

MARINA ALVARADO DE MEDEIROS

**IDENTIFICAÇÃO DE CROMOSSOMOS B EM VEADO-CATINGUEIRO
(MAZAMA GOUAZOUBIRA) POR PINTURA CROMOSSÔMICA**

Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação apresentado à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, SP, para obtenção do grau de Médico Veterinário.

Preceptor: *Profa. Dra. Sheila Canevese Rahal*

Botucatu

2022

MARINA ALVARADO DE MEDEIROS

**IDENTIFICAÇÃO DE CROMOSSOMOS B EM VEADO-CATINGUEIRO
(MAZAMA GOUAZOUBIRA) POR PINTURA CROMOSSÔMICA**

Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação apresentado à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, SP, para obtenção do grau de Médico Veterinário.

Área de concentração: *Citogenética Animal*

Preceptor: *Profa. Dra. Sheila Canevese Rahal*

Coordenador de estágios: *Prof. Dr. José Paes de Oliveira Filho*

Botucatu

2022

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Medeiros, Marina Alvarado de.

Identificação de Cromossomos B em veado-catingueiro (*Mazama gouazoubira*) por pintura cromossômica / Marina Alvarado de Medeiros. - Botucatu, 2022

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Medicina Veterinária) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Orientador: Sheila Canevese Rahal

Capes: 20204000

1. Cervidae. 2. Cromossomos. 3. Hibridização in situ fluorescente. 4. Microdissecção. 5. Coloração cromossômica.

Palavras-chave: Cervidae; Cromossomo B; FISH; Microdissecção; Pintura cromossômica.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho de conclusão de curso é referente a iniciação científica desenvolvida por mim, Marina Alvarado de Medeiros, e financiada pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

Agradeço a FAPESP pelo financiamento que possibilitou a produção desse conteúdo científico, ao Núcleo de Pesquisa e Conservação de Cervídeos (NUPECCE), localizado em Jaboticabal – SP, ao Laboratório de Biologia e Genética de Peixes do Departamento de Biologia Estrutural e Funcional da Unesp de Botucatu – SP, ao orientador da iniciação científica, Prof. Dr. José Maurício Barbanti Duarte, com coorientação da Ma. Agda Maria Bernegossi e Dr. Duílio Mazzoni Zerbinato de Andrade Silva.

MEDEIROS, Marina Alvarado. *Identificação de Cromossomos B em Veado-Catingueiro (Mazama gouazoubira) por Pintura Cromossômica*. Botucatu, 2022, 20p. Trabalho de conclusão de curso de graduação (Medicina Veterinária, Área de concentração: Citogenética Animal) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

RESUMO

Os cervídeos neotropicais do gênero *Mazama* possuem características citogenéticas marcantes, sendo uma delas a presença de cromossomos B no cariótipo. A espécie *Mazama gouazoubira* ($2n = 70 + 0-3B$) destaca-se por um elevado polimorfismo cromossômico associada a ocorrência de cromossomos Bs. Os estudos dos cromossomos supranumerários nessa espécie são recentes e escassos de informações em relação à função e origem dos Bs. Dessa forma, o presente estudo identificou os diferentes tipos de cromossomos B de *M. gouazoubira* por meio da produção de sondas específicas. Para isso, fêmeas da espécie de diferentes localidades possuindo de 0 a 1 B foram selecionadas para a confecção de sondas, passando pelo processo de microdissecção. Cada sonda produzida foi testada na própria fêmea, nas outras fêmeas selecionadas e em outros nove indivíduos de diferentes populações possuindo números variados de Bs. Posteriormente, a técnica Hibridização *in situ* fluorescente (FISH) permitiu observar os resultados das marcações das sondas produzidas nas metáfases dos diferentes indivíduos. Observou-se marcações específicas em cromossomos B, centrômeros, telômeros e marcação somente em um dos Bs em metáfases 2B. Esses resultados demonstram que existem diferentes tipos de cromossomos B dentro da espécie *Mazama gouazoubira*. Ademais, propõem-se a possível ocorrência de origens recorrentes de Bs na espécie.

Palavras-chave: cromossomo B; Cervidae; pintura cromossômica; FISH; microdissecção.

MEDEIROS, Marina Alvarado. *Identification of B Chromosomes in Gray Brocket Deer (Mazama gouazoubira) by Chromosomic Painting*. Botucatu, 2022, 20p. Undergraduate Academic Program (Veterinary Medicine, Concentration Area: Animal Cytogenetics) – School of Veterinary Medicine and Animal Science, São Paulo State University (UNESP).

ABSTRACT

Neotropical deers from genus *Mazama* have have cytogenetic peculiarities, such as the presence of B chromosomes in the karyotype. The *Mazama gouazoubira* species ($2n = 70 + 0-3B$) is distinguished by a high chromosomal polymorphism associated with B chromosome occurrence. Supernumerary chromosome studies with this species are recent and scarce of information regarding the function and origin of Bs. Thus, the present study identified the different kinds of B chromosomes from *Mazama gouazoubira* by specific probes production. For this, females from different locations having 0 to 1 B were select to making probes through the microdissection process. Each probe produced was tested on same female, on the other females selected, and nine other individuals from different populations having varying numbers of Bs. Subsequently, the Fluorescence *in situ* Hybridization (FISH) technique allowed us to observe the results of hybridization signal in the metaphases of different individuals. Specific markings were observed on B chromosomes, centromeres, telomeres, and marking only on one of the Bs in 2B metaphases. These results demonstrate that there are different types of B chromosomes within the *Mazama gouazoubira* species. Furthermore, the possible occurrence of recurrent origins of Bs in the species is proposed.

Key words: B chromosome; Cervidae; chromosomic painting; FISH; microdissection

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	8
2. REVISÃO DA LITERATURA	8
2.1. FAMÍLIA CERVIDEA E <i>MAZAMA GOUAZOUBIRA</i>	8
2.2. CROMOSSOMOS B E ESTUDOS EM CERVÍDEOS.....	9
2.3. HIBRIDIZAÇÃO <i>IN SITU</i> FLUORESCENTE (FISH).....	10
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	11
3.1. ANIMAIS.....	11
3.2. CULTURA DE PELE E FIBROBLASTOS	12
3.3. OBTENÇÃO E MARCAÇÃO DAS SONDAS.....	12
3.3.1. Microdissecção Cromossômica.....	12
3.3.2. Amplificação e Reamplificação (WGA4 – Sigma).....	12
3.4. PINTURA CROMOSSÔMICA.....	13
4. RESULTADOS.....	13
4.1. SONDAS	13
4.1.1. Sonda T314 (Fazenda Nhumirim – MS).....	13
4.1.2. Sonda T303 (Fazenda Nhumirim – MS).....	13
4.1.3. Sonda T130 (Funilândia – MG)	14
5. DISCUSSÃO	14
6. CONCLUSÃO	15
REFERÊNCIAS.....	15
APÊNDICE A.....	18
APÊNDICE B.....	19
APÊNDICE C.....	20

1. INTRODUÇÃO

A família *Cervidae* apresenta grande variabilidade cariotípica, principalmente relatada no gênero *Mazama* (TOMAZELLA, 2016), posicionando a família entre as maiores taxas de evolução cariotípica entre os mamíferos, devido à fragilidade cromossômica, apresentando polimorfismo e cromossomos B (VARGASMUNAR, 2003, apud DUARTE *et al*, 2008).

Os cromossomos B foram descritos no cariótipo de diversos seres vivos, tanto em espécies de plantas, quanto em diferentes animais e fungos (KASAHARA, 2009; VUJOŠEVIĆ & BLAGOJEVIĆ, 2004). Esses elementos apresentam variação de número entre células, tecidos do mesmo indivíduo e populações. (VOLOBUJEV, 1981, apud CAMACHO *et al*, 2000).

A Hibridização *in situ* Fluorescente (FISH – Fluorescence *in situ* Hybridization) é uma ferramenta da citogenética molecular, que viabiliza delineamento refinado do DNA cromossômico (KASAHARA, 2009; LIEHR, 2017). Dessa forma, a FISH permite esclarecer a origem dos cromossomos e relação filogenética entre as espécies (KASAHARA, 2009; LEVSKY & SINGER, 2003; LIEHR, 2017).

Sendo assim, o presente estudo teve como objetivo aprofundar as análises por citogenética molecular dos cromossomos B na espécie *Mazama gouazoubira*. Foi efetuada revisão pertinente ao assunto, seguida do material e métodos, resultados, discussão e conclusão.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. FAMÍLIA CERVIDEA E MAZAMA GOUAZOUBIRA

A família *Cervidae* apresenta mais de 52 espécies descritas, composta por mamíferos ungulados com abundante diversidade em aspectos ecológicos, morfológicos, citogenéticos e moleculares, originado de uma grande variabilidade cariotípica, sendo o gênero *Mazama* um dos mais relatados nesse último aspecto (DUARTE *et al*, 2010; TOMAZELLA, 2016). Isso é observado no gênero

principalmente pela sua alta taxa de evolução cariotípica, proporcionando fragilidade cromossômica e cromossomos B (VARGASMUNAR, 2003, apud DUARTE *et al*, 2008).

O *Mazama gouazoubira* (veado-catingueiro) é a espécie do gênero *Mazama* de maior abundância na América do Sul, sendo observado em todos os biomas no Brasil, exceto Amazônia (BLACK-DÉCIMA *et al.*, 2010). Possui porte pequeno a médio, peso aproximado de 18 kg e exibe coloração variando do cinza escuro ao marrom-avermelhado (DUARTE, 2014). A espécie possui número diploide e fundamental igual a 70 com todos os autossomos acrocêntricos, sendo o cromossomo X o maior do lote e o Y o menor do lote e metacêntrico. Estudos com essa espécie observaram a presença de uma ou duas translocações Robertsonianas, além da presença de um a três cromossomos B (NEITZEL, 1987, apud DUARTE & JORGE, 1996).

2.2. CROMOSSOMOS B E ESTUDOS EM CERVÍDEOS

Os cromossomos B, sinonímia de cromossomos supranumerários ou acessórios, já foram descritos no cariótipo de diversos seres vivos (KASAHARA, 2009). Em mamíferos, aproximadamente 75 espécies foram reconhecidas contendo cromossomos B em seus cariótipos (VUJOŠEVIĆ & BLAGOJEVIĆ, 2004).

Esses elementos apresentam variação de número entre células, tecidos do mesmo indivíduo e populações (CAMACHO *et al*, 2000). Dessa forma, foram considerados por muito tempo dispensáveis visto que não são essenciais ao ciclo de vida normal dos organismos (VOLOBUJEV, 1981, apud CAMACHO *et al*, 2000). Ademais, observa-se diversidade em morfologia, composição molecular e origem (VUJOŠEVIĆ & BLAGOJEVIĆ, 2004).

Por muito tempo, foi considerado que esses cromossomos eram totalmente heterocromáticos e desprovidos de genes; portanto, inviáveis para a produção de proteínas e não contendo nenhuma função gênica (CAMACHO & PARKER, 1994 apud CAMACHO *et al*, 2000). No entanto, com o avanço da genética molecular, observou-se a ocorrência de genes em cromossomos B e expressão gênica,

demonstrando a necessidade de estudos para esclarecer o entendimento de sua função e evolução nos organismos (; TRIFONOV *et al.*, 2013; MIAO *et al.*, 1991, apud MAKUNIN *et al.*, 2014).

A origem dos cromossomos B é discutida por décadas desde seu primeiro relato em 1907 (WILSON, 1907, apud CAMACHO *et al.*, 2000). Estudos demonstram que as possíveis origens dos Bs podem ser intraespecíficas ou hibridização interespecífica (JONES & REES, 1982, apud CAMACHO *et al.*, 2000; PERFECTTI & WERREN, 2001; YOSHIDA *et al.*, 2011).

Dessa forma, a manutenção dos Bs nos cariótipos de determinadas populações e sua presença em somente algumas células do mesmo indivíduo são consequências do seu comportamento na segregação meiótica, em que sofrem não-disjunções mitóticas e meióticas, possuem meiose irregular e frequentemente não se emparelham entre si, não seguindo as Leis Mendelianas de Transmissão (CAMACHO *et al.*, 2000; KASAHARA, 2009).

As pesquisas com cromossomos B em cervídeos abrangeram ao longo dos anos, sendo relacionado com o polimorfismo cromossômico de espécies neotropicais e de outros continentes (TRIFONOV *et al.*, 2013; TOMAZELLA, 2016; MAKUNIN *et al.*, 2016).

Os cromossomos B apresentam padrão de morfologia nos cervídeos, sendo característicos por serem os menores do cariótipo (com exceção do cromossomo Y), facilitando sua visualização (MAKUNIN *et al.*, 2016). Além disso, observouse a presença de três genes no cromossomo B da espécie *C. pygargus*, no qual foi descrito mutações e transcrição de cópia de gene específico de B (TRIFONOV *et al.*, 2013; MAKUNIN *et al.*, 2016).

2.3. HIBRIDIZAÇÃO *IN SITU* FLUORESCENTE (FISH)

A Hibridização *in situ* Fluorescente (FISH – Fluorescence *in situ* Hybridization) se baseia na complementaridade entre a sonda (segmentos de DNA ou RNA) e o DNA-alvo no cromossomo, que será marcado já fixado em uma lâmina (KASAHARA, 2009; LIEHR, 2017). Segundo Kasahara (2009), essas sondas marcadas com fluorocromo reagem quando encontram seu complementar

no alvo e, por meio de um microscópio com luz UV e jogos de filtros, é possível ver a localização do segmento em questão. Dessa forma, a FISH é uma ferramenta importante na citogenética molecular e seus estudos (LEVSKY & SINGER, 2003; LIEHR, 2017).

As sondas cromossômicas podem ser obtidas por meio da microdissecção, que possibilita isolamento de regiões cromossômicas ou do cromossomo como um todo por agulhas de vidro utilizando um micromanipulador ou um raio laser (SPEICHER & CARTER, 2005; KASAHARA, 2009).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. ANIMAIS

Foram utilizadas amostras de pele e fibroblastos de 12 indivíduos da espécie *Mazama gouazoubira*. Destas, três amostras foram de fêmeas que possuem de zero a um cromossomo B para a produção das sondas, e as demais foram provenientes de machos e fêmeas de diferentes populações com variações na quantidade de cromossomos B. Os resultados apresentados na pesquisa e a identificação de cada animal estão presentes na Tabela 1.

Tabela 1: Identificação dos *Mazama gouazoubira* (n=12).

ID	Bs	Origem	I	Sonda T314 (FN 2)	Sonda T303 (FN 1)	Sonda T130 (MG 1)
T13	0-3	Pantanal de Poconé – MT	MT	Sem sinal	Sinal em um dos Bs	Sem sinal
T117	0-3	Tocantins	TO	Sinal em B	Sinal em 3B e centrômeros	Sinal em B e centrômeros
T126	0-1	Brasília - DF	DF	Sem sinal	NR	NR
T130	0-1	Funilândia - MG	MG 1	Sinal em B e centrômeros	Sinal em B e centrômeros	Sinal em B e centrômeros
T145	0-3	Paraíba	PB	Sinal em 3B	Sinal em 3B, centrômeros	Sinal em 2B, centrômeros e telômeros

T156	0-1	Corumbá - MS	MS	Sinal em B	Sinal em B e centrômeros	Sinal em B e centrômeros
T159	0-1	Guaxupé - MG	MG 2	Sinal em centrômeros	Sinal em centrômeros	Sem sinal
T177	0-1	Tatuí - SP	SP	Sinal em centrômeros	Sinal em centrômeros	NR
T191	0-2	Mangueirinha - PR	PR	Sinal em B e centrômeros	Sinal em B e centrômeros	Sinal em B e centrômeros
T303	0-1	Fazenda Nhumirim - MS	FN 1	Sinal em B e centrômeros	Sinal em B e centrômeros	Sinal em B e centrômeros
T314	0-1	Fazenda Nhumirim - MS	FN 2	Sinal em B	Sinal B e centrômeros	Sem sinal
T354	0-2	Farias Brito - CE	CE	Sinal em centrômeros	NR	NR

ID=identificação do espécime; Bs=número de cromossomos B; Origem = local de origem do indivíduo; I = identificação do animal por localidade; NR = indica não realização da FISH.

3.2. CULTURA DE PELE E FIBROBLASTOS

Para o cultivo de fibroblastos e pele, foi seguido o protocolo descrito por Verma e Babu (1995).

3.3. OBTENÇÃO E MARCAÇÃO DAS SONDAS

3.3.1. Microdissecção Cromossômica

Para a preparação de lamínulas para microdissecção cromossômica, foi seguido o proposto por Gribble *et al.* (2004).

3.3.2. Amplificação e Reamplificação (WGA4 – Sigma)

A amplificação do DNA do material microdissecado foi realizada com o kit GenomePlex Single Cell Whole Genome Amplification Kit (WGA4-Sigma), segundo instruções do fabricante. Os DNAs amplificados pelo método WGA4 (Sigma) foram marcados utilizando o kit GenomePlex Whole Genome Amplification Reamplification Kit (WGA3-Sigma), incluindo na reação o

nucleotídeo biotina-15-dUTP (Roche Applied Science), de acordo com as orientações do fabricante (GRIBBLE *et al.*, 2004).

3.4. PINTURA CROMOSSÔMICA

A pintura cromossômica foi realizada conforme proposto por Pinkel *et al.* (1986). As preparações submetidas à FISH foram analisadas na microscopia de fluorescência. As preparações cromossômicas foram fotografadas com uma câmera Zeiss AxioCam MRm acoplada ao microscópio Olympus BX60 (objetiva de 60x), com auxílio do programa Axio Vision Release 4.8.2. As imagens obtidas foram editadas com o auxílio do programa Adobe Photoshop CS6 Portable.

4. RESULTADOS

4.1. SONDAS

4.1.1. Sonda T314 (Fazenda Nhumirim – MS)

A sonda T314 marcou em todos os Bs dos animais da pesquisa, exceto os animais MT, DF e CE. Além da marcação em cromossomo B, foi observado sinal em centrômero dos animais TO, MG 1, MG 2, PR, FN 1. Outro resultado observado foi em que não houve sinal em B do animal SP, somente nos centrômeros, constatando que a sonda foi efetiva na lâmina (Apêndice A). Em MG 2 foi encontrado uma metáfase com B, em que não houve sinal tanto em centrômeros quanto em B. Os animais CE e DF não foram constatados B nas FISH realizadas, o que é justificado pela baixa frequência de B; no entanto, CE apresentou sinal em todos os centrômeros. Por meio da imagem de DAPI (Apêndice A) é possível classificar os cromossomos como eucromáticos.

4.1.2. Sonda T303 (Fazenda Nhumirim – MS)

A sonda T303 obteve sinal em todos os cromossomos B dos animais em que foi realizado a FISH. Foi observado que o animal MT apresentou diferença de marcação em dois cromossomos B da mesma metáfase, em que somente um obteve sinal. O animal TO apresentou metáfase com três cromossomos B de intensidades diferentes. Ademais, os animais TO, MG 1, PB, MS, MG 2, SP, PR, FN 1, FN 2

apresentaram sinal em centrômero (Apêndice B). Os animais MG2 e SP não apresentaram metáfase com B, o que é justificado pela baixa frequência de B, no entanto apresentaram sinal em todos os centrômeros, evidenciando que a sonda foi efetiva na metáfase.

4.1.3. Sonda T130 (Funilândia – MG)

A sonda T130 marcou os cromossomos B dos animais realizado a FISH, exceto MT, MG 2 e FN 2. Os animais TO, MG 1, PB, MS, PR e FN 1 apresentaram sinal em centrômero. Ademais, o PB obteve sinal em telômero (Apêndice C).

5. DISCUSSÃO

O gênero *Mazama* apresenta alta variabilidade cariotípica, devido a sua elevada taxa de evolução cromossômica (VARGAS-MUNAR, 2003, apud DUARTE *et al*, 2008). *Mazama gouazoubira* é a espécie com menor quantidade de cromossomos B dentro do gênero (0-3) e apresenta uma das maiores taxas de polimorfismo cromossômico (TOMAZELLA, 2016). Os estudos dos cromossomos B nessa espécie são recentes e escassos de informações. Dessa forma, o presente trabalho obteve resultados que permitem avançar na compreensão dos cromossomos B da espécie.

A partir da visualização do DAPI na FISH, foi possível observar cromossomos B eucromáticos. Tomazella (2016) descreveu dois tipos de cromossomos B com base no padrão de cromatina: centrômero heterocromático e braços eucromáticos e outro totalmente eucromático; no entanto, já foi relatado Bs totalmente heterocromáticos na espécie (RESENDE, 2012), sendo possível a ocorrência de três tipos de cromossomo B em *M. gouazoubira*. A heterocromatina constitutiva está associada a presença de sequências de DNAs satélites (CAMACHO *et al.*, 2000), possibilitando inferir que alguns cromossomos B da espécie apresentam esse componente (TOMAZELLA, 2016).

A presença de cromossomos B heterocromáticos e eucromáticos possibilita a hipótese de uma origem recorrente, na qual os Bs teriam surgido em momentos distintos. Desta forma, os Bs que surgiram antes estariam mais degenerados (heterocromáticos) comparativamente com outros que emergiram

posteriormente, contendo mais sequências ancestrais (eucromáticos). A degeneração dos cromossomos B heterocromáticos poderia ter se dado a partir do acúmulo de DNAs repetitivos, tais como DNAs satélites, elementos transponíveis e pseudogenes (CAMACHO *et al.*, 2005; MARTIS *et al.*, 2012). Essa hipótese pode ser representada nos animais que apresentavam mais de um B na mesma metáfase e que não apresentaram marcação em ambos, como o T13 – MT.

A diferença de sinal em cromossomos B na mesma metáfase indica o acúmulo de diferentes B no mesmo indivíduo, visto que não são cromossomos homólogos. Além disso, 15 diferentes ensaios com as sondas apresentaram marcações distintas em um mesmo indivíduo, como é o caso do animal T13 com as sondas T303 e T314, reforçando a ocorrência de diferentes tipos de cromossomo B dentre os indivíduos.

Ademais, a presença de marcação em centrômeros e telômeros recapitula a suposição da origem intraespecífica de Bs, em que estes derivam de fragmentos dos cromossomos A após a ocorrência de fusões ou amplificações (JONES; REES, 1982, apud CAMACHO *et al.*, 2000; YOSHIDA *et al.*, 2011).

6. CONCLUSÃO

Os dados aqui apresentados permitiram o avanço frente ao conhecimento dos cromossomos B de *Mazama gouazoubira*. As diferentes marcações a partir da pintura cromossômica indicam que estes cromossomos apresentam sequências distintas, sendo assim, os mecanismos moleculares empregados por cada um deles para obter sucesso por meio das divisões celulares podem ser diferentes.

REFERÊNCIAS

BLACK-DÉCIMA, P.; ROSSI, R. V.; VOGLIOTTI, A.; CARTES, J. L.; MAFFEI, L.; DUARTE, J. M. B.; *et al.* Brown brocket deer *Mazama gouazoubira* (Fischer 1814). In: DUARTE, J. M. B.; GONZÁLEZ, S. **Neotropical cervidology: biology and medicine of latin american deer**. Jaboticabal: FUNEP/IUCN, 2010. p. 190-201.

CAMACHO, J. P. M. B. Chromosomes. In: GREGORY, T. R. **The evolution of the genome**. London: Academic Press, cap. 4, p. 223-286, 2005.

CAMACHO, J. P.; SHARBEL, T. F.; BEUKEBOOM, L. W. B-chromosome evolution. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London: series B**, biological sciences, London, v. 355, n. 1394, p. 163-178, 2000.

DUARTE, J. M. B. Artiodactyla - Cervidae (Veados e Cervos). In: CUBAS, Z. S.; SILVA, J. C. R.; CATÃO-DIAS, J. L. **Tratado de animais selvagens: medicina veterinária**. 2. ed. São Paulo: ROCA, p. 1204-1208, 2014.

DUARTE J. M. B.; GONZALEZ, S. **Neotropical cervidology: biology and medicine of latin american deer**. Jaboticabal: FUNEP e IUCN, p. 394, 2010.

DUARTE, J. M. B.; GONZÁLEZ, S.; MALDONADO, J. E. The surprising evolutionary history of South American deer. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, San Diego, v. 49, n. 1, p. 17-22, 2008.

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

GRIBBLE, S.; NG, B. L.; PRIGMORE, E.; BURFORD, D. C.; CARTER, N. P. Chromosome paints from single copies of chromosomes. **Chromosome Research**, Dordrecht, v. 12, n. 2, p. 143-151, 2004.

KASAHARA, S. **Introdução à pesquisa de citogenética em vertebrados**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 2009.

LEVSKY, J. M.; SINGER, R. H. Fluorescence in situ hybridization: past, present and future. **Journal of Cell Science**, Cambridge, v. 116, p. 2833-2838, pt. 14, 2003.

LIEHR, T. Classification of FISH Probes. In: LIEHR, T. **Fluorescence In Situ Hybridization (FISH)**. 2. ed. Berlin: Springer Protocols Handbooks, p. 43-47. 2017.

MAKUNIN, A. I.; DEMENTYEVA, P. V.; GRAPHODATSKY, A. S.; VOLOBOUEV, V. T.; KUKEKOVA, A. V.; TRIFONOV, V. A. Genes on B chromosomes of vertebrates. **Molecular Cytogenetics**, London, v. 7, n. 1, p. 99, 2014.

MARTIS, M. M.; KLEMME, S.; BANAEI-MOGHADDAM, A. M.; BLATTNER, F. R.; MACAS, J.; SCHMUTZER, T.; *et al.* Selfish supernumerary chromosome reveals its origin as a mosaic of host genome and organellar sequences.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, Washington, v. 109, n. 33, p. 13343-13346, 2012.

PERFECTTI, F.; WERREN, J. H. The interspecific origin of B chromosomes: experimental evidence. **Evolution: international journal of organic evolution**, Lawrence, v. 55, n. 5, p. 1069-1073, 2001

PINKEL, D.; STRAUME, T.; GRAY, J.W. Cytogenetic analysis using quantitative, high sensitivity, fluorescence hybridization. *Proc Natl Acad Sci.* vol 83, p. 2934-2938, 1986.

RESENDE, J. P. A. **Comparação cariotípica entre *Mazama gouazoubira* e *Mazama nemorivaga* (artiodactyla; cervidae) por meio de marcadores citogenéticos clássicos, fish telomérica e pintura cromossômica.** 2012. 60 f. Tese (Mestrado em Genética e Melhoramento Animal) - Universidade Estadual Paulista, Ilha Solteira, 2012.

SPEICHER, M. R.; CARTER, N. P. The new cytogenetics: blurring the boundaries with molecular biology. **Nature Reviews Genetics**, London, v. 6, n. 10, p. 782-792, 2005.

TOMAZELLA, I. M. **Análise de Polimorfismo Cromossômico em *Mazama gouazoubira* (Artiodactyla; Cervidae): implicações para a evolução cariotípica em cervidae.** 2016. 108 f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento Animal) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2016.

TRIFONOV, V. A.; DEMENTYEVA, P. V.; LARKIN, D. M.; O'BRIEN, P. C. M.; PERELMAN, P. L.; YANG, F.; *et al.* Transcription of a protein-coding gene on B chromosomes of the Siberian roe deer (*Capreolus pygargus*). **BMC Biology**, London, v. 11, p. 90, 2013.

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

VUJOŠEVIĆ, M.; BLAGOJEVIĆ, J. B chromosomes in populations of mammals. **Cytogenetic and Genome Research**, Basel, v. 106, n. 2-4, p. 247-256, 2004.

YOSHIDA, K.; TERA, Y.; MIZOIRI, S.; AIBARA, M.; NISHIHARA, H.; WATANABE, M.; *et al.* B chromosomes have a functional effect on female sex determination in Lake Victoria cichlid fishes. **PLoS Genetics**, San Francisco, v. 7, n. 8, p. e1002203, 2011.

APÊNDICE A

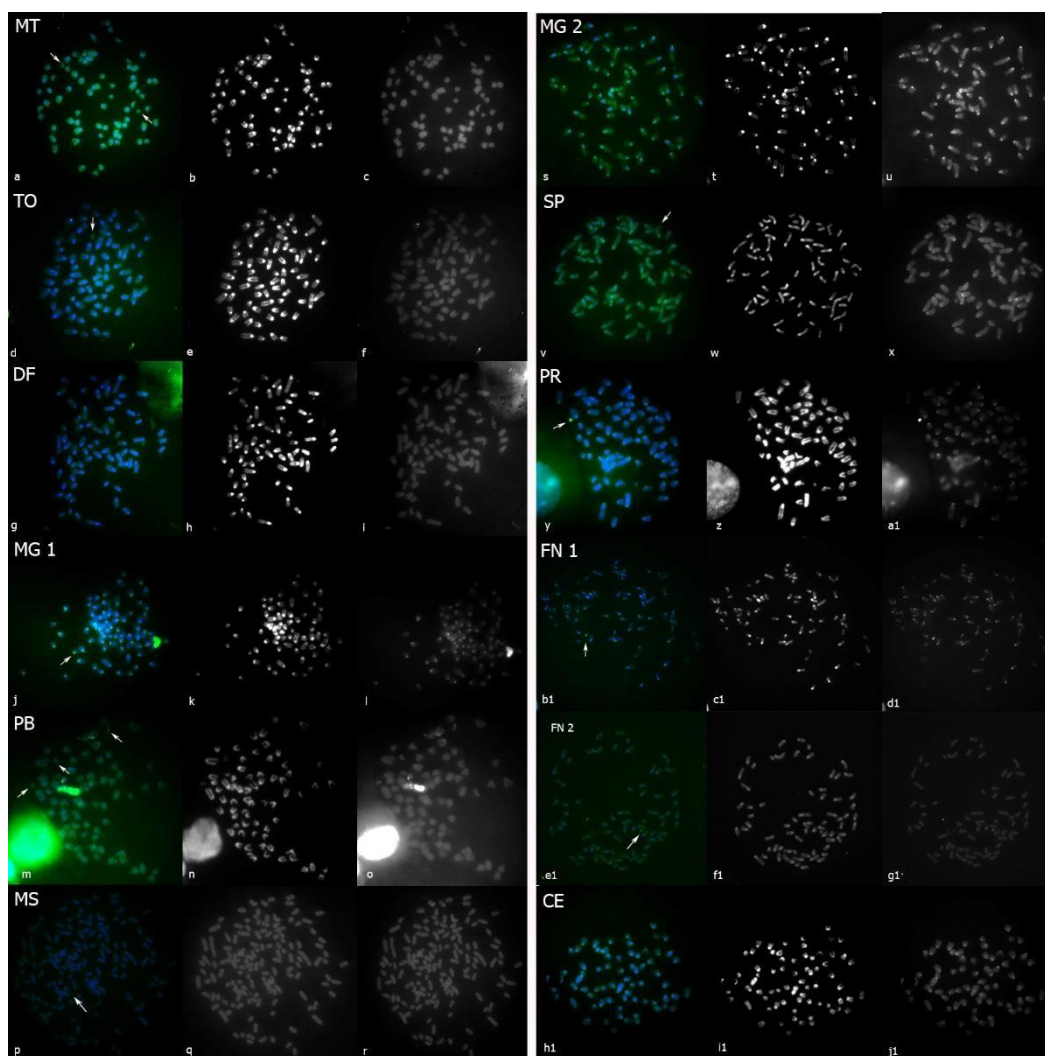


Figura 1: FISH realizadas dos animais utilizando a sonda T314, dividida em 2 colunas principais por uma linha branca. Em cada coluna principal, da esquerda para direita: FITC com DAPI; DAPI e FITC. Cada linha se refere a um animal, identificado com a foto da primeira coluna da esquerda para direita. As setas indicam o cromossomo B.

APÊNDICE B

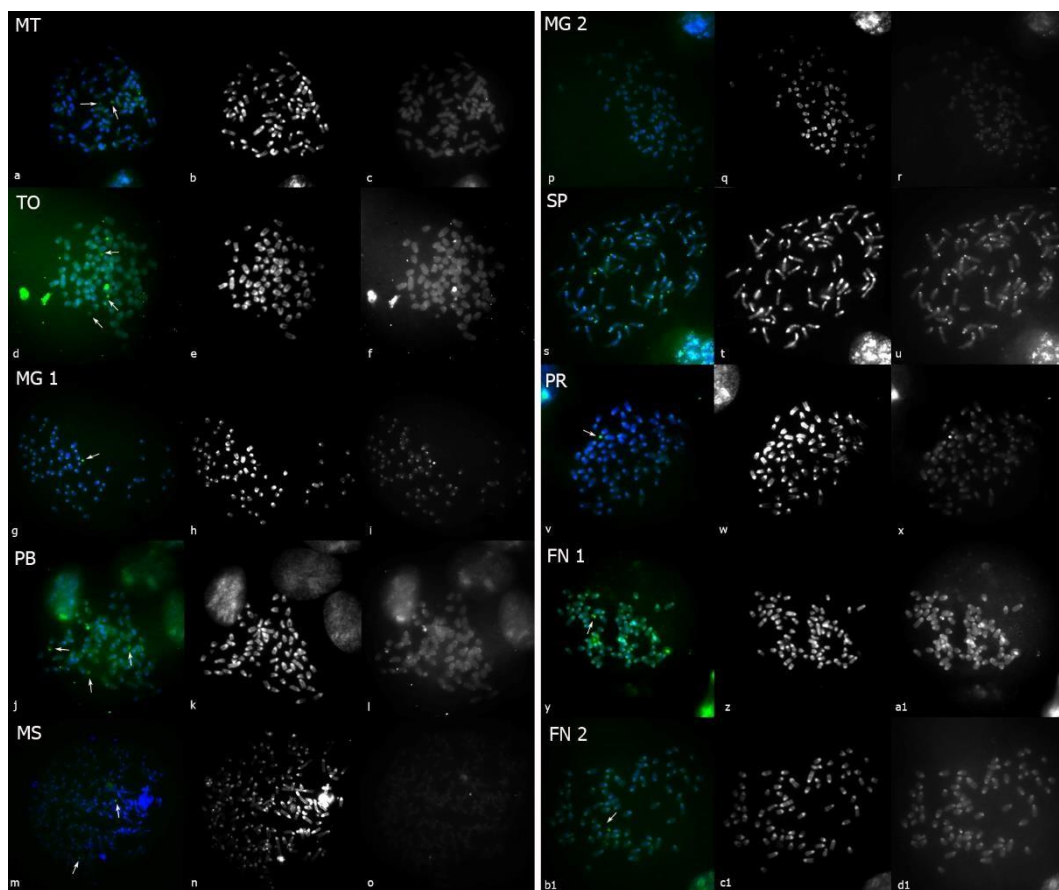


Figura 2: FISH realizadas dos animais utilizando a sonda T303, dividida em 2 colunas principais por uma linha branca. Em cada coluna principal, da esquerda para direita: FITC com DAPI; DAPI e FITC. Cada linha se refere a um animal, identificado com a foto da primeira coluna da esquerda para direita. As setas indicam o cromossomo B.

APÊNDICE C

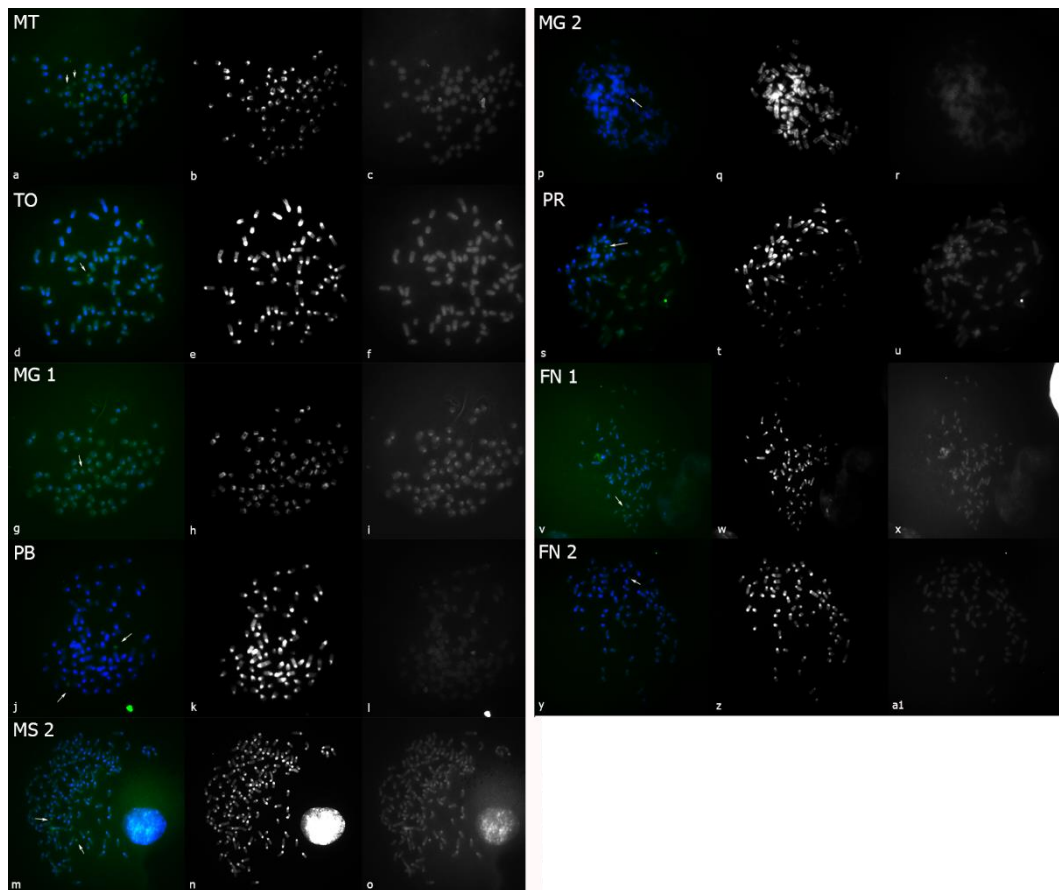


Figura 3: FISH realizadas dos animais utilizando a sonda T130, dividida em 2 colunas principais por uma linha branca. Em cada coluna principal, as colunas da esquerda para direita: FITC com DAPI; DAPI e FITC. Cada linha se refere a um animal, identificado com a foto da primeira coluna da esquerda para direita. As setas indicam o cromossomo B.