

KARINA DE CASSIA FARIA

**ANÁLISE CITOGENÉTICA COMPARATIVA EM ESPÉCIES
DE MORCEGOS DOS GÊNEROS *Molossus* (MOLOSSIDAE),
Artibeus, *Platyrrhinus*, *Sturnira*, *Glossophaga*,
Phyllostomus e *Carollia* (PHYLLOSTOMIDAE) –
CHIROPTERA (MAMMALIA)**

KARINA DE CASSIA FARIA

**ANÁLISE CITOGENÉTICA COMPARATIVA EM ESPÉCIES
DE MORCEGOS DOS GÊNEROS *Molossus* (MOLOSSIDAE),
Artibeus, *Platyrrhinus*, *Sturnira*, *Glossophaga*,
Phyllostomus e *Carollia* (PHYLLOSTOMIDAE) –
CHIROPTERA (MAMMALIA)**

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto, para obtenção do Grau de Mestre em Genética.

Orientadora: Profa. Dra. Eliana Morielle Versute

São José do Rio Preto-SP

2003

SUMÁRIO

I. INTRODUÇÃO	7
1 . Ordem Chiroptera: aspectos gerais	7
2. Estudos Citogenéticos e Interpretações Evolutivas	13
3. A Citogenética molecular	18
II. OBJETIVOS	25
III. MATERIAL E MÉTODOS	26
1. Espécies	26
2. Coletas	26
3. Preparações Cromossômicas	28
a) Preparação direta de medula óssea	28
b) Cultura de fibroblastos	29
4. Técnica de bandamento G	32
5. Extração do DNA Genômico	33
6. Preparo da Sonda Genômica	34
7. Hibridização <i>in situ</i> fluorescente	36
a) Genômica	36
b) Com sonda telomérica	37
IV. RESULTADOS	40
1. Análise Citogenética Comparativa	40
1.1. Dos padrões de bandas G	40
1.1.1 <i>A. planirostris</i> , <i>P. lineatus</i> e <i>S. lilium</i> (Stenodermatinae), <i>M.</i>	

<i>ater</i> e <i>M. molossus</i> (Molossidae)	41
1.1.2 <i>G. soricina</i> (Glossophaginae), <i>M. ater</i> e <i>M. molossus</i> (Molossidae)	45
1.1.3 <i>P. hastatus</i> (Phyllostominae), <i>M. ater</i> e <i>M. molossus</i> (Molossidae)	47
1.1.4 <i>C. perspicillata</i> (Carollinae), <i>M. ater</i> e <i>M. molossus</i>	49
1.1.5 Cromossomos Sexuais e Comparação Geral	46
1.2. Das hibridizações genômicas comparativas (ZOO-FISH)	63
2. Identificação dos Sítios de DNA Telomérico	71
2.1 <i>A. planirostris</i>	73
2.2 <i>P. lineatus</i>	73
2.3 <i>S. lilium</i>	73
2.4 <i>C. perspicilata</i>	74
2.5 <i>M. ater</i> e <i>M. molossus</i>	75
V. DISCUSSÃO	81
VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	99
VII. RESUMO	108
VIII. ABSTRACT	111

I. INTRODUÇÃO

1. Ordem Chiroptera: aspectos gerais

A ordem Chiroptera de Mammalia é representada pelos morcegos, que são animais com características morfofisiológicas particulares que possibilitam o voo. Esta condição não é observada em qualquer outro grupo de mamífero, e fez dos Chiroptera um dos grupos de maior sucesso entre os mamíferos euterianos.

Os morcegos são encontrados na maioria das regiões temperadas e tropicais do mundo. Devido à capacidade de explorar o meio aéreo e ao hábito notívago, podem utilizar uma variedade de tipos de alimentos e abrigos, geralmente não ocupados por outros animais.

Cerca de um quarto de todas as espécies de mamíferos pertencem à ordem Chiroptera, e a diversidade deste *táxon*, em termos de adaptações ecológicas e morfológicas, é muito grande.

A ordem Chiroptera apresenta cerca de 980 espécies agrupadas em duas subordens: Megachiroptera e Microchiroptera. A subordem Megachiroptera representa uma única família, a Pteropodidae. Esta família constitui-se por cerca de 169 espécies que representam as grandes formas de morcegos e ocorrem apenas no Velho Mundo (Nowak, 1999).

A subordem Microchiroptera é cosmopolita e compõem-se por 17 famílias agrupadas em oito superfamílias: Emballonuroidea (Emballonuridae),

Rhinopomatoidea (Craseonycteridae e Rhinopomatidae), Rhinolophoidea (Nycteridae, Megadermatidae e Rhinolophidae), Noctilionoidea (Noctilionidae, Mormoopidae e Phyllostomidae), Molossoidea (Antrozoidae e Molossidae), Nataloidea (Myzopodidae, Thyropteridae, Furipteridae e Natalidae), Vespertilionoidea (Vespertilionidae) e *Incertae Sedis* (Mystacinidae) (Simmons & Geisler, 1998).

No Brasil são encontradas cerca de 160 espécies de Microchiroptera, abrangendo representantes de nove famílias: Emballonuridae, Vespertilionidae, Molossidae, Phyllostomidae, Noctilionidae, Mormoopidae, Natalidae, Furipteridae e Thyropteridae (Aguiar & Taddei, 1995).

As famílias Phyllostomidae, Noctilionidae, Mormoopidae, Natalidae, Furipteridae e Thyropteridae ocorrem exclusivamente nas Américas, enquanto que as famílias Emballonuridae, Vespertilionidae e Molossidae ocorrem também no Velho Mundo.

Os relacionamentos evolutivos dentro da ordem Chiroptera são difíceis de serem estabelecidos, em parte, pela raridade de registros fósseis. Os registros fósseis mais antigos atribuídos a esta ordem são provenientes do Eoceno da Europa e da América do Norte (Jones & Genoways, 1970), datados de aproximadamente 50 milhões de anos. Embora os registros não demonstrem claramente a época em que esses animais atingiram a América do Sul, há um registro

de Molossidae (*Tadarida*), presumivelmente do Oligoceno, e um de Phyllostomidae (*Notonycteris*) do Mioceno (Taddei, 1997).

Segundo Smith (1976), a maioria das famílias de Chiroptera originou-se aparentemente da radiação adaptativa dos embalonurídeos, rinolofídeos e vespertilionídeos.

Simmons & Geisler (1998) sugeriram que Emballonuroidea não seja monofilética, porque uma das suas famílias, a Emballonuridae, ocupa uma posição basal em relação a todos os outros Microchiroptera.

Com base no grau de especialização morfológica, os embalonurídeos parecem ter chegado primeiro aos trópicos do Novo Mundo, seguidos dos vespertilionídeos. Portanto, a família Emballonuridae tem sido considerada por alguns autores como uma possível ancestral dos noctilionídeos, mormoopídeos e filostomídeos do Novo Mundo (Smith, 1976). As demais famílias neotropicais, ou seja, Natalidae, Thyropteridae e Furipteridae aparentemente derivaram do estoque vespertilionóideo.

Apesar da consideração anterior, Smith (1976) não descarta a hipótese de que os Chiroptera ancestrais datados do Eoceno foram a fonte a partir dos quais várias linhagens de Microchiroptera radiaram-se adaptativamente.

A família Emballonuridae é composta por 13 gêneros e cerca de 50 espécies amplamente distribuídas nas regiões tropicais e subtropicais do Mundo (Nowak, 1999). Nas Américas ocorrem 18 espécies das quais 15 já foram registradas

no Brasil (Taddei, 1996). Os registros fósseis mais antigos para esta família são do Eoceno médio na Europa, Mioceno médio na África e Pleistoceno na América do Sul e América do Norte (McKenna & Bell, 1998).

Hood & Baker (1986) analisando comparativamente os cromossomos de espécies de Phyllostomidae e Emballonuridae, não detectaram homologias cromossômicas entre elas. Este fato favorece uma hipótese alternativa para a origem das famílias do Novo Mundo.

Além de Emballonuridae, as famílias Vespertilionidae e Molossidae também são do Velho Mundo e ocorrem nas Américas.

Os vespertilionídeos ocorrem em todos os continentes, atingindo regiões temperadas e tropicais do Mundo. Estes animais constituem a maior família de Chiroptera, para a qual são reconhecidos 43 gêneros e cerca de 340 espécies (Nowak, 1999), sendo 74 espécies de ocorrência nas Américas e 19 no Brasil (Taddei, 1996). Os vespertilionídeos podem ser reconhecidos pela presença de uma cauda desenvolvida, estendendo-se até o extremo posterior da membrana interfemural, apresentando a forma de V.

Os registros fósseis mais antigos para os vespertilionídeos datam do Eoceno médio na Europa, Mioceno na África e Ásia, e Mioceno na América do Norte (McKenna & Bell, 1998).

A família Molossidae constitui-se de 86 espécies agrupadas em 16 gêneros, sendo encontradas nas partes quentes do mundo (Nowak, 1999). Nas

Américas, é representada por 31 espécies das quais 21 ocorrem no Brasil (Gregorin & Taddei, 2002). Os morcegos desta família alimentam-se de insetos e apresentam como principal característica uma cauda livre, que ultrapassa a membrana interfemural. Suas asas são estreitas e alongadas, e as orelhas, em geral, são achatadas (Taddei, 1996). Os registros fósseis mais antigos para os Molossidae são do Eoceno da América do Norte e da Europa, e Oligoceno da América do Sul.

Nas Américas, Molossidae é a terceira maior família em número de espécies. Embora algumas espécies estejam entre os morcegos mais comuns, como é o caso de *Molossus ater* e *Molossus molossus*, a maioria dos táxons é pobremente estudada devido à suas características de comportamento, como vôos altos e rápidos, o que tem dificultado os estudos para a família.

Entre as famílias de morcegos neotropicais, a família Phyllostomidae é a que apresenta maior representatividade, com cerca de 52 gêneros e 154 espécies. Os morcegos desta família podem ser encontrados nas regiões tropicais e subtropicais do Novo Mundo, abrangendo desde o sudoeste dos Estados Unidos e oeste da Índia até o nordeste da Argentina (Nowak, 1999).

Os registros fósseis mais antigos para a família datam do Mioceno e Pleistoceno na América do Sul e América do Norte e Pleistoceno no oeste da Índia (McKenna & Bell, 1998).

Embora esta família tem sido assunto de grandes discussões com relação à classificação e composição de gêneros, a classificação proposta por Jones &

Carter (1976) é ainda seguida por muitos autores e reconhece as seguintes subfamílias: Desmodontinae, Phyllostominae, Glossophaginae, Carollinae, Sternodermatinae e Phyllonycterinae. Porém, em proposta recente, Wetterer *et al.*, (2000) reconheceram mais uma subfamília para Phyllostomidae, a Brachyphyllinae.

Os morcegos da família Phyllostomidae variam muito em tamanho e cor da pelagem. O comprimento da cabeça e corpo compreende de 40 a aproximadamente 135 mm e, a maioria das espécies apresenta um apêndice nasal em forma de folha, o qual constitui a característica mais importante para a identificação da família. Nos morcegos vampiros este apêndice encontra-se modificado em forma de ferradura.

A grande irradiação adaptativa dos filostomídeos foi, aparentemente, uma resposta a exploração de diferentes tipos de alimentos no Novo Mundo (Smith, 1976). A subdivisão das famílias coincide em parte com os hábitos alimentares, sendo encontradas espécies insetívoras, carnívoras, nectarívoras, frugívoras, onívoras ou hematófagas. Os morcegos hematófagos pertencem à subfamília Desmodontinae e constituem os únicos mamíferos que se alimentam exclusivamente de sangue (Taddei, 1996).

A origem monofilética da família é suportada por inúmeras evidências, incluindo dados morfológicos, citogenéticos, bioquímicos e moleculares (Baker *et al.*, 1989; Simmons & Geisler, 1998; Jones *et al.*, 2002). Desmodontinae é

reconhecido como um grupo irmão de todos os outros clados de filostomídeos e, entre os demais táxons, Phyllostominae é irmão das outras seis subfamílias.

Apesar dos avanços nos estudos com enfoques evolutivos, a sistemática atual de Chiroptera é ainda insuficiente, pois os relacionamentos evolutivos de muitas espécies não foram ainda investigados em detalhes e em representatividade. As divergências observadas entre os resultados apresentados nos diferentes estudos, complicam ainda mais o quadro. Filogenias mais robustas geralmente têm sido obtidas quando diferentes e amplos conjuntos de dados (morfológicos, citogenéticos e moleculares, entre outros) têm sido abordados.

2. Estudos Citogenéticos e Interpretações Evolutivas

Os conjuntos cromossômicos atuais dos diferentes táxons animais são chamados cariótipos e originaram-se por processos mutacionais que ocorreram ao longo da evolução.

Cada cromossomo de mamífero é um mosaico de compartimentos que se mapeiam como domínios contíguos na molécula do DNA. Em cromossomos metafásicos esses domínios são visualizados como bandas transversais, sendo que cada compartimento difere de seu vizinho pelo conteúdo de bases CG.

Nos estudos citogenéticos, a identificação dos cariótipos de diferentes espécies e a determinação dos padrões longitudinais específicos de bandas, que é característico de cada par cromossômico nos permite, em muitos casos, avaliar

a intensidade e os padrões de evolução cromossômica nos diferentes grupos de organismos, determinar as diferenças e semelhanças cromossômicas, assim como os possíveis rearranjos que ocorreram na diferenciação das espécies.

Em mamíferos, entre os rearranjos cromossômicos que diferenciam os cariótipos das espécies, as translocações Robertsonianas (a fusão e a fissão) e as inversões pericêntricas parecem ser as mais frequentes (King 1993; Slijepcevic, 1998). Na fusão cêntrica cromossomos acrocêntricos ou telocêntricos dão origem a cromossomos metacêntricos ou submetacêntricos, ocasionando uma diminuição no número diplóide do conjunto cromossômico, sem alterar o número fundamental (número de braços cromossômicos) e o padrão geral de bandas cromossômicas. A fissão é o processo inverso, onde cromossomos metacêntricos ou submetacêntricos originam cromossomos acrocêntricos ou telocêntricos, aumentando o número diplóide sem alterar o número fundamental. No processo de inversão pericêntrica, que ocorre pela inversão de um fragmento quebrado contendo o centrômero, em geral há alteração na morfologia cromossômica, muitas vezes acompanhada de alteração no número fundamental, sem alterar o número diplóide.

Outro tipo de rearranjo que ocorre no cariótipo de mamíferos, porém em frequências menores que os citados anteriormente, é a translocação em *tandem*, caracterizada pela fusão de centrômeros com telômeros e telômeros com telômeros, reduzindo o número diplóide e também o número fundamental.

Muitos desses fenômenos genéticos são evidenciados pelo método mais comum de bandamento cromossômico, o bandamento G, usado para determinar homologias entre indivíduos, populações e mesmo entre espécies.

A identificação dos cromossomos pelo bandamento G foi inicialmente desenvolvida em estudos de cromossomos humanos no início da década de 70. Desde então, o bandamento G tem sido usado no estudo dos cromossomos de diferentes grupos de vertebrados. As seqüências de bandas G, que aparecem como faixas transversais ao longo dos cromossomos e refletem domínios cromatídicos com seqüências específicas de bases, podem ser comparadas entre diferentes espécies e mesmo entre categorias taxonômicas mais elevadas e, as diferenças ou semelhanças entre os táxons podem ser identificadas e usadas nos estudos evolutivos (Baker *et al.*, 1987).

Estudos comparativos dos padrões de bandas G dos complementos cromossômicos de diversos grupos animais têm mostrado, por exemplo, que na ordem Primates, com exceção dos gibões e dos macacos noturnos, há um acentuado conservadorismo cromossômico, de forma a permitir o reconhecimento de extensa homologia entre todos os grupos, desde os pró-símios até os humanos (Seuànez, 1987). Contudo, em outros grupos de mamíferos como em espécies da família Cervidae da ordem Artiodactyla, situação oposta foi observada. Neste grupo, as mudanças foram tão intensas que impedem o reconhecimento das homologias pela comparação entre os padrões de bandas cromossômicas. Apesar dessa família ser

comparativamente jovem e conter somente 32 espécies recentes, nenhum outro grupo tem diversidade cromossômica tão intensa, onde os números diplóides variam de seis (fêmeas) / 7 (machos) no *Muntiacus muntjac* a 80 no *Capreolus pygargus* (Neitzel, 1987).

A utilização das técnicas de bandamento tem contribuído bastante para o esclarecimento das relações filogenéticas e dos mecanismos de evolução das espécies de morcegos. Com a determinação do padrão diferencial de bandas cromossômicas pôde-se verificar que cariótipos morfologicamente muito semelhantes, como os dos gêneros *Carollia* (Carollinae) e *Choeroniscus* (Glossophaginae), apresentam padrões de bandas facilmente diferenciados (Stock, 1975). Por outro lado, cariótipos aparentemente muito diferentes, como os dos sete citótipos de *Rhogessa tímida*, que têm $2n = 30, 32, 34, 42, 44$ ou 52 , puderam ter sua homologia rapidamente reconhecida (Bickham & Baker, 1977; Baker *et al.*, 1985).

A contribuição quase exclusiva dos rearranjos Robertsonianos, que era admitida pelas publicações mais antigas, foi confirmada em certos casos, como em alguns Vespertilionidae (Bickham, 1979) e Molossidae (Morielle-Versute *et al.*, 1996), mas é bem documentado que rearranjos como inversões, inserções e translocações recíprocas, bem como a adição de heterocromatina constitutiva, tiveram papel significativo em outros Vespertilionidae, Phyllostomidae e Molossidae (Bickham & Hafner, 1978; Haiduk & Baker, 1982; Stock, 1983; Bickham *et al.*, 1986; Tucker, 1986; Morielle-Versute *et al.*, 1996).

O bandamento G é também bastante utilizado para um melhor esclarecimento do relacionamento entre os gêneros dentro das subfamílias, sendo possível sugerir com base nos tipos de rearranjos envolvidos na diferenciação das espécies, qual seria o cariótipo mais primitivo dentro de um determinado grupo (Baker *et al.*, 1979; Haiduk & Baker, 1982).

Os dados cromossômicos obtidos pelos bandamentos G revelam padrões cromossômicos específicos que podem ser utilizados para análise filogenética, por métodos de comparações cladísticas (Baker *et al.*, 1987, 1989). As variações nos padrões de bandas G (originadas por fusões, inversões ou translocações cromossômicas) em diferentes grupos podem ser tratadas como um caráter na análise filogenética e, a identificação do estado primitivo ou derivado do caráter possibilita que se determine o tipo e o número dos rearranjos cromossômicos incorporados durante o curso de evolução. Além disso, similaridades nos padrões de bandas evidenciam uma homologia genética, isto é, uma origem evolutiva comum, enquanto que acentuadas diferenças nos padrões de bandas sugerem maior distanciamento em termos evolutivos (Baker *et al.*, 1987). Assim, caracteres identificados como derivados, designados apomórficos, e compartilhados por diferentes *taxa* podem ser utilizados para identificar subconjuntos monofiléticos, ou seja, com uma origem evolutiva comum.

Análises comparativas entre as espécies *Phyllostomus discolor* e *Phyllostomus hastatus* confirmaram a hipótese de que *Phyllostomus* tem uma taxa

conservativa de evolução cromossômica, assim como alguns gêneros de Stenodermatinae (*Artibeus*, *Sturnira* e *Platyrrhinus*). Rodrigues *et al.* (2000), pela análise de bandamento C, G e coloração Ag-NOR puderam sugerir uma filogenia cromossômica para o gênero *Phyllostomus*, assumindo que *P. discolor* é a condição primitiva para o gênero.

3. A Citogenética Molecular

Uma grande parte dos rearranjos cromossômicos que ocorreram na evolução dos diferentes grupos de vertebrados pode ser, como vimos, determinada pelos bandamentos cromossômicos convencionais. Porém, há situações onde muitos dos fenômenos genéticos que contribuíram para a diferenciação das espécies ocorreram ao nível gênico, só podendo ser evidenciados cromossomicamente por métodos como o da citogenética molecular.

Os estudos citogenéticos moleculares utilizam-se de reagentes da biologia molecular para estudar as mudanças genéticas. O método de hibridização *in situ* fluorescente (FISH) tem sido bastante utilizado neste tipo de estudo. Esta técnica envolve o uso de sondas de DNA marcadas não isotopicamente, que são hibridizadas com o material a ser analisado. A detecção da hibridização é feita por processos imunocitoquímicos, podendo ser visualizada sob microscopia de fluorescência. As sondas utilizadas podem ser obtidas a partir do DNA genômico ou de regiões específicas (como regiões centroméricas, teloméricas ou ribossômicas) de qualquer

organismo e, um mesmo tipo de sonda de DNA pode gerar diferentes informações, relativas aos fenômenos cromossômicos responsáveis pelas variações que são observadas nos animais.

A hibridização genômica comparativa (ZOO-FISH) é uma variação da técnica de FISH e tem também assumido um importante papel no estudo da organização do genoma e nos estudos evolutivos. Através desta técnica, os segmentos cromossômicos ou cromossomos inteiros podem ser comparados e, grandes ou pequenas variações, detectadas através de microscopia óptica. Neste processo de hibridização, os fragmentos de DNA genômico ou os cromossomos inteiros, obtidos pela ação de enzimas de restrição e marcados não isotopicamente, podem funcionar como sondas que são hibridizadas com material metafásico de diferentes organismos.

A aplicação da técnica FISH em cromossomos de várias espécies de mamíferos tem gerado um grande número de informações sobre a constituição cromossômica e a evolução das espécies.

Através do uso de sondas específicas de cromossomos humanos tem sido possível verificar as homologias existentes entre os cromossomos humanos e os cromossomos de muitas outras espécies de mamíferos (Müller *et al.*, 1997, 1999; Bielec *et al.*, 1998; Volleth *et al.*, 1999; Richard *et al.*, 2001). Vezuli *et al.* (1997), usando sondas específicas de cromossomos humanos, determinaram através da hibridização genômica comparativa, as homologias de cromossomos humanos com os cromossomos de seis espécies de lêmures, confirmando sugestões anteriores de

homologias identificadas por bandamentos cromossômicos convencionais e, além disso, alguns rearranjos novos foram verificados modificando alguns pontos na filogenia destas espécies.

Em morcegos, poucos têm sido os estudos de hibridização genômica comparativa. Volleth *et al.* (1999), aplicando sondas de cromossomos humanos em exemplares da espécie *Glossophaga soricina* (Glossophaginae), encontrou homologias para todas as sondas utilizadas, podendo verificar que certas associações cromossômicas que já haviam sido detectadas por ZOO-FISH em outros grupos, também estão presentes em morcegos. Além disso, os autores puderam levantar questionamentos com relação à filogenia dentro da família Phyllostomidae, citando a condição observada em *Glossophaga* como a possível condição ancestral para a família.

Nos estudos intrafamiliares, a hibridização genômica comparativa tem sido usada, muitas vezes, em complementação a resultados obtidos através de bandamentos, permitindo um melhor esclarecimento dos aspectos evolutivos que envolvem as espécies (Bosma *et al.*, 1996; Robinson *et al.*, 1996; Svartman & Vianna-Morgante, 1999). Nash *et al.* (1998), através do uso de sondas derivadas de cromossomos de gato doméstico, urso panda e homem, puderam detectar trocas cromossômicas que ocorreram durante a evolução da família Ursidae e, as análises de homologias entre os cromossomos permitiram a reconstrução da composição genômica de um possível cariótipo ancestral.

Como vimos anteriormente, entre os eventos cromossômicos envolvidos na diferenciação dos cariótipos dos vertebrados, estão as fusões em *tandem* e Robertsonianas. Ambas dependem de modificações que envolvem especialmente os centrômeros e os telômeros, que são reconhecidos como unidades funcionais próprias da estrutura cromossômica.

Os telômeros constituem-se por unidades curtas, geralmente com cinco a oito pares de bases repetidas em *tandem*, ricas em guanina, representadas como (TTAGGG)_n (Moyzis *et al.*, 1988; Beissman & Masson, 1994).

Em vertebrados, as seqüências teloméricas foram originalmente isoladas de bibliotecas de DNA repetitivo humano. Estas seqüências são semelhantes nas demais espécies de vertebrados, podendo ser utilizadas como sondas em estudos de hibridização (Moysis *et al.*, 1988; Meyne *et al.*, 1989; Metcalfe *et al.*, 1998; Liu & Fredga, 1999).

Embora as seqüências de DNA telomérico caracteristicamente devam ser observadas nos telômeros dos cromossomos, os estudos de hibridização têm mostrado que em várias espécies de vertebrados, os sítios teloméricos estão também presentes em regiões não teloméricas, ou seja, em regiões pericentroméricas, centroméricas e intersticiais e, geralmente associados a blocos de heterocromatina constitutiva (Meyne *et al.*, 1990; Arnason *et al.*, 1988; Luke & Verma, 1993; Beissmann & Masson, 1994; Garagna *et al.*, 1997, Pagnozzi *et al.*, 2000). A origem e a função das seqüências de DNA telomérico em regiões não-teloméricas não foram

ainda esclarecidas, mas várias hipóteses já foram levantadas a respeito do que elas poderiam representar.

Uma delas é a de que a presença de seqüências teloméricas em regiões intersticiais, denominadas telômeros internos (ITs), e regiões centroméricas seriam remanescentes de telômeros de cromossomos envolvidos em rearranjos do tipo fusão, durante o processo de especiação (Meyne *et al.*, 1989, 1990; Lee *et al.*, 1993; Vermeesch *et al.*, 1996; Fagundes & Yonenaga-Yassuda, 1998; Carvalho & Mattevi, 2000; Andrades-Miranda *et al.*, 2002).

Contudo, há trabalhos que sugerem a perda dos telômeros durante o processo de fusão de cromossomos acrocêntricos, envolvidos na formação de metacêntricos robertsonianos (Rb) (Nanda *et al.*, 1995; Garagna *et al.*, 1995, 2001; Rogatcheva *et al.*, 2000).

Slijepcevic (1998) destaca duas situações que podem ocorrer com os telômeros nos vários fenômenos cromossômicos: 1) a fusão envolvendo perda de seqüências teloméricas através do encurtamento dos telômeros e, 2) fusões sem perda de seqüências. Esta segunda situação aparentemente é a mais complexa. A presença de seqüências teloméricas intersticiais é inconsistente com o papel funcional dos telômeros, sugerindo que esses “telômeros intersticiais” devem ter perdido sua função parcial ou completamente antes ou durante o evento de fusão.

Um dos principais fatores determinantes da função dos telômeros é a presença de proteínas específicas que ligam-se às seqüências teloméricas (Zakian,

1995; Shen *et al.*, 1997). Estas proteínas podem ser inativadas pela presença de outras proteínas que encontram-se na suas proximidades, como por exemplo, as proteínas centroméricas. A inativação das proteínas associadas às seqüências teloméricas ocasionaria a perda da função de telômero (Slijepcevic, 1998).

Os sítios de DNA telomérico intersticiais são aparentemente estáveis e ocorrem também em vários organismos como plantas, ciliados e nematodos (Arnason *et al.*, 1988; Luke & Verma, 1993; Beissmann & Masson, 1994; Garagna *et al.*, 1997; Pagnozzi *et al.*, 2000).

Uma outra hipótese para a ocorrência de sítios de DNA telomérico não terminais é a de que as seqüências teloméricas intersticiais seriam reservatórios de seqüências teloméricas. Quebras ocorridas nos ITs estariam envolvidas na fixação da alteração cromossômica durante a evolução do cariótipo, fornecendo novos finais cromossômicos que podem ser reconhecidos pela telomerase (Giulotto, 1997).

A origem e função das seqüências de DNA telomérico em regiões não teloméricas não foram ainda esclarecidas. Azzalin *et al.* (2001) clonando e comparando com bases de dados às seqüências ITs humanas identificaram três classes de ITs no genoma humano: (1) as ITs curtas, compostas de poucas unidades exatas de T₂AG₃; (2) longas repetições incluindo unidades degeneradas subteloméricas diretas (ITs subteloméricos) e (3) ITs de fusões, nas quais duas extensões de repetições teloméricas estão orientadas cabeça com cabeça. Este estudo ao contrário de outros, também indicou que os sítios teloméricos intersticiais produzidos por fusão de finais

cromossômicos é um evento raro e que, grande parte dos ITs foram geradas pela inserção de DNA telomérico durante o reparo de quebras na fita dupla do DNA.

Pelo exposto, fica evidente que os resultados obtidos nos diferentes estudos, procurando conhecer e caracterizar os vários aspectos citogenéticos clássicos ou moleculares para os diferentes organismos, poderão esclarecer muitos dos fenômenos considerados, além de consistirem em subsídios importantes para as interpretações evolutivas.

II. OBJETIVOS

Com base no exposto na Introdução e, na ênfase em obter informações que possam colaborar no esclarecimento sobre a origem dos morcegos exclusivamente neotropicais, pretendeu-se:

- a) Verificar, através de análises comparativas do bandamento G, se ocorrem homologias nos padrões de bandas entre espécies de Molossidae e Phyllostomidae;
- b) Identificar os rearranjos ocorridos na evolução dos cariótipos das espécies;
- c) Com o uso da Hibridização Genômica Comparativa, verificar as homologias dos segmentos cromossômicos;
- d) Determinar a localização dos sítios de DNA telomérico nos cromossomos das diferentes espécies;
- e) Interpretar os resultados dos estudos comparativos interespecíficos e;
- f) Obter informações mais detalhadas sobre a evolução cromossômica em Chiroptera.

III. MATERIAL E MÉTODOS

1. Espécies

Foram analisados citogeneticamente oito espécies de morcegos pertencentes às famílias Phyllostomidae e Molossidae. As seis espécies de Phyllostomidae analisadas pertencem a quatro subfamílias: Stenodermatinae (*Artibeus planirostris*, *Platyrrhinus lineatus* e *Sturnira lilium*); Phyllostominae (*Phyllostomus hastatus*); Glossophaginae (*Glossophaga soricina*); e Carollinae (*Carollia perspicillata*). De Molossidae foram analisados espécimes representantes de duas espécies da subfamília Molossinae: *Molossus ater* e *Molossus molossus*.

2. Coletas

Para a obtenção dos 90 espécimes trabalhados, foram realizadas coletas em área urbana e rural da região de São José do Rio Preto/SP e Campo Grande/MS (Tabela 1).

As coletas foram realizadas à noite, com o auxílio de redes do tipo “mist-nets”, que foram dispostas em possíveis rotas de vôo e saídas de abrigo. Os animais capturados foram conduzidos para o laboratório e processados para o estudo citogenético.

Todos os exemplares, exceto os de Campo Grande, foram depositados na Coleção de Quirópteros junto ao Departamento de Zoologia e Botânica do IBILCE-UNESP – SJRP.

Tabela 1. Discriminação dos espécimes coletados pela família, espécie, sexo e procedência. M = macho; F = fêmea.

Família	Espécie	Sexo	Procedência
Phyllostomidae	<i>Artibeus planirostris</i>	1M	Campo Grande/MS
		1M	Engenheiro Schmidt/SP
		2M	Mirassol/SP
		3M	Nova Aliança/SP
		1F	Nova Granada/SP
		1F	Olímpia/SP
		13M; 3F	S. J. Rio Preto/SP
	<i>Platyrrhinus lineatus</i>	1M	Campo Grande/MS
		1M	Nova Granada/SP
		2M; 1F	Mirassol/SP
		7M; 7F	S. J. Rio Preto/SP
	<i>Sturnira lilium</i>	1F	Engenheiro Schmidt/SP
		1F	Mirassol/SP
	<i>Carollia perspicillata</i>	1M; 3F	S. J. Rio Preto/SP
		1M; 1F	Guapiaçu/SP
		2M	Nova Aliança/SP
	<i>Glossophaga soricina</i>	1M	Mirassol/SP
		5M; 2F	S. J. Rio Preto/SP
		1M; 1F	Engenheiro Schmidt/SP
		2M	Nova Granada/SP
2M; 2F		Mirassol/SP	
<i>Phyllostomus hastatus</i>	1M; 2F	S. J. Rio Preto/SP	
	4F	S. J. Rio Preto/SP	
	1M	Engenheiro Schmidt/SP	
	1M	Olímpia/SP	
Molossidae	<i>Molossus ater</i>	1M	Nova Aliança/SP
		4M	S. J. Rio Preto/SP
	<i>Molossus molossus</i>	1M; 1F	Bady Bassitt/SP
		1M	Nova Aliança/SP
		3M	S. J. Rio Preto/SP

3. Preparações Cromossômicas

As preparações cromossômicas foram obtidas a partir de medula óssea e cultura de fibroblastos.

a) Preparação direta de medula óssea

As preparações de medula óssea seguiram o procedimento descrito em Varella-Garcia & Taddei (1989):

No dia subsequente à coleta, injetou-se no animal subcutânea e dorsalmente 0,2 ml de suspensão de fermento glicosado para cada 25g de peso corporal do animal, com o objetivo de induzir a ocorrência de mitoses nas células precursoras de linfócitos. Após cerca de 24 horas injetou-se intra-peritonealmente 0,2 ml de colquicina 0,05%, para cada 25g peso corporal, a fim de inibir a formação do fuso mitótico nas células.

Decorridos 30 a 40 minutos após a injeção de colquicina, os animais foram mortos, seus úmeros removidos e a medula foi recolhida em um tubo de centrífuga com o auxílio de uma seringa e solução salina de Hanks. As massas celulares foram desfeitas com sucessivas aspirações com a própria seringa e a suspensão foi centrifugada por 5 minutos a 1000 rpm. O sobrenadante foi descartado e, em seguida, foram acrescentados 8 ml de solução hipotônica KCl 0,075M a 37°C. Decorridos 30 minutos de incubação a 37°C a suspensão foi centrifugada por 5 minutos a 1000 rpm, o sobrenadante foi descartado e foram adicionados 6 ml de fixador metanol-ácido acético 3:1.

Após 15 minutos, a suspensão foi centrifugada, desprezou-se o sobrenadante e adicionou-se novo volume de fixador. Essa operação foi repetida mais uma vez sempre ressuspendendo-se o precipitado em 0,5 – 1,0 ml de fixador. O material foi, então, pingado em lâminas molhadas e geladas.

b) Cultura de fibroblastos

As culturas de fibroblastos foram obtidas a partir do cultivo de fragmentos de pulmão. O procedimento para a iniciação e manutenção das culturas seguiu o protocolo descrito em Morielle-Versute & Varella-Garcia (1995).

b.1. Coleta de amostra de tecido para iniciação de culturas

celulares

Após a morte do animal, foi feita uma assepsia na região abdominal com álcool a 70°Gl e, em seguida, com bisturi e tesoura esterilizados foi feita uma incisão próxima às costelas e na caixa torácica. Os pulmões foram retirados e colocados em um frasco contendo meio de cultura Ham F-10 completo (10% de soro fetal bovino, penicilina: 1.000.000 U/ml, quemeticina: 40.000 mg/ml e anfotericina B: 5 µg/ml). O frasco foi levado à geladeira, onde permaneceu por 24 horas.

b.2. Montagem e manutenção da cultura

O frasco com os pulmões foi transferido para uma câmara de fluxo laminar para o manuseio em condições assépticas. A biópsia foi transferida para uma placa de petri contendo meio de cultura completo, onde foi recortada várias vezes. Os recortes foram transferidos à superfície inferior de um ou mais frascos de cultivo de células, nos quais foram adicionados 2 ml de meio Ham F-10 completo. Os frascos foram incubados em estufa a 37°C por 3 dias. Posteriormente, os frascos foram observados ao microscópio invertido para verificação de aderência ao substrato e proliferação de células. Na presença de crescimento celular, mais 3 ml de meio foram adicionados. Os frascos foram novamente conduzidos à estufa e observados diariamente para verificar alterações do pH do meio, ocorrência de contaminação por fungos e bactérias e o índice de proliferação celular. Na presença contaminação ou ausência de crescimento, os frascos foram descartados.

b.3. Tripsinização das culturas

Após cerca de uma ou duas semanas do início do crescimento celular, se as células cresceram em amontoados, foi feita a tripsinização da cultura para que elas se espalhassem.

O meio de cultura foi retirado dos frascos e cerca de 5 ml de solução salina de Hanks sem cálcio e magnésio foram colocados para a diluição dos resíduos de meio que permaneceram no frasco. O Hanks foi retirado e, em seguida, acrescentou-se 1 ml de tripsina/EDTA (cultilab) a 37°C. Após cerca de 1 minuto, a

tripsina foi retirada e 5 ml de meio novo foram adicionados. Os frascos foram agitados para que as células se desprendessem e espalhassem, sendo novamente conduzidos a estufa.

b.4. Subdivisão da cultura

Quando os frascos estavam totalmente forrados de células, foi feita a replicagem ou subdivisão da cultura. Para isso, retirou-se o meio dos frascos e lavou-se as culturas com 5 ml de Hanks sem cálcio e magnésio. Em seguida, acrescentou-se 1 ml de tripsina/EDTA a 37°C, que permaneceu nos frasco por cerca de um minuto. A tripsina foi retirada, 5 ml de meio completo foram adicionados e os frascos foram agitados fortemente para que as células se desprendessem. A metade do conteúdo de cada frasco foi transferida para outro frasco e o volume completado para 5 ml de meio completo. Os frascos retornaram à estufa para que as células se rearranjassem, adquirindo condições favoráveis ao crescimento.

b.5. Bloqueio de cultura e preparação das lâminas

Para a obtenção das metáfases adicionou-se às culturas em crescimento 0,05 ml de colquicina 4×10^{-4} M. Decorridos aproximadamente 30 minutos, o meio de cultivo foi removido e substituído por cerca de 8 ml de solução de citrato de sódio a 1%. Após 30-40 minutos as células estavam hipotonizadas e descoladas. Três gotas de fixador metano-l-acético (3:1) foram adicionadas ao frasco e a suspensão de células foi recolhida em tubo de centrífuga e centrifugada por 5

minutos a 1000 rpm. O sobrenadante foi descartado, o precipitado foi ressuspenso e novo volume de fixador foi colocado junto ao precipitado. Após 15 minutos, a suspensão celular foi novamente centrifugada, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi novamente ressuspenso, fixado e centrifugado. Essa operação foi repetida mais uma vez e o material obtido foi pingado em lâminas molhadas e geladas.

4. Técnica de bandamento G

O bandamento que foi usado para determinação do padrão de bandas longitudinais dos cromossomos foi o bandamento G. Este foi processado de acordo com a técnica de De Grouchy & Turleau (1977), com modificações.

Lâminas com quinze a vinte dias de fixação foram imersas em solução de álcool metílico 50% por dois minutos. Após lavagem em água destilada, por dois minutos, as lâminas foram transferidas para solução tampão Sorensen, pH 6,8 onde permaneceram por cerca de quinze a trinta minutos. A seguir, foram imersas em solução de tripsina (DIFCO) a 0,2%, tamponada com solução salina de PBS, por um tempo variável de cinco a vinte segundos, dependendo do período decorrido após a fixação do material. O excesso de tripsina foi retirado pela imersão da lâmina em solução salina de PBS, sendo o material posteriormente corado com solução a 2% de Giemsa tamponada, por três minutos, e lavado em água destilada.

As lâminas foram observadas sob microscopia de luz e as metáfases representativas dos padrões de bandas foram fotografadas em microscópio Zeiss em

aumento de 1000 – 1250 x. O filme empregado foi ILFORD PANF 50 ASA e 100 ASA. Na revelação dos filmes foi utilizado o revelador Kodak D-72, e as imagens obtidas foram copiadas em papel kodabrome Print F2 e F3 da Kodak. As melhores metáfases documentadas foram utilizadas para a montagem dos cariótipos e comparações interespecíficas. As pranchas foram fotografadas em filme TMAX ASA 100, reveladas em D-72 e fotopiadas em Kodabrome Print F3.

5. Extração do DNA Genômico

Para a extração de DNA dos espécimes e preparo da sonda genômica, foram utilizados fragmentos de pulmão, fígado e rim. Após serem recortados, os pequenos fragmentos foram transferidos para um tubo estéril onde foi acrescentado 3 ml de tampão de lise (10 mM Tris, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl, 0,5 % Tween 20) e proteinase K na concentração 200 µg/ml, para a digestão enzimática. O tubo foi agitado e colocado em banho a 37°C overnight. Decorrido esse período, a solução viscosa obtida foi centrifugada por 15 minutos a 2000 rpm, o sobrenadante foi transferido para um tubo novo, onde foram adicionados 0,5 volume de acetato de potássio (5M) e 2,5 volumes de etanol absoluto gelado para a precipitação do DNA. O DNA precipitado foi recolhido com o auxílio de uma micropipeta, diluído em tampão TE (10 mM Tris/1 mM EDTA), dividido em alíquotas e congelado a – 20°C.

A estimativa da concentração e a verificação do grau de pureza do DNA extraído foram feitas através da leitura da absorbância das amostras de DNA, tomadas com espectrofotômetro.

Após a verificação das condições do DNA extraído ele foi devidamente identificado e utilizado no preparo da sonda genômica.

6. Preparo da Sonda Genômica

Para o preparo da sonda genômica, o DNA das espécies utilizadas foi inicialmente marcado com biotina para posterior detecção no processo de hibridização. Para a marcação com biotina foi empregado o Kit de marcação BioNick labeling system da Gibco (nºCat. 18247-015).

O protocolo de marcação da sonda foi o recomendado pelo fabricante. Cerca de 1µg de DNA foi misturado a 5 µl de dNTP marcado, 5 µl da solução de enzimas e o volume foi completado para 50 µl com água milli Q autoclavada. O material após ser misturado, foi centrifugado a 15.000 rpm por 5 segundos e incubado a 16°C por duas horas. Em seguida 5 µl de stop buffer foram adicionados para finalizar a reação.

Após a marcação, o DNA foi associado ao Cot-1 DNA de camundongo e DNA de esperma de salmão para suprimir regiões repetitivas (DNA satélite) e facilitar a ligação da sonda com as regiões de afinidade.

A cada 1 µg de DNA marcado foram adicionados 50 µg de DNA de

esperma de salmão. Em seguida, o DNA foi purificado com 1/10 volumes de acetato de sódio 3M e 2,5 volumes de etanol absoluto gelado, e a solução congelada a -20°C overnight. Posteriormente, o material foi centrifugado por 30 minutos a 12.000 rpm, o sobrenadante foi descartado e o precipitado de DNA foi seco e dissolvido em 100 μl de TE (concentração final: 10 ng DNA/ μl de TE). Para cada 50 ng de DNA marcado e purificado foram adicionados 2,5 μg de Cot-1 DNA de camundongo. Após nova precipitação com acetato de sódio 3M e etanol absoluto, o material foi centrifugado por 30 minutos a 12.000 rpm.

O precipitado de DNA (já denominado sonda) foi seco a 37°C por 15 minutos, dissolvido em 10 μl de mistura de hibridização (50% formamida, 10% w/v dextran sulfato, 1% v/v tween 20 em 2xSSC) e incubado a 37°C por 5 minutos. Após uma rápida centrifugação (2 segundos) a sonda foi congelada a -20°C até o momento do uso.

Para a hibridização, a sonda foi desnaturada em banho a 75°C por 10 minutos, incubada em gelo por 5 minutos e centrifugada por 5 segundos. Em seguida, a sonda foi colocada em banho a 37°C por 30 – 45 minutos para o “pré-annelling” das seqüências repetitivas. Posteriormente, foi incubada em gelo por 5 minutos, centrifugada por 5 segundos e mantida no gelo até o uso. Para cada lâmina 26 x 72 mm foram aplicados 14 μl de sonda em cada extremidade da lâmina (cerca de 150 ng de sonda).

7. Hibridização *in situ* fluorescente

a) Genômica

As hibridizações genômicas foram realizadas nos cromossomos após cerca de 14 dias da preparação das lâminas.

O procedimento envolveu um pré-tratamento dos cromossomos, onde as lâminas foram inicialmente desidratadas em uma série de álcoois (70, 85 e 100%) por 2 minutos cada, passadas em solução de ácido acético 70% por um minuto e imediatamente enxaguadas em dois banhos de PBS (1x) 4 minutos cada. Após nova desidratação em série de álcoois, as lâminas foram limpas em solução de RNase (1 µl da solução mãe (10mg/ml) para 99 µl de 2xSSC) por 30 minutos em câmara úmida a 37°C. Em seguida, foram lavadas em 3 banhos de 2xSSC pH 7,0 por 5 minutos cada, novamente desidratadas e passadas em solução de pepsina (50 ml água, 42 µl de HCl 12N e 50 µl de pepsina solução estoque a 8%).

As lâminas foram, então, desnaturadas em solução de formamida 70% pH 7,0 a 70°C por 2,5 minutos. A desnaturação foi interrompida pela lavagem das lâminas em uma série de álcoois gelados e, após secarem, foram colocadas a hibridizar com a sonda genômica em câmara úmida a 37°C por cerca de 48 horas.

Após a hibridização, as lâminas foram lavadas em 2 banhos de formamida 50% em 2xSSC a 45°C por 6 minutos cada e em 1 banho de 2xSSC a 45°C por 10 minutos. Em seguida foram colocadas em solução bloqueadora I (5% w/v leite em pó desnatado em washing buffer I) à TA por 20 minutos e enxaguadas em washing buffer I (4xSSC e 0,05% v/v tween 20) à TA por 5 minutos

Para a detecção, as lâminas foram incubadas em FITC-avidina produzido pela Vector, diluído em bloqueador I na concentração 2 μl : 1000 μl a 37°C, por 20 minutos. Após esse período as lâminas foram lavadas por 5 minutos em washing buffer I e washing buffer II (tampão TNE e 0,05% v/v tween 20). Posteriormente, seguiu-se a adição do anticorpo anti-avidina também da Vector em bloqueador II (5% w/v de leite em pó desnatado em washing buffer II) na concentração 2 μl : 200 μl e incubação a 37°C, por 20 minutos. As lâminas foram lavadas em 3 banhos de washing buffer II a 37°C, 5 minutos cada e incubadas novamente em FITC-avidina em bloqueador II (2 μl /1000 μl) a 37°C, por 20 minutos. Em seguida, foram lavadas em 3 banhos de washing buffer II a 37°C, 5 minutos cada, em um banho de PBS (1x) à temperatura ambiente, desidratadas na série de álcoois, secas e coradas com iodeto do propídeo (IP) 0,3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ e diamidino-fenilindole 0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (DAPI).

As lâminas foram analisadas em microscópio de epifluorescência da Zeiss com lâmpada de 50 watt, em filtro apropriado. Os resultados foram documentados por fotomicrografias em filme Supra ou Ektachrome 400 asa da Kodak.

b) Com sonda telomérica

As hibridizações com sonda telomérica também foram realizadas em preparações cromossômicas após cerca de 14 dias da preparação das lâminas. No

processo de hibridização para determinação dos sítios de DNA telomérico nos cromossomos dos morcegos, foi utilizada a sonda de seqüências teloméricas de cromossomos humanos (All human telomere – Oncor, nº Cat. P 50 97) marcada com digoxigenina.

As lâminas foram submetidas a um pré-tratamento, onde elas foram inicialmente lavadas em 2xSSC a 37°C por 8 minutos, desidratadas em série de álcoois (70, 85 e 100%) e desnaturadas em solução de formamida 70%, pH 7,0 a 70°C durante 2 minutos cada.

Após a lavagem em uma série de álcoois gelados, o material foi hibridizado com a sonda de seqüências teloméricas, por um período de 24 - 48 horas, em câmara úmida com formamida a 37°C. Após a hibridização as lâminas foram lavadas em formamida 30% por 8 minutos, em 1 banho de 2xSSC 37°C por 8 minutos, e em 1xPBD por 5 minutos.

A detecção da hibridização foi feita com o emprego do kit de detecção digoxigenina – fluoresceína-isocianato (FITC), também da Oncor, (S 1331 – DF). As lâminas foram incubadas primeiramente com o anticorpo 1 (FITC-labeled anti-digoxigenin) a 37°C por 20 minutos. Em seguida, as lâminas foram lavadas três vezes em washing buffer II a 37°C por 5 minutos cada. Posteriormente, foi adicionado o segundo anticorpo (rabbit anti-sheep) e as lâminas foram novamente incubadas a 37°C por 30 minutos. As lâminas foram, então, lavadas em 3 banhos de washing buffer II a 37°C por 5 minutos cada e incubadas em um outro anticorpo (fluorescein-labeled anti-rabbit), a 37°C por 30 minutos. Em seguida, as lâminas

foram lavadas em 3 banhos de washing buffer II a 37°C, 5 minutos cada, desidratadas em série de álcoois, secas e coradas com os contracorantes iodeto do propídeo (IP) 0,3 µg/ml e diamidino-fenilindole (DAPI) 0,5 µg/ml.

As lâminas hibridizadas foram analisadas em microscópio de epifluorescência da Zeiss com lâmpada de 50 watt, em filtro apropriado e os resultados foram documentados por fotomicrografias em filme supra ou Ektachrome 400 asa da Kodak.

IV. RESULTADOS

1. Análise Citogenética Comparativa

1.1. Dos padrões de bandas G

A análise envolvendo a identificação de homologias inter-específicas e inter-familiar foi feita comparando-se os cariótipos de seis espécies da família Phyllostomidae: *Artibeus planirostris*, *Sturnira lilium*, *Platyrrhinus lineatus*, *Glossophaga soricina*, *Phyllostomus hastatus* e *Carollia perspicillata* com duas espécies da família Molossidae: *Molossus ater* e *Molossus molossus*.

Para a identificação de homologias cromossômicas entre Molossidae e Phyllostomidae foram realizadas comparações dos padrões de bandas G de todos os autossomos e dos cromossomos sexuais. A Tabela 2 sumariza os dados cariotípicos das oito espécies comparadas no presente trabalho.

Tabela 2: Sumário dos dados cariotípicos (morfológicos) das espécies comparadas. 2n = número diplóide; NF = número fundamental; M = metacêntrico; SM = submetacêntrico; ST = subtlocêntrico; A = acrocêntrico

Família	Espécie	2n	NF	Cariótipo
Phyllostomidae	<i>A. planirostris</i>	30/31	56	11M-SM + 3ST + XY ₁ Y ₂
	<i>S. lilium</i>	30	56	11M-SM + 3ST + XY
	<i>P. lineatus</i>	30	56	11M-SM + 3ST + XY
	<i>G. soricina</i>	32	60	15M-SM + XY
	<i>P. hastatus</i>	32	58	14M-SM + 1A + XY
	<i>C. perspicillata</i>	20/21	36	7M-SM + 2ST + XY ₁ Y ₂
Molossidae	<i>M. ater</i>	48	64	4M-SM + 5ST + 14A + XY
	<i>M. molossus</i>	48	64	4M-SM + 5ST + 14A + XY

1.1.1 *A. planirostris*, *P. lineatus* e *S. lilium* (Stenodermatinae), *M. ater* e *M. molossus* (Molossidae)

A espécie *A. planirostris* tem número diplóide de cromossomos igual a 30 nas fêmeas e 31 nos machos (2N = 30/31), e um número fundamental, ou seja, número de braços cromossômicos do complemento autossômico igual a 56 (NF = 56).

A variação no número diplóide de cromossomos entre machos e fêmeas é devida ao sistema de determinação sexual do tipo XX/XY₁Y₂, resultante de uma translocação X/autossomo. O cromossomo X resultante é um subtlocêntrico de

tamanho médio, o cromossomo Y_1 (o verdadeiro Y) é acrocêntrico pequeno, e o Y_2 , o homólogo livre do autossomo translocado no cromossomo X, é acrocêntrico, com cerca de o dobro do tamanho do Y_1 .

Os cariótipos de *P. lineatus* e *S. lilium* apresentam $2n = 30$ e $NF = 56$, e assemelham-se morfológicamente ao cariótipo de *Artibeus*, apresentando a mesma constituição quanto aos autossomos e um sistema de determinação de sexo do tipo XX/XY. O cromossomo X é um submetacêntrico médio e o cromossomo Y é um acrocêntrico pequeno, com cerca de o dobro do tamanho do Y_1 de *A. planirostris*.

Nas três espécies, ou seja, *A. planirostris*, *P. lineatus* e *S. lilium* o complemento autossômico é constituído por 11 pares de cromossomos metacêntricos e submetacêntricos (1 a 4 e 8 a 14) e três pares de cromossomos submetacêntricos (5 a 7).

As espécies *M. ater* e *M. molossus* têm cariótipos semelhantes, apresentando um número diplóide de cromossomos igual a 48 ($2n = 48$) e um número fundamental igual a 64 ($NF = 64$). Em ambas o complemento autossômico constitui-se por um par de submetacêntricos muito grandes (1), três pares de submetacêntricos médios (2, 4 e 7), cinco pares de submetacêntricos médios a pequenos (8, 10, 13, 17 e 20) e 14 pares de acrocêntricos médios a pequenos (3, 5, 6, 9, 11, 12, 14, 15, 16, 18, 19, 21, 22, e 23). O cromossomo X é um submetacêntrico de tamanho médio e o Y é um acrocêntrico pequeno.

A análise comparativa evidenciou que as espécies *A. planirostris*, *P. lineatus* e *S. lilium* têm padrões de bandas G muito similares, como se verifica na

Figura 1. Todos os autossomos apresentam homologia completa de bandas ao nível de resolução cromossômica obtida.

Devido a esta característica, na comparação com *Molossus* foi usado como referência apenas o cariótipo de *A. planirostris*.

À semelhança das espécies de Stenodermatinae, *M. ater* e *M. molossus* também apresentam homologias entre os seus autossomos. Todos os cromossomos são reconhecidos como homólogos nas duas espécies (Figura 2).

A análise comparativa entre as três espécies de Stenodermatinae (através da comparação com *A. planirostris*) e as duas espécies de *Molossus*, possibilitou a identificação de homologias de cromossomos inteiros e segmentos cromossômicos, as quais estão ilustradas na Figura 3 e descritas abaixo:

- Os cromossomos submetacêntricos 10 e 11 de *A. planirostris*, *P. lineatus* e *S. lilium* são homólogos completos aos cromossomos submetacêntricos 2 e 4 de *Molossus*;
- Os cromossomos submetacêntricos 1, 2, 4, 8 e 12 de *A. planirostris*, *P. lineatus* e *S. lilium* são homólogos, respectivamente, aos cromossomos acrocêntricos e subtelocêntricos 6 (1p) e 3 (1q), 11 (2p) e 9 (2q), 17 (4p) e 5 (4q), 16 (8p) e 13 (8q) e, 15 (12p) e 18 (12q) de *Molossus*;
- O cromossomo submetacêntrico 3 de *A. planirostris*, *P. lineatus* e *S. lilium* é homólogo aos cromossomos subtelocêntricos 10 (3p) e 8 com inversão pericêntrica proximal (3q) de *Molossus*;

- O braço longo do cromossomo subtelocêntrico 5 de *A. planirostris*, *P. lineatus* e *S. liliium* é homólogo ao braço longo do cromossomo 1 de *Molossus*. Nenhuma homologia foi observada entre o braço curto do cromossomo 5 e os cromossomos de *Molossus*;

- O braço curto do cromossomo subtelocêntrico 6 de *A. planirostris*, *P. lineatus* e *S. liliium* é homólogo ao cromossomo acrocêntrico 21 de *Molossus* e, o braço longo, ao braço curto do cromossomo submetacêntrico 1 de *Molossus*;

- O cromossomo subtelocêntrico 7 de *A. planirostris*, *P. lineatus* e *S. liliium* é homólogo ao cromossomo submetacêntrico 7 e ao cromossomo acrocêntrico 23 de *Molossus*;

- Nenhuma homologia pôde ser identificada entre o cromossomo 9 de *A. planirostris*, *P. lineatus* e *S. liliium* e os cromossomos de *Molossus*;

- O cromossomo submetacêntrico 13 de *A. planirostris* é homólogo ao cromossomo 19 de *Molossus*, diferenciando-se deste apenas por uma inversão pericêntrica proximal;

- O cromossomo submetacêntrico 14 de *A. planirostris* é homólogo ao cromossomo subtelocêntrico 20 de *Molossus* diferenciando-se deste apenas por uma inversão pericêntrica proximal.

A. planirostris apresentou no seu cariótipo 29 dos 32 braços cromossômicos de *Molossus*, representados pelos braços dos cromossomos 1 a 11, 13, 15 a 21 e 23. Apenas os braços dos cromossomos 12, 14 e 22 de *Molossus* não puderam ser reconhecidos no cariótipo de *A. planirostris*.

Nota-se pela Figura 3 A que *A. planirostris* compartilha com *Molossus* dois cromossomos inteiros (cromossomos 10 e 11) e, pela Figura 3 B e C, que oito cromossomos (cromossomos 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8 e 12) podem representar fusões de cromossomos acrocêntricos, submetacêntricos e subtelocêntricos de *Molossus*.

Além das fusões, nota-se que rearranjos como inversões pericêntricas diferenciam alguns cromossomos de Stenodermatinae e Molossidae (Figura 3 C).

1.1.2 *G. soricina* (Glossophaginae), *M. ater* e *M. molossus* (Molossidae)

A espécie *G. soricina* apresenta $2n = 32$ e $NF = 60$. Seu cariótipo constitui-se de 15 pares de cromossomos autossomos metacêntricos e submetacêntricos (par 1 a 15) e um par de cromossomos sexuais do tipo XY. O cromossomo X é um submetacêntrico de tamanho médio e o Y um acrocêntrico pequeno. A análise comparativa dos padrões de bandas G entre *G. soricina* e *Molossus* possibilitou a identificação de muitas homologias ilustradas na Figura 4 e descritas abaixo:

- Os cromossomos submetacêntricos 1, 10 e 11 de *G. soricina* são homólogos completos, respectivamente, aos cromossomos 1, 2 e 4 de *Molossus*;
- Os cromossomos submetacêntricos 2, 3, 5, 7, e 9 de *G. soricina* são homólogos, respectivamente, aos cromossomos acrocêntricos e subtelocêntricos 6

(2p) e 3 (2q), 14 (3p) e 9 (3q), 17 (5p) e 5 (5q), 16 (7p) e 13 (7q), e 15 (9p) e 18 (9q) de *Molossus*;

- O braço curto do cromossomo 4 de *G. soricina* é homólogo ao cromossomo subtelocêntrico 8 de *Molossus*, e o braço longo, ao cromossomo submetacêntrico 7 após uma inversão pericêntrica proximal;

- A região proximal mediana do braço curto do cromossomo submetacêntrico 6 de *G. soricina* é homóloga ao cromossomo acrocêntrico 19 de *Molossus* e o braço longo desse mesmo cromossomo (6) é homólogo ao cromossomo subtelocêntrico 10 de *Molossus*. Nenhuma homologia foi identificada para a região mediana distal do cromossomo 6 de *G. soricina* e os cromossomos de *Molossus*;

- O braço curto do cromossomo submetacêntrico 8 de *G. soricina* é homólogo ao cromossomo acrocêntrico 21 de *Molossus*. Nenhuma homologia foi observada entre o braço longo do cromossomo 8 e os cromossomos de *Molossus*;

- Nenhuma homologia foi observada para os cromossomos 12 e 13 de *G. soricina* com os cromossomos de *Molossus*;

- O cromossomo submetacêntrico 14 de *G. soricina* é homólogo ao cromossomo subtelocêntrico 20 de *Molossus* diferenciando-se deste por uma inversão pericêntrica proximal;

- O braço longo do cromossomo submetacêntrico 15 de *G. soricina* é homólogo ao cromossomo acrocêntrico 22 de *Molossus*. Não foi encontrada homologia para o braço curto do cromossomo 15 e os cromossomos de *Molossus*.

Observa-se ainda pela Figura 4, que 29 braços cromossômicos de *Molossus*, representados pelos cromossomos 1 a 10 e 13 a 22, puderam ser reconhecidos no cariótipo de *G. soricina*. É possível observar também (Figura 4 A) que *G. soricina* e *Molossus* compartilham três cromossomos inteiros (cromossomos 1, 10 e 11) e sete cromossomos meta/submetacêntricos (2, 3, 4, 5, 6, 7 e 9) podem representar fusões de cromossomos acrocêntricos e subtelocêntricos observados no cariótipo de *Molossus* (Figura 4B e C).

Além desses, rearranjos do tipo inversões pericêntricas parecem diferenciar os cromossomos das duas espécies (Figura 4 C).

1.1.3 *P. hastatus* (Phyllostominae), *M. ater* e *M. molossus* (Molossidae)

O cariótipo de *P. hastatus* apresenta $2n = 32$ e $NF = 58$, sendo constituído de 15 pares de autossomos, 14 deles metacêntricos/submetacêntricos (1 a 14) e um acrocêntrico pequeno (15) com uma constrição secundária no braço curto. O cromossomo X é um submetacêntrico médio e o Y é um acrocêntrico pequeno. As homologias identificadas entre os autossomos de *P. hastatus* e *Molossus* estão ilustradas na Figura 5 e descritas abaixo:

- Os cromossomos submetacêntricos 1, 7, 9 e 11, e o cromossomo acrocêntrico 15 de *P. hastatus* são homólogos completos, respectivamente, aos cromossomos submetacêntricos 1, 2, 4 e 7, e ao acrocêntrico 23 de *Molossus*;

- Os cromossomos meta e submetacêntricos 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10 e 12 de *P. hastatus* são homólogos, respectivamente, aos cromossomos acrocêntricos e subtelocêntricos 11 (2p) e 9 (2q), 14 (3p) e 3 (3q), 8 (4p) e 6 (4q), 17 (5p) e 5 (5q), 12 (6p) e 10 (6q), 16 (8p) e 13 (8q), 15 (10p) e 18 (10q), e 22 (12p) e 21 (12q) de *Molossus*;

- O cromossomo submetacêntrico 13 de *P. hastatus* é homólogo ao cromossomo acrocêntrico 19 de *Molossus*, após uma inversão pericêntrica;

- O cromossomo submetacêntrico 14 de *P. hastatus* é homólogo ao cromossomo subtelocêntrico 20 de *Molossus*, após uma inversão pericêntrica proximal;

Apesar da diferença no grau de contração entre os cromossomos das duas espécies, nota-se que todos os cromossomos de *Molossus* podem ser reconhecidos no cariótipo de *P. hastatus*. Estas espécies compartilham cinco cromossomos inteiros (cromossomos 1, 7, 9, 11 e 15) representados na Figura 5 A e, oito cromossomos de *P. hastatus* podem representar fusões de cromossomos subtelocêntricos e acrocêntricos observados no cariótipo de *Molossus* (Figura 5 B).

Rearranjos do tipo inversões pericêntricas também justificam as diferenças na morfologia e padrões de bandas G das duas espécies (Figura 5 C).

1.1.4 *C. perspicillata* (Carollinae), *M. ater* e *M. molossus*

A espécie *C. perspicillata* apresenta $2n = 20$ nas fêmeas e 21 nos machos, e $NF = 36$. Semelhante ao que ocorre em *Artibeus*, a variação no número diplóide entre machos e fêmeas, é devida ao sistema de determinação sexual do tipo XX/XY_1Y_2 , resultante de uma translocação X/autossomo. A translocação X/autossomo, manifesta-se como um cromossomo subtelocêntrico grande, com uma constrição secundária no braço longo. O homólogo livre do autossomo translocado é um cromossomo telocêntrico médio designado Y_2 , e o Y_1 , o verdadeiro Y, é acrocêntrico pequeno.

Os cromossomos autossômicos consistem em um par de submetacêntricos grandes (1), dois pares de subtelocêntricos grandes (2 e 3), dois pares de submetacêntricos médios (4 e 5) e quatro pares de submetacêntricos e metacêntricos pequenos (6 a 9). Na Figura 6 está representado o bandamento G dos autossomos de *C. perspicillata*.

A análise comparativa dos padrões de bandas G não detectou homologias entre os cromossomos de *C. perspicillata* e *Molossus*. Nenhum grupo de ligação representado pelas bandas G constantes em diferentes espécies pôde ser reconhecido.

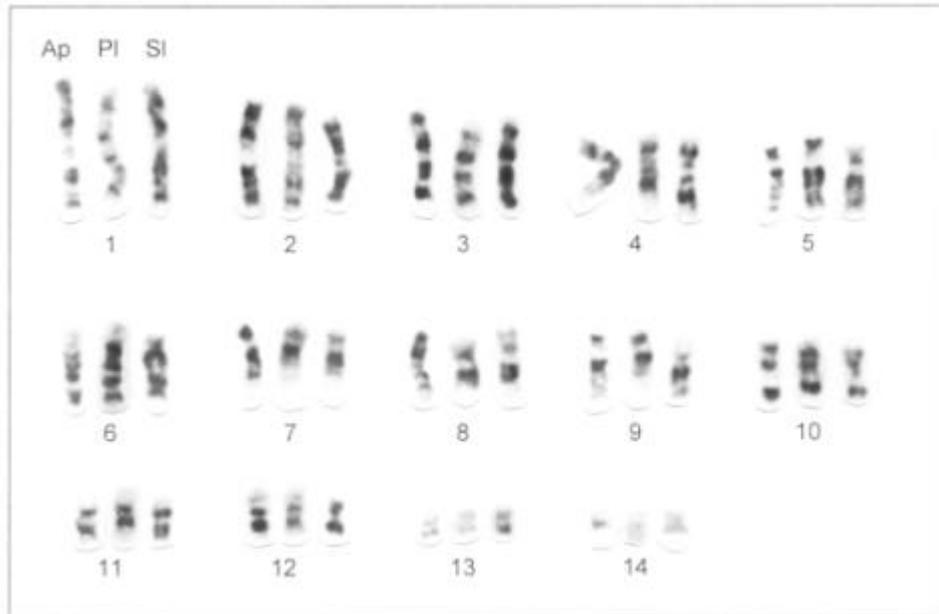


Figura 1: Homologias no padrão de bandas G entre os autossomos das espécies *A. planirostris* (Ap), *P. lineatus* (Pl) e *S. liliun* (Sl).

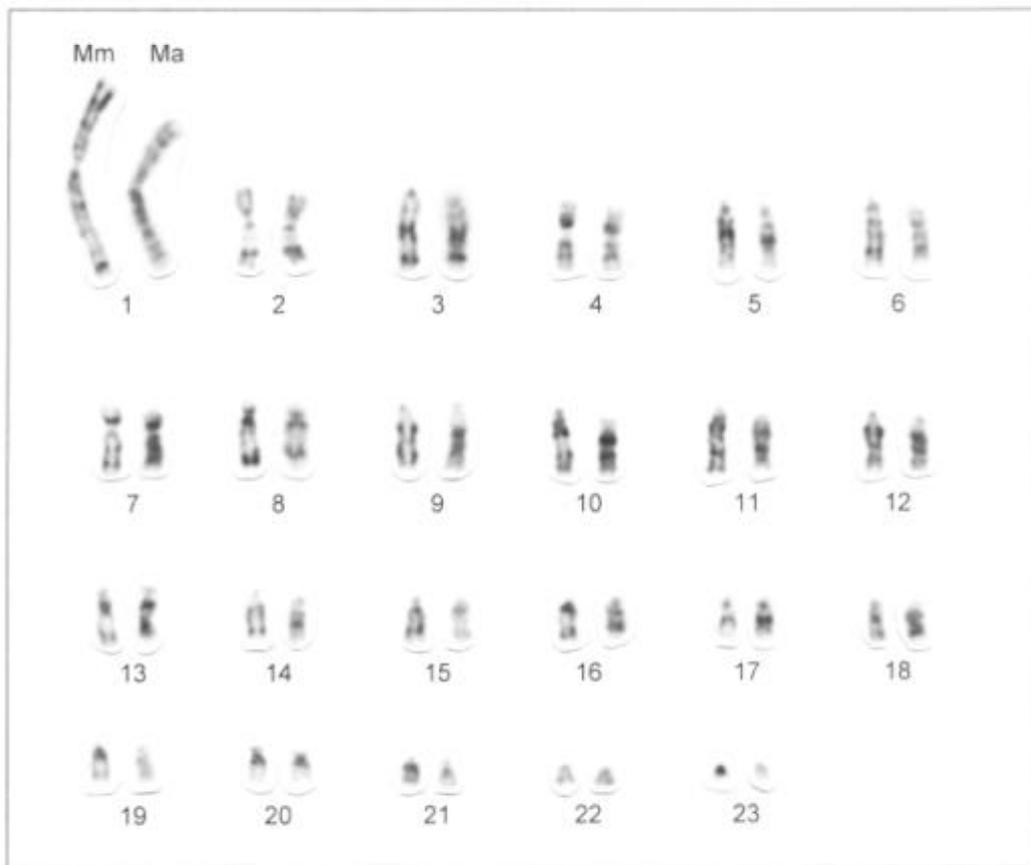


Figura 2: Homologias no padrão de bandas G entre os autossomos das espécies *M. molossus* (Mm) e *M. ater* (Ma).

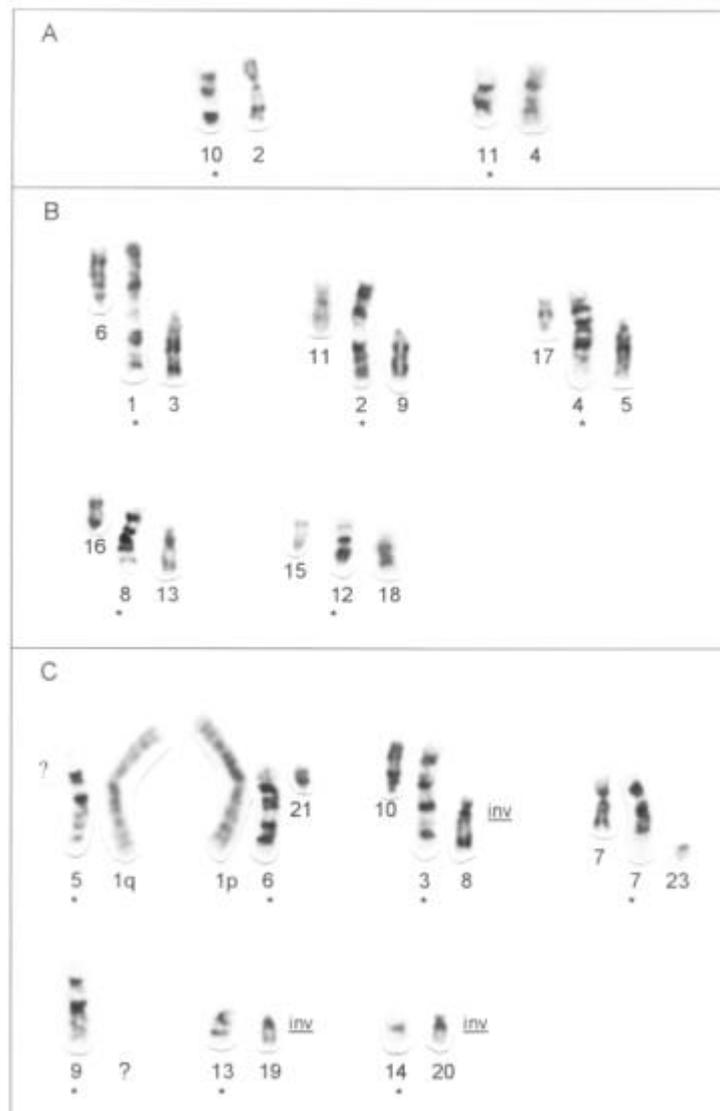


Figura 3: Homologias cromossômicas identificadas entre *A. planirostris* (cromossomos marcados com asterisco) e *Molossus*. A: Homologias de cromossomos inteiros. B: Homologias de braços cromossômicos de *A. planirostris* com cromossomos acrocêntricos e subtelocêntricos de *Molossus*. C: Homologias parciais e de braços cromossômicos de *A. planirostris* com *Molossus* após rearranjos do tipo fusões, inversões (inv) e rearranjos não determinados (?).

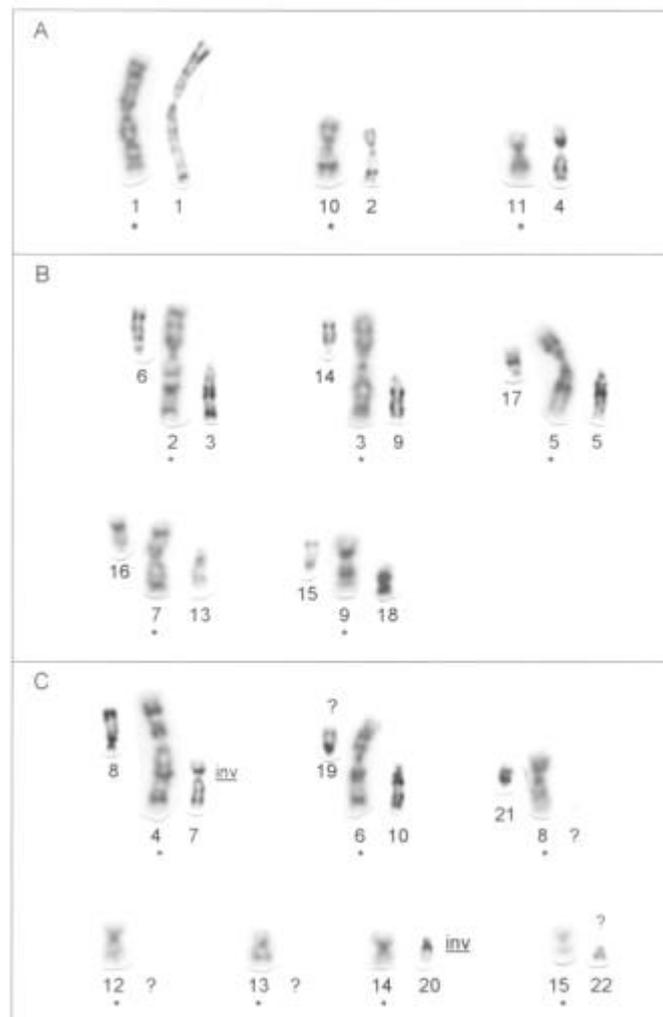


Figura 4: Homologias cromossômicas identificadas entre *G. soricina* (cromossomos marcados com asterisco) e *Molossus*. A: Homologias de cromossomos inteiros. B: Homologias de braços cromossômicos de *G. soricina* com cromossomos acrocêntricos e subtelocêntricos de *Molossus*. C: Homologias parciais e de braços cromossômicos de *G. soricina* com *Molossus* após rearranjos do tipo fusões, inversões (inv) e rearranjos não determinados (?).

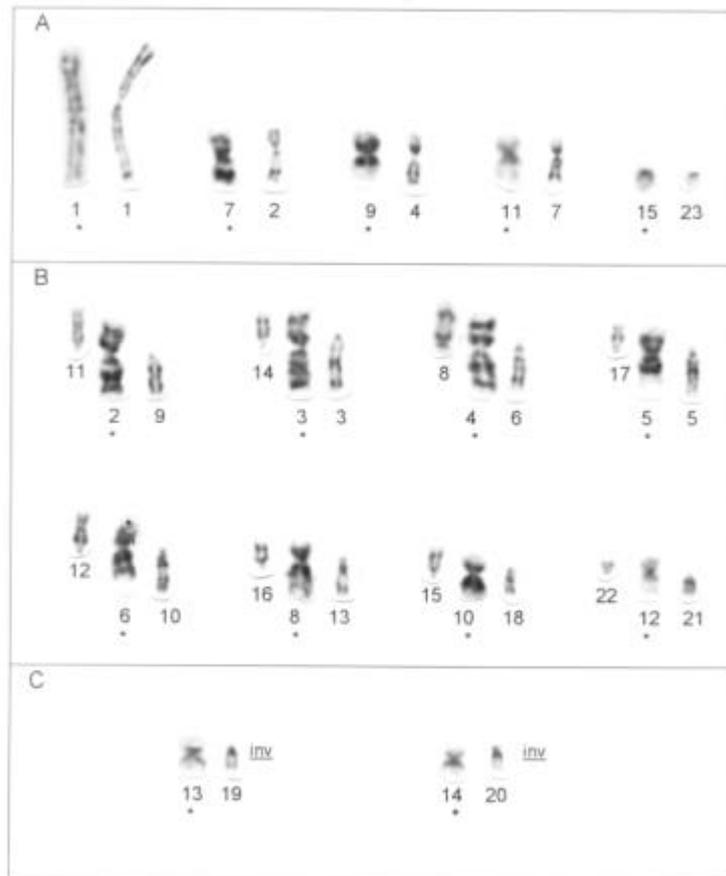


Figura 5: Homologias cromossômicas identificadas entre *P. hastatus* (cromossomos marcados com asterisco) e *Molossus*. A: Homologias de cromossomos inteiros. B: Homologias de braços cromossômicos de *P. hastatus* com cromossomos acrocêntricos e subtlocêntricos de *Molossus*. C: Homologias de cromossomos de *P. hastatus* com *Molossus* após rearranjos do tipo inversões (inv).



Figura 6: Cariótipo de *C. perspicillata* com bandamento G.

1.1.5 Cromossomos Sexuais e Comparação Geral

Os cromossomos sexuais com os padrões de bandas G das sete espécies analisadas estão ilustrados na Figura 7. A análise comparativa evidencia que:

- Os cromossomos sexuais X e Y variam entre as espécies quanto à morfologia e no padrão de bandas G. Nas três espécies de Stenodermatinae os cromossomos subtelocêntricos X apresentaram-se homólogos com o mesmo padrão de bandas G. O cromossomo Y₂, que em *A. planirostris* representa o homólogo livre do autossomo translocado para o X, pode ser visto também constituindo o cromossomo Y das espécies *P. lineatus* e *S. liliumi*

- Os cromossomos sexuais de *M. ater*, *M. molossus*, *G. soricina* e *P. hastatus* assemelham-se morfologicamente, sendo o X um cromossomo submetacêntrico de tamanho médio e o Y um acrocêntrico pequeno;

- Apesar da similaridade morfológica, os cromossomos X não são homólogos em bandas. Apenas os das duas espécies de *Molossus*;

- Os cromossomos X de *G. soricina* e *P. hastatus* diferem nos padrões de bandas e não apresentam homologias com os cromossomos X das outras seis espécies;

- O cromossomo X de *C. perspicillata* é morfologicamente diferente ao das outras espécies e não apresenta homologias com nenhum dos cromossomos X das demais espécies. O cromossomo Y, à semelhança das espécies *A. planirostris*, *G. soricina*, *P. hastatus*, *M. ater* e *M. molossus*, é um acrocêntrico pequeno;

- As homologias entre os cromossomos Y não puderam ser reconhecidas pelo pequeno tamanho dos cromossomos.

Uma análise comparativa geral, considerando-se os resultados individuais da análise dos autossomos acrescida da comparação dos cromossomos sexuais, permitiu a obtenção de informações relacionadas aos caracteres cromossômicos das espécies estudadas. Essas informações apresentadas nas Tabelas 3 e 4 e ilustradas na Figura 8 evidenciam que:

- As espécies de *Molossus* analisadas compartilham, exceto com *C. perspicillata*, dois cromossomos inteiros com todas as outras espécies (os relativos aos pares submetacêntricos 2 e 4 em *Molossus*, 10 e 11 em *A. planirostris*, *S. lilium*, *P. lineatus* e *G. soricina*, e 7 e 9 em *P. hastatus*);

- A espécie *G. soricina* compartilha 3 cromossomos inteiros com *Molossus* e com *P. hastatus* (os relativos aos pares meta e submetacêntricos 1, 10, e 11 em *G. soricina*, aos pares 1, 2, 4 em *Molossus* e aos pares 1, 7 e 9 *P. hastatus*);

- A espécie *P. hastatus* compartilha 5 cromossomos inteiros com *Molossus* (os relativos aos pares meta e submetacêntricos 1,7, 9,11, e o acrocêntrico 15 em *P. hastatus*, e aos pares submetacêntricos 1, 2, 4 e 7, e acrocêntrico 23 em *Molossus*);

- As espécies *A. planirostris*, *S. lilium*, *P. lineatus*, *G. soricina* e *P. hastatus* compartilham três cromossomos meta e submetacêntricos, originados possivelmente de fusões de cromossomos acrocêntricos e submetacêntricos semelhantes aos encontrados em *Molossus*: 17/5, 15/18 e 16/13;

- *A. planirostris*, *S. lilium*, *P. lineatus* e *P. hastatus* compartilham um cromossomo submetacêntrico originado possivelmente da fusão de cromossomos acrocêntricos semelhantes aos encontrados em *Molossus*: 11/9 (o cromossomo 2 nas quatro espécies);

- *A. planirostris*, *S. lilium*, *P. lineatus* e *G. soricina* compartilham um cromossomo originado possivelmente da fusão de cromossomos semelhantes aos encontrados em *Molossus*: 6/3 (cromossomo 1 em *A. planirostris*, *P. lineatus* e *S. lilium* e cromossomo 2 em *G. soricina*);

- Alguns cromossomos originados possivelmente da fusão de cromossomos acrocêntricos e subtelocêntricos semelhantes aos encontrados em *Molossus* são exclusivos de cada espécie: fusões 10/8inv e 7/23 observadas em *A. planirostris*, *S. lilium*, *P. lineatus* (cromossomos 3 e 7), fusões 14/9 e 19/10 observadas em *G. soricina* (cromossomos 3 e 6) e as fusões 14/3, 8/6, 12/10 e 22/21 observadas em *P. hastatus* (cromossomos 3, 4, 6 e 12);

- As espécies *A. planirostris*, *S. lilium*, *P. lineatus*, *G. soricina* e *P. hastatus* compartilham um cromossomo originado possivelmente a partir de uma inversão de um cromossomo semelhante ao cromossomo 20 encontrado em *Molossus* (cromossomo 14 nas cinco espécies);

- As espécies *A. planirostris*, *S. lilium*, *P. lineatus* e *P. hastatus* compartilham um cromossomo originado possivelmente a partir de uma inversão de um cromossomo semelhante ao cromossomo 19 encontrado em *Molossus* (cromossomo 13 nas quatro espécies).

É provável que as regiões cromossômicas e/ou braços cromossômicos para os quais não foram observadas homologias no cariótipo de *Molossus*, estejam rearranjados de tal forma que as diferenças na qualidade dos padrões de bandas dos cromossomos das espécies, bem como no grau de condensação dos cromossomos tenha dificultado a análise.

Tabela 3: Cromossomos meta e submetacêntricos com homologias completas entre *Molossus* e as espécies de Phyllostomidae analisadas.

<i>Molossus</i>	1	2	4	7	23
<i>A. planirostris</i>					
<i>P. lineatus</i>		10	11		
<i>S. lilium</i>					
<i>G. soricina</i>	1	10	11		
<i>P. hastatus</i>	1	7	9	11	15

Tabela 4: Padrões de fusão e rearranjos propostos para cromossomos acrocêntricos e subtelo-cêntricos de *M. molossus* e *M. ater* dentro das espécies analisadas.

<i>A. planirostris, P. lineatus e S. lilium</i>	6/3, 11/9, 17/5, 16/13, 15/18, ?/1q, 1p/21, 10/8inv, 7/23, 19 inv, 20 inv
<i>G. soricina</i>	6/3, 14/9, 17/5, 16/13, 15/18, 19/10, 8/7 inv, 21/?, 20 inv, ?/22
<i>P. hastatus</i>	11/9, 14/3, 8/6, 17/5, 12/10, 16/13, 15/18, 22/21, 19/inv, 20inv

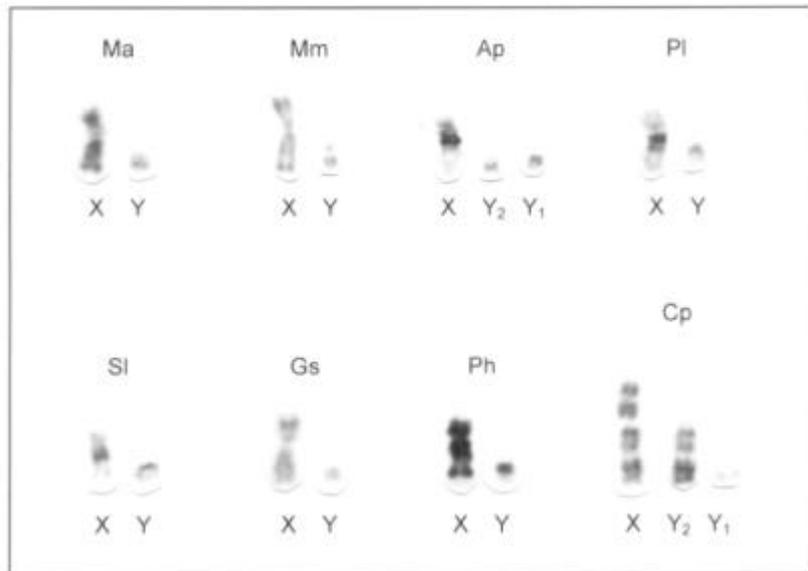


Figura 7: Padrão de bandas G dos cromossomos sexuais das espécies *M. ater* (Ma), *M. molossus* (Mm), *A. planirostris* (Ap), *P. lineatus* (Pl), *S. lilium* (Sl), *G. soricina* (Gs), *P. hastatus* (Ph) e *C. perspicilata* (Cp).

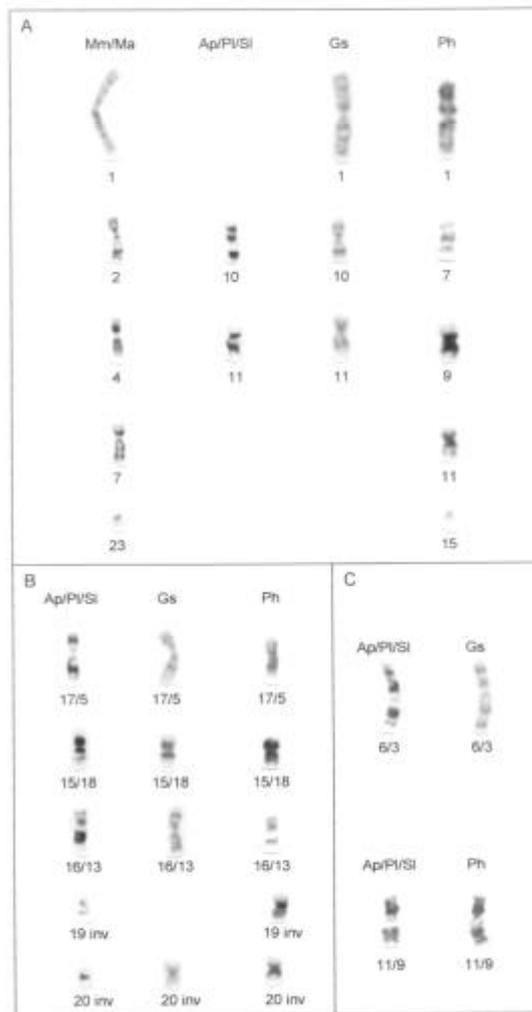


Figura 8: A: Cromossomos inteiros compartilhados entre as espécies estudadas. B: Cromossomos originados possivelmente de fusões e de inversões de cromossomos semelhantes aos encontrados em *Molossus*, compartilhados pelas espécies *A. planirostris*, *P. lineatus* e *S. lilium*, *G. soricina* e *P. hastatus*. C: Cromossomos originados possivelmente de fusões de cromossomos semelhantes aos encontrados em *Molossus*, compartilhados pelas espécies *A. planirostris*, *P. lineatus* e *S. lilium*, e *G. soricina* (6/3) e entre *A. planirostris*, *P. lineatus* e *S. lilium*, e *P. hastatus* (11/9).

1.2 Das hibridizações genômicas comparativas (ZOO-FISH)

Dez exemplares pertencentes a sete espécies, *A. planirostris* (CFC 439 e 484), *C. perspicillata* (CFC 605), *G. soricina* (CFC 443), *M. ater* (CFC 632), *P. lineatus* (CFC 376, 614, 626 e 627) e *S. liliun* (CFC 585), tiveram suas preparações cromossômicas submetidas à hibridização com sondas genômicas preparadas a partir do DNA de três exemplares representantes de três espécies: *A. planirostris* (CFC 374), *Carollia perspicillata* (CFC 433) e *M. ater* (CFC 632). Os resultados das hibridizações, discriminados pelas espécies e a sonda genômica empregada em cada preparação, estão apresentados na Tabela 5 e ilustrados nas Figuras 9 a 12.

Tabela 5: Resultados das hibridizações genômicas discriminados pelas espécies para as quais foram utilizadas preparações cromossômicas e sondas genômicas e, pela situação experimental. + = com hibridização, - = sem hibridização

Sonda	Preparação Cromossômica	Resultado	Situação experimental
<i>Molossus ater</i> (CFC 288)	<i>A. planirostris</i> (CFC 439)	-	I
	<i>C. perpicillata</i> (CFC 605)	-	I
	<i>G. soricina</i> (CFC 443)	-	I
	<i>P. lineatus</i> (CFC 376)	+	I
	<i>P. lineatus</i> (CFC 626)	-	I
	<i>P. lineatus</i> (CFC 614)	-	I
	<i>S. liliun</i> (CFC 585)	-	I
<i>A. planirostris</i> (CFC 374)	<i>C. perpicillata</i> (CFC 605)	+	II
	<i>M. ater</i> (CFC 632)	+	III
<i>C. perpicillata</i> (CFC 433)	<i>M. ater</i> (CFC 632)	+	III
	<i>G. soricina</i> (CFC 443)	+	II
	<i>A. planirostris</i> (CFC 484)	+	II
	<i>P. lineatus</i> (CFC 627)	+	II

Nota-se pela Tabela 5, que três situações experimentais foram realizadas. Uma delas (situação I) envolveu a utilização da sonda genômica de *M. ater*, uma espécie de Molossidae, aplicada sobre os cromossomos de cinco espécies de Phyllostomidae (*A. planirostris*, *C. perpicillata*, *G. soricina*, *P. lineatus* e *S. liliun*), em sete hibridizações distintas. Na segunda situação (II), preparações cromossômicas de quatro espécies de Phyllostomidae (*A. planirostris*, *C. perpicillata*,

G. soricina e *P. lineatus*) foram hibridizadas com sondas genômicas provenientes de duas espécies dessa mesma família (*A. planirostris* e *C. perpicillata*) e, uma terceira situação (III), onde preparações cromossômicas de *M. ater* foram hibridizadas com sondas de duas espécies de Phyllostomidae (*A. planirostris* e *C. perpicillata*).

Observa-se pelos resultados dos experimentos que sete das 13 hibridizações efetuadas deram resultados positivos, ou seja, apresentaram sinais de hibridização. Contudo, a maior parte das hibridizações positivas ocorreu nas situações II e III, onde as sondas utilizadas foram obtidas de espécies de Phyllostomidae.

Na situação I, onde a sonda de *M. ater* foi aplicada aos cromossomos das cinco espécies de Phyllostomidade em sete experimentos de hibridização, apenas um deles, em que a preparação cromossômica era de *P. lineatus*, apresentou hibridização (Figura 9). Na análise microscópica efetuada a hibridização resultou em fluorescência sobre braços cromossômicos inteiros e/ou parte deles, indicando aparentemente, um alto grau de complementaridade nas seqüências de DNA dos cromossomos de *P. lineatus* e a sonda utilizada (*M. ater*). Nos outros seis experimentos, nenhum sinal fluorescente foi observado sobre os cromossomos.

Diferentemente do observado na situação experimental I, nas situações II e III todos os seis experimentos de hibridização foram positivos para as sondas utilizadas.

Na situação II, em que as sondas e as preparações cromossômicas eram das espécies de Phyllostomidae, da mesma forma que no experimento com hibridização positiva da situação I, foram observados sinais fluorescentes ao longo

dos braços cromossômicos. Esses sinais apareceram como pontos ou granulações fluorescentes não homogeneamente distribuídos ao longo dos cromossomos (Figuras 10 e 11).

Algumas regiões cromossômicas apresentaram uma maior concentração de grânulos fluorescentes, tanto nas metáfases hibridizadas com as sondas de *A. planirostris* quanto de *C. perspicillata*. Porém, a quantidade de grânulos fluorescentes foi maior nas metáfases de *P. lineatus* hibridizadas com sonda de *C. perspicillata* do que nas metáfases de *A. planirostris* e *G. soricina* hibridizadas com a mesma sonda. A quantidade de grânulos fluorescentes sobre os cromossomos de *C. perspicillata* hibridizados com a sonda de *A. planirostris* foi semelhante à observada na situação inversa. Foi possível verificar, portanto, que *C. perspicillata* apresenta complementaridade de seqüências com as outras espécies, apesar da ausência de homologias de bandas G (Figura 10 e 11 A e B).

Na situação III, em que as preparações cromossômicas de *M. ater* foram hibridizadas com as duas diferentes sondas de Phyllostomidae, *A. planirostris* e *C. perspicillata*, a hibridização também apareceu como grânulos fluorescentes ao longo dos cromossomos.

Embora a hibridização com a sonda de *A. planirostris* (Figura 12 A e B) tenha sido maior, a fluorescência foi menor quando comparada com *C. perspicillata* (Figura 12 C e D). As duas hibridizações positivas reforçam a ocorrência de complementaridade nas seqüências de DNA entre Molossidae e Phyllostomidae.

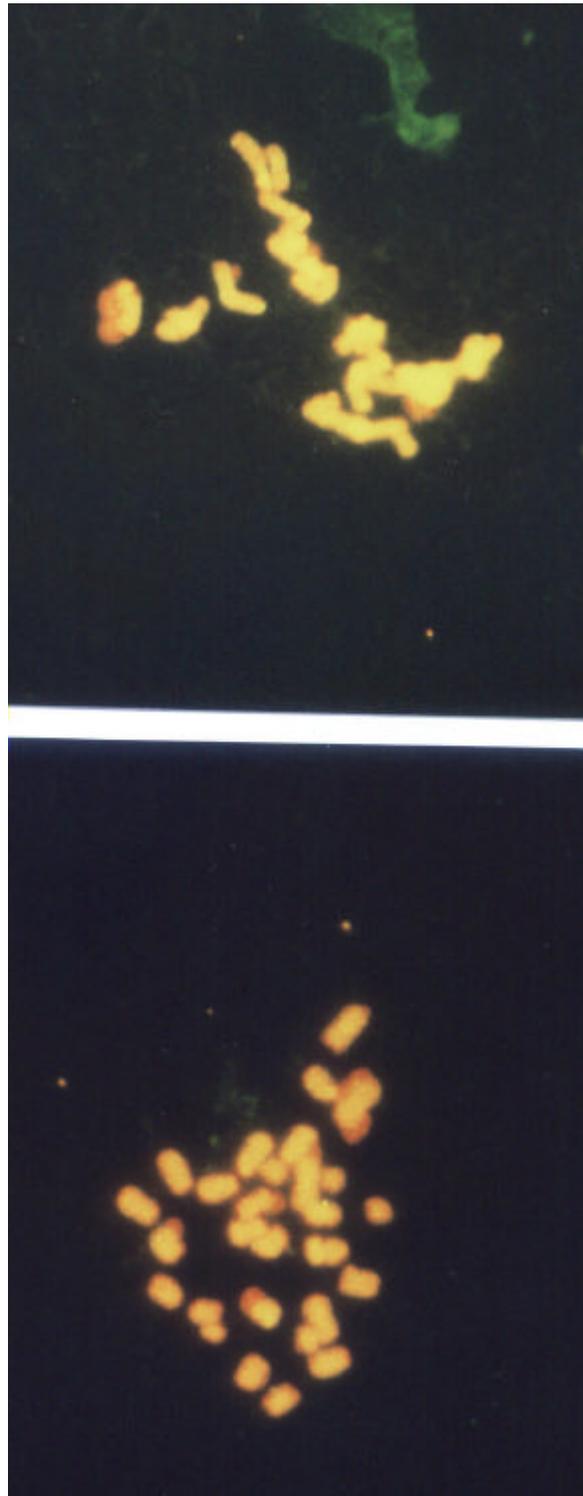


Figura 9: Hibridização genômica comparativa com sonda genômica de *M. ater* em metáfases de *P. lineatus*.

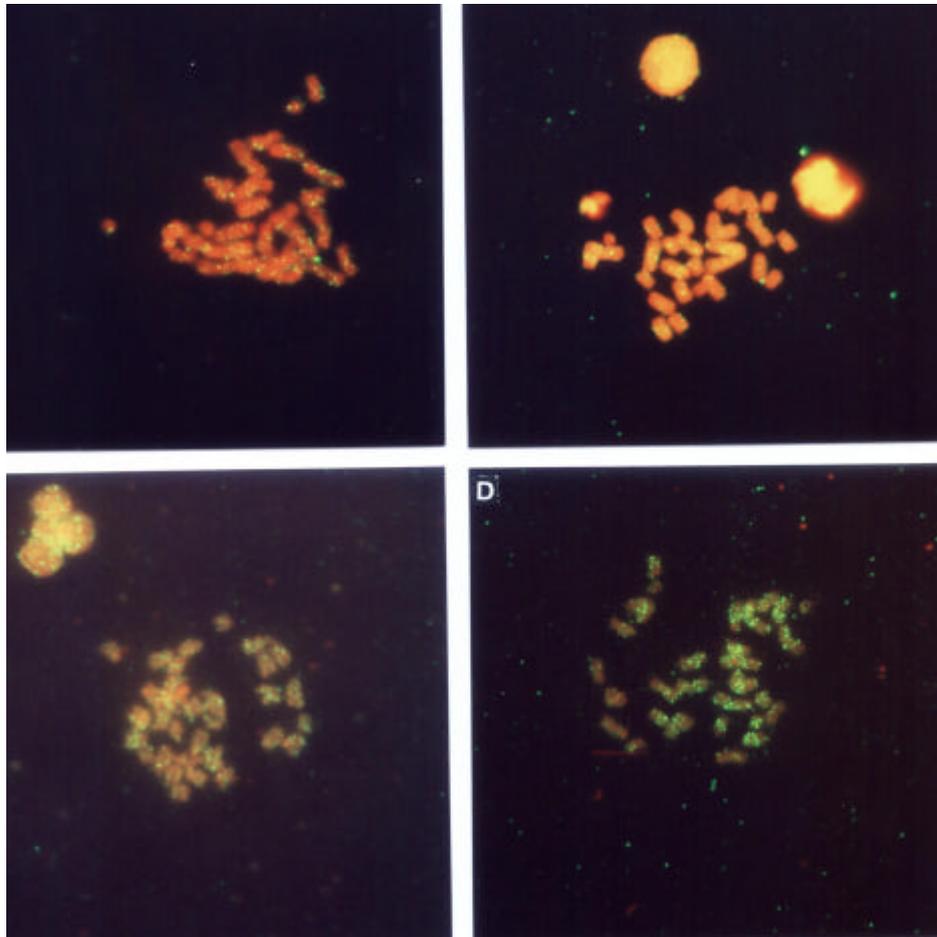


Figura 10: Hibridização genômica comparativa com sonda genômica de *C. perspicillata*. A. e B: em metáfases de *A. planirostris*. C e D: em metáfases de *P. lineatus*.

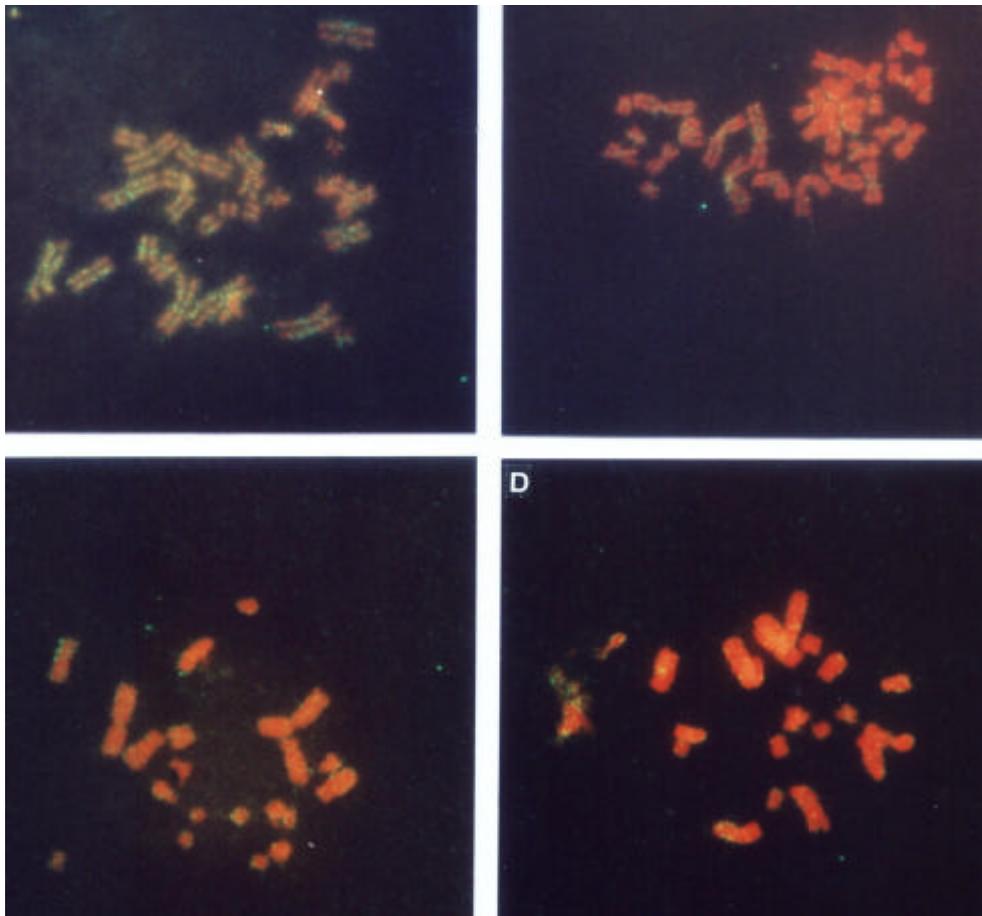


Figura 11: Hibridização genômica comparativa. A e B: Sonda genômica de *C. perspicillata* em metáfases de *G. soricina*. C e D: Sonda de genômica de *A. planirostris* em metáfases de *C. perspicillata*.

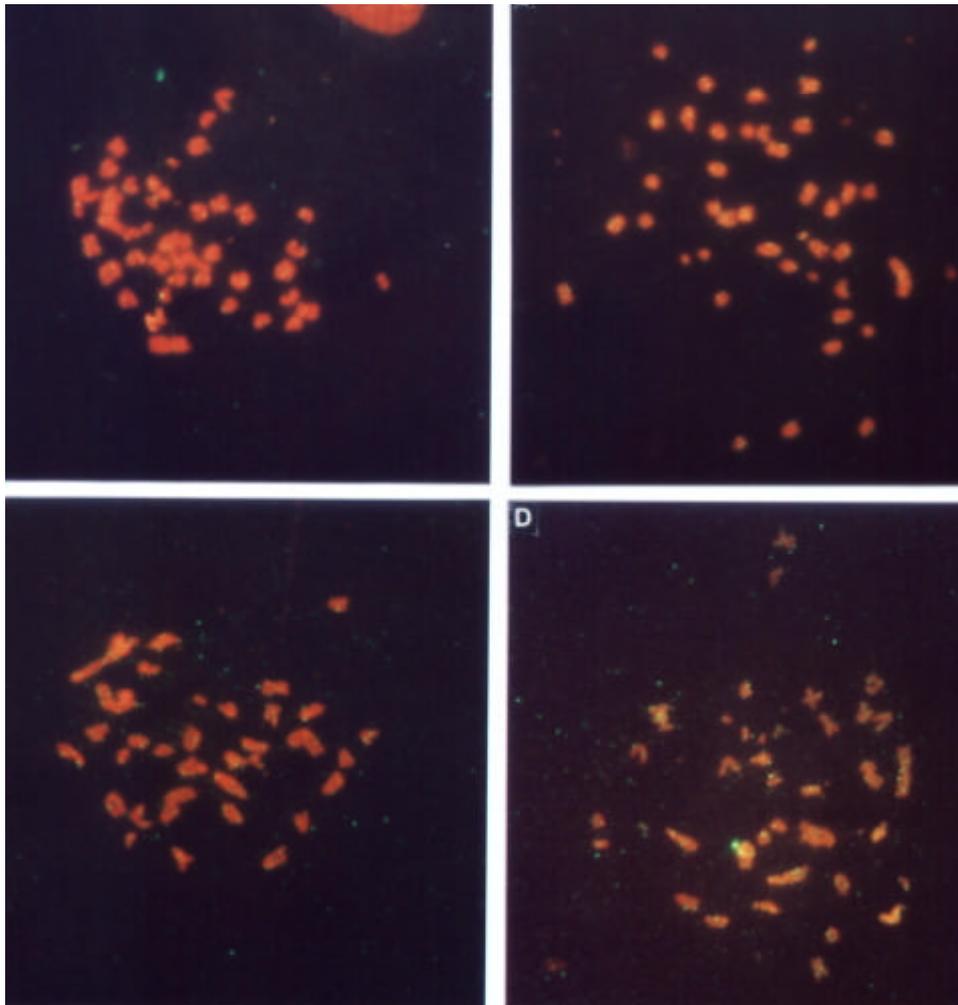


Figura 12: Hibridização genômica comparativa em metáfases de *M. ater*. A e B: com sonda genômica de *A. planirostris* e C e D: com sonda genômica de *C. perspicillata*.

2. Identificação dos Sítios de DNA Telomérico

As hibridizações com a sonda de seqüências teloméricas foram realizadas em 19 exemplares pertencentes às espécies *A. planirostris*, *P. lineatus*, *S. lilium*, *C. perspicillata*, *G. soricina*, *M. molossus* e *M. ater*. Contudo, apenas 14 preparações apresentaram hibridização positiva: *A. planirostris* (CFC 374, 423 e 484), *P. lineatus* (CFC 376, 476 e 626), *S. lilium* (CFC 585), e *C. perspicillata* (CFC 418, 465, 531 e 605) de Phyllostomidae, *M. molossus* (CFC 368) e *M. ater* (CFC 606, 632) da família Molossidae (Tabela 6).

Tabela 6: Resultados das hibridizações com sondas de seqüências teloméricas discriminados pelas espécies em que a sonda foi aplicada. + (com hibridização), - (sem hibridização).

Espécie	Exemplar	Resultado
<i>A. planirostris</i>	CFC 374	+
	CFC 423	+
	CFC 439	-
	CFC 482	-
	CFC 484	+
<i>P. lineatus</i>	CFC 376	+
	CFC 442	-
	CFC 464	-
	CFC 476	+
	CFC 626	+
<i>C. perspicillata</i>	CFC 418	+
	CFC 465	+
	CFC 531	+
	CFC 605	+
<i>G. soricina</i>	CFC 443	-
<i>S. liliium</i>	CFC 585	+
<i>M. ater</i>	CFC 606	+
	CFC 632	+
<i>M. molossus</i>	CFC 368	+

2.1 *A. planirostris*

Na espécie *A. planirostris*, a hibridização *in situ* fluorescente (FISH) permitiu a evidenciação de sinais fluorescentes, com intensidade variável nos telômeros de praticamente todos os cromossomos (Figura 13). Em algumas metáfases, durante a análise microscópica, foram observados sinais com fraca fluorescência na região pericentromérica de alguns cromossomos submetacêntricos, provavelmente relativos ao pares 5 a 7, e no maior par de cromossomos, o submetacêntrico 1. Contudo, os sinais não foram suficientes para aparecerem na documentação fotográfica.

2.2 *P. lineatus*

A análise das hibridizações com sonda telomérica nos cromossomos de *P. lineatus* evidenciou apenas marcações fluorescentes nas regiões teloméricas de ambos os braços dos cromossomos, praticamente sem nenhuma grande variação na intensidade do sinal (Figura 14). Nenhum sinal fluorescente foi observado nos cromossomos que pudesse ser correlacionado com hibridização pericentromérica ou intersticial.

2.3 *S. liliium*

Em *S. liliium* os sinais de hibridização com a sonda telomérica foram observados apenas nos telômeros de alguns cromossomos. Também foram observados, em alguns cromossomos, sinais fluorescentes fora das regiões de telômeros, os quais não puderam ser interpretados como sinais intersticiais, pois não apareceram na mesma posição e em ambas as cromátides (Figura 15).

2.4 *C. perspicillata*

A situação observada em *C. perspicillata* foi diferente à das espécies anteriores. Sinais fluorescentes indicativos de hibridização com a sonda telomérica foram observados em várias regiões cromossômicas pericentroméricas, além das regiões teloméricas (Figura 16).

As marcações pericentroméricas foram as mais intensas e, portanto, facilmente visualizadas nos braços do maior par de cromossomos, o submetacêntrico 1, nos braços longos dos cromossomos subtelocêntricos 2 e 3 e nos braços longos dos cromossomos submetacêntricos 4 e 5. Os cromossomos submetacêntricos e metacêntricos pequenos (6, 8 e 9) também apresentaram sinais fluorescentes indicativos de hibridização em regiões pericentroméricas, assim como o pequeno cromossomo acrocêntrico Y. O cromossomo X e o terceiro menor par de cromossomos (7) não apresentaram marcações fluorescentes nas regiões pericentroméricas (Figura 16).

Os sinais nas regiões teloméricas, diferentemente ao das pericentroméricas, apresentaram pouca intensidade de fluorescência e, embora não visualizados em todos os cromossomos, foram observados nos telômeros de ambos os braços curtos e longos de vários cromossomos (Figura 16).

Nenhuma marcação intersticial foi observada nos cromossomos de *C. perspicillata*.

2.5 *M. ater* e *M. molossus*

Nas espécies *M. molossus* e *M. ater* a hibridização com a sonda de seqüências teloméricas permitiu a visualização somente de sinais fluorescentes nos telômeros de praticamente todos os cromossomos. Nenhum sinal intersticial ou pericentromérico foi observado nos cromossomos submetacêntricos 1, 2, 4 e 7 (Figura 17).

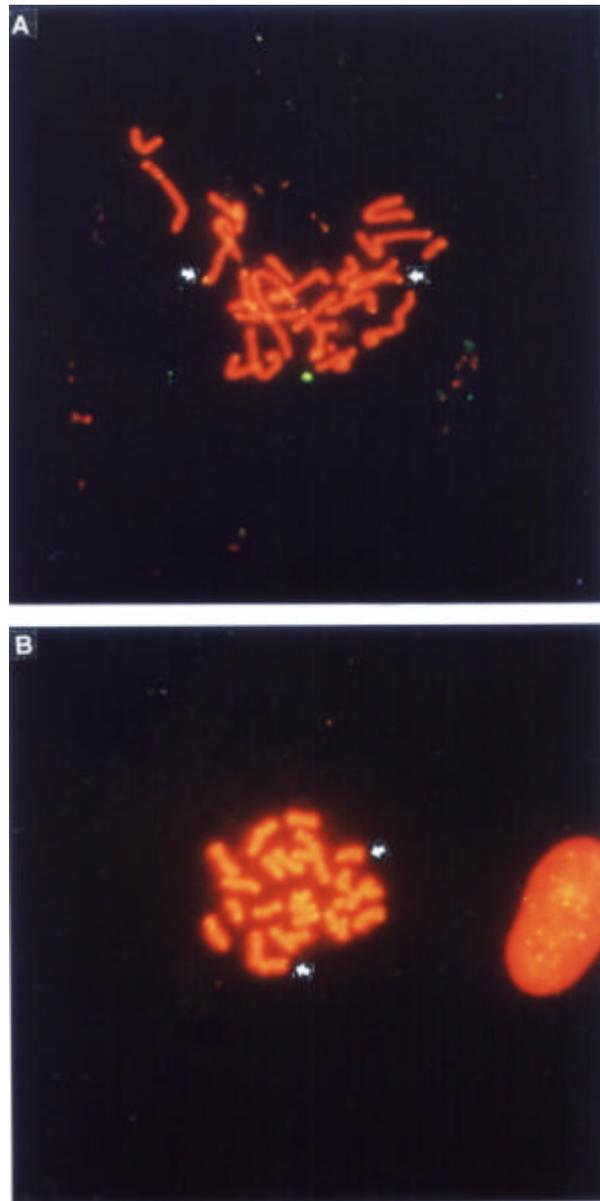


Figura 13: Hibridização *in situ* fluorescente com sonda de seqüências (TTAGGG)_n em metáfases de *A. planirostris* evidenciando marcações em regiões teloméricas (setas).

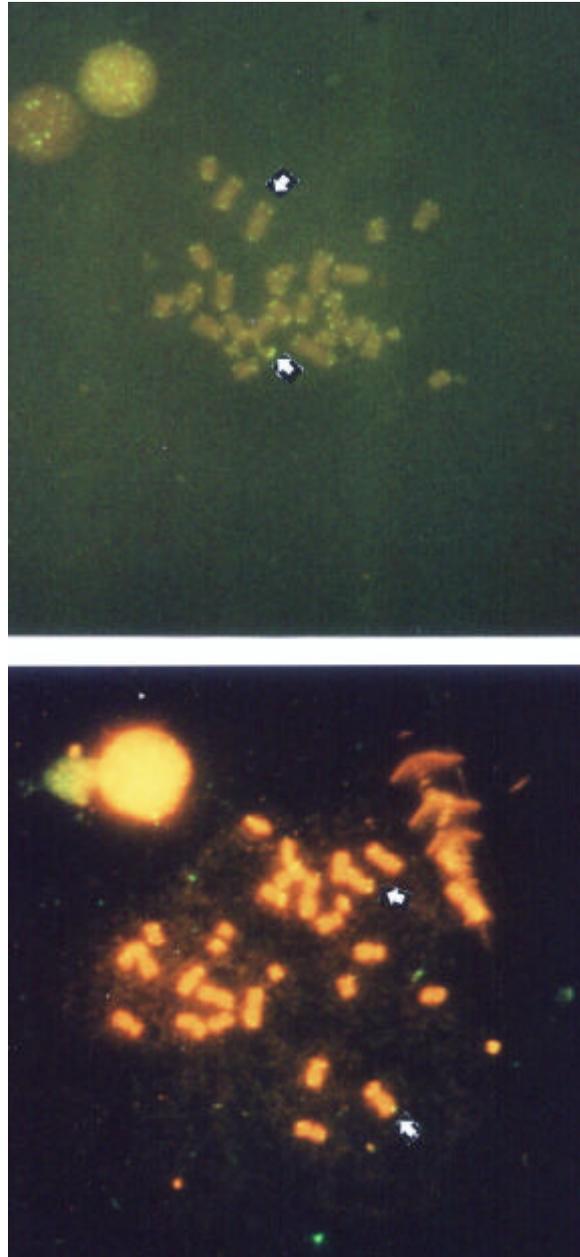


Figura 14: Hibridização *in situ* fluorescente com sonda de seqüências (TTAGGG)_n em metáfases de *P. lineatus* evidenciando marcações em regiões teloméricas (setas).

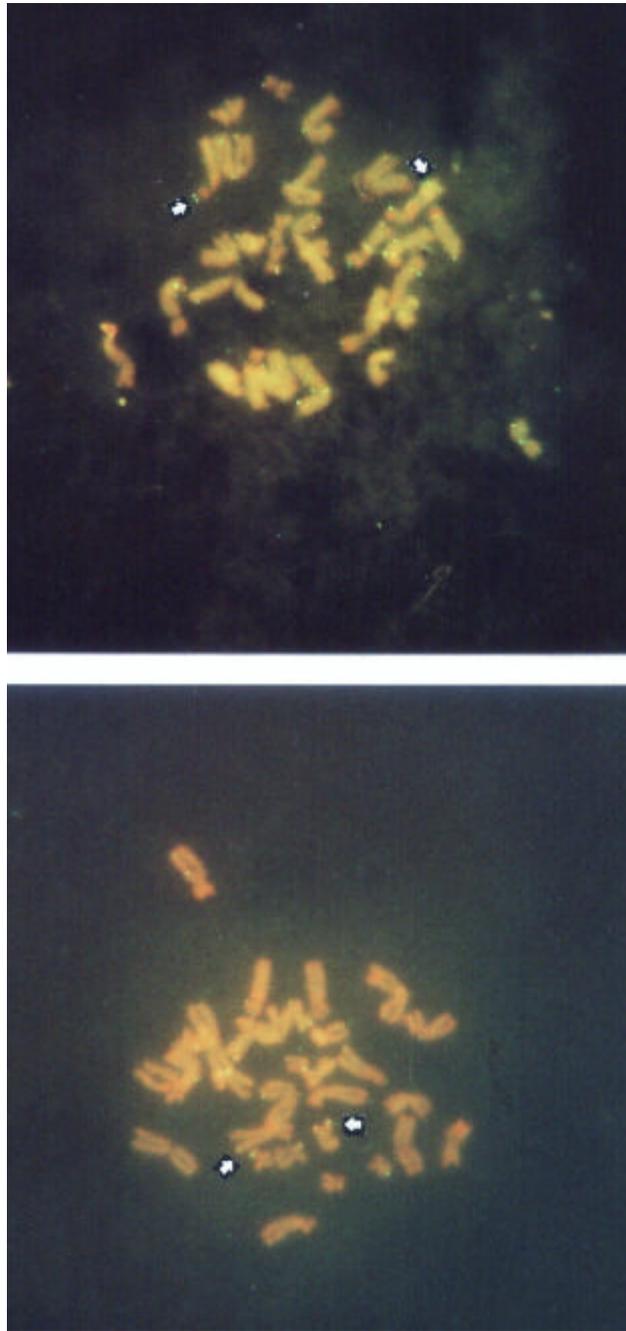


Figura 15: Hibridização *in situ* fluorescente com sonda de seqüências (TTAGGG)_n em metáfases de *S. liliium* evidenciando marcações em regiões teloméricas (setas).

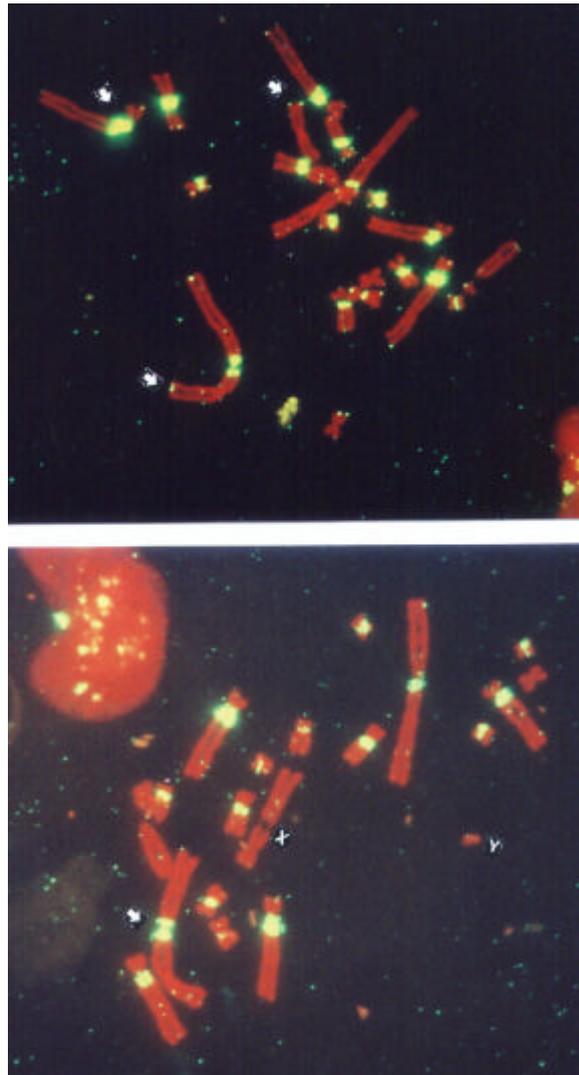


Figura 16: Hibridização *in situ* fluorescente com sonda de DNA telomérico em metáfases de *Carollia perspicillata* evidenciando marcações em regiões teloméricas e pericentroméricas dos cromossomos (setas). X = cromossomo X; Y = cromossomo Y.

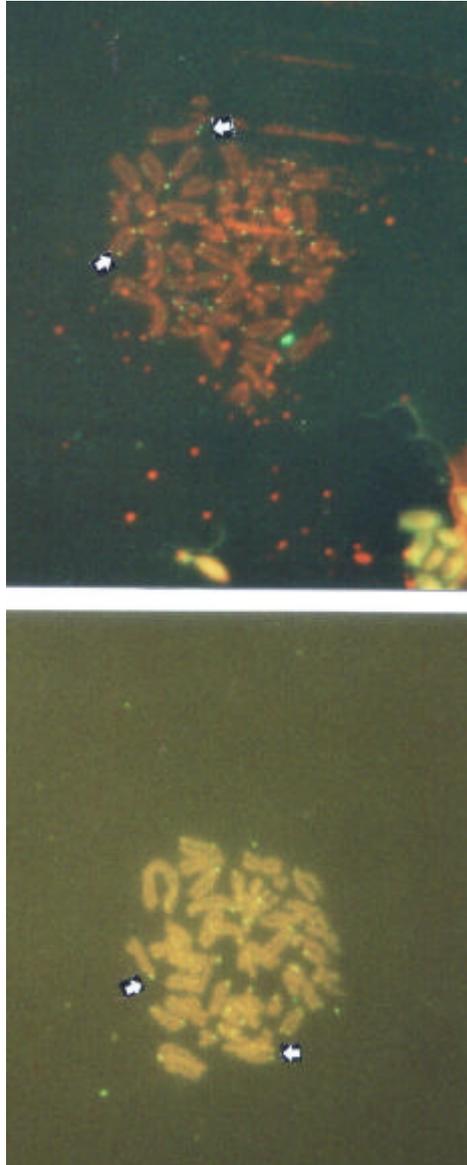


Figura 17: Hibridização *in situ* fluorescente com sonda de DNA telomérico. A: em metáfase de *M. ater* e B: em metáfases de *M. molossus*, evidenciando marcações nos telômeros (setas).

V. DISCUSSÃO

A família Phyllostomidae é uma das mais estudadas sob o ponto de vista biológico. Apesar disso, o relacionamento evolutivo intrafamiliar é complexo e ainda não está bem compreendido.

As classificações mais recentes têm reconhecido seis a sete subfamílias para Phyllostomidae. Porém, apesar de terem sido usados vários conjuntos de caracteres para o estabelecimento das propostas de classificação, os diversos autores reconhecem que há ainda muitos conflitos nas informações geradas pelos diferentes conjuntos de dados considerados. Além disso, não se tem informações completas com relação a todos os conjuntos de dados, nem no aspecto quantitativo, isto é, relativo a todos os gêneros, nem no aspecto qualitativo, isto é, em relação ao nível de resolução atingido pelos estudos já existentes. O que parece ser consenso nos resultados dos diferentes estudos é a origem monofilética da família (Baker *et al.*, 1989; Simmons & Geisler, 1998; Wetterer, *et al.*, 2000; Jones *et al.*, 2002).

A família Molossidae, diferentemente de Phyllostomidae que apresenta uma distribuição limitada às regiões neotropicais, é cosmopolita e também apresenta problemática taxonômica (Simmons, 1998).

Os estudos citogenéticos realizados em espécies das duas famílias têm propiciado aos diferentes autores fazer propostas sobre a evolução cromossômica nas famílias. Em Phyllostomidae, os resultados obtidos até o momento sugerem que

cromossomicamente a condição observada em *Macrotus* ou *Phyllostomus* seja a mais próxima à condição primitiva (Patton & Baker, 1978; Baker *et al.*, 1989)

Em Molossidae, as análises citogenéticas baseadas no estudo do cariótipo convencional e no padrão de bandas G permitiram a Warner *et al.* (1974) e Baker *et al.* (1982) sugerirem que o cariótipo ancestral para Molossidae seria semelhante ao observado em espécies dos gêneros *Otomops*, *Platymops*, *Molossus* e *Tadarida* ($2n = 48$ e $NF = 54-56$), os dois últimos presentes no Velho e no Novo Mundo.

As análises comparativas dos cariótipos das espécies analisadas no presente trabalho revelaram informações interessantes. A combinação de táxons estudada ofereceu a oportunidade de examinar espécies das duas famílias que apresentam variação cromossômica envolvendo tanto o número diplóide, que varia de $2n = 20/21$ a 48, como o número fundamental, que varia de $NF = 36$ a 64.

Os dados citogenéticos indicaram uma forte relação entre as três espécies de Stenodermatinae. As análises dos padrões de bandas G de *A. planirostris*, *P. lineatus* e *S. lilium* demonstraram que há homologias de bandas entre todos os seus cromossomos. Baker *et al.* (1979) também notaram grande similaridade entre os padrões de bandas G de *Artibeus* e *Sturnira*, sugerindo uma ancestralidade comum aos dois gêneros, que na classificação de Wetterer *et al.* (2000) foram incluídos em duas tribos diferentes, a Stenodermatini e a Sturnirini, respectivamente.

A única diferença observada entre as três espécies refere-se ao sistema de determinação do sexo. Em *A. planirostris*, o X é composto, constituindo-

se pelo cromossomo X original e por um autossomo, devido a uma translocação X/autossomo. O homólogo autossômico que fica livre no macho é denominado Y_2 e o Y original é designado Y_1 . No novo X, parte do braço curto é a porção homóloga ao cromossomo Y_2 .

Nas espécies *P. lineatus* e *S. liliun*, a translocação do autossomo foi recíproca, ou seja, para o cromossomo X e para o cromossomo Y. Nestas espécies, assim como em outras espécies de Stenodermatinae, o sistema de determinação do sexo é denominado de “Neo XY” (Tucker, 1986). Apesar dessas diferenças, as homologias entre as porções originais do X puderam ser reconhecidas.

Em vista das grandes homologias encontradas nas três espécies, nas comparações com *Molossus* foi usado como referência o cariótipo de *A. planirostris* ($2n = 30/31$ e $NF = 56$). A identificação de homologias de vários braços cromossômicos e também de cromossomos inteiros de *A. planirostris* com *Molossus* é sugestiva de uma origem comum às duas famílias.

A comparação dos cariótipos evidenciou que *A. planirostris*, *P. lineatus* e *S. liliun* apresentam no seu cariótipo, 29 dos 32 braços cromossômicos de *Molossus*, organizados de forma a permitir verificar que dois cromossomos inteiros e os braços cromossômicos de oito cromossomos submetacêntricos apresentam homologias com cromossomos acrocêntrico, submetacêntricos e subtelocêntricos observados no cariótipo de *Molossus*. Este fato é uma evidência da ocorrência de eventos do tipo fusão e/ou fissão Robertsoniana e fusão em *tandem* na diferenciação do cariótipo dessas espécies. Além desses rearranjos, inversões pericêntricas também

puderam ser identificados diferenciando os cromossomos das duas espécies, tanto no aspecto da morfologia cromossômica como no número fundamental.

À semelhança do observado com as três espécies de Stenodermatinae, os cariótipos de *G. soricina* e *Molossus* também apresentaram muitas homologias. Foi verificado que 29 braços cromossômicos de *Molossus* podem ser reconhecidos no cariótipo de *G. soricina*. Este e *Molossus* compartilham três cromossomos inteiros, e sete cromossomos meta ou submetacêntricos apresentam braços cromossômicos homólogos a cromossomos acrocêntricos e subtelocêntricos observados no cariótipo de *Molossus*, evidenciando a ocorrência de fusões e/ou fissões na evolução de seus cariótipos. As diferenças morfológicas observadas em alguns cromossomos são também devidas a eventos do tipo inversões pericêntricas.

As análises comparativas evidenciaram que as homologias entre *Molossus* e as espécies de Phyllostomidae estendem-se também à espécie de Phyllostominae. Todos os cromossomos de *Molossus* puderam ser reconhecidos no cariótipo de *P. hastatus*.

As comparações entre *Molossus* e *P. hastatus* demonstraram que as espécies compartilham cinco cromossomos inteiros e à semelhança das observações anteriores, oito cromossomos de *P. hastatus* poderiam representar fusões de cromossomos subtelocêntricos e acrocêntricos observados no cariótipo de *Molossus*. Além desses eventos, duas inversões pericêntricas justificam as diferenças na morfologia, NF e padrões de bandas G das duas espécies. Eventos como estes têm sido considerados os responsáveis pelas variações observadas nos cariótipos de

diferentes espécies de Vespertilionidae (Bickham, 1979; Bickham *et al.*, 1986) e, ao que parece pelos resultados do presente trabalho, também pelas diferenças cromossômicas interfamiliares.

A análise geral considerando os resultados individuais permitiu verificar que todas as espécies compartilham em maior ou menor grau, homologias entre si.

A. planirostris, *S. lilium* e *P. lineatus* apresentam sete cromossomos inteiramente homólogos a outros sete cromossomos de *G. soricina*. Seis deles estão também presentes em *P. hastatus* e também são seis os compartilhados por *G. soricina* e *P. hastatus*. *G. soricina* apresenta um cromossomo exclusivo compartilhado com as três espécies de Stenodermatinae e *P. hastatus* apresenta dois. As homologias compartilhadas entre os Stenodermatinae, *G. soricina*, um Glossophaginae e *P. hastatus*, um Phyllostominae, reforçam a monofilia da família.

G. soricina e *P. hastatus* apresentam um grande número de homologias cromossômicas compartilhadas com *Macrotus waterhousii*, cujo cariótipo tem sido considerado como o mais semelhante à condição primitiva para Phyllostomidae (Patton & Baker, 1978; Baker & Bass, 1979). Quatro dos seis cromossomos compartilhados pelas espécies de Stenodermatinae, Glossophaginae e Phyllostominae estão presentes no cariótipo de *Macrotus*, sendo mais uma evidência da monofilia para a família.

Ao compararmos as espécies de Phyllostomidae com *Molossus* foi possível verificar que a espécie que compartilha um maior número de cromossomos

com *Molossus* é *P. hastatus*. Além disso, no seu cariótipo foi possível reconhecer todos os cromossomos de *Molossus*, o que não aconteceu com as outras espécies. Este fato nos permite supor que a espécie *P. hastatus* está mais relacionada a *Molossus* do que as outras espécies.

Em relação aos cromossomos sexuais das oito espécies, apesar das diferenças observadas na morfologia e nos padrões de bandas G, é bem estabelecido que os cromossomos X de mamíferos tem um padrão conservativo de genes, que podem estar organizados de maneira diferente nos cromossomos das diferentes espécies de mamíferos (Chowdhary *et al.*, 1998).

A família Emballonuridae têm sido considerada a representante mais antiga de Microchiroptera e uma possível ancestral das famílias de morcegos neotropicais, ou seja, Phyllostomidae, Mormoopidae e Noctilionidae. Entretanto, não é descartada a hipótese alternativa de que os Paleochiroptera foram a fonte a partir dos quais várias linhagens de Microchiroptera derivaram independentemente.

Os estudos cromossômicos envolvendo espécies da família Emballonuridae têm revelado que a família sofreu grandes mudanças cromossômicas, refletidas nos poucos elementos homólogos compartilhados entre os diferentes gêneros (Hood & Baker, 1986). Este fato contraria o que tem sido frequentemente observado em outras famílias, caracterizadas por um conservacionismo cromossômico.

As comparações dos padrões de bandas G de embalonurídeos com padrões considerados primitivos para Phyllostomidae e Rhinopomatidae não detectaram similaridades nos padrões cromossômicos (Hood & Baker, 1986).

Em nosso estudo foi possível verificar que os Phyllostomidae apresentam grandes similaridades cromossômicas com os Molossidae, também uma família com origem provável no Velho Mundo. Estes fatos sugerem uma relação de proximidade entre essas famílias, ou seja, cromossomicamente a família Phyllostomidae está mais próxima de Molossidae do que a Emballonuridae.

Um aspecto importante na abordagem evolutiva dos táxons sob o ponto de vista filogenético, é a determinação do estado do caráter que está sendo avaliado. Em filogenética a identificação de um caráter como primitivo (plesiomórfico) ou derivado (apomórfico) é fundamental (Hennig, 1966 *in* Baker & Bass, 1979), e define a posição filogenética no relacionamento entre os organismos que estão sendo avaliados.

Os primeiros registros fósseis para as três famílias que podem ter sido possíveis ancestrais para os Phyllostomidae, ou seja, Emballonuridae, Vespertilionidae e Molossidae, datam do Eoceno (55 milhões de anos) na Europa. Porém, nas Américas, os registros datam do Mioceno (23 milhões de anos) para Vespertilionidae, Pleistoceno (um milhão) para Emballonuridae e Oligoceno (35 milhões de anos) para Molossidae. Portanto, com base nos registros fósseis, Molossidae pode ter sido a primeira a alcançar as Américas e, a partir desta, as espécies neotropicais radiaram-se adaptativamente. Para os Phyllostomidae, os

primeiros registros datam do Mioceno na América do Norte e Pleistoceno na América do Sul.

Com este pensamento e, com base nos resultados obtidos, podemos sugerir que os cromossomos de Phyllostomidae podem ter tido sua origem a partir de rearranjos ocorridos em um cariótipo ancestral semelhante ao cariótipo de *Molossus*.

A. planirostris, *P. lineatus* e *S. liliium* compartilhariam com *Molossus* duas características simplesiomórficas representadas pelos cromossomos inteiros compartilhados entre as espécies, enquanto que *G. soricina* compartilharia três e *P. hastatus* cinco, reforçando a proximidade entre *P. hastatus* e *Molossus*.

Os demais cromossomos das espécies de *A. planirostris*, *S. liliium*, *P. lineatus*, *G. soricina* e *P. hastatus*, apesar de apresentarem homologias com cromossomos e segmentos cromossômicos de *Molossus* aparecem rearranjados em decorrência dos diferentes eventos de fusões e inversões ocorridos na evolução dos cariótipos. Esses rearranjos seriam, então, os responsáveis pelas apomorfias nos cariótipos dos Phyllostomidae. Desta forma, os rearranjos compartilhados pelas cinco espécies representariam as sinapomorfias.

Os rearranjos não compartilhados e exclusivos de cada espécie representariam as autapomorfias: *A. planirostris*, *P. lineatus* e *S. liliium* com cinco, *G. soricina* com sete e *P. hastatus* com quatro.

Apesar do maior número de autapomorfias ter sido observado em *G. soricina*, as espécies *A. planirostris*, *P. lineatus* e *S. liliium* foram as espécies que apresentaram o menor número de simplesiomorfias, compartilhando praticamente o

mesmo número de sinapomorfias com *G. soricina* e *P. hastatus*. O esperado seria que elas fossem as mais autapomórficas. Cabe aqui destacar que nem todos os cromossomos ou braços cromossômicos de *Molossus* foram reconhecidos nos cariótipos de *A. planirostris*, *P. lineatus* e *S. liliium*. Além disso, *A. planirostris*, *P. lineatus*, *S. liliium* apresentam número diplóide menor ($2n = 30/31$) que os das outras duas espécies ($2n = 32$) e, à exceção de *P. hastatus*, houveram rearranjos não determinados nos cariótipos de *A. planirostris*, *P. lineatus* e *S. liliium* e *G. soricina*.

Estes fatos evidenciam que mais estudos são ainda necessários para melhor definir o relacionamento entre as espécies de Phyllostomidae. Apesar disso, os dados cromossômicos obtidos parecem justificar a inclusão das cinco espécies em subfamílias diferentes de Phyllostomidae.

Intrigante é a situação observada em *C. perspicillata*, que foi excluída de toda a discussão anterior. Isto ocorreu devido à dificuldade em incluí-la nos aspectos abordados e discutidos anteriormente. Como vimos, nenhuma homologia foi identificada entre os cromossomos de *C. perspicillata* e os das demais espécies, evidenciando que os rearranjos ocorridos ao longo da evolução do cariótipo da espécie seguiram caminhos diferentes ao das outras espécies de filostomídeos analisadas.

A única similaridade observada refere-se ao sistema de determinação de sexo que, assim como em *A. planirostris*, *S. liliium* e *P. lineatus*, em *C. perspicillata* também é do tipo XY_1Y_2 devido a uma translocação X-autossomo. Contudo, o X original difere morfologicamente e também no padrão de bandas G dos

cromossomos X das outras espécies. O X original (anterior à translocação) em *A. planirostris*, *P. lineatus* e *S. lilum* era subtelocêntrico médio em relação aos demais cromossomos do cariótipo, enquanto que em *C. perspicillata*, era representado por um cromossomos submetacêntrico médio.

Em situações como a observada em *C. perspicillata*, outras metodologias de estudo citogenético como a hibridização genômica comparativa ou ZOO-FISH têm sido importantes na determinação de homologies interespecíficas.

A hibridização genômica comparativa vem sendo utilizada em estudos inter e intrafamiliares, muitas vezes em complementação aos estudos obtidos através do bandamento G.

Volleth *et al.* (1999), baseados em estudos de hibridização genômica comparativa com sondas humanas cromossomo-específicas sugeriram alterações na filogenia da família Phyllostomidae. Seus resultados colocaram em dúvida a condição ancestral para a família, atribuída ao gênero *Macrotus*, sugerindo que *G. soricina* pudesse representar a condição ancestral.

Mais recentemente, Volleth *et al.* (2002) também através do ZOO-FISH com sondas de cromossomos humanos, puderam verificar que 25 unidades conservadas evolutivamente estão presentes em cromossomos de espécies de Micro e Megachiroptera, sendo que 10 delas puderam ser reconhecidas pelos bandamento G em análises comparativas.

No presente trabalho foram realizadas 13 hibridizações genômicas. Contudo, diferente dos estudos de Volleth *et al.* (1999, 2002), as sondas utilizadas

foram sondas genômicas preparadas a partir de DNA de algumas das espécies analisadas.

Grande similaridade entre o DNA das espécies das duas famílias pode ser verificada, reforçando os resultados obtidos com os estudos de bandas G. Foi possível verificar que as hibridizações que tiveram um maior sucesso foram aquelas em que a sonda utilizada era de espécies de Phyllostomidae. Este fato provavelmente ocorreu em virtude de problemas no processo de hibridização com a sonda de *M. ater*, pois dos sete experimentos em que a sonda foi aplicada, um deles apresentou resultado positivo.

Nas hibridizações onde a sonda de *C. perspicillata* foi aplicada aos cromossomos de *A. planirostris*, *G. soricina* e *M. ater*, ficou demonstrado que embora não tenha sido possível a identificação de homologias entre *C. perspicillata* e as demais espécies pelo bandamento G, existe uma grande quantidade de seqüências de DNA homólogas entre *C. perspicillata* e as outras espécies de Phyllostomidae, assim como com *Molossus*.

As diferenças na quantidade de grânulos fluorescentes sobre os cromossomos de *P. lineatus*, *G. soricina* e *A. planirostris* hibridizados com a sonda de *C. perspicillata*, não podem ser interpretados como sendo devidas a uma maior homologia entre as seqüências de DNA de *P. lineatus* e *C. perspicillata*, pois não é possível excluir as variações nos procedimentos técnicos que poderiam também refletir no sinal fluorescente.

A hibridização genômica com o uso de sondas obtidas a partir de DNA total como a realizada neste trabalho, não possibilita a obtenção de dados precisos como os obtidos através da hibridização com sonda de cromossomos individuais. No entanto, fornece uma informação adicional, apesar de grosseira, acerca do relacionamento entre as diferentes espécies estudadas.

Estudo semelhante foi feito por Svartman & Vianna-Morgante (1999). Em complementação aos resultados obtidos através do bandamento G, as autoras puderam verificar, através da hibridização genômica em sete espécies de marsupiais da família Didephidae, que há um extensivo conservacionismo genômico entre os autossomos das espécies e que a heterocromatina constitutiva é bastante variável na sua composição.

Um outro procedimento de hibridização que tem sido muito importante na complementação dos resultados obtidos nos estudos dos cromossomos com técnicas convencionais é a hibridização *in situ* fluorescente usando sondas de seqüências repetitivas de DNA telomérico. Os vários estudos têm fornecido informações interessantes sobre a localização desses sítios de DNA nos cromossomos de várias espécies animais, além de confirmar possíveis rearranjos envolvidos na diferenciação das espécies.

A análise da hibridização com a sonda telomérica nas espécies do presente trabalho permitiu verificar que, à semelhança do observado na literatura, os sítios de DNA telomérico estão presentes nas regiões dos telômeros dos

cromossomos, além de ocorrerem também em regiões intersticiais e, em algumas espécies, apareceram associados à heterocromatina constitutiva.

As seis espécies analisadas, *A. planirostris*, *S. liliun*, *P. lineatus*, *C. perspicillata*, *M. ater* e *M. molossus*, apresentaram marcações nos telômeros dos cromossomos, com pouca ou nenhuma variação na intensidade dos sinais. Estes resultados eram os esperados, uma vez que os telômeros são constituídos pelo DNA telomérico, um tipo especial de DNA que consiste de seqüências repetidas em *tandem* (TTAGGG)_n (Moyzis *et al.*, 1988; Beissmann & Masson, 1994).

Os cromossomos subtelocêntricos das espécies *A. planirostris*, *P. lineatus*, *S. liliun* e *C. perspicillata* apresentam heterocromatina constitutiva nos telômeros (Varella-Garcia *et al.*, 1989). Nestes cromossomos os sítios de DNA telomérico foram coincidentes com regiões de heterocromatina constitutiva. A associação entre as seqüências teloméricas e heterocromatina constitutiva tem sido observada nos cromossomos de várias espécies de vertebrados (Meyne *et al.*, 1990; Vermeesch *et al.*, 1996; Ono & Yoshida, 1997; Pagnozzi *et al.*, 2000). Embora esta associação não esteja esclarecida, há sugestões de que ela poderia indicar que a seqüência (TTAGGG)_n é um componente do DNA satélite (Metcalf *et al.*, 1998).

O genoma da maioria dos eucariotos contém várias famílias de seqüências de DNA repetitivo (satélite), muitas com repetições em *tandem*, localizadas próximas aos centrômeros ou telômeros, e menos freqüentemente em regiões intersticiais dos braços cromossômicos (Garrido-Ramos *et al.*, 1998).

As regiões de heterocromatina constitutiva constituem sítios onde algumas famílias de DNA altamente repetitivos estão localizadas. A variação na composição das frações do DNA satélite explicaria o fato de que nem todas as regiões de heterocromáticas hibridizam com a sonda telomérica, a exemplo das regiões pericentroméricas heterocromáticas de cromossomos de *A. planirostris*, *P. lineatus*, *S. liliium* e *Molossus*.

Apesar da análise dos padrões de bandas G indicar que alguns cromossomos meta e submetacêntricos de *A. planirostris*, *P. lineatus*, *S. liliium* surgiram, aparentemente, da fusão de cromossomos que supostamente possam ser considerados primitivos para a família, nenhuma marcação intersticial foi observada nos cromossomos dessas espécies ou nos cromossomos submetacêntricos das espécies de *Molossus* analisadas.

Há na literatura vários trabalhos relatando a presença de sítios teloméricos pericentroméricos em cromossomos originados por fusões Robertsonias. Fagundes & Yonenaga-Yassuda (1998), estudando duas espécies de roedores, verificaram a manutenção de seqüências teloméricas intersticiais em um evento de fusão cêntrica recente, colocalizadas com blocos de heterocromatina constitutiva. Os resultados permitiram às autoras sugerir que a amplificação das seqüências (TTAGGG)_n está relacionada com a amplificação de regiões de heterocromatina constitutiva.

Recentemente, Castiglia *et al.* (2002) também verificaram que os cromossomos metacêntricos Robertsonianos de *Mus musculus* e *Mus musculoides*

apresentam sítios de DNA telomérico intersticiais não associados à heterocromatina constitutiva, indicando que estas seqüências podem representar telômeros retidos na fusão Robertsoniana.

A ausência de sítios fluorescentes em regiões pericentroméricas e intersticiais não exclui a ocorrência de fusões cromossômicas na origem dos cromossomos meta/submetacêntricos. Há análises de hibridização *in situ* fluorescente nos cariótipos de várias espécies animais em que sabidamente os cromossomos são originados de fusão, onde nenhum sítio intersticial foi observado nos sítios de fusão (Meyne *et al.*, 1990; Nanda *et al.*, 1995; Vermeesch *et al.*, 1996; Silva & Yonenaga-Yassuda, 1998). Como vimos na Introdução, isto pode ser devido à perda das seqüências teloméricas dos cromossomos antes do evento de fusão (Slijepcevic, 1998).

Também tem sido sugerido que os telômeros inicialmente retidos durante os processos de fusão podem ser perdidos subsequente através de novos rearranjos (Meyne *et al.* 1990). Ambas as interpretações podem servir para explicar a ausência de sítios intersticiais nos cromossomos submetacêntricos das espécies de *Stenodermatinae* e *Molossus*.

Diferente do observado nas outras espécies analisadas, em *C. perspicillata* os sítios de hibridização com as seqüências teloméricas ocorreram além dos telômeros dos cromossomos, nas regiões pericentroméricas da maioria dos cromossomos. Os cromossomos de *C. perspicillata* são caracterizados pela presença de grandes blocos de heterocromatina constitutiva pericentroméricos e terminais, de

tal forma que a coincidência entre sítios de DNA telomérico e as regiões de heterocromatina foi muito evidente. Apenas a região pericentromérica do X não mostrou fluorescência após a hibridização.

A localização intracromossômica das seqüências teloméricas tem sido relatada em várias espécies. Porém, a origem e o papel das seqüências teloméricas em sítios não teloméricos não está ainda esclarecida. Sítios teloméricos intersticiais têm sido interpretados como sendo remanescentes de telômeros verdadeiros, resultantes de rearranjos cromossômicos como inversões e fusões cêntricas ou em *tandem* (Lee *et al.*, 1993; Pellegrino *et al.*, 1996; Vermeesch *et al.*, 1996).

Há também sugestões que eles podem ter sido gerados por mecanismos tais como mutações, crossing-over desigual, transposição ou amplificação de seqüências de DNA (TTAGGG)_n endógenas, ou pelos mecanismos de reparo em quebras ocorridas na linhagem germinativa durante a evolução (Vermeesch *et al.*, 1996; Garagna *et al.*, 1997; Sharma & Sharma, 1998; Azzalin *et al.*, 2001; Faravelli *et al.*, 2002).

A falta de homologias no padrão de bandas G entre *C. perspicillata* e as demais espécies estudadas indica a grande complexidade na formação desse cariótipo. Esta espécie apresenta um dos menores números diplóides entre as espécies de Phyllostomidae e foi a única em que uma grande quantidade de DNA telomérico intersticial pode ser visualizado. Portanto, qualquer uma das interpretações

apresentada para a presença dos sítios intersticiais pode ser aplicada à *C. perspicillata*.

Meyne *et al.* (1990), após analisar a localização dos sítios de DNA telomérico em muitas espécies de vertebrados, sugeriram que a presença de sítios teloméricos não terminais podem estar relacionados ao “estatus” evolutivo da espécie. Segundo os autores, as espécies mais primitivas apresentariam apenas sítios terminais, enquanto que as espécies evoluídas e altamente diferenciadas teriam sítios teloméricos e não teloméricos. Os resultados do presente trabalho em relação à *C. perspicillata*, suportam essa idéia. Assim, *C. perspicillata* seria, entre as espécies analisadas, a mais derivada.

Os dados citogenéticos apresentados neste trabalho, além de contribuir para a caracterização cromossômica de diferentes espécies de Chiroptera, evidenciam que entre os mecanismos cromossômicos que participam da evolução dos cariótipos de morcegos, os eventos Robertsonianos e pequenas inversões foram os mais frequentes. Contudo, há táxons de Chiroptera, como o de *C. perspicillata*, onde os eventos ocorridos na formação do cariótipo não poderiam ser simplesmente explicados por fusões e inversões. Rearranjos mais complexos envolvendo as seqüências eucromáticas e heterocromáticas, assim como seqüências teloméricas, devem ter ocorrido na evolução daquele cariótipo.

É possível destacar também, pelos resultados do presente trabalho, que as famílias Phyllostomidae e Molossidae estão intimamente relacionadas

cromossomicamente, o que evidencia que elas estão muito próximas quanto à sua origem.

•

VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIAR, L. M. S.; TADDEI, V. A. (Eds). Lista revisada das espécies ocorrentes no Brasil. In: News, pp 24-26. **Chiroptera Neotropical**, v. 1, p. 11-36, 1995.

ANDRADES-MIRANDA, J.; ZANCHIN, N. I. T.; OLIVEIRA, L. F. B.; LANGGUTH, A. R.; MATTEVI, M. S. (T₂AG₃) telomeric sequence hybridization indicating centric fusion rearrangements in the karyotype of the rodent *Oryzomys subflavus*. **Genetica**, v. 114, p. 11-16, 2002.

ARNASON, U.; ALLDERDICE, P.W.; LIEN, J.; WILDEGREN, B. Highly repetitive DNA in the baleen whale genera *Balaenoptera* and *Megaptera*. **J. Molec. Evol.**, v. 27, p. 217-221, 1988.

AZZALIN, C. M.; NERGADZE, S. G.; GIULOTTO, E. Human intrachromosomal telomeric-like repeats: sequence organization and mechanisms of origin. **Chromosoma**, v. 110, p. 75-82, 2001.

BAKER, R. J.; BASS, R.A. Evolutionary relationship of the Brachyphyllinae to the Glossophaginae genera *Glossophaga* and *Monophyllus*. **J. Mamm.**, v. 60, p. 364-372, 1979.

BAKER, R. J.; BASS, R. A.; JOHNSON, M. A. Evolutionary implications of chromosomal homology in four genera of Stenodermatinae bats (Phyllostomidae: Chiroptera). **Evolution**, v. 33, p. 220-226, 1979.

BAKER, R. J.; BICKHAM, J. M.; ARNOLD, M, L. Chromosomal evolution in *Rhogeessa* (Chiroptera, Vespertilionidae): possible speciation by centric fusions. **Evolution**, v. 39, p. 233-243, 1985.

BAKER, R. J.; HOOD, C. S.; HONEYCUTT, R. L. Phylogenetic relationships and classification of the higher categories of the New World bat family Phyllostomidae. **Syst. Zool.**, v. 38, p. 228-238, 1989.

BAKER, R. J.; QUMSIYEH, M.G.; HOOD,C.S. Role of chromosomal banding patterns in understanding mammalian evolution. In. GENOWAYS, H. H., (ED). Current mammalogy. Plenum Press, New York, pp. 67-96, 1987.

BAKER, R. J.; HAIDUCK, M. W.; ROBBINS, L. W.; CADENA, A.; KOOP, B. F. Chromosomal studies on South American bats and their systematic implications. In MARES, M.A.; GENOWAYS, H.H. (eds). Mammalian Biology in South America, **Special Publication Series Pymatuning Laboratory of Ecology**, v. 4, p.303-327, 1982.

BEISSMAN, H.; MASSON, J. M. Telomeric repeat sequences. **Chromosoma**, v. 103, p. 154-161, 1994.

BICKHAM, J. W. Chromosomal variation and evolutionary relationship of vespertilionid

bats. **J. Mammal.**, v. 60, n. 2, p. 350-363, 1979.

BICKHAM, J. W.; BAKER, R. J. Implications of chromosomal variation in *Rhogeessa* (Chiroptera: Vespertilionidae). **J. Mammal.**, v. 58, p. 448-453, 1977.

BICKHAM, J. W.; HAFNER, J. C. A chromosomal banding study of three species of vespertilionid bats from Yugoslavia. **Genetica**, v. 48, p. 1-3, 1978.

BICKHAM, J. W.; MCBEE, K.; SCHLITTER, D. A. Chromosomal variation among seven species of *Myotis* (Chiroptera: Vespertilionidae). **J. Mammal.**, v. 67, p. 746-750, 1986.

BIELEC, P.E.; GALLAGHER, D.S.; WOMACK, J.E.; BUSBEE D.L., Homologies between human and dolphin chromosomes detected by heterologous chromosome painting **Cytogenet. Cell Genet.** v. 81, p. 18-25, 1998.

BOSMA, A.; HAAN, N.A.; MELLINK, C.H.M.; YERLE, M.; ZIJLSTRA, C. Chromosome homology between the domestic pig and babirusa (family Suidae) elucidated with the use of porcine painting probes. **Cytogenet. Cell Genet.** v.75, p. 32-35, 1996.

CARVALHO B. A.; MATTEVI, M. S. (T₂AG₃) telomeric sequence hybridization suggestive of centric fusion in karyotype marsupials evolution. **Genetica**. v. 108, p. 205-210, 2000.

CASTIGLIA, R.; GORNUNG, E.; CORTI, M. Cytogenetic analyses of chromosomal rearrangements in *Mus minutoides/musculoides* from North-West Zambia through mapping of the telomeric sequence (TTAGGG)_n and banding techniques. **Chromosome Res.** v. 10, p. 399-406, 2002.

CHOWDHARY, B. P.; RAUDSEPP, T.; FRÖNICKE L.; SCHERTAN, H. Emerging patterns of comparative genome organization in some mammalian species as revealed by ZOO-FISH. **Genome Res.**, v. 8, p. 577-589, 1998.

DE GROUCHY, J.; TURLEAU, C. **Atlas de Maladies Chromosomiques**. Paris Expansion Scientific Française, 1977.

FAGUNDES, V.; YONENAGA-YASSUDA, Y. Evolutionary conservation of whole homeologous chromosome arms in the akodont rodents *Bolomys* and *Akodon* (Muridae, Sigmodontinae): maintenance of interstitial telomeric segments (ITBs) in recent event of centric fusion. **Chromosome Res.**, v. 6, p. 643-648, 1998.

FARAVELLI, M.; AZZALIN, C. M.; BERTONI, L.; CHERNOVA, O.; ATTOLINI, C.; MONDELLO, C.; GIULOTTO. Molecular organization of internal telomeric sequences in Chinese hamster chromosomes. **Gene**, v. 283, p. 11-16, 2002.

GARAGNA, S.; BROCCOLI, D.; REDI, C. A.; SEARLE, J. B.; COOKE, H. J.; CAPANNA, E. Robertsonian metacentrics of the mouse lose telomeric sequences but retains some minor satellite DNA in the pericentromeric area. **Chromosoma**, v. 103, p. 688-692, 1995.

GARAGNA, S.; MARZILIANO, N.; ZUCCOTTI, M.; SEARLE, J. B.; CAPANNA, E.; REDI, C. A. Pericentromeric organization at the fusion point of mouse Robertsonian translocation chromosomes. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 98, p. 171-175, 2001.

GARAGNA, S.; RONCHETTI, E.; MARCHERETTI, S.; CROVELLA, S.; FORMENTI, D.; RUMPLER, Y.; MANFREDI-ROMANINI, M. G. Non-telomeric chromosome localization of (TTAGGG)_n repeats in the genus *Eulemur*. **Chromosome Res.**, v. 5, p. 487-491, 1997.

GARRIDO-RAMOS, M. A. ; HERRAN, R.; REJÓN, C.R.; REJÓN, M. R. A satellite DNA of the Sparidae family (Pisces, Perciformes) associated with telomeric sequences. **Cytogenet. Cell Genet.**, v. 83, p. 3-9, 1998.

GIOLOTTO, E. Interstitial telomeric DNA and chromosome instability. **Rev. Brasil. Genet.** v. 20 (suppl.), p. 55-56, 1997.

GREGORIN, R.; TADDEI, V. A. Chave artificial para a identificação de Molossídeos brasileiros (Mammalia, Chiroptera). **J. Neotrop. Mammal.**, v. 9, p. 13-32, 2002.

HAIIDUK, M. W.; BAKER, R. J. Cladistical analysis of G-banded chromossomes of nectar-feeding bats (Glossophaginae, Phyllostomidae). **Syst.Zool.**, v. 31. p. 252-265, 1982.

HOOD, C. S.; BAKER, R. J. G – and C – banding chromosola studies of bats of the family Emballonuridae. **J. Mamm.**, v. 67, p. 705-711, 1986.

JONES, J. K.; GENOWAYS, H. H. Chiropteran Systematics. In: Slaughter, B. H., Walton, D. W. (Eds) **About bats.** a Chiropteran symposium. Dallas: Southern Methodist University Press, 1970, 339 p.

JONES, JR. J K.; CARTER, D. C. Annotated checklist, with keys to subfamilies and genera. **Spec. Publ. Mus.**, Texas Tech Univ., v. 10, p. 7-38, 1976.

JONES, K. E.; PURVIS, A.; MacLARNON, A.; BININDA-EDMONDS, O. R. P.; SIMMONS, N. B. A phylogenetic supertree of the bats (Mammalia: Chiroptera). **Biol. Rev.**, v. 77, p 223-259, 2002.

KING, M. **Species Evolution. The Role of Chromosome Change**, Cambridge: Cambridge University Press., 1993.

LEE, C.; SASI, R.; LIN, C. C. Interstitial localization of telomeric DNA sequences in the Indian muntjac chromosomes: Further evidence for tandem chromosome fusions in the Karyotypic evolution of the Asian muntjacs. **Cytogenet. Cell Genet.**, v. 63, p. 156- 159, 1993.

LIU, W. S.; FREDGA, K. Telomeric (TTAGGG)_n sequences are associated with nucleolus organizer regions (NORs) in the wood lemming. **Chromosome Res**, v. 7, p. 235-240, 1999.

LUKE, S.; VERMA, R. S. Telomeric repeat (TTAGGG)_n sequences of human chromosomes are conserved in chimpanzee (*Pan troglodytes*). **Mol. Gen. Genetics**, v. 237, p. 460-462, 1993.

McKENNA C. M; BELL S. K. **Classification of mammals above the species level**. New York, Columbia University, 631p., 1998.

METCALFE, C.J.; ELDRIDGE, M.S.; TODER, R.; JOHNSTON, P.G. Mapping the distribution of the telomeric sequence (T2AG3)_n in the Macropodoidea (Marsupialia), by fluorescence in situ hybridization. I. The swamp wallaby, *Wallabia bicolor*. **Chromosome Res**. v. 6, p. 603-610, 1998.

MEYNE, J.; RATLIFF, R.L.; MOYZIS, R.K. Conservation of the human telomere sequence (TTAGGG)_n among vertebrates. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v.89, p. 7049-7053, 1989.

MEYNE, J.; BAKER, R. J.; HOBART, H. H.; HSU, T. C.; RYDER, O. A.; WARD, O. G.; WILEY, J. E.; WURSTER-HILL, D. H.; YATES, T. L; MOYZIS, R. K. Distribution of non-telomeric sites of the (TTAGGG)_n telomeric sequence in vertebrate chromosomes. **Chromosoma**, v. 99, p. 3-10, 1990.

MORIELLE-VERSUTE, E.; VARELLA-GARCIA, M. A simple and fast procedure to grow bat fibroblasts from lung biopsies for cytogenetic studies. **Brazilian J. Genet.**, v. 18, p. 503-505, 1995.

MORIELLE-VERSUTE, E.; VARELLA-GARCIA, M.; TADDEI, V. A. Karyotypic patterns of seven species of molossid bats (Molossidae, Chiroptera). **Cytogenet. Cell Genet.**, v. 72, p. 26-33, 1996.

MOYZIS, R. K.; BUCKINGHAM, J. M.; CRAM, L. S.; DANI, M.; DEAVEN, L. L.; JONES, M. D.; MEYNE J.; RATLIFF, R. L.; WU, J. R. A highly conserved repetitive DNA SEQUENCE, (TTTAGGG)_n present at the telomeres of human chromosomes. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 85, p. 6622-6626, 1988.

MÜLLER, S.; O'BRIEN, P. C. M.; FERGUSON-SMITH, M. A.; WIENBERG, J. Reciprocal chromosome painting between human and prosimians (*Eulemur macaco macaco* and *E. fulvus mayottensis*). **Cytogenet Cell Genet.** v. 78, p. 260-271, 1997.

MÜLLER, S.; STANYON, R.; O'BRIEN, P. C. M.; FERGUSON-SMITH, M. A.; PLESKER, R.; WIENBERG, J. Defining the ancestral karyotype of all primates by multidirectional chromosome painting between tree shrews, lemurs and humans. **Chromosoma.**, v. 108, p. 393-400, 1999.

NANDA, I.; SCHNEIDER-RASP, S.; WINKING, H.; SCHIMID, M. Loss of telomeric sites in the chromossomes of *Mus musculus domesticus* (Rodentia: Muridae) during Robertsonian rearrangements. **Chromosome Res.**, v. 3, P. 399-409, 1995.

NASH, W. G; WIENBERG, J.; FERGUNSON-SMITH M. A.; MENNINGER, J. C., O'BRIEN, S. J. Comparative genomics: tracking chromosome evolution in the family Ursidae using reciprocal chromosome painting. **Cytogenet. Cell Genet.** v.83, p. 182-192, 1998.

NEITZEL, N. Chromosome evolution of Cervidae: Karyotypic and molecular aspects. In: OBE, G. Baslev, A. (ed) Cytogenetics. Springer- Verlag, Berlin, pp. 90-112, 1987.

NOWAK, R.M. **Walker's mammals of the world.** 6^a ed., Baltimore: Johns Hopkins University, v. 1, p: 253-470, 1999.

ONO, T., YOSHIDA, M.C. Differences in the chromosomal distribution of telomeric (TTAGGG)_n sequences in two species of the vespertilionid bats. **Chromosome Res.**, v. 5, p. 203-212, 1997.

PAGNOZZI, J. M.; SILVA, M. J. J.; YONENAGA-YASSUDA, Y. Intraspecific variation in the distribution of the interstitial telomeric (TTAGGG)_n sequences in *Micoureus demerarae* (Marsupialia: Didelphidae). **Chromosome Res.** v. 8, p. 585-591, 2000.

PATTON, J. C.; BAKER, R. J. Chromosomal homology and evolution of phyllostomatoid bats. **Syst. Zool.**, v. 27, p. 449-462, 1978.

PELLEGRINO, K. C. M., RODRIGUES, M. T., YONENAGA-YASSUDA, Y. Cariótipos de duas espécies de microteídeos do gênero *Leposoma* (Sauria, Gymnophthalmidae) investigados através de hibridação **in situ** fluorescente (FISH) de sondas teloméricas. **Rev. Brasil. Genet.**, v. 19 (Suppl), p. 107, 1996.

RICHARD F.; MESSAOUDI, C.; LOMBARD, M.; DUTRILLAUX, B. Chromosome homologies between man and mountain zebra (*Equus zebra hartmannae*) and description of a new ancestral synteny involving sequences homologous to human chromosomes 4 and 8. **Cytogenet. Cell Genet.** v. 93, p. 291-296, 2001.

ROBINSON, T.J., WILSON, V., GALLAGHER Jr. D.S., TAYLOR, J.F., DAVIS, S.K., HARRISON, W.R., ELDER, F.F.B. Chromosomal evolution in duiker antelope (Cephalophinae: Bovidae): Karyotype comparisons, fluorescence **in situ** hybridization, and raptant X chromosome variation. **Cytogenet. Cell Genet.** v. 73, p. 116-122, 1996.

RODRIGUES, L. R. R.; BARROS, R. M. S.; ASSIS, M. F. L.; MARQUES-AGUIAR, S. A.; PIECZARKA, J. C.; NAGAMACHI, C. Y. Chromosome comparison between two species of *Phyllostomus* (Chiroptera – Phyllostomidae) from Eastern Amazonia, with some phylogenetic insights. **Genet. Mol. Biol.**, v. 23. P. 595-599, 2000.

ROGATCHEVA, M. B.; ONO, T.; SONTA, S.; ODA, S.; BORODIN, P. M. Robertsonian metacentrics of the house musk shrew (*Suncus murinus*, Insectivora, Soricidae) lose the telomeric sequences in the centromeric area. **Genes Genet. Syst.**, v. 75, p. 155-158. 2000.

SEUÑEZ H. N. The chromosomes of man: evolutionary considerations. In OBE, G., BASLER, A. (ed) Cytogenetics. Springer-Verlag, Berlin, pp: 65-89, 1987.

SHARMA, G. G.; SHARMA, T. Unusual chromosomal organization of telomeric sequences and expeditious karyotypic differentiation in the recently evolved *Mus terricolor* complex. **Cytogenet. Cell Genet.**, v. 80, p. 204-208 (1998).

SHEN, M.; HAGGBLOM, C.; VOGT, M.; HUNTER, T.; LU, K. P. Characterization and cell cycle regulation of the related human telomeric proteins Pin2 and TRF1 suggest a role in mitosis. **Proc. Natl. Acad.Sci. USA**, v. 94, p. 13618-13623, 1997.

SILVA, M. J. J.; YONENAGA- YASSUDA Y. Heterogeneity and meiotic behavior of B and sex chromosome, banding patterns and localization of (TTAGGG)_n sequences by fluorescence **in situ** hybridization in the neotropical water rat *Nectomys* (Rodentia, Cricetidae). **Chromosome Res.**, v. 6, p. 455-462, 1998.

SIMMONS, N. B. A reapraisal of interfamilial relationships of bats In: KUNZ, T. H; RACEY , P. A., **Bat: biology and conservation**. Smithsonian Institution, London, 1998, p. 3-26.

SIMMONS, N. B.; GEISLEIR , J. H. Phylogenetic relationships of *Icaronycteris*, *Archeonycteris*, *Hassianycteris* and *Palaeochiropteryx* to extant bat lineages, with comments on the evolution of echolocation and foraging strategies in Microchiroptera. **Bull. Am. Mus. Nat. Hist.**, v. 235, p. 1- 82, 1998.

SLIJEPCEVIC, P. Telomeres and mechanism of Robertsonian fusion. **Chromosoma**, v. 107, p. 136-140, 1998.

SMITH, J. D. Systematics of the chiropteran family Mormoopidae. **Misc. Publ. Mus. Nat. Hist.**, v. 56, p. 1-132, 1972.

SMITH, J. D. Chiropteran evolution. **Spec Publ. Mus. Texas Tech Univ.**, v. 10, 49- 69, 1976.

STOCK, A. D. Chromosome banding pattern homology and its phylogenetic implications in the bat genera *Carollia* and *Choeronyctus*. **Cytogenet. Cell Genet.**, v.14, p. 34-41, 1975.

STOCK, A. D. Chromosomal homologies and phylogenetic relationships of the vespertilionid bat genera *Euderma*, *Idionycteris* and *Plecotus*. **Cytogenet. Cell Genet.**, v. 35, p. 136-140, 1983.

SVARTMAN, M., VIANNA-MORGANTE, A.M. Comparative genome analysis in American marsupials: Chromosome banding and **in situ** hybridization. **Chromosome Res.** v. 7, p. 267-275, 1999.

TADDEI, V.A. Sistemática de Quirópteros. **Boletim do Instituto Pasteur (Secretaria de Estado da Saúde) São Paulo**, v. 01, p. 3-8, 1996.

TADDEI, V.A. Taxonomia de Morcegos. **Biológico**, v. 59, p. 89-92, 1997.

TUCKER, P. K. Sex chromosome – autosome translocations in the leaf –nosed bats, family Phyllostomidae. I. Mitotic analysis of the subfamilies Stermodermatinae and Phyllostominae. **Cytogenet. Cell Genet.**, v. 43, p. 19-27, 1986.

VARELLA GARCIA, M.; TADDEI, V. A. Citogenética de quirópteros: métodos e aplicações. **Rev. Brasil. Zool.**, v. 6, p. 297, 1989.

VERMEESCH, J. R.; De MEURICHY, W.; VAN DEN BERGHE, H.; MARY NEN, P.; PETIT, P. Differences in the Chromosomes of the Giraffidae, okapi (*Okapia johnstoni*), and giraffe (*Giraffa camelopardalis*): evidence for ancestral telomeres at the okapi polymorphic rob (4:26) fusion site. **Cytogenet. Cell Genet.**, v. 72, p. 310-315, 1996.

VEZULI, A; HAUWY M.; WARTER, S.; RUMPLER Y. Chromosome painting: a method for testing chromosomal changes in lemur evolution. **Cytogenet. Cell Genet.** v. 78, p. 147-152, 1997.

VOLLETH, M; HELLER, K. G.; PFEIFFER, R. A.; HAMEISTER, H. A comparative ZOO-FISH analysis in bats elucidates the phylogenetic relationships between Megachiroptera and five microchiropteran families. **Chromosome Res.**, v. 10, p. 477-497, 2002.

VOLLETH, M.; KLETT, C.; KOLLAK, A.; DIXKENS, C.; WINTER, Y.; JUST, W. VOGEL, W.; HAMEISTER, H. ZOO-FISH analysis in a species of the order Chiroptera: *Glossophaga soricina* (Phyllostomidae). **Chromosome Res.**, v. 7, p.57-64, 1999.

WARNER, J. W.; PATTON, J. L.; GARDNER, A L.; BAKER, R. J. Karyotypic analysis of twenty-one species of molossid bats (Molossidae, Chiroptera). **Can. J. Genet. Cytol.**, v. 16, p. 165-174, 1974.

WETTERER, A. L.; ROCKMAN, M.V.; SIMMONS, N.B. Phylogeny of Phyllostomid bats (Mammalia: Chiroptera). Data from diverse morphological systems, sex chromosome, and restriction sites. **Bull. Am. Mus. Nat. Hist.**, v. 248, p. 1-200, 2000.

ZAKIAN, V.A. Telomeres: benning to understand the end. **Science**, v. 270, p. 1601-1607, 1995.

VII. RESUMO

Para verificar a ocorrência de homologias cromossômicas entre espécies de Molossidae e Phyllostomidae (Chiroptera), foram realizadas análises comparativas do bandamento G e, hibridização *in situ* fluorescente genômica e telomérica nas espécies *Carollia perspicillata* (Caroliinae), *Glossophaga soricina* (Glossophaginae), *P. hastatus* (Phyllostominae), *Sturnira lilium*, *Platyrrhinus lineatus* e *Artibeus planirostris* (Stenodermatinae) de Phyllostomidae e, *Molossus ater* e *Molossus molossus* (Molossinae) de Molossidae.

As análises do bandamento G evidenciaram que, à exceção de *C. perspicillata*, todas as demais espécies de Phyllostomidae compartilham homologias cromossômicas com as espécies de Molossidae.

As espécies *A. planirostris*, *P. lineatus* e *S. lilium* apresentam 29 dos 32 braços cromossômicos de *Molossus*. Estas espécies compartilham dois cromossomos inteiros e os braços de oito cromossomos meta ou submetacêntricos destas espécies de Stenodermatinae apresentam homologias com cromossomos acrocêntricos e subtelo-cêntricos de *Molossus*. *G. soricina* também apresenta 29 braços cromossômicos de *Molossus*, sendo que três cromossomos inteiros são compartilhados e os braços de sete cromossomos de *G. soricina* apresentam homologias com cromossomos acrocêntricos e subtelo-cêntricos de *Molossus*. Todos os braços cromossômicos de *P. hastatus* apresentaram homologias com os cromossomos de *Molossus*. *P. hastatus* e *Molossus*

compartilham cinco cromossomos inteiros e os braços de oito cromossomos de *P. hastatus* apresentam homologies com os cromossomos acrocêntricos e subtelocêntricos de *Molossus*. Estes resultados parecem sugerir uma proximidade maior das espécies de Molossidae com *P. hastatus* (Phyllostominae).

Além de rearranjos do tipo fusões e inversões pericêntricas, outros rearranjos cromossômicos não determinados justificam as diferenças entre os cariótipos das espécies de Phyllostomidae e Molossidae comparadas.

As hibridizações genômicas comparativas com sonda *Molossus* aplicada aos cromossomos das espécies de Phyllostomidae, e sondas de Phyllostomidae aplicadas aos cromossomos de *Molossus* e de espécies desta mesma família, porém de subfamília diferente, revelaram a grande similaridade entre as seqüências de DNA das duas famílias, além de reforçar as homologies identificadas pelo bandamento G. Nas hibridizações envolvendo sonda de DNA de *C. perspicillata*, ficou demonstrado que, embora nenhuma homologia de bandas tenha sido detectada entre os cromossomos de *C. perspicillata* e os das demais espécies, existe homologies nas seqüências de DNA entre *C. perspicillata* e as outras espécies analisadas.

As hibridizações *in situ* com sonda de telomérica revelou que as espécies *A. planirostris*, *P. lineatus*, *S. liliun* e *C. perspicillata* apresentam sítios de DNA telomérico nos telômeros dos cromossomos, alguns coincidindo com a heterocromatina constitutiva e RONS. Apenas *C. perspicillata* apresentou sinais

fluorescentes em regiões pericêntricas dos cromossomos, também coincidentes com heterocromatina constitutiva.

Estes resultados sugerem a perda de DNA telomérico nos eventos de fusão ocorridos na origem dos cromossomos meta/submetacêntricos de *A. planirostris*, *P. lineatus* e *S. lilium*. Em *C. perspicillata* são indicativos da ocorrência de extensos rearranjos cromossômicos na evolução do cariótipo.

Considerando que Molossidae é uma família que ocorre no Velho e Novo Mundo e uma das candidatas à possível ancestral dos morcegos neotropicais, é possível sugerir que os cromossomos de Phyllostomidae podem ter sido originados de um cariótipo semelhante ao observado *Molossus* através de rearranjos do tipo fusões e inversões pericêntricas.

Palavras chave: Citogenética, Hibridização *in situ* fluorescente, Molossidae, Phyllostomidae, Chiroptera.

VIII. ABSTRACT

To verify the occurrence of chromosome homologies between species of Molossidae and Phyllostomidae (Chiroptera), comparative analysis of the G-banding and genomic and telomeric fluorescence *in situ* hybridization were accomplished in the species *Carollia perspicillata* (Caroliinae), *Glossophaga soricina* (Glossophaginae), *Phyllostomus hastatus* (Phyllostominae), *Sturnira lilium*, *Platyrrhinus lineatus* and *Artibeus planirostris* (Stenodermatinae) of Phyllostomidae and, *Molossus ater* and *Molossus molossus* (Molossinae) of Molossidae.

The analysis of the G-banding evidenced that except *C. perspicillata* all the other species of Phyllostomidae share chromosome homologies with the species of Molossidae.

The species *A. planirostris*, *P. lineatus* and *S. lilium* present 29 of the 32 chromosome arms of *Molossus*. These species share two whole chromosomes and the arms of eight meta or submetacentric chromosomes of these species of Stenodermatinae present homologies with acrocentric and subtelocentric chromosomes of *Molossus*. *G. soricina* also presents 29 chromosome arms of *Molossus*, in a way that three whole chromosomes are shared and the arms of seven chromosomes of *G. soricina* present homologies with acrocentric and subtelocentric chromosomes of *Molossus*. All of the chromosome arms of *P. hastatus* presented homologies with the chromosomes of

Molossus. *P. hastatus* and *Molossus* share five whole chromosomes and the arms of eight chromosomes of *P. hastatus* present homologies with the acrocentrics and subtelocentrics chromosomes of *Molossus*. These results seem to suggest a larger proximity of the species of Molossidae with *P. hastatus* (Phyllostominae).

Besides rearrangements like fusions and pericentric inversions, other not determined chromosome rearrangements justify the differences between the karyotype of the compared species of Phyllostomidae and Molossidae.

The comparative genomic hybridizations with *Molossus* probe applied to the chromosomes of the species of Phyllostomidae, and Phyllostomidae probes applied to the chromosomes of *Molossus* and of species of this same family, however of a different subfamily, have revealed the great similarity between the sequences of DNA of the two families, besides reinforcing the homologies identified by the G banding. In the hybridizations involving *C. perspicillata* DNA probe, it was demonstrated that, although no homology of bands has been detected between the chromosomes of *C. perspicillata* and the ones of the other species, there are homologies in the sequences of DNA between *C. perspicillata* and the other species analyzed.

The *in situ* hybridization with telomeric probe revealed that the species *A. planirostris*, *P. lineatus*, *S. lilium* and *C. perspicillata* present sites of telomeric DNA in the telomeres of the chromosomes, some coinciding with the constitutive heterochromatin

and RONS. Only *C. perspicillata* presented fluorescent signs in pericentromeric areas of the chromosomes, also coincident with constitutive heterocromatin.

These results suggest the loss of telomeric DNA in the fusions events occurred in the origin of the meta/submetacentric chromosomes of *A. planirostris*, *P. lineatus* and *S. lilium*. In *C. perspicillata* they are indicative of the occurrence of extensive chromosome rearrangements in the evolution of the karyotype.

Considering that Molossidae is a family that occur origin in the Old and New World and one of candidates to possible ancestor of neotropical bats, it is possible to suggest that the chromosomes of Phyllostomidae may have been originated in a karyotype similar to the observed *Molossus* through rearrangements like fusions and pericentric inversions.

Keywords: cytogenetic, fluorescence *in situ* hybridization, Molossidae, Phyllostomidae, Chiroptera.

O presente trabalho foi realizado no Departamento de Biologia do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto, da Universidade Estadual Paulista (IBILCE/UNESP), sob a orientação da Profa. Dra. Hermione Elly Melara de Campos Bicudo, com auxílio-bolsa da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES.

Autorizo a reprodução em fotocópia deste trabalho, para fins de estudo e pesquisa.

São José do Rio Preto, 21 de fevereiro de 2003.

Cássia Cardoso de Oliveira