

Eliana Morielle Versute

Estudo Citogenético em Espécies da Família
Molossidae (Chiroptera, Mammalia)



1910000590



ELIANA MORIELLE VERSUTE

**ESTUDO CITOGENÉTICO EM ESPÉCIES DA FAMÍLIA
MOLOSSIDAE (CHIROPTERA, MAMMALIA)**

Tese apresentada para obtenção do grau
de Doutor em Ciências, no Curso de Pós-
Graduação em Ciências Biológicas, Área
de Concentração em Genética, do Insti-
tuto de Biociências, Letras e Ciências
Exatas da Universidade Estadual
Paulista - UNESP.



590/93

São José do Rio Preto
1992





Este trabalho foi realizado no Laboratório de Citogenética Humana e de Vertebrados, do Departamento de Biologia, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto, Universidade Estadual Paulista - UNESP, com auxílio financeiro da FAPESP e da FUNDUNESP.

ORIENTADORA: Profa. Dra. Marileila Varella Garcia



AGRADECIMENTOS

A Dra. Marileila Varella Garcia, pela orientação segura, e por todas as oportunidades as quais ela nos abriu a porta, permitindo-nos ingressar na carreira científica com ânimo e segurança.

Ao Dr. Valdir Antonio Taddei, não apenas por toda colaboração prestada ao longo desses anos, mas especialmente pela sua amizade e confiança.

Aos Drs. Luiz Antonio Bertollo, Wilham Jorge e Sanae Este trabalho foi realizado no Laboratório de Citogenética Humana e de Vertebrados, do Departamento de Biologia, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto, Universidade Estadual Paulista - UNESP, com auxílio financeiro da FAPESP e da FUNDUNESP.

Ao Dr. Robert James Coleman, pelo auxílio na revisão do Summary.

Aos colegas e companheiros do Curso de Pós Graduação, pela convivência agradável e pelas proveitosas trocas e experiências e idéias.

A Doutoranda Mary Massumi Itoyama, por toda a colaboração e pelo apoio, amizade e carinho constante.

Aos funcionários e amigos Claudinei Antonio Nóbile e Josué Rodrigues dos Santos e a Rosana Silistino de Souza, pela atenção e colaboração nos serviços laboratoriais e de campo.

A Direção do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, pela disposição das condições materiais.

AGRADECIMENTOS

Ao Biólogo Wagner André Pedro, pela doação de animais.

À Dra. Marileila Varella Garcia, pela orientação segura, e por todas as oportunidades às quais ela nos abriu a porta, permitindo-nos ingressar na carreira científica com ânimo e segurança.

Ao Dr. Valdir Antonio Taddei, não apenas por toda colaboração prestada ao longo desses anos, mas especialmente pela sua amizade e confiança.

Aos Drs. Luiz Antonio Bertollo, Wilham Jorge e Sanae Kasahara, pela atenção e sugestões durante a análise da pro forma.

Aos professores do Departamento de Biologia e Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas do IBILCE, pela transmissão de conhecimentos e experiências e pela amizade e convívio salutar.

Ao Dr. Robert James Coleman, pelo auxílio na revisão do Summary.

Aos colegas e companheiros do Curso de Pós-Graduação, pela convivência agradável e pelas proveitosas trocas e experiências e idéias.

À Doutoranda Mary Massumi Itoyama, por toda a colaboração e pelo apoio, amizade e carinho constante.

Aos funcionários e amigos Claudinei Antonio Nóbile e Josué Rodrigues dos Santos e a Rosana Silistino de Souza, pela atenção e colaboração nos serviços laboratoriais e de campo.

À Direção do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, pela disposição das condições materiais.

À UPD de São José do Rio Preto, em especial ao Sr. José Maria de Almeida, pelo auxílio na elaboração do programa para cadastrar os dados do presente trabalho.

Ao Biólogo Wagner André Pedro, pela doação de animais.

Aos funcionários da Biblioteca, pela presteza e valioso auxílio na aquisição dos artigos científicos. *ho dedico-o*

À bibliotecária Maria do Carmo Junqueira, pelo auxílio na revisão da citação bibliográfica.

Aos funcionários da seção de Pós-Graduação do Instituto, pelos prontos esclarecimentos e atenção. *Luiz Donizeti, amigo e*

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e Fundação para o Desenvolvimento da UNESP (FUNDUNESP), pelo auxílio financeiro concedido. *Santa, pelo esforço, apoio e dedicação*

ÍNDICE

I. INTRODUÇÃO

A. Culturas Celulares	1
B. Importância dos Estudos Citogenéticos na Ordem Chiroptera	6
C. Sítios Frágeis Cromossômicos	11
D. Objetivos .. Ao finalizar este trabalho dedico-o	14

II. MATERIAL E MÉTODOS

A. Espécimes	15
B. Coletas	15
C. Preparações Cromossômicas	
1. Células de Medula .. Ao meu marido, Luiz Donizeti, amigo e	17
2. Cultura de Fibroblastos .. companheiro sempre presente	17
2.1. Obtenção da Biopsia	26
2.2. Montagem após Desagregação Mecânica	26
2.3. Montagem após Desagregação Enzimática	27
2.4. Tripsinização .. Aos meus Pais, Décio e Santa, pelo esforço, e Replicagem das Culturas .. apoio e dedicação	27
2.5. Colheita da Cultura	28
3. Técnicas de Coloração e Bandamento Cromossômico	
3.1. Coloração Usual com Giemsa a 2X	29
3.2. Bandamento GTG	29
3.3. Bandamento CBG	29
3.4. Bandamento RBE	30
3.5. Marcação das RONS pela Prata (técnica NSG)	30
D. Congelamento das Células	31
1. Obtenção da Suspensão Celular	31
2. Estimativa do Número de Células Contidas na Suspensão	31
3. Resfriamento da Suspensão Celular	32
4. Descongelamento da Células e Semeadura de Novas Culturas	32
E. Análise Citogenética	33
F. Indução de Sítios Frágeis por Bromodesoxiuridina (5-BrdU) e Afidicolina (APC)	35

I. INTRODUÇÃO

A. Culturas Celulares	1
B. Importância dos Estudos Citogenéticos na Ordem Chiroptera	6
C. Sítios Frágeis Cromossômicos	11
D. Objetivos	14

II. MATERIAL E MÉTODOS

A. Espécimes	15
B. Coletas	15
C. Preparações Cromossômicas	

1. Células de Medula óssea	19
2. Cultura de Fibroblastos	19
2.1. Obtenção da Biopsia	26
2.2. Montagem após Desagregação Mecânica	26
2.3. Montagem após Desagregação Enzimática	27
2.4. Tripsinização para Dispersão das Células e Replicagem das Culturas	27
2.5. Colheita da Cultura	28

3. Técnicas de Coloração e Bandamento Cromossômico	29
3.1. Coloração Usual com Giemsa a 2%	29
3.2. Bandamento GTG	29
3.3. Bandamento CBG	29
3.4. Bandamento RBG	30
3.5. Marcação das RONS pela Prata (técnica NSG)	30

D. Congelamento das Células	31
1. Obtenção da Suspensão Celular	31
2. Estimativa do Número de Células Contidas na Suspensão	31
3. Resfriamento da Suspensão Celular	32
4. Descongelamento da Células e Semeadura de Novas Culturas	32
E. Análise Citogenética	33
F. Indução de Sítios Frágeis por Bromodesoxiuridina (5-BrdU) e Afidicolina (APC)	33

G. Análise Estatística	34
III. RESULTADOS	
A. Culturas de Fibroblastos	
1. Ensaios sobre Condições de Semeadura e Cultivo	35
2. Desenvolvimento das Culturas	42
3. Ensaios sobre Congelamento Celular	47
B. Estudo Citogenético em Molossídeos	
1. Descrição do Cariótipo das Espécies Analisadas	50
2. Identificação de Homologias Cromossômicas	70
3. Pesquisa de Fragilidade Cromossômica	80
IV. DISCUSSÃO	
A. Condições de Cultivo	89
B. Congelamento Celular	93
C. Variabilidade Cromossômica em Molossídeos e Significado Evolutivo	98
D. Fragilidade Cromossômica	113
V. RESUMO E CONCLUSÕES	119
VI. SUMMARY	122
VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	125

da década de 70 e início de 80, era feita em larga escala em preparações celulares obtidas de medula óssea. Contudo, apesar dessas preparações fornecerem informações citogenéticas básicas, os cromossomos metafásicos apresentavam-se geralmente muito contraídos, o que dificultava a obtenção de marcação diferencial das bandas cromossômicas. Por isso, essas preparações vêm sendo progressivamente substituídas pelas culturas celulares.

Dependendo do tipo celular em análise, as culturas podem ser de curta ou de longa duração. Linfócitos do sangue periférico e células epiteliais são cultivados por períodos curtos, sendo, geralmente, utilizados na genética clínica para efeito de diagnósticos rápidos. Culturas de outros tipos celulares, como os fibroblastos, pelo período que demoram para se estabelecer, são mais

I. INTRODUÇÃO

A. Culturas Celulares

A possibilidade da visualização direta de cromossomos humanos e animais, ao microscópio óptico, bem como a sua representação por fotomicrografias deveram-se, sobretudo, a consideráveis progressos metodológicos, tais como a identificação dos meios nutritivos para a cultura de células a partir de tecidos, a utilização de antibióticos na prevenção da ocorrência de contaminação por microorganismos com consequente perda das culturas, o emprego de agentes que induzem a divisão mitótica, como a fitohemaglutinina, ou que retêm os cromossomos em condições propícias para análise, como a colquicina, e o tratamento hipotônico.

Nos estudos das células de mamíferos, a constituição cromossômica assumiu um importante papel, principalmente na espécie humana, na qual foram reveladas inúmeras desordens, genéticas ou adquiridas como manifestações dos efeitos tóxicos de compostos mutagênicos. Nos demais grupos de animais, a constituição cromossômica também assumiu um papel relevante, com ênfase especial no reconhecimento dos padrões e do significado evolutivo das mudanças cromossômicas que ocorreram na diferenciação das espécies.

A análise cromossômica nas espécies animais, até o final da década de 70 e início de 80, era feita em larga escala em preparações celulares obtidas de medula óssea. Contudo, apesar dessas preparações fornecerem informações citogenéticas básicas, os cromossomos metafásicos apresentavam-se geralmente muito contraídos, o que dificultava a obtenção de marcação diferencial das bandas cromossômicas. Por isso, essas preparações vêm sendo progressivamente substituídas pelas culturas celulares.

Dependendo do tipo celular em análise, as culturas podem ser de curta ou de longa duração. Linfócitos do sangue periférico e células epiteliais são cultivados por períodos curtos, sendo, geralmente, utilizados na genética clínica para efeito de diagnósticos rápidos. Culturas de outros tipos celulares, como os fibroblastos, pelo período que demoram para se estabelecer, são mais



utilizadas no amplo campo da citogenética animal e experimental.

Aspectos As culturas de longa duração podem ser de dois tipos básicos: as primárias e as de linhagens. As culturas primárias são constituídas de material obtido diretamente do organismo e consistem, geralmente, em uma mistura de células fibroblastóides e epitelióides. As linhagens são subculturas das primárias, que após o cultivo seriado passam a constituir-se por apenas um tipo celular (FRESHNEY, 1987).

Entre as várias técnicas utilizadas para o cultivo de células, as mais usadas desenvolvem as células em suspensão, em monocamadas, em suspensão após adesão a partículas sustentadoras (microcarriers), ou a partir de explantes.

As culturas de células em suspensão são indicadas para a realização de estudos de nutrição, metabolismo e análise de populações, mas nem todos os tipos de células dão culturas monodispersas. O crescimento espontâneo em suspensão é restrito a linhagens celulares hemopoiéticas, tumores ascíticos e umas poucas linhagens selecionadas, como as células transformadas.

No entanto, a maioria das células necessita de um substrato de apoio para proliferar. A técnica de cultivo de células animais em monocamada, sobre superfície sólida e meio de cultura líquido, foi descoberta e desenvolvida a partir de 1943 por Earle e colaboradores (cf. FRESHNEY, 1987). As células, obtidas após desagregação mecânica ou enzimática do tecido, aderem à superfície do frasco ou a lamínulas de vidro colocadas previamente dentro do frasco, achatam-se e multiplicam-se até formarem o que se costuma chamar de tapete celular ou camada contínua, que é geralmente uniestratificada. Quando a cultura está com uma população grande de células, essas começam a soltar-se do substrato e é preciso, então, subdividi-la. Para isso, podem ser empregadas enzimas proteolíticas como tripsina, pronase ou collagenase, agentes quelantes como o ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), ou ainda a técnica de raspagem.

O ciclo de crescimento é facilmente demonstrável nas células cultivadas em monocamada, podendo-se observar nitidamente as suas quatro fases, ou seja, a fase de repouso (lag phase), a de multiplicação logarítmica (log phase), a estacionária (plateau phase) e a de degeneração logarítmica. FRESHNEY (1987) apresenta

detalhadamente a caracterização de cada uma das fases, cujos aspectos principais são resumidos a seguir.

A fase de repouso é a inicial em uma subcultura, e nela há pouca evidência de aumento no número de células. É um período de adaptação com duração de cerca de 24 horas, durante o qual as células substituem os elementos do glicocálix que foram perdidos na tripsinização, espalham-se e aderem ao substrato.

A fase de multiplicação logarítmica é o período de aumento exponencial no número de células, que ocorre após a fase inicial e termina assim que as células se tornam confluentes. A duração dessa fase depende da densidade de semeadura, da taxa de crescimento das células e da densidade na qual a proliferação celular é inibida pela densidade. Quando uma subcultura é iniciada com células que estão nessa fase, a multiplicação recomeça sem passar pela fase de repouso e as células podem permanecer indefinidamente em fase logarítmica, isto é, de multiplicação ativa.

A confluência alcançada pelas células na fase log, que faz com que todas as células estejam em contato, reduz ou interrompe o crescimento celular, ocasionando a fase estacionária. As células tornam-se menos móveis, alguns fibroblastos orientam-se paralelamente a outros e há um enrugamento da membrana plasmática, de tal forma que a célula passa a ocupar uma menor superfície do substrato, diminuindo a sua área de contato com o meio de cultura. Entretanto, a maioria das culturas com substituições regulares do meio continua a proliferar, embora em taxa reduzida, resultando em várias camadas de células. Isto indica que o termo estacionário deve ser aplicado somente em determinadas condições, ou seja, para a cultura de determinadas células.

Em alguns casos, observa-se que a fase estacionária não implica na cessação completa da proliferação celular, mas representa um estado onde a divisão celular é balanceada pela perda. Nas situações em que a perda ou morte das células é maior que a proliferação, tem-se a fase de degeneração da cultura.

Em um outro tipo de cultura, a de células em suspensão aderidas a partículas, o papel da superfície do frasco usado para o estabelecimento de uma monocamada, no caso de células dependentes de ancoragem, é substituído por partículas



microscópicas, os "microcarriers", que ficam em suspensão e servem de substrato para a adesão das células. As partículas utilizadas têm aproximadamente 100 μm de diâmetro e são feitas de substâncias orgânicas, como colágeno, gelatina e resinas protéicas do tipo Sephadex, ou de polímeros sintéticos como o poliestireno e a poliacrilamida. Essa técnica reúne em si os princípios da cultura em monocamada e da cultura em suspensão, trazendo como vantagem a obtenção de células em grande quantidade.

A cultura a partir de explantes, sem prévia dispersão celular, foi um dos primeiros tipos a serem desenvolvidos, no início do século XX (cf. FRESHNEY, 1987). Essa técnica é usualmente aplicada quando o material de que se dispõe para a preparação de culturas é escasso e quando se quer evitar alterações químicas e morfológicas que o uso de enzimas e de agentes quelantes possam causar às células. O procedimento clássico na cultura de explante envolve a embebição do fragmento de tecido que vai ser explantado em plasma sanguíneo ou linfa, antes de ser colocado sobre a superfície de crescimento. O plasma deve fornecer os fatores ou elementos que ajudam o explante a se fixar no substrato, estimulando a migração das células a partir do fragmento (HSU et al., 1960; FRESHNEY, 1987).

A técnica de cultura de explante é útil para pequenos fragmentos de tecido, tais como as biopsias. Sua desvantagem está apenas em que não pode ser aplicada aos tecidos que apresentam pouca adesividade. Contudo, células como fibroblastos, mioblastos e células epiteliais geralmente migram do explante com sucesso.

As células obtidas por qualquer uma dessas técnicas descritas podem ser analisadas sob diferentes aspectos, ou congeladas para estudos futuros, evitando-se os fenômenos de instabilidade genética, senescência da linhagem e possíveis contaminações.

O congelamento de células a temperaturas de -65°C a -70°C , ou até de -196°C em nitrogênio líquido, permite que amostras de culturas de linhagens possam ser mantidas por longos períodos de tempo, constituindo bancos de células. Geralmente, linhagens celulares heteroplóides preservam-se mais facilmente que células primárias ou linhagens diplóides e as células ao serem congeladas



devem ser saudáveis, estar livres de contaminações e, preferencialmente, situarem-se na fase de crescimento logarítmico (FRESHNEY, 1987).

MAZUR (1970) refere dois tipos básicos de congelamento celular: o lento e o rápido. Quando se congela lentamente um meio biológico celular, a formação dos cristais é exclusivamente extracelular. Esses cristais removem água dos espaços inter e intracelulares e, atingindo dimensões várias vezes superiores ao tamanho das próprias células, comprimem-nas entre si, num concentrado de seus próprios solutos. Para prevenir as injúrias ocasionadas pelo congelamento, pode-se reduzir a quantidade de água removível pela formação dos cristais, com a consequente redução da concentração de sais a um nível aceitável, através da utilização de um agente criopreservativo no meio de congelamento. Essa é a base do uso de macromoléculas de polivinilpirrolidona (PVP), polietileno glicol (PEG) e dos solventes glicerol e dimetil sulfoxido (DMSO). Tais compostos, quando presentes no meio de congelamento, unem-se a uma certa quantidade de água, impedindo-a de cristalizar-se e obrigando-a a permanecer no estado líquido. A seleção do agente crioprotetor é feita de acordo com o tipo celular e o procedimento de congelamento.

O congelamento rápido promove a formação de pequenos cristais de gelo intracelulares, que tendem a alcançar grandes dimensões durante o processo de descongelamento lento das células. Sabe-se que durante o descongelamento, na temperatura do ponto de fusão, há um aumento na recristalização com a formação de grandes cristais a partir dos pequenos cristais intracelulares, o que pode causar danos irreversíveis às células. Portanto, para prevenir as injúrias causadas por esse tipo de congelamento, é preciso impedir a formação dos grandes cristais intracelulares, por meio de aquecimento rápido. Isto mostra que a sobrevivência da célula depende não só do processo de congelamento, mas também do descongelamento.

representantes de 9 famílias: Emballonuridae, Noctilionidae, Mormoopidae, Phyllostomidae, Molossidae, Natalidae, Furpteridae, Thyropteridae e Vespertilionidae. (TADDEI, 1993; VARELLA-GARCIA et al., 1989).



B. Importância dos Estudos Citogenéticos na Ordem Chiroptera

Um dos problemas mais intrigantes na evolução dos vertebrados é a evolução e diversificação dos animais da ordem Chiroptera, que é amplamente distribuída e bem sucedida, ocorrendo predominantemente em áreas tropicais e com menor representatividade nas regiões temperadas e temperadas frias (KOOPMAN, 1970). Essa ordem constitui um dos mais antigos e divergente grupo de mamíferos, sendo representada pelos morcegos, os únicos mamíferos, entre os vertebrados, que apresentam características morfológicas e fisiológicas que os tornam aptos ao voo verdadeiro, característica que é compartilhada apenas com os pássaros atuais e possivelmente com os pterossauros reptilianos. Os morcegos são, sem dúvida, um grupo de sucesso, constituindo a segunda maior ordem de mamíferos, somente superados em número de espécies pelos roedores (NOWAK & PARADISO, 1983). A insuficiência de registros fósseis força os estudiosos da evolução do grupo a extrapolar o passado histórico, com base nas características das espécies viventes. Embora exista um considerável volume de informações sobre a biologia e ecologia dos membros da ordem Chiroptera, há muitos aspectos taxonômicos não resolvidos e as relações filogenéticas, que são frequentemente obscurecidas pela radiação adaptativa, ainda são discutíveis.

A ordem Chiroptera, que recentemente vem sendo extensivamente questionada sobre sua origem e evolução (PETTIGREW, 1991a e b), mas que presentemente é ainda aceita como monofilética (BAKER et al., 1991; SIMMONS et al., 1991), engloba cerca de 900 espécies agrupadas em 175 gêneros de 17 famílias e duas subordens: Megachiroptera e Microchiroptera. A subordem Megachiroptera contém apenas uma família, a Pteropodidae, com 42 gêneros e 162 espécies (KOOPMAN, 1984). A subordem Microchiroptera é comopolita e inclui 16 famílias, com uma representação no Novo Mundo de aproximadamente 280 espécies. Dessas, cerca de 134 são encontradas no Brasil, abrangendo representantes de 9 famílias: Emballonuridae, Noctilionidae, Mormoopidae, Phyllostomidae, Molossidae, Natalidae, Furipteridae, Thyropteridae e Vespertilionidae, (TADDEI, 1983; VARELLA-GARCIA et al., 1989).



Os estudos taxonômicos na ordem Chiroptera, na sua maior parte, fundamentam-se em padrões morfométricos comparativos, que envolvem medidas corporais externas e cranianas e características dentárias, como fórmula dentária e detalhes estruturais dos dentes. Porém, essas características consideradas isoladamente não são suficientes para definir com clareza as relações entre os diferentes taxa. HILL (1974), ao descrever a nova família de morcegos Craseonycteridae, já havia ressaltado os problemas de se basear uma classificação em alguns poucos dados, sugerindo que outros sistemas de informações fossem adicionados.

Mais recentemente, outros tipos de estudos vêm sendo utilizados nas interpretações sistemáticas, como os histomorfológicos, imunológicos, bioquímicos e citogenéticos, todos voltados ao esclarecimento das relações filogenéticas entre diferentes famílias, gêneros e espécies. O estudo dos cariótipos tem contribuído fortemente nas proposições e no estabelecimento das relações e afinidades evolutivas entre as espécies de vários grupos animais. O cariótipo não é afetado pela adaptação a diferentes nichos ecológicos, como pode acontecer com os caracteres morfológicos. Por isso, o estudo do complemento cromossômico, principalmente quando realizado com técnicas sequenciais e específicas de bandamento que apresentam boa resolução em células cultivadas, pode identificar os mecanismos de evolução cromossômica que ocorreram dentro de um grupo e contribuir para o esclarecimento dos relacionamentos filogenéticos.

Os padrões de bandamentos cromossômicos G ou R, por exemplo, podem ser utilizados para análise filogenética, por métodos de comparações cladísticas (BAKER, 1979; BAKER et al. 1983, 1989). As variações nos padrões de bandas G em diferentes taxa podem ser tratadas como um caráter, e a identificação do estado primitivo ou derivado do caráter possibilita que se determine o tipo e o número dos rearranjos incorporados durante o curso da 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



partilhados. Por diferentes taxa podem ser utilizados para identificar subconjuntos monofiléticos, ou seja, com uma origem evolutiva comum.

As informações obtidas das interpretações dos padrões de bandas cromossômicas representam dados independentes, que podem ser usados para testar os relacionamentos em taxa que tem sido tradicionalmente agrupados, com base em adaptações morfológicas altamente especializadas. A interpretação cladística dos dados resulta na formulação de um cladograma, que representa uma hipótese de relacionamento filogenético e que pode testar propostas desenvolvidas com base em outros conjuntos de dados, como por exemplo, os morfológicos, ecológicos, bioquímicos ou imunológicos.

Os mais antigos estudos citológicos em morcegos datam do início do século XIX (VARELLA-GARCIA & TADDEI, 1989, para referências). No entanto, só se tornaram consideravelmente mais frequentes a partir da década de 60, quando foram publicados os trabalhos de WAINBERG (1966), BAKER (1967), BAKER & PATTON (1967), BAKER & HSÜ (1970), entre outros, que descreveram os cariótipos de dezenas de espécies americanas de diferentes famílias.

Nessa mesma época, foram publicados os primeiros resultados de estudos com morcegos brasileiros por YONENAGA (1968), YONENAGA et al. (1969) e BEÇAK et al. (1968, 1969). Pouco mais tarde, TOLEDO (1973) apresentou o estudo citogenético de 21 espécies de morcegos brasileiros, das quais 5 analisadas pela primeira vez (*Histiotus velatus*, *Molossus ater*, *Micronycteris minuta*, *Eumops auripendulus* e *Vampyrops lineatus*). Essas primeiras análises cromossômicas, apesar das limitações técnicas a que estavam sujeitas, já apresentavam resultados interessantes em relação à taxonomia e filogenia de grupos.

A utilização das técnicas de bandamento tem contribuído bastante para o esclarecimento das relações filogenéticas e dos mecanismos de evolução cromossômica das espécies de morcegos. STOCK (1975), comparando as espécies do gênero *Carollia* (Carollinae) e *Choeroniscus* (Glossophaginae), pôde verificar que embora elas possuíssem cariótipos muito semelhantes em nível morfológico, o que poderia sugerir proximidade evolutiva, apresentavam padrões de bandas facilmente diferenciados. O mesmo foi concluído em relação

às espécies *Rhinopoma hardwickei* (Rhinopomatidae, Microchiroptera) e *Rousettus aegyptiacus* (Pteropodidae, Megachiroptera), por QUMSIYEH & BAKER (1985). Esses autores compararam os padrões de bandas G dessas duas espécies e verificaram que elas apresentavam pequena homologia cromossômica, evidenciando que a família Rhinopomatidae, considerada a mais primitiva entre os Microchiroptera, não se relacionava estreitamente com os Megachiroptera. Esses dados contrariavam o que havia sido proposto por RAY-CHAUDKURI et al. (1968), com base na similaridade das características morfológicas e nas informações cariotípicas disponíveis.

BAKER et al. (1989), analisando diferentes conjuntos de dados, incluindo os cromossômicos, propuseram uma nova classificação para os morcegos da família Phyllostomidae, que é uma das mais diversificadas entre os Microchiroptera. Eles verificaram que não haviam sinapomorfias cromossômicas, ou seja, características derivadas compartilhadas pelos gêneros *Macrotus*, *Micronycteris*, *Chrotopterus*, *Trachops* e *Vampyrus*, que suportassem a hipótese de origem monofilética. Nesse mesmo estudo, os autores confirmaram que as três espécies de morcegos vampiros (*Diphylla*, *Diaemus*, e *Desmodus*), que por suas modificações estruturais haviam sido inicialmente considerados uma família distinta de Phyllostomidae, a Desmodontidae, partilhavam um ancestral comum com os Phyllostominae, uma subfamília de Phyllostomidae, após a divergência dos gêneros *Micronycteris* e *Macrotus*. Assim, BAKER et al. (1989) mantiveram os vampiros como a subfamília Desmodontinae, conforme KOOPMAN & JONES JR (1970) haviam proposto, com base nos estudos dos cariótipos e da similaridade de proteínas e morfologia de espermatozoides (FORMAN et al., 1968).

Embora as informações citogenéticas tenham se mostrado úteis nos estudos taxonômicos, a quantidade de informações disponíveis varia entre as diferentes famílias de Chiroptera e os dados não são representativos da ordem como um todo. Na família Pteropodidae, da subordem Megachiroptera, são conhecidos os cariótipos de apenas 25 espécies de 16 gêneros, das cerca de 160 espécies que a constituem (CAPANNA & CIVITELLI, 1970; YONG & DALIWAL, 1976; ANDŌ et al., 1980; HAIDUK et al., 1981; YONG, 1984). Entre os Microchiroptera, a maioria das espécies de morcegos que vêm



sendo investigadas pertence a cinco grandes famílias: Emballonuridae, Phyllostomidae, Mormoopidae, Noctilionidae e Vespertilionidae (VARELLA-GARCIA & TADDEI, 1989).

A família Molossidae, embora não esteja entre as cinco mais estudadas, é a terceira maior em número de espécies, constituindo-se por cerca de 80 espécies agrupadas em 12 gêneros (KOOPMAN, 1984). Os morcegos dessa família são facilmente distinguíveis dos demais, apresentando uma face característica, com orelhas curtas e largas geralmente projetadas sobre os olhos e o focinho largo e obliquamente truncado, e uma cauda que se exterioriza após a borda posterior do uropatágio. Esses animais são insetívoros e cerca de metade das espécies pertence ao gênero *Tadarida* (FREEMAN, 1981). As espécies do gênero *Tadarida* são encontradas em ambos os hemisférios e as semelhanças entre as formas dos dois hemisférios, juntamente com a presença de *Tadarida* (que é provavelmente o gênero mais primitivo) no Oligoceno da Europa, sugerem que a família teve sua origem no Velho Mundo (KOOPMAN, 1970).

Nas Américas ocorrem 31 espécies de molossídeos, das quais 16 têm já descritas algumas informações citogenéticas (VARELLA-GARCIA & TADDEI, 1989, para referências). Contudo, essas informações geralmente basearam-se na análise de cromossomos corados de modo usual, que sabidamente subestima a variação detectada pelas técnicas de bandamento em cerca de 5 vezes (HAIDUK et al., 1981). As exceções são duas espécies de molossídeos, que tiveram seus padrões de bandas G descritos: *Tadarida brasiliensis* (BAKER et al., 1982) e *Eumops glaucinus* (MORIELLE et al., 1988). O número diplóide ($2n$) da família varia de 34 a 48 e o número fundamental (NF), ou seja, o número de braços do complemento autossômico, de 54 a 64. Como a maioria das espécies possui $2n=48$, os cariótipos com 48 cromossomos, como os de *Molossus*, *Otomops* e *Tadarida*, foram propostos como representativos do cariótipo primitivo (BAKER, 1970; WARNER et al., 1974; GARDNER, 1977; BAKER et al., 1982).

O interesse pelo estudo do cariótipo desses animais é justificado por várias razões. Entre elas destacam-se a quantidade significativa de espécies da família Molossidae na fauna da América do Sul, inclusive no Brasil, que apresenta representantes de 17



espécies (VARELLA-GARCIA et al., 1989), assim como a escassez de dados citogenéticos detalhados. Destaca-se, ainda, a possibilidade de que a interpretação adequada de conjuntos inter-disciplinares de dados permita o estabelecimento de parentescos e a identificação de relações evolutivas, e propicie o desenvolvimento de hipóteses filogenéticas melhor fundamentadas para a família.

C. Sítios Frágeis Cromossômicos

Os cromossomos humanos e de vários outros mamíferos apresentam regiões, denominadas sítios frágeis, que manifestam quebras e falhas frequentes quando as células cultivadas são submetidas a certos compostos químicos ou a condições especiais de cultivo.

As características morfológicas que essas regiões apresentam têm despertado o interesse de grande número de citogeneticistas, principalmente em função das dificuldades para o esclarecimento de sua natureza e participação no fenótipo e de sua importância para o conhecimento da estrutura e função do cromossomo.

O estudo dos sítios frágeis assumiu grande importância na citogenética humana, de tal forma que eles foram considerados revolucionários em conceito e natureza (SUTHERLAND & HECHT, 1985). Dos resultados obtidos foi possível verificar que os sítios frágeis compartilham certas características, como manifestação de falhas ou quebras que podem envolver uma ou ambas as cromátides do cromossomo, de deficiências e figuras trirradiais, evidenciando que essas regiões são susceptíveis a quebras e rearranjos cromossômicos. Todas as mudanças cromossômicas estruturais devidas à presença de um sítio frágil ocorrem em uma região constante no cromossomo e permanecem através da meiose e mitose, de modo que são hereditárias.

A primeira referência à hereditariedade de um cromossomo com tais características foi feita por LEJEUNE et al. (1968), no cromossomo 2 humano. Posteriormente, LUBS (1969), estudando um paciente com deficiência mental ligada ao sexo, verificou que ele apresentava um cromossomo marcador, interpretado como sendo o cromossomo X, que apresentava uma constrição secundária terminal no braço longo, que também aparecia em membros afetados e normais de

sua família. Logo após, MAGENIS et al. (1970) descreveram a ocorrência de quebras frequentes na região distal do braço longo do cromossomo 16 em um indivíduo com deficiência de imunoglobulina A e em vários membros normais da família, e esses autores designaram o fenômeno como "sítio frágil".

Na última década, muitas outras regiões cromossômicas foram reconhecidas como sítios frágeis e classificadas como comuns ou constitucionais, quando detectadas em grande número de indivíduos, ou como sítios frágeis raros quando detectadas em frequências muito baixas na população (BERGER et al., 1985). No 10º International Workshop on Human Gene Mapping, realizado em New Haven em 1989, foram listados 113 sítios frágeis, dos quais 26 são raros e 87 são comuns (HUMAN GENE MAPPING 10, 1989).

Os sítios frágeis raros são herdados com padrão codominante, expressam-se sob determinadas condições de cultivo, aparecem em menos de 0,2% dos indivíduos, têm baixos índices de expressão nos portadores, ocorrem em qualquer dos cromossomos e manifestam-se em apenas um dos homólogos (SUTHERLAND, 1979; BERGER et al., 1985; SUTHERLAND & MATTEI, 1987; SUTHERLAND & LEDBETTER, 1988; HECHT et al., 1990). Os sítios frágeis comuns também aparecem em condições de cultivo especiais e, possivelmente, são hereditários. São encontrados em praticamente todos os indivíduos testados, podem ser observados em qualquer dos homólogos de todos ou virtualmente todos os cromossomos e expressam-se em homozigose em certa proporção de células (BERGER et al., 1985; HECHT, 1986; SUTHERLAND & MATTEI, 1987; HECHT et al., 1990).

Os estudos realizados com a finalidade de esclarecer o papel ou comportamento dos sítios frágeis têm mostrado que eles tanto ocorrem espontaneamente, como podem ser induzidos nas células cultivadas. A expressão de sítios frágeis em baixas frequências pode ser observada sob determinadas condições que provocam um desbalanceamento no conjunto de desoxirribonucleotídeos durante as fases G₁ e S do ciclo celular. Essas condições incluem um estresse de timidilato, que pode ser conseguido pela inibição da timidilato sintetase por agentes inibidores, como a fluorodesoxiuridina (FUDR) (SUTHERLAND, 1979; FONATSH, 1981; MATTEI, 1981), ou por antagonistas do folato, como o metotrexato e a aminopterina (GLOVER, 1981; HECHT

et al., 1982), e também por tratamentos com bromodesoxiuridina (SUTHERLAND et al., 1985).

A indução em altas frequências pode também ser conseguida pelo uso de compostos inibidores da síntese semiconservativa e de reparo do DNA, como afidicolina, arabinofuranosil citosina e arabinofuranosil adenosina (LEONARD et al., 1988). Frequências muito mais altas na expressão dos sítios podem, ainda, ser induzidas pela combinação dessas condições ou por agentes que inibem a síntese de reparo do DNA durante a fase G₂, como a cafeína (YUNIS & SORENG, 1984), a afidicolina associada ao etanol (KUWANO & KAJII, 1987), ou a hidroxiuréia (YAN et al., 1988).

Os mecanismos pelos quais as substâncias induzem a manifestação dos sítios frágeis não estão ainda bem esclarecidos; contudo, a possibilidade de indução dos diferentes tipos de sítios frágeis pelos mesmos compostos (indução cruzada) sugere que eles tenham homologia estrutural (HECHT et al., 1988).

Os sítios frágeis estão presentes não só nos cromossomos humanos, mas também em cromossomos de outras espécies de mamíferos. O primeiro sítio frágil descrito em uma outra espécie animal foi detectado por HSU & SOMERS (1961) em células de hamster chinês, enquanto pesquisavam efeito do composto 5-bromodesoxiuridina na morfologia dos cromossomos. Eles verificaram que o cromossomo 1 do hamster apresentava um sítio frágil em um local específico de um dos braços desse cromossomo, observação que foi posteriormente confirmada por LIN et al. (1984), analisando a expressão de sítios frágeis em linhagem celular renal.

SCHMID et al. (1985), utilizando-se das técnicas de alta resolução em cromossomos humanos, de chimpanzés e de gorilas, verificaram que as três espécies partilhavam 51 sítios frágeis, evidenciando que essas estruturas eram conservadas evolutivamente.

Mais recentemente, foram identificados sítios frágeis em autossomos e cromossomos sexuais de vários outros mamíferos, entre os quais o roedor arganaz *Ellobius lutescens* (DJALALI et al., 1985), o gado bovino (UCHIDA et al., 1986), camundongos (SANZ et al., 1986; DJALALI et al., 1987, 1990; Mc ALLISTER et al., 1991), o rato indiano *Nesokia indica* (TEWARI et al., 1987), ratos de laboratório (ROBINSON & ELDER, 1987; ELDER & ROBINSON, 1989), cães (WURSTER-HILL

et al., 1988; STONE et al., 1991 a, b), coelhos (POULSEN & RONNE, 1991), porcos domésticos (RIGGS & CHRISMAN, 1991) e a rena *Rangifer tarandus* (GRIPENBERG et al., 1991). Os sítios frágeis encontrados nessas espécies foram induzidos pelos mesmos compostos químicos que induzem a expressão desses fenômenos em células humanas, mostrando um alto grau de concordância entre os diferentes tratamentos.

Vários estudos têm procurado descobrir o significado dos sítios frágeis. Nos animais, a possibilidade de associação dessas regiões com os pontos de quebras envolvidos nos rearranjos que diferenciaram espécies, e as observações de que os sítios frágeis são regiões recombinogênicas (LAIRD et al., 1987), estimulam o interesse pela procura dessa fragilidade cromossômica em outras espécies. Em relação aos animais da ordem Chiroptera, não existem dados na literatura sobre a expressão de tal fragilidade cromossômica.

D. Objetivos

Este estudo teve como um de seus objetivos a implantação das técnicas de cultura e congelamento de fibroblastos de quirópteros, através da determinação e estabelecimento das variantes metodológicas mais adequadas para iniciação da cultura, ou seja, do tipo de tecido para a obtenção das células, do processo de desagregação tecidual, dos frascos, meios e condições ideais (pH, temperatura, etc.) para o cultivo e congelamento celular. O principal objetivo, contudo, foi conseguir informações citogenéticas sobre espécies da família Molossidae, através da identificação dos padrões de bandas G, R e C e da localização das regiões organizadoras de nucléolos (RONs). Com as informações obtidas pretendeu-se reconhecer os rearranjos cromossômicos que devem ter ocorrido na diferenciação das espécies e fornecer subsídios para a discussão e estabelecimento das possíveis relações filogenéticas na família. Pretendeu-se, também, verificar a ocorrência de fragilidade cromossômica induzida por 5-bromodesoxiuridina (5-BrdU) e afidicolina (APC), assim como detectar regiões que pudessem ser coincidentemente afetadas pela fragilidade cromossômica e pelos rearranjos cromossômicos em algumas espécies.

II. MATERIAL E MÉTODOS

A. Espécimes

Foram analisados 99 espécimes, provenientes de oito localidades dos estados de São Paulo e Minas Gerais. Esses espécimes pertenciam a nove espécies da família Molossidae: *Eumops auripendulus*, *Eumops bonariensis*, *Eumops glaucinus*, *Eumops perotis*, *Molossops abrasus*, *Molossops temminckii*, *Molossus ater*, *Molossus molossus* e *Nyctinomops laticaudatus*. A identificação de cada um deles foi confirmada pelo Dr. Valdir Antonio Taddei, responsável pelo Centro de Referência para Identificação e Sistemática de Quirópteros Brasileiros e todos os exemplares estão fixados, catalogados e depositados na Coleção do Departamento de Zoologia do IBILCE de São José do Rio Preto- UNESP.

A discriminação pela espécie, número de registro no Laboratório de Citogenética, sexo e procedência é apresentada na Tabela 1.

B. Coletas

De modo geral, os molossídeos voam alto e rápido, o que dificulta as observações biológicas e a coleta de espécimes, e justifica a escassez de informações a respeito da família (FREEMAN, 1981). Embora sejam raras as informações sobre a biologia dos molossídeos, alguns autores verificaram que certas espécies possuem hábitos antropofílicos, constituindo pequenas colônias nas proximidades de habitações urbanas e mesmo no interior de residências em locais como forros (TADDEI, 1983, para referências). Por isso, esses animais foram coletados diretamente em seus locais de abrigos através da utilização de redes manuais (puçás), pinças e luvas, ou em regiões próximas à eles por meio das "mist nets" (redes de neblina), na provável rota de voo.

As coletas foram diurnas e noturnas e os espécimes foram transportados em pequenas gaiolas para o laboratório, onde receberam apenas água enquanto mantidos em cativeiro, aguardando o estudo citogenético.

Tabela 1. Discriminação por espécie, número de registro, sexo e procedência dos animais analisados. M= macho; F= fêmea.

Espécie	Número de registro	Sexo	Procedência
<i>Eumops auripendulus</i>	CFC005	M	S. J. Rio Preto, SP
<i>Eumops bonariensis</i>	CFC112	M	S. J. Rio Preto, SP
<i>Eumops glaucinus</i>	CFC006	M	S. J. Rio Preto, SP
	CFC007	M	S. J. Rio Preto, SP
	CFC023	M	S. J. Rio Preto, SP
	CFC040	M	S. J. Rio Preto, SP
	CFC082	F	S. J. Rio Preto, SP
	CFC089	F	S. J. Rio Preto, SP
	CFC092	F	S. J. Rio Preto, SP
	CFC100	M	S. J. Rio Preto, SP
	CFC110	F	S. J. Rio Preto, SP
	CFC111	F	S. J. Rio Preto, SP
	CFC141	M	S. J. Rio Preto, SP
	CFC169	F	S. J. Rio Preto, SP
<i>Eumops perotis</i>	CFC012	M	Cedral, SP
	CFC013	F	Cedral, SP
	CFC014	F	Cedral, SP
	CFC015	M	Cedral, SP
	CFC083	F	Cedral, SP
	CFC084	F	Cedral, SP
	CFC085	M	Cedral, SP
	CFC086	F	Cedral, SP
<i>Molossus molossus</i>	CFC126	F	Ribeirão Preto, SP
	CFC127	F	Ribeirão Preto, SP
	CFC128	F	Ribeirão Preto, SP
	CFC129	F	Ribeirão Preto, SP
	CFC130	F	Ribeirão Preto, SP
	CFC132	F	Ribeirão Preto, SP
	CFC133	M	Ribeirão Preto, SP
	CFC170	F	Ribeirão Preto, SP
<i>Molossops abrasus</i>	CFC115	F	Engenheiro Schmidt, SP
<i>Molossops temminckii</i>	CFC050	M	Neves Paulista, SP
	CFC121	M	Uberlândia, MG
	CFC122	F	Uberlândia, MG
	CFC142	F	Uberlândia, MG
	CFC143	M	Uberlândia, MG
	CFC145	M	Bady Bassitt, SP
	CFC153	F	Uberlândia, MG
	CFC158	M	Uberlândia, MG
	CFC160	M	Uberlândia, MG
	CFC161	M	Uberlândia, MG
	CFC166	M	Neves Paulista, SP

Tabela 1. (cont.)

Espécie	Número de registro	Sexo	Procedência
Molossus ater	CFC016	M	S. J. Rio Preto, SP
	CFC017	F	Cedral, SP
	CFC018	F	Engenheiro Schmidt, SP
	CFC019	F	Engenheiro Schmidt, SP
	CFC020	F	Engenheiro Schmidt, SP
	CFC021	F	Engenheiro Schmidt, SP
	CFC026	F	S. J. Rio Preto, SP
	CFC027	F	S. J. Rio Preto, SP
	CFC028	F	S. J. Rio Preto, SP
Nyctinomops laticaudatus	CFC046	M	S. J. Rio Preto, SP
	CFC051	M	Monte Aprazível, SP
	CFC052	F	Monte Aprazível, SP
	CFC053	M	Monte Aprazível, SP
	CFC054	F	S. J. Rio Preto, SP
	CFC066	F	S. J. Rio Preto, SP
	CFC067	F	S. J. Rio Preto, SP
	CFC068	F	S. J. Rio Preto, SP
	CFC091	F	S. J. Rio Preto, SP
	CFC105	M	S. J. Rio Preto, SP
	CFC106	F	S. J. Rio Preto, SP
	CFC109	F	S. J. Rio Preto, SP
	CFC131	M	Cedral, SP
	CFC134	M	Cedral, SP
	CFC135	M	Cedral, SP
	CFC136	M	Cedral, SP
	CFC147	M	S. J. Rio Preto, SP
Molossus molossus	CFC041	F	S. J. Rio Preto, SP
	CFC042	F	S. J. Rio Preto, SP
	CFC043	M	S. J. Rio Preto, SP
	CFC044	F	S. J. Rio Preto, SP
	CFC045	F	S. J. Rio Preto, SP
	CFC047	F	S. J. Rio Preto, SP
	CFC048	F	S. J. Rio Preto, SP
	CFC054	F	S. J. Rio Preto, SP
	CFC055	M	S. J. Rio Preto, SP
	CFC056	F	S. J. Rio Preto, SP
	CFC057	M	S. J. Rio Preto, SP
	CFC058	M	S. J. Rio Preto, SP
	CFC059	F	S. J. Rio Preto, SP
	CFC060	F	S. J. Rio Preto, SP
	CFC061	M	S. J. Rio Preto, SP
	CFC062	M	S. J. Rio Preto, SP
	CFC063	F	S. J. Rio Preto, SP
	CFC064	F	S. J. Rio Preto, SP
	CFC065	F	S. J. Rio Preto, SP
	CFC090	M	S. J. Rio Preto, SP
	CFC102	M	S. J. Rio Preto, SP
	CFC103	M	S. J. Rio Preto, SP

Tabela 1. (cont.)

Espécie	Número de registro	Sexo	Procedência
<i>Molossus molossus</i>	CFC104	M	S. J. Rio Preto, SP
	CFC137	F	Cedral, SP
	CFC138	M	S. J. Rio Preto, SP
	CFC155	M	S. J. Rio Preto, SP
	CFC156	M	S. J. Rio Preto, SP
	CFC157	F	Cedral, SP
	CFC162	M	S. J. Rio Preto, SP
	CFC168	F	S. J. Rio Preto, SP
<i>Nyctinomops laticaudatus</i>	CFC099	M	S. J. Rio Preto, SP

solução de fermento glicosado para cada 25 g de peso corporal, como indutor mitótico. No dia seguinte, preferencialmente no período da manhã, injetou-se intraperitonealmente 0,2 ml de colquicina a 0,5% para cada 25 g de peso corporal, a fim de inibir o processo de divisão celular através da interferência na formação do fuso mitótico. O animal foi, então, sacrificado após 30 a 40 minutos da injeção de colquicina, removeram-se os seus úmeros e, em alguns animais, também os fêmures. Esses ossos foram liberados dos feixes musculares e tendões e uma lâmina das epífises foi retirada para que a medula ficasse exposta. Com o auxílio de uma seringa retirou-se a medula óssea com 4 a 6 ml de solução salina de Hanks, recolhendo-se o material em um tubo de centrifuga, e ressuspendeu-se vigorosamente para separar as massas celulares.

A suspensão celular foi então centrifugada, hipotonizada com KCl 0,075 a 37°C por quarenta minutos, fixada com metanol-acético 3:1 e gotejada em lâminas geladas molhadas. O material assim preparado foi submetido às técnicas de coloração e bandamentos cromossômicos.

2. Cultura de Fibroblastos

Os fibroblastos foram obtidos a partir de fragmentos de tecido retirados dos animais e cultivados in vitro. A metodologia utilizada foi implantada no Laboratório de Citogenética de Vertebrados do Departamento de Biologia do IBILCE, durante o

C. Preparações Cromossômicas

As preparações cromossômicas foram obtidas de células de medula óssea e fibroblastos.

1. Células de Medula óssea

Para a análise cromossômica de células de medula óssea foram utilizadas as técnicas de FORD & HAMERTON (1956) e LEE & ELDER (1980) com modificações. Essa técnica foi empregada apenas para alguns dos espécimes.

O animal do qual se pretendeu analisar a medula óssea foi pesado e injetou-se subcutaneamente, na região dorsal, 0,2 ml de solução de fermento glicosado para cada 25 g de peso corporal, como indutor mitótico. No dia seguinte, preferencialmente no período da manhã, injetou-se intraperitonealmente 0,2 ml de colquicina a 0,5% para cada 25 g de peso corporal, a fim de inibir o processo de divisão celular através da interferência na formação do fuso mitótico. O animal foi, então, sacrificado após 30 a 40 minutos da injeção de colquicina, removeram-se os seus úmeros e, em alguns animais, também os fêmures. Esses ossos foram liberados dos feixes musculares e tendões e uma lasca das epífises foi retirada para que a medula ficasse exposta. Com o auxílio de uma seringa retirou-se a medula óssea com 4 a 6 ml de solução salina de Hanks, recolhendo-se o material em um tubo de centrífuga, e ressuspendeu-se vigorosamente para separar as massas celulares.

A suspensão celular foi então centrifugada, hipotonizada com KCl 0,075 a 37°C por quarenta minutos, fixada com metanol-acético 3:1 e gotejada em lâminas geladas molhadas. O material assim preparado foi submetido às técnicas de coloração e bandamentos cromossômicos.

2. Cultura de Fibroblastos

Os fibroblastos foram obtidos a partir de fragmentos de tecido retirados dos animais e cultivados *in vitro*. A metodologia utilizada foi implantada no Laboratório de Citogenética de Vertebrados do Departamento de Biologia do IBILCE, durante o



desenvolvimento do presente trabalho.

Com a finalidade de investigar as melhores condições para o cultivo celular foram desenvolvidos ensaios envolvendo variações em quatro aspectos: local de coleta da biopsia, técnica de desagregação, tipos de frascos e de meios de cultivo.

Em relação à região biopsiada, os fragmentos foram extraídos das bordas das orelhas, da porção distal da cauda ou da membrana do plagiopatágio (asa) e tinham cerca de 10 mm^2 , 10 mm de comprimento e 10 mm^2 , respectivamente. Em relação às técnicas de desagregação celular, foram desenvolvidos dois procedimentos: a desagregação mecânica da biopsia, para culturas de explante, e a desagregação mecânica e enzimática, para culturas em monocamada.

Foram utilizados, para a montagem das culturas e como substrato para o seu desenvolvimento, frascos plásticos descartáveis estéreis marca Descarplast (Rio de Janeiro - Brasil), Costar e Corning (EUA), com capacidade de 25 ml. Em relação aos meios de cultura, foram testados dois tipos diferentes: o meio mínimo essencial de Eagle com sais de Earle (MEM - Eagle) e o Ham - F10, ambos fabricados pela Cultilab (Campinas). Denominou-se meio completo qualquer um deles quando enriquecido com soro fetal bovino (20%) e 1 ml de glutamina a 200 mM e suplementado com antibióticos (125 U/ml de penicilina e 125 $\mu\text{g/ml}$ de estreptomicina).

De um total de 192 amostras, obtidas dos 99 espécimes, 27 foram de medula óssea, utilizadas só para o estudo citogenético, e as 165 restantes foram utilizadas nos ensaios envolvendo as variações nos quatro aspectos acima referidos, conforme discriminado na Tabela 2.

O procedimento utilizado em cada uma das etapas da cultura de fibroblastos é descrito a seguir.



Tabela 2. Discriminação por espécime do material colhido, local da biopsia, tipo de desagregação, frasco e meio de cultura utilizado para cada amostra semeada.

Espécie	Nº de re-gistro	Nº da amostra	Material colhido	Local da biopsia	Desagrega-ção	Frasco	Meio
E. auripendulus	CFC005	01	med.óssea	orelha	mecânica	Costar	Ham
	CFC006	02	biopsia	orelha	mecânica	Descarplast	Eagle
		03	biopsia	cauda	mecânica	Descarplast	Eagle
E. bonariensis	CFC112	01	med. óssea	orelha	mecânica	Descarplast	Ham
		02	biopsia	orelha	mecânica	Costar	Ham
		03	biopsia	orelha	enzimática	Costar	Ham
E. glaucinus	CFC006	01	biopsia	orelha	mecânica	Descarplast	Eagle
		02	biopsia	cauda	mecânica	Descarplast	Eagle
		03	med. óssea	orelha	mecânica	Costar	Eagle
	CFC007	01	med. óssea	orelha	mecânica	Descarplast	Eagle
		02	biopsia	orelha	mecânica	Descarplast	Eagle
		03	biopsia	cauda	mecânica	Descarplast	Eagle
	CFC023	01	biopsia	orelha	mecânica	Descarplast	Ham
	CFC040	01	biopsia	orelha	mecânica	Descarplast	Ham
	CFC082	01	biopsia	orelha	mecânica	Costar	Ham
	CFC089	01	biopsia	orelha	mecânica	Costa	Ham
	CFC092	01	biopsia	orelha	mecânica	Costar	Ham
	CFC100	01	biopsia	orelha	mecânica	Costar	Ham
	CFC110	01	biopsia	orelha	mecânica	Costar	Ham
		02	biopsia	orelha	enzimática	Costar	Ham
	CFC111	01	biopsia	orelha	mecânica	Descarplast	Eagle
E. lewinckii		02	biopsia	orelha	enzimática	Descarplast	Eagle
	CFC141	01	biopsia	orelha	mecânica	Descarplast	Ham
	CFC169	01	biopsia	orelha	mecânica	Costar	Ham
		02	biopsia	orelha	mecânica	Costar	Ham
		03	biopsia	orelha	mecânica	Corning	Ham
E. perotis		04	biopsia	orelha	mecânica	Corning	Ham
		05	biopsia	orelha	enzimática	Corning	Ham
	CFC012	01	biopsia	orelha	mecânica	Descarplast	Ham
		02	biopsia	cauda	mecânica	Descarplast	Eagle
	CFC013	01	med. óssea	orelha	mecânica	Costar	Ham
		02	biopsia	orelha	mecânica	Descarplast	Ham
	CFC014	01	med. óssea	orelha	mecânica	Costar	Ham
		02	biopsia	orelha	mecânica	Descarplast	Ham
	CFC015	01	med. óssea	orelha	mecânica	Costar	Ham
		02	biopsia	orelha	mecânica	Descarplast	Ham
	CFC083	01	biopsia	orelha	mecânica	Costar	Ham
		02	biopsia	orelha	mecânica	Costar	Ham
		03	biopsia	cauda	mecânica	Costar	Ham
	CFC084	01	med. óssea	cauda	mecânica	Costar	Eagle
		02	biopsia	orelha	mecânica	Costar	Ham
		03	biopsia	orelha	mecânica	Costar	Ham
		04	biopsia	cauda	mecânica	Costar	Ham

Tabela 2. (cont.)

Espécie	Nº de registro	Nº da amostra	Material colhido	Local da biopsia	Desagregação	Frasco	Meio
	CFC085	01	biopsia	orelha	mecânica	Costar	Ham
		02	biopsia	orelha	mecânica	Costar	Ham
		03	biopsia	cauda	mecânica	Costar	Ham
	CFC086	01	med. óssea	orelha	mecânica	Costar	Eagle
	CFC126	01	biopsia	orelha	mecânica	Costar	Ham
		02	biopsia	orelha	mecânica	Descarplast	Ham
		03	biopsia	orelha	enzimática	Descarplast	Ham
	CFC127	01	biopsia	orelha	mecânica	Costar	Ham
		02	biopsia	orelha	enzimática	Descarplast	Ham
	CFC128	01	biopsia	orelha	mecânica	Costar	Ham
		02	biopsia	orelha	enzimática	Costar	Ham
	CFC129	01	biopsia	orelha	mecânica	Costar	Eagle
		02	biopsia	orelha	mecânica	Descarplast	Eagle
	CFC130	01	biopsia	orelha	mecânica	Costar	Eagle
		02	biopsia	orelha	mecânica	Descarplast	Eagle
	CFC132	01	biopsia	orelha	mecânica	Costar	Ham
		02	biopsia	orelha	enzimática	Descarplast	Ham
	CFC133	01	biopsia	orelha	mecânica	Costar	Ham
		02	biopsia	orelha	mecânica	Descarplast	Ham
	CFC170	01	biopsia	orelha	mecânica	Corning	Ham
		02	biopsia	orelha	mecânica	Corning	Ham
		03	biopsia	orelha	mecânica	Descarplast	Eagle
M. abrusus	CFC115	01	med. óssea	orelha	mecânica	Descarplast	Eagle
		02	biopsia	orelha	mecânica	Costar	Ham
		03	biopsia	orelha	enzimática	Costar	Ham
		04	biopsia	orelha	mecânica	Costar	Ham
M. temminckii	CFC050	01	biopsia	orelha	mecânica	Costar	Ham
	CFC121	01	med. óssea				
		02	biopsia	orelha	mecânica	Costar	Ham
		03	biopsia	orelha	enzimática	Costar	Ham
	CFC122	01	biopsia	orelha	mecânica	Costar	Eagle
		02	biopsia	orelha	enzimática	Costar	Eagle
	CFC142	01	biopsia	orelha	mecânica	Costar	Ham
		02	biopsia	orelha	enzimática	Costar	Ham
	CFC143	01	biopsia	orelha	mecânica	Costar	Ham
		02	biopsia	orelha	enzimática	Costar	Ham
	CFC145	01	biopsia	orelha	mecânica	Costar	Ham
		02	biopsia	orelha	mecânica	Costar	Ham
		03	biopsia	orelha	mecânica	Costar	Ham
	CFC153	01	med. óssea	orelha	mecânica	Costar	Ham
		02	biopsia	orelha	mecânica	Costar	Eagle
		03	biopsia	orelha	mecânica	Costar	Eagle
	CFC158	01	med. óssea	orelha	mecânica	Costar	Ham
		02	biopsia	cauda	mecânica	Costar	Eagle
		03	biopsia	orelha	mecânica	Costar	Eagle
		04	biopsia	orelha	mecânica	Costar	Eagle

Tabela 2. (cont.)

Espécie	Nº de registro	Nº da amostra	Material colhido	Local da biopsia	Desagregação	Frasco	Meio
	CFC160	01	med. óssea	orelha	mecânica	Descarplast	Eagle
		02	biopsia	orelha	mecânica	Costar	Eagle
	CFC161	03	biopsia	orelha	mecânica	Costar	Eagle
		04	biopsia	orelha	mecânica	Costar	Eagle
	CFC161	01	med. óssea				
		02	biopsia	orelha	mecânica	Costar	Eagle
		03	biopsia	orelha	mecânica	Costar	Eagle
		04	biopsia	orelha	mecânica	Costar	Eagle
	CFC166	01	biopsia	orelha	mecânica	Costar	Eagle
		02	biopsia	orelha	mecânica	Corning	Ham
		03	biopsia	orelha	mecânica	Descarplast	Eagle
M. ater	CFC016	01	biopsia	orelha	mecânica	Descarplast	Ham
		02	biopsia	cauda	mecânica	Descarplast	Ham
	CFC017	01	biopsia	orelha	mecânica	Descarplast	Ham
		02	biopsia	orelha	mecânica	Descarplast	Ham
	CFC018	01	biopsia	orelha	mecânica	Descarplast	Ham
		02	biopsia	orelha	mecânica	Descarplast	Ham
	CFC019	01	biopsia	orelha	mecânica	Descarplast	Ham
		02	biopsia	orelha	mecânica	Descarplast	Ham
	CFC020	01	biopsia	orelha	mecânica	Descarplast	Ham
	CFC021	01	biopsia	orelha	mecânica	Descarplast	Ham
	CFC026	01	med. óssea	orelha	mecânica	Costar	Ham
		02	biopsia	orelha	mecânica	Descarplast	Eagle
	CFC027	01	biopsia	orelha	mecânica	Descarplast	Eagle
	CFC028	02	biopsia	orelha	mecânica	Descarplast	Eagle
	CFC046	01	med. óssea	orelha	mecânica	Costar	Ham
		02	biopsia	orelha	mecânica	Costar	Ham
		03	biopsia	orelha	mecânica	Costar	Eagle
	CFC051	01	med. óssea	orelha	mecânica	Costar	Ham
		02	biopsia	orelha	mecânica	Costar	Eagle
		03	biopsia	orelha	mecânica	Costar	Eagle
	CFC052	01	med. óssea	orelha	mecânica	Costar	Ham
		02	biopsia	orelha	mecânica	Costar	Eagle
	CFC053	01	biopsia	orelha	mecânica	Costar	Ham
	CFC054	01	biopsia	orelha	mecânica	Costar	Ham
		02	biopsia	orelha	mecânica	Costar	Ham
	CFC066	01	biopsia	orelha	mecânica	Costar	Ham
	CFC067	01	biopsia	orelha	mecânica	Costar	Ham
	CFC068	01	biopsia	orelha	mecânica	Costar	Ham
	CFC091	01	biopsia	orelha	mecânica	Costar	Ham
	CFC105	01	biopsia	orelha	mecânica	Costar	Ham
	CFC106	01	biopsia	orelha	mecânica	Costar	Ham
	CFC109	01	biopsia	orelha	mecânica	Costar	Ham
	CFC131	01	biopsia	orelha	mecânica	Costar	Ham
		02	biopsia	orelha	enzimática	Costar	Ham
	CFC134	01	biopsia	orelha	mecânica	Costar	Eagle
		02	biopsia	orelha	enzimática	Descarplast	Eagle
	CFC135	01	biopsia	orelha	mecânica	Costar	Eagle
		02	biopsia	orelha	enzimática	Descarplast	Eagle

Tabela 02 (cont.)

Espécie	Nº de registro	Nº da amostra	Material colhido	Local da biopsia	Desagregação	Frasco	Meio
	CFC136	01	biopsia	orelha	mecânica	Descarplast	Eagle
	CFC147	01	biopsia	orelha	mecânica	Descarplast	Ham
		02	biopsia	orelha	mecânica	Descarplast	Ham
	CFC148	01	biopsia	orelha	mecânica	Costar	Ham
M. molossus	CFC041	01	med. óssea	orelha	mecânica	Costar	Ham
		02	biopsia	orelha	mecânica	Descarplast	Eagle
N. laticaudatus	CFC042	03	biopsia	orelha	mecânica	Descarplast	Eagle
	CFC042	01	med. óssea	orelha	mecânica	Costar	Ham
		02	biopsia	orelha	mecânica	Descarplast	Eagle
		03	biopsia	orelha	mecânica	Descarplast	Eagle
	CFC043	01	med. óssea				
		02	biopsia	orelha	mecânica	Descarplast	Eagle
		03	biopsia	orelha	mecânica	Descarplast	Eagle
	CFC044	01	med. óssea				
		02	biopsia	orelha	mecânica	Costar	Ham
		03	biopsia	orelha	mecânica	Descarplast	Ham
	CFC045	01	med. óssea				
		02	biopsia	orelha	mecânica	Costar	Ham
		03	biopsia	orelha	mecânica	Descarplast	Ham
	CFC047	01	med. óssea				
		02	biopsia	orelha	mecânica	Costar	Ham
		03	biopsia	orelha	mecânica	Costar	Ham
	CFC048	01	med. óssea				
		02	biopsia	orelha	mecânica	Costar	Ham
		03	biopsia	orelha	mecânica	Costar	Ham
	CFC055	01	biopsia	orelha	mecânica	Costar	Ham
		01	biopsia	orelha	mecânica	Costar	Ham
	CFC056	01	biopsia	orelha	mecânica	Costar	Ham
	CFC057	01	biopsia	orelha	mecânica	Costar	Ham
	CFC058	01	biopsia	orelha	mecânica	Costar	Ham
	CFC059	01	biopsia	orelha	mecânica	Costar	Ham
	CFC060	01	biopsia	orelha	mecânica	Costar	Ham
	CFC061	01	biopsia	orelha	mecânica	Costar	Ham
	CFC062	01	biopsia	orelha	mecânica	Costar	Ham
	CFC063	01	biopsia	orelha	mecânica	Costar	Ham
		02	biopsia	orelha	mecânica	Costar	Eagle
	CFC064	01	biopsia	orelha	mecânica	Costar	Ham
		02	biopsia	orelha	mecânica	Costar	Ham
	CFC065	01	biopsia	orelha	mecânica	Costar	Ham
	CFC090	01	biopsia	orelha	mecânica	Costar	Ham
	CFC102	01	biopsia	orelha	mecânica	Costar	Ham
	CFC103	01	biopsia	orelha	mecânica	Costar	Ham
	CFC104	01	biopsia	orelha	mecânica	Costar	Ham
	CFC137	01	biopsia	orelha	mecânica	Costar	Eagle
	CFC138	01	biopsia	orelha	mecânica	Descarplast	Eagle
	CFC155	01	biopsia	orelha	mecânica	Costar	Ham
	CFC156	01	biopsia	orelha	mecânica	Costar	Ham
		02	biopsia	orelha	mecânica	Descarplast	Ham

Tabela 2. (cont.)

Espécie	Nº de registro	Nº da amostra	Material colhido	Local da biopsia	Desagregação	Frasco	Meio
álcool 70%, tesoura estéril, contendo meio de U/ml), estreptomicina (250 37°C, por 24 horas (meio para colheita).	CFC157	01	biopsia	orelha	mecânica	Costar	Eagle
		02	biopsia	orelha	mecânica	Descarplast	Eagle
	CFC162	01	biopsia	orelha	mecânica	Costar	Eagle
		02	biopsia	orelha	mecânica	Costar	Eagle
	CFC168	01	biopsia	orelha	enzimática	Costar	Ham
		02	biopsia	orelha	enzimática	Costar	Ham
N. laticaudatus	CFC099	01	med. óssea				
		02	biopsia	orelha	mecânica	Costar	Ham
		03	biopsia	asa	mecânica	Costar	Ham

2.1. Obtenção da Biopsia

O local escolhido para a biopsia passou por uma assepsia com três banhos de éter, três banhos de acetona e três banhos de álcool 70%. Após a assepsia foi feito o corte do fragmento com tesoura estéril e esse foi transferido para um frasco também estéril contendo meio de Eagle com 10% de soro fetal bovino, penicilina (250 U/ml), estreptomicina (250 μ g/ml) e anfotericina-B (1 μ g/ml), a 37°C, por 24 horas (meio para colheita).

2.2. Montagem após Desagregação Mecânica

Após as 24 horas a biopsia foi transferida, em câmara de fluxo laminar horizontal, para uma placa de petri de 4 cm de diâmetro, estéril, contendo cerca de 2ml de meio completo. Nessa placa, o fragmento foi recortado várias vezes com o auxílio de pinça e tesoura estéreis, sendo produzidos fragmentos menores com cerca de 2 mm². Os fragmentos assim obtidos foram implantados com o auxílio de uma pipeta Pasteur estéril na superfície inferior de frascos de cultura previamente umedecidos com soro fetal bovino. Implantados os recortes, os frascos foram invertidos e adicionou-se aos mesmos 2 ml de meio completo. Os frascos foram tampados e mantidos na posição invertida, por 24 horas, a 37°C em estufa bacteriológica. A seguir, foram cuidadosamente virados à posição correta, na qual permaneceram por 4 a 5 dias, sem qualquer movimentação. Os frascos foram observados ao microscópio invertido para verificação de aderência ao substrato, ocorrência de contaminação, crescimento celular ou necrose. Quando ocorreu o crescimento celular, mais 3 ml de meio foram adicionados aos frascos. Após nova incubação a 37°C, para que houvesse a proliferação das células, seguiram-se observações diárias para detecção de alterações de coloração do meio de cultura que indicassem alterações no pH e para verificar se havia contaminação por fungos e bactérias. Quando as células cresceram em amontoados, o material foi tripsinizado, a fim de que as células se soltassem, espalhassem e proliferassem uniformemente. A tripsinização foi também utilizada para a repicagem das culturas.

2.3. Montagem após Desagregação Enzimática

Os fragmentos da orelha, cauda ou asa, obtidos como já descrito, foram cortados com tesoura estéril, em câmara de fluxo laminar horizontal, em fragmentos de 2 mm^2 em uma placa de Petri com cerca de 2 ml de meio completo. Os pequenos fragmentos, juntamente com o meio de cultura, foram transferidos para frascos plásticos de cultura aos quais adicionou-se 3 ml de meio completo e 0,5 ml de solução de collagenase (Sigma) na concentração de 2.000 U/ml. Os frascos foram incubados em posição horizontal a 37°C , por 24 a 48 horas. No final desse período, a suspensão mostrava-se viscosa e, ao microscópio invertido, podia ser observada a frouxidão de alguns fragmentos. Nessa ocasião, a suspensão foi ressuspendida dentro do próprio frasco com uma pipeta, para que ocorresse uma melhor separação das células. Após, a suspensão foi centrifugada por oito minutos a 1000 rpm. O sobrenadante foi substituído por 5 a 10 ml de solução salina de Hanks e o material novamente centrifugado. Removeu-se o sobrenadante, diluiu-se o sedimento em 2 ml de meio completo, e transferiu-se a suspensão para o frasco de cultura, que foi incubado a 37°C . No dia seguinte, removeu-se o meio de cultura do frasco e adicionou-se 5 ml de meio novo. Os frascos foram, então, observados diariamente e, conforme o item anterior, tripsinizados quando necessário.

2.4. Tripsinização para Dispersão das Células e Replicagem das Culturas

Utilizou-se para a dispersão das células a solução de tripsina/EDTA da Cultilab (0,05 g de tripsina + EDTA 0,53 mM em 100 ml de Hanks). O meio de cultura foi retirado do frasco e introduziu-se cerca de 5 ml de solução de Hanks sem Ca^{+} e Mg^{+} para diluir o restante do meio, pois o soro nele presente inativa a ação da tripsina. Após a retirada desse meio diluído, adicionou-se 1 ml da solução de tripsina/EDTA previamente aquecida a 37°C . Decorrido cerca de um minuto, retirou-se essa solução com o auxílio de uma pipeta Pasteur e adicionou-se 5 ml de meio completo ao frasco, que foi, então, agitado para que as células se despreendessem e se espalhassem a fim de crescerem mais uniformemente. Esse material foi

reconduzido à estufa. A cultura até essa etapa é denominada primária.

Quando se observou no frasco primário um número grande de células ou a confluência das mesmas, o material foi novamente tripsinizado. As suspensões tiveram suas densidades celulares estimadas e foram divididas em dois ou mais frascos de cultura, conforme a densidade celular pretendida para a iniciação das réplicas. A partir daí permaneceram a 37°C, sempre sob observação diária. Os frascos em crescimento foram repicados tantas vezes quanto o número de réplicas necessário para as análises.

2.5. Colheita da Cultura

As culturas com crescimento satisfatório, das quais foi obtido o número de réplicas adequadas e com quantidades suficientes de células (superfície do frasco com 70 a 100% de confluência), tiveram o crescimento de seus frascos interrompidos, seguindo-se o preparo do material para as análises cromossômicas com bandamentos e a pesquisa de sítios frágeis. Uma ou mais réplicas de alguns casos foram mantidas para a realização dos ensaios relativos às etapas de congelamento.

Introduziu-se, no frasco a ser colhido, uma gota de colquicina a 0,0016% ($4 \times 10^{-4}M$) por aproximadamente uma hora. O meio de cultivo foi retirado e cerca de 8 ml de solução de citrato de sódio a 1%, pré-aquecidos a 37°C, foram colocados no frasco que foi, então, incubado novamente a 37°C por cerca de 30 a 40 minutos, tempo suficiente para que ocorresse a hipotonização e o descolamento das células. A seguir, três gotas de fixador metanol-acético 3:1 foram adicionadas ao frasco. Esse material foi, então, transferido cuidadosamente para um tubo de centrifuga e centrifugado por 8 minutos a 900 rpm. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado fixado em metanol acético 3:1 por três vezes. O material obtido foi gotejado sobre lâminas geladas molhadas e submetido às técnicas de coloração usual com Giemsa e bandamentos GTG, CBG, RBG e NSG.

3. Técnicas de Coloração e Bandamento Cromossômico

3.1. Coloração Usual com Giemsa a 2%

O material foi previamente hidrolisado em HCl 1N a 60°C, por sete minutos, lavado pelo mesmo tempo em água desionizada gelada para interromper a hidrólise e por dez minutos em água destilada corrente. Posteriormente, foi submetido a um banho rápido em solução tampão Sorensen, pH 6,8, corado com solução de Giemsa (MERCK) tamponado a 2%, com o mesmo tampão, por cerca de 7 minutos, e lavado em água destilada. No material em que foram analisados os sítios frágeis, que foi posteriormente submetido a descoloração, empregou-se somente a solução de Giemsa, sem a hidrólise prévia em HCl.

3.2. Bandamento GTG

O bandamento G processou-se 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, transferiu-se para solução tampão Sorensen, pH 6,8, onde permaneceram por 10 a 20 minutos. A seguir, imergiu-se as lâminas em solução de tripsina (DIFCO) a 0,02% tamponada com solução salina de PBS, por um tempo variável de cinco a vinte segundos, dependendo do período decorrido após a fixação do material. Retirou-se o excesso de tripsina imergindo a lâmina em solução salina de PBS, e o material foi posteriormente corado com solução tamponada de Giemsa a 2%, por 3 a 5 minutos, e lavado em água destilada.

Em situações nas quais o material havia sido fixado há menos tempo, foi necessário reduzir-se a concentração da tripsina para 0,01% e o tempo de tratamento para até dois segundos.

3.3. Bandamento CBG

Processou-se o bandamento C de acordo com a técnica de SUMNER (1972), também com modificações. Submeteu-se o material, 6 a 15 dias após a fixação, a uma hidrólise em HCl 0,2N, por quinze minutos. Em seguida, as lâminas foram lavadas em água desionizada

gelada, secas e submetidas ao tratamento com solução de $\text{Ba}(\text{OH})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ a 5%, sendo mantidas a 37°C , por um tempo variável de 10 a 20 minutos, de acordo com o período decorrido após a fixação. A seguir, o material foi lavado em água destilada, banhado em água desionizada gelada e submetido a dois tratamentos com solução salina 2XSSC, pH 7,0, um a temperatura ambiente por dez minutos e outro por sessenta minutos a 60°C . A seguir, processou-se a desidratação, passando-se em duas séries de álcoois, de concentrações 70% e 95%. Após a secagem, corou-se o material com solução de Giemsa a 2% em tampão Sorensen (pH 6,8), por 10 minutos.

3.4. Bandamento RBG

O bandamento RBG processou-se de acordo com a técnica de RIBEIRO & MELARAGNO (1986), com modificações. Lâminas obtidas de culturas após incorporação com 5-Bromodesoxiuridina (5-BrdU, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$), nas oito horas finais, foram cobertas com um filme de Hoechst 33258, na concentração de 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, e expostas à luz UV, sem cobertura com laminula, a 20 cm de distância, por doze minutos. A seguir, foram lavadas em água desionizada corrente, secas ao ar, incubadas em NaH_2PO_4 1M, pH 8 - 8,3 a 89°C durante três a cinco minutos, e coradas com Giemsa a 5% em tampão fosfato durante sete minutos.

3.5. Marcação das RONS pela Prata (Técnica NSG)

Para a marcação das RONS utilizou-se a técnica proposta por HOWELL & BLACK (1980), com modificações. Hidrolisou-se o material inicialmente em HCl 1N a 60°C , por dez minutos, e interrompeu-se a hidrólise por um banho em água gelada desionizada. Após a secagem das lâminas, depositou-se uma gota de solução reveladora de gelatina formolizada a 1% e outra de solução aquosa de nitrato de prata (MERCK) a 50% em cada uma das extremidades da lâmina. Cobriu-se as gotas misturadas com duas laminulas e manteve-se as lâminas a $50-60^\circ\text{C}$, por cerca de 7 minutos, até que a mistura das soluções apresentasse uma coloração castanho-dourada. A seguir, lavou-se as lâminas em água destilada, secou-se e submeteu-se à coloração em solução a 2% de Giemsa tamponada, por oito minutos.

D. Congelamento das Células

Utilizou-se, nos ensaios de congelamento, os métodos de congelção rápida e moderada das células, de acordo com os protocolos do Laboratório de Cultura de Células de Vertebrados do Instituto de Biociências da USP, SP, e de FRESHNEY (1987).

Os procedimentos realizados incluíram quatro etapas principais, abaixo descritas.

1. Obtenção da Suspensão Celular

As suspensões celulares foram obtidas pela tripsinização de culturas com solução de tripsina/EDTA e ressuspensão das células em 5 ml de meio completo. A seguir, a suspensão foi centrifugada a 800 rpm por 8 minutos, o sobrenadante retirado e o precipitado ressuspendido em 1,0 ml de meio Ham-F10 completo e 10% de glicerina P.A. autoclavada.

2. Estimativa do Número de Células Contidas na Suspensão

Uma alíquota de 0,1 ml foi retirada da suspensão celular contida no volume de 1 ml e a ela adicionou-se 0,1 ml de solução de azul de tripano a 0,4%, a fim de se identificar as células vivas. Após 5 a 10 minutos, uma pequena quantidade dessa mistura foi colocada no hemocitômetro e sob microscópio em campo escuro, com objetiva de 10X, foi feita a contagem de células vivas com a posterior estimativa do número de células contida no volume total da suspensão através da utilização da fórmula abaixo, conforme BIRD & FORRESTER (1981).

Células vivas contadas

$$\text{Número de células/ml} = \frac{\text{Quadrados analisados}}{\text{Células vivas contadas}} \times \text{Fator de diluição} \times \text{Fator de conversão da câmara} \quad (10^4)$$

Quadrados analisados

(10⁴)

Utilizando-se os procedimentos anteriormente descritos, foram realizados onze ensaios com diversas amostras e análises variáveis nos aspectos: (a) concentração de células contida em



3. Resfriamento da Suspensão Celular

O volume da suspensão a ser congelada foi completado para 1,5 ml ou 3,0 ml, de acordo com o número de células que se pretendia congelar por ampola, e transferido para uma ou duas ampolas plásticas (Costar) com 1,8 ml de capacidade cada, devidamente identificadas. As ampolas foram cuidadosamente fechadas e seladas com parafilme. Utilizou-se três procedimentos diferentes para o resfriamento: (a) congelamento prévio a -20°C , por uma hora, seguido do congelamento em nitrogênio líquido a -196°C , (b) congelamento prévio a -20°C por uma hora, transferência da ampola para a tampa do botijão de nitrogênio a -180°C por 24 horas e congelamento a -196°C e (c) congelamento direto da ampola a -196°C . As ampolas submetidas à temperatura de -180°C estavam revestidas por cerca de 4 camadas de jornal, para garantir um congelamento homogêneo da suspensão.

4. Descongelamento das Células e Semeadura de Novas Culturas

Decorridos alguns dias do congelamento da suspensão, as culturas foram descongeladas a fim de se verificar a eficiência de crescimento de células congeladas de modos diversos e semeadas em densidades diferentes. As ampolas foram retiradas do botijão de nitrogênio líquido com o auxílio de luvas e pinças e aquecidas a 37°C em banho maria, por 3 a 5 minutos, até o descongelamento total da suspensão. As ampolas foram, então, limpas externamente com álcool 70% e abertas na câmara de fluxo laminar. Uma pequena alíquota de 0,1 ml foi retirada para estimativa do número de células vivas contidas na suspensão após o descongelamento, após o que transferiu-se a suspensão para um ou mais frascos de cultura previamente identificados, com 3 ml de meio Ham-F10 completo, e incubou-se a 37°C , por 24 horas. A seguir, substituiu-se o meio por 5 ml de MEM - Eagle e o frasco foi reconduzido à estufa, sendo observado diariamente.

Utilizando-se os procedimentos anteriormente descritos, foram realizados onze ensaios com dezesseis amostras e analisadas variações nos aspectos: (a) concentração de células contida em



cada ampola de congelamento; (b) procedimento de congelamento; (c) tempo de armazenagem antes do descongelamento, e (d) densidade celular nos novos lançamentos após descongelamento.

Procurou-se avaliar a eficiência das técnicas de congelamento através de nova estimativa do número de células vivas após descongelamento, a fim de se calcular a porcentagem ou a viabilidade das células em cada ensaio, e pela taxa de proliferação celular, medida pelo número de dias para que a cultura ficasse totalmente confluenta.

E. Análise Citogenética

Dos espécimes de molossídeos nos quais as preparações cromossômicas resultaram satisfatórias, analisou-se os cariótipos sob microscópio óptico, em preparações coradas classicamente e submetidas às técnicas de bandamento, investigando-se e documentando-se por fotomicrografias os padrões representativos das espécies. Os cromossomos foram classificados segundo morfologia e tamanho, de acordo com LEVAN et al. (1964). Para montagem dos cariótipos eles foram ordenados em ordem decrescente de tamanho, destacando-se os cromossomos sexuais, e pareados, segundo similaridade de forma e tamanho nas preparações sem bandas, ou segundo a homologia no padrão longitudinal de bandas.

F. Indução de Sítios Frágeis por Bromodesoxiuridina (5-BrdU) e Afidicolina (APC)

Para o estudo do efeito da incorporação de 5-BrdU e APC aos cromossomos foram utilizadas culturas secundárias (réplicas) de células de alguns espécimes das espécies *Molossus ater*, *Molossus molossus* e *Eumops glaucinus*, mantidas em MEM - Eagle enriquecido com 20% de soro fetal bovino e suplementado com 125 U/ml de penicilina e 125 µg/ml de estreptomicina. Para o teste com 5-BrdU, essa foi adicionada na concentração final de 20 µM nas 26 horas finais, conforme sugerido por LIN et al. (1984). Para detecção de sítios frágeis sensíveis a APC, tal composto foi adicionado na concentração de 0,02 µM nas últimas 24 horas, conforme DJALALI et al. (1985, 1987). A fim de evitar a fotólise do DNA nos frascos de cultura que

continham a 5-BrdU, esses foram cobertos com papel alumínio. Cada experimento foi acompanhado por uma cultura controle, na qual não foi adicionada 5-BrdU e APC.

As quebras ou falhas foram pesquisadas em um total de 200 metáfases completas para cada espécime (100 nas preparações não tratadas e 100 nas preparações tratadas) em lâminas codificadas, coradas usualmente com solução de Giemsa. Para a identificação da localização das lesões cromossômicas, procedeu-se à descoloração da lâmina analisada e à reinvestigação, após bandamento G, das metáfases que apresentaram as alterações. A ocorrência de duas ou mais aberrações em uma mesma região cromossômica em pelo menos dois animais da mesma espécie, ou a expressão em homozigose em uma célula, foi considerada como indicador da ocorrência de um sítio frágil, a exemplo do proposto por WURSTER-HILL et al. (1988) e ELDER & ROBINSON (1989), respectivamente. As alterações observadas foram documentadas por fotomicrografias.

G. Análise Estatística

Para comparação entre os resultados das diferentes condições de cultivo analisadas e entre o controle e os vários tratamentos na pesquisa de fragilidade cromossômica, utilizou-se o teste de Qui-Quadrado (χ^2), tendo sido fixado em 5% o nível crítico de rejeição da hipótese de nulidade.



III. RESULTADOS

A. Culturas de Fibroblastos

1. Ensaio sobre Condições de Semeadura e Cultivo

Os resultados dos ensaios realizados para verificar as melhores condições para o cultivo das células dos morcegos, que envolveram variações em quatro aspectos básicos, ou seja, no tecido da biopsia, na técnica de desagregação celular, no substrato e no meio para cultivo das células, estão apresentados na Tabela 3. Uma avaliação quantitativa dos dados mostra que das 165 amostras semeadas:

a) 155 (94,%) foram derivadas de biopsia da orelha, 9 (5,4%) da cauda e 1 (0,6%) da asa;

b) 147 (89%) foram desagregadas mecanicamente (137 orelhas, 9 caudas, 1 asa) e 18 (11%) desagregadas enzimaticamente (orelhas);

c) 52 (31%) foram montadas em frasco Descarplast (47 orelhas, 5 caudas), 107 (65%) em frasco Costar (102 orelhas, 4 caudas, 1 asa) e 6 (4%) em frasco Corning (orelhas);

d) 113 (68%) foram cultivadas em meio Ham-F10 (108 orelhas, 4 caudas, 1 asa) e 52 (32%) em meio MEM-Eagle (47 orelhas, 5 caudas);

e) 117 (71%) aderiram aos frascos e as demais, ou seja, 19 (11%) foram descartadas por não aderência (17 orelhas, 1 cauda, 1 asa) e 29 (18%) por contaminação (27 orelhas e 2 caudas).

Das 117 amostras que aderiram:

a) 111 (96%) foram derivadas de orelhas e 6 (4%) de caudas;

b) 108 (92%) foram desagregadas mecanicamente (102 orelhas, 6 caudas) e 9 (8%) enzimaticamente ;

c) 32 (27%) foram semeadas em frasco Descarplast (28 orelhas, 4 caudas), 80 (69%) em Costar (78 orelhas, 2 caudas) e 5 (4%) em frascos Corning;

d) 80 (68%) foram cultivadas em meio Ham-F10 (78 orelhas, 2 caudas) e 37 (32%) em MEM-Eagle (33 orelhas, 4 caudas); e

e) 85 (73%) cresceram, 22 (19%) não cresceram e 10 (8%) contaminaram posteriormente.

Tabela 3. Distribuição das frequências de amostras semeadas que aderiram, que proliferaram, contaminaram, tiveram problemas na colheita e analisadas, de acordo com o tipo de biopsia, desagregação, frasco e meio de cultivo utilizados.

Espécie	Variáveis Nº de amostras	Desagregação		Frasco			Meio	
		mecânica		Descarplast	Frasco		Ham-F10	MEM-Eagle
		orelha cauda	orelha cauda		Costar	Corning		
		orelha cauda	orelha cauda	orelha cauda	orelha cauda	orelha cauda	orelha cauda	orelha cauda
<i>E. auripendulus</i>	semeadas (2)	1	1	1	1			1
	aderiram (1)	1		1				1
	creceram (1)	1		1				1
	contaminaram (2)	1	1		1			1
<i>E. bonariensis</i>	semeadas (2)	1	1		2		2	
	aderiram (2)	1	1		2		2	
	creceram (2)	1	1		2		2	
	contaminaram (2)	1	1		2		2	
<i>E. glaucinus</i>	semeadas (20)	15	2	3	7	2	8	3
	aderiram (17)	13	2	2	7	2	6	2
	creceram (16)	13	1	2	7	1	6	2
	contaminaram (10)	8	2		4	2	2	2
	problemas (2)	1		1	2			1
	analisadas (4)	3		1	2		2	
<i>E. perotis</i>	semeadas (32)	24	4	4	11	1	14	4
	aderiram (15)	13	2		5	1	6	1
	creceram (12)	11	1		3	1	6	1
	contaminaram (15)	12	3	1	2	1	10	2
	problemas (2)	1	1			1	1	1
	analisadas (4)	4			1		3	
<i>M. abrasus</i>	semeadas (2)	1		1			2	
	aderiram (2)	1		1			2	
	creceram (2)	1		1			2	
	contaminaram (1)			1			1	
	problemas (0)							
	analisadas (2)	1		1			2	
<i>M. temminckii</i>	semeadas (25)	20	1	4			23	1
	aderiram (17)	13	1	3			16	1
	creceram (7)	5	1	1			6	1
	contaminaram (13)	8	1	4			11	1
	problemas (0)							
	analisadas (2)	2					2	
<i>M. ater</i>	semeadas (37)	33	1	3	17	1	19	12
	aderiram (30)	27	1	2	10	1	19	11
	creceram (25)	24	1		7	1	17	10
	contaminaram (9)	9			8		1	1
	problemas (7)	7			3		4	4
	analisadas (12)	12			2		10	5

Tabela 3. (cont.)

Espécie	Variáveis	Desagregação		Frasco			Meio	
		mecânica	enzimática	Descarplast	Costar	Corning	Ham-F10	MEM-Eagle
	Nº de amostras	orelha cauda	orelha cauda	orelha cauda	orelha cauda	orelha cauda	orelha cauda	orelha cauda
<i>M. molossus</i>	semeadas (43)	41	2	11	32		30	13
	aderiram (32)	32		5	27		25	7
	creceram (19)	19			19		16	3
	contaminaram (14)	14		6	8		7	7
	problemas (2)	2			2		2	
	analisadas (13)	13			13		10	3
<i>N. laticaudatus</i> *	semeadas (2)	1			1		1	
	aderiram (1)	1			1		1	
	creceram (1)	1			1		1	
	contaminaram (1)	1			1		1	

* A única amostra da asa semeada após desagregação mecânica, em frasco Costar, e com meio Ham-F10, não aderiu

Das 85 amostras que cresceram:

- a) 81 (95%) foram derivadas de orelhas e 4 (5%) de caudas;
- b) 80 (94%) foram desagregadas mecanicamente (76 orelhas, 4 caudas) e 5 (6%) enzimaticamente;
- c) 21 (25%) foram semeadas em frascos Descarplast (18 orelhas, 3 caudas), 60 (71%) em Costar (50 orelhas, 1 cauda) e 4 (4%) em Corning;
- d) 58 (68%) foram cultivadas em meio Ham-F10 (57 orelhas, 1 cauda) e 27 (32%) em MEM-Eagle (24 orelhas, 3 caudas); e
- e) 52 (61%) apresentaram bom crescimento e 33 (39%) tiveram crescimento insuficiente (21 contaminaram e 12 estacionaram).

Das 52 amostras que apresentaram bom desenvolvimento das culturas:

- a) 51 (98%) foram derivadas de orelhas e uma (2%) de cauda;
- b) 49 (94%) foram desagregadas mecanicamente (48 orelhas, 1 cauda) e 3 (6%) enzimaticamente;
- c) 11 (21%) foram semeadas em frascos Descarplast (10 orelhas, 1 cauda) e 41 (79%) em Costar;
- d) 35 (67%) foram cultivadas em meio Ham-F10 e 17 (33%) em MEM-Eagle (16 orelhas, 1 cauda);
- e) 7 (13%) contaminaram durante as substituições de meio de cultura;
- f) 39 (75%) foram colhidas com sucesso (3 contaminadas e 36 normais) fornecendo material suficiente para análise;
- g) 13 (25%) apresentaram problemas na colheita (9 normais e 4 contaminadas); e
- h) 37 foram analisadas.

Das 12 amostras com crescimento insuficiente:

- a) todas foram desagregadas mecanicamente (11 orelhas, 1 cauda);
- b) 4 foram semeadas em frasco Descarplast (3 orelhas, 1 cauda), 6 em Costar e 2 em Corning;
- c) 9 foram cultivadas em meio Ham-F10 (7 orelhas, 1 cauda) e 3 em MEM-Eagle.

Observa-se, pela Tabela 3, que 67 amostras sofreram contaminações. Dessas:

a) 39 (58%) contaminaram antes do crescimento (35 orelhas, 4 caudas), sendo 20 (51%) por fungo (17 orelhas, 3 caudas) e 19 (49%) por bactérias (18 orelhas, 1 cauda); e

b) 28 (42%) contaminaram após o crescimento (25 orelhas, 3 caudas), sendo 12 (43%) por fungo (11 orelhas, 1 cauda) e 16 (57%) por bactérias (14 orelhas, 2 caudas).

Na Tabela 4 estão discriminadas, por espécie, as frequências de amostras que contaminaram antes de aderir ou que aderiram e que proliferaram, de acordo com o local de coleta da biopsia, do tipo de frasco e de meio de cultivo utilizados, para os dois métodos de desagregação tecidual tentados. Comparando os rendimentos dos dois tipos de desagregação, verificou-se a maior eficiência da desagregação mecânica, tanto no aspecto de aderência ao substrato como no de proliferação celular (valores de χ^2 na Tabela 5).

A desagregação mecânica foi adequada para propiciar a adesividade que o explante necessita para fixar-se ao substrato em relação às espécies *E. auripendulus*, *E. bonariensis*, *E. glaucinus*, *E. perotis*, *M. abrasus*, *M. temminckii*, *M. ater*, *M. molossus* e *N. laticaudatus*. Embora as espécies *E. perotis* e *M. temminckii* tenham apresentado menores frequências de adesão (54% e 65%) nas amostras desagregadas mecanicamente, a desagregação enzimática propiciou um aumento na frequência de adesão do explante apenas nas amostras de *M. temminckii* (75%).

Os dados obtidos com as amostras desagregadas mecanicamente foram comparados, por teste de χ^2 , em relação aos demais parâmetros considerados neste estudo e os resultados são apresentados na Tabela 5. Em relação à frequência com que as amostras aderiram, não houve diferença na afinidade dos explantes, independentemente de sua origem, pelos substratos plásticos das três marcas, assim como também não houve influência de qualquer dos meios utilizados. Considerando só as culturas nas quais houve proliferação celular, observou-se que os explantes obtidos de biopsia da orelha e da cauda tiveram a mesma capacidade de proliferação *in vitro* (orelha 53% e cauda 44%). Além disso, à semelhança do observado em

Tabela 4. Frequência de amostras semeadas (S), aderidas (A), contaminadas antes de aderir (C) e com proliferação (P), discriminadas pela espécie, local de coleta da biopsia, tipo de frasco e de meio de cultivo utilizado, nos casos em que foi feita desagregação mecânica e nos submetidos a desagregação enzimática.

Espécie	Biopsia												Frasco												Meio											
	orelha				cauda				asa				Descarplast				Costar				Corning				Ham-F10				MEM-Eagle							
	S	A	C	P	S	A	C	P	S	A	C	P	S	A	C	P	S	A	C	P	S	A	C	P	S	A	C	P	S	A	C	P				
Desagregação mecânica																																				
E. auripendulus	1	1		1	1								2	1		1																2	1		1	
E. bonariensis	1	1		1													1	1		1					1	1		1								
E. glaucinus	15	13		13	2	2	1	1					8	8	1	7	7	5		5	2	2	2		12	10		10			5	5	1	4		
E. perotis	24	13	1	11	4	2		1					9	6	1	4	17	7		6	2	2	2		23	10		8			5	5	1	4		
M. abrasus	1	1		1													1	1		1					1	1		1								
M. temminckii	20	13	4	5	1	1		1									20	13	3	6	1	1	1		8	8	1	3	13	6	3	3				
M. ater	33	27		24	1	1		1					16	10		8	18	18		17				24	18		15	10	10		10					
M. Molossus	41	32	2	19									11	5			30	27	2	19				28	25	1	16	13	7	1	3					
N. laticaudatus	1	1		1					1								2	1		1				2	1		1									
Total	137	102	7	76	9	6	1	4	1				46	30	2	20	96	73	5	56	5	5	1	4	99	74	2	55	48	34	6	25				
Desagregação enzimática																																				
E. bonariensis	1	1		1													1	1		1				1	1		1									
E. glaucinus	3	2		2									1	1	1		1	1	1	1				2	1		1	1	1		1					
E. perotis	4												3				1							4												
M. abrasus	1	1		1													1	1		1				1	1		1									
M. temminckii	4	3	2	1													4	3	2	1				3	2	2		1	1		1					
M. ater	3	2											2	1			1	1						1	1			2	1							
M. molossus	2												2											2												
Total	18	9	2	5									6	2	1		11	7	2	4	1			14	6	2	3	4	3		2					

relação às culturas que aderiram ao substrato, embora a frequência de crescimento tenha decrescido nos frascos Corn. e Costar para o Descarpiati, a diferença não foi significativa. Outra observação é que ambos os meios utilizados, ou seja, Ham-F10 e MEM-Eagle, foram igualmente suficientes para proporcionar e manter o crescimento das células in vitro nas condições de ensaio utilizadas.

As observações das frequências de adesão e crescimento das diferentes espécies mostraram, ainda, que as células das espécies *M. perotis* e *M. temminckii* foram as que apresentaram maiores

Tabela 5. Valores de χ^2 obtidos da comparação entre as variáveis dos parâmetros tipo de desagregação, local de biopsia, tipo de frasco e meio de cultivo.

Situação da Cultura	Parâmetro analisado	Variáveis comparadas	χ^2	Gl	P
Com adesão	tipo de desagregação	mecânica x enzimática	5,19	1	$P < 0,05$
	local de biopsia	orelha x cauda	0,3	1	ns
	tipo de frasco	Desc. x Corn. x Cost.	3,7	2	ns
	meio de cultivo	MEM-Eagle x Ham-F10	0,7	1	ns
Com proliferação celular	tipo de desagregação	mecânica x enzimática	7,07	1	$P < 0,05$
	local de biopsia	orelha x cauda	0,5	1	ns
	tipo de frasco	Desc. x Corn. x Cost.	4,2	2	ns
	meio de cultivo	MEM-Eagle x Ham-F10	0,2	1	ns

observado nas contaminações após o crescimento. No primeiro caso, o fungo apareceu associado a um fragmento de tecido com pelos, e não disperso pelo frasco, como no segundo caso.

2. Desenvolvimento das Culturas

As observações diárias das culturas mostraram que o crescimento ou proliferação celular iniciou-se entre o quarto e oitavo dia após a montagem da cultura. Em alguns casos, as células que inicialmente cresceram sob aspecto epitelial, a partir das quais surgiram as células fibroblásticas (Figura 1);

relação às culturas que aderiram ao substrato, embora a frequência de crescimento tenha decrescido dos frascos marcas Corning e Costar para o Descarplast, a diferença não foi significativa. Outra constatação é que ambos os meios utilizados, ou seja, Ham-F10 e MEM-Eagle, foram igualmente suficientes para propiciar e manter o crescimento das células in vitro, nas condições de enriquecimento utilizadas.

A observação das frequências de adesão e crescimento das diferentes espécies mostrou, ainda, que as células das espécies *E. perotis* e *M. temminckii* foram as que apresentaram maiores dificuldades para o cultivo in vitro.

Em relação às contaminações, deve-se destacar duas categorias, que se referem ao período de sua ocorrência: antes ou depois da proliferação celular. As contaminações que ocorreram antes do crescimento se caracterizavam por manifestação entre o 3º e 5º dia após a montagem da cultura. Esse tipo de contaminação foi decorrente, provavelmente, da presença de contaminantes na amostra após assepsia inadequada, ou da utilização de materiais não assépticos e do manuseio inadequado durante a montagem da cultura. As contaminações que ocorreram após o crescimento celular eram de origem exógena ao material, ou seja, eram provavelmente decorrentes de problemas ambientais, referentes à assepsia inadequada das câmaras de fluxo laminar onde as culturas eram manipuladas, e a problemas na esterilização de vidrarias ou soluções.

Os contaminantes foram fungos ou bactérias, sem prevalência de qualquer dos tipos. Nos casos de contaminação por fungo antes do crescimento, esse era de um tipo diferente do observado nas contaminações após o crescimento. No primeiro caso, o fungo apareceu associado a um fragmento de tecido com pelos, e não disperso pelo frasco, como no segundo caso.

2. Desenvolvimento das Culturas

As observações diárias das culturas mostraram que o crescimento ou proliferação celular iniciou-se entre o quarto e oitavo dia após a montagem da cultura. Em alguns casos, as células que inicialmente cresceram do explante possuíam aspecto epitelióide, a partir das quais surgiram as células fibroblastóides (Figura 1),



que davam origem, posteriormente, à cultura em monocamada (Figura 2. A). As células multiplicaram-se bem em pH ligeiramente ácido (pH 6,5 a 7,0).

Algumas amostras de *Eumops glaucinus* e *E. perotis* apresentaram apenas a proliferação inicial de células epitelióides, seguida pelo estacionamento da proliferação, sem o aparecimento posterior de fibroblastos.

A taxa de proliferação dos fibroblastos de morcegos foi elevada e, frequentemente, após cinco ou seis repiques, ou seja, em um período de cerca de 40 dias após o início do crescimento, já se observou a presença de células senescentes, caracterizadas pela forma estrelada, ocorrência de vacuolização do citoplasma e aparecimento de grânulos ao redor do núcleo (Figura 2. B).

A fim de verificar o efeito da densidade de células à sementeira na taxa de proliferação, seis ensaios foram feitos, envolvendo três amostras de uma cultura do espécime CFC156. Os ensaios compreenderam variações apenas no número de células/ml de meio de cultura na sementeira de novos repiques. Os resultados são apresentados na Tabela 6 e apontaram que concentrações em torno de $1,6 \times 10^4$ a $1,0 \times 10^5$ células/ml são boas para a iniciação de novas réplicas, de tal modo que após cerca de 4 a 7 dias podem ser colhidas e utilizadas para análise, enquanto que culturas semeadas com densidade em torno de $2,5$ ou 5×10^3 células/ml não são indicadas para a obtenção de material suficiente para análises posteriores.

Figura 2. Aspecto das células fibroblásticas. A) Crescendo em monocamada; B) Em fase de senescência.

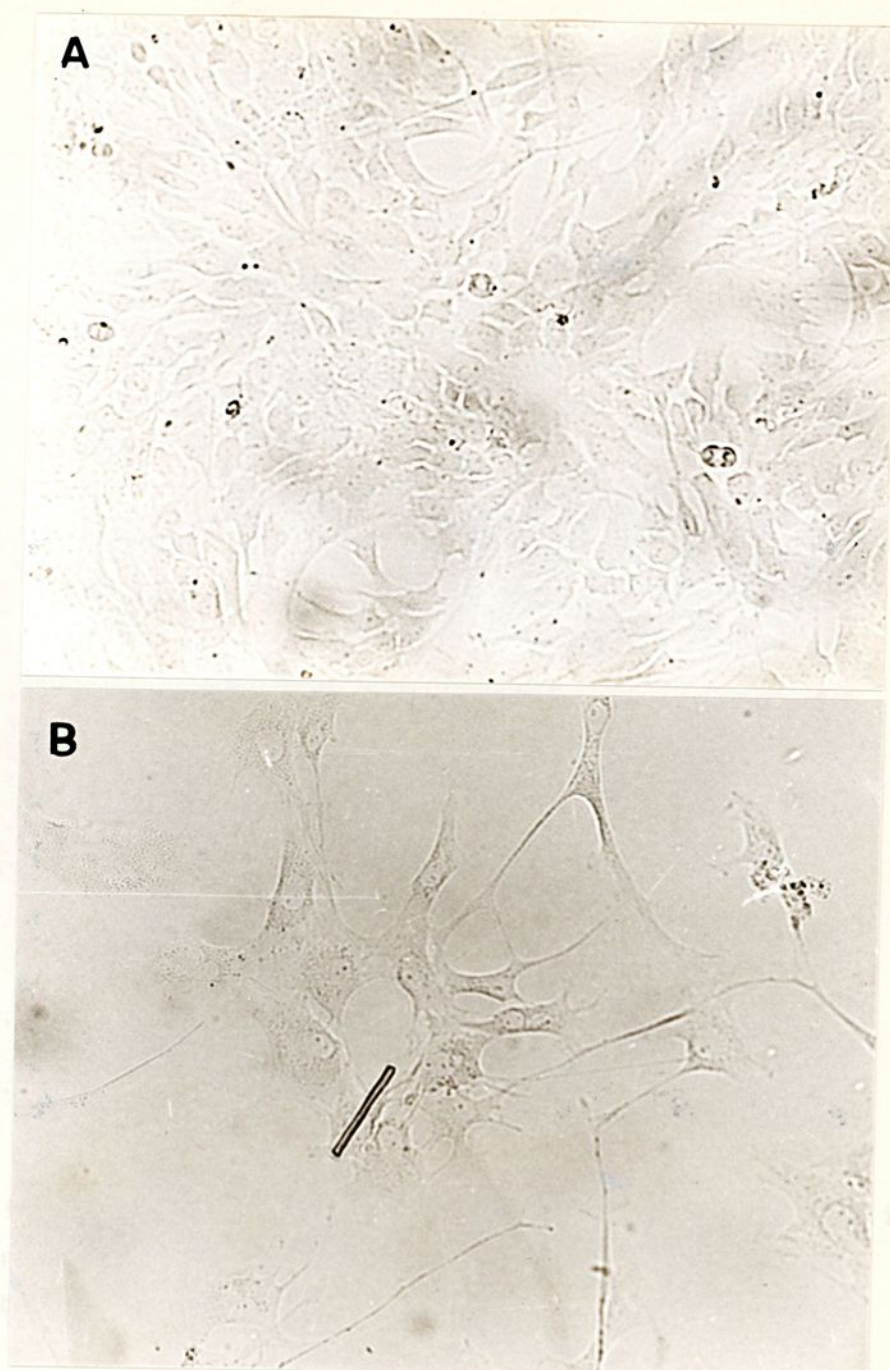


Figura 2. Aspecto das células fibroblastóides. A: Crescendo em monocamada; B: Em fase de senescência.

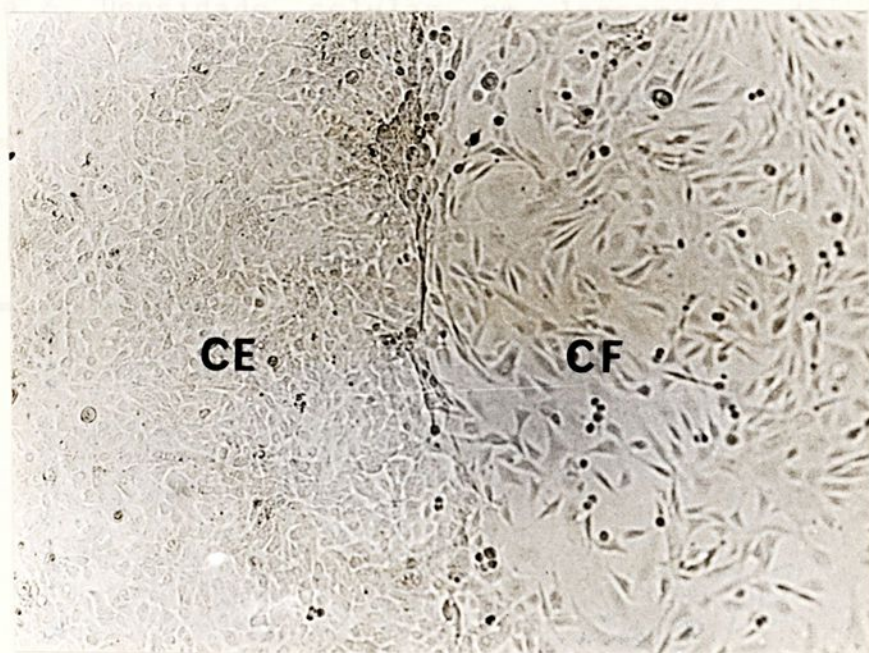


Figura 1. Diferenciação dos tipos celulares que proliferam do explante. Células epitelióides (CE) e Células fibroblastóides (CF).

3. Ensaios sobre congelamento celular

Tabela 6. Densidade celular em lançamentos de células nos repiques.

Ensaio	Amostra	Nº de células/ml de meio	Tempo de obser- vação (dias)	Confluência (%)
1	CFC156-3	$1,62 \times 10^4$	07	70
2	CFC156-3	$3,24 \times 10^4$	07	70
3	CFC156-3	$5,40 \times 10^4$	07	70
4	CFC156-3	$1,08 \times 10^5$	04	100
5	CFC156-4	$2,50 \times 10^3$	28	70
6	CFC156-4	$5,0 \times 10^3$	28	70

3. Ensaio sobre congelamento celular

Os resultados dos testes desenvolvidos para verificar quais as melhores condições de congelamento das células, para a preservação mais eficiente das linhagens celulares, são resumidos na Tabela 7. Conforme já descrito, foram testadas variações na densidade celular ao congelamento, no procedimento de congelamento, no tempo de armazenagem e na densidade celular nos novos lançamentos após o descongelamento. A concentração de células contida em cada ampola de congelamento variou de $1,5 \times 10^5$ a $3,4 \times 10^6$ células. O procedimento de congelamento consistiu no congelamento direto das ampolas em nitrogênio líquido nos ensaios 1 e 3; no resfriamento prévio das ampolas a -20°C , seguido de transferência para o botijão de nitrogênio nos ensaios 2, 4, 5 e 11, e no resfriamento prévio a -20°C seguido de congelamento a -180°C e -196°C nos ensaios 6 a 10. O tempo de armazenagem a -196°C variou de 3 a 77 dias e a densidade celular nos novos lançamentos variou de 3×10^3 a $1,5 \times 10^5$ células/ml por frasco.

Os ensaios 5, 8 e 9 não foram informativos, pois após o descongelamento as células estavam mortas. A morte dessas células pode ter ocorrido durante o processo de congelamento ou descongelamento.

O tempo de estocagem parece não ter interferido na viabilidade das células, pois quando as células foram congeladas da mesma forma e estocadas por tempos diferentes, como nos ensaios 6, 7 e 10 (40, 40 e 12 dias, respectivamente) a viabilidade ficou entre 33 e 50%, sendo que a maior taxa de viabilidade foi encontrada no ensaio 7, um dos quais em que o material ficou mais tempo estocado.

O período de estocagem parece também não ter interferido na taxa de proliferação das células, tendo em vista os resultados dos ensaios 6 e 10, nos quais observou-se que concentrações semelhantes de células (ensaio 6 = $1,2 \times 10^5$ células/ml, ensaio 10 = $1,1 \times 10^5$ células/ml), quando estocadas por tempos diferentes no nitrogênio líquido (40 e 12 dias respectivamente), apresentaram uma taxa de proliferação semelhante, alcançando 100% de confluência entre 2 e 9 dias. Os ensaios 7 e 10, embora com densidades celulares diferentes ($6,2 \times 10^4$ e $1,5 \times 10^5$ células/ml), porém



Tabela 7. Densidade celular das culturas congeladas e condições de congelamento aplicadas a cada ensaio. SC= sem crescimento; C= contaminação.

Ensaio	Amostra	Estimativa do nº de células vivas			Temperatura (°C)			Tempo de estocagem (dias)	Viabilidade (%)	Tempo de observação (dias)	Confluência (%)
		por ampola (1,5 ml)	após descongelamento	por ml/frasco após lançamento	-20	-180	-196				
1	CFC98-1	$1,5 \times 10^5$	$1,5 \times 10^4$	$3,0 \times 10^3$			+	14	10,0	40	35
2	CFC98-2	$1,8 \times 10^5$	$2,0 \times 10^4$	$4,0 \times 10^3$	+		+	13	11,0	30	70
3	CFC98-3	$1,7 \times 10^5$	$1,5 \times 10^4$	$3,0 \times 10^3$			+	12	8,8	C	
4		$1,7 \times 10^5$	$2,0 \times 10^4$	$4,0 \times 10^3$	+		+	12	12,0	23	70
5	CFC110-1 CFC110-2	$2,0 \times 10^5$			+		+	08	0,0	SC	
6	CFC125-1 CFC125-2	$1,8 \times 10^6$	$6,1 \times 10^5$	$1,2 \times 10^5$	+	+	+	40	33,0	02	100
7	CFC125-3 CFC125-4	$6,2 \times 10^5$	$3,1 \times 10^5$	$6,2 \times 10^4$	+	+	+	40	50,0	05	100
8	CFC128-1 CFC128-2	$1,0 \times 10^6$			+	+	+	77	0,0	SC	
9	CFC129-1	$1,7 \times 10^5$			+	+	+	77	0,0	SC	
10	CFC140-1 CFC140-2	$3,4 \times 10^6$	$1,1 \times 10^6$	$1,1 \times 10^5$	+	+	+	12	36,0	09	100
11	CFC156-1 CFC156-2	$1,5 \times 10^6$	$7,6 \times 10^5$	$1,5 \times 10^5$	+		+	3	50,0	04	100

congelados da mesma forma e estocados por tempos diferentes (40 e 12 dias, respectivamente), também alcançaram uma taxa de proliferação semelhante, atingindo 100% de confluência em 5 e 9 dias, respectivamente.

Os três processos de congelamento foram eficazes, ou seja, quando as células dos ensaios 1, 2, 4, 6, 7, 10 e 11 foram descongeladas, elas foram capazes de reconstituir a cultura. No entanto, os dois procedimentos que envolveram o congelamento moderado (-20°C e -196°C nos ensaios 2, 4 e 11, e -20°C , -180°C e -196°C nos ensaios 6, 7 e 10) foram os que resultaram nas maiores frequências de células vivas após descongelamento.

A densidade celular em torno de 3×10^3 células/ml mostrou-se inadequada para o início da cultura, pois as células do ensaio 1 não conseguiram ocupar um terço da superfície de 25 cm^2 do frasco, isto é, atingir cerca de 35% de confluência, nos 40 dias de observação.

As suspensões celulares com densidade em torno de 4×10^3 células/ml foram capazes de reproduzir uma cultura, proliferando e ocupando cerca de dois terços (70% de confluência) da superfície de crescimento, em até 30 dias após o lançamento. As observações diárias mostraram que essas culturas apresentaram, logo após o lançamento (3 a 4 dias), um número relativamente bom de metáfases, que diminuiu com o decorrer dos dias. Por outro lado, as suspensões celulares com valores em torno de $6,2 \times 10^4$ a $1,5 \times 10^5$ células/ml mostraram-se melhores para iniciar uma cultura, forrando a superfície de crescimento do frasco, ou seja, atingindo confluência total, em 2 a 9 dias após o lançamento (ensaios 6, 7, 10 e 11).

Em relação à espécie *E. bonariensis*, as preparações de células foram feitas a partir de culturas em frascos de 25 cm^2 e de 75 cm^2 . As células foram coletadas por meio de lavagem com solução fisiológica e centrifugação em 4°C por 5 minutos. O material foi então ressuspenso em solução fisiológica e utilizado para a preparação de lâminas citogenéticas.

Em relação à espécie *E. bonariensis*, as preparações de células foram feitas a partir de culturas em frascos de 25 cm^2 e de 75 cm^2 . As células foram coletadas por meio de lavagem com solução fisiológica e centrifugação em 4°C por 5 minutos. O material foi então ressuspenso em solução fisiológica e utilizado para a preparação de lâminas citogenéticas.



B. Estudo Citogenético em Molossídeos

1. Descrição dos Cariótipos das Espécies Analisadas

Os molossídeos que ocorrem no Brasil pertencem aos gêneros *Eumops*, *Molossops*, *Molossus*, *Nyctinomops*, *Promops* e *Tadarida*. Os animais dos gêneros *Eumops*, *Molossus*, *Nyctinomops*, *Promops* e *Tadarida* apresentam, como característica morfológica comum, as orelhas unidas em suas bordas internas por uma faixa membranosa, o que os diferencia dos animais do gênero *Molossops*, que apresentam as orelhas com bordas internas distintamente separadas. *Tadarida* e *Nyctinomops* são facilmente distinguidos dos demais por possuírem o bordo do lábio superior vincado com sulcos profundos. Essas e outras características morfológicas, como coloração, comprimento da cauda, forma e tamanho do trago e antitrigo, fórmula dentária e estrutura dos dentes, e medidas externas e cranianas vão, em conjunto, diferenciar as espécies dentro de cada um dos gêneros, evidenciando uma ampla variação que nem sempre é observada nos padrões cromossômicos analisados para algumas espécies.

A Tabela 8 apresenta a classificação dos 32 espécimes utilizados para essa análise e as informações em relação às técnicas citogenéticas empregadas.

A espécie *Eumops auripendulus* possui tamanho intermediário (antebraço: $an = 58-63$ mm) em relação às demais espécies de *Eumops* e apresenta uma pelagem marcante pela sua coloração negra pardacenta dorso-ventralmente (VIZOTTO & TADDEI, 1973). O cariótipo de *E. auripendulus*, analisado a partir de células da medula óssea de um exemplar macho e ilustrado na Figura 3, possui número diplóide de cromossomos igual a 42 ($2n=42$) e número fundamental igual a 62 ($NF=62$). Constitui-se de nove pares de cromossomos metacêntricos e submetacêntricos grandes ou médios (1 a 4, 6 e 7, 9 a 11), dois pares de subtelocêntricos médios (5 e 8), sendo o maior portador de uma constrição secundária e satélites nos braços curtos, e nove pares de acrocêntricos médios ou pequenos (12 a 20). O cromossomo X é um submetacêntrico médio e o Y um acrocêntrico pequeno.

Em relação à espécie *E. bonariensis*, as preparações de medula óssea e das biopsias não forneceram material adequado para análise citogenética.



Tabela 8. Informações sobre os espécimes de molossídeos estudados em relação a classificação taxonômica, sexo e técnicas citogenéticas empregadas. M= macho; F= fêmea.

Espécie	Número de exemplares	Sexo	Técnica utilizada (*)
<i>Eumops auripendulus</i>	1	M	A
<i>Eumops glaucinus</i>	4	3M, 1F	A, B, C e D
<i>Eumops perotis</i>	3	2M, 1F	A, B, C e D
<i>Molossops abrasus</i>	1	F	A, B, C e D
<i>Molossops temminckii</i>	2	1M, 1F	A, B, C e D
<i>Molossus ater</i>	10	5M, 5F	A, B, C, D e E
<i>Molossus molossus</i>	10	5M, 5F	A, B, C, D e E
<i>Nyctinomops laticaudatus</i>	1	M	A, B, C e D

(*) A= coloração usual; B= bandamento GTG; C= bandamento CBG; D= bandamento NSG e E= bandamento RBG.

A espécie *Eumops glaucinus*, também de tamanho intermediário (ap= 57 - 61 mm), diferencia-se morfológicamente de *E. auripendulus* com relação ao tamanho e forma do crânio (condições de desenvolvimento do cérebro na entrada na orelha), e dos dentes pré-molares, e possui a coloração do pelo verde-acinzentado. A análise cromossômica realizada em quatro espécimes (três machos e uma fêmea) revelou $2n=42$ e $NF=62$. Seu cariótipo constitui-se de doze pares de cromossomos metacêntricos e submetacêntricos com tamanhos variáveis de grandes a médios (1 a 12), um par de submetacêntricos médios (13 e 15) e dezesseis pares de acrocêntricos médios e pequenos (14 e 19). O cromossomo X é um submetacêntrico de tamanho médio e o Y um acrocêntrico pequeno. Nessa espécie as RDNs localizam-se na região proximal do braço longo do cromossomo acrocêntrico 3, no local da constrição secundária (Figura 3.B), que apresenta heteromorfismo de tamanho.



Figura 3. Cariótipo usual de *Eumops auripendulus* ($2n = 42$; $NF = 62$). Barra = 5 μ m.

grupos de submetacêntricos médios (2, 4 e 7), dois pares de submetacêntricos médios (13 e 15) e dezesseis pares de acrocêntricos médios e pequenos (3, 5 e 6, 8 e 12, 14 e 19). O cromossomo X é um submetacêntrico de tamanho médio e o Y um acrocêntrico pequeno. Nessa espécie as RDNs localizam-se na região proximal do braço longo do cromossomo acrocêntrico 3, no local da constrição secundária (Figura 3.B), que apresenta heteromorfismo de tamanho.

O padrão de bandas G do *E. perotis* é apresentado na Figura 7.A e a distribuição de heteromorfismos constitutivos, que aparece somente nas regiões centroméricas dos cromossomos, é ilustrada na Figura 7.B.

A espécie *Eumops glaucinus*, também de tamanho intermediário (an= 57 - 61 mm), diferencia-se morfológicamente de *E. auripendulus* com relação ao tamanho e forma do trago (apêndice membranoso, ereto, disposto na entrada do conduto auditivo), e dos dentes pré-molares, e possui a coloração do pelo parda-acinzentada, mais clara na região ventral (VIZOTTO & TADDEI, 1973). A análise cromossômica realizada em quatro espécimes (três machos e uma fêmea) revelou $2n=40$ e $NF=64$. Seu cariótipo constitui-se de doze pares de cromossomos metacêntricos e submetacêntricos com tamanhos variáveis de grandes a médios (1 a 12), um par de subtelocêntricos médios (13) e seis pares de acrocêntricos médios a pequenos (14 a 19). O cromossomo X é um submetacêntrico de tamanho médio e o Y é um acrocêntrico pequeno (Figura 4.A). As regiões organizadoras de nucléolos (RONS) localizam-se nos braços curtos dos pares de submetacêntricos 7, 8 e 9 e também no telômero do braço longo do menor par de acrocêntricos (Figura 4.B).

O padrão de bandas G de *Eumops glaucinus* é mostrado na Figura 5.A. A heterocromatina constitutiva, evidenciada pela banda C, aparece nas regiões centroméricas de todos os cromossomos, nas regiões pericentroméricas e braços curtos dos pares 7, 8, 9 e 10 e no braço longo do cromossomo Y (Figura 5.B).

Os morcegos de maior tamanho entre os molossídeos (an=74 - 80 mm) pertencem à espécie *Eumops perotis* (VIZOTTO & TADDEI, 1973). A análise cromossômica em três exemplares (2 machos e 1 fêmea) revelou que o cariótipo dessa espécie, apresentado na Figura 6.A, possui $2n=48$ e $NF=58$. Constitui-se por um par de cromossomos submetacêntricos muito grandes (1), três pares de submetacêntricos médios (2, 4 e 7), dois pares de subtelocêntricos médios (13 e 15) e dezessete pares de acrocêntricos médios a pequenos (3, 5 e 6, 8 a 12, 14 a 23). O cromossomo X é um submetacêntrico de tamanho médio e o Y um acrocêntrico pequeno. Nessa espécie as RONS localizam-se na região proximal do braço longo do cromossomo acrocêntrico 5, no local da constrição secundária (Figura 6.B), que apresenta heteromorfismo de tamanho.

O padrão de bandas G de *E. perotis* é apresentado na Figura 7.A e a distribuição da heterocromatina constitutiva, que aparece somente nas regiões centroméricas dos cromossomos, é ilustrada na Figura 7.B.



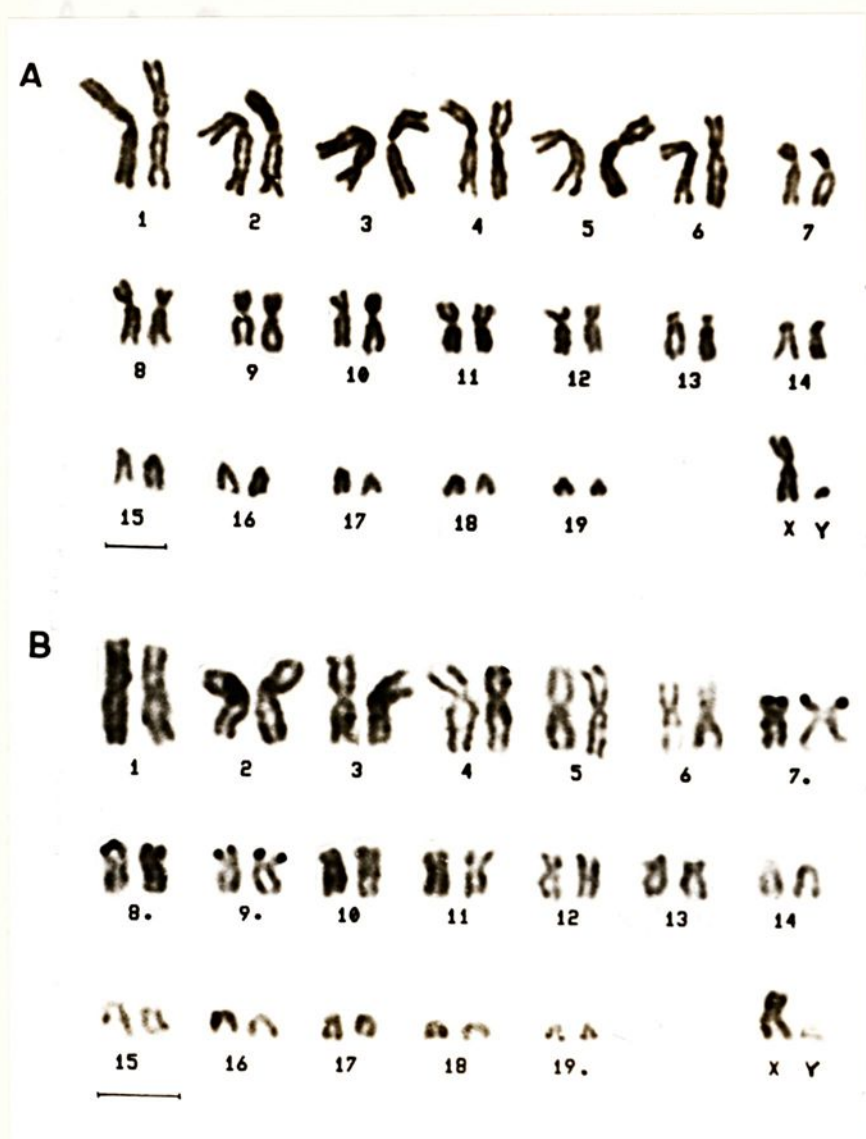


Figura 4. Cariótipo de *Eumops glaucinus* (2n = 40; NF = 64). A: Em coloração usual; B: Com a localização das RONS (assinalados com asterisco). Barra = 5µm.

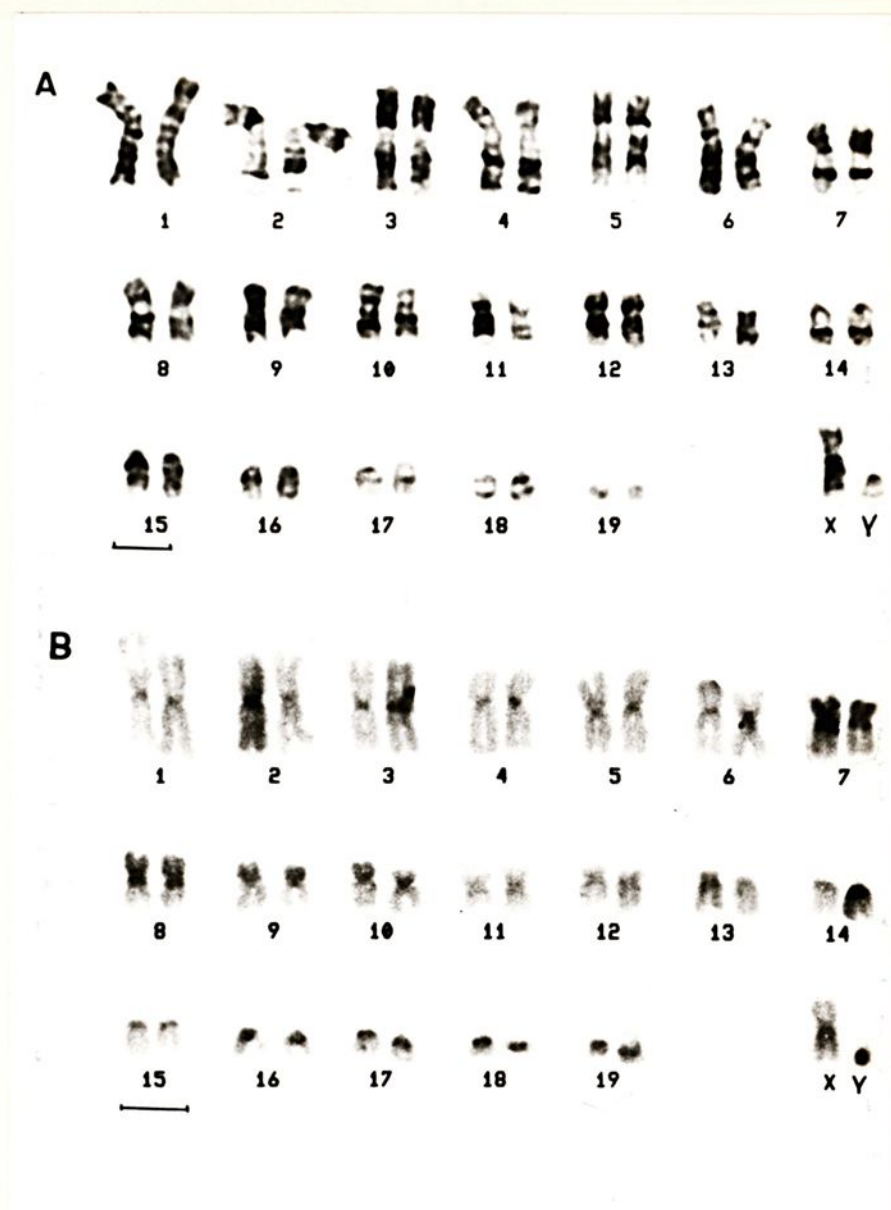


Figura 5. Cariótipo de *E. glaucinus*. A: Com bandas G; B: Com bandas C. Barra = 5µm.

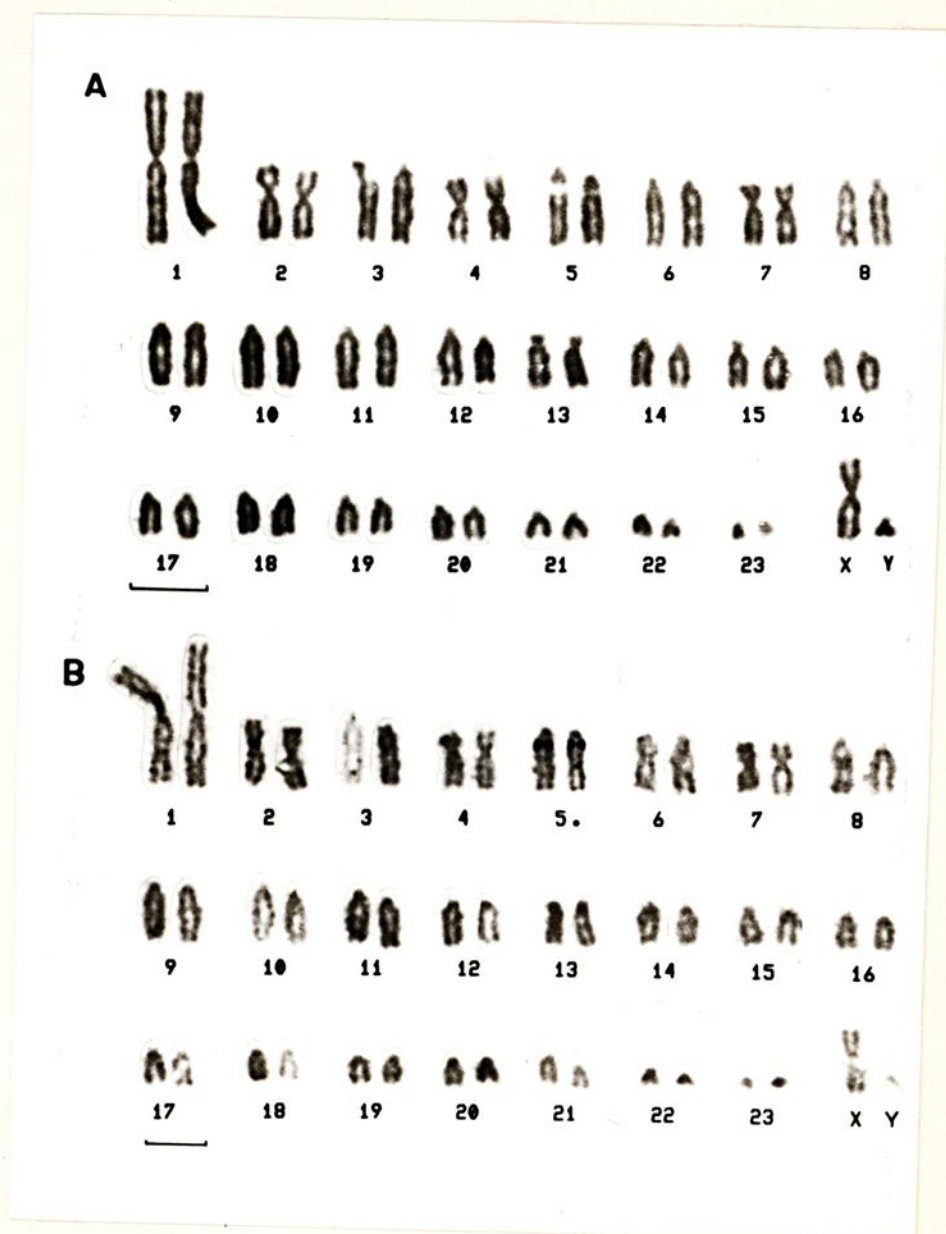
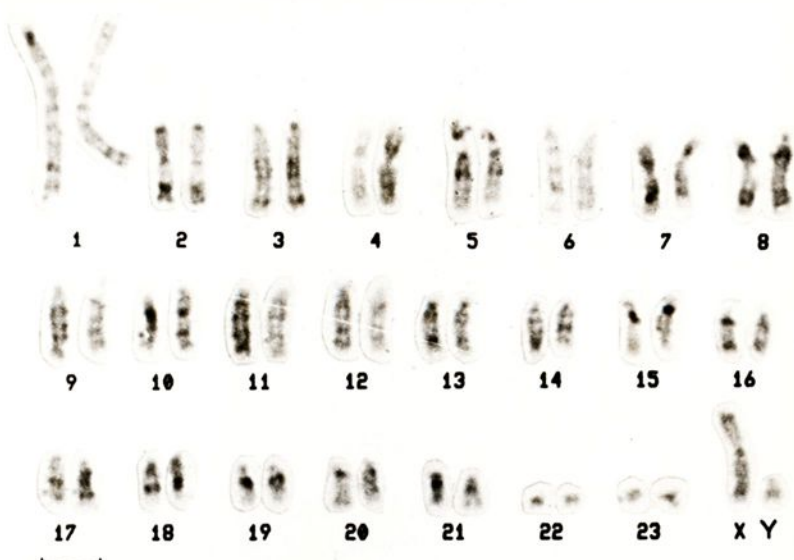


Figura 6. Cariótipo de *Eumops perotis* (2n = 48; NF = 58). A: Em coloração usual; B: Com a localização das RONS (assinalados com asterisco). Barra = 5µm.

A



B

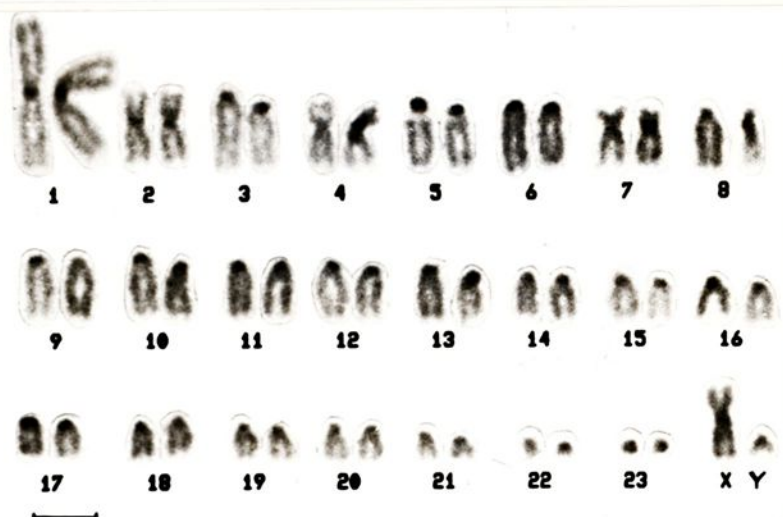


Figura 7. Cariótipo de *E. perotis*. A: Com bandas G, B: Com bandas C. maior par Barra = 5µm. (10 par 4). As constrições secundárias do braço curto do par 5 e do extremo do braço curto do par 8 (Figura 10.B).

O padrão de bandas G de *M. temminckii* é apresentado na Figura 11.A. A heterocromatina constitutiva é centromérica e aparece também no braço curto do par 10 (Figura 11.B).

Em relação ao gênero *Molossops*, a espécie *M. abrasus* é a que apresenta maior tamanho ($an = 43,5 - 46$ mm) (VIZOTTO & TADDEI, 1973). Sua constituição cromossômica caracteriza-se por $2n=34$ e $NF=64$, havendo dez pares de cromossomos metacêntricos e submetacêntricos de tamanhos variados de grandes a médios (1 a 7, 9 a 13), um par de subtelocêntricos grandes (8), três pares de subtelocêntricos médios (11, 12 e 14) e dois pares de subtelocêntricos pequenos (15 e 16). O cromossomo X é provavelmente um submetacêntrico médio e o cromossomo Y não pode ser identificado pois o único exemplar analisado era fêmea (Figura 8.A). As RONS estão localizadas nas extremidades dos braços curtos dos três pares de subtelocêntricos médios (11, 12, 14) e dos dois pares de subtelocêntricos pequenos (15 e 16) (Figura 8.B).

A Figura 9.A apresenta o padrão de bandas G de *M. abrasus* e o padrão de bandas C, encontrado na Figura 9.B, revelou que a heterocromatina constitutiva distribui-se na região centromérica de todos os cromossomos e no telômero do braço curto do par 15 de subtelocêntricos.

A espécie *M. temminckii* guarda a característica de menor tamanho entre as espécies de *Molossops* e seu cariótipo é bem diferente do de seu congênere *M. abrasus*. A análise cromossômica em dois exemplares (1 macho e 1 fêmea) dessa espécie mostrou que ela possui $2n=48$ e $NF=64$ (Figura 10.A), e o cariótipo é constituído por um par de cromossomos submetacêntricos grandes (1), dois pares de submetacêntricos médios (2 e 7), três pares de subtelocêntricos médios (8, 10, 11), um par de subtelocêntricos pequenos (20) e dezesseis pares de acrocêntricos médios a pequenos (3 a 6, 9, 12 a 19, 21 a 23). O cromossomo X é um subtelocêntrico médio e o Y um subtelocêntrico pequeno. As RONS estão localizadas em três pares de cromossomos subtelocêntricos: nas extremidades dos braços curtos do maior par de subtelocêntricos (o par 4), na constricção secundária do braço curto do par 5 e na extremidade do braço curto do par 8 (Figura 10.B).

O padrão de bandas G de *M. temminckii* é apresentado na Figura 11.A. A heterocromatina constitutiva é centromérica e aparece também no braço curto do par 10 (Figura 11.B).



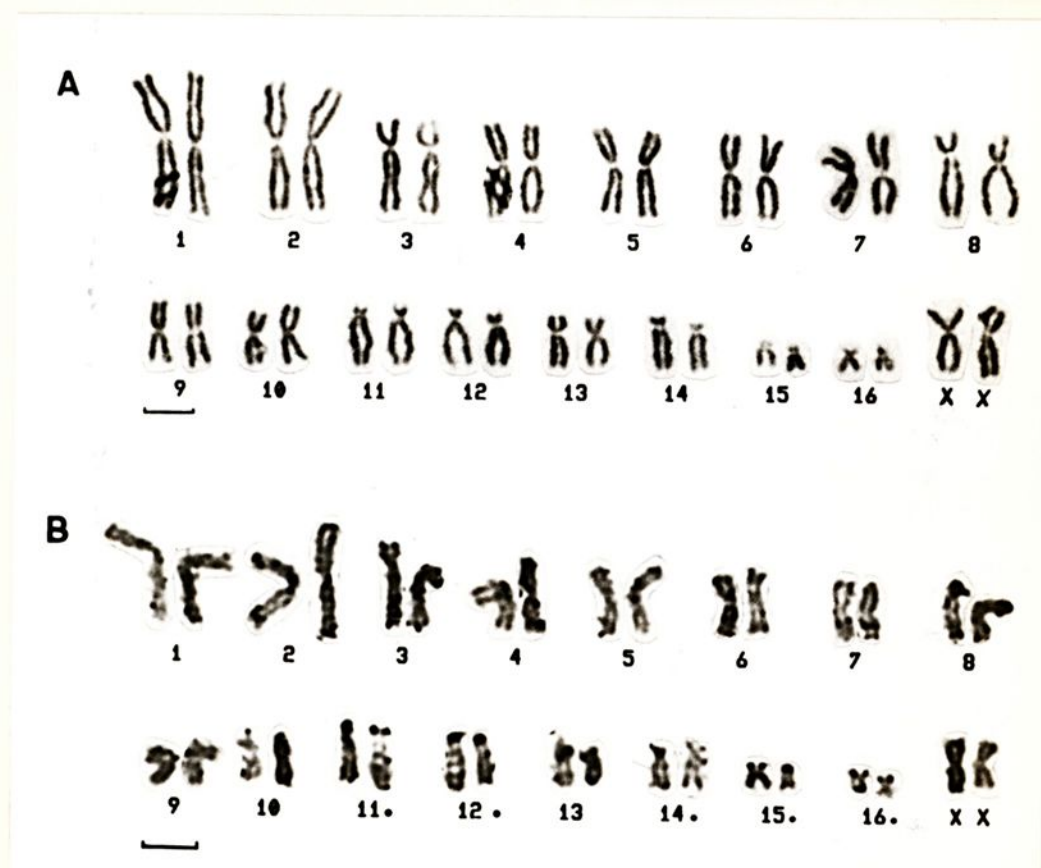


Figura 8. Cariótipo usual de *Molossops abrasus* ($2n = 34$, NF = 64).
 A: Em coloração usual. B: Com a localização das RONS
 (assinalados com asterisco). Barra = 5 μ m..



Figura 9. Cariótipo de *M. abrasus*. A: Com bandas G, B: Com bandas C. Barra = 5μm.



Figura 10. Cariótipo de *Molossops temminckii* ($2n = 48$; $NE = 64$). A: Em coloração usual; B: com a localização das RONS (assinalados com asterisco). Barra = 5μm.

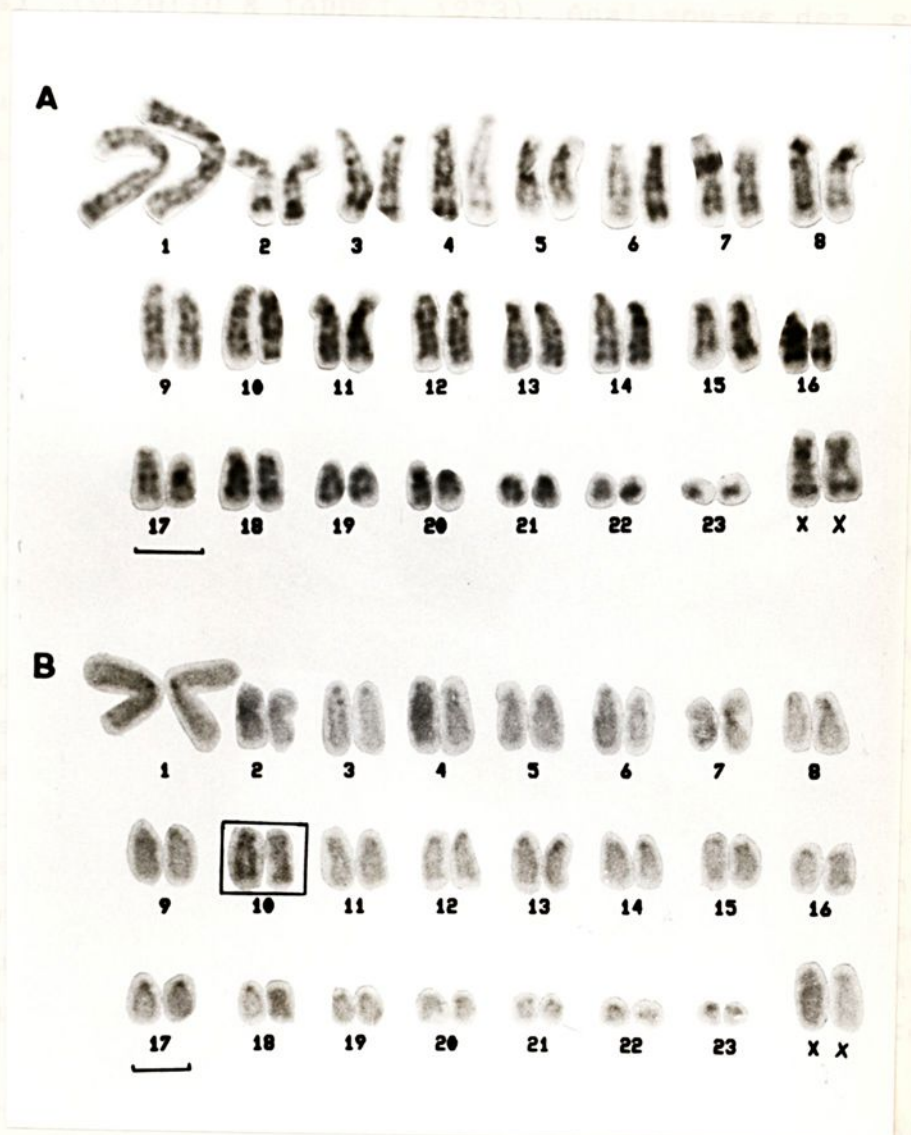


Figura 11. Cariótipo de *M. temminckii*. A: Com bandas G; B: Com bandas C. Para melhor visualização das bandas do par cromossômico 10, usou-se nesta foto cromossomos de outra metáfase, apresentados em destaque. Barra = 5 μm.

As duas espécies do gênero *Molossus* analisadas, *Molossus ater* e *Molossus molossus*, são semelhantes morfológicamente e diferem das do gênero *Eumops* quanto ao número de dentes incisivos. A espécie *M. ater* é de maior tamanho ($an=47 - 52,5$ mm e $an=34 - 41$ mm para *M. molossus*) (VIZOTTO & TADDEI, 1973). Analisou-se dez exemplares dessa espécie (5 machos e 5 fêmeas). A Figura 12.A mostra o cariótipo usual de *M. ater* ($2n=48$ e $NF=64$), que se constitui de um par de submetacêntricos muito grandes (1), três pares de submetacêntricos médios (2, 4 e 7), cinco pares de subtelocêntricos variando em tamanho de médios a pequenos (8, 10, 13, 17 e 20) e quatorze pares de acrocêntricos, também variando em tamanho de médios a pequenos (3, 5, 6, 9, 11, 12, 14 a 16, 18, 19, 21 a 23). O cromossomo X é um submetacêntrico de tamanho médio e o Y um subtelocêntrico pequeno. Nessa espécie as RONS localizam-se na constrição secundária do braço longo do segundo maior par de acrocêntricos, o número 5 (Figura 12.B), que similarmente ao par 5 de *E. perotis* também apresenta heteromorfismo de tamanho.

O padrão de bandas G é apresentado na Figura 13.A e o seu reverso (bandas R) na Figura 13.B. A heterocromatina constitutiva em *M. ater* distribui-se apenas nas regiões centroméricas de todos os cromossomos e no braço longo do cromossomo Y (Figura 14).

O cariótipo de *Molossus molossus* foi analisado a partir de células de dez espécimes (5 machos e 5 fêmeas) e, à semelhança ao de *M. ater*, apresenta $2n=48$ e $NF=64$. Seu cariótipo constitui-se por um par de submetacêntricos muito grandes (1), três pares de submetacêntricos médios (2, 4 e 7), cinco pares de subtelocêntricos variando em tamanho de médios a pequenos (8, 10, 13, 17 e 20), e quatorze pares de acrocêntricos médios ou pequenos (3, 5, 6, 9, 11, 12, 14 a 16, 18, 19, 21 a 23). O cromossomo X é um submetacêntrico médio (Figura 15.A) e o Y um subtelocêntrico pequeno (Figura 16). As RONS estão localizadas na constrição secundária do braço longo do par de acrocêntricos 5, no local da constrição secundária (Figura 15.B), também com heteromorfismo de tamanho.

O padrão de bandas G e R de *M. molossus* é semelhante ao de *M. ater* (Figura 16.A e 17), assim como a heterocromatina constitutiva que é restrita às regiões centroméricas de todos os cromossomos e ao braço longo do cromossomo Y (Figura 16.B).

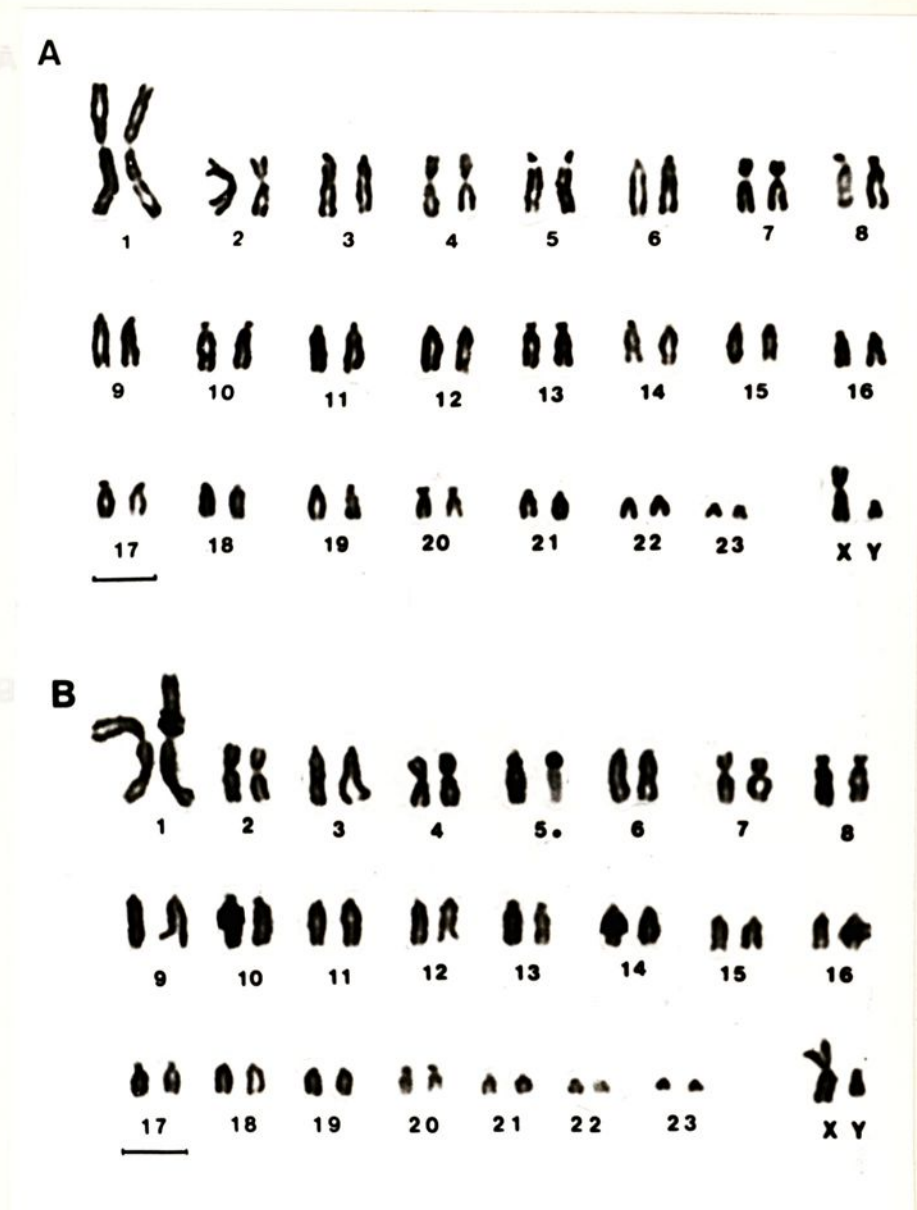


Figura 12. Cariótipo de *Molossus ater* ($2n = 48$; $NF = 64$). A: Em coloração usual; B: Com a localização das RONS (assinalados com asterisco). Barra = 5 μ m.

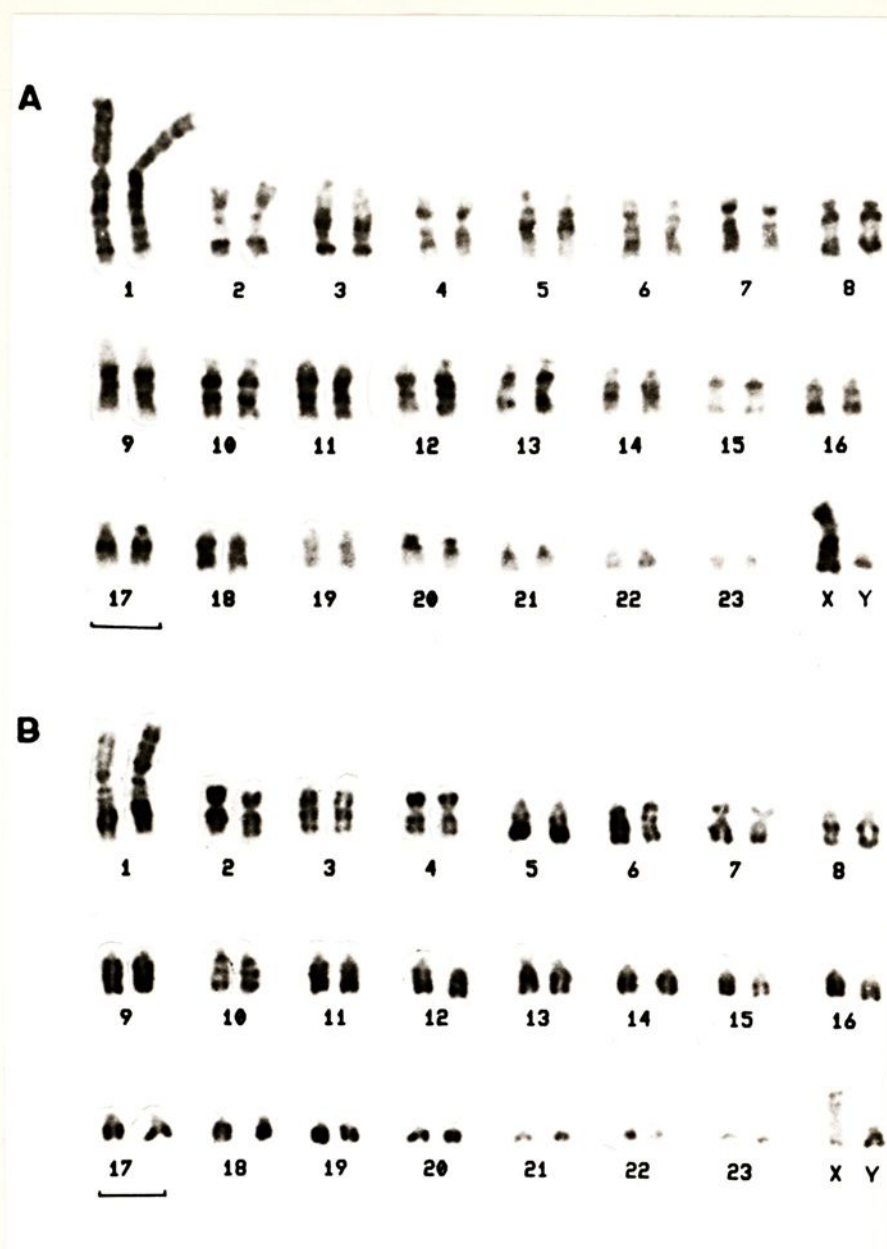


Figura 13. Cariótipo de *M. ater*. A: Com bandas G; B: Com bandas R.
Barra = 5µm.

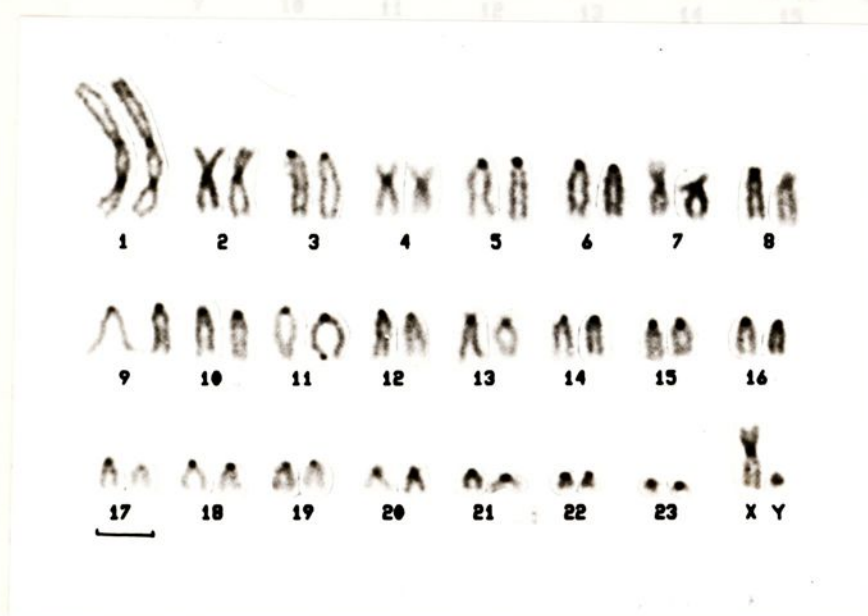


Figura 14. Cariótipo de *M. ater* com bandas C.
Barra = 5µm.

Figura 15. Cariótipo de *Molossus molossus* (2n = 42; 18 = 64). A) Em
bandas C, B) Com a localização das RDNs
correspondentes (em asterisco). Barra = 5µm.

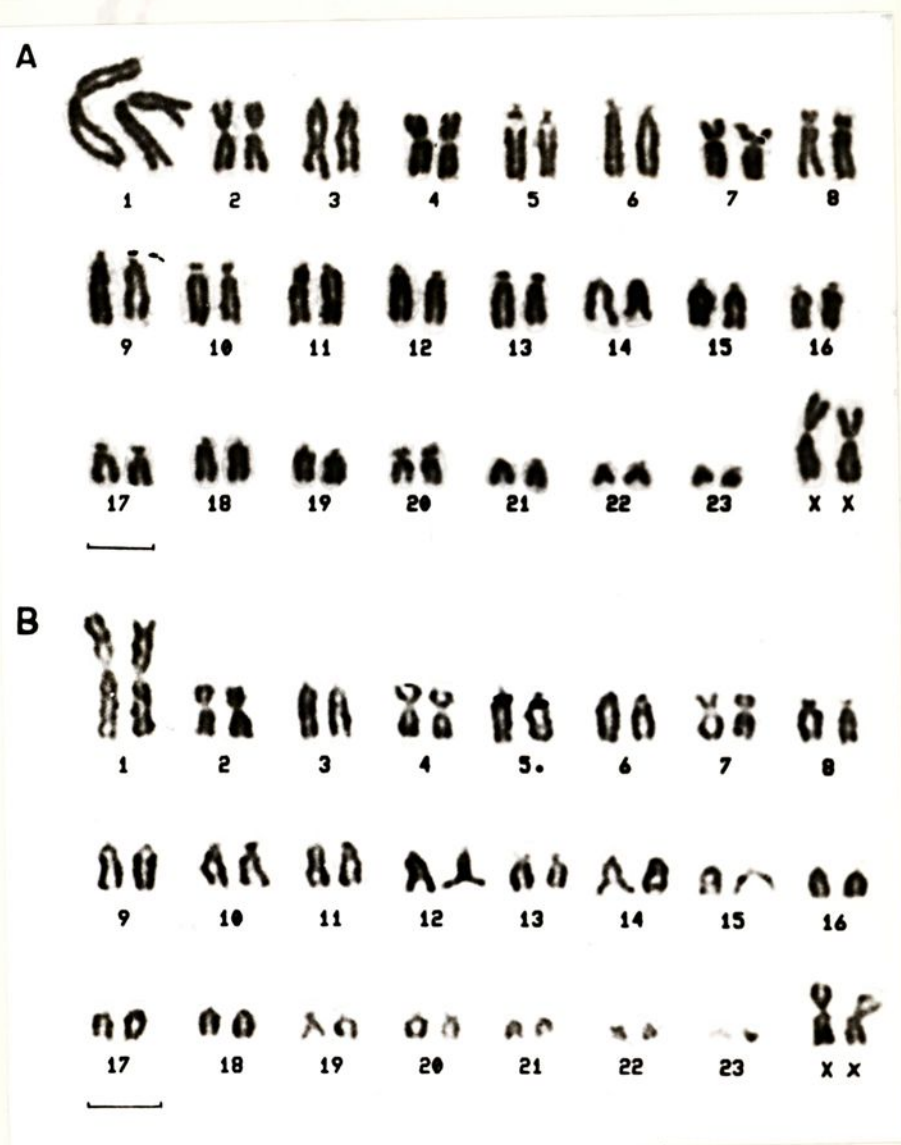


Figura 15. Cariótipo de *Molossus molossus* (2n = 48; NF = 64). A: Em coloração usual; B: Com a localização das RONS (assinalados com asterisco). Barra = 5µm.

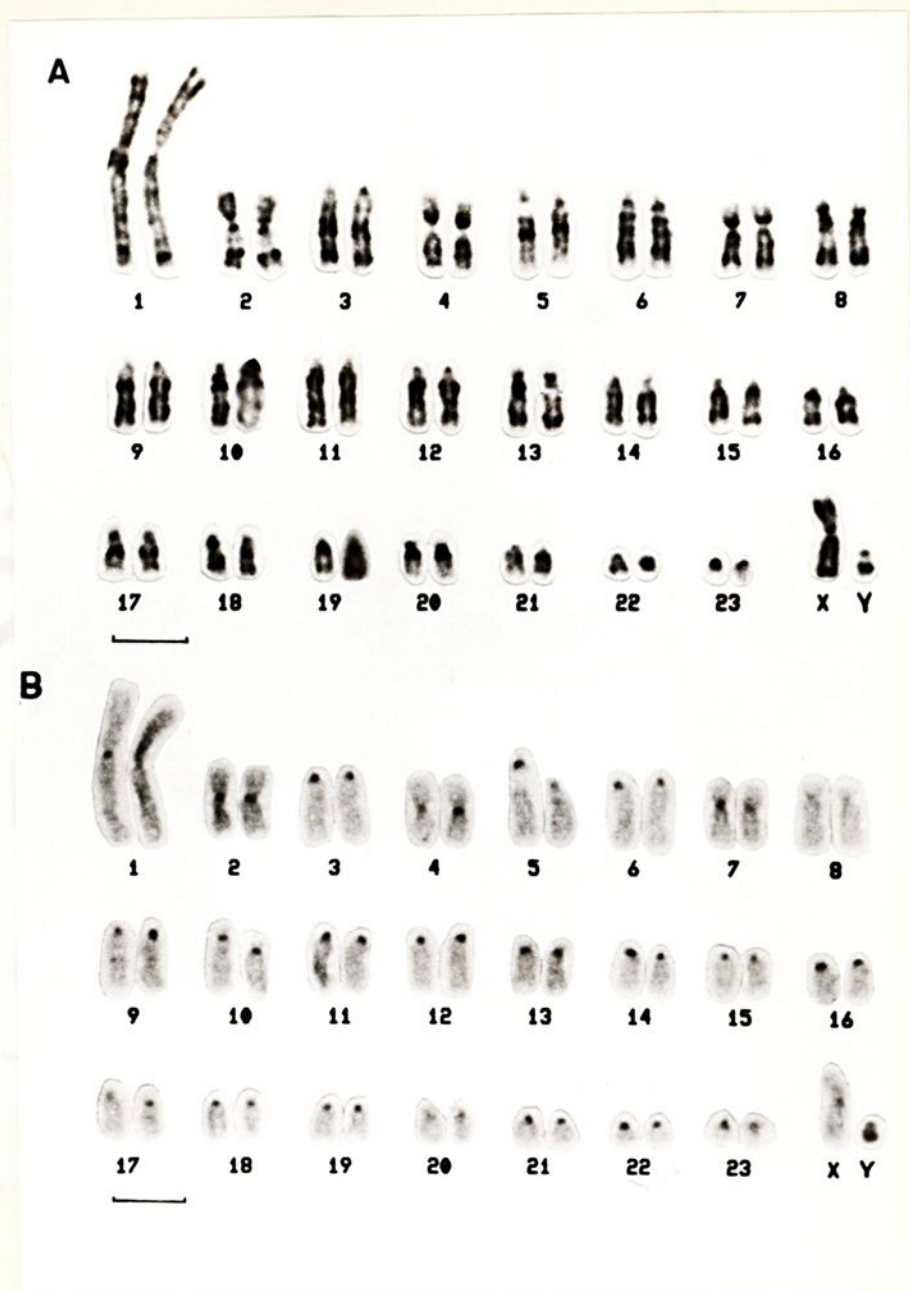


Figura 16. Cariótipo de *M. molossus*. A: Com bandas G; B: Com bandas C. Barra = 5μm.

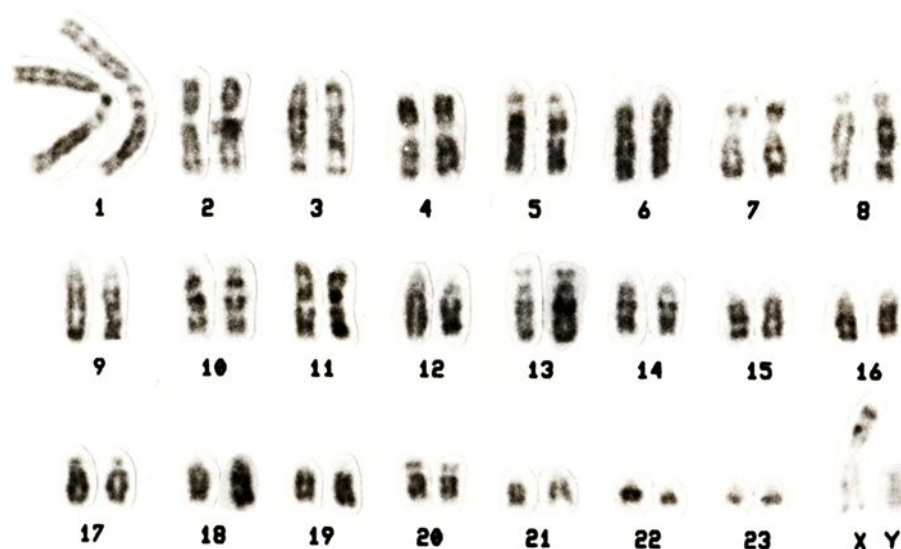


Figura 17. Cariótipo de *M. molossus* com bandas R.
Barra = 5 μ m.

B. Identificação de Homologias Cromossômicas

As análises de homologia cromossômica foram realizadas com os padrões de bandas observados para *Tadarida brasiliensis* (KOPPEL et al., 1982), cuja espécie é um dos mais antigos, encontrado inclusive no Velho Mundo, onde provavelmente os molossídeos tiveram sua origem (KOPPEL, 1979). Por isso, no presente trabalho utilizou-se o padrão de bandas G de *M. ater* como referência nos estudos comparativos realizados. As homologias identificadas são apresentadas na Tabela 9 e ilustradas nas Figuras 21, 22 e 23.

Outra espécie de *Molossus* analisada, ou seja, *M. molossus*, apresenta um nível de resolução analítico, para o padrão G, inferior ao de *M. ater*, com homologia completa entre todos os seus cromossomos.

Nyctinomops laticaudatus assemelha-se em tamanho ($an=50mm$) a *M. ater* e é pouco maior que *M. abrasus*. A espécie apresenta uma constituição cromossômica semelhante à de *Molossus*, com $2n=48$ e $NF=64$. Seu cariótipo, obtido a partir de células de medula óssea de um exemplar macho, ilustrado na Figura 18.A, possui um par de cromossomos submetacêntricos grandes (1), três pares de submetacêntricos médios (2, 4 e 7), cinco pares de subtelocêntricos variando de médios a pequenos (8, 10, 13, 17 e 20) e quatorze pares de acrocêntricos variando também de médios a pequenos (3, 5, 6, 9, 11, 12, 14 a 16, 18, 19, 21 a 23). O cromossomo X é um submetacêntrico médio e o Y um acrocêntrico pequeno. As regiões organizadoras de nucléolos localizam-se na extremidade do braço curto do segundo maior par de acrocêntricos ou seja, o par 5 (Figura 18.B).

A Figura 19.A apresenta o padrão de bandas G de *N. laticaudatus* e a distribuição de heterocromatina constitutiva, que é apenas centromérica em todos os cromossomos, é mostrada na Figura 19.B.

O heteromorfismo no tamanho da constrição secundária entre os homólogos do par cromossômico 5 das espécies que o apresentam, ou seja, *E. perotis*, *M. ater* e *M. molossus* pode ser observado na Figura 20, na qual também se observam diferenças no tamanho das RONS marcadas pela técnica de coloração por nitrato de prata.

2. Identificação de Homologias Cromossômicas

O cariótipo de *Molossus* apresenta grande similaridade com os padrões de bandas observados para *Tadarida brasiliensis* (BAKER et al., 1982), cujo gênero é um dos mais antigos, ocorrendo inclusive no Velho Mundo, onde provavelmente os molossídeos tiveram sua origem (KODPMAN, 1970). Por isso, no presente trabalho utilizou-se o padrão de bandas G de *M. ater* como referência nos estudos comparativos realizados. As homologias identificadas são apresentadas na Tabela 9 e ilustradas nas Figuras 21, 22 e 23.

A outra espécie de *Molossus* analisada, ou seja, *M. molossus*, apresentou, ao nível de resolução analisado, padrão de bandas G idêntico ao da espécie *M. ater*, com homologia completa entre todos os seus cromossomos.

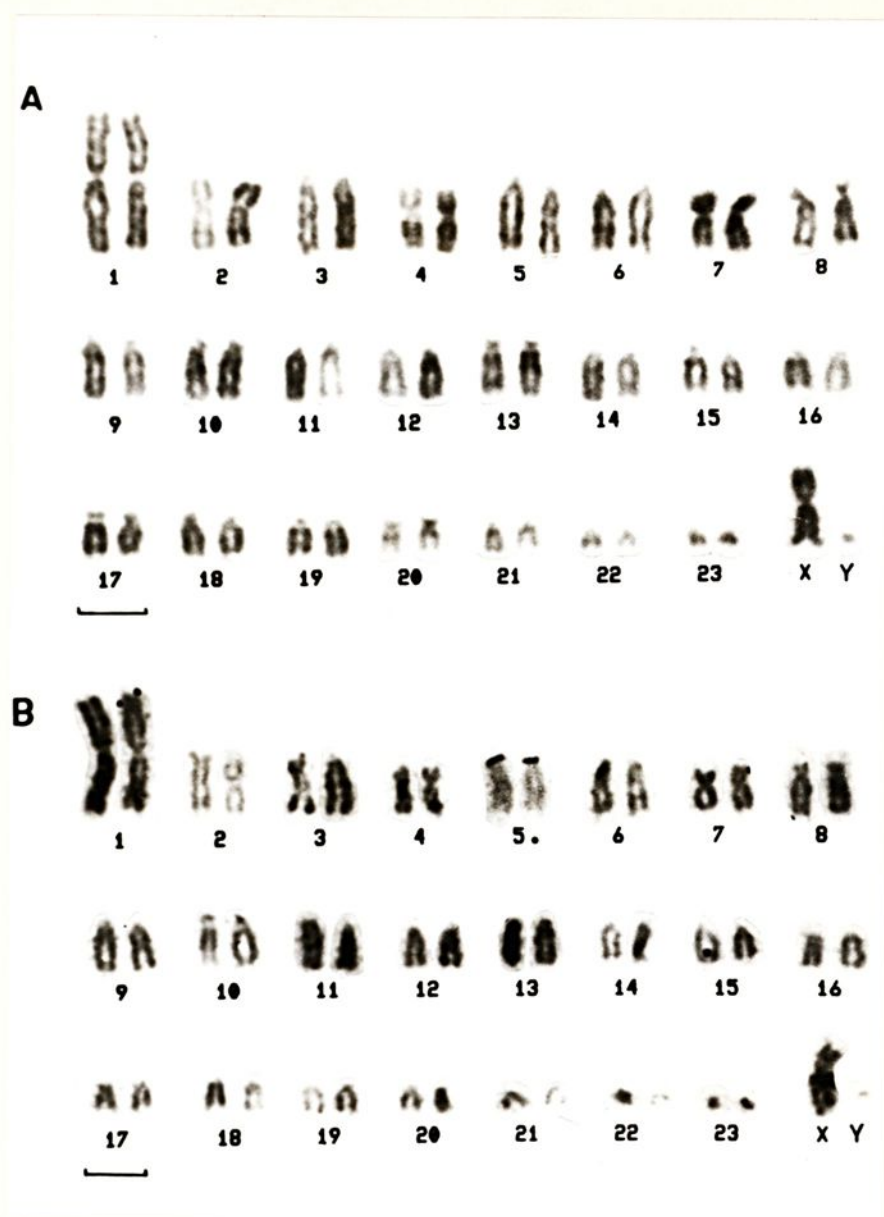


Figura 18. Cariótipo de *Nyctinomops laticaudatus*. A: Em coloração usual; B: Com a localização das RONS (assinalados com asterisco). Barra = 5µm.

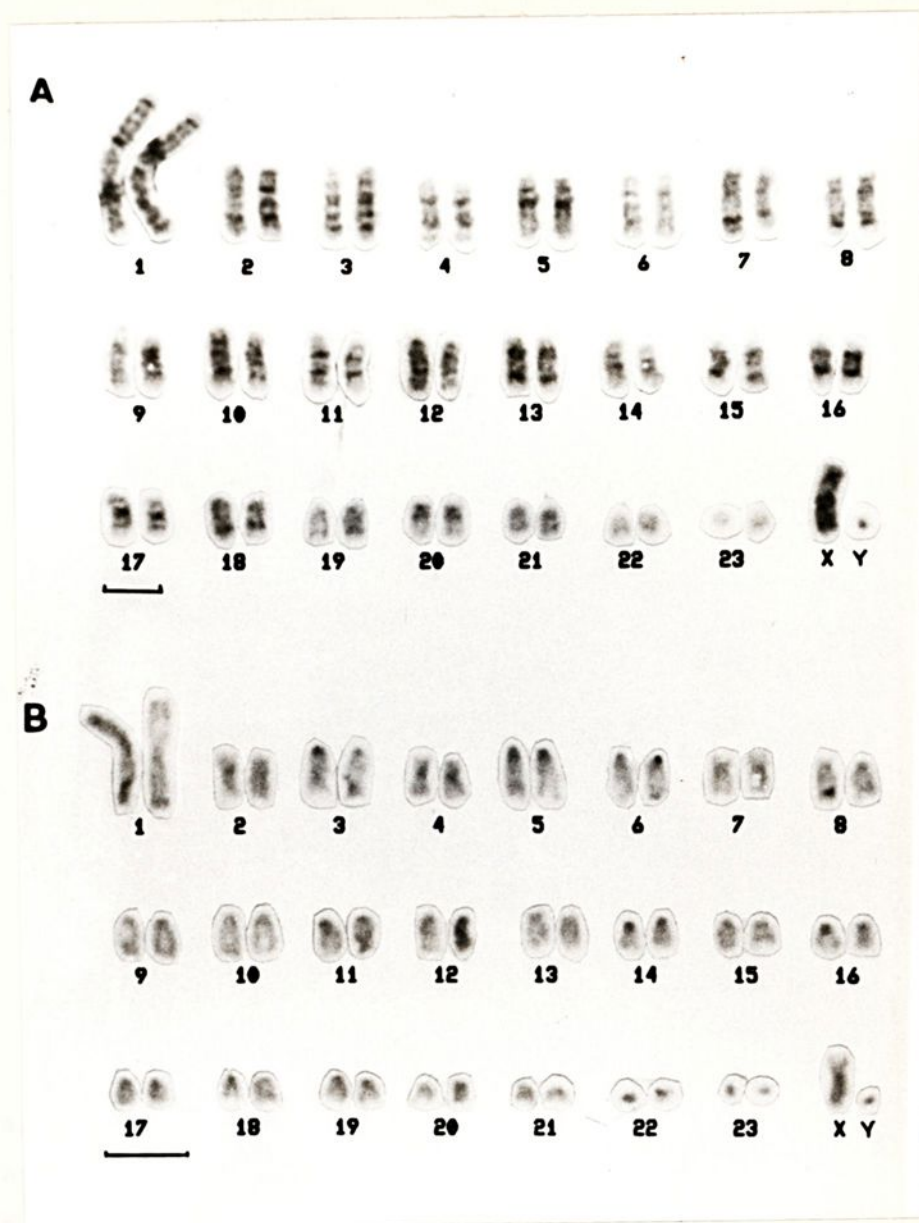


Figura 19. Cariótipo de *N. laticaudatus*. A: Com bandas G; B: Com bandas C. Barra = 5μm.

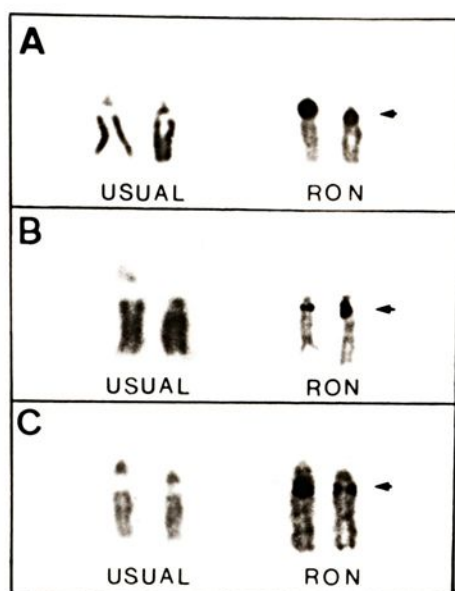


Figura 20. Paracromossômico 5 evidenciando o heteromorfismo no tamanho da constrição secundária e das RONS (setas) entre os homólogos. A: *M. ater*; B: *M. molossus*; C: *E. perotis*.

A espécie *N. laticaudatus* diferiu no seu padrão de bandas G, em relação ao de *M. ater*, aparentemente apenas por uma inversão pericêntrica ocorrida no par cromossômico 5, conforme também observado no cromossomo 11 e 5, respectivamente, das espécies *M. abrasus* e *M. temminckii*. Essa inversão alterou a localização das RONS, que passou a ser terminal nessas três espécies. A identificação de homologia entre os seus cromossomos Y não foi possível, devido ao pequeno tamanho do Y de *N. laticaudatus*.

O padrão de bandas G de *E. perotis* quando comparado com o de *M. ater* mostrou extensa homologia, que só não parece ser completa porque a espécie não apresenta os braços curtos eucromáticos dos cromossomos subtelocêntricos 8, 10, 17, 20 e Y de *M. ater*, e por apresentar, no cromossomo 15, pequenos braços eucromáticos não evidenciados no cromossomo 15 de *M. ater*.

As homologias nos padrões de bandas G de *M. temminckii* com *M. ater* são também evidentes, envolvendo vários cromossomos inteiros, como os pares 1, 2, 3, 7, 8, 12, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 e 23 de *M. temminckii*, que mostram homologias com esses mesmos pares de *M. ater*, o par 6 que parece ser homólogo ao 9 de *M. ater*, e o par 5 que é homólogo ao 5 de *M. ater*, porém apresenta-se com uma inversão pericêntrica. Para os cromossomos 4, 9, 10, 11, 13, 14, X e Y de *M. temminckii*, nada se pode concluir em relação aos cromossomos de *M. ater*.

Embora as espécies *M. abrasus* e *M. ater* possuam números diferentes de cromossomos, pôde-se identificar homologias entre praticamente todos os seus cromossomos. A única exceção é o par 5 de *M. abrasus*, que não apresentou homologia com qualquer cromossomo de *M. ater*. Os cromossomos 1, 10, 12, 14, 15, 16 e X de *M. abrasus* parecem ser homólogos aos pares 1, 4, 10, 13, 20, 22 e X de *M. ater*. O cromossomo 11 de *M. abrasus* assemelha-se ao 5 de *M. ater*, porém invertido pericentricamente, e o cromossomo 13 de *M. abrasus* assemelha-se ao 7 de *M. ater*, porém invertido paracentricamente. Os outros cromossomos de *M. ater*, à exceção do cromossomo 9 que não apresentou homologia em *M. abrasus*, aparecem nessa espécie rearranjados diferentemente. O cromossomo 2 de *M. abrasus* provavelmente originou-se da fusão dos cromossomos 12 e 3 de *M. ater*, o cromossomo 3 da fusão do 16 com o 8 invertido, o 4 da fusão

do 17 com o 11, o 6 da fusão do 2 e 23, o 8 da fusão do 21 com o 6, o 7 da fusão do 19 com o 14, e o 9 da fusão do 18 com o 15.

A comparação dos padrões de bandas G de *E. glaucinus* com *M. ater*, mostrou que as regiões reconhecidas como homólogas são poucas, limitadas a alguns cromossomos e braços cromossômicos. Embora o número fundamental seja igual e o número de cromossomos de *E. glaucinus* seja menor que o de *M. ater*, os cromossomos de *E. glaucinus* não parecem ter resultado simplesmente de fusões dos braços de *M. ater*. Alguns cromossomos de *M. ater* puderam ser reconhecidos como braços cromossômicos em *E. glaucinus*, como foi o caso dos cromossomos 13, 12, 15 e 22 de *M. ater*, que parecem constituir, respectivamente, os braços curtos dos cromossomos 2, 3, 6 e 7 de *E. glaucinus*, e os cromossomos 6 e 3 de *M. ater* que parecem constituir os braços longos dos cromossomos 1 e 4 de *E. glaucinus*. Homologias completas puderam ser identificadas entre os cromossomos 7, 16 e 17 de *M. ater* e os pares 11, 14 e 17 de *E. glaucinus*, respectivamente.



Tabela 9. Comparação das características cromossômicas entre as espécies. A= acrocêntrico, SM= submetacêntrico, ST= subtelocêntrico. Os números dentro dos parênteses referem-se aos cromossomos de *M. ater*.

*= cromossomo portador da RON.

Espécie	2N	NF	X	Y	Heterocromatina	Posição da RON	Homologias identificadas com <i>M. ater</i>
<i>M. ater</i>	48	64	SM	ST	centromérica	intercalar	1 2 3 4 5* 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 X e Y
<i>M. molossus</i>	48	64	SM	ST	centromérica	intercalar	1(1), 2(2), 3(3), 4(4), 5*(5*), 6(6), 7(7), 8(8), 9(9), 10(10), 11(11), 12(12), 13(13), 14(14), 15(15), 16(16), 17(17), 18(18), 19(19), 20(20), 21(21), 22(22), 23(23) X(X), Y(Y)
<i>M. laticaudatus</i>	48	64	SM	A	centromérica	terminal	1(1), 2(2), 3(3), 4(4), 5*(5inv.*), 6(6), 7(7), 8(8), 9(9), 10(10), 11(11), 12(12), 13(13), 14(14), 15(15), 16(16), 17(17), 18(18), 19(19), 20(20), 21(21), 22(22), 23(23), X(X)
<i>E. perotis</i>	48	58	SM	A	centromérica	intercalar	1(1), 2(2), 3(3), 4(4), 5*(5*), 6(6), 7(7), 8(8q), 9(9), 10(10q), 11(11), 12(12), 13(13), 14(14), 15(15), 16(16), 17(17q), 18(18), 19(19), 20(20q), 21(21), 22(22), 23(23), X(X), Y(Yq)
<i>M. temminckii</i>	48	64	ST	ST	centromérica terminal	terminal	1(1), 2(2), 3(3), 4*(?), 5*(5inv.*), 6(9), 7(7), 8*(8), 9(?), 10(?), 11(?), 12(12), 13(?), 14(?), 15(15), 16(16), 17(17), 18(18), 19(19), 20(20), 21(21), 22(22), 23(23)
<i>M. abrasus</i>	34	64	SM	?	centromérica terminal	terminal	1(1), 2(12/3), 3(16/8inv.), 4(17/11), 5(?), 6(2q/2p-23), 7(19/14), 8(21/6), 9(18/15), 10(4), 11*(5inv.*), 12*(10), 13(7inv.), 14*(13), 15*(20), 16*(22), X(X)
<i>E. glaucinus</i>	40	64	SM	A	centromérica intercalar terminal	terminal	1(?/6), 2(13/?), 3(12/?), 4(?/3), 5(?), 6(15/?), 7*(22/?), 8*(?), 9*(?), 10(?), 11(7), 12(?), 13(?), 14(16), 15(?), 16(?), 17(17), 18(?), 19*(?)

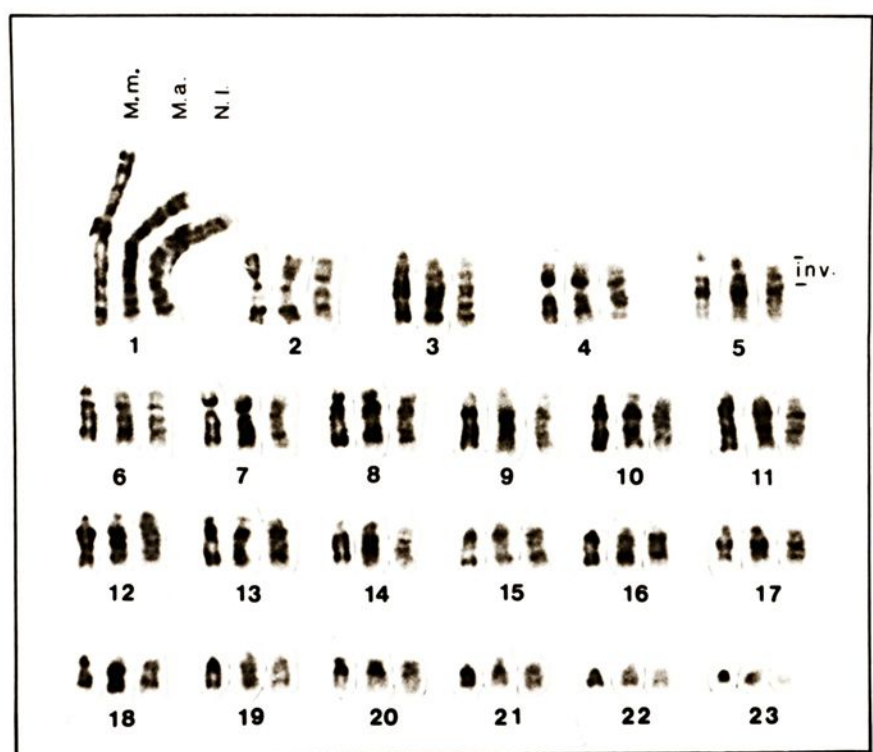


Figura 21. Padrão de bandas G do complemento haplóide mostrando as homologias entre *M. ater* (M.a.), *M. molossus* (M.m.) e *N. laticaudatus* (N.l.).

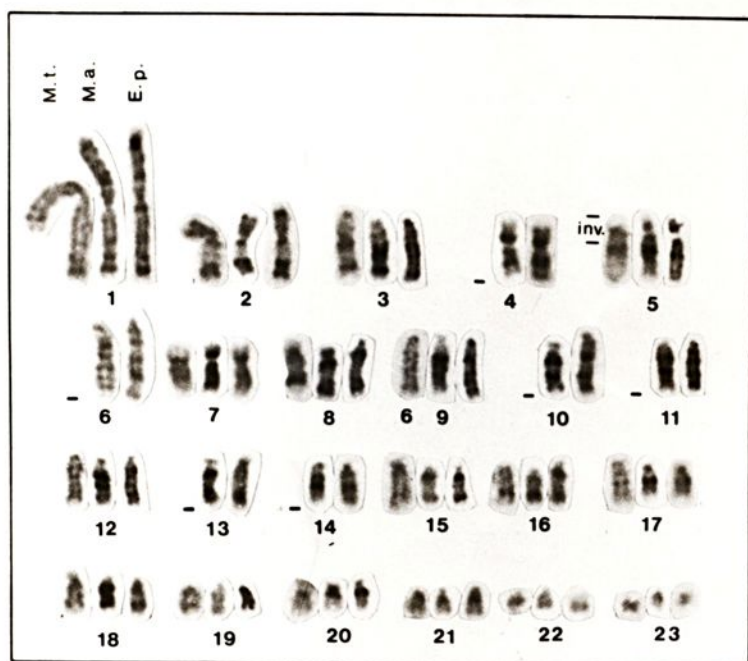


Figura 22. Padrão de bandas G do complemento haplóide mostrando as homologias entre *M. ater* (M.a.), *E. perotis* (E.p.) e *M. temminckii* (M.t.). Entre *M. ater* e *M. abraus*; B: Entre *M. ater* e *E. glaucinus*. Os cromossomos marcados com o círculo estão em A e B correspondem, respectivamente, aos cromossomos de *M. abraus* e *E. glaucinus*.

3. Pesquisa de Fragilidade Cromossômica

A fim de verificar a ocorrência de fragilidade cromossômica em moscos, induzidos por 3-bromodesoxiuridina (3-BrdU) e 5-fluorodesoxiuridina (5-FUdR), foram analisadas culturas de células de *Musca domestica* e *Eumops glaucinus*. Os resultados são apresentados na tabela 10. Os resultados são apresentados na tabela 10. Os resultados são apresentados na tabela 10.

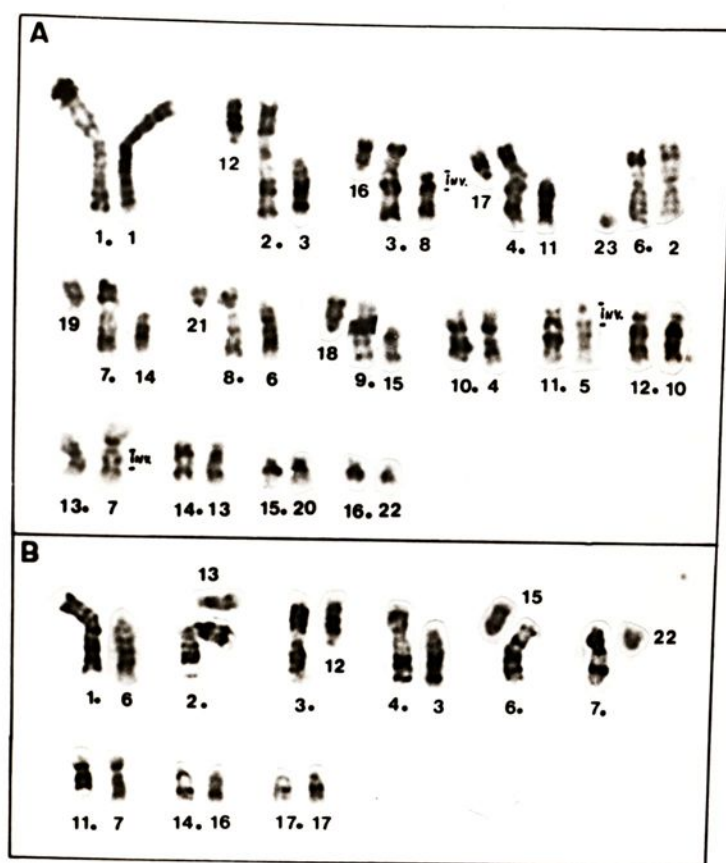


Figura 23. Padrão de bandas G do complemento haplóide mostrando as homologias. A: Entre *M. ater* e *M. abrasus*; B: Entre *M. ater* e *E. glaucinus*. Os cromossomos marcados com o círculo preto em A e B correspondem, respectivamente, aos cromossomos de *M. abrasus* e *E. glaucinus*.

3. Pesquisa de Fragilidade Cromossômica

A fim de verificar a ocorrência de fragilidade cromossômica em morcegos, induzida por 5-bromodesoxiuridina (5-BrdU) e afidicolina (APC) foram analisadas culturas de células de exemplares pertencentes às espécies de molossídeos frequentemente coletadas na região: *Molossus ater*, *M. molossus* e *Eumops glaucinus*. Os dados são discriminados na Tabela 10 pela espécie, pelo tipo de tratamento, e pelas frequências de metáfases analisadas, de metáfases com anomalias e de alterações observadas. Para cada animal foram desenvolvidas culturas com e sem tratamento com os agentes químicos. Em alguns casos, uma mesma cultura controle foi usada para os dois tratamentos.

Observa-se na Tabela 10 que a frequência total de anomalias observadas (falhas e quebras cromatídicas ou cromossômicas) nos controles e nos tratamentos com 5-BrdU não foi elevada, em qualquer dos espécimes analisados. Nos cinco espécimes de *M. ater*, de um total de 489 e 500 metáfases analisadas, respectivamente em culturas controles e tratadas com 5-BrdU, apenas 3 (0,6%) e 18 metáfases (3,6%) apresentaram anomalias, totalizando 3 e 20 quebras ou falhas cromatídicas ou cromossômicas, em cada uma das condições. Nos quatro espécimes de *M. molossus*, 14 metáfases (3,8%), de 365 analisadas para os controles, apresentaram um total de 18 alterações, e 19 metáfases (4,8%), de 400 analisadas para as culturas tratadas, apresentaram um total de 19 alterações. Em relação à espécie *E. glaucinus*, foi analisado apenas um exemplar e não se observou qualquer anomalia nas 100 metáfases analisadas do controle. No tratamento com 5-BrdU, observou-se apenas 2 metáfases anômalas (4,2%) em 47 analisadas, com um total de 3 alterações.

Comparadas as frequências totais de metáfases com e sem anomalias entre os controles e os tratamentos com BrdU, rejeita-se a hipótese de igualdade ($\chi^2 = 8,9$; 1gl; $P < 0,05$), o que indica que o agente químico induziu alterações cromossômicas, na concentração em que foi usado.

Ao analisar os dados da Tabela 10, referentes ao tratamento com APC, verifica-se que esse composto químico foi mais efetivo na indução de aberrações cromossômicas que a 5-BrdU. Em *M.*



ater, de um total de 381 metáfases analisadas nas culturas tratadas, 35 (9,2%) apresentaram alterações. Em 453 metáfases analisadas de *M. molossus*, 52 apresentaram alterações (11,5%), e em *E. glaucinus* observou-se 6 metáfases alteradas (10%), em um total de 60 analisadas. As frequências de metáfases com alterações nas culturas controles do tratamento com APC das três espécies foram 16 (4,2%) nas 376 analisadas de *M. ater*, 24 (4,8%) nas 500 analisadas de *M. molossus* e 7 (7%) nas 100 analisadas de *E. glaucinus*.

É possível verificar-se, também, que o número total de alterações (22 nos controles e 50 nos tratamentos, em *M. ater*; 29 nos controles e 75 nos tratamentos, em *M. molossus* e 8 no tratamento e no controle, em *E. glaucinus*) é superior ao número de metáfases alteradas, tanto nos controles (16, 24 e 7) como nos tratados (35, 52 e 6). Isso indica a ocorrência de mais de uma alteração em algumas das metáfases, o que se deu tanto pela manifestação de alterações em regiões cromossômicas diferentes, como pela manifestação de uma determinada alteração em homozigose.

A comparação das frequências de alterações observadas nos controles e nos tratamentos com APC, no total de espécimes, mostrou que esses grupos diferiram significativamente ($\chi^2 = 20,0$; 1gl; $P < 0,001$). Essa diferença foi bastante evidente nos espécimes CFC106, CFC109 e CFC135 de *M. ater*, CFC102, CFC103 e CFC156 de *M. molossus* e no único exemplar de *E. glaucinus*.

A Tabela 11 contém a distribuição das anomalias encontradas no tratamento com 5-BrdU nos exemplares das três espécies analisadas, de acordo com o tipo da alteração. Verifica-se, que das 20 anomalias detectadas nos cinco espécimes de *M. ater* analisados, 9 foram quebras, sendo 5 cromatídicas e 4 cromossômicas, e 11 foram falhas, 6 cromatídicas e 5 cromossômicas. Com relação aos espécimes de *M. molossus* observa-se que das 19 alterações encontradas nas células dos quatro espécimes, 7 foram quebras (4 cromatídicas e 3 cromossômicas) e 12 foram falhas (9 cromatídicas e 3 cromossômicas). O espécime de *E. glaucinus* apresentou duas falhas (uma cromossômica e uma cromatídica) e uma quebra cromossômica. Os eventos mais comuns foram, portanto, as falhas do tipo cromatídicas.

Tabela 10. Discriminação por espécie dos exemplares analisados e tipo de tratamento empregado, número de metáfases analisadas e com anomalias e número de anomalias encontradas nos dois tratamentos. 5-BrdU= bromodesoxiuridina; APC= afidicolina; C= controle; T= tratamento.

Espécie	Exemplar	Tratamento															
		5-BrdU								APC							
		Nº met. anal.		Nº met. anômalas				Nº de anom.		Nº met. anal.		Nº met. anômalas				Nº de anom.	
		C	T	C	(X)	T	(X)	C	T	C	T	C	(X)	T	(X)	C	T
Molossus ater	CFC51	100	100	1	(1,0)	5	(5,0)	1	6								
	CFC52	100	100	0	(0,0)	1	(1,0)	0	1								
	CFC53	89	100	1	(1,1)	3	(1,0)	1	3								
	CFC54	100	100	1	(1,0)	6	(6,0)	1	7								
	CFC68	100	100	0	(0,0)	3	(3,0)	0	3								
	CFC106									100	81	1	(1,0)	16	(19,8)	1	27
	CFC109									82	100	9	(11,0)	14	(14,0)	11	15
	CFC135									94	100	1	(1,1)	4	(4,0)	4	7
	CFC136									100	100	5	(5,0)	1	(1,0)	6	1
	Total	489	500	3	(0,6)	18	(3,6)	3	20	376	381	16	(4,2)	35	(9,2)	22	50
Molossus molossus	CFC48	100	100	1	(1,0)	7	(7,0)	1	7								
	CFC55	100	100	4	(4,0)	4	(4,0)	4	4								
	CFC65	65	100	8	(12,3)	6	(6,0)	12	6								
	CFC102									100	100	4	(4,0)	20	(20,0)	4	27
	CFC103									100	91	8	(8,0)	17	(18,7)	11	24
	CFC137									100	100	2	(2,0)	3	(3,0)	2	4
	CFC156									100	62	9	(9,0)	11	(17,4)	11	19
	CFC162	100	100	1	(1,0)	2	(2,0)	1	2	100	100	1	(1,0)	1	(1,0)	1	1
	Total	365	400	14	(3,8)	19	(4,8)	18	19	500	453	24	(4,8)	52	(11,5)	29	75
Eumops glaucinus	CFC110									100	60	7	(7,0)	6	(10,0)	8	8
	CFC141	100	47	0	(0,0)	2	(4,2)	0	3								
	Total	100	47	0	(0,0)	2	(4,2)	0	3	100	60	7	(7,0)	6	(10,0)	8	8
Total		954	949	17	(1,8)	39	(4,0)	21	42	976	894	47	(4,8)	93	(10,4)	59	133

Cinco regiões cromossômicas apresentaram alterações em pelo menos 2% das células: 1q proximal (2% das células tratadas do CFC51), 1p mediano (2% das células controle de CFC55), 1q mediano (3% das células tratadas de CFC54), 1q distal (2% das células tratadas de CFC48), 8q mediano (7,7% das células tratadas do CFC65) e estão ilustradas na Figura 24.A. Contudo, nenhuma delas satisfaz os critérios estabelecidos para a classificação de um sítio frágil, ou seja, se repetirem em mais de um animal e serem observadas em homozigose.

Verifica-se pela Tabela 12 que, à semelhança do observado no tratamento com 5-BrdU, os eventos mais comuns entre as alterações observadas após tratamento com APC foram as falhas, porém nesse caso do tipo cromossômica. No entanto, as quebras cromossômicas também apareceram em frequência elevada entre as alterações ocorridas.

As regiões cromossômicas que apresentaram alterações em pelo menos 2% das células nos controles e tratamentos com APC estão apresentadas na Tabela 13. Conclui-se que as seguintes regiões, ilustradas na Figura 24.B, preencheram as condições de serem classificadas como sítio frágil:

- a) 1p mediano, que apareceu com quebras em células tratadas de três animais da espécie *M. molossus* (CFC102, CFC103 e CFC156), manifestadas em homozigose em uma célula tratada de cada um dos exemplares. Essa região foi classificada como sítio frágil sensível à APC. Em *M. ater*, apenas o animal CFC106 manifestou anomalias em células tratadas, nessa região.
- b) 1q mediano, que se apresentou alterada em células tratadas dos animais CFC106 e CFC135 de *M. ater*, e em células controles e tratadas do animal CFC156 e apenas nas células controle do animal CFC103, ambos da espécie *M. molossus*. Devido à frequência de expressão dessa região em células controle do tratamento com APC de espécimes de *M. molossus* essa região foi classificada como sítio frágil espontâneo e sensível à APC.

- c) 3q proximal, que embora tenha aparecido em células tratadas de apenas um exemplar de *M. ater* (CFC106) foi observada em homozigose em uma das células. Foi, portanto, classificada como sítio frágil sensível à APC.
- d) 8q mediano, que foi a região com as maiores frequências de alterações, tanto nos exemplares de *M. ater* (CFC106 e CFC109) como nos de *M. molossus* (CFC102, CFC103, CFC137 e CFC156). Essa região apresentou uma frequência mínima de 2% de quebras em células controle do exemplar CFC103 e frequência máxima de 5% em células controle do exemplar CFC156, ambos da espécie *M. molossus*. As maiores frequências de alterações (6,2% e 8,1%, respectivamente) foram observadas em células tratadas dos animais CFC106 (*M. ater*) e CFC156 (*M. molossus*). Essa região foi também observada com quebras em homozigose em uma célula tratada do exemplar CFC106 e em uma célula controle do exemplar CFC156. Com base nas frequências de expressão nas células controle e tratadas com APC e no fato de que um exemplar de *M. molossus* (CFC65) apresentou nas células controle do tratamento com BrdU uma frequência de alteração de 7,7%, essa região foi classificada como sítio frágil espontâneo e sensível à APC.

Vale destacar, também, que algumas das regiões que apareceram com maior frequência de alterações nos tratamentos com 5-BrdU, apesar de não terem atendido os critérios estabelecidos para reconhecimento de uma região de fragilidade naqueles casos, coincidentemente foram identificadas como sítios frágeis após os ensaios com APC.



Tabela 11. Frequências e tipos de anomalias encontradas nas células tratadas com 5-BrdU dos espécimes analisados

Espécie	Espécime	Nº de metáfases analisadas	Quebras			Falhas			Total de alterações
			Cromat.	Cromos.	Total	Cromat.	Cromos.	Total	
Molossus ater	CFC51	100	2	2	4	2		2	6
	CFC52	100	1		1				1
	CFC53	100		1	1	1	1	2	3
	CFC54	100				3	4	7	7
	CFC68	100	2	1	3				3
	Total	500	5	4	9	6	5	11	20
Molossus molossus	CFC48	100	1	1	2	3	2	5	7
	CFC55	100		1	1	3		3	4
	CFC65	100	2	1	3	3		3	6
	CFC162	100	1		1		1	1	2
	Total	400	4	3	7	9	3	12	19
Eumops glaucinus	CFC141	47		1	1	1	1	2	3
Total		947	9	8	17	16	9	25	42

Tabela 12. Frequências e tipos das anomalias encontradas nas células tratadas com APC dos espécimes analisados.

Espécie	Espécime	Nº de metáfases analisadas	Quebras			Falhas			Total de alterações
			Cromat.	Cromos.	Total	Comat.	Comos.	Total	
Molossus ater	CFC106	81	5	14	19	5	3	8	27
	CFC109	100		5	5	1	9	10	15
	CFC135	100		1	1	2	4	6	7
	CFC136	100		1	1				1
	Total	381	05	21	26	08	16	24	50
Molossus molossus	CFC102	100	1	16	17	1	9	10	27
	CFC103	91		3	3	2	19	21	24
	CFC137	100	1		1	2	1	3	4
	CFC156	62	5	6	11	3	5	8	19
	CFC162	100						1	1
	Total	453	7	25	32	8	34	43	75
Eumops glaucinus	CFC110	60		4	4		4	4	8
Total		894	12	50	62	16	54	71	133

Tabela 13. Frequências percentuais de quebras e falhas em regiões cromossômicas nas quais essas lesões foram encontradas em pelo menos 2% das células nas culturas controles (C) ou tratadas (T) com afidicolina (APC).

Região cromossômica	Molossus ater								Molossus molossus									
	CFC106		CFC109		CFC135		CFC136		CFC102		CFC103		CFC137		CFC156		CFC162	
	C	T	C	T	C	T	C	T	C	T	C	T	C	T	C	T	C	T
=====																		
1p mediano		2,5								4,0		2,2					3,2	
1q mediano		4,9			2,0							2,0				2,0	3,2	
1q mediano-distal							3,0											
1q proximal-mediano													4,4					
1q distal												2,0						
3q proximal		3,7																
4q mediano													2,2					
4q proximal-mediano												2,0						
5q distal						2,0												
7q mediano														2,2				
8q mediano		6,2		3,0						5,0	2,0	4,4	2,0		5,0		8,1	
8q mediano-distal													3,3					
10q proximal-mediano				2,0														
10q mediano		3,7																
20q mediano											2,0							
Xq mediano				2,0														
SM médio q mediano											2,0							
Acro.médio q mediano		2,5																
=====																		

IV. DISCUSSÃO

A. Condições de Cultivo

As células em cultura forneceram material extremamente útil para estudos de alterações cromossômicas, a possibilidade de realizar a análise a partir de técnicas biológicas, como a morfologia celular e o conteúdo proteico. Porém, no planejamento dos experimentos com culturas celulares é importante o reconhecimento e o estabelecimento das condições propícias para a proliferação celular.

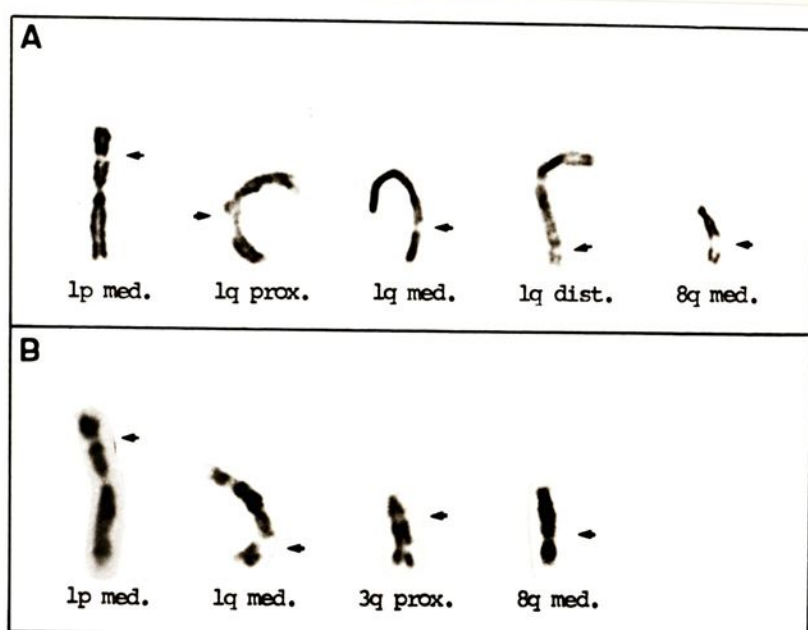


Figura 24. Regiões cromossômicas que apresentaram alterações em pelo menos 2% das células. A: No controle e no tratamento com 5-BrdU; B: Reconhecidas como sítio frágil no controle e no tratamento com APC.

IV. DISCUSSÃO

A. Condições de Cultivo

As células em cultura fornecem um material extremamente útil para estudos em diferentes áreas, e possibilitam a realização de uma série de investigações biológicas, entre as quais a análise de características qualitativas, como a morfologia celular e o conteúdo cromossômico. Porém, no planejamento dos experimentos com culturas celulares é importante o reconhecimento e o estabelecimento das condições propícias para a proliferação celular.

Com este estudo, conseguiu-se implantar a metodologia do cultivo de fibroblastos de morcegos no Laboratório de Citogenética de Vertebrados do Departamento de Biologia do IBILCE, UNESP, apesar de ainda haverem alguns problemas metodológicos a serem vencidos. O principal deles refere-se à contaminação microbiológica das culturas e o outro refere-se às dificuldades específicas com determinadas espécies, que provavelmente refletem uma variação interespecífica na resposta aos procedimentos de cultivo.

Culturas primárias de fibroblastos podem ser obtidas da proliferação de células a partir de fragmentos de alguns tecidos, como o cartilaginoso e o epitelial, que são ricos em células fibroblastóides. Nos ensaios referentes às condições de cultura, neste estudo, foram utilizados fragmentos de orelha, ricos em células cartilaginosas e epiteliais, assim como de membrana do plagiopatágio (asa) e de cauda, ricos em células epiteliais. Da membrana da asa foi utilizada apenas uma amostra e ela não aderiu ao substrato após processamento mecânico, por isso nada se pode concluir sobre tal material. Em relação a orelha e cauda verificou-se que ambas contêm tecidos que permitiram o desenvolvimento de culturas de fibroblastos.

Existem, como já referido na Introdução, várias técnicas de iniciação de culturas primárias. Para a montagem da maioria das culturas de fibroblastos dos morcegos ora analisados, foi usada a técnica de semeadura de explantes, com os fragmentos de tecido sendo desagregados mecanicamente. Essa técnica mostrou-se útil e adequada, uma vez que 92% das amostras que aderiram haviam sido processadas



por explante e, dessas, 47% cresceram satisfatoriamente.

A desagregação enzimática seleciona células resistentes ao método de desagregação mecânica, mas que são capazes de se ligarem, posteriormente, ao substrato. Ela foi utilizada em um número menor de amostras e o observado foi que 50% das amostras processadas enzimaticamente aderiram, e dessas 33% cresceram satisfatoriamente.

Os resultados deste estudo mostraram que ambos os procedimentos possibilitaram a obtenção de culturas de fibroblastos de morcegos. Entretanto, a técnica de desagregação enzimática, por envolver o uso de enzimas proteolíticas como a collagenase, é mais dispendiosa, devendo ser aplicada somente nos casos em que a desagregação mecânica não for satisfatória.

Da mesma forma que o tipo de biopsia e de desagregação interferem no sucesso das culturas de células, o substrato de cultivo celular, aqui representado pelo frasco de cultura, deve apresentar as condições necessárias para que as células se fixem e iniciem o crescimento. A maioria das células de vertebrados cultivadas *in vitro* crescem em monocamada sobre um substrato artificial, que pode ser de vidro ou plástico. Os frascos plásticos de poliestireno são os mais comumente usados e têm a vantagem de serem esterilizados pelo fabricante, geralmente por irradiação, não devendo conter substâncias tóxicas que possam influenciar as culturas. As três marcas de frascos utilizadas nos ensaios, ou seja, Descarplast, Costar e Corning, confeccionadas em poliestireno, forneceram as condições necessárias para que as células aderissem e proliferassem. Os motivos pelos quais os frascos Costar e Corning permitiram uma maior frequência de adesão e crescimento dos explantes, apesar de que a diferença não foi considerada estatisticamente significativa, devem estar relacionados com a própria constituição ou qualidade do recipiente.

As células podem sobreviver por curtos períodos de tempo em solução salina tamponada, mas para uma sobrevivência mais prolongada são necessários outros fatores normalmente presentes no plasma, que podem ser substituídos por misturas sintéticas, capazes de prolongar a sobrevivência das células. Essas misturas constituem os meios de cultura, que são também de fundamental importância no cultivo celular *in vitro*.



O meio básico de cultivo deve substituir o meio natural e sustentar o crescimento celular. Para isso, deve ter em sua composição os constituintes mínimos necessários e essenciais ao metabolismo celular. Entre eles, podemos citar os aminoácidos, as vitaminas, os sais inorgânicos e a glicose. As células de mamíferos em cultura requerem doze aminoácidos essenciais: arginina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, triptofano, valina, cistina e tirosina. Esses aminoácidos constituem o mínimo requerido pelas células, mas a maioria delas desenvolve-se melhor na presença de outros aminoácidos, que são importantes para a síntese de proteínas e de ácidos nucleicos. A maioria das vitaminas essenciais pertence ao grupo B e quase todas são parte integral de coenzimas relacionadas com o metabolismo celular. A glicose é a fonte mais comum de carboidratos e energia. Entre os sais, cuja função é contribuir na osmolalidade do meio, destacam-se principalmente os de sódio, potássio, magnésio, cálcio, cloro e outros (FRESHNEY, 1987).

Além dos componentes essenciais para o cultivo celular já citados, grande parte das células requer a suplementação do meio com soro, sendo o soro fetal bovino o mais comumente usado. O papel do soro animal nas culturas é ainda controverso, mas pouquíssimas células crescem na sua ausência e mesmo quando o crescimento ocorre, ele é sempre melhorado se for adicionado soro ao meio. O soro constitui a fonte de determinadas proteínas, como albumina, globulina e fetuína, que parecem auxiliar ou promover a aderência celular e inibir a ação de enzimas proteolíticas como a tripsina. Apresenta, também, em sua constituição, polipeptídeos como os fatores de crescimento derivados de plaquetas e fatores de crescimento de fibroblastos, hormônios como a hidrocortisona e de crescimento, minerais e substâncias que, em condições especiais, inibem a proliferação celular (FRESHNEY, 1987).

A variação nas proporções dos elementos essenciais na constituição do meio de cultura é que diferencia os meios disponíveis para o cultivo celular. Embora na literatura especializada existam informações sobre a especificidade dos meios de cultivo em relação aos tipos celulares, a escolha do meio nem sempre é fácil. Tanto o meio Ham-F10 como o MEM-Eagle apresentaram



bons resultados nos ensaios realizados, mostrando-se satisfatórios para o cultivo e manutenção das células in vitro. Embora o meio Ham-F10 seja mais rico em aminoácidos e vitaminas que o MEM-Eagle, esse mostrou-se suficiente para promover e manter o crescimento de fibroblastos de morcego nas condições de suplementação usada, ou seja, com 20% de soro fetal bovino e 200mM de glutamina.

O meio idealizado por Eagle é, provavelmente, o mais usado em culturas de células animais e inclui treze aminoácidos e oito vitaminas, dissolvidos em solução salina balanceada de Earle (cf. em FRESHNEY, 1987). Os dados de literatura mostram que culturas primárias de fibroblastos humanos, de roedores e aves e de linhagens delas derivadas podem ser mantidas em um meio relativamente simples como o MEM-Eagle, desde que suplementado com soro fetal. Meios mais complexos são necessários quando se quer promover a proliferação de tipos celulares específicos ou a expressão de alguma função celular.

Como destacado anteriormente, as contaminações microbianas ocorridas nas culturas foram um dos maiores problemas no cultivo de células. Os agentes contaminantes observados foram bactérias e fungos, e embora tenham sido feitas observações sobre as características da ocorrência da contaminação (tipo, época, etc.), nem sempre foi possível determinar sua origem. Muitas mudanças nos processos assépticos foram feitas no período de desenvolvimento deste estudo, a fim de reduzir o índice de contaminações. Entretanto, ressalte-se que a natureza dos materiais processados no Laboratório de Cultura de Células é bastante diversificada, incluindo linfócitos, fibroblastos humanos e de outros mamíferos células tumorais, e o número de pesquisadores que o utilizam é muito grande para o pequeno espaço disponível, o que faz com que nem todas as variáveis possam ser devidamente controladas.

Com base nas observações desse estudo foi possível caracterizar as culturas de células de morcegos em relação a alguns aspectos, um dos quais é o pH. Embora o pH ótimo para o crescimento das células varie pouco entre diferentes linhagens celulares, os fibroblastos humanos normais têm um melhor desenvolvimento em pH 7,4 - 7,7, e as linhagens celulares transformadas em pH 7,0 - 7,4 (EAGLE, 1973). Entretanto, há registros de que células epidérmicas podem ser mantidas em pH 5,5 (EISINGER et al., 1979). O que se



concluiu no presente trabalho é que, para fibroblastos de morcegos, o pH ótimo de crescimento situa-se entre pH 6,5 e 7,0.

A maioria das culturas celulares propaga-se de forma inalterada por um número limitado de gerações celulares, ao final do qual elas alcançam a senescência e morrem (FRESHNEY, 1987). As células normais, geralmente, não dão origem a linhagens celulares contínuas. Fibroblastos humanos permanecem euplóides até o limite de sua vida e, ao entrarem na fase de degeneração, que ocorre geralmente ao redor da 50ª geração, param de se dividir, permanecendo vivos por até dezoito meses. Entretanto, fibroblastos de camundongos e células de uma variedade de tumores humanos e animais frequentemente tornam-se aneuplóides em cultura, e podem originar as linhagens celulares. (McGANN & WALTERSON, 1987).

Os fibroblastos de morcegos estão, provavelmente, na categoria de células que proliferam rapidamente (duplicam-se em cerca de 12 a 18 horas), alcançando a senescência após cerca de 40 dias do início do crescimento.

O aparecimento, nas culturas de morcegos, inicialmente de células epiteliais e posteriormente de células fibroblastóides, é o esperado, devido à técnica de desagregação empregada, que seleciona as células com capacidade de migrar do explante. O não aparecimento de fibroblastos em algumas das amostras semeadas pode ser explicado porque eles não conseguiram migrar, ou porque não havia tal tipo celular no explante.

B. Congelamento Celular

Os repiques periódicos das culturas de células de origem animal podem ser espaçados pela estocagem das suspensões celulares em baixas temperaturas, sem que haja alterações marcantes nas suas propriedades. No entanto, o abaixamento da temperatura ocasiona uma série de fenômenos, conforme descrito na Introdução, que podem causar sérios danos às células, afetando sua sobrevivência posterior. Os mecanismos pelos quais as alterações afetam a sobrevivência das células não são claros, porém o alvo ou sítio primário da injúria do congelamento parece ser a membrana plasmática (McGANN et al., 1988), sendo também afetadas organelas como as



mitocôndrias (SHERMAN, 1972; TSVETKOV et al., 1986), os lisossomos (ROWE & LENNY, 1980) ou outras (VOLGER et al., 1970). A formação de gelo é a concentração dos eletrólitos, mais do que a presença física dos cristais de gelo, que causa graves injúrias às células. O uso de um agente crioprotetor, cujo princípio é ligar-se à uma certa quantidade de água impedindo-a de cristalizar-se às temperaturas abaixo de zero, faz com que a concentração de eletrólitos se reduza, deixando de ser letal às células (MAZUR, 1970; MCGANN et al., 1978, 1979). O agente criopreservativo a ser usado depende do tipo celular, e a condição primária para a seleção de um composto crioprotetor deve ser a baixa toxicidade nas concentrações necessárias para modificar coligativamente a composição da solução às temperaturas abaixo de zero (MCGANN & WALTERSON, 1987).
Embora o DMSO (dimetil sulfoxido) seja um dos crioprotetores mais efetivos, ele apresenta uma certa toxicidade, evidenciada em pacientes que receberam leucócitos preservados para transfusão, que foram congelados em presença desse composto (ROWE & LENNY, 1980 para referências). O glicerol é outro agente químico que tem se mostrado útil no congelamento de vários tipos celulares, inclusive leucócitos, plaquetas e granulócitos, e tem a vantagem de não ser tóxico (MAZUR, 1970; ROWE & LENNY, 1980). Por isso, foi escolhido neste estudo como solvente criopreservativo e foi introduzido na concentração de 10% no meio de cultura usado para o congelamento.

A criopreservação depende da velocidade de congelamento. Dos ensaios realizados com as amostras congeladas e descongeladas para análise posterior, pôde-se observar que as células responderam melhor aos procedimentos que envolveram: a) o resfriamento da suspensão celular a -20°C seguido do congelamento em nitrogênio líquido a -196°C e b) o resfriamento da suspensão a -20°C , seguido do congelamento em nitrogênio líquido a -130°C e -176°C . Ambos os testes resultaram na viabilidade, após descongelamento, de 11% a 50% das células.
O congelamento lento ou gradual de -1°C por minuto é considerado mais adequado para os diferentes tipos celulares (MAZUR, 1970; LEIBO & MAZUR, 1971; HARRIS & GRIFFITHS, 1977), mas para sua execução necessita-se de equipamentos dos quais o laboratório não



dispõe. Portanto, de acordo com as modalidades de congelamento aplicadas (moderado e rápido), esperava-se que houvesse a formação de pequenos cristais intracelulares, que teoricamente tiveram seu número reduzido pela introdução do glicerol, ao meio utilizado para o congelamento.

Outro importante fator na criopreservação é a concentração do agente protetor. O uso de concentrações baixas de glicerol (0,4M ou 5%) exige uma velocidade de congelamento rápida, enquanto que em concentrações mais altas (1,25M ou 10-20%) a velocidade de congelamento deve ser menor (HAZUR, 1970; DAYIAN et al., 1971; DAYIAN & ROWE, 1976; ROWE & LENNY, 1980). Nos ensaios de congelamento com velocidade moderada, a taxa de viabilidade das células, entre 33 e 50%, não foi excelente, mas as culturas puderam desenvolver-se a contento, portanto a concentração utilizada de glicerol (10%) pode ser considerada adequada. Contudo, nos ensaios com congelamento rápido, a viabilidade celular após descongelamento ficou em torno de 10%, significando provavelmente que fossem requeridas concentrações mais baixas de glicerol.

A velocidade de descongelamento é, também, um fator muito importante a ser considerado. Embora neste estudo o descongelamento tenha sido feito rapidamente a 37°C, não se pode descartar a ocorrência de perda nessa etapa, pela formação dos grandes cristais que podem causar danos às células, afetando a viabilidade celular. A morte celular, ocorrida nos ensaios 5, 8 e 9, pode ser devida tanto a problemas durante alguma etapa do processo de congelamento como no de descongelamento.

Um outro fator de grande importância na criopreservação é a temperatura de estocagem, pois ela influencia o tempo em que a célula pode permanecer viável. O período de sobrevivência estimado para células estocadas em nitrogênio líquido a -176°C, ou em outro gás com temperaturas em torno de -150°C, é de vários anos, porém decai à medida que a temperatura de congelamento aumenta. Se as células forem congeladas em temperaturas mais elevadas, entre -45 a -70°C, a sobrevivência é em torno de seis meses (BIRD & FORRESTER, 1981). Entretanto, FRESHNEY (1987) ressalta que o estoque de culturas congeladas deve ser substituído em intervalos de tempo regulares, como a cada 3 meses, a fim de preservar as propriedades



das linhagens celulares. Os ensaios 6, 7, 10 e 11 alcançaram

Nos ensaios ora realizados, o tempo máximo de estocagem foi de 77 dias e justamente nos testes que utilizaram tal período (0 e 9), as células estavam mortas após o descongelamento. Entretanto, nesses casos, a morte das células pode ter sido consequência de problemas nos processos de congelamento ou descongelamento, e não do tempo de estocagem, uma vez que os ensaios 6 e 7, nos quais as células foram estocadas por 40 dias, apresentaram viabilidade semelhante às dos ensaios 10 e 11, nos quais as células foram estocadas por 12 e 3 dias, respectivamente.

As observações referentes à densidade celular na sementeira da cultura mostraram que determinadas densidades podem recompôr as culturas de células mais rapidamente. Segundo FRESHNEY (1987), a concentração adequada de células para iniciar uma cultura está entre 10^3 a 10^5 células/ml, mas pode variar de acordo com o tipo celular. Culturas de células que proliferam rapidamente, com ciclos de divisão celular de 12 a 18 horas, devem ser iniciadas com concentração em torno de 2×10^4 células/ml, enquanto que culturas de células que proliferam lentamente, com ciclos entre 24 a 48 horas, devem ser iniciadas com concentração em torno de 5×10^4 células/ml. Em culturas primárias, a serem iniciadas com células obtidas da desagregação tecidual, a concentração deve variar de 10^3 a 6×10^3 células por cm^2 de área disponível para crescimento, o que corresponderia a valores entre $2,5 \times 10^4$ e $1,5 \times 10^5$ células/frasco de cultura com 25cm^2 e é equivalente a 5×10^3 a 3×10^4 células/ml, se a suspensão celular estiver contida em 5 ml de meio de cultivo.

Neste estudo, algumas das culturas foram semeadas em concentrações inferiores às recomendadas (3×10^3 e 4×10^3 células/ml, ensaios 1, 2, 3 e 4), o que deve justificar o tempo prolongado que foi necessário para que as células proliferassem, e que uma confluência máxima de 70% (2/3 da superfície de crescimento) somente fosse alcançada após 30 dias de observação. Nesses casos, e provavelmente pelo número insuficiente de células presentes na suspensão, a taxa de proliferação das células não conseguiu superar a taxa de envelhecimento e morte celular, ou as células atingiram a fase estacionária antes da confluência. As culturas semeadas com



$6,2 \times 10^4$ a $1,5 \times 10^5$ células/ml (ensaios 6, 7, 10 e 11) alcançaram 100% de confluência, ocupando todo o substrato de crescimento num período máximo de nove dias.

Os ensaios sobre densidades celulares nas sementeiras, realizados nas culturas não congeladas, também mostraram que as concentrações ideais estão entre 10^4 e 10^5 células/ml, conforme o exposto por FRESHNEY (1987). No entanto, um fator de fundamental importância e que pode interferir na taxa de proliferação celular de diferentes culturas secundárias, iniciadas com densidades celulares semelhantes, é a fase em que se encontra a cultura de origem. As culturas de células ideais para congelar e dar início à réplicas, são aquelas que estão na fase log, ou seja, na fase de multiplicação logarítmica. Entretanto, a duração dessa fase é variável e culturas iniciadas com células em etapas diferentes da fase log vão apresentar taxas de proliferação diferentes.

Em suma, as variações no tempo que as culturas levaram para alcançar confluência total podem ser consequentes da soma de diferentes fatores, como pequenas variações na densidade celular, tipo de congelamento aplicado e fase da cultura na qual a amostra foi congelada.

Os resultados observados nos testes de congelamento mostraram também que, em material a ser submetido as condições de congelamento aplicadas neste estudo, que redundaram em viabilidade máxima de 50%, o número de células a ser congelado deve ser alto, ou seja, as suspensões celulares devem apresentar concentrações elevadas o suficiente para poderem, após descongelamento, fornecer uma nova cultura celular.

Ressalte-se, enfim, que os resultados dos ensaios de congelamento provavelmente não podem ser atribuídos ao meio de cultura utilizado, pois é recomendado que o mesmo meio utilizado para a manutenção das células em cultura seja utilizado para o congelamento (FRESHNEY, 1987), como foi adotado neste estudo.

que ao E. perotis (2n=40 e NF=54, TOLCINO, 1974; NF=54, WARNER et al., 1974; NF=58, WAINBERG et al., 1974; presente trabalho) e E. underwoodi (2n=40 e NF=54, WARNER et al., 1974).

O cariótipo de *Eumops glaucinus* ora analisado é semelhante ao previamente descrito por WARNER et al. (1974) e por MORIELLI et

C. Variabilidade Cromossômica nos Molossídeos e Significado Evolutivo

Os estudos evolutivos na ordem Chiroptera têm utilizado comparações anatômicas e citogenéticas inter e intra-específicas, entre outras, para tentar definir os relacionamentos filogenéticos e, assim, esclarecer a evolução da ordem. A citogenética, como instrumento auxiliar no esclarecimento da história filogenética da ordem Chiroptera, tem procurado identificar o relacionamento das espécies dentro das famílias e entre famílias diferentes, através da caracterização cariotípica e de análises comparativas que podem indicar o grau de parentesco entre elas, ou seja, a natureza e a intensidade do relacionamento cromossômico.

Embora algumas espécies de molossídeos estejam entre os morcegos mais comuns, como é o caso de *Molossus ater* e *M. molossus*, muitos taxa são pobremente representados nas coleções, dada a dificuldade em se coletar esses animais pelas suas características de comportamento e hábitos. Portanto, o estudo tem sido dificultado e as interpretações das relações filogenéticas na família ainda são baseadas em dados insuficientes. Apesar da amostra estudada no presente trabalho ter incluído representantes de apenas algumas espécies, ela fornece subsídios complementares para as interpretações filogenéticas da família Molossidae.

O cariótipo do espécime analisado de *Eumops auripendulus* ($2n=42$ e $NF=62$) é semelhante ao descrito por TOLEDO (1973) e WARNER et al. (1974). Contudo, apenas TOLEDO (1973) refere a existência de satélites em um dos pares cromossômicos, o qual ele designou de par 4, e ambos descreveram os cromossomos sexuais como sendo o cromossomo X um metacêntrico médio e o Y um acrocêntrico pequeno, à semelhança do observado neste estudo. O cariótipo dessa espécie assemelha-se morfologicamente mais ao de *E. glaucinus* ($2n=40$ e $NF=64$, WARNER et al., 1974; MORIELLE et al., 1980; presente trabalho), que ao de *E. perotis* ($2n=48$ e $NF=54$, TOLEDO, 1973; $NF=56$, WARNER et al. 1974; $NF=58$, WAINBERG et al., 1974; presente trabalho) e *E. underwoodi* ($2n=48$ e $NF=56$, WARNER et al., 1974).

O cariótipo de *Eumops glaucinus* ora analisado é semelhante ao previamente descrito por WARNER et al. (1974) e por MORIELLE et

al. (1988). A forma típica de *E. glaucinus* está distribuída do México até o Peru, Bolívia, Paraguai, sudeste do Brasil, Jamaica e Cuba (EGER, 1977). Três cariótipos diferentes foram registrados para essa espécie, por WARNER et al. (1974). Espécimes da Colômbia têm $2n=40$ e $NF=64$ e os autossomos foram descritos como um grande par de submetacêntricos, uma série de onze pares de submetacêntricos decrescentes em tamanho, um par de pequenos subtelocêntricos e seis pares de acrocêntricos médios a pequenos. O cromossomo X foi identificado como um metacêntrico grande e o Y como um acrocêntrico pequeno. Os outros dois cariótipos dessa espécie têm $2n=38$ e $NF=64$, mas com variação geográfica envolvendo um par de tamanho médio que parece ser acrocêntrico em espécimes do México, submetacêntrico em espécimes da Costa Rica e com ambas as formas em Honduras. WARNER et al. (1974) sugeriram que as diferenças entre as formas de *E. glaucinus* com $2n=40$ e as com $2n=38$ resultaram de uma fusão cêntrica, e que a diferença entre as duas formas de cariótipo com $2n=38$ resultou de inversão pericêntrica. O cariótipo descrito neste trabalho assemelha-se à forma $2n=40$, com a diferença na morfologia do cromossomo X, que os autores haviam considerado metacêntrico, e não submetacêntrico, como foi verificado no presente trabalho.

Eumops perotis ($2n=48$ e $NF=50$) apresentou cariótipo usual semelhante aos descritos na literatura, porém esses apresentaram variações no número fundamental ($2n=48$ e $NF=54$, TOLEDO, 1973; $NF=56$, WARNER et al., 1974; $NF=58$, WAINBERG et al., 1974) e semelhante ao descrito para *E. underwoodi* ($2n=48$ e $NF=56$, WARNER et al., 1974). A diferença no número fundamental é devida ao número de cromossomos classificados como subtelocêntricos e acrocêntricos. WARNER et al. (1974) ressaltaram a presença de um par de cromossomos acrocêntricos com constrição secundária, o que foi também evidenciado no presente trabalho. TOLEDO (1973) e WAINBERG et al. (1974) descreveram o cromossomo X como metacêntrico, sendo que os demais autores o referiram como um submetacêntrico médio, à semelhança do que foi verificado no presente trabalho.

O cariótipo encontrado em *Molossops abrasus* ($2n=34$, $NF=64$) assemelha-se morfologicamente ao descrito por WARNER et al. (1974), porém difere quanto ao número fundamental, que esses autores referiram como 60, pois consideraram os dois menores pares de

autossomos como acrocêntricos, e não subtelocêntricos. Além disso, classificaram o cromossomo X como subtelocêntrico e não submetacêntrico, conforme concluído no presente trabalho. Contudo, destaca-se que tal conclusão foi baseada em comparações com os padrões de bandas G dos autossomos e dos cromossomos X das outras espécies estudadas, tendo em vista que foi analisado somente um exemplar do sexo feminino dessa espécie. Há, também, similaridade do cariótipo usual de *M. abrasus* com o de *Molossops greenhalli* ($2n=34$ e $NF=60$, LINARES & KIBLISKY, 1969; WARNER et al., 1974; GARDNER, 1977).

O cariótipo usual de *Molossops temminckii* apresentou diferenças em relação ao descrito por GARDNER (1977). O autor atribuiu para a espécie $2n=42$ e $NF=56$, enquanto que o observado no presente trabalho foi $2n=48$ e $NF=64$, com grande semelhança com o cariótipo de *E. perotis*, *Nyctinomops laticaudatus* e das espécies de *Molossus*. O cariótipo descrito por GARDNER (1977) não se assemelha com qualquer desses e sequer com os cariótipos de seus congêneros *M. abrasus* e *M. greenhalli*. O cariótipo ilustrado e descrito pelo autor compreende um par de autossomos grandes, cinco pares de metacêntricos ou submetacêntricos médios, dois pares de subtelocêntricos pequenos e doze pares de acrocêntricos médios a pequenos. O cromossomo X é classificado como subtelocêntrico médio e o Y como acrocêntrico pequeno. A simples ocorrência de rearranjos do tipo robertsoniano não seria suficiente para justificar essa diferença no número de cromossomos. Portanto, ou ocorreram outros rearranjos ou a identificação dos espécimes analisados por aquele autor foi feita erroneamente.

As espécies *Molossus ater* e *M. molossus* ($2n=48$ e $NF=64$) apresentam os cariótipos semelhantes entre si e semelhantes aos descritos por BAKER & LOPEZ (1970) para *M. molossus*, TOLEDO (1973), para *M. ater*, WARNER et al. (1974) e LOPES (1978), para *M. ater* e *M. molossus*. Contudo, diferiram de espécimes descritos na literatura com $NF=58$ (WARNER et al., 1974), $NF=56$ (BAKER & LOPEZ, 1970; LOPES, 1978) e $NF=60$ (TOLEDO, 1973), pois o número de cromossomos classificados como subtelocêntricos variou em cada um dos casos. WARNER et al. (1974) e LOPES (1978) referiram a presença de um par de acrocêntricos com constricção secundária nas duas espécies e todos

os autores, com exceção de TOLEDO (1973), descreveram o cromossomo X como submetacêntrico médio. Todavia, em relação ao cromossomo Y não houve concordância: em *M. molossus* o Y foi considerado acrocêntrico por BAKER & LOPEZ (1970), WARNER et al. (1974) e LOPES (1978), e subtelocêntrico no presente estudo; em *M. ater* o Y foi classificado como acrocêntrico por LOPES (1978) e subtelocêntrico por WARNER et al. (1974) e neste estudo.

A espécie *Nyctinomops laticaudatus* ($2n=48$ e $NF=64$), incluída no gênero *Tadarida* até a publicação de FREEMAN (1981), apresenta cariótipo semelhante ao descrito por WARNER et al. (1974), diferindo apenas no número fundamental, que os autores relataram como 58, com diferença no número de cromossomos subtelocêntricos observados. Há grande similaridade morfológica com os cariótipos de *Molossus ater* e *M. molossus*, porém em *N. laticaudatus* não se observou constrição secundária em qualquer par cromossômico, além de que o cromossomo Y é acrocêntrico e menor que o Y subtelocêntrico de *Molossus*.

Os dados citogenéticos já publicados para as espécies de molossídeos, resumidos na Tabela 14, mostram que o número diplóide na família varia de 34 a 48 e o número fundamental de 54 a 64. Em vinte e três das vinte e sete espécies analisadas, que representam oito dos doze gêneros que constituem a família, o número diplóide é 48. Com base nesses resultados, WARNER et al. (1974) e, posteriormente, BAKER et al. (1982) sugeriram que o número diplóide e o cariótipo primitivo de Molossidae era semelhante ao de *Molossus*, *Otomops*, *Platymops* e *Tadarida*. Como esse cariótipo é encontrado em gêneros que ocorrem tanto no Velho Mundo como no Novo Mundo (*Tadarida* e *Otomops*), pode-se supor que ele era característico de um progenitor comum.

De modo geral, verifica-se que as diferenças detectadas entre os espécimes ora analisados e os descritos na literatura referem-se ao número fundamental, e podem ser explicadas por variações no grau de condensação dos cromossomos analisados. Alguns autores (TOLEDO, 1973; WARNER et al., 1974) até mesmo admitiram que, em preparações nas quais os cromossomos se apresentavam menos contraídos, em alguns dos cromossomos considerados acrocêntricos podia-se visualizar um braço curto pequeno. Baseado nesses dados e



Tabela 14. Dados cariotípicos de espécies de molossídeos.

Espécie	2N	NF	X	Y	Referência
<i>Eumops auripendulus</i>	42	62	SM	ST	WARNER et al. (1974)
	42				TOLEDO (1973)
	42	62	SM	ST	Presente trabalho
<i>Eumops glaucinus</i>	40	64	H	A	WARNER et al. (1974)
	38	64	SM	H	"
<i>Platimops setigio</i>	38	64	A	M	WARNER et al. (1974)
	40	64	SM	A	MORIELLE et al. (1988)
<i>Promops centralis</i>	40	64	SM	A	Presente trabalho
<i>Eumops perotis</i>	48	56	SM	A	BAKER (1970)
	40	56	SM	A	WARNER et al. (1974)
<i>Eumops nasutus</i>	48	54	H	A	TOLEDO (1973)
	48	58	H	A	WAINBERG (1974)
<i>Tadarida brasiliensis</i>	48	58	SM	A	Presente trabalho
<i>Eumops underwoodi</i>	48	56	SM	A	WARNER et al. (1974)
<i>Molossops abrasus</i>	34	60	ST	SM	WARNER et al. (1974)
	34	64	SM		Presente trabalho
<i>Molossops greenhalli</i>	34	60	H	H	LINARES & KIBLISKY (1967)
	34	60	ST	SM	BAKER (1970)
<i>Tadarida macrotis</i>	34	60	ST		WARNER et al. (1974)
	34	60	ST	SM	"
<i>Molossops temminckii</i>	42	56	ST	A	GARDNER (1977)
<i>Tadarida aurispinosa</i>	48	64	ST	ST	Presente trabalho
<i>Molossus ater</i>	48	58	SM	ST	WARNER et al. (1974)
	48	56	SM	A	LOPES (1978)
	48	60			TOLEDO (1973)
<i>Tadarida condylura</i>	40	64	SM	ST	Presente trabalho
<i>Molossus aztecus</i>	48	58	SH	A	WARNER et al. (1974)
<i>Molossus rufus</i>	40	58	SH	A	WAINBERG et al. (1974)
<i>Molossus molossus</i>	48	56	SM	A	BAKER & LOPEZ (1970)
	48	56	SM	A	LOPES (1978)
	48	58	SM	A	WARNER et al. (1974)
	40	64	SM	ST	Presente trabalho
<i>Molossus pygmaeus</i>	48	58	SM	A	WARNER et al. (1974)
<i>Molossus sinaloe</i>	48	58	SM	A	WARNER et al. (1974)

Tabela 14 (cont.)

Espécie	2N	NF	X	Y	Referência
<i>Nyctinomops laticaudatus</i> (= <i>Tadarida laticaudata</i>)	48 40	64 58	SM SM	A A	Presente trabalho WARNER et al. (1974)
<i>Otomops martiensseni</i>	48 48	58 56	SM M	SM A	WARNER et al. (1974) DULIC & MUTERE (1973)
<i>Platimops setigio</i>	40	54	SM	SM	WARNER et al. (1974)
<i>Promops centralis</i>	48	58	M	A	WARNER et al. (1974)
<i>Promops davisoni</i>	48	58	SM	A	WARNER et al. (1974)
<i>Promops nasutus</i>	40	54	A	A	WAINBERG (1966)
<i>Tadarida brasiliensis</i>	48 48 48 40 40	50 54 56 56	 SM SM	 A A	PAINTER (1925) PATTON & BAKER (1966) KNIJAZEFF et al. (1967) WARNER et al. (1974) BAKER et al. (1982)
<i>Tadarida femorosacca</i>	40 48	 58	 SM	 SM	PATTON & BAKER (1966) WARNER et al. (1974)
<i>Tadarida macrotis</i>	40 48 40	 56 50	 SM SM	 A	PATTON & BAKER (1966) BAKER (1970) WARNER et al. (1974)
<i>Tadarida aurispinosa</i> (= <i>N. aurispinosus</i>)	40	58	SM	A	WARNER et al. (1974)
<i>Tadarida kalinowskii</i>	48	56	SM		WARNER et al. (1974)
<i>Tadarida condylura</i>	48	56	SM	A	DULIC & MUTERE (1973)
<i>Tadarida pumila</i>	48	58	M	A	DULIC & MUTERE (1973)
<i>Tadarida plicata</i>	48	54	SM	A	HARADA et al. (1982)

no fato de que os resultados do presente trabalho foram obtidos, em sua grande maioria, a partir de metáfases de culturas de fibroblastos, nas quais os cromossomos estão mais descondensados, sugere-se que o número fundamental para os cariótipos considerados mais primitivos ($2n=48$) seja 64 e não 54, 56 ou 58.

As homologias reconhecidas nos estudos comparativos ora realizados, que foram resumidas na Tabela 2 e ilustradas nas Figuras 21, 22 e 23, permitem algumas conclusões interessantes. Entre as sete espécies de Molossidae estudadas, e com base na similaridade dos padrões de bandas G, foi possível identificar três classes: (I) constituída pelas espécies *Molossus ater*, *M. molossus* e *Nyctinomops laticaudatus*; (II) constituída pelas espécies *E. perotis* e *Molossops temminckii* e (III) constituída pelas espécies *E. glaucinus* e *Molossops abrasus*.

As espécies da classe I têm $2n=48$ e $NF=64$. Entre elas há similaridade na morfologia dos cromossomos e homologia praticamente completa nos padrões de bandas G. As únicas exceções são o par 5 de *N. laticaudatus* que se diferencia de *M. ater* por uma inversão pericêntrica e o Y, que é muito pequeno e não pode ser comparado. Todos os outros pares parecem possuir homologia completa, no nível de resolução analisado.

A distribuição da heterocromatina constitutiva apresenta variações muito pequenas nas três espécies agrupadas nessa classe. Os autossomos e o cromossomo X apresentam apenas heterocromatina centromérica, e o braço longo do cromossomo Y é heterocromático em *Molossus*, mas não em *N. laticaudatus*. As RONS localizam-se na constricção secundária do par 5 em *M. ater* e *M. molossus*, e em *N. laticaudatus* aparecem no braço curto desse mesmo cromossomo, provavelmente devido à ocorrência da inversão pericêntrica.

As espécies da classe II possuem $2n=40$, sendo $NF=50$ em *E. perotis* e $NF=64$ em *M. temminckii*. O cariótipo de *E. perotis* é muito semelhante morfologicamente ao de *M. ater* e apresenta, também, extensa homologia de bandas. As únicas exceções são os pares 9, 10, 17, 20 e Y, que são subtelocêntricos em *M. ater* e aparecem como acrocêntricos em *E. perotis*, pois não apresentam os pequenos braços eucromáticos, e o cromossomo 15, que em *M. ater* é acrocêntrico e em *E. perotis* é subtelocêntrico. A ausência dos pequenos braços

eucromáticos ocorrida nos cromossomos 8, 10, 17 e 20 de *E. perotis* é responsável pela diferença no seu número fundamental. O cariótipo de *M. temminckii*, também apresenta semelhança morfológica com o de *M. ater*, porém as homologias detectadas entre eles aparecem em menor grau, havendo homologias de alguns cromossomos inteiros, mas diversos cromossomos sobre os quais nada se pôde concluir.

A heterocromatina constitutiva apresenta pouca variação nas espécies dessa classe. Os autossomos e o cromossomo X de *E. perotis* possuem apenas heterocromatina centromérica e em *M. temminckii* ela distribui-se pelos centrômeros dos autossomos e na região telomérica do braço curto de um par de cromossomos, provavelmente o par 10. As RONS aparecem em *E. perotis* em apenas um par de cromossomos, o par 5, que é homólogo ao 5 de *M. ater*, e em *M. temminckii* aparecem em três pares de cromossomos, os 4, 5 e 6, sendo que o par 5 é homólogo ao cromossomo 5 de *M. ater*, porém apresenta-se invertido pericentricamente, à semelhança do cromossomo 5 de *N. laticaudatus*.

O heteromorfismo em relação ao tamanho da constrição secundária observado entre os homólogos do par cromossômico 5, nas duas espécies de *Molossus* e em *E. perotis*, deve ser consequência da natureza e da atividade das RONS. Essa diferença pode estar correlacionada com a quantidade de cistrons ribossômicos (MILLER et al., 1976a e b; MIKELSAAR et al., 1977; WARBURTON & HENDERSON, 1977) ou com a atividade diferencial desses cistrons entre os homólogos, uma vez que já se tem estabelecido que a atividade de cada uma das RONS é característica e herdada como propriedade de um cromossomo particular (HENDERSON & BRUCÉ, 1980; FERRARO et al., 1981; ZAKHAROV et al., 1981; WELTENS et al., 1985, entre outros). Heteromorfismo no tamanho das RONS já foi também observado em outras espécies de morcegos (MORIELLE & VARELLA-GARCIA, 1988).

Na classe III, que se constitui por *M. abrasus*, com $2n=34$ e $NF=64$, e por *E. glaucinus*, com $2n=40$ e $NF=64$, observa-se que há homologia nos padrões de bandas G com os cromossomos de *M. ater*, apesar da pouca similaridade morfológica. Em *M. abrasus*, com exceção do cromossomo 5, para o qual não foi encontrada homologia, todos os braços cromossômicos apresentam homologias com os cromossomos de *M. ater* e, com exceção do par 7, todos os outros cromossomos de *M. ater*

podem ser identificados no cariótipo de *M. abrasus*. Embora as duas espécies possuam número fundamental idêntico, observa-se, no cariótipo de *M. abrasus*, combinações de braços cromossômicos de *M. ater* resultantes de translocações robertsonianas (fusões ou fissões) e inversões pericêntricas que determinaram a diferença no número diplóide. Em *E. glaucinus*, as homologias reduzem-se a apenas alguns braços cromossômicos e a poucos cromossomos completos.

Molossops A heterocromatina constitutiva apresenta grande variação nessa classe. Em *M. abrasus*, ela aparece nas regiões centroméricas e na região telomérica do braço curto do par 15, variando pouco em relação a *M. ater*, enquanto que em *E. glaucinus* a heterocromatina aparece em regiões pericentroméricas e ocupa braços cromossômicos inteiros. As RONS em *M. abrasus* aparecem nas regiões terminais de cinco pares de cromossomos, os 11, 12, 14, 15 e 16, homólogos respectivamente aos pares 5 invertido, 10, 13, 20 e 22 de *M. ater*, espécie na qual apenas o par 5 é o portador das RONS. Em *E. glaucinus* elas aparecem em quatro pares, os 7, 9, 9 e 17, sendo que somente 7p possui homologia no cariótipo de *M. ater*.

A possibilidade de se agrupar as sete espécies pertencentes a quatro gêneros em apenas três classes, com base nos padrões cromossômicos, mostra que a família Molossidae se caracteriza, de modo geral, por não apresentar grandes variações, ao contrário do observado para outras famílias da ordem Chiroptera. Essa estabilidade nos cariótipos, exemplificada pelo conservacionismo entre espécies de gêneros diferentes, como o observado entre *M. ater*, *M. molossus*, *E. perotis* e *N. laticaudatus*, é significativa, porque os molossídeos do Velho e do Novo Mundo separaram-se há muito tempo, provavelmente no início do Mioceno (KODMAN, 1970).

Por outro lado, evidencia-se a ocorrência de diferenças acentuadas entre espécies de mesmo gênero, como acontece em *Molossops* e *Eumops*. Variação intragenérica no número diplóide já havia sido descrita em *Eumops* por WARNER et al. (1974) e em *Molossops* por WARNER et al. (1974) e GARDNER (1977), sendo que em *E. glaucinus* foi encontrada variação intra-específica no número diplóide, sem variação no número fundamental, com ocorrência também de formas heterozigotas. Esses autores não foram capazes de

determinar se o fenômeno envolvia a ocorrência de raças cromossômicas ou se a variação cariotípica observada era um polimorfismo amplamente distribuído, como o encontrado no gênero *Mimon* da família Phyllostomidae (BAKER et al., 1972). No entanto, levantaram a hipótese de que a variação fosse devida a rearranjos robertsonianos e inversões pericêntricas, que não puderam ser confirmados pelo desconhecimento dos padrões de bandamentos. Em *Molossops greenhalli*, GARDNER (1977) detectou variações entre populações em relação à posição do centrômero e no comprimento relativo de alguns cromossomos, porém a origem da variação também não pôde ser determinada.

O que se observou, no presente trabalho, é que a variação cromossômica detectada nos gêneros *Molossops* e *Eumops* deveu-se, principalmente a rearranjos robertsonianos, no primeiro gênero, e possivelmente a inversões, translocações e variações na quantidade de heterocromatina constitutiva, no segundo. Não há dúvidas de que as RONS também estiveram envolvidas na origem da variação, uma vez que elas podem, por sua natureza e comportamento, participar ativamente dos mecanismos de mudanças cromossômicas.

Esses resultados mostram que a variação que tem sido observada nas características cranianas e externas, em alguns dos taxa de molossídeos analisados (EGER, 1977; FREEMAN, 1981), tem sido acompanhada por rearranjos cromossômicos, mas isso não ocorre na família como um todo.

FREEMAN (1981), em um estudo multivariado realizado com 70 espécies da família Molossidae, apresentou resultados interessantes de relacionamentos fenéticos e filogenéticos para a família, verificando, também, variação intragenérica. Sua análise distinguiu, além de agrupamentos morfométricos distintos, graus de relacionamento entre os grupos, os quais foram usados na formulação de propostas de relacionamentos filogenéticos. Merecem destaque nesse estudo dois grupos: um extremamente coeso, sem grandes variações, constituído pelas espécies de *Molossus*, e outro com variação intragenérica máxima, constituído pelas espécies de *Eumops*. Os resultados dos estudos citogenéticos concordam com as características observadas por FREEMAN (1981). Em relação ao gênero *Eumops* a autora fez, ainda, uma interessante observação. Apesar dele

estar mais relacionado feneticamente ao gênero *Nyctinomops*, a espécie *E. auripendulus* está mais próxima de *Molossus bondae* e *M. sinaloae*, do que até mesmo de sua congênere *E. glaucinus*. Contudo, ela postulou que o gênero *Eumops* fosse monofilético e que as similaridades fenéticas entre *E. auripendulus* e *Molossus* tenham resultado da convergência de caracteres. Morfologicamente, os cromossomos de *E. auripendulus* assemelham-se mais aos de *E. glaucinus* do que aos de *M. sinaloae* (WARNER et al., 1974) e a monofilia do gênero é reforçada pelos dados cromossômicos do presente trabalho, pois ambas as espécies de *Eumops* analisadas apresentaram caracteres considerados primitivos, indicando uma origem comum.

O conservacionismo inter-genérico no número diplóide e número fundamental já havia sido referido em várias espécies de molossídeos que tiveram seus cariótipos analisados. Entretanto, esse conservacionismo restringia-se apenas aos aspectos morfológicos, uma vez que não havia análise de padrões de bandas que permitissem comparações. Com base nos resultados do presente trabalho, pode-se concluir que as similaridades morfológicas nos cariótipos de algumas espécies de gêneros diferentes parecem abranger semelhanças também nos padrões de bandas.

WARNER et al. (1974) e BAKER et al. (1982) sugeriram que o cariótipo primitivo da família teria $2n = 48$ e seria provavelmente semelhante ao das espécies *Molossus*, *Otomops* e *Tadarida*, o que é suportado pelos dados do presente trabalho. Além disso, o fato desse cariótipo ser comum a várias espécies de gêneros diferentes, sugere que ele tenha evoluído de um ancestral que possuía os vinte e três pares de autossomos, provavelmente homólogos aos identificados em *Molossus* e *N. laticaudatus*.

Se essas conclusões realmente corresponderem ao que teria sido o cariótipo primitivo dos molossídeos, então os gêneros *Eumops* e *Molossops* incluem espécies com cariótipo semelhante ao ancestral e com cariótipos derivados. Assim sendo, a identificação de quais são os caracteres possivelmente primitivos (plesiomórficos) e derivados (apomórficos) é de grande importância para o entendimento dos eventos evolutivos.



estar mais relacionado feneticamente ao gênero *Nyctinomops*, a espécie *E. auripendulus* está mais próxima de *Molossus bondae* e *M. sinaloae*, do que até mesmo de sua congênere *E. glaucinus*. Contudo, ela postulou que o gênero *Eumops* fosse monofilético e que as similaridades fenéticas entre *E. auripendulus* e *Molossus* tenham resultado da convergência de caracteres. Morfologicamente, os cromossomos de *E. auripendulus* assemelham-se mais aos de *E. glaucinus* do que aos de *M. sinaloae* (WARNER et al., 1974) e a monofilia do gênero é reforçada pelos dados cromossômicos do presente trabalho, pois ambas as espécies de *Eumops* analisadas apresentaram caracteres considerados primitivos, indicando uma origem comum.

O conservacionismo inter-genérico no número diplóide e número fundamental já havia sido referido em várias espécies de molossídeos que tiveram seus cariótipos analisados. Entretanto, esse conservacionismo restringia-se apenas aos aspectos morfológicos, uma vez que não havia análise de padrões de bandas que permitissem comparações. Com base nos resultados do presente trabalho, pode-se concluir que as similaridades morfológicas nos cariótipos de algumas espécies de gêneros diferentes parecem abranger semelhanças também nos padrões de bandas.

WARNER et al. (1974) e BAKER et al. (1982) sugeriram que o cariótipo primitivo da família teria $2n=48$ e seria provavelmente semelhante ao das espécies *Molossus*, *Otomops* e *Tadarida*, o que é suportado pelos dados do presente trabalho. Além disso, o fato desse cariótipo ser comum a várias espécies de gêneros diferentes, sugere que ele tenha evoluído de um ancestral que possuía os vinte e três pares de autossomos, provavelmente homólogos aos identificados em *Molossus* e *N. laticaudatus*.

Se essas conclusões realmente corresponderem ao que teria sido o cariótipo primitivo dos molossídeos, então os gêneros *Eumops* e *Molossops* incluem espécies com cariótipo semelhante ao ancestral e com cariótipos derivados. Assim sendo, a identificação de quais são os caracteres possivelmente primitivos (plesiomórficos) e derivados (apomórficos) é de grande importância para o entendimento dos eventos evolutivos.

As três classes inicialmente identificadas, com base na similaridade dos padrões cromossômicos, não são adequadas para esclarecer os verdadeiros relacionamentos cariotípicos entre as sete espécies estudadas. Elas simplesmente destacam, de certa forma, o conservacionismo cariotípico da família. Por isso, procurou-se agrupar as espécies de acordo com a análise dos caracteres supostamente primitivos e apomórficos, o que permitiu a diferenciação de outras três classes. A primeira é constituída pelas espécies que têm muitas características primitivas, que são *M. ater* e *M. molossus*. A segunda é composta pelas espécies *M. abrasus*, *M. temminckii* e *N. laticaudatus* que apresentam além de características primitivas, diversas apomorfias. Uma das apomorfias, ou seja, a inversão do cromossomo 5 é compartilhada (sinapomorfia) pelas três espécies. Os demais caracteres derivados observados em *M. abrasus* e *M. temminckii* parecem ser devidos a eventos independentes e únicos para cada uma das espécies, originando suas autapomorfias, que alcançaram maior número em *M. abrasus*. A terceira classe engloba as espécies para as quais além das características primitivas, algumas autapomorfias foram identificadas, ou seja, *E. glaucinus* e *E. perotis*. As autapomorfias dessa classe também originaram-se de eventos únicos e independentes, em cada uma das espécies.

Considerado os gêneros analisados e o estado dos caracteres (primitivos ou derivados) chega-se à formulação do esquema apresentado na Figura 25, onde podem ser visualizadas as três classes identificadas.

Embora o cariótipo de *M. ater* tenha sido o escolhido para representar aquele provavelmente mais próximo ao primitivo, há indicações de que o cariótipo de *N. laticaudatus* também poderia ser indicado como semelhante ao mais primitivo. Um dos reforços a essa proposição é o fato de que, na proposta filogenética de FREEMAN (1981) já mencionada anteriormente, *Molossus* é gênero que apresenta a maior quantidade de traços derivados, seguido em ordem decrescente por *Eumops*, *Nyctinomops* e *Molossops*. Além disso, *Nyctinomops* relaciona-se feneticamente mais com as espécies do Velho Mundo, como as do gênero *Tadarida*, por isso o cariótipo de *Nyctinomops laticaudatus* possivelmente se assemelharia mais ao da condição primitiva. Em relação à morfologia cromossômica, *N. laticaudatus*



assemelha-se mais a *Tadarida* do que a *Molossus*. As descrições dos cariótipos de algumas espécies do gênero *Tadarida* não referem a presença de uma constrição secundária em um par de acrocêntricos grandes (DULIC & MUTERE, 1973; WARNER et al., 1974; HARADA et al., 1982), como o observado nas descrições do cariótipo de *Otomops*, um outro gênero do Velho Mundo (DULIC & MUTERE, 1973; WARNER et al., 1974). Tal par cromossômico, possivelmente, equivale ao cromossomo 5 do cariótipo de *N. laticaudatus* e *Molossus*, indicando que se *Tadarida* for mais primitivo que *Otomops*, a condição encontrada em *N. laticaudatus* é mais primitiva. Com base nessa hipótese, a interpretação representativa da sequência dos eventos cromossômicos ocorridos que poderia ser feita está representada no esquema da Figura 26.

Entretanto, em qualquer dos casos, isto é, quer seja *Molossus* ou *Nyctinomops* o mais primitivo, as conclusões a que se chega podem ser resumidas como segue:

- a) Cromossomicamente, *Molossus* está mais próximo a *Nyctinomops laticaudatus* do que a *E. perotis*;
- b) *Molossus* assemelha-se cromossomicamente mais a *E. perotis* que a *E. glaucinus* e *E. auripendulus*, e segundo FREEMAN (1981), essa última espécie está mais próxima feneticamente de algumas espécies de *Molossus* do que de seus congêneres;
- c) *Molossops* assemelha-se cromossomicamente mais a *N. laticaudatus* que a *Molossus*.

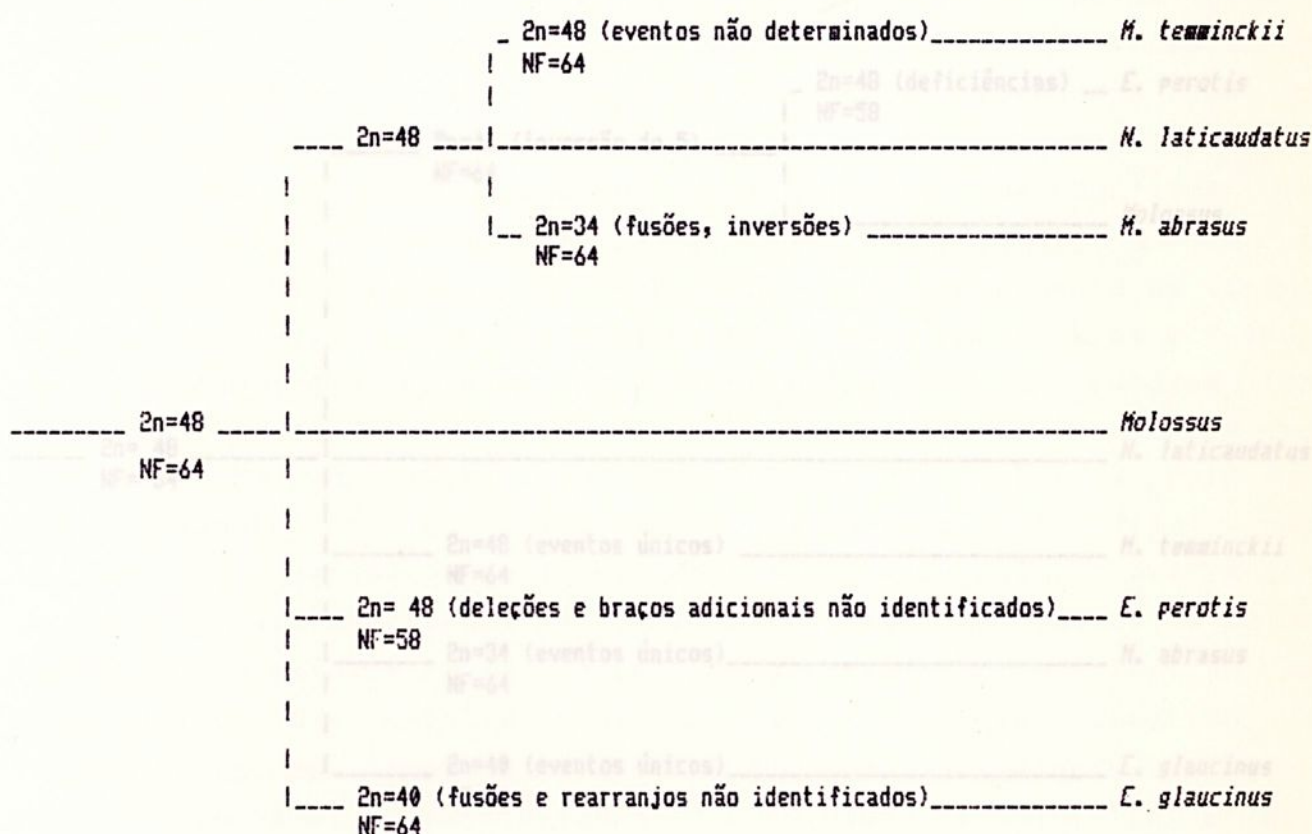


Figura 25. Esquema representativo das mudanças cromossômicas propostas na evolução cariotípica dos taxa estudados, assumindo que a condição primitiva é semelhante ao cariótipo de *M. ater*.

C. Fragilidade cromossômica

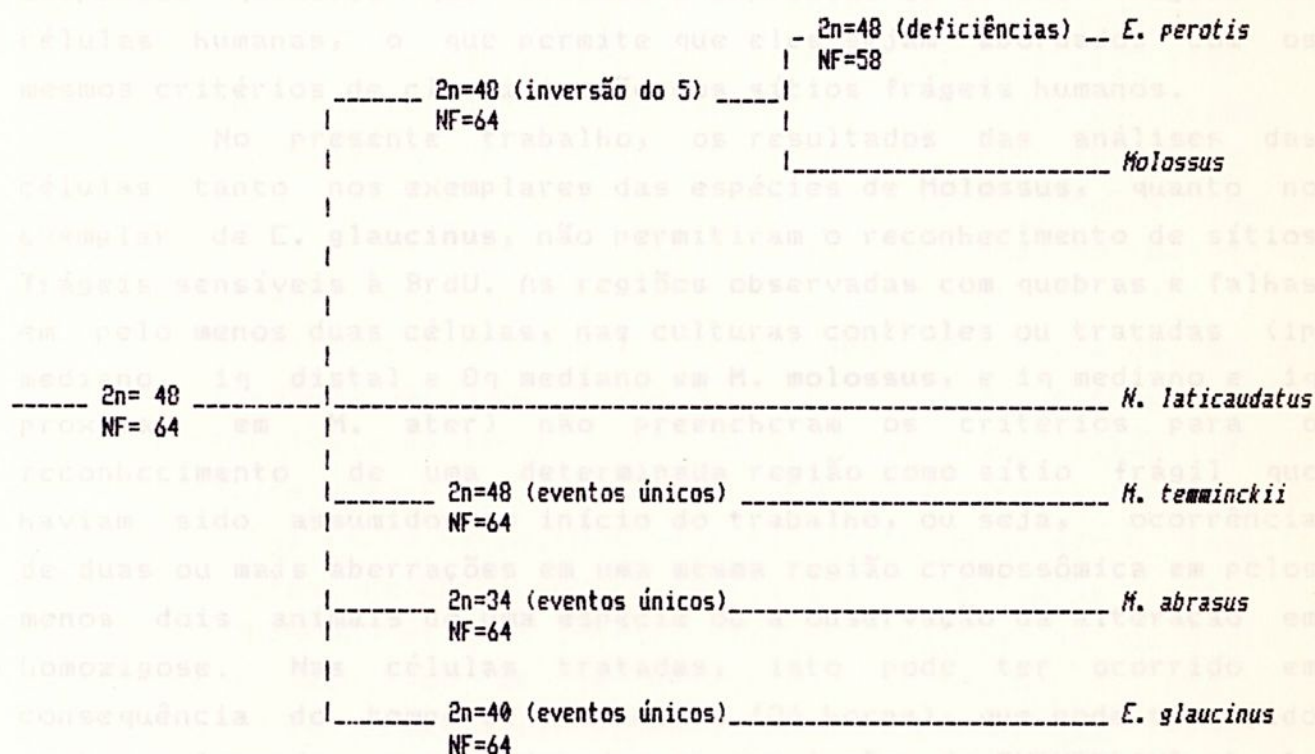


Figura 26. Esquema representativo das mudanças cromossômicas propostas na evolução cariotípica dos taxa estudados, assumindo que a condição primitiva é semelhante ao cariótipo de *N. laticaudatus*.

(BLANK et al., 1983; SUTHERLAND & HATTEI, 1987; SUTHERLAND & LEBETTER, 1988).

Sítios frágeis sensíveis à BrdU já foram observados em outras espécies animais. SCHNEIDER et al. (1986) verificaram que um cromossomo submetacêntrico de camundongo *Peromyscus eremicus*

C. Fragilidade cromossômica

Desde sua descoberta por Deckaban em 1965, inúmeros sítios frágeis tem sido descritos, não só para o cariótipo humano, mas também para uma variedade de outras espécies, desde primatas à pequenos roedores. À semelhança dos sítios frágeis humanos, os encontrados nas diferentes espécies foram induzidos pelos mesmos compostos químicos que induzem a expressão de sítios frágeis em células humanas, o que permite que eles sejam abordados com os mesmos critérios de classificação dos sítios frágeis humanos.

No presente trabalho, os resultados das análises das células tanto nos exemplares das espécies de *Molossus*, quanto no exemplar de *C. glaucinus*, não permitiram o reconhecimento de sítios frágeis sensíveis à BrdU. As regiões observadas com quebras e falhas em pelo menos duas células, nas culturas controles ou tratadas (1q mediano, 1q distal e 8q mediano em *M. molossus*, e 1q mediano e 1q proximal em *M. ater*) não preencheram os critérios para o reconhecimento de uma determinada região como sítio frágil que haviam sido assumidos no início do trabalho, ou seja, ocorrência de duas ou mais aberrações em uma mesma região cromossômica em pelos menos dois animais de uma espécie ou a observação da alteração em homozigose. Nas células tratadas, isto pode ter ocorrido em consequência do tempo de tratamento (26 horas), que pode ter sido muito prolongado, se consideradas as conclusões de SUTHERLAND et al. (1984) de que a expressão máxima de sítios frágeis comuns sensíveis ou dependentes da 5-BrdU, em linfócitos humanos, é alcançada após 4 a 12 horas do tratamento.

Em células humanas, são necessários tratamentos prolongados (20 a 26 horas) para a expressão de sítios frágeis raros. As regiões acima referidas poderiam ser sítios frágeis raros, pois expressaram-se em baixas frequências e não foram observados em homozigose, que são características que definem um sítio frágil raro (BERGER et al., 1985; SUTHERLAND & MATTEI, 1987; SUTHERLAND & LEDBETTER, 1988).

Sítios frágeis sensíveis à BrdU já foram observados em outras espécies animais. SCHNEIDER et al. (1980) verificaram que um cromossomo submetacêntrico do camundongo *Peromyscus eremicus*



apresentava uma região de fragilidade, observada após tratamento com BrdU. Da mesma forma, LIN et al. (1984) verificaram que células de hamster chinês, quando tratadas com BrdU por um ou dois ciclos celulares, apresentavam uma alta frequência de alterações, cerca de 50% delas localizadas em um sítio específico (1q22) e observadas em algumas células em ambos os homólogos. Nos dois exemplos citados evidenciaram-se sítios frágeis comuns em autossomos, mas há descrição de sítio frágil sensível à BrdU também em cromossomos X, como é o caso da rena *Rangifer tarandus* (GRIPENBERG et al., 1971).

Embora esses sítios tenham sido classificados como comuns, eles foram induzidos por BrdU após tratamentos curtos (5 a 7 horas) e longos (26 horas), o que indica que tratamentos longos também podem induzir a expressão de sítios frágeis comuns, ao menos em células de algumas espécies animais.

O mecanismo pelo qual a BrdU induz a expressão de sítios frágeis cromossômicos não está ainda bem esclarecido. Alguns estudos sobre a cronologia de incorporação desse agente nas células indicam que seu efeito é exercido durante os estágios finais da síntese de DNA, e envolve tanto as regiões onde se localizam os sítios frágeis como as regiões que duplicam seu DNA durante os estágios finais da fase S (SUTHERLAND et al., 1984, 1985). Há hipóteses de que o sítio frágil seja resultado de um atraso na duplicação do DNA em consequência da própria estrutura na região, ou de uma atividade transcricional que retarda a condensação na mitose (Le DEAU, 1986; SUTHERLAND, 1988; MORRIS, 1971).

Em relação ao tipo das alterações observadas nas células tratadas com 5-BrdU, no presente trabalho, notou-se que a maioria delas (sítio-específicas ou aleatórias) foram falhas do tipo cromatídicas. Esses achados concordam com as observações de LIN et al. (1984) em células de hamster e com outros dados da literatura, que também indicaram que, quando o agente indutor é a BrdU, as aberrações observadas são primariamente do tipo cromatídicas (MORRIS, 1971, para referências).

Dos resultados obtidos nas análises cromossômicas, após tratamento com a afidicolina, foi possível reconhecer duas regiões de fragilidade comuns às duas espécies de *Molossus* (1q mediano e 8q mediano), uma (3q proximal), detectada somente em *M. ater* e uma



(1p mediano) detectada somente em *M. molossus*. A frequência de expressão das regiões 1q mediano e 3q mediano nas células controle de dois espécimes de *M. molossus*, associada ao fato de que uma delas, ou seja, a 3q mediano, também foi observada com alta frequência em células controle de um indivíduo dessa mesma espécie no tratamento com BrdU, permitiu a classificação dessas regiões como sítios ou regiões frágeis (hot spots) comuns espontâneas, que têm sua frequência de expressão aumentada após indução por APC. Ressalta-se, também, que as regiões 1p mediano e 1q mediano, foram as mesmas que apresentaram alterações nas células controles e tratadas com a 5-BrdU. Embora naqueles casos elas não tenham podido ser classificadas como sítios frágeis, os resultados obtidos com APC reforçam a hipótese de que tais regiões sejam realmente sítios cromossômicos frágeis. humana, os sítios frágeis cromossômicos têm sido analisados.

A afidicolina foi testada em culturas de células de outros animais, e o que se verificou foi que os sítios frágeis por ela induzidos geralmente coincidiam com os induzidos pelos antagonistas do metabolismo do folato, como o metotrexato, e que se expressavam de forma semelhante ao observado em células humanas. Da mesma forma que para a BrdU, já foram encontrados sítios frágeis sensíveis à APC em autossomos e cromossomos X (DJALALI et al., 1987; ROBINSON & ELDER, 1987; WURSTER-HILL et al., 1988; ELDER & ROBINSON, 1989; McALLISTER & GREENBAUM, 1991; POULSEN & RONNE, 1991; STONE et al., 1991; RIGGS & CHRISMAN, 1991). Em todos os casos, provavelmente, tratavam-se de sítios frágeis comuns, pois a afidicolina é considerada indutora somente desse tipo de sítio frágil (SUTHERLAND 1990; HECHT et al., 1990).

Em relação ao tipo das alterações encontradas nas células tratadas com APC, notou-se que os eventos mais comuns foram as falhas cromossômicas. Os estudos sobre sítios frágeis induzidos por APC em animais não destacaram o tipo das alterações observadas. Entretanto, MURANO et al. (1989a e b) encontraram variações nas frequências de quebras e falhas do tipo cromossômicas e cromatídicas, em diferentes células humanas (linfócitos, medula óssea e fibroblastos), sugerindo que o tipo de evento observado possa refletir o número de divisões que uma determinada célula sofreu após a introdução da APC na cultura, assim como a eficácia

dos mecanismos de reparo.

A afidicolina, dependendo do estágio do ciclo celular a ela exposto e da concentração, pode atuar inibindo a atividade das DNA polimerases alfa e delta, ambas envolvidas com a duplicação do DNA (IKEGAMI et al., 1978; HANAOKA et al., 1977; LICASTRO et al., 1985, entre outros). Parece que sua ação consiste no bloqueio da forquilha de duplicação (LONN & LONN, 1983) e na interferência na junção dos segmentos de DNA adjacentes, principalmente na região dos sítios frágeis (YAGURA et al., 1982; GLOVER et al., 1984; ALNSTRON, 1989). Dessa forma, os mecanismos de reparo tornam-se insuficientes para corrigir as aberrações ocorridas nessas regiões, que são, então, vistas como alterações cromossômicas, independentemente do número de divisões que a célula tenha sofrido.

Na espécie humana, os sítios frágeis cromossômicos têm sido analisados principalmente em culturas de linfócitos estimulados com fito-hemaglutinina, nas quais foram documentados inúmeros sítios frágeis raros e comuns (SUTHERLAND & MATTEI, 1987; HECHT et al., 1990). Contudo, há também expressão de sítios frágeis em fibroblastos, células de medula óssea e amniócitos cultivados (BARBI et al., 1983; BRYANT, 1983; STEINBACH et al., 1983; MORGAN et al., 1988; PRZYLEPA & WENGER, 1980; MURANO et al., 1989a e b). A análise dos sítios frágeis em células de diferentes tecidos mostrou que a frequência de expressão e distribuição de determinados sítios varia com o tipo celular, indicando a ocorrência de sítios frágeis tecido-específicos (HECHT et al., 1987; MORGAN et al., 1988; MURANO et al., 1989a e b).

Nas demais espécies, os sítios frágeis têm sido igualmente identificados em linfócitos e fibroblastos, apresentando, também, variação tecido-específico na frequência de expressão. HUNT & BURGOYNE (1984) verificaram que a mutação "sex reversed" (srx), em camundongos, estava associada à expressão de um sítio frágil tecido-específico. ROBINSON & ELDER (1989), verificaram que de um total de 39 sítios frágeis identificados nos cromossomos de fibroblastos e linfócitos de camundongos, apenas 4 eram comuns aos dois tipos celulares e 34 não mostraram correspondência de locos, indicando provavelmente um certo grau de especificidade do tecido na expressão de sítio frágil.

Todos estes estudos, apesar da diversidade de enfoques analisados, têm mostrado que os sítios frágeis se expressam mais facilmente em linfócitos. Embora os fibroblastos de muitas espécies possam ser facilmente cultivados, eles geralmente são refratários à expressão dos sítios frágeis (ROBINSON & ELDER, 1987). As baixas frequências de expressão dos sítios frágeis, nas culturas tratadas deste trabalho, podem ser consequência dessa refratividade.

Alguns autores detectaram um alto grau de conservação evolutiva nos sítios frágeis de espécies relacionadas evolutivamente. Contudo, o conservacionismo de sítios frágeis não se limita só a espécies próximas. Em relação ao cromossomo X de mamíferos, verificou-se homologia de sítio frágil entre o homem e algumas espécies de cães domésticos (STONE et al., 1991). Por outro lado, em grupos de espécies taxonomicamente próximas, caracterizados por uma taxa rápida e acentuada de evolução cromossômica, como nos roedores (BRITTEN, 1986), o conservacionismo de sítios frágeis não é tão evidente. ELDER & ROBINSON (1989), quando compararam os sítios frágeis entre ratos e camundongos, verificaram que apenas um pequeno número deles era conservado e que eles se expressavam, sob as mesmas condições, com frequências diferentes nas células das duas espécies. A coincidência dos resultados observados em *M. ater* e *M. molossus* reforça o conservacionismo de sítios frágeis em espécies próximas e relacionadas cromossomicamente.

Baseado nos resultados de vários estudos, uma série de especulações tem sido feitas sobre um possível papel dos sítios frágeis na evolução do cariótipo de algumas espécies, durante os processos de especiação. Em primatas, cerca de 50% dos pontos de quebras envolvidos nas translocações ou inversões que ocorreram durante a evolução cariotípica do grupo consiste em sítios frágeis ou regiões muito próximas a eles, indicando que tais regiões são sítios de recombinação (GUICHOUA et al., 1982; JOTTERAND & BELLOMO, 1984). Da mesma forma, em espécies de porcos domésticos, os pontos de quebras envolvidos nas translocações recíprocas que ocorrem continuamente e de forma não casual no grupo coincidem com a localização dos sítios frágeis (RIGGS & CHRISMAN, 1991).

Um sítio frágil presente na região 1q proximal em *Ellobius lutescens*, uma espécie de roedor, flanqueia um segmento geralmente



envolvido em uma inversão pericêntrica polimórfica que caracteriza o cromossomo 1 dessa espécie (DJALALI et al., 1985). Observou-se, também, associação dos sítios frágeis com regiões limites de heterocromatina constitutiva adicionada ou presente no cariótipo primitivo, centrômeros latentes e, ainda, com RONS (SANZ et al., 1986; MIRÓ et al., 1987; TEWARI et al., 1987).

O que os pesquisadores de sítios frágeis animais questionam é se eles seriam resultantes dos processos evolutivos, ou atuariam como fatores de predisposição a esses processos. MIRÓ et al. (1987) acreditam que, de algum modo, os sítios frágeis têm dirigido a evolução cromossômica, uma vez que um mesmo sítio pode ser encontrado em cromossomos rearranjados e nos supostamente considerados como ancestrais.

O mapeamento de sítios frágeis em diferentes espécies tem mostrado que algumas dessas regiões estão incluídas em grupos de ligação e são conservadas em sintenia (DJALALI et al., 1987). Outros correlacionam-se com grupos sintênicos que foram rompidos, sugerindo que os sítios frágeis comuns devem ser os remanescentes físicos que delinearam os grupos de ligação ancestrais ou os sítios que são preferencialmente quebrados, para criar novos rearranjos sintênicos em espécies descendentes (THREADGILL & WOMACK, 1987). Essas hipóteses, associadas às descobertas moleculares envolvendo os sítios frágeis, abrem caminho e fornecem evidências para que se descubra a natureza e o papel desses sítios nos cromossomos de mamíferos.

Contudo, nenhuma associação foi observada entre os sítios frágeis detectados nas duas espécies de *Molossus* e os eventos cromossômicos que ocorreram na diferenciação das espécies analisadas no presente trabalho. De modo geral, os cromossomos que apresentaram a região frágil mantiveram-se conservados no cariótipo das outras espécies, tal como aparecem em *Molossus*.

V. RESUMO E CONCLUSÕES

O estabelecimento de culturas celulares é interessante pois possibilita a obtenção de células em grande quantidade, permitindo a realização de uma série de investigações biológicas, entre as quais o estudo citogenético. O presente trabalho teve como um dos objetivos investigar as condições favoráveis para o cultivo e congelamento de fibroblastos de morcegos no Laboratório de Citogenética de Vertebrados do Departamento de Biologia do IBILCE, UNESP, de São José do Rio Preto. Concomitantemente, o estudo objetivou caracterizar cromossomicamente algumas espécies de morcegos da família Molossidae e obter informações que pudessem ser usadas no esclarecimento das relações filogenéticas e assim ajudar na discussão sobre a evolução na família.

Os ensaios sobre condições de semeadura e cultivo celular, realizados em 165 amostras obtidas de 22 espécimes, revelaram que fragmentos de orelha e cauda constituem-se fonte adequada de fibroblastos. Esses fragmentos, quando colhidos assepticamente, processados pela técnica de explante (desagregação mecânica) e semeados em frascos plásticos de poliestireno das marcas Descarplast (Brasil), Costar ou Corning (EUA), originaram culturas celulares que puderam ser desenvolvidas nos meios Ham-F10 ou MEM-Eagle, enriquecidos com L-glutamina e 20% de soro fetal bovino, em pH 6,5 - 7,0. A densidade celular ótima na semeadura foi entre $1,62 \times 10^4$ e $1,5 \times 10^5$ células/ml e os fibroblastos dos morcegos atingiram a senescência por volta de 40º dia após o início da proliferação, geralmente após seis ou sete repiques.

Os ensaios de congelamento confirmaram os dados de literatura de que o congelamento em velocidade moderada (resfriamento a -20°C e congelamento a -196°C ou resfriamento a -20°C e congelamento a -180°C e -196°C) foi conveniente para a conservação das células. Os ensaios mostraram, ainda, que a densidade celular ao congelamento deve ser elevada ($6,2 \times 10^5$ a $3,4 \times 10^6$ células/ml), para que após o descongelamento as células viáveis sejam capazes de reproduzir uma cultura. O tempo de estocagem das células, que variou de 3 a 40 dias, pareceu não interferir na taxa de proliferação ou viabilidade após



descongelamento. Nas análises citogenéticas realizadas em 32 espécimes das espécies *Eumops auripendulus*, *E. glaucinus*, *E. perotis*, *Molossops abrasus*, *M. temminckii*, *Molossus ater*, *M. molossus* e *Nyctinomops laticaudatus*, em células de medula óssea e fibroblastos, utilizou-se os bandamentos G e R para identificar os cromossomos homólogos e as homologias cromossômicas, o bandamento C para a identificação da heterocromatina constitutiva e a coloração pelo nitrato de prata para identificação das regiões organizadoras de nucléolos (RONs).

As análises revelaram que cinco espécies de três gêneros possuem $2n=40$ (*E. perotis*, *M. temminckii*, *M. ater*, *M. molossus* e *N. laticaudatus*) e as outras três, pertencentes a dois gêneros, têm $2n$ diferentes (*E. auripendulus*, com $2N=42$; *E. glaucinus*, com $2n=40$ e *M. abrasus*, com $2n=34$). Entretanto, a maioria delas possui $NF=64$ (*E. glaucinus*, *M. temminckii*, *M. abrasus*, *M. ater*, *M. molossus* e *N. laticaudatus*).

A heterocromatina constitutiva é somente centromérica nas espécies *M. ater*, *M. molossus*, *E. perotis* e *N. laticaudatus*, mas aparece também em regiões teloméricas em *M. abrasus* e *M. temminckii* e em braços cromossômicos inteiros em *E. glaucinus*. As RONs variaram em número, ocorrendo em um par de cromossomos em *M. ater*, *M. molossus*, *E. perotis* e *N. laticaudatus*, em três pares em *M. temminckii*, em quatro pares em *E. glaucinus* e em cinco pares em *M. abrasus*. Nas espécies *M. ater*, *M. molossus* e *E. perotis* e em um par cromossômico de *M. temminckii* as RONs localizam-se em constrições secundárias intercalares, e nos demais casos dispõem-se em regiões teloméricas.

Das análises concluiu-se que, em relação à homologia dos padrões de bandas G, *Molossus ater* e *M. molossus* estão mais próximos de *N. laticaudatus* do que de *E. perotis*, porém esse último assemelha-se mais aos *Molossus* que aos seus congêneres *E. auripendulus* e *E. glaucinus*. *Molossops*, assemelha-se cromossomicamente mais a *N. laticaudatus* que a *Molossus*.

Verificou-se, também, que na família Molossidae, há tanto conservacionismo entre espécies de gêneros diferentes, observado em *M. ater*, *M. molossus*, *E. perotis* e *N. laticaudatus*, como diferenças acentuadas entre espécies de mesmo gênero, o que acontece em

Molossops e *Eumops*. A variação cromossômica observada nesses dois gêneros deve-se, principalmente, a rearranjos robertsonianos no primeiro caso e provavelmente a inversões, translocações e variação na quantidade de heterocromatina constitutiva, no segundo caso. As RONS também estão envolvidas na variação.

A análise de fragilidade cromossômica, espontânea ou induzida por bromodesoxiuridina (5-BrdU) e afidicolina (APC), mostrou que, à semelhança do observado em outros animais, os morcegos possuem regiões cromossômicas com maior susceptibilidade à quebras. A pesquisa de fragilidade cromossômica, em espécimes de *M. ater*, *M. molossus* e *E. glaucinus*, revelou que tanto a BrdU como a APC induzem aberrações cromossômicas estruturais tipo quebras e falhas. Porém, nenhuma das regiões alteradas pode ser considerada sítio frágil sensível à BrdU, pois quando as quebras atingiram a frequência mínima de 2%, não se repetiram em mais de um animal e não foram observadas em homozigose. Em relação à APC, foi possível reconhecer quatro regiões de fragilidade: duas comuns à *M. ater* e *M. molossus* (1q mediano e 8q mediano), uma observada somente em *M. ater* (3q proximal) e uma observada somente em *M. molossus* (1p mediano). Algumas dessas regiões puderam ser consideradas, em *M. molossus*, sítio frágil mesmo sem indução, como 1q mediano e 8q mediano.

A associação que tem sido observada em outros animais entre sítios frágeis e pontos de quebras envolvidos em rearranjos levou a que se fizesse uma comparação entre a localização dos sítios frágeis identificados e os rearranjos observados na diferenciação das espécies estudadas. Os resultados mostraram que as regiões com fragilidade não parecem estar envolvidas nos rearranjos que ocorreram durante a diferenciação das espécies de molossídeos.

E. glaucinus, *E. perotis*, *Molossops abrasus*, *M. temminckii*, *Molossus ater*, *M. molossus* and *Nyctinomops laticaudatus*. Karyotypic analysis was performed on bone marrow and fibroblast-like cells. G-banding patterns were used to identify chromosomal homologies. C-banding to determine constitutive heterochromatin regions and silver staining to detect nucleolar organizer regions (NORs).

Five species from three genera have $2n=42$ (*E. perotis*, *M. abrasus*, *M. temminckii*, *M. ater*, *M. molossus* and *N. laticaudatus*) and three species from the remaining two genera have $2n=42$ (*E.*

VI. SUMMARY

The establishment of cell cultures is a useful tool for biological research, specially for cytogenetic studies. The present investigation aims at the implantation of techniques for fibroblast - like cell culture in the Cytogenetic Laboratory of the Department of Biology, UNESP at São José do Rio Preto and the chromosomal characterization of some species of Molossidae bats, in order to clarify the phylogenetic relationships within this family.

Assays on cell culture conditions were performed in 165 samples obtaining from 79 specimens. Ear and tail biopsies provided fibroblast - rich material for cell cultures. Mechanical disaggregation permitted migrating cells from the tissue fragments to adhere and grow on plastic substrates, such as culture flasks from Descarplast (Brazil), Corning and Costar (USA). MEM- Eagle and Ham-F10, supplemented with 20% fetal calf serum and L-glutamine were demonstrated to supply nutritional conditions for cell growth.

Slow freezing was the most effective method for preserving bat cells. Highest rates of cell viability after thawing were reached after two (-20°C and -196°C) or three (-20°C , -180°C and -196°C) freezing steps.

High cell density, around 6.2×10^5 and 3.4×10^6 cells/ml, appeared to be an important factor for establishing new cultures from frozen material. Variation in storage time from 3 to 40 days seems to induce no changes in the proliferation or viability rates after thawing.

The cytogenetic study was carried out on 32 individuals belonging to eight Molossidae species: *Eumops auripendulus*, *E. glaucinus*, *E. perotis*, *Molossops abrasus*, *M. temminckii*, *Molossus ater*, *M. molossus* and *Nyctinomops laticaudatus*. Karyotypic analysis was performed on bone marrow and fibroblast - like cells. G-banding patterns were used to identify chromosomal homologues, C-banding to determine constitutive heterochromatin regions and silver staining to detect nucleolar organizer regions (NORs).

Five species from three genera have $2n=40$ (*E. perotis*, *M. abrasus*, *M. temminckii*, *M. ater*, *M. molossus* and *N. laticaudatus*) and three species from the remaining two genera have $2n=42$ (*E.*



auripendulus), $2n=40$ (*E. glaucinus*) and $2n=34$ (*M. abrasus*). The fundamental number (NF), however, is 64 in almost all of the species: *E. glaucinus*, *M. abrasus*, *M. ater*, *M. molossus*, and *N. laticaudatus*. Constitutive heterochromatin is found only in centromeric regions in *E. perotis*, *M. ater*, *M. molossus*, and *N. laticaudatus*, but also in telomeric regions in *M. abrasus* and *M. temminckii* and in full chromosome arms in *E. glaucinus*.

The number of NORs was variable: there is one chromosome pair bearing NORs in *E. perotis*, *M. ater*, *M. molossus*, and *N. laticaudatus*, three in *M. temminckii*, four in *E. glaucinus* and five in *M. abrasus*. NORs are located in intercalary secondary constrictions in *E. perotis*, *M. ater*, *M. molossus*, and in one chromosome pair of *M. temminckii*, and in telomeric regions in the remaining situations.

Based in G-banding homology, *M. ater* and *M. molossus* are closer to *N. laticaudatus* than to *E. perotis*. On the other hand, *E. perotis* is more similar to *Molossus* than to *E. glaucinus*. *M. abrasus* and *M. temminckii* were closer to *N. laticaudatus* than to *M. ater* and *M. molossus*.

The family Molossidae showed conservatism among species of different genera (such as *Molossus ater*, *M. molossus*, *Eumops perotis* and *Nyctinomops laticaudatus*), as well as striking differences between species of some genera (such as *Molossops* and *Eumops*). The chromosomal variation was due to robertsonian rearrangements, in the first case, and probably to inversions, translocations and changes in the constitutive heterochromatin in the second case. NORs were also involved in these changes.

The presence of spontaneous or 5-bromodeoxyuridine (BrdU) or aphidicolin (APC)-induced fragile sites in bat karyotypes was also analysed in this study. Chromosome breaks and gaps were induced both by BrdU and APC. However, BrdU induced fragile sites were not detected, since the high frequency of break in a given site was not shared by different individuals, and homozygosity was not observed. Four chromosomal regions were ascertained as APC-induced fragile sites: one in 1q median and one in 8q median in *M. ater* and *M. molossus*, one in 3q proximal in *M. ater* and one in 1p median in

M. molossus. The fragile sites in 1q and 8q were also observed without induction in *M. molossus*.

Despite the observed association between the fragile sites and the breakpoints involved in chromosomal rearrangements in several other animal species, the results of the present study did not show any coincidence between the detectable fragile sites and the breakpoints involved in chromosomal rearrangements during the evolution of the Molossidae species.

BAKER, R.J. Karyotypic variations in bats. *Southwestern Naturalist*, v.12, p. 447-450, 1967.

BAKER, R.J. Karyotypic trends in bats. In: Wiersma, W.A. (Ed.). *Biology of bats*. New York: Academic Press, 1970. p. 65-90.

BAKER, R.J. Karyology. *Spec. Publ. Mus., Texas Tech Univ.*, v. 16, p. 147-155, 1979.

BAKER, R.J.; PATTON, J.L. Karyotypic variation of North American vesperilionid bats. *J. Mamm.*, v. 46, p. 278-285, 1967.

BAKER, R.J.; LOPEZ, G. Karyotypic studies of the insular populations of bats on Puerto Rico. *Carliologia*, v. 23, p. 443-476, 1979.

BAKER, R.J.; HSU, T.C. Further studies in sex chromosome systems of American leaf-nosed bats (Chiroptera: Phyllostomidae). *Cytogenetics*, v. 9, p. 121-128, 1979.

BAKER, R.J.; GARDNER, A.L.; PATTON, J.L. Chromosomal polymorphism in the phyllostomid bat *Myotis crenulatus* (Geoffroy). *Experientia*, v. 28, p. 969-970, 1972.

BAKER, R.J.; KOOP, B.F.; HAIDUK, R.W. Resolving systematic relationships with G-bands: a study of five genera of South American cricetine rodents. *Syst. Zool.*, v. 32, p. 443-450, 1983.

BAKER, R.J.; GUNDELIN, H.W.; HOOD, C.S. Role of chromosomal banding patterns in understanding mammalian evolution. In: BENNETT, H.B. (Ed.). *Current mammalogy*. Plenum, New York, 1987. v. 1, p. 47-74.

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

BAKER, R.J.; NOVACEK, M.; SIMMONS, M.S. On monophyly of bats. *Syst. Zool.*, v.40, p. 216-231, 1991.

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALNSTRON, G. Inhibition of DNA strand break rejoining in ultraviolet-irradiated human cells: comparison of aphidicolin and cytosine arabinoside. *Biochem. Biophys. Acta.*, v. 1007, p. 357-358, 1989.
- AND¹, K., TAGAWA, T., UCHIDA, T.A. A karyotypic study on four species of the Indonesian fruit-eating bats, belonging to *Cynopterus*, *Eonycteris* and *MacroGLOSSUS* (Chiroptera, Pteropidae). *Cariologia*, v. 33, p.41-53, 1980.
- BAKER, R.J. Karyotypes of bats of the family Phyllostomidae and their taxonomic implications. *Southwestern Naturalist*, v.12, p. 407-428, 1967.
- BAKER, R.J. Karyotypic trends in bats. In: Wimsatt, W.A. (Ed.). *Biology of bats*. New York: Academic Press, 1970. p. 65-96.
- BAKER, R.J. Karyology. *Spec. Publ. Mus., Texas Tech Univ.*, v. 16, p. 107-155, 1979.
- BAKER, R.J., PATTON, J.L. Karyotypic variation of North American vespertilionid bats. *J. Mamm.*, v. 48, p. 270-286, 1967.
- BAKER, R.J., LOPEZ, G. Karyotypic studies of the insular populations of bats on Puerto Rico. *Cariologia*, v. 23, p. 465-472, 1970.
- BAKER, R.J., HSU, T.C. Further studies in sex chromosome systems of American leaf-nosed bats (Chiroptera: Phyllostomatidae). *Cytogenetics*, v. 9, p. 131-138, 1970.
- BAKER, R.J., GARDNER, A.L., PATTON, J.L. Chromosomal polymorphism in the phyllostomid bat *Mimon crenulatus* (Geoffroy). *Experientia*, v. 26, p. 969-970, 1972.
- BAKER, R.J., KOOP, B.F., HAIDUK, M.W. Resolving systematic relationships with G-bands: a study of five genera of South American cricetine rodents. *Syst. Zool.*, v. 32, p. 403-416, 1983.
- BAKER, R.J., QUMSIEYH, M.B., HOOD, C.S. Role of chromosomal banding patterns in understanding mammalian evolution. In: GENOWAYS, H.H. (Ed.). *Current mammalogy*. Plenum, New York, 1987. v. 1, p. 67-96.
- BAKER, R.J., HOOD, C.S., HONEYCUTT, R.L. Phylogenetic relationships and classification of higher categories of the New World bat family Phyllostomidae. *Syst. Zool.*, v. 38, p. 228-238, 1989.
- BAKER, R.J., NOVACEK, M.J., SIMMONS, N.B. On monophyly of bats. *Syst. Zool.*, v.40, p. 216-231, 1991.



- BAKER, R.J., HAIDUK, M.W., ROBBINS, L.W., CADENA, A., KOOP, B.F. Chromosomal studies of South American bats and their systematic implications. Spec. Publ. Ser. Pymatuning Lab. Ecol., v. 4, p. 303-327, 1982.
- BE AK, M.L., BATISTIC, R.F., VIZOTTO, L.D., BE AK, W. Mecanismo de determinação do sexo XY Y₁ em *Artibeus lituratus* (Chiroptera-Phyllostomatidae). Ci. Cult., v. 20, p. 173, 1968.
- BE AK, M.L., BATISTIC, R.F., VIZOTTO, L.D., BE AK, W. Sex determining mechanism XY₁Y₂ in *Artibeus lituratus* (Chiroptera-Phyllostomatidae). Experientia, v. 25, p. 81-83, 1969.
- BERGER, R., BLOOMFIELD, C.D., SUTHERLAND, G.R. Report of the committee on chromosome rearrangements in neoplasia and on fragile sites. Eight International Workshop on Human Gene Mapping. Cytogenet. Cell Genet., v. 40, p. 490-535, 1985.
- BIRD, B.R., FORRESTER, F.T. Basic laboratory techniques in cell culture. Atlanta: U.S. Department of Health and Human Services, 1981. p. 175.
- BRITTEN, R.J. Rates of DNA sequence evolution differ between taxonomic groups. Science, v. 231, p. 95-104, 1986.
- BRYANT, E.M. Expression of the fragile X chromosome in fibroblast. In: SANDBERG, A. A. (Ed.). Cytogenetics of the mammalian X chromosome, part B. New York: Alan R. Liss, 1983. p. 445-455.
- CAPANNA, E., CIVITELLI, M.V. Chromosomal mechanism in the evolution of chiropteran karyotypes chromosomal tables of chiroptera. Caryologia, v. 23, p. 79-111, 1970.
- DAYIAN, G., ROWE, A.W. Cryopreservation of human platelets for transfusion. A glycerol-glucose, moderated rate cooling procedure. Cryobiology, v. 13, p. 1-8, 1976.
- DAYIAN, G., CHIN, S.N., ROWE, A.W. Cryoprotection of human platelets: the influence of cooling rate and glycerol concentration on activating the lysosomal enzyme B-glucuronidase. Cryobiology, v. 8, p. 393-394, 1971.
- De GROUCHY, J., TURLEAU, C. Atlas des maladies chromosomiques. Paris, Expansion Scientific Française, 1977.
- DJALALI, M., BARBI, G., STEINBACH, P. Folic acid sensitive fragile sites are not limited to the human karyotype. Demonstration of nonrandom gaps and breaks in Persian vole *Ellobius lutescens* Th.



- inducible by methotrexate, fluorodeoxyuridine, and aphidicolin. *Hum. Genet.*, v. 70, p. 183-185, 1985.
- DAJALALI, M., ADOLPH, S., STEINBACH, P., WINKING, H., HAMEISTER, H. A comparative mapping study of fragile sites in the human and murine genomes. *Hum. Genet.*, v. 77, p. 157-162, 1987.
- DAJALALI, M., ADOLPH, S., STEINBACH, P., WINKING, H., HAMEISTER, H. Fragile sites induced by azacytidine and 5-azadeoxycytidine in the murine genome. *Hereditas*, v. 112, p. 77-81, 1990.
- DEKABAN, A. Persisting clone of cells with an abnormal chromosome in a woman previously irradiated. *J. Nucl. Med.*, v. 6, p. 740-746, 1965.
- DULIC, B., MUTERE, F. A. Comparative study of the chromosomes of some molossid bats from Eastern Africa. *Period. Biol.*, v. 75, p. 61-65, 1973.
- EAGLE, H. The effect of environmental pH on the growth of normal and malignant cells. *J. Cell Physiol.*, v. 82, p. 1-8, 1973.
- EGER, J.L. Systematics of the genus *Eumops* (Chiroptera, Molossidae). *Life. Sci. Contr. R. Ont. Mus.*, v. 110, p. 1-69, 1977.
- EISINGER, M., LEE, J.S., HEFTON, J.M., DARZYKIEWICZ, A., CHIAO, J. W., DEHARVEN, E. Human epidermal cell cultures-growth and differentiation in the absence of dermal components or medium supplements. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, v. 76, p. 5340, 1979.
- ELDER, F.F.B., ROBINSON, T.J. Rodent common fragile sites: are they conserved? Evidence from mouse and rat. *Chromosoma*, v. 97, p. 459-464, 1989.
- FERRARO, M., LAVIA, P., PELLICIA, F., De CAPOA, A. Clonal inheritance of rRNA gene activity: cytological evidence in human cells. *Chromosoma*, v. 84, p. 345-351, 1981.
- FONATSCH, C. A simple method to demonstrate the fragile X chromosome in fibroblasts. *Hum. Genet.*, v. 59, p. 186, 1981.
- FORD, C.E., HAMERTON, J.L. A colchicine hypotonic citrate squash sequence for mammalian chromosomes. *Stain. Technol.*, v. 31, p. 247-251, 1956.
- FORMAN, G.L., BAKER, R.J., GERBER, J.D. Comments on the systematic status of vampire bats. (Family Desmodontidae). *Syst. Zool.*, v. 17, p. 417-425, 1968.

- FREEMAN, P.W. A multivariate study of the family Molossidae (Mammalia, Chiroptera): morphology, ecology, evolution. *Fieldiana Zool.*, v. 7, p. 1-173, 1971.
- FRESHNEY, R.I. Culture of animal cells: a manual of basic culture. New York: A. R. Liss, 1987. p. 397.
- GARDNER, A.L. Taxonomic implications of karyotypes of *Molossus* and *Cynomops* (Mammalia: Chiroptera). *Proc. Biol. Soc. Washington*, v. 89, p. 545-550, 1977.
- GLOVER, T.W. FUDR induction of the X chromosome fragile site: evidence for the mechanism of folic acid and thymidine inhibition. *Am. J. Hum. Genet.*, v. 33, p. 234-242, 1981.
- GLOVER, T.W., GERGER, C., COYLE, J., ECHO, B. DNA polymerase inhibition by aphidicolin induces gaps breaks at common fragile sites in human chromosome. *Hum. Genet.*, v. 67, p. 136-142, 1984.
- GRIPENBERG, U., HUWHTANEN, S., WISSMAN, M., NIEMINEN, M. A fragile site in the chromosome of the reindeer (*Rangifer tarandus*, L.) *Genet. Sel. Evol.*, v. 23, Suppl. 1, p. 1355-1395, 1991.
- GUICHAOUA, M., MATTEI, M.G., MATTEI, J.F., GIRAUD, F. Aspects genetiques des sites fragiles autosomiques. A propos de 40 cases. *J. Génét. Hum.*, v. 30, p. 183-197, 1982.
- HAIDUK, M.W., BAKER, R.J., ROBBINS, L.W., SCHLITTER, D. A chromosomal evolution in African Megachiroptera: G- and C- band assesmentes of the magnitude of change in similar standard karyotypes. *Cytogenet. Cell Genet.*, v. 29, p. 221-231, 1981.
- HANAOKA, F., KATO, H., IKEGAMI, S., OHASHI, M., YAMADA, M.A. Aphidicolin does inhibit repair replication in Hela cells. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, v. 87, p. 575-580, 1979.
- HARADA, M., MINEZAWA, M., TAKADA, S., YENBUTRA, S., NUNPAKDEE, P., OHTANI, S. Karyological analysis of 12 species of bats from Thailand. *Cariologia*, v. 35, p. 269-278, 1982.
- HARRIS, L.W., GRIFFITHS, J.B. Relative effects of cooling and warming rats on mammalian cells during the freeze-thaw cycle. *Cryobiology*, v. 14, p. 662-669, 1977.
- HECHT, F. Rare polymorphic, and common fragile sites: a classification. *Hum. Genet.*, v. 74, p. 207-208, 1986.
- HECHT, F., JACKY, P.B., SUTHERLAND, G.R. The fragile X chromosome. Current methods. *Am. J. Med. Genet.*, v. 22, p. 489-495, 1982.

- HECHT, F., HECHT, B.K., KIRSCH, I.R. Fragile sites limited to lymphocytes: molecular recombination and malignancy. *Cancer Genet. Cytogenet.*, v. 26, p. 45-104, 1987.
- HECHT, H., RAMESH, K.H., LOCKWOOD, D.H. A guide to fragile sites on human chromosomes. *Cancer Genet. Cytogenet.*, v. 44, p. 37-45, 1990.
- HECHT, F., TAJARA, E.H., LOCKWOOD, D., SANDBERG, A.A., HECHT, B.K. New common fragile sites. *Cancer Genet. Cytogenet.*, v. 33, p. 1-9, 1988.
- HENDERSON, L.M., BRUERE, A.N. Inheritance of Ag-stainability of the nucleolus organizer regions in domestic sheep *Ovis aries*. *Cytogenet. Cell Genet.*, v. 26, p. 1-6, 1980.
- HILL, J.E. A new family genus and species of bat (Mammalia: Chiroptera) from Thailand. *Bull. British Mus. (Nat. Hist.), Zool.*, v. 27, p. 304-316, 1974.
- HOWELL, W.M., BLACK, A.D. Controlled silver staining of nucleolus organizer regions: a protective colloidal developer: a 1-step method. *Experientia*, v. 36, p. 1014-1015, 1980.
- HSU, T.C., KELLOGG JR., D.S. Primary cultivation and continuous propagation in vitro of tissues from small biopsy specimens. *J. Nat. Canc. Inst.*, v. 25, p. 221-235, 1960.
- HSU, T.C., SOMMERS, C.E. Effect of 5-bromodeoxyuridine on mammalian chromosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, v. 47, p. 396-403, 1961.
- HUMAN GENE MAPPING 10: Update to Tenth International Workshop on Human Gene Mapping. *Cytogenet. Cell Genet.*, v. 51, p. 1-1148, 1989.
- HUNT, P.A., BURGOYNE, P.S. A tissue-specific fragile site associated with the sex reversed (x r) mutation in the mouse. *Chromosoma*, v. 96, p. 67-71, 1987.
- IKEGAMI, S., TAGUCHI, T., OHASHI, M., OGURO, M., NAGANO, H., MANO, Y. Aphidicolin prevents mitotic cell division by interfering with the activity of DNA polymerase- α . *Nature*, v. 275, p. 458, 460, 1978.
- JOTTERAND-BELLOMO, M. Les sites fragiles autosomiques. *J. Génét. Hum.*, v. 32, p. 155-166, 1984.
- KNIAZEFF, A.J., CONSTANTINE, D., NELSON-REES, W.A., SCHMIDT, D., OWENS, R. Studies in chiropteran cell lines. 41st. Tech. Progr.



- Rept. Naval Biol. lab. Suppl. Rept., CC-8, p. 97-105, 1967.
- KOOPMAN, K.F. Zoogeography of bats. In: SLAUGHTER, B.H., WALTON, D.W. (Ed.). About bats. A chiropteran biology symposium. Dallas: Southern Methodist Univ. Press., 1970. p. 29-46.
- KOOPMAN, K.F. A synopsis of the families of bats. Bat. Res. News, v. 25, p. 25-29, 1984.
- KOOPMAN, K.F., JONES JR, J.K. Classification of bats. In: SLAUGHTER, B.H., WALTON, D.W. (Ed.). About bats. A chiropteran biology symposium. Dallas: Southern Methodist Univ. Press, 1970. p. 22-28.
- KUWANO, A., KAJII, T. Synergistic effect of aphidicolin and ethanol on the induction of common fragile sites. Hum. Genet., v. 75, p. 75-78, 1987.
- LAIRD, C.D., JAFFE, E., KARPEN, G., LAMB, M., NELSON, R. Fragile sites in human chromosomes as regions of late-replicating DNA, TIG, v. 3, p. 274-281, 1987.
- LE BEAU, M.M. Chromosomal fragile sites and cancer-specific rearrangements. Blood, v. 67, p. 849-858, 1986.
- LEE, M.R., ELDER, F.F.B. Yeast stimulation of bone marrow mitosis for cytogenetic investigations. Cytogenet. Cell Genet., v. 26, p. 36-40, 1980.
- LEIBO, S.P., MAZUR, P. The role of cooling rates in low-temperature preservation. Cryobiology, v. 8, p. 447-452, 1971.
- LEJEUNE, J., DUTRILLAUX, B., LAFOURCARD, J., BERGER, R., ABONY, D., RETHONE, M.O. Endoreduplication selective du bras long du chromosome 2 chez une femme et sa fille. C. R. Acad. Sci. III, v. 266, p. 24-26, 1968.
- LEONARD, J.C., LEONARD, R.C., THOMPSON, K.H. Arabinofuranosyl nucleosides induce common fragile sites. Hum. Genet., v. 79, p. 157-162, 1988.
- LEVAN, A., FREDGA, K., SANDBERG, A.A. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. Hereditas, v. 52, p. 201-220, 1964.
- LICASTRO, F., SARAFJAN, T., VERSTY, A.M., WALFORD, R.L. Inhibition of polymerase-alpha and beta completely blocks DNA repair induced by UV radiation in cultures neuronal cells. Biochem. Biophys. Res. Comm., v. 132, p. 929-933, 1985.



- LIN, M.S., TAKABAYASHI, T., WILSON, M.G., MARCHESE, C.A. An in vitro and in vivo study of a BrdU-sensitive fragile site in the Chinese hamster. *Cytogenet. Cell Genet.*, v. 38, p. 211-215, 1984.
- LINARES, O.J., KIBLISKY, P. Karyotype and a new record of *Molossops greenhalli* from Venezuela. *J. Mamm.*, v. 50, p. 831-832, 1969.
- LONN, U., LONN, S. Aphidicolin inhibits the syntesis and joing of short DNA fragments but not the union of 10-kilobase DNA replication intermediates. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, v. 8, p. 3996-3999, 1983.
- LOPES, M.J.S. Contribui   para o estudo citogenético de morcegos: anlise de 15 espécies. 8 Paulo, 1978. Tese (Mestrado)- Instituto de Biociências, Universidade de 8 Paulo.
- LUBS, H.A. A marker X chromosome. *Am. J. Hum. Genet.*, v. 21, p. 231-244, 1969.
- MAGENIS, R.E., HECHT, F., LOVIEN, E.W. Heritable fragile sites on chromosome 16: probable localization of haptoglobin locus in man. *Science*, v. 170, p. 85-86, 1970.
- MATTEI, M.G., MATTEI, J.F., GIRAND, F. Expression in lymphocyte and fibroblast culture of the fragile X chromosome. A new technical approach. *Hum. Genet.*, v. 59, p. 166-169, 1982.
- MAZUR, P. Cryobiology: The freezing of biological systems. The responses of living cells to ice formation are of theoretical interest and pratical concern. *Science*, v. 168, p. 939-948, 1970.
- Mc ALLISTER, B.F., GREENBAUN, I.F. Aphidicolin induced fragile sites in deer mice (*Peromyscus maniculatus*). *Cytogenet. Cell Genet.*, v. 56, p. 221, 1991.
- MCGANN, L.E. Differing actions of penetrating and nonpenetrating compounds. *Cryobiology*, v. 15, p. 257-271, 1978.
- MCGANN, L.E. Optimal temperature ranges for control of cooling rate. *Cryobiology*, v. 16, p. 211-216, 1979.
- MCGANN, L.E., WALTERSON, M.L. Cryoprotection by dimethyl sulfoxide and dimethyl sulfone. *Cryobiology*, v. 24, p. 11-16, 1987.
- MCGANN, L.E., YANG, H., WALTERSON, M. Manifestation of cell damage after freezing and thawing. *Cryobiology*, v. 25, p. 178-185, 1988.
- MIKELSAAR, A.V., SCHMID, M., KRONE, W., SCHWARZACHER, H.G., SCHNEDL, W. Frequency of Ag-stained nucleolus organizer regions in the acrocentric chromosomes of man. *Hum. Genet.*, v. 37, p. 73-77,



- 1977.
- MILLER, D.A., DEV, V.G., TANTRAVAH, R., MILLER, O.J. Suppression of human nucleolus organizer activity in mouse-human somatic hybrid cell. *Exp. Cell Res.*, v. 101, p. 235-243, 1976a.
- MILLER, O.J., MILLER, D.A., DEV, V.G., TANTRAVAH, R., CROCE, C.M. Expression of human and suppression of mouse nucleolus organizer activity in mouse-human somatic cell hybrids. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, v. 73, p. 4531-4535, 1976b.
- MIR, S., CLEMENT, J.C., FUSTER, C., EGOZUE, J. Fragile sites, chromosome evolution and human neoplasia. *Hum. Genet.*, v. 75, p. 345-349, 1987.
- MORGAN, R., MORGAN, S.S., HECHT, B.H., HECHT, F. Fragile sites at 4q23 and 7q11.23 unique to bone marrow cells. *Cancer Genet. Cytogenet.*, v. 31, p. 47-53, 1988.
- MORIELLE, E., VARELLA-GARCIA, M. Varyability of nucleolus organizer regions in phyllostomid bats. *Rev. Brasil. Genet.*, v. 11, p. 853-871, 1988.
- MORIELLE, E., GOLONI-BERTOLLO, E.M., VARELLA-GARCIA, M., TADDEI, V.A. A chromosome banding study of *Eumops glaucinus* (Chiroptera, Molossidae). *Rev. Brasil. Genet.*, v. 11, p. 791-795, 1988.
- MORRIS, S.M. The genetic toxicology of 5-bromodeoxyuridine in mammalian cells. *Mutation Res.*, v. 258, p. 161-188, 1991.
- MURANO, I., KUWANO, A., KAJII, T. Cell type-dependent difference in the distribution and frequency of aphidicolin-induced fragile sites: T and B lymphocytes and bone marrow cells. *Hum. Genet.*, v. 84, p. 71-74, 1989a.
- MURANO, I., KUWANO, A., KAJII, T. fibroblast-specific common fragile sites induced by aphidicolin. *Hum. Genet.*, v. 83, p. 45-48, 1989b.
- NOWAK, R.M., PARADISO, J.L. Walker's mammals of the world. 4 ed. Baltimore: The Johns Hopkins University Press, 1983. v. 1, p. 169-351, 1983.
- PAINTER, T.S. A comparative study on chromosomes of mammals. *Am. Naturalist*, v. 59, p. 385-408, 1925.
- PATTON, J.L., BAKER, R.J. Somatic chromosome numbers of 31 species of North American Chiroptera. *Mamm. Chromos. Newsl.*, v. 20, p. 66-67, 1966.



- PETTIGREW, J.D. Wings or brain? Convergent evolution in the origins of bats. *Syst. Zool.*, v. 40, p. 199-216, 1991a.
- PETTIGREW, J.D. A fruitful wrong hypothesis? Response to Baker, Novacek, and Simmons. *Syst. Zool.*, v. 40, p. 231-239, 1991b.
- POULSEN, B.S., RONNE, M. Hight-resolution R-banding and localization of fragile sites in *Oryctolagus cuniculus*. *Genet. Sel. Evol.*, v. 23, Suppl. 1, p. 1835-1865, 1991.
- PRZYLEPA, K.A., WENGER, S.L. Fragile sites in leukemic bone marrow cells. *Cancer Genet. Cytogenet.*, v. 31, p. 145-146, 1988.
- QUMSIYEH, M.B., BAKER, R.J. G- and C-banding karyotypes of the Rhinopomatidae (Microchiroptera). *J. Mamm.*, v. 66, p. 541-544, 1985.
- RAY-CHAUDKURI, S.P., PATHAK, S., SHARMA, T. Chromosomes and affinities of Pteropodidae (Megachiroptera) and Rhinopomatidae (Microchiroptera). *The Nucleus*, v. 1968, p. 96-101, 1968.
- RIBEIRO, M.C., MELARAGNO, M.I. Técnica modificada de bandamento R. *Ci. cult.*, v. 38, Supl., p. 844, 1986.
- RIGGS, P.K., CHRISMAN, C.L. Identification of aphidicolin-induced fragile sites in domestic pig chromosomes. *Genet. Sel. Evol.*, v. 23, Suppl. 1, p. 1875-1905, 1991.
- ROBINSON, T.J., ELDER, F.F.B. Multiple common fragile sites are expressed in the genome of the laboratory rat. *Chromosoma*, v. 96, p. 45-49, 1987.
- ROWE, A.W., LENNY, L.L. Cryopreservation on granulocytes for transfusion: studies on human granulocyte isolation, the effect of glycerol on lysosomes, kinetics of glycerol uptake and cryopreservation with dimethyl sulfoxide and glycerol. *Cryobiology*, v. 17, p. 198-212, 1980.
- SANZ, M., JENKINS, E.C., BROWN, W.T., DAVISSON, M.T., KEVIN, M.J., RODERICK, T.H., SILVERMAN, W.P., WISNIEWSKY, H.M. Mouse chromosome fragility. *Am. J. Med. Genet.*, v. 23, p. 491-509, 1986.
- SCHMID, M., OTT, G., HAAF, T., SCHERES, J.M.J.C. Evolutionary conservation of fragile sites induced by 5-azacytidine and 5-azadeoxycytidine in man, gorilla, and chimpanzee. *Hum. Genet.*, v. 71, p. 342-350, 1985.
- SCHNEIDER, N.R., CHAGANTI, R.S.K., GERMAN, J. Analysis of a BrdU-sensitive site in the cactus mouse (*Peromyscus eremicus*):



- chromosomal breakage and sister-chromatid exchange. *Chromosoma*, v. 77, p. 379-389, 1980.
- SHERMAN, J.K. Comparison of *in vitro* and *in situ* ultrastructural cryoinjury and cryoprotection of mitochondria. *Cryobiology*, v. 9, p. 112-122, 1972.
- SIMMONS, N.B., NOVACEK, M.J., BAKER, R.J. Approaches, methods, and the future of the chiropteran monophyly controversy: a reply to J.D. Pettigrew. *Syst. Zool.*, v. 40, p. 239-243, 1991.
- STEINBACH, P., BARBI, G., BAUR, S., WIEDENMAN, A. Expression of the fragile site Xq27 in fibroblasts. I. Detection of fra(X)(q27) in fibroblast clones from males with X-linked mental retardation. *Hum. Genet.*, v. 63, p. 404-405, 1983.
- STOCK, A.D. Chromosome banding pattern homology and its phylogenetic implications in the bat genera *Carollia* and *Choeroniscus*. *Cytogenet. Cell Genet.*, v. 35, p. 136-140, 1975.
- STONE, D.M., JACKY, P.B., HANCOCK, D.D., PRIEUR, D.J. Chromosomal fragile site expression in dogs: I. Breed specific differences. *Am. J. Med. Genet.*, v. 40, p. 214-222, 1991a.
- STONE, D.M., JACKY, P.B., PRIEUR, D.J. Chromosomal fragile site expression in dogs: II. Expression in boxer dogs with mast cell tumors. *Am. J. Med. Genet.*, v. 40, p. 223-229, 1991b.
- SUMNER, A.T. A sample technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Exp. Cell Res.*, v. 75, p. 304-306, 1972.
- SUTHERLAND, G.R. Hereditary fragile sites on human chromosomes. I. Factor affecting expression in lymphocyte culture. *Am. J. Hum. Genet.*, v. 31, p. 125-135, 1979.
- SUTHERLAND, G.R. The role of nucleotides in human fragile site expression. *Mutation Res.*, v. 200, p. 207-213, 1988.
- SUTHERLAND, G. R., HECHT, F. Fragile sites on human chromosomes. New York: Oxford University Press, 1985.
- SUTHERLAND, G.R., MATTEI, J.F. Report of the committee on cytogenetic markers. Ninth International Workshop on Human Gene Mapping. *Cytogenet. Cell Genet.*, v. 46, p. 316-324, 1987.
- SUTHERLAND, G.R., LEDBETTER, D.H. Report of the committee on cytogenetic markers. Human Gene Mapping 9,5: Update to the ninth International Workshop on Human Gene Mapping. *Cytogenet. Cell Genet.*, v. 49, p. 221-223, 1988.

- SUTHERLAND, G.R., JACKY, P.B., BAKER, E.G. Hereditary fragile sites on human chromosomes. XI: Factor affecting expression of fragile sites at 10q25, 16q22 and 17p12. *Am J. Hum. Genet.*, v. 36, p. 110-122, 1984.
- SUTHERLAND, G.R., PARSONS, M., BAKER, E. New class of fragile site induced by 5'-azacytidine and BrdU. *Hum. Genet.*, v. 69, p. 233-237, 1985.
- TADDEI, V.A. Morcegos. Algumas considerações sistêmicas biológicas. *Bol. Tec. Cati, Campinas*, 172, p. 1-30, 1983.
- TEWARI, R., JUYAL, R.C., THELMA, B.K., DAS, B.C., RAO, S.R.V. Folate-sensitive sites on the X-chromosome heterochromatin of the Indian mole rat *Nesokia indica*. *Cytogenet. Cell Genet.*, v. 44, p. 11-17, 1987.
- THREADGILL, D.W.; WOMACK, J.E. Syntenic assignment of HSA 9 and HSA12 homologs in the bovine. Preliminary evidence for the role of fragile sites in mammalian genome evolution. *Cytogenet. Cell Genet.*, v. 51, p. 1091, 1989. (Abstract 2664).
- TOLEDO, L.A. Estudo citogenético em morcegos brasileiros (Mammalia Chiroptera). Botucatu, 1973. Tese (Doutoramento)- Faculdade de Ciências Médicas e Biológicas de Botucatu.
- TSVETKOV, T., TSONEV, L., MENKOV, I. A quantitative evaluation of the extent of inner mitochondrial membrane destruction after freezing and thawing based on functional studies. *Cryobiology*, v. 23, p. 433-439, 1986.
- UCHIDA, I.A., FREEMAN, V.C.P., BASRUR, P.K. The fragile X in cattle. *Am. J. Med. Genet.*, v. 23, p. 557-562, 1986.
- VARELLA-GARCIA, M.V., TADDEI, V.A. Citogenética de quirópteros: métodos e aplicações. *Rev. Brasil. Zool.*, v. 6., p. 297-323, 1989.
- VARELLA-GARCIA, M.V., MORIELLE-VERSUTE, E., TADDEI, V.A. A survey of cytogenetic data on Brazilian bats. *Rev. Brasil. Genet.*, v. 12, p. 761-793, 1989.
- VIZOTTO, L.D., TADDEI, V. A. Chave para determinação de quirópteros brasileiros. *Bol. Cienc.*, v. 1, p. 1-72, 1973.
- VOLGER, H., HEBER, U., BERZBORN, R.J. Loss of function of biomembrane protein during freezing. *Biochim. Biophys. Acta*, v. 511, p. 455-469, 1978.

- WAINBERG, R.L. Cytotaxonomy of South-American Chiroptera. Arch. Biol., v. 77, p. 411-423, 1966.
- WAINBERG, R.L., BIANCHINI, L.H.D., BIANCHINI, J.J., ACTIS-DATO, G.E. P. Uniformidad cariotipica y radiacion adaptativa en *Eumops* y *Molossus* (Chiroptera, Molossidae). Physis. Scc. C. Buenos Aires, v. 33, p. 249-254, 1974.
- WARBURTON, D., HENDERSON, A.S. Sequential silver staining and hibridization in situ on nucleolus organizing regions in human cells. Cytogenet. Cell Genet., v. 24, p. 168-175, 1979.
- WARNER, J.W., PATTON, J.L., GARDNER, A.L., BAKER, R.J. Kryotypic analysis of twenty-one species of molossid bats (Molossidae, Chiroptera). Can. J. Genet. Cytol., v. 16, p. 165-174, 1974.
- WELTENS, R. KIRSCH-VOLDERS, M., HENS, L., DEFRISE-GUSSENHOVEN, SUSANNE, C. NOR variability in twins. Acta Genet. Med. Gamellol., v. 34, p. 141-151, 1985.
- WURSTER-HILL, D.H., WARD, D.G., DAVIS, B.H., PARK, J.P., MOYZIS, R.K., MEYNE, J. Fragile sites, telomeric DNA sequences, B chromosomes, and DNA content in raccon dogs, *Nyctereutes procyonoides*, with comparative notes on foxes, coyote, wolf, and raccon. Cytogenet. Cell Genet., v. 49, p. 278-281, 1988.
- YAGURA, T. KOZU, T., SENO, T. Arrest of chain growth of replicon-sized intermediates by aphidicolin during rate fibroblast cell chromosome replication. Eur. J. Biochem., v. 123, p. 15-21, 1982.
- YAN, Z., LI, X, ZHOW, X. Synergistic effect of hydroxyureia and excessive thymidine on the expression of the common fragile sites at 3p14 and 16q23. Hum. Genet., v. 80, p. 382-384, 1988.
- YONENAGA, Y. Estudos cromossomicos em espécies de Chiroptera. Cdi. Cult., v. 20, p. 172, 1968.
- YONENAGA, Y., FROTA-PESSOA, O., LEWIS, J.R. Karyotypes of seven species of brazilian bats. Caryologia, v. 22, p. 63-78, 1969.
- YONG, H.S. Robertsonian translocation, pericentric inversion and heterochromatin block in the evolution of the tailless fruit bat. Experientia, v. 40, p. 875-876, 1984.
- YONG, H.S., DHALIWAL, S.S. Chromosomes of the fruit-bat subfamily Macroglossinae from Peninsular Malasya. Cytologia, v. 41, p. 85-89, 1976.

YUNIS, J.J., SORENG, A.L. Constitutive fragile sites and cancer.
Science, v. 226, p. 1199-1204, 1984.

ZAKHAROV, A.F., DAVUDOV, A.Z., BEJUSH, V.A., EGOLINA, N.A. Genetic
determination of NOR activity in human lymphocytes from twins.
Hum. Genet., v. 60, p. 24-29, 1982.



