

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA**

ALTERAÇÕES CROMOSSÔMICAS SEXUAIS EM ÉGUAS

TACIANE DUARTE DIAS

PORTO ALEGRE

2017/2

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA

ALTERAÇÕES CROMOSSÔMICAS SEXUAIS EM ÉGUAS

TACIANE DUARTE DIAS

Orientador: Rodrigo Costa Mattos

Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação apresentado à Faculdade de Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para obtenção do grau de Médico Veterinário.

PORTO ALEGRE

2017/2

AGRADECIMENTOS

Sempre em primeiro lugar, o agradecimento vai para Aquele que tudo criou, inclusive as leis que regem e harmonizam o universo de forma que todos caminhemos para o bem. Não cai uma folha de uma árvore sem que haja a permissão de Deus, então se hoje foi possível chegar onde cheguei, é graças a Ele.

Agradeço a minha família sempre foi a minha base, o meu porto seguro. Meu pai Adalberto, minha mãe Olga e minha irmã Tairine que sempre deram todo o apoio que foi necessário, tenha sido ele financeiro ou emocional. Estavam de prontidão em tempo integral desde o início da minha vida, mas principalmente nesses cinco anos e meio. O meu muito obrigada.

À minha companheira, Fernanda, que tem segurado a minha mão nas situações mais adversas nesse exaustivo último ano de faculdade. Muito obrigada por não me soltar nunca e por jamais se dar por vencida ao tentar me manter em equilíbrio. Teria sido muito mais difícil se eu não tivesse o teu carinho e o teu suporte.

Aos meus amigos que estavam mais perto ou mais distantes, mas que de uma forma ou outra participaram do meu dia a dia. Muriel que me aguentou desde o segundo semestre todos os dias com os quilos de erva mate e litros de água. Gabriela que riu das minhas piores piadas e fez outras ainda pior. Eduardo que foi o meu companheiro de “índias” até no exterior, Marcos que me ensinou a ser uma pessoa mais extrovertida e desinibida. Vinicius Tweedie que foi a minha inspiração e meu apoio para andar sobre duas rodas. São poucas as palavras para dizer o quanto vou ser grata a vocês por fazerem parte da minha vida.

Ao melhor time de futsal feminino que a FAVET poderia conhecer, o Sinóvia. Obrigada Nic, Biga, Vandí, Laura e Camila por me proporcionarem o prazer de competir ao lado de vocês. E juntamente com a Amanda Gabana, a Amanda Serres, a Caroline Heineck, a Katerine, a Victória Dedavid, a Renata Schons, a Janyne e a Juliana vocês certamente faziam as minhas semanas mais alegres.

Ao REPROLAB que é a chave de muitas portas, assim como seus integrantes, meus amigos. Anna Bettina, Henrique, Marília, Luzia, Verônica, Gabriel, Luciana, Paula, Sabrina, Leonardo, Rogan, Dominique, Cesar, Giovane, Matheus, Vinicius Camargo, Vanessa Canal e Bárbara. E não poderia deixar de fazer um agradecimento especial a quem me deu orientações preciosas para a realização deste trabalho, muito obrigada Gustavo Larentis.

À central de transferência de embriões equinos La Grappa - Ellerstina e toda sua equipe de veterinários e colaboradores que me proporcionaram um mês intenso de vivência com o que eu mais gosto. Muito obrigada por todos ensinamentos e oportunidades.

Agradecimentos também ao meu orientador de monografia e de outros trabalhos desenvolvidos ao longo dos últimos três anos, Prof. Rodrigo Costa Mattos, pela convivência e por todo conhecimento transmitido.

Por fim, gostaria de agradecer a minha avozinha Alice, que partiu antes que pudesse presenciar o fim da minha graduação, por ser quem ela era e por me ensinar valores que permanecerão comigo para sempre. E àqueles familiares que mesmo longe fisicamente me acompanharam par a par e torceram por cada conquista, por cada vitória. Eu sinto o amor de vocês.

Love people, use things. Cause the opposite never works.

RESUMO

Anormalidades dos cromossomos sexuais são encontradas com mais frequência na espécie equina do que em outras espécies domésticas e vêm sendo relatadas e estudadas desde o início da década de 70. Estão intimamente associadas com problemas de infertilidade ou esterilidade. Muitas vezes, principalmente quando se trata da Síndrome do Sexo Reverso, as éguas podem nem apresentar a estrutura uterina. Durante o desenvolvimento embrionário e fetal há três estágios a serem vencidos para que ocorra a diferenciação sexual dos organismos: o de diferenciação do sexo cromossômico, o de diferenciação do sexo gonadal e o de diferenciação do sexo fenotípico. Erros podem acontecer em qualquer das três fases, culminando em anormalidades cromossômicas. As anormalidades cromossômicas são raramente encontradas em garanhões fenotipicamente normais, mas a adição de um cromossomo X no cariótipo de um equino pode inibir o desenvolvimento testicular e prejudicar a espermatogênese ainda que não haja influencia na libido e no comportamento de monta. As anormalidade cromossômicas mais identificadas são 63,XO, 64,XY, mosaicismo e quimerismo.

Palavras-chave: anormalidade cromossômica sexual, síndrome do sexo reverso, égua, infertilidade, esterilidade.

ABSTRACT

Sex chromosomal abnormalities are found more often in equine species than in other domestic species and they are being reported and studied since the early 1970's. The abnormalities are closely associated with problems of infertility or sterility. Many times, especially when it comes to sex reversal syndrome, mares may not present the uterine structure. During embryonic and fetal development, there are three stages to be overcome for the sexual differentiation, the sex chromosome differentiation, the gonadal sex differentiation and phenotypic sex differentiation. Mistakes can happen in any of the three phases, culminating in chromosomal abnormalities. Rarely found in phenotypically normal stallions, but the addition of a X chromosome in the karyotype of a horse can inhibit the testicular development and impair spermatogenesis though there is no influence on libido and breeding behavior. The chromosomal abnormalities most identified are 63,XO, 64,XY, mosaicism and chimerism.

Key-words: sex chromosomal abnormalities, sex reversal syndrome, infertility, sterility

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Representação do cariótipo das principais anormalidades cromossômicas.....	14
----------	--	----

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	ANORMALIDADES CROMOSSÔMICAS SEXUAIS NA ÉGUA	13
2.1	Síndrome Sexo reverso -	14
	64,XY	
2.1.1	Pseudo-hermafroditismo masculino.....	15
2.2	63,	16
	XO	
2.3	Quimerismo e Mosaicismo	18
2.3.1	Quimerismo 64,XX/64,XY.....	19
2.3.2	Mosaicismo 63,XO/64,XX.....	20
2.3.3	Mosaicismo 63,XO/64,XY.....	20
2.4	65,XXX	21
3	ANÁLISES	22
	CITOGENÉTICAS	
3.1	FISH	22
3.2	<i>G-Banding – Giemsa Banding</i>	23
3.3	<i>C-Banding</i>	23
3.4	AMEL	23
4	CONCLUSÃO	24
	REFERÊNCIAS	26

1 INTRODUÇÃO

No cavalo (*Equus caballus*), assim como em humanos, o cromossomo sexual Y determina a masculinidade do organismo. Assim, um organismo que apresenta dois cromossomos sexuais X normalmente apresenta um fenótipo de fêmea e um organismo que apresenta um cromossomo X e outro Y normalmente apresenta um fenótipo de macho (SHARP, WACHTEL e BENIRSCHKE, 1980).

Alterações cromossômicas são mais comumente detectadas em equinos do que em outras espécies domésticas e vêm sendo relatadas e estudadas nesta espécie desde início dos anos 70. Em mais de 95% dos casos estão associadas ao par de cromossomos sexuais (LEAR; McGEE, 2012), causando infertilidade ou subfertilidade (BUGNO; SLOTA; KOSCIELNY, 2007).

A maioria dos casos permanece sem diagnóstico – subestimando a prevalência – devido a três principais fatores: à complexidade do cariótipo equino, à falta de interesse nesse tipo de diagnóstico por parte dos criadores e veterinários e ao alto número de animais que apesar de apresentarem alterações genéticas, não possuem alterações fenotípicas (DEMYDA-PEYRÁS *et al.*, 2013).

Os processos de gametogênese, fertilização e embriogênese são muito complexos e delicados, o que culmina para erros inevitáveis na meiose, podendo resultar em efeitos devastadores no desenvolvimento de um indivíduo. Erros na meiose ou na mitose frequentemente resultam em adição, deleção ou rearranjo estrutural de um ou dois cromossomos, causando aneuploidia (MCFEELY, 1975).

A citogenética é a ciência que estuda a estrutura, a aparência e o desempenho dos cromossomos, que são as estruturas formadas por DNA encontradas no núcleo das células somáticas (COELHO; OLIVEIRA, 2008). Aproximadamente 14 anos atrás a Associação Nacional de Criadores de Cavalos Pura Raça Espanhola implementou o teste de DNA de

paternidade para avaliar o *pedigree* de cada potro recém-nascido. Candidatos que demonstram resultados anormais ou incertos são submetidos a análises citogenéticas rotineiramente para avaliar a presença de anormalidades cromossômicas (DEMYDA-PEYRÁS *et al.*, 2013).

As análises citogenéticas podem determinar o sexo genético, por assim dizer, mas não podem identificar mutações ou deleções de genes envolvidos na via de determinação do sexo do indivíduo (LEAR; MCGEE, 2012). Tecnologias moleculares vêm sendo desenvolvidas para confirmar os resultados das análises citogenéticas e para auxiliar na identificação das causas genéticas do desenvolvimento sexual anormal em equinos (LEAR; MCGEE, 2011).

O cariótipo equino ($2n = 64$) apresenta 31 pares de cromossomos autossômicos (ECA1-ECA31) e dois cromossomos sexuais (ECAX e ECAY). Há três estágios a serem vencidos para que ocorra a diferenciação sexual no desenvolvimento embrionário e fetal. O primeiro estágio é a diferenciação do sexo cromossômico, que é determinado no momento da fecundação do oócito X por um espermatozoide carregando o cromossomo X ou Y. O segundo é a diferenciação do sexo gonadal, determinado pelo gene SRY (*sex determining region Y*), presente no cromossomo Y, que é responsável pela masculinização do organismo em desenvolvimento através da diferenciação das gônadas em testículos, na ausência do gene SRY as gônadas se diferenciam em ovários. (ZENTENO-RUIZ; KOFMAN-ALFARO; MÉNDEZ, 2001). E o último é a diferenciação do sexo fenotípico – desenvolvido a partir do estímulo da testosterona e de diidrotestosterona. Caso não haja testosterona ou caso os tecidos não apresentem receptores para andrógenos, a tendência passiva é de diferenciação em genitália externa feminina (BUENO *et al.*, 2017; NASCIMENTO; SANTOS, 2003).

Pouco se sabe sobre o desenvolvimento sexual do embrião, mas segundo Lear; McGee (2012) o tubérculo genital já está presente no embrião equino no dia 30, as genitálias externas se diferenciam por volta do dia 45, as mamas aparecem no dia 49, o clitóris está proeminente no dia 75 e o escroto no dia 80.

Anormalidade em garanhões fenotipicamente normais são raramente relatados, mas um cromossomo X adicional parece inibir o desenvolvimento testicular e a espermatogênese, porém não há alterações na libido ou no comportamento de monta (MAKINEN; KATILA, 2004). MAKINEN; KATILA; ANDERSSON; GUSTAVSSON, (2000) identificaram dois garanhões com o cariótipo – conjunto de cromossomos de um indivíduo – 65,XXY. Um deles possuía as gônadas pequenas em proporção ao seu tamanho e o outro, ao sêmen ser analisado em microscópio, não teve presença de espermatozoides identificada. Esses achados estão de

acordo com os relatos anteriores de Kubien; Pozor; Tischner, (1993) que descreveram um garanhão 65,XXY com duas pequenas gônadas, apesar do epidídimo se apresentar bem desenvolvido, além de ser facilmente palpável.

A anormalidade cariotípica majoritariamente identificada em equinos pelo mundo todo em 1990 era a monossomia do cromossomo X (BOWLING; MILLON, 1990), mas a síndrome do sexo reverso também era frequentemente diagnosticada (BUOEN *et al.*, 2000). Esses achados estavam em parte de acordo com Long (1988) que observou que as anormalidades mais comuns eram 63,XO, 63,XO/64,XX e éguas 64,XY. Porém, Villagómez *et al.* em 2011 demonstraram em um estudo que de 17 éguas estudadas por terem um desenvolvimento sexual anormal e infertilidade, apresentando anormalidades cromossômicas sexuais, 11 apresentavam a Síndrome do Sexo Reverso, mostrando uma possível mudança dos números em 21 anos, o que pode ter sido ocasionado pelo aumento do número de diagnósticos. Segundo Anaya *et al.* (2017) o quimerismo é a terceira síndrome cromossômica sexual mais reportada em equinos.

2 ANORMALIDADES CROMOSSÔMICAS SEXUAIS EM ÉGUAS

Os equinos apresentam normalmente 64 cromossomos, 31 pares de cromossomos autossômicos, sendo 13 pares metacêntricos ou submetacêntricos e 18 pares acrocêntricos, além de dois cromossomos sexuais, sendo o X o segundo maior submetacêntrico e o Y um dos menores acrocêntricos (ANAYA *et al.*, 2017; BOWLING; BREEN; CHOWDHARY, 1997).

O desenvolvimento de técnicas para análises cromossômicas tanto em humanos quanto em animais, tem estimulado o interesse na sua aplicação em casos de infertilidade (HUGHES; KENNEDY; BENIRSCHKE, 1975). A análise do cariótipo permite a identificação de alterações cromossômicas, que podem ser tanto numéricas como estruturais. Sendo que as alterações numéricas estão relacionadas à perda ou à duplicação de cromossomos e as alterações estruturais tem como resultado o rearranjo de um ou mais cromossomos como deleção, inversão, translocação (COELHO; OLIVEIRA, 2008)

Muitos dos casos de infertilidade pesquisados têm sido associados com anormalidade cromossômicas (LONG, 1988), mas nem todos os casos de anormalidades cromossômicas têm sido associados com problemas de fertilidade, como nos mostra Halnan (1985) que ao pesquisar o cariótipo de 18 éguas com o histórico reprodutivo normal, encontrou duas éguas com o cariótipo 63,XO/64,XX.

Bugno; Slota; Koscielny (2007) desenvolveram uma pesquisa onde investigaram “citogeneticamente” uma população de 500 equinos, de diferentes raças, com idade entre um mês a três anos, sendo 228 garanhões e 272 fêmeas. Os 228 garanhões possuíam o cariótipo considerado normal, 64,XY. Com relação as éguas, 96,3% apresentaram o cariótipo normal, 64,XX. Das 10 éguas que apresentaram anormalidade congênitas, sete possuíam cariótipo 63,XO/64,XX, uma apresentava o cariótipo 63,XO, uma apresentava o cariótipo 64,XX/64XY e uma apresentava o cariótipo 64XX/65XX + 31.



Figura 1: Representação do cariótipo das principais anormalidades cromossômicas. A: Cariótipo de bandeamento G de uma égua 64,XX; B: Cariótipo de bandeamento G de uma égua 63,XO; C: Cariótipo de bandeamento G de uma égua 65,XXX; D: Cariótipo de bandeamento G de uma égua 64,XY. Adaptado de: Chandley et al., 1975.

2.1 Síndrome do Sexo Reverso - 64,XY

Das alterações cromossômicas relatadas, a Síndrome do Sexo Reverso no animal com fenótipo de fêmea e cariótipo 64, XY é aparentemente a mais comum. A maioria das éguas são investigadas por apresentarem históricos clínicos similares de infertilidade (SWITONSKI *et al.*, 2004), gônadas pequenas, ausência de comportamento estral normal e falha no desenvolvimento folicular, apesar de apresentarem a morfologia externa normal, com tamanho e conformação vulvar, do clitóris e da vagina normais (STEWART-SCOTT, 1988; HUGHES; TROMMERSHAUSEN-SMITH, 1977; MAKINEN *et al.*, 2001; ANAYA *et al.*, 2014; CHANDLEY *et al.*, 1975). Alguns autores ainda descreveram o útero dos animais

como flácidos e pequenos (MAKINEN *et al.*, 2001; BUGNO *et al.*, 2003) e a cérvix com ausência de tonicidade (PAILHOUX; CRIBIU; PARMA; COTINOT, 1995; HUGHES; TROMMERSHAUSEN-SMITH, 1977).

São reconhecidos dois principais tipos desta anormalidade: animais com o fenótipo de fêmea, mas com cariótipo 64, XY e animais com o fenótipo de macho, mas com o cariótipo 64, XX. Nos dois tipos são descritas variações fenotípicas (BUGNO *et al.*, 2003). Os relatos encontrados demonstram a ampla descrição do primeiro tipo, onde o fenótipo é de fêmea, mas o cariótipo é 64, XY, com presença ou ausência do gene SRY, que é o gene responsável pela masculinização do organismo em desenvolvimento através da diferenciação gonadal em testículos (BUENO *et al.*, 2017; BUGNO *et al.*, 2003; PAILHOUX; CRIBIU; PARMA; COTINOT, 1995; ANAYA *et al.*, 2014; MAKINEN *et al.*, 2001).

Apesar da maioria dos casos relatados apresentarem a ausência do gene SRY (ANAYA *et al.*, 2014; PAILHOUX; CRIBIU; PARMA; COTINOT, 1995; BUGNO *et al.*, 2003), Switonski *et al.* (2004) relataram um caso que mostrou a presença do gene SRY e a égua apresentava comportamento de garanhão, tentando montar em outras éguas que apresentavam cio. Além disso, Makinen *et al.* (2001) também mostraram que das 3 éguas 64, XY que estavam sendo estudadas, uma delas teve o gene SRY identificado através de PCR e essa égua apresentava altura maior que normalmente teria para sua raça e idade. O seu fenótipo era semelhante à aparência de um garanhão.

Sharp; Wachtel; Benirschke (1980) relataram um caso em que uma fêmea, descrita pelos autores como fértil, foi diagnosticada 64,XY através da pesquisa por antígeno H-Y, que está presente em garanhões normais mas não está presente em fêmeas normais. A fêmea investigada obteve resultados positivos para o antígeno H-Y, mas não nas mesmas proporções que é encontrado em garanhões.

2.1.1 Pseudo-hermafroditismo masculino

Bueno *et al.* (2017) relataram o caso de um animal que a partir do estudo citogenético foi caracterizado geneticamente como macho apresentando o cariótipo 64,XY. Porém, ao ser necropsiado, este animal apresentava uma estrutura similar a um corpo uterino na cavidade pélvica, com os cornos que terminavam no local anatômico dos ovários. Ao corte histológico, foi possível observar útero e trompas uterinas rudimentares. No lugar anatômico dos ovários foram encontradas estruturas semelhantes a testículos com túbulos seminíferos pouco desenvolvidos, sem produção de espermatozoides e epidídimo rudimentar.

Externamente o equino possuía conformação de fêmea, com presença de glândula mamária e região da genitália externa feminina. Na região medial do períneo havia uma estrutura similar a um pênis rudimentar, em direção caudal e envolto por uma prega. O animal manifestava comportamento sexual masculino, apresentando ereção e montando em éguas em estro.

Na análise molecular observou-se que o equino era negativo para a presença do gene SRY, o que leva a crer que a diferenciação testicular não ocorre de forma plena sem a presença do gene. Porém, no caso relatado houve a masculinização da genitália externa.

2.2 63, XO

Após a Síndrome do Sexo Reverso, a monossomia do cromossomo X é a anormalidade cromossômica mais descrita segundo Anaya *et al.* (2014). Encontrada apenas em cromossomos sexuais, a perda de um cromossomo inteiro – condição XO – resulta em um genoma desbalanceado (HALNAN, 1985).

Animais que apresentam esta anomalia comumente são descritos como pequenos para sua raça e idade, com ovários pequenos e lisos, desprovidos de folículos e de células germinativas (HUGHES; KENNEDY; BENIRSCHKE, 1975; BUOEN *et al.*, 1993; HUGHES; TROMMERSHAUSEN-SMITH, 1977; BLUE; BRUÈRE; DEWES, 1978; MAKINEN *et al.*, 2001; CHANDLEY *et al.*, 1975; HUGHES; BENIRSCHKE; KENNEDY; TROMMERSHAUSEN-SMITH, 1975). As éguas apresentam a morfologia externa normal, apesar da possibilidade de a genitália parecer um pouco imatura (MIYAKE; ISHIKAWA; KAWATA, 1979), mas indicam úteros pequenos e flácidos à palpação retal (MAKINEN *et al.*, 2001; HUGHES; KENNEDY; BENIRSCHKE, 1975; HUGHES & TROMMERSHAUSEN-SMITH, 1977; BUOEN *et al.*, 1993; BLUE; BRUÈRE; DEWES, 1978) devido à deficiência da circulação de esteroides ovarianos (PASHEN; DOWNIE; McCUE, 1989).

As éguas apresentam um fraco comportamento estral (MIYAKE; ISHIKAWA; KAWATA, 1979) ou, na maioria dos casos, não há expressão de comportamento estral em nenhum grau por parte das éguas mesmo ao longo da temporada reprodutiva (BLUE; BRUÈRE; DEWES, 1978; BUOEN *et al.*, 1993; MAKINEN *et al.*, 2001, CHANDLEY *et al.*, 1975).

Por animais portadores da monossomia do cromossomo X serem menores que a média de suas raças, os cavalos em miniaturas (o que não se trata de uma raça e sim de pequenez) inférteis podem passar despercebidos e fêmeas XO podem não ser detectadas (BUOEN *et al.*, 1993).

Ainda não está claro como muitos embriões XO sobrevivem e nascem. Makinen *et al.* (2001) supõem que éguas XO, comparado com outros grandes mamíferos, possuem os ovários normais durante o período fetal e então começam a degenerar, desenvolvendo a disgenesia gonadal antes de atingir a maturidade sexual e assim as éguas falham ao tentar atingir o início do ciclo estral.

Makinen *et al.* (2001) conseguiu ainda identificar que o único cromossomo de uma égua XO em estudo era de origem materna. Estudos em humanos demonstram que aproximadamente em 75% dos casos de XO – Síndrome de Turner, o cromossomo monossômico tem origem materna e em aproximadamente 25% dos casos, origem paterna (ZINN; PAGE; FISHER, 1993).

Pashen; Downie; McCue (1989) ao perceberem a semelhança entre o desenvolvimento uterino de uma égua XO e uma égua ovariectomizada, suspeitaram que a primeira poderia responder igualmente ao tratamento hormonal ao qual as éguas ovariectomizadas eram submetidas para serem receptoras de embriões. Cada uma das sete éguas XO deste estudo recebeu 0,5 mg de cipionato de estradiol duas vezes ao dia por cinco dias, seguido por 150 mg de progesterona diariamente por 14 dias. Apesar das éguas XO (menos que 0.3 ng/ml) conseguirem alcançar os mesmos níveis de progesterona que éguas em diestro (cerca de 3,9 ng/ml), nenhuma das transferências resultou em prenhez.

Hinrichs; Riera; Klunder (1989) após tratarem uma égua XO com 300 mg de progesterona diariamente, realizaram seis transferências de embrião, porém não houve evidência de prenhez detectada por ultrassonografia em nenhuma das vezes. Os autores sugeriram que a falha na sobrevivência dos embriões após seis transferências aconteceu devido a égua em questão ter baixa habilidade para manter a prenhez, mesmo que o seu útero tenha apresentado um endométrio normal na biópsia.

Não existem relatos de éguas XO que sejam férteis a ponto de gerar e parir potros saudáveis. Bowling (1985) desmentiu o relato de uma égua com o cariótipo 63,XO que havia produzido dois potros. Foram coletadas amostras sanguíneas da égua, dos seus dois potros, do pai dos potros e do pai da égua. Os dois potros se qualificaram como descendentes dos pais

relatados, porém, a égua XO em questão não poderia ser descendente do seu suposto pai. O autor sugeriu como hipótese alternativa que uma égua fértil tenha sido substituída pela égua XO como mãe. Em uma busca pelos registros sanguíneos, identificou-se apenas uma outra égua com o mesmo tipo sanguíneo e essa égua era de propriedade de quem havia relatado a égua XO como mãe dos dois potros.

Burgoyne; Baker (1981) desenvolveram um estudo que durante o período observado, uma rata com apenas um cromossomo sexual – XO, apresentava aproximadamente a metade do número de oócitos encontrados em uma rata com os dois cromossomos sexuais - XX. Os autores constataram ainda que ratas XO são férteis, porém se tornam estéreis mais novas do que ratas XX normalmente se tornariam.

Wray; Freeman; Ming (1981) relataram o caso de uma mulher confirmada portadora da Síndrome de Turner – cariótipo 45,XO, através da análise de vários tecidos, inclusive dos ovários, que levou a termo duas gestações, sendo suas duas filhas com o cariótipo linfocitário 46,XX. Além dela, outras nove mulheres aparentemente 45,XO não-mosaico foram reportadas, mostrando que há função ovariana em portadoras deste cariótipo.

Como a idade de maturidade sexual das éguas está entre a da rata e da mulher, Long (1988) argumenta que algumas éguas XO poderiam ser capazes de produzir pelo menos um potro em sua vida inteira.

2.3 Quimerismo e Mosaicismo

O termo quimerismo é oriundo da mitologia grega, onde quimera é um ser composto por partes de diferentes animais. Na biologia, esse termo é usado para fazer referências a organismos que apresentam células derivadas de mais de um zigoto (TEPLITZ; BEUTLER, 1966). O quimerismo é mais identificado em bovinos devido ao fenômeno chamado freemartin – infertilidade em fêmeas nascidas de parto gemelar com macho (HERSCHLER; FECHHEIMER, 1967).

Há uma troca entre “células formadoras de sangue” entre os dois fetos de uma mesma prenhez. Estas células acabam se estabelecendo no tecido do outro gêmeo e persistindo na vida adulta (BOWLING; RUVINSKY, 2000). Há uma anastomose vascular entre os fetos em cerca de 40% das éguas que emprenham de gêmeos (VANDEPLASSCHE; PODLIACHOUK; BEAUD, 1970). Os dois fetos são chamados de quimeras, que é definido por apresentarem uma mistura de duas populações de células sanguíneas, sendo que uma corresponde ao seu

próprio genótipo e a outra corresponde ao gêmeo que partilhou a gestação (BOWLING; RUVINSKY, 2000).

Pode-se denominar quimera um organismo que apresente quantidades detectáveis das duas populações celulares, mas em alguns casos um dos dois tipos celulares estão muito dispersos no sangue e acabam por não serem detectados no teste sanguíneo, o que pode causar erro de interpretação do teste (BOWLING; RUVINSKY, 2000).

O mosaicismismo não se trata de uma fusão de células de indivíduos diferentes como o quimerismo, mas sim de uma modificação genética de células que pertencem a um mesmo indivíduo. Mosaicismismo de cromossomos sexuais em equinos tem sido encontrado por estar associado com anormalidades reprodutivas e infertilidade (HALNAN, 1985).

2.3.1 Quimerismo 64, XX/64, XY

Esse é o cariótipo característico de um animal quimera que tem origem de uma prenhez gemelar (BUGNO; SLOTA; KOSCIELNY, 2007), onde o indivíduo possui duas linhagens distintas de células, uma advinda do seu próprio organismo e outra advinda do gêmeo que compartilha a gestação. Segundo Long (1988), um cariótipo 64,XX/XY não indica, necessariamente, problemas de fertilidade, diferentemente do que acontece na espécie bovina, no fenômeno chamado freemartin, onde as fêmeas que nascem são inférteis (HERSCHLER; FECHHEIMER, 1967).

Bugno; Slota; Koscielny (2007) ao pesquisarem o cariótipo de 500 animais, investigaram uma égua que apresentou o cariótipo 64,XX/64,XY. Essa égua tinha apenas 2 meses na data da coleta de dados e apresentou 63% da linhagem 64,XY e 37% da linhagem 64,XX. Os órgãos genitais externos apresentavam aparência normal e os internos não foram examinados, pois o animal era muito jovem.

Ao investigar 10 éguas com problemas reprodutivos, Moreno-Millán; Rodero; Alonso; Sanz (1991) encontraram duas as quais o cariótipo apresentado era 64,XX/64XY. Uma delas apresentava o fenótipo normal, com vulva e área perineal típica de uma égua nulípara. À palpação retal foi revelada a presença dos ovários que estavam menores do que geralmente seriam, além da superfície lisa. Além disso, essa égua apresentava comportamento agressivo com outras éguas, não apresentava estro e não respondeu ao tratamento conceptivo prescrito. A outra égua foi descrita com uma aparência de macho e no lugar dos ovários foi encontrada apenas uma estrutura semelhante a um testículo no lado esquerdo, mas na análise histológica

foi visto uma severa hipoplasia ovariana e nenhuma estrutura correspondente ao tecido testicular foi encontrada.

2.3.2 Mosaicismo 63,XO/64,XX

O mosaicismo 63,XO/64,XX poderia ser mais comumente encontrado se as análises citogenéticas fossem empregadas mais frequentemente, já que ao examinar 18 éguas com histórico reprodutivo normal, Halnan (1985) constatou que duas delas possuíam o cariótipo mosaico 63,XO/64,XX. No mesmo estudo, Halnan também constatou que de outras nove éguas que eram estéreis ou inférteis, oito delas eram 63,XO/64,XX.

Em um outro trabalho desenvolvido por Bugno; Slota; Koscielny (2007), de 10 éguas identificadas com anormalidades cromossômicas, 7 possuíam o cariótipo 63,XO/64,XX. Todas as éguas eram fenotipicamente normais, mas cinco delas não puderam ser examinadas internamente por serem muito jovens. As outras duas apresentavam estro e desenvolvimento dos órgãos sexuais normal.

Hughes; Benirschke; Kennedy; Trommershausen-Smith (1975) ao analisarem o cariótipo de 5 éguas fenotipicamente normais mas inférteis, encontraram uma com o cariótipo 63,XO/64,XX. Essa égua foi descrita pelos autores como mais baixa e mais leve do que o padrão da raça, sendo que os seus ancestrais eram de tamanho normal. Não possuem padrão cíclico para o comportamento estral e por vezes demonstram sinais de estro por alguns dias e então passam longos períodos sem demonstrar (PRESTES *et al.*, 2007).

Além disso, os autores encontraram uma incidência menor (1,75%) de baquetas nos neutrófilos de éguas com esse cariótipo em comparação com éguas controle (4%). REID; WEATHERSTON; ROBINSON (1987) relataram o caso de uma égua 63,XO/64,XX com 2% de neutrófilos com baquetas.

2.3.3 Mosaicismo 63, XO/64, XY

Das anormalidades cromossômicas encontradas, o cariótipo 63,XO/64,XY é o menos relatado em éguas. Hughes; Trommershausen-Smith (1977) relataram que de 12 éguas investigadas por apresentarem problemas de fertilidade, as 12 apresentavam alterações cromossômicas, porém apenas uma tinha o cariótipo 63,XO/64,XY.

As éguas do estudo acima referido apresentavam características fenotípicas normais, com útero e cervix flácidos e os ovários pequenos, lisos e firmes à palpação retal. A cervix estava dilatada ao exame com o espéculo vaginal a ponto de ser possível olhar diretamente

para o interior do útero. Dessa forma, foi possível diferenciar a anomalia dos animais apenas pela cariotipagem usando linfócitos obtidos de sangue periférico.

2.4 65, XXX

Similarmente as outras anormalidades cromossômicas já relatadas anteriormente, as éguas condicionadas à trissomia do cromossomo X também apresentam problemas de fertilidade. Podem apresentar ovários não detectáveis à palpação (HINRICHS; RIERA; KLUNDER, 1989) ou muito pequenos, pouca ou nenhuma sinalização de estro, além de um útero infantilizado ou pouco desenvolvido (STEWART-SCOTT, 1988; DE LORENZI *et al.*, 2010).

Moreno-Millán; Rodero; Alonso; Sanz (1990) descreveram o caso de uma égua 65,XXX que apesar de apresentar uma vulva normal, apresentava duas formações testiculares na região inguinal e uma vagina curta e fechada no final. Não foi detectado útero ou ovários.

Na literatura ainda existem poucos relatos de éguas 65, XXX (BUGNO *et al.*, 2003), mas a maioria dos casos estão presentes em um *status* mosaico (DE LORENZI *et al.*, 2010). O primeiro caso foi descrito em 1975, por Chandley *et al.* e nos casos relatados posteriormente (STEWART-SCOTT, 1988; BUGNO *et al.*, 2003) a infertilidade das éguas foi a principal motivação para a investigação do cariótipo.

Hinrichs, Riera; Klunder (1989) realizaram três transferências de embriões em ocasiões diferentes para uma égua 65, XXX. Não houve nenhum resultado na primeira nem na segunda transferência, mas na terceira transferência, no dia 14 pós ovulação da doadora, através do exame ultrassonográfico, foi encontrada uma vesícula embrionária de 20 mm de aparência normal. Ao ser examinada por ultrassonografia novamente no dia 18, a vesícula embrionária não foi mais encontrada além de ser constatada a presença de fluido livre no endométrio.

3 ANÁLISES CITOGENÉTICAS

As análises citogenéticas em equinos têm beneficiado a indústria do cavalo por identificar aberrações cromossômicas causando anormalidades congênitas, perdas embrionárias e infertilidade (LEAR; BAILEY, 2008). Normalmente apenas éguas ou garanhões de alto valor genético que apresentam problemas de infertilidade ou subfertilidade são submetidos a estudos citogenéticos (DEMYDA-PEYRÁS *et al.*, 2013).

Para fazer uma análise citogenética deve-se fazer uma preparação de material através de linfócitos sanguíneos ou de culturas de tecido fibroso obtido de biópsia de pele (HUGHES; KENNEDY; BENIRSCHKE, 1975).

São três os métodos mais comuns de análises citogenéticas para identificação de anormalidades cromossômicas sexuais.

3.1 FISH

O teste FISH (*fluorescence in situ hybridization*) é o método mais comumente utilizado (SPEICHER; CARTER, 2005). Tem como objetivo identificar uma sequência de DNA que é complementar à sonda utilizada e trata-se de um teste rápido (CHAUFFAILLE, 2008). Esse método utiliza sondas específicas para perda, adição ou translocação de genes. É uma técnica muito útil na determinação de porcentagens de células trissômicas em casos de quimerismo/mosaicismo se tornando importante por que essa porcentagem influencia na expressão fenotípica (LORENZI *et al.*, 2010). Além disso, é uma das áreas que tem crescido rapidamente no diagnóstico de tumores (CUI; SHU; LI, 2016).

FISH tem sido amplamente aplicado na área da pesquisa, em estudos dos processos biológicos como replicação do DNA, processamento do RNA e expressão gênica, estudos da evolução do cromossomo, incluindo a conservação de sequências e rearranjos entre espécies. Esse método tem se mostrado indispensável nos laboratórios por ser um método autônomo não só de detecção e caracterização na análise cromossômica, mas também da aquisição e constituição das anormalidades cromossômicas (TSUCHIYA, 2011).

Em humanos pode ser feito através da análise de células não cultivadas do fluido amniótico ou da amostra de vilosidades coriônicas como um procedimento padrão para a detecção de aneuploidia ou desordens genômicas (CUI; SHU; LI, 2016).

3.2 G-Banding – Giemsa Banding

G-banding é um método que torna a visualização do cariótipo fácil através da coloração dos cromossomos condensados. Para tal, é utilizado o corante de Giemsa - daí que provém a sua nomenclatura alternativa.

Os cromossomos são tratados com tripsina para que haja a digestão parcial do cromossomo, que são então corados com o corante de Giemsa. As regiões heterocromáticas, ricas em adenina e timina e parcialmente pobres em genes, coram mais escuras no bandejamento G. A cromatina menos condensada, geralmente com maior teor de citosina e guanina incorpora menos corante, tornando-se assim, mais claras no bandejamento.

3.3 C-Banding

C-banding é um método que torna possível distinguir um cromossomo X de um cromossomo Y. O cromossomo X apresenta uma banda C pericentromérica e uma banda C intersticial na parte central do braço longo. Devido à presença de heterocromatina constitutiva no acrocentro de Y, este se apresenta quase que completamente enegrecido (PAILHOUX; CRIBIU; PARMA; COTINOT, 1995).

3.4 AMEL

Hasegawa *et al*, (2000) desenvolveram um método para determinar a presença tanto do cromossomo sexual quanto a região do gene SRY, usando uma amplificação simultânea de genes de amelogenina (AMEL) encontrados tanto nos cromossomos X e Y quanto no gene SRY equino. Se trata de um método que permite um diagnóstico rápido para éguas XY antes de realizar uma outra análise citogenética do cromossomo Y, que requer tempo e experiência.

Como há uma diferença de tamanho entre os genes AMEL dos cromossomos X e Y, apenas um gene AMEL está ligado ao cromossomo X em éguas normais, enquanto que em garanhões normais são observados genes de AMEL ligados tanto nos cromossomos X e Y. Apesar desse método tornar possível um rápido diagnóstico em éguas 64,XY inférteis, ele ainda é pouco utilizado.

4 CONCLUSÃO

Geralmente a análise citogenética é uma opção de exame quando não se encontra nada que justifique a infertilidade das éguas, porém a incidência de anormalidades pode variar na população amostral. Com um n de 25 éguas inférteis, Long (1988) encontrou 12% de anormalidades cromossômicas, enquanto Chandley *et al.* (1975) com um n de 9 éguas inférteis declara 77% de anormalidades cromossômicas, porém uma das éguas apresentou anormalidade cromossômica não relacionada aos cromossomos sexuais, sendo então 66,6% de anormalidades cromossômicas sexuais. Já Bugno, Slota e Koscielny (2007) encontraram uma incidência de 3,7% em um n de 272 éguas que não foram submetidas a nenhum exame reprodutivo anterior, não sendo assim classificadas em férteis ou inférteis.

Aparentemente a presença do gene SRY em animais com a Síndrome do Sexo Reverso gera algumas alterações fenotípicas ou comportamentais, conforme a descrição das éguas que apresentaram comportamento sexual de macho e uma aparência semelhante a um garanhão (SWITONSKI *et al.*, 2004; MAKINEN *et al.*, 2001).

Animais com o cariótipo 64,XY conhecido são investigados em sua maioria, assim como todas as outras anormalidades cromossômicas sexuais, por apresentarem problemas de fertilidade. Uma égua com o cariótipo 64,XY apresentou-se fértil (SHARP; WACHTEL; BENIRSCHKE, 1980). Porém os autores especulam a possibilidade da presença de células XX ou XO ocultas nos ovários, o que justificaria a fertilidade da égua, tornando-a desta forma um animal com quimerismo, não com síndrome do sexo reverso.

Pesquisadores da síndrome de Turner, em humanos, ao relatar casos de mulheres XO que foram capazes de levar as gestações a termo, questionam a necessidade absoluta da presença dos dois cromossomos sexuais na mulher como requisito para a fertilidade. Porém, a infertilidade é o principal sinal de éguas que apresentam o cariótipo 63,XO e mesmo com o argumento de Long (1985), de que algumas éguas XO poderiam ser capazes de produzir pelo menos um potro em sua vida inteira, nenhuma prenhez provinda de éguas com monossomia do cromossomo X foi relatada até o momento.

Por vezes o mosaicismo 63,XO/64,XX pode não ser determinante de infertilidade como apontado por Halnan (1985). Porém, o mesmo estudo indicou que 88,8% das éguas estéreis

ou inférteis estudadas foram identificadas como 63,XO/64,XX. Estes diferentes resultados provindos de um mesmo estudo, com um mesmo delineamento, poderiam ser justificados pela quantidade de células sanguíneas de cada cariótipo em cada égua.

Em contraste com humanos onde a maior parte das mulheres com o cariótipo 45,XXX menstrua normalmente e é capaz de conceber uma criança (JOHNSTON *et al.*, 1961), as éguas com o cariótipo 65, XXX aparentemente são inférteis, não sendo capazes nem de manter um embrião provindo de uma transferência (HINRICHS; RIERA; KLUNDER, 1989).

Pelo fato de muitos autores indicarem diferentes prevalências das anormalidades cromossômicas sexuais, talvez fosse necessário fazer um estudo mais abrangente, com um número maior de animais, de diferentes raças e de diferentes regiões. Semelhante ao que Bugno; Slota; Koscielny (2007) fizeram ao analisar 272 éguas, entre férteis e inférteis, de mais de dez raças, nos permitindo observar uma prevalência de animais 63,XO/64,XX.

REFERÊNCIAS

- ANAYA, G. et al. Sex chromosomal abnormalities associated with equine infertility: validation of a simple molecular screening tool in the Purebred Spanish Horse. **Animal Genetics**, 2017.
- ANAYA, Gabriel et al. Sex reversal syndrome in the horse: Four new cases of feminization in individuals carrying a 64, XY SRY negative chromosomal complement. **Animal reproduction science**, v. 151, n. 1, p. 22-27, 2014.
- BLUE, M. G.; BRUERE, A. N.; DEWES, H. F. The significance of the XO syndrome in infertility of the mare. **New Zealand veterinary journal**, v. 26, n. 6, p. 137-141, 1978.
- BOWLING, A. T. Blood typing invalidates alleged evidence of fertility of XO mare. **Theriogenology**, v. 24, n. 2, p. 203-210, 1985.
- BOWLING, A. T. et al. International system for cytogenetic nomenclature of the domestic horse: report of the Third International Committee for the Standardization of the domestic horse karyotype, Davis, CA, USA, 1996. **Chromosome Research**, v. 5, n. 7, p. 433-443, 1997.
- BOWLING, A. T.; MILLON, L. V. Two autosomal trisomies in the horse: 64, XX,- 26,+ t (26q26q) and 65, XX,+ 30. **Genome**, v. 33, n. 5, p. 679-682, 1990.
- BOWLING, A. T.; RUVINSKY, A. *The Genetics of the Horse*. New York. 2000.
- BRUÈRE, A. N. et al. Preliminary observations on the occurrence of the equine XO syndrome. **New Zealand veterinary journal**, v. 26, n. 6, p. 145-146, 1978.
- BUENO, Verônica La Cruz et al. Pseudo-hermafroditismo masculino em um equino. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 45, p. 01-08, 2017.
- BUGNO, M. et al. Nonmosaic X trisomy, detected by chromosome painting, in an infertile mare. **Equine veterinary journal**, v. 35, n. 2, p. 209-210, 2003.
- BUGNO, Monika et al. A sporadic case of the sex-reversed mare (64, XY; SRY-negative): molecular and cytogenetic studies of the Y chromosome. **Theriogenology**, v. 59, n. 7, p. 1597-1603, 2003.
- BUGNO; SLOTA; KOSCIELNY. Karyotype evaluation among young horse populations in Poland. **Schweizer Archiv für Tierheilkunde**, v. 149, n. 5, p. 227-232, 2007.

- BUOEN, L. C. et al. Sterility associated with an XO karyotype in a miniature horse mare. **Equine veterinary journal**, v. 25, n. 2, p. 164-165, 1993.
- BURGOYNE, P. S.; BAKER, T. G. Oocyte depletion in XO mice and their XX sibs from 12 to 200 days post partum. **Journal of reproduction and fertility**, v. 61, n. 1, p. 207-212, 1981.
- CHANDLEY, A. C. et al. Chromosome abnormalities as a cause of infertility in mares. **Journal of reproduction and fertility. Supplement**, n. 23, p. 377-383, 1975.
- CHAUFFAILLE, Maria de Lourdes Lopes Ferrari. Análise citogenética e FISH no monitoramento da LMC em tratamento com inibidores da tirosino quinase. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, 2008
- CUI, Chenghua; SHU, Wei; LI, Peining. Fluorescence in situ hybridization: cell-based genetic diagnostic and research applications. **Frontiers in cell and developmental biology**, v. 4, 2016.
- DE LORENZI, L. et al. X trisomy in a sterile mare. **Equine veterinary journal**, v. 42, n. 5, p. 469-470, 2010.
- DEMYDA-PEYRAS, S. et al. The use of molecular and cytogenetic methods as a valuable tool in the detection of chromosomal abnormalities in horses: a case of sex chromosome chimerism in a Spanish Purebred colt. **Cytogenetic and genome research**, v. 141, n. 4, p. 277-283, 2013.
- HALNAN, C. R. E. Equine cytogenetics: role in equine veterinary practice. **Equine veterinary journal**, v. 17, n. 3, p. 173-177, 1985.
- HASEGAWA, Telhisa et al. Sex determination by simultaneous amplification of equine SRY and amelogenin genes. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 62, n. 10, p. 1109-1110, 2000.
- HERSCHLER, Michael S.; FECHHEIMER, N. S. The role of sex chromosome chimerism in altering sexual development of mammals. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 6, n. 3-4, p. 204-212, 1967.
- HINRICHS, Katrin; RIERA, Fernando L.; KLUNDER, Lynne R. Establishment of pregnancy after embryo transfer in mares with gonadal dysgenesis. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 6, n. 5, p. 305-309, 1989.
- HUGHES, J. P.; ROMMERSHAUSEN-SMITH, AT. Infertility in the horse associated with chromosomal abnormalities. **Australian veterinary journal**, v. 53, n. 6, p. 253-257, 1977.
- HUGHES, JOHN P.; KENNEDY, PETER C.; BENIRSCHKE, KURT. XO—Gonadal Dysgenesis in the Mare. **Equine veterinary journal**, v. 7, n. 2, p. 109-112, 1975.
- JOHNSTON, A. W. et al. The triple-X syndrome. **British medical journal**, v. 2, n. 5259, p. 1046, 1961.

KENT, Marijo G. et al. XY sex reversal syndrome in the mare: clinical and behavioral studies, HY phenotype. **Human genetics**, v. 79, n. 4, p. 321-328, 1988.

KUBIEŃ, ELISABETH M.; POZOR, MARGARET A.; TISCHNER, M. Clinical, cytogenetic and endocrine evaluation of a horse with a 65, XXY karyotype. **Equine veterinary journal**, v. 25, n. 4, p. 333-335, 1993.

LEAR, T. L.; BAILEY, E. Equine clinical cytogenetics: the past and future. **Cytogenetic and genome research**, v. 120, n. 1-2, p. 42-49, 2008.

LEAR, T. L.; MCGEE, R. B. Disorders of sexual development in the domestic horse, *Equus caballus*. **Sexual Development**, v. 6, n. 1-3, p. 61-71, 2012.

LONG, SUSAN E. Chromosome anomalies and infertility in the mare. **Equine veterinary journal**, v. 20, n. 2, p. 89-93, 1988.

MÄKINEN, A. et al. Two sterile stallions with XXY-syndrome. **Equine veterinary journal**, v. 32, n. 4, p. 358-360, 2000.

MÄKINEN, A. et al. X chromosome detection in an XO mare using a human X paint probe, and PCR detection of SRY and amelogenin genes in 3 XY mares. **Equine veterinary journal**, v. 33, n. 5, p. 527-530, 2001.

MÄKINEN, Auli; KATILA, Terttu. Cytogenetic analysis as a tool for studying infertility in horses. **The Journal of Animal Genetics**, v. 31, n. 2, p. 41-46, 2004.

MCFEELY, R. A. A review of cytogenetics in equine reproduction. **Journal of reproduction and fertility. Supplement**, n. 23, p. 371-374, 1975.

MIYAKE, Yoh-Ichi; ISHIKAWA, Tsune; KAWATA, Keiichiro. Three cases of mare sterility with sex-chromosomal abnormality (63, X). **Reproduction in Domestic Animals**, v. 14, n. 4, p. 145-150, 1979.

MORENO-MILLÁN, M. et al. First report of cytogenetic studies in Spanish breed horses. **Genetics Selection Evolution**, v. 23, n. 1, p. S176, 1991.

PAILHOUX, E. et al. Molecular analysis of an XY mare with gonadal dysgenesis. **Hereditas**, v. 122, n. 2, p. 109-112, 1995.

PASHEN, R. L.; DOWNIE, C.; MCCUE, P. An attempt to use progesterone treated XO mares as embryo recipients. **Equine Veterinary Journal**, v. 21, n. S8, p. 59-61, 1989.

PRESTES, Nereu Carlos et al. Um caso de disgenesia gonadal em uma égua. **Veterinária e Zootecnia**, v. 14, n. 1, p. 36-42, 2007.

REID, Scott W.; WEATHERSTON, John F.; ROBINSON, Bruce N. X chromosome mosaicism and infertility in a mare. **The Canadian Veterinary Journal**, v. 28, n. 8, p. 533, 1987.

SHARP, Auddie J.; WACHTEL, S. S.; BENIRSCHKE, K. HY antigen in a fertile XY female horse. **Journal of reproduction and fertility**, v. 58, n. 1, p. 157-160, 1980.

SPEICHER, Michael R.; CARTER, Nigel P. The new cytogenetics: blurring the boundaries with molecular biology. **Nature Reviews Genetics**, v. 6, n. 10, p. 782-792, 2005.

STEWART-SCOTT, I. A. Infertile mares with chromosome abnormalities. **New Zealand veterinary journal**, v. 36, n. 2, p. 63-65, 1988.

SWITONSKI, M. et al. Sex reversal syndrome (64, XY; SRY-positive) in a mare demonstrating masculine behaviour. **Journal of Animal Breeding and Genetics**, v. 122, n. s1, p. 60-63, 2005.

TEPLITZ, RAYMOND L.; BEUTLER, ERNEST. Analytical Review: Mosaicism, Chimerism and Sex-Chromosome Inactivation. **Blood**, v. 27, n. 2, p. 258-271, 1966.

TSUCHIYA, Karen D. Fluorescence in situ hybridization. **Clinics in laboratory medicine**, v. 31, n. 4, p. 525-542, 2011.

VILLAGÓMEZ, D. A. F. et al. Equine disorders of sexual development in 17 mares including XX, SRY-negative, XY, SRY-negative and XY, SRY-positive genotypes. **Sexual Development**, v. 5, n. 1, p. 16-25, 2011.

WRAY, H. Linton; FREEMAN, Mahlon VR; MING, Pen-Ming L. Pregnancy in the turner syndrome with only 45, X chromosomal constitutions. **Fertility and sterility**, v. 35, n. 5, p. 509-514, 1981.

ZENTENO-RUIZ, Juan Carlos; KOFMAN-ALFARO, Susana; MÉNDEZ, Juan Pablo. 46, XX sex reversal. **Archives of medical research**, v. 32, n. 6, p. 559-566, 2001.

ZINN, Andrew R.; PAGE, David C.; FISHER, Elizabeth MC. Turner syndrome: the case of the missing sex chromosome. **Trends in Genetics**, v. 9, n. 3, p. 90-93, 1993.