

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II

FACOLTA' DI MEDICINA VETERINARIA



DOTTORATO DI RICERCA IN

PRODUZIONE E SANITA' DEGLI ALIMENTI DI ORIGINE ANIMALE

INDIRIZZO: SCIENZE DELL' ALLEVAMENTO ANIMALE

XXIV CICLO

**L' uso delle analisi citogenetiche nella valutazione
dei riproduttori – Risultati sperimentali.**

.

TUTOR

Ch.mo Prof. Vittorio Barbieri

CANDIDATO

Dott.ssa Maria Franzese

COORDINATORE

Ch.ma Prof. ssa M.L. Cortesi

INDICE

Introduzione	pag. 3
La Citogenetica	pag. 5
Le Analisi Citogenetiche	pag. 8
Analisi del Cariotipo	pag. 8
Test di valutazione delle Aberrazioni Cromosomiche	pag. 13
Test dello Scambio tra Cromatidi Fratelli	pag. 16
Analisi dei Siti Fragili	pag. 19
Le anomalie cromosomiche nei cromosomi sessuali	pag. 22
Proposta di una nuova classificazione degli intersessi	pag. 24
Free-martinismo	pag. 25
Traslocazione	pag. 28
Parte Sperimentale	pag. 31
Metodiche utilizzate per le analisi citogenetiche	pag. 31
Risultati sperimentali nel bovino	pag. 35
Casi di freemartinismo nel bovino Agerolese	pag. 36
Traslocazione nel TGA Agerolese	pag. 42
SCE nel bovino Agerolese	pag. 46
Risultati sperimentali nel bufalo mediterraneo	pag. 48
Casi di freemartinismo nella bufala	pag. 50
Traslocazione nel bufalo	pag. 52
Caso di intersesso nel bufalo	pag. 56
Risultati sperimentali nel cavallo	pag. 58
Anomalie nel cavallo – descrizione di 2 casi di sesso invertito	pag. 58
Risultati sperimentali nel suino	pag. 65
Alterazioni genetiche nel suino	pag. 65

Descrizione di 2 casi di intersesso nel suino	pag. 66
Anomalie genetiche nel cane	pag. 71
Casi osservati nel cane	pag. 74
Ibridi di cinghiale: caso di nanismo	pag. 77
Discussione e Conclusioni	pag. 82
Bibliografia	pag. 85

Introduzione

Le specie animali, in particolare modo quelle domestiche, nel corso della loro evoluzione si sono differenziate in razze o biotipi con differenti forme e funzioni, molto diverse da quelle del progenitore selvaggio. L'evoluzione genetica è avvenuta in seguito alla selezione naturale ma per gli animali domestici sono state le pressioni selettive messe in atto dall'uomo che hanno determinato le caratteristiche delle specie e delle razze allevate.

A partire dagli inizi del XIX secolo si è consolidata la teoria moderna dell'allevamento animale grazie all'evoluzione delle nuove conoscenze sui meccanismi dell'eredità e dell'utilizzo di sempre più sofisticati metodi statistici. Su queste basi furono formulati piani di miglioramento basati su teorie scientifiche e preparate in scala sufficientemente grande per aver successo.

Il miglioramento genetico delle specie animali di interesse zootecnico e veterinario è quel processo che consente di incrementare le prestazioni produttive e riproduttive degli allevamenti attraverso la selezione, cioè la valutazione e la conseguente scelta dei riproduttori.

Si tratta di uno degli aspetti essenziali della gestione dell'allevamento così come le tecniche di alimentazione, mungitura e riproduzione che l'allevatore deve considerare per aumentare le produzioni della propria azienda. Rispetto a queste ultime, però, il miglioramento genetico induce incrementi permanenti dei caratteri produttivi selezionati da cui la particolare attenzione nella scelta dei soggetti da destinare alla riproduzione.

Il miglioramento genetico dei caratteri di interesse zootecnico si persegue mettendo in essere quattro punti fondamentali:

- a) la scelta degli obiettivi della selezione con la definizione, a livello operativo, dei caratteri sui quali concentrare gli sforzi del miglioramento genetico;
- b) lo studio e la descrizione della popolazione oggetto di selezione a partire dai fenotipi, dalle parentele fra gli animali, dall'entità della variabilità dei fenotipi;
- c) la valutazione genetica dei riproduttori;

d) la scelta dei criteri o della strategia di miglioramento da adottare, che consiste nel definire i programmi di selezione in base al progresso genetico atteso ed al suo costo.

E' evidente come la scelta dei riproduttori, prima di tutto esenti da anomalie genetiche (cromosomiche e geniche) ed in secondo luogo con un valore genotipico additivo superiore a quello medio della popolazione, sia un punto chiave di tale processo.

Le anomalie cromosomiche numeriche che interessano i cromosomi sessuali e quelle strutturali bilanciate, hanno lievi effetti sulla morfologia dell'animale portatore e vengono ben tollerate dalle pressioni selettive. Queste anomalie cromosomiche, quasi sempre, sfuggono all'osservazione più attenta e, senza un'analisi citogenetica, possono diffondersi facilmente nella progenie ed in breve tempo, specie mediante l'inseminazione strumentale, con conseguente deterioramento del patrimonio genetico (Gustavsson 1969, 1980). Inoltre, il controllo citogenetico dovrebbe essere una costante in tutti quei casi di femmine che, pur avendo raggiunto l'età puberale, presentano difficoltà riproduttive.

Attualmente, sulla base delle scoperte fatte nel settore della genetica animale e delle tecniche diagnostiche a disposizione, è possibile escludere le anomalie cromosomiche mediante analisi citogenetiche. Infatti già da diversi anni, i più importanti centri di inseminazione strumentale richiedono l'analisi del cariotipo per i riproduttori da utilizzare sia nella inseminazione naturale che strumentale al fine di evitare la diffusione di anomalie cromosomiche che si ripercuotono sulle capacità produttive e riproduttive degli animali (Sindrome di Turner, Sindrome di Klinefelter, Freemartinismo, Sindrome del sesso invertito, ecc).

In questa tesi verranno descritte le anomalie individuate in diverse specie mediante le indagini citogenetiche effettuate nel corso del periodo di dottorato volte ad individuare attraverso la valutazione citogenetica la capacità riproduttiva dei soggetti esaminati.

La Citogenetica

La Citogenetica è storicamente una scienza ibrida nata dalla fusione della Citologia con la Genetica e attualmente consolidata dalle scoperte fatte in altre discipline come la Biochimica, la Biologia molecolare, la Fisica e la Microscopia elettronica.

In un contesto moderno la Citogenetica si estende oltre la conoscenza della trasmissione e continuità dei caratteri, proiettandosi verso lo studio dell'assetto cromosomico delle cellule quale elemento organizzativo del loro genoma.

In origine la Citogenetica si è sviluppata soprattutto sui vegetali, dove ha contribuito a spiegare i meccanismi della determinazione del sesso e ha messo in evidenza fenomeni come la poliploidia e l'eteroploidia. Intorno agli anni '60 il notevole incremento assunto da questo ramo della genetica nell'uomo ha contribuito a richiamare l'attenzione dei ricercatori anche sugli animali, prima quelli di laboratorio e successivamente quelli allevati a scopo zootecnico (Basrur and Stranzinger, 2008). Negli ultimi decenni, grazie a numerose ricerche nel settore della citogenetica veterinaria, sono state individuate numerose anomalie cromosomiche, spesso associate a disordini clinici soprattutto di tipo riproduttivo.

Le tappe fondamentali della Citogenetica possono essere sintetizzate nei seguenti momenti:

- (a) nel 1934 Lits scopre che la Colchicina, un alcaloide vegetale, arresta la divisione cellulare alla metafase, stadio in cui i cromosomi sono meglio visibili;
- (b) l'anno successivo Khrushev mette in coltura i linfociti del sangue, ma il numero delle metafasi è troppo basso in quanto, ordinariamente, queste cellule non si dividono;
- (c) nel 1944 Avery, McCarty e McLeod scoprono nel DNA la molecola chiave dell'eredità, la cui struttura molecolare viene chiarita nel 1953 da Watson e Crick;
- (d) nel frattempo, Hsu (1952) migliora, mediante il trattamento ipotonico, la qualità delle metafasi, separando meglio i cromosomi, rendendoli distinguibili nel numero e nella forma;

- (e) poco dopo (1958), Nowell scopre che una sostanza estratta dal fagiolo agglutina gli eritrociti e stimola i linfociti alla mitosi.

Dal 1970, con l'avvento delle tecniche di bandeggio, i cromosomi, all'interno di un determinato cariotipo, vengono classificati soprattutto tenendo conto del loro bandeggio (alternanza di zone chiare e scure a seconda delle tecniche) che è tipico per ogni coppia cromosomica. Per le specie più importanti si dispone di cariotipi standard di riferimento in modo da rendere omogenei i risultati nei vari campi di indagini citogenetiche.

Dal 1990, con la disponibilità di sonde di DNA che riconoscono sia singoli loci che intere regioni cromosomiche e interi cromosomi (*painting probe*) e con la tecnica di ibridazione in *situ* in fluorescenza (FISH), la citogenetica degli animali domestici sta vivendo una nuova era con sviluppi molto promettenti. Infatti, con la tecnica FISH non solo si sono sviluppate mappe citogenetiche sempre più ricche, utili per ancorare fisicamente ai singoli cromosomi e alle regioni cromosomiche le mappe di linkage e di ibridi di radiazione, ma è stato possibile capire alcuni riarrangiamenti in diverse anomalie cromosomiche e, soprattutto, i cromosomi coinvolti in tali anomalie (Di Meo *et al.* 2000; Iannuzzi *et al.* 2001a, 2001b, 2001c, 2001d).

La Citogenetica abbraccia sostanzialmente cinque campi di indagine :

- (a) La **Citogenetica clinica** che si occupa delle anomalie cromosomiche numeriche e strutturali e dei loro effetti fenotipici (anomalie somatiche, disturbi riproduttivi, ecc.). Molte malattie nell'uomo sono dovute a disordini cromosomici.
- (b) La **Citogenetica molecolare** che si occupa dell'analisi del DNA e dell'RNA (ribosomico, messaggero e transfer) mediante l'impiego di marker molecolari marcati con sostanze non radioattive e l'utilizzo di alcune tecniche di biologia molecolare e la tecnica FISH, come prima esposto.
- (c) La **Citogenetica evolutiva** che studia le relazioni citotassonomiche tra specie affini mediante il confronto dei quadri di bandeggio cromosomico e, più recentemente, mediante la ZOO-FISH e la FISH-comparativa (ordine dei loci).

- (d) La ***Citogenetica di modificazione*** che indaga sulle possibilità di modificare l'attuale assetto genetico delle popolazioni mediante tecniche di estrema precisione quali l'ingegneria genetica, il trapianto di nuclei, il trasferimento di ovuli o di embrioni, la selezione *in vivo* di spermatozoi contenenti il cromosoma Y, la separazione individuale dei cromosomi per sostituzioni cromosomiche, l'ibridazione di cellule somatiche ed infine la riproduzione clonale.
- (e) La ***Citogenetica ambientale (mutagenesi)*** studia gli effetti sui cromosomi di sostanze mutagene, o potenzialmente mutagene, presenti nell'ambiente e che entrano nella catena alimentare (esposizione *in vivo*) o inoculate nel mezzo di coltura (esposizione *in vitro*).

Nel mondo, ogni anno, si effettuano sempre più numerose analisi citogenetiche sugli animali, principalmente bovini, suini ed equini ed ultimamente anche sugli animali di affezione. L'importanza di tali indagini si evince dai risultati ottenuti ad esempio in Francia dove, in suini fenotipicamente normali, si sono evidenziati riarrangiamenti cromosomici strutturali nello 0,5% dei soggetti analizzati. E' noto che la frequenza della Rob 1;29 nel bovino, responsabile di ipofertilità, è molto diminuita nella maggior parte dei paesi grazie anche all'applicazione di analisi citogenetiche che facilitano l'individuazione dei portatori e ne rendono possibile l'esclusione dalla riproduzione (Ducos et al., 2008). Anche nell'allevamento degli animali di affezione si va diffondendo l'uso delle indagini citogenetiche con risultati di notevole interesse in particolare per la specie canina.

Le analisi citogenetiche

Molti sono i test citogenetici oggi effettuabili in diversi laboratori. Nell'ambito di uno screening di base volto alla valutazione citogenetica di animali di interesse zootecnico le analisi più correntemente effettuate sono: l'Analisi del Cariotipo ed i test di stabilità del genoma (Test di valutazione delle Aberrazioni Cromosomiche; Test dello Scambio tra Cromatidi Fratelli; Analisi dei Siti Fragili).

Analisi del Cariotipo

Il cariotipo di una specie è l'insieme dei cromosomi ottenuti da una singola cellula in metafase ordinati per coppie omologhe seguendo un ordine ben preciso che tiene conto della lunghezza (dai più grandi ai più piccoli), della forma (metacentrici, submetacentrici, acrocentrici, telocentrici) e del quadro di bandeggio (alternanza di zone colorate e non lungo i cromosomi).

In sintesi il cariotipo è il complesso delle caratteristiche utili per riconoscere un particolare assetto cromosomico. Quando i cromosomi sono uniformemente colorati, e senza alcun bandeggio (colorazione normale di Giemsa), è possibile distinguerli solo in base alla loro grandezza e forma realizzando il cariotipo convenzionale.

Con il cariotipo bandeggiato, invece, tutte le coppie cromosomiche sono classificate tenendo conto del loro quadro di bandeggio che è tipico per ogni coppia di cromosomi omologhi.

Esistono varie tecniche di bandeggio: bande strutturali, che sfruttano l'azione singola o combinata di sostanze chimiche (acidi, basi, sali) o enzimatiche (enzimi proteolitici) che, accoppiate ad opportune temperature, denaturano in modo parziale il DNA e le proteine ad esso associate costituenti i cromosomi (Sumner *et al.*, 1971; Schnedl, 1971; Seabright, 1971). Queste tecniche sfruttano, in realtà, il diverso grado di compattezza della cromatina e tra queste ricordiamo le tecniche **GTG, GAG, CBG, CBA e RBT**.

Altre tecniche sfruttano la capacità di alcuni fluorocromi di legarsi preferenzialmente alle regioni ricche in basi A-T (eterocromatina = bande Q), oppure ricche in basi G-C (eucromatina = bande R).

Tra queste le principali sono: **QFH, QFD e RFC**.

Altre tecniche di bandeggio sfruttano l'incorporazione precoce (bande G) o tardiva (bande R) di un analogo della timina, la 5-Bromodesossipuridina (5-BrdU), durante le fasi S1 e S2, rispettivamente, del ciclo cellulare (Dutrillaux *et al.*, 1973), pertanto le bande ottenute sono chiamate bande di replicazione e tra queste ricordiamo: **GBA+CBA, GBG; RBG, RBH e RBA**.

In sintesi possiamo dire che le bande G e Q colorano le regioni eterocromatiche, le bande R quelle eucromatiche e le bande C colorano solo l'eterocromatina costitutiva (HC), che corrisponde a quella parte di eterocromatina altamente condensata (con sequenze di DNA altamente ripetitive) a replicazione tardiva e localizzata soprattutto presso i centromeri. Mentre le bande C sono notevolmente polimorfe, potendo variare tra ed entro il cariotipo di una determinata specie, le bande G e, soprattutto, le R sono strutture fortemente conservative entro la specie.

Lo studio analitico del cariotipo consente di individuare le anomalie cromosomiche, sia numeriche che strutturali.

Le anomalie cromosomiche numeriche (Tabella 1) sono deviazioni dal numero $2n$, in genere sono letali quando interessano gli autosomi, mentre sono più tollerate quando interessano i cromosomi sessuali. La variazione del numero diploide può essere spiegata da un irregolare meccanismo meiotico dei cromosomi. Nella prima profase meiotica si formerebbero diverse configurazioni e, a causa del basso numero di chiasmi, le associazioni sarebbero incomplete, determinando una disgiunzione difettosa nella successiva anafase.

Nel bovino sono noti casi di trisomia autosomica collegati ad una forma grave di brachignatismo al labbro inferiore che non permette agli animali di mangiare. Un'altra trisomia, coinvolgente il cromosoma 22, è stata trovata essere compatibile con la vita dell'animale (femmina) che ha avuto anche progenie.

Nel bufalo (*Bubalus bubalis*, $2n=50$) le anomalie cromosomiche numeriche finora riscontrate sono state a carico dei cromosomi sessuali, in particolare l'anomalia più frequente è risultata essere il freemartinismo ($2n=50$, XX/XY), mentre più rari sono stati i casi di monosomia del cromosoma X ($2n=49$, X/0) (1 caso diagnosticato), e trisomia del cromosoma X ($2n=51$, XXX) (1 caso) (Di Meo G.P., 2008). Anche nelle altre specie sono numerose le osservazioni di anomalie riscontrate e sono state individuate casistiche relative a tutte le alterazioni.

Le anomalie cromosomiche strutturali (Tabella 2), specie se bilanciate (cioè la quantità di DNA presente nelle cellule è quello tipico della specie), non comportando alterazioni visibili nel fenotipo, sfuggono alla selezione e, grazie all'impiego della fecondazione strumentale, possono essere facilmente trasmesse ad una numerosa progenie, con grave danno del patrimonio genetico in quanto riducono il valore riproduttivo dei portatori. Infatti, durante la meiosi, a seconda del tipo di anomalia strutturale presente, si possono generare gameti sbilanciati dal punto di vista genetico che quando si fondono con gameti normali danno origine a zigoti ed embrioni anch'essi geneticamente sbilanciati che muoiono nelle prime settimane di vita.

Le anomalie cromosomiche strutturali più comuni sono: la traslocazione (fusione centrica, a tandem e reciproca), l'inversione, la duplicazione, la delezione e l'isocromosomia.

Nei bovidi, e segnatamente nel bovino, la più diffusa e conosciuta anomalia cromosomica è la traslocazione Robertsoniana o fusione centrica che consiste nella fusione, lungo i centromeri, di cromosomi acrocentrici non omologhi. Ne deriva un cromosoma submetacentrico e la riduzione del numero diploide di un cromosoma per ogni due cromosomi acrocentrici coinvolti nella traslocazione. La più nota e studiata è la traslocazione che coinvolge i cromosomi 1 e 29 del cariotipo bovino. Dalla sua scoperta e relazione con l'ipofertilità (Gustavsson, 1969) questa anomalia è stata riscontrata con diverse frequenze in più di 50 razze, per lo più da carne (Popescu e Pech, 1991), e già da molti anni i più importanti centri genetici richiedono opportuna certificazione per i riproduttori dalla quale risulti, tra l'altro, che il cariotipo sia normale.

Tabella 1. Anomalie cromosomiche numeriche osservate in specie animali e vegetali

Condizione	Terminologia	Interpretazione citologica
Aneuploidia	<p>Monosomia (2n-1)</p> <p>Trisomia (2n+1)</p> <p>Tetrasomia (2n+1)</p> <p>Doppia trisomia (2n+1+1)</p> <p>Nullisomia</p>	<p>Perdita di un cromosoma</p> <p>Aggiunta di un cromosoma</p> <p>Aggiunta di una coppia di omologhi</p> <p>Aggiunta di due cromosomi non omologhi</p> <p>Perdita di una coppia di omologhi</p>
Euploidia	<p>Aploidia: n</p> <p>Triploidia: 3n</p> <p>Tetraploidia: 4n</p> <p>Autotetraploidia: 4n</p> <p>Allotetraploidia: 4n</p>	<p>Un solo genoma</p> <p>Tre genomi</p> <p>Quattro genomi</p> <p>Quattro genomi della stessa specie</p> <p>Quattro genomi di specie o generi diversi</p>

Tabella 2. Anomalie cromosomiche strutturali osservate in specie animali e vegetali

Condizione	Terminologia	Interpretazione citologica
Traslocazione	fusione centrica fusione a tandem reciproca	Fusione centromero-centromero Fusione telomero-telomero o telomero-centromero Trasposizione di segmenti
Inversione	pericentrica paracentrica	Inversione di due segmenti cromosomici intorno al centromero Inversione di due segmenti cromosomici non interessante il centromero
Delezione	terminale interstiziale	Perdita di un segmento cromosomico terminale Perdita di un segmento cromosomico Interstiziale
Duplicazione		Raddoppiamento di un segmento Cromosomico
Gap o segmento acromatico		Discontinuità di colorazione ma non di struttura
Rottura	terminale interstiziale	Discontinuità nella struttura cromosomica localizzata nei telomeri Discontinuità nella struttura cromosomica localizzata in regio intermedie

Test di valutazione delle Aberrazioni Cromosomiche

Le Aberrazioni Cromosomiche (Fig. 1,2,3,4) sono anomalie della struttura, della forma o del numero di cromosomi osservati nello stadio di metafase.

Sono classificate in:

- *Gap*: detta anche lesione acromatica. Consiste in una piccola regione non colorata del cromatidio. Le gap sono presenti anche in cellule apparentemente non esposte a mutageni conosciuti, ma la loro incidenza aumenta di molto nelle cellule esposte a vari mutageni chimici ed in cellule esposte all'azione di virus (Dulout et al., 1985). Il significato biologico delle gap non è del tutto chiarito ma possono essere in parte spiegate vari fenomeni: una parte di esse, forse, dipende da lesioni che possono divenire aberrazioni, altre invece si trovano in punti in cui si sono verificati scambi cromatidici (compresi SCE) (Heddle et al., 1970; Bender et al., 1973), altre potrebbero rappresentare semplicemente regioni localizzate in cui non si è avuto lo svolgimento del DNA.
- *Rotture*: possono essere cromatidiche o cromosomiche, a seconda che sia coinvolto uno solo dei cromatidi o tutto il cromosoma. Esse rappresentano veri e propri punti di discontinuità e possono dare origine a frammenti.
- *Frammenti*: Sono pezzi di cromosomi o di cromatidi che si sono staccati dal restante cromosoma o cromatidio e che molto spesso si sono allontanati dallo stesso. Di conseguenza, saranno cromatidici o cromosomici a seconda che sia coinvolto solo un cromatidio di un cromosoma o entrambi.)

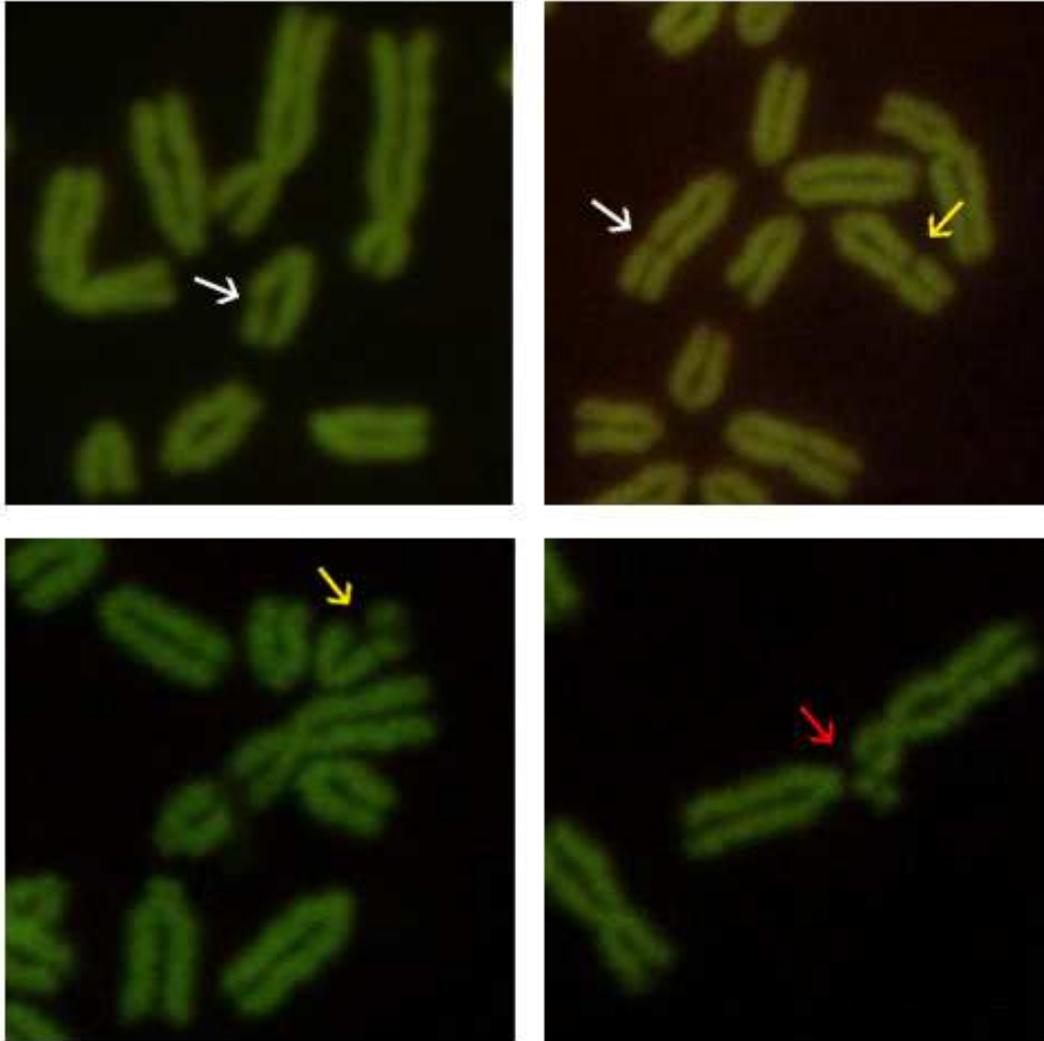


Figure 1,2,3,4. Gap (frecche bianche), rotture cromatidiche (frecche gialle) e rotture cromosomiche (frecche rosse), in cromosomi metafasici di bufalo (*Bubalus bubalis*)

Le Aberrazioni Cromosomiche possono essere il risultato di differenti eventi: rotture dirette del DNA, replicazione di uno stampo danneggiato, inibizione della sintesi del DNA o altri meccanismi ancora il cui esito finale è la rottura della catena polinucleotidica seguita da ricombinazione dei filamenti rotti. Tali rotture possono essere indotte da agenti fisici o chimici, naturali o di sintesi, sia durante la duplicazione che durante i processi di riparazione enzimatici. I cromosomi possono rompersi ad ogni stadio del ciclo cellulare (G1, S, G2) della mitosi e della meiosi. In relazione alla fase del ciclo cellulare in cui il danno al DNA si genera si formano due tipologie differenti di

aberrazioni: cromosomiche (ossia coinvolgenti entrambi i cromatidi allo stesso locus), se il danno si verifica in fase G₀/G₁, cromatidiche (ossia a carico di uno solo dei cromatidi), se si verifica in fase S/G₂. La maggior parte delle rotture si risolve rapidamente, il tempo medio necessario alla riparazione corretta è di circa 4 minuti, grazie a specifici processi di riparazione che coinvolgono numerosi enzimi e richiedono molte reazioni. Qualsiasi interferenza nel corso di tali processi può comportare l'aumento delle aberrazioni cromosomiche.

Studi sperimentali hanno dimostrato che nelle cellule animali la localizzazione delle aberrazioni cromosomiche non è casuale, ma che sono principalmente colpite le regioni eucromatiche rispetto a quelle eterocromatiche. Tuttavia, poiché le regioni eucromatiche sono riparate più rapidamente delle eterocromatiche è in queste ultime che si riscontrano più frequentemente le aberrazioni cromosomiche.

Nell'uomo le aberrazioni cromosomiche, strutturali e numeriche, sono state associate ad anomalie congenite ed a processi neoplastici. E' stato rilevato che la frequenza spontanea di aberrazioni cromosomiche in neonati è di circa 0,6%, e che nel 50% degli aborti spontanei sono presenti anomalie cromosomiche. Molte malattie genetiche recessive come l'ataxia – teleangectasia (AT), l'anemia di Fanconi (FA) e la sindrome di Bloom (BS) sono associate all'aumento della instabilità cromosomica; infine recenti studi indicano una correlazione positiva tra la frequenza delle aberrazioni cromosomiche spontanee in linfociti periferici e l'avanzato stadio del cancro.

Anche negli animali domestici le aberrazioni cromosomiche, strutturali e numeriche, sono state messe in relazione con malformazioni congenite (Di Berardino et al., 1983; Nowacka et al., 2007) e processi tumorali (Lioi et al., 2004; Peretti et al., 2007). Di Berardino et al. (1983) in una vitella, incrocio Limousine x Frisona Italiana, con malformazioni a carico degli arti anteriori (il sinistro amputato a livello del carpo ed il destro terminante con un'unghia ad uncino) ha riportato un aumento dell'instabilità cromosomica evidenziata dall'aumento del numero di rotture cromosomiche e cromatidiche. Nowacka et al. (2007) in un caso di polimelia in una vitella di razza Frisona ha effettuato analisi citogenetiche in due età differenti, a 4 e 17 mesi rivelando una

riduzione delle rotture cromatidiche e cromosomiche dal 28% al 16%. Il numero diploide era normale ($2n=60$ XX).

Lioi (2004) e Peretti (2007) in bovini affetti da Ematuria Enzootica Cronica (CEH), grave sindrome determinata dall'assunzione prolungata di ptaquiloside e quercitina, sostanze mutagene e cancerogene contenute nella felce aquilina (*Pteridium aquilinum*), hanno evidenziato un aumento del numero di aberrazioni cromosomiche (aneuploidia, gaps, rotture cromatidiche e cromosomiche, frammenti) rispetto al gruppo controllo.

Test dello Scambio tra Cromatidi Fratelli

Gli scambi tra cromatidi fratelli rappresentano una ricombinazione tra eliche di DNA durante la replicazione cromosomica e consistono in uno scambio reciproco di materiale genetico identico da un cromatidio al suo fratello. Non sono eventi mutazionali in senso stretto perché sono scambiate parti identiche di DNA, e ad oggi non si hanno evidenze di effetti negativi sulla salute umana da parte degli SCE.

È stato dimostrato che numerosissimi agenti mutageni e clastogeni inducono SCE a dosi molto più basse di quelle necessarie ad indurre mutazioni puntiformi ed aberrazioni cromosomiche strutturali. Indotti o spontanei, gli SCE indicano errori nella replicazione del DNA e l'aumento della loro frequenza nelle cellule eucarioti si verifica ogniqualvolta vi siano danni al DNA che interferiscono con i suoi processi di replicazione, pertanto fenomeni capaci di determinare solo rotture del filamento di DNA non sono in grado di generarli.

Sono localizzati per lo più nelle regioni eucromatiche o all'altezza della giunzione tra queste e le regioni eterocromatiche.

Furono evidenziati per la prima volta da Taylor in cromosomi di cellule somatiche di pianta (Taylor, 1958). Gli studi di Taylor dimostrarono che gli SCE si verificano in corso di replicazione del cromosoma e aprirono la strada per lo sviluppo di metodiche che consentissero una loro facile evidenziazione. Un importante passo avanti si ebbe quando si scoprì che la BrdU, analogo della

Timidina, incorporata per due cicli cellulari successivi dalle cellule, porta alla formazione di cromosomi i cui cromatidi fratelli hanno una composizione differente (BB-TB) (Figura 5 e 6) che può essere evidenziata usando la colorazione Giemsa (FPG), oppure coloranti fluorescenti quali la bisbenzimidide (Hoechst 33258), l'arancio d'acridina (Figura 7) o combinazioni di Hoechst e Giemsa. La tecnica FPG fu quella che più si diffuse in virtù della sua semplicità d'esecuzione e perché i vetrini così preparati potevano essere conservati a lungo. La frequenza degli SCE fu correlata al contenuto di DNA della cellula esaminata, mentre non è stata ancora evidenziata una correlazione tra gli SCE e le mutazioni puntiformi, infatti i più potenti induttori di SCE non sono responsabili della comparsa di mutazioni puntiformi, tuttavia più sono numerosi gli scambi più il genoma è potenzialmente esposto a mutazioni genetiche.

Il test SCE è stato usato per valutare la stabilità del genoma nell'uomo e nella maggior parte delle specie animali domestiche, quali il bovino (Ciotola et al., 2005; Di Berardino et al., 1979; Iannuzzi et al., 1991), il bufalo (Iannuzzi et al., 1988), la capra (Di Meo et al., 1993), la pecora (Di Meo et al., 2000) ed il suino (Peretti et al., 2006; Rubes et al., 1987), per evidenziare i danni al DNA indotti da composti chimici di origine naturale o artificiale (Iannuzzi et al., 1990, 2004; Perucatti et al., 2006; Peretti et al., 2007). E' stato inoltre utilizzato per valutare la stabilità del genoma di individui affetti da patologie tumorali (Karaman et al., 2008; Cefle et al., 2006) o con malformazioni congenite degli arti (Di Berardino et al., 1983).

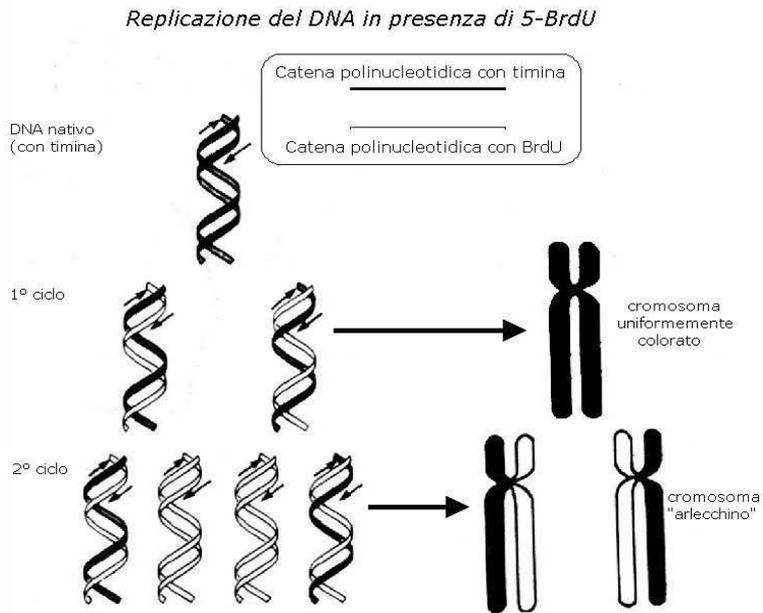


Figura 5 . Schema di replicazione del DNA in presenza di 5-BrdU

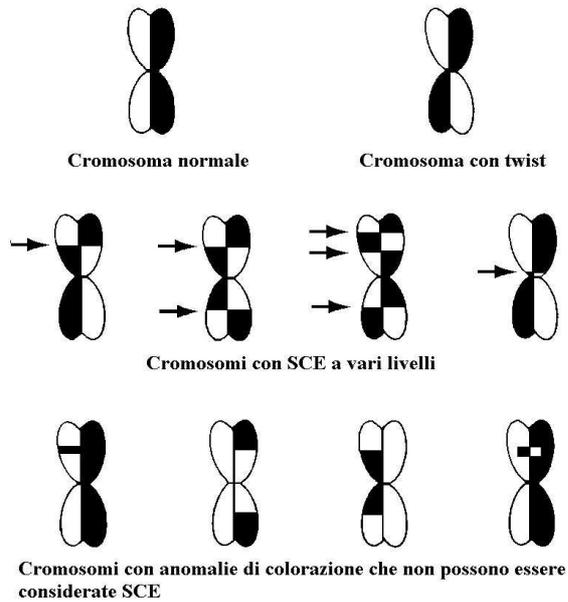


Figura 6. Schema di interpretazione degli SCE secondo Carrano e Natarajan (1998)

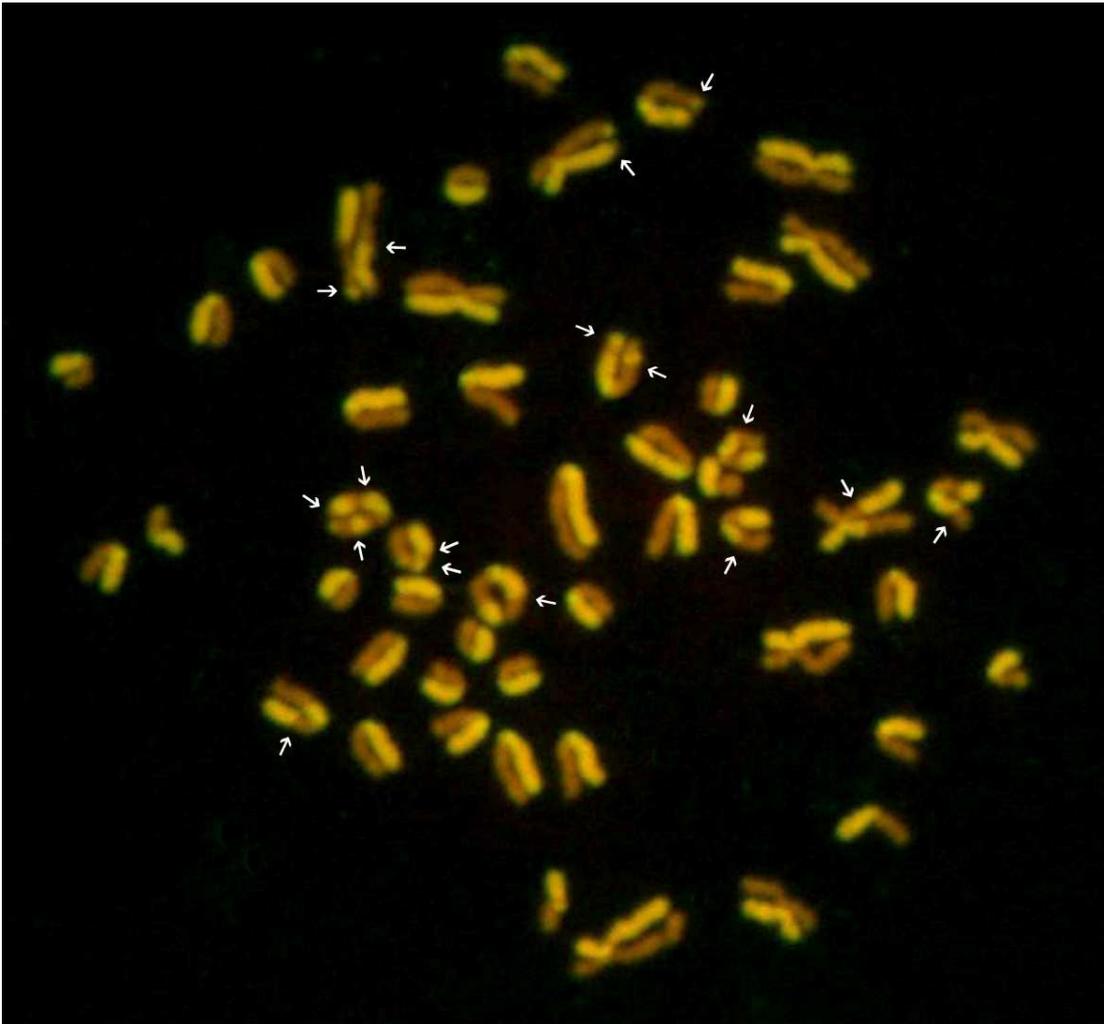


Figura 7. Piastra metafasica di bufalo (*Bubalus bubalis*; $2n=50$) con cromosomi colorati con arancio d'acridina per la visualizzazione degli SCE (indicati dalle frecce)

Analisi dei Siti Fragili

I Siti Fragili (SF) sono regioni cromosomiche ben definite, la cui particolare condizione chimica o strutturale le rende molto vulnerabili e sede preferenziale di gap, rotture cromosomiche, delezioni, traslocazioni ed SCE. Inoltre sono siti elettivi di ricombinazione genica, infatti i siti fragili sono localizzati prevalentemente nelle regioni cromosomiche coinvolte durante l'evoluzione in fenomeni di riarrangiamenti, e di integrazione virale (Nicodemo et al., 2008).

Nei preparati citogenetici si presentano come un punto non colorato del cromosoma (gap cromatidica), meno frequentemente come rotture e solo raramente come delezioni. Tali regioni in

normali condizioni colturali risultano stabili e si evidenziano quando i processi di replicazione del DNA sono parzialmente inibiti da agenti esterni, come sostanze quali l'afidicolina (Arlt et al., 2006).

Da un punto di vista evolutivo i siti fragili sono conservati e trasmessi per via ereditaria come i geni codominanti (Sutherland e Hecht 1985).

In base alla frequenza con cui sono presenti sono divisi in comuni, se presenti in quasi tutti gli individui di una stessa specie, e rari, se presenti solo in alcuni individui, nell'uomo un SF è considerato raro se presente in meno di 1 individuo su 20 (Debacker and Kooy, 2007).

La maggior parte dei Siti Fragili rari sono folato-sensibili, ossia espressi dalle cellule quando coltivate in medium carenti di acido folico e sono associati all'amplificazione di ripetizioni del trinucleotide CGG. In condizioni normali questo trinucleotide CGG è presente nel genoma in gruppi di ripetizioni minori di 50, quando questo numero di ripetizioni aumenta (più di 200) si ha la formazione di un Sito Fragile. Poiché non sono presenti in tutti gli individui essi o vengono ereditati in maniera mendeliana o compaiono ex novo in seguito a mutazioni (Kremer et al., 1991; Sutherland et al., 1998). In passato sono stati spesso associati a patologie ereditarie (Rozier et al. 2004, Schwartz et al, 2006).

I Siti Fragili comuni sono parte integrante del normale genoma di un individuo e la maggior parte di essi può facilmente essere indotto nelle cellule mediante l'esposizione ad afidicolina o ad agenti inibitori della DNA polimerasi. Generalmente sono localizzati in regioni del DNA ricche di AT e si estendono per centinaia, se non migliaia di kilobasi, localizzandosi anche nell'ambito di sequenze geniche. Sono stati spesso associati a riarrangiamenti cromosomici in cellule tumorali (Smith et al. 2006).

Diversi studi hanno dimostrato che la localizzazione di alcuni Siti Fragili nel genoma è comune a specie diverse, in particolar modo molti Siti Fragili presenti nell'uomo sono stati individuati anche nel topo (Elder and Robinson, 1989; McAllister and Greenbaum, 1997), nel cane (Stone et al., 1991), nel gatto (Stone et al., 1993), nel suino (Yang and Long, 1993) ed in varie specie di primati

(Ruiz-Herrera et al., 2004; Smeets and van de Klundert 1990; Soulie and De Grouchy, 1981), indicando che rivestono un importante ruolo funzionale. Arlt et al. (2006) li propongono quali punti di controllo del ciclo cellulare. Infatti sono regioni del DNA a replicazione tardiva per cui la cellula impedirebbe l'inizio della mitosi fintantoché essi non sono stati replicati. Ciò spiegherebbe perché tali regioni risultano altamente destabilizzate, quindi facile sede di rottura, in tutti i casi in cui i processi di replicazione del DNA vengono alterati.

Nella specie umana i SF sono stati messi in relazione a patologie tumorali e congenite (come sindromi di ritardo mentale associate o meno ad altre malformazioni), mentre nelle specie animali pochi risultano gli studi effettuati. Le specie più studiate sono il bovino (Rodriguez *et al.*, 2002), il suino (Ronne, 1995), il coniglio (Paulsen et al., 1991) ed il cavallo (Ronne, 1992) e recentemente anche il bufalo (Nicodemo et al. 2008).

Ci soffermeremo ora in modo più approfondito su alcune delle alterazioni cromosomiche che saranno oggetto della trattazione relative alla descrizione dei risultati sperimentali: anomalie cromosomiche dei cromosomi sessuali, intersessi e nuova proposta di classificazione, freemartinismo e traslocazione.

Le anomalie cromosomiche nei cromosomi sessuali

Le anomalie cromosomiche che interessano i cromosomi sessuali possono essere numeriche o strutturali. Come prima menzionato, le anomalie numeriche che interessano i cromosomi sessuali sono più tollerate dalle specie in quanto i geni sono presenti in singola copia. Questo è dovuto ad un meccanismo in base al quale la maggior parte dei geni di uno dei due cromosomi X viene inattivato a random, per cui uno solo dei due loci presenti in entrambi i cromosomi si esprime. Queste anomalie cromosomiche comportano, in genere, lievi danni a livello morfologico ma quasi sempre sono responsabili di sterilità o, in misura minore, di ipofertilità. Per tale motivo, esse rivestono grande importanza nell'allevamento animale.

Prima di menzionare le più importanti anomalie che colpiscono i cromosomi sessuali, è bene ricordare il ruolo cruciale che riveste il cromosoma Y nel determinismo del sesso. Tale cromosoma è, in genere, molto piccolo e, ad eccezione di una piccola regione eucromatica, è generalmente di natura eterocromatica. Questo è dovuto al fatto che tale cromosoma contiene pochi geni, quasi tutti coinvolti nel determinismo del sesso. In particolare, un gene (SRY= sex determining region) è responsabile della formazione dei testicoli che, tramite la produzione di testosterone, generano la formazione dell'apparato sessuale maschile. Allo stesso tempo, i testicoli producono anche le cellule del Sertoli che secernono l'ormone Anti-Mülleriano (AMH) responsabile della regressione dei dotti di Müller. Per tale motivo, quando questo cromosoma è presente, il sesso dell'animale sarà sempre maschile, qualunque sia il numero dei cromosomi X presenti. Vi è una sola eccezione a questa regola nella sindrome del sesso invertito.

Le più note anomalie numeriche che interessano i cromosomi sessuali sono le seguenti:

monosomia del cromosoma X (sindrome di Turner nell'uomo). Nell'uomo circa il 90% dei concepimenti sfociano in aborti spontanei, generalmente a 28 settimane (Powell, 1999), mentre i soggetti che sopravvivono presentano amenorrea e sterilità. Questa sindrome è molto rara negli animali domestici (Gustavsson, 1980; Iannuzzi et al., 2000; Makinen et al., 2001). Le femmine sono

in genere sterili per gravi danni all'apparato riproduttore interno e, spesso presentano uno sviluppo stentato. Nel bufalo due femmine portatrici di tale sindrome, oltre ad essere sterili (mancanza degli annessi interni in un caso e atrofia dei dotti di Muller nell'altro), le due femmine presentavano chiari tratti somatici maschili (garrese prominente, bacino stretto, corna più grandi) (Iannuzzi et al., 2000). trisomia del cromosoma X. Tale sindrome comporta anch'essa gravi problemi a livello riproduttivo per gravi danni agli annessi riproduttivi interni. Questo significa che non tutti i geni presenti in due dei tre cromosomi X sono geneticamente inattivi. Infatti, è stato visto che diversi geni restano attivi. Anche tale sindrome è stata trovata in diverse specie domestiche, incluso il bovino ed il bufalo (Iannuzzi et al. 2004), anche se molto rara.

maschi XXY (sindrome di Klinefelter nell'uomo). Tale sindrome è molto rara negli animali domestici. Come prima descritto, qualunque sia il numero dei cromosomi X presenti, il sesso del portatore sarà sempre maschile per la presenza del cromosoma Y. Nell'uomo gli individui affetti da questa sindrome presentano un fenotipo maschile con ipogonadismo, azospermia e sterilità.

sindrome del sesso invertito. Questa particolare anomalia è essenzialmente dovuta al fatto che pur essendo il cariotipo XX (femminile), oppure XY (maschile), i portatori mostrano caratteri del sesso opposto. Nelle femmine XY ciò è dovuto al fatto che i geni legati al sesso, ed in particolare il gene SRY (gene che determina il sesso), sono stati inattivati oppure deleti in seguito a rimaneggiamenti cromosomici (Berkovitz et al., 1991; Hawkins 1993; Zeng et al. 1993; Scherer et al. 1998). Questo fa sì che l'animale (che è un maschio mancato), pur avendo il cromosoma Y, non si presenta di sesso maschile. Tale sindrome è stata riscontrata sia nel bovino che nel bufalo (Iannuzzi et al. 2001, 2004) ma è soprattutto nel cavallo che sono stati registrati numerosi casi (Kent et al. 1986; Power 1986; Makinen et al. 1999; Pailhoux et al. 1995). Nel caso dei maschi XX (meno comune dei casi di femmine XY) la causa principale è da attribuirsi alla presenza nel genoma (cromosomi) di alcuni geni che influenzano il sesso ed, in particolare, al gene SRY che spesso si ritrova nel cromosoma X frutto di riarrangiamenti cromosomici avvenuti durante la gametogenesi. Gli animali affetti dalla sindrome del sesso invertito sono in genere sterili.

Proposta di una nuova classificazione degli intersessi

In una recente pubblicazione (Poth T. et altri 2010) che analizza una numerosissima casistica di intersessi relativa alla specie canina si avanza, sulla base di serie e motivate argomentazioni, la proposta di utilizzare per queste anomalie una nuova classificazione capace di unificare le tipologie sino ad ora considerate. Come è noto, ad eccezione del free-martinismo , l'intersesso è considerato un raro disordine congenito negli animali domestici. Gli individui affetti hanno parti degli organi genitali o l'intero apparato riproduttore di entrambi i sessi e presentano una vasta gamma di fenotipi.

Molti intersesso sono attualmente classificati in veri ermafroditi e pseudoermafroditi. I veri ermafroditi hanno tessuto sia ovarico che testicolare (in varie possibili combinazioni: 1) ovotestis bilaterali; 2) ovotestis monolaterale con testicolo od ovario controlaterale, e 3) testicolo con ovaio controlaterale. Le tre forme sono denominate vero ermafroditismo rispettivamente bilaterale, unilaterale e laterale.

Gli pseudoermafroditi hanno un solo tipo di tessuto gonadico, ovarico oppure testicolare ma con fenotipo opposto. Gli individui affetti sono classificati come maschi o femmine pseudoermafrodite in base al sesso gonadico. Una corretta diagnosi potrebbe essere difficoltosa a causa della grande varietà di condizioni di intersesso e per la presenza di genitali esterni ambigui nella maggior parte dei casi che inizialmente non consentono di trarre conclusioni relativamente alla causa di base del problema. In passato, altri autori hanno già asserito al necessità di determinare sia il sesso gonadico che quello cromosomico per stabilire una corretta diagnosi e classificazione (Hare, 1976; Chaffaux et al., 1980; Meyers-Wallen and Patterson, 1986; Melniczek et al., 1999).

A differenza della medicina umana una nomenclatura precisa e standardizzata in medicina veterinaria non esiste. La terminologia esistente è usata in modo non coerente ed indipendente dal disordine di base. Pertanto l' Autore propone partendo da una amplissima panoramica sulle varie forme di intersesso note in diverse razze canine una nuova classificazione in base alla forma

gonadica, alle anomalie a carico dell'apparato riproduttore e del cariotipo, e categorizzata in base allo stadio del normale sviluppo dell'apparato riproduttore che è stato coinvolto determinando la formazione di tre categorie: 1) disordini dei cromosomi sessuali; 2) disordini dello sviluppo del sesso gonadico; 3) disordini dello sviluppo del sesso fenotipico.

Partendo da queste considerazioni si può ritenere che anche per gli altri animali di interesse zootecnico e veterinario si possa proporre ed adottare tale classificazione.

Free-martinismo

Il Freemartin o mosaicismo eritrocitario (XX/XY) consiste nella coesistenza, nello stesso soggetto, di due linee cellulari diverse, una maschile XY, e l'altra femminile, XX. Questa condizione interessa le femmine cogemelle di maschi, ed è dovuta all'anastomosi placentare fra i due feti di sesso diverso, che comporta una migrazione di cellule maschili verso il feto femminile. Il freemartinismo è diffuso soprattutto nel bovino e nella pecora. Il termine 'freemartin' è inglese, e si riferisce al fatto che in Inghilterra nel XVIII secolo, nel giorno di San Martino, le femmine mascolinizzate (dette appunto 'freemartins') venivano offerte in regalo ('free') al mercato.

Il Free-Martin o mosaicismo eritrocitario (XX/XY) è una alterazione della gonadogenesi; è un esempio di intersesso che si verifica soprattutto nella bovina (raramente nelle specie ovina e suina), nel 92% delle gravidanze gemellari quando i due feti gemelli sono di sesso opposto. Nel bufalo tale sindrome è poco conosciuta in quanto non sono stati mai intrapresi studi sistematici a livello clinico in combinazione con quello citogenetico.

È caratterizzato da una malformazione genitale che si osserva nel 90% delle femmine nate gemelle di un maschio. Questa femmina è quasi sempre sterile (Greene et al. 1977; Romagnano et al. 1988; Cribiu et al, 1989; Cribiu e Chaffaux 1990; Khan and Foley, 1994, van der Schoot et al. 1995), mentre si ritiene che il maschio sia fertile, anche se qualche studio riporta gravi problemi riproduttivi in alcuni di questi maschi (Dunn et al. 1979). Sembra che la percentuale di chimerismo nei co-gemelli dipenda anche dalla razza. Infatti, Summers et al. (1984) riscontrarono il 100% di

gemellchimerici in incroci Frisona-Brahman e il 50% in incroci Jersey-Brahman. Alcuni studi hanno evidenziato come, al chimerismo sessuale nelle cellule del sangue, non corrisponda un chimerismo nelle cellule germinali (Viegier et al., 1973; Ford e Evans 1977).

Per quanto riguarda l'eziologia del freemartinismo sono state avanzate due teorie: la teoria ormonale e la teoria cellulare.

Secondo la teoria ormonale gli ormoni sessuali maschili (androgeni) arriverebbero nel feto femmina attraverso anastomosi vascolari a livello placentare la presenza nel feto femmina degli ormoni gonadici provenienti dal cogemello costituirebbe l'elemento determinante della differenziazione della gonade, ancora allo stadio indifferenziato, verso il tipo mascolino.

L'anastomosi vascolare allantoideo-coriale si stabilisce molto presto nel corso della gestazione (verso il 30° giorno) e comunque molto prima della differenziazione del sesso che avviene intorno al 45° giorno. I sostenitori di tale teoria (Wolff-Bruns e Jost-Mc Intyre, 1975) affermano che l'elemento casuale di questa sindrome sarebbe rappresentato non dagli ormoni di natura testosteronica, ma da sostanze induttrici, elaborate dagli abbozzi sessuali, le quali sono responsabili della differenziazione sessuale. Le sostanze secrete da questi abbozzi sessuali sono due: la corteccina responsabile della differenziazione femminile e la medullarina che interviene nella differenziazione maschile. Queste sostanze induttrici, stimolanti per un sesso e inibenti per l'altro, agirebbero facendo sì che, partendo dall'ambosessualità, la differenziazione sessuale avvenga con la soppressione del sesso opposto. Secondo questa ipotesi il freemartinismo sarebbe la conseguenza di una perturbazione che inizia con la comparsa degli abbozzi embrionali, della differenziazione e dello sviluppo del sesso in un individuo geneticamente femmina. Confermando l'ipotesi dell'anastomosi vascolare e dell'esistenza degli scambi circolatori nei gemelli bisessuali, le ricerche moderne hanno apportato elementi nuovi per spiegare le cause. Owen (citato in Derivaux 1975) segnala l'esistenza nei gemelli bisessuali di gruppi sanguigni identici, corrispondenti ad una mescolanza di sangue di ciascuno dei soggetti: eritromosaicismo. Vale a dire che per effetto dell'anastomosi vascolare cellule ematiche primitive di ciascun gemello si innestano precocemente

nel cogemello, dove restano funzionali durante tutto il corso della vita. Ciascun gemello elabora così due popolazioni di globuli rossi, l'una che gli è propria, l'altra proveniente dal co-gemello. La riuscita degli innesti cutanei eseguiti fra gemelli di sesso opposto costituisce una prova dell'istocompatibilità antigenica esistente tra questi soggetti. In base a ciò si può pensare anche alla possibilità del passaggio di altri elementi figurati, specialmente cellule testicolari.

Secondo la teoria cellulare, invece, a seguito dello scambio di sangue, dal gemello maschio, arriverebbero al gemello femmina cromosomi sessuali. Si ammette, in questo modo, l'esistenza di un chimerismo di cellule sessuali XX e XY nelle femmine free-martin: le cellule di cariotipo XX fanno parte del suo patrimonio genetico, quelle di cariotipo XY gli vengono dal suo co-gemello. Questo chimerismo interessa non solamente il sangue, ma anche le gonadi ed il midollo osseo. Alcuni autori (Fechheimer et al.; Bouters - citati in Derivaux 1975) sostengono l'ipotesi di una possibile azione frenatrice del cromosoma Y sullo sviluppo dell'apparato femminile e secondo loro, il grado di mascolinizzazione sarebbe in funzione del momento in cui si stabiliscono le connessioni vascolari. È interessante dire che in caso di chimerismo negli uccelli è il sesso femminile che modifica la gonade maschile visto che il sesso maschile è omogametico e il sesso femminile è eterogametico. Ohio et al. (citato in Derivaux, 1975) hanno riscontrato nei testicoli del gemello maschio delle spermatogonie di tipo XY normali e delle spermatogonie di tipo XX. Se queste ultime evolvono fino allo stadio di spermatozoi, dovrebbero trovarsi più spermatozoi X nel seme e di conseguenza si dovrebbe riscontrare una deviazione della sex_ratio in favore delle femmine nella discendenza dei torelli chimerici che sappiamo essere fertili.

Tutti questi dati mettono in discussione la teoria ormonale a favore della teoria cellulare anche se tuttavia non dovrebbero essere escluse anche influenze ormonali.

Studi citogenetici recenti sembrano dimostrare la presenza del free-martinismo in altre specie animali. Stomod (citato in Derivaux, 1975) ha descritto un caso di chimerismo ematico in ovini gemelli dizigotici e dei quali la femmina era anormale a livello genitale. Gerneke (citato in Derivaux, 1975) ha trovato in pecore, gemelle di un maschio una chimera di cellule XX e XY.

Bruire (citato in Derivaux, 1975) ha trovato in suini pseudo ermafroditi, ma geneticamente femmine, una mescolanza di cellule XX e XY, ciò sembra indicare che, in questa specie, una femmina genetica può essere provvista di cellule di tipo maschile.

Il mosaicismo di cellule XX/XY che si riscontra in seguito al freemartinismo rientra tra le anomalie cromosomiche numeriche in quanto, anche se il numero diploide è quello tipico della specie, il fatto che siano presenti cellule maschili e femminili comporta, specie per l'azione del cromosoma Y, scompensi genetici di una certa importanza, come prima menzionato.

Oltre al metodo citogenetico, anche quello molecolare con tecnica PCR viene oggi impiegato con successo per la rapidità (Aasen e Mediano, 1990; Justi et al. 1995), anche se non si può avere un'idea della percentuale di cellule XX/XY, cosa possibile solo col metodo citogenetico.

Traslocazione

La *traslocazione* è una anomalia cromosomica strutturale che consiste nel cambiamento di posizione di segmenti cromosomici e quindi delle sequenze geniche in essi contenute. Non vi è né un aumento né una perdita di materiale genetico.

Si distinguono due tipi di traslocazioni semplici: l'intracromosomica quando il cambiamento di posizione di un tratto cromosomico si verifica entro lo stesso cromosoma; e l'intercromosomica quando si verifica uno spostamento di un segmento cromosomico da un cromosoma ad un altro cromosoma non omologo. Quest'ultima a sua volta può essere:

- non reciproca: che implica un trasferimento da un cromosoma ad un altro;
- reciproca: che implica uno scambio di segmenti tra due cromosomi.

Negli organismi portatori di traslocazione si ha il cambiamento della relazione di associazione tra i geni dei cromosomi omologhi, evento che interferisce durante le fasi della meiosi e quindi della formazione dei gameti.

In altri termini i gameti prodotti da portatori di traslocazioni cromosomiche possono essere geneticamente sbilanciati, in quanto hanno duplicazioni o delezioni di alcuni geni, e possono dar luogo ad embrioni disvitali.

I soggetti portatori omozigoti di traslocazione (che hanno quindi sui cromosomi omologhi la stessa traslocazione), hanno meiosi normale, dato che tutti i geni si possono appaiare correttamente e il crossing-over non produce nessun cromatidio anomalo.

Nei portatori eterozigoti di traslocazione (nei quali quindi la traslocazione coinvolge uno solo dei cromosomi omologhi, come nel caso del toro IL MAGNIFICO) le diverse parti dei cromosomi omologhi cercano di appaiarsi come meglio possono e quindi la ripartizione dei cromosomi omologhi e dei corrispondenti segmenti genetici (geni) si potrà realizzare in vari modi dando luogo a gameti vitali (se contengono una serie completa di geni) o non vitali (se contengono delezioni o duplicazioni geniche).

I gameti portatori di segmenti cromosomici duplicati o deleti possono funzionare, ma gli zigoti originati da tali gameti generalmente muoiono.

Nei bovidi la traslocazione più diffusa è quella nota come Robertsoniana o fusione centrica che consiste nella fusione di cromosomi non omologhi lungo i centromeri. Ne deriva la formazione di un nuovo cromosoma submetacentrico con eventuale riduzione del numero diploide.

Nei portatori eterozigoti della traslocazione Robertsoniana, teoricamente, si ha la formazione di gameti che in parte sono normali o comunque bilanciati (hanno cioè un corredo genetico normale) ed in parte aneuploidi. Dai gameti bilanciati deriveranno, in seguito alla fecondazione, embrioni vitali con normale assetto cromosomico o a loro volta portatori della stessa traslocazione del genitore.

La partecipazione di gameti aneuploidi alla fecondazione porta alla formazione di zigoti monosomici o trisomici che muoiono durante la gestazione (corredo cromosomico incompatibile con la vita).

Pertanto, individui eterozigoti per una traslocazione Robertsoniana presentano una riduzione di fertilità, percentuali di aborto superiore alla media ed un certo numero di progenie aneuploide.

Nella specie bufalina, sebbene rare, sono state segnalate in passato traslocazioni di tipo robertsoniano in animali affetti da ipofertilità.

PARTE SPERIMENTALE

Introduzione alla parte sperimentale

Le indagini condotte hanno interessato specie diverse mettendo in evidenza alterazioni cromosomiche differenti. I soggetti esaminati appartenevano in molti casi a razze autoctone e sono stati esaminati nell'ambito di programmi di ricerca finalizzati alla caratterizzazione genetica di queste razze – popolazioni ed alla loro conservazione e valorizzazione.

I risultati delle ricerche saranno organizzati per specie, verranno preceduti da brevi presentazioni e seguiti dalle considerazioni relative ai tipi di alterazioni individuate.

Metodiche utilizzate per le analisi citogenetiche

Per l'effettuazione degli esami citogenetici è stato prelevato il sangue usando provette vacutainer eparinizzate. I campioni di sangue così prelevati sono stati portati il più rapidamente possibile in laboratorio e, entro le 24 ore dal prelievo, dal sangue eparinizzato sono state allestite le colture cellulari. Per ogni campione sono state allestite 2 colture cellulari, una per lo studio del cariotipo ed una per il test delle CBA.

Il sangue periferico (1-1,2 ml) è stato posto in coltura a 37.5° per 72 ore in incubatore a secco in medium RPMI 1640 arricchito FCS (10%), L-glutammina (1%), Lectina (1,5%), Penicillina-Streptomicina (1%) e amfotericina B (1%).

Per le colture destinate all'analisi del cariotipo con bandeggio R, 24 h prima del termine è stata aggiunta la Timidina (300 µg/ml) per la sincronizzazione, dopo 18 h è stato effettuato un lavaggio per rimuovere il blocco e la coltura è stata fatta ripartire in terreno completo con 5-BrdU (20 µg/ml) ed H33528 (40 µg/ml) per altre 6 h nel bufalo, nel bovino e nel cane, per 6,5 h nel cavallo e 5,5 h nel suino.

Per le colture destinate al test SCE, 21 h prima del termine è stata aggiunta 5-BrdU (10µg/ml).

Per tutte le colture un'ora prima del termine è stata aggiunta Colcemid (10µg/ml), seguito da trattamento ipotonico (KCl 0,075 M) e tre fissaggi in metanolo/acido acetico (3:1), l'ultimo dei quali effettuato overnight.

Tre gocce di sospensione cellulare sono fatte cadere su vetrini sgrassati e bagnati, i preparati vengono fatti asciugare a temperatura ambiente per almeno un giorno per il cariotipo convenzionale e dell' SCE, e 10 giorni per l'analisi del cariotipo con bande R.

Per la colorazione dei preparati sono stati seguiti protocolli differenti: per il cariotipo convenzionale i vetrini sono colorati per 10 minuti con Arancio d'acridina (0,01%); per l'analisi del cariotipo con bande R ed il test degli SCE i vetrini sono colorati per 20 minuti con H33258 (20µg/ml), quindi dopo essere stati lavati con abbondante acqua distillata vengono montati in 2XSSC ed esposti per 45 minuti agli UV. Segue un'ulteriore lavaggio e colorazione con Arancio d'acridina (0,01%) per 10 minuti.

Per il test delle CBA i vetrini sono incubati a temperatura ambiente in HCl (0,1N), quindi dopo essere stati lavati con abbondante acqua distillata vengono incubati con Ba(OH) (5% in H₂O deionizzata) a 55° C per tempi compresi tra i 10 e i 25 minuti a secondo della specie. Segue un'ulteriore lavaggio e incubazione in 2XSSC a 60° per 30 min quindi passaggi sequenziali per pochi secondi in 2XSSC, etanolo a 75°, 95° e 99°. I vetrini vengono quindi colorati a temperatura ambiente con Arancio d'acridina (0,01%) per 1 ora e montati in buffer fosfato pH7.

I vetrini sono stati osservati al microscopio ottico Nikon Eclipse 80i a fluorescenza dopo 24 h dalla colorazione, per ciascun animale sono state acquisite le immagini con telecamera Nikon Sight DS-5M e trasferite su PC per la successiva pro cessazione. In particolare per l'analisi del cariotipo sono state valutate 10 metafasi con bandeggio RBA ed il cariotipo è stato costruito rispettando gli standard di specie definiti dai diversi autori (Iannuzzi et al. 1994; Iannuzzi et al. 2003; Gustavsson I. 1988)

Per il test delle AC sono state analizzate 100 metafasi per la valutazione dell'aneuploidia . Per l'analisi delle CBA sono state analizzate 100 metafasi per l' evidenziazione dei cromosomi sessuali e di eventuali anomalie.

Per il test SCE sono state considerate 60 cellule con assetto cromosomico diploide $2n=60$ e $2n=60 \pm 1$, seguendo quanto già fatto da Peretti et al. (2008). Gli scambi sono stati individuati seguendo lo schema riportato in Figura__ (Carrano e Natarajan,1988).

Inoltre per l'effettuazione di ulteriori esami genetici ritenuti necessari per una migliore comprensione della casistica ai soggetti è stato prelevato il sangue con provette vacutainer con K3-EDTA. Il campione di sangue in provette K3-EDTA è stato usato per l'estrazione di DNA genomico mediante l'uso del kit di estrazione WIZARD Genomic DNA Purification Kit cod. A1125, Promega.

RISULTATI SPERIMENTALI

Verranno ora trattati i seguenti casi di alterazioni cromosomiche e genetiche :

- casi di freemartinismo nel bovino e nel bufalo,
- casi di traslocazioni nel bovino e nel bufalo,
- casi di intersesso nel bufalo, cavallo e suino,
- valutazione della stabilità genomica mediante SCE nel bovino,
- anomalie dello sviluppo sessuale nel cane,
- caso di nanismo in ibridi di cinghiale.

La trattazione delle casistiche osservate verrà organizzata per specie, preceduta da una sintetica descrizione delle condizioni sperimentali e completata da una valutazione dei risultati ottenuti.

Risultati sperimentali nel bovino

Come abbiamo riferito nella parte introduttiva gli studi condotti su soggetti appartenenti alla specie bovina sottoposti a test citogenetici sono state numerose ed hanno evidenziato un'ampia casistica. In questa tesi vengono riportati i risultati delle indagini effettuate su soggetti appartenenti alla razza Agerolese.

Indagini citogenetiche nel bovino Agerolese

Il bovino T.G.A. (tipo genetico autoctono) Agerolese è un animale di antiche origini. La sua origine è la zona dei Monti Lattari e della penisola Sorrentina in provincia di Napoli, area geografica in cui i Piacentini si stabilirono con i loro armamenti avviando una discreta attività agricola ed un fiorente allevamento di bovini ad attitudine lattifera. Da questo primo nucleo bovino, in seguito ai numerosi incroci effettuati con razze introdotte nei secoli successivi (Bretonne, Bruna Alpina, Jersey e Pezzata Nera Olandese) si è selezionata il T.G.A., che dal 1952, anno in cui fu presentato al Ministero dell'Agricoltura e delle Foreste lo standard, prende il nome di Agerolese. L'unicità del bovino T.G.A. Agerolese è frutto della selezione di secoli che, influenzata da un ambiente avverso, privo di pascoli, ha fissato peculiari caratteri di rusticità e resistenza e ha fatto in modo che, nonostante la scadente alimentazione, prevalentemente a base di frascume, questo bovino fosse in grado di produrre una discreta quantità di latte dalle eccellenti caratteristiche organolettiche. I bovini sono allevati con sistema a stabulazione fissa per le caratteristiche geo-morfologiche del territorio in cui non è possibile effettuare il pascolo.

L'attenzione del gruppo di ricerca facente capo alla Cattedra di Genetica Veterinaria della Facoltà di Medicina Veterinaria dell'Università di Napoli si è da alcuni anni focalizzata su questa razza dando vita ad un piano di ricerche finalizzato ad approfondire le conoscenze della caratterizzazione genetica del bovino Agerolese ai fini della sua tutela e valorizzazione.

L'Associazione Provinciale Allevatori di Napoli il 1 gennaio 2002 ha concluso il primo censimento della razza bovina Agerolese e non sono stati confrontati i dati emersi: 103 soggetti adulti (di cui 85 vacche e 18 tori) e 97 manzette.

Oggi dalle ultime valutazioni effettuate nel 2010 la popolazione ha raggiunto circa i 600 capi, compreso il giovane bestiame e soggetti non iscritti al Registro Anagrafico. Su questo patrimonio genetisti veterinari, esperti del settore zootecnico e l'associazione R.A.R.E. stanno lavorando con l'obiettivo di elaborare strategie che possano trovare una risposta concreta sul territorio (Consorzio DOP Provolone del Monaco; Progetto RARECA).

L' applicazione delle indagini citogenetiche nella popolazione bovina Agerolese è scaturita dalla considerazione che tale razza-popolazione, essendo a rischio di estinzione, è oggetto di progetti di salvaguardia e recupero pertanto è fondamentale la sua caratterizzazione cariologica per poter individuare, e successivamente eliminare dalla riproduzione, soggetti portatori di alterazioni cromosomiche che potrebbero ripercuotersi negativamente sulle caratteristiche riproduttive e produttive.

Casi di freemartinismo nel TGA Agerolese

Nell'ambito dello studio cariologico svolto nella popolazione bovina Agerolese sono stati segnalati sette casi di parti gemellari. In tre casi è sopravvissuto solo un cogemello pertanto il numero complessivo dei soggetti sospetti di essere freemartin è stato pari a undici. Dopo analisi cariologica, sono risultati freemartin sette soggetti (gruppo 1), quattro di sesso femminile e tre di sesso maschile (Tab. 3).

Le femmine free-martin sono state sottoposte ad esami ecografici e visite ginecologiche; per i soggetti dove è stato possibile, dopo macellazione, sono stati esaminati e fotografati gli organi riproduttivi. Infine sono stati eseguiti esami citoistologici delle sezioni delle gonadi, sia per verificare se trattasi di testicoli od ovaie, sia di annessi interni nei maschi per verificare la presenza o meno di spermatozoi. I campioni prelevati ai soggetti esaminati hanno seguito il protocollo in precedenza indicato e le metafasi sono state osservate a microscopio ad ingrandimento 16x per la ricerca delle metafasi e 100x per lo studio e le riprese con camera digitale a colori collegata al computer sul quale le immagini vengono trasferite, grazie ad appositi software, ed opportunamente

archivate per il successivo studio. Questo consiste nell'andare a contare, in ognuna delle 100 metafasi acquisite, il numero di cellule maschili (XY) e femminili (XX) e la presenza di eventuali anomalie cromosomiche numeriche (Fig. 8).



Fig. 8 - Due piastre metafasiche di manza Agerolese free – martin $2n=60$ XX e $2n=60$ XY

Nella tab. 3 sono riportati i risultati dell' indagine.

Tabella n 3 - Casi di Free- martin in soggetti TGA Agerolesi. I co-gemelli sono indicati dalla stessa lettera in apice

Animale	Sesso	Età	Linfociti %		Diagnosi
			XX	XY	
1	F	9 m	7.21	92.79	Freemartin
2	M	1 m	25	75	Freemartin
3	F	7 m	19	81	Freemartin
4 ^a	M	15 g	0	100	Normale
5 ^a	F	15 g	100	0	Normale
6 ^b	F	10m	49.64	50.36	Freemartin
7 ^b	M	11m	36	64	Freemartin
8 ^c	F	4 m	100	0	Normale
9 ^c	M	4 m	0	100	Normale
10 ^d	F	8 g	66	34	Freemartin
11 ^d	M	8 g	58	42	Freemartin

g= giorni; m= mesi.

Passiamo ora ad una breve descrizione della casistica rilevata.

L'animale 1 , di sesso femminile, è stato sottoposto al prelievo di sangue e relativo studio citologico all'età di circa 9 mesi; il co-gemello maschio è deceduto poco dopo la nascita. La popolazione linfocitaria è risultata essere caratterizzata per il 7.21% da cellule femminili e per il 92.79% da cellule maschili. All'età della pubertà il soggetto è stato sottoposto a visita ginecologica in seguito alla quale si è evidenziato che gli organi sessuali femminili esterni erano normali, mentre la vagina è risultata a fondo cieco. All'esame ecografico non sono state evidenziate strutture riferibili ad un

apparato genitale femminile normale. Il soggetto è stato destinato al macello all'età di 18 mesi, durante il quale non ha mai avuto manifestazioni estrali. L'esame anatomo-istologico dell'apparato genitale ha evidenziato vulva e clitoride normali, vagina a fondo cieco (Foto n.), abbozzo di utero e ovaie assenti.

L'animale 2, di sesso maschile, è stato sottoposto al prelievo di sangue e relativo studio citogenetico intorno ad un mese di vita; la co-gemella è nata disvitalizzata ed è deceduta poco dopo la nascita, evenienza non rara nei parti gemellari nella specie bovina. La popolazione linfocitaria è risultata essere caratterizzata per il 25% da cellule femminili. Attualmente l'animale è utilizzato presso un'azienda della provincia di Napoli per la valorizzazione del Tipo Genetico Agerolese.

L'animale 3, di sesso femminile, è stato sottoposto al prelievo di sangue e relativo studio citogenetico all'età di circa 7 mesi; il co-gemello maschio è deceduto poco dopo la nascita. La popolazione linfocitaria è risultata essere caratterizzata per il 19% da cellule femminili e per il 81% da cellule maschili. All'età della pubertà il soggetto è stato sottoposto a visita ginecologica in seguito alla quale si è evidenziato che gli organi sessuali femminili esterni erano normali, mentre la vagina è risultata a fondo cieco. All'esame ecografico non sono state evidenziate strutture riferibili ad un apparato genitale femminile normale. Il soggetto è stato destinato al macello e nel corso della vita non ha mai avuto manifestazioni estrali. L'esame anatomo-istologico dell'apparato genitale ha evidenziato vulva e clitoride normali, vagina a fondo cieco, abbozzi di utero e tube uterine e ovaie anormali nella morfologia e struttura.

Gli animali 4 e 5, gemelli, sono stati sottoposti al prelievo di sangue e relativo studio citogenetico subito dopo la nascita (15 giorni), grazie alla segnalazione da parte dell'allevatore. In questo caso entrambi i soggetti sono risultati genotipicamente normali con una popolazione linfocitaria del 100% riferibile al sesso di appartenenza. Gli animali hanno raggiunto la maturità sessuale senza manifestare alcun problema riproduttivo.

Gli animali 6 e 7, gemelli, sono stati sottoposti al prelievo di sangue e relativo studio citogenetico rispettivamente a 10 e 11 mesi di età, poiché il soggetto di sesso femminile subito dopo la nascita è

stato venduto ad un'altra azienda. La popolazione linfocitaria del gemello maschio (animale 7) è risultata essere caratterizzata per il 36% da cellule femminili, mentre quella della co-gemella (animale 6) per il 50.36% è risultata essere rappresentata da cellule maschili. Raggiunta la pubertà il soggetto è stato sottoposto a visita ginecologica in seguito alla quale si è evidenziato che gli organi sessuali femminili esterni erano normali, mentre la vagina è risultata a fondo cieco. All'esame ecografico non sono state evidenziate strutture riferibili ad un apparato genitale femminile normale. Il soggetto è stato macellato all'età di 18 mesi, nel corso dei quali non ha evidenziato manifestazioni estrali. L'esame anatomo-istologico dell'apparato genitale ha evidenziato una vulva normale ed un clitoride pronunciato, una vagina a fondo cieco, organizzata in concamerazioni, infine al posto delle corna uterine sono state evidenziate due strutture tubulari di lunghezza pari a circa 7-10 cm, terminanti a fondo cieco (Fig. 8 e 9). Non sono state rinvenute strutture riferibili alle gonadi.

Gli animali 8 e 9, gemelli, sono stati sottoposti al prelievo di sangue e relativo studio carilogico a 4 mesi di vita, in seguito alla richiesta da parte dell'allevatore. In questo caso entrambi i soggetti sono risultati genotipicamente normali con una popolazione linfocitaria del 100% riferibile al sesso di appartenenza. Gli animali hanno raggiunto la maturità sessuale senza manifestare alcun problema riproduttivo.

Gli animali 10 e 11, gemelli, sono stati sottoposti al prelievo di sangue e relativo studio carilogico rispettivamente a 8 giorni in seguito a richiesta esplicita da parte dell'allevatore. La popolazione linfocitaria del gemello maschio (animale 11) è risultata essere caratterizzata per il 58% da cellule femminili, mentre quella della co-gemella (animale 10) per il 34% è risultata essere rappresentata da cellule maschili.



Fig. 8 a,b,c : Bovino TGA Agerolese Freemartin. a) Soggetto visto di profilo; b) dettaglio post-macellazione dell'apparato riproduttore dello stesso animale in cui sono visibili peli ispidi alla base della rima vulvare ed un clitoride di dimensioni leggermente superiori alla norma; c) dettaglio dello post-macellazione dell'apparato riproduttore dello stesso animale in cui viene evidenziata la vagina terminante a fondo cieco.

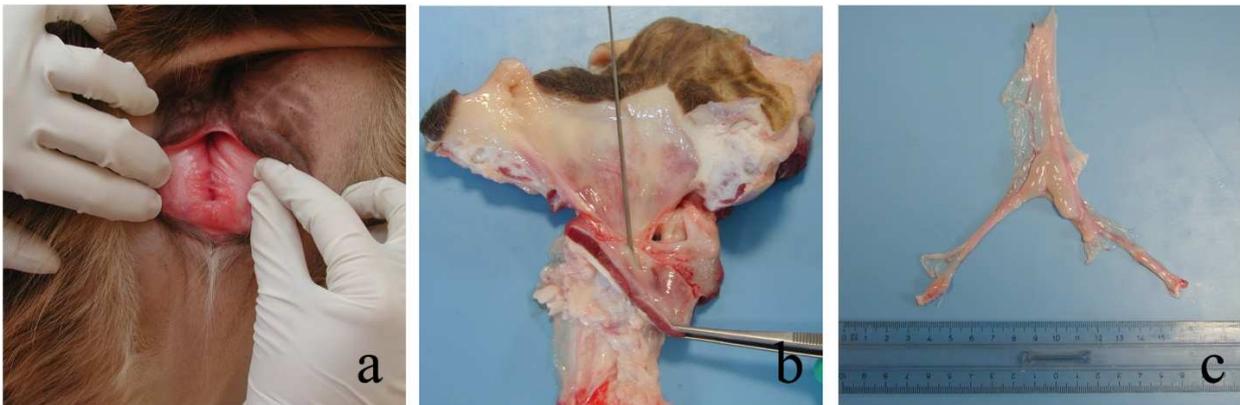


Fig.9 a,b,c : a) particolare dei genitali di bovino TGA Agerolese Freemartin in cui è possibile notare la presenza di una vulva di ridotte dimensioni e di un clitoride di dimensioni normali; b) dettaglio post-macellazione dell'apparato riproduttore dello stesso soggetto in cui è possibile osservare come la vagina termini a fondo cieco; c) dettaglio post-macellazione dell'apparato riproduttore dello stesso soggetto, sono stati ritrovati vestigia di ovaie, tube di Fallopio e di utero.

Traslocazione nel TGA Agerolese

Nei bovidi la traslocazione più diffusa è quella nota come Robertsoniana o fusione centrica che consiste nella fusione di cromosomi non omologhi lungo i centromeri. Ne deriva la formazione di un nuovo cromosoma submetacentrico con eventuale riduzione del numero diploide.

Nei portatori eterozigoti della traslocazione Robertsoniana, teoricamente, si ha la formazione di gameti che in parte sono normali o comunque bilanciati (hanno cioè un corredo genetico normale) ed in parte aneuploidi. Dai gameti bilanciati deriveranno, in seguito alla fecondazione, embrioni vitali con normale assetto cromosomico o a loro volta portatori della stessa traslocazione del genitore.

La partecipazione di gameti aneuploidi alla fecondazione porta alla formazione di zigoti monosomici o trisomici che muoiono durante la gestazione (corredo cromosomico incompatibile con la vita).

Pertanto, individui eterozigoti per una traslocazione Robertsoniana presentano una riduzione di fertilità, percentuali di aborto superiore alla media ed un certo numero di progenie aneuploide.

Nella specie bufalina, sebbene rare, sono state segnalate in passato traslocazioni di tipo robertsoniano in animali affetti da ipofertilità.

Nell' ambito delle indagini citogenetiche condotte su soggetti di razza Agerolese sono state individuati 4 soggetti con traslocazione $t(1;29)$ (fig. 10 e fig. 11) ed in tabella 4 E 5 sono riportati i risultati ottenuti con i confronti con analoghe indagini condotte su individui appartenenti ad altre 3 razze bovine TGA/ : Cinisara, Modicana e Podolica.

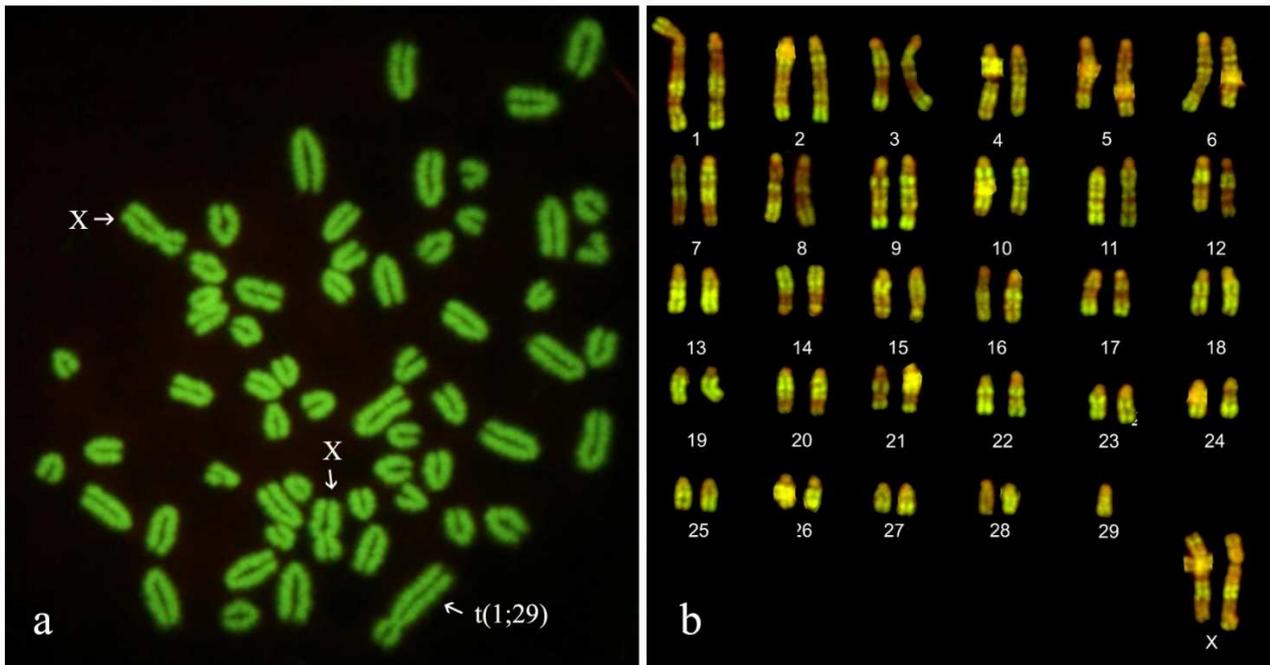


Fig 10 a,b : Bovino TGA Agerolese affetto da traslocazione (*Bos Taurus*; $2n=59;XX/t1;29$). a) piastra metafisica con colorazione per cariotipo convenzionale, sono evidenti i cromosomi sessuali X ed il cromosoma traslocato t(1;29); b) Cariotipo con bandeggio di tipo R.

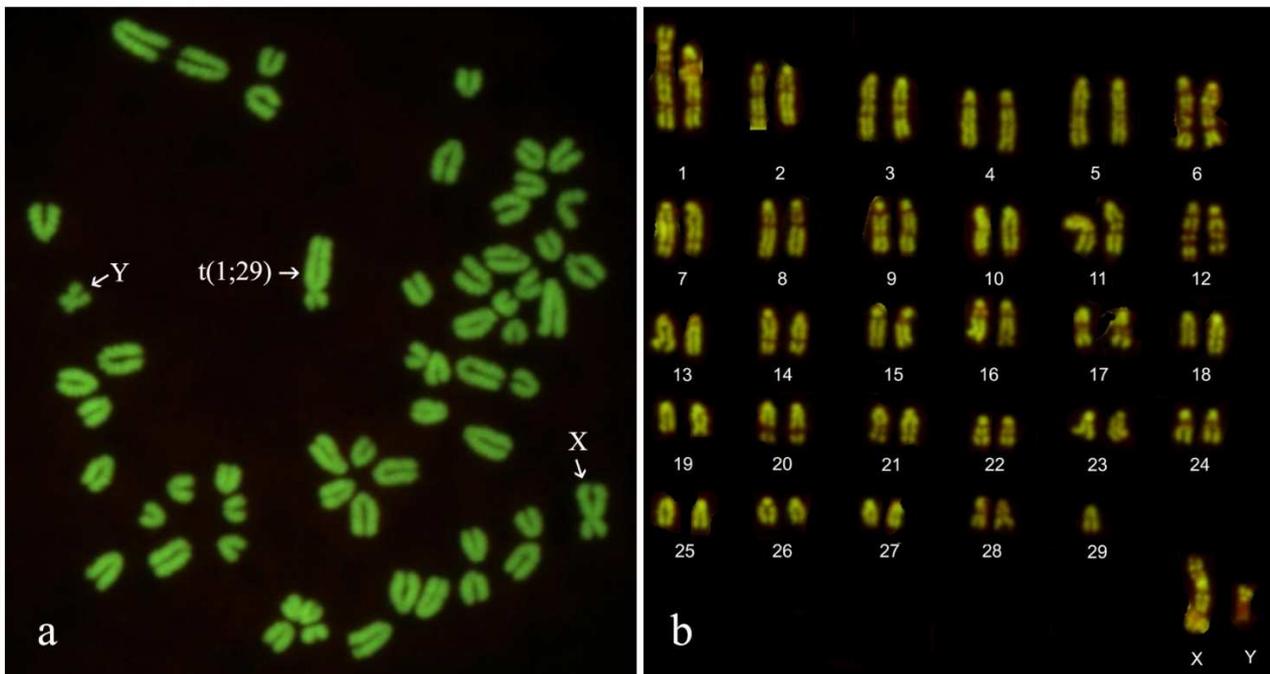


Fig 11 a,b : Bovino TGA Agerolese affetto da traslocazione (*Bos Taurus*; $2n=59;XY/t1;29$). a) piastra metafisica con colorazione per cariotipo convenzionale, sono evidenti i cromosomi sessuali X ed Y ed il cromosoma traslocato t(1;29); b) Cariotipo con bandeggio di tipo R.

Table 4. Razza e sesso dei soggetti esaminati e numero di metafasi e di cromosomi analizzati

Razze autoctone	bovine	Animali	Femmine	Maschi	Metafasi	Cromosomi
		n	n	n	n	n
Agerolese		50	40	10	5,000	299,900
Cinisara		30	17	13	3,000	179,300
Modicana		30	27	3	3,000	180,000
Podolica		35	31	4	3,500	209,200
Total		145	115	30	14,500	868,400

Table 5. Risultati citogenetici

Razze autoctone	bovine	Anomalie cromosomiche	Animali con anomalie cromosomiche	F	M
			n (%)	n	n
Agerolese		rob(1;29) 2n=60,XX/XY	4 (8)	2	2
			8 (16)	5	3
Cinisara		rob(1;29)	7 (23.3)	3	4
Modicana		0	0	0	0
Podolica		rob(1;29)	8 (22.8)	7	1
Total			17 (11.7)	10	7



Fig. 12: Toro Agerolese traslocato (*Bos Taurus*; 2n=59;XY/t1;29)



Fig.13: Cariotipo convenzionale del toro traslocato della fig. .. (*Bos Taurus*; $2n=59;XY/t1;29$)

Nelle fig. 12 e 13 sono riportate le immagini di uno dei tori traslocati e il suo cariotipo.

La discussione sui risultati osservati deve tener conto del campionamento utilizzato per i confronti, tuttavia l'incidenza di traslocazioni in popolazioni residuali risulta essere, salvo che per la Modicana, piuttosto elevata, il che implica un'attenzione a questo fenomeno più attenta, estendendo le indagini ad un campionamento molto più ampio.

SCE nel bovino TGA Agerolese

Il test dell'SCE è stato usato per definire la stabilità del genoma nell'uomo ed in molte specie animali quali il bovino, il bufalo, la capra, la pecora ed il suino. Per verificare la stabilità del genoma in questa razza – popolazione si è effettuata questa indagine seguendo le metodiche esposte in precedenza relative alla determinazione degli SCE. Per il test SCE sono state considerate 60 cellule con assetto cromosomico diploide $2n=60$ e $2n=60 \pm 1$, seguendo quanto già fatto da Peretti et al. (2008). Gli scambi sono stati individuati seguendo lo schema riportato in fig.2 (Carrano e Natarajan,1988).

Nell'indagine svolta sono stati esaminati 65 casi di bovino T.G.A. Agerolese allevati sui Monti Lattari. Nella Tab.6 sono riportati i risultati ottenuti ed in Fig. 14 è riportata una delle piastre metafasiche di Agerolese esaminate.

Tabella 6 - Media e Deviazione standard di SCE in cellule e cromosomi analizzati nella popolazione bovina TGA Agerolese

Razza/Sesso	animali esaminati	cellule analizzate	cromosomi analizzati	n SCE/cell	
				media \pm DS	range
Agerolese	65	2275	136500	5.39 ± 2.58	0-15
Maschi	20	700	42000	5.29 ± 2.46	0-11
Femmine	45	1575	94500	5.07 ± 2.41	0-15

I valori medi di SCE/cellula sono notevolmente minori nella popolazione bovina Agerolese che non in altre razze bovine italiane quali la Frisone (SCE/cell = 7.11 ± 3.35), Podolica (SCE/cell = 7.95 ± 3.41) e la Romagnola (SCE/cell = 7.32 ± 3.18) (Iannuzzi et al., 1991), mentre risulta essere simile ai valori riscontrati nella Frisone Olandese (5.41 ± 2.13) da Di Berardino e Shoffner (1979).

Tali osservazioni dimostrano che la popolazione bovina Agerolese ha un genoma più stabile rispetto ad altre razze bovine italiane

Ulteriori analisi saranno utili nel determinare se il minor numero di SCE/cellula ritrovato in questa razza, se confrontato con altre razze bovine italiane, siano legate a differenze nelle caratteristiche demografiche quali, management aziendale e fattori ambientali.

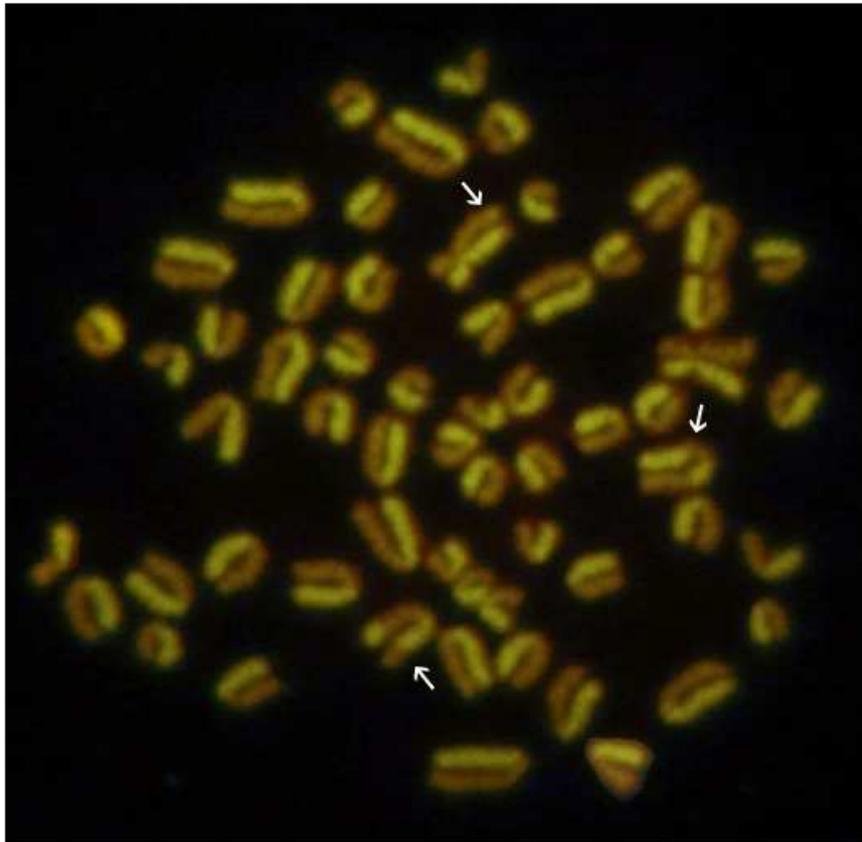


Figura 14 - Piastra metafasica di bovino TGA Agerolese (*Bos taurus*; $2n=60$) con cromosomi colorati con arancio d'acridina per la visualizzazione degli SCE (indicati dalle frecce)

Risultati sperimentali nel bufalo

Alterazioni genetiche nel bufalo mediterraneo

Il miglioramento genetico di tale specie, come per il bovino, si basa sulle prove di progenie, anche se i tori vengono macellati ancora relativamente giovani (*spesso non si ha il tempo di verificare le produzioni delle figlie*). Questo problema può essere superato con lo stoccaggio del seme. Un altro limite al miglioramento genetico è dovuto al fatto che le bufale sono di età media molto elevata. Questo rallenta di molto il ricambio generazionale e, quindi, il miglioramento genetico.

Dal punto di vista citogenetico tale specie è stata caratterizzata con diverse tecniche di bandeggio. Infatti sono disponibili ben 6 cariotipi standard con altrettante tecniche citogenetiche fig.(15). Tale specie, a differenza degli altri bovidi domestici, possiede 6 cromosomi nucleolari (Iannuzzi *et al.*, 1996). Si dispone anche di una mappa citogenetica a bassa densità con 293 loci mappati quasi tutti con la tecnica FISH su singole regioni cromosomiche (Iannuzzi *et al.*, 2003).

Il Laboratorio di Genetica Veterinaria e Biotecnologie applicate alle Produzioni Animali del Dipartimento di Scienze Zootecniche e Ispezione degli Alimenti, su richiesta dell'Associazione Nazionale Allevatori della Specie Bufalina (ANASB), effettua la valutazione citogenetica dei tori bufalini in prova di progenie. Infatti è importante verificare che un toro prima di essere iscritto al Libro Genealogico e abilitato alla riproduzione sia esente da anomalie cromosomiche oltre che possedere i requisiti genealogici (genitori iscritti al Libro Genealogico), morfologici (aver riportato alla valutazione morfologica un punteggio almeno di 80) e produttivi (valutazione genetica positiva per i caratteri oggetto di selezione) secondo quanto previsto dalle norme tecniche di selezione.

Ad oggi nella specie bufalina le anomalie cromosomiche descritte sono state principalmente le aneuploidie a carico dei cromosomi sessuali che, ben tollerate dalla specie, sono responsabili principalmente di sterilità o di ipofertilità.

A differenza del bovino nel quale i cromosomi sessuali sono facilmente riconoscibili con una semplice colorazione convenzionale in quanto essi sono submetacentrici (*gli autosomi sono tutti acrocentrici*), i cromosomi sessuali di bufalo, essendo acrocentrici, richiedono l'impiego di tecniche di bandeggio. La migliore è senza dubbio quella delle bande C in quanto i cromosomi sessuali, in generale, ma in particolare nel bufalo, mostrano un quadro di bande C completamente diverso dagli autosomi. Infatti, il cromosoma X non solo è il più grande acrocentrico ma mostra anche il più grande blocco di HC e una banda C positiva prossimale. Il cromosoma Y è un piccolo acrocentrico che all'esame delle bande C si presenta eterocromatico oppure, quando la denaturazione del cromosoma è spinta, con una banda C positiva telomerica e con bande C centromerica negativa. Tutto il contrario degli autosomi che mostrano solo bande C centromeriche. Quindi è estremamente facile riconoscere con le bande C le cellule maschili da quelle femminili.

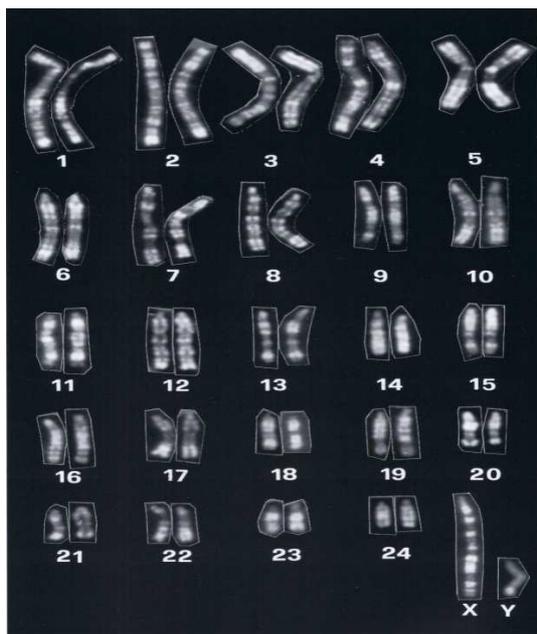


Fig. 15 - Cariotipo standard di River Buffalo (*Bubalus bubalis*; 2n=50;XY) Iannuzzi L. 1993.

In questa tesi descriveremo i casi di freemartinismo, le traslocazioni e i soggetti intersesso da noi individuati nel bufalo mediterraneo.

Casi di freemartinismo nella bufala

Nell' ambito di questi controlli sono stati esaminati 10 animali di razza bufalo mediterraneo italiano, (9 femmine ed un maschio co-gemello di una femmina) allevati nelle province di Caserta portati alla nostra attenzione per problemi riproduttivi. Oltre alla coppia cogemella, le altre 8 bufale avevano un'età variabile dai 2,5 ai 4 anni e non avevano ancora dato segni di estro oppure non erano rimaste gravide pur in presenza del toro.

Nell' indagine svolta sulla popolazione bufalina in considerazione, due animali co-gemelli di circa 6 mesi ed una bufala di circa 3 anni, sono stati trovati free-martin con frequenze di cellule maschili variabili (Tab.7). Tali frequenze sono rimaste invariate anche dopo un successivo controllo eseguito a distanza di sei mesi.

Tabella 7 - Sesso, cariotipo, percentuale di cellule femminili (F) e maschili (M) e osservazioni cliniche nei tre casi di freemartin riscontrati nel bufalo

Caso	Sesso	Cariotipo	Cellule F %	Cellule M %	Osservazioni cliniche
1	F	2n=XX/XY	50	50	<ul style="list-style-type: none">- Coformazione corporea normale- Vulva, clitoride e vagina normali- Atrofia degli annessi interni- Un solo ovaio atrofico- Sterile
1	M	2n=XX/XY	41	59	<ul style="list-style-type: none">- Conformazione corporea normale- Genitali esterni normali- Ad un anno ha manifestato lievi difetti agli arti anteriori (zoccolo)- Eliminato- Nessun esame autoptico
2	F	2n=XX/XY	30	70	<ul style="list-style-type: none">- Conformazione corporea normale- Vulva, clitoride normali- Vagina normale ma chiusa- Mancanza degli annessi interni- Sterile

Il maschio co-gemello è stato seguito fino ad un anno in quanto di alta genealogia ma poi eliminato per alcuni piccoli difetti agli arti anteriori (zoccolo). La femmina co-gemella come pure la bufala adulta, si presentavano morfologicamente normali con organi sessuali esterni (vulva, clitoride, vagina) normali. La femmina co-gemella è stata seguita fino all'età riproduttiva (2 anni). Dopo attenta visita ginecologica venivano riscontrati danni agli organi riproduttivi interni (*atrofia dei dotti di Muller*). Ciò è stato poi confermato quando, dopo alcuni mesi, la bufala è stata macellata ed esaminato il suo apparato riproduttore che ha presentato utero atrofico, un solo ovaio atrofico e corna uterine appena accennate

La bufala di 3 anni presentava, alla visita ginecologica una vagina a fondo cieco con probabile mancanza degli annessi interni come poi dimostrato dopo la macellazione dell'animale.

Negli altri soggetti non è stato identificato alcun mosaicismo leucocitario rivelando come in questa specie l'incidenza del fenomeno del freemartinismo risulti inferiore a quella riscontrata nei bovini.

Traslocazione nel bufalo

Nell'ambito delle l'analisi del cariotipo dei tori bufalini in prova di progenie è stato evidenziato che un soggetto era portatore eterozigote della traslocazione $t(1p;18)$, anomalia cromosomica riscontrata per la prima volta nella specie bufalina. Questo toro di Bufala Mediterranea Italiana si presentava con apparato riproduttore normale e libido normale. Da settembre 2009 a maggio 2010 il toro è stato sottoposto a prelievo del materiale seminale una volta a settimana mediante l'uso di vagina artificiale. Tale materiale è stato esaminato per quanto concerne il colore, il volume, la motilità, la concentrazione e la morfologia degli spermatozoi, e congelato per l'effettuazione di future analisi.

In base alle analisi fatte il seme del soggetto esaminato è risultato essere nei range fisiologici di specie (Sansone et al., 2000) e quindi di buona qualità.

Per gli esami citogenetici è stata seguita la procedura definita in premessa ed ivetrini sono stati osservati al microscopio ottico Nikon Eclipse 80i a fluorescenza dopo 24 h dalla colorazione, per ciascun animale sono state acquisite con telecamera Nikon Sight DS-5M e trasferite su PC per successiva processazione, rispettivamente 10 metafasi per l'analisi del cariotipo, 100 per il test delle CBA. Il cariotipo è stato costruito rispettando lo standard del River Buffalo (Iannuzzi,1994).

Tutte le 100 metafasi trattate con tecnica CBA evidenziavano un corredo cromosomico diploide maschile ($2n=50,XY$) ma con un polimorfismo delle bande C rispetto allo standard del River Buffalo. Si notava infatti la presenza di un piccolo cromosoma submetacentrico con una forte banda centromerica ed un grande cromosoma acrocentrico con una piccola banda centromerica (Fig. 16 a,b). Mediante l'analisi del cariotipo è stato possibile evidenziare la presenza di un solo cromosoma BBU1 normale mentre del suo omologo rimaneva solo il braccio lungo (der1q) essendosi il braccio piccolo rotto a livello del centromero e successivamente fuso con un piccolo cromosoma acrocentrico il cui bandeggio dimostra essere il BBU18 formando un nuovo cromosoma: $t(1p;18)$ (vedi fig. 17 a,b_).

Al fine di confermare la traslocazione evidenziata si è proceduto all'effettuazione di una FISH mediante l'uso di sonde cromosomiche omologhe bovine: DEFB1 (sonda specifica del cromosoma bovino BTA27, omologo del braccio corto 1p del cromosoma di bufalo BBU1) e GPI (sonda specifica del cromosoma bovino BTA18, omologo del cromosoma di bufalo BBU18) (Di Meo et al., 2008).

Le due sonde si sono ibridate coerentemente con quanto atteso sui cromosomi 1p e 18 confermando la diagnosi di traslocazione t(1p;18).

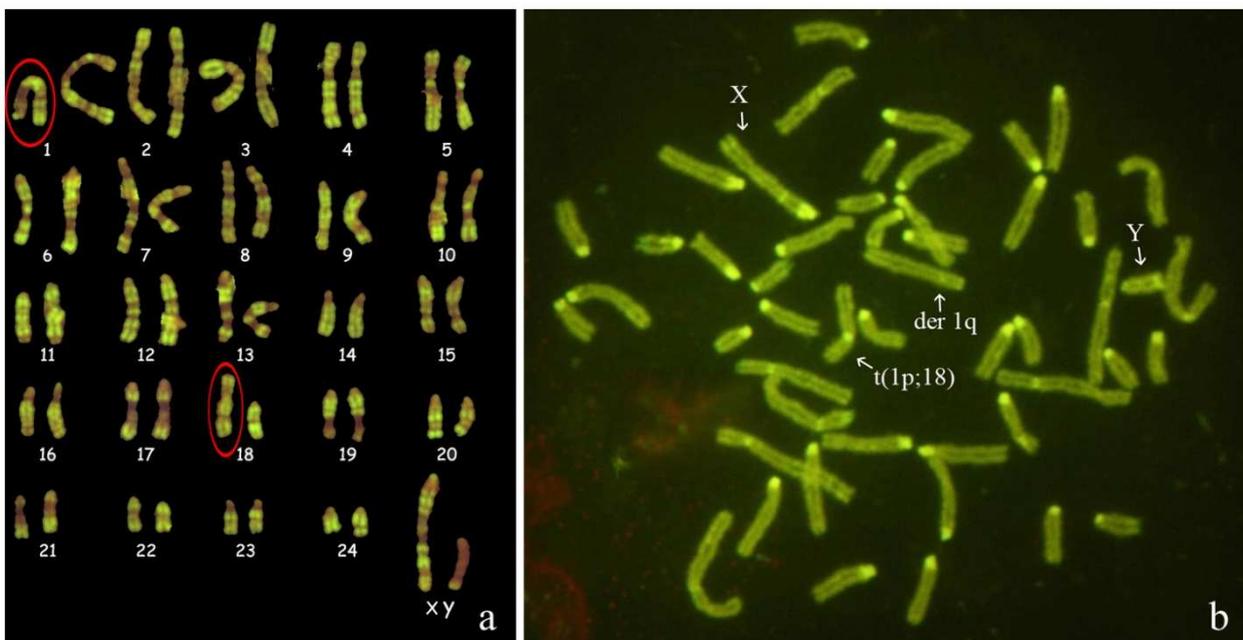


Fig. 16 a, b : a) Cariotipo di toro (*Bubalus bubalis*; $2n = 50;XY$) portatore eterozigote della traslocazione t(1p;18). In rosso sono evidenziati i due cromosomi coinvolti nella traslocazione. b) bandeggio CBA di toro (*Bubalus bubalis*; $2n = 50;XY$) portatore eterozigote della traslocazione t(1p;18). Le frecce indicano i due cromosomi sessuali ed i due cromosomi coinvolti nella traslocazione.

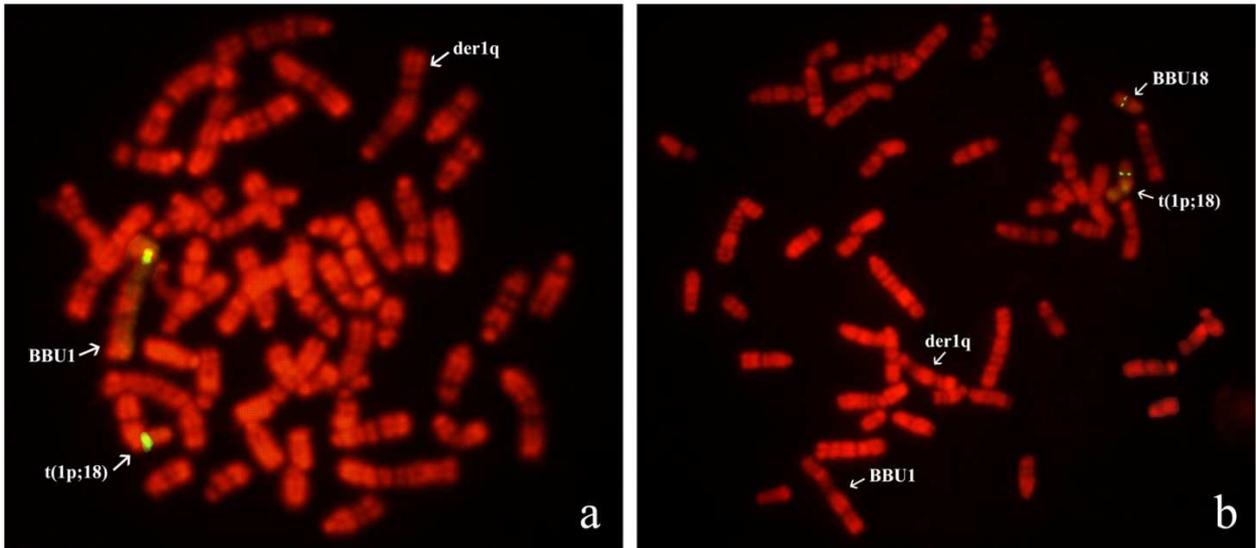


Fig. 17 a,b : Cromosomi metafasici di toro (*Bubalus bubalis*; $2n = 50;XY$) trattati con tecnica FISH; a) sonda DEFB1 localizzata sul braccio corto (p) del cromosoma BBU1; b) sonda GPI localizzata sul cromosoma BBU18.

Come è noto i gameti prodotti da portatori di traslocazioni cromosomiche possono essere geneticamente sbilanciati, in quanto hanno duplicazioni o delezioni di alcuni geni, e possono dar luogo ad embrioni disvitali. In particolare i soggetti portatori omozigoti di traslocazione (stessa traslocazione presente su entrambi i cromosomi omologhi), hanno meiosi normale, infatti tutti i geni si possono appaiare correttamente e il crossing-over non produce nessun cromatidio anomalo. Invece nei portatori eterozigoti di traslocazione (traslocazione presente solo su un cromosoma) le diverse parti dei cromosomi omologhi cercano di appaiarsi come meglio possono e quindi la ripartizione dei cromosomi omologhi e dei corrispondenti segmenti genetici (geni) si potrà realizzare in vari modi dando luogo a gameti vitali (se contengono una serie completa di geni) o non vitali (se contengono delezioni o duplicazioni geniche). I gameti portatori di segmenti cromosomici duplicati o deleti possono funzionare, ma gli zigoti originati da tali gameti generalmente muoiono.

Pertanto l'eventuale diffusione di traslocazioni in una popolazione animale ne può determinare una riduzione di fertilità con conseguenti danni economici per l'allevatore e per la stessa specie. Il

controllo citogenetico, ormai da qualche anno effettuato di *routine* nella filiera bufalina per caratterizzare i tori in prova prole, riveste quindi un ruolo fondamentale anche nel corretto management dell'allevamento, rappresentando un utile strumento d'ausilio per i medici veterinari nella diagnosi di sterilità, ipofertilità o di altre patologie genetiche. Futuri studi dovranno essere volti a valutare la trasmissione nella discendenza di questa traslocazione.

Caso di interesse nel bufalo mediterraneo

Bufala Mediterranea Italiana di anni 4, portata all'attenzione perché nonostante le ripetute inseminazioni non concepiva (sterile). Alla visita clinica il soggetto si presentava di costituzione normale. All'esame obiettivo particolare i genitali esterni si presentavano apparentemente normali mentre alla palpazione transrettale l'utero sembrava di dimensioni ridotte come pure le ovaie.

Per l'effettuazione degli esami citogenetici è stato seguito il protocollo descritto in precedenza.

Per la colorazione dei preparati sono stati seguiti protocolli differenti: per l'analisi del cariotipo, i vetrini sono colorati per 20 minuti con H33258 (20µg/ml), quindi dopo essere stati lavati con abbondante acqua distillata vengono montati in 2XSSC ed esposti per 45 minuti agli UV. Segue un'ulteriore lavaggio e colorazione con Arancio d'acridina (0,01%) per 10 minuti.

Per il test delle CBA i vetrini sono incubati a temperatura ambiente in HCl (0,1N), quindi dopo essere stati lavati con abbondante acqua distillata vengono incubati con Ba(OH) (5% in H₂O deionizzata) a 55° C per 25 minuti. Segue un'ulteriore lavaggio e incubazione in 2XSSC a 60° per 30 min quindi passaggi sequenziali per pochi secondi in 2XSSC, etanolo a 75°, 95° e 99°. I vetrini vengono quindi colorati a temperatura ambiente con Arancio d'acridina (0,01%) per 1 ora e montati in buffer fosfato pH7.

I vetrini sono stati osservati al microscopio ottico Nikon Eclipse 80i a fluorescenza dopo 24 h dalla colorazione, per ciascun animale sono state acquisite con telecamera Nikon Sight DS-5M e trasferite su PC per successiva processazione, rispettivamente 10 metafasi per l'analisi del cariotipo, 100 per il test delle CBA. Il cariotipo è stato costruito rispettando lo standard del River Buffalo (Iannuzzi,1994). Citogeneticamente il soggetto è risultato essere un maschio con 2n=50/XY. Non sono state identificate anomalie nel bandeggio RBA ed in quello CBA (Fig. 18 e 19).

Successive indagini genetiche hanno evidenziato l'assenza della regione SRY, condizione che ha ampiamente spiegato le anomalie riscontrate e la sterilità. Soggetti del genere non venendo immediatamente identificati comportano notevoli perdite economiche per l'allevatore che con indagini semplici, veloci e di relativo basso costo, effettuate su soggetti che presentano segni di

ipofertilità-sterilità possono immediatamente valutare l'opportunità di mantenere tali soggetti in allevamento o di abatterli.

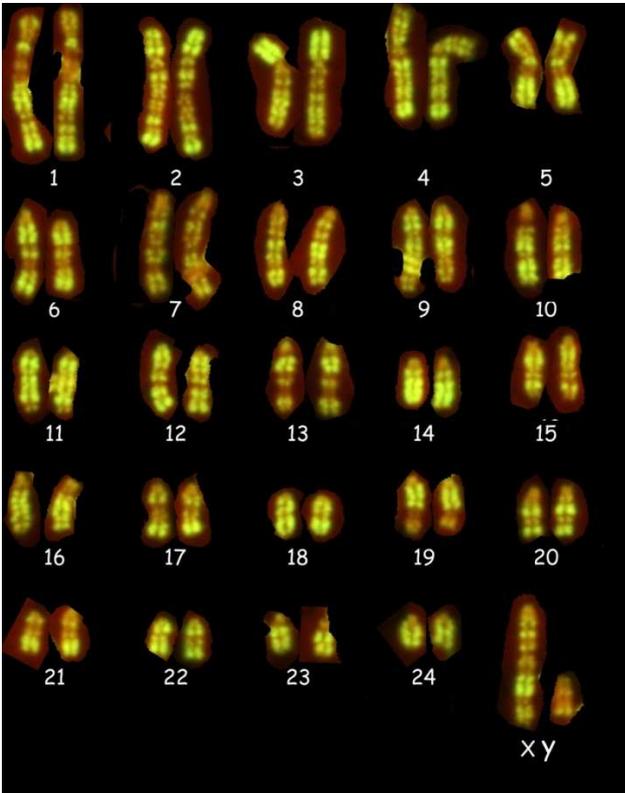


Fig.18: Cariotipo con bande R di Bufalo (*Bubalus bubalis*) intersesso $2n=50;XY$.

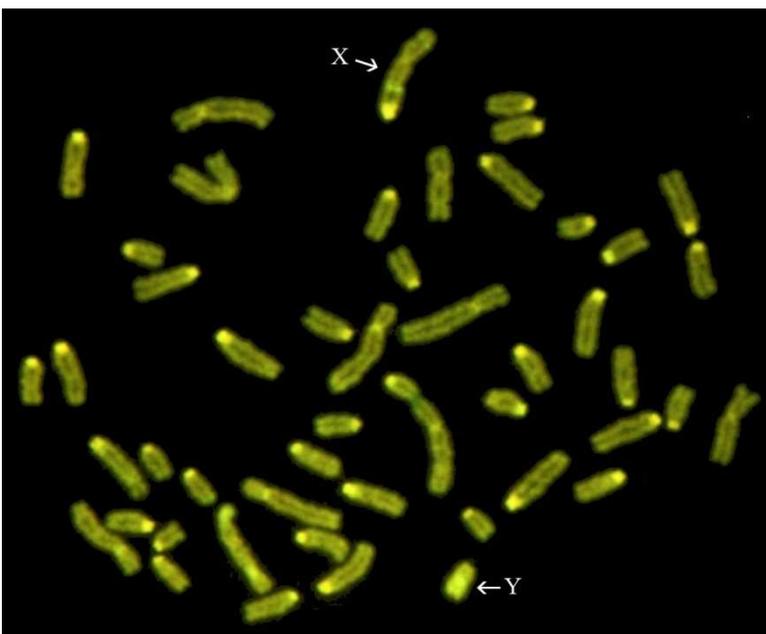


Fig. 19: Bande C in cromosomi di bufalo (*Bubalus bubalis*) intersesso. I cromosomi sessuali sono indicati.

Risultati sperimentali nel cavallo

Anomalie nel Cavallo - Descrizione di 2 casi di sesso invertito

Gli individui affetti da disordini del sesso gonadico hanno un assetto cromosomico XX o XY gonadi del sesso opposto (sesso invertito) [Lyle, 2007]. Nella sindrome del sesso invertito di tipo XX individui geneticamente femminili hanno gonadi con presenza di tessuto sia ovarico che testicolare (XX true hermaphrodites) o di solo tessuto testicolare (maschi XXs) [Rota et al., 2010; Meyers-Wallen, 1993]; al contrario nel sesso invertito XY individui geneticamente maschili sviluppano tessuto ovarico o abbozzi di gonadi (femmine XY).

Nel cavallo tali disordini sono molto frequenti e si associano a vari fenotipi : a) cavalli con intersesso XX SRY-negativi con aspetto e comportamento maschile [Villagomez et al., 2011] con una varietà di anomalie anatomiche che vanno dalla presenza di labbra vulvari normali e clitoride di aspetto simile ad un pene, vagina a fondo cieco e abbozzi di gonadi con tubuli seminiferi fino alla presenza di un piccolo pene con prepuzio e testicoli inguinali [Bannasch et al., 2007; Buoen et al., 2000]; b) cavalli con intersesso XY SRY-negativi con fenotipo e comportamento femminile [Villagomez et al., 2011; Bugno et al., 2003]; c) cavalli intersesso XY SRY-positivi con fenotipo femminile e comportamento maschile, utero ipoplastico e gonadi [Switonski et al., 2005] o comportamento simil-maschile e testicoli ipoplastico [Villagomez et al., 2011].

Come è noto nei mammiferi la differenziazione delle gonadi è sotto il controllo di numerosi geni tra i quali la regione Y determinante il sesso (SRY) gioca un ruolo chiave. Quando tale gene è presente lo sviluppo predefinito delle ovaie viene inibito e al loro posto si sviluppano i testicoli.

Sebbene l'SRY sia stato scoperto e studiato da quasi 20 anni, la sua funzione biochimica non è ancora completamente ben nota. Sembra che esso induca l'espressione del gene SOX9, che determina la formazione delle cellule del Sertoli e la differenziazione dei testicoli. Quando l'SRY è assente o non funzionante, il SOX9 è inattivo e le cellule follicolari ed ovariche si sviluppano.

Di recente il gene RSPO1 gene è stato coinvolto nella differenziazione sessuale, sembra infatti essere un'importante regolatore dello sviluppo ovarico. Nell'uomo mutazioni di tale gene sono state

evidenziate in un caso di sesso invertito 46,XX con ipercheratosi palmoplantare e carcinoma a cellule squamose della pelle (Parma et al., 2006).

Descrizione del caso 1

Puledro Purosangue Arabo dell'età di 18 mesi. Alla visita clinica il soggetto si presentava di costituzione normale con aspetto e comportamento tipici di uno stallone. All'esame obiettivo particolare i genitali esterni (fig. 20 a,b) si presentavano di anomala costituzione, era, infatti, presente una struttura simil-peniene di 8 cm di lunghezza e con direzione cranio-caudale. La struttura simil-peniene presentava inoltre un glande con un rafe mediano in posizione ventrale ed una involucri prepuziale incompleto. Il soggetto urinava regolarmente attraverso questa struttura simil-peniene attraverso la quale è stato possibile anche effettuare un cateterismo uretrale. Mediante esame ecografico trans-rettale è stato possibile evidenziare la presenza di una struttura gonadica posteriormente al rene destro, quest'ultimo era ptosico. La struttura gonadica si presentava piccola e uniformemente ecogena e poco distinguibile dai tessuti molli circostanti. La gonade sinistra era localizzata all'interno di quello che normalmente viene considerato un mesovario, presentava struttura uniforme a livello ventrale (simil-epididimale) e piccoli elementi simil-follicolari nella zona dorsale, ed è pertanto stata considerata un ovotestis.

Al fine di confermare la presenza di tessuto testicolare è stato effettuato un test di stimolazione ormonale con gonadotropina corionica umana (hCG). Campioni di sangue, per il dosaggio del testosterone circolante, sono stati prelevati 24 e 12 ore prima della somministrazione dell'hCG (Vetecor ® 3000 U.I. IV) e 12 e 24 ore dopo. Le concentrazioni di testosterone sono risultate essere rispettivamente 0.46 ng/ml prima della somministrazione dell'hCG, 0.50 ng/ml a 12 ore e 0.54 a 24 ore dalla somministrazione. I normali valori nel maschio risultano essere pari a 0.5 – 4 ng/ml, nei soggetti criptorchidi di 0.1 - 1.3 ng/ml e <0.04 ng/ml nei soggetti castrati. I valori riscontrati indicano presenza di tessuto testicolare nelle gonadi che possono pertanto essere definite degli

ovotestis nonostante non sia stato possibile asportare le stesse per l'effettuazione di esami istologici che meglio avrebbero potuto caratterizzarne la struttura e quindi consentire una diagnosi.

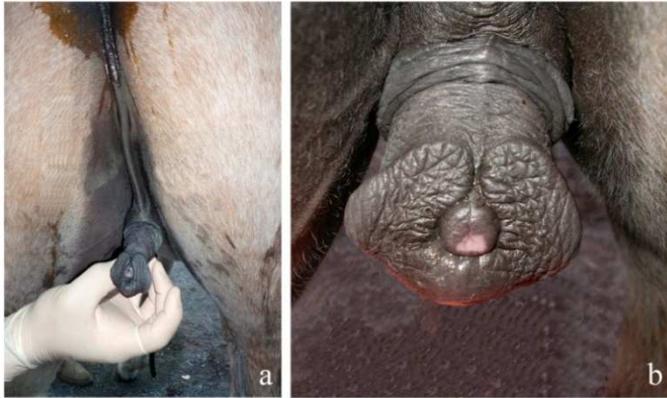


Fig. 20 a,b - Particolari dell'apparato urogenitale del caso 1: (a) Pene anormale con andamento cranio-caudale; (b) dettaglio dello stesso in cui è possibile notare la presenza sul glande di un rafe mediano.

Citogeneticamente il soggetto è risultato essere una femmina con $2n=64/XX$. Non sono state identificate anomalie (fig. 21 a,b) nel bandeggio RBA ed in quello CBA .

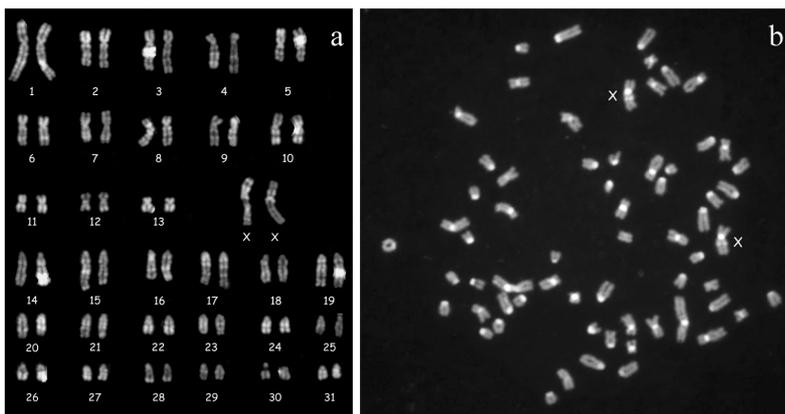


Fig. 21 a,b - (a) Cariotipo con bande RB e (b) bandeggio di tipo C del caso 1 . I cromosomi sessuali sono indicati.

Si è quindi proceduto sul DNA estratto ad effettuare l'amplificazione della regione SRY al fine di determinare se tale regione genetica, normalmente presente sul cromosoma Y e talvolta riscontrata

nei casi di interesse di soggetti XX, fosse presente. La PCR effettuata secondo i protocolli indicati da (Han et al. 2010) non ha evidenziato la presenza di tale regione. Il soggetto esaminato può pertanto essere considerato un sesso invertito XX-SRY negativo (fig.22 . Tale condizione è stata molte volte diagnosticata nel cavallo (Villagomez et al., 2011) ed indica che altri geni sono coinvolti nello sviluppo dell'apparato riproduttore.

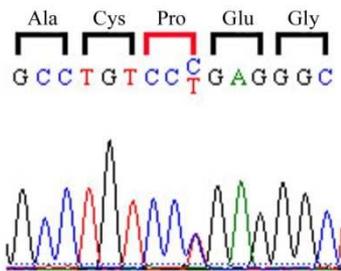


Fig. 22 - Parte della sequenza dell'esone 3 del gene RSPO1 in cui si osserva il polimorfismo nucleotidico riscontrato nel puledro XX SRY-negativo affetto da intersesso.

Descrizione del caso 2

Puledro Trottatore Italiano dell'età di 3 mesi. Alla visita clinica il soggetto si presentava di costituzione normale ed all'esame obiettivo particolare i genitali esterni si presentavano di anomala costituzione, risultava infatti presente una piega al di sotto dell'ano che termina in una struttura simil-prepuziale la cui distanza dall'ano è anomala. Da tale struttura è possibile estrarre una struttura simil-peniene (fig. 23 a,b). Il soggetto urina regolarmente da tale struttura e data la giovane età non è stato possibile caratterizzare meglio la condizione anatomica e fisiologica mediante appropriati esami collaterali cui si procederà appena l'animale abbia raggiunto un'età adeguata. Citogeneticamente il soggetto è risultato essere una femmina con $2n=64/XX$. Non sono state identificate anomalie nel bandeggio RBA ed in quello CBA fig.(24 a,b).



Fig. 23 a,b : Particolari dell'apparato urogenitale del caso 2: (a) Struttura simil-prepuziale con anomala distanza dall'ano; (b) dettaglio dello stesso in cui è possibile notare la presenza di una struttura simil-peniene.

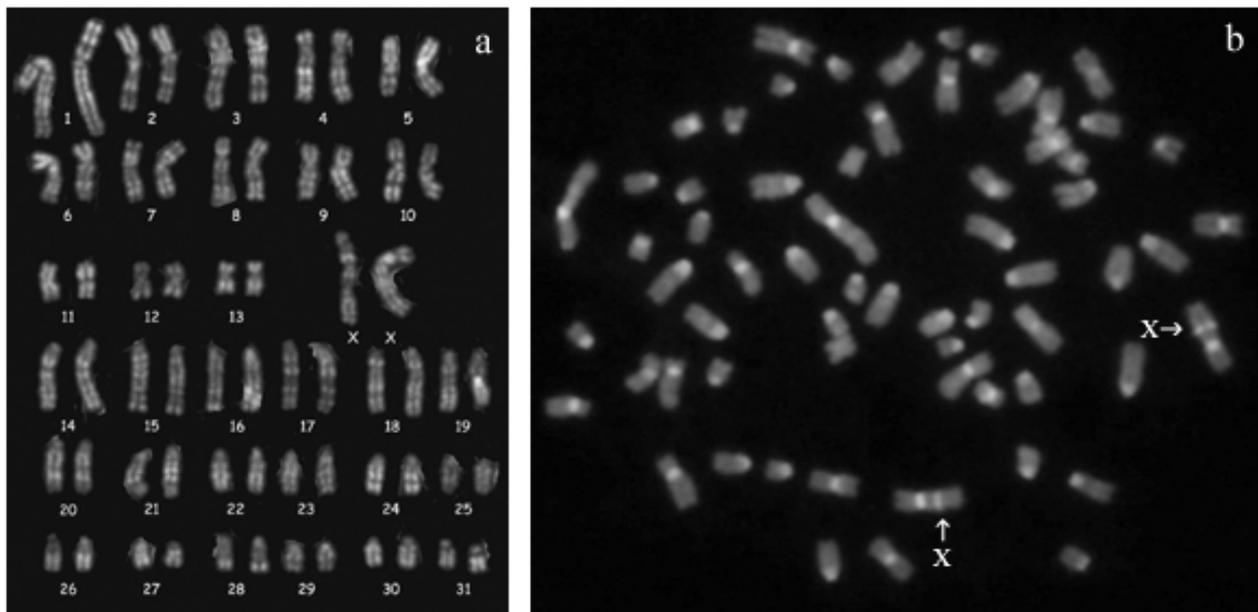


Fig. 24 a,b - Cariotipo con bande RB (a) e CBA (b) del caso 2.

Si è quindi proceduto sul DNA estratto ad effettuare l'amplificazione della regione SRY al fine di determinare se tale regione genetica, normalmente presente sul cromosoma Y e talvolta riscontrata

nei casi di intersesso di soggetti XX, fosse presente. La PCR effettuata secondo i protocolli indicati da [Han et al. 2010] non ha evidenziato la presenza di tale regione.

Il soggetto esaminato può pertanto anch'esso classificato come affetto da sesso invertito XX-SRY negativo.

L'intersesso XX SRY-negativo è il disordine di sviluppo sessuale di più frequente riscontro nel cavallo ma il primo caso descritto differisce da quelli precedentemente riportati in letteratura in quanto il puledro Arabo ha un fenotipo maschile caratterizzato da un piccolo pene con direzione anomala ma normalmente connesso con uretra e vescica. Inoltre i risultati del test ormonale confermano la presenza di tessuto testicolare e la diagnosi ecografica di ovotestis. Il sesso del puledro è stato poi determinato sia mediante analisi del cariotipo (mediante RBA-banding e lo studio di 100 metaphases con CBA banding) che genetica (geni SRY e ZFX/ZFY).

Il sessaggio molecolare dei mammiferi viene effettuato mediante l'analisi del gene SRY e più di recente con geni X ed Y-linked con aspetti dimorfici di facile evidenziazione come (ZFX/ZFY) (Han et al. 2010). La mancata amplificazione in PCR dei geni SRY e ZFY nel puledro indicano che il cromosoma Y è completamente assente e allo stesso tempo che il gene SRY non è coinvolto in questo caso di sesso invertito.

Le basi genetiche del sesso invertito variano nelle diverse specie animali: nel topo e nell'uomo è stato correlato ad una sovraespressione del SOX9, (Qin and Bishop, 2005; Kojima et al., 2008), nelle capre sembra che una delezione del locus PIS sia associata con il sesso invertito XX (Villagomez et al., 2011) e nell'uomo una mutazione a carico del gene RSPO1 comporta una totale inversione del sesso da femminile a maschile (Parma et al., 2006).

Ad oggi le cause genetiche di questo tipo di disordini dello sviluppo sessuale nel cavallo, così come in altre specie animali, sono sconosciute sia per la complessità dei processi che portano alla differenziazione sessuale che per la difficoltà di individuare quale dei passaggi della cascata regolatoria non è correttamente funzionante.

Risultati sperimentali nel suino

Alterazioni genetiche nel suino

Le anomalie di sviluppo dell'apparato riproduttore nella specie suina hanno una frequenza variabile da 0,1% a 0,6% (Pailhoux et al., 1994) rappresentando un fenomeno relativamente frequente se confrontato con altre specie di interesse zootecnico. Tali anomalie, che, anche in questa specie, prendono il nome di intersesso, sono causa di perdite economiche per vari motivi: la sterilità dei soggetti affetti, la loro maggiore suscettibilità ad infezioni del tratto genito-urinario ed il declassamento delle carcasse legato allo sviluppo di un odore sgradevole definito come "boar taint" (tanfo di ferro). In letteratura sono descritte numerose varianti fenotipiche con apparati riproduttori da quasi completamente femminili a quasi completamente maschili, essendo la condizione più frequente rappresentata dalla compresenza di organi derivanti sia dai dotti di Müller che da quelli di Wolff. Clinicamente questi soggetti si presentano quasi sempre come delle femmine con vulva normale e clitoride da ingrossato a simil-penieno con eventuale presenza di un abbozzo di sacco scrotale con un evidente involucreo prepuziale (Hunter and Greve, 1996) e presenza di tessuto gonadico solo di tipo ovario, solo di tipo testicolare o di entrambi contemporaneamente. Secondo numerosi studi l'intersesso nel suino è una condizione ereditaria (Villagomez et al., 2009) le cui cause genetiche (diagnosticate) sono varie: chimerismo XX/XY; aneuploidie dei cromosomi sessuali, traslocazioni di porzioni del cromosoma Y sul cromosoma X o su altri autosomi, mutazioni di geni autosomici. In base ai dati riportati in letteratura la maggior parte dei suini intersesso presenta assetto cromosomico femminile ($2n = 38;XX$) con assenza del gene SRY o di altre sequenze specifiche del cromosoma Y. Questa condizione, diagnosticata anche in altre specie, unita a studi di genome scan effettuati sul genoma di suino dimostrano che il fenomeno dell'intersesso in questa specie ha un controllo di tipo multigenico (Pailhoux et al., 2001). I casi di intersesso legati a chimerismo (XX/XY) e aneuploidie dei cromosomi sessuali (in particolare assetti XXY) sono stati raramente riscontrati nel suino, a differenza di quanto accade in altre specie di interesse zootecnico. In letteratura sono poi riportati due casi di intersesso associati a mutazioni

strutturali del cromosoma 9, il primo relativo ad un suino che presentava genitali esterni femminili con clitoride ingrossato e genitali interni femminili con presenza bilaterale di testicoli in assenza di ovaie in cui cariologicamente è stata evidenziata una delezione del braccio p di uno dei due cromosoma 9 ($2n = 38; XX$) (del 9p) (Tambasco et al., 1990), ed il secondo relativo ad un suino che presentava genitali esterni femminili con clitoride ingrossato e genitali interni femminili con presenza bilaterale di testicoli ipoplastici privi di attività spermatogonica ma con presenza in quello sinistro di strutture simil-follicolari e ovociti degenerati in cui cariologicamente è stata evidenziata inversione paracentrica di uno dei cromosoma 9: ($2n = 38; XX$) 9 (p1.2; p2.2) (Pinton et al., 2002). Durante il triennio di dottorato sono stati sottoposti ad analisi citogenetiche due suini in quanto affetti da anomalie dei genitali esterni. Il primo soggetto (Caso 1) è un suino TGA casertano di 6 mesi. Il secondo soggetto (Caso 2) è un suino ibrido Goland esaminato all'età di tre mesi.

Descrizione di 2 casi di intersesso nel suino

Descrizione del caso 1

Suino TGA Casertano di 6 mesi. Alla visita clinica il soggetto si presentava di costituzione normale. All'esame obiettivo particolare i genitali esterni (vedi fig. 25 a,b) si presentavano di anomala costituzione, al di sotto dell'apertura anale era infatti presente un'apertura vulvare da cui protundeva una struttura simil peniena.

I vetrini sono stati osservati al microscopio ottico Nikon Eclipse 80i a fluorescenza dopo 24 h dalla colorazione, per ciascun animale sono state acquisite con telecamera Nikon Sight DS-5M e trasferite su PC per successiva processazione, rispettivamente 10 metafasi per l'analisi del cariotipo, 100 per il test delle CBA. Il cariotipo è stato costruito rispettando lo standard del suino (Gustavsson, 1988).

Citogeneticamente il soggetto è risultato essere una femmina con $2n=38/XX$. Non sono state identificate anomalie nel bandeggio RBA ed in quello CBA (vedi Fig. 26 a,b).



Fig.25 a,b: Suino intersesso TGA Casertano. a) la freccia rossa indica un clitoride di dimensioni tali da protudere dalla rima vulvare; b) particolare dei genitali esterni del soggetto intersesso.

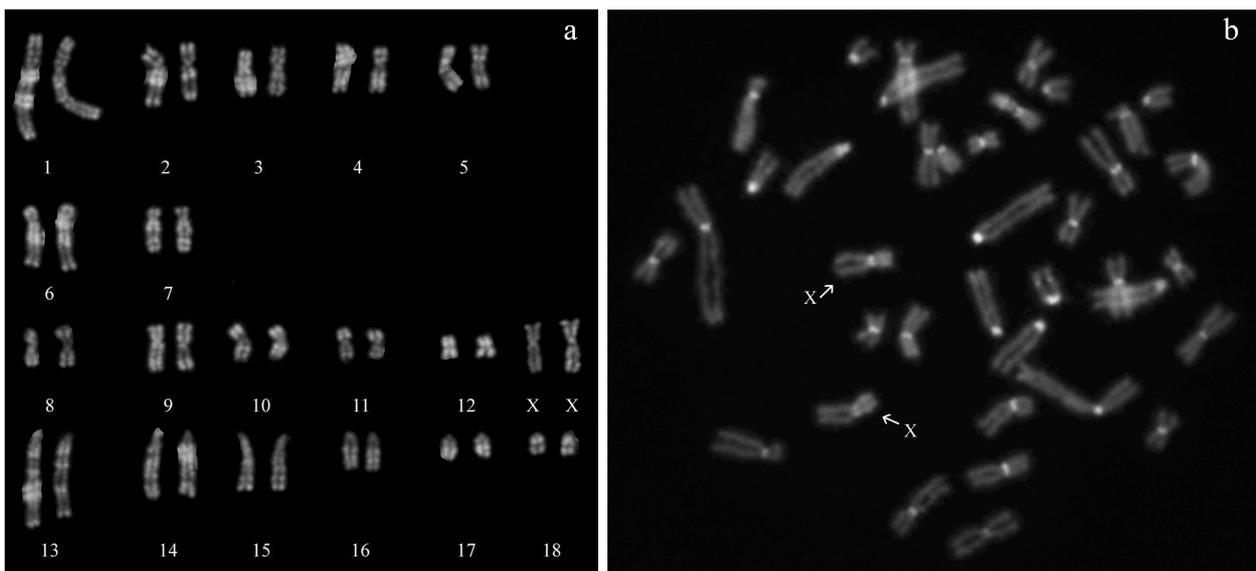


Fig.26 a,b : (a) Cariotipo con bande RB e (b) bandeggio di tipo C del suino caso 1. I cromosomi sessuali sono indicati.

Descrizione del caso 2

Suino Ibrido Goland di 3 mesi. Alla visita clinica il soggetto si presentava di costituzione normale. All'esame obiettivo particolare i genitali esterni (fig.27 a,b) si presentavano di anomala costituzione, al di sotto dell'apertura anale era infatti presente un'apertura vulvare da cui

protundeva una struttura simil peniena, era inoltre possibile mediante palpazione percepire la presenza di strutture simil-testicolari nella regione posteriore (Fig. 28).

Il soggetto è stato abbattuto all'età di 4 mesi ed all'esame anatomico-patologico dell'apparato genito-urinario è stato possibile evidenziare che la vagina terminava a fondo cieco ed era seguita da vestigia uterine e tube di falloppio, mentre erano assenti strutture simil-ovariche. Erano inoltre presenti delle vescichette seminali (Fig. 29 a,b,c).

Per l'effettuazione degli esami citogenetici è stato seguito il protocollo descritto per il suino parte iniziale della descrizione dei risultati sperimentali.

I vetrini sono stati osservati al microscopio ottico Nikon Eclipse 80i a fluorescenza dopo 24 h dalla colorazione, per ciascun animale sono state acquisite con telecamera Nikon Sight DS-5M e trasferite su PC per successiva processazione, rispettivamente 10 metafasi per l'analisi del cariotipo, 100 per il test delle CBA. Il cariotipo è stato costruito rispettando lo standard del Suino domestico (*Sus scrofa domestica*) (Gustavsson, 1988).

Citogeneticamente il soggetto è risultato essere una femmina con $2n=38/XX$. Non sono state identificate anomalie nel bandeggio RBA ed in quello CBA (Fig. 30).



Fig.27 a,b - a) Suino intersesso Ibrido Goland. ; b) particolare dei genitali esterni del soggetto intersesso.



Fig. 28 - Suino intersesso Ibrido Goland, dettaglio dell'apparato riproduttore in cui sono visibili i testicoli

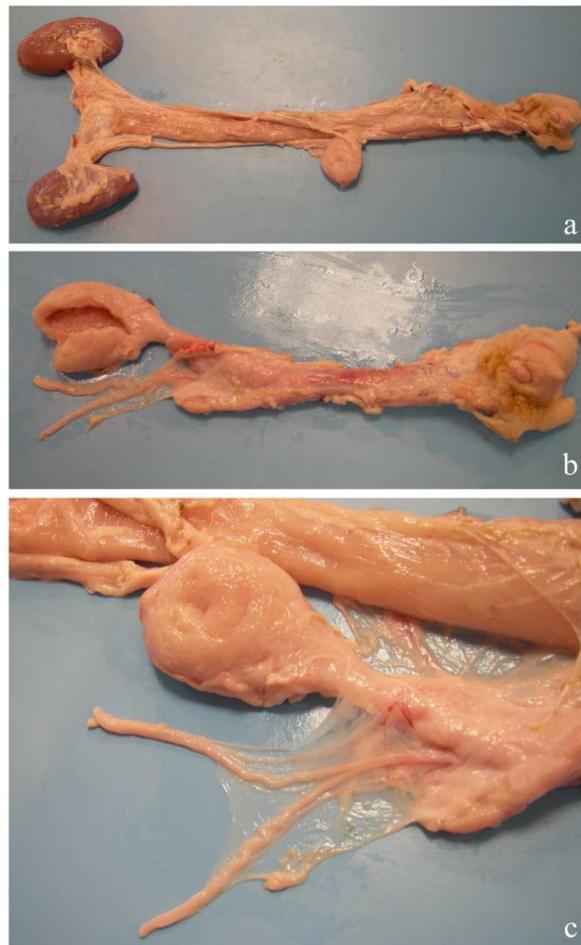


Fig. 29 a,b,c - a) Apparato genito-urinario di suino intersesso; b) e c) dettaglio in cui sono ben visibili le vescichette seminali e vestigia di utero prive di ovaie

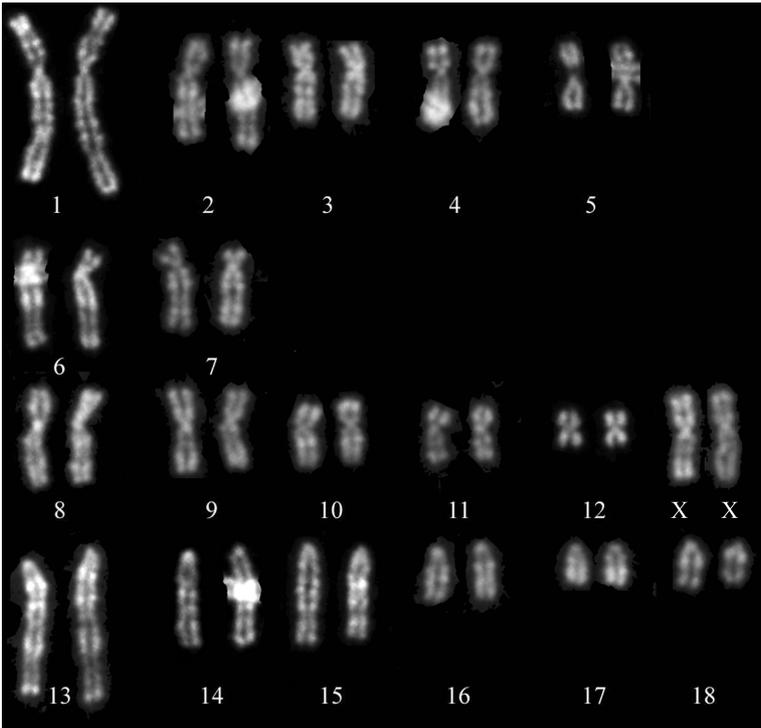


Fig.30 - Cariotipo con bande RB del suino intersesso $2n=38;XXCANE$

Anomalie genetiche nel cane

Disordini del sesso cromosomico nel cane

Le anomalie riportate nel cane includono variazioni congenite nel numero di cromosomi sessuali ed XX/XY chimerismo-mosaicismo che esitano in eventi casuali. I casi di aneuploidia del cromosoma X si basano su fenomeni di mancata disgiunzione mitotica in corso di meiosi e causano genitali iposviluppati piuttosto che di aspetto ambiguo.

Monosomia del cromosoma X, anche chiamata Sindrome di Turner nella donna. Le cagne affette sono sterili ed hanno ovaie prive di follicoli con parti dell'apparato riproduttore femminile ipoplastiche associate a genitali esterni normali o ambigui.

La trisomia X determina sterilità nella cagna con genitali "infantili ed utero malformato (Switonsky et al., 2000).

L'assetto cromosomico XXY, chiamato nell'uomo sindrome di Klinefelter, è nel cane associato a sterilità, gli individui possono avere fenotipo maschile con testicoli ipoplastici e a volte presenza di utero, oppure avere fenotipo femminile con ovaie prive di follicoli, epididimi ipoplastici e un tratto genitali femminile deforme.

Nelle chimere XX/XY coesiste più di una linea cellulare. Il chimerismo è dovuto alla fusione di più zigoti o cellule derivanti da più zigoti, mentre il mosaicismo XX/XY deriva o da una mancata disgiunzione in un singolo zigote o da cellule derivanti da un singolo zigote. In genere il fenotipo di una chimera o di un mosaico dipendono dalla proporzione di tessuto testicolare nelle gonadi e dalla sua attività ormonale (Feldman and Nelson, 2004).

Le cagne con cariotipo XX/X0 sono sterili ed hanno genitali esterni femminili di normale aspetto. Nel cane, il chimerismo o il mosaicismo XX/XY ed XX/XXY sono associati a presenza di genitali esterni ambigui e di entrambi i testicoli o di entrambe le ovaie o di ovotestis uni o bilaterale. Un altro caso con mosaicismo 78,XX/77,X0/79,XXY e presenza di genitali ambigui è stato descritto da Pullen (1970). Il chimerismo/mosaicismo XY/XXY nel cane è associato a criptorchidismo bilaterale, assenza di spermatogenesi, e genitali esterni ambigui (Goldschmidt et al., 2001). È stato

segnalato un caso di sesso invertito nel cane designato come mosaico 78,XY/78,XYrcp (X;autosome). Gli autori ipotizzano che tale traslocazione possa essere responsabile del disordine di sviluppo sessuale del soggetto in esame determinando presenza di ovotestis, clitoride di notevoli dimensioni e con osso (Schelling et al., 2001).

Disordini dello sviluppo del sesso gonadico nel cane

I cani affetti presentano un'assetto cromosomico XX oppure XY ma il sesso cromosomico non è congruente con quello gonadico.

Esistono due tipologie di sesso invertito: XX sex reversal (XXSR) ed XY sex reversal (XYSR). In entrambi i casi si verifica lo sviluppo di genitali esterni con vari gradi di anomalie, che sono direttamente correlate alla quantità di tessuto testicolare nelle gonadi. L'anomalia XXSR viene poi divisa in due tipologie attualmente denominate come vero ermafroditismo XX e sindrome XX maschile. I veri ermafroditi XX sono caratterizzati dall'averne entrambe le tipologie di tessuto sia testicolare che ovarico in una di queste tre combinazioni: bilaterale, monolaterale e laterale, e tra queste la prima forma è quella più frequente. Nei soggetti affetti, spesso, in associazione ad un paramesonefro non influenzato, troviamo un mesonefro parzialmente sviluppato. A differenza dei veri ermafroditi XX, i maschi XX non hanno tessuto ovarico ma testicoli bilaterali privi di attività spermatogonica ed in posizione ovarica, inoltre presentano strutture derivanti dal parziale sviluppo sia dei dotti mesonefrici che paramesonefrici con conseguente formazione di parti di apparato riproduttore sia maschile che femminile a diverso grado di differenziazione. I maschi XX sono sterili, mentre i veri ermafroditi XX in base al grado di mascolinizzazione possono anche riprodursi. Lo sviluppo di testicoli in femmine con un normale assetto cariologico XX sembrerebbe contraddittoria. Eziologia e patogenesi di tale fenomeno sono solo parzialmente noti, ma numerose sono le ipotesi proposte. Nell'uomo, l'80% dei maschi XX ed il 10% dei veri ermafroditi XX presentano la traslocazione del gene Y-linked SRY. Ma, nel cane, tutti i soggetti XXSR ad oggi esaminati sono SRY negativi indicando un meccanismo SRY-indipendente per l'induzione della formazione dei testicoli in cani con assetto cromosomico XX. Ulteriori ipotesi fatte nel cane

presuppongono la presenza di geni localizzati sugli autosomi con effetti Y, come già dimostrato in altre specie, ad esempio il gene SXR in topi femmina portatrici (Schlafer and Miller, 2007) o mutazioni, in capre XX, che influenzano la trascrizione dei geni PISRT1 e FOXL2 (Kothapalli et al., 2005). Altri geni candidati (WT1, DMRT1, GATA4, FOG2, LHX1/LIM1, SF1, SOX9, LHX9, RSPO1) noti per l'aver un ruolo nel processo di determinazione del sesso e pertanto nello sviluppo di XXSR ed XYSR nell'uomo ed in modelli animali sono stati presi in considerazione.

Recentemente un altro locus genico, probabilmente localizzato in CFA29, è stato indicato come possibile responsabile di sesso invertito nei cani (Pujar et al., 2007). Si dovrebbe prendere in considerazione che più di un meccanismo potrebbe essere coinvolto nello sviluppo della sindrome del sesso invertito nei mammiferi (Meyers-Wallen et al., 1999; Pujar et al., 2007). Analisi di genealogia in persone con familiarità sia alla sindrome del maschio XX che al vero ermafroditismo XX in fratelli ha suggerito una base genetica della problematica (Sarafoglou and Ostrer, 2000; Cotinot et al., 2002). Nel cane è stata dimostrato che nell'American cocker spaniel vi è un carattere di tipo autosomico recessivo responsabile sia di vero ermafroditismo XX che di maschi XX e si presume che in molte altre razze canine vi possa essere la stessa condizione.

Disordini di sviluppo del sesso fenotipico nel cane

Nei cani affetti il sesso gonadico e quello cromosomico corrispondono ma i genitali esterni hanno caratteristiche del sesso opposto. Sono attualmente classificati sia come femmine che come maschi pseudoermafroditi in base al loro sesso gonadico. Lo pseudoermafroditismo maschile è più frequente di quello femminile e si basa o sulla mancata regressione del paramesonefro (sindrome della persistenza dei dotti di Muller, PMSD) o sulla mancata mascolinizzazione androgeno-dipendente legata ad una carenza di enzimi per la biosintesi del testosterone o mancata sensibilità dei loro recettori nei tessuti target (sindrome di insensibilità agli androgeni, AIS). La PMSD è la forma più frequente nel cane ed è autosomica recessiva nel Miniature Schnauzer (Meyers-Wallen and Patterson, 1989; Wu et al., 2009). A differenza di maschi XX, i cani affetti da PMSD hanno assetto cromosomico XY (Meyers-Wallen and Patterson, 1986). Solitamente i cani affetti hanno

criptorchidismo mono o bilaterale, e possono essere fertili in caso di testicolo-testicoli nello scroto (Chaffaux et al., 1980). Hanno tipicamente genitali esterni ambigui accanto a strutture derivanti dal paramesonefro e tendono ad avere infezioni del tratto urinario, prostatiti, iperplasia endometriale cistica, piometra e tumori testicolari. L'ipospadia è stata descritta in numerose razze canine tra cui il Boston terrier nel quale si ritiene sia ereditaria. Può presentarsi da sola o associata ad altre anomalie del tratto genitale. Gli pseudoermafroditi femmina hanno assetto cromosomico XX ed ovaie bilaterali ma mascolinizzazione androgeno-dipendente dei genitali che può variare da un leggero ingrossamento del clitoride fino ad un aspetto dei genitali esterni quasi completamente maschile.

Casi osservati

Caso 1

Pastore Tedesco di 2 anni portato a visita perché manifestava difficoltà di accoppiamento. Il soggetto presentava mancinità degli arti anteriori e trascinarsi dell'arto posteriore sx (displasia anca esclusa in passato). All'esame obiettivo particolare dell'apparato riproduttore è stato possibile notare un pene di morfologia normale ma con asta più corta (ipospadia) mentre i testicoli si presentano normali. Al fine di escludere anomalie legate ai cromosomi sessuali si è proceduto all'effettuazione di analisi citogenetiche: cariotipo convenzionale e cariotipo con bande R.

Mediante il cariotipo convenzionale sono state escluse anomalie numeriche dei cromosomi sessuali e condizioni di chimerismo XX/XY, mentre l'esame con bande R ha escluso la presenza di alterazioni cromosomiche strutturali importanti. Successive indagini genetiche hanno dimostrato la presenza del gene SRY la cui sequenza era normale.

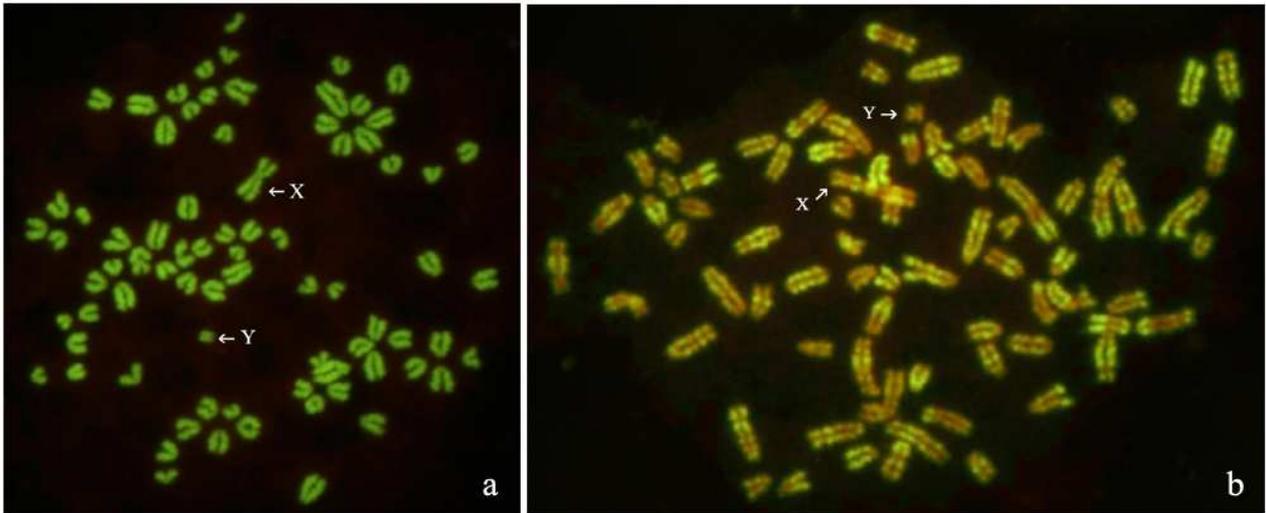


Fig.31 a,b - a) caso 1 - piastra metafase di cane (*Canis familiaris*, $2n=78;XY$) affetto da ipospadia, sono evidenti i cromosomi sessuali X ed Y; b) piastra metafase trattata con tecnica per il bandeggio di tipo R dello stesso soggetto di prima, sono indicati i cromosomi sessuali.

Caso 2

Rott-Weiler maschio di 8 mesi portato a visita per mancata discesa dei testicoli. Il soggetto presentava testa con profilo femminile ed ipospadia. Al fine di escludere anomalie legate ai cromosomi sessuali si è proceduto all'effettuazione di analisi citogenetiche: cariotipo convenzionale e cariotipo con bande R. (fig.32 a,b).

Mediante il cariotipo convenzionale sono state escluse anomalie numeriche dei cromosomi sessuali e condizioni di chimerismo XX/XY, mentre l'esame con bande R ha escluso la presenza di alterazioni cromosomiche strutturali importanti. Successive indagini genetiche hanno dimostrato la presenza del gene SRY la cui sequenza era normale.

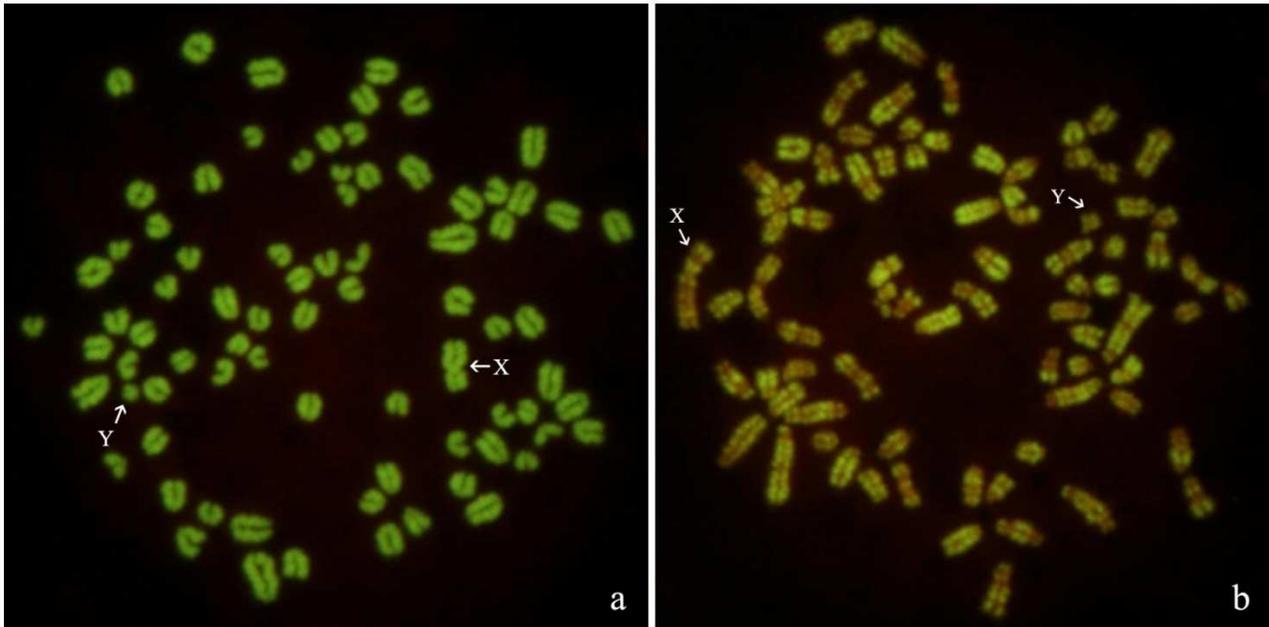


Fig.32 a,b - a) caso 2 - piastra metafascica di cane (*Canis familiaris*, $2n=78;XY$) affetto da ipospadia, sono evidenti i cromosomi sessuali X ed Y; b) piastra metafascica trattata con tecnica per il bandeggio di tipo R dello stesso soggetto di prima, sono indicati i cromosomi sessuali.

Come riportato in letteratura le anomalie dello sviluppo dell' apparato riproduttore difficilmente presentano alterazioni citogenetiche.

Questi due casi sono stati riferiti per evidenziare come in questa specie le anomalie di sviluppo sessuale nel cane abbiano cause complesse non facilmente evidenziabili dalle sole indagini citogenetiche ed il sequenziamento di SRY.

Ibridi di cinghiale : caso di nanismo

A conclusione della casistica osservata e sin qui descritta ci pare interessante trattare un caso particolare di nanismo in un ibrido di cinghiale. La segnalazione della esistenza di un soggetto di dimensioni assai ridotte presente in un allevamento amatoriale semibrado collegato ad una attività agrituristica e di fattoria didattica ci indusse a verificare la notizia e ad effettuare le indagini necessarie.

Alla nostra attenzione è stato portato un soggetto ibrido (cinghiale(3/4) – suino(1/4)) di dimensioni assai ridotte di età riferita di circa 22 mesi ed inoltre è stato individuato un fratello di questo soggetto, di circa 27 mesi di età, nato dal parto precedente della madre anch' esso non particolarmente sviluppato (Fig. 33). Inoltre ci veniva comunicato che gli altri nati delle due nidiate (composte da 3 e 4 animali) erano tutti deceduti poco tempo dopo la nascita . Riportiamo quanto si è fino ad ora potuto osservare su questi ibridi:

Ibridi di Cinghiale nani : Padre: cinghiale ungherese - Madre: Cinghiale ungherese x Large White

Caso 1: Al momento del prelievo il soggetto presentava: h garrese 20 cm, lunghezza tronco dalla punta del grugno 56 cm, aspetto armonico (fig.33) e deformità dell'apparato riproduttore. Non erano presenti testicoli e scroto mentre era presente un involucreo prepuziale rigonfio e non era possibile sfoderare il pene (fig.35). Poco tempo dopo il soggetto moriva per cause accidentali e sul cadavere è stata eseguita l' autopsia. All'esame autoptico si sono evidenziate anomalie anatomiche solo a carico della dentatura e dell'apparato riproduttore mentre tutti gli altri organi ed apparati erano di dimensioni correlate a quelle del soggetto. Per quanto riguarda la dentatura nell'arcata superiore si osservava la ritenzione dei denti da latte che formavano una seconda arcata posteriormente a quelli da adulto mentre sull'arcata inferiore erano presenti solo 1 grosso incisivo posto quasi trasversalmente alla gengiva e dopo pochi millimetri di spazio vuoto un secondo incisivo più piccolo per ogni emiarcata (vedi fig. 34). Per quanto riguarda i genitali esterni è stato possibile evidenziare la presenza di una cisti parapeniena con contenuto liquido biancastro ed in

addome era presente un solo testicolo con aspetto emorragico (fig.36 a,b). All'esame radiografico ed alla TAC è stato possibile evidenziare fenomeni di mineralizzazione della laringe e delle cartilagini costali compatibili con la condizione di nanismo.

L'analisi del cariotipo con bande tipo R (fig. 37) non ha evidenziato anomalie di bandeggio

Caso 2: età alla morte 26 mesi circa. Fratello del Caso 1 ma di diversa nidiata. morto per trauma cranico. Il soggetto presentava: h garrese 34 cm, lunghezza tronco dalla punta del grugno 80 cm, peso 14,5 kg, aspetto armonico, monorchidismo e presenza in zona paraprepuziale di due cisti, probabile ipospadia (fig. 38 a,b) e difficoltà nello sfoderamento completo. All'esame autoptico si sono evidenziate anomalie anatomiche solo a carico dell'apparato riproduttore mentre tutti gli altri organi ed apparati erano di dimensioni correlate a quelle del soggetto. Oltre alla conferma della presenza di cisti con contenuto liquido biancastro a livello paraprepuziale è stato possibile rinvenire un secondo testicolo ritenuto in addome di dimensioni ridotte (fig.39).

Su questo soggetto non è stato possibile effettuare indagini citogenetiche in quanto morto prima dell'effettuazione del prelievo di sangue.



Fig 33: Ibridi cinghiale x suino affetti da nanismo



Figura 34: Caso 1 dettaglio della dentatura in cui è possibile osservare la permanenza dei denti da latte e l'alterazione degli incisivi dell'arcata inferiore.



Figura 35: Caso 1, dettaglio dei genitali esterni. Si osserva anorchidismo ed sacco prepuziale rigonfio

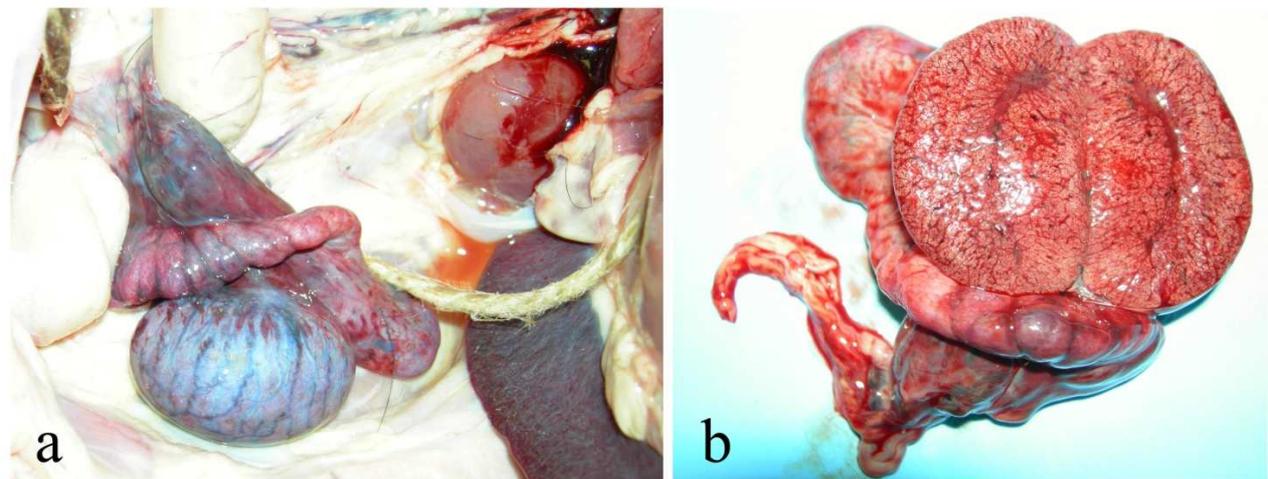


Figura 36 a,b : Caso 1, a) dettaglio dell'addome in cui è possibile osservare l'anomala posizione del testicolo e b) sezione sagittale mediale del testicolo in cui è possibile osservare la condizione emorragica.

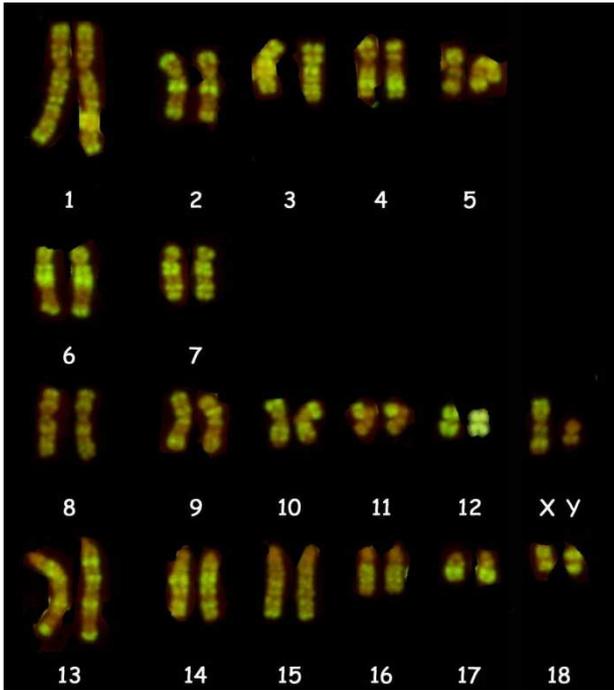


Figura 37: Cariotipo con bande R del Caso 1 $2n=38;XY$



Fig 38 a,b : Caso 2 Particolare dei genitali esterni a) sacco prepuziale e b) difficoltà nello sfoderamento completo.

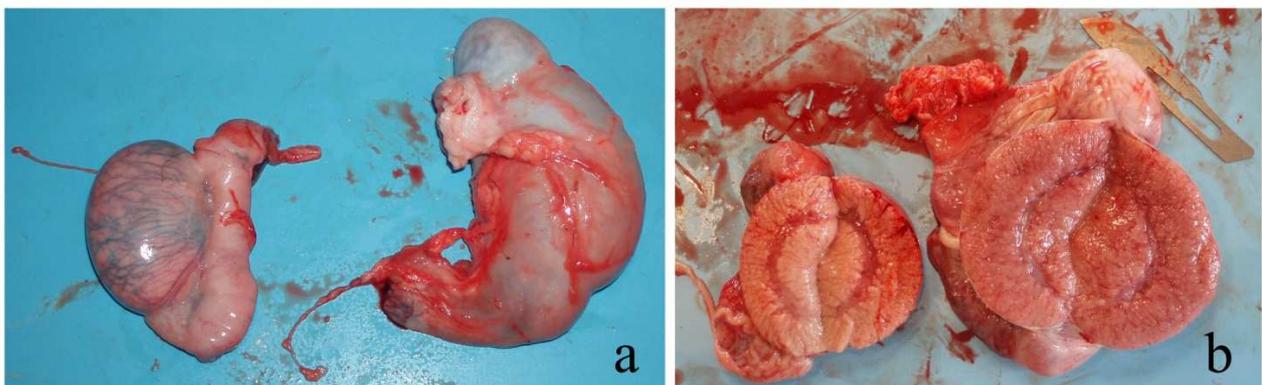


Fig 39 a,b: Caso 2, a) testicoli interi, a destra quello rinvenuto in addome mentre quello a sinistra era correttamente situato nel sacco scrotale. b) sezione sagittale mediale dei testicoli.

Numerose indagini si sono interessate ai meccanismi di ritardo nella crescita in diverse specie ed hanno individuato nel suino mutazioni che potrebbero essere responsabili dell' anticipo di quelle patologie endocondriali ritenute responsabili di un mancato accrescimento (Nielsen V.H. et altri 2000). Casi di nanismo nel suino sono stati segnalati ed è noto come esistano razze nane che vengono allevate a scopo sperimentale o come animali da compagnia. Nessuna segnalazione di nanismo abbiamo reperito nel cinghiale.

Vista la peculiarità dei casi descritti di cui il primo in particolare presentava le caratteristiche del nanismo si è inserito questi due animali in una serie di ulteriori indagini.

Riferiamo i risultati preliminari ottenuti sottoponendo i campioni dei 2 soggetti al test della PSE ed all'amplificazione e sequenziamento della regione del gene RYR1 recante la mutazione 1843C→ della PSS.

Al taglio enzimatico entrambi i cinghiali ibridi sono risultati (NN) ossia non portatori dell'allele mutato mentre al sequenziamento si sono evidenziati in corrispondenza dell'introne 16, che precede la sequenza esonica contenente la mutazione responsabile della PSE, due polimorfismi il primo alla base 682 dell'introne consistente in una transizione C→T ed il secondo alla base 708 dell'introne consistente consistente in una transizione T→C.

Il significato di tale polimorfismo è attualmente oggetto di approfondimenti e ulteriori indagini su questi casi sono in corso e potranno contribuire a chiarire le cause genetiche di queste anomalie.

DISCUSSIONE e CONCLUSIONI

I risultati delle ricerche descritti offrono un quadro ampio e articolato delle anomalie genetiche individuabili nelle specie animali di interesse zootecnico e veterinario.

Il free-martinismo ed il mosaicismismo leucitario ad esso legato per la presenza di cellule XX/XY, rappresenta l'anomalia cromosomica sessuale più frequente nei bovini, infatti si verifica con una frequenza pari a circa 0.2% delle gravidanze. Nell'allevamento bovino tale anomalia assume particolare importanza dal momento che le femmine free-martin, nel 90% dei casi, non sono fertili e presentano gli organi genitali esterni (rima vulvare) morfologicamente normali. Pertanto, è praticamente impossibile per l'allevatore individuare le femmine free-martin, soprattutto nei casi in cui il maschio co-gemello muore nelle prime settimane di vita embrionale. In tali circostanze, l'allevatore si accorgerà del problema solo nel momento in cui la femmina, raggiunta l'età riproduttiva, non presenterà estro oppure non resterà gravida.

Una diagnosi precoce di free-martinismo è possibile effettuarla solo attraverso un'indagine citogenetica oppure un esame molecolare mediante la tecnica PCR. L'analisi citogenetica rispetto a quella molecolare ha il vantaggio di poter stabilire con esattezza la percentuale di cellule maschili presenti nella femmina free-martin e poter quindi prevedere che tipo di alterazioni possono evidenziarsi nello sviluppo morfologico dell'apparato riproduttore.

E' emerso che il freemartinismo da un punto di vista clinico si manifesta con alterazioni riproduttive gravi (assenza di estro) solo nei soggetti di sesso femminile. La causa è legata essenzialmente a due circostanze:

- (a) la differenziazione del sesso (intorno ai 40-45 gg) ha luogo successivamente alla formazione delle anastomosi placentari (2° - 3° settimana di vita fetale)

(b) la differenziazione delle gonadi si realizza prima (circa una settimana) nei maschi che nelle femmine (Ruvinsky and Spider, 1999), pertanto si ha prima la formazione dei testicoli e, quindi, a causa dell'azione sia del testosterone che dell'ormone anti-Mulleriano, è alterato lo sviluppo dell'apparato riproduttivo femminile (Vigier et al. 1984).

E' possibile osservare che nelle co-gemelle freemartin, indipendentemente dalla percentuale di cellule maschili (da 50.36% a 92.79%), lo sviluppo degli organi riproduttivi interni è stato compromesso.

Nella razza Agerolese da noi studiata e nei casi di freemartin nel bufalo mediterraneo il rapporto tra coppie di gemelli esaminate e numero di casi di anomalie riscontrate risulta meno elevato di quanto previsto dalla letteratura.

Sempre nella TGA Agerolese nel confronto con altre razze i valori medi di SCE/cellula sono risultati inferiori a quanti rilevato nella Frisona ($SCE/cell = 7.11 \pm 3.35$), Podolica ($SCE/cell = 7.95 \pm 3.41$) e la Romagnola ($SCE/cell = 7.32 \pm 3.18$) (Iannuzzi et al., 1991), mentre risulta essere simile ai valori riscontrati nella Frisona Olandese (5.41 ± 2.13) da Di Berardino e Shoffner (1979).

Tali osservazioni dimostrerebbero che la popolazione bovina Agerolese ha un genoma più stabile rispetto ad altre razze bovine italiane forse dovuto alle particolari condizioni ambientali del territorio dove questa razza si è formata.

I casi di traslocazioni riferiti dimostrano ancora una volta come le indagini citogenetiche diventino essenziali nella valutazione dei riproduttori in particolare per soggetti appartenenti a razze-popolazioni residuali la cui bassa consistenza permetterebbe un aumento dell'incidenza delle traslocazioni nelle popolazioni stesse con un evidente danno per le capacità riproduttive riducendo la possibilità di aumentarne la consistenza, parametro essenziale per una valorizzazione che passi per un programma di miglioramento genetico.

I casi di interesse che abbiamo trattato rientrano in un più ampio progetto di ricerca che si pone l'obiettivo di comprendere le cause delle anomalie di sviluppo dell'apparato riproduttore. L'

incidenza di queste alterazioni nell' ambito delle popolazioni animali sono spesso sottostimate nonostante i danni zootecnici ed economici che possono determinare.

Risulta evidente che le cause della presenza di soggetti intersessi o con anomalie dell' apparato riproduttore non siano le stesse nelle diverse specie e che a determinarle concorrano una serie di fattori: infatti oltre al gene SXR anche i geni WT1, DMRT1, GATA4, FOG2, LHX1/LIM1, SF1, SOX9, LHX9, RSPO1 sono stati segnalati per l' avere un ruolo nel processo di determinazione del sesso e pertanto nello sviluppo riproduttivo. Tale quadro risulta particolarmente complesso nella specie canina ed è per tale motivo che ne abbiamo trattato riferendo le nuove proposte di classificazione che potrebbero essere adottate per tutte le specie animali di nostro interesse.

Analogo interesse presenta il caso di nanismo descritto, non solo perché evidenziato in un ibrido poco studiato, ma in quanto una comprensione più ampia del fenomeno può chiarire i meccanismi genetici del controllo dell' accrescimento.

Infine i risultati delle indagini, cliniche e citogenetiche, svolte sugli animali studiati evidenziano l'importanza di una diagnosi citogenetica applicata in modo più ampio nell' allevamento animale che comporta, oltre al vantaggio economico dell' allevatore, la possibilità grazie ad una casistica più ampia di meglio definire le cause delle alterazioni genetiche. Inoltre l' estendersi dell'uso delle tecniche proprie della citogenetica molecolare e di biologia molecolare fornirà ulteriori informazioni utili ad una sempre maggior comprensione di questi fenomeni.

E' auspicabile, quindi, che le associazioni degli allevatori nel prossimo futuro ricorrano sistematicamente, ogni qual volta insorgano problemi riproduttivi o si evidenzino caratteristiche legate a possibili alterazioni o malattie genetiche, all'ausilio diagnostico offerto dalla citogenetica classica e molecolare.

BIBLIOGRAFIA

1. Arlt M.F., Durkin G.S., Ragland R.L. Glover T.W. (2006) Common fragile sites as target for chromosome rearrangements. *DNA REPAIR* 5:1126-1135.
2. Bannasch D, Rinaldo C, Millon L, Latson K, Spangler T, Hubberty S, Galuppo L, Lowenstine L: SRY negative 64,XX intersex phenotype in an American saddlebred horse. *Vet J* 173(2):437-9 (2007).
3. Basrur P.K. and Stranzinger G. (2008) Veterinary cytogenetics: past and perspective. *Cytogenet Genome Res* 120:11-25.
4. Basrur PK, Kanagawa H. Sex anomalies in pigs. *J Reprod Fertil.* 1971 Sep;26(3):369-71.
5. Bender M. A., Bedford J. S., Mitchell J. B., (1973) Mechanisms of chromosomal aberration production. II. Aberrations induced by 5-bromodeoxyuridine and visible light. *Mutation Res.* 20,403-416.
6. Biason-Lauber A: Control of sex development. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 24(2):163-8 (2010).
7. Bugno M, Klukowska J, Słota E, Tischner M, Switoński M: A sporadic case of the sex-reversed mare (64,XY; SRY-negative): molecular and cytogenetic studies of the Y chromosome. *Theriogenology* 1;59(7):1597-603 (2003).
8. Buoen LC, Zhang TQ, Weber AF, Ruth GR: SRY-negative, XX intersex horses: the need for pedigree studies to examine the mode of inheritance of the condition. *Equine Vet J* 32(1):78-81 (2000).
9. Carrano A.V. and Natarajan A.T. (1988) Consideration for population monitoring using cytogenetic techniques. *Mut. Res.* 204:379-406.
10. Cefle K., Ucur A., Guney N., Oztrk S., Palanduz S., Tas F., Asoglu O., Bayrak A., Muslumanoglu M., Aydiner A. (2006) Increased sister chromatid exchange frequency in yong

women with breast cancer and in their first-degree relatives. *Cancer Genetics and Cytogenetics* 171: 65-67.

11. Chiang C., Litingtung Y., Lee E., Young K.E., Corden J.L., Westphal H., Beachy P.A. (1996) Cyclopia and defective axial patterning in mice lacking Sonic hedgehog gene function. *Nature*. Oct 3; 383(6599):407-13.
12. Ciotola F., Peretti V., Di Meo G.P., Perucatti A., Iannuzzi L., Barbieri V. (2005) Sister chromatid exchanges (SCE) in the Agerolese cattle population. *Vet. Res. Comm.*, 29 (Supplement 2), 359-361.
13. Debacker K. and Kooy R.F. (2007) Fragile sites and human disease. *Human Molecular Genetics* 16(2):R150-R158.
14. Di Bernardino D., Iannuzzi L., Fregola A., Matassino D. (1983) Chromosome instability in a calf affected by congenital malformation. *Vet Rec* 112:429-432.
15. Di Bernardino D., Shoffner R.N. (1979) Sister chromatid exchange in chromosomes of cattle (*Bos taurus*). *J Dairy Sci* 62:627-632.
16. Di Meo G.P., Iannuzzi L., Perucatti A., Ferrara L., Pizzillo M., Rubino R. (1993) Sister chromatid exchange in the goat (*Capra hircus*). *Hereditas* 118: 35-38.
17. Di Meo G.P., Molteni L., Perucatti A., De Giovanni A., Incarnato D., Succi G., Schibler L., Cribiu E.P., Iannuzzi L. (2000) Chromosomal characterization of three centric fusion translocations in cattle using G-, R- and C-banding and FISH technique. *Cariologia* 53 (3-4): 213-218.
18. Di Meo G.P., Perucatti A., Di Palo R., Iannuzzi A., Ciotola F., Peretti V., Neglia G., Campanile G., Zicarelli L., Iannuzzi L. (2008) Sex chromosome abnormalities and sterility in river buffalo. *Cytogenet Genome Res.* 120: 127-131.
19. Di Meo GP, Perucatti A, Fornataro D, Incarnato D, Ferrara L, Matassino D, Iannuzzi L (2000) Sister chromatid exchange in chromosomes of sheep (*Ovis aries*). *Cytobios* 101: 71-78.

20. Ducos A., Revay T., Kovacs A., Hias A., Pinton A., Bonnet-Garnier A., Molteni L., Slota E., Switonski M., Arruga M.V., vanHaerigen W.A., Nicolae I., Chaves R., Guedes-Pinto H., Andersson M., Iannuzzi L. (2008) Cytogenetic screening of livestock populations in Europe: an overview. *Cytogenet Genome Res* 120:26-41.
21. Dutrillaux B., Laurent C., Couturier J., Lejeune. (1973) Coloration des chromosomes humains par l'acridine orange, après traitement par le 5-bromodeoxyuridine. *C.R. Acad. Sci. Paris* 276: 3179-3181.
22. Gustavsson I. (1969) Cytogenetics, distribution and phenotypic effects of a translocation in Swedish cattle. *Hereditas* 63: 68-169.
23. Gustavsson I: Standard karyotype of the domestic pig. Committee for the Standardized Karyotype of the Domestic Pig. *Hereditas*. 1988;109(2):151-7.
24. Han SH, Yang BC, Ko MS, Oh HS, Lee SS: Length difference between equine ZFX and ZFY genes and its application for molecular sex determination. *J Assist Reprod Genet* 27(12):725-8 (2010).
25. Han SH, Yang BC, Ko MS, Oh HS, Lee SS: Length difference between equine ZFX and
26. Heddle J. A., Bodycote D. J. (1970) On the formation of chromosomal aberrations. *Mutat. Res.* 9, 117-126.
27. Hunter RH, Greve T. Intersexuality in pigs: clinical, physiological and practical considerations. *Acta Vet Scand.*,37(1), 1-12 (1996)
28. Iannuzzi L, Di Meo GP, Perucatti A, Incarnato D, Peretti V, Ciotola F, Barbieri V: An improved characterization of horse (*Equus caballus*, 2n=64) chromosomes by using replicating G and R banding patterns. *Caryologia* 56(2):201-207 (2003).
29. Iannuzzi L, Perucatti A, Di Meo GP, Ferrara L. (1988) Sister chromatid exchange in chromosomes of river buffalo (*Bubalus bubalis* L.). *Caryologia* 41: 237-244.
30. Iannuzzi L.(1994) Standard karyotype of the river buffalo (*Bubalus bubalis* L., 2n=50). *Cytogenetic Cell Genet* 67:102 – 113

31. Iannuzzi L., Di Meo G. P., Perucatti A., Ferrara L. (1990) Mitomycin C-induced sister chromatid exchange in X-chromosomes of Bovidae. *J. Hered.* 81 (1): 78-80.
32. Iannuzzi L., Di Meo G. P., Perucatti A., Ferrara L. and Gustavsson I. (1991) Sister chromatid exchange in chromosomes of cattle from three different breeds reared under similar conditions. *Hereditas* 114: 201-205.
33. Iannuzzi L., Di Meo G.P., Leifsson P.S., Eggen A., Christensen K. (2001a) A case of trisomy 28 in cattle revealed by both banding and FISH-mapping techniques. *Hereditas* 134: 147-151.
34. Iannuzzi L., Di Meo G.P., Perucatti A., Eggen A., Incarnato D., Sarubbi F., Cribiu E. (2001b) A pericentric inversion in cattle Y-chromosome. *Cytogenet. Cell Genet.* 94: 202-205.
35. Iannuzzi L., Di Meo G.P., Perucatti A., Incarnato D., Molteni L., De Giovanni A., Succi G., Gustavsson I. (2001c) A new balanced autosomal reciprocal translocation in cattle revealed by banding techniques and HSA-painting probes. *Cytogenet. Cell Genet.* 94: 225-228.
36. Iannuzzi L., Molteni L., Di Meo G.P., De Giovanni A., Perucatti A., Succi G., Incarnato D., Eggen A., Cribiu E.P. (2001d) A case of azoospermia in a cattle bull carrying an Y-autosome reciprocal translocation. *Cytogenet. Cell Genet.* 95: 225-227.
37. ISCNDB2000 International System for Chromosome Nomenclature of Domestic Bovids: D. Di Bernardino, G.P. Di Meo, D.S. Gallagher, H. Hayes & L. Iannuzzi (co-ordinator) (2001) eds. *Cytogenetics Cell Genetics* 92: 283-299.
38. Nielsen V.H., Bendixen C., Arnbjerg J. et altri (2000) Abnormal growth plate function in pigs carrying a dominant mutation in tipe X collagen. *Mammalian Genome* 11, 1087-1092.
39. Kierstein G., Vallinoto M., Silva A., Schneider M.P., Iannuzzi L., Breing B. (2004) Analysis of mitochondrial D-loop region casts new light on domestic water buffalo (*Bubalus bubalis*). *Phylogeny Mol Phylogeny Evol.* 30:308-324.

40. Kojima Y, Hayashi Y, Mizuno K, Sasaki S, Fukuit Y, Koopman P, Morohashi K, Kohri K: Up-regulation of SOX9 in human sex-determining region on the Y chromosome (SRY)-negative XX males. *Clin Endocrinol* 68:791-799 (2008).
41. Koopman P, Gubbay J, Vivian N, Goodfellow P, Lovell-Badge R: Male development of chromosomally female mice transgenic for Sry. *Nature* 9;351(6322):117-21 (1991).
42. Kremer E.J., Pritchard M., Lynch M., Yu S., Holman K., Bakre E., Warren S.T., Schlessinger D., Sutherland G.R., Richards R.I. (1991) Mapping of DNA instability at the fragile X to a trinucleotide repeat sequence p(CCG)n. *Science* 252:1711-1714.
43. Lapointe J.M., Lachance S., Steffen D.J. (2000) Tibial hemimelia, meningocele, and abdominal hernia in Shorthorn cattle. *Vet Pathol. Sep*; 37(5):508-11.
44. Lioi M.B., Barbieri R., Borzacchiello G., Dezzi S., Roperto S., Santoro A., Russo V. and Roperto F. (2004) Chromosome aberration in cattle with Chronic Enzootic Haematuria. *J. Comp. Path. Vol.* 113: 233-236.
45. Lyle SK: Disorders of sexual development in the dog and cat. *Theriogenology* 68(3):338-43 (2007).
46. McAllister B.F., Greenbaum I.F. (1997) How common are common fragile sites: variation of aphidicolin-induced chromosomal fragile sites in a population of the deer mouse (*Peromyscus maniculatus*). *Hum. Genet.* 100:182–188.
47. Meyers-Wallen VN: Genetics of sexual differentiation and anomalies in dogs and cats. *J Reprod Fertil Suppl* 47:441-52 (1993).
48. Nicodemo D., Coppola G., Pauciullo A., Cosenza G., Ramunno L., Ciotola F., Peretti V., Di Meo G.P., Iannuzzi L., Rubes J., Di Bernardino D. (2008) Chromosomal expression and localization of aphidicolin-induced fragile sites in the standard Karyotype of River Buffalo (*Bubalus bubalis*). *Cytogenet Genome Res* 120:178-182.

49. Pailhoux E, Popescu PC, Parma P, Boscher J, Legault C, Molteni L, Fellous M, Cotinot C. Genetic analysis of 38XX males with genital ambiguities and true hermaphrodites in pigs. *Anim Genet.* 25(5):299-305 (1994)
50. Pailhoux E, Vigier B, Vaiman D, Schibler L, Vaiman A, Criuiu E, Nezer C, Georges M, Sundström J, Pelliniemi LJ, Fellous M, Cotinot C. Contribution of domestic animals to the identification of new genes involved in sex determination. *J Exp Zool.* 290(7):700-8 (2001)
51. Pailhoux E.; Pelliniemi L.; Barbosa A.; Parma P.; Kuopio T.; Cotinot C. Relevance of intersexuality to breeding and reproductive biotechnology programs; XX sex reversal in pigs. *Theriogenology*, 47, 93-102 (1997)
52. Parma P, Radi O, Vidal V, Chaboissier MC, Dellambra E, Valentini S, Guerra L, Schedl A, Camerino G: R-spondin1 is essential in sex determination, skin differentiation and malignancy. *Nat Genet* 38(11):1304-9 (2006).
53. Peretti V., Ciotola F., Albarella S., Restucci B., Meomartino L., Ferretti L., Barbieri V., Iannuzzi L. (2008). Increased SCE levels in Mediterranean Italian buffaloes affected by limb malformation (transversal hemimelia). *Cytogenet Genome Res.* 120(1-2):183-7.
54. Peretti V., Ciotola F., Albarella S., Russo V., Di Meo G., Iannuzzi L., Roperto F., Barbieri V. (2007) Chromosome fragility in cattle with chronic enzootic haematuria. *Mutagenesis* 22: 317-320.
55. Peretti V., Ciotola F., Dario C., Albarella S., Di Meo G.P., Perucatti A., Barbieri V., Iannuzzi L. (2006) Sister chromatid exchange (SCE) in Casertana pig. *Hereditas* 143:113-116.
56. Perucatti A., Di Meo G.P., Albarella S., Ciotola F., Incarnato D., Caputi Jambrenghi A., Peretti V., Vonghia G., Iannuzzi L. (2006) Increased frequencies of both chromosome abnormalities and SCEs in two sheep flocks exposed to high dioxin levels during pasturage. *Mutagenesis*, 21: 67-75.

57. Pinton A, Pailhoux E, Piumi F, Rogel-Gaillard C, Darré R, Yerle M, Ducos A, Cotinot C. A case of intersexuality in pigs associated with a de novo paracentric inversion 9 (p1.2; p2.2) *Anim Genet.* 33(1):69-71 (2002).
58. Pires R.M., Reichert R.H., Kasahara S. (1998) Cytogenetics of three breeds of river buffalo (*Bubalus bubalis* L.), with evidence of a fragile site on the X chromosome. *Theriogenology* Feb;49(3):529-38.
59. Popescu C.P., Pech A. (1991) Une bibliographie sur la translocation 1/29 de bovins dans le monde (1964-1990). *Ann. Zootech.* 40: 271-305.
60. Poth T., Brewer W., Walter B., Hecht W. e Hermann W. (2010). *Animal Repr. Science*, 121, 197-207.
61. Poulsen B.S., Kristiansen K., Rønne M. (1991) Comparative analysis of autosomes in karyotypes from pig and rabbit using RBG-banding and in situ hybridization. *M.Cytobios* 67(268):23-7.
62. Qin Y, Bishop CE: Sox9 is sufficient for functional testis development producing fertile male mice in the absence of SRY. *Hum Mol Genet* 14:1221-1229 (2005).
63. Rodriguez V., Llambí S., Postiglioni A., Guevara K., Rincón G., Fernández G., Mernies B., Arruga M.V. (2002) Localisation of aphidicolin-induced break points in Holstein-Friesian cattle (*Bos taurus*) using RBG-banding.. *Genet Sel Evol.* Nov-Dec;34(6):649-56.
64. Rønne M. (1992) Putative fragile sites in the horse karyotype. *Hereditas.* 117(2):127-36.
65. Rønne M. (1995) Localization of fragile sites in the karyotype of *Sus scrofa domestica*: present status. *Hereditas* 122(2):153-62.
66. Rota A, Cucuzza AS, Iussich S, Delorenzi L, Parma P: The case of an Sry-negative XX male Pig with an inguinal gonad. *Reprod Domest Anim* 45(4):743-5 (2010).
67. Rozier L., El-Achkar E., Apiou F., Debatisse M. (2004) Characterization of a conserve aphidicoline-sensitive common fragile site at human 4q22 and mouse 6C1: possible association with a human inherited disease and cancer. *Oncogene* 23:6772-6880.

68. Rubes J. (1987) Chromosomal aberrations and sister-chromatid exchanges in swine. *Mutat Res.*, Jun;191(2):105-9.
69. Savage J.R. (1976) Classification and relationships of induced chromosomal structural changes. *J Med Genet.* Apr; 13(2):103-22.
70. Schnedl W. (1971) Analysis of the human karyotype using a reassociation technique. *Chromosoma* 34: 448-454.
71. Schwartz M., Zlotorynski E., Kerem B. (2006) The molecular basis of common and rare fragile sites. *Cancer Letters* 232:13-26.
72. Seabright M. (1971) A rapid banding technique for human chromosomes. *Lancet* (2): 971-972.
73. Shutherland G.R. and Hecht F. (1985) Fragile sites on human chromosomes. Oxford University Press, New York.
74. Smeets D.F.C.M., van de Klundert F.A.J.M. (1990) Common fragile sites in man and three closely related primate species. *Cytogenet. Cell Genet.* 53:8–14.
75. Stone D.M., Jacky P.B., Hancock D.D., Prieur D.J. (1991) Chromosomal fragile site expression in dogs. *Am. J. Med. Genet.* 40:214–222.
76. Stone D.M., Stephens K.E., Doles J. (1993) Folate-sensitive and aphidicolin-inducible fragile sites are expressed in the genome of the domestic cat, *Cancer Genet. Cytogenet.* 65:130–134.
77. Sumner A.T., Evans H.J., Buckland R.A. (1971) New technique for distinguishing between human chromosomes. *Nature New Biol.* 232: 31-32.
78. Sutherland G.R. Baker E., Richards R.I. (1998) Fragile sites still breaking. *Trends Genet* 14:501-506.
79. Switonski M, Chmurzynska A, Szczerbal I, Lipczynski A, Yang F, Nowicka-Postulszna A: Sex reversal syndrome (64,XY; SRY-positive) in a mare demonstrating masculine behaviour. *J Anim Breed Genet* 122 Suppl 1:60-3 (2005).

80. Taylor J. H. (1958) Sister chromatid exchanges in tritium-labeled chromosomes. *Genetics* 43: 515-529.
81. Tomaselli S, Megiorni F, Lin L, Mazzilli MC, Gerrelli D, Majore S, Grammatico P, Achermann JC: Human RSPO1/R-spondin1 Is Expressed during Early Ovary Development and Augments β -Catenin Signaling. *PLoS One* 28;6(1) (2011).
82. Villagómez DA, Lear TL, Chenier T, Lee S, McGee RB, Cahill J, Foster RA, Reyes E, St John E, King WA: Equine disorders of sexual development in 17 mares including XX, SRY-negative, XY, SRY-negative and XY, SRY-positive genotypes. *Sex Dev* 5(1):16-25 (2011).
83. Villagómez DA, Lear TL, Chenier T, Lee S, McGee RB, Cahill J, Foster RA, Reyes E, St John E, King WA: Equine disorders of sexual development in 17 mares including XX, SRY-negative, XY, SRY-negative and XY, SRY-positive genotypes. *Sex Dev* 5(1):16-25 (2011).
84. Villagómez DA, Parma P, Radi O, Di Meo G, Pinton A, Iannuzzi L, King WA. Classical and molecular cytogenetics of disorders of sex development in domestic animals. *Cytogenet Genome Res.* 126(1-2):110-31 (2009)
85. Wolff S., Perry P. (1974) Differential Giemsa staining of sister chromatids and the study of sister chromatid exchanges without autoradiography. *Chromosoma* 48: 341-353.
- ZFY genes and its application for molecular sex determination. *J Assist Reprod Genet* 27(12):725-8 (2010).