

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**COMPARAÇÃO CARIOTÍPICA ENTRE *Mazama gouazoubira*
e *Mazama nemorivaga* (ARTIODACTYLA; CERVIDAE) POR
MEIO DE MARCADORES CITOGENÉTICOS CLÁSSICOS,
FISH TELOMÉRICA E PINTURA CROMOSSÔMICA.**

Juliana Pinho de Almeida Resende
Bióloga

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

Novembro de 2012

FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS DE
JABOTICABAL
UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

**COMPARAÇÃO CARIOTÍPICA ENTRE *Mazama gouazoubira* e
Mazama nemorivaga (ARTIODACTYLA; CERVIDAE) POR MEIO
DE MARCADORES CITOGENÉTICOS CLÁSSICOS, FISH
TELOMÉRICA E PINTURA CROMOSSÔMICA.**

Mestranda: Juliana Pinho de Almeida Resende

Orientador: José Maurício Barbante Duarte

Co-orientadora: Vanessa Veltrini Abril

Tese de Mestrado apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias do Câmpus de Jaboticabal – UNESP, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Genética e Melhoramento Animal.

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

Novembro de 2012

Resende, Juliana Pinho de Almeida
R433c Comparação cariotípica entre *Mazama gouazoubira* e *Mazama nemorivaga* (ARTIODACTYLA; CERVIDAE) por meio de marcadores citogenéticos clássicos, FISH telomérica e Pintura cromossômica./ Juliana Pinho de Almeida Resende. – – Jaboticabal, 2012

x, 53 f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2012

Orientador: José Maurício Barbanti Duarte

Banca examinadora: Jeffrey Frederico Lui, Diogo C. Cabral de Mello

Bibliografia

1. *Mazama gouazoubira*. 2. *Mazama nemorivaga*. 3. Fusão cromossômica

I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 599.735.3

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.
e-mail: jubio.pinho@yahoo.com.br

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

Juliana Pinho de Almeida Resende – Nascida em 15 de junho de 1986, na cidade de Ribeirão Preto, SP, Brasil, graduou-se em Ciências com Habilitação Plena em Biologia dezembro de 2008, pelo Centro Universitário Barão de Mauá. Durante a graduação, trabalhou de Agosto de 2005 a Setembro de 2007 como estagiária no Bosque e Zoológico Fábio Barreto de Ribeirão Preto/São Paulo. De setembro de 2007 a fevereiro de 2009 trabalhou como professora de Educação Ambiental e Ecologia do Sistema COC de Educação de Ribeirão Preto/São Paulo. Em Março de 2009 tornou-se integrante do Núcleo de Pesquisa e Conservação de Cervídeos em onde desenvolveu pesquisas na área de Citogenética. Durante a execução deste trabalho, recebeu bolsa Mestrado financiada pela Fundação de Apoio a Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP.

“Dedico aos meus pais, António Carlos e Regina, e ao meu irmão Guilherme por todo o apoio, incentivo e por acreditarem em mim e em meus sonhos. Sem a ajuda e dedicação de vocês tudo teria sido mais difícil e talvez impossível de acontecer. Vocês são os responsáveis pelo o que sou e conquisto. Amo vocês!”

AGRADECIMENTOS

A Deus por tudo me guiar, proteger e me dar forças para conquistar aquilo que desejo.

Ao **Prof. Dr. José Maurício Barbanti Duarte** pela oportunidade de desenvolver um trabalho sob sua orientação, confiança, paciência, ensinamentos e por contribuir com minha formação profissional.

A minha co-orientadora **Dra. Vanessa Veltrini Abril** pela co-orientação, ensinamentos, paciência, críticas, conselhos, carinho e amizade. Você foi fundamental para que tudo acontecesse e se concretizasse.

Ao **Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento Animal** e à **FAPESP** pelo suporte financeiro oferecido através da bolsa de estudos e reserva técnica.

A minha grande companheira de laboratório **Iara Maluf Tomazella** pela amizade, carinho, ajuda, paciência, ensinamentos, risadas, parceria e conselhos. Você foi um presente de Deus durante meu período no NUPECCE e tudo o que vivemos eu vou levar para o resto da minha vida.

Aos técnicos **João Airton Boer** e **Paulo Antonio Tosta**, pela ajuda, dicas e auxílio no laboratório, pela amizade e carinho.

Aos meus avós, **Aparecida** e **Serafim**, por todo o cuidado, carinho, preocupação e ajuda durante todo o período do mestrado.

Aos queridos colegas e amigos **NUPECCIANOS** por toda amizade e boa convivência durante todo o período do trabalho. Em especial agradeço a Ana Maria e Paula (Caju) pela grande amizade, conselhos, conversas, carinho, ajuda e caronas durante o período que convivemos. Ao Javier pela amizade, carinho, respeito, ensinamentos, conselhos e parceria. A Ellen pela amizade, carinho, conselhos, ajuda, preocupação e pela ótima convivência durante o período que moramos juntas. A Luciana (barraca) Marina (Pici),

Eveline, Marina Figueiredo, Aline (Kokotinha), Josi, Vinicius (Mau Mau), Maurício (Piauí), Maurício (Janota), Mariana, Márcio, Pedro.

Ao meu grande amigo **Raoni** pela amizade e parceria de muitos anos. Por abraçar minhas ideias e dividir sonhos e momentos comigo. Sem seu apoio e companheirismo esta jornada não teria se iniciado.

A **Família Torrati Mirândola** (Tia Rosana, Tio Sérgio, Tauan, Raoni e Hilly) por todo o apoio, torcida e parceria durante o mestrado. Vocês foram essenciais na realização deste sonho.

As minhas queridas e amadas amigas, **Francine, Ramila, Julia, Stella, Polyana e Thaís**, por toda a paciência, carinho, apoio e torcida. Amo vocês hoje e sempre.

A minha **família** querida, meus tios (Sandra, Oswaldo), primos (Paula, Fábio, Daniela, Eduardo e Julia) e cunhada (Andreza), pela torcida, orações e apoio constante.

Aos meus pais (**Regina e Antonio Carlos**) que sempre me apoiaram, me deram o melhor e fizeram de tudo para que meus sonhos fossem realizados. Vocês são meu porto seguro e a razão da minha luta e crescimento. Também ao meu irmão (**Guilherme**) por todo o apoio, amor e ajuda sempre que precisei. Amo vocês incondicionalmente.

Muito obrigada!

SUMÁRIO

	Página
I. INTRODUÇÃO	5
II. REVISÃO DE LITERATURA	7
III. MATERIAL E MÉTODOS	14
3.1. Animais	14
3.2. Colheita de amostras	14
3.3. Cultivo de linfócitos	16
3.4. Cultivo de fibroblastos	16
3.5. Análise e captura de imagens.....	17
3.6. Citogenética clássica	17
3.6.1. Bandamento G	17
3.6.2. Coloração Ag-RON	17
3.6.3. Bandamento C	18
3.7. Citogenética Molecular	18
3.7.1. FISH telomérica	18
3.7.2. Pintura cromossômica	18
IV. RESULTADOS.....	20
4.1. Bandamentos.....	25
4.1.1. Banda G	25
4.1.2. Banda C	29
4.1.3. Coloração Ag-RON	33
4.1.4. FISH telomérica	34
4.1.5. Pintura cromossômica.....	37
V. DISCUSSÃO	39
VI. CONCLUSÕES	44

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	46
--------------------------------------	----

COMPARAÇÃO CARIOTÍPICA ENTRE *Mazama gouazoubira* e *Mazama nemorivaga* (ARTIODACTYLA; CERVIDAE) POR MEIO DE MARCADORES CITOGENÉTICOS CLÁSSICOS, FISH TELOMÉRICA E PINTURA CROMOSSÔMICA.

RESUMO - As espécies *Mazama gouazoubira* e *Mazama nemorivaga*, por muito tempo trouxeram dúvidas quanto à sua classificação e atualmente são descritas como espécies diferentes. A constituição cariotípica de *M. gouazoubira* ($2n=70$ e $NF=70$) é similar à de *M. nemorivaga* ($2n=67$ a 69 e $NF=69$ a 72), o que as difere são o número de cromossomos B e o cromossomo X. O objetivo deste trabalho foi analisar as diferenças cariotípicas, identificando os rearranjos cromossômicos que diferenciaram as espécies. Amostras de sangue e pele foram coletadas de 23 animais (15 *M. gouazoubira* e 08 *M. nemorivaga*) e as preparações cromossômicas foram submetidas aos bandamentos (C, G e coloração Ag-RON) e a hibridização *in situ* fluorescente. Dos 15 *M. gouazoubira* 02 foram variantes e dos 8 *M. nemorivaga* 4 foram variantes. A banda C mostrou que nas duas espécies as regiões centroméricas e pericentroméricas de todos os cromossomos são heterocromáticas, exceto o Y que é eucromático. As regiões organizadoras do nucléolo ativas foram localizadas nos mesmos pares cromossômicos (1 e 2) nas duas espécies. Sinais teloméricos foram localizados nas extremidades de todos os cromossomos e na região mediana do X nas duas espécies foi detectado um sinal telomérico intersticial. Os machos *M. nemorivaga* apresentaram um cromossomo sem par homólogo a metade distal do braço q do cromossomo X. A pintura cromossômica mostrou total homeologia da sonda do cromossomo X de *M. gouazoubira* com o braço p e com a metade proximal do braço q do X de *M. nemorivaga*. A metade distal do cromossomo X não apresentou sinal de hibridização e foi originada por uma fusão em tandem de um autossomo acrocêntrico, diferenciando o sistema sexual de *M. nemorivaga*.

Palavra-chave: sistema sexual múltiplo, fusão cromossômica, cromossomos B

Karyotype comparison between *Mazama gouazoubira* and *Mazama nemorivaga* (ARTIODACTYLA; CERVIDAE) through conventional cytogenetic marks, FISH analysis of telomeric repeats and chromosome painting.

RESUMO - The taxonomic classification of *Mazama gouazoubira* and *Mazama nemorivaga* has been uncertain, but nowadays they are described as distinct species. The standard karyotype constitution of *M. gouazoubira* ($2n=70$ and $FN=70$) is similar to *M. nemorivaga* ($2n=68$ and $FN=70$) and the differences between them are the number of B chromosomes and the morphology of X chromosome. This study aimed to analyze the karyotypic differences between *M. gouazoubira* and *M. nemorivaga* species identifying the chromosomal rearrangements that distinguished them. Blood and skin samples were collected from 23 animals (15 *M. gouazoubira* and 08 *M. nemorivaga*) and chromosomal preparations were submitted to G and C banding, Ag-NOR staining and to fluorescent hybridization in situ. From 15 *M. gouazoubira* analyzed here, two of them showed variants karyotypes while from eight *M. nemorivaga*, 4 of them were variants. The analysis of C-bands showed all centromeric and pericentromeric regions were heterochromatic, except the Y chromosome. In both species the active nucleolar organizer regions were observed in the terminal position of chromosome pairs 1 and 2. The telomeric sites were located at all the chromosomes ends and at the half of X-chromosome q arm in both species. The males of *M. nemorivaga* showed one acrocentric chromosome without its corresponding pair, but it was homologous to distal half of q arm of X-chromosome. The chromosome painting analysis showed total homeology of the X-chromosome *M. gouazoubira* probe with the whole p arm and proximal half of q arm of X-chromosome from *M. nemorivaga*. The distal half of X-chromosome did not show hybridization signal and it was originated by tandem fusion of a small acrocentric, resulting in a different sexual system for *M. nemorivaga*.

Keywords: multiple sexual system; chromosome fusion; B chromosome

I. INTRODUÇÃO

A classificação taxonômica do gênero *Mazama* e a divisão das espécies de veados cinza por muito anos estiveram repletas de divergências e incertezas.

Atualmente o gênero *Mazama* agrupa o segundo maior número de espécies de cervídeos, havendo até o momento dez espécies reconhecidas: *M. rufina*, *M. pandora*, *M. chunyi*, *M. bricenii*, *M. nemorivaga*, *M. temama*, *M. americana*, *M. gouazoubira*, *M. nana* e *M. bororo* (WEMMER, 1998; ROSSI, 2000; GROVES, 2007). Os membros do gênero dividem-se em dois grupos, com base na coloração da pelagem, os veados vermelhos (*M. americana*, *M. nana* e *M. bororo*) e os veados marrons ou cinzas (*M. gouazoubira* e *M. nemorivaga*) (DUARTE, 2008).

As espécies *M. gouazoubira* e *M. nemorivaga*, que por muito tempo trouxeram dúvidas quanto à classificação, atualmente são descritas como espécies diferentes. Após vários estudos e comparações, diferenças marcantes (cromossomos sexuais, número de cromossomos B, diferenças morfológicas) foram encontradas e as espécies classificadas separadamente (ROSSI, 2000). Estudos realizados por Duarte et al. (2008) trouxeram a ideia de que *M. gouazoubira* e *M. nemorivaga* pertenceriam a dois gêneros distintos e sugere a possibilidade de existência de duas espécies dentro dos *M. nemorivaga*, uma ocorrendo na região oeste da Amazônia e outra ao leste.

Com os avanços dos estudos citogenéticos, polimorfismos envolvendo número e morfologia cromossômica passaram a ser observados em várias espécies de mamíferos (WANG, 2003). A genética é uma ferramenta valiosa para o esclarecimento de processos evolutivos e classificação de diferentes espécies de cervídeos (DUARTE & MERINO, 1997). Os primeiros trabalhos citogenéticos em mamíferos mostraram uma grande variação do número diplóide entre as espécies e consideravam as fusões cromossômicas como um dos principais mecanismos de diferenciação cariotípica (CHANDRA et al., 1967; GUSTAVSSON & SUNDT, 1969; TAYLOR et al., 1969; JORGE & BENIRSCHKE, 1977; NEITZEL, 1987).

As diferenças cariotípicas, somadas às diferenças morfológicas, corroboram a classificação de *M. nemorivaga* como espécie verdadeira, separando-a de *M.*

gouazoubira. Wilson et. al (1974) propôs que a evolução cromossômica e morfológica ocorrem paralelamente. Estudos mais detalhados destas espécies poderão identificar as particularidades e ajudar no entendimento dos processos evolutivos sofridos por elas para que assim, a comparação das espécies *M. gouazoubira* e *M. nemorivaga* venham confirmar as ideias propostas anteriormente.

O presente trabalho buscou elucidar as diferenças entre a constituição cromossômica de *M. gouazoubira* e *M. nemorivaga*, identificando os tipos de rearranjos envolvidos na diferenciação cariotípica das duas espécies a partir da determinação das regiões que apresentam homologia. Para isso, utilizou-se, além das colorações clássicas da citogenética (bandamentos G, C e coloração Ag.RON), a técnica de hibridização *in situ* fluorescente (FISH) já que, até o momento, os estudos cromossômicos feitos com as duas espécies em questão se restringiram a uma descrição preliminar dos bandamentos clássicos (G, C e RON) sem nenhum tipo de análise comparativa aprofundada.

II. REVISÃO DE LITERATURA

Allen (1915) foi quem realizou a primeira grande divisão taxonômica do gênero *Mazama*, classificando sete espécies para veados cinza. Este autor descreveu a espécie *Mazama superciliaris* para o Brasil e *Mazama nemorivagus*, que Cuvier (1817) já havia citado como espécime originário de Cayenne, na Guiana Francesa. Miranda-Ribeiro (1914) durante um amplo estudo taxonômico sobre os cervídeos brasileiros encontrou no estado de Rondônia uma pequena espécie de veado cinza, classificando-a como *Mazama rondoni*.

Ribeiro (1919) descreveu para o Brasil quatro espécies do gênero *Mazama*, incluindo para o grupo de veados cinza *Mazama gouazoubira* e *Mazama rondoni*. Ávila-Pires (1959) desconsiderou *Mazama rondoni* como espécie e a classificou como subespécie de *Mazama gouazoubira*. Cabrera (1960) também descreveu quatro espécies para o Brasil, inclusive *Mazama gouazoubira*, mas descreveu *Mazama rondoni* como sendo *Mazama gouazoubira superciliaris*, subespécie de *Mazama gouazoubira*, (DUARTE, 1996). Czernay (1987) considerou *M. gouazoubira* como espécie válida, mas também considerou *M. rondoni* sinonímia de *M. g. superciliaris*. Já Duarte (1996) considerou cinco espécies válidas para o Brasil, e entre estas *Mazama gouazoubira* e *Mazama rondoni*. Finalmente Rossi (2000) considerou *Mazama rondoni* como sinonímia de *Mazama nemorivaga*, que hoje é reconhecida como espécie válida (ROSSI & DUARTE, 2008; ROSSI et al. 2010). A Figura 1 (a e b) ilustram, respectivamente, exemplares machos das espécies *M. gouazoubira* e *M. nemorivaga*.



Figura 1. Exemplos machos da espécie *M. gouazoubira* (a) e *M. nemorivaga* (b).

Mazama gouazoubira é uma espécie de pequeno a médio porte, ocorrendo nas savanas com uma coloração amarronzada e ocorrem nas florestas com uma coloração acinzentada. Seu peso é de aproximadamente 18 kg e apresenta em média 50 cm de altura (ROSSI 2000). Suas orelhas são grandes e arredondadas e os chifres não são ramificados. A região ventral é baía, com áreas brancas na parte inferior da cauda e face interna da orelha. É a espécie de cervídeo mais abundante da região neotropical (DUARTE, 1996). Esta espécie é encontrada desde florestas densas contínuas até savanas abertas com poucas e pequenas manchas de mata. Segundo Eisenberg (1989) e Emmons (1990), ocorre desde o Panamá até a Argentina Central. Para Duarte (1996) sua distribuição no Brasil vai do Rio Grande do Sul até o norte do Estado do Mato Grosso. Já para Rossi (2000) a distribuição da espécie abrange as regiões Sul, Sudeste, Nordeste e Centro-Oeste do Brasil. O veado catingueiro (*M. gouazoubira*) é classificado pela IUCN Red List (2009) como LC ('least concern' = pouco preocupante; não sofre ameaça imediata à sobrevivência). Porém, no Brasil, a classificação regional é variável, sendo considerada espécie vulnerável no Rio Grande do Sul (Marques et al. 2002) e ameaçada no Rio de Janeiro (BERGALLO et al. 2000). A Figura 2 representa um mapa com a área de ocupação da espécie *M. gouazoubira*.



Figura 2: Distribuição geográfica da espécie *Mazama gouazoubira*. Fonte: <http://www.iucnredlist.org>, IUCN (International Union for Conservation Of Nature) 2008.

Duarte (1996) descreveu *M. nemorivaga* como espécie de pequeno porte, pesando em torno de 15 kg e com 48 cm de altura. Os animais desta espécie apresentam orelhas pequenas e afiladas, olhos que ultrapassam a linha do crânio e mufla grande. Sua coloração é acinzentada mesclada com pêlos amarelados, principalmente nas laterais. A espécie *M. nemorivaga* parece estar restrita ao bioma de Floresta Ombrófila Densa, presente na região amazônica e particularmente no estado do Maranhão, ela pode ocorrer nas áreas de transição entre Cerrado e Floresta Estacional e, possivelmente em Floresta Estacional Decidual (ROSSI, 2000). Aparentemente está distribuída no Brasil, Guiana Francesa, Suriname, Guiana, Venezuela, Colômbia, Panamá (Ilha San José), Equador, Peru, e provavelmente na Bolívia (ROSSI & DUARTE 2008; ROSSI et al. 2010). No Brasil a espécie é encontrada nos estados do Amazonas, Pará, Rondônia, Amapá, norte do Mato Grosso e nordeste do Maranhão (ROSSI, 2000). A IUCN (*International Union for Conservation of Nature*) considera a espécie como Não Prioritária (LC), devido a deficiência de informação da mesma, porém no Brasil acredita-se que esteja sob ameaça, devido ao desmatamento e a caça (ROSSI & DUARTE 2008). A Figura 3 representa um mapa com a área de distribuição da espécie *M. nemorivaga*.



Figura 3: Distribuição geográfica da espécie *Mazama nemorivaga*. Fonte: <http://www.iucnredlist.org>, IUCN (International Union for Conservation Of Nature) 2008.

Duarte (1998) analisou morfologicamente os *Mazama* cinzas do Brasil e relatou que os *M. gouazoubira* do nordeste brasileiro, que são os menores do Brasil, são semelhantes aos *M. nemorivaga* na maioria das características biométricas. Entretanto, comparando-se estes últimos aos *M. gouazoubira* do sul e centro-oeste do Brasil, os *M. nemorivaga* são bem menores. Este mesmo autor, em 1996, sugere que *M. nemorivaga* pode estar substituindo *M. gouazoubira* na região Amazônica.

Após comparação entre o cariótipo de diferentes espécies, foi possível estabelecer que o cariótipo ancestral para a família Cervidae possuía $2n=70$ e $NF=70$, sendo todos os cromossomos acrocêntricos, exceto o Y que foi caracterizado como um pequeno metacêntrico. Este cariótipo é observado em duas espécies atuais, porém distantes filogeneticamente: a espécie neotropical *M. gouazoubira* e a asiática *Hydropotes inermis* (NEITZEL, 1987; TAYLOR, 1969; FONTANA & RUBINI, 1990). Estudos realizados por Sarria Perea (2012) sugerem que o cromossomo X acrocêntrico de *M. gouazoubira* seria produto de uma inversão pericêntrica, a partir de um cromossomo X ancestral de dois braços, uma vez que as demais espécies da tribo Odocoileini possuem um cromossomo X com esta morfologia. Porém, a hipótese inversa de que o cromossomo X de dois braços tenha se derivado de um ancestral com morfologia acrocêntrica não é descartável (SARRIA PEREA, 2012).

As primeiras análises citogenéticas incluindo espécies de cervídeos neotropicais foram realizadas por Neitzel (1979). Após estudar uma fêmea de *M. gouazoubira*, Neitzel (1979) encontrou $2n=70$ e $NF=70$, com todos os cromossomos acrocêntricos. Neitzel (1987) analisou um macho de *M. gouazoubira* e definiu o cromossomo X como o maior e o Y como o menor do complemento, descrevendo também os padrões de bandas G e C desta espécie.

Duarte (1992) realizou um estudo com 35 espécimes de *M. gouazoubira* do Brasil, encontrando os mesmos resultados descritos por Neitzel (1987), além de relatar a localização das regiões organizadoras do nucléolo (RON) nos telômeros dos cromossomos 2 e 3. O mesmo autor descreveu a existência de translocações do tipo Robertsoniana e de cromossomos B em alguns indivíduos. Os cromossomos B ou supranumerários são elementos adicionais, mas dispensáveis, já que não estão presentes em todos os indivíduos. São elementos extras no cariótipo e morfologicamente distintos de quaisquer cromossomos regulares, podendo ser os menores em tamanho ou muito grande como é o caso de alguns peixes. Sua ocorrência é praticamente universal em peixes, anfíbios, répteis e mamíferos (KASAHARA 2009). Estes cromossomos são encontrados nos cervídeos neotropicais variando de 1 a 6 em *M. nana* (ABRIL & DUARTE, 2008), 4 a 5 em *M. bororo* (DUARTE & JORGE, 2003) e 2 a 6 em *M. americana* (SARRIA PEREA, 2004). Duarte & Merino (1997), sugeriram que tais cromossomos B pudessem ser oriundos de fragmentos centroméricos resultantes das quebras cromossômicas de rearranjos como as translocações Robertsonianas. Nestes trabalhos não foram realizados bandamentos que permitissem a identificação dos cromossomos envolvidos nas fusões.

A constituição cariotípica de *M. nemorivaga* é muito similar à de *M. gouazoubira* ($2n = 70$ e $NF = 70$), já que ambas possuem os cromossomos autossômicos acrocêntricos. Porém o que as difere é que, *M. nemorivaga* tem um par autossômico a menos e cromossomo X submetacêntrico, enquanto em *M. gouazoubira* este cromossomo é um acrocêntrico grande (DUARTE, 1992; DUARTE, 1998). Também é verificado em *M. nemorivaga* o grande número de cromossomos B (2 a 8), o que não é encontrado em *M. gouazoubira*. A morfologia submetacêntrica do cromossomo X, encontrada em *M. nemorivaga*, parece ser uma característica

ancestral originada a partir de uma inversão pericêntrica e está presente em todas as espécies da subfamília Capreolinae, exceto em *M. gouazoubira* (NEITZEL, 1987; FONTANA & RUBINI, 1990).

Após estudar uma fêmea capturada na região de Rondônia, Duarte (1992) descreveu seu cariótipo como $2n=66$, acrescido de 8 cromossomos B, com dois pares de cromossomos submetacêntricos. Duarte & Merino (1997) explicaram que este mesmo animal poderia ser a espécie *Mazama rondoni*, descrita por Ribeiro (1919).

Os trabalhos realizados por Duarte (1998) constataram diferenças marcantes no cariótipo dos animais analisados. Este autor encontrou variações de $2n=67$ a 69 e $NF=69$ a 72 , sendo alguns cromossomos submetacêntricos, inclusive o cromossomo X e um grande número de cromossomos B (2 a 8). Estes animais foram considerados *Mazama rondoni*, seguindo a sugestão feita por Duarte & Merino (1997). Duarte (1998) constatou que alguns animais da espécie *M. gouazoubira* apresentavam fusões cêntricas e, estes resultados se aproximaram dos obtidos por este mesmo autor em 1992. Isto pode indicar a fragilidade cromossômica existente nesta espécie (DUARTE, 1998). As primeiras análises por meio de bandamentos em *M. nemorivaga* foram realizadas por Ferreto (2010), que por meio do bandamento G identificou que os machos apresentavam um cromossomo sem par. Este autor propôs então que havia ocorrido uma fusão X-autossômica, que provocou a diferenciação do sistema sexual, tornando-o XX/XY1Y2.

Duarte (1996) depois de encontrar diferenças citogenéticas entre *M. gouazoubira* e *M. nemorivaga* (*M. rondoni*), passou a considerá-las espécies distintas, o que foi confirmado por Rossi (2000) através de estudos morfológicos. Estudos moleculares revelaram que *M. gouazoubira* e *M. nemorivaga* não são um grupo monofilético e sugere a possibilidade de existência de duas espécies dentro do que hoje é considerado *M. nemorivaga*, uma ocorrendo na região oeste da Amazônia e outra ao leste (DUARTE et. al., 2008).

As técnicas de bandamento são capazes de caracterizar regiões cromossômicas, facilitando a discriminação entre cariótipos aparentemente similares, revelando mecanismos de rearranjos e no estabelecimento de homologias (OZOUF-COSTAZ & FORESTI, 1992). A utilização da citogenética clássica de forma conjunta à citogenética molecular fornece importantes informações, pois muitos processos

genéticos que contribuíram para a diferenciação das espécies só podem, muitas vezes, serem evidenciados cromossomicamente pela citogenética molecular. Sendo assim, a técnica de hibridização *in situ* fluorescente (FISH) é usada para uma análise mais refinada do DNA cromossômico e a pintura cromossômica, que é uma variação da FISH, tem sido muito útil para se detectar homologias cromossômicas gerando informações sobre o processo de evolução cariotípica e sobre a citotaxonomia (MATSUBARA et al., 2004). Cromossomos inteiros ou segmentos cromossômicos podem ser usados como sondas hibridizadas em outra espécie e as variações entre os cariótipos detectadas por microscopia de fluorescência (GUERRA, 2004). No início as sondas de cromossomos humanos foram as primeiras a serem utilizadas e por isso a técnica de ZOO-FISH foi muito utilizada nas comparações dos cariótipos de primatas, e posteriormente entre outras espécies de mamíferos (KASAHARA, 2009).

A evolução cariotípica do gênero *Muntiacus* da família Cervidae tem sido amplamente estudada desde a época de 90 através da técnica de pintura cromossômica, para se estabelecer as relações das espécies próximas (YANG et.al. 1995). Yang et. al. (1997) confirmou que *Muntiacus reevesi* ($2n=46$) evoluiu cariotipicamente a partir de ancestral hipotético da família Cervidae ($2n=70$). Para isto, sondas de *M. gouazoubira* e *M. reevesi* foram utilizadas e hibridizadas em metáfases de *M. reevesi*, *M. gouazoubira* e *Hidropotes inermis*. Através da pintura cromossômica recíproca a teoria de que a evolução cariotípica de *Muntiacus* se deu por fusões em tandem foi revista, assim, outros rearranjos cromossômicos, além de fusões cêntricas e em tandem, aconteceram durante a evolução do gênero.

Abril et. al. (2010) utilizou pela primeira vez a técnica em um trabalho com cervídeos neotropicais, buscando entender o processo de evolução cromossômica da espécie *M. americana* no Brasil, utilizando algumas sondas cromossômicas da espécie *M. gouazoubira* ($2n=70$; $NF=70$).

III. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Animais

Para a realização deste estudo foram analisados 15 animais e/ou material biológico da espécie *M. gouazoubira* (12 fêmeas e 03 machos) e 08 animais e/ou material biológico da espécie *M. nemorivaga* (03 machos e 05 fêmeas), mantidos em cativeiro e/ou mantidos no banco de células pelo Núcleo de Pesquisa e Conservação de Cervídeos (NUPECCE), do Departamento de Zootecnia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP - campus de Jaboticabal (Tabela 1).

3.2. Colheita das amostras

Os animais foram contidos física e quimicamente por meio da aplicação manual da associação de 5 a 7 mg/kg de Cloridrato de ketamina e 1 mg/kg de cloridrato de xilazina (NUNES *et al.*, 1997), para a realização da colheita de sangue e pele, que foram processadas em laboratório num prazo de até 24 horas. As amostras foram colhidas em Vacutainer® heparinizados de 10 mL e estocadas em geladeira à 4°C, logo após o procedimento.

Um pequeno fragmento de pele (1 cm x 1 cm) foi colhido da face interna da coxa após tricotomia e desinfecção da área com álcool 70%, mergulhado em solução McCoy's com altos níveis de antibiótico (100 ml McCoy's acrescidos de 10 mg de Anfotericina B e 25 mg Sulfato de Gentamicina) e levado para geladeira (4°C), até a chegada no laboratório. Foram utilizadas amostras de pele congeladas em meio crioprotetor (DUARTE *et al.* 1999), e mantidas no banco de células do NUPECCE, estas foram descongeladas em banho-maria 37°C

Tabela 1: Dados das espécies *Mazama gouazoubira* (Mg) e *Mazama nemorivaga* (Mn) analisados, com identificação, procedência, origem geográfica, sexo (F = fêmea; M = macho) e espécie.

Identificação	Procedência	Origem	Sexo
Mg01	Estrada Rib.Preto/Jardinópolis	Desconhecida	F
Mg02	NUPECCE	Desconhecida	F
Mg03	Desconhecida	Carajás/PA	F
Mg04	Desconhecida	Luiz Antônio/SP	F
Mg05	Desconhecida	Descalvado/SP	F
Mg06	Desconhecida	Santa Rosa de Viterbo/SP	F
Mg07	Zoo Piracicaba/SP	Desconhecida	F
Mg08	Desconhecida	Franca/SP	F
Mg09	Zoo Guaíra/SP	Desconhecida	F
Mg10	Desconhecida	Carajás/PA	M
Mg11	Zoo Guaíra/SP	Desconhecida	F
Mg12	Zoo Piracicaba/SP	Desconhecida	M
Mg13	Zoo Piracicaba/SP	Desconhecida	F
Mg14	NUPECCE	Desconhecida	M
Mg15	Zoo Ilha Solteira/SP	Desconhecida	F
Mn01	Desconhecida	Santarém/PA	F
Mn02	Desconhecida	Imperatriz/MA	M
Mn03	Desconhecida	Juína/MT	M
Mn04	Desconhecida	Macapá/AP	F
Mn05	Desconhecida	Macapá/AP	F
Mn06	Desconhecida	Marabá/PA	M
Mn07	Desconhecida	Rondônia	F
Mn08	Desconhecida	Rio Branco/AC	M

3.3. Cultivos de linfócitos (MOORHEAD et al., 1960, com modificações)

Para o cultivo de linfócitos, as amostras de sangue heparinizado foram centrifugadas a 1200 rpm por 6 minutos. O anel leucocitário foi colhido com pipeta Pasteur e 0,3 ml deste foi depositado em 4 ml de meio DMEM (Meio Essencial Mínimo Modificado de Dulbecco) enriquecido com 1 ml de soro fetal bovino e 0,6 ml de fitohemaglutinina P.

As culturas permaneceram incubadas por 72 horas a 37°C e uma hora antes da colheita foram adicionados 0,3 ml de colchicina 0,0016 %. Após sua retirada da estufa, as culturas foram depositadas em tubos de fundo cônico e centrifugadas a 12000 rpm por 6 minutos descartando-se o sobrenadante. O sedimento foi ressuspenso em 10 mL de solução hipotônica (KCl 0,075M) e incubado numa temperatura de 37°C por 20 minutos. Depois, o material foi centrifugado, o sobrenadante descartado novamente e o sedimento foi restituído em 6 mL de solução fixadora de metanol e ácido acético 3:1 (Carnoy) respectivamente, em três ocasiões.

3.4. Cultivo de fibroblastos (VERMA & BABU, 1995)

As amostras de pele foram divididas em pequenos fragmentos com o auxílio de lâmina de bisturi e transferidos a frascos de cultivo T25 com 1 mL de meio de cultura DMEM, suplementado com soro fetal bovino a 50%, 5µL de amicacina para cada 1 mL de meio de cultura e em seguida levados à estufa 5% CO₂ a 37°C (VERMA & BABU, 1995).

Após 48 horas de cultivo, quando já havia ocorrido a aderência dos fragmentos no frasco, foram adicionados 3 mL de meio com 10% de soro fetal bovino que foram trocados a cada 48 horas até o momento de colheita da cultura. Foi realizado supervisionamento diário até a formação de uma camada de células no fundo do frasco. Para fazer a colheita foram adicionados 60µL de colchicina (0,016%) em cada frasco, ficando a 37°C por 30–40 minutos na estufa. Logo após, foi adicionada uma solução de tripsina para promover a dissociação das células e posterior colheita,

hipotonização com KCl 0,075M e fixação, como realizado na colheita do cultivo de linfócitos.

3.5. Análise e captura de imagens

As lâminas coradas com Giemsa foram analisadas através do microscópio Zeiss Axiophot II (objetiva de 100x) equipado com câmera Zeiss AxioCam MRm, por meio do programa AxioVision 4.8. As imagens foram editadas com o auxílio do programa Adobe Photoshop CS3.

3.6. Citogenética clássica

3.6.1. Bandas G (SEABRIGHT, 1971, modificada).

Foram empregadas lâminas de dez dias de preparação, as quais foram mergulhadas numa solução de tripsina 0,0015% em tampão fosfato e a temperatura ambiente por 2 a 3 segundos. A coloração foi feita com solução Giemsa 1:30 em tampão fosfato pH 6,8 por 6 minutos.

3.6.2. Coloração Ag-RON (HOWELL & BLACK, 1980).

Em lâminas de 30 dias ou menos, foram pingadas duas gotas de nitrato de prata a 50% e uma gota de solução coloidal (1g de gelatina P.A. em 50 mL de água deionizada mais 0,5 mL de ácido fórmico), colocando-se uma lamínula sob a preparação. A lâmina foi colocada em câmara úmida, e aquecida a 56°C em estufa durante 8 minutos até obter uma coloração dourada. Após isso, a lâmina foi mergulhada em água destilada para retirada da lamínula, sendo depois lavada com água corrente e analisada ao microscópio.

3.6.3. Bandas C (SUMNER, 1972)

As lâminas foram hidrolisadas em solução de HCl (0,02N) por 15 minutos, sendo em seguida enxaguadas em água destilada e posteriormente imersas em solução de Ba(OH)₂ (0,07N) a 41°C durante 30 minutos. As lâminas foram enxaguadas novamente e incubadas em solução 2 x SSC a 60°C por 2 hora. Em seguida as lâminas foram coradas com Giemsa a 2 % em tampão fosfato, por 15 a 20 minutos.

3.7. Citogenética molecular

3.7.1. FISH telomérica

Para a identificação dos sítios teloméricos, foram usadas sondas construídas por PCR utilizando-se os iniciadores 1 (TTAGGG)₅ e 2 (CCCTAA)₅ (IJDO et al., 1991). A marcação da sonda foi feita pelo método *nick translation* utilizando-se o Kit BionickTM Labeling System (Invitrogen Life Technologies) seguindo as especificações do fabricante.

As preparações cromossômicas foram desnaturadas em formamida 70%/2xSSC a 67°C, desidratadas em série alcoólica e a incubadas com a sonda a 37°C durante 16 horas. A detecção das sondas biotinizadas foi realizada com solução de avidina conjugada a FITC (fluoresceína-isotilcianato) e a contra-coloração cromossômica foi feita com iodeto de propídio em *antifade*.

3.7.2. Pintura cromossômica

Para pintura cromossômica, as sondas de *Mazama gouazoubira* utilizadas neste trabalho foram preparadas a partir de uma linhagem celular de um macho da espécie (com 2n=70 + 3B; NF=70) mantida pelo laboratório de Citogenética Molecular do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade de Cambridge, Inglaterra, coordenado pelo Dr. Malcolm A. Ferguson-Smith. O primeiro trabalho utilizando

sondas de *M. gouazoubira* foi o de Yang et. al. (1997a) no qual de 16 picos separados na citometria, 13 sondas cromossômicas foram utilizadas. Os cromossomos foram separados por citometria de fluxo seguindo a metodologia de Yang et al. (1995) e amplificados por DOP-PCR (*Degenerate oligonucleotide primer*) (FERGUSON-SMITH et al., 1998; TELENIUS et al. 1992). Para a realização deste trabalho foi realizada uma nova separação dos cromossomos no laboratório da Universidade de Cambridge e 30 picos foram isolados e enviados para o laboratório de citogenética do NUPECCE.

A marcação das sondas foi realizada através da incorporação de biotina-16-dUTP (Roche) também por DOP-PCR e a hibridização foi feita de acordo com Yang et al. (1995). As lâminas foram pepsinizadas por 2 minutos, desidratadas em série alcoólica, desnaturadas em formamida 70% / 2xSSC por 1 minuto, desidratadas novamente em série alcoólica e a incubação com a sonda foi a 37°C durante 24 horas para hibridizações espécie-específica e durante 72 horas para inter-específicas. A detecção das sondas biotiniladas foi realizada com Cy3 conjugado à avidina e a contra-coloração cromossômica foi feita com DAPI.

IV. RESULTADOS

Foram estabelecidos o complemento cromossômico (número diplóide e número fundamental) dos 23 animais analisados (Tabela 2).

Dos 15 animais cativos da espécie *M. gouazoubira* analisados, 13 exibiram o cariótipo padrão da espécie ($2n=70$, $NF=70$). As Figuras 4 e 5 ilustram os cariótipos padrão de fêmea e de macho da espécie, respectivamente, sob coloração de Giemsa.

As fêmeas Mg05 e Mg09 de *M. gouazoubira* apresentaram cariótipo variante devido à presença de um cromossomo autossômico submetacêntrico, produto de uma fusão Robertsoniana, resultando em um cariótipo com $2n=69$ e $NF=70$ (figura 06). Os cromossomos B não foram encontrados em todos os animais desta espécie, aparecendo somente em 03 fêmeas e 01 macho, com variação de 0 a 3 e morfologia acrocêntrica ou puntiforme.

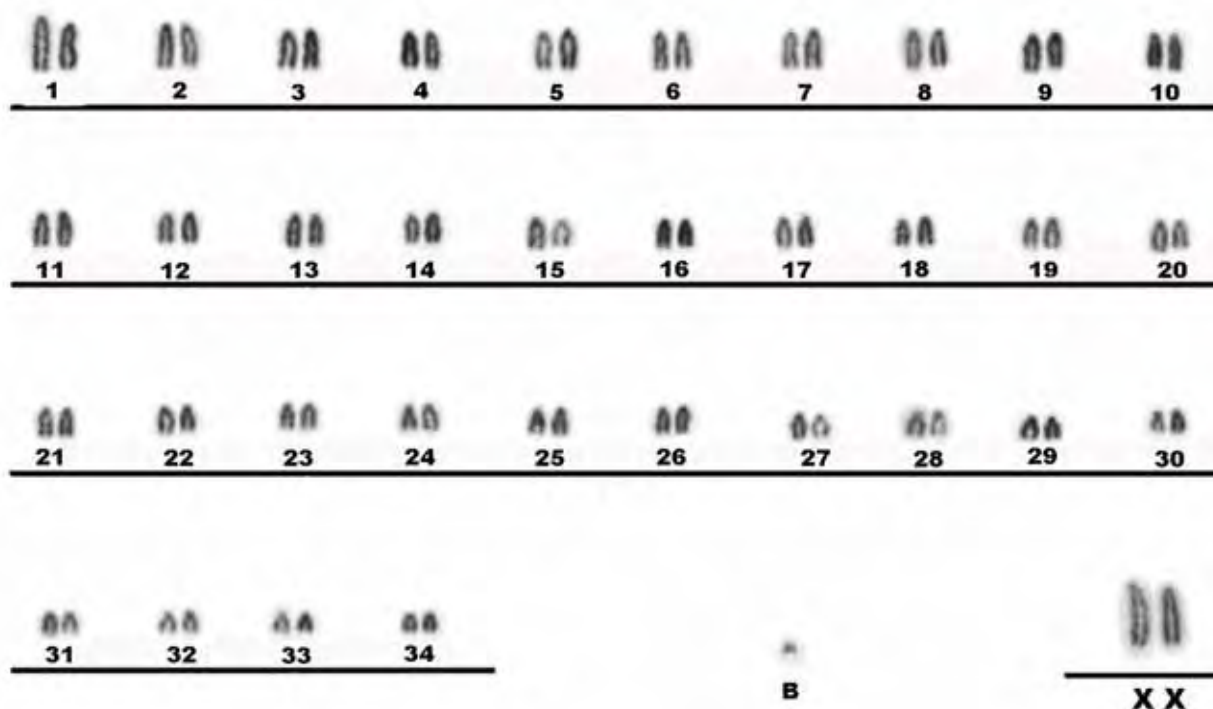


Figura 4: Cariótipo padrão de fêmea da espécie *Mazama gouazoubira* sob coloração convencional Giemsa, com $2n=70$; $NF=70 + 01 B$.

Tabela 2: Dados cariotípicos dos animais amostrados, onde Mg = *Mazama gouazoubira*; Mn = *Mazama nemorivaga*; M = macho; F = fêmea; 2n = número diplóide; NF = número fundamental, FR= presença de rearranjo do tipo fusão Robertsoniana, B = número de cromossomos B.

Identificação	Sexo	2n/ NF	Polimorfismo (FR ou B)
Mg01	F	2n=70, NF=70	-----
Mg02	F	2n=70, NF=70	-----
Mg03	F	2n=70, NF=70	0 a 3 B
Mg04	F	2n=70, NF=70	
Mg05	F	2n=69, NF=70	FR
Mg06	F	2n=70, NF=70	-----
Mg07	F	2n=70, NF=70	-----
Mg08	F	2n=70, NF=70	0 a 2 B
Mg09	F	2n=69, NF=70	FR
Mg10	F	2n=70, NF=70	0 a 3 B
Mg11	F	2n=70, NF=70	-----
Mg12	M	2n=70, NF=70	-----
Mg13	F	2n=70, NF=70	-----
Mg14	M	2n=70, NF=70	0 a 3 B
Mg15	F	2n=70, NF=70	-----
Mn01	F	2n=68, NF=70	2 a 4 B
Mn02	M	2n=69, NF=70	2 a 6 B
Mn03	M	2n=67, NF=70	FR, 2 a 6 B
Mn04	F	2n=69, NF=72	FR, 4 a 5 B
Mn05	F	2n=69, NF=72	FR, 4 a 6 B
Mn06	F	2n=68, NF=70	4 a 6 B
Mn07	F	2n=68, NF=70	4 a 6 B
Mn08	M	2n=69, NF=70	2 a 4 B

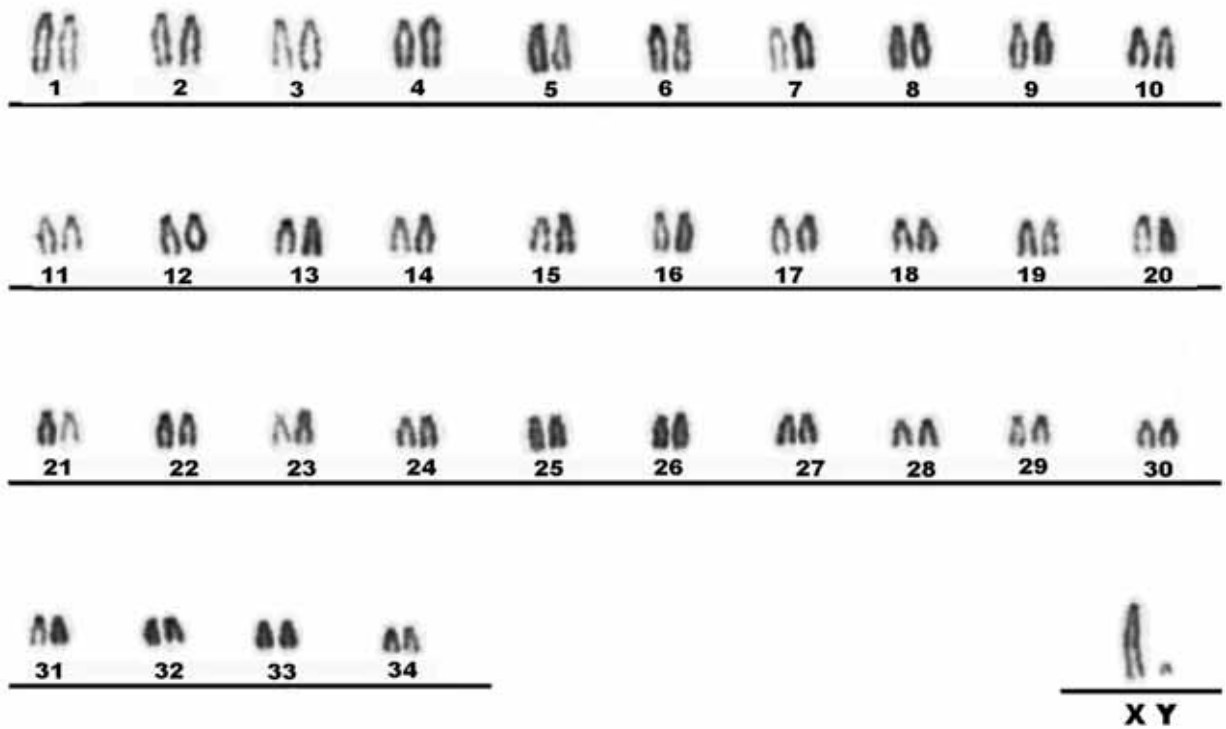


Figura 5: Cariótipo padrão de macho da espécie *Mazama gouazoubira* sob coloração convencional Giemsa, com $2n=70$; $NF=70$.

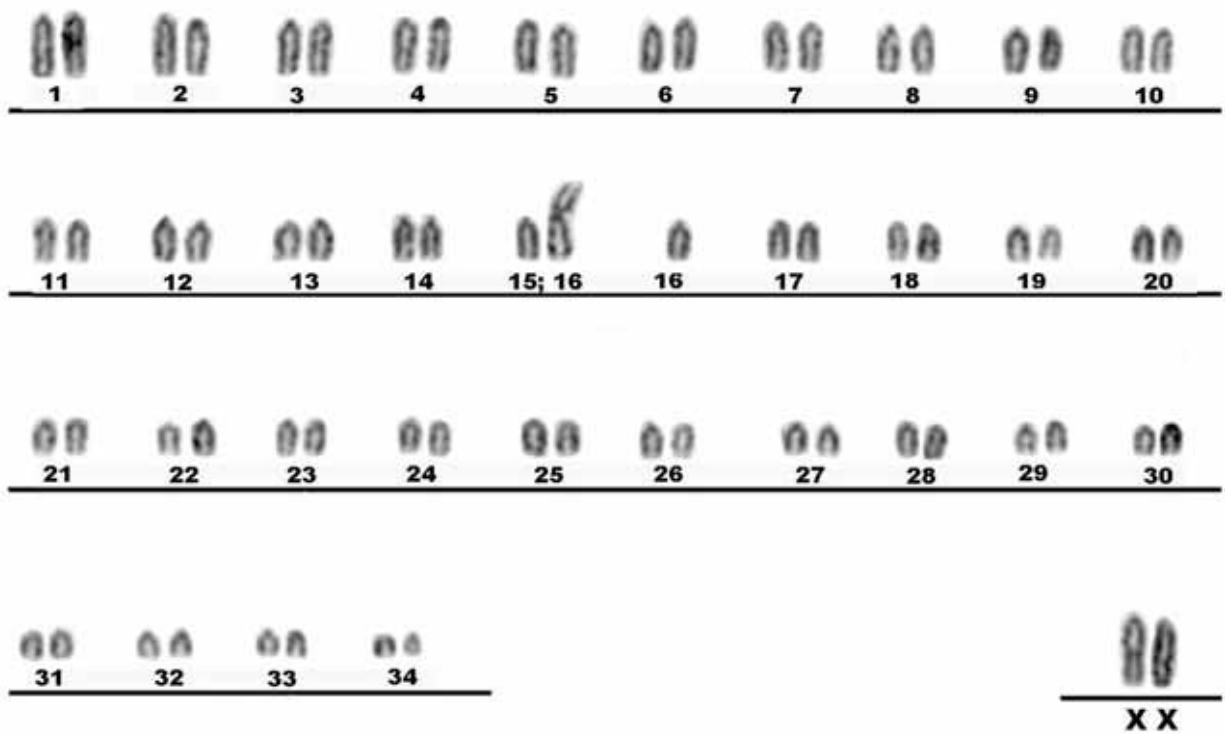


Figura 6: Cariótipo representativo das fêmeas Mg05 e Mg09 portadoras de translocação, sob coloração convencional Giemsa, com $2n=69$; $NF=70$.

O número diplóide encontrado para os animais da espécie *M. nemorivaga* variou de 67 a 69. As fêmeas Mn01, Mn06 e Mn07 apresentaram $2n=68$ e $NF=70$, enquanto as fêmeas Mn04 e Mn05 apresentaram $2n=69$ e $NF=72$. As Figuras 7 e 8 ilustram os cariótipos padrões de fêmea ($2n=68$) e macho ($2n=69$) da espécie *M. nemorivaga* sob coloração convencional de Giemsa. Os machos Mn02 e Mn08 apresentaram $2n=69$ e o macho Mn03 apresentou $2n=67$ com número fundamental constante ($NF=70$).

Além disto, no macho Mn03 foi encontrado um par autossômico de morfologia submetacêntrica originado a partir de uma fusão cêntrica (Figura 9). As fêmeas Mn04 e Mn05 apresentaram um cromossomo autossômico submetacêntrico devido à fusão centromérica entre dois cromossomos autossômicos acrocêntricos (Figura 10). Os cromossomos B apareceram nos oito animais, variando de 2 a 6 com morfologia acrocêntrica ou puntiforme, semelhante aos encontrados em *M. gouazoubira*.

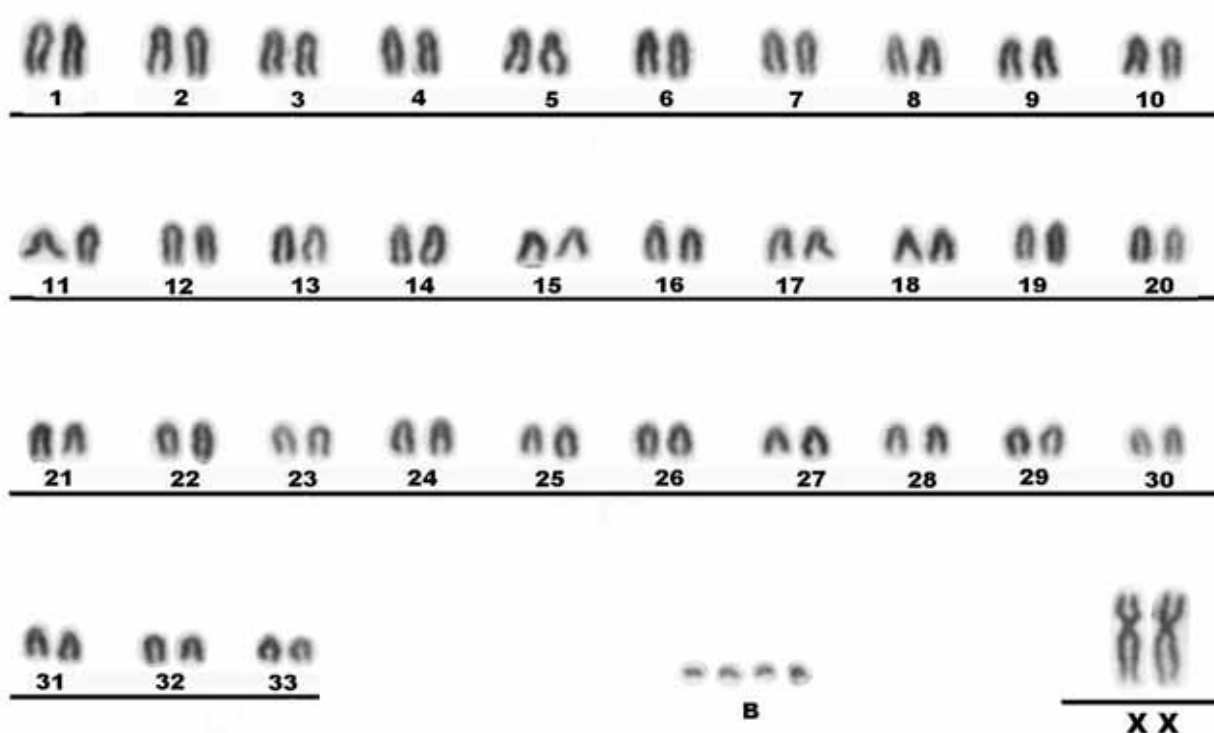


Figura 7: Cariótipo padrão de fêmea da espécie *Mazama nemorivaga* sob coloração convencional Giemsa, com $2n=68$; $NF=70 + 04 B$.

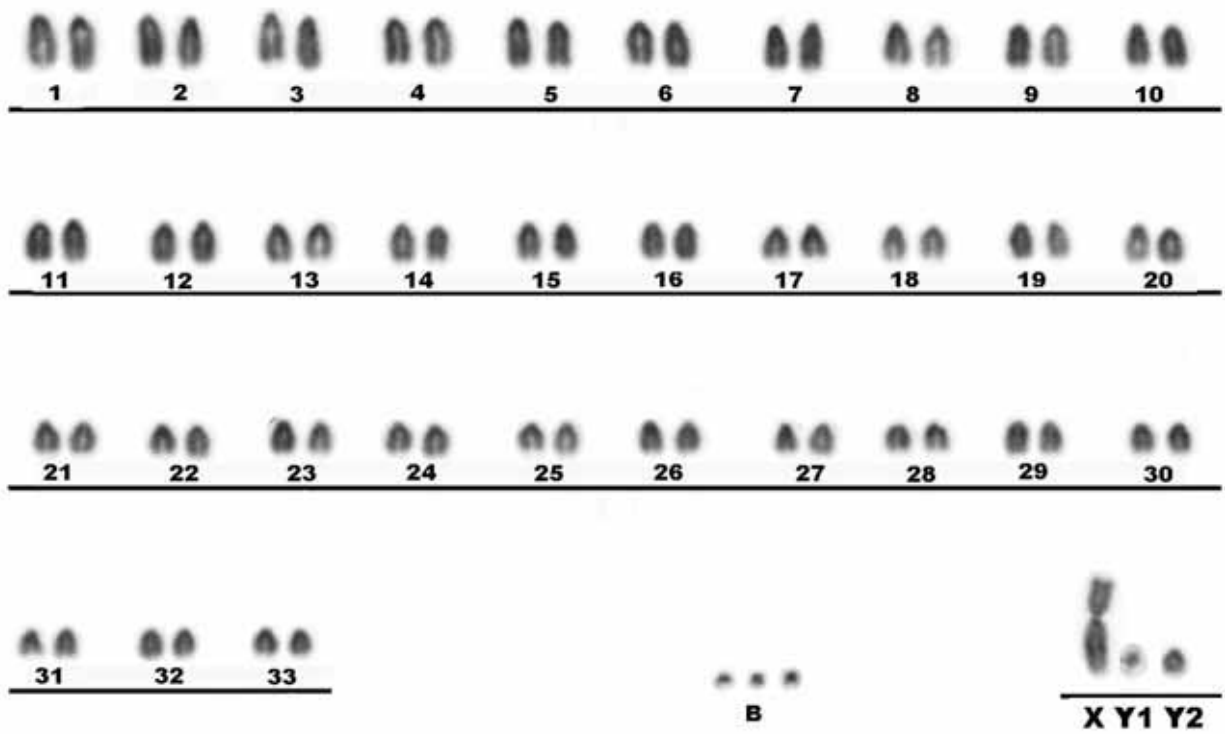


Figura 8: Cariótipo padrão de macho da espécie *Mazama nemorivaga* sob coloração convencional Giemsa, com $2n=69$; $NF=70 + 03 B$.

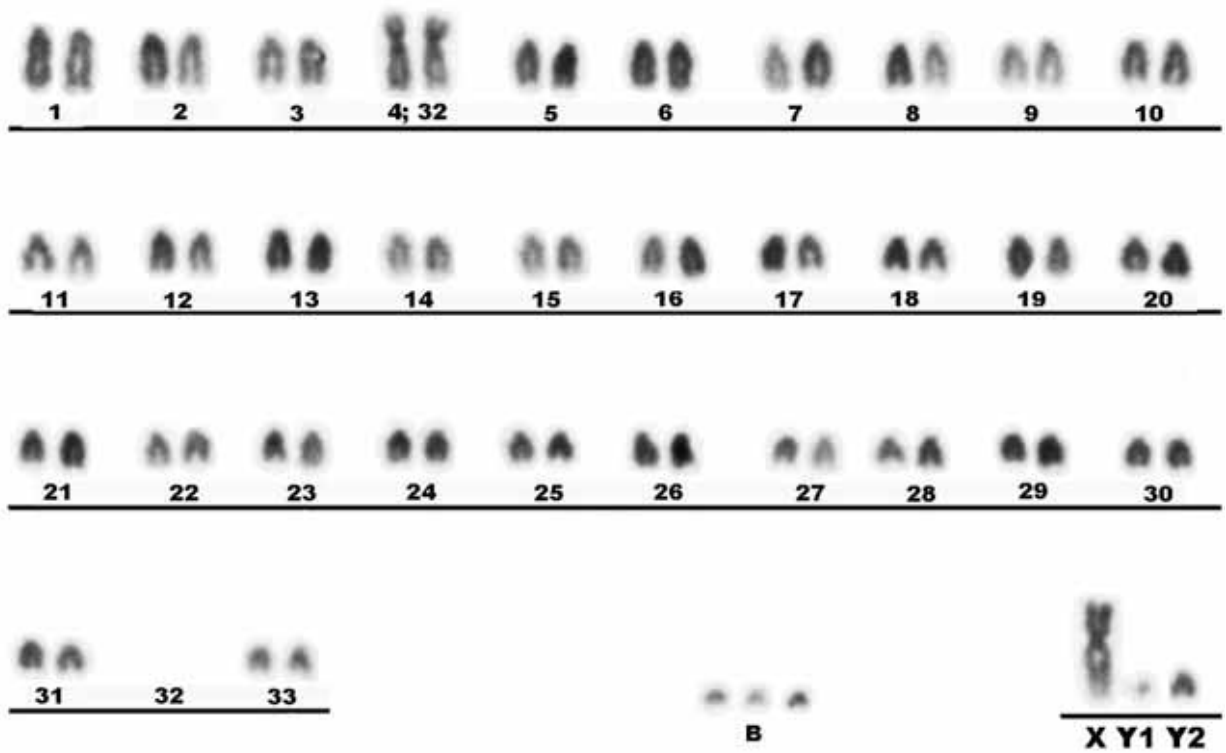


Figura 9: Cariótipo variante do macho Mn03 da espécie *Mazama nemorivaga* portador de translocação, sob coloração convencional Giemsa, com $2n=67$; $NF=70 + 03 B$.

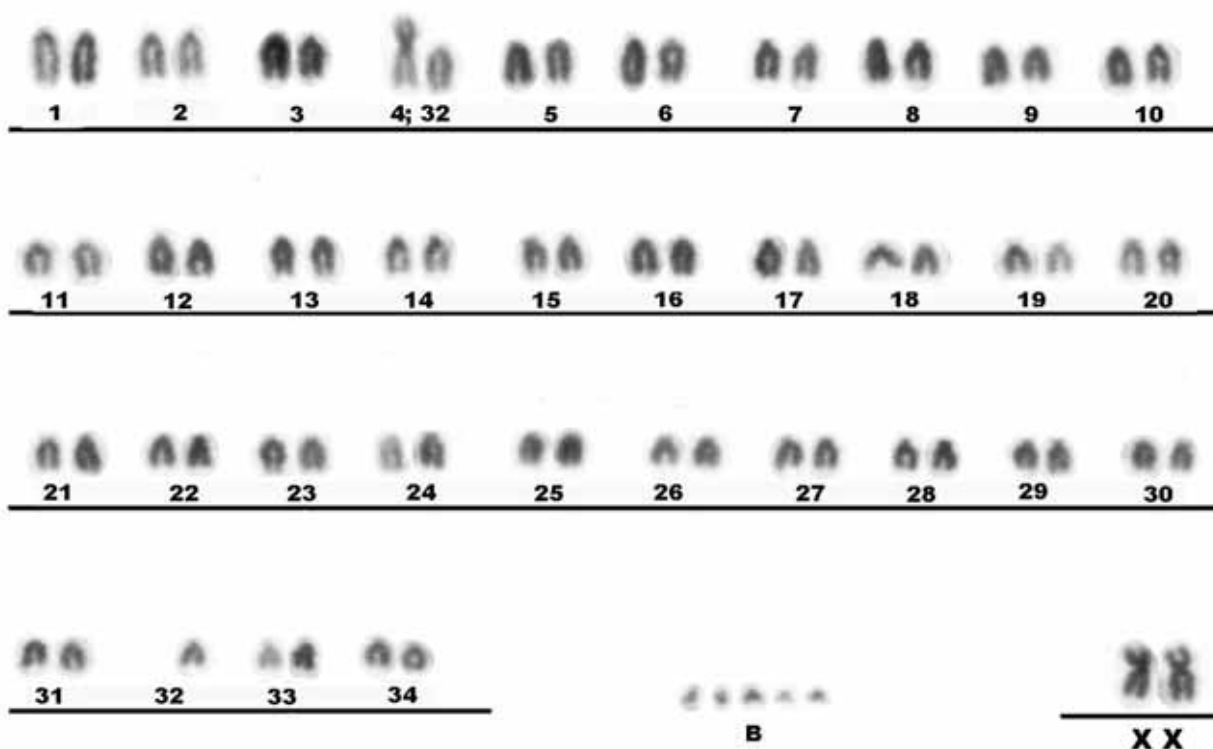


Figura 10: Cariótipo variante das fêmeas Mn04 e Mn5 da espécie *Mazama nemorivaga* portadoras de translocação, sob coloração convencional Giemsa, com $2n=69$; $NF=72 + 05 B$.

4.1. Bandamentos

4.1.1. Banda G

Através do bandamento G foi possível identificar quais cromossomos estão envolvidos nas translocações que ocorreram nas fêmeas Mg05 e Mg09 da espécie *M. gouazoubira*, bem como no macho Mn03 e nas fêmeas Mn04 e Mn05 da espécie *M. nemorivaga*.

A figura 11 ilustra o cariótipo padrão de uma fêmea da espécie *M. gouazoubira* sob bandamento G. A comparação dos cariótipos das duas fêmeas de *M. gouazoubira* que possuem cariótipos variantes com o cariótipo padrão da espécie,

mostrou que em ambas os cromossomos envolvidos nos rearranjos do tipo fusão cêntrica são o 15 e 16 do cariótipo padrão. (Figura 12).

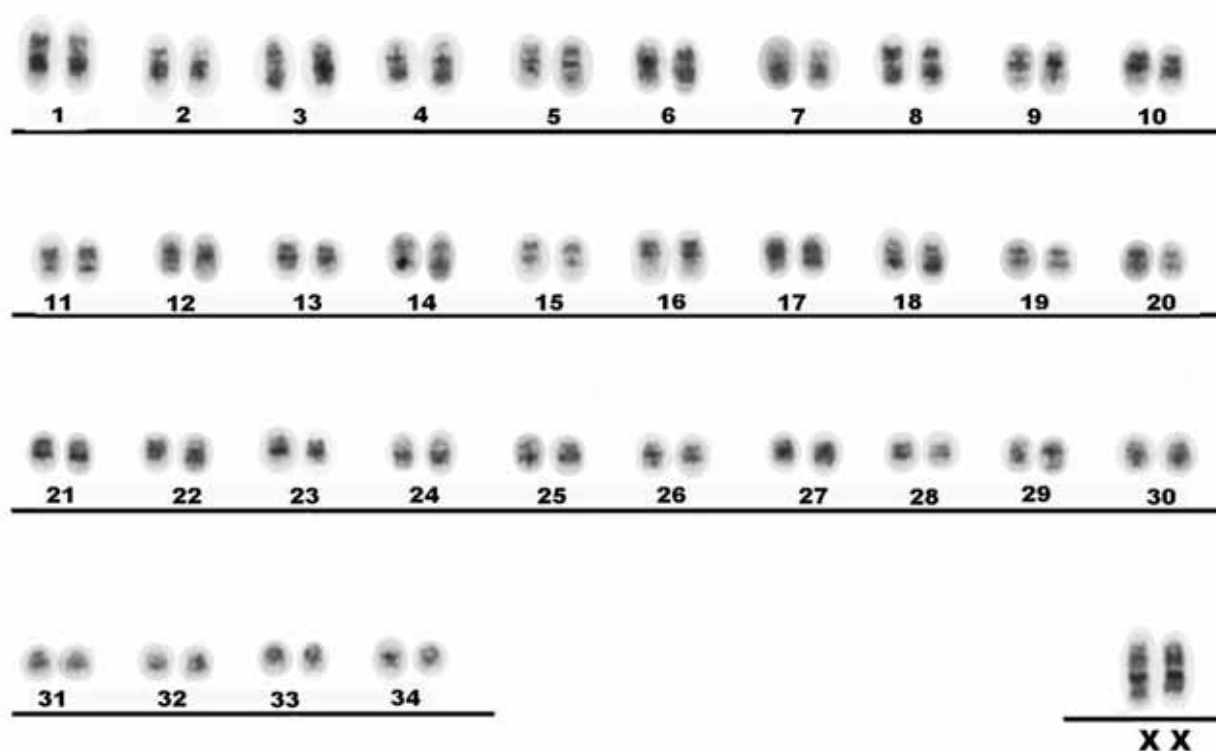


Figura 11: Cariótipo de fêmea da espécie *Mazama gouazoubira* sob bandamento G. com $2n=70$; $NF=70$.

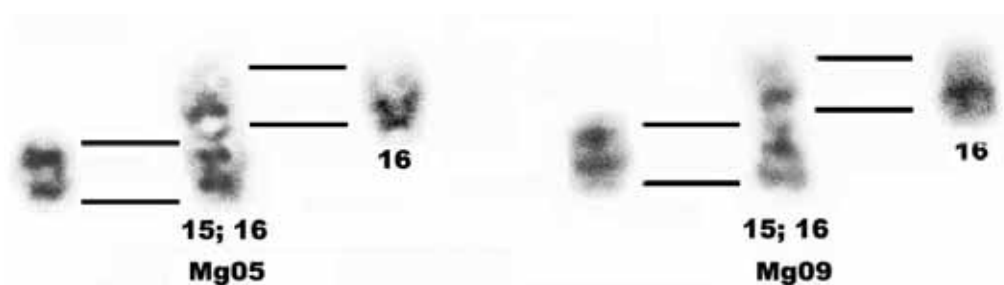


Figura 12: Cromossomos das fêmeas Mg05 e Mg09 envolvidos na fusão cêntrica sob bandamento G.

O bandamento G permitiu identificar na espécie *M. nemorivaga* que os cromossomos 4 e 32 do cariótipo padrão, são os envolvidos na fusão cêntrica presente no macho Mn03 e nas fêmeas Mn04 e Mn05. As figuras 13 e 14 ilustram os cariótipos de uma fêmea e macho da espécie *M. nemorivaga* sob bandamento G e a figura 15 ilustra os cromossomos envolvidos na fusão cêntrica.

O cromossomo sem par observado nos machos de *M. nemorivaga* mostrou homologia com a metade distal do braço “q” do cromossomo X, confirmando a fusão X-autossômica. Este cromossomo corresponde ao 34 (menor do lote de autossomos) da espécie *M. gouazoubira*. (Figura 16).

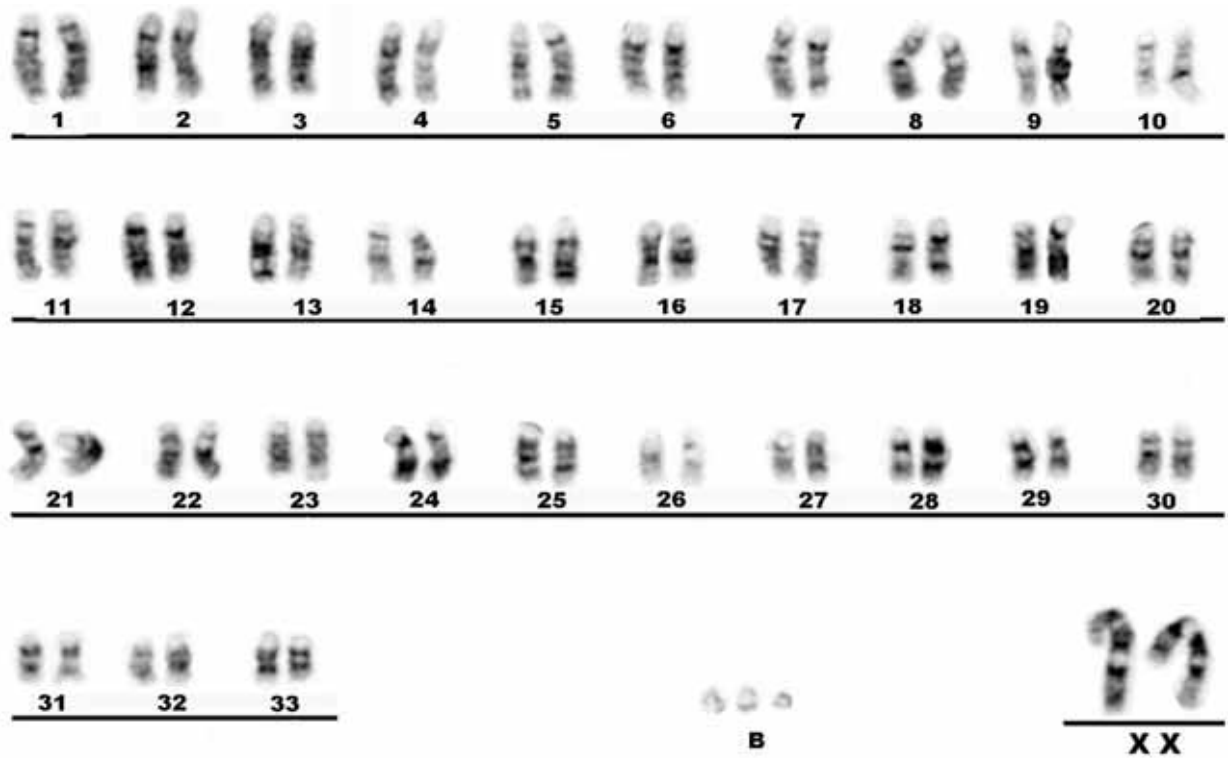


Figura 13: Cariótipo de fêmea da espécie *Mazama nemorivaga* sob bandamento G, com $2n=68$; $NF=70 + 03 B$.

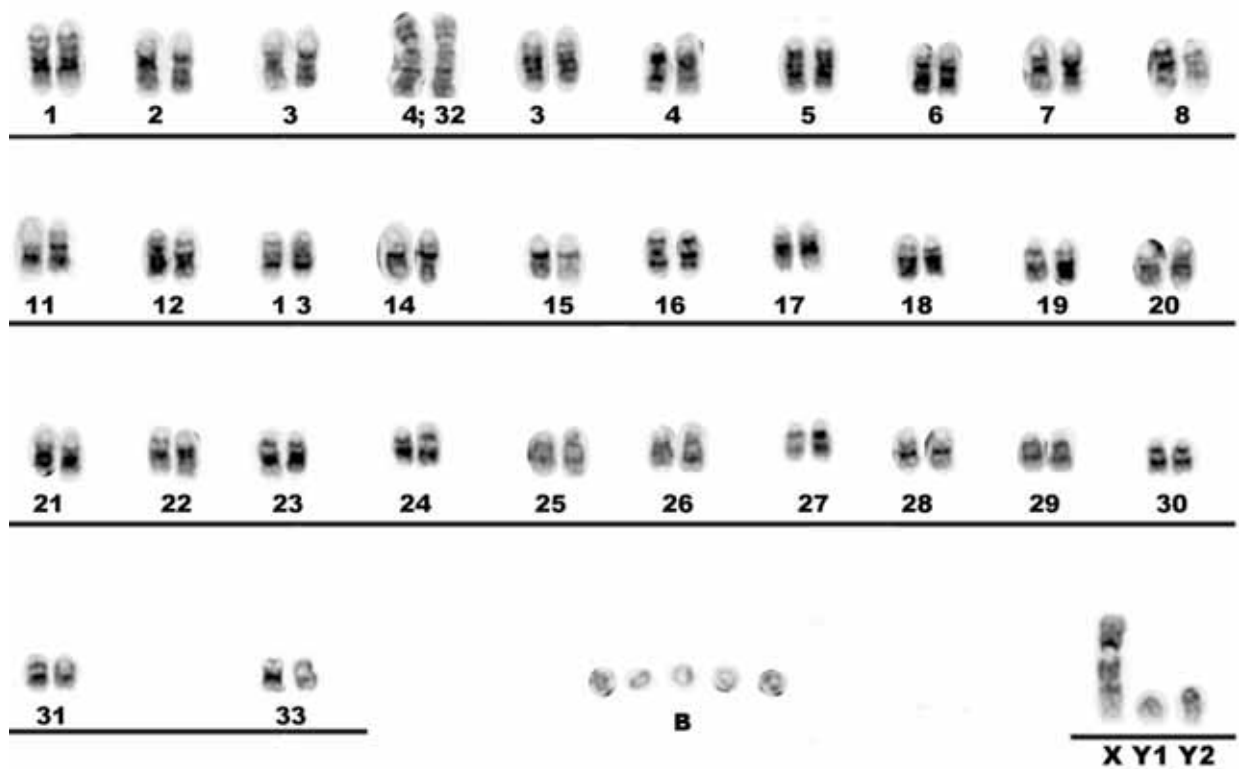


Figura 14: Cariótipo de macho da espécie *Mazama nemorivaga* sob bandamento G, com $2n=67$; $NF=70 + 05 B$.

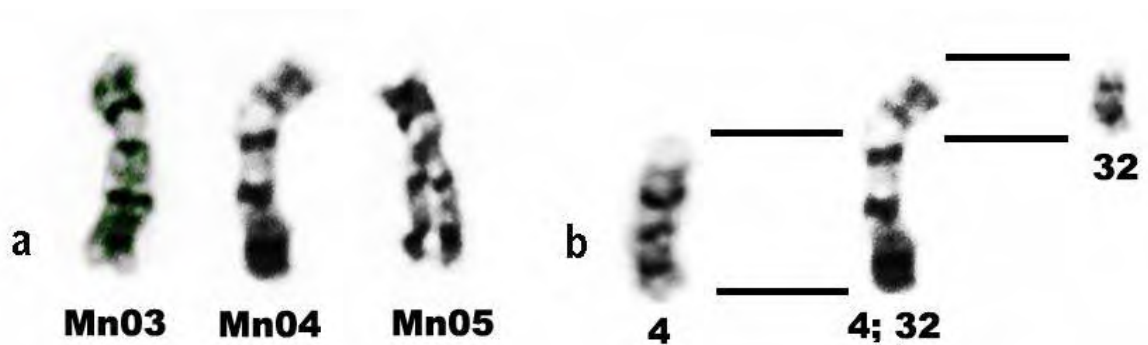


Figura 15: Cromossomos submetacêntricos oriundos de fusão cêntrica nos animais variantes da espécie *M. nemorivaga*. (a). Cromossomos rearranjados do macho Mn03 e das fêmeas Mn04 e Mn05 sob bandamento G. (b). Homologia entre os acrocêntricos do cariótipo padrão de *M. nemorivaga* (pares 4 e 32) com o cromossomo rearranjado dos cariótipos padrões.



Figura 16: Regiões homólogas entre X e Y2 de *Mazama nemorivaga* sob bandamento G, evidenciando o a fusão X-autossômica.

4.1.2. Banda C

Os animais da espécie *M. gouazoubira* apresentaram regiões ricas em heterocromatina constitutiva pericentromérica em todos os cromossomos autossômicos. As figuras 17 e 18 ilustram os kariótipos padrões de uma fêmea e de um macho *M. gouazoubira* sob bandamento C. Nas fêmeas portadoras de translocação (Mg05 e Mg09) nota-se um grande bloco heterocromático na região centromérica dos cromossomos autossômicos fusionados (Figura 19). Em relação aos cromossomos sexuais, o X mostrou-se heterocromático na região centromérica, enquanto o Y mostrou-se eucromático. Os cromossomos B apresentaram-se heterocromático.

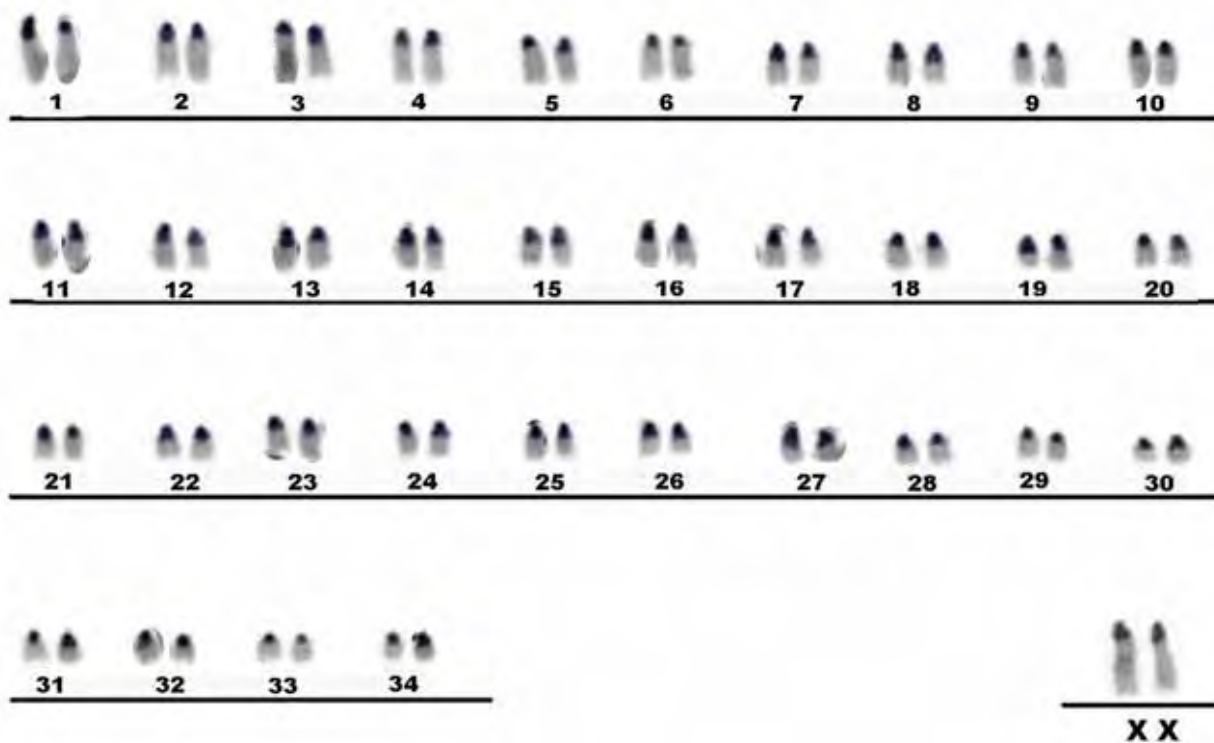


Figura 17: Cariótipo padrão de fêmea da espécie *Mazama gouazoubira* sob bandamento C, com $2n=70$; $NF=70$.

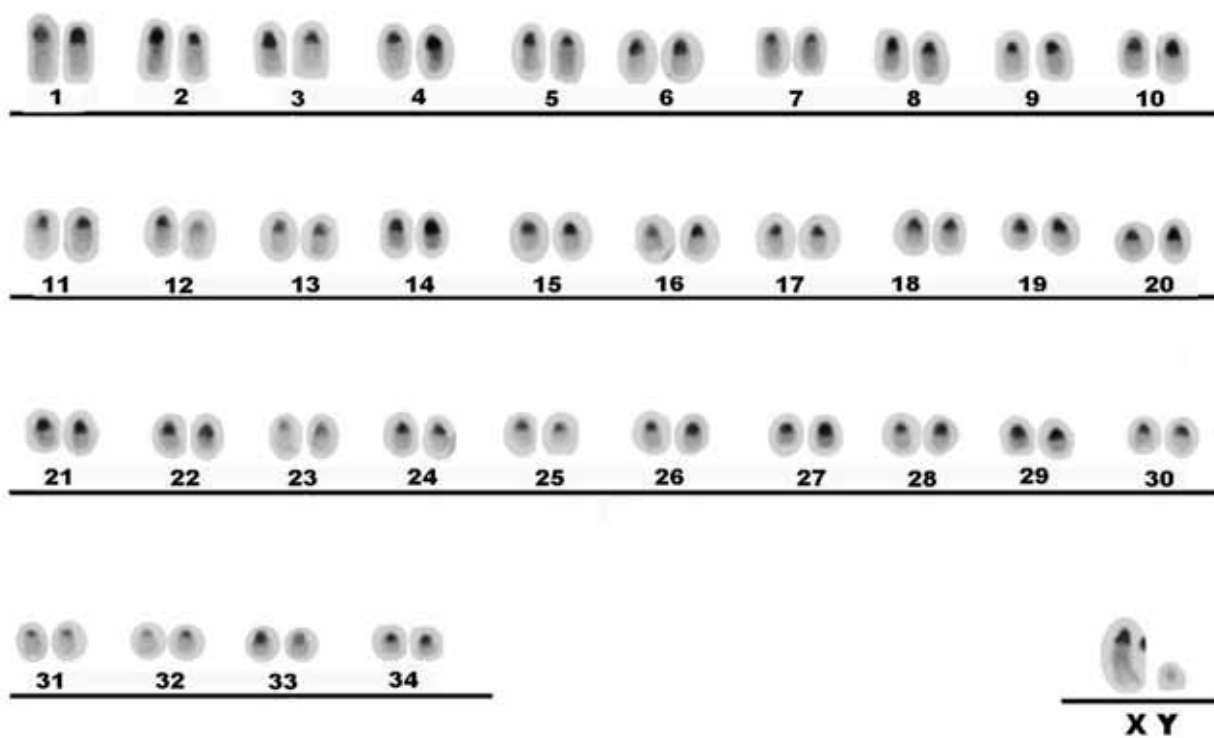


Figura 18: Cariótipo padrão de macho da espécie *Mazama gouazoubira* sob bandamento C, com $2n=70$; $NF=70$.

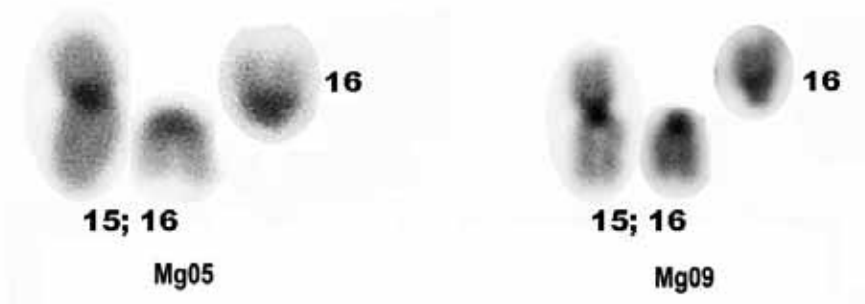


Figura 19: Cromossomos das fêmeas Mg05 e Mg09 envolvidos na translocação, sob bandamento C, respectivamente.

Na espécie *M. nemorivaga* também foram encontradas marcações de heterocromatina na região centromérica de todos os cromossomos autossômicos (Figura 20). Nos animais portadores de translocação (Mn03, Mn04 e Mn05), também foram observados grandes blocos heterocromáticos na região centromérica dos cromossomos autossômicos fusionados (Figura 21). Os cromossomos B dos animais analisados desta espécie são heterocromáticos

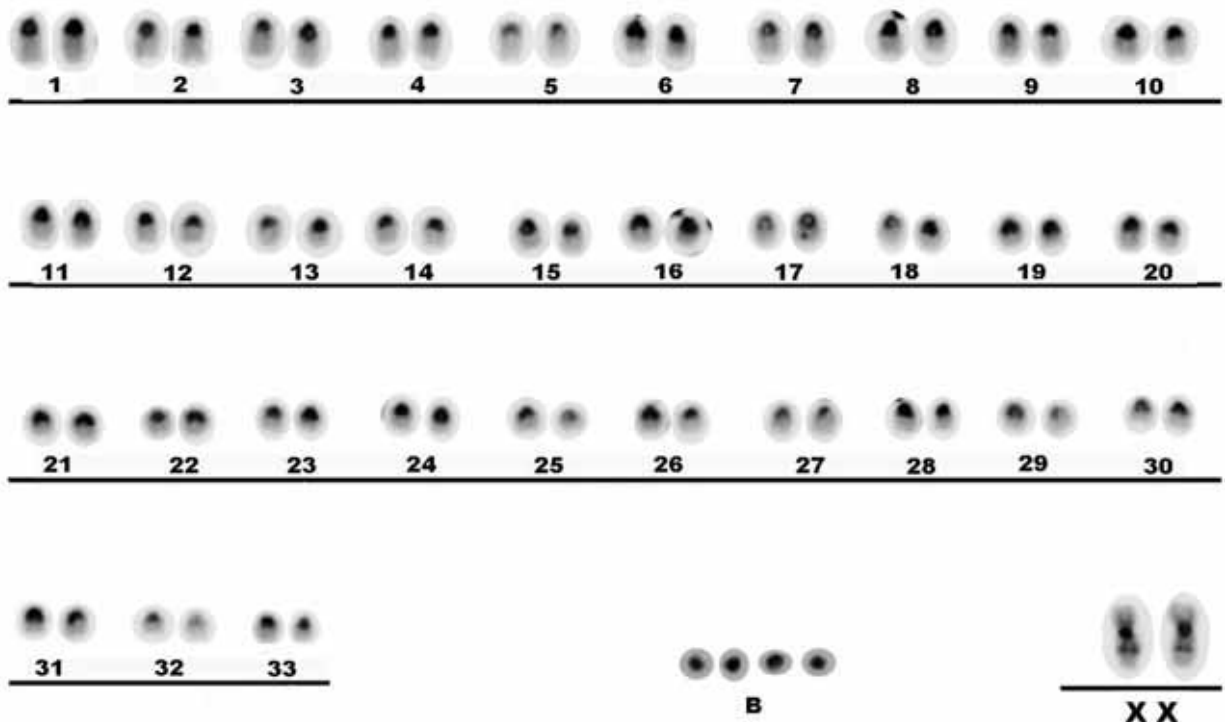


Figura 20: Cariótipo padrão de fêmea da espécie *Mazama nemorivaga* sob bandamento C, com $2n=68$; $NF=70 +04 B$.

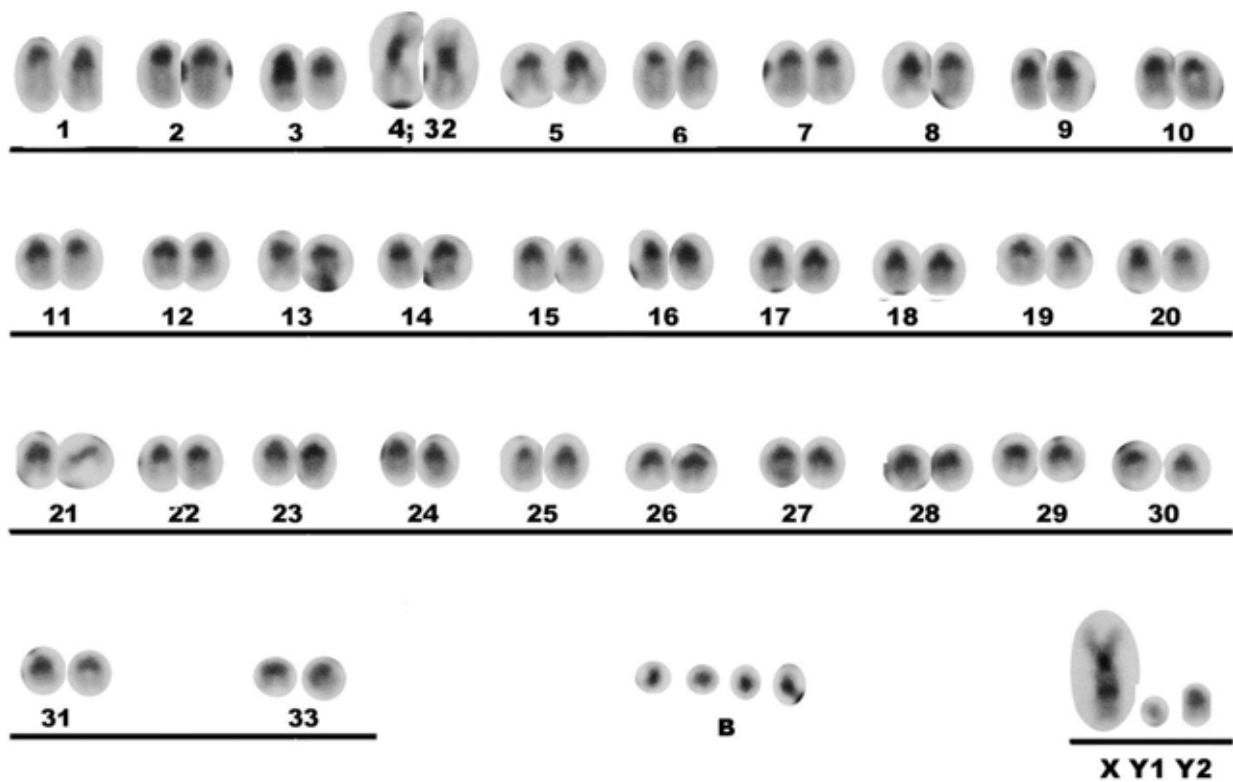


Figura 21: Cariótipo do macho Mn03 da espécie *Mazama nemorivaga* portador de translocação (4; 32) sob bandamento C, com $2n=67$; $NF=70$ e 04 cromossomos B.

O cromossomo X desta espécie apresentou um bloco heterocromático na região centromérica e banda intersticial na metade do braço q, enquanto o cromossomo Y se apresentou eucromático (Figura 22).

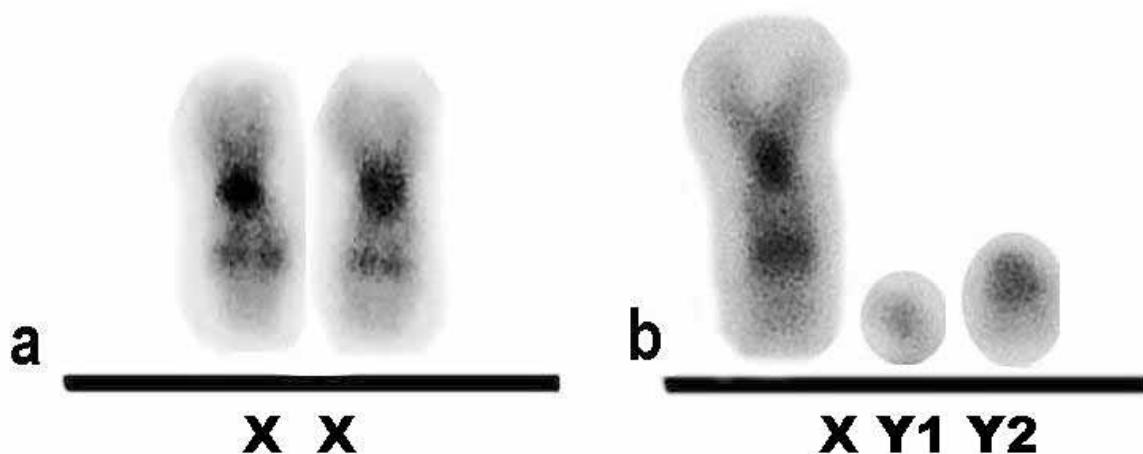


Figura 22: Cromossomos sexuais (a) de fêmea e (b) macho da espécie *Mazama nemorivaga*, sob bandamento C, evidenciando marca intersticial na metade distal do braço "q" do cromossomo X.

4.1.3. Coloração Ag-RON

Através desta coloração pode-se notar que as regiões organizadoras nucleolares ativas encontram-se na região terminal dos dois maiores pares de cromossomos autossômicos, em ambas as espécies. As figuras 23 e 24 ilustram os cariótipos de uma fêmea de *M. gouazoubira* e uma fêmea de *M. nemorivaga*, respectivamente.

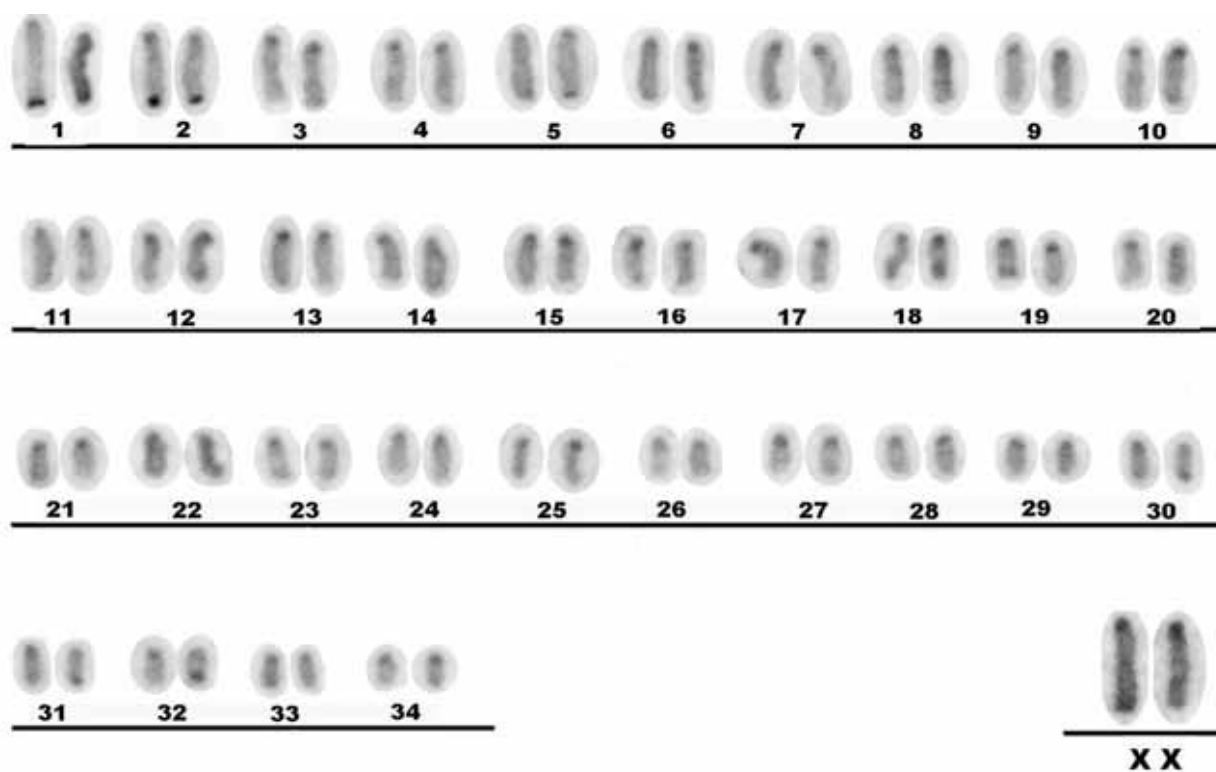


Figura 23: Cariótipos de fêmea de *Mazama gouazoubira* sob coloração Ag-Ron, com $2n=70$; $NF=70$.

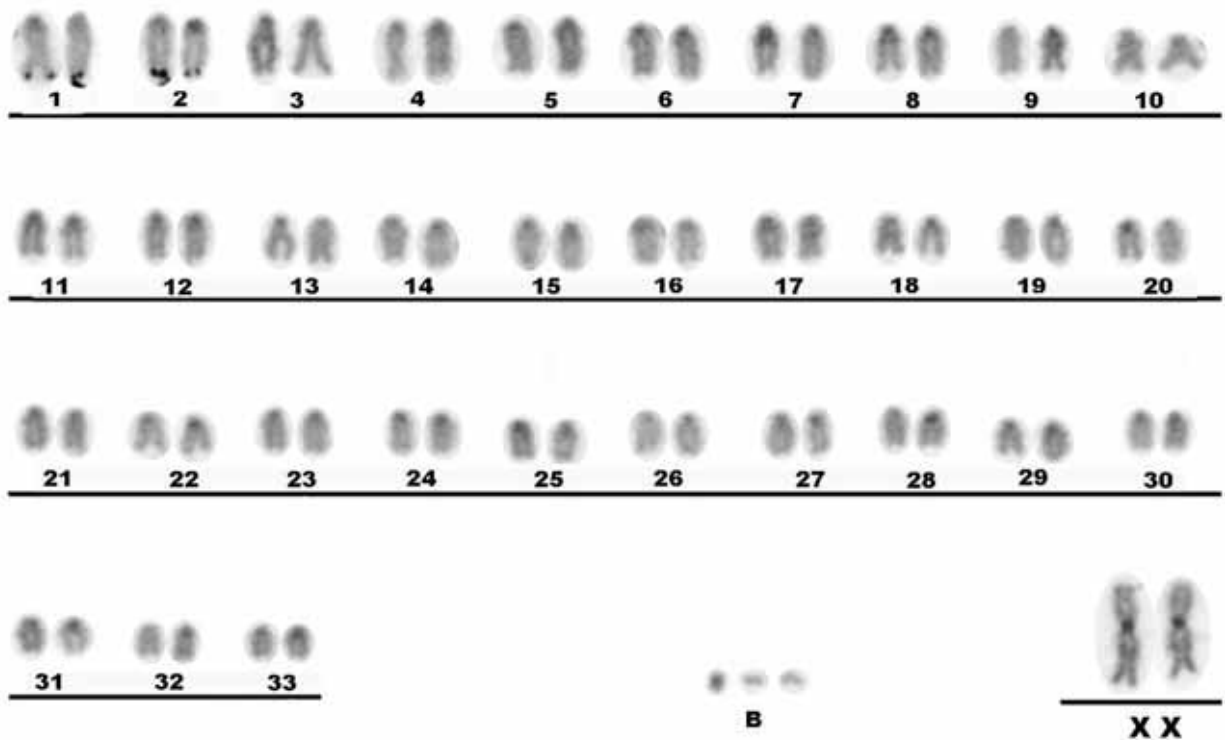


Figura 24: Cariótipo de fêmea de *Mazama nemorivaga* sob coloração Ag-RON, com $2n=68$, $NF=70 + 03 B$.

4.1.4. FISH telomérica

Todos os cromossomos autossômicos (acrocêntricos e submetacêntricos) mostraram sinais teloméricos nas extremidades cromossômicas em ambas as espécies. Os cromossomos B de ambas as espécies apresentaram sinal de hibridização com a sonda telomérica, mas, na espécie *M. nemorivaga* o sinal foi mais intenso. As figuras 25 e 26 ilustram metáfases de *M. gouazoubira* e *M. nemorivaga*, respectivamente, com hibridização *in situ* fluorescente de sondas teloméricas. Nas duas espécies analisadas, o cromossomo X apresentou além do sinal telomérico nas extremidades, uma marcação telomérica intersticial na região mediana do braço longo. A figura 27 a e b ilustram os cromossomos sexuais de *M. gouazoubira* e *M. nemorivaga*, respectivamente, com sinal telomérico intersticial (STI) no cromossomo X e marcação telomérica.

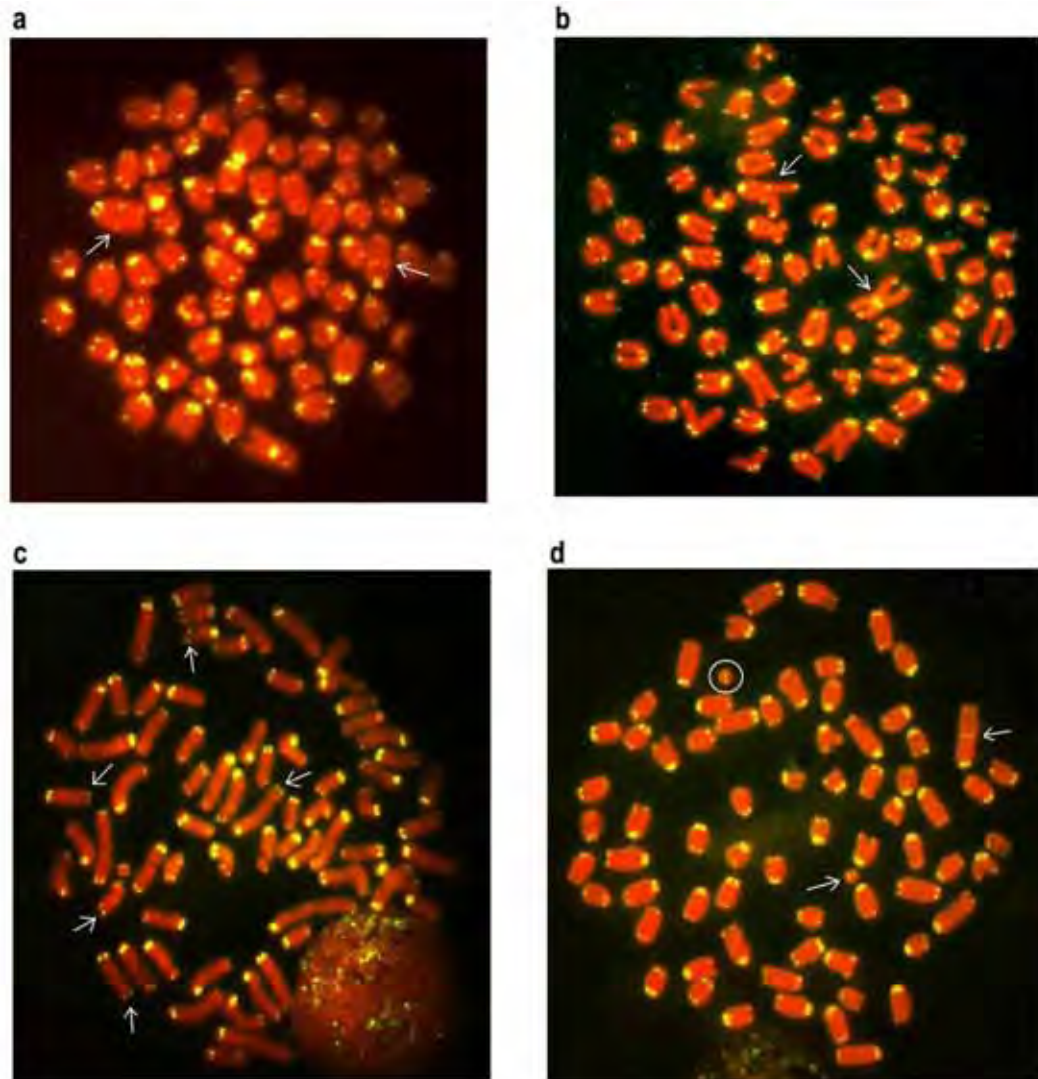


Figura 25: Hibridização *in situ* telomérica em *Mazama gouazoubira*. (a) Metáfase de fêmea ($2n=69$; $NF=70$) evidenciando através das setas os cromossomos X com sinal telomérico intersticial; (b) Metáfase de fêmea com $2n=69$; $NF=70$, setas apontam o cromossomo fusionado e o cromossomo X acrocêntrico com STI. (c) Metáfase de macho com $2n=70$; $NF=70$, setas apontam alguns sítios teloméricos. (d) Metáfase de macho ($2n=70$; $NF=70 + 01 B$) evidenciando através das setas os cromossomos sexuais com marcação telomérica e o círculo o cromossomo B.

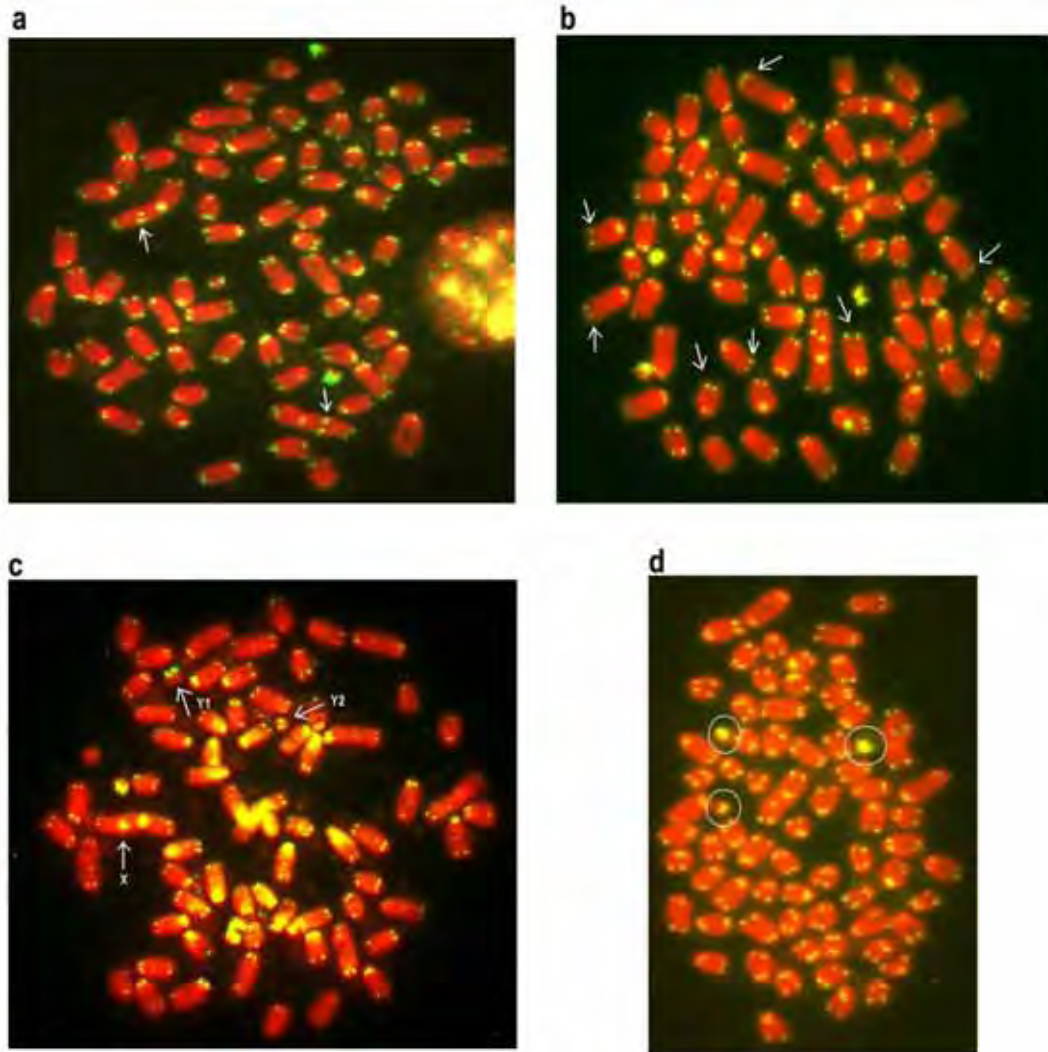


Figura 26: Hibridização *in situ* telomérica em *Mazama.nemorivaga*. (a) Metáfase de fêmea ($2n=68$; $NF=70 + 03 B$) evidenciando através das setas os cromossomos X com sinal telomérico intersticial; (b) Metáfase de fêmea com $2n=68$; $NF=70 + 04 B$, setas apontam alguns sinais teloméricos. (c) Metáfase de macho com $2n=67$; $NF=70 + 03 B$, setas apontam os cromossomos sexuais (XY1Y2). (d) Metáfase de fêmea com $2n=70$; $NF=70 + 03 B$, círculos evidenciam os cromossomos B com sinal telomérico.

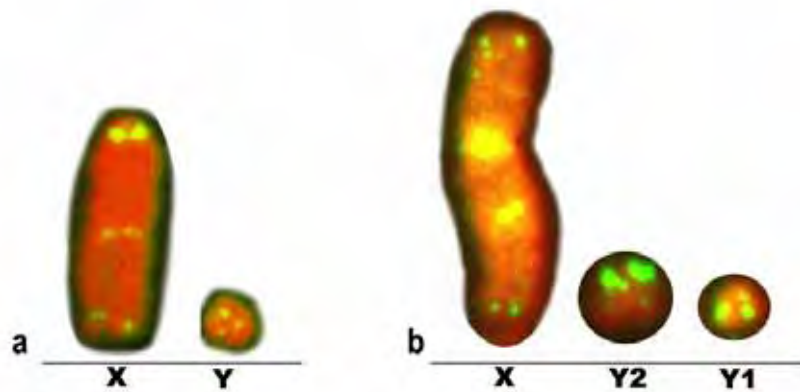


Figura 27. Identificação dos sítios teloméricos nos cromossomos sexuais de (a) *Mazama gouazoubira* e (b) *Mazama nemorivaga*, respectivamente.

4.1.5 Pintura cromossômica

A hibridização da sonda do cromossomo X de *M. gouazoubira* em *M. gouazoubira* (espécie-específica) teve correspondência total com o cromossomo (Figura 28). A hibridização da sonda do cromossomo X de *M. gouazoubira* nos cromossomos de *M. nemorivaga* (inter-específica) corroborou com os resultados apresentados pelas outras técnicas. A sonda teve correspondência com o braço curto do X de *M. nemorivaga* em sua totalidade e com a metade proximal do braço longo. A metade distal do cromossomo X que não apresentou sinal de hibridização corresponde ao acrocêntrico que sofreu uma fusão em tandem com o X (Figura 29).

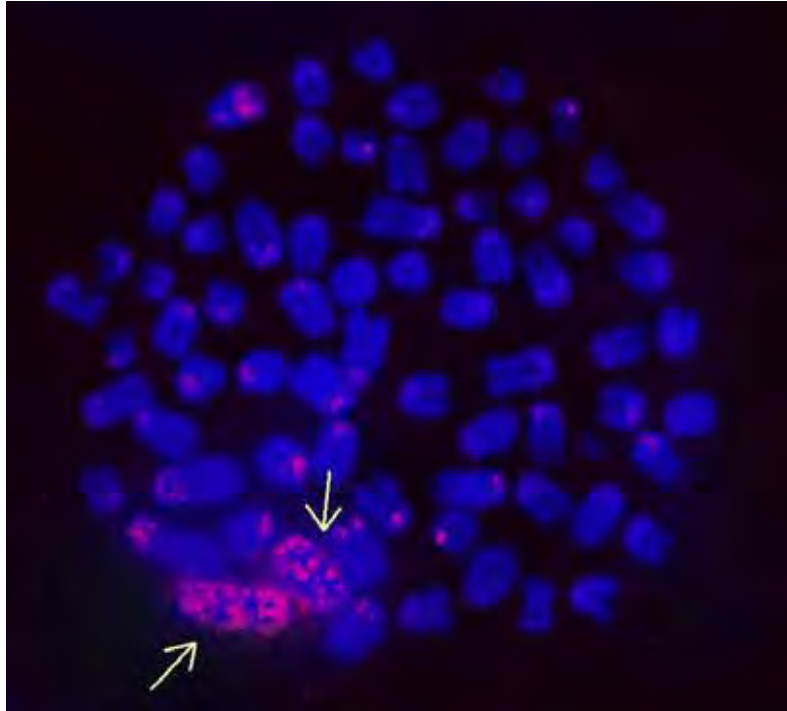


Figura 28. Hibridização *in situ* da sonda do cromossomo X de *M. gouazoubira* em metáfases de *M. gouazoubira* com contracoloração com DAPI e marcação em vermelho (Cy3).

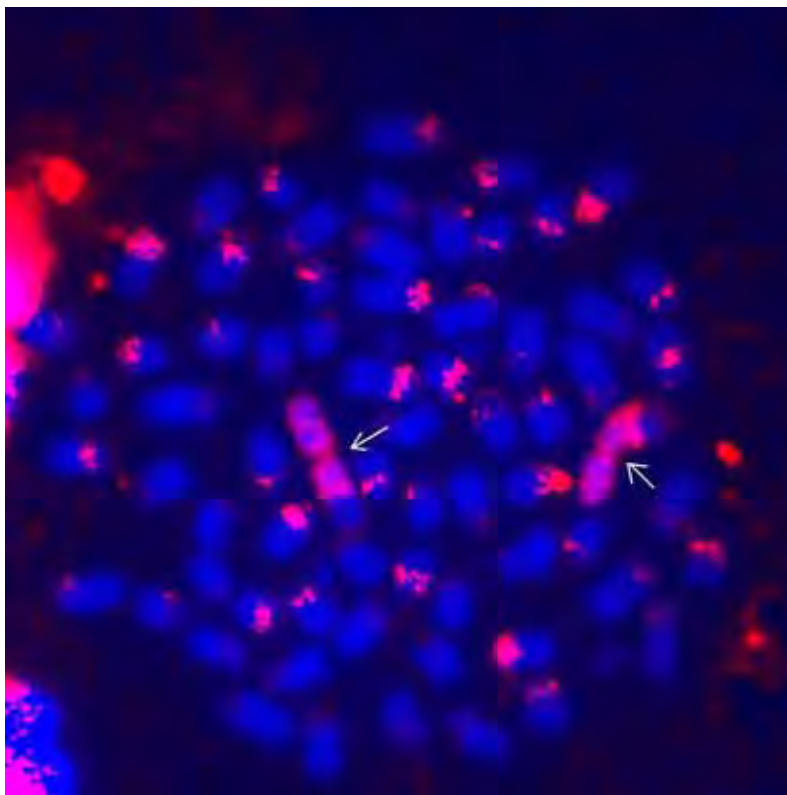


Figura 29. Hibridização *in situ* da sonda do cromossomo X de *M. gouazoubira* em metáfases de *M. nemorivaga* com contracoloração com DAPI e marcação em vermelho (Cy3).

V. DISCUSSÃO

Os estudos cariotípicos em associação com estudos morfológicos auxiliam na classificação e diferenciação das espécies. Entretanto, até hoje as informações quanto à classificação, distribuição e biologia das espécies *Mazama gouazoubira* e *Mazama nemorivaga* são desconhecidas e controversas. Este é, portanto, o primeiro estudo comparativo entre estas espécies na tentativa de ampliar o entendimento dos eventos cromossômicos que as diferenciaram.

Dos 15 animais da espécie *M. gouazoubira* analisados neste trabalho, 13 apresentaram cariótipo padrão ($2n=70$, $NF=70$) e 02 animais foram variantes, devido à ocorrência de rearranjo cromossômico Robertsoniano que originou um cromossomo autossômico submetacêntrico. Os rearranjos Robertsonianos alteram o número diplóide, mas não alteram o número de braços cromossômicos (NF) do cariótipo (YOSIDA, 1983). As espécies do gênero *Mazama* possuem uma ampla variabilidade cromossômica, devido à ocorrência de rearranjos cromossômicos que propiciaram o processo de especiação (VARGAS-MUNAR, 2003). Duarte (1992) já havia relatado que a ocorrência de translocações é comum para esta espécie.

Na espécie *M. nemorivaga* foi encontrada uma variação de $2n=67$ a 69 e $NF=70$ a 72 , igual à encontrada por Duarte em 1998. Dos 08 animais analisados, 03 apresentaram cariótipo polimórfico, também devido à ocorrência de rearranjos Robertsonianos, do tipo fusão cêntrica entre dois acrocêntricos.

Através do bandamento G foi possível identificar que os cromossomos envolvidos na fusão cêntrica em *M. gouazoubira* eram o 15 e 16 nos dois animais variantes, todos na condição heterozigota. Na espécie *M. nemorivaga* a comparação pelo bandamento G mostrou que 3 animais polimórficos apresentavam os cromossomos 4 e 32 envolvidos na fusão cêntrica, sendo que 2 deles apresentaram a fusão na condição heterozigota e somente o animal Mn03 apresentou fusão cêntrica em homozigose, ou seja, cada cromossomo do par 4 se fusionou a um cromossomo do par 32, deixando o cariótipo deste animal com 2 cromossomos autossômicos submetacêntricos.

Também, foi possível estabelecer uma homologia entre o cromossomo sem par (correspondente ao 34, menor do lote de autossomos da espécie *M. gouazoubira*) presente no cariótipo dos machos de *M. nemorivaga* com a metade distal do braço q do cromossomo X, corroborando os resultados descritos por FERRETO (2010).

Os cromossomos B ou supranumerários, foram encontrados em cinco animais da espécie *M. gouazoubira* com variação de 0 a 03 e, nos animais da espécie *M. nemorivaga* eles apareceram variando de 02 a 06. Esses cromossomos também são encontrados nos *Mazama* vermelhos: *M. nana* (1 a 6 B) (ABRIL & DUARTE 2008), *M. bororo* (4 a 5 B) (DUARTE & JORGE, 2003), *M. americana* (2 a 6 B) (ABRIL et al, 2010; SARRIA PEREA, 2004). Os cromossomos B são cromossomos adicionais e dispensáveis que estão presentes em alguns indivíduos de algumas populações de algumas espécies, que provavelmente se originaram dos cromossomos A, mas que seguiram sua própria evolução (CAMACHO, 2005). O número de indivíduos com cromossomos B no cariótipo é geralmente menor dos que não apresentam nenhum, daí a ideia de que não são essenciais à sobrevivência (KASAHARA, 2009). Para alguns autores os cromossomos B são parasitas naturais (OSTERGREN, 1945) e não seguem as leis da herança Mendeliana (JONES, 1995). Em ambas as espécies os cromossomos B se apresentaram heterocromáticos quando submetidos ao bandamento C. Nas espécies *M. americana* (ABRIL, 2009) e *M. nana* (ABRIL, 2005) estes cromossomos comportam-se de maneira variável perante o bandamento C, alguns aparecendo totalmente ou parcialmente heterocromáticos e outros, integralmente eucromáticos. Camacho (1993) relacionou a natureza heterocromática da maioria desses cromossomos à presença de sequências de DNA repetitivo. Muitos estudos têm sido realizados para esclarecer a origem e evolução desses cromossomos. As técnicas de FISH têm mostrado em alguns casos, que os cromossomos B e os cromossomos do complemento A compartilham sequências repetitivas, mas os B podem ter também DNA satélite específico (KASAHARA, 2009). A existência de sequências de DNA compartilhadas entre os cromossomos do complemento A e os B, sustenta a origem intraespecífica, no entanto, a presença de DNA específico dos B no complemento A sustenta a origem interespecífica (CAMACHO et. al., 2000). Os cromossomos B de *M. gouazoubira* e *M. nemorivaga*

apresentaram sinal de hibridização com a sonda telomérica em ambas as espécies, porém em *M. nemorivaga* o sinal foi mais intenso.

A análise cromossômica comparativa mostrou que o padrão de distribuição da heterocromatina encontrada em cada cromossomo não foi diferente entre as espécies. O bandamento C evidenciou, nas duas espécies, um bloco de heterocromatina constitutiva pericentromérica em todos os cromossomos autossômicos. Uma característica típica das bandas C é que são altamente variáveis no que diz respeito à quantidade. Ganhos ou perdas de regiões de banda C estão relacionados a uma propriedade típica das sequências repetitivas, constituintes da heterocromatina. As variações de bandas C podem ser observadas entre indivíduos de uma mesma espécie ou populações ou podem diferenciar populações de uma mesma espécie (KASAHARA, 2009). Na região centromérica dos cromossomos fusionados de ambas as espécies foi observado um grande bloco heterocromático.

O cromossomo Y das duas espécies se apresentou eucromático. O cromossomo X de *M. nemorivaga* apresentou, além do bloco centromérico, uma marca intersticial na região mediana do braço longo. Numerosas bandas intersticiais foram encontradas nos maiores cromossomos das espécies *M. nana* e *M. bororo*, demonstrando que as fusões em tandem foram responsáveis pela formação do cariótipo destas espécies (ABRIL & DUARTE, 2008; DUARTE & JORGE, 2003). Em *M. americana* também foi encontrada uma marca intersticial no terço distal do braço longo do X que é resquício de uma fusão em tandem X-autossômica que originou o sistema sexual do tipo XX/XY₁Y₂ da espécie (ABRIL et al., 2010).

As regiões organizadoras do nucléolo ativas foram localizadas nos dois primeiros pares de cromossomos autossômicos (1 e 2). Duarte (1992) descreve os pares 2 e 3 como portadores de RON para *M. gouazoubira*, porém devido ao tamanho muito parecido dos cromossomos autossômicos da espécie e a baixa qualidade das preparações cromossômicas desta primeira descrição, este resultado gera dúvidas quanto à sua validade. Assim como o bandamento C, a técnica de identificação das Ag-RON tem sido empregada nas análises citogenéticas de vertebrados, visando uma melhor caracterização dos cariótipos. Isso tem sido útil para os grupos nos quais as espécies apresentam cariótipos altamente similares (KASAHARA, 2009).

A comparação cariotípica entre *M. gouazoubira* e *M. nemorivaga* mostrou que a grande diferença entre as espécies está nos cromossomos sexuais, pois *M. gouazoubira* apresenta sistema XX/XY com X acrocêntrico e *M. nemorivaga* possui sistema XX/XY1Y2 com cromossomo X submetacêntrico. Apesar dos primeiros estudos com citogenética de cervídeos terem considerado a condição acrocêntrica do X como ancestral para a família (NEITZEL, 1987; FONTANA & RUBINI, 1990), estudos recentes indicam que é provável que o ancestral dos Cervídeos possuísse um X submetacêntrico, e que apenas as espécies *M. gouazoubria* e *Hydropotes inermes*, a partir de uma inversão pericêntrica, passaram a ter o X de morfologia acrocêntrica (SARRIA-PEREA, 2012). Isso explicaria o sítio telomérico intersticial (STI) no X de *M. gouazoubira*, enquanto que o STI de *M. nemorivaga* é facilmente associado ao ponto de fusão em tandem do X com o autossomo.

O cromossomo que na análise convencional com coloração de Giemsa está aparentemente sem par, se mostrou homólogo à região distal do cromossomo X em *M. nemorivaga*, o que o leva a se comportar como Y2, tornando o sistema sexual desta espécie múltiplo do tipo XX/XY1Y2. Neitzel (1987) sugeriu que em uma espécie deste mesmo gênero, *Mazama americana*, este tipo de translocação também teria ocorrido, sendo resultado de uma fusão em tandem entre o cromossomo X e um autossomo. Abril et al. (2010) confirmaram por meio da análise de bandamento G e pintura cromossômica a existência deste rearranjo para *M. americana*, que também diferenciou o sistema sexual da espécie. Este tipo de sistema é encontrado em outras espécies de mamíferos como morcegos (quirópteros), pequenos roedores (família Echimyidae) e peixes (gênero *Hoplias*) (KASAHARA & DUTRILLAUX, 1983; AMARAL et al. 2010; BERTOLLO et al., 1978).

Nos animais analisados foram observados sítios teloméricos em todos os cromossomos e sítio telomérico intersticial (STI) na região mediana no cromossomo X acrocêntrico de *M. gouazoubira* e na região mediana do braço longo do cromossomo X de *M. nemorivaga*. Este resultado coincide com a marca intersticial no cromossomo X de *M. nemorivaga*, visualizada através do bandamento C, confirmando o local da fusão X-autossômica. Abril (2009) encontrou resultados semelhantes para a espécie *M. americana*, com todos os cromossomos X apresentando sinal telomérico nas extremidades, além de uma marca telomérica intersticial no cromossomo X.

A técnica de pintura cromossômica tem sido usada fortemente em estudos comparativos, pois um cromossomo inteiro de uma determinada espécie, ou parte dele, pode ser identificado no complemento de outra espécie (ZOO-FISH) (KASAHARA, 2009). Neste estudo utilizaram-se sondas do cromossomo X da espécie *M. gouazoubira* para hibridizar no cromossomo X de *M. gouazoubira* (espécie-específica) e no cromossomo X de *M. nemorivaga* (inter-específica). Os resultados mostraram que na hibridização espécie-específica o cromossomo X teve correspondência total com a sonda. Já na hibridização inter-específica o braço curto do cromossomo X e a metade proximal do braço longo tiveram correspondência com a sonda, mas a metade distal do cromossomo X de *M. nemorivaga* não teve correspondência com a sonda do cromossomo X de *M. gouazoubira*. Este resultado comprova a ocorrência da fusão X-autossômica descrita anteriormente. Abril (2009) encontrou resultados semelhantes ao utilizar sonda do cromossomo X de *M. gouazoubira* em *M. americana*. Este autor encontrou que a sonda teve correspondência com o braço curto do X de *M. americana* em sua totalidade e com o terço proximal do braço longo. Os dois terços distais do cromossomo X que não mostraram sinal de hibridização corresponderam ao acrocêntrico ancestral que sofreu uma fusão em tandem com o X.

Através dos bandamentos cromossômicos e das técnicas de hibridização *in situ* fluorescente, foi possível comparar as duas espécies e identificar os eventos que as diferenciaram, além de identificar as regiões de homologia. Há numerosas evidências de que a similaridade nos padrões de bandas é útil para a identificação de homologias genéticas (SAWYER & HOZEER, 1986). Quando espécies próximas são comparadas ou quando um número limitado de rearranjos ocorre dentro de um cariótipo, o padrão de análise por bandamentos é muito informativo para determinadas homologias (PATAK & STOCK, 1974).

A citogenética tem contribuído muito na identificação e classificação de novas espécies de diversos grupos de animais já que a análise cariotípica permite avaliar a intensidade e os padrões de evolução cromossômica (VARELLA-GARCIA et.al. 1989). Rearranjos do tipo fusão Robertsoniana são um dos principais mecanismos de diferenciação cariotípica (GUSTAVSON; SUNDT, 1969; TAYLOR et. al., 1969; JORGE E BENIRSCHKE, 1977; NEITZEL, 1987). Os dados obtidos através das análises por

bandamentos e hibridização *in situ* fluorescente, somados as diferenças morfológicas encontradas nestas duas espécies, demonstram que elas passaram por um intenso processo de evolução e que a fusão X-autossômica provocou uma diferenciação ainda maior, tornando o sistema sexual destas espécies diferentes.

A espécie *M. nemorivaga* está distribuída por todo o território amazônico, ocupando os estados do Amazonas, Pará, Rondônia, Amapá, norte do Mato Grosso e nordeste do Maranhão (ROSSI, 2000). Duarte et. al. (2008) sugeriu a possibilidade da existência de duas espécies dentro do que hoje é considerado *M. nemorivaga*, uma ocorrendo na região oeste da Amazônia e outra ao leste. Análises moleculares recentes demonstraram que há uma diferença entre os animais localizados acima e abaixo do rio Amazonas. Através das análises cariotípicas foi possível estabelecer que o padrão cariotípico para a espécie *M. nemorivaga* é $2n=68$; $NF=70$ para fêmeas e $2n=69$; $NF=70$ para machos. Neste trabalho foram analisados 6 animais (Mn01, Mn02, Mn03, Mn06, Mn07 e Mn08) com procedência de regiões abaixo do rio Amazonas (Santarém, Imperatriz, Juína, Rondônia, Rio branco e Marabá) e 2 animais (Mn04 e Mn05) de regiões acima do rio Amazonas (Macapá). Os seis animais apresentaram 33 pares de cromossomos autossômicos, enquanto os dois outros animais apresentaram 34 pares de cromossomos autossômicos. Estes resultados podem indicar que, talvez os dois animais localizados acima do rio Amazonas não tenham sofrido fusão X-autossômica, mantendo os 34 pares de autossomos, indicando que a hipótese de Duarte et. al. (2008) sobre a existência de duas espécies dentro dos *M. nemorivaga*.pode realmente ser válida.

VI. CONCLUSÕES

As comparações das técnicas de citogenética clássica e molecular mostraram que *M. gouazoubira* e *M. nemorivaga* são espécies com grandes semelhanças citogenéticas e que a grande diferença entre elas está nos cromossomos sexuais.

A morfologia submetacêntrica do cromossomo X de *M. nemorivaga*, a alta frequência e quantidade de cromossomos B e a ocorrência do evento de fusão X-autossômica, responsável pela formação do sistema sexual múltiplo (XX/XY1Y2) são as diferenças marcantes das espécies estudadas.

A marcação intersticial encontrada através da hibridização *in situ* telomérica no cromossomo X de *M. gouazoubira* corrobora a hipótese de que este cromossomo tenha se derivado de uma inversão pericêntrica a partir de um cromossomo X ancestral de dois braços, enfraquecendo ainda mais a hipótese de que o cariótipo ancestral dos cervídeos era igual a $2n=70$; $NF=70$. Já o sinal telomérico intersticial encontrado também no cromossomo X de *M. nemorivaga* deve ser considerado como um resquício da fusão em tandem do mesmo com um autossomo.

A variação cariotípica de $2n=67$ a 69 e $NF=70$ a 72 encontrada nos animais amostrados da espécie *M. nemorivaga* talvez possa validar a hipótese de que existam duas espécies dentro dos *M. nemorivaga*. As fêmeas com $2n=69$; $NF=72$ (Mn04 e Mn05) apresentaram 34 pares de cromossomos autossômicos, um par autossômico a mais do que o cariótipo considerado padrão para a espécie, encontrado em 6 dos 8 animais analisados neste trabalho. A identificação dos cariótipos variantes nesses dois animais corrobora a hipótese de que o rio Amazonas atue como barreira geográfica para esta espécie. Uma maior amostragem da área acima do rio Amazonas e uma análise mais detalhada por meio de bandamentos cromossômicos e pintura cromossômica é, portanto, essencial para a confirmação da diferenciação dentro da espécie *M. nemorivaga*.

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRIL, V. V.; **Análise Citogenética do Veado-Mão-Curta (*Mazama nana*): A Busca Das Diferenças entre os indivíduos e seu papel na evolução e conservação da espécie.** 2005. 50 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2005.

ABRIL, V. V.; **Evolução cromossômica no veado-mateiro - *Mazama americana* (MAMMALIA; CERVIDAE).** 2009. 108 f. Dissertação (Doutorado) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2009.

ABRIL, V. V.; DUARTE, J. M. B.; Chromosome polymorphism in the Brazilian dwarf brocket deer, *Mazama nana* (Mammalia, cervidae). **Genetics and molecular Biology** v.31, p.53-57, 2008.

ABRIL V.V.; CARNELOSSI, E. A. G.; GONZÁLEZ, S.; DUARTE, J. M. B. Elucidating the evolution of the Red Brocket Deer *Mazama americana* Complex (Artiodactyla; Cervidae). **Citogenetic and Genome Research.** v. 128: p. 177-187, 2010.

AMARAL, P.J.S.; NAGAMACHI, C.Y.; COSTA, M.J.R.; PEREIRA, A.L.; NORONHA, R.C.R.; ROSSI, R.V.; OLIVEIRA, A.C.M.; Caracterização cromossômica de *Proechimys cf longicaudatus* (Rodentia, Echymidae) do Norte do Mato Grosso, com sistema sexual múltiplo. **Resumo do 56º Congresso Brasileiro de Genética.** Guarujá SP, Setembro 2010.

ALLEN, J. A.; Notes on American deer of the genus *Mazama*. **Bull. Am. Mus. Nat. Hist.** New York, v.34, p.521-553, 1915.

AVILA-PIRES, F. D. As formas sul-americanas do veado-virá. **An. Acad. Brasileira Ciências.** v.31, p.547-556, 1959.

BERGALO, H.G.; Rocha, C.F.D.; Alves, M.A.S. & Van Sluys, M. 2000. **A fauna ameaçada de extinção no Estado do Rio de Janeiro.** EDUERJ. 166p.

BERTOLLO , L.A.C.; TAKAHASHI, C.S.; MOREIRA-FILHO, O.; Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). **Brazil J. Genet**, v. 1:p. 103-120, 1978.

CABRERA, A.; Catalogo de los mamíferos de America del Sur. **Revista Museo Argentino Bernardino Rivadavia**, Argentina, v.4, p.309-732, 1960.

CAMACHO, J.P.M. Polimorfisms and geographic distribution. First B-chromosome **Conference - Anais. Universidad Autónoma de Madri**, Madrid, Espanha, 1993.

CAMACHO, J.P.M. B chromosomes. In: Gregory, T.R. **The evolution of the genome**. San Diego, California, USA, p. 223-286, 2005.

CAMACHO J. P. M.; SHARBEL T. F.; BEUKEBOOM L. W.; B-chromosome evolution. **The Royal Society**. v. 355, p.163-178, 2000.

CHANDRA, H. S.; HUNGERFORD, D. A.; WAGNER, J.; SNYDER, R. L. Chromosomes of five artiodactyl mammals. **Chromosoma**. v.21, p.211-220,1967.

CUVIER, G. F.; **Dictionnaire des Sciences Natureles. Zoologie. Mammiferes**. Paris, F. G. Levrault, 1817.

CZERNAY, S.; Die Spiesshirsche und Pudus: die Gattungen *Mazama* und *Pudu*. A. Ziemsen, Wittenberg Lutherstadt, **Die Neue Brehm-Bucherei Heft**, v.581, 84p, 1987.

DUARTE, J. M. B.; **Aspectos taxonômicos e citogenéticos de algumas espécies de cervídeos brasileiros**. Jaboticabal: Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias. 1992, 153p. Dissertação de Mestrado.

DUARTE, J. M. B.; **Guia de identificação de cervídeos brasileiros**: Jaboticabal, FUNEP, 14p, 1996.

DUARTE, J. M. B.; MERINO, M. L.; Taxonomia e Evolução. In: Duarte, J. M. B. (ed.) **Biologia e conservação de cervídeos sul-americanos: *Blastocerus*, *Ozotocerus* e *Mazama***. Jaboticabal, FUNEP, p.1-21, 1997.

DUARTE, J. M. B.; JORGE, W.; Análise Citotaxonômica dos *Mazamas* Cinzas do Brasil (*Mazama gouazoubira* and *Mazama rondoni*). In: Duarte, J. M. B. **Análise citogenética de taxonômica do gênero *Mazama* (Cervidae: Mammalia) no Brasil**. Tese de doutorado, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 1998.

DUARTE, J. M. B.; RAMALHO, M. F. D.; LIMA, V. F. H.; JORGE, W.: A leukocyte cryopreservation technique for cytogenetic studies. **Genetics and Molecular Biology**, v.22, n.3, p.399-400, 1999.

DUARTE J. M. B. and JORGE. 2003. Morphologic and cytogenetic description of the small red brocket (*Mazama bororo* Duarte, 2006) in Brazil. **Mammalia** v. 67 (3): p. 403-410.

DUARTE, J.M.B.; GONZÁLEZ, S.; MALDONADO, J. E.; *The surprising evolutionary history of South American deer*. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, p. 17-22., 2008.

EISEMBERG, J. F.; **Mammals of the neotropics**. Vol. I. University of Chicago Press, Chicago, 449p., 1989.

EMMONS, L. H.; **Neotropical rainforest mammals, a field guide**. University of Chicago Press, Chicago, 281 p., 1990.

FERGUSON-SMITH, M. A.; NORDENSKJOLD, M.; PFRAGNER, R.; PONDER, B. A. J. Cytogenetic analysis by chromosome painting using DOOP-PCR amplified flow-sorted chromosomes. **Genes, Chromosomes & Cancer**, New York, v.4, p.257-263, 1992.

FERRETO, B. **Bandamento cromossômico em *Mazama nemorivaga***. Relatório de Iniciação Científica (FAPESP), 2010. Faculdades de Ciências Agrárias e Veterinárias. Universidade Estadual Paulista de Jabotical.

FONTANA, F.; RUBINI, M. Chromosomal evolution in Cervidae. **BioSystems**, Amsterdam, v. 34, p. 157-174, 1990.

GUSTAVSSON, I.; SUNDT, C.O. Three polymorphic chromosome systems of centric fusion type in a population of Manchurian Sika Deer (*Cervs Nippon hotulorum*). **Chromosoma** v.28, p.245-254, 1969.

GROVES, C. P.; Family Cervidae. p.249-256 in D.R.Prothero & S. E. Foss, eds., **The Evolution of Artiodactyls**. Baltimore: Johns Hopkins University Press, 2007.

GUSTAVSSON, I.; SUNDT, C.O. Three polymorphic chromosome systems of centric fusion type in a population of Manchurian Sika Deer (*Cervs Nippon hotulorum*). **Chromosoma** v.28, p.245-254, 1969.

HOWELL, W.W.; BLACK, D.A.; Controlled silver staining of nucleous organizer regions with a protective colloidal developer: a 1 step method. **Experientia**, v.36, p.1014-1015, 1980.

IJDO, J. W.; WELLS, R. A.; BALDINI, A.; REEDERS, S. T. Improved telomere detection using a telomere repeat probe (TTAGGG)_n generated by PCR. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.19, p.4780, 1991.

IUCN (International Union for Conservation of Nature). 2001. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2010.2. **International Union for Conservation of Nature** <www.iucnredlist.org>. Acessado em 4 de outubro de 2010.

JONES, R.N. B chromosomes in plants. Transley Review No. 85. **New Phytologist**, 131:411-434, 1995.

JORGE, W.; BENIRSCHKE, K. Centromeric heterochromatin and G-banding of the Red Brocket Deer, *Mazama americana temama* (Cervoidea, Artiodactyla) with a probable non-robertsonian translocation. **Cytologia**, v. 42, p.711-721, 1977.

KASAHARA, S. & DUTRILLAUX, B. Chromosome banding patterns of four species of bats, with special reference to a case of X-autosome translocation. **Ann. Genet.**, v. 26: p. 197-201, 1983.

KASAHARA S.; **Introdução à pesquisa em citogenética de Vertebrados**. Sociedade Brasileira de Genética – Ribeirão Preto, SP. 1ªed., 160p, 2009.

MARQUES, A. A. B., C. S. FONTANA, E. VÉLEZ, G. A. BENCKE, M. SCHNEIDER, AND R. E. REIS. 2002. **Lista de Referência da Fauna Ameaçada de Extinção no Rio Grande do Sul**: Decreto no 41.672, de 10 junho de 2002. FZB / MCT-PUCRS / Pangea (Publicações Avulsas FZB, 11), Porto Alegre, Brasil.

MATSUBARA, K.; NISHIDA-UMEHARA, C.; KIMIYUKI, T.; NUKAYA, D.; MATSUDA, Y. Karyotypic evolution of Apodemus (Muridae, Rodentia) inferred from comparative FISH analyses. **Chromosome Research**, v.12, p.383–395, 2004.

MIRANDA-RIBEIRO, A.; **História natural. Zoologia. Mamíferos**. Rio de Janeiro, Comissão de Linhas Telegráficas Estratégicas de Mato-Grosso ao Amazonas. Anexo nº5, 1914.

MOORHEAD, R. S; NOWELL, P. C; MELINAN, W. J; BATTIPS, D. M; HUNGERFORD, A.; Chromosome preparations of leucocytes culture from human peripheral blood. **Exp. Cell. Res.** v.20, p.13, 1960

NEITZEL, H. Chromosomenevolution in der Familie der Hirsche (Cervidae). **Bongo**. v.3, p.27-38, 1979.

NEITZEL H.; Chromosome evolution of Cervidae: Karyotypic and molecular aspects. In: OBE, G.; BASLER, A. (Ed.). **Cytogenetics, Basic and applied aspects**, Berlin: Springer Verlag, p.90-112, 1987

NUNES, A. L. V; GASPARINI, R. L; DUARTE, J. M. B; PINDER, L; BUSCHINELLI, M. C.; Captura, contenção e manuseio. In: Duarte, J. M. B. **Biologia e conservação de cervídeos sul americanos: *Blastocerus*, *Ozotoceros* e *Mazama***. FUNEP, Jaboticabal, p.142-170, 1997.

OSTERGREN, G. **Parasitic nature of extra fragment chromosomes**. Bot Notiser, v. 2: p. 157-163, 1945.

OZOUF-COSTAZ, C. e FORESTI, F. Fish cytogenetics research: advances, applications and perspectives. In: Proceedings of the 7th International Congress of Ichthyology. **Netherl. J. Zool.** v. 42(2-3), p. 277-290, 1992.

PATAK, S.; STOCK, A. D. The chromoso of mammals: karyological homology as revealed by banding techniques. **Genetics**, v78, p.714-197, 1974.

RIBEIRO,A.M. Os veados do Brasil segundo as colecçõesRondon e de varios museus nacionaes e estrangeiros. **Rev. Museu Paulista**. v.11, p.209-308, 1919.

ROSSI, R.V. & DUARTE, J.M.B 2008. *Mazama nemorivaga*. In: IUCN 2008. **2008 IUCN Red List of Threatened Species**. <www.iucnredlist.org>.

ROSSI, R. V.; **Taxonomia de *Mazama* Ranfinesque, 1817 do Brasil (*Artyodactyla, Cervidae*)**. São Paulo, Universidade de São Paulo, Instituto de Biociências, Diss. de Mestrado, 2000.

ROSSI, R. V. Amazonian Brown Brocket Deer *Mazama nemorivaga* In: Duarte, J. M. B.; Gonzalez, S. **Neotropical Cervidology: Biology and Medicine of Latin American Deer**. Jaboticabal: FUNEP and Gland, Switzerland: IUCN, 2010. Cap.23, p.202-210.

SARRIA-PEREA, J. A. **Comparação entre alguns citótipos de *Mazama americana* (*Artiodactyla; Cervidae*): Quão grande é a diferença entre eles?** 2004. 41 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2004.

SARRIA-PEREA, J. A. **Taxonomia e Filogenia do Gênero *Mazama* (MAMMALIA; CERVIDAE)** na Colômbia. 2012. 72 f. Dissertação (Doutorado) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2012.

SAWYER, J. R.; HOZIER J. C.; Hegg resolution of mouse chromosomes: banding conservation between man and mouse. **Science**, v. 232. P. 1632-1635, 1986.

SEABRIGHT, M.; A rapid banding technique for human chromosomes. **Lancet**, v.11, p.971-972, 1971.

SUMNER, A. T.; A simple technique of demonstrating centromeric heterochromatin. **Exp. Cell Res.**, v.75, p.304-306, 1972.

TAYLOR, K.M.; HUNGERFORD, D.A.; SNYDERR, L. Artiodactyl mammals: their chromosome cytology in relation to patterns of evolution. In: BENIRSCHKE, K. **Comparative mammalian cytogenetics**. Berlin: Springer Verlag, p.346-356, 1969.

TELENIUS, H.; PELMEAR, A. H.; TUNNACLIFFE, A.; CARTER, N. P.; BEHMEL, A.; FERGUSON-SMITH, M. A.; NORDENSKJOLD, M.; PFRAGNER, R.; PONDER, B. A. J. Cytogenetic analysis by chromosome painting using DOOP-PCR amplified flow-sorted chromosomes. **Genes, Chromosomes & Cancer**, New York, v.4, p.257-263, 1992.

VARELA-GARCIA, M.; TADDEI, V. A.; Citogenética de Quirópteros: Métodos e aplicações. **Revista Brasileira de Zoologia**. v. 6 (2): p. 297-323, 1989.

VARGAS-MUNAR, D.S.F. **Relação entre fragilidade cromossômica e trocas entre cromátides irmãs com a variabilidade cariotípica de cervídeos brasleiros**. 2003. 35 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2003.

VERMA, R. S; BABU, A.; **Human chromosomes: principles and techniques**. 2.ed. New York: McGraw Hill, 1995.

WEMMER, C.; **Status survey and conservation action plan, Deer**. Gland: IUCN, 106 p., 1998.

WILSON, A. C.; SARICH, V. M.; MAXSON, L. R. The importance of gene rearrangement in evolution: Evidence from studies on rates of chromosomal. Protein and anatomical evolution. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v.71, p.3028-3030, 1974

YANG, F.; CARTER, N.P.; FERGUSON-SMITH, M.A. A comparative study of karyotypes of muntjacs by chromosome painting. **Chromosoma**, v. 103, p.642-652, 1995.

YANG, F.; O'BRIEN, P.C.M.; WIENBERG, J.; NEITZEL, H.; LIN, C.C.; FERGUSON-SMITH, M. A. Chromosomal evolution of the Chinese muntjac (*Muntiacus reevesi*). **Chromosoma**, v.106, p.37-43, 1997.

YOSIDA, T.H. Chromosome differentiation and species evolution in rodents. In: **Chromosomes in Evolution of Eukaryotic Groups Vol. 1**. Sharma A.K. & Sharma, A. (eds.). [S. l.: s. n.], p. 147 – 176, 1983.