

## **Estudo citogenético em equinos para detecção de portadores de monossomia do cromossomo X**

*(Cytogenetic study in equines for detection of X monosomy)*

P.M. Tsuribe<sup>1</sup>, W. Jorge<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Aluna do Curso de Pós-Graduação em Genética -  
Instituto de Biociências - UNESP - Campus de Botucatu  
18618-000 - Botucatu, SP

<sup>2</sup>Depto. de Biologia Geral - ICB/UFMG

### **RESUMO**

O estudo citogenético de 22 éguas com problemas de fertilidade mostrou quatro delas com mosaicismos cromossômicos 63,X/64,XX. O cromossomo X, como esperado, apresentou marcação específica da banca C com uma faixa heterocromática intersticial no braço longo, além da banda pericentromérica usual. Observou-se uma grande variação nos sinais clínicos nas éguas com mosaicismos, o que poderia ser decorrente do tipo de zigoto original ou da época em que o mosaicismos se estabeleceu.

**Palavras-Chave:** Monossomia, infertilidade, mosaicismos, equinos

### **ABSTRACT**

A cytogenetic study of 22 mares with fertility has showed that four of them had 63,X/64,XX mosaicism. The X-chromosome has presented the expected interstitial heterochromatic C - banding located in the long arm, besides of the usual centromeric band. The great variation of clinic signs observed in mares with mosaicism, could be due to the type of zygote or the time the mosaicism occurred.

**Key words:** Monosomy, infertility, mosaicism, equines

## INTRODUÇÃO

Em equinos, foi observado que a esterelidade e/ou anomalias do sistema reprodutivo, podem ser causadas pelas aberrações dos cromossomos sexuais, principalmente por perda ou por não-disjunção do cromossomo X ou Y, a nível pré- ou pós-zigótico, resultando em animais do sexo feminino com monossomia pura do X (X0) ou mosaicismos X0/XX.

Tem sido demonstrado que éguas portadoras do mosaicismos apresentam grande similaridade nas características reprodutivas quando comparadas com animais X0. Em geral, os animais apresentam ovários muito reduzidos, ausência de folículo, útero reduzido, cérvix flácido e ciclo estral ausente ou irregular. Segundo Chandley et al. (1975) os animais mosaicos poderiam ter apenas a fertilidade reduzida, dependendo das proporções relativas das linhagens XX ou X0, particularmente nas gônadas.

Como regra, a análise do cariótipo é realizada através de cultura de linfócitos de sangue periférico, ficando os demais tecidos indeterminados. A identificação cariotípica de outros tecidos é tarefa complicada nos animais de grande porte, embora seja de grande importância, uma vez que as proporções de células normais e aneuploides em um determinado tecido podem não ser as mesmas nos demais.

O presente trabalho teve como objetivo analisar a estrutura cromossômica de 22 animais com diferentes problemas de fertilidade, a fim de verificar a existência de aneuploidias do cromossomo X.

## MATERIAL E MÉTODO

Foram analisadas, citogeneticamente, 22 éguas com problemas reprodutivos de várias raças, determinando-se o número, a forma e o bandamento dos cromossomos. Foram utilizadas as técnicas de bandamento C (Summer, 1972) e G (Sanchez et al., 1973) para evidenciar os cromossomos sexuais, a posição centrométrica e o pareamento dos homólogos (Fig. 1 e 2). As metáfases foram obtidas a partir de cultivo de linfócitos de sangue periférico proposto pela *Segunda Conferência Internacional para padronização de Animais. Cariótipo dos Animais Domésticos* (Di Berardino et al., 1990).

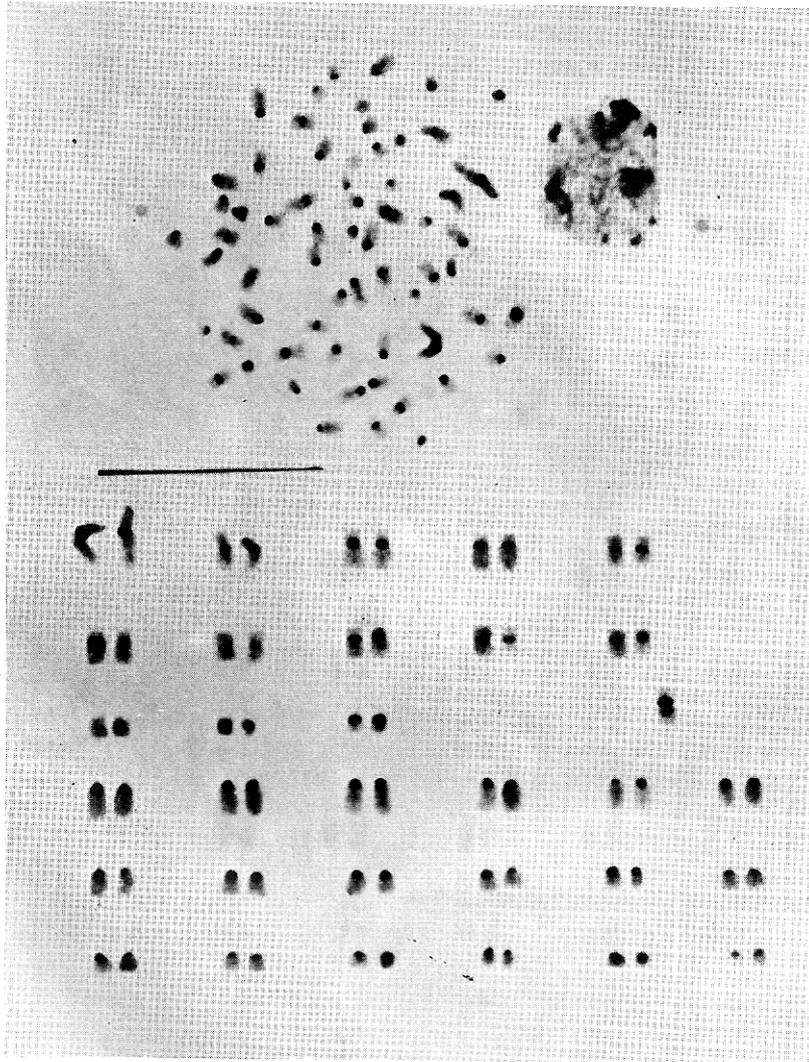


Figura 1 Fotografia de uma metáfase e o cariótipo de uma linhagem X0, utilizando a técnica de bandamento centromérico (bandas C). Observar o cromossomo X assinalado na metáfase e no cariótipo, portador de banda intersticial no braço longo, além do bandamento centromérico usual (banda C)

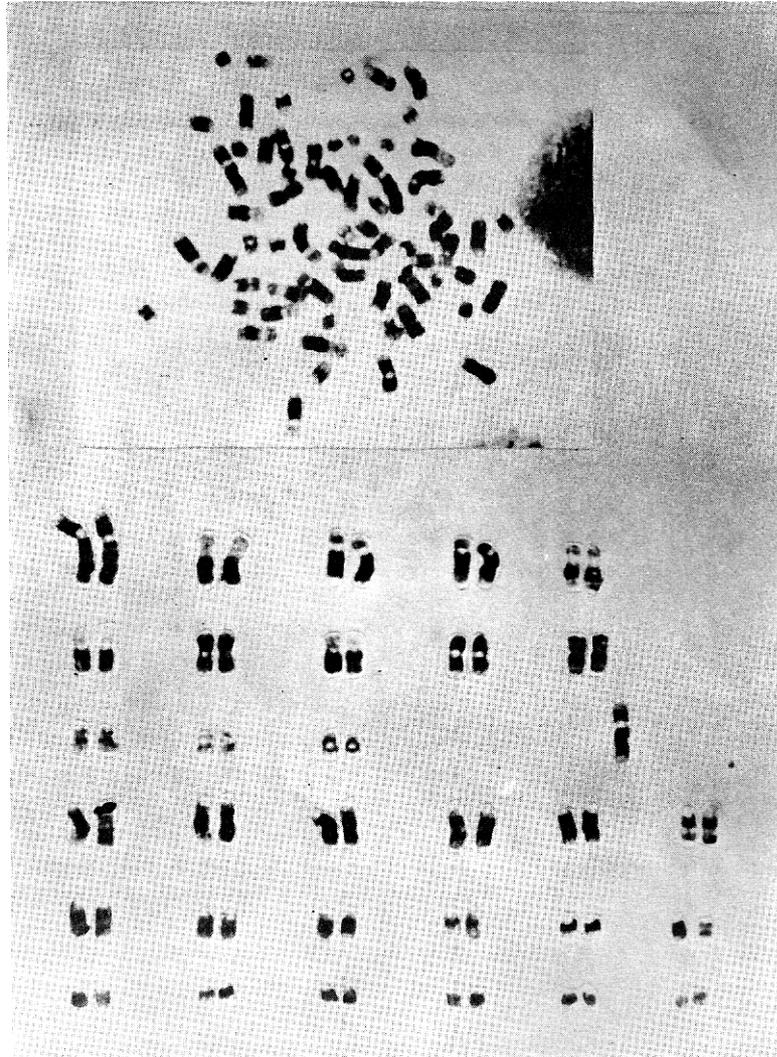


Figura 2 Fotografia de uma metáfase e cariótipo de uma linhagem X0, utilizando bandamento G. Observar o bandamento G do cromossomo X, que o distingue dos demais cromossomos (assinalado na metáfase e no cariótipo)

Os animais eram provenientes do Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Campus de Botucatu (SP), para onde foram encaminhadas por problemas de baixa fertilidade e onde receberam assistência médica.

Para cada animal, foram analisadas 50 metáfases pela técnica de coloração convencional. Com isso, segundo Beiguelman (1982), há 99,48% de probabilidade de se encontrar a primeira metáfase monossômica, caso o animal apresente pelo menos 10% da linhagem aneuplóide. Tais probabilidades são calculadas a partir da fórmula  $(p+q)^n$  onde  $p$  é a probabilidade de encontrar células anômalas e  $n$  é o número de células examinadas. No caso de animais com linhagem 63,X, pelo menos 20 metáfases com bandamento C ou G eram analisadas, para confirmar o diagnóstico.

No resultado final, só eram considerados animais X0 ou mosaico X0/XX, se fosse comprovado através de bandamento C ou G que o cromossomo deletado era o X.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tab. 1 mostra a análise cromossômica de 22 animais. Destes, quatro (18,2%) eram portadores de mosaicismo 63,X / 64,XX. Julgamos que esta frequência, poderá ser maior se ocorrer uma seleção rigorosa dos animais com características típicas de monossomia X, tais como: ovários e útero pequenos, cérvix flácido ausência de ciclo estral e folículos não palpáveis. Para explicar o mosaicismo dos quatro animais, algumas hipóteses são formuladas: no caso da égua 1, com 90% de células 63,X e sinais clínicos de animais X0, inclusive baixa estatura, julga-se que tenha se originado de um embrião 63,X, com posterior aparecimento de células normais por não-disjunção pós-zigótica. Todavia, não se exclui a possibilidade de ter se originado de um zigoto XY ou XX, com perda de cromossomos nas primeiras fases do desenvolvimento.

A égua 2 (78,4% de células 64,XX) e a égua 3 (77,7% de células 64,XX), e com quadro clínico similar ao da égua 1, provavelmente originaram-se de um embrião 63,X, com posterior não disjunção e seleção celular, favorecendo as células normais, apresentando apenas ovários pequenos. A hipótese é de que tenha se originado de um embrião 64,XX, com posterior aparecimento de células monossômicas.

Tabela 1 Análise cromossômica de éguas com diferentes problemas de fertilidade

Animal n°	Raça	Idade (anos)	Histórico/Aparelho genital	n° de cromossomos/ metáfases analisadas		Cariótipo
01	Quarto de milha	3	ciclo estral normal; pequenos sem folículo, útero pequeno, aplasia do corno uterino, baixa estatura	43	4	63,X/64,XX
02	Quarto de milha	6	ciclo estral irregular, útero pequeno, resquício de cérvix, vagina curta, ovários normais à palpação	16	58	63,X/64,XX
03	sem raça definida	ND	ausência de ciclo estral, cérvix, útero e ovários pequenos	21	42	63,X/64,XX
04	Puro sangue inglês	ND	ciclo estral normal, ovários pequenos	16	34	63,X/64,XX
05	Appaloosa	12	nunca pariu; ciclo estral normal, ovários normais com folículos	2	68	64,XX
06	Crioulo	6	pariu apenas 2 vezes; aparelho genital normal	-	50	64,XX
07	Manga-larga	6	nunca pariu, ciclo estral normal, aparelho genital normal	-	50	64,XX
08	Andaluz	ND	ovários pequenos	-	100	64,XX
09	Anglo-argentino	ND	abortos frequentes	-	90	64,XX
10	Brasileiro de hipismo	6	mortalidade embrionária em 1992, útero flácido	-	50	64,XX
11	Appaloosa	14	ciclo estral irregular, ovários normais, aplasia do corno uterino esquerdo sem folículo	-	50	64,XX
12	Puro sangue inglês	3,5	ovários pequenos sem folículo	-	48	64,XX
13	Árabe	ND	problemas de coordenação motora desde o nascimento, atraso na 1ª gestação	-	50	64,XX
14	Puro sangue inglês	9	nunca pariu, ciclo estral normal	-	60	64,XX
15	Puro sangue inglês	6	nunca pariu, ciclo estral normal	-	50	64,XX
16	Puro sangue inglês	ND	já pariu, mas está vazia há 2 anos, ciclo estral irregular	-	50	64,XX
17	Campolina	8	apenas 3 crias, distúrbio do comportamento	-	50	64,XX
18	Puro sangue inglês	7	nunca pariu, assimetria entre os cornos uterinos, ovários normais	-	50	64,XX
19	Manga-larga	9	ciclo estral e ovários normais, útero pequeno	-	50	64,XX
20	Árabe	6	cio ausente, útero e ovários pequenos	-	50	64,XX
21	Manga-larga paulista	11	nunca pariu, ciclo estral irregular, aparelho genital normal	-	61	64,XX
22	Pônei	5	cios longos anovulatórios, ovários pequenos sem folículos	-	50	64,XX

ND - não determinada.

A constatação “in vitro” da existência de uma ou várias linhagens celulares com aberrações cromossômicas, ao lado de cariótipo normal, parece garantir que o indivíduo, manifesta ou manifestará os sinais clínicos já referidos, comumente associados às células anômalas. Dependendo das proporções de células normais e aneuplóides, podem ser encontrados animais mosaicos com sinais clínicos menos acentuados, com fertilidade normal ou reduzida. De acordo com Carlin et al., 1978, em consequência da intensa seleção celular que pode ocorrer entre os linfócitos até os dois ou três primeiros anos de vida, tal correlação só poderia ser realizada em cultura de fibroblastos ou tecido ovariano, onde a seleção celular “in vivo” parece ser inexistente ou pouco acentuada. Excluindo-se a possibilidade da ocorrência de seleção celular, admite-se que os animais mosaicos que apresentam maior número de células XX em relação a X0, são oriundos de um embrião normal com posterior aparecimento de células monossômicas. A porcentagem de células monossômicas será tanto menor quanto mais tarde ocorrer o erro mitótico e maior a chance do animal ser normal.

É na fase inicial do desenvolvimento embrionário que a aberração cromossômica pode trazer maiores consequências nos processos de diferenciação por insuficiência genômica, pois é nesta fase que os dois cromossomos X estão ativos. De acordo com Therman & Susman (1990), há regiões do cromossomo X “inativado” que permanecem ativas. Acredita-se que existam determinados genes que devem permanecer ativos em dose dupla, não só na fase em que os dois X estão ativos mas, durante todo o desenvolvimento embrionário e funcional do sistema reprodutivo. Dessa forma, o que deve ser considerado é o tipo de zigoto e a época em que o mosaicismo se estabeleceu como também a proporção das duas linhagens celulares presentes no animal adulto, principalmente no tecido ovariano.

A constatação de mosaicismo cromossômico na cultura de linfócitos de recém-nascidos ou de potras com um ou dois meses de idade, muito embora não permita um prognóstico seguro, indica um quadro mais favorável do que o estabelecimento para os casos com a mesma alteração cromossômica sem mosaicismo. Assim, em relação a monossomia do X, poder-se-ia depositar maior esperança no desenvolvimento reprodutivo menos afetado quando o animal recém-nascido é um mosaico, do que quando não o é. Nesse caso seria importante acompanhar, desde o nascimento, o seu desenvolvimento e sua evolução. Muitas são as dificuldades em correlacionar as características reprodutivas com a frequência de células monossômicas. Uma delas está em estabelecer a linhagem predominante no animal com mosaicismo, já que pode haver variação na frequência das linhagens linfocitárias durante a vida do animal e, em menor escala, durante a cultura.

As técnicas de bandamento empregadas, principalmente a C, foram úteis no reconhecimento dos cromossomos de eqüinos (Fig. 1). Assim, poderiam ser identificados o cromossomo número 11, com ausência de marcação centromérica e o 7 com marcação leve, bem como o X, através da banda intersticial do braço longo.

A relação da monossomia do X com o desenvolvimento e mortalidade pré-natal na égua é ainda desconhecida. Nos camundongos, todos os embriões XO são viáveis e nos humanos há uma grande mortalidade dos mesmos. É possível que em eqüinos e nos camundongos os genes responsáveis pela variabilidade não estejam presentes nos cromossomos sexuais, mas somente os relacionados ao sistema reprodutivo. Dessa forma, a perda de um X resultaria apenas em esterilidade. Na espécie humana, onde apenas 1% dos fetos XO sobrevivem, os genes responsáveis pela viabilidade, devem estar presentes nos cromossomos X. Estes genes necessitam estar em dose dupla na fase em que os dois X estão ativos, para garantir a sobrevivência intra-uterina.

#### REFEÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BEIGUELMAN, B. *Citogenética humana*. 2ª edição. São Paulo: Guanabara Koogan, 1982. p.178-218: As cromossomopatias autossômicas.
- CARLIN, M.E., LEON, S., GILBERTO, J.P. A comparison between a trisomy 21 child (probably mosaic) with normal intelligence and a mosaic Down syndrome population *Birth Defects: Original Article Series*, v.24, p.327-341, 1978.
- CHANDLEY, A.C., FLETCHER, J., ROSSDALE, P.D. et al. Chromosome abnormalities as a cause of infertility in mares. *J. Reprod. Fertil.*, v.23, p.377-383, 1975.
- DI BERARDINO, D. et al. International System for Cytogenetic Nomenclature of Domestic Animals. *Cytogen Cell Gen.*, v.53, p.65-79, 1990.
- MOORHEAD, P.S., NOWEL, P.C., MELLMAN, W.J. et al. Chromosome preparations of leucocytes cultured in from human peripheral blood. *Exp. Cell. Res.*, v.20, p.613-616, 1960.
- SANCHEZ, O., ESCOBAR, J.J., YUNIS, J.J. A simple G-banding technique. *Lancet*, v.2, p.269, 1973.
- SUMNER, A.T. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Exp. Cell. Res.*, v.75, p.304-306, 1972.
- THERMAN, E., SUSMAN, B. The similarity of phenotypic effects caused by Xq deletions in the human female: a hypothesis. *Hum. Genet.*, v.85, p.175-183, 1990.