

SANDRA REGINA DE CARVALHO MARCHESIN

**ANÁLISE CITOGENÉTICA EM ESPÉCIES DE
VESPERTILIONIDAE DOS GÊNEROS *Eptesicus*, *Histiotus*,
Lasiurus E *Myotis* (CHIROPTERA, MAMMALIA)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista – UNESP, para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora: *Prof^a. Dr^a. Eliana Morielle Versute*

São José do Rio Preto

2002

Marchesin, Sandra Regina de Carvalho.

Análise citogenética em espécies de Vespertilionidae dos gêneros *Eptesicus*, *Histiotus*, *Lasiurus* e *Myotis* (Chiroptera, Mammalia) / Sandra Regina de Carvalho Marchesin. – São José do Rio Preto : [s.n.], 2002
98 f. : il. ; 30 cm.

Orientadora: Eliana Morielle Versute

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista. Instituto
de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Citogenética. 2. Hibridização *in situ* fluorescente. 3. Chiroptera.
4. Vespertilionidae. I. Versute, Eliana Morielle. II. Universidade
Estadual Paulista. Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. III.
Título.

CDU – 575

SANDRA REGINA DE CARVALHO MARCHESIN

**ANÁLISE CITOGÉNÉTICA EM ESPÉCIES DE VESPERTILIONIDAE
DOS GÊNEROS *EPTESICUS*, *HISTIOTUS*, *LASIURUS* E *MYOTIS*
(CHIROPTERA, MAMMALIA)**

COMISSÃO JULGADORA

DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE

Presidente e Orientador: _____

Prof^ª. Dr^ª. Eliana Morielle Versute

2^º Examinador _____

Prof^ª. Dr^ª. Marlene Kiyoni Hosaki Kobayashi

3^º Examinador _____

Prof. Dr. Wagner André Pedro

São José do Rio Preto, ____/____/____.

I. INTRODUÇÃO

1. ORDEM CHIROPTERA

Os morcegos constituem a segunda maior ordem de mamíferos, a ordem Chiroptera, que apresenta cerca de 1000 espécies amplamente distribuídas, ocorrendo em regiões tropicais e temperadas com exceção de algumas ilhas oceânicas remotas e Antártica (KOOPMAN, 1970; NOWAK, 1999). Devido a características particulares das espécies a ordem está subdividida em duas subordens (Megachiroptera e Microchiroptera) e 17 famílias. A subordem Megachiroptera possui apenas a família Pteropodidae, com 42 gêneros e cerca de 166 espécies distribuídas nas regiões tropicais e subtropicais do Velho Mundo, da África até Austrália, Samoa e Ilhas Carolinas (KOOPMAN, 1993). Os representantes dessa subordem constituem as maiores formas de morcegos, podendo alcançar até 1,70 m de envergadura (NOWAK, 1999).

As dezesseis famílias restantes constituem a subordem Microchiroptera, com uma distribuição quase mundial, exceto nas regiões polares e ilhas muito afastadas dos continentes. Nas Américas há registros da ocorrência de nove famílias: Emballonuridae, Furipteridae, Molossidae, Mormoopidae, Natalidae, Noctilionidae, Phyllostomidae, Thyropteridae e Vespertilionidae, todas com representantes no Brasil, as quais podem ser identificadas com relativa facilidade, com base em características morfológicas externas (TADDEI, 1983; 1996).

Os morcegos são os únicos mamíferos que compartilham com os pássaros e, possivelmente, com os répteis Pterossauros extintos, a habilidade

única de sustentar o voo. Esta importante característica permitiu a exploração do meio aéreo, onde o número de predadores e competidores é relativamente menor, o que lhes possibilitou utilizar diferentes tipos de alimentos e abrigos.

Entre os mamíferos, representam o grupo mais versátil quanto aos hábitos alimentares, podendo utilizar uma grande variedade de tipos de alimentos, como frutos, néctar, pólen, partes florais, folhas, insetos, outros artrópodes, pequenos peixes, anfíbios, pássaros, pequenos mamíferos e sangue.

Em decorrência de seus hábitos, os morcegos desempenham um importante papel no controle de insetos, na polinização e na dispersão de sementes de numerosas espécies vegetais. No entanto, podem ser reservatórios naturais de agentes infecciosos, como o vírus da raiva paralítica (*Lyssavirus spp*), e o protozoário *Trypanosoma cruzi* (doença de Chagas) e, às vezes, seus abrigos naturais proporcionam condições favoráveis à proliferação de fungos patogênicos, como o *Histoplasma capsulatum*, causador da histoplasmose.

A importância desses animais do ponto de vista ecológico, econômico e médico-sanitário, aliada ao conjunto de características peculiares que apresentam, tornaram este grupo intensamente investigado sob enfoques morfológicos, fisiológicos, ecológicos e sistemáticos. Neste último aspecto, por exemplo, há problemas taxonômicos não resolvidos e as relações filogenéticas propostas para as espécies, os gêneros, as famílias e as subordens incluem hipóteses não confirmadas.

Os poucos registros fósseis atribuídos a essa ordem de mamíferos são provenientes de sedimentos do Eoceno da Europa e da América do

Norte (JONES & GENOWAYS, 1970), datados de, aproximadamente, cinquenta milhões de anos. Por esta razão, os estudos referentes à evolução destes animais têm sido feitos a partir da inferência do seu passado histórico, baseada principalmente em características morfológicas das espécies viventes.

Existe um consenso na hipótese de que a maioria dos microquirópteros tenham se originado no Velho Mundo. Esta hipótese é suportada pela ocorrência de representantes das famílias Emballonuridae, Rhinolophidae, Megadermatidae, Vespertilionidae e Molossidae em depósitos da Europa no Terciário médio. Estas famílias radiaram-se adaptativamente e ocorrem atualmente em toda região zoogeográfica do Velho Mundo, sendo que Emballonuridae, Vespertilionidae e Molossidae, alcançaram também o Novo Mundo, porém, os Emballonuridae ficaram restritos às regiões Neotropicais (SMITH, 1976).

Apesar dos inúmeros questionamentos e hipóteses sobre a origem e evolução dos quirópteros, um ancestral embalonuróideo tem sido proposto para a posição basal de Microchiroptera. Esta hipótese é baseada principalmente na aparente antigüidade do grupo antes que em qualquer conjunto de características primitivas (SMITH, 1976).

Uma variedade de dados têm sido analisados para determinar o relacionamento das famílias de Microchiroptera e, a partir deles, algumas hipóteses filogenéticas têm sido propostas.

SMITH (1976), revendo a história da classificação dos quirópteros, apresentou a primeira hipótese filogenética do relacionamento

evolutivo para morcegos (Figura 1). Em sua proposta, o autor indica dois clados dentro de Microchiroptera: **Yinochiroptera**, constituído pelos Emballonuroidea (Emballonuridae + Rhinopomatidae + Craseonycteridae) e Rhinolophoidea (Nycteridae + Megadermatidae + Rhinolophidae + Hipposideridae), e **Yangochiroptera** constituído pelos Noctilionoidea (= Phyllostomoidea, Noctilionidae + Mormoopidae + Phyllostomidae) e Vespertilionoidea (Mystacinidae + Molossidae + Myzopodidae + Thyropteridae + Furipteridae + Natalidae + Vespertilionidae).

Ao longo de duas décadas, foram várias as propostas filogenéticas, contudo, havia incongruências. Recentemente, SIMMONS (1998) e SIMMONS e GEILSER (1998), a partir da reunião e análise filogenética de dados morfológicos, citogenéticos e moleculares obtidos por diferentes autores (VANVALEN, 1979; NOVACEK, 1991; VOLLETH & HELLER, 1994a) propuseram uma árvore representativa da história dos microquirópteros (Figura 2). Nesta proposta o subclado Yangochiroptera é apresentado como monofilético e Yinochiroptera como parafilético, devido a posição de Emballonuridae no ramo basal em Microchiroptera.

A relação de proximidade dos membros de Vespertilionoidea não está clara. Apesar de Vespertilionidae ser tratada como um clado por muitos autores (SMITH, 1976; VAN VALEN, 1979; NOVACEK, 1991), a presença deste grupo nas freqüentes discussões taxonômicas indica que seu parentesco não está bem resolvido, necessitando de maiores esclarecimentos.

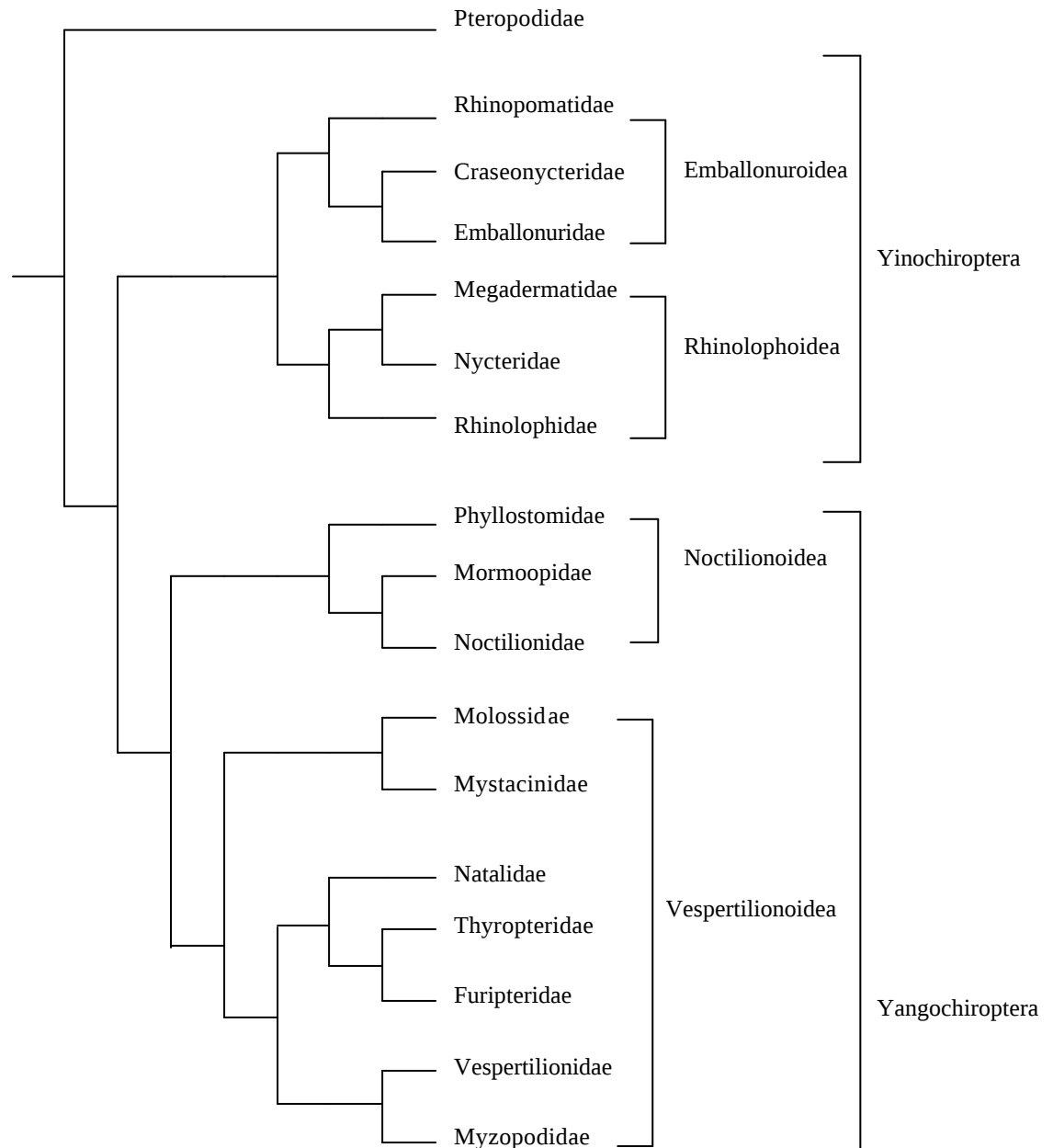


Figura 1: Hipótese Filogenética apresentada por SMITH (1976).

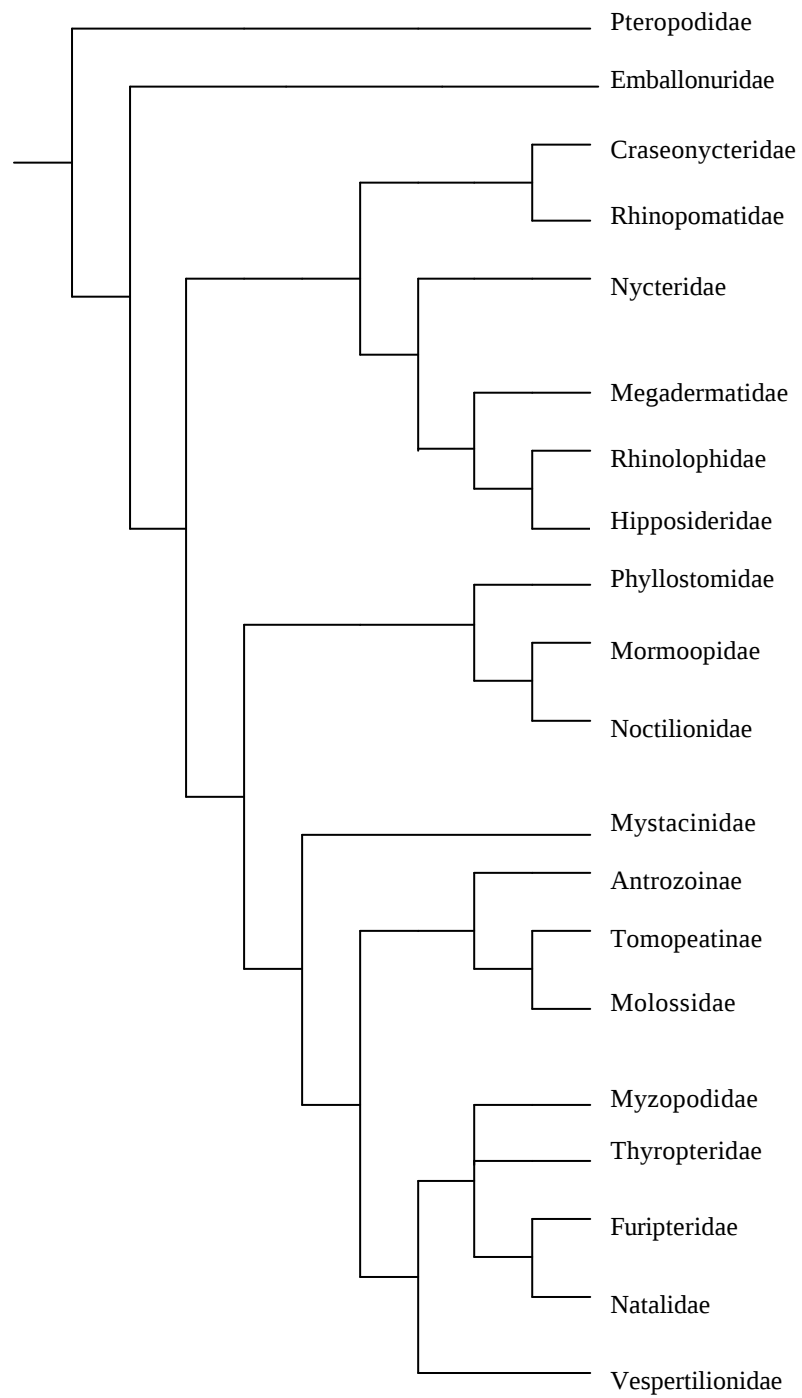


Figura 2: Hipótese Filogenética proposta por SIMMONS (1998) e SIMMONS & GEILSER (1998).

2. FAMÍLIA VESPERTILIONIDAE

A família Vespertilionidae é verdadeiramente cosmopolita, ocorrendo em todos os continentes, com algumas espécies atingindo as zonas temperadas frias e muitas ilhas oceânicas, tais como, Bermudas, Galápagos e Hawai (KOOPMAN 1970). Trata-se da maior família de Chiroptera, representando um terço das espécies atuais de morcegos (KOOPMAN, 1993). Constitui um grupo bastante diversificado, para o qual são reconhecidos 42 gêneros e cerca de 355 espécies, das quais 74 ocorrem nas Américas e, dessas, 19 podem ser encontradas no Brasil (TADDEI, 1996). Os primeiros registros fósseis de morcegos da família Vespertilionidae datam do Eoceno médio na Europa. Na América do Norte o registro mais recente desta família é do Oligoceno médio e na Índia Ocidental, América do Sul e Austrália datam do Pleistoceno (KOOPMAN, 1984).

Os vespertilionídeos podem ser facilmente reconhecidos pela presença de uma cauda longa contida em toda a extensão da membrana interfemural. Sua coloração é bastante variável, mas as espécies dos gêneros *Myotis*, *Histiotus* e *Eptesicus*, em geral, são negras ou apresentam várias tonalidades de marrom. O comprimento do antebraço, medida tomada do cotovelo até à extremidade proximal dos metacarpos, varia de 27 mm a 30 mm nas espécies menores, como no caso do gênero *Rogheessa* e, até cerca de 60 mm nas espécies maiores, como é o caso da espécie *Lasiurus cinereus* (VIZOTTO & TADDEI, 1973; TADDEI, 1983). As espécies pertencentes aos gêneros *Eptesicus* e *Myotis* apresentam comprimento de antebraço variando de 30 mm a 43 mm

respectivamente, estando entre as espécies que possuem tamanho intermediário (VIZOTTO & TADDEI, 1973).

De forma geral, os morcegos da família Vespertilionidae são encontrados presos a troncos ou suspensos em ramos, freqüentemente protegidos pela folhagem. Ao entardecer alçam vôos altos onde a eficiência das redes de captura (*mist-nets*) é discutível, dificultando a obtenção de exemplares em número satisfatórios para os estudos, em todos os meses do ano (TADDEI, 1980). Este fato, aliado ao pequeno número de caracteres morfológicos adequados para a classificação taxonômica dos vespertilionídeos, determinam a escassez de publicações referentes ao relacionamento filogenético de Vespertilionidae. Em decorrência do grande número de espécies da família, a sistemática, ao nível familiar, é controversa e o reconhecimento dos gêneros com elevado número de espécies como *Eptesicus* e *Myotis* não é simples.

As espécies que ocorrem no Brasil pertencem aos gêneros *Eptesicus* (4 spp.), *Histiotus* (3 spp.), *Lasiurus* (5 spp.), *Myotis* (6 spp.) e *Rhogeessa* (1 spp.) (Tabela 1).

A primeira proposta de classificação para Vespertilionidae foi feita por TATE em 1942, que baseou-se principalmente em caracteres dentários, particularmente a redução ou perda de dentes pré-molares e incisivos. Esta classificação reconheceu apenas uma subfamília para Vespertilionidae: a Vespertilioninae. Outras propostas foram posteriormente formuladas, sendo que KOOPMAN (1984) reconheceu e agrupou os gêneros e espécies de Vespertilionidae em cinco subfamílias: Kerivoulinae, Vespertilioninae (com as tribos Myotini,

Vespertilionini, Nycticeiini, Lasiurini, Antrozoini e Nyctophilini), Murinae, Miniopterinae e Tomopeatinae.

A proposta mais recente de classificação para os Vespertilionidae foi apresentada por SIMMONS (1998), que realizou uma análise filogenética utilizando diferentes conjuntos de dados. Em sua classificação ela reconhece cinco subfamílias: Vespertilioninae (27 gêneros e 180 spp.), Myotinae (2 gêneros e 86 spp.), Miniopterinae (1 gênero e 10 spp.), Murinae (2 gêneros e 16 spp.) e Kerivoulinae (1 gênero e 22 spp.). Dessas, as três últimas são claramente monofiléticas. As espécies dos gêneros *Eptesicus*, *Histiotus*, *Lasiurus* e *Rhogeessa* estão incluídas na subfamília Vespertilioninae, enquanto que a subfamília Myotinae constitui-se pelas espécies de *Myotis* e *Lasionycteris*. A proposta apresentada por SIMMONS (1998) foi embasada entre outros dados, pelos resultados dos estudos realizados por VOLLETH & HELLER (1994a).

SIMMONS (1998) e SIMMONS & GEISLER (1998) apoiados nos estudos de VOLLETH & HELLER (1994a), os quais envolveram a análise de cariótipos de cinquenta espécies pertencentes a vinte e três gêneros de Vespertilionidae, propuseram a elevação da tribo Myotini para a categoria de subfamília, e a exclusão da subfamília Tomopeatinae de Vespertilionidae, agora reconhecida como subfamília de Molossidae. Apesar da proposta, a monofilia de Myotinae, permanece incerta, pois nenhuma sinapomorfia morfológica é conhecida para o grupo e não há dados cromossômicos disponíveis para *Lasionycteris*. A monofilia da subfamília Vespertilioninae e do gênero *Myotis*,

pertencente a subfamília Myotinae, é suportada por dados cromossômicos (VOLLETH & HELLER, 1994a).

Embora VOLLETH & HELLER (1994a) tenham analisado apenas espécies européias, o estudo foi fundamental para a proposta de classificação apresentada por SIMMONS (1998), indicando a importância dos estudos citogenéticos nas interpretações evolutivas.

Tabela 1. Espécies de Vespertilionidae que ocorrem no Brasil (Segundo TADDEI, 1996).

Superfamília/ Subfamília	Gênero	Espécie	Autor e data
Vespertilionoidea			
Vespertilioninae	<i>Eptesicus</i>	<i>E. brasiliensis</i>	(Desmarest, 1819)
		<i>E. diminutus</i>	Osgood, 1915
		<i>E. furinalis</i>	(d'Orbigny, 1847)
		<i>E. fuscus</i>	(Beauvois, 1796)
	<i>Histiotus</i>	<i>H. alienus</i>	Thomas, 1916
		<i>H. montanus</i>	(Phillippi & Landback, 1861)
		<i>H. velatus</i>	(I. Geoffroy, 1824)
	<i>Lasiurus</i>	<i>L. borealis (blossevillii)</i>	(Müller, 1776)
		<i>L. cinereus</i>	(Beauvois, 1796)
		<i>L. ebenus</i>	
		<i>L. ega</i>	(Gervais, 1856)
		<i>L. egregius</i>	(Peters, 1870)
	<i>Rhogeessa</i>	<i>R. tumida</i>	H. Allen, 1866
Myotinae	<i>Myotis</i>	<i>M. albescens</i>	(E. Geoffroy, 1806)
		<i>M. levis</i>	(I. Geoffroy, 1824)
		<i>M. nigricans</i>	(Schinz, 1821)
		<i>M. riparius</i>	(Handley, 1960)
		<i>M. ruber</i>	(E. Geoffroy, 1806)
		<i>M. simus</i>	Thomas, 1901

3. ESTUDOS CITOGENÉTICOS EM VESPERTILIONIDAE

Os estudos citogenéticos em vespertilionídeos, de maneira geral, têm mostrado que o padrão cromossômico da família apresenta um certo conservacionismo. A maioria das espécies pertencentes a um mesmo gênero ou a grupos de gêneros relacionados, usualmente tem apresentado extensa similaridade cariotípica, caracterizada pelos mesmos números diplóide de cromossomos e número fundamental (número de braços do complemento autossômico) ou mesmo número fundamental e número diplóide pouco diferenciado. Entretanto, há descrições de ocorrência de variações intragenéricas, intra e interespecíficas.

A comparação dos padrões de bandas G, C e NOR entre diferentes gêneros de Vespertilionidae, também tem mostrado conservacionismo cariotípico (BICKHAM & HAFNER, 1978; BICKHAM, 1979a e b; VOLLETH, 1985, BICKHAM, 1987; VOLLETH & TIDEMAN, 1989; VOLLETH *et al.*, 2001) e, quando são detectadas diferenças, essas derivam de algumas fusões e pequenas inversões pericêntricas e variações no número e localização das regiões organizadoras nucleolares - RONS (STOCK, 1983; VOLLETH, 1987; VOLLETH & HELLER, 1994a e b).

Das 74 espécies Americanas de Vespertilionidae, 46 foram estudadas citogeneticamente. Contudo, apenas oito estudos foram realizados a partir de espécimes brasileiros (Tabela 2) e, para a maioria deles, as informações sobre os padrões de bandas não são completas.

Os vespertilionídeos do gênero *Lasiurus* são endêmicos da América do Norte e Sul. O relacionamento evolutivo de *Lasiurus* com outros

gêneros não está bem estabelecido, havendo sugestões de que ele se diferenciou muito cedo no estoque dos vespertilionídeos (BICKHAM, 1987). Os dados cariotípicos obtidos para *Lasiurus* apoiam essa idéia, pois somente três pares de cromossomos foram identificados como homólogos aos considerados plesiomórficos (BICKHAM, 1987).

O número exato de espécies pertencentes ao gênero *Lasiurus* é ainda controverso, entretanto, das espécies americanas citadas na literatura, sete tiveram alguns dos seus padrões cromossômicos determinados (BICKHAM, 1987). A comparação dos cariótipos dessas espécies permitiu a BICKHAM (1987) supor que cinco espécies, *L. borealis*, *L. cinereus*, *L. degelidus*, *L. seminolus* e *L. minor*, que têm cariótipos semelhantes, com o número diplóide ($2n=28$) e número fundamental ($NF=48$), representam a condição primitiva, enquanto que *L. ega* ($2n=28$, $NF=48$) e *L. intermedius* ($2n=26$, $NF=44$) que compartilham uma sinapomorfia (uma inversão no cromossomo X), seriam táxons irmãos.

Em relação às espécies pertencentes ao gênero *Eptesicus* (32 spp), as informações citogenéticas obtidas para cinco espécies americanas evidenciam um conservacionismo cariotípico ao nível morfológico. Todas as espécies apresentam $2n=50$ e $NF=48$ (BAKER & PATTON, 1967; WILLIAMS, 1978; BICKHAM, 1979a; FREITAS *et al.*, 1992). As espécies *E. fuscus* e *E. lynni*, para as quais há informações sobre o padrão de bandas G e a localização da heterocromatina constitutiva, não apresentam diferenças nos padrões de bandas e algumas homologias puderam ser detectadas entre os cromossomos de *E. fuscus* e *Myotis sodalis* (BICKHAM, 1979a).

As espécies do gênero *Histiotus* são muito semelhantes às do gênero *Eptesicus* nas características dentárias e cranianas, porém, morfológicamente diferem de *Eptesicus* por apresentarem um grande pavilhão auditivo (NOWAK, 1999). Não há na literatura dados sobre estudos citogenéticos em espécimes de *H. velatus*, exceto para *H. montanus*, que apresenta o complemento cromossômico constituído por 24 autossomos acrocêntricos, muito similar a *Eptesicus*, sendo seu número diplóide $2n=50$ e número fundamental, $NF=48$ (WILLIAMS, 1978; TOLEDO, 1973).

O gênero *Myotis* da subfamília Myotinae apresenta o maior número de espécies entre os mamíferos, e o reconhecimento das mesmas não é fácil, dificultando a taxonomia do grupo. Apesar de toda esta diversidade, o gênero é muito conservado cariotipicamente (HARADA & YOSIDA, 1978; HARADA & UCHIDA, 1982; BICKHAM *et al.*, 1986). Todas as espécies americanas de *Myotis* analisadas (22 spp) apresentam o mesmo número diplóide ($2n= 44$) e quase que invariavelmente o mesmo número fundamental ($NF=50$ e 52) (TOLEDO, 1973, BICKHAM, 1979a e b; BICKHAM *et al.*, 1986; ANDRADE *et al.*, 1995).

A obtenção dos padrões de bandamentos cromossômicos, bem como de informações sobre a distribuição da heterocromatina constitutiva e da localização das regiões organizadoras de nucléolos nas espécies brasileiras de Vespertilionidae, poderá fornecer informações sobre as mudanças cromossômicas que ocorreram no grupo.

Muitos estudos têm sido realizados com a finalidade de determinar o papel ou o significado do conservacionismo e das variações

cromossômicas que caracterizam os cariótipos das espécies não só de morcegos, mas de outros grupos de vertebrados. Esses estudos mostram que existem diferenças na natureza, quantidade e distribuição dos rearranjos cromossômicos entre os diferentes táxons, e, na maioria das vezes, os padrões de um dado grupo podem ser traçados e usados como ferramentas auxiliares à interpretação dos relacionamentos entre as espécies.

Entre os eventos cromossômicos que têm sido responsáveis pelas variações na família Vespertilionidae, podemos destacar as pequenas inversões pericêntricas e algumas fusões que teriam ocorrido em regiões centroméricas ou teloméricas de cromossomos ancestrais (STOCK, 1983; VOLLETH, 1987; VOLLETH & HELLER, 1994a e b).

No processo de fusão, os telômeros, que representam as regiões terminais dos cromossomos, cuja função principal é manter a estabilidade e integridade dos cromossomos, podem ser eliminados ou desativados. O DNA telomérico é constituído de seqüências simples e repetitivas do tipo (TTAGGG)_n. Essas seqüências apresentam-se conservadas nas diferentes espécies de vertebrados (MEYNE *et al.*, 1989) e, interessante, têm sido detectadas não apenas em telômeros, mas também em regiões cromossômicas intersticiais e centroméricas numa variedade de espécies de vertebrados (MEYNE, *et al.*, 1989, 1990; ABUÍM *et al.*, 1996; VERMEESCH *et al.*, 1996; GARAGNA *et al.*, 1997; ONO & YOSIDA, 1997; FONTANA *et al.*, 1998; GO *et al.*, 2000).

Entre as várias hipóteses propostas para explicar a presença de sítios teloméricos intersticiais, inclui-se a de que as seqüências teloméricas

possam ser evidências de remanescentes de telômeros após eventos de fusão ocorrida entre dois cromossomos acrocêntricos ancestrais (MEYNE, *et al.*, 1990; FINATO *et al.*, 2000). Assim, a identificação dos sítios de DNA telomérico, em cromossomos das espécies de Vespertilionidae, pode auxiliar na determinação da direcionalidade dos eventos ocorridos nos cromossomos das diferentes espécies, sendo portanto, um aspecto de grande importância para os estudos evolutivos.

Tabela 2. Estudos cromossômicos em espécies da família Vespertilionidae que ocorrem nas Américas. 1: informações gerais; 2: foto de cariótipo usual; 3: bandas G; 4: bandas C; 5: localização das regiões organizadoras do nucléolo; 6: citogenética molecular; +: espécimes coletados no Brasil; ++: espécies que ocorrem no Brasil.

Táxon	Referência	Natureza do estudo
VESPERTILIONIDAE		
<i>Antrozous pallidus</i>	BICKHAM, 1979a	3
	BAKER <i>et al.</i> , 1992	6
++ <i>Eptesicus brasiliensis</i>	BAKER & PATTON, 1967	1
	LOPES, 1978	2+
	FREITAS <i>et al.</i> , 1992	1+
	BAGGIO <i>et al.</i> , 1996	2+
++ <i>Eptesicus diminutus</i>	WILLIAMS, 1978	2
++ <i>Eptesicus furinalis</i>	WILLIAMS, 1978	2
	VARELLA-GARCIA <i>et al.</i> , 1989	1+
++ <i>Eptesicus fuscus</i>	BICKHAM, 1979a	3, 4
	BAKER <i>et al.</i> , 1992	6
<i>Eptesicus lynni</i>	BICKHAM, 1979a	3, 4
<i>Euderma maculatum</i>	STOCK, 1983	3, 4
++ <i>Histiotus montanus</i>	WILLIAMS & MARES, 1978	2
++ <i>Histiotus velatus</i>	TOLEDO, 1973	2+
	ANDRADE <i>et al.</i> , 1995	1
<i>Idionycteris phyllotis</i>	STOCK, 1983	3, 4
	VOLLETH & HELLER, 1994b	3
<i>Lasionycteris noctivagans</i>	BICKHAM, 1979a	3, 4
	BAKER <i>et al.</i> , 1992	6
++ <i>Lasiurus borealis</i> (<i>L. blossevillii</i>)	BICKHAM & BAKER, 1979	3
	BICKHAM, 1987	3, 4+
	VARELLA-GARCIA <i>et al.</i> , 1989	3, 4
++ <i>Lasiurus cinereus</i>	BICKHAM, 1979a	3
	BICKHAM, 1987	3
	BAKER <i>et al.</i> , 1992	6
	BAGGIO <i>et al.</i> , 1996	2+
		Continua.

Continuação Tabela 2

++	<i>Lasiurus ega</i>	TOLEDO, 1973	2, 7+
		BICKHAM, 1979a	3
		BICKHAM, 1987	3, 4
	<i>Lasiurus intermedius</i>	BAKER & PATTON, 1967	2
		BICKHAM, 1987	3, 4
		BICKHAM, 1979a	3
	<i>Lasiurus seminolus</i>	BICKHAM, 1987	3, 4
		BICKHAM, 1979b	3, 4
		BICKHAM, 1979b	3, 4
	<i>Myotis albescentis</i>	BICKHAM, 1979b	3, 4
		BICKHAM, 1979b	3, 4
		BICKHAM, 1979b	3, 4
	<i>Myotis auriculus</i>	BICKHAM, 1979b	3, 4
		BICKHAM, 1979b	3, 4
		BICKHAM, 1979b	3, 4
	<i>Myotis austroriparius</i>	BAKER & PATTON, 1967	1
		BAKER & PATTON, 1967	1
		BICKHAM, 1979b	3, 4
	<i>Myotis californicus</i>	BICKHAM, 1979b	3, 4
		BICKHAM, 1979b	3, 4
		BICKHAM, 1979b	3, 4
	<i>Myotis elegans</i>	BICKHAM, 1979b	3, 4
		BICKHAM, 1979b	3, 4
		BICKHAM, 1979b	3, 4
	<i>Myotis evotis</i>	BICKHAM, 1979b	3, 4
		BICKHAM, 1979b	3, 4
		BICKHAM, 1979b	3, 4
	<i>Myotis grisescens</i>	BICKHAM, 1979b	3, 4
		BICKHAM, 1979b	3, 4
		BICKHAM, 1979b	3, 4
	<i>Myotis keaysi</i>	BAKER <i>et al.</i> , 1992	6
		BAKER <i>et al.</i> , 1992	6
		BAKER <i>et al.</i> , 1992	6
	<i>Myotis keenii</i>	BICKHAM, 1979b	3, 4
		BICKHAM <i>et al.</i> , 1986	3
		ANDRADE <i>et al.</i> , 1995	1+
	<i>Myotis leibii</i>	BICKHAM <i>et al.</i> , 1986	3, 4
		BICKHAM <i>et al.</i> , 1986	3, 4
		BICKHAM <i>et al.</i> , 1986	3, 4
	<i>Myotis levis</i>	BICKHAM <i>et al.</i> , 1986	3, 4
		BICKHAM <i>et al.</i> , 1986	3, 4
		BICKHAM <i>et al.</i> , 1986	3, 4
	<i>Myotis lucifugus</i>	BICKHAM <i>et al.</i> , 1986	3, 4
		BICKHAM <i>et al.</i> , 1986	3, 4
		BICKHAM <i>et al.</i> , 1986	3, 4
	<i>Myotis milleri</i>	REDUKER <i>et al.</i> , 1983	2
		REDUKER <i>et al.</i> , 1983	2
		REDUKER <i>et al.</i> , 1983	2
	<i>Myotis nigricans</i>	TOLEDO, 1973	2+
		BICKHAM, 1979b	3, 4
		BAGGIO <i>et al.</i> , 1996	2+
	<i>Myotis riparius</i>	BAKER & JORDAN, 1970	2
		BAKER & JORDAN, 1970	2
		BAKER & JORDAN, 1970	2
	<i>Myotis simus</i>	BICKHAM, 1979b	3, 4
		BICKHAM, 1979b	3, 4
		BICKHAM, 1979b	3, 4
	<i>Myotis sodalis</i>	BICKHAM, 1979b	3, 4
		BICKHAM, 1979b	3, 4
		BICKHAM, 1979b	3, 4
	<i>Myotis thysanodes</i>	BAKER <i>et al.</i> , 1992	6
		BAKER <i>et al.</i> , 1992	6
		BAKER <i>et al.</i> , 1992	6
	<i>Myotis velifer</i>	BICKHAM, 1979b	3, 4
		BICKHAM, 1979b	3, 4
		BICKHAM, 1979b	3, 4
	<i>Myotis vivesi</i>	BAKER & PATTON, 1967	2
		BAKER & PATTON, 1967	2
		BAKER & PATTON, 1967	2
	<i>Myotis volans</i>	BAKER & PATTON, 1967	1
		BAKER & PATTON, 1967	1
		BAKER & PATTON, 1967	1
	<i>Myotis yumanensis</i>	BICKHAM, 1979b	3, 4
		BICKHAM, 1979b	3, 4
		BICKHAM, 1979b	3, 4
	<i>Myotis sp</i>	MORATELLI, <i>et al.</i> 2000	1
		MORATELLI, <i>et al.</i> 2000	1
		MORATELLI, <i>et al.</i> 2000	1
	<i>Nycticeius humeralis</i>	BICKHAM, 1979a	3
		BICKHAM, 1979a	3
		BICKHAM, 1979a	3
	<i>Pipistrellus hesperus</i>	BAKER <i>et al.</i> , 1992	6
		BAKER <i>et al.</i> , 1992	6
		BAKER <i>et al.</i> , 1992	6
	<i>Pipistrellus subflavus</i>	BAKER & PATTON, 1967	2
		BAKER & PATTON, 1967	2
		BAKER & PATTON, 1967	2
	<i>Plecotus rafinesquii</i>	BICKHAM, 1979a	3, 4
		BICKHAM, 1979a	3, 4
		BICKHAM, 1979a	3, 4
	<i>Plecotus townsendii</i>	BAKER <i>et al.</i> , 1992	6
		BAKER <i>et al.</i> , 1992	6
		BAKER <i>et al.</i> , 1992	6
	<i>Rhogeessa genowaysi</i>	BAKER & MASCARELLO, 1969	2
		BAKER & MASCARELLO, 1969	2
		BAKER & MASCARELLO, 1969	2
	<i>Rhogeessa parvula</i>	STOCK, 1983	3, 4
		STOCK, 1983	3, 4
		STOCK, 1983	3, 4
	<i>Rhogeessa tumida</i>	VOLLETH & HELLER, 1994b	3.
		VOLLETH & HELLER, 1994b	3.
		VOLLETH & HELLER, 1994b	3.
	<i>Rhogeessa genowaysi</i>	BAKER <i>et al.</i> , 1985	3
		BAKER <i>et al.</i> , 1985	3
		BAKER <i>et al.</i> , 1985	3
	<i>Rhogeessa parvula</i>	BAKER <i>et al.</i> , 1985	3
		BAKER <i>et al.</i> , 1985	3
		BAKER <i>et al.</i> , 1985	3
	<i>Rhogeessa tumida</i>	BICKHAM & BAKER, 1977	3, 4
		BICKHAM & BAKER, 1977	3, 4
		BICKHAM & BAKER, 1977	3, 4
	<i>Rhogeessa tumida</i>	BAKER <i>et al.</i> , 1985	4
		BAKER <i>et al.</i> , 1985	4
		BAKER <i>et al.</i> , 1985	4
	<i>Rhogeessa tumida</i>	BAKER <i>et al.</i> , 1992	6
		BAKER <i>et al.</i> , 1992	6
		BAKER <i>et al.</i> , 1992	6

II. OBJETIVOS

Devido à escassez de informações citogenéticas para espécimes brasileiros de Vespertilionidae, o presente trabalho teve como objetivo principal a realização de estudos citogenéticos em espécies da família pertencentes aos gêneros *Eptesicus*, *Myotis*, *Histiotus* e *Lasiurus*. Desta forma, visamos:

- * Determinar os padrões cromossômicos das espécies através da aplicação de técnicas de coloração diferencial (G, C e Ag-NORs);

- * Estudar a variação cromossômica dos autossomos e cromossomos sexuais através de análises comparativas dos cariótipos e padrões de bandas obtidos;

- * Determinar a localização dos sítios de sequências teloméricas nos cromossomos das espécies, através da técnica de hibridização *in situ* fluorescente, e correlacioná-los com os eventos cromossômicos envolvidos nas variações detectadas.

- * Contribuir para a citotaxonomia do grupo.

III. MATERIAL E MÉTODOS

1. ESPÉCIES

Foram estudadas citogeneticamente seis espécies da família Vespertilionidae: *Myotis nigricans*, *Myotis riparius*, *Lasiurus cinereus*, *Lasiurus ega*, *Eptesicus brasiliensis* e *Histiotus velatus*, totalizando 59 espécimes, coletados em diferentes localidades do estado de São Paulo e Mato Grosso do Sul (Tabela 3).

2. COLETAS

Para a obtenção dos animais, foram realizadas coletas em área urbana e rural da região de São José do Rio Preto-SP, Araçatuba-SP e Campo Grande-MS, conforme apresentado na Tabela 3.

As coletas foram realizadas à noite, uma vez que esses animais apresentam hábitos crepusculares e notívagos. Os animais foram capturados por redes (*mist-nets*) que foram armadas em local de saída de abrigo e em possíveis rotas de voo. Em ambientes fechados foi utilizado puçá (rede manual).

Os animais capturados foram colocados em gaiolas especiais e conduzidos para o laboratório para serem processados e fixados. À exceção dos exemplares provenientes de Campo Grande e Araçatuba, todos os exemplares foram catalogados e encontram-se depositados na Coleção de Quirópteros junto ao Departamento de Zoologia e Botânica do IBILCE de São José do Rio Preto.

Tabela 3: Discriminação dos exemplares coletados por espécie, procedência, sexo e coletor. **M**: macho; **F**: fêmea.

Espécie	Procedência	Número de exemplares	Coletor
<i>Myotis nigricans</i>	Mirassol/SP	1M	Morielle-Versute, E. <i>et al.</i>
	Guapiaçu/SP	2M; 5F	Morielle-Versute, E. & Marchesin, S. R. C
	Miranda/ MS	1M; 2F	Taddei, V. A. <i>et al.</i>
	S. J. do R. Preto/SP	11M; 5F	Morielle-Versute, E. <i>et al.</i>
	Araçatuba/SP	14F	Pedro, W. A. <i>et al.</i>
	Cedral/SP	1M	Garcia, M. S.
	Campo Grande/MS	2M; 3F	Taddei, V. A. <i>et al.</i>
	Aquidauana/MS	1F	Taddei, V.A. <i>et al.</i>
<i>Lasiurus ega</i>	S. J.do R. Preto/SP	1F	Morielle-Versute, E. <i>et al.</i>
	Mirassol/SP	1M; 1F	Morielle-Versute, E. & Marchesin, S. R. C.
<i>Lasiurus cinereus</i>	S. J. do R. Preto/SP	1F	Morielle-Versute, E. <i>et al.</i>
<i>Histiotus velatus</i>	S. J. do R. Preto/SP	3M	Morielle-Versute, E. <i>et al.</i>
<i>Eptesicus brasiliensis</i>	S. J. do R. Preto/SP	1F	Marchesin, S. R. C. <i>et al.</i>
	Nova Aliança/SP	3F	Marchesin, S. R. C. <i>et al.</i>

3. PREPARAÇÕES CROMOSSÔMICAS

Preparações celulares foram obtidas diretamente de medula óssea (cultura de curta duração) e cultura de fibroblastos, conforme procedimentos descritos abaixo.

a) Preparação Direta de Medula Óssea

As preparações de medula óssea seguiram os protocolos de FORD & HAMERTON (1966) e LEE & ELDER (1980), com algumas modificações.

No primeiro dia subsequente à coleta, injetou-se no animal subcutaneamente e dorsalmente, 0,2 ml de solução de fermento glicosado para cada 25g de peso corporal, a fim de estimular a divisão celular em células da medula óssea.

Decorridas 24 horas da injeção de fermento, foi aplicado intra-peritonalmente, 0,2 ml de colquicina (0,05%) para cada 25g de peso corporal, a fim de bloquear a divisão celular. Após 30 a 40 minutos, o animal foi sacrificado e os ossos longos removidos (antebraços). Com a ajuda de uma seringa contendo aproximadamente 8 ml de solução salina de Hanks, a medula óssea foi recolhida em tubo de centrífuga. As massas celulares foram desfeitas por sucessivas aspirações com a própria seringa e a suspensão foi centrifugada por 8 minutos a 900 rpm. Descartou-se o sobrenadante, deixando-se 0,5 ml de precipitado no tubo. A este volume foram adicionados 8 ml de solução hipotônica KCl 0,075M a 37° C, ressuspendeu-se devagar e deixou-se a 37° C, por 30 minutos.

A seguir, a suspensão foi centrifugada por 8 minutos a 900 rpm, desprezou-se o sobrenadante, agitou-se levemente para que ressuspendesse e colocou-se 5 ml de fixador metanol-acético (3:1). Após um repouso de 15 minutos, a suspensão foi novamente centrifugada, desprezou-se o sobrenadante e novo volume de fixador foi adicionado ao tubo. Essa operação foi repetida mais uma vez, ressuspensando-se o último precipitado em 0,5 – 1,0 ml de fixador. O material obtido foi gotejado em lâminas molhadas, geladas e submetido a técnicas de coloração e bandamentos.

b) Cultura de Fibroblastos

As culturas de fibroblastos seguiram o protocolo de MORIELLE-VERSUTE & VARELLA-GARCIA (1995), com algumas modificações.

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

Para início das culturas celulares, foram utilizadas biópsias de fragmentos de pulmão. Após a morte do animal por estrangulamento, o que determina uma morte rápida, foi feita uma assepsia na região abdominal com algodões embebidos em álcool 70° GL. Posteriormente, com bisturi e tesouras esterilizadas, fez-se uma incisão abaixo das costelas e na caixa torácica e, com o auxílio de uma pinça esterilizada, retirou-se os pulmões. Estes foram colocados em um frasco estéril contendo meio de cultura completo: meio Ham F-10, suplementado com soro fetal bovino (10%), penicilina (1.000.000 U/ml),

quemeticina (40.000 mg/ml) e anfotericina B (5 µg/ml). O frasco com o fragmento foi levado à geladeira, onde permaneceu por 24 horas.

b.2) Montagem e manutenção da cultura

O frasco com a biópsia foi levado à câmara de fluxo laminar onde foi manuseado em condição asséptica. A biópsia foi transferida para uma placa de Petri contendo meio de cultura completo, onde foi várias vezes recortada em pequenos fragmentos com tesoura esterilizada. Esses fragmentos, com cerca de 2 mm, foram transferidos com uma pipeta Pasteur à superfície inferior de um ou mais frascos para cultura de células, nos quais foram adicionados 2 ml de meio completo Ham F-10 (Cutilab). Os frascos foram então incubados em estufa a 37° C por 3 dias sem qualquer movimentação. Decorrido esse tempo, o frasco foi observado ao microscópio para verificação de aderência ao substrato e proliferação de células. Ocorrendo o crescimento, mais 3ml de meio foram adicionados ao frasco em câmara de fluxo laminar. O frasco foi novamente conduzido à estufa e observado diariamente, para detectar alterações do pH do meio, ocorrência de contaminação por fungos e bactérias e para acompanhar as condições das culturas em relação à taxa de proliferação. Na presença de contaminação ou ausência de crescimento, o frasco foi descartado.

b.3) Tripsinização das culturas

Após cerca de uma ou duas semanas do início do crescimento celular, foi feita a tripsinização da cultura a fim de que células que cresceram em

amontoados se espalhassem, possibilitando um crescimento mais uniforme. Para isso, o meio de cultura foi retirado do frasco e cerca de 5 ml de solução de Hanks sem cálcio e magnésio foram colocados para a diluição dos resíduos do meio que persistiam no frasco, pois o soro fetal bovino nele presente inativa a tripsina. O Hanks foi retirado e 1 ml de tripsina/EDTA (Cutilab) a 37° C foi colocado no frasco de cultura. Após aproximadamente um minuto, essa solução foi removida com o auxílio de uma pipeta e 5 ml de meio novo foram adicionados ao frasco. Em seguida, o frasco foi agitado para que as células se desprendessem e se espalhassem, sendo reconduzido à estufa. A cultura até essa etapa foi denominada primária.

b.4) Subdivisão da cultura

Quando o frasco se encontrava forrado de células, isto é, as células estavam totalmente confluentes, foi feita a replicagem da cultura. Para isso, foi retirado o meio do frasco e a cultura foi lavada com 5 ml de Hanks sem cálcio e magnésio. Acrescentou-se em seguida, 1 ml de tripsina/EDTA a 37° C, permanecendo no frasco por cerca de 1 minuto. Retirou-se a tripsina e adicionou-se ao frasco 5 ml de meio completo. Agitou-se fortemente o frasco para que as células se desprendessem. Em seguida metade do conteúdo do frasco, ou seja, cerca de 2,5 ml, foi transferido para um outro frasco. Posteriormente, o volume dos frascos foi completado para 5 ml com meio completo e estes retornados à estufa. Dessa forma, as células rearranjaram-se em dois frascos, adquirindo condições mais favoráveis ao crescimento.

Através deste procedimento um maior número de células foi obtido.

b.5) Bloqueio da cultura e preparação da lâminas

Para a obtenção das células em metáfases foi adicionado às culturas em crescimento 0,05 ml de colquicina 4×10^{-4} M. Após aproximadamente 30 a 40 minutos, o meio de cultivo foi removido e substituído por cerca de 6 ml de solução de citrato de sódio a 1% a 37° C. Passados 30 minutos, agitou-se cuidadosamente o frasco para que as células descolassem. A suspensão foi transferida para tubos de centrifuga onde foram adicionadas três gotas de fixador metanol-acético (3:1), e levada a centrifugar 5 minutos a 900 rpm. O sobrenadante foi descartado, o precipitado ressuspensionado e novo volume de fixador colocado junto ao precipitado. Após 15 minutos, a suspensão celular foi novamente centrifugada. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado novamente ressuspensionado, fixado e centrifugado por 5 minutos. Essa operação foi repetida mais uma vez (num total de três vezes). O material obtido foi gotejado em lâminas molhadas, geladas e submetido a técnicas de coloração e bandamentos.

4. TÉCNICAS DE BANDAMENTO CROMOSSÔMICO

a) Coloração convencional com Giemsa.

No processo de coloração convencional, lâminas com um ou mais dias de fixação foram hidrolisadas em HCl 1 N a 60° C por 5 a 7 minutos. A seguir, a hidrólise foi interrompida lavando-se a lâmina em água desionizada

gelada. A lâmina foi então seca e corada em solução de Giemsa 2% em tampão fosfato, pH 6,8, por cerca de 7 minutos.

b) Bandamento G

O bandamento G seguiu o protocolo de DE GROUCHY & TURLEAU (1977), com modificações. Lâminas com quinze dias de fixação foram imersas em solução de álcool metílico 50% por dois minutos. Após lavagem em água destilada, por dois minutos, foram transferidas para solução tampão Sorensen pH 6,8, onde permaneceram por cerca de quinze a trinta minutos. A seguir, as lâminas foram imersas em solução de tripsina 1: 250 (DIFCO) a 0,2%, tamponada com solução salina de PBS, por um tempo variável de cinco a vinte segundos, dependendo do período decorrido após a fixação do material. O excesso de tripsina foi retirado pela imersão da lâmina em solução salina de PBS, sendo o material posteriormente corado com solução a 2% de Giemsa tamponada, por oito minutos, e lavado em água destilada.

c) Bandamento C

O bandamento C, para a determinação da localização da heterocromatina constitutiva processou-se de acordo com o protocolo de SUMNER (1972), com modificações. As preparações cromossômicas com quinze dias após a fixação foram submetidas à hidrólise em HCl 0,2 N, à temperatura ambiente durante 30 minutos. Completado esse tempo, as lâminas foram lavadas em água destilada e submetidas ao tratamento com hidróxido de bário a 5%, sendo

mantidas a 60°C, por tempo variável de 15 a 25 minutos. A seguir, o material foi lavado em água destilada e passado rapidamente em HCl 1 N em banho-maria a 60° C. Posteriormente, as lâminas foram incubadas em 2xSSC pH 7,0 a 60° C durante 20 minutos e, em seguida, lavadas em água destilada. Após a secagem, o material foi corado com solução tamponada de Giemsa a 2%, pH 6,8 durante 30 minutos, lavado em água destilada e seco ao ar.

d) Coloração Ag-NOR

A coloração Ag-NOR para a localização das regiões organizadoras nucleolares (RONs) processou-se de acordo com o protocolo de HOWELL & BLACK (1980) com modificações. O material foi inicialmente hidrolisado em HCl a 60° C por 20 minutos, sendo a hidrólise interrompida por um banho em água gelada desionizada. Após a secagem das lâminas, uma gota de solução reveladora de gelatina formolizada a 1% e outra de solução aquosa de nitrato de prata a 50% foram depositadas em cada uma das extremidades da lâmina. Sobre as gotas misturadas foram colocadas duas lamínulas e as lâminas mantidas a 50-60° C, por cerca de 7 minutos, até que a mistura das soluções apresentasse coloração castanho-dourada. A seguir, as lâminas foram lavadas em água destilada, secas e submetidas à coloração em solução a 2% de Giemsa tamponada por 8 minutos.

5. HIBRIDIZAÇÃO *IN SITU* FLUORESCENTE (FISH) COM SONDA TELOMÉRICA

A sonda utilizada no procedimento de hibridização para determinação dos sítios de DNA telomérico foi a *All human telomere* - Oncor, nº Cat. P 5097. Esta sonda consiste de seqüências de DNA de segmentos teloméricos de cromossomos humanos marcadas com digoxigenina.

O procedimento de hibridização *in situ* fluorescente envolveu um pré-tratamento dos cromossomos, seguido da hibridização e detecção. Inicialmente, os cromossomos foram desidratados em uma série de álcoois 70, 85 e 100%, por 2 minutos. cada, limpos com solução de RNase (100 µg/ml em 2xSSC a 37°C por 1 hora) e pepsina, e desnaturados em solução de formamida 70%/2xSSC, pH 7,0 à 72°C durante 2 minutos. Após nova desidratação na série de álcoois gelados, o material foi hibridizado com a sonda de seqüências teloméricas a 37°C por períodos de 15 a 20 horas. Após a hibridização, as lâminas foram lavadas em 2 banhos de 2xSSC à temperatura ambiente, 1 banho em formamida 50% a 37°C e 1 banho em *Washing Buffer I* (4 x 2xSSC e 0,05% v/v tween 20) à 37° C por 5 minutos. A detecção da hibridização foi feita com o emprego do kit de detecção também da Oncor digoxigenina - fluoresceína-isotiocianato (FITC) (S 1331 - DF), com e sem amplificação do sinal, e uso dos contracorantes iodeto de propídeo (IP) e diamidino-fenilindole (DAPI).

6. ANÁLISE CITOGENÉTICA

As lâminas com as colorações convencionais e bandamentos foram observadas sob microscopia de luz. Para a caracterização dos cariótipos foram analisados os cromossomos metafásicos, que permitem o melhor

reconhecimento da morfologia e padrões de bandas. Para cada animal foram analisadas diversas metáfases com os diferentes tipos de bandas e coloração. As metáfases representativas dos padrões de bandas obtidos foram fotografadas em microscópio Zeiss em aumento de 1000 – 1250 X. O filme empregado foi ILFORD PANF 50 ASA e 100 ASA. Na revelação dos filmes foi utilizado o revelador Kodak D-72, e as imagens obtidas foram copiadas em papel Kodabrome Print F2 e F3 da Kodak. As melhores metáfases documentadas foram utilizadas para a montagem dos cariótipos, onde os cromossomos foram ordenados em ordem decrescente de tamanho, destacando-se os cromossomos sexuais. Na descrição dos cariótipos, os cromossomos foram classificados segundo a morfologia e tamanho de acordo com LEVAN *et al.* (1964). As pranchas foram fotografadas em filme TMAX ASA 100, reveladas em D-72 e fotocopiadas em Kodabrome Print F2.

As preparações submetidas à hibridização *in situ* fluorescente foram observadas ao microscópio de epifluorescência da Zeiss, com lâmpada de 50 watts e filtros apropriados. As metáfases representativas foram fotografadas com filmes Ektachrome 400 ASA (Kodak), Supra 400 ASA (Kodak), Ultra 400 ASA (Kodak) e as imagens convertidas em fotografias.

IV. RESULTADOS

No desenvolvimento do trabalho foram obtidas dos 59 espécimes, 85 amostras, sendo 55 biópsias, para as quais foram iniciadas culturas de fibroblastos e 30 preparações diretas de medula óssea (cultura de curta duração). Em relação às culturas de fibroblastos, 54,5% (30) apresentaram crescimento celular, porém, somente doze forneceram número suficiente de metáfases para a realização de colorações e bandamentos (Tabela 4). A taxa de crescimento das culturas de *Vespertilionidae*, avaliada visualmente pela proliferação das células e ocupação da superfície de adesão (substrato), foi baixa quando comparada com culturas estabelecidas no mesmo período para outras espécies, como por exemplo, as pertencentes à família *Molossidae*.

As demais culturas que apresentaram crescimento foram perdidas durante o manuseio pela contaminação por fungos e bactérias. As 25 culturas restantes não apresentaram crescimento pois, 23 contaminaram logo no início (nos três primeiros dias) e 2 os fragmentos não aderiram.

Em relação às 30 amostras de medula óssea, nenhuma delas forneceu material celular para análise. Esses resultados e os obtidos nas análises citogenéticas são apresentados e discutidos com maiores detalhes separadamente para cada uma das espécies e situações.

Tabela 4: Resultados obtidos para os exemplares processados, discriminados pela espécie, número de registro, sexo e procedimento de cultura utilizado. **Cr** = cresceu, **S** = suficiente, **I** = insuficiente, M = macho, F = fêmea.

Espécie	Número de Registro	Sexo	Procedimentos	Resultados	
				Situação da Cultura	Metáfases
<i>Myotis nigricans</i>	CFC 218	F	Fibroblasto	Cr	S
	CFC 456	M	Fibroblasto	Cr	I
	CFC 460	F	Fibroblasto	Cr	I
	CFC 461	F	Fibroblasto	Cr	I
	CFC 468	F	Fibroblasto	Cr	I
	CFC 469	F	Fibroblasto	Cr	I
	CFC 470	F	Fibroblasto	Cr	S
	CFC 471	F	Fibroblasto	Cr	I
	CFC 472	F	Fibroblasto	Cr	I
	CFC 473	M	Fibroblasto	Cr	S
	CFC 485	F	Fibroblasto	Cr	I
	CFC 486	F	Fibroblasto	Cr	I
	CFC 492	F	Fibroblasto	Cr	I
	CFC 494	F	Fibroblasto	Cr	I
	CFC 522	F	Fibroblasto	Cr	I
	CFC 568	M	Fibroblasto	Cr	S
	CFC 569	M	Fibroblasto	Cr	S
	CFC 584	M	Fibroblasto	Cr	I
	CFC 586	M	Fibroblasto	Cr	I
	CFC 587	F	Fibroblasto	Cr	S
	CFC 588	F	Fibroblasto	Cr	I
	CFC 591	M	Fibroblasto	Cr	I
<i>Myotis riparius</i>	CFC 579	F	Fibroblasto	Cr	S
<i>Lasiurus ega</i>	CFC 114	F	Fibroblasto	Cr	S
	CFC 515	F	Fibroblasto	Cr	I
<i>Lasiurus cinereus</i>	CFC 119	F	Fibroblasto	Cr	S
<i>Histiotus velatus</i>	CFC 346	M	Fibroblasto	Cr	S
	CFC 516	M	Fibroblasto	Cr	I
	CFC 562	M	Fibroblasto	Cr	S
<i>Eptesicus brasiliensis</i>	CFC 567	F	Fibroblasto	Cr	S

1. *Myotis nigricans* e *Myotis riparius*

Foram processados 47 espécimes de *Myotis nigricans* (18 machos e 29 fêmeas) e um espécime de *Myotis riparius* (1 fêmea). Para *M. nigricans*, foi possível o estabelecimento de culturas de fibroblastos apenas de seis espécimes (CFC 218, CFC 470, CFC 473, CFC 568, CFC 569 e CFC 587), a partir das quais foram preparadas lâminas contendo metáfases para análise. As demais culturas, não cresceram (2) ou apresentaram contaminação por fungos logo no início ou durante o crescimento celular (39). A presença de microorganismos como fungos e bactérias em culturas, geralmente, ocasionam morte parcial das células ou descolamento, comprometendo assim o seu desenvolvimento.

As metáfases obtidas a partir das culturas celulares dos 6 espécimes de *M. nigricans* foram submetidas a coloração com Giemsa para obtenção do cariótipo usual, a coloração por Ag-NOR para visualização das regiões organizadoras nucleolares (RONs), ao bandamento G, C e a hibridização *in situ* fluorescente com sonda telomérica.

Nas preparações a partir de medula óssea, os estímulos para indução de divisões mitóticas foram realizados pela aplicação de suspensão de fermento glicosado no dorso do animal, 24 horas antes da morte, em 22 espécimes e 48 horas antes da morte, em 2 espécimes. Porém, as células em divisão, ou seja, as células de medula não responderam ao estímulo aplicado.

A cultura de fibroblasto estabelecida para o único espécime de *M. riparius* (CFC 579) processado possibilitou a obtenção de um número razoável

de metáfases para análise. Não foram feitas preparações de lâminas a partir de medula óssea, pois o espécime foi coletado em Campo Grande e apenas a biópsia de pulmão foi disponibilizada. As lâminas com metáfases foram submetidas a coloração com Giemsa, coloração Ag-NOR, bandamento G, bandamento C e hibridização *in situ* fluorescente.

Os exemplares de *M. nigricans* apresentaram um cariótipo com número diplóide de cromossomos igual a 44 ($2n=44$), constituído por três pares de cromossomos meta-submetacêntricos grandes (pares 1-3), um par de cromossomos submetacêntricos médios (14) e dezessete pares de acrocêntricos de tamanho médio a pequeno (pares 4-13 e 15-21). Portanto, o número fundamental, ou seja, o número de braços do complemento autossômico é igual a 50 ($NF=50$). Os cromossomos sexuais constituem-se por um par de cromossomos heteromórficos, do tipo XY, sendo o cromossomo X um submetacêntrico grande (Figura 3A) e o cromossomo Y um acrocêntrico pequeno.

O padrão de bandamento G obtido para *M. nigricans* está apresentado na Figura 3B. Nenhuma informação foi obtida sobre a localização da heterocromatina constitutiva para *M. nigricans*, através do bandamento C.

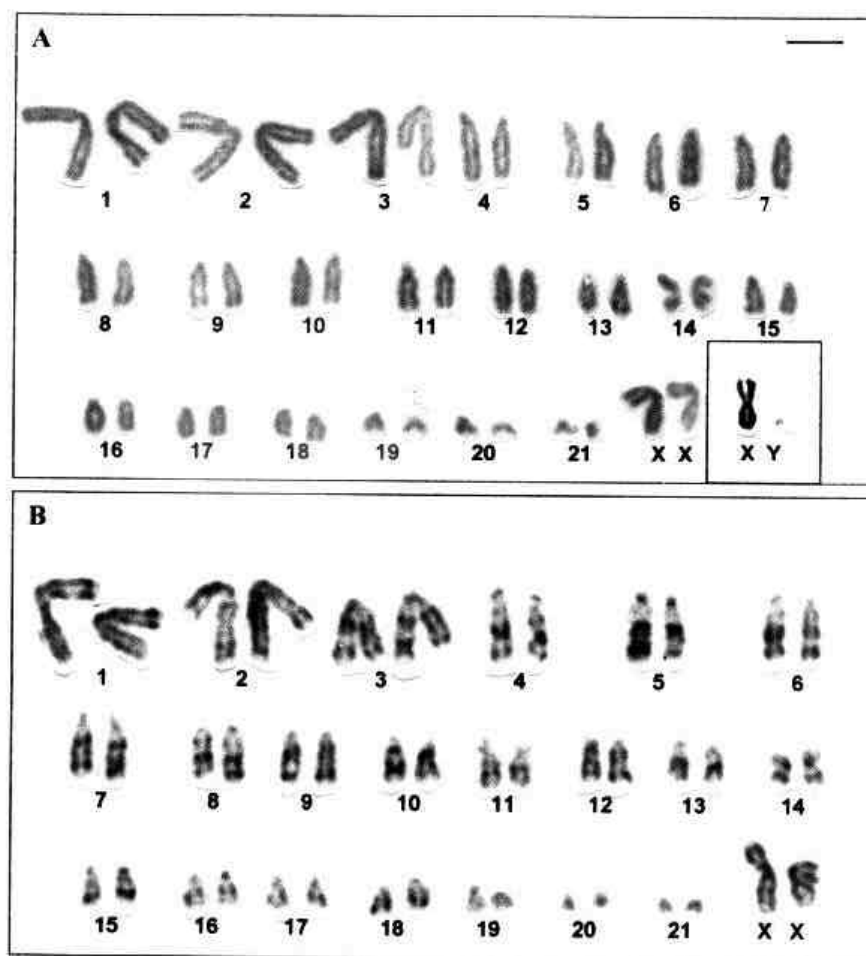


Figura 3: Cariótipo de *Myotis nigricans* ($2n=44$; $NF=50$). A) Coloração usual com Giemsa; B) Bandas G.
Barra=5µm

A partir da análise do material corado pela prata foi possível detectar uma variação no número de nucléolos nos núcleos interfásicos de *M. nigricans*. De um total de 401 núcleos analisados, 26% (101) apresentaram 4 nucléolos. Nos núcleos restantes houve grande variação, sendo observados núcleos com um a nove nucléolos (5% e 0,5%, respectivamente), conforme dados representados na Tabela 5 e Figuras 4 e 5D.

A análise dos cromossomos metafásicos permitiu a visualização das RONS e a observação da ocorrência de variação no número de cromossomos marcados em cada metáfase. Em *M. nigricans* as RONS foram observadas nas regiões terminais dos braços curtos de cromossomos acrocêntricos de tamanhos médio a pequeno, e na região terminal do braço longo de um cromossomo acrocêntrico médio. O número de cromossomos com RONS marcados pela prata variou de 7 a 9. Apesar do número predominante de 4 nucléolos nos núcleos interfásicos de *M. nigricans*, indicando fusão nuclear, nenhum dos cromossomos organizadores nucleolares foram observados em associação nas metáfases analisadas.

O exemplar analisado de *Myotis riparius*, à semelhança de *M. nigricans* apresentou cariótipo com número diplóide de 44 cromossomos ($2n=44$), constituído por três pares de cromossomos meta-submetacêntricos grandes (pares 1-3), um par de cromossomos submetacêntricos médios (14) e dezessete pares de acrocêntricos de tamanho médio a pequeno (pares 4-13 e 15-21). O número de braços do complemento autossômico, isto é, seu número fundamental, é igual a 50 ($NF=50$). O espécime analisado foi uma fêmea, apresentando cromossomos

sexuais constituídos por um par de cromossomos X submetacêntricos médios (Figura 6A).

O padrão de bandamento G obtido para *M. riparius* está apresentado na figura 6B e é similar ao observado em *M. nigricans*, sendo possível identificar homologias entre seus cromossomos.

Em *M. riparius* observou-se que a heterocromatina constitutiva, revelada pelo bandamento C, distribui-se apenas nas regiões centroméricas dos cromossomos (Figura 7).

A análise pela coloração Ag-NOR mostrou que de maneira semelhante à *M. nigricans*, *M. riparius* também apresentou uma grande variação no número, frequência e tamanho dos nucléolos. Foram observados de um a nove nucléolos por núcleo interfásico (6% e 0,25%, respectivamente), sendo mais freqüente a presença de três nucléolos, pois de 406 núcleos analisados para esta espécie, 32,5% deles apresentaram três nucléolos (Tabela 5 e Figuras 4 e 8D).

Em metáfases de *M. riparius*, observou-se marcações de RONS apenas nas regiões terminais de braços curtos de cromossomos acrocêntricos de tamanhos médio a pequeno. Entretanto, de maneira semelhante ao observado em *M. nigricans*, foi detectada uma variação no número de cromossomos metafásicos marcados pela prata, sendo observados cromossomos com seis a dez RONS (Figura 8A-C). Esses cromossomos não foram observados em associação nas metáfases analisadas.

Tabela 5: Número de nucléolos interfásicos nos núcleos de *Myotis nigricans* e *Myotis riparius*.

Número de nucléolos por Núcleo interfásico	Número de núcleos analisados e Porcentagens	
	<i>Myotis nigricans</i>	<i>Myotis riparius</i>
01	(20) - 5%	(23) - 5,7%
02	(47) - 11,77%	(116) - 28,57%
03	(90) - 22,55%	(132) - 32,51%
04	(101) - 25,31%	(79) - 19,45%
05	(84) - 21,05%	(43) - 10,6%
06	(40) - 10,02%	(10) - 2,5%
07	(15) - 3,75%	(01) - 0,25%
08	(02) - 0,5%	(01) - 0,25%
09	(02) - 0,5%	(01) - 0,25%
10	-	(01) - 0,25%
Total analisado	(401) - 100%	(407) - 100%

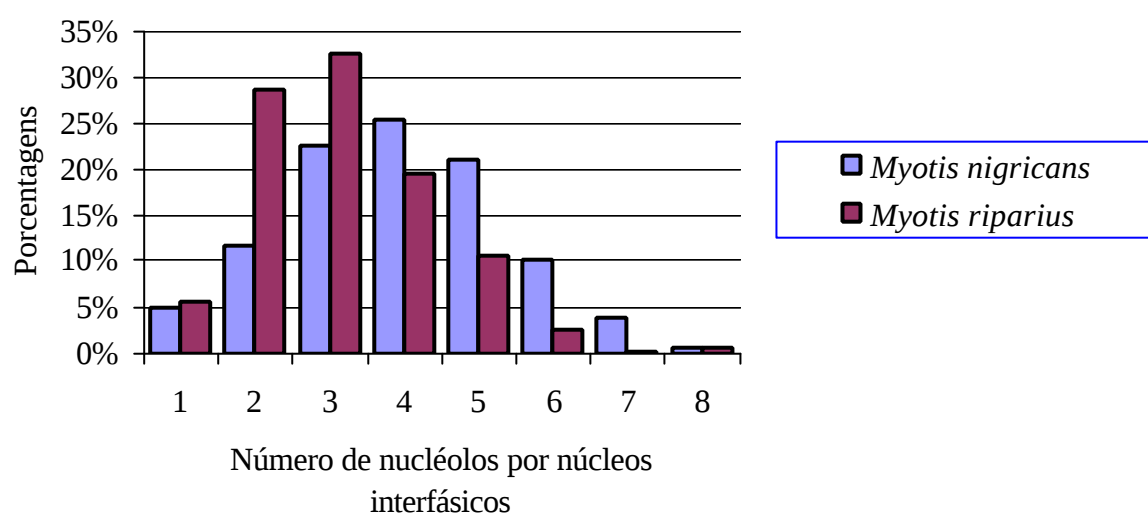


Figura 4: Variação e frequência do número de nucléolos por núcleo interfásico, nas espécies de *Myotis nigricans* e *Myotis riparius*.

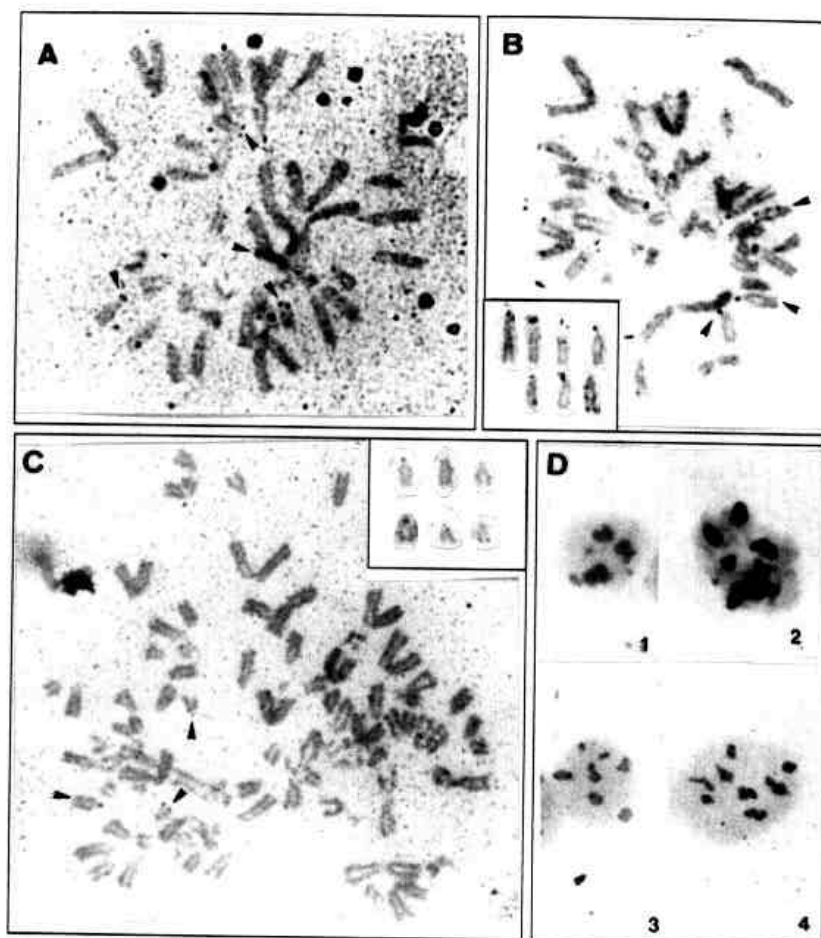


Figura 5: Metáfases e núcleos interfásicos de *Myotis nigricans* corados pela prata. A, B e C) Metáfases evidenciando cromossomos acrocêntricos com RONS em regiões terminais dos braços curtos e braço longo (setas); **in set**: destaque dos cromossomos marcados; D) Núcleos interfásicos evidenciando 3, 6, 7 e 8 nucléolos (1-4).

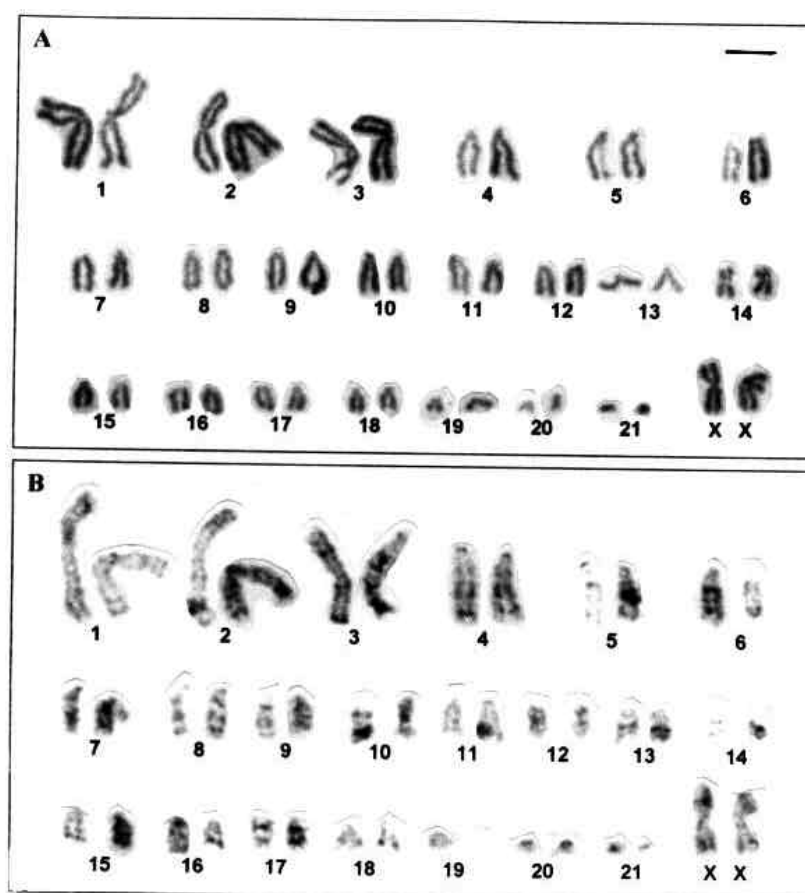


Figura 6: Cariótipo de *Myotis riparius* ($2n=44$; $NF=50$). A) Coloração usual com Giemsa; B) Bandas G.
Barra= $5\mu m$

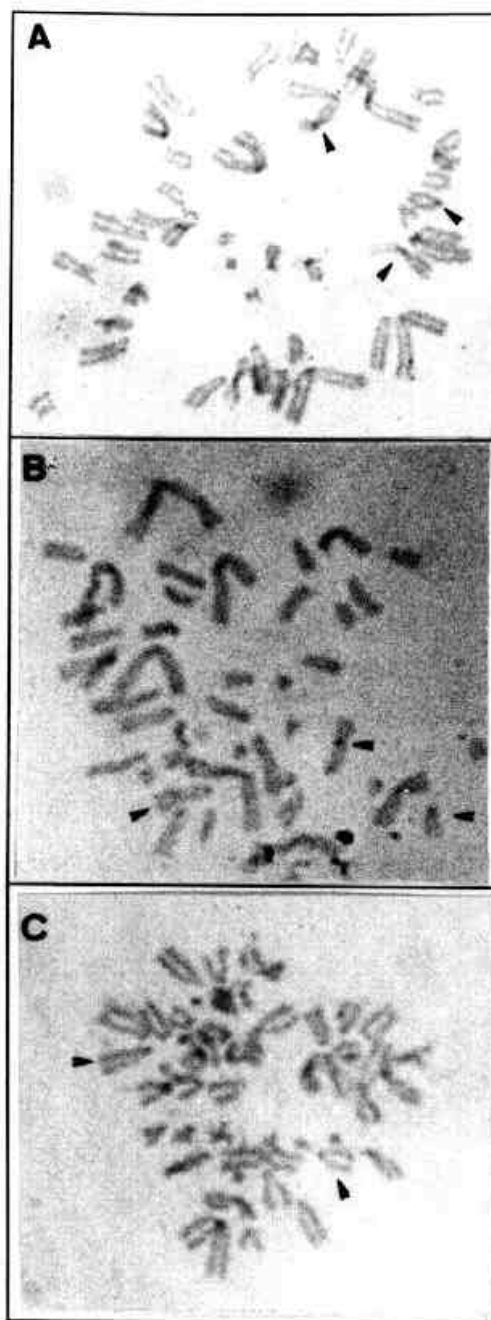


Figura 7: Metáfases de *Myotis riparius* com bandamento C. Setas indicam cromossomos com marcações em regiões pericentroméricas.

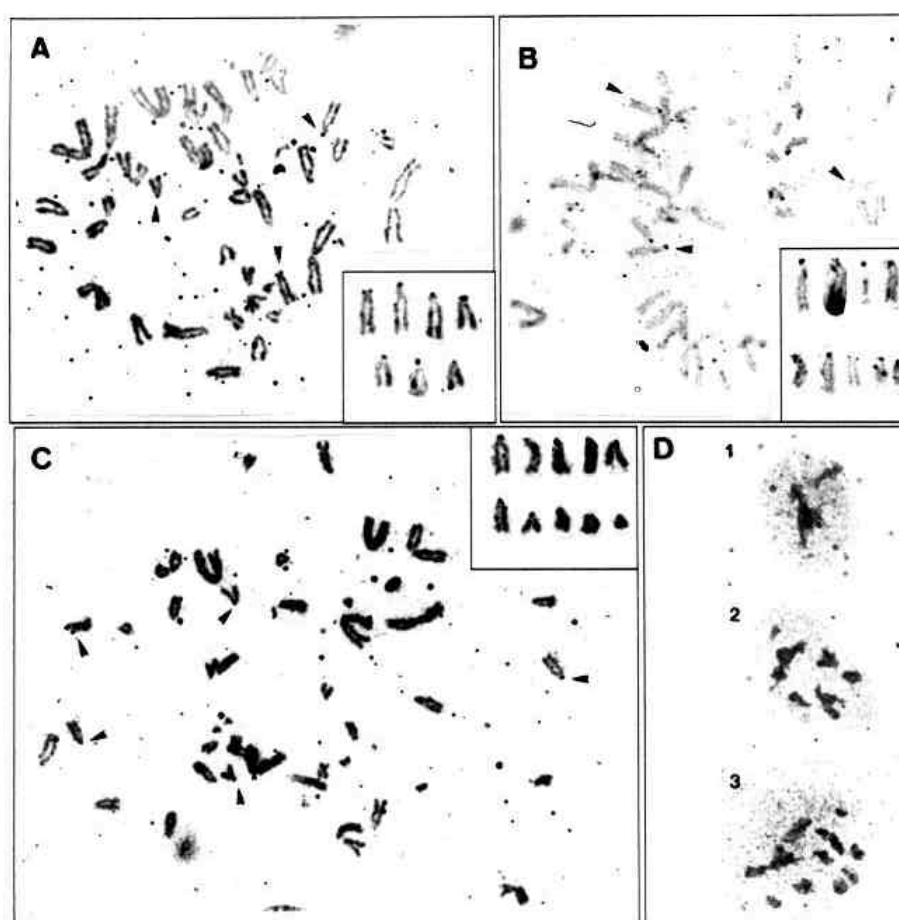


Figura 8: Metáfases e núcleos interfásicos de *Myotis riparius* corados pela prata. A, B e C) Metáfases evidenciando as RONS em regiões terminais dos braços curtos dos cromossomos acrocêntricos (setas); **in set**: destaque dos cromossomos marcados; D) Núcleos interfásicos evidenciando 2, 6, e 10 nucléolos (1-3).

A partir da aplicação da hibridização *in situ* fluorescente (FISH) em metáfases de *M. nigricans* e *M. riparius* foi possível identificar os sítios cromossômicos hibridizados com as seqüências (TTAGGG)_n, características de telômeros. Os sinais fluorescentes indicativos da hibridização foram observados nos telômeros dos cromossomos e em regiões pericentroméricas de alguns cromossomos acrocêntricos, nas duas espécies analisadas (Figuras 9 A-C e 10 A-C). Os sinais apresentaram variação na intensidade de fluorescência entre os cromossomos, sendo que os telômeros dos cromossomos de *M. nigricans* apresentaram maior fluorescência que essas mesmas regiões em *M. riparius*. Foram observados ainda, sinais fluorescentes em região intersticial das duas cromátides de um dos braços do segundo maior par de cromossomos meta-submetacêntricos de *M. nigricans*, indicando a possibilidade de um sítio intersticial (ITS – *Interstitial Telomeric Signal*) de seqüências (TTAGGG)_n (Figura 9A).

Durante a análise dos cromossomos submetidos ao FISH, onde esses são corados pelo DAPI, um fluorocromo A-T específico, observou-se que alguns cromossomos das duas espécies analisadas apresentavam fluorescência aumentada em regiões onde tipicamente são observados blocos de heterocromatina constitutiva após o bandamento C, como as regiões pericentroméricas (Figuras 9D-F e 10D-F).

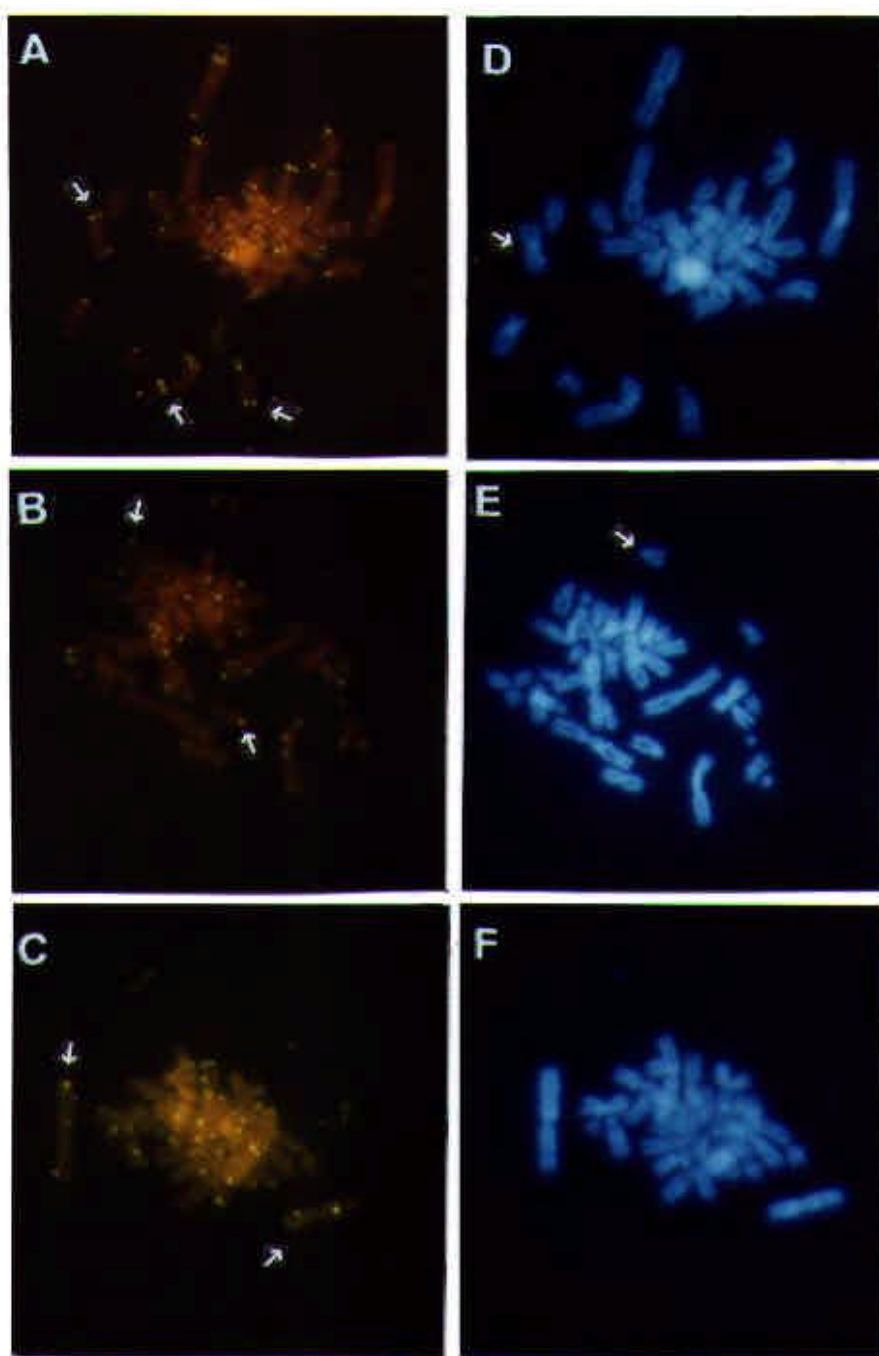


Figura 9: Hibridização *in situ* fluorescente com sonda de seqüências teloméricas (TTAGGG)_n em metáfases de *Myotis nigricans*. A-C) As setas indicam marcações nos telômeros, em regiões pericentroméricas e em um dos braços do cromossomo 2; D-F) Metáfases em coloração DAPI evidenciando a morfologia dos cromossomos e sinais fluorescentes nos centrômeros.

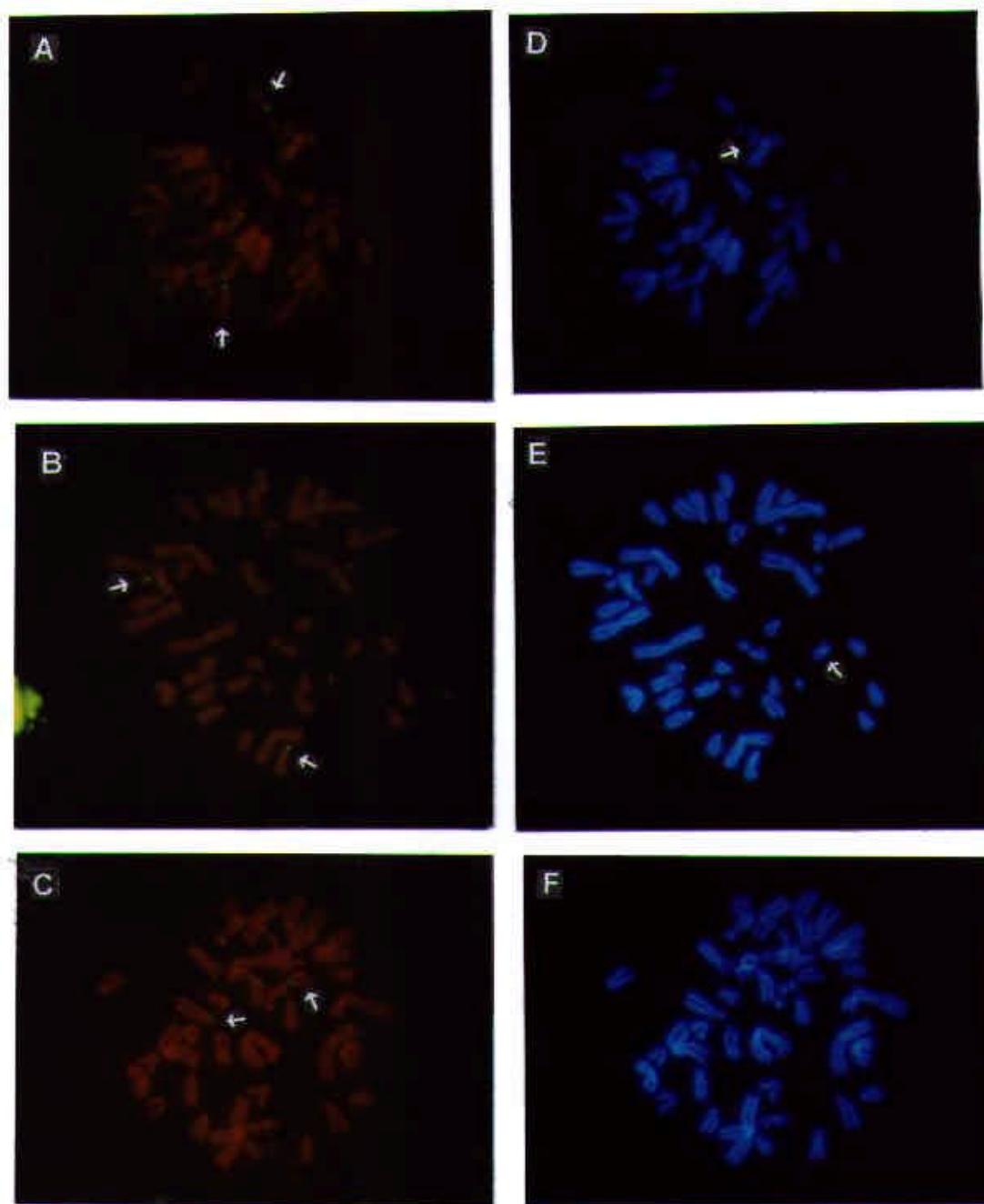


Figura 10: Hibridização *in situ* fluorescente com sonda de seqüências teloméricas (TTAGGG)_n em metáfases de *Myotis riparius*. A-C) As setas indicam marcações nos telômeros e em regiões pericentroméricas; D-F) Metáfases em coloração DAPI evidenciando a morfologia dos cromossomos e sinais fluorescentes nos centrômeros.

2. *Lasiurus ega* e *Lasiurus cinereus*

Quatro espécimes do gênero *Lasiurus* foram capturados e analisados, sendo três de *L. ega* (CFC 114, CFC 506, CFC 515) e um de *L. cinereus* (CFC 119). Para todos foram iniciadas culturas a partir de biópsia de pulmões, para o cultivo de fibroblastos. Duas das culturas (CFC 515 e CFC506) sofreram contaminações por fungos e bactérias logo no início do cultivo, sendo descartadas. As demais (CFC 114 – *L. ega* e CFC 119 – *L. cinereus*), cresceram satisfatoriamente sendo possível a obtenção de lâminas com número razoável de metáfases, as quais foram submetidas aos bandamentos e colorações. A preparação a partir de medula óssea foi feita apenas para *Lasiurus ega* (CFC 515), contudo o estímulo, aplicado 24 horas antes da morte do animal não foi satisfatório.

A partir da análise de cromossomos metafásicos corados por Giemsa foi possível a obtenção do cariótipo usual do exemplar fêmea de *L. ega*, que apresentou um número diplóide de 28 cromossomos ($2n=28$) e número fundamental igual a 48 (NF=48). Seu cariótipo constitui-se por dez pares de cromossomos meta-submetacêntricos grandes a médios (pares 1-10), um par de subtelocêntricos pequenos (par 12) e dois pares de acrocêntricos pequenos (pares 11 e 13), o menor deles apresentando uma constrição secundária proximal no braço longo (par 13). O cromossomo sexual X é um subtelocêntrico médio (Figura 11A).

A heterocromatina constitutiva evidenciada pelo padrão de bandas C foi identificada nas regiões centroméricas de todos os cromossomos,

com variação no tamanho dos blocos heterocromáticos, e também no braço curto e região pericentromérica do cromossomo X (Figura 11B).

Nenhum dado foi obtido referente a localização das RONS pela coloração Ag-NOR. Entretanto, foi possível observar a partir da coloração usual, que as regiões dos centrômeros (as constrições primárias) apresentaram uma certa descondensação em várias metáfases analisadas. Juntamente com estas, outras regiões também apresentaram descondensação diferencial, merecendo destacar a região proximal do braço longo do par cromossômico 13. Algumas dessas regiões podem representar possíveis sítios de DNA ribossômico nesta espécie.

O cariótipo observado para *L. cinereus* é semelhante ao de *L. ega*, apresentando número diplóide de cromossomos igual a 28 ($2n=28$) e número fundamental igual a 48 ($NF=48$). Constitui-se por dez pares de cromossomos meta-submetacêntricos variando de grandes a médios (pares 01-10), um par de subtelocêntricos pequenos (par 12) e dois pares de acrocêntricos pequenos (pares 11 e 13). Os pares 11 e 13 apresentaram um heteromorfismo de tamanho e forma, sendo observado em um único elemento de cada par, uma constrição secundária em posição mediana-distal no braço longo do cromossomo do par 11 e proximal no braço longo do cromossomo do par 13. Os cromossomos sexuais na fêmea analisada compõem-se de um par de cromossomos X submetacêntricos médios (Figura 12A).

A análise do bandamento C possibilitou a observação da distribuição da heterocromatina constitutiva para a espécie, identificada nas

porções centroméricas de todos cromossomos autossomos e dos cromossomos sexuais (Figura 12B).

A análise das metáfases coradas pela prata (Ag-NOR) evidenciou que as regiões organizadoras nucleolares (RONs) em *L. cinereus* estão localizadas nos cromossomos acrocêntricos heteromórficos, coincidindo com as constrições secundárias presentes nestes cromossomos. As marcações ocorreram na região distal do braço longo de um dos cromossomos do par 11 e na região proximal do braço longo de um dos cromossomos do par 13 (Figura 12C e D).

A obtenção de padrões de bandas G e FISH para *L. ega* e *L. cinereus* não foi possível devido ao número insuficiente de metáfases e espécimes coletados para este gênero.

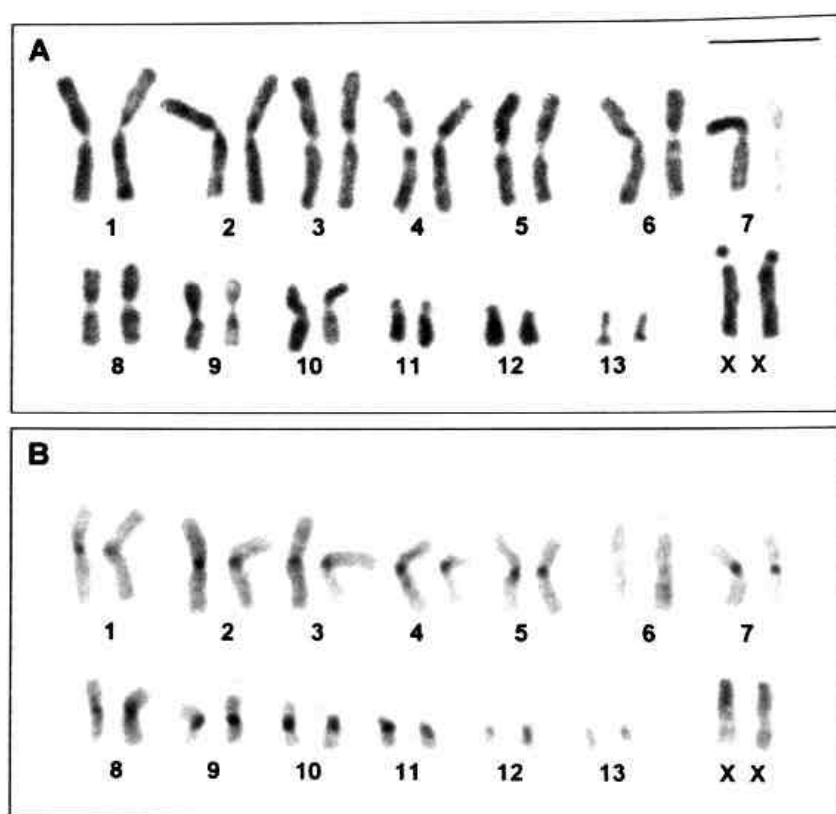


Figura 11: Cariótipo de *Lasiurus ega* ($2n=28$; $NF=48$). A) Coloração usual com Giemsa; B) Bandamento C.
Barra= $5\mu m$.

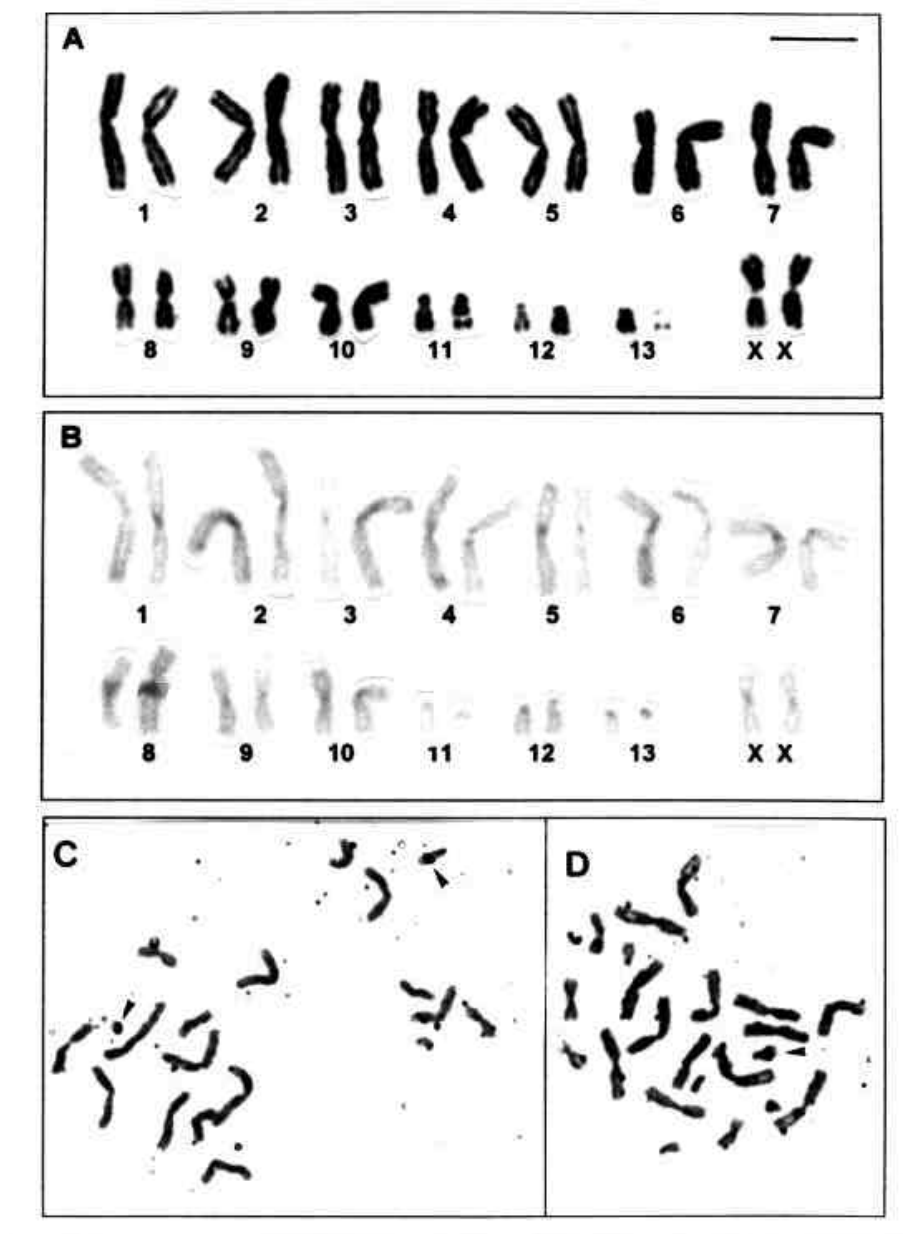


Figura 12: *Lasiurus cinereus* ($2n=28$; $NF=48$). A) Cariótipo em coloração usual com Giemsa; B) Cariótipo com bandamento C; C e D) Metáfases parciais indicando a localização das RONS (setas) na porção distal do braço longo em um dos cromossomos do par 11 e na porção proximal do braço longo em um dos cromossomos do par 13. Barra= $5\mu m$.

3. *Histiotus velatus*

Das culturas iniciadas a partir das biópsias de pulmões, obtidas de três espécimes de *Histiotus velatus* coletados (CFC 346, CFC 516 e CFC 562), somente para os exemplares (CFC 346 e CFC 562) foi possível a obtenção de lâminas com metáfases. As preparações de medula óssea não forneceram metáfases. O estímulo aplicado no espécime CFC 516 aparentemente não foi suficiente para a indução do aumento de células em divisão.

O exemplar macho analisado (CFC 346) da espécie *H. velatus* apresentou um número diplóide de cromossomos de $2n=50$ e o número fundamental $NF=48$. O cariótipo possui vinte e quatro pares de autossomos, representados por cromossomos acrocêntricos que variam em tamanho (pares de 01 a 24), um dos quais apresenta uma constrição secundária proximal no braço longo (15). Os cromossomos sexuais constituem-se por um X submetacêntrico médio e um Y acrocêntrico pequeno (Figura 13A). A heterocromatina constitutiva, evidenciada após o bandamento C, está localizada nas regiões centroméricas dos cromossomos e na porção terminal do braço longo de um acrocêntrico pequeno (par 21) (Figura 13B). A coloração Ag-NOR evidenciou a presença de 2 nucléolos nos núcleos interfásicos, bem como a localização das RONS, que foram observadas na constrição secundária do braço longo do par acrocêntrico 15 (Figura 13D).

A análise da hibridização *in situ* fluorescente em metáfases de *H. velatus* possibilitou a observação de sinais de fluorescência com intensidade variável nos telômeros de praticamente todos os cromossomos, e em regiões

pericentroméricas de cromossomos acrocêntricos. Não houve coincidência dos sinais com as regiões organizadoras nucleolares (RONs) (Figura 14A e B). Nenhum dado foi obtido referente ao padrão de bandamentos G.

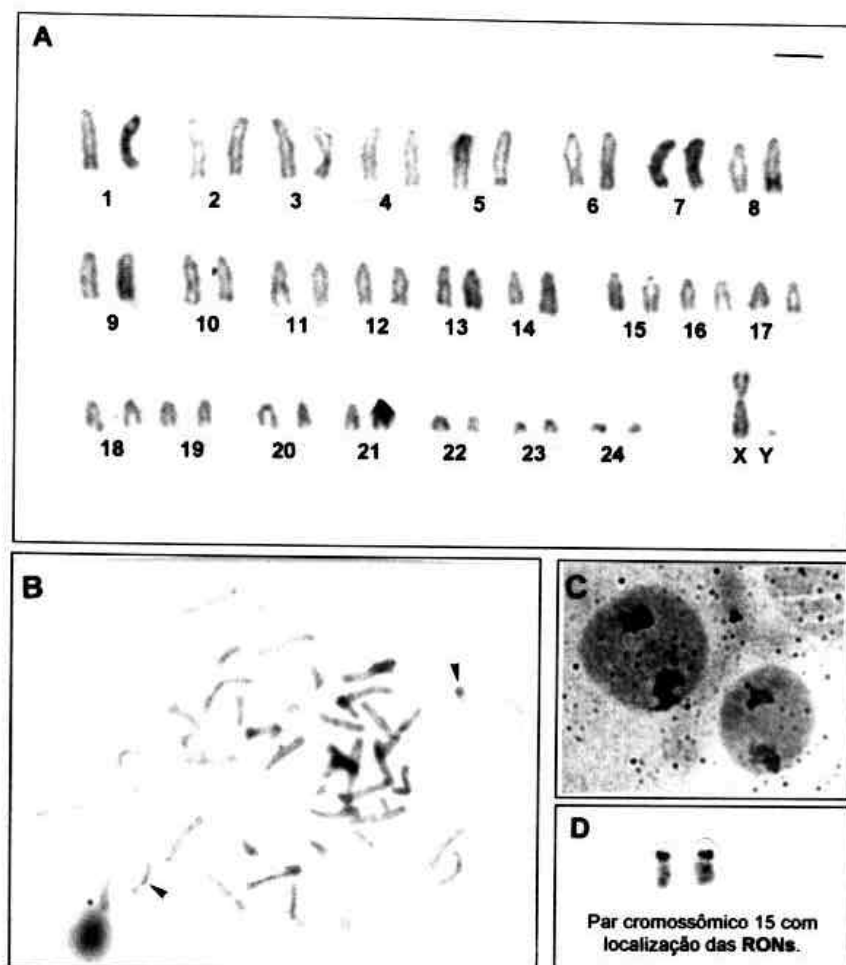


Figura 13: *Histiotus velatus* ($2n=50$; $NF=48$). A) Cariótipo em coloração usual com Giemsa. B) Metáfase com bandamento C. C) Núcleos interfásicos corados pela prata evidenciando os nucléolos; D) Localização das RONS.

Barra= $5\mu m$

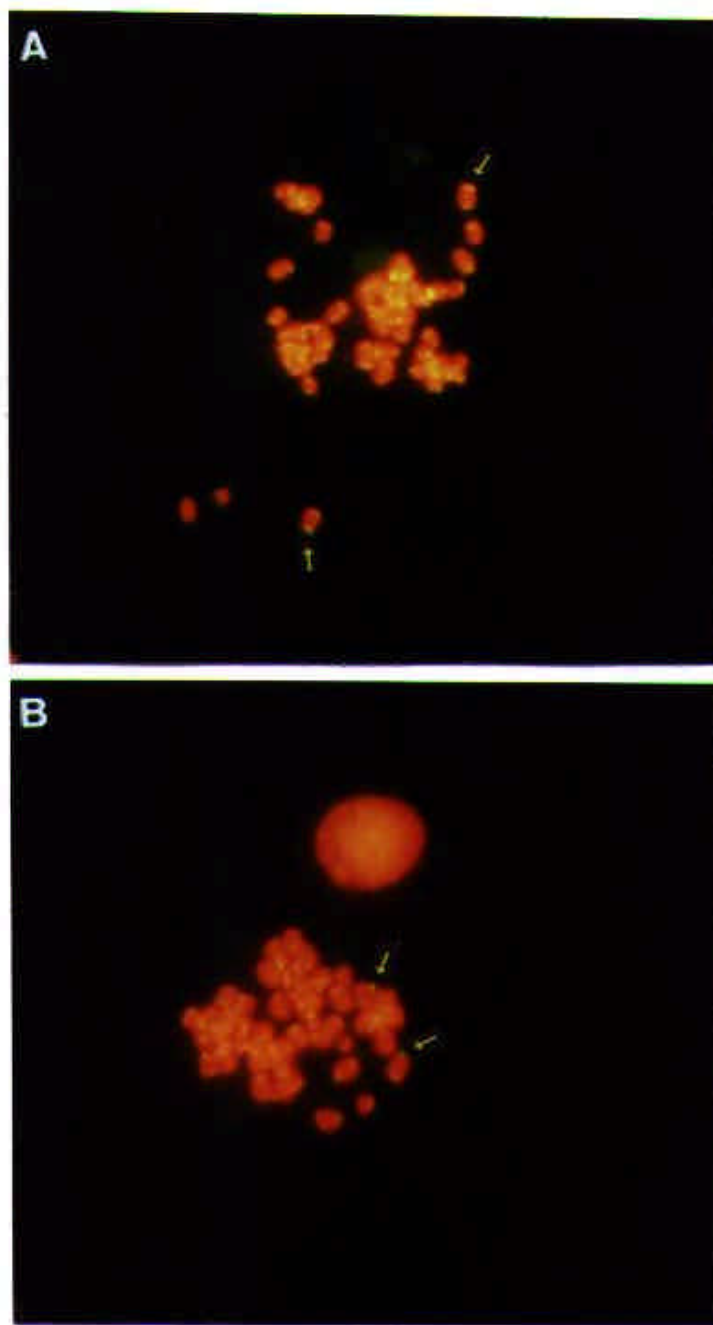


Figura 14: Metáfases de *Histiotus velatus* após hibridização *in situ* fluorescente com sonda de seqüências teloméricas (TTAGGG)_n. As setas indicam marcações nos telômeros e regiões pericentroméricas.

4. *Eptesicus brasiliensis*

Dos quatro espécimes de *Eptesicus brasiliensis* capturados, para somente um espécime (CFC 567) foi possível a obtenção de lâminas com metáfases a partir das culturas de fibroblastos. Durante o cultivo e manutenção das culturas, elas apresentaram crescimento satisfatório, sendo possível efetuar alguns repiques para aumentar o número de células em cultivo. Contudo, após as preparações das lâminas, o número de metáfases foi baixo, o que dificultou a aplicação dos diferentes bandamentos. As preparações a partir de medula óssea não propiciaram a obtenção de metáfases, possivelmente pela ausência de resposta ao estímulo aplicado.

As lâminas com as poucas metáfases obtidas foram submetidas a coloração usual, hibridização *in situ* fluorescente com a sonda de DNA telomérico (TTAGGG)_n e coloração Ag-NOR.

O espécime analisado, uma fêmea, apresentou número diplóide $2n=50$ e $NF=48$, sendo todos os cromossomos do complemento autossômico acrocêntricos, variando em tamanho de grandes a pequenos (Figura 15). Foi possível observar ainda, em um pequeno par (15), uma constrição secundária proximal no braço longo. O cromossomo sexual X é representado por um cromossomo submetacêntrico médio (Figura 15A e B).

O local provável das RONS é a constrição secundária proximal no braço longo do par de acrocêntricos 15. Apenas uma lâmina foi submetida a hibridização *in situ* fluorescente, a qual apresentou hibridização positiva nos telômeros de alguns cromossomos e em regiões pericentroméricas (Figura 16A).

Os sinais nas regiões teloméricas apresentaram pouca intensidade de fluorescência e nenhuma marcação intersticial foi observada. Na coloração pelo DAPI foi possível verificar fluorescência aumentada na região pericentromérica de alguns cromossomos (Figura 16B).

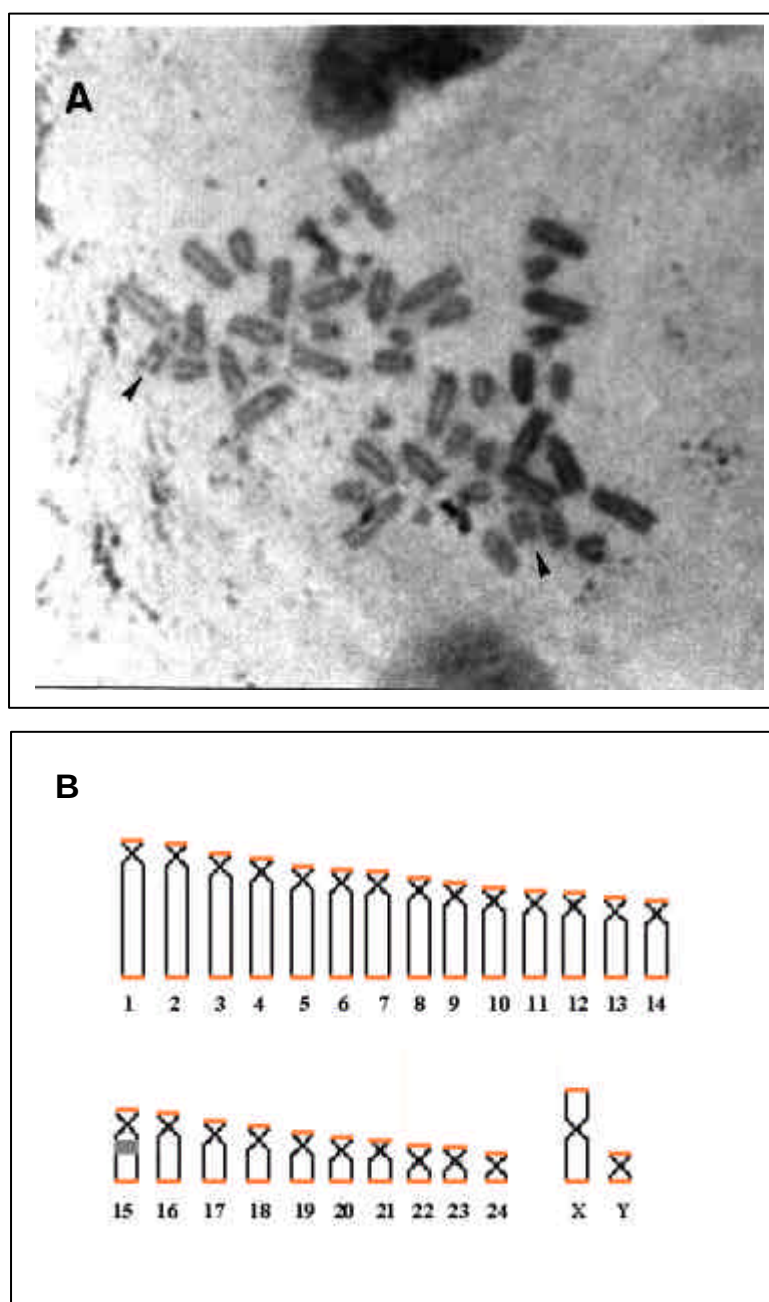


Figura 15: *Eptesicus brasiliensis* ($2n=50$; $NF=48$). A) Metáfase parcial em coloração usual com Giemsa, setas indicando os cromossomos portadores da constrição secundária. B) Representação esquemática do cariótipo com a localização dos sítios de DNA telomérico (TTAGGG)_n (em laranja) e a localização possível das RONS (em cinza).

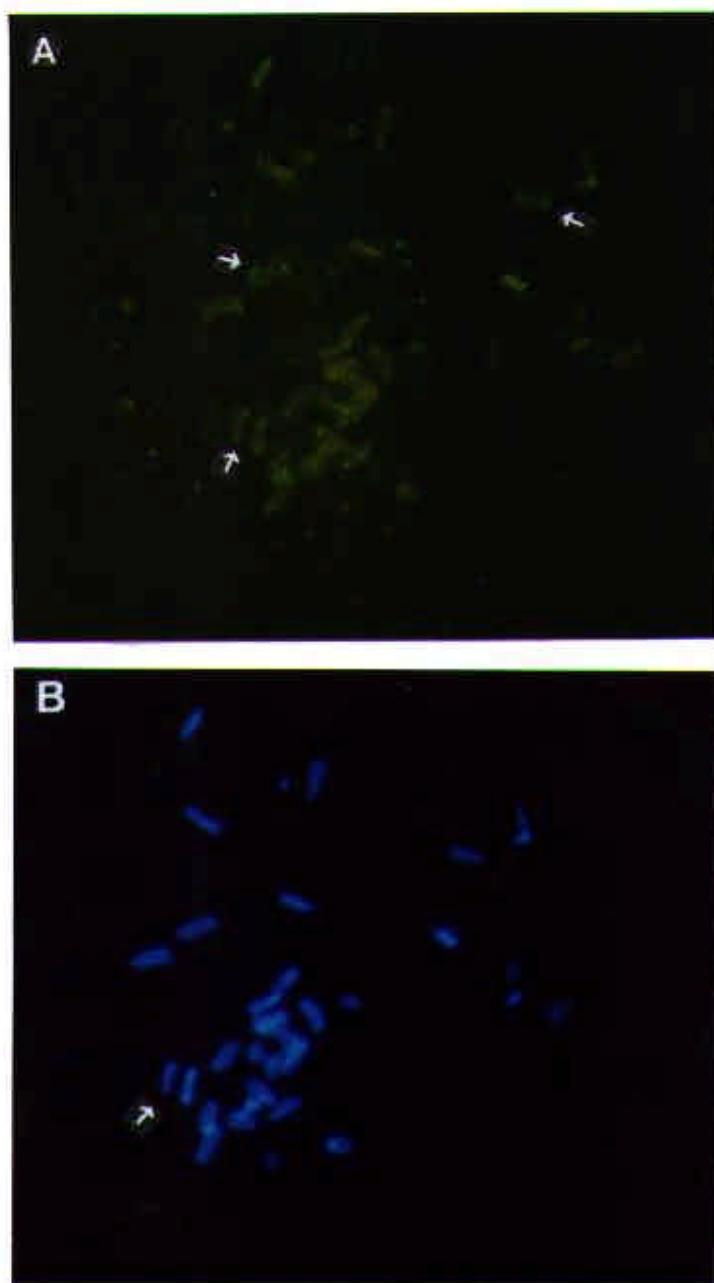


Figura 16: Hibridização *in situ* fluorescente com sonda de seqüências teloméricas (TTAGGG)_n em metáfases de *Eptesicus brasiliensis*. A) As setas indicam marcações nos telômeros e em regiões pericentroméricas. B) Metáfase parcial em coloração DAPI evidenciando a morfologia dos cromossomos e sinais fluorescentes nos centrômeros.

V. DISCUSSÃO

1. Culturas Celulares

Em morcegos, um tecido que mostra-se bastante adequado para a iniciação de culturas de células do tipo fibroblastóide, é o de pulmão (MORIELLE-VERSUTE & VARELLA-GARCIA, 1995). Os fragmentos obtidos dos recortes de biópsias de pulmão apresentam grande aderência ao substrato plástico dos frascos de cultura. Dessa forma, podem ser depositados diretamente na superfície dos frascos, facilitando assim a aderência das células fibroblastóides ao substrato, propiciando a sua proliferação e o desenvolvimento da cultura. Entretanto, a manipulação inadequada da cultura, a ocorrência de contaminações das amostras, ou ainda, esterilizações insuficientes dos materiais utilizados nas culturas, podem ocasionar contaminação por microorganismos como fungos e bactérias, determinando prejuízo no desenvolvimento destas.

As culturas de células iniciadas para os diferentes espécimes deste trabalho apresentaram um alto índice de contaminações. Cerca de 46% delas apresentaram contaminação no início da cultura, ou seja, durante os três primeiros dias após a montagem. Nestes casos, a causa mais provável para as contaminações é a presença de bactérias e/ou fungos que poderiam estar presentes na biópsia de pulmão. Embora os pulmões sejam retirados em condições assépticas, não há garantias quanto a presença de microorganismos nos condutos pulmonares, que quando em presença do meio de cultivo podem proliferar, comprometendo as condições da cultura e o crescimento celular.

As demais culturas, ou seja, os 54% restantes não contaminaram nos três primeiros dias, apresentando crescimento celular. Contudo, apenas doze culturas foram colhidas para a obtenção de metáfases e preparação de lâminas. As demais apresentaram contaminações secundárias ocorridas durante os procedimentos de manutenção das culturas (trocas de meio ou repiques). Os microorganismos mais frequentes nas contaminações de culturas secundárias foram os fungos.

MCGARRITY (1976) estudando as causas do alto índice de contaminação de culturas por micoplasmas, diz ser inaceitável a contaminação em experimentos já padronizados e propõe uma série de cuidados preventivos para minimizar o problema. Os micoplasmas são microorganismos patogênicos auto-replicantes, extremamente pequenos, que parasitam aparelho respiratório e trato urinário humano (RAZIN, 1985; 1994). As contaminações por micoplasmas são de difícil detecção e são responsáveis pelo insucesso das culturas celulares, pois interferem na atividade metabólica normal das células. Apesar de MCGARRITY (1976) identificar algumas das fontes envolvidas na contaminação é difícil detectar a procedência de microorganismos como micoplasma que podem, por exemplo, estar presentes no próprio soro fetal bovino utilizado nas culturas celulares, caso o soro não tenha sido testado quanto a presença de micoplasmas.

Geralmente, os microorganismos mais facilmente detectados que podem estar envolvidos no processo de contaminação são fungos e bactérias. Contudo, uma vez que o material biológico utilizado no preparo das culturas de longa duração são os pulmões, pela sua natureza, função e constituição, são

passíveis de carregarem uma série de microorganismos contaminantes inclusive protozoários como nematodos e outros ainda não identificados (BREDT, A., 1996).

Há que se destacar o fato de que em relação às culturas que apresentaram crescimento celular, este foi muito lento, quando comparado ao crescimento celular de culturas de outras espécies de morcegos, particularmente da família Molossidae. MORIELLE-VERSUTE & VARELLA-GARCIA (1995) relatam que os fibroblastos derivados de pulmões de morcegos apresentam uma alta taxa de crescimento, e que as células estão disponíveis para análises cromossômicas nas passagens iniciais, ou até elas exibirem sinais de senescência, geralmente presentes após 45 dias de cultivo. Diferente dos resultados de MORIELLE-VERSUTE & VARELLA-GARCIA (1995), OBARA & SAITOH (1977) relatam para uma espécie de Vespertilionidae (*Miniopterus schreibersi*) o tempo de três meses para a realização da primeira subcultura (repique), e a obtenção das primeiras metáfases dando-se somente após a segunda passagem, efetuada por volta da segunda semana após a obtenção da primeira subcultura. Estes dados associados aos resultados deste trabalho demonstram que aparentemente a taxa de proliferação celular em Vespertilionidae é menor.

O crescimento lento da cultura, refletido nas poucas células presentes no substrato de crescimento, é o responsável pelo baixo índice mitótico e pela dificuldade na obtenção de metáfases e preparo das lâminas, assim como pela maior frequência de contaminações durante a sua manutenção.

Em relação às culturas de medula óssea, também não foi possível a obtenção metáfases, mesmo depois de aplicados estímulos com injeções

de fermento glicosado por períodos de 24 e 48 horas antes da morte dos animais. A injeção de fermento utilizado para a indução de proliferação celular não resultou no aumento de células em divisão, indicando que os animais não responderam aos estímulos aplicados. Esta ausência aos estímulos e portanto, a não obtenção de metáfases, sugere que ambos os tempos de exposição ao fermento glicosado (24 e 48 horas) foram, provavelmente, insuficientes para a indução de mitoses nas células hematopoiéticas.

Apesar das dificuldades encontradas neste trabalho, o estabelecimento de culturas celulares a partir de fibroblastos 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.

2. Estudos Citogenéticos

As duas espécies de *Myotis* analisadas apresentaram o mesmo número diplóide ($2n=44$) e mesmo número fundamental ($NF=50$). O cariótipo obtido para *M. riparius* apresentou-se similar ao de *M. nigricans*, tanto em coloração usual quanto nos padrões de bandas G.

De forma geral, o cariótipo observado para *M. nigricans* é bastante semelhante em coloração convencional e padrão de bandas G, aos descritos na literatura para essa espécie, e também aos das outras espécies de *Myotis* analisadas (BAKER & PATON, 1967; BICKHAM *et al.*, 1979a e b-Tabela 2).

Semelhante ao observado em *Myotis*, também foram encontradas similaridades entre *Lasiurus cinereus* ($2n=28$; $NF=48$) e *Lasiurus ega*

($2n=28$ e $NF=48$), e entre *Histiotus velatus* ($2n=50$; $NF=48$) e *Eptesicus brasiliensis* ($2n=50$; $NF=48$). Esses dados mostram que o padrão cromossômico da família apresenta um certo conservacionismo. A maioria das espécies pertencentes a um mesmo gênero ou a grupos de gêneros relacionados usualmente tem apresentado extensa similaridade cariotípica, caracterizada pelos mesmos números diplóides e fundamental ou mesmo número fundamental e número diplóide pouco diferenciado.

Entretanto, há descrições de ocorrência de variações intragenérica, intra e interespecíficas. Alguns táxons de Chiroptera com menor representatividade em número de espécies, apesar de muito relacionados taxonômicamente apresentam grande variabilidade cromossômica. À exemplo podemos destacar os gêneros *Rhogeessa* e *Nycticeius*, cujo número diplóide encontrado nas espécies estudadas varia de 30 a 52 e de 34 a 46 respectivamente, com pequena variação no número fundamental ($NF=48$ e 52) (BICKHAM & BAKER, 1977; HONEYCUTT *et al.*, 1980; BAKER *et al.*, 1985; RUEDAS *et al.*, 1990) e, *Pipistrellus*, cujo número diplóide varia de 26 a 44 e o número fundamental de 44 a 56 (OBARA *et al.*, 1976). Esses dados sugerem que entre os eventos cromossômicos que têm sido responsáveis pelas variações estão as pequenas inversões pericêntricas e algumas fusões.

A análise dos núcleos interfásicos e dos cromossomos corados pela prata (coloração Ag-NOR), nas espécies de *Myotis*, permitiu observar variação no número de nucléolos interfásicos e na localização, número e tamanho das RONS.

O número de regiões organizadoras nucleolares corresponde ao número máximo de nucléolos que podem ser encontrados nas células interfásicas. Todavia, o número de RONS que são ativadas pode variar e, portanto, o número de nucléolos pode ou não corresponder ao número de RONS. Nos núcleos analisados da espécie *M. nigricans* o número de nucléolos variou de 01 a 09. O número máximo de 09 indica que pelo menos quatro pares de cromossomos possuem RONS. Em *M. riparius* foram observados de 01 até 10 nucléolos, o que indica a presença de RONS em até cinco pares de cromossomos.

As informações obtidas na análise dos nucléolos interfásicos foram significativas, pois a análise dos cromossomos evidenciou uma variação na localização e no número de cromossomos marcados pela prata. Na espécie *M. nigricans* foram observados até 09 cromossomos com RONS ativas, sendo 07 o número mais freqüentemente observado. Essas RONS foram observadas na região terminal dos braços curtos de cromossomos acrocêntricos e também na região terminal do braço longo de um acrocêntrico médio. Em *M. riparius*, o número máximo observado de cromossomos com RONS ativas foi 10, sendo 07 o número mais freqüentemente observado. Nesta espécie as RONS estão localizadas apenas nos braços curtos de cromossomos acrocêntricos médios e pequenos.

A variação no número de cromossomos marcados em *Myotis* deve estar refletindo a ativação diferencial de RONS, resultando também uma variação no número e no tamanho dos nucléolos. Além da ativação diferencial, a fusão nucleolar resultante do movimento, crescimento e aproximação dos nucléolos que podem ocorrer tanto pela semelhança de atividade dessas regiões,

quanto pela afinidade química, podem ser também responsáveis pela variação no número de nucléolos (SCHWARZACHER & WACHTLER, 1993).

Além da variação no número e na localização, as marcações detectadas como RONS variaram em tamanho. Várias marcações apresentaram-se pequenas e difíceis de serem detectadas. O tamanho e o número das RONS podem estar relacionados com a ativação diferencial dos sítios ribossomais.

Não há informações na literatura a respeito do número e localização exatos das regiões organizadoras nucleolares para as espécies *M. nigricans* e *M. riparius*; entretanto, o número alto de RONS parece ser característico do gênero *Myotis*. VOLLETH (1987) analisando a localização de regiões organizadoras nucleolares em vespertilionídeos, observou que espécies européias pertencentes ao gênero *Myotis* apresentam um grande número de cromossomos marcados pela Ag-NOR, sendo relatado para nove espécies de *Myotis* uma variação de 03 a 12 pares de cromossomos com RONS.

Contrastando com as outras duas espécies anteriores, em *Lasiurus cinereus* e *Histiotus velatus* foram observadas apenas duas RONS, restritas às regiões dos cromossomos que apresentam constrições secundárias. Em *L. cinereus* as constrições estão em dois cromossomos distintos determinando marcações heteromórficas. Embora o padrão Ag-NOR não tenha sido obtido para *Lasiurus ega*, o espécime analisado apresentou uma constrição secundária proximal no braço longo do cromossomo 13, local provável da RON.

Em *H. velatus* a constrição é proximal no braço longo do par acrocêntrico 15, local das RONS. Embora não tenha sido obtido o padrão Ag-

NOR para *E. brasiliensis*, pela similaridade de seu cariótipo com o de *H. velatus* e a presença de uma constrição secundária proximal no braço longo do par 15, presume-se que também nessa espécie as RONS sejam em número de um par. Tanto em *L. cinereus* quanto em *H. velatus* os cromossomos com RONS apareceram marcados em todas as metáfases analisadas, e com tamanho proporcionalmente maior que as RONS múltiplas das espécies de *Myotis*.

VOLLETH (1987) também observou RONS coincidentes com constrições secundárias nas espécies *Eptesicus serotinus*, *Nyctalus leisleri*, *N. lasiopterus*, *N. noctula*, e *Vespertilio murinus*. A autora ao considerar os resultados de seu trabalho propôs três hipóteses para explicar a origem de múltiplas RONS em vespertilínídeos: 1) presença de genes ribossomais em todos os sítios potenciais, mas com ativação e inativação alternada, 2) diferenças espécie-específicas não apenas no número de genes de RNAr mas também nos cromossomos homólogos, ocasionadas por desbalanço em *crossing-over* desigual. 3) mobilidade de DNAr entre os sítios cromossômicos.

A variação na localização e no número das RONS entre as duas espécies de *Myotis* analisadas pode ser devida a inativação diferencial dos genes e a pequenos rearranjos terminais que ocorreram durante eventos do tipo translocações, inversões e fusões.

Além das similaridades cariotípicas morfológicas e nas RONS, as espécies *M. nigricans* e *M. riparius* apresentaram o padrão de bandas G semelhante. Essa similaridade refletida nas homologias identificadas entre os seus

cromossomos, reforça o parentesco entre essas duas espécies e o conservacionismo cromossômico que tem sido observado para o gênero *Myotis*.

Apesar de não ter sido determinada a localização da heterocromatina constitutiva em *M. nigricans* pelo bandamento C, a coloração pelo DAPI, revelou que as regiões centroméricas dos cromossomos de *M. nigricans* apresentavam fluorescência aumentada em relação aos braços cromossômicos. O DAPI pela sua forma de ligação com o DNA produz bandas nos cromossomos e marca positivamente regiões de heterocromatina ricas em AT. Esta observação nos permite admitir que possivelmente as regiões pericentroméricas sejam áreas de localização de heterocromatina constitutiva em *M. nigricans*.

Em *M. riparius* a heterocromatina foi identificada apenas nos centrômeros dos cromossomos. Esses dados são indicativos de que há pouca variação na quantidade de heterocromatina constitutiva em *Myotis*.

O único espécime analisado de *L. ega* apresentou similaridade quanto a morfologia do cariótipo ($2n=28$; $NF=48$) e localização da heterocromatina constitutiva com os dados da literatura para essa mesma espécie. A heterocromatina constitutiva localizada nas regiões centroméricas de todos os cromossomos e do cromossomo X, variou apenas quanto ao tamanho dos blocos centroméricos. *L. ega* diferencia-se de *L. cinereus* por apresentar o braço curto do X heterocromático. Apesar de não ter sido possível a obtenção da localização das RONS pela coloração Ag-NOR, a análise do cariótipo usual revelou a presença de uma constrição secundária proximal no braço longo do cromossomo 13, provável

sítio de DNA ribossômico. Não há na literatura até o momento descrição das RONS para a espécie.

A espécie *L. cinereus* apresentou uma pequena variação no padrão cariotípico descrito para a espécie, em coloração usual. Trata-se da presença de dois pares de autossomos heteromórficos portadores das RONS. A localização das RONS coincidentes com as constrições secundárias localizadas em cromossomos heteromórficos, não foi referida em nenhum dos trabalhos da literatura. Da mesma forma não há informações sobre a heterocromatina constitutiva, que ocorreu nas regiões centroméricas dos cromossomos, com variação apenas no tamanho dos blocos heterocromáticos.

Das espécies reconhecidas para *Lasiurus*, sete foram analisadas citogeneticamente (TOLEDO, 1973; BICKHAM & BAKER, 1979; BICKHAM, 1987; VARELLA-GARCIA *et al.*, 1989). As espécies, *L. cinereus*, *L. seminolus*, *L. minor*, *L. degelidus* e *L. borealis* possuem número diplóide ($2n=28$), número fundamental ($NF=48$) e o padrão de bandamentos G idêntico. O cromossomo sexual nessas espécies é representado por um X submetacêntrico e um pequeno Y (BICKHAM, 1987). A espécie *L. ega* diferencia-se das cinco anteriores apenas pelo cromossomo X, que nesta espécie é subtelocêntrico e, *L. intermedius* ($2n=26$ e $NF=44$), além de apresentar um menor número de cromossomos, apresenta um cromossomo X acrocêntrico.

BICKHAM (1987) atribui a ocorrência de uma inversão a partir de um par cromossômico X acrocêntrico e a subsequente adição de um pequeno braço heterocromático para explicar os eventos que levaram a formação do par de

cromossomos sexuais subtelocêntricos em *L. ega*. Para o autor, as espécies analisadas que apresentaram o padrão cariotípico idêntico (*L. cinereus*, *L. seminolus*, *L. minor*, *L. degelidus* e *L. borealis*) representariam a condição primitiva e, *L. ega* e *L. intermedius* que compartilham uma inversão no cromossomo X, seriam táxons irmãos.

A análise de *H. velatus* revelou que o número diplóide dessa espécie é maior que o das outras espécies analisadas ($2n=50$) e igual ao observado para *Eptesicus brasiliensis*. Contudo, o número fundamental é igual ao de outras três espécies analisadas (*L. ega*, *L. cinereus* e *E. brasiliensis*), ou seja, $NF=48$. Este dado indica um conservacionismo no número de braços do complemento autossômico nas quatro espécies. A partir da análise do padrão de bandamento C foi possível observar a presença de heterocromatina constitutiva centromérica em todos os cromossomos, e no braço longo do cromossomo 21. Não há na literatura informações publicadas para o cariótipo de espécimes de *H. velatus* (VARELLA-GARCIA, 1989), contudo, o cariótipo de *H. velatus* é semelhante ao de uma outra espécie, *H. montanus*, que também apresentou $2n=50$; $NF=48$ (WILLIAMS, 1978).

A espécie *E. brasiliensis* analisada, apresentou número diplóide $2n=50$ e $NF=48$, estando de acordo com dados da literatura em relação a este gênero, como é o caso de *E. furinalis* e *E. brasiliensis* que apresentaram $2n=50$ e $NF=48$ (WILLIAMS, 1978; BAGGIO *et al.*, 1996; VARELLA-GARCIA *et al.*, 1989). Apesar das similaridades nos cariótipos dessas espécies de *Eptesicus*, há no gênero variação quanto a constituição do cariótipo, como o observado em algumas espécies africanas, *E. brunneus* ($2n=36$; $NF=50$), *E. capensis* ($2n=32$; $NF=50$), *E.*

rendalli ($2n=38$; $NF=50$), *E. somalucus* ($2n=26$; $NF=48$), *E. tenuipinnis* ($2n=36$; $NF=52$) (MCBEE, 1987; MORALLES *et al.*, 1991), que apresentaram números diplóides menores de cromossomos. Ainda à semelhança do observado na espécie *H. velatus*, *E. brasiliensis* provavelmente apresenta as RONS na posição da constrição secundária proximal do braço longo do 15, coincidindo também com informações da literatura para essa espécie (FREITAS *et al.*, 1992). O padrão de bandamento C para a espécie *E. brasiliensis* não foi obtido e não há descrições na literatura; contudo, a partir da análise de metáfases coradas por DAPI verificou-se a presença de fluorescência aumentada em regiões pericentroméricas de alguns cromossomos, indicando a presença de heterocromatina constitutiva rica em AT nestas regiões.

Em geral, a quantidade de heterocromatina constitutiva em espécies da família Vespertilionidae é bem pequena, quando comparadas a espécies de outras famílias de Chiroptera (ANDÔ, 1980; MARCHESIN *et al.*, 2001; FARIA *et al.*, 2001). Contudo, apesar da quantidade de heterocromatina constitutiva variar e caracterizar algumas espécies de morcegos, o padrão geral para a ordem é de pouca heterocromatina constitutiva, limitada às regiões centroméricas dos cromossomos (BICKHAM, 1979a e b; ANDÔ, 1980; VOLLETH, 2001).

A análise morfológica comparativa dos cariótipos das espécies estudadas neste trabalho evidencia que apesar de haver variações nos números diplóides ($2n=28-50$), os números fundamentais variam muito pouco ($NF=48-50$). Interessante é o fato que as espécies com maior número diplóide ($2n=50$: *H.*

velatus e *E. brasiliensis*) não são as que apresentam o maior número fundamental (NF=50: *M. nigricans* e *M. riparius*). Elas compartilharam o número de braços com as espécies de menores números cromossômicos, ou seja, com *L. ega* e *L. cinereus* (NF=48).

Os cariótipos de *H. velatus* e *E. brasiliensis* constituem-se de autossomos acrocêntricos, enquanto que em *Lasiurus*, a maioria dos autossomos são meta-submetacêntricos. Morfologicamente as diferenças entre os cariótipos dessas espécies podem ser derivadas de processos do tipo fusão/fissão, ou seja, eventos Robertsonianos, que apesar de alterarem o número ou a morfologia dos cromossomos, não alteram o número de braços.

As espécies *M. nigricans* e *M. riparius* possuem em seu cariótipo, quatro pares de autossomos meta-submetacêntricos e 17 pares de acrocêntricos; porém, o número fundamental é maior que o das outras espécies ou seja, NF=50. As comparações com os cariótipos das outras espécies sugerem que além de fusões/fissões, outros processos ocorreram alterando o NF, como por exemplo, inversões pericêntricas. As inversões pericêntricas são referidas como as responsáveis pela diferença nos cromossomos sexuais de espécies de *Lasiurus* (BICKHAM, 1987).

As informações obtidas neste trabalho em associação com as disponíveis na literatura reforçam o conservacionismo cariotípico que tem sido observado na família.

O gênero *Myotis* é o mais diverso entre os mamíferos mas, também, um dos mais conservado cariotipicamente. É atribuída a este gênero a

condição cariotípica mais próxima à ancestral (BICKHAM, 1979a; BAKER & JORDAN, 1970; CAPANNA & CIVITELLI, 1970; ANDÔ, 1977; VOLLETH, 1994a e b).

As análises citogenéticas indicam que entre os eventos mais frequentes nas variações encontradas nos diferentes gêneros e espécies de Vespertilionidae, estariam as translocações Robertsonianas e as fusões. Algumas espécies teriam retido a condição primitiva com um alto número cromossômico, incluindo *Myotis* ($2n=44$), *Eptesicus* ($2n=50$) e *Histiotus* ($2n=50$) e outros, como as de *Lasiurus*, apresentam espécies com cariótipos mais especializados devidos a redução do número de cromossomos, a partir de fusões cêntricas.

As fusões parecem predominar entre os eventos de variação cromossômica nos vários grupos de vertebrados. VOLLETH & HELLER (1994a e b), a partir da comparação do cariótipo de várias espécies de Vespertilionidae com um cariótipo reconhecido como “básico” para vespertilionídeos, determinaram que entre os vários eventos que teriam participado do curso evolutivo dos cariótipos de vespertilionídeos estão as inversões e na maior parte as translocações Robertsonianas. O “cariótipo básico” proposto pelas autoras apresentaria os três grandes cromossomos metacêntricos formados pelos braços cromossômicos 1 a 6 reconhecidos no cariótipo padrão descrito para *M. nigricans* por BICKHAM, 1979b. Estes cromossomos reconhecidos como 1/2, 3/4 e 5/6 estão presentes em um grande número de gêneros da família e também em espécies da família Molossidae e Natalidae, sugerindo que esta combinação seja a mais próxima à condição ancestral.

Em gêneros como *Eptesicus*, *Histiotus* e *Scotophilus* que apresentam cromossomos acrocêntricos, os braços 1, 2, 3, 4, 5 e 6, representam cromossomos individuais e, no gênero *Lasiurus*, esses seis braços e todos os outros do cariótipo básico foram observados em diferentes combinações, sendo encontrados 57 produtos diferentes de fusões. A partir desta análise VOLLETH & HELLER (1994a) concluíram que exceto os três grandes submetacêntricos 1/2, 3/4 e 5/6 e um pequeno cromossomo metacêntrico (16/17), os demais cromossomos do cariótipo básico e dos cariótipos de muitos gêneros de vespertilionídeos seriam elementos acrocêntricos, e cada cromossomo metacêntrico adicional seria resultante de produto de fusão. Se esta interpretação estiver correta as espécies de *Lasiurus* teriam cariótipos mais derivados em relação aos de *Myotis*, *Eptesicus* e *Histiotus*.

Análises citogenéticas moleculares através de hibridização *in situ* fluorescente têm contribuído na elucidação dos processos cromossômicos observados na diferenciação das espécies, confirmando algumas hipóteses de evolução cromossômica.

As técnicas de hibridização *in situ* fluorescente que utilizam sondas de DNA obtidas de cromossomos inteiros ou de regiões específicas dos cromossomos como, DNA ribossômico, centromérico e telomérico, têm sido utilizadas nos estudos citogenéticos em diferentes grupos de animais como metodologia complementar, e tem fornecido suporte para os estudos citogenéticos clássicos.

Os centrômeros e os telômeros, que sabidamente desempenham funções importantes na dinâmica e estabilidade dos cromossomos, têm merecido atenção especial, pois, freqüentemente estão envolvidos nos eventos responsáveis pelas variações cromossômicas detectadas nos vários grupos de vertebrados.

O entendimento de como regiões de telômeros participam ou atuam nos eventos de fusões ou translocações, pode contribuir para o estabelecimento da direcionalidade de ocorrência de um evento cromossômico desse tipo.

Neste trabalho a análise de hibridização *in situ* com sonda de seqüências teloméricas (TTAGGG)_n evidenciou a ocorrência de sinais fluorescentes nos cromossomos de *M. nigricans*, *M. riparius*, *H. velatus* e *E. brasiliensis*. Conforme esperado, essas marcações foram observadas principalmente nas regiões teloméricas dos cromossomos uma vez que os telômeros são constituídos por um tipo especial de DNA, o DNA telomérico, que consiste de seqüência repetitivas em tandem (TTAGGG)_n. Nos cromossomos acrocêntricos, a fluorescência estendeu-se também às regiões pericentroméricas; entretanto, nenhuma marcação centromérica foi observada nos cromossomos submetacêntricos de *M. nigricans* e *M. riparius*. Em *M. nigricans* além dos telômeros foi possível observar uma marcação intersticial no segundo maior par de cromossomos (par 2). As marcações fluorescentes variaram em tamanho e intensidade. Esta variação pode estar relacionada à condensação cromossômica, variação na extensão do telômero ou ainda artefato técnico decorrente do processo de hibridização (MEYNE *et al.*, 1990; SLIJEPCVIC *et al.*, 1997).

A presença de seqüências homólogas aos telômeros em regiões não teloméricas, já foi observada em outras espécies de morcegos, assim como em espécies de outros grupos de mamíferos (MEYNE *et al.*, 1990; ABUÍN *et al.*, 1996; VERMEESCH, *et al.*, 1996; ONO & YOSIDA, 1997; GO *et al.*, 2000; FINATO *et al.*, 2000). A presença de marcações fluorescentes em regiões pericentroméricas têm sido interpretada como remanescentes de telômeros funcionais após eventos de fusões, como uma possível associação entre seqüências teloméricas degeneradas e heterocromatina constitutiva, ou com outro tipo de DNA satélite presente nas proximidades do centrômero (TAGLIAVINI, *et al.*, 1999; LIU & FREDGA, 1999; CERDA *et al.*, 1999). Apesar das interpretações, os vários estudos realizados na tentativa de esclarecer a associação entre os diferentes tipos de DNA têm mostrado que não há uma correlação consistente entre localização da heterocromatina constitutiva e a presença de sítios de seqüências de DNA (TTAGGG)_n.

Dados da literatura sugerem que durante a evolução cromossômica de algumas espécies de morcegos, tais como as pertencentes à família Molossidae, ocorreram fusões Robertsonianas em que os sítios teloméricos dos acrocêntricos foram mantidos após a fusão (MORIELLE-VERSUTE *et al.*, 1998; FINATO *et al.*, 2000). Na análise de hibridização *in situ* fluorescente das espécies *M. nigricans* e *M. riparius*, que apresentam cromossomos submetacêntricos, não foram observadas marcações fluorescentes (TTAGGG)_n em regiões pericentroméricas, que indicassem a ocorrência de fusões cromossômicas na origem desses cromossomos.

Há na literatura alguns trabalhos relatando que as fusões observadas nos cromossomos de roedores não mantiveram os telômeros. FAGUNDES & YONENAGA-YASSUDA (1998) analisando comparativamente as espécies de roedores *Bolomys lasiurus* ($2n=33, 34$) e *Akodon montensis* ($2n=24, 25$), a partir da utilização da técnica hibridização *in situ* fluorescente com sonda (TTAGGG) $_n$ e bandamentos G, observaram que os rearranjos ocorridos nestas duas espécies teriam sido fusões cêntricas seguidas de inversões pericêntricas com perda de telômeros e centrômero. Resultados semelhantes também foram observados em espécies de morcegos do gênero *Eumops* por FINATO *et al.* (2000).

Nas espécies de *H. velatus* e *E. brasiliensis* os sinais de hibridização com a sonda telomérica limitaram-se aos telômeros e regiões pericentroméricas dos cromossomos.

As marcações pericentroméricas e teloméricas dos acrocêntricos de *M. nigricans* e *M. riparius* coincidiram com as regiões de heterocromatina constitutiva e com RONS presentes nas regiões terminais dos braços curtos e longos.

Diferentemente das marcações pericentroméricas, a marcação intersticial presente apenas num dos braços do segundo maior par de cromossomo de *M. nigricans*, não apresentou associação com heterocromatina constitutiva. As ITS também têm sido observadas nos cromossomos de outras espécies de mamíferos (FAGUNDES & YONENAGA-YASSUDA, 1998; VERMEESCH *et al.*, 1996; LIU & FREDGA, 1999). Contudo, apesar das várias interpretações, a origem e

importância destas bandas intersticiais (ITS) até o momento não foram esclarecidas.

A associação entre alguns tipos de DNAs repetitivos como, DNA telomérico, heterocromatina constitutiva e DNA ribossômico, tem sido observada em várias espécies de vertebrados e é um aspecto não esclarecido (ABUÍN, *et al.*, 1996; SLJEPCEVIC, *et al.*, 1997; MARCHESIN *et al.*, 2001). Esta associação entre os diferentes tipos de DNA repetitivos permite-nos concluir que, à semelhança de dados da literatura, as seqüências de DNA ribossômico e satélite de heterocromatina constitutiva seriam frações subteloméricas intimamente relacionadas, que podem não estar ocupando o mesmo sítio no cromossomo.

Os dados citogenéticos apresentados neste trabalho contribuem para a caracterização cromossômica de espécies brasileiras de Vespertilionidae e evidenciam que apesar do conservacionismo cromossômico que caracteriza alguns gêneros, a identificação de pequenas variações no número de cromossomos, na quantidade e localização da heterocromatina constitutiva e, da variação no número, tamanho e posição das RONS são aspectos importantes que estão relacionados com a evolução cromossômica da família e consequentemente, com a diferenciação das espécies.

VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABUÍN, M.; MARTÍNEZ, P.; SÁNCHEZ, L. Localization of repetitive telomeric sequence (TTAGGG)_n in four salmonid species **Genome**, v. 39, p. 1035-1038; 1996.

ANDŌ, K.; TAGAWA, T.; UCHIDA, T. A. Considerations of karyotypic evolution within Vespertilionidae. **Experientia**, v.33,p.877, 1977.

ANDŌ, K.; TAGAWA, T.; UCHIDA, T. A. The C - banding pattern of 6 japanese species of vespertilionine bats (Mammalia: Chiroptera). **Experientia**, v. 36, p. 653-654, 1980.

ANDRADE, F. M.; TRIEVEILER, F.; FREITAS, T. R. O. Estudos ecomorfológicos e citogenéticos em Quirópteros do Parque Estadual de Monai, R. S.). **Rev. Bras. Genet.**, v. 18 (Supl.), p. 496, 1995.

BAGGIO, C. R.; ALTHOFF, S. L.; SILVA, M. L. B.; HASS, S.; SBALQUEIRO, I. J. Análise citogenética em Chiróptera-Mammalia da região sul do Brasil. in: Congresso Brasileiro de Zoologia, 21, **Resumos....**,1996. p. 224.

BAKER, R. J.; JORDAN. R. G. Chromosomal studies of some neotropical bats of the families Emballonuridae, Noctilionidae, Natalidae and Vespertilionidae. **Caryologia**, v.23, n.4, p. 595-604, 1970.

BAKER, R. J; MASCARELLO. J. J. Chromosomes of some vespertilionid bats of the genera *Lasiurus* and *Plecotus* **Sowthwest. Nat.** v.14, p. 249-251, 1969.

BAKER, R. J.; PATTON, J. L. Karyotypes and karyotypic variation of north american vespertilionid bats. **J. Mammal**, v. 48, p. 270-286, 1967.

BAKER, R. J.; BICKHAM, J. M.; ARNOLD, M. L. Chromosomal evolution in *Rhogeessa* (Chiroptera, Vespertilionidae): possible speciation by centric fusions. **Evolution**, v. 39, n. 2, p. 233-243, 1985.

BAKER, R. J.; MALTIBIE, M.; OWEN, J. G Reduced number of ribosomal sites in bats: evidence for a mechanism to contain genome size. **J. Mamm.**, v. 73, n. 4, p. 847 - 858, 1992.

BICKHAM, J. W. Chromosomal variation and evolutionary relationship of vespertilionid bats. **J. Mammal**, v. 60, n.2, p. 350-363, 1979a.

BICKHAM, J. W. Banded karyotypes of 11 species of American bats (Genus *Myotis*). **Cytologia**, v. 44, p. 789-797, 1979b.

BICKHAM, J. W. Chromosomal variation among seven species of lasiurine bats (Chiroptera: Vespertilionidae). **J. Mammal** , v. 68, n.4, p. 837-842, 1987.

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

BICKHAM, J. W.; BAKER, R. J. Canalization model of chromosomal evolution. **Carnegie Mus. Nat. Hist.** , v. 13, p. 70-84, 1979.

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

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

BREDT, A. Morcegos em áreas urbanas e rurais: manual de manejo e controle. **FNS**. Brasília, p.1-117, 1996.

CAPANNA, E.; CIVITELLI, M. V., Chromosomal Mechanisms in the evolution of Chiropteran Karyotype Chromosomal tables of Chiroptera. **Caryologia**, v. 23, n. 1, p. 79-111, 1970.

CERDA, M. C.; BERRÍOS, S.; FERNÁNDEZ-DONOSO, R.; GARAGNA, S.; REDI, C. Organization of complex nuclear domains in somatic mouse cells. **Biol. Cell**, v. 91, p. 55-65, 1999.

DE GROUCHY, J.; TURLEAU, C. **Atlas des maladies chromosomiques**. Paris: Expansion Scientific Française, 1977.

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

FARIA, K. C.; MARCHESIN, S. R. C.; MORIELLE-VERSUTE, E. Evidências citogenéticas da organização diferencial de alguns tipos de DNA repetitivos e satélites em morcegos (Chiroptera, Mammalia). In Congresso Nacional de Genética, 47, 2001, Águas de Lindóias, **Resumos...**, SBG, 2001. 1 CD-Room.

FINATO, A. O.; VARELLA-GARCIA, M.; TAJARA, E. H.; TADDEI, V. A.; MORIELLE-VERSUTE, E. "Intrachromosomal distribution of telomeric repeats in *Eumops glaucinus* and *Eumops perotis* (Molossidae, Chiroptera). **Chromosome Res.** v.8: 563-569, 2000.

FONTANA, F.; LANFREDI, M.; CHICCA, M.; AIELLO, V.; ROSSI, R. Localization of repetitive telomeric sequence (TTAGGG)_n in four sturgeon species. **Chromosome Res.** v. 6, p. 303-306, 1998.

FORD, C. E.; HAMERTON, J. L. A colchicine hypotonic citrate, squash sequence for mamalian Chromosomes. **Stain Technol.** v. 31, 247-251, 1966.

FREITAS, T., R., O.; BOGO, M. R.; CHRISTOFF, A., U. G., C-bands and NOR studies in two species of bats from Sourthern Brazil (Chiroptera: Vespertilionidae, Molossidae). **Z. Säugetierkunde**, v.57, p. 330-334, 1992.

GARAGNA, S.; RONCHETTI, E.; MASCHERETTI, S. Non Telomeric Chromosome localization of (TTAGGG)_n repeats in the genus Eulemur. **Chromosome Res.**, v. 08, p.487-491, 1997.

GO, Y.; RAKOTOARISOA, G.; KAWAMOTO, Y.; RANDRIANJAFY, A.; KOYAMA, N. PRINS analysis of the telomeric sequence in seven lemurs. **Chromosome Res.** v.8, p. 57-65, 2000.

HARADA, M.; UCHIDA, A. T. Karyotipe of rare species, *Myotis pruinus*, Involving pericentric inversion and duplicated translocation. **Cytologia**, v.47, p. 539-543, 1982.

HARADA, M.; YOSIDA, T. H. Karyological study of four japonese *Myotis* bats (Chiroptera, Mammalia). **Chromosoma**, v. 65, p. 283-291, 1978.

HONEYCUTT, R. L.; BAKER, R. J.; GENOWAYS, H. H Results of the Alcoa Foundation-Suriname Expeditions. III. Chromosomal data for bats (Mammalia, Chiroptera) from Suriname. **Ann. Carnegie Mus.**, v. 49, p. 237-250, 1980.

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

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

KOOPMAN, K. F. Zoogeography of bats. In: SLAUGHTER, B. H.; WALTON, D. W. (Ed.). **About bats**. a chiropteran biology symposium. Dallas: Southern Methodist University Press, 1970. 339 p.

KOOPMAN, K. F. A sinopsis of the families of bats. **Bat Res. News**, v. 25, p. 25-29, 1984.

KOOPMAN, K. F. Order Chiroptera (Pp.137-241). In: WILSON, D. E.; REEDER, D. M., **Mammal Species of the world. A taxonomic and geographic reference** (Ed.). Washington and London: Smithsonian Institution Press, 1993, p.137-241.

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.

LEVAN, A.; FREDGA, K.; SANDBERG, A. A. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. **Hereditas**, v. 52. P. 201-220, 1964.

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

LOPES, M. J. S. **Contribuição para o estudo citogenético de morcegos: análise de 15 espécies.** 1978. Dissertação (Mestrado), Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo.

MARCHESIN, S. R. C.; FARIA, K. C.; MORIELLE-VERSUTE, E. Heterogeneidade na distribuição de seqüências repetitivas de DNA telomérico, ribossômico e heterocromatina constitutiva em cromossomos de morcegos. In: congresso Nacional de Génética, 47, 2001, Águas de Lindóias, **Resumos...**, SBG, 2001. 1 CD-Room.

MCBEE, K. Systematics of African Bats of the Genus *Eptesicus* (Mammalia: Vespertilionidae). 2. Karyotypes of African Species and their Generic Relationships. **Ann. Carnegie Mus.** v. 56, p. 213-222, 1987.

MCGARRITY, G. J. Spread and Control of Mycoplasmal Infection of Cell Cultures. **In Vitro** v. 12, n. 9, p.643-648, 1976.

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

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

MORALES, J. C.; BALLINGER, S. W.; BICKHAM, J. W.; GREENBAUN, I. F.; SCHLITTER, D. A. Genetic Relationships Among Eight Species of *Eptesicus* and *Pipistrellus* (Chiroptera: Vespertilionidae). **J. Mammal**, v. 72, n. 2, p. 286-291, 1991.

MORIELLE-VERSUTE, E.; TADDEI, V. A. Estudos citogenéticos em espécies de Vespertilionidae (Chiroptera). **Genetics Mol. Biol.**, v.21 (Suplemento), p. 73, 1998.

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

MORATELLI, J. L.; FILARDY, A. A.; PACHECO, T. C. G.; ALVES, V. A.; ARMADA, J. L.; PERACCHI, A. L. Estudos citogenéticos em Quirópteros da Região Sudeste do Brasil. In: Congresso Nacional de Genética 46, 2000, **Resumos...**, SBG, 2000.

NOVACEK, M., J. Aspects of morphology of the colchlea in microchiropteran bats: An investigation of character transformation. **Bull. Am. Mus. Nat. Hist.**, v. 206, p. 84-100, 1991.

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

OBARA, Y.; SAITOH, K. Some cytogenetic and cell physiologic aspects of a Chiropteran cell line., **Sci. Rep. Hirosaki Univ.**, v. 24, n^o. 2, p. 73-80, 1977.

OBARA, Y.; TOMIYASU, T.; SAITOH, K. Chromosome studies in the japanese vespertilionid bats. II. G-banding pattern of *Pipistrellus abramus* Temminck. **Proc. Japan. Acad.**, v. 52, p. 383-386, 1976.

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

RAZIN, S. Molecular biology and genetics of mycoplasma (Mollicutes). **Microbiol. Rev.**, v. 49, p. 419, 1985.

RAZIN, S. DNA probes and PCR in diagnosis of mycoplasma infections. **Mol. Cell Probes**, v. 8, p. 497, 1994.

REDUKER, D.W.; YATES, T.L.; GREEMBAUM, I.F. Evolutionary affinities among southwestern long-eared *Myotis* (Chiroptera: Vespertilionidae). **J. Mammal**, v. 64, p. 666-677, 1983.

RUEDAS, L.A.; LEE JR., T.E.; BICKHAM, J.W.; SCHLITTER, D.A. Chromosomes of five species of vespertilionid bats from Africa. **J. Mammal**, v. 71, p. 94-100, 1990.

SCHWARZACHER, H. G.; WACHETLER, F. The nucleolus. **Anat. Embryol.**, v. 188, p. 515-536, 1993.

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

SIMMONS, N., B.; GEISLER, J., H. Phylogenetic relationships of *Icaronycteris*, *Archeonycteris*, *Hassianycteris*, and *Palaeochiropteryx* to extant bat lineages, with comments on the evolution of echolocation and foraging strategies in Microchiroptera. **Bull. Am. Mus. Nat. Hist.**, v. 235, p. 1-182, 1998.

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

SLIJEPCEVIC, P.; HANDE, M. P.; BOUFFLER, S. D.; LANSDORP, P.; BRYANT, P. E. Telomere length, chromatin structure and chromosome fusigenic potential. **Chromosoma**, v. 106, p. 413-421, 1997.

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

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

TADDEI, V. A. Biologia reprodutiva de Chiroptera: perspectivas e problemas. **Inter-Facies Escritos e Documentos**, São José do Rio Preto, n. 6, p. 1-18, 1980.

TADDEI, V. A. Morcegos. Algumas considerações sistemáticas e biológicas. **Bol. Tec. CATI**, Campinas, n. 172, p. 1-30, junho 1983.

TADDEI, V. A. Sistemática de Quirópteros. **Bol. do Inst. Pasteur**, São Paulo, v.1, n. 2, p. 3-8, out./dez., 1996.

TAGLIAVINI, J.; WILLIOT, P.; CONGIU, L.; CHICCA, M.; LANFREDI, M.; ROSSI, R.; FONTANA, F. Molecular cytogenetic analysis of the karyotype of the European Atlantic sturgeon, *Acipenser sturio*. **Heredity**, v. 83, p. 520-525, 1999.

TATE, G. H. H. Results of the Archbold Expeditions, nº 47, Review of the vespertilionine bats, with special attention to genera and species of the Archbold Collections. **Bull. Am. Mus. Nat. Hist.** v.80, p. 221-297, 1942.

TOLEDO, L. A. **Estudos citogenéticos em morcegos brasileiros (Mammalia: Chiroptera)**. 1973, Tese (Doutorado), Faculdade de Ciências Médicas e Biológicas de Botucatu, Botucatu.

VAN VALEN, L. The evolution of bats. **Evolutionary Theory**, v. 04, p. 104-12, 1979.

VARELLA-GARCIA, M.; TADDEI, V.A. Citogenética de quirópteros: métodos e aplicações. **Rev. Bras. Zool.**, v. 6, p. 297-323, 1989.

VARELLA-GARCIA, M.; MORIELLE-VERSUTE, E.; TADDEI, V. A. A survey of cytogenetic data on brazilian bats. **Rev. Bras. Genet.**, v. 12, p. 761-793, 1989.

VERMEESCH, J. R.; DE MEURICHY, W.; VAN DEN BERCGHE, H.; MARYNEN, P.; PETIT, P. Differences in the distribution and nature of the interstitial telomeric (TTAGGG)_n sequences in the chromosomes of the Giraffidae, okapi (*Okapia johnstoni*) and giraffe (*Giraffa camelopardalis*): evidence for ancestral telomeres at the okapi polymorphic rob(4;26) fusion site. **Cytogenet. Cell Genet.** v. 72, 310-315. 1996.

VIZOTTO, L. D.; TADDEI, V. A., Chave para determinação de Quirópteros Brasileiros. **Bol. Ciênc.**, v. 01, p. 1-72, 1973.

VOLLETH, M. Chromosomal homologies of the genera *Vespertilio*, *Plecotus* and *Barbastella* (Chiroptera: Vespertilionidae). **Genetica**, v. 66, p. 231-236, 1985.

VOLLETH, M. Differences in location of nucleolus organizer regions in European vespertilionid bats. **Cytogenet Cell Genet**, v. 44, p. 186-197, 1987.

VOLLETH, M.; TIDEMANN, C. R. Chromosome studies in three genera of Australian vespertilionid bats and their systematic implications. **Z. Säugetierkunde**, v. 54, p. 215-222, 1989.

VOLLETH, M.; HELLER, K-G. Phylogenetic relationships of vespertilionid genera (Mammalia: Chiroptera) as revealed by karyological analysis. **Z. zool. Syst. Evol. -forsch**, v. 32, p. 11 - 34, 1994a.

VOLLETH, M.; HELLER, K-G. Karyosystematics of plecotine bats: a reevaluation of chromosomal data. **J. Mammal**, v. 75, p. 416 - 419, 1994b.

VOLLETH, M.; BRONNER, G.; GÖPFERT, M. C.; HELLER, K. G.; HELVERSEN, O.; YONG, H. S. Karyotype comparison and phylogenetic relationships of *Pipistrellus*-like bats (Vespertilionidae; Chiroptera; Mammalia). **Chromosome Res.**, v. 09, p. 25-46, 2001.

WILLIAMS, D. F., Taxonomic and karyologic comments os small brown bats, genus *Eptesicus*, from South America. **Ann. Carnegie Mus.**,v. 47, p. 361-383, 1978.

WILLIAMS, D. F.; MARES, M. A. Karyologic affinities of the South American big-eared bat, *Histiotus montanus* (Chiroptera, Vespertilionidae) **J. Mammal**, v. 59, p. 844-846, 1978.

VII. RESUMO

Foram analisados citogeneticamente seis espécies de Vespertilionidae dos gêneros *Myotis*, *Lasiurus*, *Histiotus* e *Eptesicus*. As metáfases obtidas de culturas de fibroblastos foram analisadas em coloração convencional, Ag-NOR, bandamento C e G e hibridização *in situ* fluorescente com sonda de seqüências teloméricas (TTAGGG)_n humana.

As espécies *Myotis nigricans*, *Myotis riparius* (2n=44; NF=50), *Eptesicus brasiliensis* (2n=50; NF=48) e *Histiotus velatus* (2n=50; NF=48) foram as que apresentaram o maior número de cromossomos; *Lasiurus ega* (2n=28; NF=48) e *Lasiurus cinereus* (2n=28; NF=48) apresentaram o menor número de cromossomos, o que evidencia variabilidade cariotípica ao nível morfológico.

A coloração Ag-NOR evidenciou variação no número de nucléolos interfásicos e nos cromossomos com RONS. Em *M. nigricans* e *M. riparius* as marcações nos cromossomos portadores de RONS variaram em distribuição, número e tamanho. Em *M. nigricans* o número de cromossomos marcados variou de 7 a 9 e em *M. riparius* de 6 a 10. Nas duas espécies, as RONS foram observadas nas extremidades dos braços curtos e longos de cromossomos acrocêntricos. A variação no número deve estar refletindo a ativação diferencial de RONS, o que resulta uma variação no número e no tamanho dos nucléolos. Em *M. nigricans* o número de nucléolos observados variou de 01 a 09 e em *M. riparius* de 01 a 10. Além da ativação diferencial, a fusão nucleolar resultante do movimento, crescimento e aproximação dos nucléolos podem ser responsáveis pela variação observada. Em *L. cinereus* e *H. velatus* as RONS foram

coincidentes com as constrições secundárias dos pares heteromórficos 11 e 13 em *L. cinereus*, e 15 em *H. velatus*.

O padrão de bandas G obtidos para as espécies *M. nigricans* e *M. riparius* evidenciou a ocorrência de homologias cromossômicas entre elas.

A heterocromatina constitutiva detectada por bandamento C variou muito pouco entre as espécies. Em *M. riparius*, *L. ega*, *L. cinereus* e *H. velatus*, está localizada principalmente nas regiões centroméricas dos cromossomos, variando apenas no tamanho dos blocos heterocromáticos. A espécie *L. ega*, diferentemente das outras, apresentou também heterocromatina constitutiva no braço curto do cromossomo X e, *H. velatus*, apresentou uma marcação na porção terminal do braço longo de um cromossomo acrocêntrico pequeno.

A análise da hibridização *in situ* fluorescente com sonda telomérica revelou marcações em regiões terminais da maioria dos cromossomos de *M. nigricans*, *M. riparius*, *H. velatus* e *E. brasiliensis*, e em regiões pericentroméricas dos cromossomos acrocêntricos dessas espécies. Com exceção de *M. nigricans* que apresentou marcação intersticial em um dos braços do cromossomo submetacêntrico 2, nenhuma outra marcação intersticial foi observada nos demais submetacêntricos das espécies. Não houve coincidência com outros tipos de DNA repetitivos analisados.

Os resultados apresentados neste trabalho contribuem para a caracterização cromossômica de espécimes brasileiros de Vespertilionidae, e a análise comparativa dos resultados permitiu a observação de que entre os eventos

que participaram da evolução cromossômica da família estão as translocações Robertsonianas, as inversões e alterações no DNA ribossômico e heterocromatina constitutiva.

Palavras chave: Citogenética; FISH, Chiroptera, Vespertilionidae.

VIII. ABSTRACT

Six species of four vespertilionid genera (*Myotis*, *Lasiurus*, *Histiotus* and *Eptesicus*) were cytogenetically analyzed. The metaphases obtained from fibroblast cultures were analyzed in conventional staining, Ag-NOR, C and G banding and fluorescent *in situ* hybridization with probe of human telomeric sequence (TTAGGG)_n.

The species *Myotis nigricans* (2n=44, NF=48), *Myotis riparius* (2n=44; NF=50), *Eptesicus brasiliensis* (2n=50; NF=48) and *Histiotus velatus* (2n=50; NF=48) showed the highest number of chromosomes; *Lasiurus ega* (2n=28; NF=48) and *Lasiurus cinereus* (2n=28; NF=48) showed the lowest number, indicating karyotypic variability on the morphologic level.

Ag-NOR staining evinced variation in the number of interphasic nucleoli and in chromosomes with NORs. In *M. nigricans* and *M. riparius*, the chromosomal Ag-stained regions varied in distribution, number and size. In *M. nigricans*, the number of marked chromosomes varied between 7 and 9, and in *M. riparius*, the number varied between 6 and 10.

In both species, the NORs were observed on the extremities of the short and long arms of acrocentric chromosomes. The variation in number might be reflecting of NORs differential activation, resulting in variation in the number and size of nucleoli. In *M. nigricans*, the number of observed nucleoli has varied between 01 and 09, and in *M. riparius*, between 01 and 10. Besides differential activation, the nucleolar fusion resulting from the movement, growth and approximation of nucleoli might be responsible for the observed variation. In

L. cinereus and *H. velatus*, the NORs were coincident with the secondary constrictions of heteromorphic pairs 11 and 13 in *L. cinereus*, and pair 15 in *H. velatus*.

The pattern for G banding obtained for the species *M. nigricans* and *M. riparius* evinced the occurrence of chromosomal homologies between them.

The constitutive heterochromatin showed little variation between the species. In *M. riparius*, *L. ega*, *L. cinereus* and *H. velatus*, it is mainly situated on the centrometric region of the chromosomes, with variation occurring only in the size of the heterochromatic blocks. The species *L. ega*, differently from the others, has also presented constitutive heterochromatin on the short arm of chromosome X, and *H. velatus* has presented constitutive heterochromatin on the long arm terminal portion of a small acrocentric chromosome.

The analysis of fluorescent *in situ* hybridization with human telomeric probe showed signals in terminal regions of most chromosomes from *M. nigricans*, *M. riparius*, *H. velatus* and *E. brasiliensis*, and in the pericentrometric regions of acrocentric chromosomes from those species. With the exception of *M. nigricans*, which presented interstitial signal in one of the arms of submetacentric 2 chromosome, no other interstitial mark was observed on the other submetacentrics from the species. Coincidence did not occur with other types of repetitive DNA which were analyzed.

The results from this study represent a contribution to the chromosomal characterization of Brazilian specimens of Vespertilionidae, and the

comparative analysis of results allowed the indication that Robertsonian translocations, ribosomal DNA inversions and constitutive heterochromatin are among the events taking part in the chromosomal evolution of the family.

Keywords: Cytogenetics; FISH; Chiroptera; Vespertilionidae.