

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JULIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

EVOLUÇÃO CROMOSSÔMICA NO VEADO-MATEIRO -
***Mazama americana* (MAMMALIA; CERVIDAE).**

Vanessa Veltrini Abril

Orientador: Prof. Dr. **José Maurício Barbanti Duarte**

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

Julho de 2009

A163e Abril, Vanessa Veltrini
Evolução cromossômica no veado-mateiro – *Mazama americana*
(MAMMALIA; CERVIDAE) / Vanessa Veltrini Abril. – – Jaboticabal,
2009
iv, 92 f. ; il; 28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias, 2009

Orientador: José Maurício Barbanti Duarte

Banca examinadora: Fausto Foresti, Cláudio de Oliveira, Orlando
Moreira Filho, Vera Fernanda Martins Hossepian de Lima

Bibliografia

1. *Mazama americana*. 2. Rearranjos. 3. Evolução cromossômica.
I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 639.111.1:636.082

**Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da
Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de
Jaboticabal.**



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CÂMPUS DE JABOTICABAL
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS



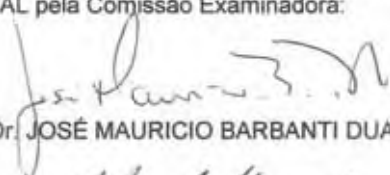
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

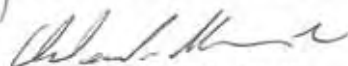
TÍTULO: EVOLUÇÃO CROMOSSÔMICA NO VEADO-MATEIRO - *Mazama americana*
(MAMMALIA; CERVIDAE).

AUTORA: VANESSA VELTRINI ABRIL

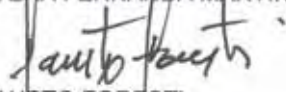
ORIENTADOR: Dr. JOSÉ MAURICIO BARBANTI DUARTE

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de DOUTOR em GENÉTICA E MELHORAMENTO ANIMAL pela Comissão Examinadora:


Dr. JOSÉ MAURICIO BARBANTI DUARTE


Dr. ORLANDO MOREIRA FILHO


Dra. VERA FERNANDA MARTINS H. DE LIMA


Dr. FAUSTO FORESTI


Dr. CLÁUDIO DE OLIVEIRA

Data da realização: 24 de julho de 2009.


Presidente da Comissão Examinadora
Dr. JOSÉ MAURICIO BARBANTI DUARTE

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

VANESSA VELTRINI ABRIL – Nascida em 12 de setembro de 1979, na cidade de Monte Alto, SP, Brasil, graduou-se em Licenciatura em Ciências Biológicas em dezembro de 2002, pelo Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista – IBILCE/UNESP, campus de São José do Rio Preto, SP. Durante a graduação, foi bolsista do Programa de Educação Tutorial da Secretaria de Ensino Superior – PET/SESu, no período de março 2000 a agosto de 2001, permanecendo como voluntária até dezembro de 2002. Foi bolsista PIBIC/CNPq durante o estágio de Iniciação Científica no Laboratório de Citogenética de Insetos do Departamento de Biologia do IBILCE/UNESP de agosto de 2001 a julho de 2002. Tornou-se integrante do Núcleo de Pesquisa e Conservação de Cervídeos em 2003, junto ao qual desenvolveu pesquisas na área de Citogenética. Titulou-se como mestre em Genética e Melhoramento Animal em março de 2005, após apresentar a dissertação “Análise citogenética do veado-mão-curta (*Mazama nana*): a busca das diferenças entre os indivíduos e seu papel na evolução e conservação da espécie”. Durante a execução deste trabalho, recebeu bolsa Doutorado financiada pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior –CAPES.

NÃO SEI

*Não sei se a vida é curta
ou longa demais para nós.
Mas sei que nada do que vivemos tem sentido,
se não tocarmos o coração das pessoas.*

*Muitas vezes basta ser
colo que acolhe,
braço que envolve,
palavra que conforta,
silêncio que respeita,
alegria que contagia,
lágrima que corre,
olhar que acaricia,
desejo que sacia,
amor que promove.
E isso não é coisa de outro mundo.
É o que dá sentido à vida,
é o que faz com que ela não seja
nem curta, nem longa demais.
Mas que seja intensa,
verdadeira e pura!
Enquanto durar.*

CORA CORALINA

*Aqueles que tanto amo,
Edna, Augusto e Guto, que
se fazem presentes em todos
os momentos de minha vida
e sempre me incentivam na
busca pelo conhecimento.
Dedico.*

Agradecimentos

Com mais esta etapa de minha vida que se concretiza, não poderia deixar de agradecer àqueles de alguma forma participaram da execução deste trabalho:

- Ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento Animal, à FAPESP e CAPES pelo financiamento desta pesquisa e pela bolsa de Doutorado;*
- Ao Prof. Dr. José Maurício Barbanti Duarte, pela oportunidade de desenvolver mais um trabalho sob sua orientação, pela preocupação com minha formação profissional e, pela convivência e aprendizado, seja durante o trabalho sério ou nos momentos de descontração;*
- Aos técnicos Paulo Antonio Tosta e João Airton Boer, pelo auxílio no laboratório, pela boa convivência e amizade;*
- Aos integrantes do Núcleo de Pesquisa e Conservação de Cervídeos (NUPECCE), que juntos desempenham um papel imprescindível na conservação da fauna e do ambiente como um todo. Além disso, a convivência intensa com os integrantes deste grupo fez o com que os problemas surgidos se tornassem menores e as alegrias se expandissem e contagiassem. Assim, fica aqui registrado meu muito obrigada aos 'nupecianos': Alexandre (Geléia), Eveline, Bruna (Longa), Chris, Marina (K-stanha), Elias (Gafa), Ricardo, Allyson, André, Javier, Marcio, Pedro, Aline (Kokotinha), Maurício (Janota), Maurício (Piauí), Marina, Vinícius (Mau Mau), Kena, Luciana, Samantha, Roberta, Natália, Victor (Guidão), Tatiana, Paula (Caju), Ana;*
- Aos meus primeiros orientados de iniciação científica Cínthia, Jacqueline e Alexsandro, pela ajuda, confiança e amizade;*
- Aos amigos conquistados durante este período, Léo, Márcio, Anaisa, Maria Eliane (Durva) e Simone;*

- À Eveline em especial, por se tornar minha amiga-irmã e companheira de todos os dias, por ser sempre tão generosa e delicada, independentemente da situação;
- À Simone Crestoni e sua família, pela hospedagem e recepção calorosa durante os dias de estágio em São Paulo;
- À Prof. Dra. Silvia Regina Rogatto, pela acolhida no laboratório Neogene, no Hospital A.C. Camargo, e a todas suas orientadas, em especial à Cássia Terrassani por compartilhar sua experiência com citogenética molecular e investir seu tempo no meu aprendizado;;
- Ao Prof. Dr. Malcom A. Ferguson-Smith do Laboratório de Citogenética Molecular do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade de Cambridge, Inglaterra, por nos fornecer as sondas cromossômicas de Mazama gouazoubira e à técnica Patrícia O'Brien pela disposição em tirar nossas dúvidas;
- Aos professores. Dr. Edivaldo Herculano de Oliveira, Dr. Júlio César Pieczarka e Dra. Cleusa Yoshiko Nagamachi, pela acolhida no Laboratório de Citogenética da Universidade Federal do Pará e pela orientação técnica;
- Aos amigos feitos em Belém, Luciana, David, Fábio, Marcela, Adauto, Patrícia, Cris e todos os outros que me acolheram com tanta alegria e me deram a oportunidade de vivenciar uma cultura diferente;
- Ao Daniel, por participar das angústias e das vitórias que acompanharam este trabalho, apoiando-me e incentivando-me para sempre seguir em frente;
- Aos meus pais Augusto e Edna e, ao meu irmão querido Guto, pelo amor incondicional e pela motivação em superar as dificuldades, buscando o crescimento pessoal e profissional,

Muito obrigada!

SUMÁRIO

	Página
CAPÍTULO 1 - CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	1
INTRODUÇÃO.....	1
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	2
REFERÊNCIAS.....	17
CAPÍTULO 2 - ANÁLISE COMPARATIVA ENTRE DIFERENTES VARIANTES CARIOTÍPICAS DE <i>Mazama americana</i> (MAMMALIA; CERVIDAE).....	26
RESUMO	26
INTRODUÇÃO	26
MATERIAL E MÉTODOS	28
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	28
CONCLUSÃO.....	42
REFERÊNCIAS.....	42
CAPÍTULO 3 – ANÁLISE MEIÓTICA DE UM MACHO DE VEADO- MATEIRO (<i>Mazama americana</i> – MAMMALIA; CERVIDAE) PORTADOR DE UMA FUSÃO EM HETEROZIGOSE, CROMOSSOMOS B E SISTEMA SEXUAL MÚLTIPLO.....	45
RESUMO	45
INTRODUÇÃO	46
MATERIAL E MÉTODOS.....	47
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	48
CONCLUSÃO.....	52
REFERÊNCIAS.....	52
CAPÍTULO 4 - LOCALIZAÇÃO DA HETEROCROMATINA E DAS SEQUÊNCIAS TELOMÉRICAS EM <i>Mazama americana</i> (MAMMALIA; CERVIDAE).....	55
RESUMO	55
INTRODUÇÃO	55
MATERIAL E MÉTODOS	57
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	58
CONCLUSÃO.....	64
REFERÊNCIAS.....	65
CAPÍTULO 5 - PINTURA CROMOSSÔMICA E SUA APLICAÇÃO NO ESTUDO CROMOSSÔMICO DA ESPÉCIE NEOTROPICAL <i>Mazama americana</i> (MAMMALIA; CERVIDAE).....	69
RESUMO	69
INTRODUÇÃO	69
MATERIAL E MÉTODOS.....	71
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	73
CONCLUSÃO.....	84
REFERÊNCIAS.....	84

CAPÍTULO 6 - CONCLUSÃO GERAL E IMPLICAÇÕES.....	88
APÊNDICES	
APÊNDICE A - PROTOCOLO DE HIBRIDIZAÇÃO IN SITU TELOMÉRICA.....	91
APÊNDICE B - PROTOCOLO DE REAMPLIFICAÇÃO E MARCAÇÃO DAS SONDAS CROMOSSÔMICAS.....	93

EVOLUÇÃO CROMOSSÔMICA DO VEADO-MATEIRO - *Mazama americana* (MAMMALIA; CERVIDAE)

RESUMO - Estudos com veado-mateiro (*Mazama americana*) mostram que há muitas controvérsias quanto ao número de subespécies ou até quanto ao desdobramento destas em espécies. Em estudo citotaxonômico foram encontradas variações cromossômicas intra e interpopulacionais em populações de *M. americana* geograficamente distantes, com número diplóide de 48 a 53 e número fundamental de 46 a 57. Com base nisto, o presente estudo visou compreender como ocorreu a reorganização cromossômica dentro das variantes encontradas durante a evolução do grupo. Para isto, estrutura e organização dos cromossomos de *M. americana* foram analisadas para identificar os rearranjos que originaram a variação intraespecífica através das técnicas de bandamento cromossômico (bandas G, C, Ag-NOR), hibridação *in situ* (FISH) com sondas teloméricas e pintura cromossômica com o uso de sondas cromossômicas da espécie *Mazama gouazoubira*. Foram identificados seis citótipos distribuídos em 12 cariótipos diferentes: Rondônia (2n=42 ou 43 e NF=46; 2n=42 e NF=49), Juína (2n= 43, 44 ou 45 e NF=48; 2n=44 e NF=46), Jarí (2n=49; NF=56, Carajás (2n=50 e NF=54), Santarém (2n=51 e NF=56) e Paraná (2n=51,52 ou 53 e NF=56). O cariótipo básico do citótipo Paraná foi utilizado como base comparativa para os demais. Os rearranjos que originaram essas diferenças foram fusões cêntricas, em tandem e inversões pericêntricas. A análise de complexo sinaptonêmico confirmou a existência de um sistema sexual múltiplo do tipo XX/XY1Y2 através da detecção de uma trivalente sexual. Sítios teloméricos intersticiais evidenciam que a ocorrência de eventos de fusões em tandem foi essencial para a evolução cariotípica desta espécie e a homologia de sondas cromossomo-específicas de *M. gouazoubira* corroboram que o caminho da reorganização cromossômica entre estas espécies foi principalmente através de fusões.

Palavras-chave: *Mazama americana*, rearranjos, evolução cromossômica.

CHROMOSOMAL EVOLUTION OF RED BROCKET DEER - *Mazama americana* (MAMMALIA; CERVIDAE)

SUMMARY – Studies with the red brocket deer (*Mazama americana*) shown that there are a lot of controversies about the number of subspecies or about the unfolding of these in new species. Citotaxonomic studies found intra and interpopulational chromosomal variations, with diploid number varying from 48 to 53 and fundamental number from 46 to 57. Based on these studies, the aim of the present study was understood how the chromosomal reorganization occurred between this variants during the evolution process. For that, we analyzed the chromosomal structure and organization of *M. americana*, identifying the rearrangements responsible for the intraspecific variation through chromosome banding (G and C-banding, Ag-NOR), in situ hybridization of telomeric probes and chromosome painting using probes of *M. gouazoubira* species. It were found six different variants: Rondônia (2n=42 or 43 and FN=46; 2n=42 and FN=49), Juína (2n= 43, 44 or 45 and FN=48; 2n=44 and FN=46), Jarí (2n=49 and FN=56), Carajás (2n=50 and FN=54), Santarém (2n=51 and FN=56) and Paraná (2n=51,52 or 53 and FN=56). The basic karyotype of Paraná variant was choosing for comparative analysis. The rearrangements responsible for these chromosomal differences were centric and tandem fusions and pericentric inversions. The synaptonemal analysis sustained the existence of a multiple sexual system (XX/XY1Y2) with detection of a sexual trivalent. Interstitial telomeric sites shown the occurrence of tandem fusions was essential for the karyotype evolution of this species and the homology with the probes of *M. gouazoubira* corroborated that the way of chromosomal reorganization between these species was mainly through chromosome fusions.

Keywords: *Mazama americana*, rearrangements, chromosome evolution.

CAPÍTULO 1 - CONSIDERAÇÕES GERAIS

INTRODUÇÃO

Os animais pertencentes à família Cervidae são um grupo relativamente novo na escala evolutiva e o seu padrão de evolução cromossômica foi pouco estudado, havendo, portanto, pouca compreensão dos processos que geraram a intensa variabilidade cariotípica encontrada principalmente nos veados neotropicais do gênero *Mazama*.

A citogenética tem sido indicada como uma ferramenta importante no estudo taxonômico da família Cervidae desde a década de 60, quando os primeiros trabalhos publicados já mostravam uma grande variação do número diplóide entre as espécies e consideravam as fusões cromossômicas como um dos principais mecanismos de diferenciação cariotípica (CHANDRA et al., 1967; GUSTAVSSON; SUNDT, 1969; TAYLOR et al. 1969; JORGE; BENIRSCHKE, 1977; NEITZEL, 1987).

Com o avanço dos estudos citogenéticos, as variações envolvendo número e morfologia cromossômica passaram a ser observadas em várias espécies de mamíferos por meio da análise dos bandamentos que, por sua vez fornecem importantes informações para determinadas homologias (PATAK; STOCK, 1974). Entretanto, há situações em que muitos processos genéticos que contribuem para a diferenciação das espécies ocorrem ao nível gênico, só podendo ser evidenciados cromossomicamente pela citogenética molecular (GUERRA, 2004). Assim, a técnica de hibridização *in situ* fluorescente (FISH) é usada para um delineamento mais refinado do DNA cromossômico e a pintura cromossômica, que é uma variação da FISH, tem sido muito útil para se detectar homologias cromossômicas gerando informações sobre o processo de evolução cariotípica e sobre a citotaxonomia (MATSUBARA et al., 2004).

O veado-mateiro (*Mazama americana*) apresenta ampla distribuição na região neotropical e é considerada a maior espécie brasileira do gênero, chegando a 40kg e 60cm de altura. A variabilidade de aspectos morfológicos, ecológicos e citogenéticos

desta espécie, aliada aos poucos estudos, geram controvérsias sobre sua correta definição taxonômica. Estudos citogenéticos revelam variações cromossômicas (citótipos) que sugerem sua divisão em várias espécies, podendo caracterizar uma superespécie. A descrição citogenética de 33 animais de várias localidades do Brasil feita por Duarte (1998) mostrou variação do número diplóide ($2n=42$ a 53) e do número fundamental de braços ($NF=48$ a 57), além da variação de cromossomos B. Essa variação cromossômica teve correlação com a origem geográfica dos animais, ou seja, alguns cariótipos foram característicos de algumas regiões do Brasil. Entretanto, até o momento, os estudos cromossômicos feitos com a espécie se restringem à descrição superficial dos bandamentos clássicos (G, C e RON), sem uma análise comparativa mais aprofundada.

Por essas razões, o presente estudo teve como objetivo geral compreender como se deu o processo evolutivo que gerou diferenças cromossômicas entre os *M. americana* de diferentes regiões do Brasil. De forma mais específica, buscou-se:

- analisar comparativamente animais da espécie *M. americana* de diferentes localidades brasileiras pelas técnicas de bandamento clássico identificando os rearranjos ocorridos durante a diferenciação dos citótipos;

- comprovar a existência do sistema sexual múltiplo nesta espécie por meio da análise de pareamento meiótico;

- mapear a distribuição das seqüências teloméricas por meio de hibridização *in situ* fluorescente, confirmando se o sentido da evolução cromossômica nesta espécie foi por fusões cromossômicas;

- entender o processo de evolução cromossômica de *M. americana* no Brasil a partir do cariótipo basal dos cervídeos ($2n=70$; $NF=70$) pela pintura cromossômica.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. Família Cervidae: Taxonomia

No mundo há 17 gêneros e 45 espécies de cervídeos distribuídos pela América,

Europa, Ásia e norte da África, além de outras regiões nas quais não ocorreriam naturalmente, mas tiveram suas populações estabelecidas por introdução humana (NOWAK, 1991).

Os Artiodactyla ruminantes são divididos em duas infra-ordens, Tylopoda (Camelidae) e Pecora. Dentro desta última, a família Tragulidae tem sido considerada como a ancestral das famílias Cervidae, Moschidae, Giraffidae, Antilocapridae e Bovidae (GALLAGHER et al., 1999). Entre os Artiodactyla, a família Cervidae é a mais diversa em número de espécies, depois de Bovidae (GROVES, 2007).

A inexistência na América de registros fósseis de cervídeos, que datam o Plioceno, quando os táxons neotropicais possivelmente migraram para o Sul, faz com que história evolutiva da família Cervidae tenha inúmeras lacunas (WEBB, 2000).

Os poucos registros fósseis encontrados na América do Norte demonstram que os dois principais ramos de cervídeos do Novo Mundo (tribos Odocoileini e Rangiferini), inicialmente se diversificaram em paralelo na Ásia e, no final do Plioceno (três milhões de anos atrás) se estabeleceram na América do Norte. No final do Plioceno, há 2,4 milhões de anos, ocorreu a grande migração dos mamíferos terrestres da América do Norte para a América do Sul (“Great American Interchange”) (WEBB, 1991). Em um curto espaço de tempo, a colisão e troca de fauna entre os continentes favoreceu a diversificação genética dos mamíferos na América do Sul em relação aos da América do Norte (WEBB, 2000).

Na América Central e do Sul, esta diversificação gerou duas formas morfológicas de cervídeos. A primeira é representada pelos gêneros *Pudu* e *Mazama* e se refere às pequenas espécies de cervídeos, com até 60 cm de cernelha quando adultos e machos com chifres sem ramificações. Na segunda, encontram-se as espécies de grande estatura e machos de chifres ramificados, pertencentes aos gêneros *Odocoileus*, *Hippocamelus*, *Ozotoceros* e *Blastocerus* (EISENBERG, 2000).

A colonização com novas espécies na América do Sul, segundo Gilbert et al. (2006), se deu em duas etapas: no início do Plioceno por um ancestral do ramo dos cervídeos da América do Sul e, no final do Plioceno e início do Pleistoceno por *Mazama americana* e *Odocoileus virginianus*. Estes mesmos autores sugerem que,

provavelmente, devido à enorme semelhança morfológica encontrada entre os cervídeos da América Latina, adaptações similares e independentes possam ter ocorrido ao longo do tempo para as espécies do gênero *Mazama*. Segundo Duarte et al. (2008) oito formas ancestrais invadiram a América do Sul no final do Plioceno, sofrendo por aqui uma intensa diversificação após a colonização.

Explicações para história evolutiva do gênero *Mazama* ainda são pouco consistentes, pois também não é claro quem migrou primeiro após a formação do istmo panamenho, podendo ter havido diferenciação na América Central antes da grande migração (WEBB, 2000).

Embora a definição taxonômica do gênero *Mazama* (Rafinesque, 1817) com base na morfologia externa sempre gere muitas controvérsias, ele é o segundo gênero em número de espécies de cervídeos, havendo até o momento sete espécies reconhecidas: *M. rufina*, *M. pandora*, *M. chunyi*, *M. americana*, *M. gouazoubira*, *M. nana* e *M. bororo* (WEMMER, 1998). Existem ainda indícios citogenéticos e morfológicos que apontam a validade de *M. nemorivaga* como espécie e uma possível divisão de *M. americana* em diferentes espécies com base em seus cariótipos (DUARTE; JORGE, 1996; ROSSI, 2000; SARRIA-PEREA, 2004).

Este gênero tem distribuição que se estende do sul do México ao centro da Argentina (EISENBERG; REDFORD, 1999). Como características distintivas dos *Mazama* estão o pequeno e médio porte (15 a 40 Kg), chifres pequenos e não ramificados nos machos, órbita com borda superior achatada e quase reta, osso frontal levemente projetado acima da fossa preorbital, rhinarium grande e ausência de tufo metatarsal (ALLEN, 1915). Os “pequenos cervídeos florestais solitários” são pouco estudados em vida-livre e as principais razões desse desconhecimento encontram-se nas dificuldades de observação impostas pela densa vegetação de seus habitats (BARRETTE, 1987) e seu comportamento evasivo (VOGLIOTTI, 2004).

Entre os mamíferos, a família Cervidae é uma das que apresentam altas taxas de evolução cariotípica e a explicação para isto parece ser uma intensa fragilidade cromossômica (VARGAS-MUNAR, 2003). Esta característica gerou uma grande diversificação cariotípica entre as espécies de *Mazama* e não se mostra correlacionada

com os baixos níveis de diversificação morfológica encontrados nestas mesmas espécies (GROVES; GRUBB; 1987; DUARTE; MERINO, 1997). A variabilidade cariotípica intraespecífica também é considerada um fenômeno comum entre os Cervidae, porém raramente são explicadas a origem e manutenção destas variações dentro das populações (HERZOG; HARRINGTON, 1991).

Em um recente trabalho sobre a história evolutiva dos Cervídeos sulamericanos do gênero *Mazama*, Duarte et al. (2008) sugerem que exista uma relação polifilética entre os animais do gênero *Mazama*, baseados nos altos índices de divergência molecular e citogenética encontrados entre os grupos que são morfológicamente similares. A análise filogenética baseada no DNA mitocondrial (citocromo b) feita por estes autores indicou que os veados vermelhos (*M. americana*, *M. nana* e *M. bororo*) não se agrupam no mesmo ramo da árvore filogenética que os veados cinza (*M. gouazoubira* e *M. nemorivaga*) e que estes últimos deveriam ser considerados em um gênero distinto de *Mazama*, o qual tem como espécie tipo *M. americana*. Ainda, *M. gouazoubira* e *M. nemorivaga* deveriam também estar em gêneros distintos, uma vez que também não se posicionam agrupados na análise filogenética.

Atualmente, no Brasil, são reconhecidas cinco espécies a partir de evidências morfológicas (ROSSI, 2000) e citogenéticas (DUARTE; MERINO, 1997; DUARTE; JORGE, 2003) e moleculares (DUARTE et al., 2008): *M. gouazoubira*, *M. nemorivaga*, *M. americana*, *M. nana* e *M. bororo*.

2. O veado-mateiro – *Mazama americana*

Popularmente conhecida por veado-mateiro, *M. americana* é a maior espécie do gênero, com 30 a 40 Kg e 65 cm de altura (DUARTE, 1996; Figura 01). Para Ribeiro (1919) e Vieira (1955), a espécie ocorre desde as Guianas e Peru, até o Rio Grande do Sul, Paraguai e Argentina, mas Eisenberg (1989) e Emmons (1990) relataram uma distribuição desde o México até o norte da Argentina.

Junqueira (1940) cita que o veado-mateiro prefere habitar as grandes matas, à beira dos rios, quase sempre cobertas de vegetação densa, evitando o sol. Na Argentina, Olrog e Lucero (1981) relataram *M. americana* ocupando cerrados fechados,

selvas e bosques em regiões de até 2.500 m de altura. Eisenberg (1989) acredita que a espécie ocupa desde florestas semidecíduas até cerrado fechado, pois como Emmons (1990) citou, eles são adaptados para a vida na floresta. Segundo Bodmer (1997), esta espécie na Amazônia prefere as encostas das florestas úmidas de terra firme. Sua distribuição se sobrepõe à de outros veados do gênero, como *M. gouazoubira*, *M. nana* e possivelmente, *M. bororo* em uma variedade de ecossistemas (EMMONS; FEER, 1997; VOGLIOTTI, 2004; RIVERO et al., 2005; FERRARI et al., 2005).



Figura 01. Macho de veado-mateiro (*Mazama americana*). Foto de J.M.B. Duarte.

Atualmente, o veado-mateiro apresenta uma distribuição fragmentada na Floresta Atlântica e nas Florestas Tropicais da América Central, onde a conversão de áreas florestadas em áreas cultivadas e pastagens foi intensa. A espécie *M. americana* está categorizada internacionalmente como DD (dados deficiente) na “IUCN Red List of Threatened Species 2007” (DEER SPECIALIST GROUP, 2008), refletindo a falta de conhecimento sobre a espécie.

Os veados desta espécie dificilmente são observados em vida livre devido ao seu comportamento tímido e cauteloso. São solitários, embora possam ser encontrados em casais na estação de acasalamento (EMMONS; FEER, 1997). São bons nadadores e frequentemente usam pequenos rios como via de movimentação

pelas florestas e como estratégia anti-predatória, ampliando sua rota de fuga (REID, 1997; VOGLIOTTI, 2004).

A taxonomia da espécie *Mazama americana* ainda é incerta quanto ao número de subespécies ou até quanto ao desdobramento destas subespécies em espécies. Cabrera (1960) citou 9 subespécies (*M.a.gualea*, *M.a.jucunda*, *M.a.rosii*, *M.a.rufa*, *M.a.sarae*, *M.a.sheila*, *M.a.whitelyi*, *M.a.zamora* e *M.a.zetta*), enquanto Czernay (1987) citou 15, completando a lista de Cabrera (1960) com *M.a.temama*, *M.a.cerasina*, *M.a.reperticia*, *M.a.americana*, *M.a.trinitatis* e *M.a.carrikeri*. Thomas (1913) havia elevado ao nível de espécie *Mazama zetta* e *M.sheila*, o que seria posteriormente corroborado por Allen (1915), que além destas, cita como espécies *Mazama trinitatis*, *M.rufa*, *M.sartorii*, *M.gualea*, *M.fuscata* e *M.zamora*.

Na mais recente revisão taxonômica de *Mazama* utilizando informações morfológicas, Rossi (2000) propôs a existência de somente uma espécie de *Mazama americana* no Brasil. O referido autor incluiu também nessa espécie o *Mazama bororo*, descrito por meio de sua constituição cromossômica (DUARTE; JORGE, 2003).

Geralmente os estudos taxonômicos levam em consideração os aspectos morfológicos dos animais (MEDELLIN et al., 1998; ROSSI, 2000; GONZALEZ et al., 2003), mas os aspectos genéticos têm sido cada vez mais utilizados como ferramentas na solução de problemas taxonômicos (DUARTE; MERINO, 1997).

3. Citogenética e evolução

A diversidade cariotípica em Mammalia é bem acentuada, destacando-se a variação no número cromossômico desde 6 e 7 em *Muntiacus muntjak* (WURSTER; BENIRSCHKE, 1970), até 102 em *Tympanoctomys barrerae* (GALLARDO et al., 1999). As diferenças existentes entre os cariótipos de diferentes espécies e aquelas entre indivíduos de mesma espécie (polimorfismo cromossômico) são decorrentes de rearranjos cromossômicos que ocorreram em ancestrais comuns remotos ou mais recentes.

A especiação por alopatria, que implica em uma divergência gênica cumulativa decorrente de isolamento geográfico, seria o modo pelo qual as alterações genômicas

se fixariam e dariam origem a novas espécies (MAYR, 1969, 1977). Wilson et al. (1974), propôs que a evolução cromossômica e a evolução morfológica ocorram paralelamente. White (1978) afirmou que os cromossomos possam ser úteis para remontar a história evolutiva de vários grupos. Outros autores sugeriram que as mutações cromossômicas teriam uma importância no isolamento reprodutivo e, portanto no processo de especiação (REIG, 1981; KING, 1993).

King (1993) considerou que os principais rearranjos envolvidos nos processos de isolamento reprodutivo e, conseqüentemente na especiação, seriam aqueles que provocam uma heterose potencialmente negativa - fusões em tandem, translocações e inversões, ao passo que adição ou deleção de heterocromatina constitutiva e os polimorfismos cromossômicos seriam considerados como mudanças adaptativas ou neutras sem quaisquer implicações neste processo. Segundo Baker e Bickham (1986) o polimorfismo cromossômico poderia ser mantido em uma população, pois em alguns casos a heterozigose aumentaria o valor adaptativo em comparação ao homozigoto.

Rieseberg (2001) sugeriu que os rearranjos cromossômicos reduzem mais o fluxo gênico pela supressão da recombinação e aumento do efeito do isolamento dos genes ligados do que pela redução do valor adaptativo. Os rearranjos cromossômicos podem provocar diferentes efeitos no valor adaptativo, dependendo da espécie e do tipo de rearranjos envolvidos. Nem sempre os rearranjos cromossômicos provocariam a redução da fertilidade, pois alguns mecanismos da meiose como a supressão parcial ou completa da recombinação, podem diminuir os problemas de segregação. Desta forma, as translocações e inversões produziriam um efeito negativo, enquanto que as adições e deleções de heterocromatina seriam consideradas neutras.

Para White (1968), o surgimento de polimorfismos cromossômicos em uma população pequena e isolada, é resultante do cruzamento de um indivíduo alterado cromossomicamente com um indivíduo sem alteração. Este processo originará cariótipos homozigotos e heterozigotos para a alteração (NADLER, 1969), e caso o rearranjo esteja sendo fixado por meio do homozigoto, este irá gerar um mecanismo de isolamento genético que conduzirá à especiação.

4. Bandamentos cromossômicos e citogenética molecular

Com o avanço dos estudos citogenéticos, polimorfismos (variações) envolvendo número/morfologia cromossômicos e tamanhos de regiões específicas passaram a ser observados em várias espécies de mamíferos (WANG et al., 2003). A análise cromossômica tornou-se uma ferramenta importante para a conservação e manejo da vida silvestre (BENIRSCHKE; KUMAMMOTO, 1991; ROBINSON; ELDER, 1993; KINGSWOOD et al., 1998a, 1998b).

Quando espécies próximas são comparadas ou quando um número limitado de rearranjos ocorre dentro de um cariótipo, o padrão de análise por bandamentos é muito informativo para determinadas homologias (PATAK; STOCK, 1974). Entre as técnicas mais usadas estão as bandas G, bandas C e coloração Ag-RON.

O procedimento para bandamento G (SEABRIGHT, 1971) permite a visualização de bandas escuras e claras, que são segmentos cromossômicos que se condensam mais cedo e mais tarde na prófase, respectivamente (GUERRA, 1988). Este padrão de bandas permite a detecção apurada de rearranjos e facilita a comparação entre cariótipos.

Com a técnica de bandamento C (SUMNER, 1972) é possível visualizar as regiões de heterocromatina constitutiva, que estão geralmente localizadas nas regiões centroméricas dos cromossomos. Esta heterocromatina é altamente condensada, repetitiva e rica em A-T ou C-G (FERNANDEZ et al., 2002).

A coloração Ag-RON por impregnação de prata (HOWELL; BLACK, 1980) localiza os sítios cromossômicos de DNA ribossômico 45S que estão em atividade transcricional (WANG et al., 2003) e pode ser uma importante ferramenta em estudos evolutivos e citotaxonômicos (GALETTI JR et al., 1995).

O bandamento cromossômico é um método efetivo, entretanto há situações em que muitos dos processos genéticos que contribuíram para a diferenciação das espécies ocorreram ao nível gênico ou na forma de rearranjos cromossômicos complexos, só podendo ser evidenciados cromossomicamente pela citogenética molecular.

Assim, a hibridização *in situ* fluorescente (FISH) é uma técnica utilizada para um

delineamento mais refinado do DNA cromossômico e consiste basicamente no pareamento de determinado segmento de DNA ou RNA marcado com uma molécula de fácil identificação e chamada de sonda, com uma seqüência complementar de nucleotídeos situada no cromossomo e chamada seqüência-alvo. O objetivo da técnica é verificar se algum cromossomo na célula possui essa seqüência e qual a sua exata localização (GUERRA, 2004).

A pintura cromossômica, também chamada de pintura cromossômica comparativa ou ZOO-FISH, é uma variação da técnica de FISH e tem sido uma importante ferramenta para detectar homologias cromossômicas e gerar informações sobre o processo de evolução cariotípica e para a citotaxonomia (MATSUBARA et al., 2004). Nesta técnica segmentos cromossômicos ou cromossomos inteiros de uma espécie podem ser usados como sondas hibridizadas em outra espécie e as variações entre os cariótipos detectadas por microscopia de fluorescência. As sondas cromossomo-específicas podem ser obtidas pelas técnicas de separação por fluxo (*flow sorting*) que é uma variação da citometria de fluxo, ou por microdissecção cromossômica utilizando-se um aparelho de micromanipulação (GUERRA, 2004). Após qualquer uma das técnicas de obtenção da sonda cromossômica, o DNA é amplificado por PCR (*Polymerase Chain Reaction*) e marcado para ser utilizado em experimentos de FISH. As primeiras sondas cromossomo-específicas foram produzidas a partir de cromossomos humanos e foram hibridizadas em outras espécies de mamíferos, causando uma revolução na citogenética comparativa (ALKALAEVA et al., 2002).

Entretanto, não se deve tirar o mérito e importância da citogenética clássica devido à evolução das técnicas moleculares. Uma análise feita somente por bandamento G pode levar a erros de interpretação, pois nem sempre é possível saber se uma banda (em uma espécie A) é equivalente em tamanho ou composição de DNA à outra (na espécie B). Porém, apenas o uso da pintura cromossômica também não fornece informações sobre os rearranjos intracromossômicos, como as inversões. Assim, há uma forte complementação de informações entre os bandamentos clássicos e a pintura cromossômica (PIECZARKA; NAGAMACHI, 2004).

5. Citogenética de cervídeos neotropicais

Para cervídeos, as primeiras suposições sobre evolução cromossômica surgiram no início dos anos 60. Estes trabalhos já indicavam a citogenética como uma ferramenta importante para estudos taxonômicos (CHANDRA et al., 1967) e os rearranjos do tipo fusão Robertsoniana como um dos principais mecanismos de diferenciação cariotípica (GUSTAVSSON; SUNDT, 1969; TAYLOR et al., 1969; JORGE; BENIRSCHKE, 1977; NEITZEL, 1987). Estes autores surpreenderam-se com a grande variação do número diplóide dentro da família Cervidae, já que acreditavam que a evolução destes animais teria ocorrido de forma conservativa. Entretanto, Neitzel (1987) explicou que a variação cariotípica existente entre os cervídeos poderia ser considerada uma característica evolutiva para o grupo.

De acordo com os estudos citogenéticos, o cariótipo ancestral ou basal para a família Cervidae possui $2n=70$ e $NF=70$ (Figura 02), composto por 68 autossomos acrocêntricos, um X acrocêntrico e um Y metacêntrico, respectivamente, o maior e o menor do lote (TAYLOR et al., 1969; NEITZEL, 1987; FONTANA; RUBINI, 1990). Este cariótipo está representado em duas espécies recentes, porém distantes filogeneticamente, que estão classificadas em duas diferentes subfamílias, *Mazama gouazoubira* (subfamília Odocoileinae) e *Hydropotes inermis* (subfamília Hydropotinae) (NEITZEL, 1987).

Após análise citogenética, foi verificado que os cromossomos destas duas espécies são idênticos em número, morfologia, padrão de bandas G, satélites terminais, região organizadora do nucléolo no braço q dos dois maiores pares de autossomos além de grandes blocos de heterocromatina constitutiva pericentromérica em todos os cromossomos, exceto no Y (FONTANA; RUBINI, 1990). Outra observação feita por Neitzel (1987) foi que mesmo tendo forte identidade cariotípica, estas duas espécies não apresentam correlação fenotípica, confirmando que a diversificação cariotípica não é necessariamente relacionada à divergência anatômica (WILSON et al., 1974).

Entre os mamíferos, há muitas espécies de cervídeos que se distinguem por sua variação cariotípica (BOGENBERGER et al., 1987). O processo de evolução

cromossômica tem levado a uma ampla diversificação desta família e os padrões de evolução diferem significativamente entre as diferentes subfamílias. Análises moleculares e citogenéticas parecem indicar que um processo complexo de diferenciação ocorreu cedo na subfamília Odocoileinae (FONTANA; RUBINI, 1990, DOUZERY; RANDI, 1997).

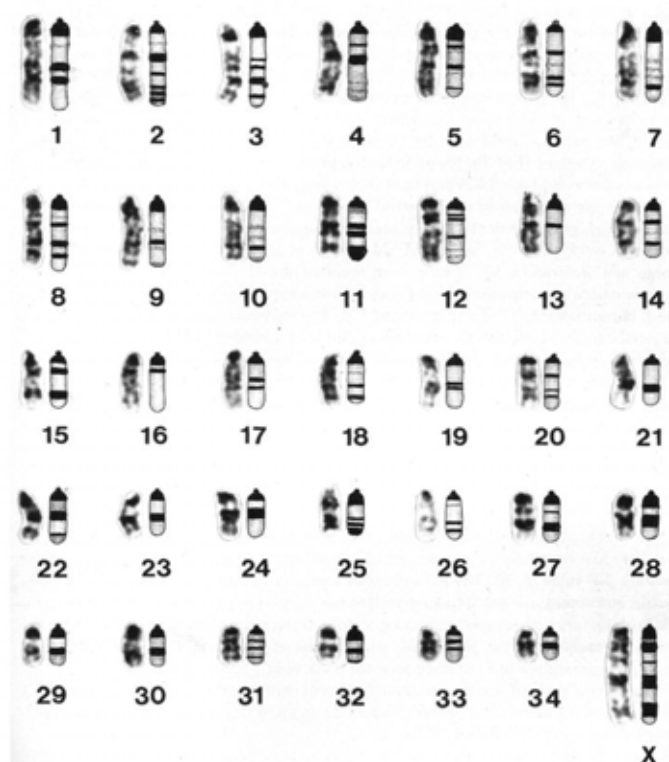


Figura 02. Representação esquemática do padrão de bandas G do ancestral hipotético de Cervidae, com $2n=70$ e $NF=70$ (extraído de NEITZEL, 1987).

Fontana e Rubini (1990), baseados em dados citogenéticos de 30 espécies e 20 subespécies de cervídeos da subfamília Odocoileinae, inferiram relações filogenéticas através da evolução cariotípica destes animais. O ramo principal da árvore filogenética construída separa-se em dois ramos, em um deles estão *M. americana* e *M. temama*, que passaram por complexos rearranjos interespecíficos, incluindo fusões em tandem, fusões Robertsonianas e inversões pericêntricas e, no outro ramo, estão agrupadas as espécies do grupo principal *Odocoileus* (*O. virginianus*, *O. v. borealis*, *O. hemionius*,

Pudu puda, *Alces alces americana*, *Hippocamelus bisulcus*), que apresentaram um menor grau de diferenciação durante a linhagem evolutiva (FONTANA; RUBINI, 1990).

O cariótipo ancestral para o grupo *Odocoileus* manteve a conformação cariotípica original dos Cervidae ($2n=70$ e $NF=70$), ainda presente em *Mazama gouazoubira* (NEITZEL, 1987; FONTANA; RUBINI, 1990; DUARTE; JORGE, 1996). O ancestral comum às outras espécies (incluindo os outros *Mazama*) sofreu uma inversão pericêntrica no cromossomo X, passando a ter um cariótipo similar ao da espécie recente *Capreolus* spp., o que explica a proximidade filogenética entre as duas espécies de *Capreolus* (*C. capreolus* and *C. pygargus*) e *Hydropotes inermis* (subfamília Hydropoteinae) após análises de DNA mitocondrial (DOUZERY; RANDI, 1997).

Outra linhagem surgiu após uma inversão pericêntrica de um autossomo, chegando ao cariótipo $2n=70$ e $NF=74$, presente em *O. virginianus*, *O. haemionus*, *Alces alces*, *Hippocamelus bisulcus* e *Pudu puda* (FONTANA; RUBINI 1990). A linhagem sul americana acumulou sucessivas translocações Robertsonianas, chegando ao cariótipo de *Blastocerus dichotomus* ($2n=68$ e $NF=74$) e *Ozotoceros bezoarticus* ($2n=66$ e $NF=74$).

De forma independente, outra linhagem acumulou múltiplas fusões em tandem, dando origem às diferentes espécies de *Mazama* vermelhos (DUARTE; JORGE, 1996). A espécie *M. nana* possui $2n=36$ a $41 + 1-6B$ e $NF=58$ após fusões em tandem e cêntricas (ABRIL; DUARTE, 2008), enquanto *M. bororo* tem $2n=34 + 4-5B$ e $NF=46$ (DUARTE; JORGE, 2003).

Para *M. americana* os padrões de evolução cariotípica foram significativamente diferentes, o que pode ser uma evidência para afirmar que as linhagens da América Central e do Sul são realmente espécies distintas, em vez de considerá-las como uma única, distribuída pelas florestas destas regiões (GROOVES; GRUBB, 1987).

Além dos cervídeos neotropicais, há outros exemplos de cervídeos com grandes diferenças cromossômicas entre espécies próximas, como os *Muntiacus*, que têm um alto grau de diversificação cariotípica e tiveram uma reorganização radical e rápida dos cromossomos, durante sua evolução (YANG et al., 1995). Vários trabalhos têm

mostrado que na divergência destes animais a partir do cariótipo ancestral ($2n=70$), uma série de fusões cêntricas e em tandem ocorreram em diferentes combinações. A técnica de pintura cromossômica comparativa, também chamada Zoo-FISH, tem sido amplamente usada para estudos de evolução cariotípica em *Muntiacus* desde a década de 90 (YANG et al., 1995; YANG et al., 1997a, 1997b, 1997c, 1997d; FRONICKE; SCHERTHAN, 1997).

Em trabalho realizado por Yang et al. (1995), sondas cromossômicas de *Muntiacus muntjak vaginalis* ($2n=6, 7$) foram hibridizadas em *Muntiacus gongshanensis* ($2n=8,9$), *Muntiacus crinifrons* ($2n=8,9$) e *Muntiacus reevesi* ($2n=46$) com o objetivo de se detectar e caracterizar rearranjos cromossômicos complexos ou pequenos, ocorridos durante a evolução destas espécies próximas. Com o uso da citogenética molecular, foram encontradas evidências diretas que confirmam a teoria da fusão em tandem durante a evolução do gênero *Muntiacus*.

Dentro da mesma linha de pesquisa, Yang et al. (1997a) confirmou que o cariótipo de *M. reevesi* ($2n=46$) evoluiu a partir do ancestral hipotético de Cervidae ($2n=70$), a partir de 12 fusões em tandem envolvendo os pares cromossômicos de 1 a 5 e 11. Para isto, 13 cromossomos de *M. gouazoubira* e a maioria dos cromossomos de *M. reevesi* foram usados como sondas, hibridando-as em metáfases de *M. reevesi*, *Hydropotes inermis* e *M. gouazoubira*. Uma sonda derivada de uma sequência centromérica satélite (sonda C5) de *M. reevesi* mostrou sinais de hibridização nas regiões centroméricas de todos os cromossomos das espécies estudadas. Além disso, foram detectados sinais da sonda C5 em regiões intersticiais não aleatórias dos cromossomos 1, 2, 3, 4, 5 e 11 de *M. reevesi*, os mesmos que mostraram homologia com mais de um cromossomo de *M. gouazoubira*, corroborando a teoria das fusões.

Com o uso da pintura cromossômica recíproca entre *M. m. vaginalis*, *M. reevesi* e *M. gouazoubira*, a teoria de que a evolução cariotípica de *Muntiacus* se deu por fusões em tandem foi reavaliada (YANG et al., 1997b). Verificou-se que os braços eucromáticos da maioria dos cromossomos de *M. reevesi* foram conservados no genoma de *M. m. vaginalis*, exceto para os cromossomos 1, 3, 4 e 5, que passaram por rearranjos intracromossômicos. Assim, outros rearranjos cromossômicos, além de

fusões cêntricas e em tandem, aconteceram durante a evolução do gênero. A hibridização entre *M. m. vaginalis* e *M. gouazoubira* indicou que os braços eucromáticos deste último aparecem conservados na totalidade na espécie indiana, enquanto o padrão encontrado entre muntiacu *M. m. vaginalis* e *M. gouazoubira* corrobora Yang et al. (1997a), no qual os cromossomos 1, 2, 3, 4, 5 e 11 da espécie chinesa evoluíram exclusivamente por fusões em tandem.

Os rearranjos estruturais são os principais responsáveis pela variabilidade cromossômica em muitas taxa de mamíferos. Entretanto, a variação cromossômica intra e interindividual também podem ser causadas pela presença de cromossomos B (PALESTIS et al., 2004; CIVITELLI et al., 1989; JONES; REES, 1982). Ao contrário dos rearranjos estruturais, a presença destes cromossomos não interfere no processo das divisões meióticas e mitóticas (CIVITELLI et al., 1989). Enquanto na mitose esses cromossomos se dispersam irregularmente entre as células-filhas, na meiose podem ocorrer pareamentos ocasionais entre cromossomos B não homólogos ou entre cromossomos B e cromossomos A (complemento normal) (SWITONSKI; STRANZINGER, 1998; CIVITELLI et al., 1989).

Entre as espécies de cervídeos neotropicais há relatos deste tipo de cromossomo para *Mazama nana* (1 a 6 cromossomos) (ABRIL; DUARTE, 2008), *M. bororo* (4 a 5 cromossomos) (DUARTE; JORGE, 2003), *M. gouazoubira* (0 a 3 cromossomos) (DUARTE; JORGE, 1996), *M. nemorivaga* (2 a 8 cromossomos) (DUARTE, 1998) e *M. americana* (2 a 6 cromossomos) (SARRIA-PEREA, 2004). O comportamento destes cromossomos é muito variável frente às diferentes técnicas de bandamento. Em *M. nana*, alguns cromossomos B mostram-se eucromáticos, enquanto outros são completamente heterocromáticos e ainda, alguns com uma banda C positiva na região pericentromérica. Nesta mesma espécie, alguns cromossomos supranumerários mostraram uma banda G positiva na região telomérica (ABRIL; DUARTE, 2008). Para *M. americana*, estes cromossomos foram vistos em todos os animais analisados por Sarria-Perea (2004) com constituição heterocromática predominantemente e origem provável de resíduos das fusões em tandem entre cromossomos verdadeiros.

6. Evolução cromossômica da espécie *Mazama americana*

A citogenética tem sido de grande utilidade no estudo da família Cervidae, com destaque para o gênero *Mazama*, já que a complexidade da constituição cromossômica deste gênero vai além da variação cariotípica interespecífica, havendo também polimorfismos cromossômicos intraespecíficos surgidos a partir de rearranjos, principalmente fusões cêntricas e em tandem e, pela presença de cromossomos supranumerários (DUARTE; JORGE, 1996).

A descrição citogenética de *Mazama americana* foi realizada inicialmente por Taylor et al. (1969), o qual cita $2n=68$ e $NF=74$. Entretanto, Jorge e Benirschke (1977), analisando três indivíduos de *Mazama americana temama*, descrevem um cariótipo básico com $2n=50$ e $NF=70$, sendo um deles possuidor de uma fusão. O cromossomo X foi um submetacêntrico, de tamanho aproximado ao sétimo par e o Y o menor do lote e metacêntrico.

As diferenças cromossômicas entre os animais analisados por estes autores deixaram dúvidas quanto à sua classificação. Baseados nos achados citogenéticos de Jorge e Benirschke (1977), Groves e Grubb (1987) elevariam estes animais à categoria de espécie, *Mazama temama*. Outro padrão foi descrito para a espécie por Neitzel (1987), com a análise de uma fêmea procedente do Paraguai com $2n=52$, acrescido de quatro a cinco cromossomos B e $NF=56$, sendo o X submetacêntrico e o maior do lote. Com estes resultados, as dúvidas quanto ao padrão cariotípico da espécie cresceram.

Posteriormente, Duarte e Merino (1997) analisaram quatro animais do Brasil com números diplóides de 48, 50, 52 e 54 e NF de 54, 54, 56 e 56 respectivamente, sendo estes resultados os que mais se assemelham aos obtidos por Neitzel (1987). Segundo Duarte e Merino (1997), estas variantes intraespecíficas podem indicar a existência de várias espécies dentro dos veados-mateiro. Em outro trabalho, Duarte (1998) analisou 33 espécimes de *M. americana* de várias localidades do Brasil, encontrando extenso polimorfismo, com número diplóide de 42 a 53 cromossomos e o número fundamental de braços de 48 a 57, excetuando-se os cromossomos supranumerários (B). Como para cada região do país amostrada foram encontradas

variantes cariotípicas distintas, estas foram nomeadas pelos autores de citótipos. A partir daí foram descritos sete citótipos distintos: Rio Negro, Manaus, Jari, Acre, Rondônia, Carajás e Rio Paraná (Tabela 01). Entre os animais de um mesmo citótipo também houve variação cromossômica, porém estas foram menores que as encontradas entre citótipos diferentes.

Dessa maneira, permanecem inúmeras dúvidas a respeito do grau de diferenciação entre e dentro dos citótipos e que nível de diferenciação poderia gerar uma barreira reprodutiva real entre as variantes, que caracterizasse uma espécie distinta (DUARTE, 1998).

Tabela 1. Citótipos de *Mazama americana*, segundo Duarte (1998), onde: 2n = número diplóide, A= grandes cromossomos de dois braços, D= cromossomos acrocêntricos grandes, E= cromossomos acrocêntricos pequenos, B= cromossomos supranumerários ou B.

Citótipo	2n	A	D	E	B	Origem
Acre	46-47	0	10- 14	31-33	2-4	Acre
Rio Negro	44	1	5	30	4	Acre, Alto Rio Negro (AM)
Manaus	43-44	4	4	31- 34	3-5	Manaus (AM), Manacapuru (AM)
Carajás	48-51	2-4	6-8	36-38	3-6	Carajás, Oriximiná, Parauapebas (PA)
Paraná	52-53	2	6	42-43	2-5	Paraná, Paraguai
Rondônia	42-45	2-4	7-10	26-28	3-5	Ariquemes (RO), Vilhena (RO)
Jari	48-50	3	5-7	38	3	Norte do Pará -Projeto Jari (PA)

Sarria-Perea (2004) comparou citogeneticamente alguns citótipos da espécie *M. americana* e diferenciou os citótipos Paraná e Carajás por uma fusão em tandem. Além disso, relatou que o citótipo Rondônia é evolutivamente mais distante dos citótipos Paraná e Carajás, por diferir em quatro fusões em tandem e uma translocação Robertsoniana. Neste mesmo trabalho foi descrita pela primeira vez por bandamentos cromossômicos, uma fusão X-autossômica que ocorreu no ancestral dos veados-mateiros sul americanos, originando um sistema sexual complexo do tipo XX/XY1Y2.

Duarte (1998) alertou sobre o fato de que os distintos citótipos encontrados possuem potencial de serem espécies distintas e alguns podem estar sob risco de extinção. Muitos problemas ambientais para conservação das espécies estão

relacionados à vulnerabilidade de pequenas populações e ao fato das florestas tropicais das Américas Central e do Sul estarem sendo fortemente transformadas pela agricultura e pecuária, causando a fragmentação e perda dos habitats ocupados pelo veado-mateiro. Entre as populações mais ameaçadas, estaria a da bacia do Paraná (citótipo Paraná).

Duarte et al. (2008) encontraram um alto nível de diversidade genética no DNA mitocondrial para *Mazama americana* corroborando os dados citogenéticos e sugerindo a presença de um complexo de espécies crípticas.

REFERÊNCIAS

- ABRIL, V. V.; DUARTE, J. M. B. Chromosome polymorphism in the Brazilian dwarf red brocket deer, *Mazama nana* (Mammalia, Cervidae). **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v.31, n.1, p.53-57, 2008.
- ALKALAEVA, E. Z.; TRIFONOV, V. A.; PERELMAN, P. L.; GRAPHODATSKY, A. S. Comparative chromosome painting. **Russian Journal of Genetics**, New York, v.38, n.8, p.1034-1042, 2002.
- ALLEN, J. A. Notes on American deer of the genus *Mazama*. **Bulletin of the American Museum of Natural History**, New York, v.34, p.521-553, 1915.
- BAKER, R. F.; BICKHAM, J. W. Speciation by monobrachial centric fusions. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v.83, p.8245-8248, 1986.
- BARRETTE, C. The comparative behavior and ecology of chevrotains, musk deer and morphologically conservative deer. In: Wemmer, C. M. (ed.) **Biology and management of the Cervidae**. London: Smithsonian Institution Press, 1987. parte I, p.200-213: Review papers and theoretical issues.
- BENIRSCHKE, K. Y.; KUMAMOTO, A. T. Mammalian Cytogenetics and Conservation of Species. **Journal of Heredity**, Washington, v.82, p.187-191, 1991.
- BODMER, R. E. Ecologia e conservação dos veados mateiro e catingueiro na

Amazônia. In: Duarte, J. M. B.(ed) **Biologia e conservação de cervídeos sul-americanos: *Blastocerus*, *Ozotocerus* e *Mazama***. Jaboticabal: FUNEP, p.70-77, 1997.

BOGENBERGER J.; NEITZEL, H.; FITTER, F. A highly repetitive DNA component common to all Cervidae: its organization and chromosomal distribution during evolution. **Cromosoma**, Berlin, v.95, p.154-161, 1987.

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

CHANDRA, H. S.; HUGENFORD, D. A.; WAGNER, J. Chromosomes of five artiodactyls mammals. **Chromosoma**, Berlin, v.2, p. 211-220, 1967.

CIVITELLI, M. V.; CONSETINO, P.; CAPANNA, E. Inter- and intra-individual chromosome variability in *Thamnomys* (*Grammomys*) gazelle (Rodentia, Muridae) B-chromosomes and structural heteromorphisms. **Genetica**, v.79, p.93-105, 1989.

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

DEER SPECIALIST GROUP 2000. *Mazama americana*. Disponível em: <www.iucnredlist.org>. Acesso em: 05 maio 2008.

DOUZERY E.; RANDI, E. The mitochondrial control region of Cervidae, evolutionary patterns and phylogenetic content. **Molecular Biology and Evolution**, Ribeirão Preto, v.14, n.11, p. 1154-1166, 1997.

DUARTE, J. M. B.; GONZALEZ, S.; MALDONADO, J. E. The surprising evolutionary history of South American deer. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, Orlando, v.49, p.17-22, 2008.

DUARTE, J. M. B.; JORGE, W. Morphologic and Cytogenetic Description of the Small Red Brocket (*Mazama bororo* Duarte, 1996) in Brazil. **Mammalia**, Paris, v.67, n.3, p.403-410, 2003.

DUARTE, J. M. B. Análise citotaxonômica do veado mateiro no Brasil (*Mazama americana*). In: _____. **Análise citogenética e taxonômica do gênero *Mazama* (Cervidae; Artiodactyla) no Brasil**. 1998. Não paginado. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista,

Botucatu, 1998.

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

DUARTE, J. M. B.; JORGE, W. Chromosomal polymorphism in several population of deer (genus *Mazama*) from Brazil. **Archivos de Zootecnia**, Córdoba, v.45, p.281-287, 1996.

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

EISEMBERG, J. F.; REDFORD, K. H. **Mammals of the neotropics**. Chicago: The University of Chicago Press, 1999. v.3, 340 p.

EISEMBERG, J. F. **Mammals of the neotropics**. Chicago: The University of Chicago Press, 1989. v.1, 449p.

EISENBERG, J. F. The Contemporary Cervidae of Central and South America. In: VRBA, E. S.; SCHALLER, G. B. **Antelopes, deer, and relatives: fossil record, behavioral ecology, systematic, and conservation**. New Haven: Yale University Press, 2000. p.189-202.

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

EMMONS, L. H.; FEER, F. **Neotropical rainforest mammal: a field guide**. 2. Chicago: The University of Chicago Press, 1997. 281p.

FERNANDEZ, R.; BARRAGAN, M. J.; BULLEJOS, M.; MARCHAL, J. A.; DIAZ DE LA GUADIA, R.; SANCHEZ, A. New C-band protocol by heat denaturation in the presence of formamide. **Hereditas**, Lund, v.137, n.2, p.145-8, 2002.

FERRARI, C. A.; PAVIOLO, A.; DI BLANCO, Y.; DE ANGELO C.; DI BITETTI, M. S. Abundancia, uso del hábitat y patrones de actividad del venado pardo (*Mazama americana*) y la paca (*M. nana*) en la selva Paranaense. **Proceeding of XX Jornadas Argentinas de Mastozoología, SAREM**. Buenos Aires, 2005.

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

FRONICKE, L.; SCHERTHAN, H. Zoo-fluorescence in situ hybridization analysis of human and Indian muntjac karyotypes (*Muntiacus muntjak vaginalis*) reveals satellite DNA clusters at the margins of conserved syntenic segments. **Chromosome Research**, Oxford, v.5, n.4, p.254-61, 1997.

GALETTI JR, P. M.; C. A. MESTRINER, P. J. MONACO, E. M. RASCH. Post-zygotic modifications and intra and interindividual nucleoli organizing region variations in fish: report of a case involving *Leporinus friderici*. **Chromosome Research**, Oxford, v.3, p.285-290, 1995.

GALLAGHER JR., D. S.; DAVIS, S. K.; DONATO, M. De.; BURZLAF, J. D.; WOMACK, J. E.; TAYLOR, J. F.; KUMAMOTO, A. T. A molecular cytogenetic analysis of the tribe Bovine (*Artiodactyla*: *Bovidae*: *Bovinae*) with an emphasis on sex chromosome morphology and NOR distribution. **Chromosome Research**, Oxford, v.7, p.481-492, 1999.

GALLARDO, M. H.; BICKHAM, J. W.; HONEYCUTT, R. L.; OJEDA, R. A.; KÖHLER, N. Discovery of tetraploidy in a mammal. **Nature**, v.401, p.341, 1999.

GILBERT, C.; ROPIQUET, A.; HASSANIN, A. Mitochondrial and nuclear phylogenies of Cervidae (*Mammalia*, *Ruminantia*): Systematics, morphology, and biogeography. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, Orlando, v.40, n.1, p. 101-117, 2006.

GONZALEZ, S.; ALVAREZ-VALIN, F.; MALDONADO, J. E. Morphometric differentiation of endangered pampas deer (*Ozotoceros bezoarticus*), with description of a new subspecies from Uruguay. **Journal of Mammalogy**, Lawrence, v.83, n.4, p.1127-1140, 2003.

GROOVES, C. P.; GRUBB, P. Relationships of living deer. In: WEMMER, C.M. **Biology and management of the Cervidae**. Washington: Smithsonian Institution Press. p.21-59. 1987.

GROVES, C. P. Family Cervidae. In: PROTHERO D. R.; FOSS, S. E. (eds.). **The Evolution of Artiodactyls**. Baltimore: Johns Hopkins University Press, 2007. p.249-256.

GUERRA, M. **Introdução à Citogenética Geral**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 1988.142p.

- GUERRA, M. **FISH – Conceitos e Aplicações na Citogenética**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 2004. 176p.
- GUSTAVSSON, I.; SUNDT, C. O. Three polymorphic chromosome systems of centric fusion type in a population of Manchurian Sika Deer (*Cervus Nippon hotulorum*). **Chromosoma**, Berlin, v.28, p.245-254. 1969.
- HERGOZ, S.; HARRINGTON, R. The role of hybridization in the karyotype evolution of deer (Cervidae; Artiodactyla; Mammalia). **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.82, p. 425-429, 1991.
- HOWELL, W. W.; BLACK, D. A. Controlled silver staining of nucleous organizer regions with a protective colloidal developer: a 1 step method. **Experientia**, Basel, v.36, p.1014-1015, 1980.
- JONES, R. N.; REES, H. **B. Chromosomes**. Academic Press, London, 1982.
- JORGE, W.; BENIRSCHKE, K. Centromeric heterochromatin and G-banding of the Red Brocket Deer *Mazama americana* temama (Cervoidea, Artiodactyla) with probable non-Robertsonian translocation. **Cytologia**, Tokyo, v.42, p.711-721, 1977.
- JUNQUEIRA, J. F. D. Veados do Brasil. **Chácaras e Quintais**. São Paulo, v.62, p.330-331, 1940.
- KING, M. **Species Evolution: The Role of Chromosome Changes**. Cambridge, Cambridge University Press, 1993.
- KINGSWOOD, S. C.; KUMAMOTO, A. T.; CHARTER, S. J.; JONES, M. L. Cryptic chromosomal variation in suni *Neotragus moschatus* (Artiodactyla, Bovidae). **Animal Conservation**, Cambridge, v.1, p.95-100, 1998a.
- KINGSWOOD, S. C.; KUMAMOTO, A. T.; CHARTER, S. J.; AMAM, R. A.; RYDER, O. A. Centric fusion polymorphisms in Waterbuck (*Kobus ellipsiprymnus*). **Journal of Heredity**, Washington, v.89, n.1, p.96-100, 1998b.
- MATSUBARA, K.; NISHIDA-UMEHARA, C.; TSUCHIYA, K; NUKAYA, D.; MATSUDA, Y. Karyotypic evolution of Apodemus (Muridae, Rodentia) inferred from comparative FISH analyses. **Chromosome Research**, Oxford, v.12, p.383-395, 2004.
- MAYR, E. Species, speciation and chromosomes. In: BENIRSCHKE, K. (ed.) **Comparative mammalian cytogenetics**. Berlin, Springer-Verlag, 1969, p.1-7.

- MAYR, E. **Populações, espécies e evolução**. v. 5. São Paulo: Ed. Universal, 1977. 485p.
- MEDELLÍN, R. A.; GARDNER, A. L.; ARANDA, J. M. The taxonomic status of the yucatán brown brocket, *Mazama pandora* (Mammalia: Cervidae). **Proceedings of the Biological Society of Washington**. Washington, v.111, n.1, p.1-14, 1998.
- NADLER, C. F.; LAY, D. M.; HASSINGER, J. D. Chromosomes of three Asian mammals: *Meriones meridianus* (Rodentia: Gerbillinae), *Spermophilopsis leptodactylus* (Rodentia: Sciuridae), *Ochotona rufescens* (Lagomorpha: Ochotonidae). **Experientia**; Basel, v.25, n.7, p.774-5, 1969.
- NEITZEL, H. Chromosome evolution of Cervidae: Karyotypic and molecular aspects. In: OBE, G.; BASLER, A. (Ed.). **Cytogenetics, Basic and applied aspects**, Berlin: Springer Verlag, 1987, p.90-112.
- NOWAK, R. M. **Mammals of the world**. 5 ed. London: The Johns Hopkins university Press, 1991. 1629p.
- OLROG, C. C.; LUCERO, M. M. **Guia de los Mamíferos Argentinos**. Tucuman, Argentina, 1981, 151p.
- PALESTIS, B. G., TRIVERS, R.; BURT, A.; JONES, R. N. The distribution of B chromosomes across species. **Cytogenetics and Genome Research**, v.106, p.151-158, 2004.
- PATAK, S.; STOCK, A. D. The X chromosome of mammals: karyological homology as revealed by banding techniques. **Genetics**, Pittsburgh, v.78, p.703-714, 1974.
- PIECZARKA, J. C.; NAGAMACHI, N. Y. Pintura cromossômica como instrumento para estudos filogenéticos em primatas. In: GUERRA, M. **FISH – Conceitos e Aplicações na Citogenética**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 2004. p.115-132
- REID, F. A. **A field guide to the mammals of Central American and southeast Mexico**. New York: Oxford University Press, 1997. 346p.
- REIG, O. A. Teoría del origen y desarrollo de la fauna de mamíferos de América del Sur. **Museo Municipal de Ciencias Naturales Lorenzo Scaglia**, v.1, 1981, 162p.
- RIBEIRO, A. M. Os veados do Brasil segundo as coleções Rondon e de vários museus nacionais e estrangeiros. **Revista do Museu Paulista**, São Paulo, v.11, p.209-308,

1919.

RIESEBERG, L. H. Chromosomal rearrangements and speciation. **Trends in Ecology and Evolution**, Amsterdam, v.16, n.7, p.351-356, 2001.

RIVERO, K.; RUMIZ, D. I.; TABER, A.B. Differential habitat use by two sympatric brocket deer species (*Mazama americana* and *M. gouazoubira*) in a seasonal Chiquitano forest of Bolivia. **Mammalia**, Paris, v.69, p.169-183, 2005.

ROBINSON, T. J.; ELDER, F. F. B., Cytogenetics: its role in wildlife management and the genetic conservation of mammals. **Biological Conservation**, Essex, v.63, p.47-51. 1993.

ROSSI, R. V. **Taxonomia de *Mazama* Ranfinesque, 1817 do Brasil (*Artiodactyla*, *Cervidae*)**. 2000. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.

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

SEABRIGHT, M. A rapid banding technique for human chromosomes. **The Lancet**, London, v.1, p.971-972, 1971.

SUMNER, A. T. A simple technique of demonstrating centromeric heterochromatin. **Experimental Cell Research**, New York, v.75, p.304-306, 1972.

SWITONSKI, M.; STRANZINGER, G. Studies of Synaptonemal complexes in farm mammals – A Review. **Journal of Heredity**, v.89, p.473-480, 1998.

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

THOMAS, O. On certain of the smaller South American cervidae. **Annals and Magazine of Natural History**, London, v.11, p.585-589, 1913.

VARGAS-MUNAR, D. S. F. **Relação entre fragilidade cromossômica e trocas entre cromátides irmãs com a variabilidade cariotípica de cervídeos brasileiros**. 2003. 35f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias,

Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2003.

VIEIRA, C. C. Lista Remissiva dos mamíferos do Brasil. **Arquivos de Zoologia**, São Paulo, v.8, p.458-464, 1955.

VOGLIOTTI, A. **História natural de Mazama bororo (Artiodactyla; Cervidae) através da etnozootologia, monitoramento fotográfico e rádio-telemetria**. 2004. 99 f. Dissertação (Mestrado em Ecologia de Agroecossistemas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.

WANG, J. X.; ZHAO, X.; KOH, H. S.; DENG, Y. I.; QI, H. Y. Chromosomal polymorphisms due to heterochromatin growth and pericentric inversions in white-bellied rat, *Niviventer confucianus*, from China. **Hereditas**, Lund, v.138, p.59-64, 2003.

WEBB, D. S. Ecogeography and the Great American Interchange. **Paleobiology**, New York, v.17, n.3, p.266-280, 1991.

WEBB, D. S. Evolutionary History of new world cervidae. In: VRBA, E. S; SCHALLER, G. B. **Antelopes, Deer, and Relatives: fossil record, behavioral ecology, systematic, and conservation**. New Haven: Yale University Press, 2000. p. 38-64.

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

WHITE, M. J. D. Models of speciation: New concepts suggest that the classical sympatric and allopatric models are not the only alternatives. **Science**, v.159, p.1065-70, 1968.

WHITE, M. J. D. **Models of speciation**. San Francisco: W. H. Freeman and Company, 1978, 427p.

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

WURSTER, D. H.; BENIRSCHKE, K. Indian muntjac, *Muntiacus muntjak*: a deer with a low diploid chromosome number. **Science**, v.168, p.1364 - 1366. 1970.

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

652, 1995.

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

YANG, F.; O'BRIEN, P. C. M.; WIENBERG, J.; FERGUSON-SMITH, M. A. A reappraisal of the tandem fusion theory of karyotype evolution in the Indian muntjac using chromosome painting. **Chromosome Research**, Oxford, v.5, p.109-117, 1997b.

YANG, F.; O'BRIEN, P. C. M.; WIENBERG, J.; FERGUSON-SMITH, M. A. Evolution of the black muntjac (*Muntiacus crinifrons*) karyotype revealed by comparative chromosome painting. **Cytogenetics and cell genetics**, Basel, v.76, n.3-4, p.159-63, 1997c.

YANG, F.; MULLER, S.; JUST, R.; FERGUSON-SMITH, M. A.; WIENBERG, J. Comparative chromosome painting in mammals: human and the Indian muntjac (*Muntiacus muntjak vaginalis*). **Genomics**, San Diego, v.39, n.3, p.396-401, 1997d.

CAPÍTULO 2 - ANÁLISE COMPARATIVA ENTRE DIFERENTES VARIANTES CARIOTÍPICAS DE *Mazama americana* (MAMMALIA; CERVIDAE).

RESUMO

Os animais da espécie *Mazama americana* amostrados no Brasil parecem estar passando por uma reorganização cromossômica intensa, o que gera uma grande variabilidade cariotípica. Animais de diferentes localidades foram analisados por meio das técnicas clássicas de bandamento cromossômico e classificados em seis citótipos distintos de acordo com sua região de origem – Rondônia com $2n=42/43$; $NF=46$, Juína com $2n=44/45$; $NF=48$, Jarí com $2n=48/49$; $NF=56$, Santarém com $2n=50/51$; $NF=56$, Carajás $2n=50/51$; $NF=54$ e, Paraná com $2n=52/53$; $NF=56$. Foi possível eleger um cariótipo básico de cada citótipo e suas variantes, em decorrência da presença de fusões cêntricas em heterozigose, inversões e aneuploidias. A partir do citótipo Paraná foi possível identificar uma linhagem que diferenciou os cariótipos de Santarém e Jarí por fusões cêntricas e o cariótipo de Carajás, por uma fusão em tandem. Os cromossomos dos citótipos Juína e Rondônia parecem ter tido uma origem diferenciada, a partir de outra linhagem do ancestral da espécie, que acumulou múltiplas fusões em tandem e uma fusão cêntrica.

Palavras-chave: citótipos, rearranjos cromossômicos, *Mazama americana*.

INTRODUÇÃO

A caracterização citogenética fornece um dos mais confiáveis critérios taxonômicos (DOBIGNY et al., 2002; SEUÁNEZ et al., 2005) mas ainda é escassa para a maioria de cervídeos neotropicais.

Os primeiros trabalhos sobre evolução cromossômica de cervídeos surgiram no início dos anos 60 e indicavam os rearranjos do tipo fusão Robertsoniana como um dos

principais mecanismos de diferenciação cariotípica deste grupo (GUSTAVSSON; SUNDT, 1969; TAYLOR et al., 1969; JORGE; BENIRSCHKE, 1977; NEITZEL, 1987).

A variabilidade de aspectos morfológicos, ecológicos e genéticos da espécie *Mazama americana*, aliada aos poucos estudos, geram controvérsias sobre sua correta definição taxonômica. As dúvidas quanto ao padrão cariotípico da espécie também aumentaram à medida que novos estudos foram realizados. A descrição citogenética de um animal com $2n=68$ e $NF=74$ foi feita primeiramente por Taylor et al. (1969). Jorge e Benirschke (1977) analisaram três indivíduos de *Mazama americana temama* com $2n=50$ e $NF=70$. Outro padrão foi descrito por Neitzel (1987), uma fêmea procedente do Paraguai com $2n=52 + 4 a 5B$ e $NF=56$, sendo o X submetacêntrico e o maior do lote.

Os últimos dados publicados sobre citogenética de *M. americana* se restringiram às técnicas de bandamento clássico e mostraram a existência de um complexo polimorfismo que pode indicar a existência de várias espécies e não uma única (DUARTE; MERINO, 1997; DUARTE, 1998; Sarria-Perea, 2004). Duarte (1998) após analisar 33 indivíduos de *M. americana* de várias localidades do Brasil, encontrou uma variação cromossômica que apresentou coerência geográfica, ou seja, alguns cariótipos foram característicos de algumas regiões e a partir disso foram descritos citótipos distintos (Rio Negro, Manaus, Jari, Acre, Rondônia, Carajás e Rio Paraná). Sarria-Perea (2004) comparou três destes citótipos, Paraná, Carajás e Rondônia. Ele diferenciou os animais do Paraná dos de Carajás pela ocorrência de uma fusão em tandem. Além disso, relatou que o citótipo Rondônia é evolutivamente mais distante dos outros dois, por diferir em quatro fusões em tandem e uma translocação Robertsoniana. Neste mesmo trabalho foi descrito um sistema sexual complexo do tipo XX/XY1Y2, devido a uma fusão X-autossômica que ocorreu no ancestral dos veados-mateiros sul americanos.

O presente estudo buscou compreender como ocorreu a reorganização cromossômica dentro das variantes cariotípicas brasileiras, analisando comparativamente animais de diferentes localidades do Brasil.

MATERIAL E MÉTODOS

Os 23 animais da espécie *Mazama americana* utilizados neste trabalho foram provenientes de diferentes localidades do Brasil (Tabela 01). Culturas de fibroblastos foram feitas a partir de fragmentos de pele e as preparações cromossômicas foram submetidas aos bandamentos G (SEABRIGHT, 1971), C (SUMNER, 1973) e coloração Ag-RON (HOWELL; BLACK, 1980).

Os cromossomos foram classificados de acordo com a razão de braços em metacêntricos, submetacêntricos ou acrocêntricos e, de acordo com o comprimento relativo (CR) em grupos: A (grandes cromossomos de dois braços= $CR > 2,5\%$), C (pequenos cromossomos de dois braços= $CR < 2,5\%$), D (grandes cromossomos acrocêntricos= $CR > 3,0\%$), E (pequenos cromossomos acrocêntricos= $CR < 3,0\%$) e B (supranumerários ou cromossomos B= $CR < 1,5\%$).

A análise comparativa entre os citótipos foi realizada partindo-se do cariótipo com maior número diplóide e maior número fundamental com o objetivo de se localizar os rearranjos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir da origem e constituição cariotípica dos 23 animais analisados foram identificados seis citótipos (Rondônia, Juína, Jarí, Carajás, Santarém e Paraná) com número diplóide variando entre 42 a 53 e número fundamental entre 48 a 56 (Tabela 01; Figura 01). A variação cromossômica de *M. americana* encontrada neste trabalho corroborou os resultados já descritos na literatura, incluindo informações novas a respeito da origem dos maiores cromossomos (grupos A e D) nos citótipo com menor número diplóide e fortalecendo as teorias propostas para a evolução da espécie.

Além do cariótipo básico dos citótipos (Figura 01), foram encontrados animais portadores de fusões cêntricas, inversões e aneuploidias, originando variantes dentro dos diferentes citótipos (Figura 02).

No citótipo Paraná a única variante encontrada foi devido à presença de um par heterozigoto para uma fusão cêntrica entre os pares 16 e 21 em uma fêmea (Figura 02a). O macho com cariótipo variante do citótipo Carajás apresentou um par heterozigoto para uma fusão cêntrica entre os pares 5 e 14 (Figura 02b).

Tabela 01. Resultados da análise citogenética dos animais da espécie *Mazama americana*, agrupados por citótipo, onde 2n=número diplóide; NF=número fundamental; B=variação de cromossomos B; RO=Rondônia; JU=Juína; JA=Jarí; CA=Carajás; PR=Paraná; SA=Santarém; v=cariótipo variante; b=cariótipo básico.

Nº	Citótipo	2n/NF	B	Origem de cativeiro	Origem de natureza
T235	PR ^v	2n=51/NF=56	4	Pres. Prudente/SP	Desconhecida
T255	PR ^b	2n=52/NF=56	1-4	Criadouro Teuto/GO	Desconhecida
T256	PR ^b	2n=52/NF=56	0, 2-4	Criadouro Itaipu /PR	Nascido em cativeiro
T257	PR ^b	2n=52/NF=56	2-5	Zôo de Cascavel/PR	Pq. Nac. Iguaçu/PR
T192	PR ^b	2n=52/NF=56	3-4	Zoo de Curitiba/PR	Desconhecida
T270	PR ^b	2n=52/NF=56	5-7	Pq. Nac. do Iguaçu/PR	Pq. Nac. Iguaçu/PR
T268	PR ^b	2n=52/NF=56	3	-----	Pq. Nac. Iguaçu/PR
T271	PR ^b	2n=52/NF=56	3-5	-----	Pq. Nac. Iguaçu/PR
T267	PR ^b	2n=53/NF=56	4	-----	Pq. Nac. Iguaçu/PR
T205	PR ^b	2n=53/NF=56	1-5	Criadoro Itaipu/PR	Nascido em cativeiro
T259	SA ^b	2n=51/NF=56	3, 4 ou 6	Criadouro Santarém/PA	Desconhecida
T260	SA ^b	2n=51/NF=56	3-4	IBAMA Santarém/PA	Itaituba/PA
T258	JA ^b	2n=49/NF=56	4-5	Criadouro Santarém/PA	Desconhecida
T254	CA ^b	2n=50/NF=54	3-6	IBAMA Imperatriz/MA	Açailândia - MA
T274	CA ^v	2n=50/NF=54	3	IBAMA Imperatriz-MA	Nascida em cativeiro
T252	JU ^v	2n=43/NF=48	3	IBAMA Juína/MT	Juína - MT
T253	JU ^v	2n=43/NF=48	3 ou 5	IBAMA Juína/MT	Juína - MT
T247	JU ^v	2n=44/NF=46	3-5	IBAMA Juína /MT	Juína - MT
T248	JU ^b	2n=44/NF=48	2-6	IBAMA Juína/MT	Juína - MT
T251	JU ^b	2n=45/NF=48	2-3	IBAMA Juína/MT	Juína – MT
T211	RO ^v	2n=42/NF=49	0, 2-5	Zôo de Ariquemes/RO	Desconhecida
T269	RO ^v	2n=42/NF=46	3-5	Buritis-RO	Buritis/RO
T021	RO ^b	2n=43/NF=46	4-6	Zôo de Ariquemes/RO	Desconhecida

Entre os animais de Juína foi encontrada uma fêmea portadora de um par heterozigoto para fusão cêntrica entre os pares 6 e 21 além de um macho portador de um cromossomo X extra (macho XXY1Y2) (Figura 02c, 02d). Para o citótipo Rondônia, duas variantes foram detectadas: um macho portador de uma fusão cêntrica em heterozigose entre os pares 7 e 20 (Figura 02e) e, uma fêmea com inversão pericêntrica em ambos os cromossomos do par 3 do citótipo básico, originando o par 2 com morfologia submetacêntrica (correspondente ao par 1 do citótipo Paraná) e outra inversão pericêntrica em um dos cromossomos do par 5 (Figura 02f).

A variação intrapopulacional (de cada citótipo) foi causada principalmente por fusões cênicas, na forma heterozigota. Apesar da amostragem ter sido muito diferente entre as regiões brasileiras, aparentemente o citótipo Paraná é mais estável cromossomicamente, pois de 10 animais houve apenas uma variante devido a um par heterozigoto para uma fusão cêntrica. A amostragem dos outros citótipos foi muito menor, porém encontrou-se um maior número de variantes. Nos animais da Amazônia ocidental (citótipos Juína e Rondônia), além da ocorrência de fusões cênicas em heterozigose também foram encontrados um macho portador de uma aneuploidia envolvendo o cromossomo X e uma fêmea portadora de inversões pericêntricas.

Todos os animais amostrados apresentaram cromossomos B pequenos e acrocêntricos ou puntiformes. Além da variação numérica destes cromossomos entre os indivíduos, na maioria também ocorreu variação intraindividual. Estes cromossomos não apresentaram um padrão de coloração constante perante o bandamento C, aparecendo ora totalmente heterocromáticos ou eucromáticos, ora parcialmente heterocromáticos. Alguns destes cromossomos mostraram uma banda G positiva na região telomérica do braço longo. Os cromossomos B não foram levados em conta na análise comparativa entre os citótipos, pois apresentam como característica principal a variação em número dentro de um mesmo indivíduo, corroborando as informações encontradas na literatura (KARTAVTSEVA et al. 2004; FAGUNDES et al. 2004)

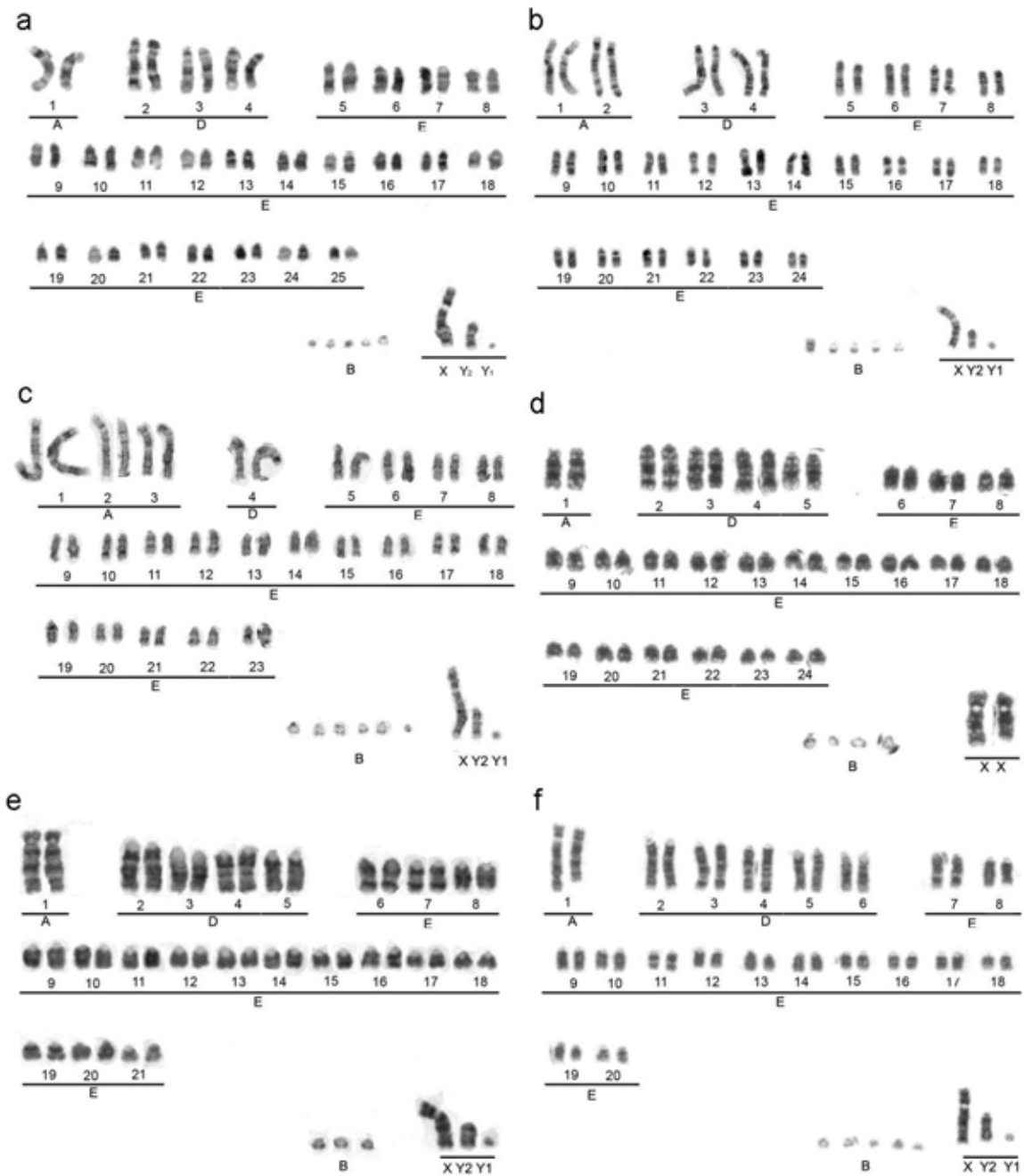


Figura 01. Cariótipos básicos dos seis citótipos encontrados para *M. americana*. (a) Citótipo Paraná ($2n=52/53$ e $NF=56$); (b) Citótipo Santarém ($2n=51/NF=56$); (c) Citótipo Jarí ($2n=49/NF=56$); (d) Citótipo Carajás ($2n=50/NF=54$); (e) Citótipo Juína ($2n=45/NF=48$); (f) Citótipo Rondônia ($2n=43/NF=46$).

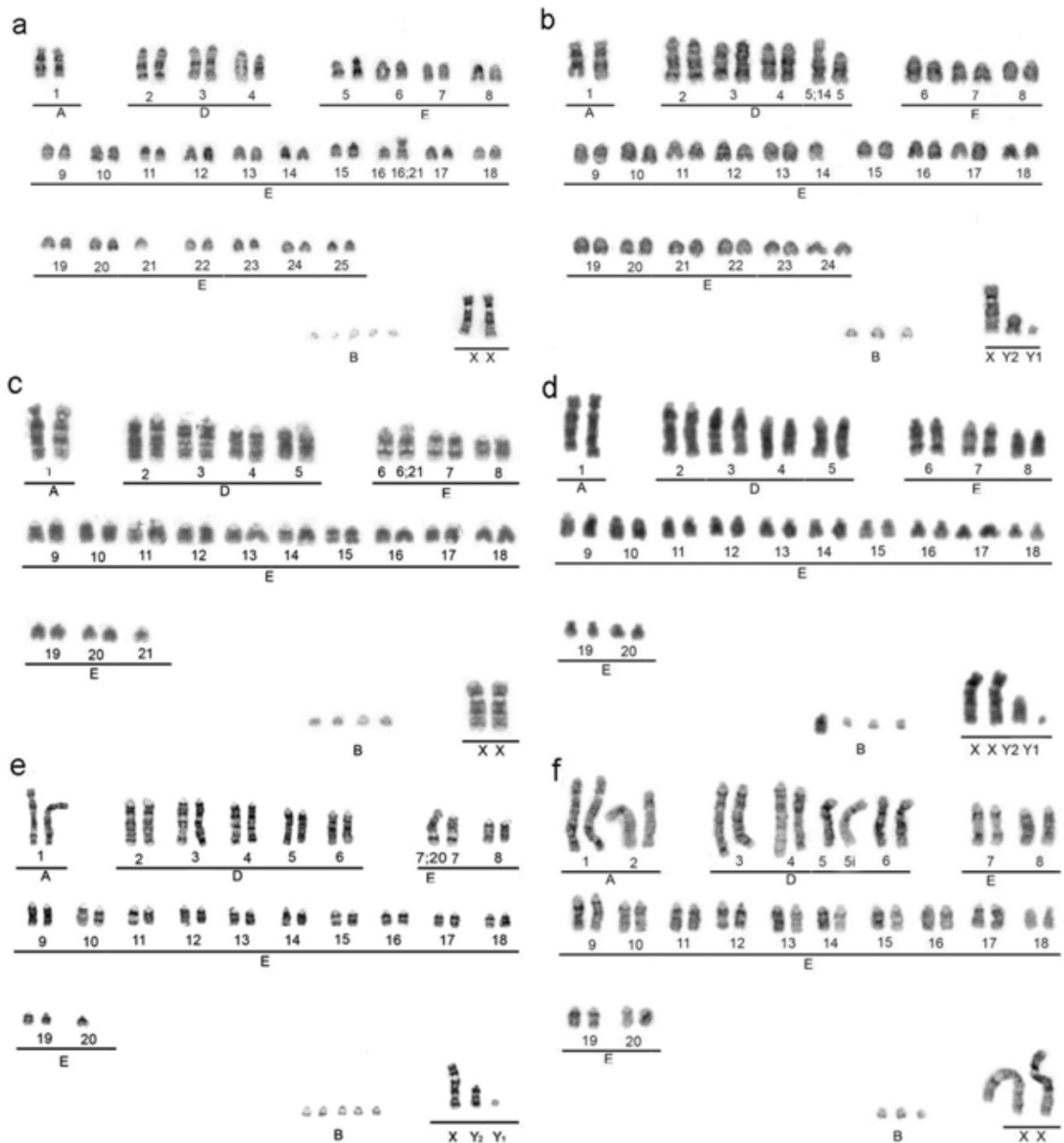


Figura 02. Cariótipos das variantes encontradas nos diferentes citótipos de *M. americana*. (a) Variante $2n=51/NF=56$ do citótipo Paraná; (b) Variante $2n=50/NF=54$ do citótipo Carajás; (c) Variante $2n=43/NF=48$ do citótipo Juína; (d) Variante $2n=44/NF=46$ do citótipo Juína; (e) Variante $2n=42/NF=46$ do citótipo Rondônia; (f) Variante $2n=42/NF=49$ do citótipo Rondônia.

Os cromossomos sexuais de *M. americana* formam um sistema múltiplo do tipo XX/XY1Y2 devido a uma fusão X-autossômica ancestral. O bandamento G permitiu identificar corretamente a região do X homóloga a um acrocêntrico de tamanho mediano (grupo E). Uma banda C positiva no braço longo do cromossomo X coincide com o ponto de fusão em tandem entre este e o autossomo ancestral, homólogo ao Y2. O cromossomo Y1 é o menor do lote, com morfologia metacêntrica, totalmente eucromático.

O cariótipo básico do citótipo Paraná ($2n=52/53$ e $NF=56$) foi utilizado como ponto de partida para as comparações cromossômicas entre os citótipos por apresentar o maior número diplóide e fundamental dentre os animais analisados (Figura 03). Neste citótipo foram encontradas bandas heterocromáticas intersticiais nos cromossomos do grupo D, além de grandes blocos de heterocromatina pericentromérica nestes e também no grupo E. O par cromossômico 1 apresentou um pequeno bloco de heterocromatina centromérica e duas marcações intersticiais no braço q. As regiões organizadoras do nucléolo (RON) foram localizadas nos telômeros dos pares acrocêntricos 5 e 6.

Os citótipos Paraná e Santarém diferenciaram-se por um único rearranjo. O par 1 do citótipo Santarém, um submetacêntrico do grupo A, se originou a partir da fusão cêntrica entre o par 4 e o par 11 do citótipo Paraná (Figura 04). O par 2 de Santarém corresponde ao par 1 do citótipo Paraná. Todos os outros cromossomos são correspondentes entre estes citótipos, inclusive os portadores da RON.

A partir do citótipo Paraná dois eventos independentes de fusão cêntrica ocorreram para originar os pares 1 e 2 do cariótipo básico do citótipo Jarí (Figura 05). O par 1 corresponde aos cromossomos 2 do grupo D e 5 do grupo E do citótipo Paraná, e se originou de uma fusão na região centromérica. O par 5 no citótipo Paraná é portador da RON, característica que corrobora o bandamento G comprovando sua homologia entre este e o braço curto do par 1 no citótipo Jarí (Figura 05a, 05b e 05c). O outro par portador da RON (JA5=PR6) não sofreu rearranjo, permanecendo na sua forma acrocêntrica. O par 2 do citótipo Jarí, surgiu através da fusão entre os pares 4 e 11 do citótipo Paraná, correspondendo ao par 1 do citótipo Santarém (Figura 05d e

05e). Os outros cromossomos aparecem em ambos os citótipos, incluindo os pares 1 e 3 do citótipo Paraná que correspondem respectivamente aos pares 3 e 4 em Jarí.

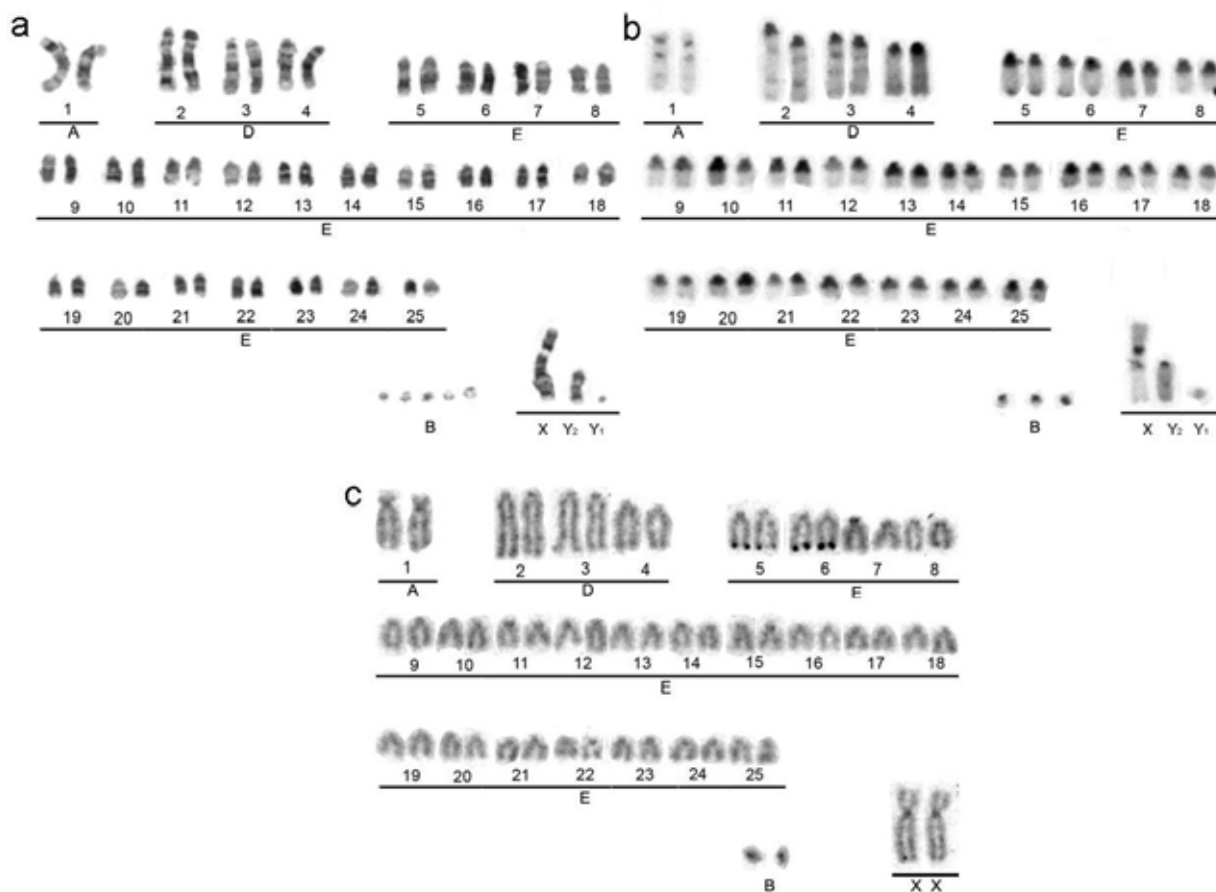


Figura 03. Cariótipo básico do citótipo Paraná (PR) (2n=52/53 e NF= 56) sob bandamento G (a), bandamento C (b) e coloração Ag-RON (c).

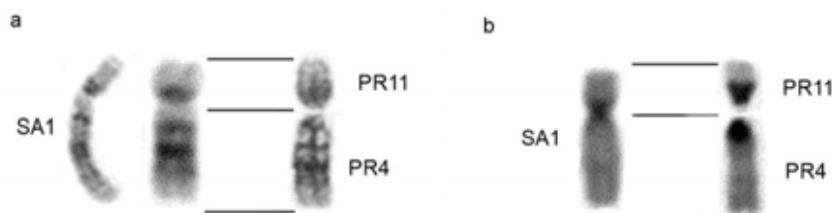


Figura 04. Cromossomos correspondentes entre os citótipos Paraná (PR) e Santarém (SA) sob bandamento G em (a) e bandamento C em (b). Cromossomo SA1 em dois níveis de resolução e os cromossomos PR4 e PR11.

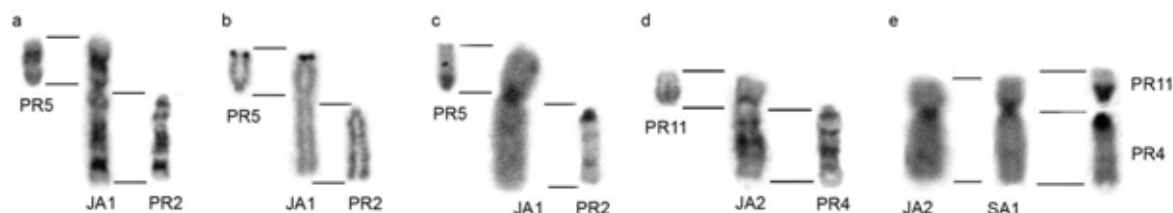


Figura 05. Cromossomos correspondentes entre os citótipos Paraná (PR) e Jarí (JÁ). (a) Comparação sob bandamento G entre cromossomo JA1 com PR5 e PR2; (b) mesma comparação sob coloração Ag-RON e (c) sob bandamento C; (d) comparação sob bandamento G entre JA2 com os cromossomos PR11 e PR4; (e) cromossomos JA2, SA1, PR11 e PR4 sob bandamento C.

A principal diferença existente entre os citótipos Paraná e Carajás envolve um dos pares portadores da RON. O cromossomo 5 do citótipo Paraná parece ter sofrido uma fusão em tandem com o cromossomo 10 do grupo E, originando o cromossomo 3 do grupo D do citótipo Carajás (Figura 06). Além disso, o animal T274, portador do cariótipo variante do citótipo Carajás, apresentou um rearranjo em heterozigose para fusão cêntrica entre os pares 5 e 14. O par rearranjado é correspondente aos cromossomos SA1 e ao JA2 e, conseqüentemente tem sua origem a partir do citótipo Paraná explicada pela fusão cêntrica entre os pares 4 e 11 (Figura 07).

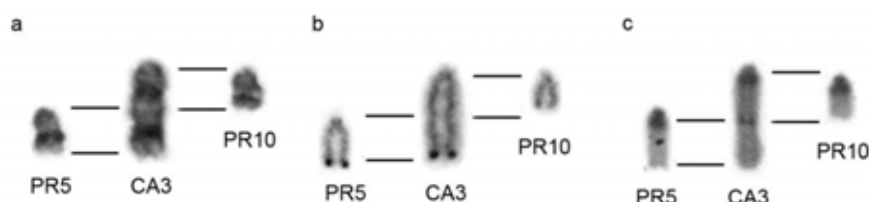


Figura 06. Cromossomos correspondentes entre os citótipos Paraná (PR) e Carajás (CA). (a) Comparação sob bandamento G de CA3 com os cromossomos PR5 e PR10; (b) Mesma comparação sob coloração Ag-RON e (c) sob bandamento C.

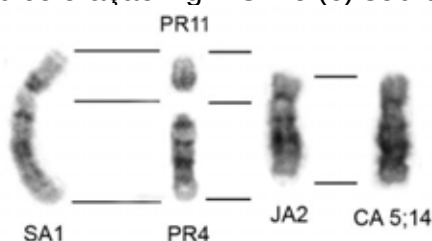


Figura 07. Comparação sob bandamento G entre os citótipos (Santarém) SA, Paraná (PR), Jarí (JA) e Carajás (CA), evidenciando a equivalência entre o cromossomo rearranjado CA 5;14 com JA2, SA1 e os acrocêntricos PR4 e PR11.

Do citótipo Paraná para o citótipo Juína houve uma redução de quatro pares cromossômicos. Assim, a análise comparativa entre esses citótipos evidenciou um padrão de rearranjos mais complexos do que os que ocorreram entre os citótipos acima comparados. O primeiro par cromossômico do cariótipo básico de Juína (JU1) foi formado por um evento de fusão em tandem e uma fusão cêntrica (Figura 08a). A fusão em tandem entre os cromossomos 5 e 23 do citótipo Paraná originou o braço longo, que mostra a região organizadora do nucléolo na constrição secundária originada no ponto de fusão entre estes dois cromossomos, enquanto que a fusão cêntrica entre os cromossomos 18 e 5, originou o braço curto. Os pares 6 e 7 do citótipo Juína podem ter sua origem explicada pela ocorrência de uma fusão em tandem. Os cromossomos 14 e 17 do citótipo Paraná originaram o par 6 de Juína (Figura 08b) e, os cromossomos 11 e 22 do Paraná originaram o par 7 (Figura 08c).

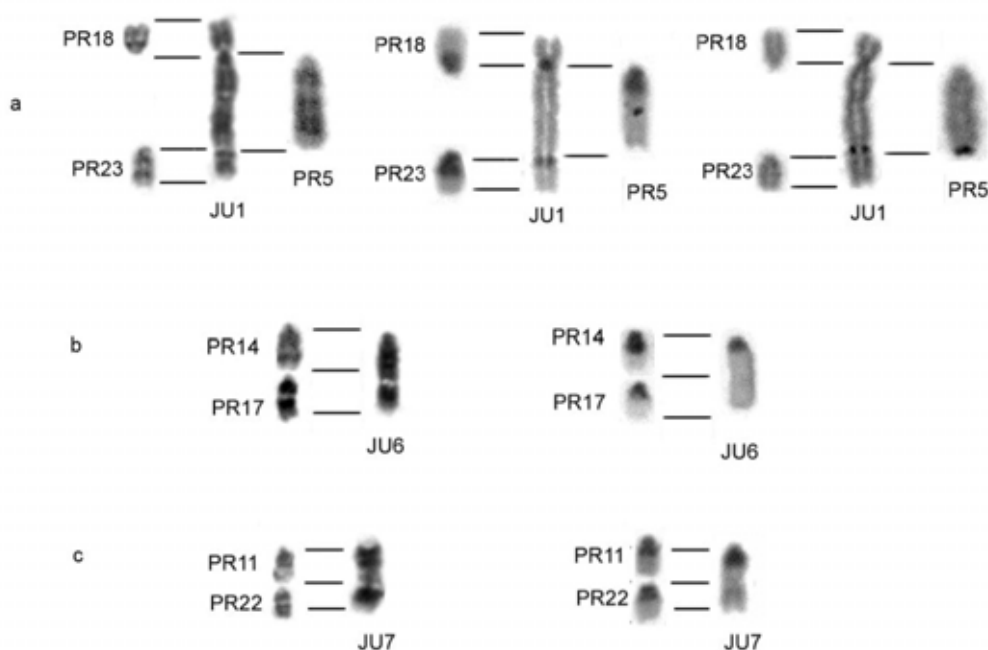


Figura 08. Cromossomos correspondentes entre os citótipos Paraná (PR) e Juína (JU). (a) Comparação sob bandamentos G, C e coloração Ag-RON de JU1 com PR23, PR5 e PR18; (b) Comparação sob bandamentos G e C de JU6 com PR14 e PR17; (c) Comparação sob bandamentos G e C de JU7 com PR11 e PR22.

O citótipo Rondônia se assemelha ao citótipo Juína em sua constituição cromossômica. O par 1 tem a mesma origem nestes dois grupos, ou seja, formado pelos cromossomos 5, 23 e 18 do citótipo Paraná através de uma fusão em tandem e uma fusão cêntrica (Figura 09a). A formação deste par, nestes dois citótipos, envolveu o cromossomo PR5 e, portanto, a RON aparece na constrição secundária, no ponto de fusão em tandem entre o PR23 e PR5 e, o outro par portador da RON ficou posicionado como oitavo cromossomo autossomo (JU8=RO8=PR6). O cromossomo 4 do citótipo Rondônia pode ter sua origem explicada a partir do citótipo Paraná (envolvendo 2 fusões em tandem entre os cromossomos 8, 11 e 22) ou a partir do citótipo Juína (por meio de uma fusão em tandem entre os cromossomos 10 e 7) (Figura 09b). O sétimo par autossômico do citótipo Rondônia surgiu a partir da fusão em tandem entre os cromossomos 14 e 17 do citótipo Paraná e é equivalente ao par 6 de Juína (JU6) (Figura 09c).

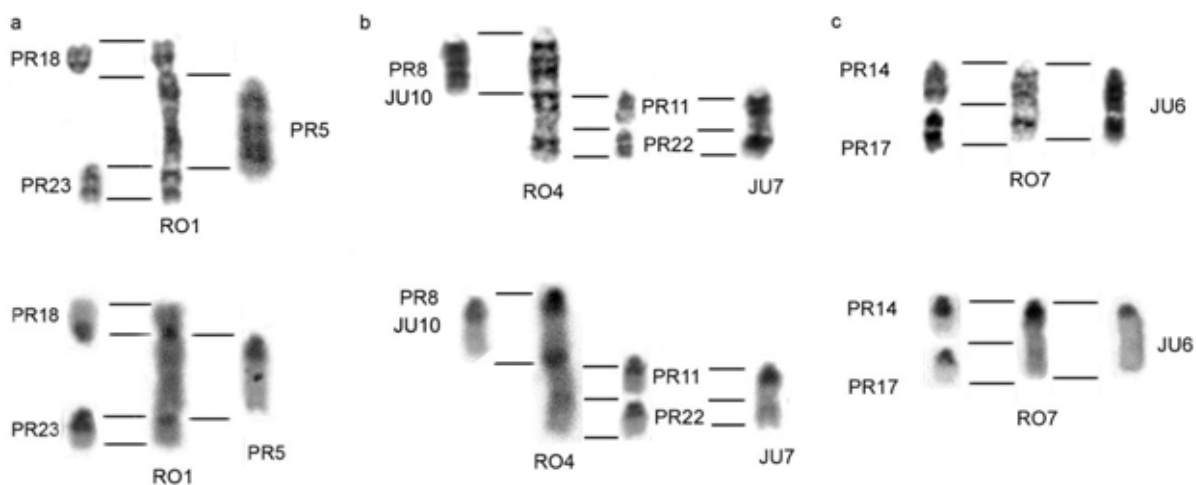


Figura 09. Cromossomos correspondentes entre os citótipos Rondônia (RO), Paraná (PR) e Juína (JU) sob bandamento G e C. (a) Origem de RO1 a partir dos cromossomos PR23, PR5 e PR18; (b) Origem de RO4 a partir dos cromossomos PR8, PR11 e PR22 ou a partir dos cromossomos JU8 e JU7; (c) Origem de RO7 ou JU6 a partir dos cromossomos PR14 e PR17.

Após a comparação dos cariótipos de Rondônia e Juína com Paraná foi possível reconhecer a origem do par 1 do citótipo Paraná (PR1) a partir de uma inversão pericentromérica do par acrocêntrico 3 (RO3/JU3). Assim, PR1 pode ser considerado um par derivado e o acrocêntrico correspondente (RO3/JU3) mais basal.

As diferenças encontradas na distribuição cromossômica das regiões organizadoras do nucléolo (RON) entre espécies próximas são atribuídas aos rearranjos acumulados por cada uma desde a divergência de seu ancestral comum (SATANI et al., 2002). Por meio da localização dos cromossomos portadores da RON em *M. americana* foi possível diferenciar pelo menos quatro variantes (Figura 10). O par acrocêntrico PR5, portador da RON no citótipo Paraná, nos citótipos Rondônia e Juína apresentou-se rearranjado com os cromossomos PR18 e PR23 originando o par submetacêntrico RO1 e JU1. Em Carajás, uma fusão em tandem uniu os pares PR5 PR10 no CA3. Em Jarí PR5 forma uma fusão cêntrica com o PR2 e, em Santarém não está rearranjado, aparecendo na forma acrocêntrica. Assim, a variação interpopulacional encontrada para a RON em *M. americana* corrobora o caminho evolutivo descrito por meio dos bandamentos por Sarria-Perea (2004), acrescentando dados dos citótipos não analisados por este autor (Santarém, Jarí e Juína).

Mesmo com a obtenção de diferentes graus de resolução dos bandamentos G entre os seis citótipos analisados foi possível identificar as homologias entre todos os cromossomos, partindo-se do citótipo Paraná (Figura 11).

Sarria-Perea (2004) e Carnelossi (2007) utilizando análises cromossômicas e de DNA mitocondrial respectivamente, defenderam em seus trabalhos a teoria de que os veados desta espécie divergiram na América do Sul, diferenciando-se em três linhagens principais. Carnelossi (2007) por meio dos estudos dos genes mitocondriais verificou que entre as espécies irmãs *M. nana* e *M. bororo* há uma menor distância genética do que a existente entre os clados de *M. americana*. Outro achado deste mesmo autor foi que animais pertencentes ao mesmo citótipo não formaram grupos monofiléticos sugerindo que as variações cromossômicas parecem ter ocorrido mais rápido do que as variações moleculares. Corroborando este achado, Duarte et al. (2008) sugere a existência de um complexo de espécies crípticas dentro de *M.*

americana. Duas fêmeas da espécie morfologicamente semelhantes e cariotipicamente distintas caíram em duas linhagens divergentes na árvore construída a partir da análise de DNA mitocondrial.

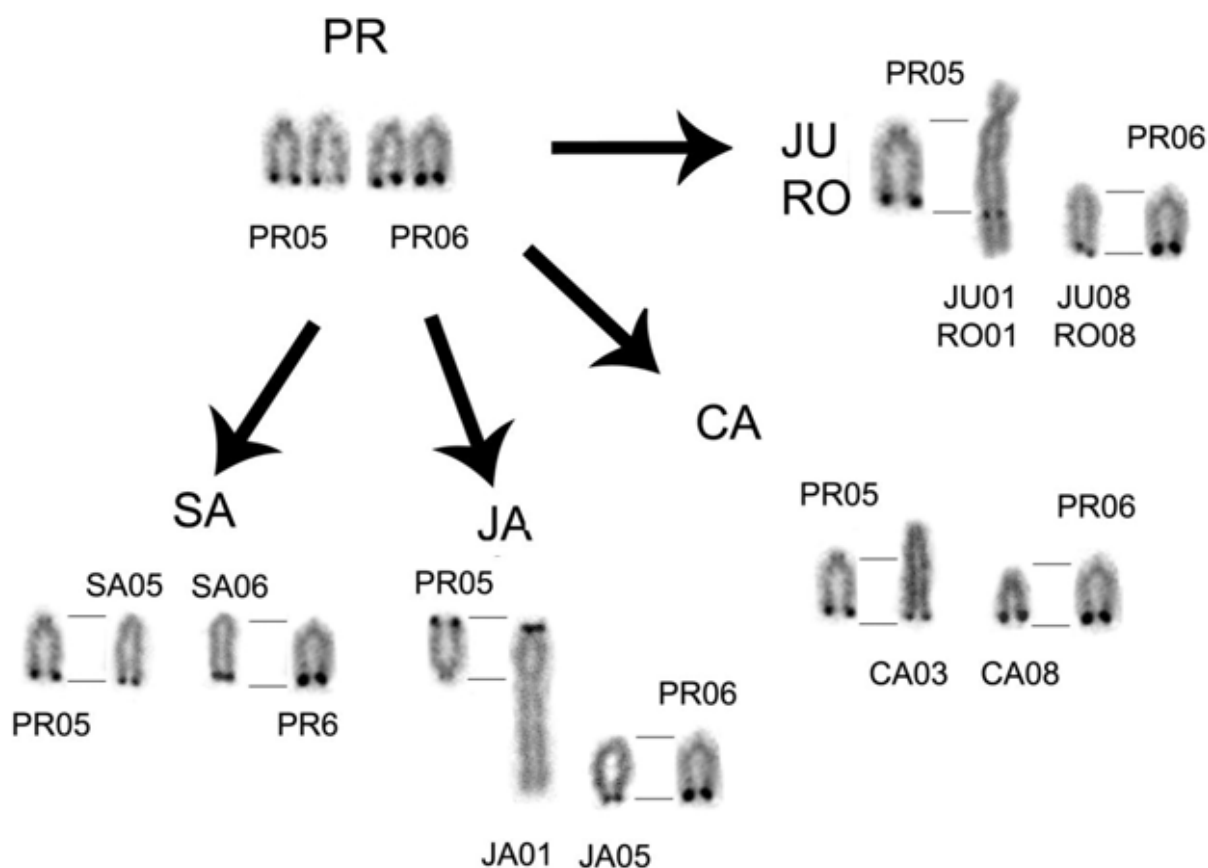


Figura 10. Comparação entre os citótipos dos pares portadores da Região Organizadora do Nucléolo (RON), evidenciando diferentes rearranjos responsáveis pela reorganização destes cromossomos, onde PR=Paraná, SA=Santarém JA=Jari, CA=Carajás, JU=Juína, RO=Rondônia.

Segundo Sarria-Perea (2004) o ancestral da espécie que entrou no continente sul-americano possuía provavelmente um cariótipo próximo do citótipo Paraná ($2n=52/53$; $NF=56$), porém formado apenas por cromossomos do tipo acrocêntrico e que já apresentava o sistema sexual do tipo $XX/XY1Y2$. A partir da colonização do continente, as linhagens podem ter se diferenciado em decorrência do isolamento

geográfico e da ação de diferentes pressões seletivas durante um período em que condições climáticas adversas fragmentaram a floresta Amazônica. As mudanças adaptativas rápidas em resposta às pressões da seleção diversificadora nos diferentes ambientes não diferenciaram fenotipicamente os animais das diferentes regiões brasileiras. Entretanto, os cromossomos dos animais amostrados no lado ocidental da Amazônia se rearranjaram até alcançarem os citótipos Rondônia e Juína enquanto que, de modo independente, os da parte ocidental e do sul do país chegaram primeiramente nos citótipo Paraná e deste, diferenciaram-se nos citótipos Carajás, Santarém e Jarí.

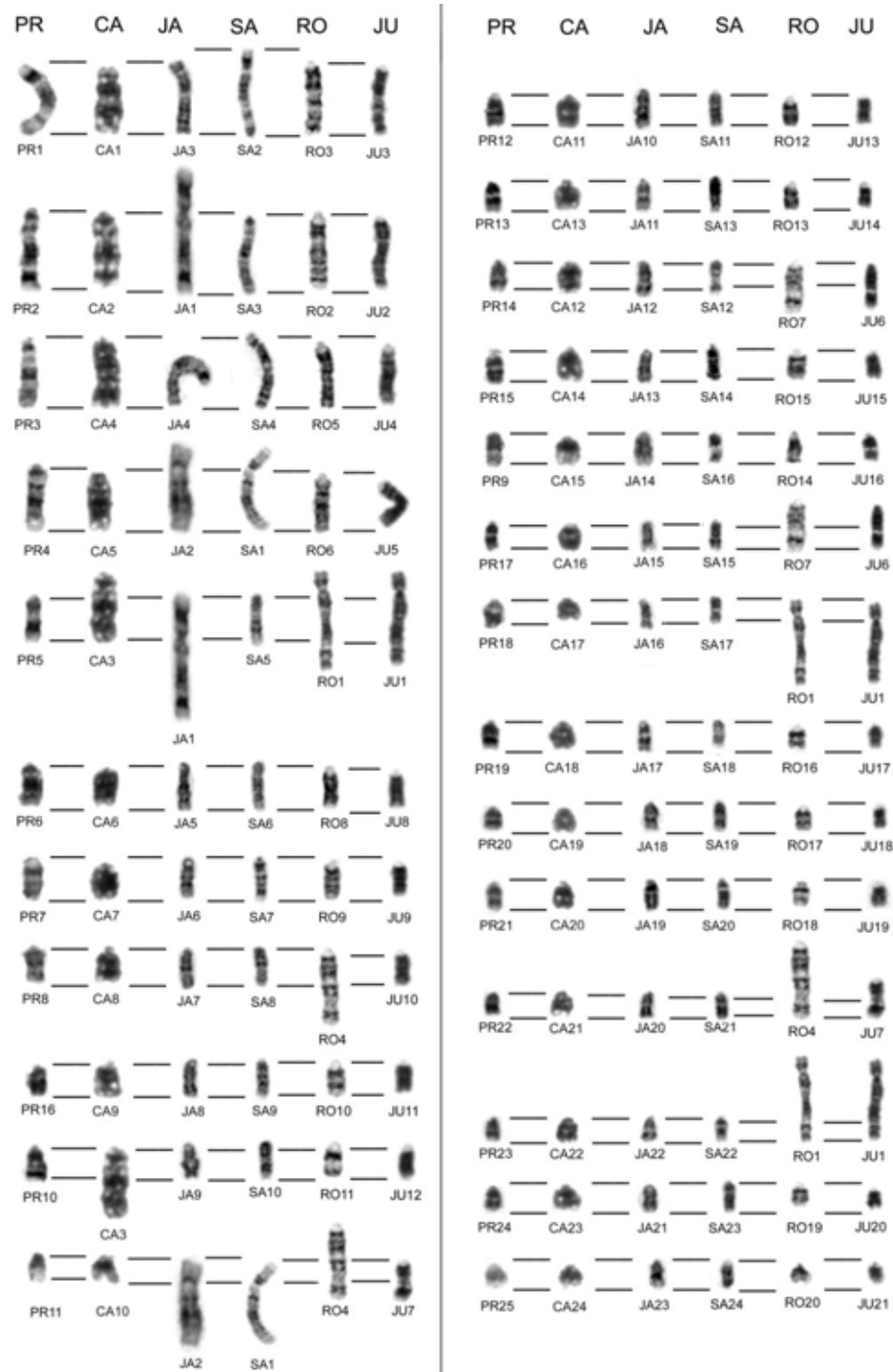


Figura 10. Comparação entre os seis citótipos analisados (PR=Paraná; CA=Carajás; JA=Jarí; SA=Santarém; RO=Rondônia; JU=Juína) e identificação das correspondências cromossômicas sob bandamento G.

CONCLUSÕES

A comparação entre os cariótipos e a identificação dos rearranjos que geraram as principais diferenças entre os citótipos mostraram que as fusões em tandem e cêntricas são as alterações cromossômicas responsáveis pela reorganização cromossômica e diferenciação das variantes de *M. americana*.

A distinção entre duas linhagens de veado-mateiro no Brasil tornou-se clara a partir das análises de bandamento cromossômico, corroborando as informações já existentes. Uma destas linhagens originou o cariótipo do citótipo Paraná e com a fixação de novos rearranjos a partir deste surgiram os citótipos Carajás, Santarém e Jarí. A outra linhagem, com menor número diplóide e fundamental devido a um maior número de fusões em tandem, deu origem ao citótipo Juína e Rondônia.

Entretanto, para que se possa afirmar com certeza que existem pelo menos duas espécies distintas dentro do que hoje chamamos de *M. americana* são necessárias informações sobre qual nível de diferenciação cromossômica poderia gerar uma barreira reprodutiva real. Para isso, além dos trabalhos com citogenética e genética molecular, estudos como qualidade de sêmen, análise meiótica, perfil hormonal entre outros, realizados com híbridos produzidos entre linhagens cromossômicas distintas poderão contribuir para a elucidação da complicada sistemática do grupo.

REFERÊNCIAS

- CARNELOSSI, E. A. G. **Diferenças moleculares entre citótipos de Mazama americana (Artiodactyla: Cervidae)** 2008. 67 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia – Genética e Melhoramento Animal) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal. 2008.
- DOBIGNY, G.; BAYLAC, M.; DENYS, C. Geometric morphometrics, neural networks and diagnosis of sibling *Taterillus* (Rodentia, Gerbillinae). **Biological Journal of the**

Linnean Society, Oxford, v. 77, n.3, p.319–327, 2002.

DUARTE, J. M. B.; GONZALEZ, S.; MALDONADO, J. E. The surprising evolutionary history of South American deer. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, Orlando, v.49, p.17-22, 2008.

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

DUARTE, J. M. B. Análise citotaxonômica do veado mateiro no Brasil (*Mazama americana*). In: _____. **Análise citogenética e taxonômica do gênero *Mazama* (Cervidae; Artiodactyla) no Brasil**. 1998. Não paginado. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 1998.

FAGUNDES, V.; CAMACHO, J. P. M.; YONENAGA-YASSUDA, Y. Are the dot-like chromosomes in *Trinomys iheringi* (Rodentia, Echimyidae) B chromosomes? **Cytogenetic and Genome Research**, Basel, v.106, n.2-4, p.159-164, 2004.

GUSTAVSSON, I.; SUNDT, C. O. Three polymorphic chromosome systems of centric fusion type in a population of Manchurian sika deer (*Cervus nippon hortulorum* Swinhoe) **Chromosoma**, Berlin, v. 28, p. 245-254, 1969.

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

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

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

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

Estadual Paulista, Jaboticabal, 2004.

SANTANI, A.; RAUDSEPP, T.; CHOWDHARY, B. P. Interstitial telomeric sites and NORs in Hartmann's zebra (*Equus zebra hartmannae*) chromosomes. **Chromosome Research**, Oxford, v.10, p.527-534, 2002.

SEABRIGHT, M. A rapid banding technique for human chromosomes. **The Lancet**, London, v.1, p.971-972, 1971.

SEUÁNEZ, H. N.; BONVICINO, C. R.; MOREIRA, M. A. The primates of the Neotropics: genomes and chromosomes. **Cytogenetic and Genome Research**, Basel, v.108, n.1–3, p.38–46, 2005.

SUMNER, A. T. A simple technique of demonstrating centromeric heterochromatin. **Experimental Cell Research**, New York, v.75, p.304-306, 1972.

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

CAPÍTULO 3 – ANÁLISE MEIÓTICA DE UM MACHO DE VEADO-MATEIRO (*Mazama americana* – MAMMALIA; CERVIDAE) PORTADOR DE UMA FUSÃO CÊNTRICA EM HETEROZIGOSE, CROMOSSOMOS B E SISTEMA SEXUAL MÚLTIPLO

RESUMO

Os cervídeos do gênero *Mazama* apresentam ampla variabilidade cromossômica intra e interespecífica devido à ocorrência de rearranjos e cromossomos B. Animais portadores de aneuploidias e rearranjos estruturais geralmente mostram pareamentos cromossômicos anômalos, que resultam em falhas na gametogênese e produção de gametas desbalanceados. Utilizamos análises de complexo sinaptonêmico para estudar do pareamento cromossômico de um macho de *Mazama americana* portador de uma translocação Robertsoniana em heterozigose e cromossomos B, além de um sistema sexual múltiplo (XY1Y2). O complexo sinaptonêmico dos espermátócitos mostrou pareamento cromossômico normal para todos os cromossomos. O par sexual e o rearranjado apresentaram configuração de trivalente na meiose, completamente pareado, exceto na região dos centrômeros. As eletromicrografias mostraram homologia entre os cromossomos B, mas também univalentes não pareados, confirmando o comportamento anômalo e a segregação não mendeliana dos mesmos. Desta maneira, a análise de complexo sinaptonêmico apresentou-se como uma ferramenta importante, já que a variação cromossômica intraespecífica, encontrada na maioria das espécies do gênero *Mazama*, pode ser responsável por falhas na espermatogênese em situações específicas.

Palavras-chave: meiose, complexo sinaptonêmico, rearranjos, cromossomos sexuais, cromossomos B.

INTRODUÇÃO

Para algumas espécies de cervídeos, o estudo dos cromossomos pode ser uma importante ferramenta para a taxonomia, manejo e conservação, pois a variação cariotípica intraespecífica impõe um limite na estabilidade meiótica na produção dos gametas. Dependendo da diferença estrutural ou numérica entre o cariótipo de dois indivíduos, os descendentes podem ser inférteis. Isto se torna especialmente importante para os cervídeos do gênero *Mazama* que são muito parecidos morfológicamente, mas têm diferenças cromossômicas devido a polimorfismos inter e intraespecíficos (DUARTE; JORGE, 1996; DUARTE; JORGE, 2003; ABRIL; DUARTE, 2008; DUARTE et al. 2008). Uma das possíveis explicações para a freqüente ocorrência destes polimorfismos é a fragilidade cromossômica encontrada nos *Mazama* (VARGAS-MUNAR, 2003).

Durante a prófase I da meiose, os cromossomos homólogos interagem uns com os outros formando bivalentes. No zigóteno, a estrutura do complexo sinaptonêmico começa a ser formada, fornecendo a base para a correta disjunção dos cromossomos na meiose e para a recombinação gênica entre os cromossomos homólogos (BOGDANOV, 2003).

Pareamentos anômalos em animais portadores de rearranjos podem resultar em falhas na espermatogênese, levando à produção de gametas desbalanceados (SWITONSKI; STRANZINGER, 1998). No paquíteno e diplóteno, a principal diferença entre homozigotos e heterozigotos Robertsonianos é a presença de um trivalente autossômico nos heterozigotos (WALLACE et al., 1992). A configuração *cis* do trivalente, no paquíteno, pode ser um pré-requisito para a correta disjunção dos cromossomos e para a formação de gametas balanceados, enquanto que a alta incidência da configuração *trans* pode ser relacionada com a alta taxa de não disjunção meiótica (DAVISSON et al., 1981; PATHAK; LIN, 1981; LOGUE; HARVEY, 1978).

Além dos rearranjos, os cromossomos B também apresentam um comportamento meiótico particular. Eles são chamados também de cromossomos acessórios ou supranumerários. Dispensáveis para os indivíduos, eles apresentam

segregação não mendeliana e alto grau de polimorfismo. Aparentemente, existe uma variação numérica inter e intraindividual devido ao comportamento irregular dos cromossomos B, tanto na meiose quanto na mitose (JONES; REES, 1982).

Análises de complexo sinaptonêmico de animais portadores destes cromossomos mostraram que o comportamento sináptico dos cromossomos B depende do número destes cromossomos nos espermatócitos. Univalentes, bivalentes e trivalentes e/ou bivalente+univalente já foram observados quando um, dois ou três cromossomos B, respectivamente, estavam presentes na célula. (SWITONSKI et al., 1987a; SHI et al., 1988).

Estudos citogenéticos de *Mazama americana* de várias regiões do Brasil mostram que existem muitas variantes cariotípicas com diferentes distribuições geográficas: citótipo Paraná ($2n=52♀/53♂+3-4B$ e $NF=56$); citótipo Carajás ($2n=50♀/51♂+3-4B$ e $NF=54$); citótipo Rondônia ($2n=42♀/43♂+3-5B$ e $NF=46$); e citótipo Acre ($2n=46♀/47♂+3-4B$ e $NF=56$) (DUARTE, 1998; SARRIA-PEREA, 2004).

Aqui, nós investigamos o processo de sinapse cromossômica de um macho de *Mazama americana* portador de uma translocação Robertsoniana em heterozigose, cromossomos B e sistema sexual múltiplo (XY1Y2).

MATERIAL E MÉTODOS

Um macho adulto de *Mazama americana* (T269), originário de Buritis-RO, mantido em cativeiro no Núcleo de Pesquisa e Conservação de Cervídeos (NUPECCE), Jaboticabal, SP, Brasil foi utilizado como modelo experimental para este trabalho. Preparações cromossômicas foram realizadas a partir de culturas de fibroblastos e coradas seguindo o método de Verma e Babu (1995) e o padrão de bandamento G foi obtido de acordo com Seabright (1971).

A análise do complexo sinaptonêmico foi feita como descrito por Wise e Nail (1987), com modificações. A amostra testicular foi obtido por biópsia e mantido em solução salina de Hanks'. Para a preparação da suspensão celular, o material foi

divulsionado com lâmina de bisturi, acrescentando-se algumas gotas de solução salina de Hanks'. A suspensão celular foi transferida para um tubo de centrífuga, previamente acondicionado em gelo, centrifugada por 13 minutos e o sedimento diluído até a concentração desejada. Uma gota da suspensão e duas gotas de detergente TritonX100 (0,03%, pH=7,5) foram colocadas sobre uma lâmina previamente plastificada. As células foram observadas ao microscópio por cerca de 13 minutos (quando as membranas plasmáticas começam a se romper) e 6 gotas de fixador (paraformaldeído 0,4%) foram adicionadas à lâmina. O material foi então homogeneizado, agitando-se a lâmina com cuidado que foi então colocada para secar por 16 horas a 45° C. Depois de seca, a lâmina foi lavada em solução de Photo-Flo (KODAK) 0,4% durante 1 minuto, enxaguada em água destilada, colocada para secar a temperatura ambiente e depois corada com nitrato de prata. Após a análise em microscópio de luz, as células meióticas, aderidas no plástico, foram transferidas para grades de cobre de 50 mesh e as análises feitas em microscópio eletrônico de transmissão a 80kV com um instrumento Phillips EM301.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O animal analisado (T269) da espécie *Mazama americana* (2n=42; NF=46) apresentou um rearranjo do tipo fusão cêntrica em heterozigose entre os cromossomos 7 e 20, além de uma variação no número de cromossomos B (3 a 5) e uma fusão X autossômica, gerando um sistema sexual múltiplo (XY1Y2) (Figura 01). A alta incidência de rearranjos cromossômicos em *Mazama americana* e em outras espécies do gênero sempre incitou ao questionamento se estas variações poderiam causar isolamento reprodutivo por falhas no pareamento meiótico (DUARTE; JORGE, 1996; DUARTE; JORGE, 2003; ABRIL; DUARTE, 2008; DUARTE et al. 2008).

A análise meiótica mostrou pareamento completo na forma de bivalentes dos cromossomos autossomos (Figura 02a). Os cromossomos envolvidos no rearranjo do tipo fusão cêntrica apresentaram uma configuração de trivalente durante o estágio de

paquíteno, havendo pareamento não homólogo na região do centrômero entre os cromossomos não rearranjados em algumas células (Figuras 02b e 02c) e não pareamento em outras.

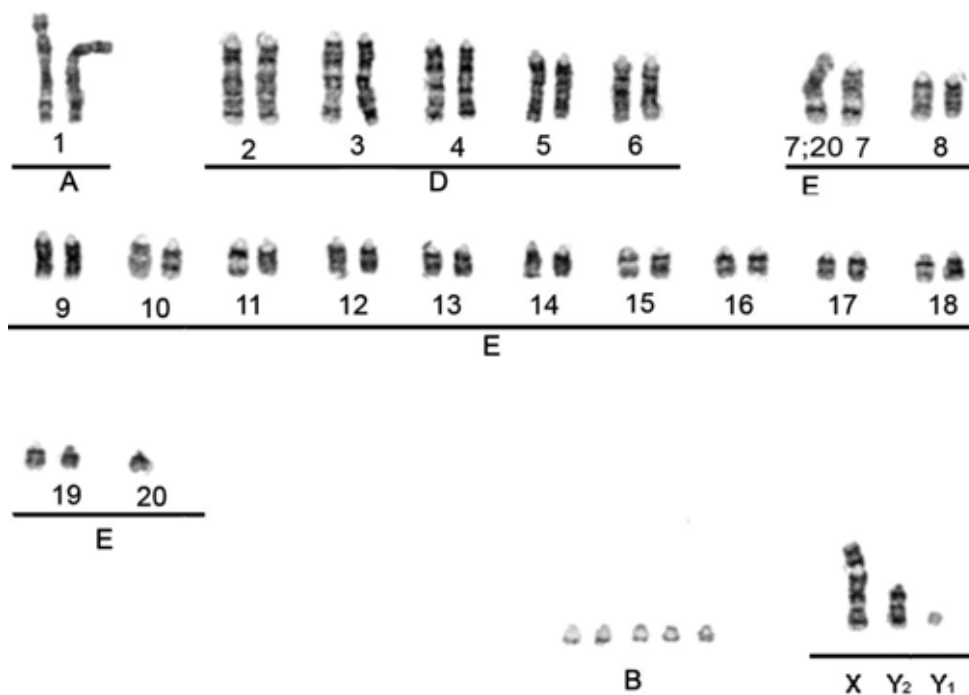


Figura 01 – Cariótipo sob bandamento G do macho de *Mazama americana* (T269; 2n=42 + 3 a 5 B; NF=46).

O pareamento do rearranjo do tipo fusão cêntrica entre os cromossomos 7 e 20, encontrado no exemplar desta espécie, indica que existem poucas chances de formação de gametas desbalanceados, visto que os cromossomos apresentaram-se completamente pareados, exceto na região centromérica. Switonski et al. (1987a) sugerem que a ausência de pareamento na região centromérica dos cromossomos rearranjados pode indicar que o pareamento se inicia na região do telômero e que a região do centrômero é o último segmento a se parear. A ausência de pareamento entre as regiões proximais dos cromossomos 7 e 20 e o cromossomo rearranjado 7;20 pode ser devido a isto ou também à falta de homologia desta região, visto que pode ter

ocorrido a perda da região do centrômero no cromossomo translocado.

Os cromossomos B apareceram na forma de bivalentes (Figura 02f) e univalentes (Figura 02g). Em algumas células analisadas neste trabalho, a presença de bivalentes de cromossomos B foi observada, enquanto que em outras se encontrou somente um univalente, confirmando o comportamento anômalo e a segregação não mendeliana que estes apresentam. Estes resultados corroboram os trabalhos encontrados na literatura para outras espécies nas quais foram observados univalentes não pareados e bivalentes indicando que há homologia entre eles (SWITONSKI et al., 1987b).

O sistema sexual múltiplo XY1Y2 já foi descrito para cervídeos por Pathak e Lin (1981) em *Muntiacus muntjak*. Neitzel (1987) sugere uma possível ocorrência desse tipo de rearranjo em *Mazama americana* devido ao comportamento de replicação tardia dos cromossomos X, observado em uma fêmea originária do Paraguai. A análise de bandamento cromossômico realizado por Sarria-Perea (2004) descreveu o sistema sexual múltiplo (XY1Y2) na espécie *M. americana* nos 3 citótipos analisados (Paraná, Rondônia e Carajás). O presente trabalho vai além, comprovando a existência dessa fusão X autossômica tanto por bandamento cromossômico como por análise de pareamento meiótico. Na avaliação meiótica foi identificada uma configuração trivalente no pareamento destes cromossomos devido à translocação X-autossomo ocorrida no ancestral da espécie. Como esperado, o Y1, original da espécie, pareou-se parcialmente ao X somente na região pseudo-autossômica, enquanto que o Y2, autossomo ancestral, se associou ao terço distal do braço longo do X (Figura 02d e 02e). Este pareamento sugere que, ao se separarem do X na anáfase I, o Y1 e o Y2 migram juntos para a mesma célula.

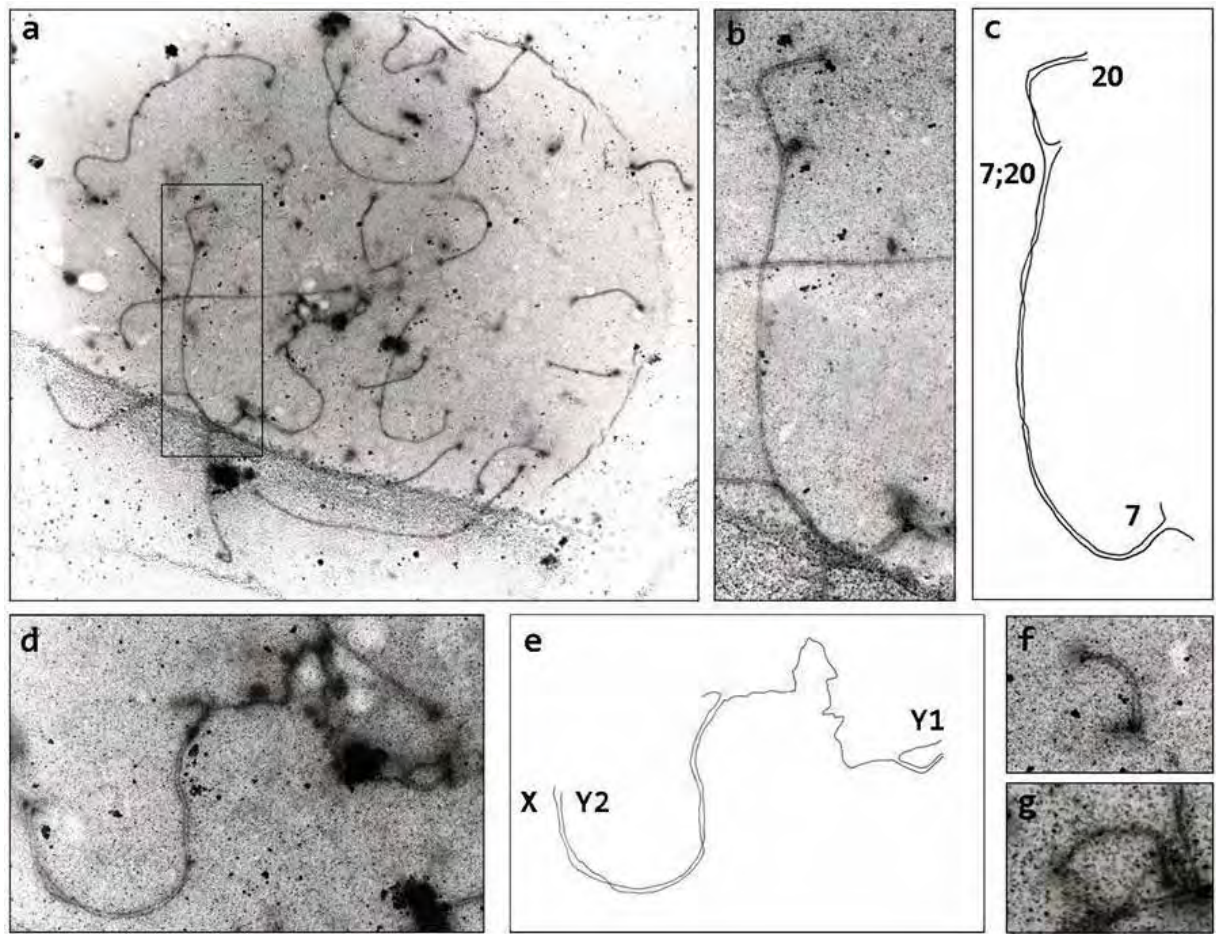


Figura 02 - (a) Eletromicrografia do complexo sinaptonêmico do animal T269 (*M. americana*) com 18 bivalentes autossômicos, 1 trivalente do rearranjo autossômico, 1 trivalente sexual (XY1Y2) e 2 bivalentes de cromossomos B, todos pareados corretamente. (b) Aumento do retângulo delineado em (a) evidenciando o trivalente formado pelo rearranjo entre os cromossomos 7 e 20 e o pareamento não homólogo na região do centrômero entre os cromossomos não rearranjados. (c) Desenho esquemático do pareamento cromossômico visto em (b). (d) Eletromicrografia dos cromossomos sexuais (XY1Y2) mostrando o pareamento parcial do cromossomo Y1 (original) à região pseudo-autossômica do X e a completa associação do Y2 (autossomo ancestral) ao terço distal do braço longo do X em uma configuração *cis*. A região não pareada do X mostrou-se mais corada do que a pareada aos Y1 e Y2 em algumas células do que em outras. (e) Desenho esquemático do pareamento cromossômico visto em (d). (f) Bivalente de cromossomos B completamente pareado e (g) um univalente foram encontrados.

CONCLUSÕES

A análise de complexo sinaptonêmico se mostra muito importante, já que a variação cromossômica intraespecífica devido a rearranjos, encontrada na maioria das espécies de *Mazama*, pode ser responsável por falhas na gametogênese em situações específicas, levando espécies ou populações a declínios importantes (ABRIL; DUARTE, 2008). Portanto, o estudo do pareamento meiótico dos animais cativos tem grande importância, uma vez que mostra se há chances de diminuição de fertilidade quando há acúmulo de rearranjos em heterozigose, dando subsídios para trabalhos de conservação *in situ*.

No caso de *M. americana*, a tendência à fragilidade cromossômica (Vargas-MUNAR, 2003) associada ao isolamento em refúgios (DUARTE et al., 2008) pode explicar a existência de inúmeras variantes cariotípicas no Brasil. Essas variantes poderiam ser espécies válidas, uma vez que fosse comprovada a esterilidade do híbrido entre elas e a análise do complexo sinaptonêmico pode ser uma das ferramentas utilizadas para a resolução desses problemas. Nesse contexto, a análise do animal aqui analisado, que é portador de uma fusão cêntrica foi importante, pois sugeriu que este rearranjo parece ser bem suportado pelos animais, e provavelmente não afeta a fertilidade. Quando for possível definir o nível de variação cromossômica que afeta o pareamento meiótico, estaremos próximos de definir quantas espécies de *Mazama* temos no Brasil.

REFERÊNCIAS

- ABRIL, V. V.; DUARTE, J. M. B. Chromosome polymorphism in the Brazilian dwarf brocket deer, *Mazama nana* (Mammalia, Cervidae). **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v.3, p.53-57, 2008.
- BOGDANOV, Y. Variation and evolution of meiosis. **Russian Journal of Genetics**, New York, v.39, p.363-381, 2003.
- DAVISSON, M. T.; POORMAN, P. A.; RODERICK, T. H.; MOSES, M. J. A pericentric

inversion in the mouse. **Cytogenetics and Cell Genetics**, Basel, v.30, p.70-76, 1981.

DUARTE, J. M. B., JORGE, W. Chromosomal polymorphism in several populations of deer (genus *Mazama*) from Brazil. **Archivos de Zootecnia**, Cordoba, v.45, p.281-287. 1996.

DUARTE, J. M. B. (1998) Análise citotaxonômica do veado mateiro no Brasil (*Mazama americana*). In: _____. **Análise citogenética e taxonômica do gênero *Mazama* (Cervidae; Artiodactyla) no Brasil**. 1998. Não paginado. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 1998.

DUARTE, J. M. B.; JORGE, W. Morphologic and cytogenetic description of the small red brocket (*Mazama bororo* Duarte, 1996) in Brazil. **Mammalia**, Paris, v.67, n.3, p.403-410, 2003.

DUARTE, J. M. B.; GONZALEZ, S.; MALDONADO, J. E. The surprising evolutionary history of South American deer. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, Orlando, v.49, p.17-22, 2008.

JONES, R. N.; REES, H. B. **B Chromosomes**. New York: Academic Press. 1982, 266p.

LIN, C. C.; SASI, R.; FAN, Y. S.; CHEN, Z. Q. New evidence for tandem chromosome fusions in the karyotypic evolution of Asian muntjacs. **Chromosoma**, Berlin, v.101, p.19-24, 1991.

LOGUE, D. N.; HARVEY, M. J. A. Meioses and spermatogenesis in bulls heterozygous for a presumptive 1/29 Robertsonian translocation. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v.54, p.159-165, 1978.

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

PATHAK, S.; LIN, C. C. Synaptonemal complex of the sex-autosome trivalent in a male Indian muntjac. **Chromosoma**, Berlin, v.82, p.367-376, 1981.

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

Estadual Paulista, Jaboticabal, 2004.

SEABRIGHT, M. A rapid banding technique for human chromosomes. **The Lancet**, London, v.1, p.971-972, 1971.

SHI, L.; TANG, L.; MA, K.; MA, C. Synaptonemal complex formation among supernumerary B chromosomes: an electron microscopy study on spermatocytes of chinese raccoon dog. **Chromosoma**, Berlin, v.97, p.178-183, 1988.

SWITONSKI, M.; STRANZIN GER, G. Studies of Synaptonemal Complexes in Farm Mammals – A Review. **Journal of Heredity**, Washington, v.89, p. 473-480, 1998.

SWITONSKI, M.; GUSTAVSSON, I.; PLOEN, L. The nature of the 1;29 translocation in cattle as revealed by synaptonemal complex analysis using electron microscopy. **Cytogenetics and Cell Genetics**, Basel, v.44, p.103-111, 1987a.

SWITONSKI, M.; GUSTAVSSON, I.; HOJER, K.; PLOEN, L. Synaptonemal complex analysis of the B-chromosomes in spermatocytes of the silver fox (*Vulpes fulvus* Desm.). **Cytogenetics and Cell Genetics**, Basel, v.45, p.84-92, 1987b

VARGAS-MUNAR, D. S. F. **Relação entre fragilidade cromossômica e trocas entre cromátides irmãs com a variabilidade cariotípica de cervídeos brasileiros**. Jaboticabal, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Dissertação de Mestrado, 35pp. 2003.

VERMA, R. S.; BABU, A. **Human chromosomes: principles and techniques**. 2.ed. New York: McGraw Hill, 1995, p.419.

WALLACE, B. M. N.; SEARLE, J. B.; EVERETT, C. A. Male meiosis and gametogenesis in wild house mice (*Mus musculus domesticus*) from a chromosome hybrid zone; a comparison between “simple” Robertsonian heterozygotes and homozygotes. **Cytogenetics and Cell Genetics**, Basel, v.61, p.211-220, 1992.

WISE, D.; NAIL, B. A technique for analysing fish meiotic chromosomes with light and electron microscopies. **Copeia**, Lawrence, p.499-503, 1987.

CAPÍTULO 4 - LOCALIZAÇÃO DA HETEROCROMATINA E DAS SEQUÊNCIAS TELOMÉRICAS EM *Mazama americana* (MAMMALIA; CERVIDAE)

RESUMO

A distribuição cromossômica da heterocromatina constitutiva e de seqüências teloméricas (TTAGGG)_n em *Mazama americana* foi estudada neste trabalho através do bandamento C e da hibridização *in situ* fluorescente, respectivamente. Blocos de heterocromatina pericentromérica foram encontrados em todos os cromossomos enquanto que bandas intersticiais foram detectadas apenas nos grandes cromossomos dos grupos A e D. Os sinais teloméricos foram detectados em todos os cromossomos: autossomos, sexuais e cromossomos B. Além das seqüências nas extremidades de todos os cromossomos, marcações intersticiais foram encontradas principalmente nos maiores autossomos dos grupos A e D, corroborando os dados que mostram que estes se originaram através de eventos de fusão cêntrica e em tandem. As diferenças entre os quatro citótipos analisados por bandamento C e localização dos sinais teloméricos corroboram as informações sobre a origem dos maiores cromossomos principalmente por meio de fusões em tandem.

Palavras-chave: telômero, heterocromatina, fusão em tandem, hibridização *in situ*.

INTRODUÇÃO

Entre os diferentes compartimentos genômicos, a heterocromatina constitutiva, incluindo o DNA satélite e as outras seqüências repetitivas tem se mostrado um marcador confiável para estudos evolutivos (SAFFERY et al., 1999; MELES et al., 2008). Além disso, alguns autores indicam que a presença de heterocromatina constitutiva pode facilitar a ocorrência de rearranjos (YUNIS; YASMINEH, 1971).

Os telômeros são constituídos por seqüências repetidas em tandem (TTAGGG)_n

especializadas e com diversas funções, como proteção das extremidades cromossômicas, replicação, organização nuclear, idade celular, progressão de tumores e regulação gênica (BOLZÁN; BIANCHI, 2006). Os telômeros foram localizados principalmente nas extremidades cromossômicas em todos os vertebrados estudados, mas também em outras regiões como as pericentroméricas que ficaram conhecidas como sítios teloméricos intersticiais (STIs) (MEYNE et al., 1990; RUIZ-HERRERA et al., 2008). Os STIs localizados em regiões heterocromáticas (Het-STIs) são considerados como remanescentes de rearranjos ocorridos no ancestral (LEE et al., 1993).

Estudos de comparação citogenética sugerem que os cariótipos dos cervídeos derivaram de um ancestral que possuía todos os cromossomos acrocêntricos e número diplóide e fundamental iguais a 70. A reorganização dos cromossomos dos cervídeos a partir deste ancestral ocorreu principalmente através de fusões cêntricas e em tandem, reduzindo o número diplóide até chegar aos cariótipos atuais (NEITZEL, 1987; FONTANA; RUBINI, 1990).

Entre os cervídeos, o gênero *Mazama* é um dos que apresentam taxas altas de evolução cariotípica e isso pode ser explicado pela fragilidade cromossômica encontrada nestes animais (DUARTE; JORGE, 1996; VARGAS-MUNAR, 2003).

Informações sobre o padrão de evolução da espécie *M. americana* tem gerado muitas perguntas. Duarte (1998) encontrou expressiva variação tanto no número diplóide (de 42 a 53) quanto no número fundamental (de 48 a 57) e cariótipos característicos de algumas regiões brasileiras que foram classificados em sete citótipos (Rio Negro, Manaus, Jarí, Acre, Rondônia, Carajás e Paraná). Sarria-Perea (2004) comparou cromossomicamente três citótipos e identificou uma fusão em tandem diferenciando Paraná de Carajás, considerou Rondônia evolutivamente mais distante de Paraná e Carajás por diferir em quatro fusões em tandem e uma translocação Robertsoniana. Ao estudar molecularmente a espécie, Carnelossi (2008) detectou duas linhagens evolutivas, uma composta pelos citótipos Rondônia e Juína e outra pelos citótipos Paraná e Carajás afirmando a existência de um grau de diferenciação genética dentro da espécie maior do que entre diferentes espécies do gênero *Mazama*, o que reforça a hipótese destes dois grupos serem espécies distintas.

Neste trabalho comparou-se a distribuição cromossômica da heterocromatina constitutiva (banda C) com a distribuição de seqüências teloméricas buscando um maior entendimento do padrão de evolução cariotípica e diferenciação entre os citótipos da espécie *M. americana*.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais de quatro citótipos da espécie foram avaliados: Paraná, Santarém, Jarí e Rondônia (Tabela 01). Para isto, as preparações cromossômicas foram obtidas de culturas de fibroblastos feitas a partir de fragmentos de pele segundo Verma e Babu (1995), submetidas ao bandamento C (SUMNER, 1973) e hibridização *in situ* (IJDO et al., 1991).

Tabela 01. Informações sobre os animais da espécie *Mazama americana* avaliados neste trabalho, onde M=macho; RO=Rondônia; JA=Jarí; PR=Paraná; SA=Santarém.

Nº	Sexo	Origem de cativeiro	Origem de natureza	Citótipo
T205	M	Criadero Itaipu/PR	Nascido em cativeiro	PR
T259	M	Criadouro Santarém/PA	Desconhecida	SA
T258	M	Criadouro Santarém/PA	Desconhecida	JA
T021	M	Zôo de Ariquemes/RO	Desconhecida	RO

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

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

As análises e imagens foram feitas em microscópio de fluorescência Zeiss Axiophot II equipado com filtro para FITC e uma câmera digital Olympus Camedia C5060. As imagens digitais foram editadas com o auxílio do programa Adobe Photoshop CS2.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O animal do citótipo Paraná analisado apresentou $2n=53$ e $NF=56$, além de 1 a 5 cromossomos B (Figura 01a). O bandamento C mostra grandes blocos de heterocromatina pericentromérica em todos os cromossomos além de bandas intersticiais nos cromossomos dos grupos A e D.

Os representantes dos citótipos Santarém ($2n=51$ e $NF=56$; Figura 01b) e Jarí ($2n=49$ e $NF=56$; Figura 01c) mantiveram o padrão das marcações heterocromáticas do Paraná, visto que os três se originaram da mesma linhagem a partir das fusões cêntricas entre os cromossomos do citótipo Paraná (PR4;PR11 em Santarém e entre PR4;PR11 e PR5;PR2 em Jarí) (Capítulo 2).

Já o animal do citótipo Rondônia ($2n=43$ e $NF=46$;) mostrou como diferença o cromossomo 1, com uma banda heterocromática no centrômero e outra intersticial na região de constrição secundária (Figura 01d). Este cromossomo teve sua origem a partir de uma fusão cêntrica entre os cromossomos PR18;PR5 e da fusão em tandem entre o cromossomos PR5 com o PR23, originando um submetacêntrico com uma constrição secundária no braço longo (Capítulo 2).

O cromossomo X de todos os citótipos apresentou heterocromatina centromérica e um bloco intersticial no terço proximal do braço longo, compatível com o ponto de fusão descrito entre o X e o acrocêntrico ancestral que originou o Y2 (SARRIA-PEREA 2004). Este bloco intersticial de heterocromatina parece ser padrão no cromossomo X de várias espécies de diferentes ordens de mamíferos que possuem translocação X-autossômica e os autores sugerem que a separação do compartimento autossômico do sexual seja crítica para a viabilidade deste rearranjo nos mamíferos (SHI et al., 1991;

YANG et al., 1997; DOBIGNY et al., 2004; DEUVE et al., 2006).

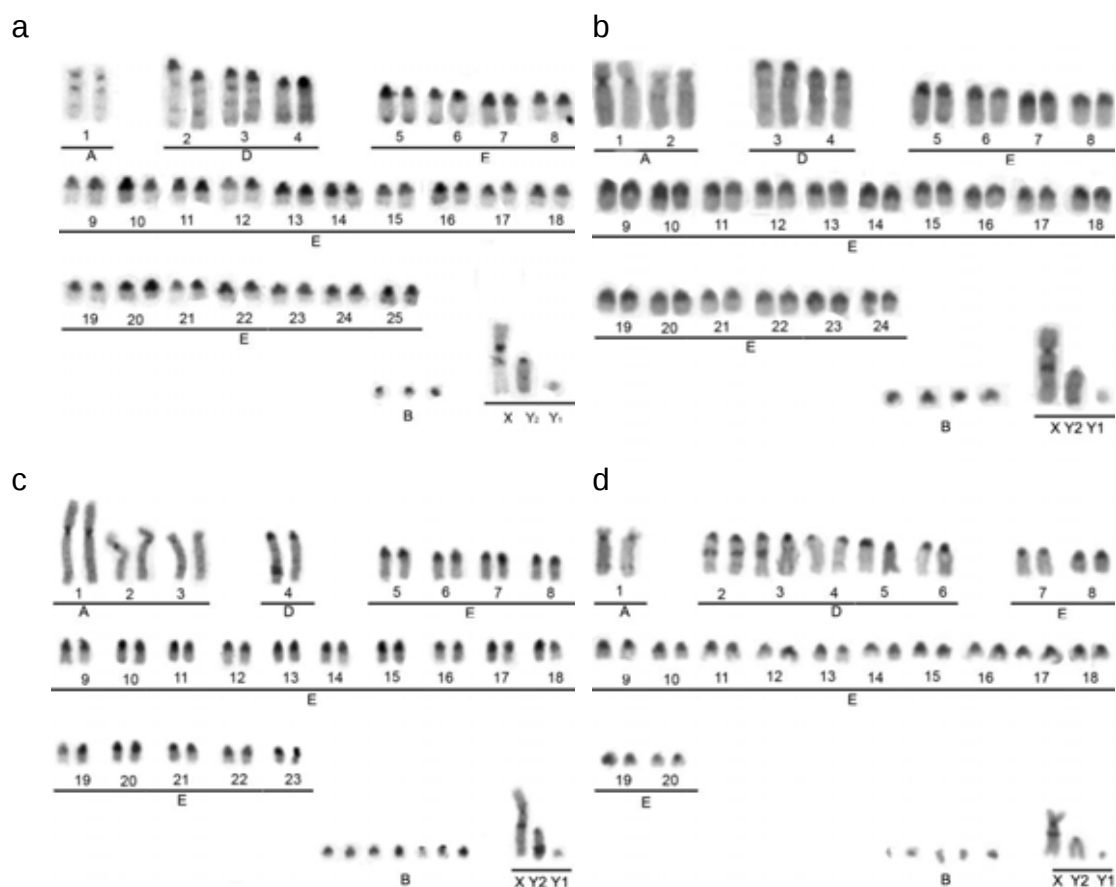


Figura 01. Cariótipos básicos dos quatro citótipos de *M. americana* analisados, sob bandamento C. (a) Citótipo Paraná (2n=52/53 e NF= 56); (b) Citótipo Santarém (2n=51/NF=56); (c) Citótipo Jarí (2n=49/NF=56); (d) Citótipo Rondônia (2n=43/NF=46).

Em algumas metáfases, o Y2 mostrou uma banda pouco nítida no meio do braço longo e uma característica região heterocromática centromérica menor do que dos outros cromossomos acrocêntricos do grupo E. O Y1 mostrou padrão eucromático em todos os animais analisados.

A hibridização fluorescente *in situ* telomérica corroborou as análises de bandamento cromossômico (Capítulo 2; SARRIA-PEREA, 2004,) mostrando que para o cariótipo ancestral de *M. americana* chegar até as variantes atuais, vários eventos de fusão cêntrica e, principalmente em tandem ocorreram. Embora as fusões em tandem sejam eventos evolutivos raros, elas foram responsáveis pela drástica redução do

número diplóide nos cervídeos do gênero *Muntjac* e como consequência muitas STIs foram localizadas em regiões não centroméricas (LEE et al., 1993; SCHERTHAN, 1990; HARTMANN; SCHERTHAN, 2004).

No citótipo Paraná (Figuras 02a e 03a) foram encontradas marcações teloméricas nas extremidades e no terço distal do braço longo do par 1, coincidindo com uma das bandas heterocromáticas intersticiais. Todos os cromossomos acrocêntricos mostraram sinais teloméricos nas extremidades cromossômicas, entretanto, os acrocêntricos do grupo D mostraram também marcações intersticiais (dois sinais no par 2 e 1 sinal nos pares 3 e 4).

Para o citótipo Santarém a hibridização telomérica mostrou que o par 1 apesar de ter se originado de uma fusão cêntrica não possui resquício de sequência telomérica na região do centrômero, mantendo entretanto, o sinal intersticial no braço q do acrocêntrico que lhe deu origem (Figuras 2b e 3b). Os demais cromossomos mostraram padrão similar ao do citótipo Paraná, com sinais nas extremidades e intersticiais para o grupo D.

O citótipo Jarí mostrou o mesmo padrão do citótipo Santarém, para os sinais teloméricos no grupo cromossômico A, ou seja, apesar de cromossomos acrocêntricos grandes (grupo D) aparecerem rearranjados com acrocêntricos pequenos (grupo E) não foi encontrado nenhuma marcação telomérica na região do centrômero (Figuras 2c e 3c).

O citótipo Rondônia, que possui menor número diplóide, mostrou número maior de STIs (Figuras 2d e 3d). O par 1 apresentou uma marcação nas extremidades e na região de constrição secundária. O maior número de cromossomos do grupo D neste citótipo é devido aos eventos de fusão em tandem entre os cromossomos do grupo E a partir do ancestral da espécie, o que fica evidente com as marcações intersticiais presentes nos cromossomos do grupo D.

Em todos os citótipos analisados, o cromossomo X mostrou além dos sinais teloméricos nas extremidades uma marca telomérica intersticial, que não coincidiu com o ponto de fusão em tandem do autossomo acrocêntrico com o X (Figura 04). O sinal da sequência telomérica apareceu na metade da região homóloga ao Y2 e foi

detectado também no Y2, único cromossomo do grupo E com STI.

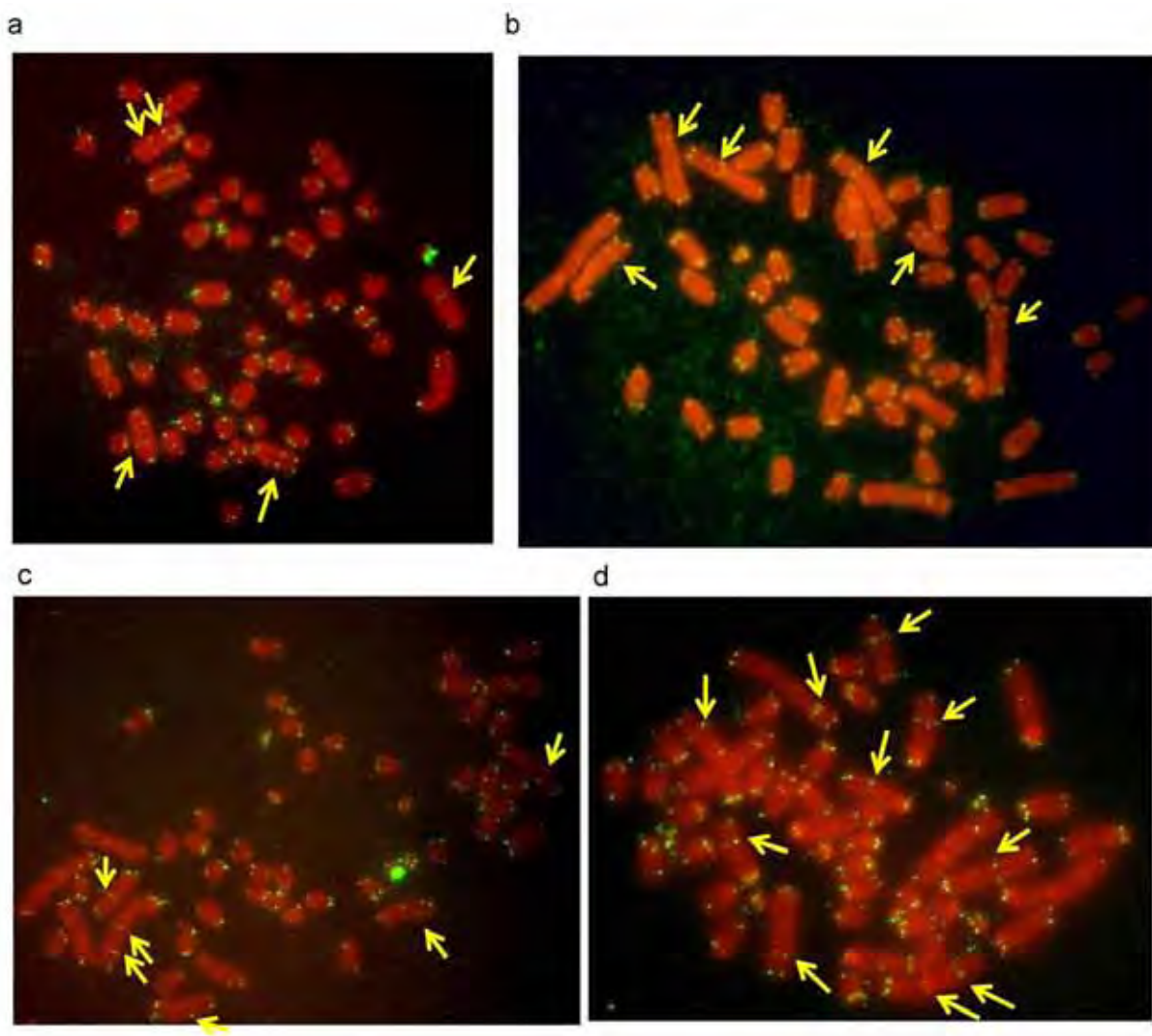


Figura 02. Hibridização *in situ* telomérica em *M. americana*. (a) Metáfase do citótipo Paraná (2n=53; NF= 56); (b) Metáfase do citótipo Santarém (2n=51/NF=56); (c) Metáfase do citótipo Jarí (2n=49/NF=56); (d) Metáfase do citótipo Rondônia (2n=43/NF=46). Setas amarelas apontam algumas dos sítios teloméricos intersticiais (STIs).

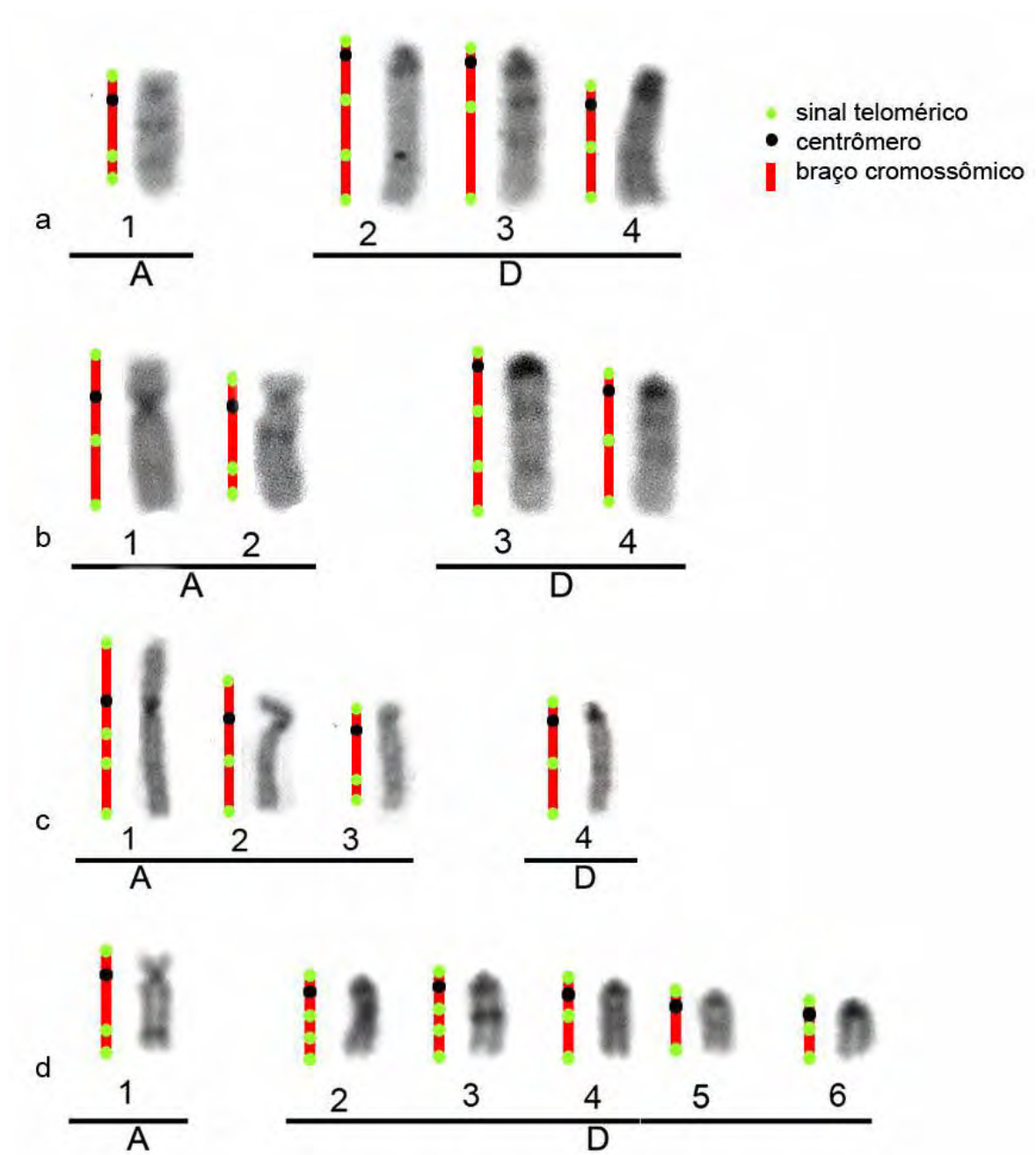


Figura 03. Localização das sequências teloméricas e bandamento C nos cromossomos dos grupos A e D. (a) Citótipo Paraná; (b) Citótipo Santarém; (c) Citótipo Jarí; (d) Citótipo Rondônia.

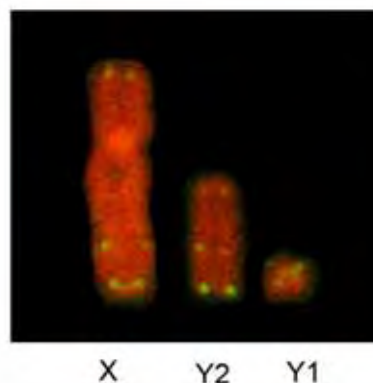


Figura 04. Identificação dos sítios teloméricos nos cromossomos sexuais de *Mazama americana* (XY1Y2).

Todos os cromossomos B dos citótipos de *M. americana* analisados aqui apresentaram sinais de hibridização com a sonda telomérica e um comportamento variável quanto ao tipo de cromatina, perante a técnica de bandamento C, alguns aparecendo totalmente ou parcialmente heterocromáticos e ainda outros, integralmente eucromatinizados. A capacidade heteropicnótica dos cromossomos B, característica resultante da sua evolução molecular pode ser a principal responsável por este comportamento variável (BOUGOURD; JONES, 1997). Outra possível explicação seria a de que estes cromossomos derivem de fragmentos cêntricos remanescentes da quebra associada às fusões cromossômicas ou, da amplificação ou fragmentação de regiões paracentroméricas dos cromossomos A (CAMACHO et al., 2000).

Alguns rearranjos deixam marcas que servem como “pistas” da provável origem dos cromossomos. As bandas heterocromáticas intersticiais e seqüências teloméricas intersticiais podem ser indicativos de eventos de fusão em tandem no ancestral (LIN et al. 1991, YANG et al. 1997). Entretanto, a perda de heterocromatina centromérica e telomérica nos pontos de fusão pode ser um fator importante na estabilização dos rearranjos, garantindo sua fixação no processo de especiação (ELDER, 1980), como ocorreu no camundongo doméstico, no qual os rearranjos Robertsonianos que ocorreram durante o processo de evolução cariotípica tiveram perda completa dos telômeros (GARAGNA et al., 1995; NANDA et al., 1995).

Fusões cêntricas, também chamadas de translocações Robertsonianas (fusões Rb), são rearranjos que envolvem a fusão de dois cromossomos telo ou acrocêntricos originando um meta ou submetacêntrico e são tidos como um dos mais freqüentes na evolução cariotípica dos mamíferos (HOLMQUIST; DANCIS, 1979). Uma vez que os telômeros preservam a estabilidade e integridade cromossômica (ZAKIAN, 1997) nas fusões Rb estas estruturas podem ser perdidas na quebra cromossômica que precede a formação do rearranjo ou então inativadas (SLIJEPCEVIC, 1998). Estas informações da literatura servem como base para explicar a presença de seqüências teloméricas nos cromossomos B, das STI no meio dos braços dos grandes cromossomos (grupos A e D) e da ausência de marcações teloméricas na região centromérica dos grandes cromossomos do grupo A dos citótipos Santarém, Jarí e Rondônia que se originaram por fusões cêntricas

Análises moleculares revelaram que as repetições de DNA telomérico e centromérico (satélite) estão presumivelmente envolvidas nos processos de fusão em tandem, entretanto o exato mecanismo permanece desconhecido (LEE et al., 1993).

CONCLUSÕES

O curso da evolução cariotípica dos veados neotropicais do gênero *Mazama* não é muito claro, entretanto, os padrões de bandamento clássicos sugerem que a partir do ancestral, eventos de fusões em tandem e cêntricas ocorreram durante a diferenciação das espécies.

Entre as variantes cariotípicas do veado-mateiro, *M. americana*, além dos rearranjos encontrados por meio da análise de bandas G, foi possível confirmar sua ocorrência através da identificação dos sítios teloméricos intersticiais remanescentes de eventos de fusão em tandem. Estes sítios são coincidentes com bandas heterocromáticas, podendo então ser consideradas resquícios dos rearranjos ocorridos durante o processo evolutivo.

REFERÊNCIAS

- BOLZÁN, A. D.; BIANCHI, M. S. Telomeres, interstitial telomeric repeat sequences, and chromosomal aberrations. **Mutation Research**, Amsterdam, v.612, p.189–214, 2006.
- BOUGOURD, S. M.; JONES, R. N. B chromosomes: a physiological enigma. **New Phytologist**, Cambridge, v.137, n.1, p.43-54, 1997.
- CAMACHO, J. P. M.; SHARBEL; T. F.; BEUKEBOOM, L. W. B chromosome evolution. **Philosophical Transactions of the Royal Society**, London, v.355, n.1394, p. 163-178, 2000.
- CARNELOSSI, E. A. G. **Diferenças moleculares entre citótipos de Mazama americana (Artiodactyla: Cervidae)** 2008. 67 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia – Genética e Melhoramento Animal) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal. 2008.
- DEUVE, J. L.; BENNETT, N. C.; O'BRIEN, P. C. M; FERGUSON-SMITH, M. A.; FAULKES, C. G.; BRITTON-DAVIDIAN, J.; ROBINSON, T. J. Complex evolution of X and Y autosomal translocations in the giant mole-rat, *Cryptomys mechowii* (Bathyergidae). **Chromosome Research**, Oxford, v.14, p.681–691, 2006.
- DOBIGNY, G.; OZOUF-COSTAZ, C.; BONILLO, C.; VOLOBOUEV V. Viability of X-autosome translocations in mammals: an epigenomic hypothesis from a rodent case-study. **Chromosoma**, Berlin, v. 113, p. 34–41, 2004.
- DUARTE, J. M. B.; JORGE, W. Chromosomal polymorphism in several population of deer (genus *Mazama*) from Brazil. **Archivos de Zootecnia**, Córdoba, v.45, p.281-287, 1996.
- DUARTE, J. M. B. (1998) Análise citotaxonômica do veado mateiro no Brasil (*Mazama americana*). In: _____. **Análise citogenética e taxonômica do gênero Mazama (Cervidae; Artiodactyla) no Brasil**. 1998. Não paginado. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 1998.
- ELDER, F. F. B. Tandem fusion, centric fusion, and chromosomal evolution in the cotton rat, genus *Sigmodon*. **Cytogenetics and Cell Genetics**, Basel, v.26, p.199-210, 1980.

- FONTANA, F.; RUBINI, M. Chromosomal evolution in Cervidae. **Biosystems**, Amsterdam, v.34, p.157-174, 1990.
- GARAGNA, S.; BROCCOLI, D.; REDI, C.A.; SEARLE, J.B.; COOKE, H.J.; CAPANNA, E. Robertsonian metacentrics of the house mouse lose telomeric sequences but retain some minor satellite DNA in the pericentromeric area. **Chromosoma**, Berlin, v.103, n.10, p.685–692, 1995.
- HARTMANN, N.; SCHERTHAN, S: Characterization of ancestral chromosome fusion points in the Indian muntjac deer. **Chromosoma**, Berlin, v.112, p.213–220, 2004.
- HOLMQUIST, G.P.; DANCIS, B. Telomere replication, kinetochore organizers, and satellite DNA evolution. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v.76, p.4566-4570, 1979.
- IJDO, J. W.; WELLS, R. A.; BALDINI, A.; REEDERS, S. T. Improved telomere detection using a telomere repeat probe (TTAGGG)_n generated by PCR. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.19, p.4780, 1991.
- LEE, C.; SASI, R.; LIN, C. C. Interstitial localization of telomeric DNA sequences in the Indian muntjac chromosomes: further evidence for tandem chromosome fusions in the karyotypic evolution of the Asian muntjacs, **Cytogenetics and Cell Genetics**, Basel, v.63, p.156:159, 1993.
- LIN, C. C.; SASI, R.; FAN, Y. S.; CHEN, Z. Q. New evidence for tandem chromosome fusions in the karyotypic evolution of Asian muntjacs. **Chromosoma**, Berlin, v.101, p.19-24, 1991.
- MEYNE, J.; BAKER, R. J.; HOBART, H. H.; HSU, T. C.; RYDER, O. A.; Ward, O. G.; Wiley, J. E; Wurster-Hill, D. H.; Yates, T. L.; Moyzis, R. K. Distribution of non-telomeric sites of the (TTAGGG)_n telomeric sequence in vertebrate chromosomes. **Chromosoma**, Berlin, v.99, p.3–10, 1990.
- MELES, S.; ADEGA, F.; GUEDES-PINTO, H.; CHAVES R. The karyotype and sex chromosomes of *Praomys tullbergi* (Muridae, Rodentia): A detailed characterization. **Micron and Microscopica Acta**, New York, v.39, p.559–568, 2008.
- NANDA, I.; SCHNEIDER-RASP, S.; WINKING, H.; SCHMID, M. Loss of telomeric sites in the chromosomes of *Mus musculus domesticus* (Rodentia, Muridae) during

Robertsonian rearrangements. **Chromosome Research**, Oxford, v. 3, p. 399–409, 1995.

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

RUIZ-HERRERA, A.; NERGADZE, S.G.; SANTAGOSTINO, M.; GIULOTTO, E. Telomeric repeats far from the ends: mechanisms of origin and role in evolution. **Cytogenetic and Genome Research**, Oxford, v.122, p.219–228, 2008.

SAFFERY, R.; EARLE, E.; IRVINE, D.V.; KALITSIS, P.; CHOO, K.H. Conservation of centromere protein in vertebrates. **Chromosome Research**, Oxford, v.7, n.4, p.261–265, 1999.

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

SCHERTHAN, H. Localization of the repetitive telomérica sequence (TTAGGG) n in two muntjac species and implications for their karyotypic evolution. **Cytogenetics and Cell Genetics**, Basel, v.53, p.115–117, 1990.

SHI, L.; YANG, F.; KUMAMOTO, A. The chromosomes of tufted deer (*Elaphodus cephalophus*). **Cytogenetics and Cell Genetics**, Basel, v. 56, p.189–192, 1991.

SLIJEPCEVIC, P. Telomeres and mechanisms of Robertsonian fusion. **Chromo-soma**, Berlin, v.107, p.136-140, 1998.

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

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

VERMA, R. S.; BABU, A. **Human Chromosomes: Principle and techniques.** 2a. ed., McGraw Hill Inc., 1995, p.419.

YANG, F.; O'BRIEN, P. C.; WIENBERG, J.; FERGUSON-SMITH, M. A. A reappraisal of the tandem fusion theory of karyotype evolution in Indian muntjac using chromosome painting. **Chromosome Research**, Oxford, v. 5, p.109-117, 1997.

YUNIS, J. J.; YASMINEH, W. G. Heterochromatin, satellite DNA and cell function. **Science**, v.174, p.1200–1209, 1971.

ZAKIAN, V.A. Life and cancer without telomerase. **Cell**, v.91, p.1-3, 1997.

CAPÍTULO 5 - PINTURA CROMOSSÔMICA E SUA APLICAÇÃO NO ESTUDO CROMOSSÔMICO DA ESPÉCIE NEOTROPICAL *Mazama americana* (MAMMALIA; CERVIDAE).

RESUMO

A citogenética tem sido utilizada como metodologia para o estudo taxonômico da família Cervidae. Os cervídeos neotropicais são pouco estudados cromossomicamente e os poucos trabalhos na literatura se restringem às análises baseadas em citogenética clássica. A citogenética molecular é uma importante ferramenta para o estudo citotaxonômico e comparação genômica ao nível cromossômico. O foco deste trabalho foi utilizar a pintura cromossômica pela primeira vez na espécie *Mazama americana* buscando entender o processo de evolução cromossômica a partir da espécie que reteve o cariótipo basal dos cervídeos (*Mazama gouazoubira* $2n=70$; $NF=70$). Com o uso das sondas cromossômicas de *M. gouazoubira* foi possível comprovar o sistema sexual múltiplo em veado mateiro, a provável natureza dos cromossomos B como seqüências repetitivas de DNA e ainda corroborar a teoria de que os cromossomos se organizaram a partir do ancestral através de fusões.

Palavras-chave: pintura cromossômica, fusão em tandem, *Mazama americana*, *M. gouazoubira*.

INTRODUÇÃO

A pintura cromossômica, também chamada de pintura cromossômica comparativa ou ZOO-FISH, é uma variação da técnica de FISH e tem sido uma importante ferramenta para detectar homologias cromossômicas e gerar informações sobre o processo de evolução cariotípica e para a citotaxonomia (MATSUBARA et al., 2004). Inicialmente, sondas cromossomo-específicas de humanos foram hibridizadas em

outras espécies de mamíferos, causando uma revolução na citogenética comparativa (ALKALAEVA et al., 2002). Nesta técnica segmentos cromossômicos ou cromossomos inteiros de uma espécie podem ser usados como sondas hibridizadas em outra espécie e as variações entre os cariótipos detectadas por microscopia de fluorescência. As sondas cromossomo-específicas podem ser obtidas pelas técnicas de separação por fluxo (flow sorting) que é uma variação da citometria de fluxo, ou de microdissecção cromossômica utilizando-se um aparelho de micromanipulação (GUERRA, 2004). Após qualquer uma das técnicas de obtenção da sonda cromossômica, o DNA é amplificado por PCR (Polymerase Chain Reaction) e marcado para ser utilizado em experimentos de FISH.

Entretanto, não se deve tirar o mérito e importância da citogenética clássica devido à evolução das técnicas moleculares. Uma análise feita somente por bandamento G pode levar a erros de interpretação, pois nem sempre é possível saber se uma banda (em uma espécie A) é equivalente em tamanho ou composição de DNA à outra (na espécie B), porém, apenas o uso da pintura cromossômica não fornece informações sobre os rearranjos intracromossômicos, como as inversões. Assim, há uma forte complementação de informações entre os bandamentos clássicos e a pintura cromossômica (PIECZARKA; NAGAMACHI, 2004).

Da mesma forma que as diferentes espécies de muntiacus despertam interesse nos geneticistas devido às marcantes diferenças cariotípicas existentes em animais proximamente relacionados (LAN et al., 1995), as espécies neotropicais do gênero *Mazama* também o fazem.

Desde os primeiros trabalhos publicados com citogenética de cervídeos, a variação encontrada para o número diplóide contradizia o que os autores esperavam, ou seja, acreditavam que a evolução destes animais teria ocorrido de forma conservativa (GUSTAVSSON; SUNDT, 1969; TAYLOR et al., 1969; JORGE; BENIRSCHKE, 1977; NEITZEL, 1987. Entretanto, Neitzel (1987) explicou que a variação cariotípica existente entre os cervídeos poderia ser considerada uma característica evolutiva para o grupo.

De acordo com os estudos citogenéticos, o cariótipo basal para a família Cervidae

possui $2n=70$ e $NF=70$ (Figura 01), composto por 68 autossomos acrocêntricos, um X acrocêntrico e um Y metacêntrico, respectivamente, o maior e o menor do lote (NEITZEL, 1987; FONTANA; RUBINI, 1990). Duas espécies recentes, porém distantes filogeneticamente retiveram este cariótipo: *Mazama gouazoubira* (subfamília Odocoileinae) e *Hydropotes inermis* (subfamília Hydropotinae) (NEITZEL, 1987).

O veado-mateiro (*Mazama americana*) apresenta ampla distribuição na região neotropical e é considerada a maior espécie brasileira do gênero, chegando a 40kg e 60cm de altura. A variabilidade de aspectos morfológicos, ecológicos e citogenéticos desta espécie, aliada aos poucos estudos, geram controvérsias sobre sua correta definição taxonômica. Variações cromossômicas (citótipos) sugerem sua subdivisão em várias espécies, podendo caracterizar uma superespécie. A descrição citogenética de 33 animais de várias localidades do Brasil feita por Duarte (1998) mostrou variação do número diplóide ($2n=42$ a 53) e do número fundamental de braços ($NF=48$ a 57), além da presença de cromossomos B. Os cariótipos encontrados foram característicos de algumas regiões do Brasil e foram descritos como citótipos (DUARTE, 1998; SARRIA-PEREA, 2004). Entretanto, até o momento, os estudos cromossômicos feitos com a espécie se restringem à descrição superficial dos bandamentos clássicos (G, C e RON), sem uma análise comparativa mais aprofundada.

Por essas razões, o presente estudo teve como objetivo utilizar a técnica de pintura cromossômica comparativa pela primeira vez em um trabalho com cervídeos neotropicais, buscando entender o processo de evolução cromossômica de *M. americana* no Brasil a partir da espécie que reteve o cariótipo basal dos cervídeos (*Mazama gouazoubira* $2n=70$; $NF=70$).

MATERIAL E MÉTODOS

As hibridizações *in situ* foram realizadas em preparações cromossômicas de um macho da espécie *Mazama gouazoubira* e em oito animais da espécie *M. americana* pertencentes a quatro citótipos distintos: Paraná, Santarém, Jarí e Rondônia (Tabela

01). Para isto, as preparações cromossômicas foram obtidas de culturas de fibroblastos feitas a partir de fragmentos de pele segundo Verma e Babu (1995), submetidas ao bandamento G (SEABRIGHT, 1971) e pintura cromossômica (FERGUSON-SMITH et al., 1998).

Os cromossomos foram classificados de acordo com a razão de braços em metacêntricos, submetacêntricos ou acrocêntricos e, de acordo com o comprimento relativo (CR) em grupos: A (grandes cromossomos de dois braços= $CR > 2,5\%$), C (pequenos cromossomos de dois braços= $CR < 2,5\%$), D (grandes cromossomos acrocêntricos= $CR > 3,0\%$), E (pequenos cromossomos acrocêntricos= $CR < 3,0\%$) e B (supranumerários ou cromossomos B= $CR < 1,5\%$).

Tabela 01. Informações sobre os animais analisados citogeneticamente.

Espécie	Nº	Sexo	Origem de cativeiro	Origem de natureza
<i>M. gouazoubira</i>	T277	Macho	Zoo de Carajás/PA	Araguaína/TO
<i>M. americana</i>	T192	Fêmea	Zoo de Curitiba/PR	Desconhecida
<i>M. americana</i>	T270	Fêmea	Pq. Nac. do Iguaçu/PR	Pq. Nac. Iguaçu PR
<i>M. americana</i>	T205	Macho	Criadouro Itaipu/PR	Nascido em cativeiro
<i>M. americana</i>	T260	Macho	IBAMA Santarém/PA	Itaituba - PA
<i>M. americana</i>	T258	Macho	Criadouro Santarém/PA	Desconhecida
<i>M. americana</i>	T247	Macho	IBAMA Juína/MT	Juína - MT
<i>M. americana</i>	T269	Macho	Buritis-RO	Buritis - RO
<i>M. americana</i>	T021	Macho	Zôo de Ariquemes - RO	Desconhecida

Para pintura cromossômica, as sondas de *Mazama gouazoubira* utilizadas neste trabalho foram preparadas a partir de uma linhagem celular de um macho da espécie com $2n=70 + 3B$; $NF=70$ mantida pelo laboratório de Citogenética Molecular do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade de Cambridge, Inglaterra, coordenado pelo Dr. Malcolm A. Ferguson-Smith. O primeiro trabalho utilizando sondas de *M. gouazoubira* foi o de Yang et. al. (1997a) no qual de 16 picos separados na citometria, 13 sondas cromossômicas foram utilizadas. Os cromossomos foram

separados por citometria fluxo seguindo a metodologia de Yang et al. (1995) e amplificados por DOP-PCR (*Degenerate oligonucleotide primer*) (Ferguson-Smith et al., 1998; Telenius, et al. 1992).

Para a realização deste trabalho foi realizada uma nova separação dos cromossomos no laboratório da Universidade de Cambridge e 30 picos foram isolados e enviados para o laboratório de citogenética do NUPECCE. Destes, 5 picos foram identificados e utilizados como sondas em um primeiro momento.

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

As lâminas submetidas às técnicas de bandamento cromossômico foram analisadas e fotografadas em um microscópio Olympus CX31 em objetiva de 100x com uma câmera digital Olympus Camedia C5060. Já as imagens digitais de pintura cromossômica foram obtidas usando o microscópio de fluorescência Zeiss Axiophot II (objetiva de 100x) equipado com câmera Zeiss AxioCam MRm, por meio do programa AxioVision 3.1. Todas as imagens foram editadas com o auxílio do programa Adobe Photoshop CS2.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O macho de *M. gouazoubira* T277 apresentou $2n=70$; $NF=70$ e uma variação de 0 a 3 cromossomos B (Figura 01). Entre os animais da espécie *M. americana* avaliados três foram do citótipo Paraná, um Santarém, um Jarí, um Juína e dois do citótipo Rondônia (Tabela 02).

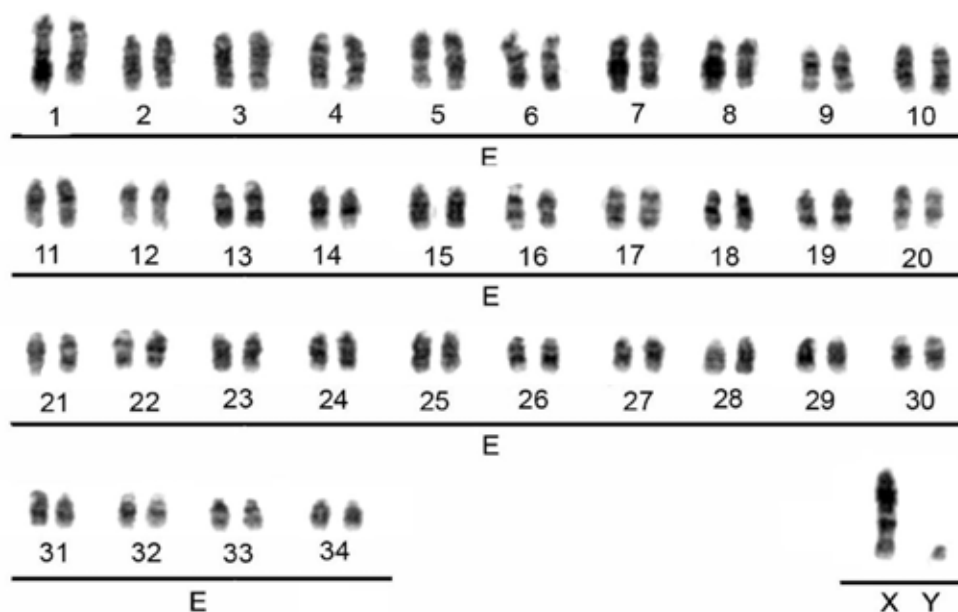


Figura 01 Cariótipo de *Mazama gouazoubira* ($2n=70$; $NF=70$) sob bandamento G.

Tabela 02. Animais da espécie *Mazama americana* analisados, onde $2n$ =número diplóide; NF =número fundamental; B=variação de cromossomos B; RO=Rondônia; JU=Juína; JA=Jarí; PR=Paraná; SA=Santarém.

Nº	Sexo	Citótipo	$2n/NF$	B
T192	Fêmea	PR	$2n=52/NF=56$	3-4
T270	Fêmea	PR	$2n=52/NF=56$	5-7
T205	Macho	PR	$2n=53/NF=56$	1-5
T260	Macho	SA	$2n=51/NF=56$	3-4
T258	Macho	JA	$2n=49/NF=56$	4-5
T247	Macho	JU	$2n=44/NF=46$	3-5
T269	Macho	RO	$2n=42/NF=46$	3-5
T021	Macho	RO	$2n=43/NF=46$	4-6

A caracterização das sondas através da hibridização espécie-específica (sondas de *M. gouazoubria* hibridizadas em cromossomos de *M. gouazoubira*) foi fundamental para a verificação do funcionamento do DNA como sonda e para a identificação do

cromossomo que foi separado pela citometria de fluxo. Neste trabalho cinco sondas de *M. gouazoubira* (MgoA, MgoB, MgoC, MgoK, MgoI) foram utilizadas (Figura 02). Observou-se que as regiões centroméricas dos cromossomos apresentaram marcações intensas, indicando a localização de regiões heterocromáticas que são normalmente evidenciadas em banda C. Essas regiões marcadas podem dificultar a interpretação dos sinais de hibridização, principalmente nos menores cromossomos acrocêntricos.

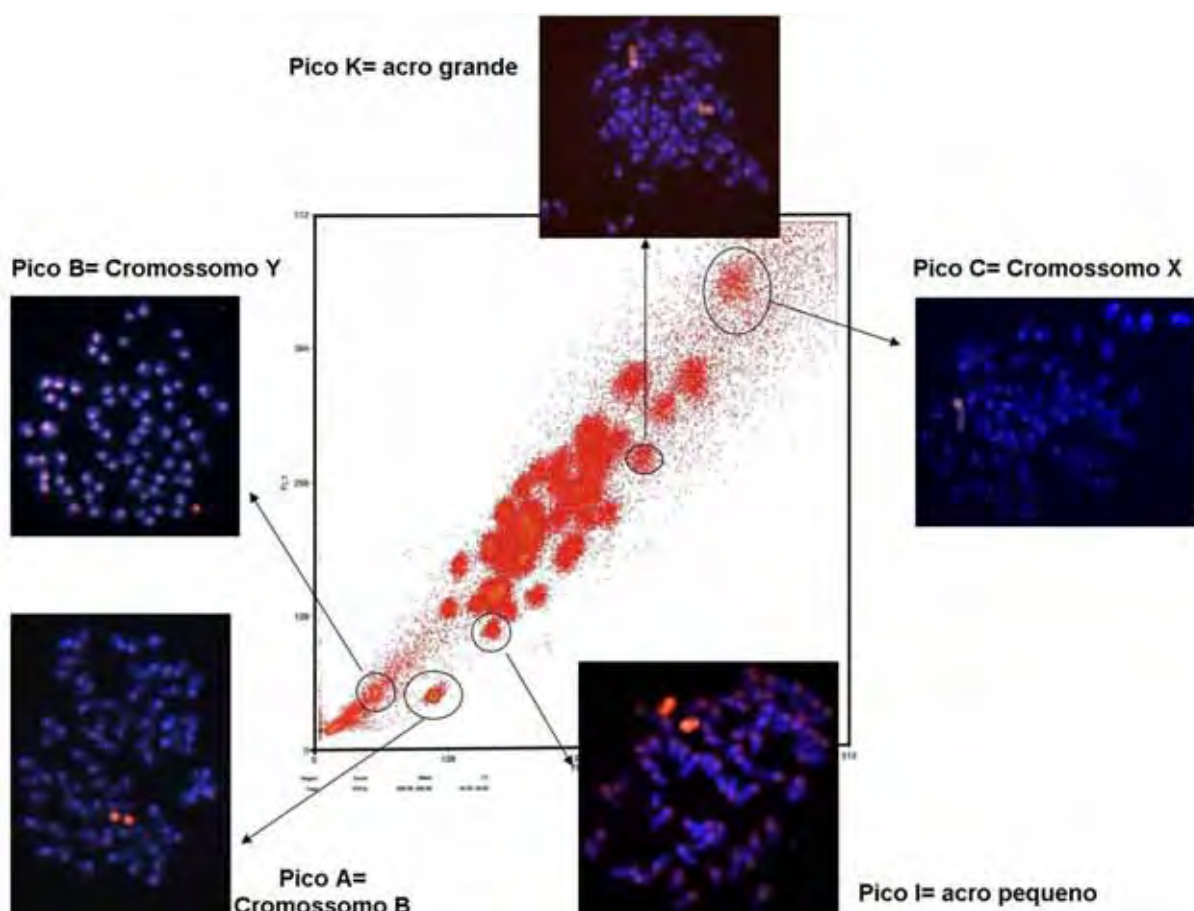


Figura 02. Cariótipo de fluxo dos cromossomos de *Mazama gouazoubira* ($2n=70$; $NF=70$) com os picos utilizados nos experimentos espécie-específicos, identificados nas metáfases hibridizadas (Pico A= sonda MgoA= cromossomo B; Pico B= sonda MgoB= cromossomo Y; Pico C= sonda MgoC= cromossomo X; Pico K= sonda MgoK e Pico I= sonda MgoI= cromossomos autossomos).

O pico MgoA correspondeu aos cromossomos B da espécie *Mazama gouazoubira*, o pico MgoB marcou o cromossomo Y e o pico MgoC hibridizou o cromossomo X. Estes três picos foram de fácil identificação, já que corresponderam aos cromossomos sexuais e aos cromossomos B, que são os menores do conjunto. A identificação dos picos que correspondem aos autossomos não foi realizada de forma completa, pois como todos têm a mesma morfologia acrocêntrica e o tamanho entre os 34 pares varia pouco, será necessário aliar a técnica de bandamento G à hibridização *in situ* para a correta identificação do par. Neste trabalho os cromossomos autossomos correspondentes às sondas MgoK e MgoI foram classificados como um cromossomo grande que está entre os 6 primeiros pares e um pequeno que está entre os 5 últimos do cariótipo de *M. gouazoubira*, respectivamente.

Da mesma forma que ocorreu na hibridização espécie-específica, nos experimentos interespecíficos (sondas de *M. gouazoubria* hibridizadas em cromossomos de *M. americana*) foram observadas marcações intensas nas regiões centroméricas e também em regiões intersticiais. Essas marcações corresponderam às regiões heterocromáticas que são normalmente evidenciadas em banda C e podem confundir a correta localização do sítio de hibridização. Foram realizados testes incluindo-se DNA de esperma de Salmão e *Human Cot-1*, que funcionam como DNA competidor não marcado para suprimir a hibridização da sonda com as seqüências repetitivas do genoma, entretanto, os resultados encontrados com os competidores presentes não foram diferentes sem o seu uso.

A sonda A, que corresponde aos cromossomos B de *M. gouazoubira*, marcou os cromossomos B de *M. americana*, além de também apresentar hibridização em algumas regiões heterocromáticas. A Figura 03 mostra o padrão de hibridização desta sonda no citótipo Rondônia (Figuras 03a) e no citótipo Paraná (Figuras 03b). Em ambas, os cromossomos B apareceram marcados intensamente, sugerindo que a constituição do DNA em *M. gouazoubira* e *M. americana* se manteve a mesma durante a reorganização do genoma. Entretanto, a detecção de fluorescência em regiões correspondentes à heterocromatina indica que a constituição destes cromossomos está relacionada a seqüências repetitivas. Alguns trabalhos mostram que pode-se encontrar

dois tipos de seqüências de DNA repetitivo, uma específica dos cromossomos B e outra compartilhada entre cromossomos autossomos, sexuais e B (TRIFONOV et al. 2002; MATSUBARA et al., 2004).

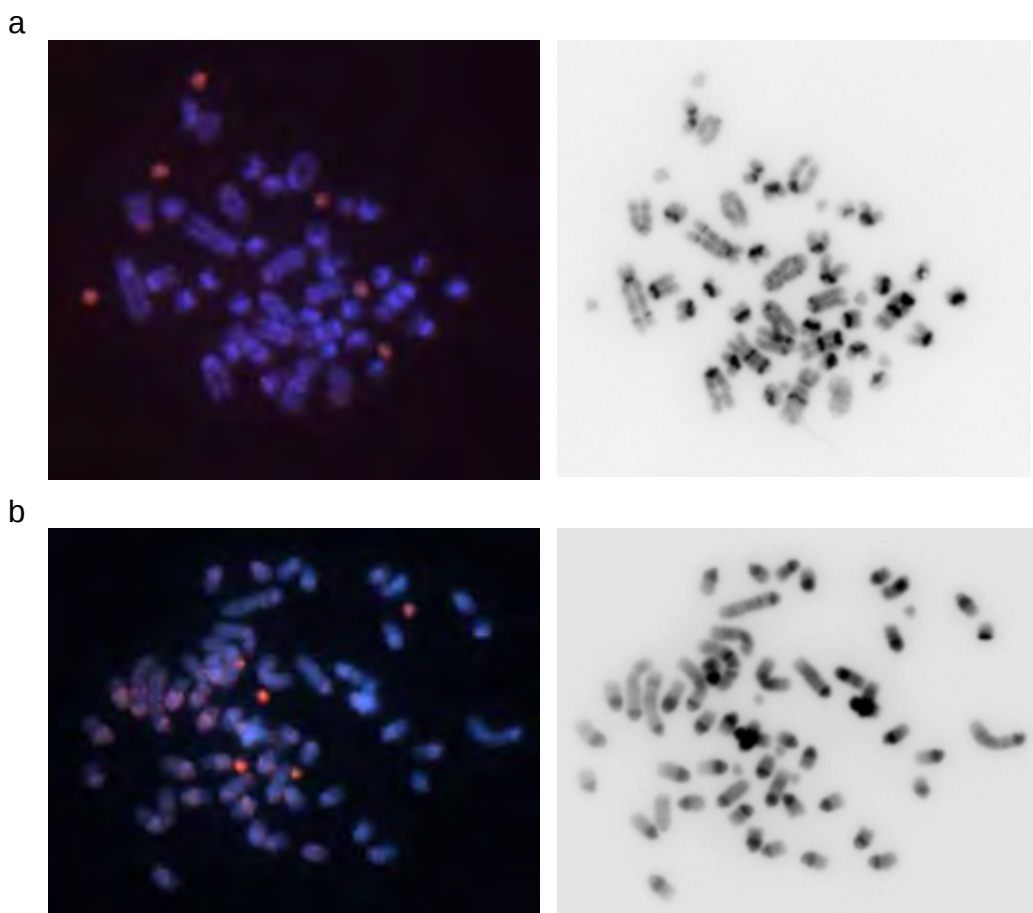


Figura 03 Hibridização *in situ* da sonda A (cromossomos B) de *M. gouazoubira* em metáfases de *M. americana* com contracoloração de DAPI e marcação em vermelho (Cy3) e, seu padrão DAPI invertido. a) Metáfase do representante do citótipo Rondônia (T021); b) Metáfase do representante do citótipo Paraná (T205).

Os cromossomos sexuais de *M. gouazoubira* mostraram-se totalmente conservados em *M. americana*. A sonda B, correspondente ao cromossomo Y de *M. gouazoubira*, marcou o cromossomo Y de *M. americana* em sua totalidade (Figura 04). Nas fêmeas desta última espécie não foi encontrado nenhum sinal de hibridização desta sonda. A disponibilidade de sondas cromossomo-específicas e de métodos de hibridização *in situ* fluorescente faz com que a determinação de rearranjos como as

translocações entre cromossomos sexuais e autossomos seja feita com segurança, resolvendo dúvidas que possam existir sobre a organização cariotípica da espécie em questão (DEUVE et al., 2006).

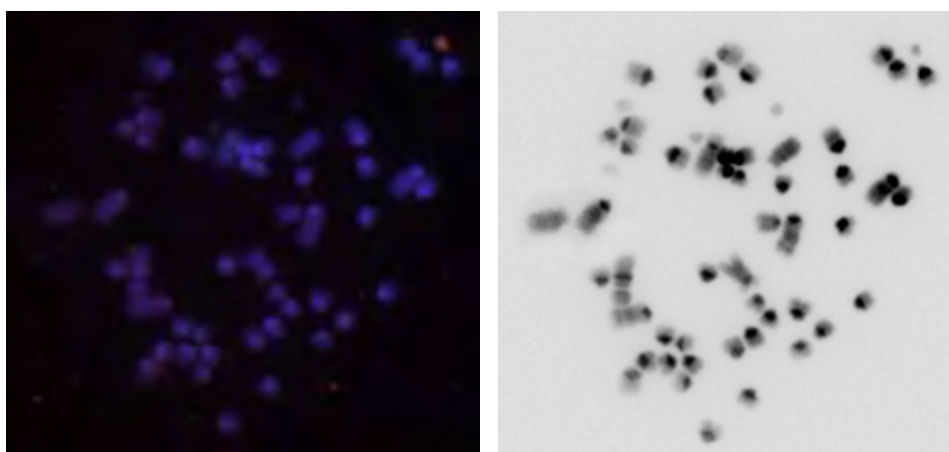


Figura 04. Hibridização *in situ* da sonda B (cromossomo Y) de *M. gouazoubira* em metáfases de *M. americana*. Metáfase do representante do citótipo Santarém (T260) com contracoloração de DAPI e marcação em vermelho (Cy3) e, seu padrão DAPI

A hibridização da sonda do cromossomo X de *M. gouazoubira* (sonda MgoC) em *M. americana* produziu o resultado esperado, corroborando os dados sobre o sistema sexual múltiplo existente na espécie (SARRIA-PEREA, 2004). Esta sonda teve correspondência com o braço curto do X de *M. americana* em sua totalidade e com o terço proximal do braço longo. Os dois terços distais do cromossomo X que não mostraram sinal de hibridização correspondem ao acrocêntrico ancestral que sofreu uma fusão em tandem com o X. A Figura 05a mostra uma metáfase de uma fêmea do citótipo Paraná, evidenciando dois cromossomos marcados; na Figura 05b, uma metáfase de um macho do citótipo Santarém evidencia sinal em apenas um cromossomo e, na Figura 05c onde se tem uma metáfase do macho T247 do citótipo Juína com dois cromossomos marcados (macho XXY1Y2).

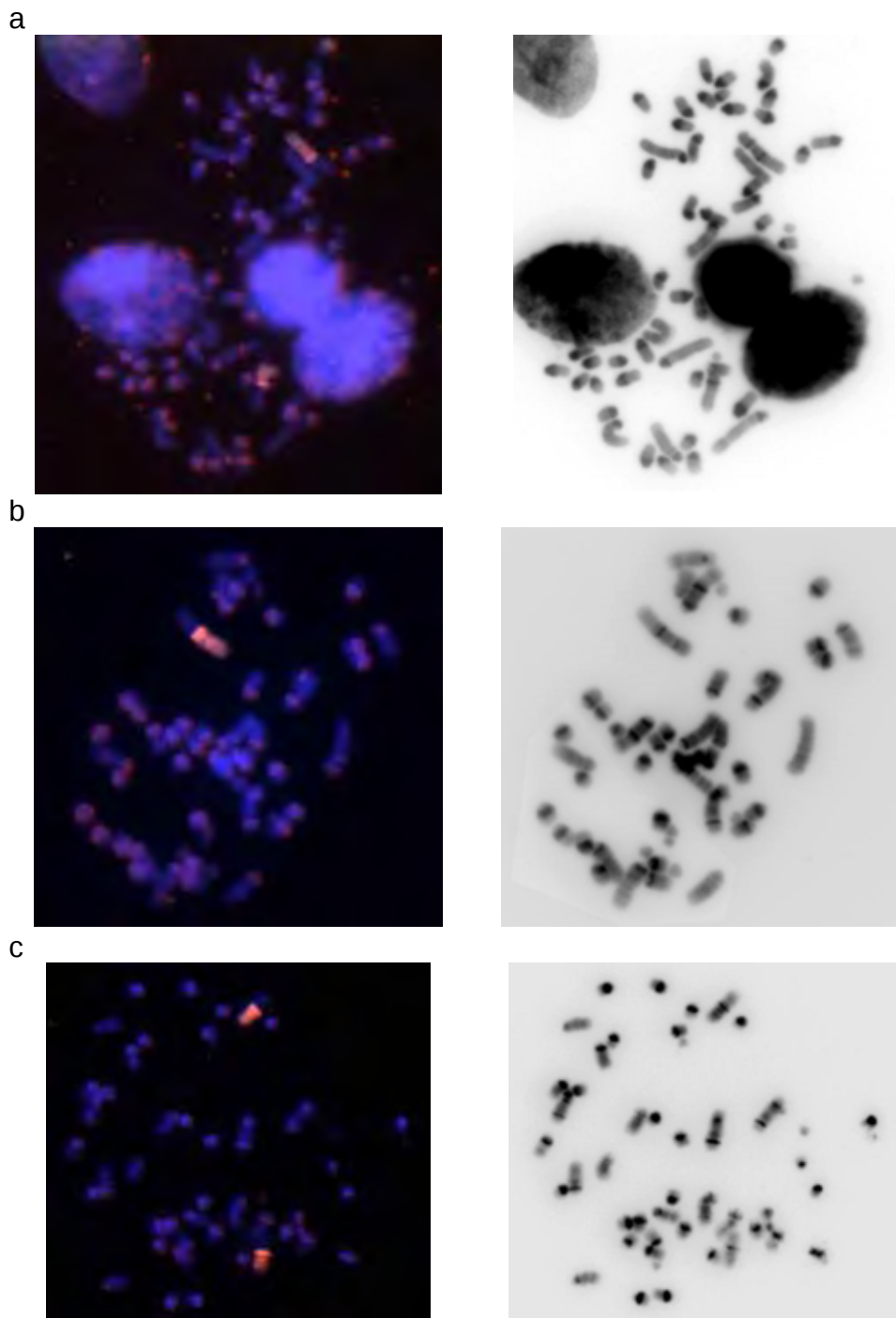


Figura 05. Hibridização *in situ* da sonda C (cromossomo X) de *M. gouazoubira* em metáfases de *M. americana* com contracoloração de DAPI e marcação em vermelho (Cy3) e, seu padrão DAPI invertido em: a) Metáfase do representante do citótipo Paraná (T270); b) Metáfase do representante do citótipo Santarém (T269); c) Metáfase do representante do citótipo Juína (T247).

A hibridização neste último macho corrobora os resultados de bandamento G e C (Capítulo 2), mostrando que este animal é portador de uma aneuploidia para o cromossomo X, apresentando quatro cromossomos sexuais (XXY1Y2). A presença de um cromossomo X adicional caracteriza uma síndrome que está associada à hipoplasia testicular, oligo ou azoospermia e degradação dos túbulos seminíferos (Sysa, 1996). A ocorrência de mosaicismos ou quimerismo é frequentemente associada a esta síndrome e o uso da pintura cromossômica como método de diagnóstico é muito útil, pois facilita a detecção do cromossomo adicional nas metáfases (Slota et al. 2003; Lue et al. 2005).

Para compensar a dosagem desigual de genes entre os sexos dos mamíferos (dois X nas fêmeas e um X no macho) ocorre a inativação de um dos X nas células somáticas das fêmeas através do silenciamento transcricional e como consequência há um retardo na replicação deste X inativado (LYON, 1998). Nos casos das translocações X-autossômicas, pode ocorrer a inativação da região autossomal adjacente ao X interferindo no tempo de replicação deste segmento cromossômico e afetando negativamente o estabelecimento do rearranjo (ASHLEY, 2002). Apesar deste mecanismo que atua contra a fixação destes rearranjos, as translocações X-autossomo não são incomuns em mamíferos (Rodentia – DEUVE et al. 2006; DOBGNY et al. 2002; Soricomorpha – PACK et al. 1993; Artiodactyla – VASSART et al. 1995; YANG et al. 1997b; Carnivora – FREDGA, 1972; Chiroptera – TUCKER 1986). A fusão X-autossomo em *M. americana* parece ter driblado os problemas com a inativação do X em um ancestral da espécie, se fixando na região sul-americana.

A sonda Mgo1 correspondeu a um autossomo pequeno de *M. gouazoubira*, e apareceu nos três citótipos de *M. americana* como um bloco único, logo abaixo do centrômero de um par acrocêntrico do grupo D, além de marcar também os cromossomos B. No citótipo Paraná, o par marcado foi o 3 (Figura 06a). Já, nos dois citótipos Jarí e Santarém, esta sonda marcou o par 4 pertencente ao grupo D que têm homologia ao par 3 do Paraná (Figura 06b e 06c).

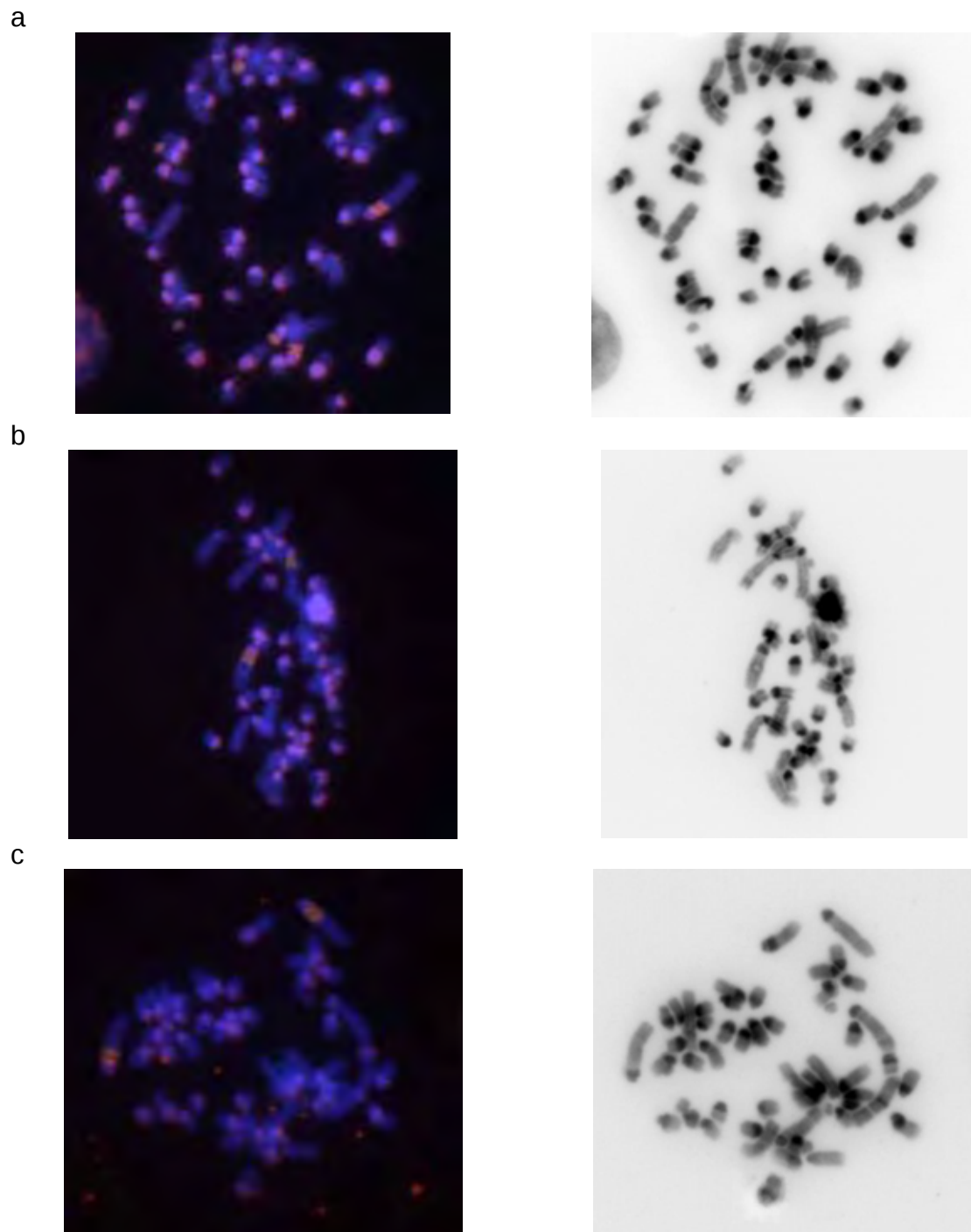


Figura 06. Hibridização *in situ* da sonda Mgo1 de *M. gouazoubira* em metáfases de *M. americana* com contracoloração de DAPI e marcação em vermelho (Cy3) e, seu padrão DAPI invertido em: a) Metáfase do representante do citótipo Paraná (T192) ; b) Metáfase do representante do citótipo Jarí (T258); c) Metáfase do representante do citótipo Santarém (T260).

Os citótipos Paraná e Santarém tiveram o mesmo padrão de hibridização para a sonda MgoK e o sinal de hibridização foi detectado na região mediana dos braços longos do par 7 de ambos os citótipos (Figuras 07a e 07b). No citótipo Rondônia foi o par 9 que mostrou homologia com a sonda MgoK. Entretanto, o sinal foi o detectado estava na região proximal ao centrômero em cerca de dois terços de seu comprimento (Figura 07c). A diferença entre estes cromossomos dos três citótipos não foi encontrada devido à baixa resolução do bandamento G.

Uma das conclusões mais importantes que se pode tirar destas hibridizações é que um dos rearranjos envolvidos na evolução dos veados da espécie *M. americana* a partir do ancestral *M. gouazoubira* são as fusões cromossômicas e que os cromossomos ancestrais podem não ter sofrido muitas reorganizações intra-cromossômicas. Da mesma forma que Yang et al.(1995) encontraram nos trabalhos com *Muntiacus*, as sondas utilizadas aqui mostraram um único sinal de hibridização e isto foi uma evidencia direta de que os cariótipos se reorganizaram por meio das fusões.

Entretanto, ainda é cedo para inferir qual foi o caminho evolutivo que o cariótipo basal ($2n=70$; $NF=70$) percorreu para alcançar a configuração cariotípica da espécie *Mazama americana*. A otimização dos experimentos de hibridização *in situ* com as outras sondas cromossômicas e o uso de uma técnica de coloração que permita a identificação dos pares, como bandamento G ou coloração com actinomicina-D e DAPI, irá trazer subsídios para uma maior discussão sobre a evolução cariotípica dos veados neotropicais.

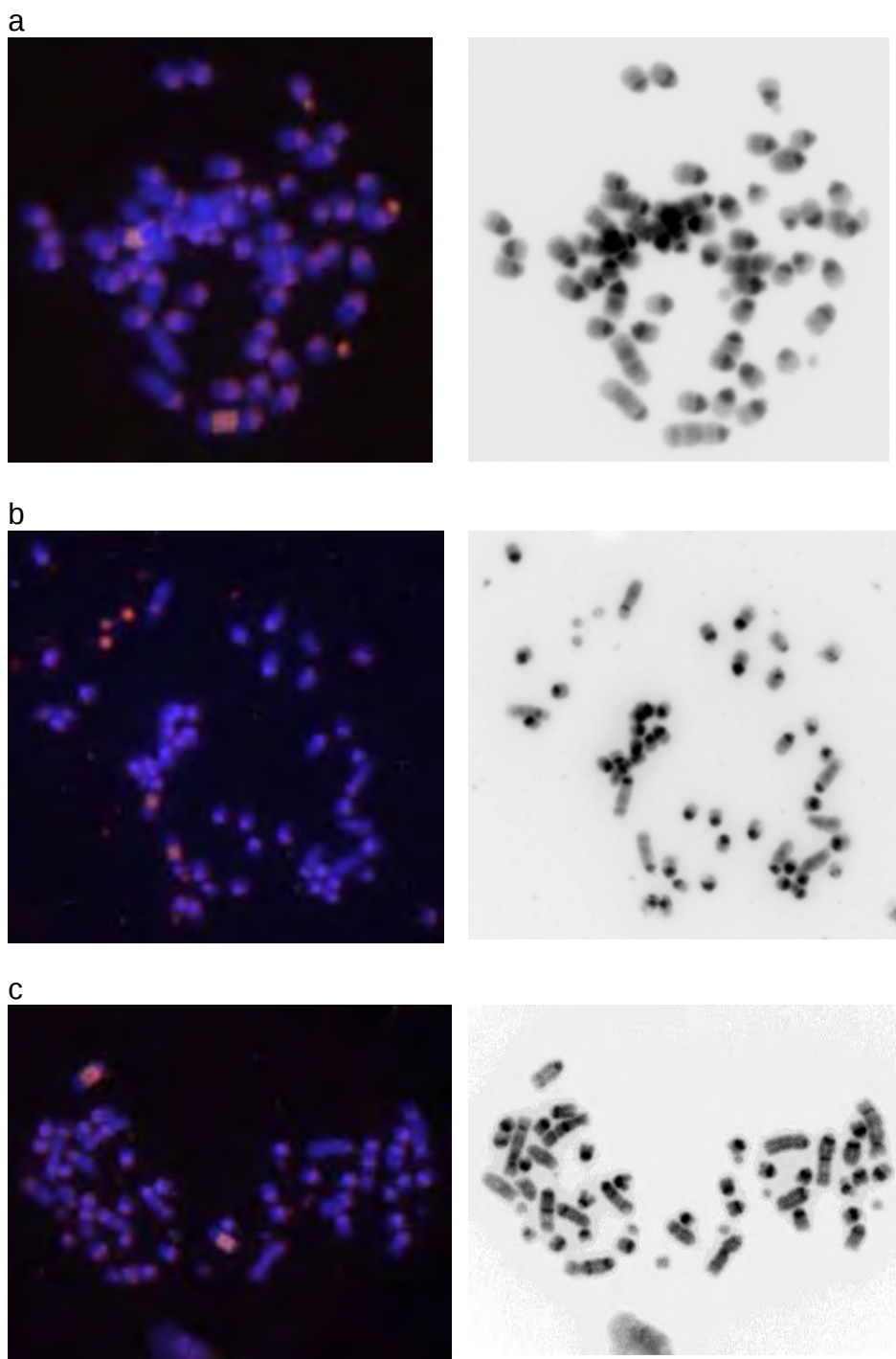


Figura 07. Hibridização *in situ* da sonda MgoK de *M. gouazoubira* em metáfases de *M. americana* com contracoloração de DAPI e marcação em vermelho (Cy3) e, seu padrão DAPI invertido. a) Metáfase do representante do citótipo Paraná (T205); (b) Metáfase do representante do citótipo Santarém (T260); (c) Metáfase do representante do citótipo Rondônia (T021).

CONCLUSÕES

Os resultados gerados neste trabalho são preliminares, já que a hibridização das sondas dos outros cromossomos autossômicos de *M. gouazoubira* isolados na citometria de fluxo e a identificação destes por meio do padrão de bandas trará maior consistência para as conclusões tiradas até o momento.

Por hora foi possível corroborar a existência do sistema sexual múltiplo em veado mateiro descrito previamente pela citogenética clássica, identificar a provável natureza dos cromossomos B como seqüências repetitivas de DNA e ainda corroborar a teoria de que os cromossomos se organizaram a partir do cariótipo basal através de fusões.

REFERÊNCIAS

- ALKALAEVA, E. Z.; TRIFONOV, V. A.; PERELMAN, P. L.; GRAPHODATSKY, A. S. Comparative chromosome painting. **Russian Journal of Genetics**, New York, v.38, n.8, p. 1034-1042, 2002.
- ASHLEY, T. X-Autosome translocations, meiotic synapsis, chromosome evolution and speciation. **Cytogenetic and Genome Research**, Basel, v.96, p.33-39, 2002.
- DEUVE, J. L.; BENNETT, N. C.; O'BRIEN, P. C. M.; FERGUSON-SMITH, M. A.; FAULKES, C. G.; BRITTON-DAVIDIAN, J.; ROBINSON, T. J. Complex evolution of X and Y autosomal translocations in the giant mole-rat, *Cryptomys mechowii* (Bathyergidae). **Chromosome Research**, Oxford, v.14, p.681-691, 2006.
- DOBIGNY, G.; ANISKIN, V.; VOLOBOUEV, V. Explosive chromosome evolution and speciation in the gerbil genus *Taterillus* (Rodentia, Gerbillinae). **Cytogenetics and Genome Research**, Basel, v.96, p.117-124, 2002.
- DUARTE J. M. B. (1998) Análise citotaxonômica do veado mateiro no Brasil (*Mazama americana*). In: _____. **Análise citogenética e taxonômica do gênero *Mazama* (Cervidae; Artiodactyla) no Brasil**. 1998. Não paginado. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista,

Botucatu, 1998.

FERGUSON-SMITH, M. A.; YANG, F.; O'BRIEN, P. C. M. Comparative mapping using chromosome sorting and painting. **ILAR Journal**, Washington, v. 39, p. 68-76, 1998.

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

FREDGA, K. Comparative chromosome studies in mongooses (Carnivora, Voverridae). I. Idiograms of 2 species and karyotype evolution in Herpestinae. **Hereditas**, Lund, v.71, p.1-74, 1972.

GUERRA, M. **FISH – Conceitos e Aplicações na Citogenética**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 2004. 176p.

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

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

LAN, H.; WANG, W.; SHI, L. Phylogeny of *Muntiacus* (Cervidae) based on mitochondrial DNA restriction maps. **Biochemical Genetics**, New York, v.33, p. 377-389, 1995.

LYON, M. F. X-Chromosome inactivation: a report hypothesis. **Cytogenetics and Cell Genetics**, Basel, n.80, p.133-137, 1998.

LUE, Y.; JENTSCH, D.; WANG, C.; RAO, P.N.; HIKIM, A.P.S.; SALAMEH, W.; SWERDLOFF, R.S. XXY mice exhibit gonadal and behavioral phenotypes similar to Klinefelter syndrome. **Endocrinology**, v.146, n.9, p.4148-4154, 2005.

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

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

PACK, S. D.; BORODIN, P. M.; SEROV, O. L.; SEARLE, J. B. The X-autosome

translocation in the common shrew (*Sorex araneus* L.): late replication in female somatic cells and pairing in male meiosis. **Chromosoma**, Berlin, v.102, p.355-360, 1993.

PIECZARKA, J. C.; NAGAMACHI, N. Y. Pintura cromossômica como instrumento para estudos filogenéticos em primatas. In: GUERRA, M. **FISH – Conceitos e Aplicações na Citogenética**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 2004. p.115-132.

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

SEABRIGHT, A. T. A rapid banding technique for human chromosomes. **Lancet**, v.1, p. 971-972, 1971.

SLOTA, E.; KOZUBSKA-SOBOCINSKA, A.; KOSCIELNY, M.; DANIELAK-CZECH, B.; REJDUCH, B. Detection of the XXY trisomy in a bull by using sex chromosome painting probes. **J. Appl. Genet.**, v.44, n.3, p.379-382, 2003.

SYSA, P. S. (1996) Testicular functions in animals with chromosomal aberrations. **Reprod. Dom. Anim.** 31:509-514.

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

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

TRIFONOV, V. A.; PERELMAN, P. L.; KAWADA, S.-I.; IWASA, M.; ODA, S.-I.; GRAPHODATSKY, A. Complex structure of B-chromosomes in two mammalian species: *Apodemus peninsulae* (Rodentia) and *Nyctereutes procyonoides* (Carnivora). **Chromosome Research**, Oxford, v.10, p.109-116, 2002.

TUCKER, P. K. Sex chromosome-autosome translocations in the leaf-nosed bats, family Phyllostomidae. I. Mitotic analyses of the subfamilies Stenodermatinae and Phyllostominae. **Cytogenetics and Cell Genetics**, Basel, v.43, p.19-27, 1986.

VASSART, M.; SEGUELA, A.; HAYES, H. Chromosomal evolution in gazelles. **Journal of Heredity**, Washington, n.86, p.158-167, 1995.

VERMA, R.S.; BABU, A. **A human chromosomes: Principle and techniques**. 2a. ed., McGraw Hill Inc., 1995, p. 419.

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

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

YANG, F.; O'BRIEN, P. C. M.; WIENBERG, J.; FERGUSON-SMITH, M. A. A reappraisal of the tandem fusion theory of karyotype evolution in the Indian muntjac using chromosome painting. **Chromosome Research**, Oxford, v.5, p.109-117, 1997b.

CAPÍTULO 6 – CONCLUSÕES GERAIS E IMPLICAÇÕES

O uso de diferentes técnicas como bandamentos cromossômicos, análise meiótica e citogenética molecular geraram resultados importantes para o estudo cariotípico de *Mazama americana*. A partir da comparação destes, foi possível fazer as seguintes inferências:

- a. Entre os animais analisados há um polimorfismo cromossômico que diferencia as regiões amostradas em seis citótipos distintos;
- b. Fusões em tandem e cêntricas foram os rearranjos responsáveis pela diferenciação dos citótipos e também pela variação cromossômica encontrada;
- c. A partir de um ancestral comum, a diferenciação cromossômica da espécie ocorreu por meio da divergência de duas linhagens principais, Paraná e Juína, e o acúmulo de rearranjos em cada uma destas resultou na diferenciação dos outros citótipos (Figura 01);
- d. A análise do complexo sinaptonêmico mostrou que a existência de animais heterozigotos para fusões cêntricas na espécie pode ser bem tolerada em decorrência da configuração *cis* encontrada para o rearranjo;
- e. Os sítios teloméricos intersticiais detectados nos maiores cromossomos são remanescentes das fusões em tandem que ocorreram durante o processo evolutivo;
- f. Os cromossomos B encontrados na maioria das espécies do gênero *Mazama*, no veado-mateiro são constituídos por seqüências de DNA repetitivo e seu comportamento meiótico, com a formação de univalentes ou bivalentes, explica a variação numérica intra-individual;
- g. As sondas de dois cromossomos autossomos de *M. gouazoubira* apareceram como blocos únicos nos cromossomos em *M. americana*, corroborando a informação de que um dos rearranjos responsáveis pela reorganização cariotípica a partir do ancestral foram as fusões;
- h. Uma fusão X-autossômica ocorreu no ancestral da espécie, gerando o sistema sexual múltiplo do tipo XY1Y2. A análise meiótica mostrou pareamento exato entre o

Y2 e o terço distal do X e, a pintura cromossômica mostrou que a região do cromossomo X tem homologia completa com o cromossomo X do cariótipo basal dos Cervídeos (*Mazama gouazoubira*).

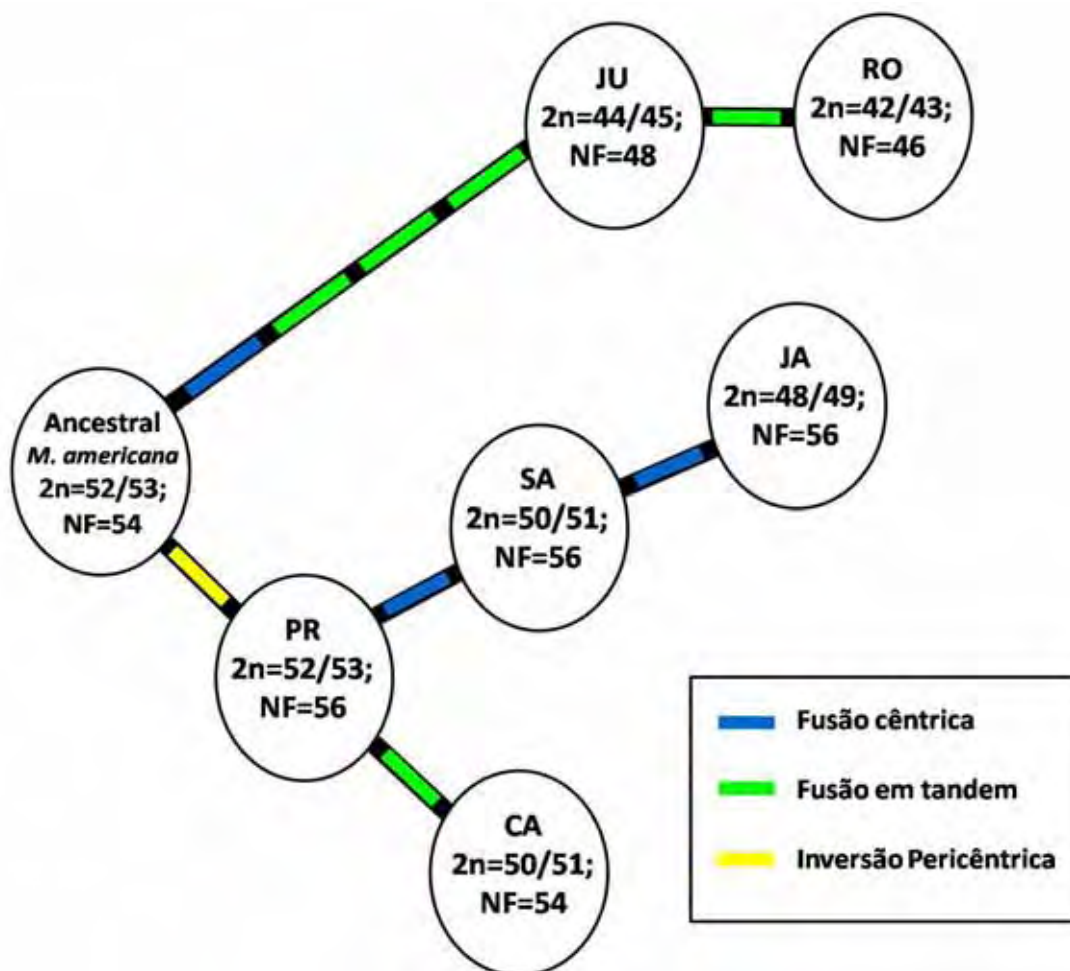


Figura 01. Padrão de divergência e diferenciação cromossômica entre os seis citótipos de *M. americana* avaliados (PR=Paraná; CA=Carajás; SA=Santarém; JA=Jarí; JU=Juína; RO=Rondônia; 2n= número diplóide; NF=número fundamental)

Verifica-se assim, que as diferentes técnicas utilizadas neste trabalho geraram importantes informações a respeito da evolução cromossômica da espécie. Deve-se agora investir na pintura cromossômica, buscando avaliar com maior detalhamento como ocorreu a diferenciação a partir do cariótipo basal da família Cervidae. Além disso, o uso de outras seqüências como DNA ribossomal e satélite, usadas como

sondas na hibridização fluorescente *in situ* pode aglutinar novos dados e auxiliar no entendimento da grande variabilidade cariotípica existente em *M. americana*.

De modo geral, este trabalho mostrou que a espécie em questão é um modelo muito importante para estudos de evolução cromossômica e citotaxonomia. A complexidade cariotípica observada está relacionada com o padrão de evolução e com a distribuição da espécie por todo território brasileiro. Além disso, a diferenciação cromossômica entre animais isolados geograficamente pode remeter à existência de mais de uma espécie e esta possibilidade tem fortes implicações sobre o *status* de conservação de dos animais de cada região.

Este é o primeiro trabalho que utiliza como ferramenta a citogenética molecular no estudo dos cervídeos neotropicais. Foi, portanto, um importante passo, para que o processo evolutivo não só da espécie estudada aqui, mas das cinco espécies brasileiras do gênero *Mazama* que despertam o interesse pela grande variação cariotípica frente a uma grande similaridade morfológica, comece a ser compreendido mais a fundo.

APÊNDICE A - PROTOCOLO DE HIBRIDIZAÇÃO *IN SITU* TELOMÉRICA

Para a identificação dos sítios teloméricos as sondas foram construídas por PCR (*Polymerase Chain Reaction*) utilizando-se os iniciadores 1 (TTAGGG)₅ e 2 (CCCTAA)₅ (IJDO et al., 1991).

Reagentes da PCR (volume final 100uL):

- 2µl do iniciador 1 (1000ng/µL); 2µl do iniciador 2 (1000ng/µL); 10µL de tampão 10x para PCR; 16µl de dNTP mix(1,25mM); 3µl de Mg₂Cl 50mM; 2µl de Taq Polimerase; 65µl de água ultrapura.

A programação da reação está descrita na Tabela 01A. Após a amplificação, foi preparado um gel de agarose 1% para verificação do tamanho dos fragmentos, utilizando um marcador de 1kb.

Tabela 01A. Informações sobre a reação de PCR para a construção da sonda telomérica

Temperatura	Tempo	Ciclo
94°C	1 min	
55°C	30seg	
72°C	1min	
94°C	1min	
60°C	30seg	
72°C	1min30seg	
4°C	-	-

A marcação da sonda foi feita pelo método *nick translation* utilizando-se o Kit BionickTM Labeling System (Invitrogen Life Technologies), seguindo as especificações do fabricante.

A hibridização telomérica foi dividida nas seguintes etapas:

a. Preparação e desnaturação cromossômica: Lâminas recém preparadas foram desidratadas em série alcoólica gelada 70-85-100%, por 5 minutos cada. Após secas, foram incubadas em formamida 70%/2xSSC, pH 7,0 a 67°C por 2 minutos para que ocorresse a desnaturação do DNA cromossômico. Imediatamente foram imersas em etanol 70%, antes de passarem por mais uma série de desidratação em etanol gelado 70-80-100%, por 2 minutos cada.

b. Desnaturalização da sonda: Para 30µL de mistura de hibridização foram adicionados 6 µL de sonda, 6µL de sulfato dextran 50%, 3µL de 20xSSC e 15µL de formamida. Esta solução foi centrifugada rapidamente, colocada por 5 minutos a 95°C em termociclador e depois, o tubo foi colocado imediatamente no gelo.

c. Incubação: Os 30 uL de solução de hibridização foram colocados sobre a lâmina preparada e esta foi coberta por uma lamínula. A lâmina foi mantida em câmara úmida (2xSSC) a 37°C, com a lamínula voltada para baixo, overnight.

d. Lavagem pós-hibridização: A lamínula foi removida cuidadosamente e a lâmina incubada em 2XSSC pH 7,0 a 70°C em banho-maria, por 5 minutos. Após este passo, a lâmina foi transferida para tampão 1xPBD (20% 20xSSC, 1%Triton 100, 1% leite em pó desnatado, água, pH 7,0) a temperatura ambiente.

e. Detecção: Sobre uma lamínula, foram aplicados 30uL da solução de detecção FITC-avidina+Tampão C (0,1M de bicarbonato de sódio pH=8,5 e 0,15M de cloreto de sódio). A lâmina foi então invertida sobre a lamínula e incubada por 30 minutos em câmara úmida (2xSSC) a 37°C. A lamínula foi removida cuidadosamente e a lâmina passou por 3 lavagens de 2 minutos cada, em 1xPBD a 45°C. Sobre outra lamínula foram colocados 40uL de solução anti-avidina/1xPBD e após a inversão da lâmina sobre a lamínula e incubação por 5 minutos em câmara úmida (2xSSC) a 37°C, o material passou por mais 3 lavagens em 1xPBD a 45°C. Mais uma incubação em solução de detecção foi realizado com 8 minutos de incubação seguido por outra série de lavagem em 1xPBD a 45°C.

f. Montagem da lâmina: Uma mistura de 20uL de antifade + 0,7uL de iodeto de propídio (50mg/mL) foram colocados sobre uma lamínula e esta foi invertida sobre a lâmina.

REFERÊNCIAS

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

APÊNDICE B - PROTOCOLO DE REAMPLIFICAÇÃO E MARCAÇÃO DAS SONDAS CROMOSSÔMICAS

A partir do produto primário de DNA, as sondas foram preparadas segundo Yang et al. (1997a). O produto primário da PCR foi reamplificado (2ª DOP-PCR) e marcado com biotina-16-dUTP, por DOP-PCR. O iniciador utilizado para a segunda amplificação e para a marcação da sonda foi o 6MW (5'CGACTCGAGNNNNNNATGTGG3') (TELENIUS et al., 1992). O produto do DOP-PCR deve ter segmentos com tamanho que variam entre 200 e 2000 pb.

Reagentes da 2ª DOP-PCR (volume final 25uL):

- 1µl de DNA cromossômico; 2,5µl de tampão 10x para PCR; 2,5µl de dNTP mix; 2,5µl de 6MW; 1,25µl de Mg₂Cl 50mM; 0,25µl de Taq Polimerase; 15µl de água ultrapura.

Os reagentes foram agitados em vórtex e centrifugados rapidamente, antes de serem levados para o termociclador (Tabela 01B).

Tabela 01B. Informações sobre a reação de DOP-PCR

Passo	Temperatura	Tempo	Ciclo
Desnaturação inicial	94°C	5 min	1
Desnaturação	94°C	1min 30seg	
Anelamento	62°C	1min 30seg	
Extensão	72°C	3min	
Extensão final	72°C	8 min	1
Pausa	4°C	-	-

d. Marcação por amplificação dos fragmentos cromossômicos

Neste trabalho, foi utilizado o dUTP ligado ao hapteno de visualização indireta, biotina-16-dUTP e que necessita de anticorpos ligados a fluorocromos para serem visualizados.

Reagentes para a reação de marcação da sonda (volume final de 25uL):

- 1µl de DNA cromossômico da segunda amplificação; 2,5µl de 6MW; 2,5µl de

tampão 10x para PCR; 2,0µl de dNTP mix (com metade da concentração de dTTP); 2,5µL de biotina-16-dUTP; 1,25µl de Mg₂Cl 50mM; 0,25µl de Taq Polimerase; 13µl de água ultrapura.

A reação no termociclador para marcação e incorporação da biotina-16-dUTP no DNA sonda seguiu os mesmos passos descritos na Tabela 01B.

e. Preparação e desnaturação cromossômica

As lâminas recém preparadas foram incubadas em solução de pepsina 1% em HCl (500uL pepsina em 50mL de HCl 10mM) por 1 a 2 minutos e lavadas 2 vezes em 2xPBS por 5 minutos, todas as incubações à temperatura ambiente.

Após este procedimento, a lâmina passou por uma série de desidratação em etanol 70%, 70%, 90% e 90% por 2 minutos e 100% por 4 minutos. Após a desidratação, a lâmina ficou por 1 hora a 60°C ou overnight por 37°C.

A desnaturação cromossômica foi realizada incubando-se a lâmina em solução de formamida 70%/2xSSC a 70°C por 45 segundos. Após este passo, a lâmina foi colocada em etanol 70% gelado por 4 minutos e seguiu para uma nova série de desidratação alcoólica à temperatura ambiente por 2 minutos em etanol 70%, 90%, 90% e por 4 minutos em etanol absoluto (100%).

f. Desnaturação da sonda

Em um microtubo, uma mistura de 14 mL da solução de hibridização (formamida 50%, sulfato dextran 10%, 2xSSC) mais 1mL (para hibridização espécie-específica) ou 13 mL de solução de hibridização com 2mL de sonda (para hibridização inter-específica) foi desnaturada a 70°C por 10 minutos e, deixada a 37°C por um período de 20 a 30 minutos para a reassociação das seqüências repetitivas de DNA.

g. Incubação

Os 15 uL de solução de hibridização foram colocados sobre a lâmina seca, preparada previamente. Uma lamínula foi colocada sobre a solução, vedada com selante e incubada em câmara úmida a 37°C por 24 horas quando a sonda e a

preparação cromossômica eram da mesma espécie (espécie-específica) ou por 72 horas quando as espécies eram diferentes (inter-específica).

h. Lavagens pós-hibridização

Após o selante e a lamínula serem removidos cuidadosamente, a lâmina passou por duas lavagens de 5 minutos cada em formamida 50%/2XSSC pH 7,0 a 45°C em banho-maria quando a hibridização era espécie-específica ou a 42°C quando era inter-específica. A lâmina passou por duas lavagens de 5 minutos em solução 2xSSC, nas mesmas condições de temperatura da lavagem anterior.

i. Detecção

Para detecção da hibridização, as sondas marcadas com biotina foram visualizadas com Cy3-estreptavidina (cianina-3 – estreptavidina conjugada).

Uma solução com 200uL de 4xSSC/0,5%Tween 20 e 0,4uL de Cy3-avidina foi colocada sobre a lâmina ainda úmida de 2xSSC, coberta com lamínula e incubada por 20 minutos a 37°C. Após a incubação a lamínula foi lavada por 3 vezes em 4xSSC/0,5%Tween 20 à temperatura ambiente.

j. Montagem da lâmina

Com as lâminas ainda úmidas, a solução de contracoloração (0,7µL iodeto de propídeo e 15 µL antifade ou em 15 uL de DAPI/antifade) foi colocada sobre o material. Uma lamínula foi colocada sobre a solução e vedada com esmalte.

REFERÊNCIAS

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