UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP

CÂMPUS DE JABOTICABAL

ANÁLISE DE POLIMORFISMO CROMOSSÔMICO EM *Mazama gouazoubira* (ARTIODACTYLA; CERVIDAE): IMPLICAÇÕES PARA A EVOLUÇÃO CARIOTÍPICA EM CERVIDAE

Iara Maluf Tomazella

Bióloga

2016

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP

CÂMPUS DE JABOTICABAL

ANÁLISE DE POLIMORFISMO CROMOSSÔMICO EM *Mazama gouazoubira* (ARTIODACTYLA; CERVIDAE): IMPLICAÇÕES PARA A EVOLUÇÃO CARIOTÍPICA EM CERVIDAE

Iara Maluf Tomazella

Orientador: Prof. Dr. José Maurício Barbanti Duarte

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

2016

Tomazella, Iara Maluf
T655i Análise de polimorfismo cromossômico em *Mazama gouazoubira* (ARTIODACTYLA; CERVIDAE): implicações para a evolução cariotípica em Cervidae / Iara Maluf Tomazella. – – Jaboticabal, 2016
xii, 108 f. : il. ; 29 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2016
Orientador: José Maurício Barbanti Duarte
Banca examinadora: Denise Crispim Tavares, Patrícia Pasquali Parise Maltempi, Fausto Foresti, Jackson Antônio Marcondes de Souza
Bibliografia

1. *Mazama gouazoubira*. 2. Sítios frágeis. 3. Translocação Robertsoniana. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 599.735.3:575

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.
e-mail: iara_tomazella@hotmail.com

unesp

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: ANÁLISE DE POLIMORFISMO CROMOSSÔMICO EM *Mazama gouazoubira* (ARTIODACTYLA; CERVIDAE): IMPLICAÇÕES PARA A EVOLUÇÃO CARIOTÍPICA EM CERVIDAE

AUTORA: IARA MALUF TOMAZELLA
ORIENTADOR: JOSÉ MAURICIO BARBANTI DUARTE

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em GENÉTICA E MELHORAMENTO ANIMAL, pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. JOSÉ MAURICIO BARBANTI DUARTE
Departamento de Zootecnia / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Profa. Dra. PATRICIA PASQUALI PARISE MALTEMPI
Departamento de Biologia / IB-Rio Claro

Prof. Dr. FAUSTO FORESTI
Departamento de Morfologia / Instituto de Biociências de Botucatu

Profa. Dra. DENISE CRISPIM TAVARES
Departamento de Ciências Biológicas / Universidade de Franca

Prof. Dr. JACKSON ANTONIO MARCONDES DE SOUZA
Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Jaboticabal, 01 de dezembro de 2016

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

IARA MALUF TOMAZELLA – Nascida em 11 de setembro de 1986, na cidade de Batatais, SP, Brasil, graduou-se em Bacharelado em Ciências Biológicas em dezembro de 2009, pela Universidade de Franca, Franca, SP. Durante a graduação, fez estágio e Iniciação Científica no Laboratório de Mutagênese e Citogenética da Universidade de Franca, no período de março de 2007 a dezembro de 2009, sob a orientação da Prof. Dra. Denise Crispim Tavares. Recebeu bolsa de Iniciação Científica da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (2009/00755-6) - durante o ano de 2009. Em agosto de 2010, iniciou o curso de Mestrado em Genética e Melhoramento Animal na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal (FCAV/UNESP) e, durante a execução deste trabalho, recebeu bolsa de Mestrado da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (2010/03627-6). Concluiu a dissertação de Mestrado com o tema “Identificação dos cromossomos de *Mazama gouazoubira* (ARTIODACTYLA; CERVIDAE) envolvidos em rearranjos induzidos pela doxorrubicina”, no ano de 2012. Ingressou no curso de Doutorado em março de 2013, no mesmo programa e na mesma unidade, sob a orientação do Prof. Dr. José Maurício Barbanti Duarte. Nos três primeiros meses de Doutorado, recebeu bolsa financiada pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, sendo que após esse período, a bolsa de Doutorado foi financiada pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (2013/06100-7). Desde janeiro de 2010, quando tornou-se integrante do Núcleo de Pesquisa e Conservação de Cervídeos – NUPECCE, desenvolve pesquisas na área de Citogenética, participando de diversos projetos e coorientando alunos de Iniciação Científica.

“A alegria não chega apenas no encontro do achado, mas faz parte do processo da busca. E ensinar e aprender não pode dar-se fora da procura, fora da boniteza e da alegria”

Paulo Freire

Aos meus pais,

***Martha** e **Fábio**,*

*e a minha irmã **Carla**,*

pelo amor incondicional e por todo

apoio, fé e confiança que sempre

depositaram em mim e,

às minhas amadas avós,

***Lourdes** e **Olga** (in memorian),*

por todo carinho e exemplos de bondade.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. José Maurício Barbanti Duarte, pela orientação, confiança, ensinamentos e pela enorme contribuição para minha formação acadêmica e crescimento profissional.

Aos professores Dr. Fausto Foresti e Dr. Cláudio de Oliveira, especialmente a Dra. Patrícia Elda Sobrinho Scudeler, pelo suporte e realização das microdissecções conduzidas no Laboratório de Biologia e Genética de Peixes, do Instituto de Biociências, UNESP/Botucatu.

Ao Dr. Diogo Teruo Hashimoto, pela disponibilidade e ajuda com algumas técnicas moleculares.

Ao técnico do laboratório João Airton Bôer, por toda ajuda e auxílio no laboratório, pela boa convivência, torcida e pelas conversas nos momentos de descontração.

Ao Prof. Dr. Jackson Antônio Marcondes de Souza, pelos ensinamentos durante a realização do estágio docência nas disciplinas Genética Básica e Genética Aplicada.

Aos integrantes e ex-integrantes do Núcleo de Pesquisa e Conservação de Cervídeos (NUPECCE), pela boa convivência e trabalho em equipe, especialmente aos amigos da genética Jorge, Lorena, Carol, Marina, pelos momentos felizes e trocas de experiências. Em especial, à Eveline e Vanessa, pelos ensinamentos e conselhos acadêmicos, à Luciana, por todas as conversas que ajudaram a dimunuir toda a angústia do final desse ciclo, e à Louise e Aline, por toda amizade, conversas, festas e congressos.

Às minhas orientadas de iniciação cientifica Janaína, Nadime e Gabriela, pela confiança e carinho, em especial à Mirela, por toda ajuda e amizade.

A toda família Maluf e Tomazella, por todo amor, torcida, alegrias compartilhadas e por permanecermos sempre unidos, tornando minha vida mais leve e feliz. Em especial a tia Santina, por todo suporte, preocupação e incentivo, e a pequena Lili, por ter trazido mais luz e alegria para nossa família.

Ao meu namorado, companheiro e amigo Fernando, por todo amor, dedicação, paciência e compreensão por todos os momentos que estive ausente.

Às minhas queridas Carla, Lívia, Mariana, Ariani e Nathália, por toda amizade, amor, companheirismo e torcida, que reforçam cada vez mais nossos laços de irmandade.

À Luna, a vira-lata mais linda que sempre me recebeu com muito aconchego quando chegava em casa.

Aos meus queridos afilhados Du e Davi, e sobrinhos do coração Arthur e Gregório, por todo carinho, felicidade e honra de tê-los em minha vida.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP – Processo número 2013/06100-7) pela concessão de 38 meses de bolsa de Doutorado e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão de 3 meses de bolsa de Doutorado.

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Câmpus de Jaboticabal, em especial ao departamento de Zootecnia e ao Setor de Animais Silvestres, e ao Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento Animal.

A todos que aqui não citei, mas de alguma forma contribuíram com essa conquista.

SUMÁRIO

	Página
CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS...	iii
RESUMO.....	iv
ABSTRACT.....	v
LISTA DE ABREVIATURAS.....	vi
LISTA DE TABELAS.....	viii
LISTA DE FIGURAS.....	x
CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	1
Introdução.....	1
Revisão bibliográfica.....	3
Família Cervidae e gênero *Mazama*.....	3
Citogenética geral, da família Cervidae e do gênero *Mazama*...	6
Mazama gouazoubira e suas particularidades citogenéticas.....	11
Cromossomos B.....	15
Rearranjos cromossômicos e seu papel na evolução cromossômica.....	17
Fragilidade cromossômica.....	20
Referências.....	21
CAPÍTULO 2 – IDENTIFICAÇÃO DOS CROMOSSOMOS ENVOLVIDOS NAS TRANSLOCAÇÕES ROBERTSONIANAS EM *Mazama gouazoubira* (MAMMALIA; CERVIDAE).....	30
Resumo.....	30
Introdução.....	31
Material e métodos.....	32
Resultados.....	35
Análise convencional.....	35
Biometria cromossômica.....	38
Identificação dos cromossomos envolvidos nas translocações Robertsonianas.....	39
Confirmação das translocações X-autossômicas.....	42
Hibridizações com sondas dos cromossomos translocados.....	45
Distribuição das translocações Robertsonianas na população brasileira de *M. gouazoubira*.....	46
Discussão.....	47
Conclusão.....	52
Referências.....	53
CAPÍTULO 3 – VARIABILIDADE E DIFERENCIAÇÃO DOS CROMOSSOMOS B ENTRE INDIVÍDUOS DE *Mazama gouazoubira* (MAMMALIA; CERVIDAE).....	58
Resumo.....	58
Introdução.....	59
Material e métodos.....	60
Resultados.....	63
Discussão.....	69
Conclusão.....	74

Referências..... 74
CAPÍTULO 4 – LOCALIZAÇÃO DOS SÍTIOS FRÁGEIS COMUNS EM *Mazama gouazoubira* (MAMMALIA; CERVIDAE) E SUA RELAÇÃO COM O POLIMORFISMO CROMOSSÔMICO..... 79
Resumo..... 79
Introdução..... 80
Material e métodos..... 81
Cultivos celulares e indução de sítios frágeis..... 81
Coloração convencional – Giemsa..... 82
Bandamento G..... 83
Resultados..... 83
Análise do índice mitótico e dos sítios frágeis comuns..... 83
Identificação dos cromossomos portadores de SFCs e localização dos SFCs dentro de cada cromossomo..... 88
Discussão..... 89
Conclusão..... 92
Referências..... 93
CAPÍTULO 5 – CONCLUSÕES GERAIS E SUAS IMPLICAÇÕES.... 96
Apêndice A..... 98
Apêndice B..... 102
Cultivos de fibroblastos..... 102
Cultivos de linfócitos..... 103
Coloração convencional (Giemsa)..... 103
Referências..... 104
Apêndice C..... 105
1 – Construção das sondas teloméricas..... 105
2 – Construção das sondas de rDNA 5S..... 106
3 – Construção das sondas de rDNA 18S..... 107
Referências..... 108

unesp UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Jaboticabal

CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 010640/13 do trabalho de pesquisa intitulado **"Análise do polimorfismo cromossômico em *Mazama gouazoubira* (Artiodactyla; Cervidae); implicações para a evolução cariotípica em Cervidae"**, sob a responsabilidade do Prof. Dr. José Mauricio Barbanti Duarte, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), em reunião ordinária de 09 de outubro de 2014.

Jaboticabal, 09 de outubro de 2014.

Prof.ª Dr.ª Paola Castro Moraes
Coordenadora – CEUA

Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias
Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane, s/n CEP 14884-900 - Jaboticabal - SP - Brasil
Tel. 16 3209 2600 - fax 16 3202 4275 www.fcav.unesp.br

ANÁLISE DE POLIMORFISMO CROMOSSÔMICO EM *Mazama gouazoubira* (ARTIODACTYLA; CERVIDAE): IMPLICAÇÕES PARA A EVOLUÇÃO CARIOTÍPICA EM CERVIDAE

RESUMO - *Mazama gouazoubira* (2n=70; NF=70), popularmente chamado de veado-catingueiro, é conhecido por apresentar fragilidade cromossômica, responsável pela variação cromossômica intraespecífica, caracterizada pela presença de translocações Robertsonianas e cromossomos B. Não existem dados sobre a localização das regiões cromossômicas envolvidas com os rearranjos em *M. gouazoubira* e com a possível existência de sítios frágeis (SFs) nos pontos em que ocorrem esses rearranjos. Assim, torna-se necessário avaliar o polimorfismo cromossômico apresentado pela espécie e identificar os SFs, investigando sua relação com o polimorfismo. Dos 135 animais analisados, 68 (50,37%) são individuos variantes, 47 animais (69,12%) apresentaram cromossomos B, seis animais (8,82%) são heterozigotos para uma translocação Robertsoniana, um indivíduo (1,47%) é homozigoto para uma translocação Robertsoniana, 14 animais (20,59%) são portadores de cromossomos B e heterozigotos para uma translocação Robertsoniana. Foram identificados sete tipos distintos de translocações (X;16, X;21, 7;21, 8;21, 4;16, 20;26, 14;16), envolvendo nove cromossomos diferentes. As translocações X-autossômicas foram confirmadas pelas técnicas de banda C, coloração Ag-RON, hibridização *in situ* fluorescente (FISH) com sondas teloméricas e pintura cromossômica com a sonda específica do cromossomo X. Foi observada uma grande variabilidade de cromossomos B entre os indivíduos analisados, sendo esses cromossomos altamente heterogêneos em relação aos padrões de distribuição de heterocromatina, presença e quantidade de rDNA nas regiões organizadores de nucléolos (RON), localização de sequências teloméricas e homologias entre lotes A e B. A afidicolina foi um eficiente indutor de sítios frágeis comuns (SFCs), revelando a ocorrência de SFCs na forma de “gaps” e quebras, tanto cromatídicas como cromossômicas. A técnica de banda G localizou 531 SFCs distribuídos em 18 pares cromossômicos (X, 1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 11, 13, 14, 16, 17, 18, 21, 22 e 34), sendo que a maioria está localizada em pontos de transição entre as bandas claras e as bandas escuras. As diferentes taxas de SFCs apresentada por cada cromossomo mostrou que alguns pares cromossômicos são mais frágeis do que outros. Dos 18 pares cromossômicos com SFCs, sete estão relacionados com as translocações Robertsonianas observadas no veado-catingueiro e somente um cromossomo envolvido no polimorfismo não possui SFCs. Assim, o polimorfismo cromossômico apresentado pelo *M. gouazoubira* pode estar relacionado com a fragilidade cromossômica. É necessário aprofundar os estudos para entender qual o impacto desse polimorfismo na população brasileira do veado-catingueiro.

Palavras-chave: cromossomos B, FISH, sítios frágeis, translocação Robertsoniana, veado-catingueiro

ANALYSIS OF CHROMOSOMAL POLYMORPHISM IN *Mazama gouazoubira* (ARTIODACTYLA; CERVIDAE): IMPLICATIONS FOR CERVIDAE KARYOTYPE EVOLUTION

ABSTRACT - *Mazama gouazoubira* (2n = 70; FN = 70), popylarly known as brown brocket deer, is known to have chromosomal fragility, which is responsible for intraspecific chromosome variation, characterized by the presence of Robertsonian translocations and B chromosomes. There are no data of the location of the chromosome regions involved in rearrangements of *M. gouazoubira* and the possible existence of fragile sites (FSs) in points where breaks occur. Thus, it is necessary to evaluate the chromosomal polymorphism presented by this species and to identify the FSs, investigating the relationship between FSs and polymorphism. Were analyzed 135 animals, of which 68 (50.37%) were variant individuals, 47 animals (69.12%) had B chromosomes, six animals (8.82%) were heterozygous for a Robertsonian translocation, one individual (1.47%) was homozygous for a Robertsonian translocation, 14 animals (20.59%) presented both B chromosomes and heterozygotes for a Robertsonian translocation. Were identified seven different types of translocations (X;16, X;21, 4;16, 14;16, 7;21, 20;26, 8;21) involving nine different chromosomes. X-autosomal translocations were confirmed by C-banding, Ag-NOR staining, Fluorescence in situ hybridization (FISH) with telomeric probes and chromosome painting with X chromosome-specific probe. A large variability of B chromosomes was observed among the analyzed individuals. These chromosomes were highly heterogeneous in relation to pattern of heterochromatin distribution, presence and amount of rDNA in nucleolar organizer region (NOR), lozalization of telomeric sequences and homologies between chromosome complements A and B. Aphidicolin was an efficient inducer of common fragile sites (CFSs), showing the occurrence of CFSs in gaps and breaks, both chromatid and chromosomal. The G-banding located 531 CFSs distributed in 18 chromosome pairs (X, 1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 11, 13, 14, 16, 17, 18, 21, 22 and 34). It was found that the most CFSs are localized at the boundaries between the bright bands and dark bands. The different rates of CFSs presented by each chromosome showed that some chromosome pairs are more fragile than others. Of the 18 chromosomes pais with CFSs, seven are related to the Robertsonian translocations observed in brown brocket deer, and only one chromosome involved with polymorphism does not have CFSs. Thus, the chromosomal polymorphism presented by *M. gouazoubira* may be related to chromosomal fragility. It is necessary to deepen the studies to understand the impact of this polymorphism on the Brazilian population of brown brocket deer.

Keywords: B chromosomes, FISH, fragile sites, Robertsonian translocation, brown brocket deer

LISTA DE ABREVIATURAS

2n = número diploide
2XSSC = solução salina de citrato de sódio duas vezes concentrada
AF25 = cultivos tratados com 25 µL de afidicolina
AF50 = cultivos tratados com 50 µL de afidicolina
BG = banda G
C.C. = cultivos controle
CR = comprimento relativo
DAPI = 4'-6-diamidino-2-fenilindol
DMEM = Meio essencial mínimo modificado de Dulbecco
DMSO = dimetilsulfóxido
DNA = ácido desoxirribonucléico
DOP-PCR = "Degenerate Oligonucleotide Primer – Polymerase Chain Reaction"
DP = desvio padrão
FISH = Hibridização *in situ* fluorescente
Gcr = "gap" cromossômico
Gct = "gap" cromatídico
HCl = ácido clorídrico
ICZN = "International Commission on Zoological Nomenclature"
ID = idiograma
IM = índice mitótico
IUCN = "International Union for Conservation of Nature"
m = cromossomo metacêntrico
NF = número fundamental
Pb = pares de bases
PBS = solução salina tamponada com fosfato
PCR = "Polymerase Chain Reaction"
Qcr = quebra cromossômica
Qct = quebra cromatídica
r = razão de braços cromossômicos
rDNA = DNA ribossômico

RON = região organizadora de nucléolo

rRNA = RNA ribossômico

SFB = soro fetal bovino

SFCs = sítios frágeis comuns

SFs = sítios frágeis

sm = cromossomo submetacêntrico

STI = sítio telomérico intersticial

Xf = cromossomo X fusionado

Xn = cromossomo X normal

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2 – Identificação dos cromossomos envolvidos nas translocações Robertsonianas em *Mazama gouazoubira* (Mammalia; Cervidae)..... 30

Tabela 1. Frequência de cromossomos B em cada metáfase de alguns animais analisados..... 37

Tabela 2. Classificação dos pares cromossômicos de acordo com seus respectivos valores do comprimento relativo (CR)..... 38

Tabela 3. Cromossomos translocados: valores da razão entre os braços cromossômicos (r), classificação de acordo com os valores de r, cromossomos que compõem os braços curto e longo e presença em homozigose ou heterozigose..... 40

CAPÍTULO 3 – Variabilidade e diferenciação dos cromossomos B entre indivíduos de *Mazama gouazoubira* (Mammalia; Cervidae)..... 58

Tabela 1. Fêmeas utilizadas na microdissecção de cromossomos B e identificação das sondas produzidas..... 62

Tabela 2. Composição genética dos cromossomos B de indivíduos da espécie *M. gouazoubira*, em relação ao tipo de cromatina encontrado (Banda C), presença de regiões organizadoras de nucléolo (Ag-RON) e presença de sequências teloméricas (FISH telo)..... 65

CAPÍTULO 4 – Localização dos sítios frágeis comuns em *Mazama gouazoubira* (Mammalia; Cervidae) e sua relação com o polimorfismo cromossômico apresentado pela espécie..... 79

Tabela 1. Informações dos animais da espécie *Mazama gouazoubira* utilizados para a indução e análise dos sítios frágeis comuns..... 82

Tabela 2. Valores do índice mitótico observados nos animais analisados..... 84

Tabela 3. Valores totais dos tipos de alterações cromossômicas analisadas nos cultivos celulares nos animais T83, T93, T126, T130, T131 e T137..... 86

APÊNDICE A..... 98

Tabela 1. Identificação, sexo, número diploide (2n), quantidade de cromossomos B e origem dos animais da espécie *M. gouazoubira* amostrados... 98

APÊNDICE C..... 105

Tabela 1. Reação de PCR utilizada para amplificação e marcação das sondas teloméricas..... 105

Tabela 2. Reação de PCR utilizada para amplificação e marcação das sondas de rDNA 5S..... 107

Tabela 3. Reação de PCR utilizada para amplificação e marcação das sondas de rDNA 18S..... 108

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1 – Considerações gerais..... 1

Figura 1. Fotografia com escala de um macho adulto da espécie *Mazama gouazoubira* (Foto Duarte, J.M.B.)..... 12

Figura 2. Área de distribuição de *Mazama gouazoubira* (BLACK-DÉCIMA et al., 2010, com modificações)..... 13

Figura 3. Cariótipo padrão de um macho da espécie *M. gouazoubira* (2n=70; NF=70), sob coloração convencional (Giemsa). Fonte: ABRIL et al. (2010)..... 14

Figura 4. Comportamento meiótico de uma translocação Robertsoniana em heterozigose, evidenciando a segregação correta (dois gametas balanceados) e a não-disjunção (quatro gametas desbalanceados). Fonte: NACHMAN; SEARLE, 1995, com modificações..... 18

CAPÍTULO 2 – Identificação dos cromossomos envolvidos nas translocações Robertsonianas em *Mazama gouazoubira* (Mammalia; Cervidae)..... 30

Figura 1. Cariótipos de indivíduos da espécie *Mazama gouazoubira*, sob coloração convencional (Giemsa) e aumento de 1000x. (a) Fêmea padrão (2n=70; NF=70); (b) Macho padrão (2n=70; NF=70); (c) Macho portador de um cromossomo B (2n=70+1B; NF=70); (d) Fêmea heterozigota para uma translocação Robertsoniana (14;16) (2n=69; NF=70)..... 36

Figura 2. Cariótipos dos sete diferentes tipos de translocações em heterozigose encontradas no *M. gouazoubira*, sob bandamento G e aumento de 1000x. (a) Translocação Robertsoniana 4;16 (2n=69; NF=70); (b) Translocação Robertsoniana 14;16 (2n=69; NF=70); (c) Translocação Robertsoniana 7;21 (2n=69; NF=70); (d) Translocação Robertsoniana 20;26 (2n=69; NF=70); (e) Translocação Robertsoniana X;16 (2n=69; NF=70); (f) Translocação Robertsoniana 8;21 (2n=69; NF=70); (g) Translocação Robertsoniana X;21 (2n=69; NF=70)..... 41

Figura 3. Comparação entre Banda G (BG) e o idiograma (ID) de Neitzel (1987) de cada tipo de translocação Robertsoniana. (a) Translocação 4;16; (b) Translocação 14;16; (c) Translocação 7;21; (d) Translocação 20;26; (e) Translocação X;16; (f) Translocação 8;21; (g) Translocação X;21..... 42

Figura 4. Bandamento C em *M. gouazoubira*, com aumento de 1000x. (a) e (b) Metáfases evidenciando a localização da heterocromatina constitutiva. Setas indicam a posição de uma banda heterocromática intersticial no cromossomo X. 43

Figura 5. Coloração Ag-RON em *M. gouazoubira*, com aumento de 1000x. (a) e (b) Metáfases evidenciando a localização da RON. Setas 1 indicam o cromossomo translocado sem a presença de RON e setas 2 apontam a posição da RON..... 44

Figura 6. Translocações X-autossômicas: marcações no X fusionado (Xf) e no X normal (Xn). (a) FISH telomérica; (b) Pintura cromossômica; (c) DAPI invertido..... 45

Figura 7. Pintura cromossômica com sondas dos cromossomos translocados obtidas pela microdissecção, com aumento de 1000x. A contra-coloração foi feita com DAPI (azul) e a marcação com Digoxigenina (vermelho)..... 45

Figura 8. Mapa do Brasil com a distribuição dos sete diferentes tipos de translocações Robertsonianas (14;16, X;16, X;21; 8;21, 20;26, 7;21 e 4;16) observadas nos indivíduos da espécie *Mazama gouazoubira*..... 46

CAPÍTULO 3 – Variabilidade e diferenciação dos cromossomos B entre indivíduos de *Mazama gouazoubira* (Mammalia; Cervidae)..... 58

Figura 1. Metáfases de indivíduos de *M. gouazoubira* sob banda C, com aumento de 1000x. (a) Fêmea (2n=70+0-1B; NF=70) com o cromossomo B totalmente eucromático; (b) Macho (2n=70+0-1B; NF=70) com o cromossomo B com os braços cromossômicos eucromáticos e os centrômeros heterocromáticos..... 64

Figura 2. Diferentes tipos de cromossomos B de *M. gouazoubira* sob coloração Ag-RON. a) Ausência de região organizadora de nucléolo (RON); (b) Presença de RON de intensidade fraca na região intersticial; (c) Presença de RON de intensidade fraca na extremidade; (d) Presença de RON de forte intensidade na região intersticial; (e) Presença de RON de forte intensidade na extremidade..... 64

Figura 3. FISH telomérica nos cromossomos B. (a) Marcação telomérica intersticial; (b) Forte sinal telomérico na regiao peregiãoromérica; (c) Sinal telomérico de baixa intensidade..... 66

Figura 4. Amplificação das sondas de rDNA em gel de agarose. (a) Eletroforese em gel de agarose 2% do rDNA 5S (coluna 0 = marcador de 50 pares de bases, coluna 1 = produto de PCR de rDNA 5S); (b) Eletroforese em gel de agarose 1% do rDNA 18S (coluna 0 = marcador de 1.000 pares de bases, coluna 1 = produto de PCR de rDNA 18S)..... 66

Figura 5. Pintura cromossômica de cromossomos B na espécie *M. gouazoubira*. (a) Hibridização das sondas S1, S2 e S5; (b) Hibridização das sondas S3e S4.A contra-coloração foi feita com DAPI (azul) e a marcação com Digoxigenina (vermelho), com aumento de 1000x..... 68

Figura 6. Pintura cromossômica da sonda de cromossomo B obtida por citometria de fluxo na espécie *M. gouazoubira*: (a) animal T66 e (b) animal T145. A contra-coloração foi feita com DAPI (azul) e a marcação com Digoxigenina (vermelho), com aumento de 1000x..... 68

CAPÍTULO 4 – Localização dos sítios frágeis comuns em *Mazama gouazoubira* (Mammalia; Cervidae) e sua relação com o polimorfismo cromossômico..... 79

Figura 1. Média e desvio padrão por cultivo (C.C. = cultivos controle, DMSO = cultivos tratados com DMSO, AF25 e AF50 = cultivos tratados com 0,1µmol/L e 0,2µmol/L de afidicolina, respectivamente) dos seis animais analisados em relação ao número total de sítios frágeis comuns (SFCs) e ao número total de metáfases que apresentaram SFCs..... 85

Figura 2. Metáfases da fêmea T130 da espécie *Mazama gouazoubira*, sob coloração convencional (Giemsa) e aumento de 1000x. (a) Seta 1 indica uma quebra cromatídica, a seta 2 um “gap” cromossômico e as setas 3 e 4 “gaps” cromatídicos. B) Seta indica uma quebra cromossômica..... 87

Figura 3. Metáfase da fêmea T130 da espécie *Mazama gouazoubira*, sob coloração convencional (Giemsa) e aumento de 1000x, com setas indicando alguns complexos cromossômicos formados por associações cromossômicas... 87

Figura 4. Números de sítios frágeis comuns (SFCs) encontrados nos cromossomos de *Mazama gouazoubira* submetidos ao tratamento com afidicolina (AF25 e AF50)..... 88

Figura 5. Idiograma dos cromossomos de *Mazama gouazoubira* mostrando a localização dos sítios frágeis comuns encontrados nas metáfases tratadas com afidicolina (AF25 e AF50) dos animais T83, T93, T126, T130, T131 e T137. Idiograma de Neitzel (1987) com modificações..... 89

APÊNDICE C..... 105

Figura 1. Iniciadores teloméricos 1 $(TTAGGG)_5$ e 2 $(CCCTAA)_5$ complementares entre si sem necessidade da utilização de DNA molde (MARTINS; VICARI, 2012; com adaptações)..... 106

CAPÍTULO 1 – Considerações gerais

Introdução

Os animais da família Cervidae pertencem à ordem Artiodactyla e possuem atualmente 52 espécies descritas, que estão distribuídas em diferentes nichos ecológicos (GRUBB, 2005). Dentro da família Cervidae, o gênero *Mazama* é composto por cinco espécies que são encontradas no Brasil: *M. nana, M. gouazoubira, M. nemorivaga, M. bororo* e *M. americana*, as quais são reconhecidas e diferenciadas tendo como base aspectos morfológicos e citogenéticos (DUARTE; MERINO, 1997; ROSSI, 2000; DUARTE; JORGE, 2003; ABRIL et al., 2010).

Do ponto de vista citogenético, os Artiodactyla apresentam como característica marcante alguns tipos de rearranjos que são responsáveis pela redução do número cromossômico e por pequenas variações no número fundamental de braços cromossômicos (NF), como as translocações Robertsonianas. Este evento é comumente observado na família Cervidae, que exibe várias características cromossômicas interessantes de serem estudadas (TAYLOR; HUNGERFORD; SNYDER, 1969). Os cervídeos apresentam uma considerável variação interespecífica e intraespecífica no número cromossômico e na presença de cromossomos B, responsáveis pelas altas taxas de polimorfismo cromossômico intraespecífico. Tal polimorfismo pode ser comumente encontrado nas espécies do gênero *Mazama* (GROVES; GRUBB, 1987; DUARTE; JORGE, 1996).

A espécie *M. gouazoubira*, também conhecida como veado-catingueiro, foi descrita por Fischer em 1814 e é uma pequena espécie de cervídeo que está amplamente distribuída na América do Sul. Conhecida por apresentar grande plasticidade ecológica, essa espécie ocupa diferentes ambientes, como a Mata Atlântica, Cerrado, Caatinga e Pantanal (ROSSI, 2000; BLACK-DÉCIMA et al., 2010; MERINO; ROSSI, 2010). Esse cervídeo neotropical é caracterizado por ter retido o cariótipo basal da família Cervidae (2n=70; NF=70). Entretanto, frequentemente são encontrados animais com redução do número diploide de 70 para 69 cromossomos, devido a ocorrência de uma translocação Robertsoniana. Além disso, os

cromossomos B estão frequentemente presentes nos indivíduos dessa espécie. Diante dessas variações cromossômicas observadas no veado-catingueiro, foi sugerida para essa espécie alta fragilidade cromossômica, a qual seria responsável por facilitar a ocorrência do polimorfismo cromossômico intraespecífico (NEITZEL, 1987; DUARTE, 1992; 1998; DUARTE; JORGE, 1996; DUARTE; MERINO, 1997).

De acordo com Rubes, Musilova e Mastromonaco (2008), os indivíduos de uma mesma espécie com diferenças cromossômicas devem ser monitorados, com o intuito de impedir que esses rearranjos cromossômicos sejam mantidos na população. Tal medida deve ser adotada para evitar consequências desfavoráveis para a população, como a diminuição da capacidade reprodutiva e do “fitness”, diminuição do número populacional, aumento dos níveis endogâmicos, entre outras. Para Wurster e Benirschke (1968), as translocações Robertsonianas agem como uma barreira citogenética reprodutiva, pois gradativamente a população vai se tornando mais heterogênea e, consequentemente, os indivíduos desenvolvem uma incompatibilidade reprodutiva. Dessa forma, esse rearranjo pode levar a especiação, contribuindo com a evolução cariotípica das espécies.

No entanto, até o presente momento, o polimorfismo cromossômico (presença de cromossomos B e ocorrência de translocações Robertsonianas) do *M. gouazoubira* não foi profundamente estudado. Com isso, ainda não foram identificados os cromossomos envolvidos nas translocações Robertsonianas e também não foi verificada a extensão desse polimorfismo. Estes estudos são fundamentais para identificar se os cromossomos envolvidos nos rearranjos estão relacionados com a evolução cariotípica dos *Mazama*, se existem cromossomos prioritariamente envolvidos e se estes rearranjos foram independentes ou foram retidos do ancestral. Questões relacionadas com a origem, composição genética e com o papel dos cromossomos B nos cervídeos ainda são desconhecidas, sendo necessário avançar no estudo desse tema. Além disso, é de extrema importância avaliar se a fragilidade cromossômica proposta para a espécie tem alguma relação com a ocorrência das translocações Robertsonianas e com a presença dos cromossomos B. Diante do exposto, o presente estudo teve como objetivo geral fazer um mapeamento cromossômico da espécie *M. gouazoubira*, buscando avançar no entendimento do polimorfismo cromossômico e sua relação com a fragilidade

cromossômica apresentada pela espécie. Dessa maneira, esse trabalho teve como objetivos:

- Caracterizar citogeneticamente espécimes de *M. gouazoubira* provenientes de diferentes regiões do Brasil;

- Identificar e quantificar os indivíduos variantes (portadores de translocações Robertsonianas e de cromossomos B);

- Identificar os cromossomos envolvidos nas translocações Robertsonianas;

- Estudar a composição genética dos cromossomos B e suas possíveis homologias com os cromossomos do lote cromossômico A;

- Localizar os sítios frágeis comuns (SFCs) produzidos pela afidicolina e determinar se os mesmos estão relacionados aos cromossomos envolvidos com o polimorfismo cromossômico.

O presente trabalho foi avaliado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) desta unidade de Ensino (processo nº 010640/13) que certificou sua conformidade com os princípios éticos na experimentação animal, adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Revisão bibliográfica

Família Cervidae e gênero *Mazama*

A família Cervidae é composta por mamíferos ungulados que pertencem à Ordem Artiodactyla. Atualmente, os cervídeos estão separados em 17 gêneros, sendo descritas 52 espécies, que podem ser encontradas na Europa, América, Ásia e norte da África, além das regiões ocupadas por esses animais devido à introdução humana (NOWAK, 1991; GRUBB, 2005). Esta família é dividida em duas subfamílias: a subfamília Capreolinae, composta pelas tribos Rangiferini, Capreolini e Alceini, e a subfamília Cervinae, que compreende as tribos Muntiacini e Cervini. A tribo Rangiferini agrupa os quatro gêneros brasileiros: *Odocoileus, Blastocerus, Ozotoceros* e *Mazama*, além de outros três gêneros *Hippocamelus, Pudu, Rangifer* (ABRIL et al., 2010).

Os cervídeos representam um grupo de animais extremamente diversificado, devido às características não só morfológicas como também genéticas e ecológicas (DUARTE; GONZÁLEZ, 2010). Em relação aos atributos morfológicos, com exceção dos animais da espécie *Hydropotes inermis* e do gênero *Moschus*, todos os cervídeos machos apresentam chifres (simples ou ramificados), sendo que a espécie *Rangifer tarandus* é a única em que as fêmeas apresentam chifres. Entre os cervídeos, são encontradas pequenas espécies, como o *Pudu mephistophiles*, pesando aproximadamente 6 kg, e espécies maiores, como o *Alces alces*, que pode ultrapassar os 600 kg (PUTMAN, 1988; DUARTE; GONZÁLEZ, 2010). Do ponto de vista genético, altas taxas de divergência tanto molecular como citogenética podem ser observadas entre as espécies de cervídeos, principalmente entre as espécies do gênero *Mazama*, que são conhecidas por serem morfologicamante similares. Além disso, a partir de análises filogenéticas utilizando o gene mitocondrial citocromo b foi possível inferir que, pelo menos, oito formas ancestrais de cervídeos entraram na América do Sul no final do Plioceno (DUARTE; GONZÁLEZ; MALDONADO, 2008).

Os espécimes da família Cervidae possuem altas taxas de evolução cromossômica, o que pode ser observado pela extensa diferenciação cariotípica. O reflexo dessa diversificação está explícito na variação do número diploide (2n) entre as espécies de cervídeos, sendo encontradas espécies com baixo 2n, como o *Muntiacus muntjac* (2n=6♀/7♂) e espécies com 2n alto, como o *Capreolus pygargus* (2n=80) (NEITZEL, 1987; FONTANA; RUBINI, 1990). Os cervídeos são animais que apresentam uma grande plasticidade ecológica e ocupam diferentes nichos ecológicos, como o *Blastocerus dichotomus*, que é característico de áreas alagadas, enquanto *Mazama americana* é típico de florestas secas de terra firme (DUARTE; MERINO, 1997). Os cervídeos apresentam outras características capazes de individualizar esse grupo animal, como a presença de cascos que recobrem totalmente os dedos, ausência dos dentes incisivos superiores, glândulas odoríferas situadas em diferentes locais, entre outras (DUARTE; MERINO, 1997).

Os primeiros representantes da família Cervidae provavelmente viveram na Eurásia, eram pequenos, sem chifres, com grandes caninos (apenas os machos) e habitavam as florestas tropicais (EISENBERG, 1987; GEIST, 1998). A literatura indica que, possivelmente, foi no início do Plioceno que os veados saíram

da Ásia em direção a América do Norte, passando pelo Estreito de Bering. Os grandes animais da América do Norte derivaram das pequenas formas encontradas na Eurásia, com um progressivo aumento corporal (GEIST, 1998; WEBB, 2000). Além do grande tamanho corporal, esses animais apresentavam patas traseiras e dianteiras uniformes, chifres ramificados e hábitos de viver em grupos. Na transição do Plioceno para o Pleistoceno, os cervídeos da América do Norte se deslocaram pelo Istmo do Panamá, entrando na América do Sul (EISENBERG, 1987; WEBB, 2000). As primeiras espécies de veados Neotropicais possuíam tamanho corporal médio e chifres ramificados. Com o passar do tempo, algumas espécies de cervídeos tiveram sua forma corporal modificada em resposta a adaptação aos novos ambientes encontrados, como as densas florestas. Em geral, as novas características desses animais eram corpo pequeno, chifres simples e patas menores, as quais podem ser observadas nas espécies que compõem o gênero *Mazama* (WEBB, 2000; MERINO; ROSSI, 2010).

Atualmente, os cervídeos Neotropicais representam um dos grupos de ungulados mais diversificados, sendo composto por 17 espécies e seis gêneros viventes: *Blastocerus*, *Hippocamelus*, *Odocoileus*, *Ozotoceros*, *Pudu* e *Mazama* (GRUBB, 2005; MERINO; ROSSI, 2010). Até o momento, são reconhecidas e diferenciadas oito espécies brasileiras: *B. dichotomus* (cervo-do-pantanal), *Ozotoceros bezoarticus* (veado-campeiro), *Odocoileus virginianus* (veado-galheiro), *M. americana* (veado-mateiro)*, Mazama gouazoubira* (veado-catingueiro)*, Mazama nana* (veado mão-curta)*, Mazama nemorivaga* (veado-roxo) e *Mazama bororo* (veado-mateiro-pequeno) (FONTANA; RUBINI, 1990; DUARTE; MERINO, 1997; DUARTE; JORGE, 2003; ABRIL et al., 2010; DUARTE; GONZÁLEZ, 2010).

As espécies do gênero *Mazama* estão distribuídas em toda região tropical e subtropical, que se estende desde o Estado de Veracruz, no México até o Paraguai (MERINO; ROSSI, 2010). Há grande variação morfológica entre as espécies, sendo encontrados grandes animais, os quais apresentam o dobro do tamanho quando comparados com as menores espécies (ALLEN, 1915; ROSSI, 2000). De acordo com a cor da pelagem, as espécies desse gênero são divididas em dois grupos: grupos dos veados cinza (cor da pelagem varia do marrom avermelhado ao marrom acinzentado) e grupo dos veados vermelhos (com

coloração variando do vermelho escuro ao vermelho amarelado) (ALLEN, 1915). Segundo Rossi (2000), apesar de ser possível distinguir as espécies de *Mazama* por meio de caracteres morfológicos, tais como coloração da pelagem e medidas cranianas, essa é uma ferramenta pouco eficiente no reconhecimento e diferenciação dessas espécies, devido à grande variação morfológica intraespecífica.

Portanto, para corroborar e fornecer resultados mais precisos aos dados morfológicos, análises citogenéticas e moleculares podem ser utilizadas para auxiliar na resolução de incertezas taxonômicas referentes ao gênero *Mazama*. Análises moleculares realizadas com o gene mitocondrial citocromo b indicam que as espécies do gênero *Mazama*, apesar da grande similaridade morfológica, apresentam origem polifilética, sendo possível observar altas taxas de distinção filogenética entre essas espécies (DUARTE; GONZÁLEZ; MALDONADO, 2008).

Citogenética geral, da família Cervidae e do gênero *Mazama*

Em animais selvagens, tanto nos de vida livre como nos animais de cativeiro, a citogenética é uma importante ferramenta capaz de fornecer dados valiosos sobre uma espécie e/ou um indivíduo específico, como o número e estrutura cromossômica, a ocorrência de variações cromossômicas numéricas intraespecíficas e de anormalidades cromossômicas capazes de influenciar os fenótipos dos animais (RUBES; MUSILOVA; MASTROMONACO, 2008). O avanço das técnicas de bandamentos cromossômicos da citogenética clássica entre os anos de 1960 e 1970 permitiu o progresso da pesquisa, acarretando no entendimento do papel dos cromossomos e dos rearranjos cromossômicos nos eventos de especiação, nas doenças e a influência dos rearranjos na capacidade reprodutiva (RUBES; MUSILOVA; MASTROMONACO, 2008). As técnicas de citogenética clássica Bandas C, G e coloração Ag-RON são as mais comumente utilizadas.

A Banda G (SEABRIGHT, 1971) produz padrões de bandas claras e escuras em todos os cromossomos, sendo que as bandas escuras apresentam maior conteúdo de bases A (Adenina) e T (Timina), são representadas pelos segmentos que reagem positivamente à técnica de banda G e que se condensam

tardiamente na prófase. Já as bandas claras são representadas pelos segmentos que reagem negativamente à banda G e que condensam mais cedo na prófase. Essa técnica, além de possibilitar a identificação de rearranjos cromossômicos e a comparação entre cariótipos semelhantes de grupos de espécies muito próximas, também é amplamente utilizada no pareamento correto dos homólogos (GUERRA, 1988; KASAHARA, 2009). Entretanto, é sabido que em cervídeos, inclusive na espécie *M. gouazoubira*, é difícil a obtenção de Banda G de boa qualidade (DUARTE, 1998; VALERI, 2014). Segundo Estandarte (2012), devido à capacidade do fluorocromo DAPI (4'-6-diamidino-2-fenilindol) em se ligar especificamente nas bases A e T, os padrões cromossômicos produzidos por esse fluorocromo são similares aos padrões observados no bandamento G, o que seria uma alternativa válida para contornar os problemas relacionados com a obtenção de Banda G nos cromossomos de cervídeos.

O bandamento C é uma técnica de citogenética clássica responsável por reconhecer regiões de heterocromatina, que são evidenciadas após tratamentos com HCl, hidróxido de bário e solução salina concentrada (SUMNER, 1972). Em muitas espécies de mamíferos, como nas espécies de cervídeos do gênero *Mazama*, a heterocromatina é encontrada na região pericentromérica dos cromossomos (DUARTE, 1992; ABRIL; DUARTE, 2008; ABRIL, 2009; FIORILLO et al., 2013). Além de fornecer informações sobre a distribuição da heterocromatina nos cromossomos das espécies, a banda C pode ser aplicada em estudos evolutivos e na detecção de rearranjos cromossômicos (SUMNER, 1972; ABRIL; DUARTE, 2008; ABRIL, 2009; FIORILLO et al., 2013)

A coloração Ag-RON é um método eficiente e capaz de evidenciar as regiões organizadoras de nucléolo (RON) transcricionalmente ativas nos cromossomos de plantas e animais pela impregnação da prata (HOWELL; BLACK, 1980). Em algumas espécies, a RON está presente em apenas um par cromossômico (HSU; SPIRITO; PARDUE, 1975) enquanto em outras, são encontradas RON múltiplas, como nas espécies de cervídeos *M. nana*, *M. americana*, *M. nemorivaga* e *M. gouazoubira* (DUARTE, 1992; ABRIL; DUARTE, 2008; ABRIL, 2009; FIORILLO et al., 2013). A RON é composta por múltiplas cópias de DNA ribossômico (rDNA), RNA ribossômico (rRNA) e proteínas. Em geral, os

vertebrados apresentam dois tipos de rDNA: o primeiro é o rDNA 45S, que está presente na RON e é responsável pela transcrição das sequências de rRNA18S, 5,8S e 28S; e o segundo é o rDNA 5S, genes repetitivos responsáveis pela transcrição das moléculas de rRNA 5S, localizados fora da RON (HENDERSON; WARBURTON; ATWOOD, 1972; HENDERSON et al., 1974; HSU; SPIRITO; PARDUE, 1975; GOODPASTURE; BLOOM, 1975; GROSS et al., 2010). Dessa forma, a coloração Ag-RON não é capaz de detectar sequências de rDNA 5S e nem sequências de rDNA 45S que não estavam previamente ativas na transcrição do rRNA, sendo necessária a utilização de técnicas mais avançadas, como a hibridização *in situ* fluorescente (FISH) (HOWELL; BLACK, 1980; KASAHARA, 2009).

A FISH é uma técnica altamente sensível, capaz de identificar sequências específicas de DNA nos cromossomos de diversas fases, como na metáfase e na interfase (PINKEL; STRAUME; GRAY, 1986). Nessa técnica de citogenética molecular há uma reação de hibridização entre sequências complementares, sendo que segmentos de DNA marcados com fluorocromos (biotina, digoxigenina, etc), chamados de sondas, são diretamente hibridizados com o DNA alvo, o qual está fixado em uma lâmina (LANGER; WALDROP; WARD, 1981; PINKEL; STRAUME; GRAY, 1986). Existem diferentes tipos de sondas que são utilizadas em experimentos de FISH, como as sondas teloméricas, sondas ribossomais (45S, 18S, 5S, etc), sondas de sequências únicas e sondas utilizadas na pintura cromossômica (IJDO et al., 1991; FERGUSON-SMITH; TRIFONOV, 2007; GROSS et al., 2010)

A pintura cromossômica é uma variação da técnica de FISH que utiliza parte de um cromossomo ou um cromossomo inteiro como sonda, fornecendo informações sobre a detecção de rearranjos cromossômicos, identificação de cromossomos, mapeamento gênico, entre outros (PINKEL et al., 1988). Além disso, trabalhos mostram a importância da FISH para a compreensão do curso da evolução cromossômica de algumas espécies da família Cervidae, como *M. americana*, *Muntiacus reevesi*, *Muntiacus crinifrons* e *Muntiacus muntjak vaginalis* (YANG et al., 1995; YANG et al., 1997a, 1997b, 1997c; ABRIL, 2009).

Na década de 80, por meio da citogenética clássica, Neitzel analisou 11 cariótipos submetidos ao bandamento G de diferentes espécies de cervídeos, sugerindo que o cariótipo ancestral hipotético dos cervídeos possuía números diploide e fundamental iguais a 70, sendo composto por 68 cromossomos autossômicos acrocêntricos, o X acrocêntrico e o Y metacêntrico (NEITZEL, 1982). Este cariótipo foi conservado e pode ser encontrado em duas espécies atuais, relativamente distantes e pertencentes a diferentes subfamílias: a espécie neotropical *M. gouazoubira* e a espécie asiática *H. inermis*, o que corrobora o cariótipo ancestral proposto. Além disso, padrões de bandamentos C, G e coloração Ag-RON indicam que os cariótipos de *M. gouazoubira* e *H. inermis* são similares, sugerindo que o cariótipo dessas espécies tenha sido conservado a partir do cariótipo ancestral dos cervídeos a mais de 25 milhões de anos (NEITZEL, 1982; 1987).

De acordo com os dados publicados por Neitzel (1987) e Fontana e Rubini (1990), o padrão de evolução cariotípica dos cervídeos está baseado na diminuição do número de cromossomos por meio da ocorrência de fusões cromossômicas, podendo ser estas mais complexas, como nas espécies de *Mazama*, ou mais simples, como em *B. dichotomus*. Tanto a subfamília Capreolinae como a Cervinae, sofreram sucessivos e complexos rearranjos cromossômicos, como fusões em tandem, inversões pericêntricas e translocações Robertsonianas (FONTANA; RUBINI, 1990), os quais acarretaram na diminuição do 2n das espécies a partir do ancestral hipotético dos cervídeos com 2n=70 (NEITZEL, 1987; ABRIL et al., 2010).

A família Cervidae é caracterizada por uma extrema diversificação cariotípica, apresentando cariótipos que variam de 2n=6 (*M. muntjac*) a 2n=80 (*C. pygargus*). Entretanto, a maioria das espécies de veados apresentam cariótipos com alto 2n (NEITZEL, 1987; FONTANA; RUBINI, 1990). Entre os cervídeos Neotropicais que ocorrem no Brasil, as espécies *B. dichotomus* (2n=68; NF=74), *Ozotoceros bezoarticus* (2n=66; NF=74) e *Odocoileus virginianus* (2n=70; NF=74), além de exibirem alto 2n, são caracterizadas por uma estabilidade cromossômica por não apresentarem rearranjos cromossômicos intraespecíficos e não possuírem cromossomos B, assim, consequentemente não exibem polimorfismo cariotípico. Por

outro lado, as espécies do gênero *Mazama*: *M. gouazoubira* (2n=70+0-3B; NF=70), *M. nemorivaga* (2n=68+2-8B; NF=70), *M. bororo* (2n=34+4-5B; NF=46), *M. americana* (2n=42-53+3-5B; NF=46-56) e *M. nana* (2n=36-41+1-6B; NF=58), são conhecidas pelas altas taxas de fragilidade cromossômica, causando instabilidade cromossômica que pode ser observada por meio dos frequentes rearranjos cromossômicos e presença de cromossomos B, o que leva a um polimorfismo cromossômico intraespecífico (DUARTE; GIANNONI, 1995; ABRIL et al., 2010; VARGAS-MUNAR; SARRIA-PEREA; DUARTE, 2010). Esta variação cariotípica observada no grupo dos veados é ocasionada por complexos rearranjos cromossômicos e pode ser considerada como uma característica evolutiva do grupo (NEITZEL, 1987; DUARTE; JORGE, 1996).

Polimorfismo cromossômico é a diversidade cromossômica detectada dentro de uma população isolada, que pode ser resultante da variação de rearranjos (KOOP; BAKER; GENOWAYS, 1983). No gênero *Mazama,* o polimorfismo encontrado é decorrente da fragilidade cromossômica, que nada mais é do que a tendência de um cromossomo se quebrar, propiciando a ocorrência de rearranjos cromossômicos, o que acarreta na formação de novas espécies após isolamento geográfico (DUARTE; JORGE, 1996; VARGAS-MUNAR; SARRIA-PEREA; DUARTE, 2010). Tal fato mostra que os cariótipos desse gênero ainda não estão fixados, ou seja, esses cariótipos estão sob processo de evolução, o que pode ser corroborado pelo amplo polimorfismo encontrado nas espécies do gênero (DUARTE; MERINO, 1997). Há evidências de que alguns eventos de especiação sejam decorrentes de rearranjos cromossômicos, fato que pode ser observado em espécies que são intimamente relacionadas e muito semelhantes morfologicamente, mas que diferem em seus cariótipos, como nas espécies do gênero *Mazama* (BAKER; BICKHAM, 1986).

Da mesma forma em que Allen (1915) dividiu o gênero *Mazama* em dois grupos (vermelhos e cinzas) de acordo com a coloração da pelagem, Duarte, González e Maldonado (2008) corroboraram essa divisão tendo como base aspectos citogenéticos e moleculares. Assim, ficou evidente que o grupo dos veados vermelhos apresenta baixo 2n, com altas taxas de variação cromossômica inter e intraespecíficas, sendo composto por *M. americana*, *M. bororo* e *M. nana*. Por outro

lado, o grupo dos veados cinza exibe baixos níveis de polimorfismo cromossômico intraespecífico, além de apresentar cariótipos com alto 2n, sendo compreendido pelo *M. nemorivaga* e *M. gouazoubira* (DUARTE; GONZÁLEZ; MALDONADO, 2008).

Mazama gouazoubira e suas particularidades citogenéticas

Mazama gouazoubira, também conhecido como veado-catingueiro, foi descrito pela primeira vez em 1801, por Azara. O primeiro espécime coletado e descrito foi na cidade de Assunção, no Paraguai, o qual foi denominado *Gouazoubira*. Entretanto, Azara não seguiu as normas de nomenclatura binomial proposta por Linnaeus, sendo assim, sua descrição não foi considerada. Em 1814, Fischer utilizou a descrição feita por Azara, classificando aquele espécime como *Cervus gouazoupira*. Durante muitos anos, vários debates em relação ao correto nome da espécie foram realizados pela ICZN (“International Commission on Zoological Nomenclature”), sendo que no ano de 2001, foi determinado que a correta citação da espécie seria *Mazama gouazoubira* Fischer 1914 (ALLEN, 1915; WINSTON, 1999; ICZN, 2001; BLACK-DÉCIMA et al., 2010).

O veado-catingueiro possui pequeno a médio porte, sendo que os indivíduos da região Nordeste brasileira são menores do que os indivíduos da região Sul (ROSSI, 2000). Seu peso raramente excede os 20 kg, sua altura média é de 50 cm na cernelha e sua coloração varia de um tom cinza esverdeado até o marrom claro (Figura 1). Algumas partes de seu corpo são brancas, como na face interna da orelha, que é grande e arredondada, e na parte inferior da cauda. Uma característica marcante da espécie é a mancha superciliar esbranquiçada, que pode ser vista na maioria dos indivíduos (DUARTE; MERINO, 1997). Os machos apresentam chifres simples, relativamente grossos e inclinados póstero-dorsalmente. Variações do padrão de coloração podem ser observados nessa espécie, sendo que, em geral, os animais de áreas abertas possuem coloração castanho claro, enquanto os animais de florestas são castanho escuro (DUARTE; MERINO, 1997; ROSSI, 2000; BLACK-DÉCIMA et al., 2010).

Figura 1. Fotografia com escala de um macho adulto da espécie *Mazama gouazoubira* (Foto Duarte, J.M.B.).

A espécie *M. gouazoubira* apresenta uma ampla distribuição na América do Sul, que cobre toda a área que se estende desde a região leste pré-Andina na Argentina e na Bolívia até a costa Atlântica na região oeste. Na região norte, a área limite desse veado é a região Amazônica, enquanto na região sul, a distribuição dessa espécie inclui todo o Uruguai e parte da Argentina, sendo que a província Entre Rios é o limite máximo de sua área de distribuição (PINDER; LEEUWENBERG, 1997). No Brasil, essa espécie pode ser encontrada em todas as regiões, exceto a região Amazônica, que é ocupada pela espécie *M. nemorivaga*, cuja distribuição não se sobrepõe com a espécie em questão (Figura 2). *Mazama gouazoubira* é conhecido por apresentar grande plasticidade ecológica, habitando diversos e diferentes lugares, como as vegetações abertas observadas na Caatinga, os campos da região dos Pampas, o Cerrado, a Floresta Ombrófila Densa costeira e a área de transição entre o Cerrado e a Floresta Ombrófila Densa (DUARTE, 1998; ROSSI, 2000). Além dessas áreas, o veado-catingueiro pode ser comumente encontrado em áreas tomadas pela agricultura (RODRIGUES; CERVEIRA; DUARTE, 2014).

Figura 2. Área de distribuição de *Mazama gouazoubira* (BLACK-DÉCIMA et al., 2010, com modificações).

Do ponto de vista genético, os altos níveis de fluxo genético entre diferentes localidades dentro da distribuição da espécie sugerem a ocorrência de intercambio de animais entre as áreas, revelando que não existe uma barreira geográfica (BIDEGARAY et al., 2003). Figueiredo (2014), estudando o DNA mitocondrial e nuclear de indivíduos da espécie *M. gouazoubira* provenientes de diferentes regiões brasileiras, observou que essa espécie foi subdividida em cinco clados diferentes. Apesar dessa subdivisão, não foi encontrada nenhuma separação biogeográfica, pois animais de diferentes clados ocorrem em simpatria.

No final da década de 70, a partir de uma fêmea, foi realizada a primeira análise citogenética da espécie *M. gouazoubira*, que determinou o número diploide e fundamental da espécie iguais a 70 (NEITZEL, 1979). Uma análise mais profunda de um macho da espécie estabeleceu que todos os autossomos são acrocêntricos, o cromossomo X é o maior acrocêntrico do lote, enquanto o Y é um metacêntrico, sendo o menor do lote (Figura 3) (NEITZEL, 1987).

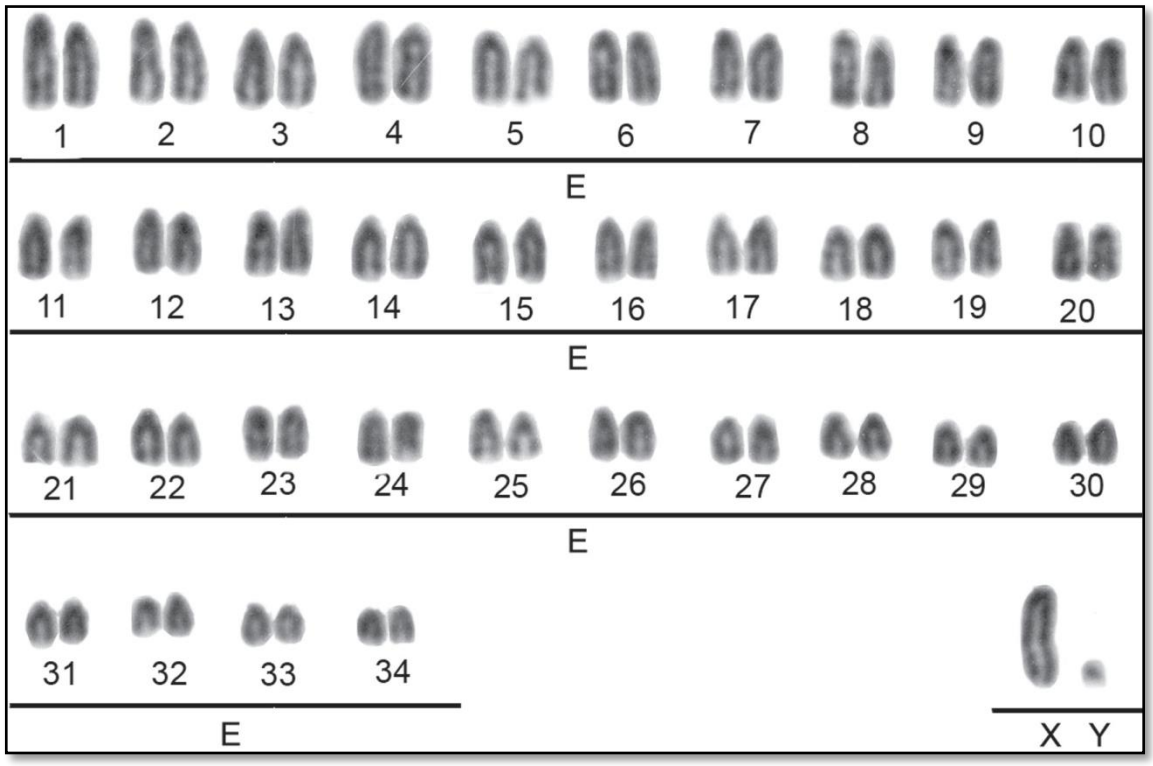

Figura 3. Cariótipo padrão de um macho da espécie *M. gouazoubira* (2n=70; NF=70), sob coloração convencional (Giemsa). Fonte: ABRIL et al. (2010).

Já no início dos anos 90, Duarte encontrou indivíduos que apresentavam 2n=69 e cromossomos B, sendo que dos 35 animais estudados, 20% mostraram algum tipo de translocação. Em outro estudo, foram analisados 14 animais dessa espécie, sendo que destes, dois apresentaram 2n=69 e em três animais foram encontrados de 1 a 3 cromossomos B (DUARTE, 1992; DUARTE; JORGE, 1996). Analisando-se 81 espécimes de *M. gouazoubira,* Duarte (1998) verificou que entre os animais amostrados, 16% apresentaram uma translocação Robertsoniana (2n=69), 3,7% continham duas translocações Robertsonianas (2n=68) e 23,4% eram portadores de 1 a 3 cromossomos B. A explicação para a redução do número diploide de 70 para 69 ou 68 é baseada na ocorrência de uma ou duas translocações Robertsonianas (DUARTE; JORGE, 1996). Contudo, nenhum dos cromossomos envolvidos nas translocações acima citadas foram identificados, devido à dificuldade de obtenção de banda G. Estes estudos revelaram que a espécie estudada apresenta fragilidade cariotípica e que essas variações encontradas (translocações Robertsonianas e presença de cromossomos B) são

comuns para a espécie, evidenciando um alto nível de polimorfismo (DUARTE, 1998). Devido ao fato da espécie *M. gouazoubira* possuir cariótipo basal e à facilidade de ocorrência de várias translocações Robertsonianas, indicando a naturalidade com que esses rearranjos acontecem, foi sugerido que a evolução cariotípica do gênero *Mazama* está baseada em fusões em tandem e translocações Robertsonianas (NEITZEL, 1987; FONTANA; RUBINI, 1990; DUARTE; MERINO, 1997; ABRIL et al., 2010).

Cromossomos B

Ao estudar os cromossomos de diferentes espécies de milho, Fisk (1925) notou que frequentemente eram observados corpos escuros, arredondados ou alongados, que variavam tanto no número, como na forma e tamanho. Às vezes, esses corpos escuros formavam bivalentes entre si ou apenas se apresentavam como univalentes. Fisk relatou que esses corpos poderiam ser formados tanto de cromatina como de material derivado do nucléolo, porém, independentemente de sua composição, esses corpos atrapalhavam a contagem exata do número cromossômico das espécies estudadas. O estudo de Fisk foi um dos primeiros a relatar a existência dos cromossomos B. Após serem descobertos, as primeiras descrições de cromossomos B em mamíferos só ocorreram décadas depois, sendo primeiramente relatados nas espécies *Petauroides volans* e *Vulpes vulpes* (HAYMAN; MARTIN, 1965; MOORE; ELDER, 1965).

Os cromossomos B, também conhecidos como cromossomos extras, cromossomos supernumerários ou cromossomos acessórios, são cromossomos adicionais e não pertencem ao conjunto básico de cromossomos de uma espécie, designado como lote A (CAMACHO; SHARBEL; BEUKEBOOM, 2000). Esses cromossomos são muito diferentes dos cromossomos do lote A, tanto em relação à forma quanto ao comportamento durante o ciclo celular, o que permite distingui-los dos outros cromossomos (RANDOLPH, 1941). Entretanto, foi observado que em algumas espécies animais, os cromossomos B, o DNA satélite e os cromossomos sexuais compartilham características morfológicas e comportamentais, além de

apresentarem composição molecular semelhante (AMOS; DOVER, 1981; SILVA et al., 2016).

López-Léon et al. (1994) sugerem que os cromossomos B possuem características diferentes e especiais, dependendo da espécie em que estão sendo estudados. Entretanto, algumas dessas características aparentam estar presentes em quase todos os Bs de diferentes espécies, tais como o fato de serem dispensáveis, inconstantes em indivíduos da mesma espécie e entre metáfases de um mesmo individuo, ter herança não-mendeliana, não se recombinarem com o lote cromossômico A, serem heterocromáticos e possuírem origem desconhecida (JONES; REES, 1982; LÓPEZ-LEÓN et al., 1994; DHAR et al., 2002; MATSUBARA et al., 2008). Contudo, o avanço da ciência e os inúmeros estudos com cromossomos B de diferentes espécies, possibilitou progresso no entendimento desses cromossomos, sendo que atualmente é reconhecido que os cromossomos B são altamente heterogêneos e apresentam diferentes propriedades, dependendo da espécie que os portam (TRIFONOV et al., 2013). Além disso, foi descrito que alguns cromossomos B são compostos de vários tipos de sequências de DNA repetitivo, como elementos transponíveis, DNA satélite e DNA ribossômico (CAMACHO; SHARBEL; BEUKEBOOM, 2000; MATSUBARA et al., 2008).

Em algumas espécies a origem dos cromossomos B está perto de ser conhecida, como por exemplo, na espécie de inseto *Eyprepocnemis plorans*, que por meio da técnica da FISH foi possível observar que os cromossomos B são compostos por sequências de DNA repetitivo e ribossomal semelhantes às sequências encontradas no cromossomo sexual X. A descoberta de que os Bs podem ter originado do lote cromossômico A foi confirmada por meio do estudo meiótico da espécie de inseto, que mostrou que os cromossomos B e o cromossomo X se associam na meiose, porém não foi observada a formação de quiasmas, indicando que não ocorreu recombinação entre esses cromossomos (CAMACHO; SHARBEL; BEUKEBOOM, 2000; DHAR et al., 2002). Na espécie de peixe *Prochilodus lineatus*, a FISH realizada com sondas de cromossomos B obtidas pela microdissecção possibilitou a identificação de três tipos diferentes de cromossomos B que, apesar de serem diferentes, apresentaram regiões homologas entre si. Além

disso, um dos três tipos de cromossomo B apresentou sequências homólogas da região centromérica com alguns cromossomos do lote A (PENITENTE et al., 2016).

Rearranjos cromossômicos e seu papel na evolução cromossômica

Os rearranjos cromossômicos são definidos como as mudanças que ocorrem na estrutura dos cromossomos a partir da ocorrência de quebras em dois locais diferentes, seguida pela união desses locais, formando uma configuração cromossômica diferente (GRIFFITHS et al., 2009). Existem diferentes tipos de rearranjos que podem acometer os cromossomos, como as deleções (perda de um segmento cromossômico), as duplicações (duplicação de um segmento cromossômico), inversões (mudança da orientação de um segmento cromossômico), as translocações (movimento de segmentos cromossômicos entre diferentes cromossomos) e os eventos de fusões e fissões (GUERRA, 1988). Tais rearranjos podem ser balanceados ou desbalanceados, sendo que as duplicações e as deleções são exemplos de rearranjos desbalanceados, pois mudam a quantidade de genes de um cromossomo. Já os rearranjos balanceados não alteram a dosagem gênica dos cromossomos, apenas mudam a ordem dos genes nos cromossomos, sendo representados pelas inversões e pelas translocações recíprocas (GRIFFITHS et al., 2009). A translocação Robertsoniana, também conhecida por fusão cêntrica, é um tipo de translocação recíproca e balanceada, no qual não há ganho nem perda de material genético para o indivíduo (KOOP; BAKER; GENOWAYS, 1983).

Em mamíferos, a translocação Robertsoniana é um dos rearranjos mais comumente incorporados na evolução, na qual há a fusão de dois cromossomos (telocêntricos ou acrocêntricos) pelo centrômero formando um cromossomo de dois braços (KOOP; BAKER; GENOWAYS, 1983; BAKER; BICKHAM, 1986; GARAGNA et al., 2001). Há relatos que essa translocação ocorre em altas taxas em mamíferos e também influencia na fertilidade dos indivíduos que são heterozigotos para cromossomos Robertsonianos. Esse rearranjo causa consequências médicas em humanos; em mamíferos domésticos, perda de produtividade e um consequente prejuízo econômico, e em mamíferos silvestres, esse rearranjo contribui para o isolamento reprodutivo o que poderá culminar em

uma possível e futura especiação (BAKER; BICKHAM, 1986; GARAGNA et al., 2001).

Geralmente, indivíduos heterozigotos para translocações Robertsonianas apresentam uma redução do “fitness” em relação aos indivíduos normais, devido à segregação e emparelhamento incorreto dos cromossomos durante a meiose, tendo como consequência a redução da fertilidade (Figura 4). Porém, se um indivíduo heterozigoto para translocação Robertsoniana transmitir, preferencialmente, o cromossomo translocado para sua prole, a probabilidade de fixação desse rearranjo cromossômico na população é maior (NACHMAN; SEARLE, 1995). Entretanto, em algumas espécies de vertebrados, os indivíduos heterozigotos para translocações Robertsonianas apresentam maior “fitness” em relação aos indivíduos homozigotos, evidenciando uma heterose cromossômica positiva. Neste caso, os problemas meióticos são compensados pela vantagem fenotípica dos indivíduos com cariótipos intermediários (GUSTAVSSON; SUNDT, 1969; BAKER et al., 1983).

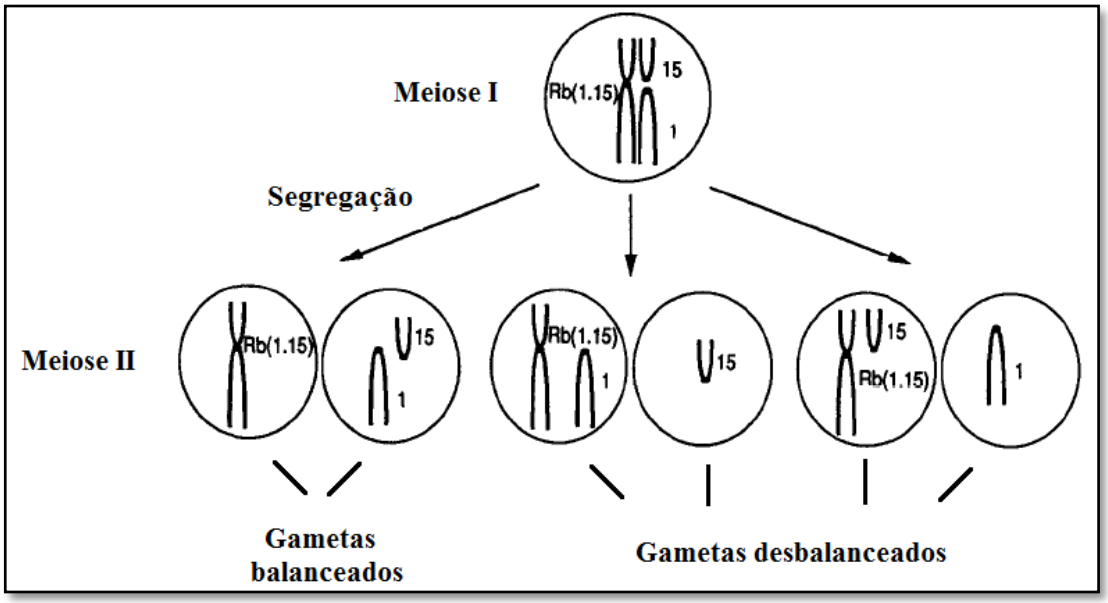

Figura 4. Comportamento meiótico de uma translocação Robertsoniana em heterozigose, evidenciando a segregação correta (dois gametas balanceados) e a não-disjunção (quatro gametas desbalanceados). Fonte: NACHMAN; SEARLE, 1995, com modificações.

Há muito tempo é conhecido que os rearranjos cromossômicos desempenham importante papel para o isolamento reprodutivo, o que acarreta em um processo de especiação (CAPANNA; CIVITELLI; CRISTALDI, 1977). Apesar dos eventos de especiação estarem mais relacionados com rearranjos que suprimem a recombinação, como as inversões cromossômicas, a translocação Robertsoniana causa não só a supressão da recombinação na região pericentromérica, mas também interfere negativamente no fitness dos heterozigotos para esse rearranjo. Tal fato indica que esse rearranjo cromossômico pode acarretar em redução do fluxo gênico, formando uma barreira entre os indivíduos (RIESEBERG, 2001).

Na literatura podem ser encontrados diferentes modelos de especiação baseados em rearranjos cromossômicos, como o Modelo de Cascata ou cadeia, Modelo de Transiliência Cromossômica, Modelo de Fusão Monobraquial, entre outros (WHITE, 1968; TEMPLETON, 1981; BAKER; BICKHAM, 1986; RIESEBERG, 2001). Como observado na literatura, o principal rearranjo encontrado em *M. gouazoubira* é a translocação Robertsoniana (DUARTE, 1992; 1998; DUARTE; JORGE, 1996), sendo plausível inferir que o Modelo de especiação cromossômica baseado nas Fusões Monobraquiais mais se aproxima da espécie em questão. Esse modelo sugere que populações isoladas de determinada espécie fixam, independentemente, translocações Robertsonianas envolvendo diferentes cromossomos com mínimos problemas de fertilidade. Porém, se duas populações isoladas de uma mesma espécie entrarem em contato e se reproduzirem, poderão ser produzidos heterozigotos para duas translocações Robertsonianas e, como consequência, ocorrerá um isolamento reprodutivo por meio de graves problemas meióticos (BAKER; BICKHAM, 1986).

As espécies do gênero *Mazama* apresentam altas taxas de evolução cariotípica causadas por múltiplos rearranjos cromossômicos (NEITZEL, 1987; FONTANA; RUBINI, 1990). Entretanto, a estrutura populacional está diretamente relacionada com a taxa de transmissão desses rearranjos, ou seja, em geral, apenas populações pequenas e altamente endogâmicas estão sujeitas a rapidamente fixarem um rearranjo em homozigose em um curto período de tempo. Além disso, deve ser considerado que os rearranjos cromossômicos, quando fixados, podem atuar como um tipo de mecanismo isolado, que permitirá o acúmulo de fatores

isolados. Com o tempo, esses fatores acarretarão na diferenciação anatômica entre indivíduos (NEITZEL, 1987).

Fragilidade cromossômica

A fragilidade cromossômica, ou seja, a tendência de um cromossomo se quebrar proporciona instabilidade a algumas regiões do cromossomo que são conhecidas como sítios frágeis (SFs) (SUTHERLAND, 1979; GLOVER; STEIN, 1988). Os SFs estão localizados em determinadas regiões cromossômicas e são categorizados em: SFs raros e SFs comuns (SFCs). Os raros possuem baixa frequência de expressão gênica, seguem a forma de segregação Mendeliana, mas não estão presentes em todos os cromossomos. Já os SFCs provavelmente são homozigotos em todos os indivíduos e são características normais da estrutura do cromossomo, sendo que a maioria deles é induzida pela afidicolina (SUTHERLAND, 1988; SUTHERLAND; BAKER; RICHARDS, 1998; SUTHERLAND; RICHARDS, 1999; GLOVER et al., 2005).

A afidicolina é uma micotoxina produzida pelos fungos *Cephalosporium aphidicola* e *Nigrospora oryzae*, conhecida por ser um inibidor específico da DNA polimerase, impedindo assim a síntese do DNA nuclear. É sabido que baixas doses de afidicolina induzem SFCs, que podem ser observados nos cromossomos na forma de “gaps” ou de quebras em preparações cromossômicas metafásicas (SPADARI; SALA; PEDRALI-NOY, 1982; MAKIOKA et al., 1999; RUIZ-HERRERA et al., 2004; GLOVER et al., 2005). Os SFCs expressos na forma de “gaps” e quebras podem envolver apenas uma das cromátides ou as duas cromátides dos cromossomos e podem ser visualizados nos cromossomos utilizando as técnicas de banda G e da FISH (RUIZ-HERRERA et al., 2002; RUIZ-HERRERA et al., 2004; GLOVER et al., 2005; OUYANG et al., 2006).

Foi observado que os SFs estão relacionados com a evolução genômica dos mamíferos. Existem regiões cromossômicas conhecidas pelo acúmulo de pontos de quebras que são utilizados e reutilizados durante a evolução genômica, sendo chamados de pontos de quebras evolutivos. Em humanos, há evidências de que esses pontos se acumulam com maior frequência nos SFs. Foi

proposto que SFs com os pontos de quebras evolutivos são conservados e transmitidos a partir de um ancestral comum (RUIZ-HERERRA; CASTRESANA; ROBINSON, 2006).

REFERÊNCIAS

ABRIL, V. **Evolução cromossômica no veado-mateiro – *Mazama americana* (MAMMALIA; CERVIDAE).** 2009. 92 f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento Animal) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Jaboticabal, 2009.

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. 31, p. 53-57, 2008.

ABRIL, V. V.; SARRIA-PEREA, J. A.; VARGAS-MUNAR, D. S. F.; DUARTE, J. M. B. Chromosome Evolution. In: DUARTE, J. M. B.; GONZÁLEZ, S. (1 ed.). **Neotropical Cervidology. Biology and Medicine of Latin American Deer**. Jaboticabal: FUNEP e IUCN, 2010, p. 18-26.

ALLEN, J. A. Notes on American deer of the genus *Mazama*. **Bulletin American Museum of Natural History**, New York, v. 34, p. 521-553, 1915.

AMOS, A.; DOVER, G. The distribution of repetitive DNAs between regular and supernumerary chromosomes in species of *Glossina* (Tsetse): a two-step process in the origin of supernumeraries. **Chromosoma**. Berlin v. 81, p. 673-690, 1981.

AZARA, F. **Essais sur l'histoire naturalle des quadrupedes de la province du Paraguay**. Paris: Traduits sur le manuscrit inédit de l'auteur par M. L. E. Moreau-Saint-Méry, 1801. P. 1-36.

BAKER, R. J.; CHESSER, R. K.; KOOP, B. F.; HOYT, R. A. Adaptive nature of chromosomal rearrangement: differential fitness in pocket gophers. **Genetica**, Wien, v. 61, p. 161-164, 1983.

BAKER, R. J.; 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.

BIDEGARAY, L.; MALDONADO, J.; DUARTE, J. M. B.; GONZÁLEZ, S. Variabilidad genética en *Mazama gouazoubira* (MAMMALIA; CERVIDAE). In: **IV Taller de Cervídos del Uruguay – VII Jornadas de Zoología del Uruguay**, 2003, Montevideo. Anais do IV Taller de Cervídos del Uruguay – VII Jornadas de Zoología del Uruguay. Montevideo: Sociedad Zoológica del Uruguay, 2003, 173p.

BLACK-DÉCIMA, P.; ROSSI, R. V.; VOGLIOTTI, A.; CARTES, J. L.; MAFFEI, L.; DUARTE, J. M. B.; GONZÁLEZ, S.; JULIÁ, J. P. Brown brocket deer *Mazama gouazoubira* (Fischer, 1814). In: DUARTE, J. M. B.; GONZÁLEZ, S (1 ed.). **Neotropical Cervidology. Biology and Medicine of Latin American Deer.** Jaboticabal: FUNEP e IUCN, 2010, p. 190-201.

CAMACHO, J. P. M.; SHARBEL, T. F.; BEUKEBOOM, L. W. B-chromosome evolution. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B – Biological Sciences**. London, v. 355, p. 163-178, 2000.

CAPANNA, E.; CIVITELLI, M. V.; CRISTALDI, M. Chromosomal rearrangement, reproductive isolation and speciation in mammals. The case of *Mus musculus*. **Bolletino di zoologia**, London, v. 44, p. 213-246, 1977.

DHAR, M. K.; FRIEBE, B.; KOUL, A. K.; GILL, B. S. Origin of an apparent B chromosome by mutation, chromosome fragmentation and specific DNA sequence amplification. **Chromosoma**, Berlin, v. 111, p. 332-340, 2002.

DUARTE, J. M. B. **Aspectos taxonômicos e citogenéticos de algumas espécies de cervídeos brasileiros**. 1992. 153p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento Animal) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 1992.

DUARTE, J. M. B. Análise taxonômica dos *Mazama* cinzas do Brasil. 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 “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, 1998.

DUARTE, J. M. B.; GIANNONI, M. L. Cytogenetic analysis of the Pampas Deer, *Ozotoceros bezoarticus* (Mammalia, Cervidae). **Brazilian Journal of Genetics**. Ribeirão Preto, v. 18, p. 485-488, 1995.

DUARTE, J. M. B.; GONZÁLEZ, S. **Neotropical Cervidology. Biology and Medicine of Latin American Deer.** Jaboticabal: FUNEP e IUCN, 2010, 394p.

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

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, p. 403-410, 2003.

DUARTE, J. M. B.; MERINO, M. L. Taxonomia e evolução. In: DUARTE, J. M. B. (ed.). **Biologia e Conservação de Cervídeos Sul-Americanos*: Blastocerus*, *Ozotoceros* e *Mazama***. Jaboticabal: FUNEP, 1997, p. 1-21.

EISENBERG, J. F. The evolutionary history of the Cervidae with special reference to the South American radiation. In: WEMMER, C. (ed.). **Biology and Management of the Cervidae**. Washington D.C.: Smithsonian Institution Press, 1987, p 60-64.

ESTANDARTE, A. K. C. **Staining Strategies for Imaging of Metaphase Chromosomes**. Department of Chemistry - University College London University of London. Dissertação de Mestrado, 2012.

FERGUSON-SMITH, M. A.; TRIFONOV, V. Mammalian karyotype evolution. **Nature Reviews Genetics**. London, v. 8, p. 950-962, 2007.

FISK, E. L. The chromosomes of *Zea mays*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. Washington, v. 11, p. 352-356, 1925.

FIGUEIREDO, M. G, de. **Filogenia e taxonomia dos veados cinza (*Mazama gouazoubira* e *Mazama nemorivaga*)**. 2014. 57p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento Animal) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2014.

FIORILLO, B. F.; SARRIA-PEREA, J. A.; ABRIL, V. V.; DUARTE, J. M. B. Cytogenetic description of the Amazonian brown brocket *Mazama nemorivaga* (Artiodactyla; Cervidae). **Comparative Cytogenetics**, Sofia, v. 7, p. 25-31, 2013.

FISCHER, G. Zoognosia Tabulis Synoptics Illustrata. **Typis Nicolai Sergeidis Vsevolozky**, Mosquae, v. 3, p. 1-732, 1814.

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

GARAGNA, S.; MARZILIANO, N.; ZUCCOTTI, M.; SEARLE, J. B.; CAPANNA, E.; REDI, C. A. Pericentromeric organization at the fusion point of mouse Robertsonian translocation chromosomes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 98, p. 171-175, 2001.

GEIST, V. **Deer of the world. Their evolution, behavior, and ecology**. Pennsylvania: Stackpole Books, 1998. p. 1-122.

GLOVER, T. W.; STEIN, C. K. Chromosome breakage and recombination at fragile sites. **The American Journal of Human Genetics**, Houston, v. 43, p. 265-273, 1988.

GLOVER, T. W.; ARLT, M. F.; CASPER, A. M.; DURKIN, S. G. Mechanisms of common fragile site instability. **Human Molecular Genetics**, Oxford, v. 14, p. 197-205, 2005.

GOODPASTURE, C.; BLOOM, S. E. Visualization of Nucleolar Organizer Regions in Mammalian Chromosomes Using Silver Staining. **Chromosoma**, Berlin, v. 53, p. 37-50, 1975.

GRIFFITHS, A. J. F.; WESSLER, S. R.; LEWONTIN, R. C.; CARROLL, S. B. Alterações Cromossômicas em Larga Escala. In: _____. 9. ed. **Introdução à Genética**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A., 2009, p. 475-515.

GROSS, M. C.; SCHNEIDER, C. H.; VALENTE, G. T.; MARTINS, C.; FELDBERG, E. Variability of 18S rDNA locus among *Symphysodon* fishes: chromosomal rearrangements. **Journal of Fish Biology**, Scotland, v. 76, p. 1117-1127, 2010.

GROVES, C. P.; GRUBB, P. Relationships of Living Deer. In: WEMMER, C. M. (ed.). **BIOLOGY and MANAGEMENT of the CERVIDAE.** Washington: Smithsonian Institution Press, 1987, p. 21-59.

GRUBB, P. Order Artiodactyla. In: WILSON, D. E.; REEDER, D. M. (eds.). **Mammal species of the world, a taxonomic and geographic reference.** Baltimore: The John Hopkins University Press, 2005, p. 637-722.

GUERRA, M. Variação e Evolução Cromossômica: Variação Estrutural. In: _____. (1 ed.). **Introdução à Citogenética Geral**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A., 1988, p. 102-120.

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.

HAYMAN, D. L.; MARTIN, P. G. Supernumerary chromosomes in the marsupial *Schoinobates Volans* (Ker). **Australian Journal of Biological Sciences**, Melbourne, v. 18, p. 1081-1082, 1965.

HENDERSON, A. S.; WARBURTON, D.; ATWOOD, K. C. Location of Ribosomal DNA in the Human Chromosome Complement. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 69, p. 3394-3398, 1972.

HENDERSON, A. S.; EICHER, E. M.; YU, M. T.; ATWOOD, K. C. The Chromosomal Location of Ribosomal DNA in the Mouse. **Chromosoma**, Berlin, v. 49, p. 155-160, 1974.

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.

HSU, T. C.; SPIRITO, S. E.; PARDUE, M. L. Distribution of 18+28S Ribosomal Genes in Mammalian Genomes. **Chromosoma**, Berlin, v. 53, p. 25-36, 1975.

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.

INTERNATIONAL COMMISSION ON ZOOLOGICAL NOMENCLATURE (ICZN).Opinion 1985 (Case 3018). *Cervus gouazoubira* Fischer, 1814 (currently Mazama *gouazoupira*; Mammalia, Artiodactyla): specific name conserved as the correct original spelling. **Bulletin of the Zoological Nomenclature**, London, 58:247, 2001.

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

KASAHARA, S. **Introdução à Pesquisa em Citogenética de Vertebrados**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 2009, 160p.

KOOP, B. F.; BAKER, R. J.; GENOWAYS, H. H. Numerous chromosomal polymorphisms in a natural population of rice rats (*Oryzomys*, Cricetidae). **Cytogenetics and Cell Genetics**, Basel, v. 35, p. 131-135, 1983.

LANGER, P. R.; WALDROP, A. A.; WARD, D. C. Enzymatic synthesis of biotin-labeled polynucleotides: Novel nucleic acid affinity probes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 78, p. 6633-6637, 1981.

LÓPEZ-LEÓN, M. D.; NEVES, N.; SCHWARZACHER, T.; HESLOP-HARRISON, J. S.; HEWITT, G. M.; CAMACHO, J. P. M. Possible origin of a B chromosome deduced from its DNA composition using double FISH technique. **Chromosome Research**, Oxford, v. 2, p. 87-92, 1994.

MAKIOKA, A.; OHTOMO, H.; KOBAYASHI, S.; TAKEUCHI, T. Effects of Aphidicolin on *Entamoeba histolytica* Growth and DNA Synthesis. **Tokai Journal of Experimental and Clinical Medicine**, Tokyo, v. 23, p. 417-422, 1999.

MATSUBARA, K.; YAMADA, K.; UMEMOTO, S.; TSUCHIYA, K.; IKEDA, N.; NISHIDA, C.; CHIJIWA, T.; MORIWAKI, K.; MATSUDA, Y. Molecular cloning and characterization of the repetitive DNA sequences that comprise the constitutive heterochromatin of the A and B chromosomes of the Korean field mouse (*Apodemus peninsulae*, Muridae, Rodentia). **Chromosome Research**, Oxford, v. 16, p. 1013-1026, 2008.

MERINO, M. L.; ROSSI, R. V. Origin, systematics, and morphological radiation. In: DUARTE, J. M. B.; GONZÁLEZ, S. (1 ed.). **Neotropical Cervidology. Biology and Medicine of Latin American Deer**. Jaboticabal: FUNEP e IUCN, 2010, p. 2-11.

MOORE, J. W.; ELDER, R. L. Chromosome of the fox. **Journal of Heredity**, Oxford, v. 56, p. 142-143, 1965.

NACHMAN, M. W.; SEARLE, J. B. Why is the house mouse karyotype so variable? **Trees**, Heidelberg, v. 10, p. 397-402, 1995.

NEITZEL, H. Chromosomenevolution in der Familie der Hirshe (Cervidae). **Bongo**, Berlin, v. 3, p. 27-38, 1979.

NEITZEL, H. Karyotypenevolution und deren Bedeutung für den Speciationsprozess der Cerviden (Cervidae; Artiodactyla; Mammalia). 1982. Ph.D. Thesis, Freie Universität, Berlin.

NEITZEL, H. Chromosome evolution of Cervidae: Karyotypic and molecular aspects. In: OBE, G.; BASLER, A. (eds.). **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.

OUYANG, Y.; KWON, Y. T.; AN, J. Y.; ELLER, D.; TSAI, S-C.; DIAZ-PEREZ, S.; TROKE, J. J.; TEITELL, M. A.; MARAHRENS, Y. Loss of Ubr2, an E3 ubiquitin ligase, leads to chromosome fragility and impaired homologous recombinational repair. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 596, p. 64-74, 2006.

PENITENTE, M.; DANIEL, S. N.; SOBRINHO-SCUDELER, P. E.; FORESTI, F.; PORTO-FORESTI, F. B chromosome variants in *Prochilodus lineatus* (Characiformes, Prochilodontidae) analyzed by microdissection and chromosome painting techniques. **Caryologia**, Firenze, v. 69, p. 181-186, 2016.

PINDER, L.; LEEUWENBERG, F. Veado-catingueiro (*Mazama gouazoubira*, Fischer 1814). In: DUARTE, J. M. B (ed.). **Biologia e Conservação de Cervídeos Sul-Americanos: *Blastocerus, Ozotoceros* e *Mazama***. Jaboticabal: FUNEP, 1997, p. 60-67.

PINKEL, D.; STRAUME, T.; GRAY, J. W. Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 83, p. 2934-2938, 1986.

PINKEL, D.; LANDEGENT, J.; COLLINS, C.; FUSCOE, J.; SEGRAVES, R.; LUCAS, J.; GRAY, J. W. Fluorescence *in situ* hybridization with human chromosome-specific libraries: Detection of trisomy 21 and translocations of chromosome 4. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 85, p. 9138-9142, 1988.

PUTMAN, R. **The natural history of deer**. London: Christopher Helm. 1988. 191p.

RANDOLPH, L. F. Genetic characteristics of the B chromosomes in maize. **Genetics**, Rockville Pike Bethesda, v. 26, p. 608-631, 1941.

RIESEBERG, L. H. Chromosomal rearrangements and speciation. **Trends in Ecology & Evolution**, Amsterdam, v. 16, p. 351-358, 2001.

RODRIGUES, T. F.; CERVEIRA, J. F.; DUARTE, J. M. B. Uso de áreas agrícolas por *Mazama gouazoubira* (Mammalia; Cervidae) no Estado de São Paulo. **Iheringia. Série Zoológica**, Porto Alegre, v. 104, p. 439-445, 2014.

ROSSI, R. V. **Taxonomia de *Mazama* Rafinesque, 1817 do Brasil (Artiodactyla; Cervidae).** 2000. Não paginado. Dissertação (Mestrado em Zoologia) – Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.

RUBES, J.; MUSILOVA, P.; MASTROMONACO, G. F. Cytogenetics of wild and captive bred non-domestic animals. **Cytogenetics and Genome Research**, Basel, v. 120, p. 61-68, 2008.

RUIZ-HERRERA, A.; PONSÀ, M.; GARCÍA, F.; EGOZCUE, J.; GARCÍA, M. Fragile sites in human and *Macaca fascicularis* chromosomes are breakpoints in chromosome evolution. **Chromosome Research**, Oxford, v. 10, p. 33-44, 2002.

RUIZ-HERRERA, A.; GARCIA, F.; FRONICKE, L.; PONSA, M.; EGOZCUE, J.; CALDES, M. G.; STANYON, R. Conservation of aphidicolin-induced fragile sites in Papionini (Primates) species and humans. **Chromosome Research**, Oxford, v. 12, p. 683-690, 2004.

RUIZ-HERERRA, A.; CASTRESANA, J.; ROBINSON, T. J. In mammalian chromosomal evolution driven by regions of genome fragility? **Genome Biology**, London, v. 7, p. R115, 2006.

SEABRIGHT, A. T. A rapid banding technique for human chromosomes**. The Lancet**, London, v. 2, p. 971-972, 1971.

SILVA, D. M. Z. A.; DANIEL, S. N.; CAMACHO, J. P. M.; UTSUNOMIA, R.; RUIZ-RUANO, F. J.; PENITENTE, M.; PANSONATO-ALVES, J. C.; HASHIMOTO, D. T.; OLIVEIRA, C.; PORTO-FORESTI, F.; FORESTI, F. Origin of B chromosomes in the genus *Astyanax* (Characiformes, Characidae) and the limits of chromosome painting. **Molecular Genetics and Genomics**, Berlin, v. 291, p. 1407-1418, 2016.

SPADARI, S.; SALA F.; PEDRALI-NOY, G. Aphidicolin: a specific inhibitor of nuclear DNA replication in eukaryotes. **Trends in Biochemical Sciences**, Berlin, v. 7, p. 29-32, 1982.

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

SUTHERLAND, G. R. Heritable fragile sites on human chromosomes. II: Distribution, phenotypic effects and cytogenetics. **The American Journal of Human Genetics**, Houston, v. 31, p. 136-148, 1979.

SUTHERLAND, G. R. The role of nucleotides in human fragile sites expression. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 200, p. 2007-213, 1988.

SUTHERLAND, G. R.; BAKER, E.; RICHARDS, R. I. Fragile sites still breaking. **Trends in Genetics**, Riverport Lane, v. 14, p. 501-506, 1998.

SUTHERLAND, G. R.; RICHARDS, R. I. Fragile sites – Cytogenetics similarity with molecular diversity. **The American Journal of Human Genetics**, Houston, v. 64, p. 354-359, 1999.

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

TEMPLETON, A. R. Mechanisms of speciation – a population genetic approach. **Annual Review of Ecology and Systematics**, Palo Alto, v. 12, p. 23-48, 1981.

TRIFONOV, V. A.; DEMENTYEVA, P. V.; LARKIN, D. M.; O'BRIEN, P. C. M.; PERELMAN, P. L.; YANG, F.; FERGUSON-SMITH- M. A.; GRAPHODATSKY, A. S. Transcription of a protein-coding gene on B chromosomes of the Siberian roe deer (*Capreolus pygargus*). **BioMed Central Biology**, London, v. 11, p. 90-101, 2013.

VALERI, M. P. **Caracterização cariotípica de uma população de *Mazama gouazoubira* (ARTIODACTYLA; CERVIDAE) do Pantanal da Nhecolândia.** 2014. 48p. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Zootecnia) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Jaboticabal, 2014.

VARGAS-MUNAR, D. S. F.; SARRIA-PEREA, J. A.; DUARTE, J. M. B. Different responses to doxorubicin-induced chromosome aberrations in Brazilian deer species. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 9, p. 1545-1549, 2010.

WEBB, S. D. Evolutionary history of new world deer. In: VRBA, E. S.; SCHALLER, G. B. (eds.) **Antelopes, deer, and relatives. Fossil record, behavioral ecology, systematic, and conservation**. New Haven e London: Yale University Press, 2000, p. 38-64.

WHITE, M. J. D. Models of speciation. **Science**, Washington, v. 159, p. 1065-1070, 1968.

WINSTON, J. E. Biological Nomenclature. In: _____ (ed.). **Describing Species: Pratical Taxonomic Procedure for Biologists**. New York: Columbia University Press, 1999, p. 19-39.

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, p.159-63, 1997c.

CAPÍTULO 2 – Identificação dos cromossomos envolvidos nas translocações Robertsonianas em *Mazama gouazoubira* (Mammalia; Cervidae)

RESUMO

Mazama gouazoubira exibe polimorfismo cromossômico intra específico, ocasionado pela ocorrência de translocações Robertsonianas e presença de cromossomos B. Animais variantes foram avaliados, com o intuito de investigar os cromossomos B e quais são os cromossomos que compõem as translocações Robertsonianas na população brasileira de *M. gouazoubira*. Dos 135 animais analisados, 68 (50,37%) apresentaram variação cromossômica (47 animais (69,12%) com cromossomos B, seis animais (8,82%) heterozigotos para uma translocação Robertsoniana, um indivíduo (1,47%) homozigoto para uma translocação Robertsoniana e 14 animais (20,59%) portadores de cromossomos B e heterozigotos para uma translocação Robertsoniana). Foi observada variação numérica inter e intraindividual de cromossomos B entre os 61 animais que os portam. Dos 21 animais portadores de translocações, foram identificados sete tipos distintos de translocações (X;16, X;21, 7;21, 8;21, 4;16, 20;26, 14;16), envolvendo nove cromossomos diferentes. As translocações X-autossômicas foram confirmadas pelas técnicas de banda C, coloração Ag-RON, hibridização *in situ* fluorescente (FISH) telomérica e pintura cromossômica com a sonda específica do cromossomo X. As diferentes translocações não seguiram um padrão específico de distribuição entre as diferentes regiões brasileiras. A população brasileira apresentou altas taxas de polimorfismo cromossômico, tanto em relação à presença e variação numérica de cromossomos B, como nos tipos de translocações e cromossomos envolvidos nessas translocações. Os diferentes tipos de translocações observados na espécie *M. gouazoubira* podem causar uma barreira citogenética, acarretando em isolamento reprodutivo e um rápido processo de especiação.

Palavras-chave: banda G; cromossomos B; fragilidade cromossômica; polimorfismo cromossômico; veado-catingueiro

Introdução

Os rearranjos cromossômicos constituem eventos cromossômicos responsáveis por causar isolamento reprodutivo, fundamental no processo de especiação. Esse tipo de especiação está associado a vários táxons que exibem variação cariotípica intraespecífica (CAPANNA; CIVITELLI; CRISTALDI, 1977). Entretanto, é necessário desvendar a maneira com que esses rearranjos são mantidos, se interagem e causam o isolamento reprodutivo, possibilitando compreender os mecanismos que atuam nos eventos de especiação. É conhecido que o rearranjo mais comumente encontrado é a translocação Robertsoniana (DION-CÔTÉ et al., 2015).

Pode-se dizer que a translocação Robertsoniana é o rearranjo mais frequente em espécies com variação cromossômica intraespecífica devido principalmente ao fato desse rearranjo não alterar o tamanho do genoma das espécies e nem afetar a expressão gênica (ROBERTSON, 1916; GAZAVE et al., 2003). Muitos mamíferos exibem polimorfismo cromossômico intraespecífico derivado de translocações Robertsonianas (*Neotoma lepida* e *Neotoma micropus*, BAKER; MASCARELLO, 1969; *Cervus nipponhortulorum*, GUSTAVSSON; SUNDT, 1969; *Sorex araneus*, FEDYK, 1980; *Oryzomys macconnelli*, KOOP; BAKER; GENOWAYS, 1983; *Cervus nippon pseudaxis*, BONNET et al., 2001; *Axis axis*, *Cervus albirostris*, *Cervus timorensis russa*, *Cervus unicolor* e *Cervus eldi siamensis*, BONNET-GARNIER et al., 2003).

Comumente é relatada a ocorrência de translocações Robertsonianas em diferentes espécies animais, sendo necessário considerar o fato de que esse rearranjo pode causar uma desvantagem seletiva devido a redução da fertilidade ocasionada pela incompatibilidade gamética (CAPANNA; CIVITELLI; CRISTALDI, 1977). Por outro lado, variações polimórficas parecem ser estáveis em algumas populações naturais e isoladas de mamíferos (KOOP; BAKER; GENOWAYS, 1983). Há relatos de que indivíduos heterozigotos para translocações Robertsonianas apresentam uma heterose positiva, sendo que os distúrbios meióticos decorrentes desse rearranjo podem ser compensados por uma pressão seletiva diferencial, considerada uma das forças seletivas que atuam na evolução cariotípica das

espécies. Dessa maneira, os indivíduos heterozigotos apresentam maior “fitness” em relação aos homozigotos, fornecendo um mecanismo inicial para que ocorra a evolução cromossômica (BAKER et al., 1983).

Tem sido relatado que a espécie *M. gouazoubira* apresenta polimorfismo cromossômico decorrente de presença de cromossomos B e altas e frequentes taxas de translocações Robertsonianas (DUARTE, 1992; 1998; DUARTE; JORGE, 1996). Entretanto, pouco se sabe sobre qual é a extensão desse polimorfismo, quais os cromossomos envolvidos nessas translocações e qual é o impacto desse rearranjo na população brasileira de *M. gouazoubira*. Diante disso, o presente trabalho buscou compreender qual é o tamanho do polimorfismo cromossômico do *M. gouazoubira*, quais cromossomos compõem as translocações Robertsonianas e se essas são as mesmas em diferentes localidades do Brasil.

Material e métodos

Foram avaliadas amostras de pele e sangue de 135 animais da espécie *M. gouazoubira* provenientes de diferentes localidades do Brasil (Apêndice A). As amostras de pele estavam estocadas no banco criogênico do Núcleo de Pesquisa e Conservação de Cervídeos (NUPECCE), localizado na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista -FCAV/UNESP, Câmpus de Jaboticabal. As amostras de sangue foram obtidas dos animais que são mantidos em cativeiro pelo NUPECCE. Cultivos de fibroblastos foram feitos a partir de fragmentos de pele (VERMA; BABU, 1995) e cultivos de linfócitos a partir de amostras de sangue heparinizadas (MOORHEAD et al., 1960). As preparações cromossômicas obtidas foram submetidas à coloração convencional utilizando o corante Giemsa, visando à caracterização citogenética dos espécimes (Apêndice B).

Os cromossomos corados com Giemsa foram classificados de acordo com a razão de braços (r) e o comprimento relativo (CR) (LEVAN; FREDGA; SANDBERG, 1964). Os valores de r foram usados para calcular a posição centromérica, classificando os cromossomos em metacêntricos ($1 \leq r < 1,7$), submetacêntricos ($1,7 \leq r \leq 3$) e acrocêntricos ($r > 3$), enquanto o CR dividiu os pares cromossômicos em grupos: grupo A (grandes cromossomos de dois braços,

CR≥6%), grupo C (pequenos cromossomos de dois braços, CR<6%), grupo D (grandes cromossomos de um braço, CR≥5%), grupo E (pequenos cromossomos de um braço, CR<5%) e grupo B (cromossomos B, CR<1,5%). Dados de r e CR de cada par cromossômico de todos os animais foram submetidos ao método dos quadrados mínimos para classificar e agrupar os cromossomos, com nível de significância de 5%. As médias de r e CR foram comparadas pelo teste de Tukey (P<0,05), com o auxílio do programa GraphPad Prism versão 7.0.

Após a coloração convencional, foi realizada uma triagem para identificar os indivíduos normais e os indivíduos variantes (portadores de cromossomos B e de translocações Robertsonianas). Os animais portadores de translocações cromossômicas foram submetidos ao bandamento G (SEABRIGHT, 1971), com o intuito de identificar os cromossomos envolvidos nessas translocações. Para a correta identificação das translocações X-autossômicas, foram realizadas as técnicas de banda C (SUMNER, 1972), coloração Ag-RON (HOWELL; BLACK, 1980), hibridização *in situ* fluorescente (FISH) com sondas teloméricas e pintura cromossômica com o uso de uma sonda específica do cromossomo X da espécie *M. gouazoubira*. As sondas teloméricas foram construídas por PCR utilizando-se os iniciadores 1 (TTAGGG)5 e 2 (CCCTAA)5 e marcadas por meio da incorporação da Digoxigenina Roche®, também por PCR (IJDO et al., 1991) (Apêndice C – 1). A sonda do cromossomo X foi obtida pelo método de citometria de fluxo, preparada a partir de uma linhagem celular de um macho de *M. gouazoubira* (2n=70+3B; NF=70) mantida pelo laboratório de Citogenética Molecular do Departamento de Medicina Veterinária, Universidade de Cambridge, Inglaterra, coordenado pelo Professor Dr. Malcolm A. Ferguson-Smith. Os cromossomos foram separados por citometria de fluxo (YANG et al., 1995) e amplificados por DOP-PCR (*Degenerate Oligonucleotide Primer – Polymerase Chain Reaction*) (TELENIUS et al., 1992; FERGUSON-SMITH; YANG; O'BRIEN, 1998), sendo a sonda marcada por meio da incorporação da Digoxigenina Roche®, por DOP-PCR.

Após a identificação dos cromossomos envolvidos nas translocações e os diferentes tipos de translocações Robertsonianas encontradas, a FISH com sondas dos cromossomos translocados obtidas por microdissecção foi realizada com o intuito de confirmar se um mesmo tipo de translocação era compartilhada por

diferentes animais. Para tanto, foram confeccionadas, por microdissecção, sondas apenas das translocações mais frequentes (X;16 e 14;16), sendo a amplificação do DNA realizada com o kit WGA4 Sigma Genome Plex® (Single Cell Whole Genome Amplification Kit) e a reamplificação e marcação (Digoxigenina Roche®) foi feita com o kit WGA3 Sigma (Genome Plex® WGA Reamplification Kit) (GRIBBLE et al., 2004).

Na FISH, independentemente do tipo de sonda utilizada (sonda telomérica, sonda específica do cromossomo X e sonda das translocações X;16 e 14;16), as preparações cromossômicas fixadas nas lâminas foram pepsinizadas, lavadas em PBS e em 2XSSC, desidratadas em série alcoólica e então foram envelhecidas por 1 hora a 60ºC. Depois foram desnaturadas em formamida 70%/2xSSC e desidratadas em uma nova série alcoólica. Concomitantemente à desnaturação das preparações cromossômicas, as sondas foram adicionadas em uma solução de hibridização, depois desnaturadas e incubadas nas preparações cromossômicas a 37ºC “overnight”. A detecção das sondas marcadas com digoxigenina foi realizada com Anti-Digoxigenina Roche® e a contra-coloração cromossômica foi feita com DAPI e “antifade”. Na etapa em que as sondas foram misturadas com a solução de hibridização, também foi adicionado DNA competidor não marcado com o intuito de suprimir a hibridização das sondas com as sequências repetitivas encontradas no genoma. Foram utilizados três competidores diferentes: o DNA de esperma de Salmão, “Human Cot-1” e DNA total da própria espécie (*M. gouazoubira*). A supressão cromossômica foi utilizada para a sonda específica do cromossomo X e para as sondas dos cromossomos translocados.

O teste de Qui-Quadrado, com nível de significância a 5% foi utilizado para verificar se a população brasileira de *M. gouazoubira* analisada estava em equilíbrio de Hardy-Weinberg em relação aos diferentes tipos de translocações Robertsonianas encontradas, com o auxílio do programa GraphPad Prism versão 7.0. Os valores observados e esperados foram calculados para cada tipo de translocação, em que p^2 representa os indivíduos normais, 2pq os indivíduos heterozigotos para uma translocação e q^2 os indivíduos homozigotos para uma translocação.

Todas as preparações cromossômicas foram analisadas e fotografadas no microscópio Olympus BX60 (objetiva de 100x) equipado com uma câmera Zeiss AxioCam MRm, por meio do programa AxioVision Release 4.8.2. Entretanto, as preparações submetidas às técnicas de citogenética clássica foram analisadas na microscopia de campo claro, enquanto as preparações submetidas à FISH foram analisadas na microscopia de fluorescência. As imagens obtidas foram editadas com o auxílio do programa Adobe Photoshop CS6 Portable.

RESULTADOS

Análise convencional

Após a análise convencional (Giemsa) das preparações cromossômicas dos animais da espécie *M. gouazoubira*, foi possível traçar o perfil citogenético da espécie no Brasil. O cariótipo padrão da espécie (2n=70; NF=70) é composto por 68 cromossomos autossômicos acrocêntricos, cromossomo sexual X acrocêntrico e Y metacêntrico, sendo que o X é o maior cromossomo do lote A enquanto o Y é o menor. Frequentemente são encontrados indivíduos variantes, ou seja, com cariótipos distintos do padrão para a espécie, caracterizados pela presença de cromossomos B e/ou ocorrência de translocações Robertsonianas. Os cromossomos B variaram de zero a três, são pequenos e com morfologia acrocêntrica ou puntiforme. Em cada indivíduo foi encontrado apenas um tipo de translocação Robertsoniana, que pode estar em heterozigose (2n=69; NF=70) ou em homozigose (2n=68; NF=70).

Foram identificados e quantificados os indivíduos variantes, sendo que dos 135 animais analisados, 68 (50,37%) apresentaram variação cromossômica e 67 (49,63%) apresentaram cariótipo padrão (Figuras 1a e 1b). Entre os indivíduos variantes, 61 animais foram portadores de cromossomos B e 21 apresentaram translocações Robertsonianas, sendo que 47 animais (69,12%) apresentaram apenas cromossomos B (Figura 1c), seis animais (8,82%) foram heterozigotos para uma translocação Robertsoniana (Figura 1d), um indivíduo (1,47%) foi homozigoto para uma translocação Robertsoniana e 14 animais (20,59%) portadores de cromossomos B e heterozigotos para uma translocação Robertsoniana.

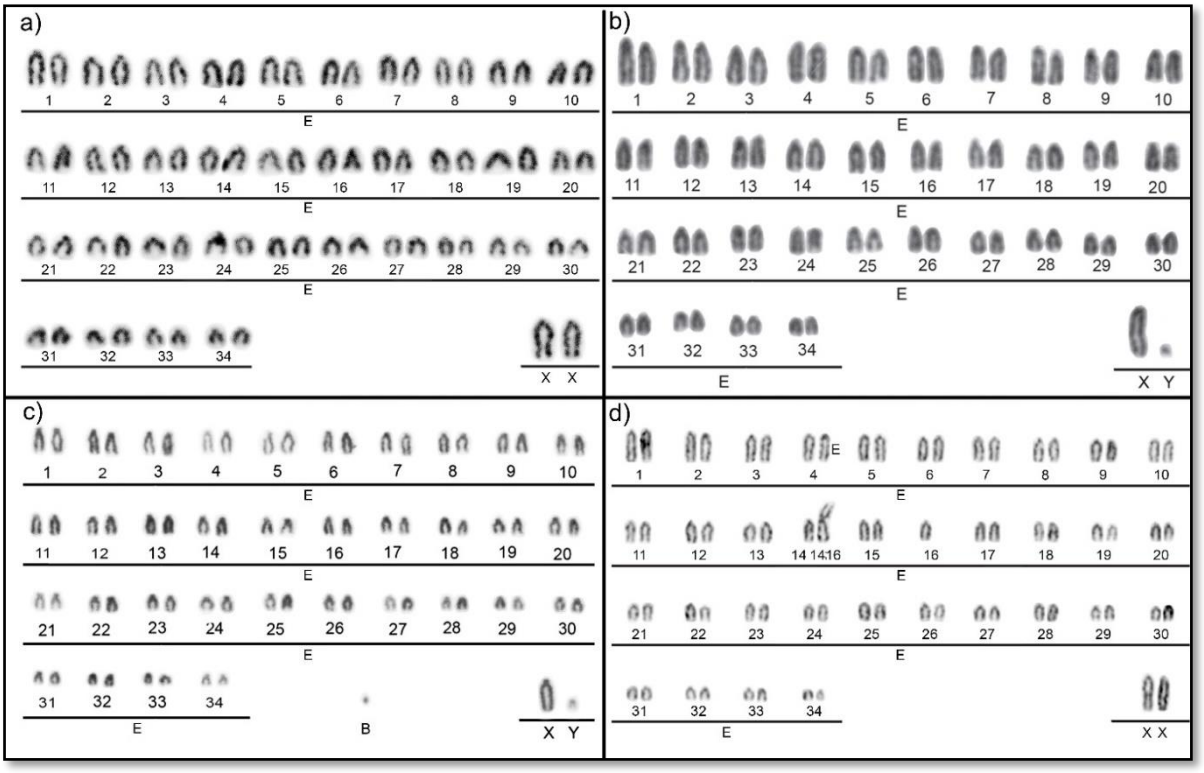

Figura 1. Cariótipos de indivíduos da espécie *Mazama gouazoubira*, sob coloração convencional (Giemsa) e aumento de 1000x. (a) Fêmea padrão (2n=70; NF=70); (b) Macho padrão (2n=70; NF=70); (c) Macho portador de um cromossomo B (2n=70+1B; NF=70); (d) Fêmea heterozigota para uma translocação Robertsoniana (14;16) (2n=69; NF=70).

A frequência de cromossomos B encontrada nos animais analisados indicam que há uma grande variação numérica tanto inter como intraindividual (Tabela 1). A presença de três cromossomos Bs foi menos frequente em todos indivíduos, com exceção do T92, que apresentou maior frequência de três cromossomos Bs. Metáfases com cromossomos Bs variando de zero a um foram mais frequentes na maioria dos animais analisados. Em três animais (T17, Mgo04 e CatFap02) não foi observada nenhuma metáfase sem cromossomo B, ou seja, pelo menos um cromossomo B estava presente, sugerindo que a presença de cromossomo B possa ser indispensável para as células desses animais. O indivíduo Mgo04 apresentou número fixo de um cromossomo B nas células analisadas, reforçando a hipótese de que os cromossomos Bs não sejam dispensáveis.

Tabela 1. Frequência de cromossomos B em cada metáfase de alguns animais analisados.

	Frequência de cromossomos Bs (%) em cada metáfase			
Identificação	**0**	**1**	**2**	**3**
T17	0	33,33	50	16,67
T66	44	24	8	24
T92	14,28	21,43	14,28	50
T93	53,57	32,14	7,14	7,14
T94	58,33	33,33	4,17	4,17
T112	22,72	59,10	18,18	0
T117	71,42	14,29	14,29	0
T126	83,33	16,67	0	0
T128	84	16	0	0
T130	82,61	17,39	0	0
T131	26,09	47,83	17,39	8,69
T142	68,18	31,82	0	0
T145	50	28,58	14,28	7,14
T152	80	20	0	0
T155	85,71	14,29	0	0
T156	76	24	0	0
T157	84	16	0	0
T159	70,59	29,41	0	0
T177	80	20	0	0
T191	93,75	6,25	0	0
T193	50	25	25	0
T194	68	8	12	12
T195	76,19	23,81	0	0
T196	80	20	0	0
T209	71,43	28,57	0	0
T277	36,37	36,37	27,27	0
T278	29,17	16,66	29,17	25
T294	56	44	0	0
T300	42,86	57,14	0	0
T302	71,43	28,57	0	0
T303	75	25	0	0
T306	16,66	83,34	0	0
T307	50	39,28	7,14	3,58
T314	56,52	43,48	0	0
T318	78,96	10,52	10,52	0
T319	80	12	8	0
T323	72,22	27,78	0	0
T331	78,28	13,04	4,35	4,35
T341	35,29	41,18	23,52	0
T347b	83,33	16,67	0	0
T352	65,22	34,78	0	0
T354	50	40	10	0
Mgo02	83,33	16,67	0	0
Mgo03	36,37	63,63	0	0
Mgo04	0	100	0	0
Mgo05	66,67	33,34	0	0
Mgo10	50	50	0	0
Mgo11	30	40	30	0
CatFap01	10,52	68,42	21,04	0
CatFap02	0	66,67	33,34	0
CatFap07	5	95	0	0

Biometria cromossômica

Como pode ser observado na Tabela 2, as médias do CR dos pares cromossômicos de todos os indivíduos analisados foram comparadas pelo teste de Tukey (*P*<0,05), classificando todos os pares cromossômicos como sendo do grupo E (pequenos cromossomos de um braço).

Tabela 2. Classificação dos pares cromossômicos de acordo com seus respectivos valores do comprimento relativo (CR).

Par cromossômico	CR		Grupo cromossômico
	Média	DP	
1	4,678	0,382	E
2	4,218	0,203	E
3	3,900	0,136	E
4	3,750	0,107	E
5	3,616	0,106	E
6	3,501	0,0989	E
7	3,414	0,0876	E
8	3,320	0,083	E
9	3,237	0,079	E
10	3,140	0,090	E
11	3,065	0,081	E
12	2,999	0,069	E
13	2,920	0,057	E
14	2,855	0,049	E
15	2,778	0,058	E
16	2,718	0,070	E
17	2,660	0,065	E
18	2,610	0,061	E
19	2,568	0,064	E
20	2,519	0,068	E
21	2,476	0,073	E
22	2,430	0,062	E
23	2,383	0,062	E
24	2,351	0,061	E
25	2,306	0,065	E
26	2,263	0,064	E
27	2,212	0,070	E
28	2,172	0,064	E
29	2,134	0,060	E
30	2,071	0,066	E
31	1,994	0,089	E
32	1,919	0,103	E
33	1,831	0,104	E
34	1,638	0,183	E
X	5,355	0,638	Grupo Sexual

DP = desvio padrão; E = pequenos cromossomos de um braço, CR<5%

As médias de r dos cromossomos translocados dos diferentes animais foram comparadas pelo teste de Tukey (*P*<0,05), evidenciando que há diferença

entre os cromossomos envolvidos nas translocações (Tabela 3). Nos animais T83, T92, T133, T143, T156, T177, T300 e T307, o braço longo do cromossomo translocado tem entre as maiores medidas do lote e, nesses animais, os cromossomos translocados foram classificados como sendo submetacêntricos. Nos animais T83, T92, T156, T177, T300 e T307, os valores de CR indicam que o braço longo dos cromossomos translocados tem a maior medida do lote. Já os animais Mgo03, T93, T94, T112, T126, T146, T191, T209, T273, T301, T302, T341 e T348 foram classificados como sendo do tipo metacêntrico.

Identificação dos cromossomos envolvidos nas translocações Robertsonianas

Com o bandamento G, foram identificados os cromossomos envolvidos nas translocações dos 21 animais portadores de translocação Robertsoniana (Tabela 3). A translocação do animal T302 é composta pelos cromossomos 16 e 4 (Figura 2a), enquanto nos animais Mgo03, T93, T94, T112, T146, T191, T209, T273, T341 e T348 são os cromossomos autossômicos 14 e 16 que estão fusionados (Figura 2b). O animal T301 tem os cromossomos autossômicos 21 e 7 envolvidos na translocação (Figura 2c) e o cromossomo translocado do animal T126 é composto pelos autossomos 20 e 26 (Figura 2d). Os animais T83, T92, T156, T300 e T307 possuem uma translocação Robertsoniana do tipo X-autossômica, ou seja, ocorreu uma fusão do cromossomo autossômico 16 com o cromossomo sexual X (Figura 2e). Outra translocação X-autossômica foi observada no animal T177, envolvendo o sexual X e o autossomo 21 (Figura 2g). Já o cromossomo translocado dos animais T133 e T143 é composto pelos cromossomos 8 e 21 (Figura 2f). Para a confirmação dos cromossomos envolvidos nas translocações, os padrões de banda G obtidos foram comparados com o idiograma descrito por Neitzel (1987) (Figura 3).

A análise estatística de Qui-Quadrado mostrou que não há diferenças estatisticamente significativas (P>0,05) entre os valores observados e esperados para cada tipo de translocação Robertsoniana avaliada, indicando que cada tipo de translocação está em equilíbrio de Hardy-Weinberg. Esse dado sugere que essas translocações são neutras e não apresentam valor adaptativo para os indivíduos que as portam.

Tabela 3. Cromossomos translocados: valores da razão entre os braços cromossômicos (r), classificação de acordo com os valores de r, cromossomos que compõem os braços curto e longo e presença em homozigose ou heterozigose.

Identificação	R	Classificação	Braço curto	Braço longo	Hetero/Homo
Mgo03	1,369	m	16	14	Hetero
T83	1,958	sm	16	X	Hetero
T92	2,288	sm	16	X	Hetero
T93	1,518	m	16	14	Hetero
T94	1,198	m	16	14	Hetero
T112	1,535	m	16	14	Hetero
T126	1,304	m	26	20	Hetero
T133	1,764	sm	21	8	Hetero
T143	1,728	sm	21	8	Hetero
T146	1,508/1,559	m/m	16	14	Homo
T156	2,049	sm	16	X	Hetero
T177	1,820	sm	21	X	Hetero
T191	1,441	m	16	14	Hetero
T209	1,448	m	16	14	Hetero
T273	1,257	m	16	14	Hetero
T300	2,005	sm	16	X	Hetero
T301	1,241	m	21	7	Hetero
T302	1,484	m	16	4	Hetero
T307	1,760	sm	16	X	Hetero
T341	1,317	m	16	14	Hetero
T348	1,558	m	16	14	Hetero

m =metacêntrico; sm = submetacêntrico; hetero = heterozigoto para uma translocação; homo = homozigoto para uma translocação

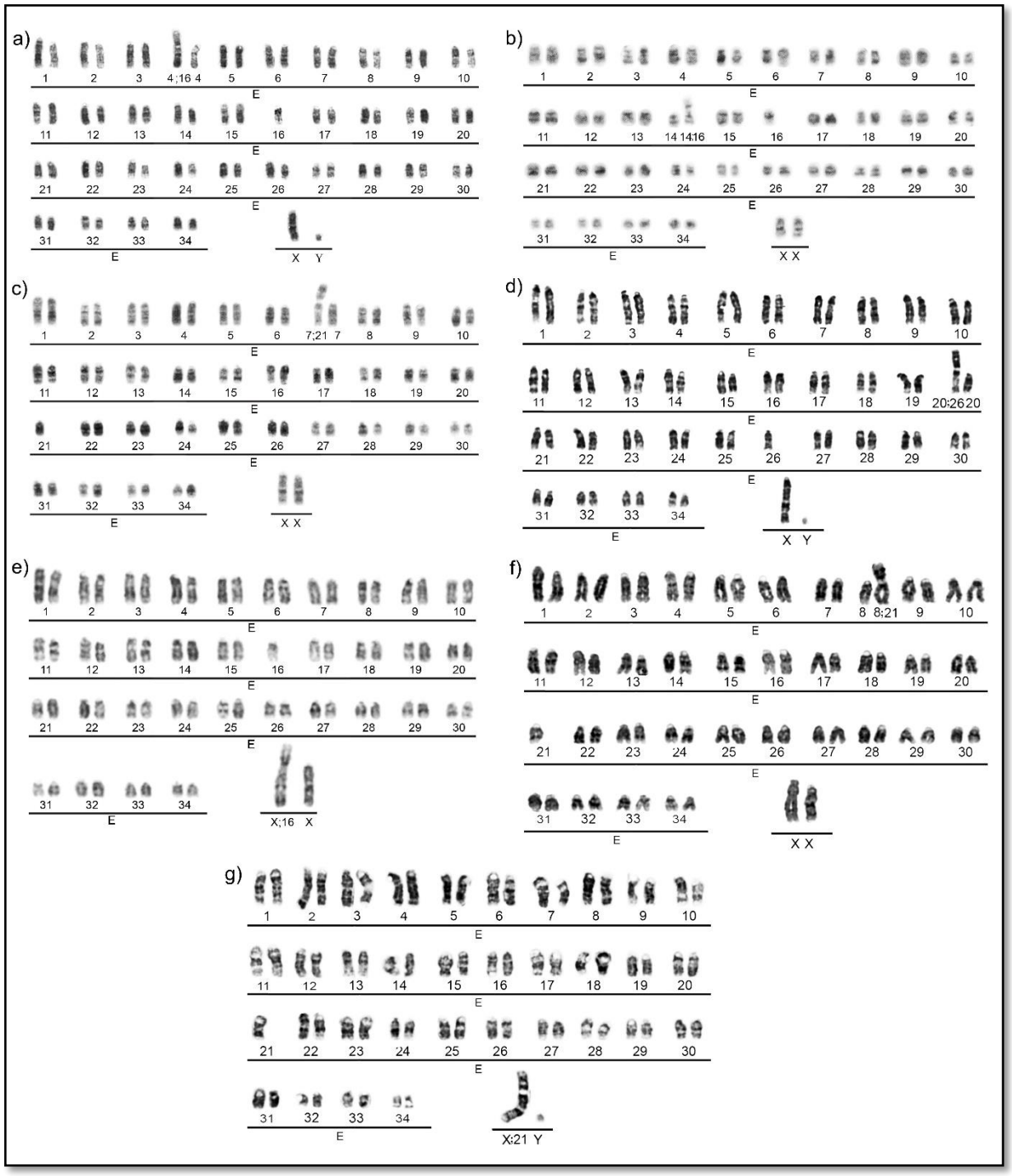

Figura 2. Cariótipos dos sete diferentes tipos de translocações em heterozigose encontradas no *M. gouazoubira*, sob bandamento G e aumento de 1000X. (a) Translocação Robertsoniana 4;16 (2n=69; NF=70); (b) Translocação Robertsoniana 14;16 (2n=69; NF=70); (c) Translocação Robertsoniana 7;21 (2n=69; NF=70); (d) Translocação Robertsoniana 20;26 (2n=69; NF=70); (e) Translocação Robertsoniana X;16 (2n=69; NF=70); (f) Translocação Robertsoniana 8;21 (2n=69; NF=70); (g) Translocação Robertsoniana X;21 (2n=69; NF=70).

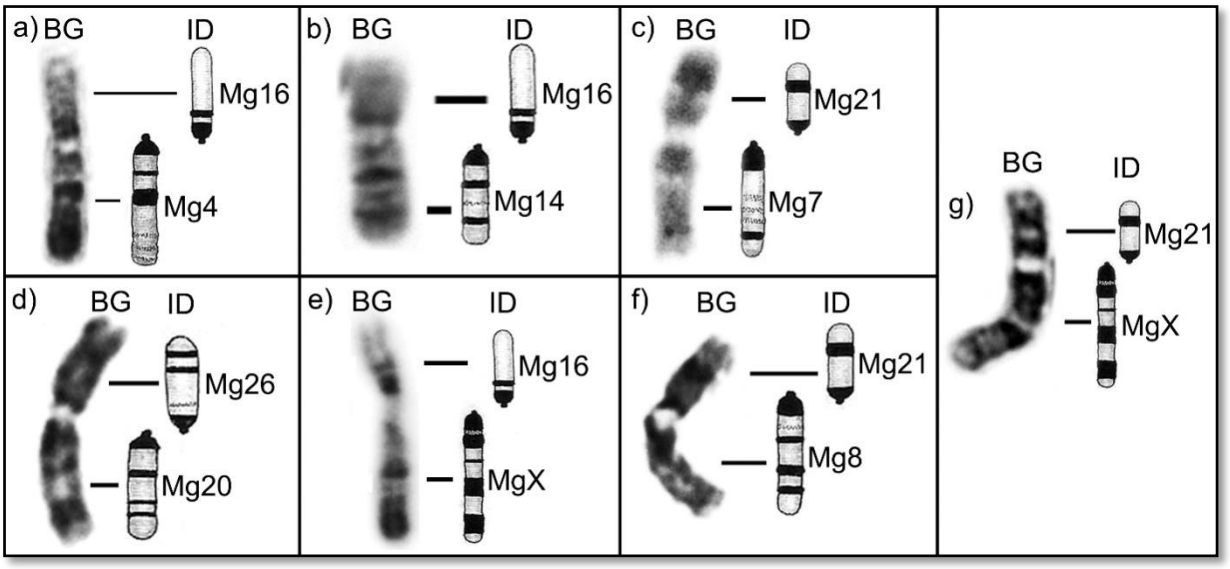

Figura 3. Comparação entre Banda G (BG) e o idiograma (ID) de Neitzel (1987) de cada tipo de translocação Robertsoniana. (a) Translocação 4;16; (b) Translocação 14;16; (c) Translocação 7;21; (d) Translocação 20;26; (e) Translocação X;16; (f) Translocação 8;21; (g) Translocação X;21.

Sete tipos diferentes de translocação Robertsoniana foram observados na população brasileira de *M. gouazoubira*, os quais envolvem nove cromossomos distintos. Desses sete tipos, o cromossomo 16 está presente em três tipos, estando associado com três cromossomos diferentes (4;16, 14;16 e X;16). O cromossomo 21 também está envolvido em três diferentes tipos de translocações, sendo observadas associações com os cromossomos 7, 8 e X. O cromossomo sexual X faz parte de duas diferentes translocações (X;16 e X;21).

Confirmação das translocações X-autossômicas

Bandamento C e Coloração Ag-RON

O bandamento C evidenciou blocos de heterocromatina constitutiva na região pericentromérica de todos os cromossomos autossômicos. O cromossomo sexual Y mostrou-se eucromático, enquanto o X apresentou um bloco heterocromático na região pericentromérica e uma banda intersticial (Figura 4). Todos os cromossomos translocados apresentaram um grande bloco heterocromático na região centromérica, que é o ponto de fusão entre os cromossomos envolvidos nas translocações. Como apenas o cromossomo X apresenta uma banda heterocromática intersticial, essa técnica foi eficiente em

comprovar o envolvimento do cromossomo X nas translocações Robertsonianas X;16 e X;21. As regiões organizadoras de nucléolo (RON) marcadas pela coloração Ag-RON estão localizadas nos telômeros dos pares 1 e 2. A biometria cromossômica mostrou que o cromossomo sexual X e os pares cromossômicos 1 e 2 são os maiores do lote A e que algumas translocações Robertsonianas apresentavam o braço longo composto por um grande cromossomo, portador da maior medida do lote. A associação desses dados mostra que como o braço longo do cromossomo translocado não é portador de RON e tem uma das maiores medidas, confirma a ocorrência das translocações X-autossômicas (Figura 5).

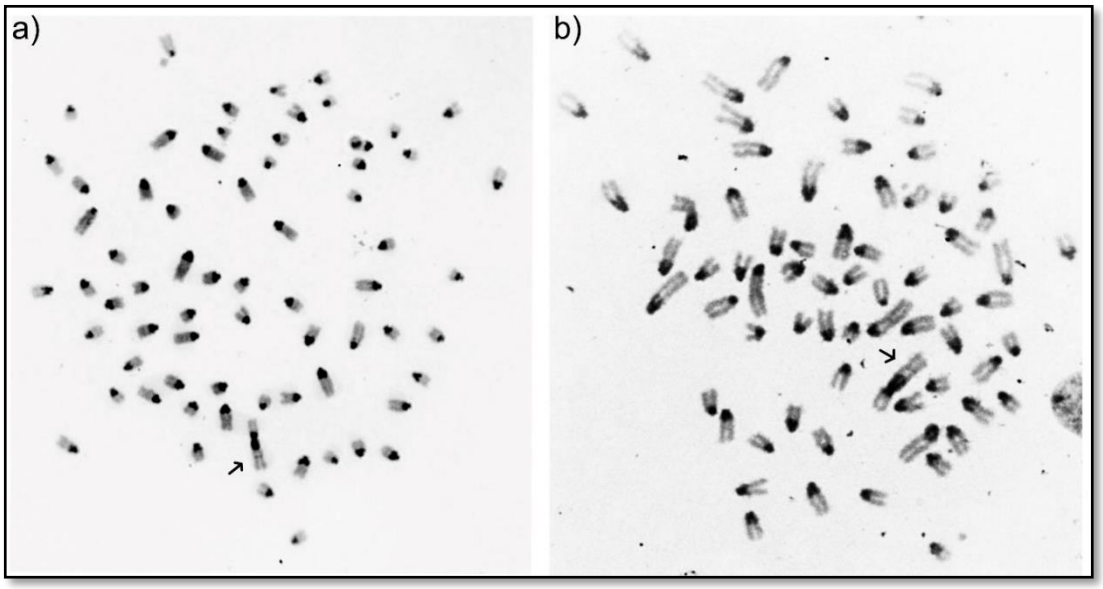

Figura 4. Bandamento C em *M. gouazoubira*, com aumento de 1000x. (a) e (b) Metáfases evidenciando a localização da heterocromatina constitutiva. Setas indicam a posição de uma banda heterocromática intersticial no cromossomo X.

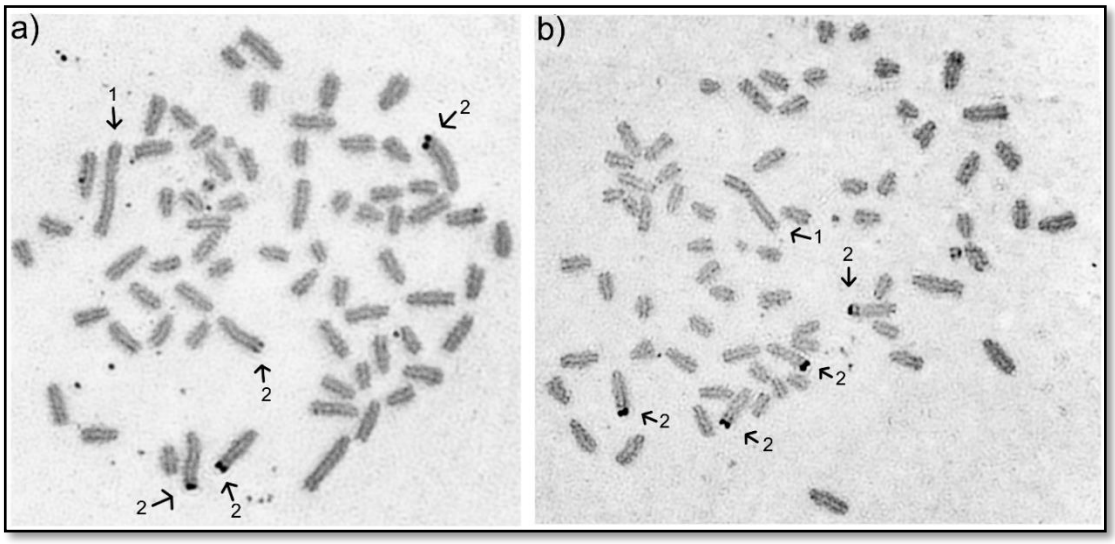

Figura 5. Coloração Ag-RON em *M. gouazoubira*, com aumento de 1000x. (a) e (b) Metáfases evidenciando a localização da RON. Setas 1 indicam o cromossomo translocado sem a presença de RON e setas 2 apontam a posição da RON nos autossomos.

FISH telomérica e Pintura cromossômica

Todos os cromossomos, autossomos e sexuais, apresentaram sinais teloméricos nas extremidades cromossômicas e apenas o cromossomo sexual X mostrou um sítio telomérico intersticial (STI) na região mediana do braço longo. A presença do STI foi de extrema importância para confirmar a ocorrência de translocações Robertsonianas X-autossômica (Figura 6a).

A pintura cromossômica da sonda do cromossomo X nos animais que apresentaram translocação X-autossômica (X;16 e X;21) mostrou uma correspondência total com o braço longo do cromossomo translocado e, nas fêmeas, com o outro cromossomo X, confirmando assim o envolvimento do cromossomo X nessa translocação (Figura 6b). Com a inversão da foto do contra corante DAPI para preto e branco, foi possível obter o mesmo padrão de bandas observadas na Banda G, dando maior suporte aos dados apresentados. Além disso, a foto invertida do DAPI também confirmou o padrão de bandas do braço curto dos cromossomos translocados (Figura 6c).

Assim, a análise conjunta dos dados fornecidos pela biometria cromossômica, Bandas G e C, Coloração Ag-RON, FISH telomérica e pintura cromossômica forneceram dados robustos para confirmar o envolvimento do cromossomo sexual X nas translocações X-autossômicas X;16 e X;21.

Hibridizações com sondas dos cromossomos translocados

A sonda do cromossomo translocado X;16 foi hibridizada nos animais T83, T92, T156, T300 e T307, enquanto a sonda do cromossomo translocado 14;16 foi hibridizada nos animais Mgo03, T93, T94, T112, T146, T191, T209, T273 e T348. Sinais de hibridização foram observados em todos os cromossomos autossômicos e sexuais. Apesar do sinal ser mais intenso nas regiões pericentroméricas, foram observados sinais ao longo dos braços de todos os cromossomos, não sendo possível observar apenas os sítios de hibridizações (Figura 7). Nenhum DNA supressor utilizado foi capaz de inibir as sequências de DNA repetitivo, impossibilitando a confirmar se as translocações X;16 e 14;16 são compartilhadas por diferentes animais.

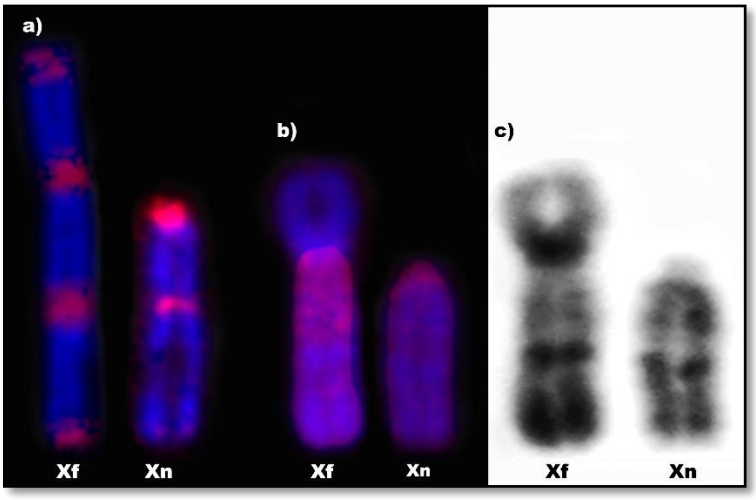

Figura 6. Translocações X-autossômicas: marcações no X fusionado (Xf) e no X normal (Xn). (a) FISH telomérica; (b) Pintura cromossômica; (c) DAPI invertido.

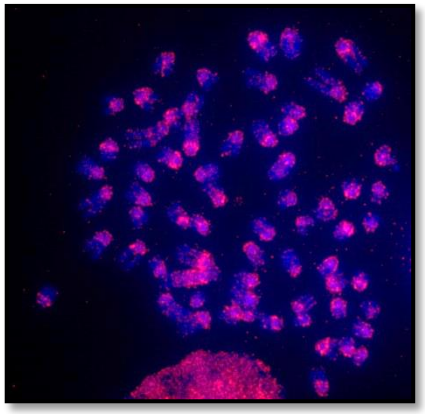

Figura 7. Pintura cromossômica com sondas dos cromossomos translocados obtidas pela microdissecção, com aumento de 1000x. A contra-coloração foi feita com DAPI (azul) e a marcação com Digoxigenina (vermelho).

Distribuição das translocações Robertsonianas na população brasileira de *M. gouazoubira*

Os diferentes tipos de translocações não seguiram um padrão de distribuição específico para uma determinada área, região ou população (Figura 8), sugerindo que uma mesma translocação, que ocorre em áreas diferentes e distantes, seja independente uma da outra.

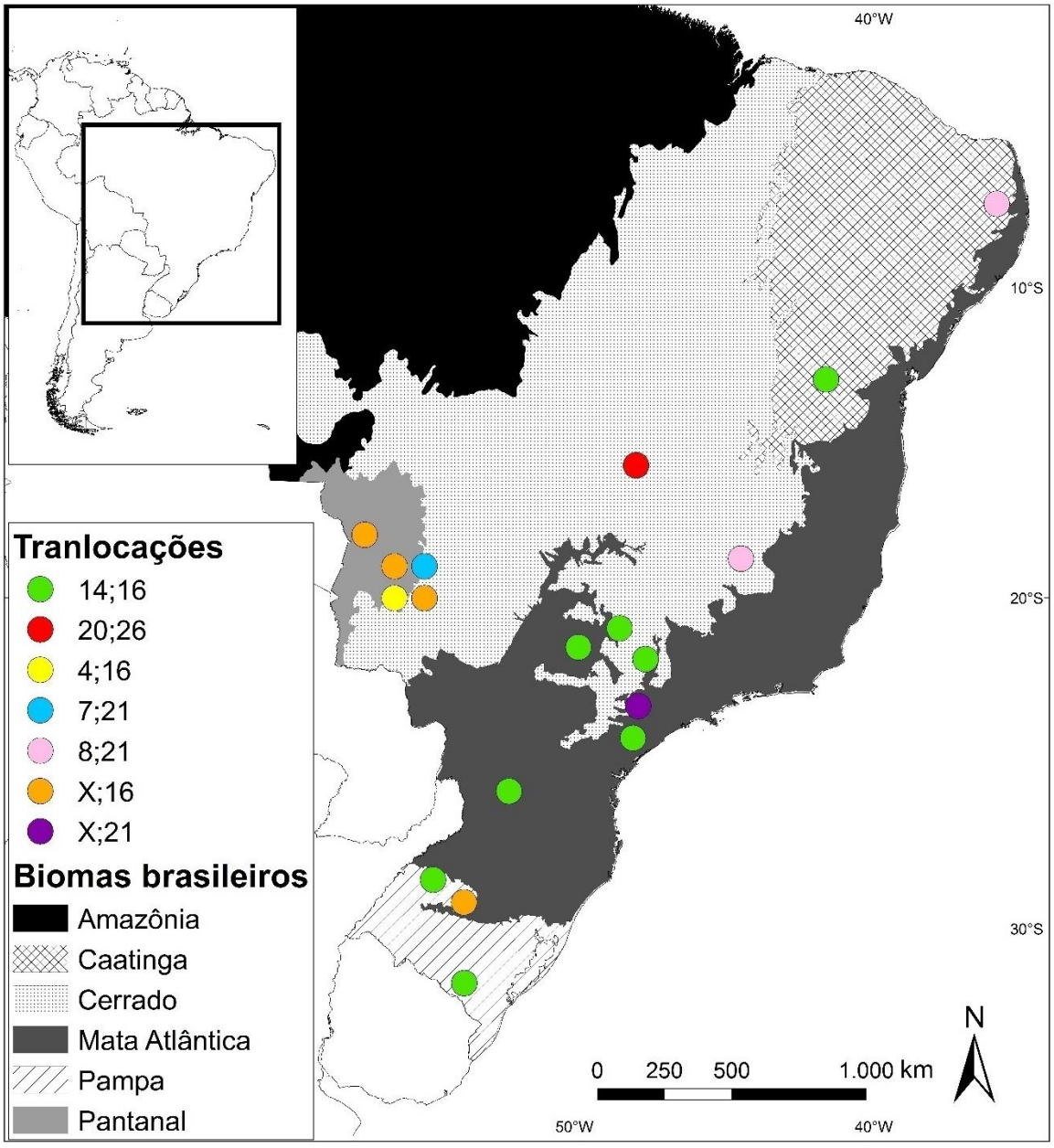

Figura 8. Mapa do Brasil com a distribuição dos sete diferentes tipos de translocações Robertsonianas (14;16, X;16, X;21; 8;21, 20;26, 7;21 e 4;16) observadas nos indivíduos da espécie *Mazama gouazoubira*.

Na região de transição entre Mata Atlântica e Pampa, foram encontrados dois tipos diferentes de translocações Robertsonianas (14;16 e X;16), enquanto na Caatinga, foram observadas as translocações 8;21 e 14;16. As translocações 20;26 e 8;21 foram características do Cerrado e, na transição desse bioma para a Mata Atlântica, foram observadas as translocações 14;16 e X;21.

DISCUSSÃO

O polimorfismo cromossômico estudado no presente trabalho revelou que a população de *M. gouazoubira* brasileira é composta por indivíduos cromossomicamente distintos. Essa heterogeneidade genética é causada por fusões de diferentes cromossomos pelo centrômero, originando diferentes tipos de translocações Robertsonianas, além da variabilidade interindividual de cromossomos B, tanto em relação a presença quanto ao número. Na literatura são encontrados trabalhos que verificaram que o polimorfismo cromossômico apresentado pelo veado-catingueiro também é decorrente dos mesmos eventos cromossômicos descritos no presente estudo, ou seja, presença de cromossomos B e translocações Robertsonianas (DUARTE, 1992;1998; DUARTE; JORGE, 1996; TOMAZELLA, 2012; VALERI, 2014). Duarte (1998) afirma ainda que essas variações cromossômicas são normais para a espécie e que esse cervídeo neotropical apresenta cromossomos com alta fragilidade, o que seria plausível para explicar o polimorfismo cromossômico observado.

Quando comparado com outras espécies do gênero *Mazama*, *M. gouazoubira* é a espécie com menor número de cromossomos B, sendo que *M. nana* apresenta de 1 a 6 cromossomos B (ABRIL; DUARTE, 2008), *M. bororo* 4 a 5 (DUARTE; JORGE, 2003), *M. nemorivaga* 2 a 8 (DUARTE, 1998) e *M. americana* apresenta de 0 a 7 cromossomos B (ABRIL, 2009). A baixa quantidade de cromossomos B no veado-catingueiro contrastando com altas quantidades desse cromossomo nas outras espécies do gênero pode ser explicada pelo modo em que ocorreu a evolução cariotípica no gênero *Mazama*. A partir de um ancestral com autossomos exclusivamente acrocêntricos, a espécie *M. gouazoubira* reteve esse cariótipo enquanto as outras espécies de *Mazama* sofreram rearranjos (como translocações Robertsonianas e fusões em tandem) que diminuíram seus números

diploides (NEITZEL, 1987; FONTANA; RUBINI, 1990; ABRIL et al., 2010b). Na formação dos cromossomos de dois braços, esses rearranjos podem ter gerado fragmentos cêntricos, originando os cromossomos B (DUARTE; JORGE, 1996; PALESTIS et al., 2003).

Apesar de conter o menor número de cromossomos B, *M. gouazoubira* apresentou, nesse trabalho, altas frequência de animais portadores de cromossomos B (43,70%). De acordo com Palestis et al. (2003), existem fortes indícios de que os mamíferos apresentam associação entre a presença de cromossomos B e a frequência de cromossomos acrocêntricos no lote A, ou seja, os cromossomos B ocorrem em maiores frequências em espécies que apresentam mais cromossomos autossômicos acrocêntricos. Além disso, cariótipos compostos quase completamente por cromossomos acrocêntricos são mais susceptíveis ao acúmulo de cromossomos B devido a teoria do curso centromérico, que favorece maiores quantidades de centrômeros durante a meiose nas fêmeas (PALESTIS et al., 2003). Desse modo, as altas frequências de cromossomos B em *M. gouazoubira* podem ser explicadas pela composição cromossômica de seu cariótipo (cromossomo sexual X e todos os autossomos são acrocêntricos).

Foram observados indivíduos heterozigotos para uma translocação e apenas um indivíduo (T146) homozigoto para uma translocação 14;16. Resultados semelhantes foram descritos por Duarte (1998) que, dos 81 espécimes de *M. gouazoubira* estudados, encontrou 16% de espécimes heterozigotos para uma translocação Robertsoniana e 3,7% homozigotos para uma translocação Robertsoniana, ressaltando a maior frequência de indivíduos heterozigotos para uma translocação. Por outro lado, Valeri (2014) observou apenas indivíduos heterozigotos para uma translocação em uma população de veado-catingueiro localizada no Pantanal da Nhecolândia. Apenas com a observação dos valores do índice centromérico dos cromossomos translocados foi possível inferir que não eram os mesmos cromossomos envolvidos nas translocações Robertsonianas. Tais dados também foram constatados por Valeri (2014) e Duarte (1998).

Existem outras espécies de cervídeos que frequentemente apresentam translocações Robertsonianas, sendo que um dos interesses dos pesquisadores que as estudam é semelhante à um dos objetivos desse estudo, ou seja, identificar

os cromossomos envolvidos nas translocações Robertsonianas (BONNET et al., 2001; BONNET-GARNIER et al., 2003). Na identificação dos cromossomos envolvidos nas translocações Robertsonianas das espécies de cervídeos *Axis axis*, *Cervus albirostris*, *Cervus timorensis russa*, *Cervus unicolor*, *Cervus eldi siamensis* e *Cervus nippon pseudaxis*, foram encontrados 13 tipos distintos de translocações Robertsonianas envolvendo 19 cromossomos diferentes. Além disso, foi observado que cinco tipos de translocações são compartilhados por, no mínimo, duas espécies e que existem alguns cromossomos que são mais frequentes nas translocações do que outros (BONNET et al., 2001; BONNET-GARNIER et al., 2003). Na população brasileira de *M. gouazoubira*, nove cromossomos compõem sete tipos diferentes de translocações, revelando um polimorfismo cromossômico decorrente de diferentes tipos de translocações Robertsonianas, o que também é relatado para outras espécies de mamíferos, como na população selvagem de *Mus musculus domesticus* da Grécia (CHONDROPOULOS et al., 1996).

Além do bandamento G, as técnicas de citogenética clássica banda C e coloração Ag-RON, e de citogenética molecular FISH telomérica e pintura cromossômica, ajudaram a confirmar a translocação X-autossômica. É conhecido que a espécie *M. gouazoubira* apresenta RON localizada nos pares cromossômicos 1 e 2, e heterocromatina constitutiva presente na região pericentromérica de todos os autossomos e no sexual X (NEITZEL, 1987; DUARTE, 1992; DUARTE, 1998). Além disso, o cromossomo X possui uma banda intersticial evidenciada tanto pela banda C como pela FISH telomérica (RESENDE, 2012), a qual é um indício da ocorrência de uma inversão pericêntrica e fornece uma marcação que diferencia esse cromossomo dos demais. Como nenhum dos cromossomos translocados apresentaram RON, a possibilidade dos pares 1 e 2 estarem envolvidos nas translocações Robertsonianas estudadas foi excluída. Apesar de não ter sido encontrada nenhuma relação entre a presença de RON e as translocações, trabalhos relatam a existência dessa relação, como nas espécies de mamíferos *Potorous tridactylis* e *Carollia perspicillata*. Nessas duas espécies, a RON está localizada na translocação X-autossômica, sendo que em *C. perspicillata* a RON está situada no ponto de fusão entre os cromossomos (HSU; SPIRITO; PARDUE, 1975).

Como mostrado no presente trabalho, seis animais (T83, T92, T156, T177, T300 e T307) apresentaram uma translocação do tipo X-autossômica, sendo que esse tipo de translocação já foi descrito para outros grupos de mamíferos, como humanos, morcegos e gazelas (MATTEI et al., 1982; TUCKER, 1986; VASSART, SEGUELA, HAYES, 1995). Segundo Ashley (2002), translocações envolvendo o cromossomo sexual X e um autossomo são preocupantes, devido ao fato desse cromossomo sexual ser altamente conservado nos mamíferos. Essa conservação ocorre para a manutenção do balanço genético entre fêmeas e machos, uma vez o cromossomo Y dos machos perdeu muitos genes durante o processo evolutivo dos mamíferos. Nos mamíferos, a manutenção do balanço genético se dá por meio da inativação aleatória do cromossomo X. Em indivíduos com uma translocação X-autossômica em heterozigose, preferencialmente o cromossomo X normal é inativado, porém, em humanos foram relatados casos nos quais o cromossomo X translocado foi inativado, causando uma monossomia autossômica (MATTEI et al., 1982). Tal monossomia autossômica pode contribuir para o desenvolvimento de fenótipos anormais com sérios problemas clínicos, como desenvolvimento tardio, dificuldade de aprendizagem, obesidade, entre outros problemas detectados em estudos realizados com mulheres que apresentavam translocações X-autossômicas (MATTEI et al., 1982; WATERS et al., 2001).

Além disso, a fixação de uma translocação Robertsoniana do tipo X-autossômica, como as aqui observadas, pode alterar os padrões de expressão genica, causar a formação de um sistema sexual múltiplo do tipo XX/XY1Y2 e consequentemente, processos de especiação (FREGDA, 1970; ASHLEY, 2002). Foi observado que algumas espécies pertencentes ao gênero *Mazama* apresentam sistema sexual múltiplo do tipo XX/XY1Y2, sendo que há indícios de que esse tipo de sistema sexual tenha se originado em decorrência de uma fusão X-autossômica (FIORILLO et al., 2013; ABRIL et al., 2010a; ABRIL; DUARTE, 2008). Esse fato pode ser facilmente corroborado pela comparação dos cariótipos das espécies *M. nemorivaga* e *M. gouazoubira*, sendo que uma das únicas diferenças entre esses cariótipos é a presença de uma translocação X-autossômica, indicando que a ocorrência desse rearranjo podo ter influenciado na separação das espécies *M. nemorivaga* e *M. gouazoubira* (RESENDE, 2010).

Nos indivíduos heterozigotos para translocações Robertsonianas entre dois cromossomos autossômicos, caso observado em 14 animais, provavelmente ocorreu sinapses entre os homólogos acrocêntricos não fusionados com o metacêntrico (fusão dos autossomos acrocêntricos) durante a meiose. Segundo Ashley (2002), a sinapse entre os cromossomos homólogos se inicia nas extremidades dos telômeros, indo em direção ao centrômero, entretanto em algumas espécies de mamíferos portadoras de translocações Robertsonianas, não são observadas sinapses perto das extremidades dos centrômeros ou essas sinapses ocorrem de forma tardia. Com isso, essas extremidades soltas tendem a se associar com as extremidades dos cromossomos sexuais, causando redução da fertilidade e até mesmo, a esterilidade.

É provável que as translocações Robertsonianas analisadas não sejam compartilhadas pelo um mesmo ancestral, ou seja, elas surgiram *de novo* e de maneira isolada. Foram encontrados três diferentes tipos de translocações Robertsonianas (X;16, 7;21 e 4;16) em uma mesma população localizada no Pantanal da Nhecolândia, revelando um preocupante polimorfismo intrapopulacional. A preocupação está relacionada com a real possibilidade de dois indivíduos portadores de dois tipos diferentes de translocações se acasalarem, podendo gerar descendentes heterozigotos para duas translocações Robertsonianas diferentes e, como consequência, o surgimento de graves problemas meióticos, como diminuição da capacidade reprodutiva pela produção de gametas desbalanceados e isolamento reprodutivo (BAKER; BICKHAM, 1986; NACHMAN; SEARLE, 1995).

Tomazella (2012) identificou os cromossomos portadores de aberrações cromossômicas induzidas pela doxorrubicina na espécie *M. gouazoubira*, os quais poderiam estar relacionados à fragilidade cromossômica. Os cromossomos X, 4, 7, 8, 14, 16, 20 e 26 foram identificados por Tomazella (2012), como sendo portadores de aberrações cromossômicas, bem como no presente estudo, sendo os cromossomos envolvidos nas translocações Robertsonianas. Além disso, Vargas-Munar, Sarria-Perea e Duarte (2010) observaram que o *M. gouazoubira* apresentou altas taxas de aberrações cromossômicas em resposta ao agente mutagênico doxorrubicina, evidenciando uma instabilidade cromossômica.

Alguns cromossomos estão envolvidos nas translocações com maior frequência, como o cromossomo 16 (associado com três diferentes cromossomos, sendo encontrado em 16 animais), o cromossomo 14 (associado com apenas um cromossomo, sendo encontrado em 10 animais) e o cromossomo sexual X (associado com dois diferentes cromossomos, sendo encontrado em 6 animais). Existem teorias que explicam as altas frequências de determinados cromossomos envolvidos em translocações específicas, como nas translocações 14;16 e X;16. A primeira teoria é a da fragilidade cromossômica, que sugere a existência de pontos de quebras nos cromossomos 14, 16 e X, propiciando a ocorrência de rearranjos nesses sítios frágeis (MATTEI et al., 1982). Uma segunda explicação pode estar centrada na organização espacial dos cromossomos dentro do núcleo, ou seja, nos territórios cromossômicos, em que os rearranjos cromossômicos ocorrem entre cromossomos que estão localizados espacialmente próximos, evidenciando que a arquitetura nuclear pode facilitar a ocorrência de rearranjos entre cromossomos vizinhos (GANDHI et al., 2009). Outra suposição tem enfoque nos elementos de transposição, que influenciam diretamente a ocorrência de rearranjos cromossômicos. Esses rearranjos podem acontecer por meio de dois mecanismos: recombinação ectópica (ação indireta), que se dá pela recombinação entre as múltiplas cópias de elementos de transposição que são muito semelhantes e estão espalhadas pelo genoma; e transposição aberrante (ação direta), quando ocorre sinapse entre elementos de transposição híbridos (formados por dois elementos de transposição distintos) devido à sua complementaridade (GARCIA; GAIESKY, 2015).

CONCLUSÃO

O polimorfismo cromossômico estudado na espécie *M. gouazoubira* pode ser observado não só em relação à presença de cromossomos B e translocações Robertsonianas, mas também na variação numérica inter e intraindividual de cromossomos B, e nos cromossomos envolvidos nas translocações. As altas taxas de rearranjos cromossômicos observadas na espécie sugerem que o cariótipo do *M. gouazoubira* seja um ponto de partida para a emergência de novas espécies.

A existência de sete tipos de translocações Robertsonianas compostas por nove cromossomos tornou-se clara a partir da análise dos padrões de bandas cromossômicas proporcionadas pela banda G. O envolvimento de cromossomos específicos em mais de um tipo de translocação reforça a teoria da fragilidade cromossômica proposta para o veado-catingueiro. Apesar de todos os tipos de translocações Robertsonianas poderem causar impactos reprodutivos por incompatibilidade gamética, as translocações X-autossômicas são mais impactantes e podem causar sérios problemas de fertilidade.

Por fim, a espécie *M. gouazoubira* apresenta uma real fragilidade cromossômica, a qual é responsável por rearranjos cromossômicos que podem causar um isolamento reprodutivo por incompatibilidade cromossômica. Tal fato indica que a espécie possa estar sujeita a um rápido processo de especiação, sendo necessário entender o papel desses diferentes rearranjos no potencial para gerar isolamento reprodutivo da espécie.

REFERÊNCIAS

ABRIL, V. V. **Evolução cromossômica no veado-mateiro - *Mazama americana* (MAMMALIA; CERVIDAE).** 2009. 108 f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento Animal) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2009.

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. 31, p. 53-57, 2008.

ABRIL, V. V.; CARNELOSSI, E. A. G.; GONZÁLEZ, S.; DUARTE, J. M. B. Elucidating the Evolution of the Red Brocket Deer *Mazama americana* Complex (Artiodactyla; Cervidae). **Cytogenetic and Genome Research**, Würzburg, v 128, p. 177-187, 2010a.

ABRIL, V. V.; SARRIA-PEREA, J. A.; VARGAS-MUNAR, D. S. F.; DUARTE, J. M. B. Chromosome Evolution. In: DUARTE, J. M. B.; GONZÁLEZ, S. (1 ed.). **Neotropical Cervidology. Biology and Medicine of Latin American Deer**. Jaboticabal: FUNEP e IUCN, 2010b, p. 18-26.

ASHLEY, T. X-Autosome translocations, meiotic synapsis, chromosome evolution and speciation. **Cytogenetic and Genome Research**, Würzburg, v. 96, p. 33-39, 2002.

BAKER, R. J.; 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.

BAKER, R. J.; MASCARELLO, J. T. Karyotypic analyses of the genus *Neotoma* (Cricetidae; Rodentia). **Cytogenetics**, Basel, v. 8, p. 187-198, 1969.

BAKER, R. J.; CHESSER, R. K.; KOOP, B. F.; HOYT, R. A. Adaptive nature of chromosomal rearrangement: differential fitness in pocket gophers. **Genetica**, Wien, v. 61, p. 161-164, 1983.

BONNET, A.; THEVÉNON, S.; CLARO, F.; GAUTIER, M.; HAYES, H. Cytogenetic comparison between Vietnamese sika deer and cattle: R-banded karyotypes and FISH mapping. **Chromosome Research**, Oxford, v. 9, p. 673-687, 2001.

BONNET-GARNIER, A.; CLARO, F.; THEVÉNON, S.; GAUTIER, M.; HAYES, H. Identification by R-banding and FISH of chromosome arms involved in Robertsonian translocations in several deer species. **Chromosome Research**, Oxford, v. 11, p. 649-663, 2003.

CAPANNA, E.; CIVITELLI, M. V.; CRISTALDI, M. Chromosomal rearrangement, reproductive isolation and speciation in mammals. The case of *Mus musculus*. **Bolletino di zoologia**, London, v. 44, p. 213-246, 1977.

CHONDROPOULOS, B. P.; FRAGUEDAKIS-TSOLIS, S. E.; MARKAKIS, G.; GIAGIA-ATHANASOPOULOU, E. Morphometric variability in karyologically polymorphic populations of the wild *Mus musculus domesticus* in Greece. **Acta Theriologica**, v. 41, p. 375-382, 1996.

DION-CÔTÉ, A-M.; SYMONOVÁ, R.; RÁB, P.; BERNATCHEZ, L. Reproductive isolation in a nascent species pair is associated with aneuploidy in hybrid offspring. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, London, v. 282, p. 2862, 2015.

DUARTE, J. M. B. **Aspectos taxonômicos e citogenéticos de algumas espécies de cervídeos brasileiros**. 1992. 153 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento Animal) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 1992.

DUARTE, J. M. B. Análise taxonômica dos *Mazama* cinzas do Brasil. 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 “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, 1998.

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.

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, p. 403-410, 2003.

FEDYK, S. Chromosome polymorphism in a population of *Sorex araneus* at Bialowieza, Poland. **Folia Biologica**, Prague, v. 28, p. 83-120, 1980.

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.

FIORILLO, B. F.; SARRIA-PEREA, J. A.; ABRIL, V. V.; DUARTE, J. M. B. Cytogenetic description of the Amazonian brown brocket *Mazama nemorivaga* (Artiodactyla; Cervidae). **Comparative Cytogenetics**, Sofia, v. 7, p. 25-31, 2013.

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

FREGDA, K. Unusual sex chromosome inheritance in mammals. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B**, London, v. 259, p. 15-36, 1970.

GANDHI, M. S.; STRINGER, J. R.; NIKIFOROVA, M. N.; MEDVEDOVIC, M.; NIKIFOROV, Y. E. Gene position within chromosome territories correlates with their involvement in distinct rearrangement types in thyroid cancer cells. **Genes, Chromosomes & Cancer**, New York, v. 48, p. 222-228, 2009.

GARCIA, C. F.; GAIESKY, V. L. S. V. Evolução Cromossômica em Eucariotos – Rearranjos Cromossômicos e Elementos de Transposição. In: CARARETO, C. M. A.; MONTEIRO-VITORELLO, C. B.; SLUYS, M-A.; V. **Elementos de Transposição – Diversidade, evolução, aplicações e impacto nos genomas dos seres vivos**. 1. ed. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Genética/ Editora FIOCRUZ, 2015. cap 2, p. 43-64.

GAZAVE, E.; CATALAN, J.; RAMALHINHO, M. G.; MATHIAS, M. L.; NUNES, A. C.; DUMAS, D.; BRITTON-DAVIDIAN, J.; AUFFRAY, J. C. The non-random occurence of Robertsonian fusion in the house mouse. **Genetics Research**, Cambridge, v. 81, p. 33-42, 2003.

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

HSU, T. C.; SPIRITO, S. E.; PARDUE, M. L. Distribution of 18+28S Ribosomal Genes in Mammalian Genomes. **Chromosoma**, Berlin, v. 53, p. 25-36, 1975.

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.

KOOP, B. F.; BAKER, R. J.; GENOWAYS, H. H. Numerous chromosomal polymorphisms in a natural population of rice rats (*Oryzomys*, Cricetidae). **Cytogenetics and Cell Genetics**, Basel, v. 35, p. 131-135, 1983.

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

MATTEI, M. G.; MATTEI, J. M.; AYME, S.; GIRAUD, F. X-Autosome Translocations: Cytogenetic Characteristics and Their Consequences. **Human Genetics**, Berlin, v. 61, p. 295-309, 1982.

MOORHEAD, R. S.; NOWELL, P. C.; MELINAN, W. J.; BATTIPS, D. M.; HUNGERFORD, A. Chromosome preparations of leucocytes culture from human peripheral blood. **Experimental Cell Research***,* New York, v. 20, p.13, 1960.

NACHMAN, M. W.; SEARLE, J. B. Why is the house mouse karyotype so variable? **Trees**, Heidelberg, v. 10, p. 397-402, 1995.

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

PALESTIS, B. G.; BURT, A.; JONES, R. N.; TRIVERS, R. B chromosomes are more frequent in mammals with acrocentric karyotypes: support for the theory of centromeric drive. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, London, v. 271, p. S22-S24, 2003.

RESENDE, J. P. de A. **Comparação cariotípica entre *Mazama* cinzas do Brasil (*Mazama gouazoubira* e *Mazama nemorivaga*; ARTIODACTYLA; CERVIDAE)**. 2012. 58 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento Animal) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2012.

ROBERTSON, W. R. B. Chromosomes studies. II. Taxonomic relationships shown in the chromosomes of Tettigidae and Acrididae; V-shaped chromosomes and their significance in Acrididae Lacustidae and Grillidae. **Journal of Morphology**, Malden, v. 27, p. 179-219, 1916.

RUBES, J.; MUSILOVA, P.; MASTROMONACO, G. F. Cytogenetics of wild and captive bred non-domestic animals. **Cytogenetics and Genome Research**, Basel, v. 120, p. 61-68, 2008.

SEABRIGHT, A. T. A rapid banding technique for human chromosomes**. The Lancet**, London, v. 2, 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.

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.

TOMAZELLA, I. M. **Identificação dos cromossomos de *Mazama gouazoubira* (ARTIODACTYLA; CERVIDAE) envolvidos em rearranjos induzidos pela doxorrubicina**. 2012. 58 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento Animal) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2012.

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

VALERI, M. P. **Caracterização cariotípica de uma população de *Mazama gouazoubira* (ARTIODACTYLA; CERVIDAE) do Pantanal da Nhecolândia**. 2014. 46 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Zootecnia) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2014.

VARGAS-MUNAR, D. S. F.; SARRIA-PEREA, J. A.; DUARTE, J. M. B. Different responses to doxorubicin-induced chromosome aberrations in Brazilian deer species. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 9, p. 1545-1549, 2010.

VASSART, M.; SEGUELA, A.; HAYES, H. Chromosome evolution in gazelles. **Hereditas**, Lund, v. 86, 216-227, 1995.

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

WATERS, J. J.; CAMPBELL, P. L.; CROCKER, A. J. M.; CAMPBELL, C. M. Phenotypic effects of balanced X-autosome translocations in females: a retrospective survey of 104 cases reported from UK laboratories. **Human Genetics**, Berlin, v. 108, p. 318-327, 2001.

WURSTER, D. H.; BENIRSCHKE, K. Chromosome Studies in the Superfamily *Bovoidea*. **Chromosoma**, Berlin, v. 25, p. 152-171, 1968.

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.

CAPÍTULO 3 – Variabilidade e diferenciação dos cromossomos B entre indivíduos de *Mazama gouazoubira* (Mammalia; Cervidae)

RESUMO

As espécies de cervídeos neotropicais do gênero *Mazama* são conhecidas por apresentar cromossomos B, que podem ter sido originados a partir de quebras dos cromossomos do lote A. Apesar dos cromossomos B dessas espécies possuírem o mesmo padrão morfológico, pouco se sabe sobre a diversidade inter e intraespecífica de cromossomos B em relação a sua constituição genética. Frente a isso, esse trabalho avaliou a composição e diferenciação genética dos cromossomos B entre diferentes animais da espécie *M. gouazoubira*. Além disso, também investigou as homologias existentes entre os cromossomos B e os cromossomos do lote A. Em relação ao tipo de cromatina, foram encontrados dois tipos de cromossomos B: um totalmente eucromático e o outro com os braços eucromáticos e região pericentromérica heterocromática. A maioria dos cromossomos B não exibiram regiões organizadores de nucléolos (RON), enquanto nos que a RON estava presente, esta apresentou diferentes graus de intensidade. A hibridização *in situ* fluorescente (FISH) com sondas teloméricas mostrou que todos os cromossomos B apresentaram sinais teloméricos. A pintura cromossômica com sondas de cromossomos inteiros acusou a presença de diferentes cromossomos B em relação a existência de homologias entre lotes A e B, sendo que alguns cromossomos B tem homologia com o lote A. A espécie *M. gouazoubira* apresentou uma considerável heterogeneidade de cromossomos B em relação aos seus conteúdos genéticos, sendo que esses são importantes geneticamente e merecem ser melhor estudados.

Palavras-chave: bandamento C; citometria de fluxo; coloração Ag-RON; FISH; microdissecção

INTRODUÇÃO

Desde quando foram observados pela primeira vez há 100 anos, os cromossomos B despertam interesse e atenção dos cientistas devido as suas principais características, que incluem o fato de serem dispensáveis, estarem presentes em diversas espécies animais, vegetais e de fungos, além de possuírem diversas e diferentes origens (AMOS; DOVER, 1981; VUJOSEVIC; BLAGOJEVIC, 2004). Com exceção das aves, todos os maiores grupos taxonômicos são portadores de cromossomos B, sendo encontradas altas taxas em mamíferos (VUJOSEVIC; BLAGOJEVIC, 2004). Entre os indivíduos em que esses cromossomos estão presentes, é sabido que os mesmos são expressos de diferentes maneiras, dependendo do tecido analisado, sendo que nem sempre estão presentes em todos os tecidos de um indivíduo (CAMACHO; SHARBEL; BEUKEBOOM, 2000).

Em muitas espécies de animais, durante a meiose, os cromossomos B exibem características morfológicas e comportamentais semelhantes aos cromossomos sexuais, o que indica que possivelmente tenham alguma ligação com os cromossomos sexuais, como uma possível origem (JONES; REES, 1982). Contudo, antes de inferir sobre as relações evolutivas entre os cromossomos B e os cromossomos do lote A, tanto os autossomos como os sexuais, é necessário avaliar alguns aspectos como a composição, organização genética e as sequências de DNA entre os diferentes cromossomos B (AMOS; DOVER, 1981). Dentro de uma mesma espécie, pode ser encontrado polimorfismo dos cromossomos B em relação ao número, à composição genética e ao seu comportamento, fato comumente observado em alguns mamíferos, como nas espécies de roedores dos gêneros *Akodon* e *Nectomys*, e nos cervídeos do gênero *Mazama* (YONENAGA-YASSUDA; ASSIS; KASAHARA, 1992; DUARTE, 1998; SILVA; YONENAGA-YASSUDA, 1998; DUARTE; JORGE, 2003; SARRIA-PEREA, 2004; ABRIL; DUARTE, 2008; ABRIL, 2009; RESENDE, 2012).

As espécies de cervídeos brasileiros do gênero *Mazama* apresentam cromossomos B, sendo observado um grande polimorfismo em relação ao número de cromossomos B presente em cada espécie: *M. nemorivaga* (2 a 8 cromossomos)

(DUARTE,1998; RESENDE, 2012), *M. gouazoubira* (0 a 3 cromossomos) (DUARTE; JORGE, 2003; RESENDE, 2012), *M. nana* (1 a 6 cromossomos) (ABRIL; DUARTE, 2008), *M. bororo* (4 a 5 cromossomos) (DUARTE; JORGE, 2003) e *M. americana* (2 a 6 cromossomos) (SARRIA-PEREA, 2004; ABRIL, 2009). Para explicar a ocorrência desses cromossomos, foi sugerido que provavelmente os cromossomos B das espécies do gênero *Mazama* tenham se originado de quebras ocorridas nos cromossomos do lote A, fato corroborado pelas altas taxas de fragilidade cromossômica apresentada pelo gênero (DUARTE; JORGE, 1996; DUARTE, 1998; VARGAS-MUNAR; SARRIA-PEREA; DUARTE, 2010).

Apesar do polimorfismo numérico de cromossomos B entre as espécies do gênero *Mazama*, existe um padrão morfológico comum a todos cromossomos B dessas espécies (DUARTE; JORGE, 1996). Entretanto, a variabilidade e diferenciação desses cromossomos não foram estudadas profundamente em nenhuma espécie, deixando lacunas acerca da diversidade de cromossomos B existentes nos *Mazama* neotropicais. Dessa maneira, o presente estudo buscou preencher essas lacunas, iniciando o estudo dos cromossomos B com a espécie *M. gouazoubira*, avaliando a composição e diferenciação genética dos cromossomos B entre diferentes espécimes, além de investigar a existência de sequências homólogas entre cromossomos B e cromossomos do lote A.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram avaliados 20 animais da espécie *M. gouazoubira* portadores de cromossomos B, sendo realizados cultivos de fibroblastos (VERMA; BABU, 1995) e cultivos de linfócitos (MOORHEAD et al., 1960) (Apêndice B). Para avaliar a constituição genética e as diferenças entre os cromossomos B dos espécimes, as preparações cromossômicas foram submetidas às técnicas de banda C (SUMNER, 1972), coloração Ag-RON (HOWELL; BLACK, 1980) e hibridização *in situ* fluorescente (FISH) com sondas teloméricas e sondas de rDNA 18S e 5S. Desses 20 animais, foram selecionadas aleatoriamente cinco fêmeas (Tabela 1), as quais foram submetidas à pintura cromossômica para avaliar a diferenciação entre os cromossomos B de diferentes animais e a existência de sequências homólogas

entre cromossomos dos lotes A e B. Para a realização da pintura cromossômica, foram utilizadas sondas de cromossomos B inteiros obtidas pelo método de microdissecção e de citometria de fluxo.

Na identificação dos sítios teloméricos, sondas teloméricas foram construídas por PCR utilizando-se os iniciadores 1 $(TTAGGG)_5$ e 2 $(CCCTAA)_5$ e marcadas por meio da incorporação da Digoxigenina Roche®, também por PCR (IJDO et al., 1991). As sondas de rDNA 5S foram obtidas por PCR utilizando-se os iniciadores 5Sf (5'-TACGCCCGATCTCGTCCGATC-3') e 5Sr (5'-CAGGCTGGTATGGCCGTAAGC-3'), e o DNA total do *M. gouazoubira*. Sondas de rDNA 18S foram amplificadas a partir do DNA total do *M. gouazoubira* e dos iniciadores 18Sf (5'-CCGCTTTGGTGACTCTTGAT-3') e 18Sr (5'-CCGAGGACCTCACTAAACCA-3'). Os iniciadores 5Sf e 5Sr foram desenhados a partir da sequência do rDNA 5S da espécie *Salmo gardnerii* (KOMIYA; TAKEMURA, 1979), enquanto os iniciadores 18Sf e 18Sr (responsáveis pela amplificação de um segmento de DNA que transcreve o rRNA 18S) foram desenhados a partir da espécie *Ictalurus punctatus* (GROSS et al., 2010). As sondas 5S e 18S foram amplificadas e marcadas com Digoxigenina Roche® segundo Martins e Vicari (2012) (Apêndice C).

Sondas de cromossomos B inteiros de cinco fêmeas de *M. gouazoubira* (Tabela 1) foram confeccionadas pelo método de microdissecção, sendo a amplificação do DNA realizada com o kit WGA4 Sigma Genome Plex® (Single Cell Whole Genome Amplification Kit) e a reamplificação e marcação (Digoxigenina Roche®) foi feita com o kit WGA3 Sigma (Genome Plex® WGA Reamplification Kit) (GRIBBLE et al., 2004). Na microdissecção, não foram utilizados indivíduos machos a fim de se evitar dúvidas entre cromossomos B e o cromossomo sexual Y, pois os mesmos são facilmente confundidos. Foram utilizadas apenas metáfases portadoras de um cromossomo B de fêmeas de *M. gouazoubira*, sendo que cada fêmea deu origem a uma sonda.

Tabela 1. Fêmeas utilizadas na microdissecção de cromossomos B e identificação das sondas produzidas.

Identificação do animal	Origem	Identificação da sonda
T66	Curitiba/PR	S1
T145	Paraíba/PB	S2
T159	Guaxupé/MG	S3
T278	Araguaína/TO	S4
T314	Pantanal/MS	S5

A sonda de cromossomos B obtida pelo método de citometria de fluxo foi preparada a partir de uma linhagem celular de um macho de *M. gouazoubira* (2n=70+3B; NF=70) mantida pelo laboratório de Citogenética Molecular do Departamento de Medicina Veterinária, Universidade de Cambridge, Inglaterra, coordenado pelo Professor Dr. Malcolm A. Ferguson-Smith. Os cromossomos foram separados por citometria de fluxo (YANG et al., 1995) e amplificados por DOP-PCR (*Degenerate Oligonucleotide Primer –Polymerase Chain Reaction*) (TELENIUS et al., 1992; FERGUSON-SMITH; YANG; O'BRIEN, 1998). A marcação da sonda oriunda da citometria de fluxo foi realizada por meio da incorporação da Digoxigenina Roche®, por DOP-PCR.

A sonda S1 foi hibridizada no animal T66, a S2 no animal T145, a S3 no animal T159, a S4 no animal T278 e a S5 no animal T314. Já a sonda obtida na citometria de fluxo foi hibridizada nesses mesmos 5 animais. Para a realização da FISH, lâminas contendo as preparações cromossômicas foram pepsinizadas, lavadas em PBS e em 2XSSC, desidratadas em série alcoólica e então foram envelhecidas por 1 hora a 60ºC. A desnaturação cromossômica foi realizada incubando-se as lâminas em formamida 70%/2xSSC e depois foram desidratas em uma nova série alcoólica. Concomitantemente a desnaturação das lâminas, foi feita a desnaturação das sondas, as quais foram incubadas nas preparações cromossômicas a 37ºC "overnight". A detecção das sondas marcadas com digoxigenina foi realizada com Anti-Digoxigenina Roche® e a contra-coloração cromossômica foi feita com DAPI e "antifade" (SVARTMAN, 2012).

Todas as reações de amplificação e marcação por PCR foram visualizadas por eletroforese em gel de agarose. As preparações cromossômicas foram analisadas e fotografadas no microscópio Olympus BX60 (objetiva de 100x)

equipado com uma câmera Zeiss AxioCam MRm, por meio do programa AxioVision Release 4.8.2. Entretanto, as preparações submetidas às técnicas de bandamentos cromossômicos foram analisadas na microscopia de campo claro, enquanto as preparações submetidas à pintura cromossômica foram analisadas na microscopia de fluorescência. As imagens obtidas foram editadas com o auxílio do programa Adobe Photoshop CS6 Portable.

RESULTADOS

Os resultados do bandamento C, da coloração Ag-RON e das diferentes sondas utilizadas na FISH permitiram compreender como é a constituição genética e a diversidade de tipos de cromossomos B existentes entre os indivíduos da espécie *M. gouazoubira*, além de evidenciar homologias entre os cromossomos dos lotes A e B.

O bandamento C, responsável por evidenciar regiões de heterocromatina constitutiva, indicou que existem dois tipos de cromossomos B, sendo que alguns são totalmente eucromáticos (Figura 1a) enquanto outros apresentam os braços cromossômicos eucromáticos e os centrômeros heterocromáticos (Figura 1b). Além disso, foi observado que, em um mesmo animal, todos os cromossomos B apresentavam a mesma constituição de cromatina. Em relação ao tipo de cromatina encontrada, existem pelo menos dois tipos de cromossomos B na espécie *M. gouazoubira* (Tabela 2). Essas regiões heterocromáticas podem estar associadas com sequências de DNA satélite.

Na coloração Ag-RON, foram encontrados três padrões de cromossomos B: o primeiro padrão não apresentou RON (Figura 2a), no segundo padrão as RON apareceram fracamente coradas (Figura 2b e 2c) e o último padrão apresentou regiões organizadoras do nucléolo (RON) fortemente coradas (Figura 2d e 2e). Foi verificado que em um mesmo animal, foram encontrados cromossomos B com diferentes padrões de RON: presença e ausência de RON, RON forte e fraca, e RON fraca e ausente (Tabela 2). Além disso, entre os indivíduos que apresentaram cromossomos B com RON de fraca e forte intensidades, as mesmas estavam localizadas em diferentes posições: algumas nas extremidades cromossômicas e

outras na região intersticial; entretanto, foi constatado que essa variação foi apenas interindividual. A impregnação da RON por nitrato de prata evidenciou que os cromossomos B de *M. gouazoubira* possuem sítios que estavam transcricionalmente ativos antes da interfase.

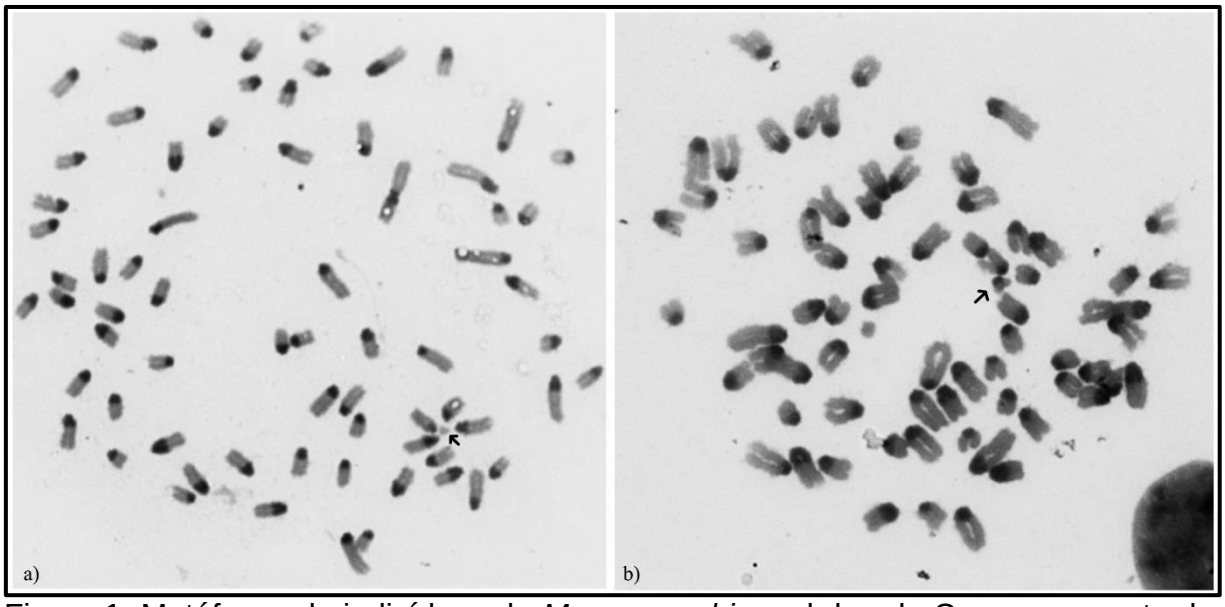

Figura 1. Metáfases de indivíduos de *M. gouazoubira* sob banda C, com aumento de 1000x. (a) Fêmea (2n=70+0-1B; NF=70) com o cromossomo B totalmente eucromático; (b) Macho (2n=70+0-1B; NF=70) com o cromossomo B com os braços cromossômicos eucromáticos e os centrômeros heterocromáticos.

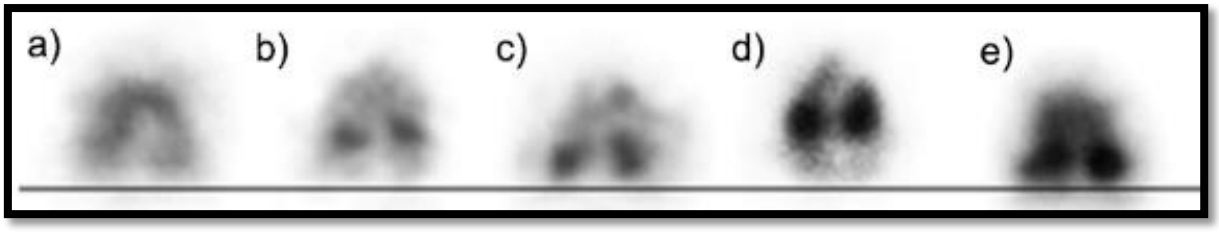

Figura 2. Diferentes tipos de cromossomos B de *M. gouazoubira* sob coloração Ag-RON. (a) Ausência de região organizadora de nucléolo (RON); (b) Presença de RON de intensidade fraca na região intersticial; (c) Presença de RON de intensidade fraca na extremidade; (d) Presença de RON de forte intensidade na região intersticial; (e) Presença de RON de forte intensidade na extremidade.

A FISH telomérica indicou que todos os cromossomos B apresentaram sinais teloméricos. Entretanto, foi observado que os cromossomos B se comportaram de diferentes maneiras em relação a localização e intensidade de sinal

telomérico (Tabela 2). Apenas um cromossomo B apresentou marcação telomérica intersticial (Figura 3a), além das marcações nos telômeros. A maioria dos cromossomos B apresentaram forte sinal telomérico na região pericentromérica, sendo esse sinal mais intenso do que aquele observado nos telômeros dos cromossomos do lote A (Figura 3b). Alguns cromossomos B exibiram sinal telomérico semelhante e de mesma intensidade das marcações verificadas nos cromossomos autossômicos e sexuais (Figura3c).

Tabela 2.Composição genética dos cromossomos B de indivíduos da espécie *M. gouazoubira*, em relação ao tipo de cromatina encontrado (Banda C), presença de regiões organizadoras de nucléolo (Ag-RON) e presença de sequências teloméricas (FISH telo).

ID	Bs	Coloração Ag-RON	Banda C	FISH telo
T17	0-3	Fraca	Hetero+eucro	Forte sinal pericentromérico
T66	0-3	Fraca	Eucro	Forte sinal pericentromérico
T92	0-3	Ausente	Eucro	Sinal telomérico normal
T93	0-3	Ausente	Eucro	Sinal telomérico normal
T94	0-1	Ausente	Eucro	Forte sinal pericentromérico
T112	0-2	Fraca/Forte	Hetero+eucro	Forte sinal pericentromérico
T117	0-3	Forte	Hetero+eucro	Forte sinal telomérico intersticial
T142	0-1	Forte/Ausente	Eucro	Forte sinal pericentromérico
T145	0-3	Forte	Eucro	Sinal telomérico normal
T156	0-1	Ausente	Eucro	Forte sinal pericentromérico
T159	0-1	Ausente	Eucro	Sinal telomérico normal
T177	0-2	Ausente	Hetero+eucro	Sinal telomérico normal
T191	0-1	Ausente	Hetero+eucro	Forte sinal pericentromérico
T194	0-3	Fraca/Ausente	Hetero+eucro	Sinal telomérico normal
T278	0-3	Forte	Hetero+eucro	Forte sinal pericentromérico
T294	0-3	Ausente	Hetero+eucro	Forte sinal pericentromérico
T300	0-2	Fraca	Hetero+eucro	Forte sinal pericentromérico
T302	0-2	Ausente	Eucro	Forte sinal pericentromérico
T307	0-3	Ausente	Eucro	Forte sinal pericentromérico
T314	0-1	Fraca	Eucro	Forte sinal pericentromérico
T331	0-3	Ausente	Hetero+eucro	Forte sinal pericentromérico
T341	0-2	Ausente	Hetero+eucro	Forte sinal pericentromérico
T348	0-2	Ausente	Eucro	Forte sinal pericentromérico

ID = identificação do espécime; Bs = quantidade de cromossomos B; Fraca = RON de fraca intensidade; Forte = RON de forte intensidade; Ausente = RON ausente; Hetero+eucro =centrômero heterocromático e braços eucromáticos; Eucro = totalmente eucromáticos.

Não foi possível identificar as sequências ribossomais 18S e 5S utilizando iniciadores desenhados a partir de sequências genômicas das espécies *Ictalurus punctatus* e *Salmo gardnerii*, respectivamente. A falta de homologia entre as sequências dos iniciadores utilizados e do *M. gouazoubira* impossibilitou à amplificação e construção das sondas de rDNA 5S (Figura 4a) e 18S (Figura 4b).

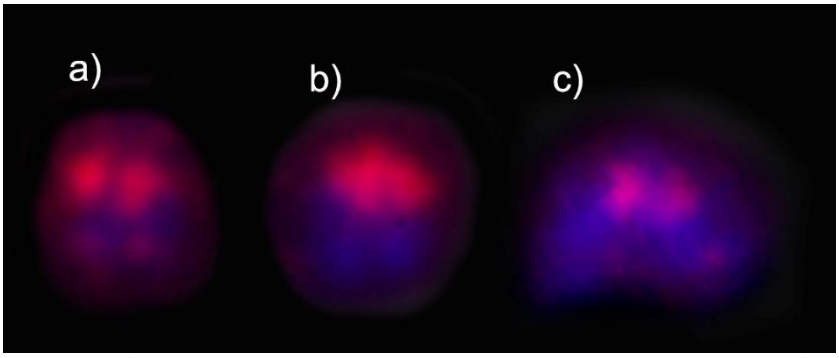

Figura 3. FISH telomérica nos cromossomos B. (a) Marcação telomérica intersticial; (b) Forte sinal telomérico na região pericentromérica; (c) Sinal telomérico de baixa intensidade.

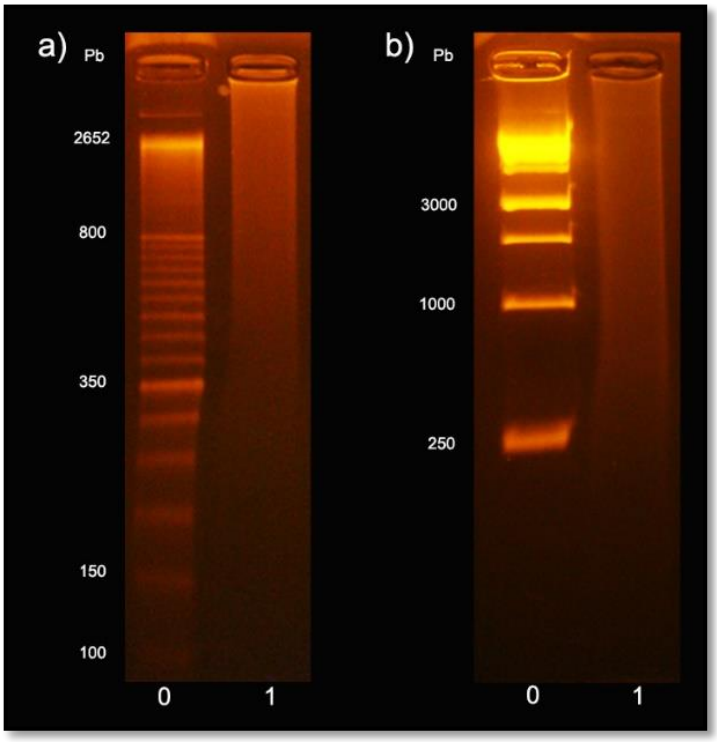

Figura 4. Amplificação das sondas de rDNA em gel de agarose. (a) Eletroforese em gel de agarose 2% do rDNA 5S (coluna 0 = marcador de 50 pares de bases, coluna 1 = produto de PCR de rDNA 5S); (b) Eletroforese em gel de agarose 1% do rDNA 18S (coluna 0 = marcador de 1.000 pares de bases, coluna 1 = produto de PCR de rDNA 18S).

Na pintura cromossômica dos cromossomos B microdissectados nos animais T66, T145 e T314, as sondas marcaram apenas os cromossomos B e nenhum sinal foi observado nos autossomos e nos sexuais (Figura 5a), indicando a ausência de homologia entre os cromossomos B e os cromossomos do lote A. Os animais T66 e T145 são portadores de 0-3 cromossomos B e a pintura cromossômica mostrou que os 3 cromossomos B desses animais apresentaram marcação, ou seja, provavelmente eles são iguais. Já nos animais T159 e T278 as sondas dos cromossomos B marcaram todos os autossomos, os cromossomos sexuais e os cromossomos B (Figura 5b), revelando uma homologia entre os cromossomos dos lotes A e B. Como pode ser observado na Figura 5b, é evidente que tanto a sonda S3 como a S4 não marcaram a região pericentromérica dos cromossomos do lote A, indicando que os cromossomos B dos animais T159 e T278 não possuem homologia com essas regiões, que são ricas em sequências de DNA repetitivo. Além disso, essa figura também aponta que não existem um ou mais cromossomos específicos que possam ter mais similaridade com os cromossomos B, mas sim algumas sequências que são compartilhadas por todos os cromossomos do lote A e os cromossomos B. Provavelmente, essas desconhecidas sequências compartilhadas entre os cromossomos dos lotes A e B sejam compostas por elementos de transposição.

Nos animais T66, T145 e T314 a pintura cromossômica realizada com a sonda de cromossomo B obtida por citometria de fluxo mostrou que apenas os cromossomos B emitiram sinal positivo (Figura 6). Esse resultado indicou que o cromossomo B utilizado como sonda não apresentou nenhuma homologia com os cromossomos do lote A. Provavelmente esse cromossomo B seja igual aos cromossomos B dos animais T66, T145 e T314, pois os padrões de marcação foram os mesmos. A falta de sinal positivo de hibridização nos cromossomos B e nos cromossomos do lote A nos animais T159 e T278, indicou que sonda cromossômica hibridizada não apresentou nenhuma homologia com os cromossomos desses animais.

Esses resultados evidenciaram que não existe apenas um cromossomo B comum a todos os indivíduos da espécie *M. gouazoubira*. A análise conjunta de diferentes técnicas citogenéticas (Ag-RON, banda C, FISH telomérica e pintura

cromossômica) revelou a existência de uma enorme heterogeneidade entre os cromossomos B da espécie *M. gouazoubira*, tanto em relação a presença e localização de RON e das sequências teloméricas como nos padrões de cromatina (Tabela 2) e homologias existentes entre cromossomos dos lotes A e B.

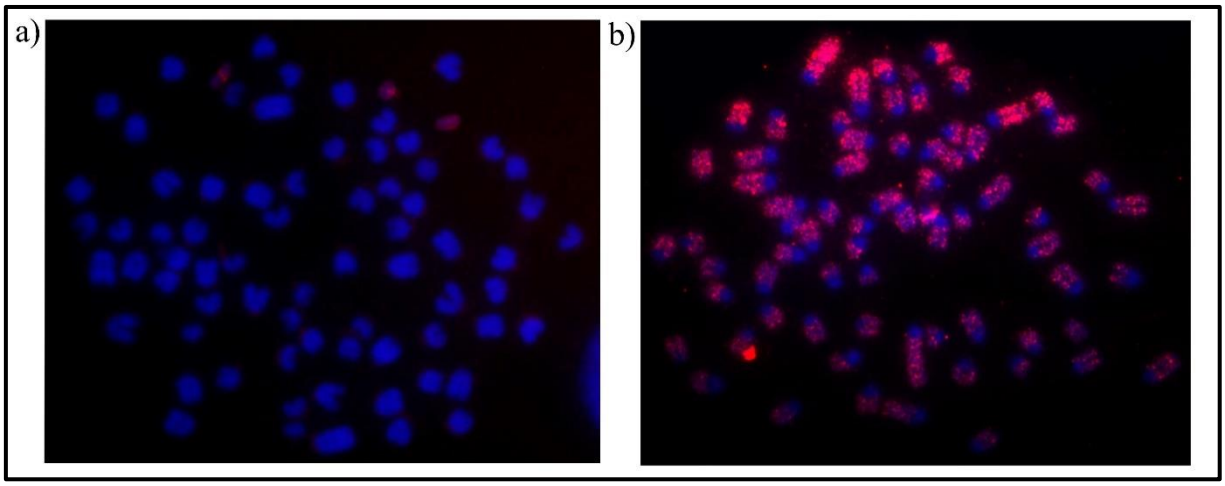

Figura 5. Pintura cromossômica de cromossomos B na espécie *M. gouazoubira*. (a) Hibridização das sondas S1, S2 e S5; (b) Hibridização das sondas S3 e S4. A contra-coloração foi feita com DAPI (azul) e a marcação com Digoxigenina (vermelho), com auemento de 1000x.

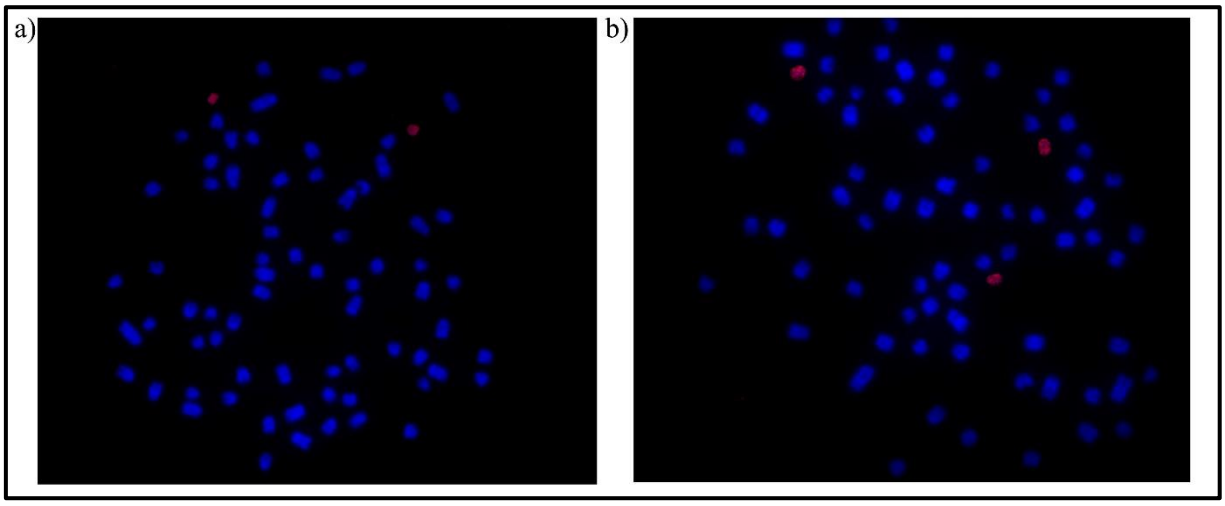

Figura 6. Pintura cromossômica da sonda de cromossomo B obtida por citometria de fluxo na espécie *M. gouazoubira*: (a) animal T66 e (b) animal T145. A contra-coloração foi feita com DAPI (azul) e a marcação com Digoxigenina (vermelho), com aumento de 1000X.

DISCUSSÃO

Diferentes estudos relataram a presença de cromossomos B em algumas espécies de cervídeos neotropicais, entre elas *M. gouazoubira*. Entretanto, nenhum desses trabalhos aprofundaram os estudos para tentar entender um pouco mais sobre a constituição molecular desses cromossomos e, consequentemente, os possíveis efeitos desses cromossomos nos indivíduos que os portam. Dessa maneira, o presente trabalho produziu resultados que permitem avançar no entendimento dos cromossomos B da espécie *M. gouazoubira*.

Em algumas espécies de mamíferos são relatadas diferenças intraindividuais em relação a morfologia, tamanho e comportamento frente a diferentes técnicas citogenéticas (bandamentos G e C, coloração Ag-RON, FISH telomérica, entre outras), como nos roedores do gênero *Nectomys* (SILVA; YONENAGA-YASSUDA, 1998), nas espécies *Uromys caudimaculatus* (BAVERSTOCK; GELDER; JAHNKE, 1982), *M. nana* (ABRIL; DUARTE, 2008), *M. nemorivaga* (RESENDE, 2012), *M. gouazoubira* (RESENDE, 2012) e *M. americana* (ABRIL, 2009). Variabilidade em relação aos padrões e localização de cromatina, das sequências de rDNA e sequências teloméricas dos cromossomos B, além das homologias entre cromossomos dos lotes A e B foram descritas no presente trabalho para a espécie *M. gouazoubira*.

Foram encontrados dois tipos de cromossomos B em relação aos padrões de cromatina, um com centrômero heterocromático e braços eucromáticos e outro totalmente eucromático. Entretanto, Resende (2012) relata ter encontrado cromossomos B de espécimes de *M. gouazoubira* totalmente heterocromáticos, indicando a existência de um terceiro tipo de cromossomo B. Apesar de uma das características comuns a quase todos os cromossomos B da maioria das espécies é sua constituição heterocromática, alguns autores mostram a existência de cromossomos B eucromáticos em mamíferos (PATTON, 1977; VUJOSEVIC; BLAGOJEVIC, 2004; MAKUNIN et al., 2014). Regiões cromossômicas ricas em heterocromatina constitutiva estão associadas com a presença de sequências de DNA satélite (MATSUBARA et al., 2008), permitindo supor que alguns cromossomos B do veado-catingueiro apresentam DNA satélite na região pericentromérica.

A presença de genes de rDNA nos cromossomos B do veado-catingueiro foi evidenciada pela coloração Ag-RON, sendo observados três padrões de cromossomos B: RON fortemente coradas, RON com fraca intensidade e ausência de RON. As diferentes intensidades de coloração da RON podem ser explicadas pelo fato de existir variabilidade na quantidade de genes de rDNA dentro de cada RON ou diferentes níveis de atividade gênica (YONENAGA-YASSUDA; ASSIS; KASAHARA, 1992), sendo que RON fortemente coradas devem possuir maiores quantidades de rDNA e/ou maior atividade do que as RON fracamente coradas. Além disso, foi verificado variabilidade intraindividual no padrão de RON e variabilidade interindividual na posição da RON nos cromossomos B. Esse polimorfismo interindividual de cromossomos B portadores ou não de RON também foi relatado por Duarte (1992) em espécimes de *M. gouazoubira* e por Yonenaga-Yassuda, Assis e Kasahara (1992) na espécie *Akodon* aff. *arviculoides*. A grande variabilidade encontrada entre os cromossomos B do veado-catingueiro em relação a presença ou ausência, posição e intensidade de coloração da RON, revelaram características individuais de cada cromossomo B, as quais são geneticamente determinadas pela atividade da RON (YONENAGA-YASSUDA; ASSIS; KASAHARA, 1992).

Além das RON localizadas nos pares cromossômicos 1 e 2 (DUARTE, 1992; 1998), o *M. gouazoubira* apresentou RON em alguns cromossomos B, permitindo supor que esses cromossomos B possam ter originado desses pares autossômicos. Essa hipótese pode ser suportada pelo fato de ter sido observado sítios frágeis próximos da localização da RON nos pares 1 e 2, como mostrado no Capítulo 4 - Localização dos sítios frágeis comuns em *Mazama gouazoubira* (Mammalia; Cervidae) e sua relação com o polimorfismo cromossômico apresentado pela espécie. De acordo com Beukeboom (1994), a presença de DNA ribossômico pode gerar quebras cromossômicas, sendo que os fragmentos quebrados podem ser transportados por elementos de transposição, iniciando assim, a origem de um cromossomo B.

Todos os cromossomos B avaliados apresentaram sinais teloméricos nas extremidades cromossômicas. Contudo, a maioria dos cromossomos B apresentaram forte sinal telomérico na região pericentromérica, alguns exibiram sinal

telomérico semelhante aos cromossomos do lote A e apenas um cromossomo B apresentou marcação telomérica intersticial. Sequências teloméricas foram observadas nos cromossomos B de outras espécies do gênero *Mazama*: *M. americana* (ABRIL, 2009), *M. gouazoubira* (RESENDE, 2012) e *M. nemorivaga* (RESENDE, 2012), entretanto, nenhum relato foi feito em relação a intensidade e posição dessas sequências.

Ausência de homologia entre cromossomos dos lotes A e B foi observada em alguns animais por meio da FISH com sondas produzidas por microdissecção, sugerindo que esses cromossomos B não se derivaram dos cromossomos do lote A. Por outro lado, se os cromossomos B evoluíram dos cromossomos autossômicos e/ou sexuais, eles estão altamente diferenciados (CAMACHO; SHARBEL; BEUKEBOOM, 2000), sendo que essa diferenciação é muito antiga e impossibilita a detecção de homologias pela técnica da FISH.

Alguns cromossomos B de *M. gouazoubira* apesentaram similaridade com os cromossomos do lote A, apesar de não ter sido observada nenhuma sequência específica similar entre os cromossomos dos dois lotes. Isso pode ser explicado pela provável existência de elementos de transposição nos cromossomos B, levando esses cromossomos a serem compostos por diferentes tipos de DNA provenientes de diferentes fontes (BEUKEBOOM, 1994; CAMACHO; SHARBEL; BEUKEBOOM, 2000). Dessa forma, experimentos de pintura cromossômica utilizando sondas de cromossomos B inteiros, como os conduzidos no presente trabalho, não fornecem dados claros sobre a presença de sequências homólogas devido a presença de elementos de transposição tanto nos cromossomos do lote A como nos cromossomos B (SILVA et al., 2016).

Por outro lado, essa similaridade entre cromossomos dos lotes A e B observadas no *M. gouazoubira* corrobora a hipótese sugerida por Duarte e Jorge (1996), a qual afirma que os cromossomos B originaram de fragmentos cêntricos oriundos de quebras cromossômicas. Similaridades entre cromossomos dos lotes A e B no veado-catingueiro também foram estudas por Makunin et al. (2016), que verificaram o conteúdo molecular dos cromossomos B e evidenciaram padrões de sequências semelhantes aos cromossomos autossômicos. Foi observado que apesar das espécies de cervídeos *Capreolus pygargus* e *M. gouazoubira* possuírem

o mesmo cariótipo padrão (2n=70+0-3B) e possivelmente o mesmo ancestral comum, os seus cromossomos B não apresentam nenhuma sequência homóloga, indicando que os cromossomos B dessas duas espécies possuem origens independentes (TRIFONOV et al., 2013; MAKUNIN et al., 2016). Ademais, Trifonov et al. (2013) foram pioneiros em descrever genes transcricionalmente ativos em cromossomos B, fato observado na espécie de cervídeo *C. pygargus*.

Em algumas espécies de mamíferos a FISH identificou que os cromossomos B derivaram do lote A, como por exemplo em cachorros, em que diversos segmentos cromossômicos evolutivamente conservados no lote A mostraram similaridade com segmentos de cromossomos B (BECKER et al., 2011). Apesar da sonda de cromossomo B ter marcado os cromossomos B e os autossomos na espécie *Vulpes vulpes*, a marcação autossômica foi diferente da observada no presente estudo. Ao contrário do resultado aqui apresentado, a sonda de cromossomo B da espécie *V. vulpes* marcou apenas a região centromérica e blocos intersticiais de heterocromatina de todos os autossomos, evidenciando que os cromossomos B possuem sequências repetitivas derivadas dos autossomos do lote A (BASHEVA et al., 2010).

Esses resultados mostraram variabilidade inter e intraindividual entre os cromossomos B do *M. gouazoubira*. Além disso, esses cromossomos B são geneticamente importantes, uma vez que alguns são compostos por eucromatina (local rico em regiões codificadoras) e por RON (regiões que apresentam sequências de genes ribossomais). Essa importância genética foi observada em um espécime de veado-catingueiro, por meio da análise do conteúdo genético de seus três cromossomos B, sendo encontrados 34 genes completos e 21 genes parciais, incluindo os proto-oncogenes RET e KIT (MAKUNIN et al., 2016). Segundo Makunin et al. (2014), esse conteúdo genético dos cromossomos B pode ser o responsável por sua manutenção, transmissão e ocorrência em diferentes espécies, devido ao fato desses cromossomos possuírem elementos genéticos que são benéficos para seu portador.

Em determinadas espécies, os cromossomos B possuem seu próprio sistema evolutivo, além de não conferirem nenhuma vantagem para os indivíduos que os portam. Com isso, são considerados parasitas, ou seja, elementos egoístas

que persistem nas células de um organismo para usar a maquinaria celular, a qual é responsável pela transmissão e manutenção dos cromossomos do lote A. Quando esses pequenos cromossomos estão em pequeno número, como observado na espécie *M. gouazoubira*, causam nenhum ou pouco impacto nos indivíduos que os portam, porém, em grandes quantidades, podem causar diferenças fenotípicas e impactos na reprodução, como a redução da fertilidade (CAMACHO; SHARBEL; BEUKEBOOM, 2000; JONES; HOUBEN, 2003). Por outro lado, existem estudos que sugerem que os cromossomos B de vertebrados podem se comportar como um elemento cariotípico que segrega de forma autônoma, transportando regiões genômicas que poderiam influenciar a flexibilidade do genoma, possibilitando a ocorrência de novas adaptações para seus portadores (TRIFONOV et al., 2013).

Diante disso, não é possível sugerir qual é o papel dos cromossomos B em *M. gouazoubira*, além de não se saber qual é o impacto desses na espécie em questão. Entretanto, o fato desses cromossomos estarem sempre presentes e não serem eliminados durante a evolução sugere que possivelmente eles confiram alguma vantagem adaptativa para a espécie. Ademais, técnicas de citogenética mostraram que os cromossomos B do veado-catingueiro são diferentes entre si, possibilitando inferir duas hipóteses: 1) A partir de um cromossomo B ancestral em comum, o qual pode ter originado por meio de quebras do lote A ou serem elementos genéticos externos, outros cromossomos B foram sendo derivados e diferenciados, originando vários tipos distintos de cromossomos B dentro da espécie *M. gouazoubira*. 2) Os diferentes tipos de cromossomos B encontrados na espécie são provenientes de vários cromossomos B ancestrais, ou seja, não possuem um mesmo cromossomo B ancestral. Além disso, a existência de sequências homólogas entre cromossomos dos lotes A e B sugerem que possivelmente os cromossomos B se originaram dos autossomos ou as homologias encontradas são derivadas de trocas cromossômicas entre os cromossomos dos dois lotes, como proposto para roedores por Matsubara et al. (2008).

CONCLUSÃO

A população brasileira de *M. gouazoubira* apresentou uma considerável heterogeneidade de cromossomos B. A variabilidade desses cromossomos está centrada na constituição genética dos mesmos, sendo que foram observadas diferenças nos padrões de distribuição da heterocromatina e da eucromatina, presença e grau de intensidade das RON, localização e intensidade de marcação das sequências teloméricas e homologias com os cromossomos do lote A. Isso mostra que existe mais de um tipo de cromossomo B no veado-catingueiro, sugerindo que esses diferentes cromossomos tiveram origens independentes ou que se originaram a partir de um ancestral comum e, posteriormente, acumularam diferentes graus de diferenciação.

O fato desses cromossomos B não estarem sendo eliminados em *M. gouazoubira* sugere que talvez possam conferir alguma vantagem adaptativa para os indivíduos que os portam. Essa vantagem benéfica dos cromossomos B pode estar ligada ao seu conteúdo genético, que provavelmente desempenha um importante papel genético. A descoberta de sítios que estavam transcricionalmente ativos durante a interfase nos cromossomos B é um indicio de que esses cromossomos exerçam alguma função nos indivíduos que os portam.

REFERÊNCIAS

ABRIL, V. V. **Evolução cromossômica no veado-mateiro - *Mazama americana* (MAMMALIA; CERVIDAE).** 2009. 108 f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento Animal) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2009.

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. 31, p. 53-57, 2008.

AMOS, A.; DOVER, G. The distribution of repetitive DNAs between regular and supernumerary chromosomes in species of *Glossina* (Tsetse): a two-step process in the origin of supernumeraries. **Chromosoma,** Berlin, v. 81, p. 673-690, 1981.

BASHEVA, E. A.; TORGASHEVA, A. A.; SAKAEVA, G. R.; BIDAU, C.; BORODIN, P. M. A- and B-chromosome pairing and recombination in male meiosis of the silver fox (*Vulpes vulpes* L., 1758, Carnivora, Canidae). **Chromosome Research**, Oxford, v. 18, p. 689-696, 2010.

BAVERSTOCK, P. R.; GELDER, M.; JAHNKE, A. Cytogenetic studies of the Australian rodent *Uromys caudimaculatus*, a species showing extensive heterochromatin variantion. **Chromosoma**, Berlin, v. 84, p. 517-533, 1982.

BECKER, S. E. D.; THOMAS, R.; TRIFONOV, V. A.; WAYNE, R. K.; GRAPHODATSKY, A. S.; BREEN, M. Anchoring the dog to its relatives reveals new evolutionary breakpoints across 11 species of the Canidae and provides new clues for the role of B chromosomes. **Chromosome Research**, Oxford, v. 19, p. 685-708, 2011.

BEUKEBOOM, L. W. Bewildering Bs: an impression of the 1st B-Chromosome Conference. **Heredity**, Oxford, v. 73, p. 328-336, 1994.

CAMACHO, J. P. M.; SHARBEL, T. F.; BEUKEBOOM, L. W. B-chromosome evolution. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B**, London, v. 355, p. 163-178, 2000.

DUARTE, J. M. B. **Aspectos taxonômicos e citogenéticos de algumas espécies de cervídeos brasileiros**. 1992. 153p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento Animal) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 1992.

DUARTE, J. M. B. Análise taxonômica dos *Mazama* cinzas do Brasil. 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 “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, 1998.

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.

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, p. 403-410, 2003.

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.

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

GROSS, M. C.; SCHNEIDER, C. H.; VALENTE, G. T.; MARTINS, C.; FELDBERG, E. Variability of 18S rDNA locus among *Symphysodon* fishes: chromosomal rearrangements. **Journal of Fish Biology**, Scotland, v. 76, p. 1117-1127, 2010.

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.

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.

JONES, N.; HOUBEN, A. B chromosomes in plants: escapees from the A chromosome genome? **Trends in Plant Science**, Cambridge, v. 8, p. 417-423, 2003.

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

KOMIYA, H.; TAKEMURA, S. Nucleotide sequence of 5s ribosomal RNA from rainbow trout (*Salmo gairdnerii*) liver. **Journal of Biochemistry**, Oxford, v 86, 1067-1080, 1979.

MAKUNIN, A. I.; DEMENTYEVA, P. V.; GRAPHODATSKY, A. S.; VOLOBOUEV, V. T.; KUKEKOVA, A. V.; TRIFONOV, V. A. Genes on B chromosome of vertebrates. **Molecular Cytogenetics**, Jena, v. 7, p. 99-109, 2014.

MAKUNIN, A. I.; KICHIGIN, I. G.; LARKIN, D. M.; O'BRIEN, P. C. M.; FERGUSON-SMITH, M. A.; YANG, F.; PROSKURYAKOVA, A. A.; VOROBIEVA, N. V.; CHERNYAEVA, E. N.; O'BRIEN, S. J.; GRAPHODATSKY, A. S.; TRIFONOV, V. A. Contrasting origin of B chromosome in two cervids (Siberian roe deer and grey brocket deer) unravelled by chromosome-specific DNA sequencing. **BioMed Central Genomics**, London, v.17, p. 618-632, 2016.

MARTINS, C.; VICARI, M. R. Hibridização *in situ* em Cromossomos de Peixes. In: GUERRA, M. (Ed.). **Citogenética Molecular: Protocolos Comentados**. Ribeirão Preto: SBG, 2012. cap. 4, p. 59-87.

MATSUBARA, K.; YAMADA, K.; UMEMOTO, S.; TSUCHIYA, K.; IKEDA, N.; NISHIDA, C.; CHIJIWA, T.; MORIWAKI, K.; MATSUDA, Y. Molecular cloning and characterization of the repetitive DNA sequences that comprise the constitutive heterochromatin of the A and B chromosomes of the Korean field mouse (*Apodemus peninsulae*, Muridae, Rodentia). **Chromosome Research**, Oxford, v. 16, p. 1013-1026, 2008.

MOORHEAD, R. S.; NOWELL, P. C.; MELINAN, W. J.; BATTIPS, D. M.; HUNGERFORD, A. Chromosome preparations of leucocytes culture from human peripheral blood. **Experimental Cell Research***,* New York, v. 20, p.13, 1960.

PATTON, J. L. B-Chromosome Systems in the Pocket Mouse, *Perognathus bailleyi*: Meiosis and C-Band Studies. **Chromosoma**, Berlim, v. 60, p. 1-14, 1977.

RESENDE, J. P. de A. **Comparação cariotípica entre *Mazama* cinzas do Brasil (*Mazama gouazoubira* e *Mazama nemorivaga*; ARTIODACTYLA; CERVIDAE)**. 2012. 58 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento Animal) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Jaboticabal, 2012.

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 em Genética e Melhoramento Animal) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2004.

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

SILVA, D. M. Z. A.; DANIEL, S. N.; CAMACHO, J. P. M.; UTSUNOMIA, R.; RUIZ-RUANO, F. J.; PENITENTE, M.; PANSONATO-ALVES, J. C.; HASHIMOTO, D. T.; OLIVEIRA, C.; PORTO-FORESTI, F.; FORESTI, F. Origin of B chromosomes in the genus *Astyanax* (Characiformes, Characidae) and the limits of chromosome painting. **Molecular Genetics and Genomics**, Berlin, v. 291, p. 1407-1418, 2016.

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

SVARTMAN, M. Hibridização *in situ* em Mamíferos. In: GUERRA, M. **Citogenética Molecular: Protocolos comentados.** Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 2012, p. 89-100.

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 DOP-PCR amplified flow-sorted chromosomes. **Genes, Chromosomes & Cancer**, New York, v.4, p.257-263, 1992.

TRIFONOV, V. A.; DEMENTYEVA, P. V.; LARKIN, D. M.; O´BRIEN, P. C. M.; PERELMAN, P. L.; YANG, F.; FERGUSON-SMITH, M. A.; GAPHODATSKY, A. S. Transcription of a protein-coding gene on B chromosomes of the Siberian roe deer (*Capreolus pygargus*). **BioMed Central Biology**, London, v. 11, p. 90-101, 2013.

VARGAS-MUNAR, D. S. F.; SARRIA-PEREA, J. A.; DUARTE, J. M. B. Different responses to doxorubicin-induced chromosome aberrations in Brazilian deer species. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 9, p. 1545-1549, 2010.

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

VUJOSEVIC, M.; BLAGOJEVIC, J. B chromosomes in populations of mammals. **Cytogenetics and Genome Research**, Basel, v. 106, p. 247-256, 2004.

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.

YONENAGA-YASSUDA, Y.; ASSIS, M. F. L.; KASAHARA, S. Variability of the nucleolus organizer regions and the presence the rDNA genes in the supernumerary chromosome of *Akodon* aff. *arviculoides* (Cricetidae, Rodentia). **International Journal of Cytology, Cytosystematics and Cytogenetics**, v. 45, p. 163-174, 1992.

CAPÍTULO 4 – Localização dos sítios frágeis comuns em *Mazama gouazoubira* (Mammalia; Cervidae) e sua relação com o polimorfismo cromossômico.

RESUMO

A espécie *Mazama gouazoubira* é conhecida por apresentar o cariótipo basal da família Cervidae (2n=70; NF=70), a partir do qual foram originados os cariótipos de todas as outras espécies de cervídeos. Além disso, a espécie exibe polimorfismo cromossômico, o qual é caracterizado pela presença de translocações Robertsonianas e cromossomos B. Acredita-se que essa espécie apresenta fragilidade cromossômica, a qual seria responsável tanto pelo polimorfismo cromossômico quanto pela instabilidade cromossômica que propiciou a ocorrência de rearranjos, que estariam relacionados com a diferenciação cromossômica entre as espécies da família Cervidae. Dessa forma, o objetivo desse trabalho foi identificar e localizar os sítios frágeis comuns (SFCs) presentes nos cromossomos de *M. gouazoubira*, visando construir um mapa contendo os SFCs da espécie. Com a indução de SFCs pela afidicolina foi possível detectar a ocorrência de SFCs na forma de “gaps” e quebras, tanto cromatídicas como cromossômicas. Além disso, o bandamento G permitiu localizar 531 SFCs que estão presentes em 18 pares cromossômicos, mostrando que alguns pares cromossômicos são mais frágeis do que outros. Desses 18 pares cromossômicos com SFCs, sete estão relacionados com as translocações Robertsonianas observadas no veado-catingueiro. Além disso, dos sete pares cromossômicos relacionados com as translocações, os cromossomos X, 4, 7, 14, 16 e 21 apresentaram SFCs na região pericentromérica. A espécie *M. gouazoubira*, apresenta altas taxas de SFCs que podem estar relacionados com a ocorrência de translocações Robertsonianas na espécie, corroborando a teoria da fragilidade cromossômica apresentada pelo veado-catingueiro.

Palavras-chave: afidicolina; bandamento G; fragilidade cromossômica, translocação Robertsoniana.

INTRODUÇÃO

Sítios frágeis (SF) são pontos específicos que se quebram quando são expostos a determinados tipos de agentes químicos ou condições específicas de cultivos celulares, e são divididos em raros ou comuns. Os sítios frágeis comuns (SFCs) podem ser induzidos pela BrdU (5-bromo-2'-deoxiuridina), 5-azacitidina e pela afidicolina (SUTHERLAND, 1988). Apresentam algumas características peculiares como a presença de "gaps" (segmentos cromossômicos não corados) de tamanho variável e quase sempre presente nas duas cromátides de um cromossomo (DEKABAN, 1965). Além disso, em um mesmo indivíduo, os SFCs estão localizados exatamente no mesmo ponto cromossômico e nos mesmos cromossomos em diferentes células analisadas (SUTHERLAND, 1977; 1979). Esses sítios seguem padrões de herança mendeliana, sendo que a instabilidade cromossômica produzida por eles é evidenciada por meio de alterações cromossômicas, como os "gaps", quebras, fragmentos acêntricos, formas trirradiais, entre outras. As alterações cromossômicas se iniciam com um "gap", sendo que nesse "gap" pode ocorrer uma quebra e, a partir dessas, são originados fragmentos cêntricos ou novas configurações, como as trirradiais ou as quadrirradiais. Os "gaps" são resultado da extrema desespiralização do DNA devido a falhas ocorridas durante o processo de compactação do DNA nos cromossomos (SUTHERLAND, 1979).

Acredita-se que os "gaps" cromatídicos ocorram durante a fase G2 do ciclo celular. Outra explicação plausível é que os indutores de SFCs agem durante a síntese de DNA. A expressão dos SFCs pode ser influenciada diretamente pelo tempo exato em que ocorre a espiralização das cromátides no fim da fase G2 ou no começo da prófase (SUTHERLAND, 1979).

Existe uma diferença entre a ocorrência de SFCs presentes nos cromossomos e a existência molecular dos pontos de quebras evolutivos, sendo que nem todos os SFCs expressam pontos de quebras evolutivos. Todavia, as bandas cromossômicas que expressam SFs, tanto os raros como os comuns, apresentam uma tendência maior em concentrar os pontos de quebras evolutivos do que quando comparadas com bandas que não expressam SFs (RUIZ-HERERRA; CASTRESANA; ROBINSON, 2006).

Provavelmente a espécie *M. gouazoubira* apresenta cromossomos frágeis, os quais são responsáveis pelo polimorfismo cromossômico observado na espécie tanto na presença de cromossomos B como na ocorrência de translocações Robertsonianas. Tal fragilidade pode estar relacionada com a maneira em que ocorreu a evolução cromossômica no gênero *Mazama*, uma vez que *M. gouazoubira* é conhecido por ter retido o cariótipo ancestral hipotético dos cervídeos (2n=70; NF=70), a partir do qual foram derivados os cariótipos de todas as outras espécies da família Cervidae (NEITZEL, 1987; DUARTE, 1992; 1998; VARGAS-MUNAR; SARRIA-PEREA; DUARTE, 2010). Em vista disso, o presente estudo buscou identificar e localizar os SFCs presentes nos cromossomos de *M. gouazoubira*, visando construir um mapa contendo os SFCs da espécie, que poderá ser utilizado em estudos futuros para a identificação dos pontos de quebras evolutivos. Ademais, os cromossomos portadores de SFCs foram relacionados com os cromossomos envolvidos no polimorfismo cromossômico apresentado pela espécie.

MATERIAL E MÉTODOS

Cultivos celulares e indução de sítios frágeis

Foram avaliados seis animais (três fêmeas e três machos) da espécie *M. gouazoubira* (Tabela 1), sendo realizados cultivos celulares a partir de fragmentos de pele segundo a metodologia descrita por Verma e Babu (1995) (Apêndice B). Para a indução de SFCs, 0,01mmol/L de afidicolina foi dissolvida em DMSO, sendo feitos quatro cultivos por animal: cultivos controle (C.C.), cultivos tratados o solvente DMSO (DMSO – concentração final 0,2µmol/L), cultivos tratados com concentração final de 0,1µmol/L de afidicolina (AF25) e cultivos tratados com concentração final de 0,2µmol/L de afidicolina (AF50). Cada cultivo foi realizado com 5 mL de meio de cultura (4,5 mL de DMEM e 0,5 mL de SFB), fornecendo as concentrações finais descritas acima. Nas últimas 24 horas de cultivo, ou seja, 24 horas antes da colheita, foram adicionados aos cultivos os tratamentos DMSO, AF25 e AF50. Após as 24 horas de tratamento, as células foram colhidas e as preparações cromossômicas foram obtidas usando os protocolos padrão de colheita celular.

Tabela 1. Informações dos animais da espécie *Mazama gouazoubira* utilizados para a indução e análise dos sítios frágeis comuns.

Nº	**Sexo**	**2n**	**NF**	**Origem**
T83	F	2n=69	70	Júlio de Castilho – RS
T93	M	2n=69	70	Candiota – RS
T126	M	2n=69	70	Brasília – DF
T130	F	2n=70	70	Funilândia – MG
T131	F	2n=70	70	Divinópolis – MG
T137	M	2n=70	70	Fortaleza- CE

Nº = número de identificação do animal; 2n = número diploide; NF = número fundamental; F = fêmea; M = macho.

As preparações cromossômicas foram submetidas a dois tipos de coloração: coloração convencional utilizando o corante Giemsa, para a análise do índice mitótico e dos SFCs (“gaps” e quebras), e o bandamento G (SEABRIGHT, 1971), para a identificação dos cromossomos portadores de SFs e localização dos mesmos nos cromossomos.

Coloração convencional - Giemsa

Índice mitótico

Utilizando as preparações cromossômicas de cada cultivo realizado de todos os animais, foi calculado o Índice Mitótico (IM), que foi determinado pela razão entre o número de metáfases encontradas em 1000 células analisadas por cultivo, sendo um total de 4000 células analisadas por animal. O número obtido do IM foi expresso em porcentagem (GALLOWAY et al., 1994; TAKAHASHI, 2003). Dados do IM foram submetidos a análise de variância (ANOVA) para avaliar o efeito da citotoxicidade da afidicolina, com nível de significância de 5%. As médias de cada cultivo (C.C., DMSO, AF25 e AF50) foram comparadas pelo teste de Tukey (P<0,05), com o auxílio do programa GraphPad Prism versão 7.0.

Análise dos sítios frágeis

Foram analisadas 50 metáfases de cada cultivo celular de todos os animais com o intuito de verificar a presença de SFCs na forma de “gaps” e quebras. Dessa forma, foram identificados e quantificados quatro tipos de alterações cromossômicas: os “gaps” cromatídicos, os “gaps” cromossômicos, as quebras cromatídicas e as quebras cromossômicas. Dados dos números totais de SFCs e

dos números totais de metáfases com SFCs foram submetidos a análise de variância (ANOVA) para avaliar o efeito da afidicolina em induzir SFCs, com nível de significância de 5%, com o auxílio do programa GraphPad Prism versão 7.0.

Bandamento G

Com o intuito de identificar os cromossomos portadores de SFCs e localizar os SFCs dentro de cada cromossomo, 100 metáfases de cada cultivo tratado com afidicolina (AF25 e AF50) de cada animal foram submetidas ao bandamento G. Para tanto, foi utilizada como base comparativa o idiograma feito por Neitzel (1987). A partir dessas identificações, foi realizada uma análise quantitativa a fim de encontrar os pontos cromossômicos com suas respectivas frequências de ocorrência dos SFCs. Com isso, foi possível construir um mapa dos SFCs presentes em *M. gouazoubira*, que permitiu relacionar a fragilidade desses cromossomos com o polimorfismo apresentado pela espécie.

RESULTADOS

Análise do índice mitótico e dos sítios frágeis comuns

Somente após o tratamento com diferentes concentrações de afidicolina e, consequentemente a análise do IM que as concentrações finais de afidicolina a serem utilizadas no presente estudo foram determinadas. Primeiramente, as concentrações escolhidas foram baseadas em trabalhos prévios utilizando outros grupos de mamíferos (RUIZ-HERRERA et al., 2002; RUIZ-HERRERA et al., 2004; RUIZ-HERRERA et al., 2005). Tais autores utilizaram as concentrações de 0,1µmol/L e 0,2µmol/L de afidicolina (0,02 µM) diluída em DMSO. No presente trabalho, a partir desta mesma diluição de afidicolina (0,02 µM), foram testadas as concentrações de 0,004µmol/L, 0,02µmol/L, 0,04µmol/L, 0,08µmol/L, 0,1µmol/L e 0,2µmol/L, sendo que todos foram citotóxicos segundo o teste do IM. Em decorrência disso, a afidicolina foi novamente diluída em DMSO (0,01 µM). As concentrações finais de afidicolina escolhidas para os tratamentos foram 0,1µmol/L (AF25) e de 0,2µmol/L (AF50).

Segundo a análise do IM, não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas nos valores do IM entre os cultivos tratados com DMSO, AF25 e AF50 com o cultivo controle (C.C.), o que indica ausência de citotoxicidade nos cultivos celulares nas condições utilizadas (Tabela 2).

Tabela 2. Valores do índice mitótico observados nos animais analisados.

Animais	Índice Mitótico			
	C.C.	DMSO	AF25	AF50
T83	3,6	3,5	3,6	4,2
T93	3,9	3,3	4,5	3,4
T126	3,8	3,5	4	2,7
T130	3,5	3,4	2,6	3,2
T131	3,0	2,6	2,5	2,6
T137	3,3	2,7	4,0	3,1

AF= afidicolina (0,01µM/L); C.C. = cultivos controle; DMSO = cultivos tratados com 0,2µmol/L do solvente DMSO; AF25 = cultivos tratados com 0,1µmol/L de afidicolina; AF50 = cultivos tratados com 0,2µmol/L de afidicolina. Foram analisadas 1000 células por cultivo celular, totalizando 4000 células por animal.

Com a análise do número total de SFCs e do número total de metáfases que apresentaram SFCs, houve uma diferença estatisticamente significativa (P<0,05) entre os C.C. em relação aos cultivos que foram tratados com afidicolina (AF25 e AF50), revelando um aumento significativo tanto do número total de SFCs como do número total de metáfases que apresentaram SFCs nos cultivos tratados com afidicolina. Não foram observadas diferenças significativas (P>0,05) entre os C.C. e os cultivos tratados com DMSO, indicando que somente o solvente utilizado não foi capaz de induzir SFCs (Figura 1).

Foram encontrados SFCs tanto nos C.C. como nos cultivos tratados com DMSO, entretanto os números totais de SFCs e de metáfases que apresentaram SFCs foram bem menores do que os observados nos cultivos tratados com afidicolina (Figura 1). Os SFCs observados nos cultivos que não entraram em contato com o indutor afidicolina são considerados SFCs espontâneos.

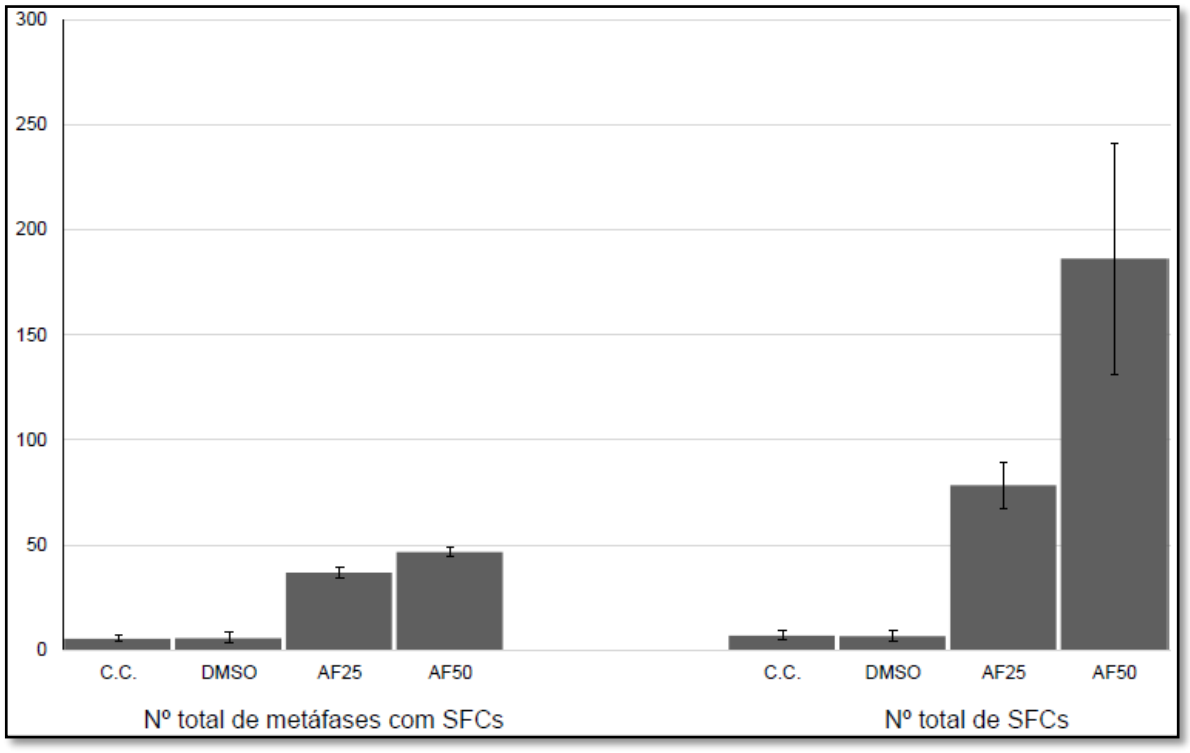

Figura 1. Média e desvio padrão por cultivo (C.C. = cultivos controle, DMSO = cultivos tratados com DMSO, AF25 e AF50 = cultivos tratados com 0,1µmol/L e 0,2µmol/L de afidicolina, respectivamente) dos seis animais analisados em relação ao número total de metáfases que apresentaram SFCs e ao número total de sítios frágeis comuns (SFCs).

Em relação à análise dos SFCs, foram detectados quatro tipos de alterações cromossômicas: quebras cromatídicas (Qct), quebras cromossômicas (Qcr), “gaps” cromatídicos (Gct) e “gaps” cromossômicos (Gcr) (Tabela 3). Ainda na Tabela 3, foi observado que concomitantemente ao aumento da concentração de afidicolina adicionada nos cultivos AF50 em relação aos cultivos AF25, o número total de SFCs dos cultivos AF50 aumentou mais que o dobro. Não foram observadas diferenças significativas entre os animais em relação a sensibilidade à afidicolina, revelando que os cromossomos de todos os animais se comportaram da mesma forma frente a ação dessa substância.

Apesar das quebras e dos “gaps” (Figura 2), tanto cromatídicos como cromossômicos, serem mais frequentes e as únicas alterações cromossômicas incluídas nas análises do presente estudo, outras alterações cromossômicas mais complexas foram observadas, como as associações entre os cromossomos, formando complexos rearranjos cromossômicos (Figura 3).

Tabela 3. Valores totais dos tipos de alterações cromossômicas analisadas nos cultivos celulares nos animais T83, T93, T126, T130, T131 e T137.

Animal	C.C.					DMSO					AF25					AF50					T/animal
	Tipos de alterações cromossômicas																				
	Gct	Gcr	Qct	Qcr	T	Gct	Gcr	Qct	Qcr	T	Gct	Gcr	Qct	Qcr	T	Gct	Gcr	Qct	Qcr	T	
T83	3	0	2	0	**5**	1	0	2	2	**5**	26	23	12	7	**68**	37	47	28	24	**136**	**214**
T93	3	0	3	1	**7**	3	1	2	0	**6**	39	20	7	8	**74**	40	34	9	29	**112**	**199**
T126	6	1	1	1	**9**	3	2	2	1	**8**	38	12	10	11	**71**	76	88	17	59	**240**	**328**
T130	8	0	1	0	**9**	2	2	1	0	**5**	42	28	16	9	**95**	77	73	63	30	**243**	**352**
T131	4	0	1	0	**5**	4	1	1	0	**6**	28	30	12	20	**90**	63	83	24	42	**212**	**313**
T137	6	0	2	1	**9**	8	1	3	0	**12**	29	7	19	18	**73**	56	48	32	37	**173**	**267**
T/alt. crom.	30	1	10	3	**-**	21	7	11	3	**-**	202	120	76	73	**-**	349	373	173	221	**-**	**-**

AF = afidicolina (0,01 µM/L). Foram analisadas 50 metáfases coradas com Giemsa por cultivo celular de cada animal, sendo analisadas um total de 200 metáfases por animal. C.C. = cultivos controle; DMSO = cultivos tratados com DMSO; AF25 e AF50 = cultivos tratados com 0,01µmol/L e 0,02µmol/L de afidicolina, respectivamente; Gct = “gap” cromatídico; Gcr = “gap” cromossômico; Qct = quebra cromatídica; Qcr = quebra cromossômica; T = total de alteração cromossômica (Gct + Gcr + Qct + Qcr) por cultivo celular de cada animal; T/alt. crom. = total de alterações cromossômicas de acordo com o tipo de alteração; T/animal = total de alterações cromossômicas de cada animal.

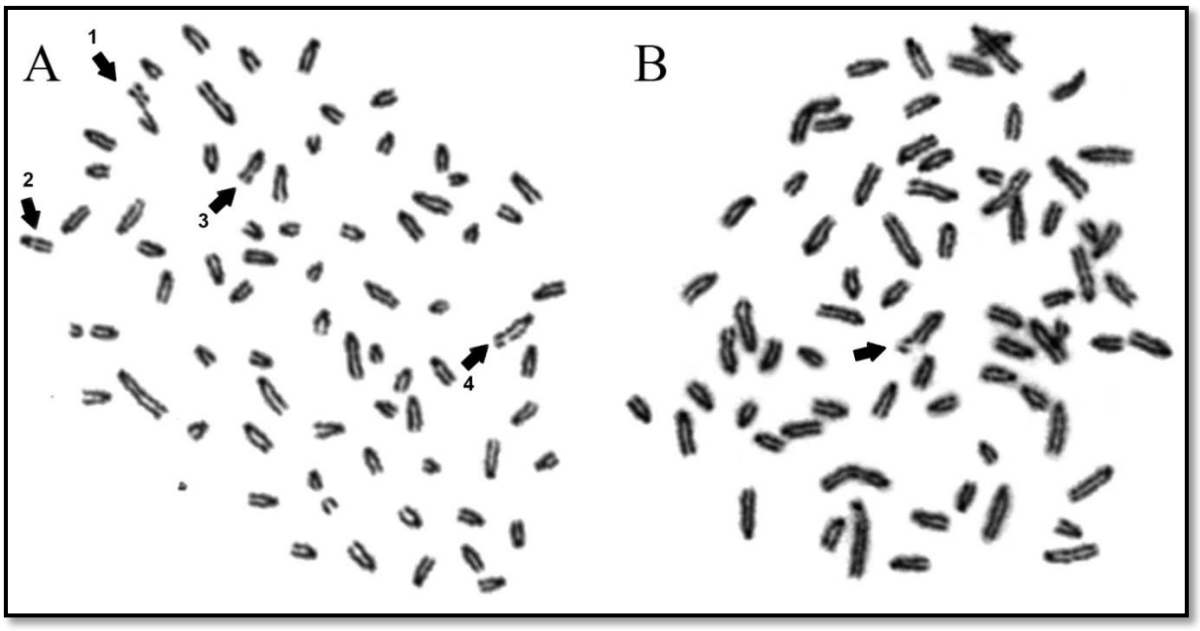

Figura 2. Metáfases da fêmea T130 da espécie *Mazama gouazoubira*, sob coloração convencional (Giemsa) e aumento de 1000x. (a) Seta 1 indica uma quebra cromatídica, a seta 2 um “gap” cromossômico e as setas 3 e 4 “gaps” cromatídicos. (b) Seta indica uma quebra cromossômica.

Figura 3. Metáfase da fêmea T130 da espécie *Mazama gouazoubira*, sob coloração convencional (Giemsa) e aumento de 1000x, com setas indicando alguns complexos cromossômicos formados por associações cromossômicas.

Identificação dos cromossomos portadores de SFCs e localização dos SFCs dentro de cada cromossomo

Os resultados obtidos com técnica de bandamento G indicam que, das 1200 metáfases analisadas, foram encontrados 531 SFCs distribuídos em 18 cromossomos (cromossomo sexual X e pares cromossômicos autossômicos 1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 11, 13, 14, 16, 17, 18, 21, 22 e 34). Os cromossomos que apresentaram SFCs com seus respectivos números de SFCs estão descritos na Figura 4 e na Figura 5.

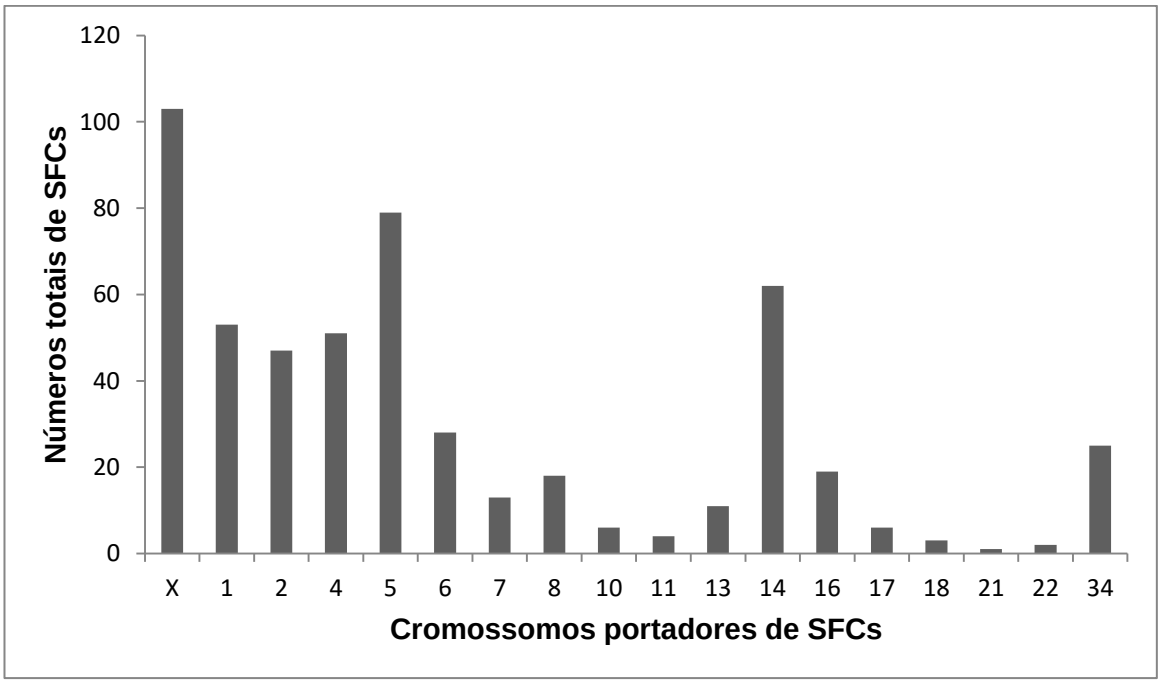

Figura 4. Números de sítios frágeis comuns (SFCs) encontrados nos cromossomos de *Mazama gouazoubira* submetidos ao tratamento com afidicolina (AF25 e AF50).

Em relação à localização dos SFCs dentro de cada cromossomo, foi observado que a maioria dos SFCs estão localizados em pontos de transição entre as bandas claras e as bandas escuras, alguns estão dentro das bandas escuras e outros dentro das bandas claras. Com esses dados, foi possível construir um mapa contendo os SFCs da espécie *M. gouazoubira* (Figura 5). A Figura 5 também permite observar a ocorrência de SFCs na região pericentromérica dos pares cromossômicos 1, 4, 7, 11, 13, 14, 16, 18, 21, 22, 34 e no cromossomo sexual X.

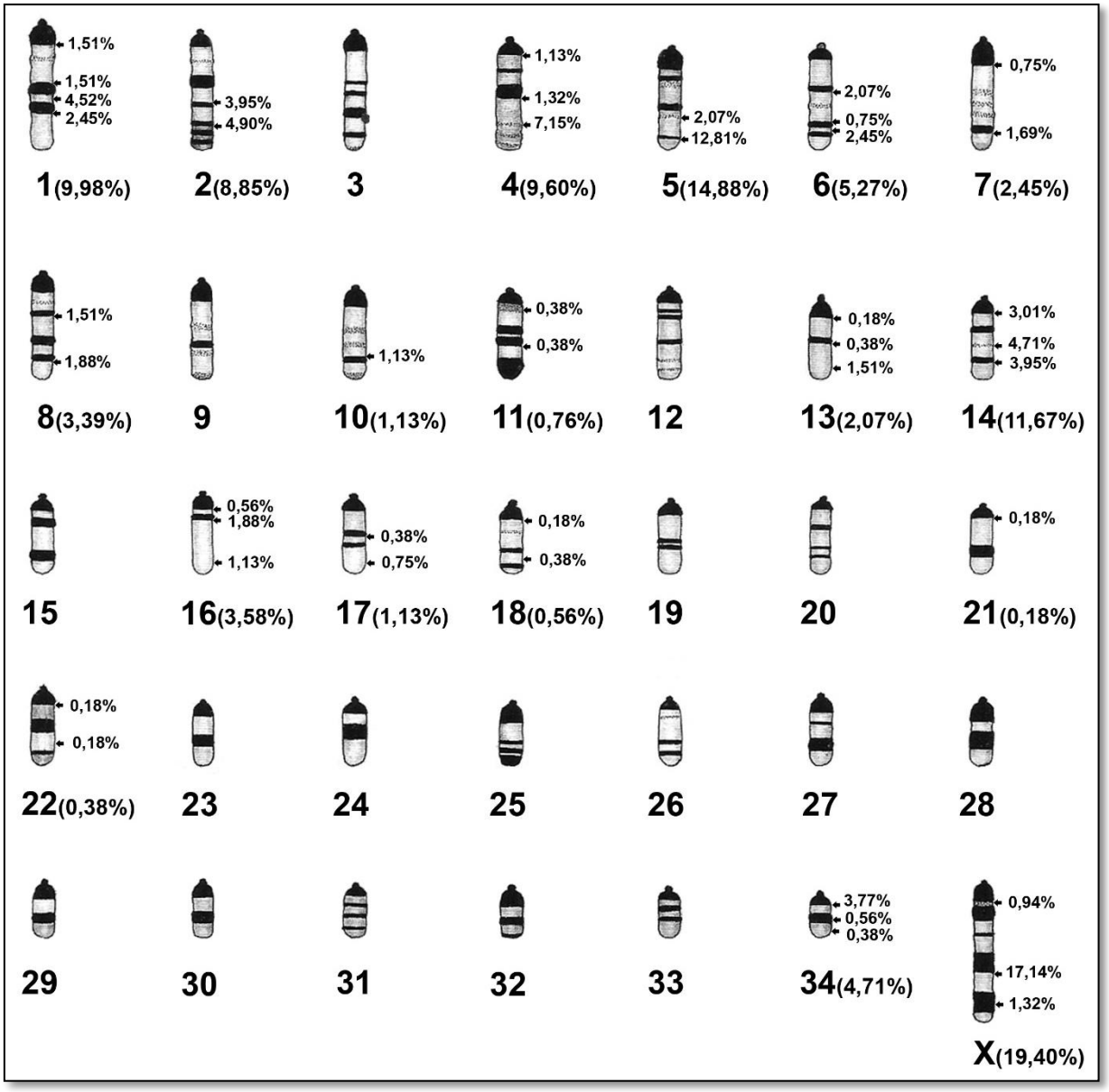

Figura 5. Idiograma dos cromossomos de *Mazama gouazoubira* mostrando a localização dos sítios frágeis comuns encontrados nas metáfases tratadas com afidicolina (AF25 e AF50) dos animais T83, T93, T126, T130, T131 e T137. Idiograma de Neitzel (1987) com modificações.

DISCUSSÃO

É conhecido que existem regiões nos genomas dos mamíferos que estão diretamente relacionadas com a evolução cromossômica, indicando a presença de sítios preferenciais para a ocorrência de rearranjos. Essa teoria de evolução cromossômica segue o Modelo de Ruptura Frágil, que sugere que os SFCs

estão intimamente correlacionados com os pontos de quebras que são conservados durante a evolução cromossômica das espécies (PEVZNER; TESLER, 2003). Acredita-se que a evolução cariotípica das espécies do gênero *Mazama* seguiu o Modelo de Ruptura Frágil. Dessa forma, a partir do cariótipo ancestral, foram sendo originadas as outras espécies. Como *M. gouazoubira* reteve o cariótipo ancestral hipotético dos cervídeos, é possível que os SFCs envolvidos na evolução cromossômica dessas espécies tenham sido conservados dentro de seus cromossomos. Com isso, o presente trabalho descreveu, pela primeira vez, os SFCs induzidos pela afidicolina nos cromossomos da espécie *M. gouazoubira*, os quais foram localizados por meio da técnica do bandamento G.

Os SFCs são conhecidos como variantes raras e dependem de condições de cultivos celulares ideais para serem corretamente expressos, devido ao fato de existirem alguns fatores capazes de inibir, aumentar ou diminuir a sua expressão. Além disso, apenas determinados tipos de agente químicos são capazes de induzir a expressão de SFCs, sendo necessário utilizar concentrações específicas (SUTHERLAND, 1979). Em vista disso, os experimentos aqui realizados seguiram metodologias eficientes já utilizadas com outros grupos de mamíferos e descritas na literatura (RUIZ-HERRERA et al., 2002; RUIZ-HERRERA et al., 2004).

O modo de ação da afidicolina, agente indutor de SFCs utilizado no presente trabalho, não está ligado com a sua intercalação direta ao DNA, mas sim com a inibição da DNA polimerase das células eucariotas. A afidicolina é conhecida como um eficiente indutor de SFCs, os quais podem ser expressos na maioria dos indivíduos de uma espécie (SPADARI; SALA; PEDRALI-NOY, 1982; RUIZ-HERRERA et al., 2004). Esses SFCs são comumente visualizados na forma de “gaps” e de quebras cromossômicas ou cromatídicas (SUTHERLAND, 1979). Esses tipos de alterações cromossômicas foram observados neste trabalho, sendo que os “gaps”, tanto cromatídicos como cromossômicos foram mais frequentes do que as quebras. Ainda, o aumento da quantidade de alterações cromossômicas observadas foi concomitante ao aumento da concentração de afidicolina utilizada. Tais dados também foram relatados por Ruiz-Herrera et al. (2002), ao analisarem SFCs induzidos pela afidicolina em *Macaca fascicularis*.

Como apresentado nesse estudo, a maioria dos SFCs que foram observados está localizada em regiões de transição entre as bandas claras e as bandas escuras fornecidas pela técnica do bandamento G. A técnica de banda G produz padrões alternados de bandas claras e escuras, as quais estão relacionadas com a composição do DNA e a organização estrutural da cromatina ao longo dos braços cromossômicos. As bandas escuras são regiões altamente condensadas, compostas por DNA que se replica tardiamente na fase S do ciclo celular, por sequências repetitivas ricas em adenina e timina, e são regiões heterocromáticas responsáveis pela codificação de poucos genes que são expressos. Por outro lado, as bandas claras são regiões mais descondensadas, que possuem DNA que se replicam na etapa inicial da fase S, composta por sequências repetitivas ricas em citosina e guanina, são eucromáticas e responsáveis pela codificação de vários genes que são expressos (CROCKER; BURNETT, 2005).

As regiões de transição entre as bandas claras e escuras caracterizam a transição entre regiões altamente condensadas e descondensadas, ou ainda a transição entre regiões que se replicam cedo ou tarde durante a fase S. Essa transição entre diferentes níveis de compactação e entre as fases de replicação causam uma instabilidade na cromatina, ocasionando diversos danos ao DNA, como as quebras e os rearranjos cromossômicos. Tal instabilidade está relacionada com o fato dessas regiões de transição serem grandes e desprovidas de sítios de origens de replicação, o que influencia negativamente no bom andamento da forquilha de replicação e, consequentemente, gera um atraso na replicação (WATANABE; MAEKAWA, 2013). Debatisse, El Achkar e Dutrillaux (2006) relataram que a maioria dos SFCs induzidos pela afidicolina observados em humanos estão localizados na região de transição entre as bandas claras e escuras, fato que corrobora os resultados aqui apresentados.

Como descrito no Capítulo 2 – “Identificação dos cromossomos envolvidos nas translocações Robertsonianas em *Mazama gouazoubira* (Mammalia; Cervidae)”, foram observados sete tipos diferentes de translocação Robertsoniana na população brasileira de *M. gouazoubira*, sendo que esses sete tipos de translocações envolvem 9 cromossomos diferentes (X, 4, 7, 8, 14, 16, 20, 21 e 26). Contrastando esses resultados com o mapa dos SFCs (Figura 5), é possível

perceber que apenas os pares cromossômicos 20 e 26 não apresentaram SFCs. Por outro lado, todos os outros sete pares cromossômicos possuem SFCs, sendo que alguns pares, como o X, 4 e o 14, se mostraram altamente frágeis. Além disso, os cromossomos X, 4, 7, 14, 16 e 21 apresentaram SFCs na região pericentromérica. Tais dados sugerem que a fragilidade apresentada por esses cromossomos em uma região próxima ao centrômero, pode estar facilitando a ocorrência quebras e fusões entre cromossomos pelo centrômero, sendo esse tipo de rearranjo conhecido como translocação Robertsoniana. Esse pressuposto pode ser sustentado pelos dados descritos por Denison et al. (2002), que relataram a ocorrência de translocações Robertsonianas em pontos próximos de SFCs induzidos pela afidicolina em humanos.

Por fim, é provável que as translocações Robertsonianas da espécie *M. gouazoubira* estejam ocorrendo em pontos específicos do genoma, conhecidos como SFCs. A identificação e localização dos SFCs de *M. gouazoubira* representa um avanço nos estudos para compreender o modo em que ocorreu a evolução cromossômica nos cervídeos. A partir desses resultados, são sugeridos novos estudos para identificar quais desses SFCs apresentam pontos de quebras evolutivos, que seriam conservados e reutilizados durante a evolução cromossômica das espécies do gênero *Mazama*, contribuindo de forma fundamental com o processo de especiação.

CONCLUSÃO

Os resultados permitiram construir um mapa dos SFCs de *M. gouazoubira* e desenvolver uma ferramenta capaz de inferir se os SFCs estão relacionados com os pontos de quebras responsáveis pelo polimorfismo cromossômico apresentado pela espécie. Com isso, pode-se concluir que os SFCs localizados nos cromossomos que estão envolvidos nas translocações Robertsonianas podem estar facilitando a ocorrência desses rearranjos. As altas frequências de SFCs observadas em determinados cromossomos sugere que eles sejam mais frágeis do que quando comparado com os outros pares cromossômicos.

Esse trabalho é o ponto de partida para entender a relação entre os SFCs dessa espécie com a evolução cariotípica e o processo de especiação que ocorreu entre as espécies do gênero *Mazama*. Acredita-se que a evolução cromossômica dos cervídeos ocorreu por meio de complexos rearranjos cromossômicos a partir do cariótipo ancestral e hipotético da família Cervidae, o qual foi conservado na espécie *M. gouazoubira* (NEITZEL, 1987; FONTANA; RUBINI, 1990). Considerando a teoria de Ruiz-Herrera, Castresana e Robinson (2006) sobre a conservação dos pontos de quebras evolutivos que são reutilizados durante a evolução dos mamíferos, é provável que o *M. gouazoubira* tenha retido os pontos de quebras evolutivos junto com a conservação do cariótipo ancestral dos cervídeos.

REFERÊNCIAS

CROCKER, J.; BURNETT, D. **The science of laboratory diagnosis**. John Wiley & Sons Ltda, West Sussex, 2. ed., p. 564, 2005.

DEBATISSE, M.; EL-ACHKAR, E.; DUTRILLAUX, B. Common Fragile Sites Nested at the Interfaces of Early and Late-Replicating Chromosome Bands. **Cell Cycle**, Georgetown, v. 6, p. 578-581, 2006.

DEKABAN, A. Persisting Clone of Cells With an Abnormal Chromosome in a Woman Previously Irradiated. **Journal of Nuclear Medicine**, Reston, v. 6, p. 740-746, 1965.

DENISON, S. R.; MULTANI, A. S.; PATHAK, S.; GREENBAUM, I. F. Fragility in the 14q21q translocation region. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 25, p. 271-276, 2002.

DUARTE, J. M. B. **Aspectos taxonômicos e citogenéticos de algumas espécies de cervídeos brasileiros**. 1992. 153p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento Animal) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 1992.

DUARTE, J. M. B. Análise taxonômica dos *Mazama* cinzas do Brasil. 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 “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, 1998.

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

GALLOWAY, S. M.; AARDEMA, M. J.; ISHIDATE, M. JR.; IVETT, J. L.; KIRKLAND, D. J.; MORITA, T.; MOSESSO, P.; SOFUNI, T. Report from working group on *in vitro* tests for chromosomal aberrations. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 312, p. 241-261, 1994.

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

PEVZNER, P.; TESLER, G. Human and mouse genomic sequences reveal extensive breakpoint reuse in mammalian evolution. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 100, p. 7672-7677, 2003.

RUIZ-HERRERA, A.; PONSÁ, M.; GARCÍA, F.; EGOZCUE, J.; GARCÍA, M. Fragile sites in human and *Macaca fascicularis* chromosomes are breakpoints in chromosome evolution. **Chromosome Research**, Oxford, v. 10, p. 33-44, 2002.

RUIZ-HERRERA, A.; GARCÍA, F.; FRÖNICKE, L.; PONSÁ, M.; EGOZCUE, J.; CALDÉS, M. G.; STANYON, R. Conservation of aphidicolin-induced fragile sites in Papionini (Primates) species and humans. **Chromosome Research**, Oxford, v. 12, p. 683-690, 2004.

RUIZ-HERRERA, A.; GARCÍA, F.; GIULOTTO, E.; ATTOLINI, C.; EGOZCUE, F.; PONSÁ, M.; GARCÍA, M. Evolutionary breakpoints are co-localized with fragile sites and intrachromosomal telomeric sequences in primates. **Cytogenetic and Genome Research**, Würzburg, v. 108, p. 234-247, 2005.

RUIZ-HERRERA, A.; CASTRESANA, J.; ROBINSON, T. Is mammalian chromosomal evolution driven by regions of genome fragility? **Genome Biology**, London, v. 7, p. R115.1-16, 2006.

SEABRIGHT, A. T. A rapid banding technique for human chromosomes**. The Lancet**, London, v. 2, p. 971-972, 1971.

SPADARI, S.; SALA F.; PEDRALI-NOY, G. Aphidicolin: a specific inhibitor of nuclear DNA replication in eukaryotes. **Trends in Biochemical Sciences**, Berlin, v. 7, p. 29-32, 1982.

SUTHERLAND, G. R. Fragile sites on human chromosomes: demonstration of their dependence on the type of tissue culture medium. **Science**, Washington, v. 197, p. 265-266, 1977.

SUTHERLAND, G. R. Heritable Fragile Sites on Human Chromosomes I. Factors Affecting Expression in Lymphocyte Culture. **The American Journal of Human Genetics**, Houston, v. 31, p. 125-135, 1979.

SUTHERLAND, G. R. The role of nucleotides in human fragile sites expression. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 200, p. 2007-213, 1988.

TAKAHASHI, C. S. Testes citogenéticos *in vitro* e aneuploidia. *In*: RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. **Mutagênese Ambiental**, Canoas: ULBRA, p. 151-172, 2003.

VARGAS-MUNAR, D. S. F.; SARRIA-PEREA, J. A.; DUARTE, J. M. B. Different responses to doxorubicin-induced chromosome aberrations in Brazilian deer species. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 9, p. 1545-1549, 2010.

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

WATANABE, Y.; MAEKAWA, M. R/G-band boundaries: Genomic instability and human disease. **Clinica Chimica Acta**, Netherlands, v. 419, p. 108-112, 2013.

CAPÍTULO 5 – CONCLUSÕES GERAIS E SUAS IMPLICAÇÕES

O presente trabalho gerou resultados importantes para o estudo do polimorfismo cariotípico de *M. gouazoubira*. Por meio da utilização de diferentes técnicas citogenéticas foi possível fazer as seguintes inferências:

- Além da presença de cromossomos B e das translocações Robertsonianas, foi observado polimorfismo cromossômico em relação a variação numérica inter e intraindividual de cromossomos B, e aos cromossomos envolvidos nas translocações;

- Foram encontrados sete tipos de translocações Robertsonianas compostas por nove cromossomos; sendo que alguns cromossomos compõem mais de um tipo de translocação;

- Os cromossomos B da população brasileira de *M. gouazoubira* são altamente heterogêneos, sendo encontrada variabilidade numérica inter e intraindividual, nos padrões de cromatina, presença e quantidade de rDNA, localização das sequências teloméricas e homologias com os cromossomos do lote A;

-A existência de, pelo menos, dois tipos de cromossomo B no veado-catingueiro, sugere que esses diferentes cromossomos tiveram origens distintas;

- Além dos cromossomos B não serem eliminados, eles são transmitidos ao longo das gerações, indicando que talvez possam conferir alguma vantagem adaptativa;

- Foi feito um mapeamento dos SFCs da espécie *M. gouazoubira*, permitindo relacioná-los com o polimorfismo cromossômico apresentado pela espécie;

- Dos nove cromossomos envolvidos nas translocações Robertsonianas, sete apresentaram SFCs, sendo que determinados cromossomos exibiram altas taxas de SFCs;

- Os cromossomos X, 4, 7, 14, 16 e 21 apresentaram SFCs na região pericentromérica, indicando que provavelmente as fusões que ocorrem pelo centrômero nas translocações Robertsonianas são facilitadas pela fragilidade dessas regiões.

Por fim, esse trabalho mostrou que parte do polimorfismo cromossômico do veado-catingueiro está relacionado com seus cromossomos frágeis, uma vez que as altas taxas de SFCs encontradas podem explicar os frequentes rearranjos observados. A fragilidade cromossômica apresentada pelo *M. gouazoubira* permite supor que seu cariótipo seja um ponto de partida para a emergência de novas espécies, sendo que possivelmente esses rearranjos irão ocorrer e, se forem fixados, surgirá uma nova espécie. Dessa forma, essa variedade de cariótipos encontrada, muitas vezes em uma mesma população, pode causar um isolamento reprodutivo por incompatibilidade cromossômica, o que implicaria em um processo de especiação.

APÊNDICE A

Tabela 1. Identificação, sexo, número diploide (2n), quantidade de cromossomos B e origem dos animais da espécie *M. gouazoubira* amostrados.

Identificação	Sexo	2n	Cromossomo B	Origem
T013	F	70	0-3	Poconé - MT
T014	M	70	-	Rosário Oeste - MT
T015	F	70	-	Tangará da Serra - MT
T017	F	70	1-3	Desconhecida
T026	F	70	-	Rio Branco - AC
T042	M	70	0-1	Maranhão
T047	F	70	0-2	Faina - GO
T048	F	70	-	Aracruz - ES
T061	M	70	-	São Roque - SP
T063	F	70	-	Contenda - PR
T065	F	70	-	Cativeiro - Zoológico Curitiba
T066	F	70	0-3	Cativeiro - Zoológico Curitiba
T067	M	70	-	Cativeiro - Zoológico Curitiba
T068	F	70	0-3	Cativeiro - Zoológico Curitiba
T069	M	70	-	Rio Branco do Sul - PR
T073	F	70	-	Turvo - SC
T074	F	70	-	Gramado - RS
T075	M	70	-	Gramado - RS
T076	F	70	-	Gramado - RS
T077	M	70	-	Alegrete - RS
T078	M	70	-	Desconhecida
T079	M	70	-	Santo Antônio da Patrulha - RS
T080	F	70	-	São Francisco de Paula - RS
T082	M	70	0-2	Camobi - RS
T083	F	69	-	Júlio de Castilho - RS
T091	F	70	-	Candiota - RS
T092	F	69	0-3	Candiota - RS
T093	M	69	0-1	Candiota - RS
T094	F	69	0-1	Noroeste do Rio Grande do Sul
T095	M	70	-	Noroeste do Rio Grande do Sul
T096	F	70		Engenho Grande - RS
T100	M	70	-	Lages - SC

T101	F	70	-	Palmas - PR
T111	M	70	-	Jundiaí - SP
T112	M	69	0-2	Bebedouro - SP
T113	F	70	-	Pitangueiras - SP
T114	M	70	-	Ribeirão Preto - SP
T115	M	70	-	Goiás Velho - GO
T116	F	70	-	Uruaçu - GO
T117	M	70	0-3	Tocantins
T118	M	70	-	Goiânia - GO
T119	F	70	-	Goiânia - GO
T121	F	70	0-1	Desconhecida
T125	M	70	-	Ceilândia – DF
T126	M	69	0-1	Brasília – DF
T127	F	70	0-2	Desconhecida
T128	M	70	0-1	Fazenda Alegria – MS
T129	F	70	-	Luís Antônio – SP
T130	F	70	0-1	Funilândia – MG
T131	F	70	0-3	Divinópolis – MG
T132	M	70	-	Curvelo – MG
T133	M	69	-	Curvelo – MG
T134	M	70	-	Juazeiro – BA
T135	F	70	-	Petrolina – PE
T136	M	70	-	Desconhecida
T137	M	70	-	Fortaleza – CE
T138	F	70	-	Mossoró – RN
T139	M	70	-	Mossoró – RN
T140	M	70	-	Mossoró – RN
T141	M	70	0-1	João Pessoa – PB
T142	M	70	0-1	Desconhecida
T143	F	69	-	Campina Grande – PB
T144	M	70	-	Paraíba
T145	F	70	0-3	Paraíba
T146	M	68	-	Chapada Diamantina – BA
T147	F	70	-	Boa Vista do Tupim – BA
T152	F	70	0-1	Barrinha – SP
T153	F	70	-	Sorocaba – SP
T154	M	70	-	Jundiaí – SP
T155	M	70	0-1	Fazenda Alegria – MS

T156	F	69	0-1	Fazenda Alegria – MS
T157	M	70	0-1	Fazenda Alegria – MS
T159	F	70	0-1	Guaxupé – MG
T168	M	70	-	São Carlos – SP
T169	M	70	-	Jundiaí – SP
T170	F	70	0-2	Desconhecida
T171	F	70	-	Desconhecida
T173	M	70	-	Desconhecida
T174	M	70	-	Sorocaba – SP
T175	M	70	0-1	Desconhecida
T176	M	70	-	Sorocaba – SP
T177	M	69	0-1	Tatuí – SP
T178	M	70	-	Piedade – SP
T180	F	70	-	Fazenda Alegria – MS
T181	M	70	-	Fazenda Alegria – MS
T182	M	70	-	Fazenda Alegria – MS
T191	M	69	0-2	Mangueirinha – PR
T193	F	70	0-2	Serra da Mesa – GO
T194	M	70	0-3	Serra da Mesa – GO
T195	F	70	0-1	Serra da Mesa – GO
T196	M	70	0-1	Serra da Mesa – GO
T209	M	69	0-1	Parque Estadual Intervales
T214	F	70	-	Parque Estadual Intervales
T273	F	69	-	Descalvado – SP
T277	M	70	0-2	Araguaína - TO
T278	F	70	0-3	Araguaína - TO
T294	M	70	0-3	Fazenda Nhumirim - MS
T298	M	70	-	Fazenda Nhumirim - MS
T299	F	70	-	Fazenda Nhumirim - MS
T300	M	69	0-2	Fazenda Nhumirim - MS
T301	F	69	-	Fazenda Nhumirim - MS
T302	M	69	0-2	Fazenda Nhumirim - MS
T303	F	70	0-1	Fazenda Nhumirim - MS
T306	M	70	0-1	Desconhecida
T307	M	69	0-3	Fazenda Nhumirim - MS
T313	M	70	-	Fazenda Nhumirim - MS
T314	F	70	0-1	Fazenda Nhumirim - MS
T315	F	70	-	Fazenda Nhumirim - MS

T316	M	70	-	Fazenda Nhumirim - MS
T317	F	70	-	Fazenda Nhumirim - MS
T318	M	70	0-2	Fazenda Nhumirim - MS
T319	M	70	0-2	Fazenda Nhumirim - MS
T320	M	70	-	Fazenda Nhumirim - MS
T323	M	70	0-1	Guariba - SP
T331	M	70	0-3	Goiânia - GO
T341	F	69	0-2	Desconhecida
T347b	M	70	0-1	Santa Rosa do Viterbo - SP
T348	F	69	0-3	Promissão - SP
T352	F	70	0-1	Paraná
T354	F	70	0-2	Fortaleza - CE
T355	M	70	-	Grande Sertão Veredas - MG
Mgo01	F	70	-	Desconhecida
Mgo02	F	70	0-1	Região de Franca - SP
Mgo03	F	69	0-1	Desconhecida
Mgo04	F	70	0-1	Região de Ribeirão Preto - SP
Mgo05	F	70	0-1	Luís Antônio – SP
Mgo06	F	70	-	Santa Rosa do Viterbo - SP
Mgo08	F	70	-	Zoológico de Piracicaba - SP
Mgo09	F	70	-	Zoológico de Guaíra - SP
Mgo10	F	70	0-1	Zoológico de Ilha Solteira - SP
Mgo11	M	70	0-2	Zoológico de Piracicaba - SP
Mgo12	F	70	-	Zoológico de Piracicaba - SP
CatFap01	M	70	0-2	Cativeiro – NUPECCE - SP
CatFap02	M	70	0-2	Cativeiro – NUPECCE - SP
CatFap07	M	70	0-1	Cativeiro – NUPECCE - SP

APÊNDICE B

Cultivos de fibroblastos

Amostras de pele com aproximadamente 1 cm² foram excisadas da face interna da coxa após tricotomia e assepsia da área com álcool 70%. O material colhido foi armazenado em criotubo com solução McCoy's contendo alta concentração de antibiótico e mantido a 4°C até a chegada ao laboratório. No laboratório o fragmento de pele foi dividido em cinco partes e imerso em meio crioprotetor (composto por soro inativado equino com 10% de glicerol ou meio composto por 73,75% de meio McCoy's, 20% de soro equino inativado, 6,25% de DMSO, 100 mg mL^{-1} de PVP e 0,1 mg de penicilina), mantido por quatro horas a 4°C, trinta minutos no vapor do nitrogênio líquido e mergulhado em nitrogênio líquido (DUARTE et al., 1999). Para o cultivo de fibroblastos, o processo de descongelamento foi feito em banho-maria (37°C) até que o meio de congelamento voltasse ao estado líquido. O fragmento foi então lavado três vezes com solução salina tamponada com fosfato (PBS) em placas de Petri descartáveis. O material foi divulsionado mecanicamente em uma placa de Petri descartável contendo 1 mL de meio de cultivo DMEM (Meio Essencial Mínimo Modificado de Dulbeco - Cutilab) e 1 mL de soro fetal bovino (SFB – Cultilab), depois foi transferido para os frascos de cultivo T25 contendo 3,0 mL de meio DMEM suplementado com SFB a 50%, 50 mg L^{-1} de Sulfato de Gentamicina e 2 mg L^{-1} de Anfotericina B. Os frascos foram levados para estufa a 5% CO_2 e 37°C por 48 horas sem qualquer movimento (VERMA; BABU, 1995). A cultura primária foi monitorada diariamente e o meio foi trocado a cada 48 horas até a formação de uma monocamada de células no fundo do frasco. Depois de formada a monocamada, um dia antes da colheita foi feita a tripsinização. Uma hora antes da colheita, foram adicionados 60 µL de colchicina (0,016%) em cada frasco e eles foram incubados a 37°C por trinta minutos. Após a incubação foi realizada a tripsinização para que as células se desprendessem dos frascos. O conteúdo do frasco foi transferido para um tubo de centrífuga cônico, centrifugado por seis minutos a 167,6 g e o sobrenadante descartado. Após o descarte do sobrenadante, os sedimentos foram ressuspendidos em 8 mL de solução hipotônica KCl 0,067M e incubados a 37°C por vinte minutos. Após a incubação foi feita a pré-

fixação adicionando três gotas de fixador (solução de metanol e ácido acético 3:1), e então os materiais foram centrifugados por seis minutos a 241,4 g e os sobrenadantes descartados. Os sedimentos foram ressuspendidos em três ocasiões com solução fixadora.

Cultivos de linfócitos

Foram colhidas amostras de sangue por meio da contenção física e química (aplicação manual ou do lançamento de dardos por zarabatana da associação anestésica 7 mg/kg de Cloridrato de ketamina e 1 mg/kg de cloridrato de xilazina). O sangue foi colhido da veia jugular, as amostras foram estocadas em geladeira à 4°C e o processamento destas amostras se deu num prazo máximo de 24 horas. No cultivo de linfócitos, as amostras de sangue heparinizadas foram centrifugadas a 241,4 g por 6 minutos. O anel leucocitário foi colhido com pipeta Pasteur e 0,400 mL deste depositado em 3,150 mL de DMEM enriquecido com 0,855 mL de SFB e 0,600 mL de fitohemaglutinina P. As culturas ficaram incubadas por 72 horas a 37°C e uma hora antes da colheita foram adicionados 0,300 mL de colchicina 0,0016 % em cada frasco, que foram novamente incubados a 37°C por trinta minutos (MOORHEAD et al., 1960). Depois, as culturas foram retiradas da estufa e depositadas em tubos de fundo cônico e centrifugadas por seis minutos a 241,4 g, sendo o sobrenadante descartado. Após o descarte do sobrenadante, os sedimentos foram ressuspendidos em 8 mL de solução hipotônica KCl 0,067M e incubados a 37°C por vinte minutos. Após a incubação foi feita a pré-fixação adicionando três gotas de fixador, e então os materiais foram centrifugados por seis minutos a 241,4 g e os sobrenadantes descartados. Os sedimentos foram ressuspendidos em três ocasiões com solução fixadora.

Coloração convencional (Giemsa)

As preparações cromossômicas obtidas nos cultivos de linfócitos e de fibroblastos foram gotejadas em lâminas e submetidas à coloração convencional utilizando o corante Giemsa (0,5 mL de solução corante Giemsa + 4,5 mL de solução tampão fosfato 0,06M) por aproximadamente 8 minutos.

REFERÊNCIAS

DUARTE, J. M. B.; RAMALHO, M. F. P. T.; LIMA, V. F. H.; JORGE, W. A leukocyte cryopreservation technique for cytogenetic studies. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 22, p. 399-400, 1999.

MOORHEAD, R. S.; NOWELL, P. C.; MELINAN, W. J.; BATTIPS, D. M.; HUNGERFORD, A. Chromosome preparations of leucocytes culture from human peripheral blood. **Experimental Cell Research***,* New York, v. 20, p.13, 1960.

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

APÊNDICE C

1 – Construção das sondas teloméricas

As sondas teloméricas foram construídas utilizando-se os iniciadores 1 $(TTAGGG)_5$ e 2 $(CCCTAA)_5$, sendo que a amplificação e marcação foram feitas por PCR (IJDO et al., 1991). Amplificação - reagentes utilizados na PCR (volume final 100µL):

- 2µl do iniciador 1 (1000ng/µL); 2µl do iniciador 2 (1000ng/µL); 10µL de tampão 10x para PCR; 2µl de dATP (2mM); 2µl de dCTP (2mM);2µl de dGTP (2mM); 2µl de dTTP (2mM); 3µl de Mg2Cl 50mM; 2µl de Taq Polimerase; 73µl de água ultrapura.

Marcação - reagentes utilizados na PCR (volume final 100µL):

- 2µl do iniciador 1 (1000ng/µL); 2µl do iniciador 2 (1000ng/µL); 10µL de tampão 10x para PCR; 2µl de dATP (2mM); 2µl de dCTP (2mM);2µl de dGTP (2mM); 1µl de dTTP (2mM);1µl de dUTP digoxigenina-11-dUTP (1mM); 3µl de Mg_2Cl 50mM; 2µl de Taq Polimerase; 4µl do produto da amplificação; 69µl de água ultrapura.

A programação das reações de amplificação e marcação está descrita na Tabela 1. Após a PCR, foi preparado um gel de agarose 2% para verificação do tamanho dos fragmentos, utilizando um marcador de 50 pb, sendo esperado um arraste entre 100-600 pb.

Tabela 1. Reação de PCR utilizada para amplificação e marcação das sondas teloméricas

Temperatura	Tempo	Ciclos
94 ºC	1 min	
55 ºC	30 seg	20 ciclos
72 ºC	1 min	
94 ºC	1 min	
60 ºC	30 seg	10 ciclos
72 ºC	1 min e 30 seg	
4 ºC	-	-

Para a construção das sondas teloméricas não é necessário utilizar DNA molde, pois os iniciadores utilizados são complementares entre si (Figura 1).

Além disso, esses iniciadores possuem sequências repetitivas, permitindo o anelamento em posições diferentes (MARTINS; VICARI, 2012).

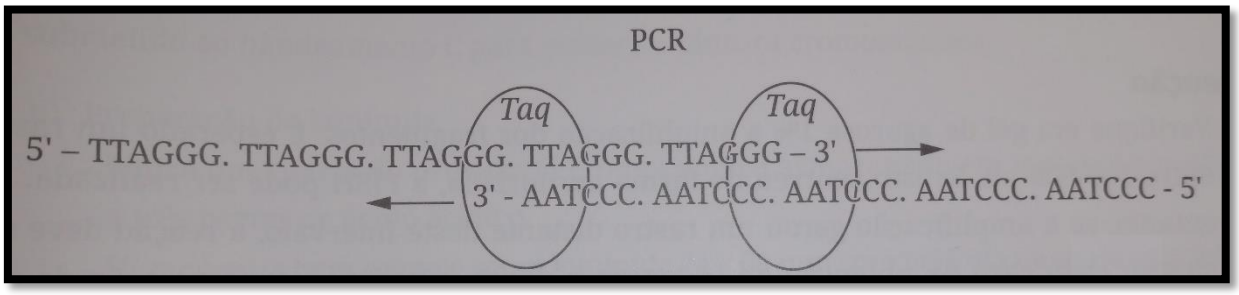

Figura 1. Iniciadores teloméricos 1 $(TTAGGG)_5$ e 2 $(CCCTAA)_5$ complementares entre si sem necessidade da utilização de DNA molde (MARTINS; VICARI, 2012; com adaptações).

2 – Construção das sondas de rDNA 5S

Para a construção das sequências de rDNA 5S foram utilizados os iniciadores 5Sf (5'-TACGCCCGATCTCGTCCGATC-3') e 5Sr (5'-CAGGCTGGTATGGCCGTAAGC-3'), e o DNA total do *M. gouazoubira*. Os iniciadores utilizados amplificam o gene de rDNA 5S, que possui várias repetições em tandem, sendo que cada repetição é composta por um gene rRNA 5S e uma região espaçadora não transcricional (NTS). Os iniciadores 5Sf e 5Sr foram desenhados a partir da sequência do rDNA 5S da espécie *Salmo gardnerii* (KOMIYA; TAKEMURA, 1979) e amplificados por PCR de acordo com Pendás et al. (1994). Reagentes utilizados na PCR e reação realizada para amplificação e marcação (Tabela 2) (MARTINS; VICARI, 2012):

Amplificação (volume final 25µL):

- 1,5µl de5Sf (10µM); 1,5µl de5Sr (10µM); 1,0µL de DNA genômico do *M. gouazoubira* (100ng); 2,5µl de tampão 10x para PCR; 1,5µl de dATP (2mM); 1,5µl de dCTP (2mM);1,5µl de dGTP (2mM); 1,5µl de dTTP (2mM); 0,75µl de Mg_2Cl 50mM; 0,75µl de Taq Polimerase; 11µl de água ultrapura.

Marcação (volume final 25µL):

- 1,5µl de5Sf (10µM); 1,5µl de5Sr (10µM); 2,5µL de tampão 10x para PCR; 1,5µl de dATP (2mM); 1,5µl de dCTP (2mM);1,5µl de dGTP (2mM); 0,75µl de dTTP (2mM);0,75µl de dUTP digoxigenina-11-dUTP (1mM); 0,75µl de Mg_2Cl 50mM;

0,75µl de Taq Polimerase; 1,5µl do produto da amplificação; 10,5µl de água ultrapura.

Tabela 2. Reação de PCR utilizada para amplificação e marcação das sondas de rDNA 5S

Temperatura	Tempo	Ciclos
94 ºC	5 min	
95 ºC	1min	
63 ºC	30 seg	35
72 ºC	1 min	
72 ºC	7min	
4 ºC	-	-

Após a PCR, foi preparado um gel de agarose 2% para verificação do tamanho dos fragmentos, utilizando um marcador de 50 pb, sendo esperados fragmentos com aproximadamente 400 pb.

3 – Construção das sondas de rDNA 18S

Para a obter as sequências de rDNA 18S foram utilizados os iniciadores 18Sf (5'-CCGCTTTGGTGACTCTTGAT-3') e 18Sr (5'-CCGAGGACCTCACTAAACCA-3'), e o DNA total do *M. gouazoubira*. Os iniciadores 18Sf e 18Sr, responsáveis por amplificar um fragmento de DNA responsável por transcrever o rRNA 18S, foram desenhados a partir de sequências genômicas da espécie *Ictalurus punctatus* (GROSS et al., 2010). Os reagentes utilizados na PCR e reação realizada para amplificação e marcação, estão descritos abaixo (Tabela 3) (MARTINS; VICARI, 2012):

Amplificação (volume final 25µL):

- 1,5µl de18Sf (10µM); 1,5µl de18Sr (10µM); 1,0µL de DNA genômico do *M. gouazoubira* (100ng); 2,5µl de tampão 10x para PCR; 1,5µl de dATP (2mM); 1,5µl de dCTP (2mM);1,5µl de dGTP (2mM); 1,5µl de dTTP (2mM); 0,75µl de Mg_2Cl 50mM; 0,75µl de Taq Polimerase; 11µl de água ultrapura.

Marcação (volume final 25µL):

- 1,5µl de18Sf (10µM); 1,5µl de18Sr (10µM); 2,5µL de tampão 10x para PCR; 1,5µl de dATP (2mM); 1,5µl de dCTP (2mM);1,5µl de dGTP (2mM); 0,75µl de dTTP (2mM);0,75µl de dUTP digoxigenina-11-dUTP (1mM); 0,75µl de Mg_2Cl 50mM;

0,75µl de Taq Polimerase; 1,5µl do produto da amplificação; 10,5µl de água ultrapura.

Tabela 3. Reação de PCR utilizada para amplificação e marcação das sondas de rDNA 18S

Temperatura	Tempo	Ciclos
95 ºC	5 min	
95 ºC	40 seg	
55 ºC	40 seg	30
72 ºC	2 min	
72 ºC	5min	
4 ºC	-	-

Os produtos da PCR foram conferidos em gel de agarose 1% utilizando um marcador de 1.000 pb, sendo esperados fragmentos com aproximadamente 1.400 pb.

REFERÊNCIAS

GROSS, M. C.; SCHNEIDER, C. H.; VALENTE, G. T.; MARTINS, C.; FELDBERG, E. Variability of 18S rDNA locus among *Symphysodon* fishes: chromosomal rearrangements. **Journal of Fish Biology**, Scotland, v. 76, p. 1117-1127, 2010.

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

KOMIYA, H.; TAKEMURA, S. Nucleotide sequence of 5s ribosomal RNA from rainbow trout (*Salmo gairdnerii*) liver. **Journal of Biochemistry**, Oxford, v 86, 1067-1080, 1979.

MARTINS, C.; VICARI, M. R. Hibridização *in situ* em Cromossomos de Peixes. In: GUERRA, M. (Ed.). **Citogenética Molecular: Protocolos Comentados**. Ribeirão Preto: SBG, 2012. cap. 4, p. 59-87.

PENDAS, A. M.; MORAN, P.; FREIJE, J. P.; GARCIA-VASQUEZ, E. Chromosomal mapping and nucleotide sequence of two tandem repeats of Atlantic salmon *5s* rDNA. **Cytogenetics and Cell Genetics**, Basel, v. 67, p. 31-36, 1994.