cariótipo foi realizado pela avaliação das metáfases, obtidas após cultura dos linfócitos. De cada animal foram analisadas cerca de 25 células, tendo sido encontrado número diplóide de  $2n=60$ , em 62 animais. Uma vaca apresentou, na análise de 652 células pela coloração convencional, mosaicism 59,X0/60,XX/61,XXX na seguinte proporção: X0 (1,23%), XX (97,85%) e XXX (0,92%). Em uma segunda cultura, utilizando bandamento R, por incorporação de 5-bromodeoxiuridina (BrdU), as mesmas linhagens de células foram encontradas na proporção 1:124:1, respectivamente. O animal portador deste cariótipo apresentou ciclo estral normal, tendo iniciado por 5 vezes prenhez, produzindo 3 bezerros viáveis, 1 natimorto e na última gestação um feto mumificado de aproximadamente 6 meses. A presente informação coloca em evidência que, em bovinos, o complemento cromossômico X0/XX/XXX não ocorre exclusivamente em fêmeas estéreis.

**Termos para indexação:** Mosaicism 59,X0/60,XX/61,XXX, cariótipo, bovino, *Bos indicus*

### REPRODUCTIVE IMPLICATION OF MOSAICISM 59,X0/60,XX/61,XXX IN BOVINE

**SUMMARY:** Different numerical and structural chromosomal aberrations have been observed in cattle. Some of these chromosomal anomalies, such as XX/XY chimerism; X trisomy; mosaicism and Robertsonian translocation are associated with reproductive problems. The present study aimed to characterize the incidence of chromosomal alterations in cows used as embryo donors. Karyotypes of 63 *Bos indicus* and *Bos taurus* cows of different age and parity, maintained in uniform management conditions, were analyzed. The karyotype study was performed by means of metaphase analysis obtained after lymphocyte culture. Approximately 25 cells from each animal were analyzed and the diploid number  $2n=60$  was found in 62 animals. The karyotype analysis by conventional staining in 652 cells of the remaining animal showed the existence of 59,X0/60,XX/61,XXX mosaicism with the following percentages: X0 (1.23%), XX (97.85%) and XXX (0.92%). In a second culture using R-banding by 5-bromodeoxyuridine (BrdU), the same cell lineages were found in a 1:124:1 ratio, respectively. The animal carrying this karyotype presented a regular estrus

**cycles, having started 5 pregnancies, producing 3 viable calves, 1 still-born and, on the last pregnancy, a mummified fetus of about 6 months. The present information points out that, in the bovine, the chromosomal complement X0/XX/XXX does not occur exclusively in sterile females.**

**Index terms: 59,X0/60,XX/61,XXX mosaicism, karyotype, cattle, bovine, *Bos indicus***

## INTRODUÇÃO

Em bovinos, diferentes complementos cromossômicos anormais (61,XXX; 60,XX/60,XY; 59,X0/60,XX; 120,XXXX/60,XX; 59,X0/60,XX/61,XXX; 59,X0/60,XX/61,X0) têm sido descritos geralmente como estando associados à redução da fertilidade ou mesmo esterilidade (SWARTZ e VOGT, 1983), sendo o complemento 60,XX/60,XY de maior ocorrência, pois cerca de 90% das fêmeas nascidas de partos gemelares heterossexuais apresentam a referida anomalia (CHAPMAN et al., 1978).

A trissomia do cromossomo X em animais domésticos é relativamente rara. Nos bovinos, apesar do grande número de exemplares estudados citogeneticamente, há poucos relatos, sendo que a maioria deles relaciona essa anomalia a problemas reprodutivos (RIECK et al., 1970; NORBERG et al., 1976; BUOEN et al., 1981; LINARES et al., 1981; KING e LINARES, 1983; SWARTZ e VOGT, 1983; SYED et al., 1987; PINHEIRO et al., 1989). Com relação ao complemento mosaico 59,X0/60,XX/61,XXX, a ocorrência é ainda mais rara, encontrando apenas dois relatos em que essa anomalia cromossômica esteve associada com anestro e infertilidade (SWARTZ e VOGT, 1983 e SOLDATOVIC et al., 1993). Entretanto, trabalhos de BHATIA e SHANKER (1990) mostraram, na espécie caprina, que essa anomalia pode não estar relacionada com a função ovariana ou com a habilidade de levar a gestação a termo. Assim, estudos suplementares são necessários para caracterizar a incidência dessa anomalia, bem como, determinar sua associação a problemas reprodutivos na espécie bovina. O presente trabalho objetivou estabelecer a incidência de anomalias cromossômicas em rebanhos específicos das raças Nelore e tipo Tropical, utilizadas como doadoras de embriões, bem como, descrever a implicação dessas anomalias na fertilidade dos mesmos.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram analisados os cariótipos de 63 vacas, sendo 51 da raça Nelore e 12 do tipo Tropical, de diferentes

idades e partições, utilizadas como doadoras de embriões para estudos experimentais, no Centro de Genética e Reprodução Animal do Instituto de Zootecnia, Nova Odessa-SP.

O estudo dos cariótipos foi realizado por meio de metafases obtidas de cultura de linfócitos de sangue periférico, segundo a técnica de MOORHEAD et al. (1960), com algumas modificações. Tubos "Vacutainer" heparinizados e estéreis foram utilizados para a coleta de sangue da veia jugular após assepsia do local. Os tubos com o sangue foram centrifugados, a camada de glóbulos brancos foi retirada utilizando uma agulha (120X10) acoplada a uma seringa de 10 ml. Aproximadamente 20 gotas dessa camada foram distribuídas em frascos de cultura contendo 4 ml de meio RPMI enriquecido com 1 ml de soro fetal bovino; 0,1 ml de fitohemaglutinina e antibióticos. Dois frascos de cultura para cada animal foram incubados a 37,5°C. Após 71 horas adicionou-se 0,1ml de solução de colquicina a 0,0016% em cada frasco, permanecendo em incubação por mais uma hora. Em seguida, o material foi centrifugado (800 rpm) durante 8 minutos, sendo o sobrenadante desprezado. A hipotonização das células foi feita adicionando-se solução de cloreto de potássio (0,075 M) e incubação por mais 8 minutos. Para a fixação foi utilizado metanol: ácido acético (3:1), recém preparado. Quando o material estava convenientemente lavado foi acrescentado 0,5 ml de fixador e mantido a 4°C por duas horas, antes do preparo das lâminas. As preparações foram coradas em solução de Giemsa. Aproximadamente 25 metafases por animal foram analisadas ao microscópio óptico, com objetiva de imersão. As melhores metafases foram fotografadas e copiadas para montagem do cariótipo. Adicionalmente, utilizou-se o bandamento R (DUTRILLAUX e COUTURIER, 1981) para confirmar as anomalias encontradas na coloração convencional. A comparação entre as diferentes linhagens de células encontradas no mosaicismismo foi realizada utilizando o teste do  $\chi^2$ .

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

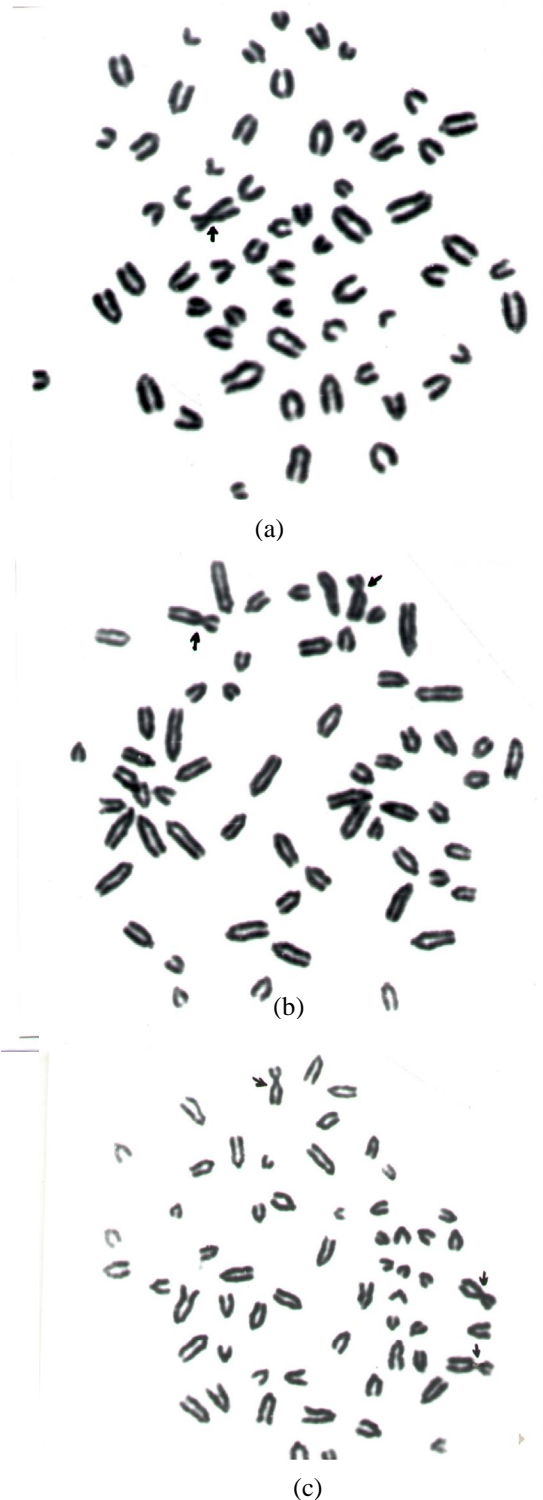
Dos 63 animais analisados citogeneticamente, pela coloração convencional, 62 apresentaram um cariótipo normal  $2n=60$ . A outra fêmea da raça Nelore apresentou

o complemento cromossômico 59,X0/60,XX/61,XXX (Figura 1). A análise de um maior número de metáfases (652), confirmou essa observação (8/638/6). Adicionalmente, esse mesmo complemento foi evidenciado utilizando bandamento R, por incorporação com BrdU (1/124/1).

As causas mais frequentes de aneuploidias estão relacionadas a erros durante a divisão celular, seja na meiose I ou meiose II da gametogênese, seja na mitose, durante o desenvolvimento embrionário (BASRUR, 1980). O erro mais provável é uma não disjunção que pode dar origem a gametas dissômicos ou nulissômicos, ou células aneuplóides com  $2n+1$  e  $2n-1$  (BASRUR, 1980). Pode também ocorrer falha durante o deslocamento de um cromossomo para o pólo, na anáfase (atraso anafásico), levando à formação de gametas nulissômicos ou células aneuplóides com  $2n-1$ .

Geralmente, a monossomia autossômica impede a viabilidade das células de mamíferos, contudo, se estiver presente nos cromossomos sexuais é possível o nascimento e o desenvolvimento de indivíduos portando a anomalia X0 ou XX/X0 (RICHARD et al., 1968). As trissomias autossômicas em animais são igualmente incompatíveis com a vida, porém, como no caso da monossomia, a trissomia de cromossomos sexuais é viável, haja vista a descrição de constituição XXX, XX/XXX, XXY, XYY em humanos (McFEELY, 1968).

A principal causa que leva ao desenvolvimento de linhagens X0 e XXX de uma única célula XX, originando o mosaïcismo X0/XX/XXX é atribuída à não disjunção mitótica do cromossomo X durante a embriogênese. A fêmea do presente estudo apresentou mosaïcismo em três linhagens de células na proporção de 1,23% (X0), 97,85% (XX), 0,92% (XXX), considerando o total de 778 células analisadas pelos métodos de cultura convencional e banda R. Semelhante mosaïcismo foi observado por SWARTZ e VOGT (1983) em duas novilhas (Simental e Hereford X Red Poll), as quais, embora apresentassem cio e tivessem sido inseminadas, permaneceram vazias após duas estações de monta e por SOLDATOVIC et al. (1993), em uma novilha da raça Red Pied, de 22 meses de idade, fenotipicamente normal, mas com histórico de anestro. Na inspeção pós morte, esse animal apresentou ovários e trompas subdesenvolvidos. Os autores sugeriram que as não disjunções mitóticas devem ter ocorrido num estágio precoce da embriogênese. Na análise da vaca do presente estudo, observou-se uma diferença significativa ( $P < 0,001$ ) entre o número de



**Figura 1. (a) Metáfase evidenciando a monossomia do cromossomo X; (b) metáfase evidenciando o complemento sexual normal e (c) metáfase evidenciando a trissomia do cromossomo X (setas)**

de células normais e anormais sugerindo que a não disjunção deve ter ocorrido durante a embriogênese tardia, como referido por BHATIA e SHANKER (1990) em uma cabra 59, X0/60, XX/61, XXX.

O complemento cromossômico X0/XX/XXX parece ter efeito variável sobre a fertilidade. Nos dois casos reportados anteriormente (SWARTZ e VOGT, 1983 e SOLDATIC et al., 1993), as novilhas eram provavelmente estéreis. A vaca do presente estudo, ciclava normalmente, tendo iniciado por 5 vezes a prenhez, produzindo 3 produtos viáveis, um natimorto, e na última gestação houve mumificação do feto, ao redor do sexto mês, detectada pelo exame de ultrasonografia, com expulsão do feto aos 10 meses de gestação. Essa observação é semelhante à relatada por BHATIA e SHANKER (1990) em uma cabra, a qual apresentou alguns problemas de reprodução, mas foi capaz de levar a termo vários nascimentos, sendo que no primeiro parto teve um natimorto e no segundo nasceram dois cabritos, um dos quais com deformações morfológicas, morrendo dias após o nascimento, e o outro, aparentemente normal, que também morreu com cerca de seis meses de idade.

### CONCLUSÕES

A incidência de anomalias cromossômicas nas raças Nelore e Tropical é relativamente baixa (< 2%).

A ocorrência do complemento cromossômico X0/XX/XXX em bovinos, não é exclusiva de fêmeas estéreis.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BASRUR, P. K. *Laboratory Manual for Genetics* Vet Med. Canada University of Guelph, Canada, 1980. 207 p.
- BHATIA, S. SHANKER, V. A case report on X0/XX/XXX mixoploidy . goat. Vet. Rec., London, 126: 312-313, 1990.
- BUOEN, L.C., SEGUIN, B. E., WEBER, A. F. et al. X-trisomy karyotype and associated infertility in a holstein-heifer. J. Am. Vet. Med. Assoc., Chicago, v.179,n.8, p. 808-811, 1981.
- CHAPMAN, H. N., BRUERE, A. N., JAINE, P.M. XY n.  
(c)
- DUTRILLAUX, B., COUTURIER, J. La pratique de l'analyse chromosomique. Paris: Masson, 1981. 86 p.
- KING, W. A., LINARES, T. A cytogenetic study of repeat-breeder heifers and their embryos. Can. Vet. J. Ottawa, v. 24, 112-115, 1983.
- LINARES, T., KING, W. A., GUSTAVSSON, I. et al. Trisomy X in Swedish Red and White breed heifers. Proceedings of the American Society of Animal Production, 37., 1981. (Abstracts ).p.162.
- Mc FEELY, R.A. Chromosomes and Infertility. J Am. Vet.Med.Assoc., Chicago, v.153,n.12, 1968.
- MOORHEAD, P. S., NOWELL, P. C., MELLMAN, W. J. et al. Chromosome preparations of leukocytes cultured from human peripheral blood. Exp. Cell Res., New York, v.20 .p.613-616, 1960.
- NORBERG, H. S., REFSDAL, A. O., GARM, O. N. et al. A case report on X-trisomy in cattle. Hereditas, Lund, v.82 p. 69-72, 1976.
- PINHEIRO, L. E. L.; BASRUR, P. K.; ALMEIDA Jr., I. L. Frequência de anomalias cromossômicas em fêmeas bovinas de diferentes raças com distúrbios de fertilidade. R. bras. Reprod. anim., Bel Horizonte, v.13, n.4,p. 221-228, 1989.
- RIECK, G. W., HOHN, H., HERZOG, A. X-trisomie beim Rind mit Anzeichen familiärer disposition für meisesforungen. Cytogenetics, Switzerland, v. 9, p. 401-409, 1970.
- SWARTZ, H.A., VOGT, D. W. Chromosome abnormalities as a cause of 4 reproductive inefficiency in heifers. J. Hered., Washington, v.74, p.320-321, 1983.
- SOLDATOVIC, B., VUCINIC, M., STANIMIROVIC, Z. et al. A mosaicism with karyotype designation of 59,X0/60,XX/61,XXX in Red Pied heifer. Acta. Vet., Beograd (parte III), v. 43, n.5-6, p. 335-340, 1993.
- SYED, M., NES, N., RONNINGEN, K. J. Anim. Breed. Genet., Hamburg, v.104,p. 113, 1987.