



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E BIODIVERSIDADE
DOUTORADO EM BIOTECNOLOGIA E BIODIVERSIDADE

CARACTERIZAÇÃO CITOGENÉTICA DE BOVINOS DA RAÇA NELORE
(Bos taurus indicus Linnaeus, 1758)

ANDRÉIA PIRES AMANCIO

Goiânia
Goiás - Brasil
©2019

**TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR
VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES E DISSERTAÇÕES
NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG**

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: Dissertação Tese

2. Identificação da Tese ou Dissertação:

Nome completo do autor: Andréia Pires Amancio

Título do trabalho: Caracterização citogenética de bovinos da raça Nelore (*Bos taurus indicus*, Linnaeus 1758).

3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento SIM NÃO¹

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.

Andréia Pires Amancio
Assinatura do(a) autor(a)²

Ciente e de acordo:

Assinatura do(a) orientador(a)²
Prof. Aparecido D. da Cruz, PhD
Coordenador - RE 3989
Núcleo de Pesquisas Replicon
UFMG - Goiás

Data: 08 / 10 / 19

¹ Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

² A assinatura deve ser escaneada.

ANDRÉIA PIRES AMANCIO

CARACTERIZAÇÃO CITOGENÉTICA DE BOVINOS DA RAÇA NELORE
(Bos taurus indicus Linnaeus, 1758)

Orientador: Prof. Dr. Aparecido Divino da Cruz, *PhD*

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Biotecnologia e Biodiversidade da Rede Pró-
Centro-Oeste como requisito para obtenção do
título de *Doctor Scientiae*.

Goiânia
Goiás – Brasil
©2019

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Pires Amancio, Andréia

Caracterização citogenética de bovinos da raça Nelore (*Bos taurus indicus*, Linnaeus 1758) [manuscrito] / Andréia Pires Amancio. - 2019. 63 f.

Orientador: Prof. Dr. Aparecido Divino da Cruz.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Goiás, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP), Programa de Pós graduação em Biotecnologia e Biodiversidade, Goiânia, 2019.

Inclui lista de figuras.

1. Cariótipo. 2. Citogenética Molecular. 3. Alterações cromossômicas estruturais. 4. *Bos taurus indicus*. I. Divino da Cruz, Aparecido, orient. II. Título.

CDU 60



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E
BIODIVERSIDADE
Rua 235, S/N - Setor Universitário - Goiânia/GO CEP 74605-050
Fone (62) 3209.6362
email: pgbb.goias@gmail.com

ATA DA REUNIÃO DA BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE TESE DE ANDRÉIA PIRES AMANCIO - Aos treze dias do mês de setembro do ano de 2019 (13/09/2019), às 09:00 horas, reuniram-se os componentes da Banca Examinadora: Profs. Drs. APARECIDO DIVINO DA CRUZ, CLÁUDIO CARLOS DA SILVA, ALEX SILVA DA CRUZ, CINTIA PELEGRINETI TARGUETA DE AZEVEDO BRITO e ALLINY DAS GRAÇAS AMARAL, para, sob a presidência do primeiro, e em sessão pública realizada na ÁREA IV DA PUC-GOÍÁS SALA DO MESTRADO DE GENÉTICA, procederem à avaliação da defesa de tese intitulada: "CARACTERIZAÇÃO CITOGENÉTICA DE BOVINOS DA RAÇA NELORE (BOS TAURUS INDICUS, LINNAEUS, 1758)", em nível de DOUTORADO, área de concentração em BIOTECNOLOGIA, de autoria de ANDRÉIA PIRES AMANCIO, discente do PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E BIODIVERSIDADE, da Universidade Federal de Goiás. A sessão foi aberta pelo orientador da discente, Prof. Dr. APARECIDO DIVINO DA CRUZ, que fez a apresentação formal dos membros da Banca e orientou a Candidata sobre como utilizar o tempo durante a apresentação de seu trabalho. A palavra a seguir, foi concedida a autora da tese que, em 30 minutos procedeu à apresentação de seu trabalho. Terminada a apresentação, cada membro da Banca arguiu a Candidata, tendo-se adotado o sistema de diálogo sequencial. Terminada a fase de arguição, procedeu-se à avaliação da defesa. Tendo-se em vista o que consta na Resolução nº. 1181/2013 do Conselho de Ensino, Pesquisa, Extensão e Cultura (CEPEC), que regulamenta o Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biodiversidade a Banca, em sessão secreta, expressou seu julgamento, considerando a candidata **Aprovada ou Reprovada:**

Banca Examinadora	Aprovada / Reprovada
Prof. Dr. Aparecido Divino da Cruz	<u>Aprovado</u>
Prof. Dr. Cláudio Carlos da Silva	<u>Aprovado</u>
Prof. Dr. Alex Silva da Cruz	<u>Aprovado</u>
Profa. Dra. Cintia Pelegrineti Targueta de Azevedo Brito	<u>Aprovado</u>
Profa. Dra. Alliny das Graças Amaral	<u>Aprovado</u>

Em face do resultado obtido, a Banca Examinadora considerou a candidata HABILITADA (Habilitada ou não Habilitada), cumprindo todos os requisitos para fins de obtenção do título de DOUTORA EM BIOTECNOLOGIA E BIODIVERSIDADE, na área de concentração em BIOTECNOLOGIA, pela Universidade Federal de Goiás. Cumpridas as formalidades de pauta, às 12h 15 min, a presidência da mesa encerrou esta sessão de defesa de tese e para constar eu, HELOÍSA DE SOUSA VIEIRA, secretária do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biodiversidade lavrei a presente Ata que depois de lida e aprovada, será assinada pelos membros da Banca Examinadora e por mim em duas vias de igual teor.

A Banca Examinadora aprovou a seguinte alteração no título da Tese:

Prof. Dr. Aparecido Divino da Cruz (PUC/GO) [assinatura]

Prof. Dr. Cláudio Carlos da Silva (PUC/GO) [assinatura]

Prof. Dr. Alex Silva da Cruz (PUC/GO) [assinatura]

Profa. Dra. Cintia Pelegrineti Targueta de Azevedo Brito (UFGO) [assinatura]

Profa. Dra. Alliny das Graças Amaral (UEG) [assinatura]

Secretária da Pós-Graduação [assinatura]

Com todo carinho, à minha avó Ilma Barbosa Pires (*in memoriam*), dedico.

AGRADECIMENTOS

Depois de anos de lutas, alegrias e conquistas, chegou o momento de agradecer.

Primeiramente a Deus, pela minha família, oportunidades e amigos.

Agradeço às pessoas especiais da minha vida: à Minha mãe Madalena Amancio, meu porto seguro e razão da minha vida, ao meu irmão Eduardo Amancio, pelo seu amor incondicional e ao meu Papi Clorivan Barbosa, pelos exemplos de força e união. Amo muito vocês!

Um agradecimento profundo e sincero a uma pessoa muito amada, a minha avó materna Ilma Barbosa (*in memorian*), quanta saudade eu sinto, avó cuidadosa, religiosa, com seu amor me ensinou tanto sobre a vida, tanto rezou e esperou para me ver doutora, que hoje espero tê-la deixado orgulhosa, ‘eu te amo, vó!’.

Ao meu eterno namorado Carlos Campos, verdadeiro significado de companheirismo e alegria, não encontro palavras para agradecer sua importância nessa jornada, tanto tempo juntos, com o dom de me escutar e me acalmar com um simples olhar, já não me vejo sem você e não recordo de um passado em que você não esteja presente. Como sou grata por esse amor!

Aos meus tios e tias, primos e primas, por todo apoio, parceria, incentivo e alegria compartilhados nos momentos difíceis. Foram tantas colaborações que no fundo, somos todos um pouco doutores.

De modo muito especial gostaria de agradecer a um dos melhores professores que já conheci durante meus anos de estudo, Professor Dr. Aparecido Divino da Cruz (Peixoto). Desde a graduação, seus ensinamentos, sua confiança e seu olhar cuidadoso foram muito importantes para meu crescimento profissional e pessoal. Tenho profunda admiração por esse pesquisador e humano incrível que você é. Espero que possamos continuar dividindo esses momentos de conhecimento e amizade.

Agradeço aos professores da Escola de Ciência Agrárias e Ambientais da Pontifícia Universidade Católica de Goiás, Professor. Dr. Cláudio Carlos da Silva e Professor Dr. Alex S. da Cruz, pelos ensinamentos compartilhados; aos técnicos do Núcleo de Pesquisas Replicon: Cristiano Ribeiro, Damiana da Cunha e Eduardo Pedrosa, pelo trabalho em conjunto.

Em especial, gostaria de agradecer aos amigos: à Professora Caroline Melo (Carol), pelos momentos de descontração, conselhos e verdadeira amizade durante todos esses anos; à Professora Thais Cidália, pela sabedoria e companheirismo; à Irene Plaza Pinto, pelos ensinamentos e paciência durante essa jornada; à Cintia Faria, pessoa maravilhosa que passou por todas as aflições e inseguranças junto comigo, amiga que o doutorado me deu de presente; e à Professora Fabiana Gonçalves pela amizade e torcida tão necessária nessa reta final.

Às amigas Andréia Marcelino e a Andreyra Costa, meu muito obrigada por sempre proporcionarem bons momentos de risadas, distração e leveza entre um experimento e outro.

Agradeço aos colegas de laboratório pelos momentos de estudo e trabalho: Jaqueline Forte, Larissa Carvalho, Lorrynne Guimarães, Raissa Fidélcio, Sabrina Duarte e Samara Pereira; em especial ao estudante de iniciação científica Rafael Carneiro pelo auxílio e dedicação durante todos os experimentos e a todos aqueles que passaram pelo Núcleo de Pesquisas Replicon durante os 11 anos que estive presente e que de alguma forma contribuíram com a conclusão dessa tese e com a minha formação.

Obrigada também ao Prof. Dr. Rajib Deb do *Indian Council of Agricultural Research*, pela experiência compartilhada durante o tempo de seu estágio post-doutoral desenvolvido junto ao Núcleo de Pesquisas Replicon sob a orientação do Professor Dr. Aparecido Divino da Cruz. E ao Médico veterinário Marco Aurélio por ter cedido as amostras biológicas de alguns dos seus animais para eventuais análises.

Agradeço a colaboração direta das instituições Pontifícia Universidade Católica de Goiás (PUC-Goiás) e ao Núcleo de Pesquisas Replicon da Escola de Ciências Agrárias e Biológicas da PUC-Goiás, durante as atividades experimentais do presente estudo.

Agradeço a Rede Pró-Centro-Oeste e ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia e Biodiversidade pela oportunidade de realizar o doutorado.

Agradeço também às agências de fomento à pesquisa pelo apoio financeiro: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Goiás (FAPEG).

Obrigada por tudo!

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	vii
RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	ix
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1 Formação das raças locais brasileiras.....	4
2.2 Citogenética bovina por Bandejamento.....	6
2.2.1 Bandejamento C.....	9
2.2.2 Bandejamento GTG.....	10
2.2.3 Bandejamento Ag-NOR.....	11
2.3 Hibridização fluorescente <i>in situ</i> (FISH).....	11
3. JUSTIFICATIVA.....	14
4. OBEJTIVOS.....	17
4.1 Objetivo Geral.....	17
4.2 Objetivos Específicos.....	17
5. MATERIAL E MÉTODOS.....	18
5.1 Delineamento do estudo.....	18
5.2 Caracterização das amostras.....	18
5.3 Cultura de células.....	18
5.4 Bandejamento C.....	19
5.5 Bandejamento GTG.....	19
5.6 Bandejamento NOR.....	20
5.7 Amplificação e marcação das regiões para obtenção das sondas.....	20
5.8 Hibridização Fluorescente <i>in Situ</i> (FISH).....	21
5.9 Análise e captura das metáfases.....	21
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	22
6.1 CAPÍTULO I – ARTIGO PUBLICADO.....	23
6.2 CAPÍTULO II – ARTIGO A SER SUBMETIDO.....	35
7. CONCLUSÃO.....	45
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	47

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação esquemática de uma translocação Robertsoniana entre os cromossomos autossômicos dos bovinos. A e B ilustram cromossomos acrocêntricos não homólogos 1 e 29 respectivamente. C indica a fusão dos braços longos e a perda de ambos os braços curtos dos respectivos cromossomos. D mostra o produto final da translocação um cromossomo submetacêntrico.....	8
Figura 2 - Metáfase Bovina por Bandeamento C. Metáfase bovina de uma fêmea (XX), após a técnica de bandeamento C (Laboratório Núcleo de Pesquisas Replicon – PUC-Goiás).....	9
Figura 3 - Metáfase Bovina por Bandeamento GTG. Metáfase bovina de uma fêmea (XX), após a técnica de bandeamento GTG (Laboratório Núcleo de Pesquisas Replicon – PUC- Goiás).....	10
Figura 4 - Metáfase Bovina por Bandeamento NOR. Metáfase bovina de uma fêmea (XX), após a técnica de bandeamento NOR (Laboratório Núcleo de Pesquisas Replicon – PUC- Goiás).....	11

RESUMO

AMANCIO, Andréia Pires, A.P., Universidade Federal de Goiás, setembro de 2019.
Caracterização citogenética de bovinos da raça Nelore (*Bos taurus indicus* Linnaeus, 1758). Orientador: Aparecido Divino da Cruz.

O setor agropecuário vem se destacando na economia brasileira nas últimas décadas por seu contínuo aumento em produtividade e sua importância para a manutenção do equilíbrio da balança comercial do país. Após a introdução dos bovinos no Brasil e posterior dispersão destes pelo território nacional, houve um intenso processo de adaptação de certos grupos às condições ambientais específicas de cada local ou região, sendo este processo responsável pela fundação de raças locais bovinas brasileiras. Estes animais podem apresentar alterações cromossômicas numéricas e/ou estruturais, podendo resultar em um grupo de características indesejadas ao produtor que pretende expandir seu rebanho ou até mesmo para a preservação de características de uma espécie. O objetivo do presente estudo foi padronizar os bandeamentos C, GTG e NOR para a subespécie bovina (*Bos taurus indicus* Linnaeus, 1758) e posteriormente produzir uma sonda pancentromérica, a partir da amplificação e marcação de *primers* específicos para região centromérica nos cromossomos autossômicos dos bovinos. Foram coletadas amostras de sangue de bovinos, para obtenção dos cromossomos metafásicos através do método de cultura celular. Posteriormente foram realizados os bandeamentos citogenéticos, a amplificação, a marcação da sonda cromossômica e para validação dessa sonda a técnica de FISH. Através dos bandeamentos foi possível o pareamento cromossômico correto desses animais e com a utilização da sonda pancentromérica, a marcação das regiões de centrômero de todos os cromossomos autossômicos. Esses resultados oferecem uma nova ferramenta que atenda às necessidades do melhoramento genético dos bovinos que podem apresentar alguma alteração cromossômica.

Palavras-chaves: Cariótipo, Citogenética Molecular, Alterações cromossômicas estruturais; *Bos taurus indicus*.

ABSTRACT

AMANCIO, Andréia Pires, A.P., Universidade Federal de Goiás, setembro de 2019.
Cytogenetic characterization of Nelore cattle (*Bos taurus indicus* Linnaeus, 1758). Orientador: Aparecido Divino da Cruz.

The agricultural sector has been standing out in the Brazilian economy in recent decades for significant increase in productivity and its growing importance for maintaining the country's balance of trade. After the introduction of cattle in Brazil and their subsequent dispersal throughout the national territory, there was an intense process of adaptation of certain groups to specific environmental conditions of each place or region, which is responsible for the formation of several local Brazilian cattle breeds. These animals may present numerical and/or structural chromosomal alterations, which may result in a group of undesired characteristics to the producer that intends to expand his herd or even for the preservation of characteristics of a species. The aim of this study was to standardize the C, GTG and NOR banding for the bovine subspecies (*Bos taurus indicus*, Linnaeus 1758) and subsequently produce a pancentromeric probe by amplification and labeling the centromeric regions of autosomal chromosomes of cattle. Bovine blood samples were collected to detect metaphasic chromosomes using the cell culture method. Subsequently, cytogenetic banding, amplification, chromosomal probe labeling and FISH technique were performed. Through the banding it was possible the correct chromosomal pairing of these animals and with the use of the pancentromeric probe, the marking of the centromere regions of all autosomal chromosomes. These results may offer a new tool that meets the needs of genetic improvement of these animals.

Key-words: Karyotype, Molecular Cytogenetics, Structural Chromosomal Alterations, *Bos taurus indicus*.

1. INTRODUÇÃO

A pecuária nacional depende, em grande parte, do potencial de produção dos rebanhos, sendo a bovinocultura de corte um dos maiores contribuintes para o agronegócio nacional. Merecendo destaques, a importância nutricional, econômica, social e cultural do gado de corte no cenário brasileiro (GOMES *et al.*, 2017).

Outro ponto da pecuária de corte nacional está relacionado à prática de seleção genética dos animais usados e do melhoramento genético dos rebanhos brasileiros, com predomínio do uso de animais zebuínos da raça Nelore nas regiões Centro-Oeste, Norte, Nordeste e Sudeste (LAUREANO *et al.*, 2011). A Associação Brasileira de Criadores de Zebu – ABCZ, juntamente com outros programas de melhoramento genético, vem proporcionando melhor qualidade genética dos animais devido à aplicação de tecnologias no manejo dos pastos, da nutrição, reprodução, sanidade e consequentemente redução da idade ao abate e aumento da produtividade e qualidade de carcaças comercializadas (LEMOS, 2013).

Em geral, as raças bovinas locais brasileiras, apresentam características fenotípicas importantes, moldadas pelo ambiente e seleção, destacando: eficiência em se adaptar a regiões de clima tropical, resistência a parasitas e às doenças infecciosas e não menos importante, a sua capacidade de sucesso reprodutivo quando submetidas a cenários de baixa quantidade e qualidade de forragem (MENEZES *et al.*, 2015).

Várias espécies de animais domésticos consideradas atualmente como raças locais brasileiras têm em comum sua origem nos primeiros animais trazidos para o país, no período em que foi colônia do Reino de Portugal. As raças bovinas, Pantaneiro e o Curraleiro Pé-Duro são exemplos desses grupos raciais que se desenvolveram e se mantem no território brasileiro (EGITO *et al.*, 2011).

A diversidade genética e fisiológica dentro das espécies domesticadas é refletida pela variedade de raças e tipos de animais ancestrais existentes. Neste contexto, a extinção de um único potencial recurso genético dos animais que constituem um rebanho impede o acesso à informação genética, que são úteis para o planejamento da pecuária no futuro (ISSA *et al.*, 2009). Por esta razão, é necessário manter o controle citogenético dos animais reprodutores, pois as alterações de ordem cromossômicas podem ser herdadas e transmitidas aos descendentes em intervalos curtos de gerações (TABERLET *et al.*, 2011).

Neste contexto, a citogenética corresponde a uma das áreas da genética que permite avaliar os cromossomos, possibilitando a identificação de alterações numéricas e/ou estruturais dos cromossomos (MERGENER *et al.*, 2011). As informações cariotípicas de um rebanho permitem ao pecuarista a oportunidade de detectar os animais que são portadores de alterações cromossômicas e destina-los ao consumo. Minimizando, a propagação de anomalias e maximizando a eficiência reprodutiva (PIRES *et al.*, 2010).

Alguns estudos descreveram alterações cromossômicas na espécie bovina e, por vezes relacionam estas alterações cromossômicas com manifestações fenotípicas morfológicas e/ou funcionais nos animais (EL-BAYOUMI *et al.*, 2011; DAWOOD *et al.*, 2014; TRUKHACHEV *et al.*, 2017). No caso específico dos bovinos, a constituição cromossômica exerce efeito marcante sobre a fertilidade do rebanho (ROSA *et al.*, 2013).

Nos bovinos em geral, o fato dos cromossomos autossômicos serem todos acrocêntricos, é muito comum a ocorrência de fusões cêntricas, ou translocação Robertsoniana, quando ocorre a fusão de dois cromossomos acrocêntricos ou telocêntricos não homólogos na altura dos seus centrômeros (MATOS, 2013).

É comum na literatura considerar que a fusão cêntrica é um fenômeno de rearranjo cromossômico muito comum e recorrente, apontado como um direcionador das configurações cariotípicas ao longo da evolução. Esta hipótese tem ampla aceitação entre os especialistas (IANNUZZI *et al.*, 2008; CIOTOLA *et al.*, 2009). Em bovinos são conhecidos mais de 50 tipos de translocações Robertsonianas. A fusão cêntrica já foi observada em todos os autossomos, mas os pares 1, 14, 16, 21, 29 são os mais frequentemente envolvidos nesses rearranjos estruturais (RODERO-SERRANO *et al.*, 2013).

No contexto do estudo de populações envolvendo rebanhos bovinos, o uso de técnicas citogenéticas vem recebendo destaque para determinar variabilidade, diferenciação genética e estrutural dos grupos amostrais. Porém, novas metodologias ainda estão em desenvolvimento para monitorar os padrões genéticos, preservação e a conservação da biodiversidade em escala local e global (WAGNER, FORTIN 2013; TORO *et al.*, 2014).

Para compreender a organização cromossômica e a evolução cariotípica de uma espécie, estão sendo utilizadas sondas cromossomo-específicas, que podem ser

obtidas a partir de DNA de sequências únicas, DNA repetitivo, sequências loco-específica obtida por amplificação pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), grandes sequências de DNA genômico clonadas em vetores e cromossomos inteiros obtidos por microdissecção (CAPOCO, 2016).

Visando solucionar os problemas encontrados durante o pareamento e análise dos cromossomos em bovinos, lembrando que os animais desse grupo possuem características semelhantes e várias técnicas citogenéticas vem sendo aplicadas. Porém, nos animais domésticos, em geral, essas ferramentas ainda são pouco exploradas, em decorrência da dificuldade na padronização e atualização das mesmas.

Para os bovinos, em especial na raça Nelore, faz-se necessário a exploração cariotípicas desses animais para compreender e identificar alterações cromossômicas que podem prejudicar a maximização da capacidade produtiva do rebanho, colaborando para o melhoramento genético das diversas raças, além da Nelore e para a conservação dos germoplasmas (COPPOLA *et al.*, 2007).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Formação das raças locais brasileiras

O processo de formação de raças brasileira pode ser observado de duas formas, a primeira, mediante evoluções e adaptações impostas naturalmente ao longo do tempo, de exposição dos animais a diferentes localidades e a segunda, por cruzamentos controlados entre as espécies de interesse econômico, selecionados pelo homem, visando à fixação das características produtivas de interesse econômico (DA SILVA, 2012).

Portanto, a formação de uma raça comercial está intrinsicamente associada à redução da diversidade genética, nos estágios iniciais, e posteriormente, a concentração e fixação de algumas características específicas no grupo de animais selecionados para compor o rebanho (VERGANI; OLIVEIRA, 2016).

Os parâmetros genéticos permitem melhor conhecimento das vantagens e desvantagens de uma determinada raça. Os resultados da incorporação desses parâmetros na raça são traduzidos em animais cada vez mais eficientes e rentáveis aos olhos do produtor (AMARAL, 2012). Embora essa redução da diversidade genética e consequentemente o aumento na frequência de características desejadas seja benéfico em relação ao ganho econômico. Por outro lado, a diminuição da diversidade genética pode levar a depressão endogâmica e, assim, ser prejudicial para o rebanho.

O conceito de raças bovinas surgiu no final do século XVIII na Grã-Bretanha, após um período de intenso cruzamentos consanguíneos e abates para alcançar objetivos específicos de reprodução. Por conseguinte, os animais tornaram-se fenotipicamente, e, até certo ponto, genotipicamente distintos e passaram a receber denominações raciais específicas (MARSHALL, 2014).

Na agropecuária, são classificadas como locais, as raças que só ocorrem em um país ou transfronteiriças as raças que ocorrem em mais de um país. As raças transfronteiriças podem ser regionais, que ocorrem em mais de um país dentro de uma única região ou continente, ou internacionais, as que ocorrem em mais de uma região ou continente (FAO, 2010).

Os bovinos se distribuem em duas subespécies. A primeira, denominada taurino (*Bos taurus taurus*), disseminados pelas regiões de clima temperado, é representada em grandes partes pelas as raças bovinas europeias. A segunda, zebuíno

(*Bos taurus indicus*), habita nas regiões tropicais, representada por animais de origem indiana e africana. As raças zebuínas são facilmente identificáveis pela giba ou cupim, que corresponde à porção cervical dos músculos romboide e trapézio, que é entremeada por gordura e constitui uma reserva energética para o animal. O cupim não é encontrado nos animais europeus (MORAIS, 2014).

No Brasil, são exploradas quatro raças zebuínas oriundas da Índia, o Nelore, Gir, Guzerá e Sindi (OLIVEIRA *et al.*, 2002). Cerca de 80% do rebanho local é composto por animais zebuínos, os demais 20% são de taurinos de origem europeia. É dentro dessa variedade que estão às raças que se tornaram brasileiras. As raças de origem europeia criadas no país apresentam características adaptativas semelhantes às zebuínas, que ganharam terreno por apresentar maior resistência que as europeias. Os taurinos ficam estressados com o calor e não expressam todo seu potencial genético com pastagens de baixa qualidade (OLIVEIRA, 2018).

Acredita-se que existiam três rotas principais da introdução de bovinos no país, São Vicente (São Paulo), Pernambuco e Bahia. Os bovinos desembarcados em São Vicente foram irradiados para os campos Sulinos, Goiás e Vale do São Francisco (Minas Gerais e Bahia), nesse desembarque continha um lote de 20 animais da raça Nelore, logo a seleção da raça Nelore existente hoje, teve sua origem em Minas Gerais (FELIX *et al.*, 2013).

De acordo com os dados disponibilizados pela Associação Brasileira de Criadores de Zebu (ABCZ) acerca do rebanho Puro de Origem da raça Nelore apresenta, os animais apresentam até 128 ascendentes em sua árvore genealógica. Nessa genealogia foram considerados os animais criados nos estados da Bahia, São Paulo, Minas Gerais, Mato Grosso do Sul, Paraná e Rio de Janeiro (FARIA, *et al.*, 2002).

A busca por raças mais produtivas fez com que ao final do século XIX e início do século XX houvessem importações de raças consideradas exóticas, que, embora altamente produtivas, foram selecionadas em regiões de clima temperado. Estas raças, por cruzamentos absorventes, causaram rápida substituição nas raças locais, que apresentavam níveis de produção mais baixos, porém distinguiam-se das primeiras por estarem adaptadas (EGITO *et al.*, 2002; SANTOS *et al.*, 2003). Em consequência, muitas raças que já foram economicamente importantes, correm o risco de entrar em extinção, ainda que possuam características interessantes dos pontos de vista econômico e de melhoramento (TABERLET *et al.*, 2011).

De acordo com REDDY e colaboradores (2016), cruzamentos indiscriminados resultam na diluição das raças e uma perda de genes nas populações, podendo reduzir o número de animais reprodutores quando comparados o número de efetivo de ancestrais. Estudos citogenéticos e conservação do germoplasma são ferramentas úteis para caracterizar e conservar as raças que apresentam esse risco de extinção (MARIANTE; ALBUQUERQUE, 2011).

Os dados de FARIA e colaboradores (2002), para animais da raça Nelore, apresentaram um número reduzido de ancestrais existentes, sendo afirmados pela predominância na utilização de alguns animais reprodutores. De acordo com esses autores, pelo número efetivo de reprodutores é possível avaliar o balanço das contribuições dos fundadores entre as gerações, pela taxa de seleção e variação do tamanho do grupo dos animais.

Os Recursos Genéticos Animais (RGAs), existem na forma de várias raças e linhagens que possuem composição genética própria e adaptação a nichos ecológicos específicos (SHARMA *et al.*, 2015). Esse recurso foi criado em 1983, quando a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) preocupada com a perda do material genético dos rebanhos, incluiu as raças de animais domésticos ameaçadas ao programa (PEZZINI, 2010).

Surgiu então, uma rede de conservação dos recursos genéticos animais, estudadas e exploradas pela Embrapa, em parceria com as universidades e as empresas estaduais do setor produtivo em nível local, regional e nacional (MARIANTE; ALBUQUERQUE, 2011).

Do ponto de vista econômico do Brasil, uma das raças mais estudadas é a Nelore, pois apresenta correlações genéticas favoráveis com as características de importância econômica, tais como longevidade, produção, reprodução e características de carcaça, e adaptabilidade as condições dimórficas presente no país, favorecendo a sua criação na atividade de corte e a preferência do produtor pela raça (PIRES *et al.*, 2017).

2.2 Citogenética bovina por Bandeamento

A citogenética é uma ferramenta comumente utilizada em estudos de reprodução de animais, conservação das raças e na determinação de anormalidades cromossômicas associadas a características deletérias (DAVID *et al.*, 2014).

As técnicas citogenéticas se baseiam na análise dos cromossomos obtidos durante a divisão celular, especificamente na metáfase da mitose, quando os mesmos se encontram mais condensados, permitindo o pareamento cromossômico e montagem do cariótipo (GUERRA, 1988). O material submetido à cultura celular passa por tratamentos até que as células cheguem à fase de divisão celular desejada, para que posteriormente seja empregada a técnica de bandeamento dos cromossomos (BORGES-OSÓRIO; ROBINSON 2013).

As técnicas de bandeamento comumente utilizadas produzem banda C, quando há necessidade de evidenciar as regiões centroméricas dos cromossomos ou de outras regiões que possuem heterocromatina constitutiva, bandas G que permite a análise através do padrão de bandas características que cada par cromossômico apresenta e bandas NOR que marcam as Regiões Organizadoras de Nucléolo nos cromossomos (IANNUZZI; DI BERARDINO, 2008).

Porém, outras técnicas de bandeamento podem ser aplicadas para a identificação dos cromossomos, como bandeamento Q que utiliza quinacrina mostarda, bandeamento R (reverso) resultando em bandas reversas nos cromossomos, correspondendo a um padrão de bandas contrárias ao de bandas G (NUSSBAUM *et al.*, 2008).

Em especial para os bovinos, a análise citogenética e o uso de suas metodologias, contribuíram para identificação de subespécies nesses animais, além de estudos de preservação, estudos comparativos para o cromossomo Y e identificação de alterações numéricas e estruturais (YIMER; ROSNINA, 2014). De acordo com AHMAD e colaboradores (2004), essas alterações cromossômicas (numéricas e estruturais) podem resultar em casos de subfertilidade ou esterilidade, sendo um critério importante de seleção para touros reprodutores.

O complemento cromossômico diploide dos bovinos contém 60 cromossomos, incluindo os pares de cromossomos sexuais XY e XX para machos e fêmeas, respectivamente (REJDUCH *et al.*, 2000). O cariótipo bovino é simétrico e gradual, sendo todos os cromossomos autossômicos acrocêntricos. Os machos são heterogaméticos, e a diferenciação sexual é estabelecida pelo sistema XY (DA CRUZ, 2011). Concorrem nos rebanhos, animais taurinos (*Bos taurus taurus* - BTA) e zebuínos (*Bos taurus indicus* - BIN), de origens europeia e indiana, respectivamente. Entre taurinos e zebuínos observa-se dimorfismo para o cromossomo Y, que pode ser

submetacêntrico ou metacêntrico nos animais pertencentes à subespécie *Bos taurus taurus* e acrocêntricos na subespécie *Bos taurus indicus* (LUNA, 2012).

Entre as alterações estruturais mais recorrentes nos bovinos, temos as translocações Robertsonianas (Figura 1), que envolve a fusão cêntrica de dois cromossomos acrocêntricos, com a formação de um único cromossomo metacêntrico ou submetacêntrico, dependendo do tamanho dos pares envolvidos na translocação (BARASC *et al.*, 2018).

De acordo com DEMYDA-PEURÁS e colaboradores (2012), a perda do material cromossômico presente nos braços curtos dos cromossomos acrocêntricos não implica em alterações fenotípicas para os seus portadores, estes cromossomos apresentam seus braços curtos, constituídos de DNA repetido ricos em rDNA, cujas sequências são redundantes e importantes para a transcrição de RNA ribossomal.

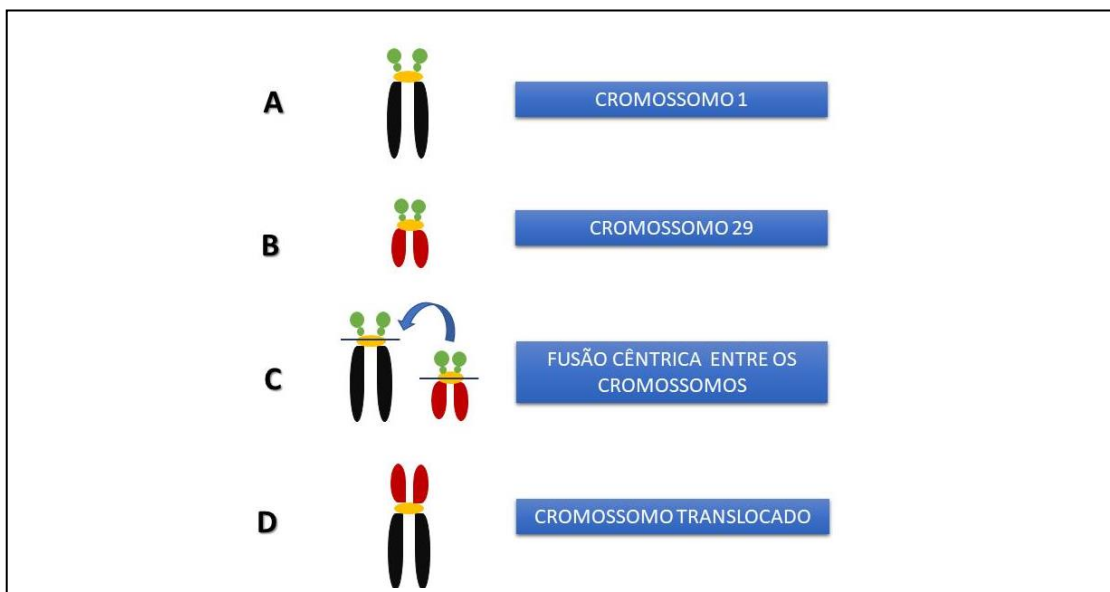


Figura 1 - Representação esquemática de uma translocação Robertsoniana entre os cromossomos autossômicos dos bovinos. A e B ilustram cromossomos acrocêntricos não homólogos 1 e 29 respectivamente. C indica a fusão dos braços longos e a perda de ambos os braços curtos dos respectivos cromossomos. D mostra o produto final da translocação um cromossomo submetacêntrico.

As anormalidades estruturais envolvendo os autossomos bovinos têm efeito direto sobre a fertilidade do animal portador, além de causar anomalias congênitas e perdas embrionárias. Consequentemente, resultam em prejuízo econômico na produção dos animais, podendo ser erradicado por meio de diagnóstico genético e remoção precoce dos animais afetados do plantel de reprodutores (PAVARINI *et al.*, 2008). Assim, o monitoramento citogenético, aliado a outras ferramentas da citogenética

molecular e citogenômica, assegura a integridade e a boa qualidade do germoplasma bovino transmitido a gerações futuras.

Para compreender a organização cromossômica e a evolução cariotípica de uma espécie, técnicas citogenéticas, tais como bandeamento C, G, NOR (Regiões Organizadoras de Nucléolo) e FISH (Hibridização Fluorescente *in situ*), vêm sendo utilizadas para monitorar os padrões genéticos, preservação e a conservação da biodiversidade em escala local e global (WAGNER, FORTIN, 2013; TORO *et al.*, 2014).

2.2.1 Bandeamento C

O bandeamento C descrito por SUMMER (1972) é utilizado para identificar a localização e a variação das regiões de heterocromatina constitutiva que são sequências de DNA altamente repetitivas as quais não possuem atividade gênica. A heterocromatina se concentra em blocos, distribuídos preferencialmente em algumas regiões dos cromossomos, como ao redor da constrição secundária, e em porções proximais e terminais dos braços cromossômicos (Figura 2). A distribuição e o tamanho dos blocos de heterocromatina são idênticos nos cromossomos homólogos. Assim, o Bandeamento C pode ser empregado na caracterização de espécies e na detecção de alterações cromossômicas estruturais (ANDRADES-MIRANDA; MATTEVI, 2011).



Figura 2 – Metáfase Bovina por Bandeamento C. Metáfase bovina de uma fêmea (XX), após a técnica de bandeamento C (Laboratório Núcleo de Pesquisas Replicon – PUC- Goiás).

2.2.2 Bandeamento GTG

O bandeamento GTG combinado com tripsina e *giemsa* (GTG) (do inglês, *G-bands by Trypsin using Giemsa*) utiliza a tripsina, uma proteinase de largo espectro, para que ocorra a desnaturação das proteínas do cromossomo e depois com a aplicação do *giemsa* cora a cromatina, resultado em bandas claras e escuras. A diferenciação do padrão bandeado do cromossomo deve-se a ocorrência de regiões ricas em guanina e citosina, que se apresentam menos condensadas e, portanto, mais facilmente digeridas pela proteinase, que depois de coradas com *giemsa*, resultam em uma cor mais difusa, formando as bandas claras (Figura 3).

Em contrapartida, regiões de cromatina ricas em timina e adenina são mais condensadas e, conseqüentemente, a digestão enzimática das proteínas nestas regiões ficam prejudicadas, permitindo uma maior deposição de corante após a coloração, formando as bandas escuras (ROSSETTO, 2015).



Figura 3 – Metáfase Bovina por Bandeamento GTG. Metáfase bovina de uma fêmea (XX), após a técnica de bandeamento GTG (Laboratório Núcleo de Pesquisas Replicon – PUC- Goiás).

A técnica de bandeamento G é uma das mais utilizadas na rotina citogenética, o padrão alternado de bandas claras e escuras facilita a análise estrutural, a identificação do cromossomo e dos homólogos. Conseqüentemente, permite a observação e possíveis alterações estruturais mais facilmente (BORGES-OSÓRIO; ROBINSON, 2013).

2.2.3 Bandeamento Ag-NOR

O bandeamento Ag-NOR (do inglês, *Silver-stained Nucleolar Organizer Regions*) cora regiões organizadoras de nucléolo nos cromossomos com uso de nitrato de prata. É amplamente reconhecido que NORs contém rDNA, que são regiões ricas em repetições em tandem de genes ribossomais. O DNA repetitivo contido na NOR se condensa em torno de proteínas que possuem afinidade por prata. Portanto, quando corados, os cromossomos revelam os locais das proteínas nucleolares, permitindo a identificação de uma NOR (Figura 4). Essa técnica é muito utilizada em estudos de cromossomos marcadores e na detecção de rearranjos cromossômicos (ANDRADES MIRANDA; MATTEVI, 2011).

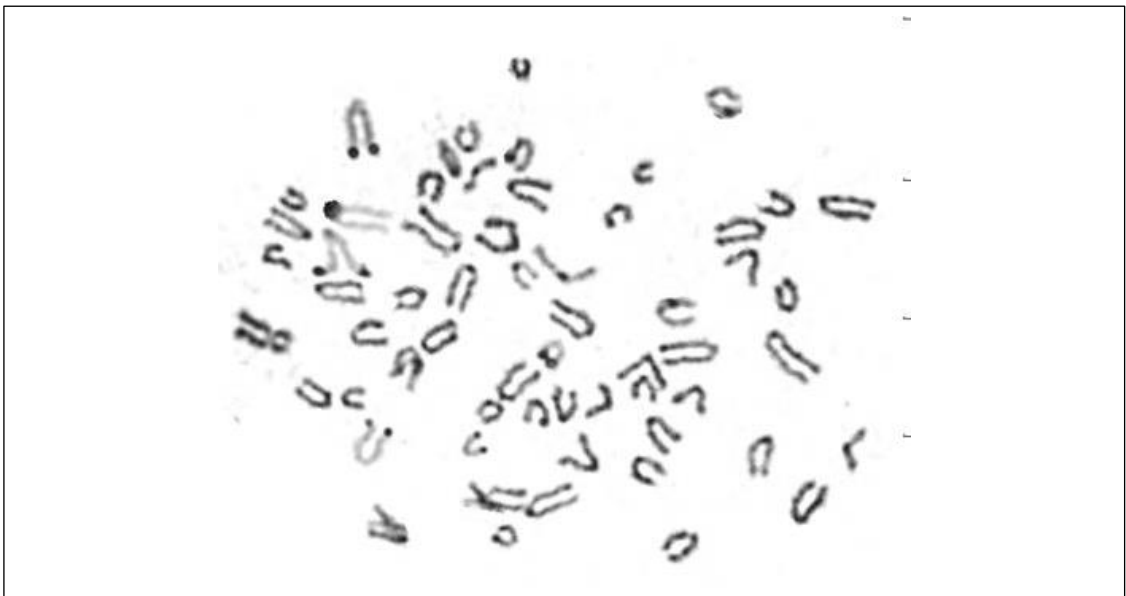


Figura 4 – Metáfase Bovina por Bandeamento NOR. Metáfase bovina de uma fêmea (XX), após a técnica de bandeamento NOR (Laboratório Núcleo de Pesquisas Replicon – PUC- Goiás).

2.3 Hibridização fluorescente *in situ* (FISH)

Entre as metodologias da citogenética molecular, destaca-se a utilização de sondas cromossomo-específicas associadas às técnicas de FISH (do inglês, *Fluorescence in situ Hybridization*). Essa técnica foi proposta por Gall e Pardue (1969) para análises cromossômicas e por Buongiorno-Nardeli e Amaldi (1969) para cortes histológicos. O desenvolvimento do FISH proporcionou um enorme progresso nos estudos da organização dos genomas (VOLPI; BRIDGER, 2008).

A técnica de FISH envolve a marcação de nucleotídeos ou sequências de DNA específico, mediante o emprego de um fluorocromo (moléculas fluorescentes). A

sequência marcada é chamada de sonda, que é usada para se ligar à sua cadeia de DNA complementar (DNA alvo), localizada em um cromossomo específico. Ao final da reação o sinal fluorescente pode ser visto com o auxílio de um microscópio de epifluorescência, permitindo a identificação exata da localização da sequência alvo no cromossomo (TICIANELLI *et al.*, 2011).

O primeiro passo para o FISH consiste no desenvolvimento das sondas, que são sequências de DNA que variam cerca de 100 a 300 pb até maiores que 1Mpb, complementar ao DNA-alvo de interesse. As sondas de fita simples de DNA são comumente hibridizadas em cromossomos metafásicos, mas podem também ser desenvolvidas para serem usadas em núcleos interfásicos (GUERRA, 2004).

Os principais tipos de sondas de DNA utilizadas na técnica de FISH são:

a. Sondas centroméricas, consistem de sequências de DNA repetitivo situadas no centrômero e na região pericentromérica de um cromossomo específico, adequadas para a quantificação do número cromossômico e úteis na identificação e/ou diagnóstico de aneuploidias.

b. Sondas subteloméricas, permitem identificar translocações atípicas que envolvem regiões subteloméricas.

c. Sondas de sequência única são específicas para um determinado loco único, sendo úteis para identificar deleções e duplicações submicroscópicas.

d. Sondas para cromossomos inteiros, são obtidas de diferentes regiões de um dado cromossomo. Quando todas essas regiões são utilizadas juntas em uma única hibridização, todo o cromossomo fica fluorescente. Muito utilizada para caracterizar rearranjos complexos com pequenas translocações. Embora esse tipo de sonda seja geralmente usada para marcar todo o cromossomo, ela pode ser desenvolvida para a pintura de apenas um dos braços cromossômicos, conforme o interesse investigativo (NEVES; GUEDES, 2012).

Os diferentes tipos de sondas podem ser marcados diretamente, por incorporação de nucleotídeos fluorescentes, ou indiretamente, por incorporação de moléculas repórter que são subsequentemente detectadas por anticorpos fluorescentes ou por moléculas de afinidade. Em todos os casos, as diferentes sondas são hibridizadas no genoma do organismo em estudo, caracterizando diversos eventos, como alteração ou evolução do cariótipo (SCUDELER, 2010). O grau de especificidade cromossômica da sonda utilizada vai depender do rigor da reação de hibridização, pois esta

especificidade é determinada diretamente pela complementariedade entre as bases da dupla fita (DAVID *et al.*, 2014).

Novas metodologias de FISH tem possibilitado o uso de sondas com diversos tipos de fluoróforos dentro de diferentes campos de investigação, incluindo análise de danos cromossômicos, mapeamento genéticos, genômica comparativa, evolutiva e ecologia microbiana (VOLPI, 2008).

Na medicina veterinária, a técnica FISH tem sido aplicada para diagnosticar vários agentes infecciosos tais como *Lawsonia intracellularis* e *Pasteurella multocida* em porcos (BOUTRUP *et al.*, 2010; PORS *et al.*, 2011), *Treponema spp.* responsável por causar periodontite em cães (NORDHOFF *et al.*, 2008), *Coxiella burnetii* presente em bovinos (HANSEN *et al.*, 2011), e bactérias do gênero *Brachyspira*, que afeta principalmente suínos (JENSEN *et al.*, 2010).

No caso particular dos bovinos, essa técnica tem sido utilizada para detectar alterações cariotípicas. Mais recentemente, existem trabalhos abrangentes que discutem e apontam importantes melhorias, aplicabilidades, além do desenvolvimento de recursos moleculares destinados à citogenética e a citogenômica animal (RAUDSEPP; CHOWDHARY, 2016).

3. JUSTIFICATIVA

O rebanho efetivo nacional de bovinos registrado no sistema de dados de Pesquisa Pecuária Municipal para o ano de 2017 foi de 214,9 milhões de cabeças, redução de 1,5% quando comparado no ano 2016. O rebanho efetivo nacional inclui os animais destinados tanto à produção de carne quanto à de leite. A região Centro-Oeste permaneceu na liderança nacional, contribuindo com 34,5% do total de cabeças dos rebanhos brasileiros (IBGE, 2018).

Com o desempenho das raças melhoradas, os recursos genéticos nos bovinos estão sendo progressivamente perdidos, em decorrência da substituição das raças tradicionais por raças mais produtivas, ameaçando sua conservação e implicando no empobrecimento da biodiversidade local das raças (TABERLET *et al.*, 2011).

A caracterização genética dos animais é importante para orientar os programas de conservação de recursos genéticos animais (RGA), permitindo a avaliação da variabilidade genética dos animais, fundamental na elaboração estratégica de melhoramento e planos de conservação das populações (SHARMA *et al.*, 2015). Na pecuária brasileira, ainda são escassas as iniciativas que objetivam avaliar a integridade do material genético e relacioná-la com características produtivas indesejadas, tais como perdas gestacionais e subfertilidade, focando esforços nas características de produção.

Através da aplicação de ferramentas citogenéticas é possível identificar anomalias cromossômicas estruturais e/ou numéricas nos bovinos, permitindo ao pecuarista a oportunidade de descartar animais indesejáveis (portadores de alterações cromossômicas, por exemplo) da cadeia produtiva e incrementar a qualidade do rebanho (PIRES *et al.*, 2010).

A respeito das metodologias citogenéticas, as técnicas de bandeamento ainda são os procedimentos mais utilizados para a avaliação do cariótipo bovino, uma vez que os métodos de cariotipagem permitem a reprodução de padrões cromossômicos bem estabelecidos (IANNUZZI; DI BERARDINO, 2008). Apesar de sua ampla aplicação, em alguns estudos com organismos que possuem cromossomos pequenos ou cariótipos complexos, a análise cariotípica é pouco aplicada, já que a metodologia requer um conhecimento profundo sobre o padrão de bandas de um cromossomo. Porém, o desenvolvimento de técnicas citogenéticas moleculares como o FISH aplicada a diversos organismos levou a uma melhora significativa na investigação citogenética,

representando uma alternativa válida com métodos padronizados (SOARES *et al.*, 2018).

As aplicações do FISH em animais e humanos são semelhantes e aproximadamente o mesmo nível de avanço foi alcançado por citogeneticistas. O uso de sondas cromossômicas em animais domésticos permitiu que várias questões importantes fossem resolvidas, incluindo detecção de aberrações cromossômicas e cariótipos complexos, mapeamento genético e a descrição evolutiva dos cromossomos (RUBES *et al.*, 2009).

Ao contrário dos seres humanos, o uso da técnica de FISH ainda é muito limitado na citogenética animal. Isto se deve principalmente à falta de sondas comerciais que são essencialmente limitadas a cromossomos sexuais para a maioria das espécies domésticas. Além disso, apenas alguns laboratórios de excelência no mundo têm disponibilidade de sondas, limitando assim a aplicação do método a poucos grupos de pesquisa (PAUCIULLO *et al.*, 2014).

Embora as técnicas de bandeamento tenham sido usadas em animais domésticos desde o início de 1970 (IANNUZZI; DI BERARDINO, 2008), o Sistema Internacional para Nomenclatura Cromossômica de Bovídeos Domésticos (*International System for Chromosome Nomenclature of Domestic Bovids* - ISCNDB, 2000) surgiu após o uso de técnicas da citogenética molecular, como o FISH e marcadores moleculares (DI BERARDINO *et al.*, 2001).

A resolução molecular de cariótipos complexos por FISH é particularmente útil para os pequenos cromossomos, cuja semelhança nos padrões de bandas torna sua identificação muito difícil, em especial no caso dos bovinos, devido ao fato dos cromossomos autossômicos serem todos acrocêntricos e de tamanhos relativos semelhantes. Adicionalmente, a ocorrência de translocações Robertsonianas, envolvendo a fusão de dois cromossomos acrocêntricos, é comum em bovinos, podendo resultar problemas de subfertilidade nos animais de acordo com os cromossomos envolvidos na fusão cêntrica (JORGE, 2006; KOCHNEVA *et al.* 2011; TRUKHACHEV *et al.* 2017).

Diante desse contexto, nota-se que após a introdução dos bovinos no Brasil, houve um processo de adaptação de certos grupos, sendo responsável pela formação de várias raças locais brasileiras. Contudo, apesar do desenvolvimento de programas de conservação que visem à caracterização genética e fenotípica dos bovinos, e avaliação

do potencial produtivo das populações, atualmente, são poucas as pesquisas que buscam caracterizar estes animais citogeneticamente e correlacionar possíveis alterações cromossômicas com ineficiência reprodutiva nos rebanhos.

De acordo com OLIVEIRA (2002), no Brasil não existe uma prova unificada de progênie para raça Nelore no Programa de Melhoramento Genético, inviabilizando o trabalho do produtor que pretende selecionar seus animais. Assim, por falta de um banco de dados genéticos e análise citogenética desses animais faz com que os produtores por animais que são utilizados nos campeonatos e os que foram mais premiados.

O objetivo deste trabalho foi a caracterização citogenética da raça bovina nelore, por técnicas de bandeamento C, G e NOR. Construir uma sonda pancentromérica para marcar os cromossomos autossômicos dos bovinos podendo ser empregada na detecção de algumas alterações nos bovinos e comparar os resultados obtidos na raça Nelore em animais da raça Holandesa.

4. OBEJTIVOS

4.1 Objetivo Geral

Caracterização citogenética de bovinos da raça Nelore (*Bos taurus indicus*, Linnaeus, 1758).

4.2 Objetivos Específicos

- Obter os cromossomos bovinos mediante cultura celular de linfócitos periféricos em curto prazo;
- Caracterizar o cariótipo do Nelore (*Bos taurus indicus*) com as técnicas de bandeamento do tipo C, GTG e NOR;
- Amplificar segmentos conservados pericentroméricos dos cromossomos autossômicos acrocêntricos para ser usados como sondas pancentroméricas autossômicas de Nelore;
- Aplicar estratégias de *Nick Translation-PCR* para marcar os *amplicons* com o fluorocromo *SpectrumGreen™ direct-labeled* dUTP, para permitir a identificação do sinal fluorescente em microscopia de epiluminação;
- Usar a técnica de Hibridização Florescente *in situ* (FISH) para visualizar a eficiência das sondas específicas para marcar e revelar os centrômeros de autossomos de Nelore em metáfase;
- Verificar a sensibilidade e especificidade da sonda pancentromérica como sonda de enumeração de todos os autossomos de Nelore;
- Testar a transferabilidade da sonda pancentromérica desenvolvida para a animais zebuínos em animais taurinos.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Delineamento do estudo

A presente proposta foi aprovada pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da PUC-Goiás (nº 7350171017/2016). Esse estudo trata-se da padronização das técnicas citogenéticas de bandeamento do tipo C, GTG e NOR, e construção de sondas cromossômica em bovinos, mediante amplificação e marcação por *Nick Translation* e Hibridização Fluorescente *in situ* (FISH). A pesquisa foi conduzida no Núcleo de Pesquisas Replicon da Pontifícia Universidade Católica de Goiás (NPR/PUC – Goiás) em parceria mutua com o Laboratório de Citogenética Humana e Genética Molecular (LaGene) da Secretaria de Estado da Saúde de Goiás (SES – GO).

5.2 Caracterização das amostras

A análise foi composta por bovinos da raça Nelore subespécie *Bos taurus indicus*, Linnaeus 1758, sendo dois machos e duas fêmeas, provenientes da Escola de Ciências Agrárias e Biológicas da PUC - Goiás.

Para o segundo teste, foram utilizadas amostras de quatro fêmeas da raça Holandesa (*Bos taurus taurus*, Linnaeus 1758) para análise de subfertilidades nessas fêmeas e comparação dos resultados obtidos com os animais zebuínos. As amostras foram obtidas mediante a coleta de 3,0 mL de sangue periférico por punção da veia jugular dos animais. As amostras biológicas foram armazenadas sob refrigeração (4 a 8°C) em tubos estéreis e heparinizados até o momento do seu processamento.

5.3 Cultura de células

A cultura celular foi realizada a partir de 1,0 mL de sangue total em meio RPMI 1640 *Medium* (Gibco™, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EUA) (4,0 mL), suplementado com Soro Fetal Bovino (Gibco™, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EUA) (1,0 mL), Fitohemaglutinina (Gibco™, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EUA) (100,0 µL) e enriquecido com Penicilina (Gibco™, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EUA) (100,0 U/µL). A cultura transcorreu em uma estufa a 38°C com 5% de CO₂.

Após o crescimento desejado das células por 71 horas, foram acrescentados 75,0µL de KaryoMax® COLCEMID® *Solution* (Gibco™, Thermo Fisher Scientific,

Massachusetts, EUA) às células em suspensão, que retornaram para a incubação por 30 minutos. Posteriormente, a amostra foi transferida para um tubo cônico de 15,0 mL e centrifugado por 10 minutos a 1.000 rotações por minuto (rpm). Logo após, o sobrenadante foi desprezado, deixando-se cerca de 1,0 mL de material.

No sistema foi acrescentado 10,0 mL de solução hipotônica (KCl a 0,075 M) e mantido na estufa por 35 minutos. Em seguida, as células foram fixadas com solução de Carnoy (Metanol + Ácido acético na proporção de 3:1), incubadas por 10 minutos a temperatura ambiente e imediatamente centrifugadas por 10 minutos a 1.000 rpm. As células do ‘*pellet*’ foram fixadas por três trocas sucessivas de fixador de Carnoy, até que o material se tornasse claro. As células fixadas foram mantidas em 5,0 mL de solução fixadora na geladeira até o momento da análise.

5.4 Bandeamento C

Para realizar o bandeamento C, a suspensão de células foi gotejada em uma lâmina de vidro limpa e desengordurada sobre vapor de banho-maria a 60°C para o espalhamento das metáfases e envelhecidas na geladeira durante dois dias. Posteriormente, as lâminas foram submersas em solução de HCL a 0,2N por 10 minutos. A desnaturação alcalina do DNA ocorreu expondo os cromossomos a 5% de Hidróxido de Bário por 15 min a 37°C. Logo após, o material foi lavado em água destilada, mantido em temperatura ambiente para secagem e, em seguida, as lâminas foram coradas com de solução de KaryoMAX® *Giemsa Stain* (Gibco™, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EUA) a 10% por 5 minutos. A técnica foi padronizada para a espécie do estudo, após alguns testes realizados, variando temperatura e tempo em que o material ficou exposto à solução alcalina.

5.5 Bandeamento GTG

Para o bandeamento GTG, o material foi gotejado em lâminas de vidro limpas e desengorduradas sobre o vapor de banho-maria a 60°C e armazenado a temperatura ambiente por sete dias. Após o envelhecimento do material, foram realizados tratamentos em solução de tripsina (Gibco™, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EUA) diluídas em 48,0 mL de PBS a 0,025% a 37°C e coradas em solução de KaryoMAX® *Giemsa Stain* (Gibco™, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EUA) a 5% por 5 minutos. Após a realização de testes com tempos diferentes de imersão na

enzima, obteve-se um resultado satisfatório nos tempos de 6 segundos e 7 segundos. Essa técnica de bandeamento foi padronizada para os animais deste estudo, segundo o protocolo de GUERRA e DE SOUZA (2002).

5.6 Bandeamento NOR

No bandeamento NOR, o material foi gotejado em lâminas limpas e desengorduradas sobre o vapor do banho-maria a 60°C e envelhecido na geladeira ao longo de dois dias. Logo após, foram adicionadas sobre o material duas gotas de nitrato de prata a 50% (AgNO₃) e duas gotas de gelatina a 2%, diluída em ácido fórmico a 1% (CH₂O₂). O local onde foi depositada a solução foi coberto por uma lamínula. Em seguida, a lâmina foi colocada em uma câmara úmida a 65°C, ao abrigo da luz por um tempo variando entre 3 a 5 minutos até que o material apresentasse uma coloração acobreada.

5.7 Amplificação e marcação das regiões para obtenção das sondas

Inicialmente, o genoma bovino da subespécie *Bos taurus indicus* disponível no banco de dados do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) foi analisada. Na plataforma do NCBI foi selecionado o cromossomo autossômico 1, por ser o maior acrocêntrico na subespécie, e a partir dele foram desenhados *primers* correspondentes às regiões próximas ao centrômero. Essas regiões costumam ter sequências que são conservadas e se repetem por todos os cromossomos. As regiões pericentroméricas selecionadas foram amplificadas mediante uma Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) (do inglês, *Polymerase Chain Reaction*), usando os *primers* CATTLE F – senso, (5'AGGGGCTTCTCCAGATGAT3') e CATTLE R – antisenso (5'AAGGCACCATCCACTTCGAG3'). A amplificação por PCR gerou um produto de 1.901 pb para a região centromérica.

O tamanho do produto amplificado foi verificado em gel de agarose a 1%. Posteriormente, os *amplicons* produzidos por PCR foram reamplificados por *semi-nested* PCR, usando os mesmos *primers* e o protocolo da técnica de CGH *Nick Translation*[®] (Vysis[™]), para a marcação com o *SpectrumGreen*[™] *direct-labeled* dUTP. Ao final da marcação, o produto se constituiu na sonda final, que foi armazenado refrigerado e ao abrigo de luz até o uso, que revelaria na cor verde a região centromérica nos cromossomos da subespécie *Bos taurus indicus* (BIN).

5.8 Hibridização Fluorescente *in Situ* (FISH)

As lâminas utilizadas para o FISH continham metáfases obtidas por meio de cultura de linfócitos, depois de gotejadas as mesmas foram mantidas a -20°C por 24 horas.

Para a fixação do material, as lâminas foram desidratadas a temperatura ambiente por 1 minuto em série de solução aquosa de etanol a 70%, 85% e etanol PA (100%). Posteriormente, a sonda preparada e marcada com o *SpectrumGreen*TM *direct-labeled* dUTP (VysisTM) foi aplicada sobre a lâmina, coberta por uma lamínula (24x24mm) e mantida no hibridizador HYBrite® (VysisTM) passando pela etapa de co-desnaturação por 5 minutos a 74°C e anelamento por 48 h a 37°C.

Após a hibridização, a lamínula foi cuidadosamente removida e realizada as lavagens adstringentes a 72°C para a remoção do excesso de sondas não hibridizadas. As soluções de lavagem foram *UltraPure*TM 20X SSC *Buffer* (InvitrogenTM, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EUA) a 0,04% por 2 minutos, seguido de lavagem em solução de *UltraPure*TM 20X SSC *Buffer* com 0,05% de Tween[®] 20 (USB Corporation, Cleveland, EUA) por 1 minuto. Foi retirado o excesso de solução e em seguida as células foram contra coradas com 10µL de DAPI Antifade (4',6-Diamidino-2-Phenylindole) (Cytocell, Cambridge) por 10 minutos. Após esse tempo, foi procedida a análise do material e a captura das imagens.

5.9 Análise e captura das metáfases

A captura das metáfases cromossômicas para os três tipos de bandeamento e para o teste de FISH foram efetuadas mediante microscopia óptica de luz branca e de epifluorescência, com o auxílio de uma estação de cariotipagem constituída por um microscópio Axioplan 2Imaging[®] (Carl Zeiss, Alemanha) com platina motorizada controlada pelo *software* Metafer[®] 3.4.0 (Metasystems Corporation, Alemanha) e analisadas com auxílio dos *softwares* IKAROS[®] e ISIS[®] (Metasystems Corporation, Alemanha). Foram analisadas vinte metáfases de cada animal, claramente observáveis e bem distribuídas, sem sobreposição de cromossomos da subespécie *Bos taurus indicus*.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados e discussão estão apresentados em forma de artigos subdivididos em capítulos.

O artigo I trata da padronização das técnicas de bandeamento para a subespécie *Bos taurus indicus*, Linnaeus 1758. Artigo publicado na Revista *Comparative Cytogenetics*.

O artigo II trata da construção e validação de sondas para regiões de centrômero, com a técnica de pintura cromossômica no estudo dos cromossomos autossômicos de bovinos (*Bos taurus*, Linnaeus 1758).

Banded karyotype of Nelore cattle (*Bos taurus indicus* Linnaeus, 1758)

Andréia Pires Amancio^{1,2}, Sabrina Sara Moreira Duarte^{2,3}, Rafael Carneiro Silva²,
Alex Silva da Cruz², Danilo Conrado Silva², Claudio Carlos da Silva^{1,2,4,5},
Aparecido Divino da Cruz^{1,2,3,4}

1 PhD Program in Biotechnology and Biodiversity, Federal University of Goiás, Rede Centro Oeste de Pós-Graduação de Pesquisa e Inovação, Rua 235, n. 40, Setor Leste Universitário, Goiânia, GO 74605-050, Brazil **2** Replicon Research Group, Genetics Master's Program, School of Agrarian and Biological Sciences, Pontifical Catholic University of Goiás, Rua 235, n. 40, Setor Leste Universitário, Goiânia, GO 74605-050, Brazil **3** Genetics and Molecular Biology Master's and PhD Program, Federal University of Goiás, Avenida Esperança, s/n., Campus Samambaia, Goiânia, GO 74690-900, Brazil **4** Human Cytogenetics and Molecular Genetics Laboratory, Health Secretary of Goiás State Goiânia, GO, Brazil **5** State University of Goiás, Campus Eseffego, Goiânia, GO, Brazil

Corresponding author: Andréia Pires Amancio (andreaamancio5@gmail.com)

Academic editor: Nina Bulatova | Received 23 May 2019 | Accepted 4 August 2019 | Published 29 August 2019

<http://zoobank.org/2A818874-4B15-49D7-A689-BF50ECF518BE>

Citation: Amancio AP, Duarte SSM, Silva RC, da Cruz AS, Silva DC, da Silva CC, da Cruz AD (2019) Banded karyotype of Nelore cattle (*Bos taurus indicus* Linnaeus, 1758). *Comparative Cytogenetics* 13(3): 265–275. <https://doi.org/10.3897/CompCytogen.v13i3.36449>

Abstract

Chromosome banding techniques were applied and standardized to obtain karyotype characteristics for the first time in Brazil of Nelore cattle – *Bos taurus indicus* Linnaeus, 1758 – (bovine subspecies most prominent in Brazilian livestock). Blood samples were collected from the animals of the School of Agrarian and Biological Sciences of the Pontifical Catholic University of Goiás, two males and two females of pure breed. These samples were submitted to the cell culture method to study metaphase chromosomes. Chromosome banding techniques (C, G and NOR) revealed the karyotype architecture of Nelore cattle common with that of other breeds of zebu cattle formerly karyotyped. The diploid chromosome number was invariably normal, $2n = 60$. C-banding revealed C-positive heterochromatin in centromeric regions almost in all chromosomes. G-banding presented the expected band pattern in the respective chromosome pairs in correspondence with the established chromosomal patterns for the species. Ag-staining for nucleolus organizer regions (AgNOR) was identified on the telomeric end of the long arm in 7 autosomal chromosomes. In this study we found more regions in chromosomes with staining than presented in the literature for the *Bos indicus* group (BIN). These NOR regions were repeated on the same chromosomes for the 4 animals studied.

Keywords

AgNOR; Brazil breeds; Cytogenetics; Karyotype; Zebu

Introduction

Nelore is an important bovine breed and well noted in Brazil for its meat production, body size and sturdiness. However, the meat industry has demanded products of higher quality. Thus, in the last 5 years, specifically with respect to meat production, the cross between Angus (taurine) and Nelore (zebu) breeds has been growing in Brazil. Indiscriminate crossing of Nelore cattle may result in a dilution of the breed and a decline in their number which may result in complete genetic extinction. Consequently, the conservation of the original breed is necessary (Reddy et al. 2016).

Despite this trend in the market, Nelore still comprises up to 80% of the national cattle of bovine breeds raised for meat, mostly due to its combination of productivity and adaptability to the tropics (Júnior et al. 2016). The states of Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, and Goiás, a region known as Central Brazil, hold 43% of the country bovine cattle composed of Nelore breed (IBGE 2017).

Cytogenetic studies are highly useful for genetic characterization and for effective conservation of the species seriously at risk of extinction (Bharti et al. 2017). Genotype-based selection could be a powerful tool to assist farmers on making decisions regarding phenotype/genotype correlations and their interaction with the environment when managing their herds (Paulino et al. 2014).

Despite the extensive genomic investigation in cattle, not so many novelties are reported about bovine chromosomes that could be an excellent and inexpensive tool to provide important pieces of information useful for animal characterization, herd management, and evolutionary studies of breeds (David et al. 2014). The application of cytogenetic techniques has led to a simple cytological determination of the two main subspecies used in formation of domestic cattle breeds – *Bos taurus taurus* Linnaeus, 1758, Y(BTA) is submetacentric, and *Bos taurus indicus* Linnaeus, 1758, Y(BIN) is acrocentric (Halnan and Watson 1982). In their karyotypes, the X chromosome is always the only morphologically distinguishable chromosome among monotonously acrocentric metaphases, being large and submetacentric (Raudsepp and Chowdhary 2016).

For correct identification of individual chromosomes, several banding techniques were developed, broadly divided into two categories: those that produce bands along the entire chromosome (Q, G, and R) and those that mark specific regions of each chromosome (C, T, or NOR) (Miranda and Mattevi 2011). Among other breeds of BIN cytogenetically studied, Nelore cattle in Brazil are still not so exploited, due to the difficulty to standardize and update the cytogenetic techniques commonly used to study chromosomes, for example, the time necessary to culture cell and preparation of slides with material for banding techniques.

We are presenting in this work the necessary characterization of Nelore's chromosomes using G-, C-, and NOR-banding methodologies.

Material and methods

Biological samples were collected from four animals (2 male, 2 female), products industrial breeding Nelore, belonging to the study station of the Faculty of Agrarian of Biological Sciences / Pontifical Catholic University of Goiás. The herd maintained at lots of 28 m² of pasture and fed with fodder twice a day. Both males were 28 months old, weighing about 430kg. Both females were 35 months old, weighing about 480 kg. Blood samples of about 3ml of peripheral blood from the external jugular vein of each animal were kept in vacuum tubes containing heparin to prevent blood clotting and cooled on ice until arriving at the laboratory. Conventional cytological techniques were applied adapted to local and laboratory conditions of peripheral blood culturing and chromosome preparation (Verma and Babu 1995; David et al. 2014; Rosetto 2015).

Cell culture and cytological preparation

Cell culture was performed from 1ml of blood sample transferred into RPMI 1640 (Gibco RPMI 1640 Medium) (4ml), enriched with FBS (Fetal Bovine Serum, Gibco (1ml), PHA (Phytohemagglutinin, Gibco) and antibiotics (Penicillin G sodium salt, Sigma-Aldrich) (100U/ μ L). The cell suspension was stored in an incubator at 38 °C under 5% of carbon dioxide (CO₂) for 71 hours. After this time, 75 μ l of colchicine (Colcemid, Gibco) was added and incubation continued for an additional 30 minutes. Subsequently, samples were transferred to a 15ml conical tube and centrifuged for 10 minutes at 1000rpm, and then the supernatant was discarded (leaving about 1ml of material in the tube). A total of 10ml of hypotonic solution (KCl at 0.075 M) was added into the tube and incubated for 35 minutes at 38 °C, 5% CO₂. The cells were then fixed with Carnoy's solution (3 parts of methanol to 1 part of acetic acid), fixation was performed for 10 minutes at room temperature and immediately centrifuged for 10 minutes at 1000rpm. The cell pellet was fixed by three successive washes with the fixative, until the material became clear. Fixed cells were maintained in a suspension with 5ml of fixative in the refrigerator until the time of chromosomal analysis.

C-banding

The cell suspension was dropped on a microscope slide over a water-bath steaming at 60 °C. Slides were previously cleaned and degreased to guarantee adequate spreading of metaphases. Metaphase spreads were aged in the refrigerator for 2 days. Subsequently, the slides were soaked in 0.2N HCl solution for 10 min, rinsed in distilled water. DNA denaturation was carried out in a solution of 5% barium hydroxide for 15 min at 37 °C, slides were rinsed in distilled water at room temperature. After drying, the slides were stained with 10% Giemsa's solution for 5 minutes (KaryoMAX Giemsa Stain Solution).

G-banding

For the GTG banding, slides with the metaphase spreads were stored at room temperature for 7 days. After aging, slides were treated in 0.025% trypsin solution (Gibco) diluted in 4mL of PBS at 37 °C for 6–7 seconds. Afterwards, slides were stained in 5% Giemsa's solution for 5 minutes (KaryoMAX Giemsa Stain Solution).

NOR banding

Ag-staining of NORs (Nucleolus Organizer Regions) was carried out after aging the slides for 2 days in a refrigerator. Subsequently, 2 drops of 50% silver nitrate (AgNO₃, Sigma-Aldrich) and 2 drops of 2% gelatin diluted in 1% formic acid were added to the material and covered by a glass coverslip. The slide was then placed into a humid chamber at 65 °C protected from light for a time ranging from 3 to 5 minutes until the slide surface showed a copper-like color.

Analysis of metaphases and chromosomal measurement

Metaphases were captured using white light microscopy with the aid of a karyotyping station consisting of a microscope Axioplan 2 Imaging (Carl Zeiss, Alemanha) with motorized platinum controlled by Metafer 3.4.0 software (Metasystems Corporation, Germany). Captured images were analyzed using IKAROS (Metasystems Corporation, Germany).

Twenty metaphases of each animal were analyzed. The lengths of chromosomes in micrometers were measured in mitotic metaphase of male and female cells. Karyotype symmetry/asymmetry index (S/AI), the mean length of short arm (Ls), length of long arm (Ll), total length of arm (LT), arm ratio (AR-long/short chromosome), centromeric index (CI) and type of chromosome and formula were estimated according to Eroğlu (2015).

All chromosomes measurements were translated by computation using software IKAROS (Metasystems Corporation, Germany), after pairing each pair of homologs in G- banded karyotype. Homologs were paired for all four animals, according to sex, and the final chromosome measurement corresponded to arithmetic mean of individual estimation for each chromosome.

Results and discussion

The study of Brazilian Nelore cattle adds to the list of the zebu (*B. t. indicus*) breeds so far karyologically investigated. The diploid number in all 4 studied animals was found to be 60, consisting of 29 pairs of autosomes and one pair of sex chromosomes – the kar-

yotype constitution, common to domestic cows of taurine/*B. taurus* and zeburine/*B. indicus* origin and established in all former reports (Wurster and Benirschke 1968; Evans et al. 1973; Mayr and Gruber 1986).

The Brazilian Nelore line originated from Ongole, a predominant breed in India (Oliveira et al. 2002). Our results were similar to those of Bharti and collaborators (2017) characterized the Ongole cattle with 29 acrocentric autosomal chromosomes and the sexual pairs, chromosome X as large submetacentric and chromosome Y as small acrocentric, thus suggesting common chromosome architecture of the Nelore cattle with that of other recognized breeds of BIN.

The measures for autosomes did not vary between male and female. Therefore, here we show the corresponding figures for the males in order to show all autosomal and both heteromorphic sex chromosome for the studied subspecies. All chromosomes measurements were represented in Table 1.

The chromosome pairs indicate evidence of interchromosomal asymmetry. S/AI for Nelore karyotype was 2.97 and 2.98 for female and male animals, respectively, classified its karyotype between symmetric and asymmetric, most likely due to the presence of the X chromosomes. The karyotype formulae were also different for male and female Nelore cows, corresponding, respectively, to 1SM+59A and 2SM+58A. For additional discussion about the importance to know the values of the karyotype symmetry/asymmetry in higher animals, readers are strongly advised to read the work of Eroğlu (2015).

With respect to sex chromosomes in Nelore, in our results the ratio between X and Y chromosomes was 2.45 indicating a remarkable in level of allosomic heteromorphism, a common observation among animals harboring XY sex determination mechanism, leading to an evolutionary stronger reproductive isolation (Lima 2014).

Chromosome X is relatively a few larger than chromosome 1, the largest acrocentric chromosome in the bovine karyotype. X/1 proportion is close to one (1,1 μ m). On the other hand, Y chromosome is close in size to autosomal chromosomes 24 (BIN), with an average size of 29,5 μ m then compared to the smallest acrocentric chromosome 29 (BIN), Y/29 proportion was found to be 1,3. Due to its acrocentric morphology and its small size, the Y chromosome of Nelore can easily be confused with several other small autosomal chromosomes that are also acrocentric. Here we report difficulty in the identification of Y(BIN) when relying only on Giemsa staining, just as reported by Melo (2009).

However, C-, GTG-, and NOR-banding provided a better morphological characterization of all chromosomes, including Y chromosome in Nelore, facilitating the proper differentiation of autosomal and sexual chromosomes for the breed.

In our case, Y is acrocentric, as in the first descriptions of the zebu karyotype (Halnan and Watson 1982.) This decision was made based on arm ratio and centromeric index (CI) for all Y chromosomes measured. Acrocentric chromosomes generally show an extend satellite and visually may suggest the shape of submetacentric chromosomes.

C-banding demonstrated dark bands (C-positive) on all centromeric region of autosomes, analyzed in the bovine material which showed well-defined heterochromatin

Table 1. The average measurements and arm ratio of the entire chromosome complement for male *Bos taurus indicus* Linnaeus, 1758, after homologs were paired up following GTG- banding.

Chromosome pair	Total length (µm)	Long arm (µm)	Short arm (µm)	Arm ratio (long/short)	Centromeric index	Chromosome type
1	67,9	61,7	6,2	9,952	9,131	A
2*	60,9	54,3	6,6	8,227	10,837	A
3*	57,8	51,8	6	8,633	10,381	A
4*	56,7	50,8	5,9	8,610	10,406	A
5	53,5	48,4	5,1	9,490	9,533	A
6	52,6	46,9	5,7	8,228	10,837	A
7	49,9	44,6	5,3	8,415	10,621	A
8	50,5	45,1	5	8,352	10,693	A
9	49,5	44,4	5,1	8,706	10,303	A
10	47,4	42,2	5,2	8,115	10,970	A
11*	45,6	40,6	5,0	8,120	10,965	A
12	42,2	37	5,2	7,115	12,322	A
13	38,7	33,1	5,6	5,911	14,470	A
14	40,3	35	5,3	6,604	13,151	A
15	38,5	33,5	5,0	6,700	12,987	A
16	38,6	33	5,6	5,893	14,508	A
17	37,8	32,2	5,6	5,750	14,815	A
18	35,6	30,2	5,4	5,593	15,169	A
19	33,5	28	5,5	5,091	16,418	A
20	32,3	26,4	6	4,475	18,266	A
21	31,7	26,5	5,2	5,096	16,404	A
22	32,2	26,9	5,3	5,075	16,460	A
23	31	26,1	4,9	5,327	15,806	A
24	29,5	24,2	5,3	4,566	17,966	A
25*	28,2	23	5,2	4,423	18,440	A
26	26,5	21,3	5,2	4,096	19,623	A
27	26,6	21,5	5,1	4,216	19,173	A
28*	25,3	20,2	5,1	3,961	20,158	A
29	22,6	18	4,6	3,913	20,354	A
X	66,6	44,2	22,4	1,973	33,634	SM
y	29,4	23,7	5,7	4,2	19,388	A

Note: A: acrocentric; SM: submetacentric.

*Nucleolus organizer chromosomes.

blocks. Stranzinger et al. (2007), studied the polymorphism of chromosome Y in various breeds of cattle (*Bos taurus*) in Switzerland, showed the C-negative X chromosome and C-positive Y chromosome from C-banding. However, in the animals in this study no dark bands (light or C-negative) were identified on the X and Y chromosomes (Figure 1).

The GTG banding provides alternated light and dark bands on the chromosomes, the distribution of these bands is different for each chromosome, facilitating the identification of the homologous pairs. Pinheiro et al. (1984) analyzed the BIN and BTA bovine chromosomes by G bands and found that the pattern of bands presented by the chromosomes was identical and that the difference between these animals was evidently genic.

Thus, in the GTG banding analysis the haploid set of Nelore cattle consists of 29 autosomes and 1 sexual pair including X and Y chromosome. The pair composition

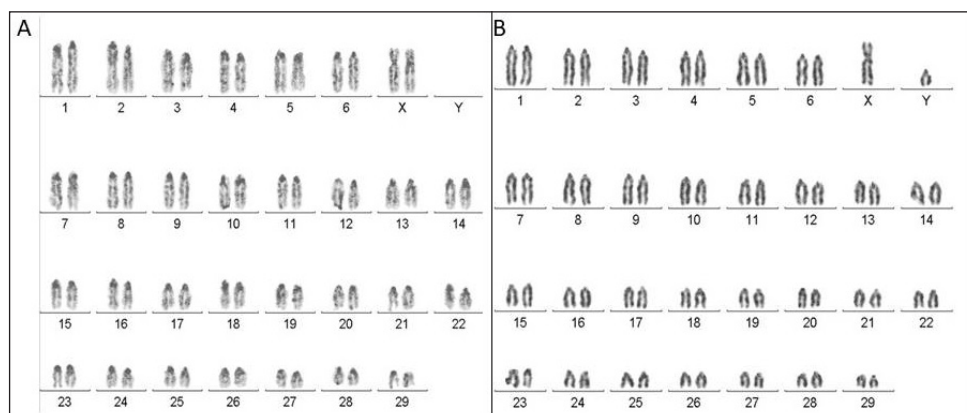


Figure 1. C-banded bovine chromosomes of Nelore breed. **A** female (XX) **B** male (XY).

presented in Figure 2 follows the nomenclature of the standard GTG-banded cattle karyotype (Di Berardino et al. 2001). In addition, the GTG banding can serve as a guide for the diagnosis and association of possible chromosomal alterations, being considered a differential technique for the characterization of species at chromosome levels (Rosetto 2015).

In spite of the diverse qualities that the GTG- banding provides, it requires an extended time of 7 days for preparation of the slides, along with the obtaining of metaphases in good condition for the analysis of the chromosomes.

The NOR technique, initially described by Mayr and Gruber (1986), revealed 5 pairs of the zebu (*B. indicus*) chromosomes 2, 3, 4, 11 and 28 with the nucleolar organizer regions located on the long arms. That was considered an important discovery in the conserved regions in the genus *Bos* Linnaeus, 1758 and may vary within species BTA and BIN. There are genomic controversies in the literature regarding the location of the nucleolar organizer regions in the *Bos taurus* species, some breeds presented six pairs of NORs in chromosomes 2, 3, 4, 11, 25 and 28, whereas others presented 5 pairs in chromosomes 2, 3, 4, 11 and 25 respectively (Melo 2009).

The seven nucleolus organizing regions (NORs) were located on the autosomal chromosomes of cattle Nelore. The four animals that made up the sample group in this study presented the NORs in the same chromosomal pairs, which are the autosomal pairs 2, 3, 4, 11, 22, 25 and 28 shown in figure 3. In contrast, Mayr and Gruber (1986) indicated that NORs of the cattle BIN appear on eight positions of the long arm of the pair autosomes 2, 3, 4 and 28.

Jantarat and colleagues (2009) performed the banding in C, G and NOR Thai's native cattle (*Bos taurus indicus*) and the results were compared to our study. There was a difference in the result of the NOR technique, the Thai's native cattle presented NOR in three pairs of autosomal chromosomes whereas for the studied Nelore breed, seven pairs of chromosomes presented the silver placement in the telomeric region.

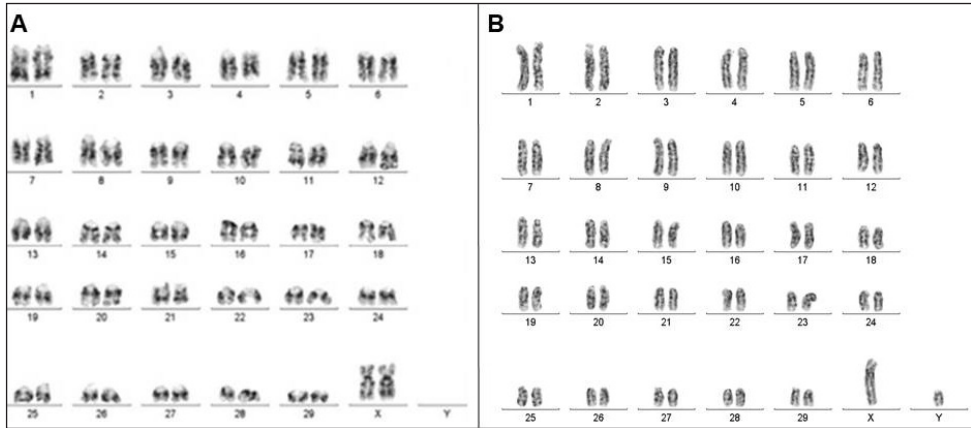


Figure 2. GTG-banding profile for the pairing of the chromosomes of the Nelore karyotype. **A** female (XX) **B** male (XY).

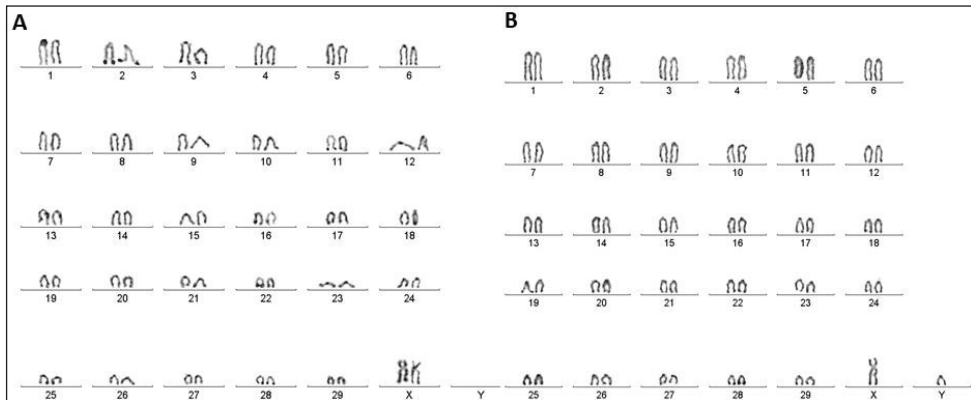


Figure 3. The nucleolus organizer regions on the long arm of the pairs of autosomal chromosomes 2, 3, 4, 11, 22, 25, and 28 by NOR-banding technique in female and male respectively. **A** female (XX) **B** male (XY).

Conclusion

About 80% of the Brazilian herd is composed of zebu breeds (*Bos t. indicus*), animals with more rusticity and easy adaptation to the predominant environment in the country (Amaral et al. 2012). Among these breeds, Nelore stands out the beef cattle with the greatest expansion in the central-west region. Therefore, it is important to study the cytogenetics of this group, being the most used chromosome banding techniques (CRPBZ 2015).

There was no cytogenetic characterization by banding techniques (C-, GTG- and NOR) for the Nelore Brazilian breed. For the animals of this study, the C banding made possible an exact identification of the acrocentric chromosomes. The technique GTG-banding provided the correct characterization of the pairs homologues, espe-

cially the autosomal chromosomes of cattle that are all acrocentric. In particular, the in this study it was possible to identify nucleolus organizing regions in other chromosomes, different from what was already known for subspecies *Bos t. indicus*.

The variation in the composition of the chromosomes that make up the national herds, especially those in this study, can be explained by the many preceding intersextions and inbreeding. This management practice is commonly used to increase the herd of animals with favorable traits. Therefore, our observation can be in correspondence to the work of Carneiro et al. (2007) which refers to genetic diversity and genealogical control of the Nelore breed.

In addition to the banding techniques excellent for studies of morphology and chromosome classification, instead of new cytogenetic methodologies, such as Fluorescent In Situ Hybridization (FISH) and High Resolution Banding, can be used to understand chromosomal rearrangements and to clarify phenomena that may be related to the integrity of bovine genetic material (Luna 2012, De Lorenzi et al. 2017).

Acknowledgments

The authors are grateful to the School of Agrarian and Biological Sciences of the Pontifical Catholic University of Goiás (PUC-Goiás) for authorizing the collection of bovine samples. We are also grateful for both Replicon Research Group of Pontifical Catholic University of Goiás and Human Cytogenetics and Molecular Genetics Laboratory of Health Secretary of Goiás State for logistical support for the execution of this study. The study was funded by the Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Ensino Superior (CAPES) and from the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Goiás (FAPEG).

References

- Amaral G, Carvalho F, Capanema L, Carvalho CA (2012) Panorama da pecuária sustentável. BNDS Setorial 36: 249–288.
- Bharti A, Panduranga Reddy P, Gnana Prakash M, Sakaram D (2017) Cytogenetic characterization of ongole cattle. International Journal of Advanced Biological Research 7(3): 574–577.
- Carneiro TX, Gonçalves EC, Schneider MPC, Silva A (2007) Diversidade genética e eficiência de DNA microssatélite para o controle genealógico da raça Nelore. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia 59(5): 1257–1262. <https://doi.org/10.1590/S0102-09352007000500024>
- CRPBZ – Centro de Referência da Pecuária Brasileira – ZEBU. Zebuicultura 2015. <http://www.zebu.org.br/Home/Secao/9331> [accessed: 10 May 2019]
- David JAO, Aguiar LL, Mainardi VF (2014) Aplicações da citogenética em ciência animal. Deminicis BB, Martins CB (Eds) Caufes. 1ª Tópicos Especiais em Ciência Animal III. Alegre, Espírito Santo, Brasil, 222–228.

- De Lorenzi L, Iannuzzi A, Rossi E, Bonacina S, Parma P (2017) Centromere Repositioning in Cattle (*Bos taurus*) Chromosome 17. *Cytogenetic and Genome Research* 151: 191–197. <https://doi.org/10.1159/000473781>
- Di Berardino D, Iannuzzi L (1981) Chromosome banding homologies in swamp and murrh buffalo. *Journal of Heredity* 72: 183–188. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jhered.a109469>
- Di Berardino D, Di Meo GP, Gallagher DS, Hayes H, Iannuzzi L (2001) ISCNDB2000 International system for chromosome nomenclature of domestic bovids. *Cytogenetics and Cell Genetics*, 92: 283–299. <https://doi.org/10.1159/000056917>
- Eroğlu H (2015) Which chromosomes are submetacentric or acrocentric? A new karyotype symmetry/asymmetry index. *Caryologia* 68: 1–7. <https://doi.org/10.1080/00087114.2015.1032614>
- Evans HJ, Buckland RA, Sumner AT (1973) Chromosome homology and heterochromatin in goat, sheep and ox studied by banding techniques. *Chromosoma (Berlin)* 42: 383–402. <https://doi.org/10.1007/BF00399407>
- Halnan CRE, Watson JI (1982) Y chromosome variants in cattle *Bos taurus* and *Bos indicus*. *Annales de génétique et de sélection animale, INRA Editions* 14(1): 1–16. <https://doi.org/10.1186/1297-9686-14-1-1>
- IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Diretoria de Pesquisas, Coordenação de Agropecuária, Pesquisa da Pecuária Nacional 2017. <http://www.ibge.gov.br> [accessed: 20 January acessado 2019]
- Júnior CPB, Borges LS, de Sousa PHAA, de Oliveira MRA, Cavalcante DH, de Andrade TV, Barros CD, Sousa Júnior SC (2016) Melhoramento Genético em Bovinos de Corte (*Bos indicus*) Efeitos ambientais, melhoramento genético animal, pecuária de corte, peso ao desmame. *Nutri Time* 13(1): 4558–4564.
- Lima TG (2014) Higher levels of sex chromosome heteromorphism are associated with markedly stronger reproductive isolation. *Nature Communications* 5(4743). <https://doi.org/10.1038/ncomms5743>
- Luna HS (2012) Citogenética clássica aplicada ao monitoramento de germoplasma bovino. *Revista Brasileira de Reprodução Animal, Belo Horizonte, Minas Gerais, (Brasil)* 36(2): 84–93.
- Mayr B, Gruber K (1986) Nucleolus organizer regions and heterochromatin in the zebu (*Bos indicus* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 73: 832–835. <https://doi.org/10.1007/BF00289387>
- Melo TC (2009) Avaliação de aberrações cromossômicas em bovinos (*Bos taurus taurus*) infectados pelo papilomavírus bovino. Ph.D. Dissertation, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil.
- Miranda JA, Mattevi MS (2011) Técnicas de bandeamento e coloração cromossômica. Maluf SW, Riegel M Ed Artmed. *Citogenética Humana, (Brasil)* 63–69.
- Oliveira JHR, Magnabosco CU, Borges AMSM (2002) Nelore: base genética e evolução seletiva no Brasil. *Documentos/Embrapa Cerrados (INFOTECA-SE), Planaltina, Distrito Federal (Brasil)* 49: 54 pp.

- Oliveira Júnior GA, Perez BC, Ferraz JBS (2017) Genomics applied to puberty in beef cattle (*Bos indicus*). *Revista Brasileira Reprodução Animal*, Belo Horizonte, Minas Gerais (Brasil) 41(1): 264–269.
- Paulino MF, Detmann E, Silva GA, Almeida MA, Márquez CED, Moreno SPD, Moura HF, Cardenas GE, Lima CAJ, Martins SL, Manso RM, Ortega MER, Lopes AS, Carvalho VV (2014) Bovinocultura otimizada. 9a Simpósio internacional de produção de gado de corte, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais (Brasil), 139–164.
- Pinheiro LEL, Ferrari I, Ferraz JBS, Almeida JR (1984) Heteromorfismo cromossômico na raça caracu. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, Belo Horizonte 8 (1): 17–20.
- Raudsepp T, Chowdhary BP (2016) Chromosome Aberrations and Fertility Disorders in Domestic Animals. *Annual Review of Animal Biosciences*, 4: 15–43. <https://doi.org/10.1146/annurev-animal-021815-111239>
- Reddy PRK, Reddy AN, Ramadevi A, Kumar DS (2016) Nutritional significance of indigenous cow milk with regard to A2 beta casein – An overview. *International Journal of Science, Environment and Technology* 5(5) 3376–3380.
- Rosetto CFR (2015) Avaliação do bandeamento cromossômico por digestão enzimática e tratamento com solução tampão citratado. Ph.D. Dissertation, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Faculdade de Medicina de Botucatu, São Paulo.
- Jantarat S, Tanomtong A, Kakampuy W, Kaewsri S, Buranarom K (2009) Standardized karyotype and idiogram of Thai's native cattle, *Bos indicus* (Artiodactyla, Bovidae) by convention staining, G-banding, C-banding and NOR-banding techniques. *Thai Journal of Genetics* 2(2): 164–174. <https://doi.org/10.14456/tjg.2009.15>
- Stranzinger GF, Steiger D, Kneubuhler J, Hagger C (2007) Y chromosome polymorphism in various breeds of cattle (*Bos taurus*) in Switzerland. *Journal of Applied Genetics* 48: 241–245. <https://doi.org/10.1007/BF03195218>
- Verma RS, Babu A (1995) *Human chromosomes principles and techniques*. 2nd edn. McGraw-Hill, New York, 419 pp.
- Wurster DH, Benirschke K (1968) Chromosome studies in the superfamily Bovidae. *Chromosoma* (Berlin) 25: 152–171. <https://doi.org/10.1007/BF00327175>

6.2 CAPÍTULO II – ARTIGO A SER SUBMETIDO

CONSTRUÇÃO DE SONDA PANCENTROMÉRICA PARA *Bos taurus* Linnaeus, 1758.

Andréia Pires Amancio^{1,2}, Rafael Carneiro Silva², Alex Silva da Cruz^{2,3}, Rajib Deb⁵, Rafequee Rahman⁵, Claudio Carlos da Silva^{1,2,3,4} e Aparecido Divino da Cruz^{1,2,3}.

¹ Programa de Pós Graduação em Biotecnologia e Biodiversidade, Universidade Federal de Goiás, Rede Pró Centro Oeste de Pós-Graduação de Pesquisa e Inovação, Rua 235, n. 40, Setor Leste Universitário, Goiânia, GO 74605-050, Brasil.

² Núcleo de Pesquisas Replicon, Programa Mestrado em Genética, Escola de Ciências Agrárias e Biológicas, Pontifícia Universidade Católica de Goiás, Rua 235, n. 40, Setor Leste Universitário, Goiânia, GO 74605-050, Brasil.

³ Laboratório de Citogenética Humana e Genética Molecular, Secretaria de Saúde do Estado de Goiás, Goiânia, GO, Brasil.

⁴ Universidade Estadual de Goiás, Campus Eseffego, Goiânia, GO, Brasil.

⁵ Central Institute of Fisheries Technology - Indian Council of Agricultural Research, Nova Deli, Indian.

Autor correspondente: Andréia Pires Amancio (andreaamancio5@gmail.com)

RESUMO

O objetivo desse estudo foi construir sondas a partir do DNA bovino, para marcar os cromossomos autossômicos em animais *Bos taurus indicus* Linnaeus, 1758. As sondas cromossômicas foram obtidas a partir da análise no banco de dados do genoma bovino. Foram confeccionados *primers* específicos, amplificados, marcado por *nick translation* e sequencialmente a sonda foi hibridizada em metáfases bovinas. A técnica de FISH (*Hybridization in situ fluorescent*) mostrou uma excelente especificidade nas metáfases da espécie investigada. As regiões centroméricas dos 29 pares dos cromossomos autossômicos foram identificadas simultaneamente, não houve marcação nos pares sexuais. Esse resultado permitiu avanços para análise cariotípica nos ruminantes domésticos. A resolução de cariótipos complexos por FISH é particularmente útil, em especial para os bovinos. Os cromossomos desse gênero são caracterizados como pequenos e semelhantes, de difícil identificar. A caracterização de cromossomos pequenos e semelhantes é inerente ao gênero *Bos*. A técnica de FISH representa uma ferramenta prática para estudos estruturais e numéricos, auxiliando no diagnóstico de anormalidades cromossômicas, monitorar a saúde reprodutiva e até para cariótipo comparativo entre diferentes espécies. As etapas padronizadas poderão direcionar os procedimentos de construção de sondas cromossomo-específicas para outros cromossomos da espécie utilizada nesse trabalho, bem como poderão ser aplicadas em outros animais domésticos.

Palavras-chaves: Citogenética; Cariótipo; FISH; *Bos taurus indicus*.

INTRODUÇÃO

O avanço da citogenética animal se deve em parte ao aprimoramento das técnicas de bandeamento cromossômico, que ainda são os procedimentos mais usados para a análise cariotípica das espécies. Os métodos de cariotipagem geram informações padronizadas e bem estabelecidas para se compreender as variações entre as espécies e para as inferências evolutivas entre os grupos. Em especial, a análise e a caracterização citogenética dos animais domésticos, ainda são feitas aplicando-se os métodos clássicos de bandeamento, incluindo C, GTG e NOR (IANNUZZI; BERARDINO, 2008).

Com o surgimento das ferramentas citogenéticas moleculares baseadas em Hibridização *in situ* Fluorescente (FISH) houve melhora significativa no conhecimento sobre a estrutura e a organização dos cromossomos, assim como o aperfeiçoamento na detecção de alterações cromossômicas não identificadas através das análises cromossômicas convencionais. Além disso, foi possível reconhecer os cromossomos como marcadores da variação entre espécies e subespécies (SENE, 2011).

As aplicações do FISH em animais domésticos e humanos são muito parecidas, sendo mais frequentemente aplicada na detecção de aberrações cromossômicas, na avaliação de cariótipos complexos, no mapeamento comparativo e na inferência acerca da evolução dos cromossomos em grupos taxonomicamente próximos (PAUCIULLO *et al.*, 2014). No entanto, apesar da similaridade de interesses, existe uma diferença substancial de quantidade de sondas comercialmente disponíveis para se estudar os cromossomos humanos, quando comprado com os animais.

Em geral, as sondas cromossômicas para animais se restringem aos cromossomos sexuais na maioria das espécies domésticas e a dois autossomos em bovinos para a detecção de translocações Robertsonianas que são os rearranjos cromossômicos detectados em bovinos, a mais frequente é a translocação rob (1; 29) (BARASC *et al.*, 2018).

De acordo com RUBES e colaboradores (2009), em especial para os bovinos, além do alto custo, apenas alguns laboratórios de excelência no mundo disponibilizam sondas cromossômicas, limitando-se assim a aplicação do método a poucos grupos de pesquisa.

O objetivo do presente estudo foi construir uma sonda pancentromérica para quantificar os cromossomos metafásicos de bovinos, marcada por *nick translation* para ser usada em reações de FISH. Neste sentido, o conhecimento e análise na quantidade

de cromossomos da espécie *Bos taurus indicus* por pintura cromossômica podem fornecer informações significativas sobre alterações, mecanismos de diversificação cromossômica e contribuir com estudos evolutivos neste grupo.

MATERIAIS E MÉTODOS

Inicialmente, o genoma bovino da subespécie *Bos taurus indicus* Linnaeus, 1758, disponível no banco de dados do NCBI foi analisada. Na plataforma do NCBI, foi selecionado o BIN1 (*Bos t. indicus*), por ser o maior acrocêntrico na subespécie, e a partir dele foram desenhados *primers* correspondentes às regiões próximas ao centrômero. Essas regiões costumam ter sequências que são conservadas e se repetem por todos os cromossomos.

Os animais que compuseram o grupo controle eram bovinos zebuínos da raça Nelore, dois machos e duas fêmeas saudáveis. E quatro fêmeas taurinas da raça Honlandesa, essas fêmeas apresentavam um quadro de subfertilidade.

As regiões pericentroméricas selecionadas foram amplificadas mediante a Reação em cadeia da Polimerase (PCR) (do inglês, *Polymerase Chain Reaction*) usando os *primers* CATTLE F - senso (5'AGGGGCCTTCTCCAGATGAT3') e CATTLE R – antisenso 5'AAGGCACCATCCACTTCGAG3'). A amplificação por PCR gerou um produto de 1.901 pb para a região centromérica, sendo o tamanho do produto amplificado verificado em gel de ágarose a 1%.

O mix da reação foi preparado para um volume final de reação de 25,0 µL, sendo 4,0 µL de Tampão 5x da *Phusion® High-Fidelity DNA Polymerases* (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EUA), 2,50 µL contendo 10 pmoles de cada oligonucleotídeo iniciador (*Foward* e *Reverse*), 1,0 µL de mix de dNTPs (10 mM de cada nucleotídeo), 0,3 µL de *Phusion® High-Fidelity DNA Polymerases*, 12,7 µL de água ultra pura e 100 ng/µL de DNA genômico total.

Os ciclos de temperatura foram compostos por uma primeira etapa de desnaturação inicial a 95°C por 3 minutos, seguido de 40 ciclos de 95°C por 30 segundos (desnaturação), 66°C por 30 segundos (anelamento) e 72°C por 1 minuto e 20 segundos (extensão). Ao final, um único ciclo de extensão de 10 minutos a 72°C foi acrescido ao protocolo de termociclagem. O produto da PCR (15,0 µL) foi submetido à eletroforese em gel de agarose a 1%. O *amplicon* foi recortado do gel de agarose,

purificado e quantificado para ser reamplificado na reação de *nick translation* para marcação da sonda.

Reação Semi-Nested PCR e *Nick Translation*[®]

Os *amplicons* produzidos por PCR foram reamplificados por *Semi-Nested PCR*, usando os mesmos *primers* e o protocolo da técnica de *Nick Translation*[®] (Vysis[™]) para a marcação da sonda com *SpectrumGreen*[™] *direct-labeled* dUTP (Vysis[™]). Foi adicionado ao mix da reação 5,0 µL de produto de PCR purificado, contendo 1,0 µg de DNA, 2,50 µL de *SpectrumGreen*[™] *direct-labeled* dUTP (0,2 mM), 5,0 µL de dTTP (0,1 mM), 10,0 µL de dNTP mix (0,3 mM de dATP, dCTP e dGTP), 10,0 µL de enzima *Nick Translation Enzyme*. O volume final da reação foi ajustado para 50 µL com água livre de nuclease. Posteriormente, o mix foi incubado por 2 h a 15°C e depois aquecido a 70°C por 10 minutos. Após esse período de incubação, o produto foi precipitado com etanol absoluto e acetato de sódio (50M).

A amostra foi centrifugada por 30 minutos à 12.000rpm, descartou-se o sobrenadante e após 10 minutos em temperatura ambiente, o DNA foi ressuspensão em 3,0 µL de água livre de nuclease e 7,0 µL de tampão de hibridização (*Hybridization CGH buffer*, Vysis[™]), volume final para 10,0 µL. Ao final, o produto se constituiu na sonda marcada, que foi armazenada sob refrigeração e ao abrigo de luz até o uso, que revelaria na cor verde a região centromérica dos BINs.

Hibridização Fluorescente *in situ* (FISH)

As lâminas utilizadas para o FISH continham metáfases obtidas por meio de cultura de linfócitos, depois de gotejadas as mesmas foram mantidas a -20°C por 24 horas. Para a fixação do material, as lâminas foram desidratadas a temperatura ambiente por 1 minuto em série de solução aquosa de etanol a 70% e 85% e etanol PA (100%). Posteriormente, a sonda preparada e marcada com o *SpectrumGreen*[™] *direct-labeled* dUTP, foi aplicada sobre a lâmina, coberta por uma lamínula (24x24mm) e mantida no hibridizador HYBrite[®] (Vysis[™]) passando pela etapa de co-desnaturação por 5 minutos a 74°C e anelamento por 48h a 37°C. Na tabela 1 pode ser visualizado as etapas da hibridização das amostras.

Tabela 1. Etapas da hibridação dos fragmentos marcados por *nick translation* envolvendo a co-desnaturação do DNA alvo e da sonda marcada.

Etapas	Temperatura (°C)	Tempo	Ciclos
Co-desnaturação inicial	74	5 minutos	1
Anelamento	37	48 horas	1
Armazenamento	4	∞	∞

Após a hibridização, a lamínula foi cuidadosamente removida e realizada as lavagens adstringentes ao abrigo da luz a 72°C para a remoção do excesso de sondas não hibridizadas. As soluções de lavagem foram *UltraPure™ 20X SSC Buffer* (Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EUA) a 0,04% por 2 minutos, seguido de lavagem em solução de *UltraPure™ 20X SSC Buffer* com 0,05% de Tween® 20 (USB Corporation, Cleveland, EUA) por 1 minuto. Foi retirado o excesso de solução e em seguida as células foram contra coradas com 10,0 uL de DAPI Antifade (4',6-Diamidino-2-Phenylindole) (Cytocell, Cambridge). As lâminas foram mantidas em geladeira por 10 minutos, previamente ao início das análises.

As imagens foram capturadas em um microscópio Axioplan 2Imaging® (Carl Zeiss, Alemanha) com platina motorizada controlada pelo *software* Metafer® 3.4.0 (Metasystems Corporation, Alemanha) e analisadas com auxílio dos *softwares* ISIS® (Metasystems Corporation, Alemanha).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A metodologia do *nick translation* foi útil para marcar a sonda pancentromérica nos cromossomos autossômicos de *Bos taurus indicus* produzida a partir da amplificação por PCR de um segmento de 1.901 pb da região centromérica do BIN 1. A sonda preparada foi útil e eficiente para a quantificação de todos os cromossomos autossômicos da subespécie *Bos taurus indicus* nas metáfases, mediante o FISH.

A região escolhida do cromossomo 1 mostrou-se conservada em todos os outros autossômicos produzindo um padrão pancentromérico útil para a quantificação dos cromossomos bovinos. Na figura 1 mostra-se a metáfase capturada para os zebuínos, em **A** observa-se a metáfase de um macho (XY) e em **B** a metáfase de uma fêmea (XX). Nota-se ainda que os cromossomos sexuais, indicados pelas setas, não apresentaram nenhuma marcação.

Os sinais fluorescentes verdes indicam a região centromérica dos cromossomos autossômicos dos bovinos aqui analisados, região escolhida para marcação.

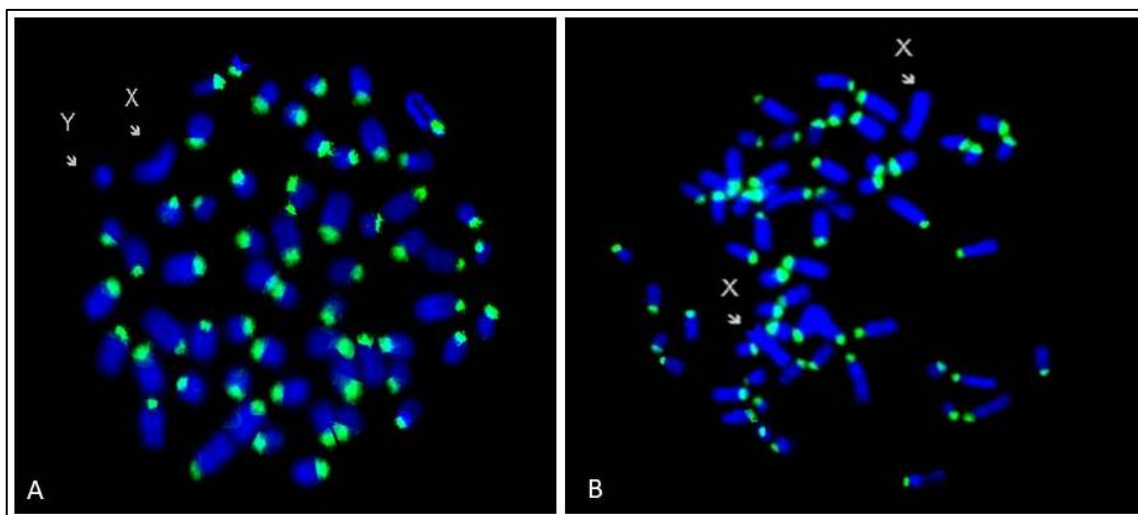


Figura 1. Os centromeros revelados pela hibridização de uma sonda de cerca de 1.900 pb desenhada para a região centromérica dos BINs da subespécie *Bos taurus indicus* Linnaeus, 1758.

Após a padronização da reação para a sonda pancentromérica, foram selecionadas quatro fêmeas da raça Holandesa (*Bos t. taurus*), que apresentavam um quadro de subfertilidade, para o FISH em cromossomos metafásicos. Esta abordagem foi importante para demonstrar a transferabilidade da sonda pancentromérica desenvolvida para *Bos taurus indicus* em *Bos taurus taurus*. Os animais foram escolhidos com subfertilidade na expectativa de que pudessem ser portadores de fusões cêntricas.

No entanto, todas as fêmeas analisadas apresentavam lote cromossômico correspondendo a $2n=60$, com 58 autossômicos acrocêntricos. Na figura 2 foi possível visualizar o sinal da sonda nos 58 cromossomos autossômicos, correspondendo a cariótipos sem alterações cromossômicas numérica e/ou estrutural. Uma vez que, em bovinos, os casos de subfertilidade comumente são resultados de translocações Robertsonianas envolvendo dois cromossomos autossômicos.

Nota-se que apesar da sonda ser desenhada para a região centromérica dos BINs da subespécie *Bos taurus indicus* Linnaeus, marcou os BTAs da subespécie *Bos taurus taurus*.

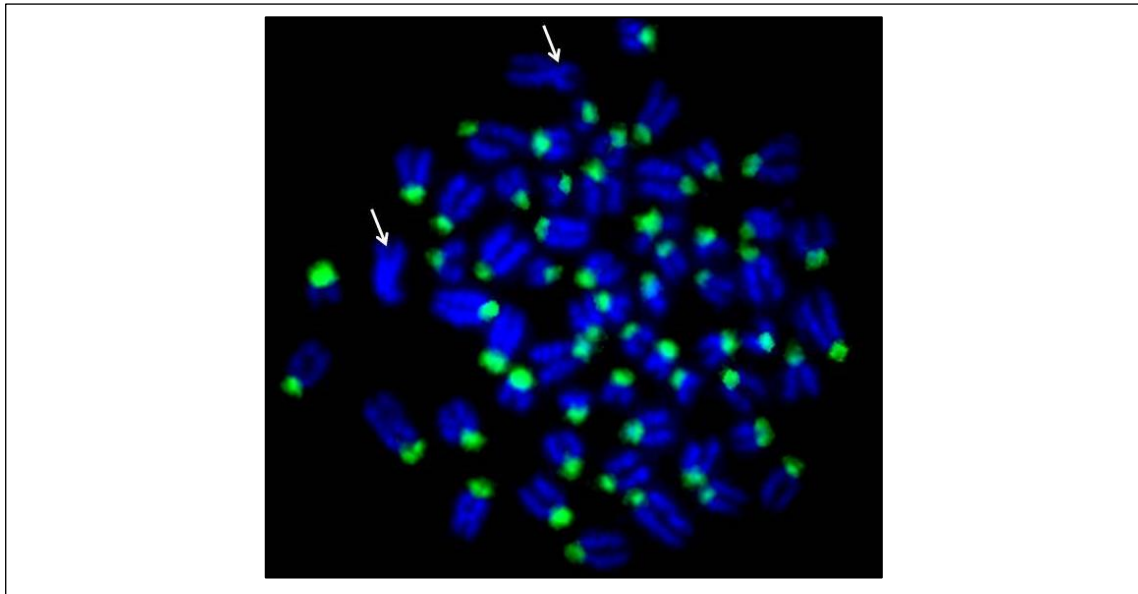


Figura 2. Os centrômeros dos cromossomos autossômicos revelados em verde pela sonda pancentromérica em uma fêmea da raça Holandesa.

Como já é bem estabelecida na literatura os animais da espécie *Bos taurus* possui todos os cromossomos autossômicos acrocêntricos, com um dimorfismo no cromossomo Y, tendo as subespécies representadas da seguinte forma, *Bos taurus indicus*, $2n=60$, BIN com cromossomo Y acrocêntrico e X submetacêntrico, e *Bos taurus taurus*, $2n=60$, BTA com cromossomos Y submetacêntrico e o X também submetacêntrico (MEO et al., 2005; LUNA, 2012; RAUDSEPP, CHOWDHARY 2016).

Para a obtenção do sinal nos centrômeros, foi realizada a marcação direta da sonda, com dUTP marcado com (*SpectrumGreen*TM *direct-labeled* dUTP) mediante *nick translation*. A marcação fluorescente direta, aproveitando os mesmos oligonucleotídeos iniciadores da PCR na reamplificação mediante uma *semi-nested* PCR, foi eficiente para produzir sondas a partir das sequências do DNA bovino, escolhidas na região pericentromérica do autossômico 1, a partir do genoma bovino da subespécie *Bos taurus indicus* disponível no banco de dados do NCBI.

BILTUEVA e colaboradores (2014) detectaram uma translocação em bovinos envolvendo os cromossomos 13 e 26, mediante pintura cromossômica usando a técnica de DOP-PCR (do inglês, *Degenerate Oligonucleotide-primed Polymerase Chain Reaction*) para preparar as sondas.

Nesse contexto, a técnica de DOP-PCR foi usada para marcar X e Y de espermatozoides bovinos (RENS et al., 2001). Porém, a técnica de DOP usa um *primer*

degenerado e a marcação é feita de forma indireta por um dUTP marcado com um fluorocromo. De acordo com PARRILLA (2003), a escolha do fluorocromo e do tipo de marcação interfere diretamente no nível de *background* e na qualidade da sonda, sendo necessário comparar diferentes métodos a fim de se encontrar um resultado aceitável.

SEBESTOVA *et al.*, (2016) construíram a partir da microdissecção a laser sondas cromossômicas para comparação morfológicas dos cromossomos de dois animais da família Bovidae. Como no presente estudo, os autores usaram o *SpectrumGreen*TM *direct-labeled* dUTP para marcar as sondas. No entanto, a reamplificação foi feita por DOP-PCR. Ao final, a DOP-PCR havia produzido muitas amplificações espúrias e inespecíficas, sendo necessário o uso de um DNA competidor para minimizar este efeito no sistema de amplificação da sonda.

O uso do *nick translation* possibilitou, tanto simplificação quanto redução no custo da metodologia, que facilitaria a sua adaptação por outros laboratórios. *Nick translation* e DOP-PCR têm sido usadas com relativo sucesso para produzir sondas WCP (do inglês, *Whole Chromosome Paintin*) para estudos de cromossomos animais, a exemplo do estudo de SOARES (2017), que fabricaram sondas do tipo WCP por DOP-PCR para cromossomos B de uma espécie de roedores (*Akodon montensis*) da Ilha de São Francisco do Sul, Santa Catarina.

Os métodos de reamplificação por *semi-nested* PCR e marcação por *nick translation* não envolveram manipulação extensiva das amostras e, portanto, o risco de contaminação foi menor do que em procedimentos de marcação, como a marcação por DOP-PCR, que é frequentemente usada para produzir sondas de DNA. Esses resultados contribuem para a expansão do uso da metodologia na produção de sondas específicas para estudos e diagnósticos em animais domésticos.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Escola de Ciências Agrárias e Biológicas da Pontifícia Universidade Católica de Goiás (PUC-Goiás) pela autorização da coleta de amostras. Ao Doutor Aparecido D. da Cruz é bolsista produtividade em pesquisa PQ2 do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). Agradecemos aos Doutores Rajib Deb e Rafeeqe Rahman, no auxílio para customização das regiões cromossômicas marcadas. Agradecemos também ao Grupo de Pesquisas Replicon da PUC-Goiás e ao Laboratório de Citogenética Humana e Genética Molecular da Secretaria de Saúde do Estado de Goiás pelo apoio logístico na execução deste estudo. E ao financiamento realizado pela Coordenadoria de Aperfeiçoamento de

Ensino Superior (CAPES) e pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Goiás (FAPEG).

REFERÊNCIAS

- BARASC, Harmonie *et al.* Analysis of Meiotic Segregation Pattern and Interchromosomal Effects in a Bull Heterozygous for a 3/16 Robertsonian Translocation. **Cytogenet and Genome Research**, v. 156, n. 4, p. 197 – 203, 2018. <https://doi.org/10.1159/000494289>.
- BILTUEVA, L. *et al.* A New Case of an Inherited Reciprocal Translocation in Cattle: rcp(13;26) (q24;q11). **Cytogenet and Genome Research**, v. 144, n. 3, p. 208-211, 2014.
- DI MEO, G.P *et al.* Chromosome evolution and improved cytogenetic maps of the Y chromosome in cattle, zebu, river buffalo, sheep and goat. **Chromosome Research**, n. 13, p. 349-355, 2005. <https://doi.org/10.1007/s10577-005-2688-4>
- IANNUZZI, Leopoldo; DI BERARDINO, Dino. Tools of the trade: diagnostic and research applied to domestic animal cytogenetics. **Journal of Applied Genetics**, v. 49, p. 357–366, 2008. <https://doi.org/10.1007/BF03195634>
- LUNA, Helder S. Citogenética clássica aplicada ao monitoramento de germoplasma bovino. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.36, n.2, p.84-93, 2012.
- PAUCIULLO Alfredo *et al.* Sequential Cross-Species Chromosome Painting among River Buffalo, Cattle, Sheep and Goat: A Useful Tool for Chromosome Abnormalities Diagnosis within the Family Bovidae. **Plos ONE**, v. 9, n. 10, 2014. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0110297>
- PARRILLA, I *et al.* Fluorescence in situ hybridization in diluted and flow cytometrically sorted boar spermatozoa using specific DNA direct probes labelled by nick translation. **Reproduction Research**, v. 126, n. 3, p. 317-325, 2003.
- RAUDSEPP T., CHOWDHARY B. P. Chromosome aberrations and fertility disorders in domestic animals. **Annual Review of Animal Biosciences**, v. 4, p. 15-43, 2016.
- RENS Willem *et al.* An X-Y paint set and sperm FISH protocol that can be used for validation of cattle sperm separation procedures. **Reproduction Research**, v. 212, p. 541-546, 2001. <https://doi.org/10.1530/rep.0.1210541>.
- RUBES, Jiri *et al.* Fluorescence in situ Hybridization Applied to Domestic Animal Cytogenetics. **Cytogenet Genome Research**, v. 126, p. 34-48, 2009. <https://doi.org/10.1159/000245905>.
- SEBESTOVA, Hana *et al.* Effect of species-specific differences in chromosome morphology on chromatin compaction and the frequency and distribution of RAD51

and MLH1 foci in two bovid species: cattle (*Bos taurus*) and the common eland (*Taurotragus oryx*). **Chromosoma**, v.125, p.137-149, 2016.
<https://doi.org/10.1007/s00412-015-0533-x>

SENE, Viviani F. **Citogenética molecular e caracterização cromossômica no gênero *Eigenmannia* (Teleostei, Gymnotiformes, Sternopygidae)**. Botucatu, São Paulo, 2011
Dissertação (mestrado).

SOARES, Ricardo. J *et al.* Evaluation of fluorescence *in situ* hybridization techniques to study long non-coding RNA expression in cultured cells. **Nucleic Acids Research**, v. 46, n. 1, p. 4, 2018.

7. CONCLUSÃO

No presente estudo, o uso das técnicas de bandeamento C, GTG, NOR, e na citogenética molecular o uso do FISH, permitiu uma análise detalhada acerca dos cromossomos bovinos da raça Nelore.

Sendo assim foi possível:

- Obter os cromossomos metafásicos dos bovinos, a partir do método de cultura celular.
- Visualizar blocos de coloração diferenciada nos cromossomos dos bovinos, com o uso das técnicas de bandeamento C, GTG e NOR. As regiões marcadas apareceram como faixas transversais mais coradas em algumas regiões, outras não, podendo identificar os pares homólogos. E como pontos em regiões específicas (centrômero e regiões terminais), permitindo a caracterização cromossômica melhorada na espécie estudada.
- Caracterizar o cariótipo do Nelore, que se mostrou idêntico ao já descrito na literatura para essa subespécie (*Bos taurus indicus*), sendo todos os cromossomos autossômicos acrocêntricos e o par sexual com X submetacêntrico e o Y acrocêntrico.
- A amplificação dos segmentos em regiões conservadas do centrômero nos cromossomos bovinos mostrou-se satisfatória e específica, marcando exatamente as regiões centroméricas dos cromossomos autossômicos.
- O uso da técnica de *Semi-Nested* PCR, foi satisfatória, pois reamplificou a região que foi marcada na técnica de *Nick Translation* com o fluorocromo *SpectrumGreen*TM *direct-labeled* dUTP, aumentando assim, o sinal na hora da análise. Nenhuma marcação inespecífica foi visualizada durante as análises.
- Validar a sonda pancentromérica, com a técnica de FISH usando a marcação direta, forneceu resultado seguro e útil na identificação apenas dos cromossomos autossômicos e não marcando os sexuais da espécie estudada, sendo classificada com boa especificidade. O processo da marcação com a qualidade no sinal obtido demonstrou que as etapas utilizadas para preparação das sondas fluorescente foram ideais para avaliar os cromossomos autossômicos bovinos, podendo ser uma ferramenta útil na detecção de alterações numéricas e/ou estruturais nos bovinos, e na determinação sexual dos animais.

- O uso da sonda pancentromérica em bovinos da raça Holadesa, resultou na marcação de todos os cromossomos autossômicos, sugerindo o sucesso dessa marcação à uma transferibilidade entre as subespécies *Bos t. taurus* e *Bos t. indicus*.

Os resultados demonstraram que, apesar do uso das técnicas de bandeamento e a construção de sondas pancentromérica serem metodologias extensas e desafiadoras, a padronização de cada etapa possibilitou a caracterização citogenética e a marcação específica dos cromossomos autossômicos nos bovinos da raça Nelore.

Os avanços biotecnológicos estão permitindo melhor análise e caracterização dos animais, essas metodologias padronizadas podem ser ampliadas para outros grupos de animais domésticos e aplicadas em estudos com outro enfoque, como conservação.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHMAD, Ishfa; JAVED, Khalid; SATTAR Abdul *et al.* Screening of breeding bulls of different breeds through karyotyping. **Pakistan Veterinary Journal**, v. 24, n. 4, p. 190-192, 2004.
- AMARAL, Rosimira dos Santos. **Estrutura populacional, tendência genética e depressão por endogamia em Nelore Mocho do Nordeste do Brasil**. 2012. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Universidade Estadual do Sudeste da Bahia, Itapetinga – Bahia, 2012.
- ANDRADES-MIRANDA, Jaqueline; MATTEVI, Margarete S. **Técnicas de bandeamentos e coloração cromossômica**. Citogenética humana – Artmed. Porto Alegre, 2011. p. 63-69.
- BARASC, Harmonie *et al.* Analysis of Meiotic Segregation Pattern and Interchromosomal Effects in a Bull Heterozygous for a 3/16 Robertsonian Translocation. **Cytogenet and Genome Research**, v. 156, n. 4, p. 197 – 203, 2018.
- BIANCHINI, Eliandra *et al.* Características corporais associadas com a adaptação ao calor em bovinos naturalizados brasileiros. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.41, p.1443-1448, 2006.
- BORGES-OSÓRIO; MARIA Regina; ROBINSON, Wanyce M. **Genética Humana**. 3ª edição, Porto Alegre, Editora Artmed, 2013.
- BOUTRUP, Torsten S *et al.* Early Pathogenesis in Porcine Proliferative Enteropathy caused by *Lawsonia intracellularis*. **Journal of Comparative Pathology**, v.143, p.101-109, 2010.
- CAPOCO, Martinha Mappingala. **Mapeamento de DNA repetitivo na abelha sem ferrão *Tetragonisca fiebrigi* (Schwarz, 1938) com ênfase nos cromossomos Bs**. 2016. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Estrutural) - Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 2016.
- CIOTOLA, Francesca *et al.* Native cattle breeds of Southern Italy: Karyological profile. **Italian Journal of Animal Science**, v. 8, 2010.
- COPPOLA, Gianfranco *et al.* Use of cross-species in-situ hybridization (ZOO-FISH) to assess chromosome abnormalities in day-6 in-vivo - or in-vitro-produced sheep embryos. **Chromosome Research**, v. 15, p. 399–408, 2007.
- DA CRUZ, Izinara Rosse. **Aplicação marcadores moleculares para análise de diversidade genética no cromossomo Y de bovinos da raça Guzerá**. 2011. Dissertação (Mestrado em Genética Molecular) - Universidade Federal de Minas Gerais - Belo Horizonte, 2011.

DA SILVA, Marcelo C.; BOAVENTURA, Vanda M.; FIORAVANTI, Maria Clorinda S. História do povoamento bovino no Brasil Central. **Revista UFG**, Goiânia, v.13, n. 13, 2012.

DAVID, José A. O.; AGUIAR, Laura L.; MAINARDI, Vivian F. Capítulo 21- Aplicações da citogenética em ciência animal. **Tópicos especiais em Ciência Animal III**, Alegre, Espírito Santo - Editora CAUFES, p. 222-230, 2014. ISBN: 978-85-61890-56-8

DAWOOD, Muhammad *et al.* Cytogenetic Screening Related to Infertility Problems in Nili-Ravi Buffalo Punjab. **Advances in Animal and Veterinary Sciences**, v. 2, n. 6, p. 351-353, 2014.

DE CAMPOS SANTIAGO, Thaironi *et al.* Cadeia produtiva da bovinocultura de corte no município de Altamira, PA. **Cadernos de Ciência & Tecnologia**, v. 36, n. 1, p. 26429, 2019.

DEMYDA-PEYRÁS, S *et al.* Populational study of the t1;29 translocation in Andalusian minority cattle breeds. **Chromosome Research**, v. 20, n. 793, 2012.

DI BERARDINO, D *et al.* ISCNDB2000 International system for chromosome nomenclature of domestic bovids. **Cytogenetics and Cell Genetics**, v. 92, p.283-299, 2001.

EGITO, André A *et al.* Origem e diversidade genética materna de populações de bovinos da raça curraleira de diferentes regiões do Brasil. **Actas Iberoamericanas de Conservación Animal**, v. 1, p. 110-113, 2011.

EGITO, Andrea A.; MARIANTE, Arthur S.; ALBUQUERQUE, Maria S. M. Programa Brasileiro de Conservação de Recursos Genéticos. **Archivos de Zootecnia**, Córdoba, v. 51, n. 193, p. 39-52, 2002.

EI-BAYOUMI, Kh. M.; IMAN, El-Araby E.; ASMAA W. Cytogenetic Analysis Related to Some Infertility Problems in Cattle. **Global Veterinaria**, v. 7, n. 4, p. 323–329, 2011.

FAO. Situação mundial dos recursos genéticos animais para agricultura e alimentação – versão resumida. COMISSÃO DE RECURSOS GENÉTICOS PARA AGRICULTURA E ALIMENTAÇÃO ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS PARA AGRICULTURA E ALIMENTAÇÃO. **Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**, Brasília, DF, p. 42, 2010.

FARIA, F. J. C, *et al.* **Número efetivo de fundadores, ancestrais e genomas remanescentes nas raças Zebuínas brasileiras.** IN: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, Recife - CE, n. 39, 2002.

FELIX, Gisele A *et al.* Potencial de uso de raças bovinas locais brasileiras: curraleiro pé - duro e pantaneiro. **Enciclopédia biosfera**, Centro Científico Conhecer, Goiânia, v.9, n.16, p. 1715, 2013.

GOMES, Rodrigo C.; FEIJÓ, Gelson L. D.; CHIARI, Lucimara. Evolução e Qualidade da Pecuária Brasileira. Campo Grande: Embrapa - **Gado de Corte**, p. 4, 2017.

GUERRA, Marcelo. **Hibridização *in situ*: princípios básicos**. In: FISH-Conceitos e aplicações na citogenética. 1ªed. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética. 2004. 1-32p.

HANSEN, Matte S *et al.* Coxiella burnetii associated placental lesions and infection level in parturient cows. **The Veterinary Journal**, v.190, n.2, p.135-139, 2011.

IANNUZZI, Leopoldo; DI BERARDINO, Dino. Tools of the trade: diagnostic and research applied to domestic animal cytogenetics. **Journal of Applied Genetics**, v. 49, p. 357-366, 2008.

IBGE. **INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA**. Diretoria de Pesquisas, Coordenação de Agropecuária, Pesquisa da Pecuária Nacional. Junho de 2018. <http://www.ibge.gov.br> (acessado em Janeiro/2019).

ISSA, Érica C *et al.* Cytogenetic analysis of the y chromosome of native brazilian bovine breeds: preliminary data. **Archivos de Zootecnia**, v.58, n. 221, p. 93-101, 2009.

JENSEN, Tim K.; CHRISTENSEN, A. S.; BOYE, Mate. Brachyspira murdochii Colitis in Pigs. **Veterinary Pathology**. v.47, n.2, p.334-338, 2010.

JORGE, Wilham. *et al.* Caracterização genética de bovinos por meio de estudos do cromossomo Y e do DNA mitocondrial. Empresa brasileira de pesquisa agropecuária. **Embrapa Cerrados**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 1ª ed. Brasília, DF. p.74, 2006.

KOCHNEVA, Marina *et al.* A new case of reciprocal translocation rcp(13;26) in cattle. **Agricultural Biology**, n. 6, p. 84-89, 2011.

LAUREANO, Momyka M. M *et al.* Estimates of heritability and genetic trends for growth and reproduction traits in Nelore cattle. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 63, n. 1, p. 143-152, 2011.

LEMOS, Fernanda Kesrouani. **A evolução da bovinocultura de corte brasileira: elementos para a caracterização do papel da Ciência e da tecnologia na sua trajetória de desenvolvimento**. 2013. Dissertação (Mestrado) – Escola Politécnica, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

LINHARES, Natália D.; SVARTMAN, Marta; VALADARES, Eugênia R. Diagnóstico citogenético de pacientes com retardo mental idiopático. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, Rio de Janeiro, v. 48, n. 1, p. 33-39, 2012.

LUNA, Helder S. Citogenética clássica aplicada ao monitoramento de germoplasma bovino. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.36, n.2, p.84-93, 2012.

- MARCELO Guerra. **Introdução à Citogenética Geral**. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1988, 142p.
- MARIANTE, Arthur S.; ALBUQUERQUE, Maria S. M. Criopreservação de recursos genéticos animais brasileiros. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.35, n.2, p. 64 – 68, 2011.
- MARSHALL, Karen. Optimizing the use of breed types in developing country livestock production systems: a neglected research area. **Journal of Animal Breeding Genetics**, n. 131, v. 5, p. 329-340, 2014.
- MATOS, Susana de Medeiros. **Efeito de variáveis ambientais, fisiológicas e citogenéticas em vacas holandesas no semiárido nordestino**. 2013. Dissertação (Mestrado em Produção Animal) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Mossoró, 2013.
- MENEZES, Patrícia *et al.* Produção animal no Brasil: caracterização, simulação de cenários para pastagens e alternativas de adaptação às mudanças climáticas. **Embrapa Pecuária Sudeste** [Recurso eletrônico], São Carlos, São Paulo, 2015.
- MERGENER, R.; LUDWIG, L. B.; MALUF, S. W. Alterações cromossômicas estruturais. **Citogenética Humana**. Porto Alegre: Artmed, 2011.
- MORAIS, Pedro Gilberto Silva. **Homeopatia no controle de carrapatos *Rhipicephalus microplus* em bovinos mestiços leiteiros**. 2014. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia – Minas Gerais, 2014.
- NEVES, Saira M. N.; GUEDES, Roberto. Hibridização *in situ* fluorescente: princípios básicos e perspectivas para o diagnóstico de doenças infecciosas em medicina veterinária. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.79, n.4, p.627-632, 2012.
- NORDHOFF, Marcel *et al.* Association of *Treponema* spp. with canine periodontitis. **Veterinary Microbiology**, v.127, p.334-342, 2008.
- NUSSBAUM, Robert L *et al.* **Genética médica** – Thompson &Thompson. - 7ª edição. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan, p.63-64, 2008.
- OLIVEIRA, José Henrique Ferreira; MAGNABOSCO, Claudio de Ulhoa; BORGES, Arnaldo Manuel de Souza Machado. Nelore: base genética e evolução seletiva no Brasil. **Embrapa Cerrados. Documentos**, 49. Planaltina: Embrapa Cerrados, 54p. 2002.
- OLIVEIRA, Marcos. Contribuição dos bovinos Brasileiros - Raças formadas no Brasil desde os primeiros tempos da colonização guardam características que podem ser úteis aos criadores. Revista Pesquisa **FAPESP**. Ed. 264, Fevereiro 2018. Disponível: <https://revistapesquisa.fapesp.br/2018/02/15/contribuicoes-dos-bovinos-brasileiros/>. Acesso em: 20/05/2019.

- PAUCIULLO Alfredo *et al.* Sequential Cross-Species Chromosome Painting among River Buffalo, Cattle, Sheep and Goat: A Useful Tool for Chromosome Abnormalities Diagnosis within the Family Bovidae. **Plos ONE**, v. 9, n. 10, 2014.
- PAVARINI, Saulo P *et al.* Anomalias congênitas em fetos bovinos abortados no sul do Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 28, n. 3, 2008.
- PEZZINI, Tomaz Gelson. **Análise da estrutura genética, da biometria e da viabilidade populacional da raça bovina crioula lageana**. 2010. Tese (Doutorado em Ciências Animais) - Universidade de Brasília – Brasília, 2010.
- PIRES, Bruno C *et al.* Genetic analyses on bodyweight, reproductive, and carcass traits in composite beef cattle. **Animal Production Science**, v. 57, n. 3, p. 415–421, 2017.
- PIRES, Rita M. L *et al.* Análise citogenética de bovinos da raça pardo-suíça. **Boletim de Indústria Animal**, Nova Odessa, v.67, n.2, p. 151-155, 2010.
- PORS, Susanne E *et al.* Occurrence and associated lesions of *Pasteurella multocida* in porcine bronchopneumonia. **Veterinary Microbiology**, v.150, p.160–166, 2011. profile. **Italian Journal of Animal Science**, v.8, p. 54–56, 2009.
- RAUDSEPP T., CHOWDHARY B. P. Chromosome aberrations and fertility disorders in domestic animals. **Annual Review of Animal Biosciences**, v. 4, p. 15-43, 2016.
- REDDY, Ravi Kanth P *et al.* Nutritional significance of indigenous cow milk with regard to A2 β -CASEIN A2 – an overview. **International Journal of Science, Environment and Technology**, v. 5, n. 5 p. 3376-3380, 2016.
- REJDUCH, Barbara; SLOTA, Ewa; GUSTAVSSON, Ingemar. 60XY/60XX chimerism in the germ cell line of mature bulls born in heterosexual twinning. **Theriogenology**, v. 54, n. 4, p. 621-627, 2000.
- RODERO-SERRANO, Evangelina *et al.* The rob(1;29) chromosome translocation in endangered Andalusian cattle breeds. **Livestock Science**, v. 158, p. 32-39, 2013.
- ROSA, Antônio N. F *et al.* Melhoramento Genético Aplicado em Gado de Corte – **Programa Geneplus - Embrapa**, Brasília, 1ed., p.256, 2013.
- ROSSETTO, Cristina Ferreira Ramos. **Avaliação do bandeamento cromossômico por digestão enzimática e tratamento com solução tampão citratado**. 2015. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Médica) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Botucatu, São Paulo, 2015.
- RUBES, Jiri *et al.* Fluorescence in situ Hybridization Applied to Domestic Animal Cytogenetics. **Cytogenet Genome Research**, v. 126, p. 34-48, 2009.
- SANTOS, Sandra *et al.* Estratégias de conservação in situ do cavalo pantaneiro. **Documentos**, Corumbá, n. 55, 2003.

SCUDELER, Patrícia E. S. **Estudo da estrutura molecular dos cromossomos supranumerários em *Moenkhausia sanctaefilomenae* (Teleostei, Characiformes, Characidae)**. 2010. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista – Botucatu, São Paulo, 2010.

SHARKEY, Freddie H.; MATHER, Eamonn; FITZPATRICK, David R. Chromosome analysis: what and when to request. **Archives of Disease in Childhood**, v. 90, n. 12, p. 1264-1269, 2005.

SHARMA, Rekha *et al.* Genetic diversity and relationship of Indian cattle inferred from microsatellite and mitochondrial DNA markers. **BMC Genetics**, v. 16, p. 16-73, 2015.

SOARES, Ricardo. J *et al.* Evaluation of fluorescence *in situ* hybridization techniques to study long non-coding RNA expression in cultured cells. **Nucleic Acids Research**, v. 46, n. 1, p. 4, 2018.

SUMMER, A.T. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. **Experimetal Cell Research**, v. 75, p. 304-306, 1972.

TABERLET, Pierre *et al.* Conservation genetics of cattle, sheep, and goats. **Comptes Rendus Biologies**, v. 334, p. 247 – 254, 2011.

TICIANELLI, Janahi S *et al.* Intersexo e outras anomalias do desenvolvimento do aparelho reprodutor nos animais domésticos e o auxílio da citogenética para o diagnóstico. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 35, n. 1, p. 26-32, 2011.

TORO, Miguel A.; VILLANUEVA, Beatriz; FERNANDEZ, Jesús. Genomics applied to management strategies in conservation programmes. **Livestock Science**, Amsterdam, v. 166, p. 48–53, 2014.

TRUKHACHEV, Vladimir I *et al.* Characteristics of the chromosome Set of Holstein Cows with Reproductive Disorders in the North-Caucasian Cattle Population. **Cytology and Genetics**, v. 51, n. 4, p. 272-277, 2017.

TRUKHACHEV, Vladimir; OLEYNIK, Sergey; ZLYDNEV, Nikolay. Features of the karyotype of north caucasus ayrshire dairy cattle population: defects in reproductive functions. **8th International Scientific Conference Rural Development**, p. 162-166, 2017.

VERGANI, Karen; OLIVEIRA, Flávio G. A adaptação do gado europeu nos campos de cima da serra. 18o Congresso Estadual de Medicina Veterinária (Canela – RS) **Gado de Corte**, p. 19-86. 2016.

VERMA R. S, BABU A. Human chromosomes principles and techniques. 2nd edn. **McGrawHill**, New York. 1995.

VOLPI, Emanuela V.; BRIDGER, Joanna. MFISH glossary: no overview of the fluorescence in situ hybridization technique. **BioTechniques**, v. 45, n. 4, p. 388-390, 2008.

WAGNER, Helene H.; FORTIN, Marie-Josée. A conceptual framework for the spatial analysis of landscape genetic data. **Conservation Genetics**, Dordrecht, v. 14, p. 253-261, 2013.

YIMER, Nurthusien.; ROSNINA, Yusoff. Chromosomal Anomalies and Infertility in Farm Animals: A Review. **Pertanika Journal of Tropical Agricultural Science**, v. 37, n. 1, p. 1-18, 2014.