

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA
FILHO”**

**FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**IDENTIFICAÇÃO DOS CROMOSSOMOS DE *Mazama
gouazoubira* (ARTIODACTYLA; CERVIDAE) ENVOLVIDOS
EM REARRANJOS INDUZIDOS PELA DOXORRUBICINA**

**Iara Maluf Tomazella
Bióloga**

2012

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA
FILHO”**

**FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**IDENTIFICAÇÃO DOS CROMOSSOMOS DE *Mazama
gouazoubira* (ARTIODACTYLA; CERVIDAE) ENVOLVIDOS
EM REARRANJOS INDUZIDOS PELA DOXORRUBICINA**

Iara Maluf Tomazella

Orientador: Prof. Dr. José Maurício Barbanti Duarte

Coorientadora: Dra. Vanessa Veltrini Abril

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

2012

Tomazella, Iara Maluf
T655i Identificação dos cromossomos de *Mazama gouazoubira*
(ARTIODACTYLA; CERVIDAE) envolvidos em rearranjos induzidos
pela doxorubicina / Iara Maluf Tomazella. – Jaboticabal, 2012
x, 58 f. : il. ; 29 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2012
Orientador: José Maurício Barbanti Duarte
Banca examinadora: Raquel Alves dos Santos, Marcelo de Bello
Cioffi

Bibliografia

1. *Mazama gouazoubira*. 2. Aberrações cromossômicas. 3.
Evolução cromossômica. 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

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 Mutagenese e Citogenética da Universidade de Franca, no período de março de 2007 a dezembro de 2009. Recebeu bolsa de Iniciação Científica da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP - 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.

*“... A vida é trabalho construtivo
no cotidiano efêmero,
visando aprendizado da alma eterna.
E a alma sabe no fundo
que sua morada é distante,
um longo e difícil caminho.
Toda conquista não se faz por si só, é
necessário para tanto
ter vontade e objetivo.
Para os despertos do caminho,
o sonho só realiza-se
para quem tem os pés no chão.
Somente é possível
para quem sabe unir
a mística da fé e
a sensatez da razão.”*

GILBERTO BRANDÃO MARCON

Dedico

*Aos meus pais,
Fábio e Martha, e a minha irmã
Carla, por todo o apoio, incentivo,
amor, por estarem presentes em todos
os momentos e serem tudo de mais
importante na minha vida.*

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. José Maurício Barbanti Duarte, pela oportunidade, confiança, ensinamentos sobre ciência, ética e conservação e pela contribuição para minha formação.

À Prof. Dra. Vanessa Veltrini Abril, pela indispensável ajuda, ensinamento, conselhos, paciência e amizade. Sem a sua ajuda teria sido mais complicado, obrigada por tudo que você fez por mim durante a execução deste trabalho.

Aos técnicos de laboratório João Ailton Bôer e Paulo Antônio Tosta, pela ajuda laboratorial e convivência.

Às Professoras Dra. Catarina Satie Takahashi e Dra. Elza Tiemi Sakamoto Hojo, pela contribuição na parte da mutagênese e pela atenção dispensada.

À equipe que ajudou inúmeras vezes na contenção dos animais, em especial à médica veterinária Ellen de Fátima Carvalho Peroni e ao Beterraba.

A todos os integrantes do NUPECCE, pelos momentos alegres, convívio diário, trabalho em equipe e por terem me recebido tão bem quando entrei no grupo.

Às ex-companheiras de apartamento Mayhara, Gessi e Josi, por terem me acolhido assim que cheguei em Jaboticabal, pelos momentos felizes e pelas longas conversas.

A minha família inteira, pelo amor, carinho, união, companheirismo e por me mostrarem o real valor de uma família. Em especial, agradeço a tia Santina, pelo apoio e incentivo.

Ao Fernando e as minhas eternas amigas (ãic) Livia, Ariani, Mariana, Ana, Nathália, Fabiana e Carla, pelo carinho, amor e por estarem comigo em todos os momentos, trazendo sempre muita alegria.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa de Mestrado.

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.

SUMÁRIO

	PÁG.
RESUMO.....	iii
ABSTRACT.....	iv
LISTA DE ABREVIATURAS.....	v
I. INTRODUÇÃO.....	01
II. REVISÃO DE LITERATURA.....	03
Família Cervidae.....	03
Evolução Cromossômica dos Cervídeos.....	06
Espécie <i>Mazama gouazoubira</i> (Fischer, 1814).....	10
Citogenética da Espécie <i>Mazama gouazoubira</i>	12
Agentes Mutagênicos e Doxorrubicina.....	15
Fragilidade Cromossômica e Aberrações Cromossômicas.....	16
Classificação e Formação das Aberrações Cromossômicas.....	17
Bandamento G.....	21
III. MATERIAL E MÉTODOS.....	22
Animais.....	22
Acesso às Amostras.....	22
Cultivo Celular e Delineamento Experimental.....	22
Bandamento G.....	23
Análise e Captura das Imagens.....	23
Análise do Índice Mitótico.....	23
Análise das Aberrações Cromossômicas por Coloração Convencional (Giemsa)....	24
Identificação Cromossômica por Bandamento G.....	24
Localização das Regiões Cromossômicas por Bandamento G.....	25
IV. RESULTADOS.....	25
Seleção dos Animais.....	25
Análise do Índice Mitótico.....	25
Análise das Aberrações Cromossômicas por Coloração Convencional (Giemsa)....	26
Identificação Cromossômica por Bandamento G.....	34

Localização das Regiões Cromossômicas por Bandamento G.....	37
V. DISCUSSÃO.....	43
VI. CONCLUSÕES.....	48
VII. REFERÊNCIAS.....	48

IDENTIFICAÇÃO DOS CROMOSSOMOS DE *Mazama gouazoubira* (ARTIODACTYLA; CERVIDAE) ENVOLVIDOS EM REARRANJOS INDUZIDOS PELA DOXORRUBICINA

RESUMO – O processo de evolução cariotípica dos cervídeos a partir de um ancestral comum e hipotético, que possuía cariótipo com número diplóide e fundamental igual a 70, foi marcado por complexos rearranjos cromossômicos. Este cariótipo foi retido e pode ser encontrado na espécie Neotropical *Mazama gouazoubira*, que apresenta variação cromossômica e esta por sua vez, pode ser explicada pela fragilidade cromossômica. Este trabalho teve como finalidade identificar os cromossomos portadores de aberrações cromossômicas induzidas pela doxorubicina, e localizar as regiões de quebras desses cromossomos. Foram analisados citogeneticamente 6 animais por meio da coloração convencional para a identificação e quantificação de 9 diferentes tipos de aberrações cromossômicas (anel, dicêntrico, gap cromatídico, gap cromossômico, quebra cromatídica, quebra cromossômica, forma trirradial, forma quadrirradial e rearranjo) e pelo bandamento G para a identificação precisa dos cromossomos portadores das aberrações e localização das regiões de quebras desses cromossomos. Os pares cromossômicos 1, 2, 4, 5, 6, 7, 15, 16 e o cromossomo sexual X apresentaram aberrações cromossômicas em todos os animais analisados. Entre os cromossomos que apresentaram aberrações cromossômicas, as regiões em que estas se concentraram com maior frequência foram as regiões mediana e distal em relação ao centrômero. Tais dados sugerem que estas regiões dos cromossomos podem estar mais suscetíveis à fragilidade cromossômica e conseqüentemente, poderiam estar envolvidas com a diferenciação cariotípica das espécies.

Palavras-chave: Aberrações cromossômicas, bandamento G, evolução cromossômica, veado-catingueiro

***Mazama gouazoubira* (ARTIODACTYLA; CERVIDAE) CHROMOSOMES IDENTIFICATION INVOLVED IN DOXORUBICIN-INDUCED REARRANGEMENTS**

ABSTRACT - The process of karyotype evolution of deer from a hypothetical common ancestor with diploid and fundamental numbers equal to 70 was characterized by complex chromosomal rearrangements. This ancestral karyotype was retained and it is considered to be standard for the current Neotropical species, *Mazama gouazoubira*. Several animals of this species, analyzed in different studies, showed karyotype variation that can be explained by chromosomal fragility. This study aimed to identify the chromosomes carrying doxorubicin-induced aberrations and to locate the regions of chromosome breaks (proximal, middle or distal). Six animals were analyzed by conventional staining for the identification and quantification of nine different types of chromosomal aberrations (ring, dicentric, chromatid gap, chromosomal gap, chromatid break, chromosomal break, triradials form, quadriradials form and rearrangements) and by G-banding for the precise identification of the chromosomes that carry aberrations and the regions where the breaks occur. The 1, 2, 4, 5, 6, 7, 15 and 16 chromosome pairs and the X sex chromosome showed chromosomal aberrations in all analyzed animals. Among all chromosomes that presented chromosomal aberrations, most of them were located in the middle and distal regions. These data suggest that the middle and distal regions of the chromosome may be more susceptible to chromosomal fragility and, consequently, could be involved in the karyotype differentiation of *Mazama* species.

Key-words: Brown Brocket Deer, chromosomal aberrations; chromosome evolution, G-banding

LISTA DE ABREVIATURAS

2n = número diplóide

AC = aberrações cromossômicas

A = cromossomo na forma de anel

Dic = cromossomo dicêntrico

DNA = ácido desoxirribonucléico

DMEM = Meio essencial mínimo modificado de Dulbecco

DP = desvio padrão

DXR = doxorubicina

F1 = fêmea 1

F2 = fêmea 2

F3 = fêmea 3

Fq = forma quadrirradial

Ft = forma trirradial

Gcr = gap cromossômico

Gct = gap cromatídico

ICZN = International Commission on Zoological Nomenclature

IM = índice mitótico

IUCN = International Union for Conservation of Nature

M1 = macho 1

M2 = macho 2

M3 = macho 3

NF = número fundamental

NUPECCE = Núcleo de Pesquisa e Conservação de Cervídeos

Qcr = quebra cromossômica

Qct = quebra cromatídica

Re = rearranjo

RON = região organizadora do nucléolo

I. INTRODUÇÃO

Entre os mamíferos, a família Cervidae é marcada por uma extrema diversificação cariotípica, na qual se observa espécies com altos números diplóides, como *Hydropotes inermis* com $2n=70$, e espécies com número diplóide baixo como *Muntiacus muntjak vaginalis*, que possui apenas 6 cromossomos nas fêmeas e 7 nos machos (FONTANA e RUBINI, 1990). Foi sugerido que o cariótipo ancestral hipotético dos cervídeos possuía número diplóide e fundamental igual a 70, o qual foi retido e pode ser encontrado em duas espécies atuais, o *Mazama gouazoubira* e o *H. inermis* (NEITZEL, 1987).

Entre as espécies do gênero *Mazama*, apesar da semelhança morfológica, há uma ampla variação do número diplóide, que pode ser entendida por meio da análise da evolução cromossômica ocorrida no gênero, que teve as inversões pericêntricas, as fusões em tandem e as fusões Robertsonianas como rearranjos responsáveis por este processo evolutivo (FONTANA e RUBINI, 1990). A facilidade de ocorrência desses rearranjos pode ser facilmente evidenciada pela observação de várias fusões Robertsonianas em *M. gouazoubira* (DUARTE e MERINO, 1997).

A variação cariotípica do gênero *Mazama* pode ser explicada pela teoria da fragilidade cromossômica proposta por Duarte e Jorge (1996) e corroborada por Vargas-Munar (2010), que prediz que os cromossomos desse gênero são mais instáveis do que os cromossomos da espécie *Blastocerus dichotomus*. Além disso, foi observado que das 3 espécies de *Mazama* analisadas (*M. americana*, *M. gouazoubira* e *M. nana*), *M. gouazoubira* apresentou as mais altas frequências de aberrações cromossômicas (AC) induzidas pela doxorubicina (DXR) (VARGAS-MUNAR, 2010).

A DXR ou adriamicina é um quimioterápico que tem sido usado por mais de 30 anos no tratamento de vários tipos de câncer. Esta substância da família das antraciclinas é obtida pela bactéria *Streptomyces peucetius* e é conhecida por causar inibição da topoisomerase II (APLAN et al., 1996; SINGAL e ILISKOVIC, 1998; QUILES et al., 2002). Foi descrito por Coquelle e colaboradores (1997) que a DXR é um poderoso agente clastogênico, ou seja, que causa múltiplas quebras cromossômicas distribuídas ao acaso.

Devido à variedade de ambientes ocupados pelo *M. gouazoubira*, ocorreram importantes modificações morfológicas e genéticas nos indivíduos dessa espécie. Há muito

tempo, pesquisadores tentam explicar os mecanismos de evolução cromossômica, a fim de entender a dinâmica da organização do genoma dos mamíferos. A citogenética tem sido um meio muito promissor para estudos evolutivos, uma vez que ela pode auxiliar na elucidação dos mecanismos envolvidos na especiação cromossômica (NADEAU e TAYLOR, 1984; PINDER e LEEUWENBERG, 1997; ALMEIDA et al., 2001; MARTINEZ et al., 2011).

Como a espécie *M. gouazoubira* reteve o cariótipo ancestral, o qual originou os cariótipos das outras espécies de cervídeos, e apresentou elevadas taxas de AC quando suas células foram submetidas à DXR, ela foi escolhida como objeto de estudo. A DXR foi utilizada, pois além de ser um poderoso indutor de AC, este agente mutagênico já foi identificado anteriormente na literatura como sendo eficaz em causar quebras em cromossomos de cervídeos, bem como a concentração adequada para ser usada nessa espécie, sem causar citotoxicidade. Frente a isso, a identificação dos cromossomos portadores de altas taxas de aberrações cromossômicas poderia indicar quais cromossomos estariam envolvidos nas alterações cariotípicas que ocorreram ao longo da especiação dos cervídeos.

Assim, o presente trabalho teve como objetivos identificar os cromossomos portadores de AC e localizar as regiões de quebras induzidas pela DXR nos cromossomos de *M. gouazoubira*, analisando a frequência e os diferentes tipos de quebras que ocorreram em cada cromossomo.

II. REVISÃO DE LITERATURA

Família Cervidae

A família Cervidae, pertencente à ordem Artiodactyla e à subordem Ruminantia, teve uma rápida radiação adaptativa durante o Pleistoceno na América do Sul, ocupando diversos nichos ecológicos (DUARTE e MERINO, 1997).

Provavelmente, os representantes mais antigos da família Cervidae habitaram a Eurásia, como por exemplo, o *Dicrocerus*, que viveu neste local na época do Mioceno. A literatura indica que os cervídeos evoluíram de pequenos animais onívoros desprovidos de chifres até animais herbívoros de grande porte com galhadas ramificadas (EISENBERG, 1987; VISLOBOKOVA, 1990). Os cervídeos machos possuíam longos caninos, os quais eram usados para disputar as fêmeas com outros machos, sendo que atualmente esses longos dentes podem ser encontrados somente na espécie *H. inermis* (EISENBERG, 1987; MERINO et al., 2010)

Os cervídeos são ruminantes que apresentam quatro dedos em cada extremidade, recobertos por cascos, sendo que apenas dois deles se apóiam no solo. Em quase todas as espécies os machos apresentam chifres, que são estruturas ósseas que se desenvolvem a partir de processos permanentes do osso frontal, recobertos pela pele, denominados pedúnculos. Os chifres de algumas espécies são ramificados, como no *B. dichotomus*, enquanto em outras não se ramificam, como nas espécies do gênero *Mazama* (DUARTE e MERINO, 1997).

Os cervídeos são artiodáctilos que possuem amplo número de espécies, ficando atrás apenas da família Bovidae (GROVES, 2007). Atualmente estão descritos 17 gêneros e 52 espécies de cervídeos, as quais podem ser encontradas na Europa, América, Ásia e norte da África, além das regiões ocupadas por esses animais devido à introdução humana (NOWAK, 1991; WALKER, 1991; GRUBB, 2005). De acordo com Geist (1998), o fato de esses animais habitarem diversos tipos de ambientes e terem passado por várias radiações adaptativas pode estar ligado com a diversidade de espécies apresentada pela família em questão.

Esta família é dividida em duas subfamílias: a Capreolinae e a Cervinae. Na subfamília Cervinae são encontradas as tribos Muntiacini e Cervini. Já a subfamília

Capreolinae é composta pelas tribos Rangiferini, Capreolini e Alceini. Na tribo Rangiferini estão os gêneros *Hippocamelus*, *Pudu*, *Rangifer*, *Odocoileus*, *Blastocerus*, *Ozotoceros* e *Mazama*, sendo que os quatro últimos podem ser encontrados no território Brasileiro (ABRIL et al., 2010).

Os gêneros *Blastocerus* e *Ozotoceros* são monoespecíficos, representados pelas espécies *B. dichotomus* (cervo-do-pantanal) e *O. bezoarticus* (veado-campeiro), respectivamente. *O. virginianus* e *O. hemionus* são as espécies representantes do gênero *Odocoileus*. No gênero *Mazama*, atualmente, são descritas dez espécies: *M. rufina*, *M. pandora*, *M. chunyi*, *M. temama*, *M. bricenii*, *M. americana*, *M. gouazoubira*, *M. nana*, *M. nemorivaga* e *M. bororo* (DUARTE e GONZÁLEZ, 2010). No Brasil são reconhecidas cinco destas: *M. nana* ($2n=36$ a 40 ; $NF=56$ a 60), *M. gouazoubira* ($2n=70$; $NF=70$), *M. nemorivaga* ($2n=68$; $NF=70$), *M. bororo* ($2n=32$ a 34 ; $NF=46$) e *M. americana* ($2n=48$ a 53 ; $NF=46$ a 57), tendo como base aspectos morfológicos e citogenéticos (Figura 1) (FONTANA e RUBINI, 1990; DUARTE e MERINO, 1997; WEMMER, 1998; DUARTE e JORGE, 2003; DUARTE, 2007; ABRIL et al., 2010).

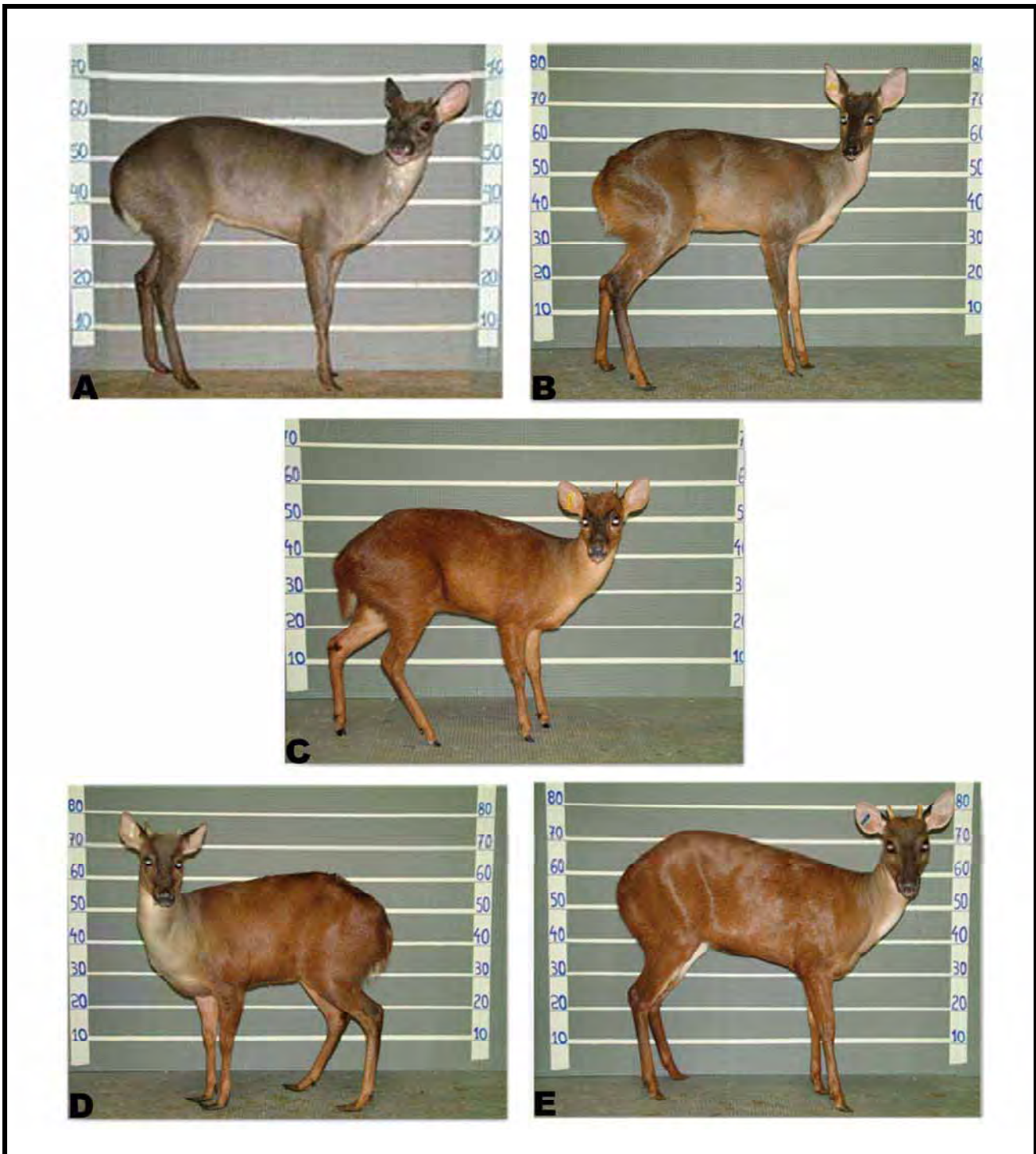


Figura 1 – Espécies do gênero *Mazama* encontradas no Brasil. (A) *Mazama nemorivaga* (veado roxo, $2n=68$; $NF=70$). (B) *Mazama gouazoubira* (veado catingueiro, $2n=70$; $NF=70$). (C) *Mazama nana* (veado mão-curta, $2n=36$ a 40 ; $NF=56$ a 60). (D) *Mazama bororo* (veado bororó de São Paulo, $2n=32$ a 34 ; $NF=46$). (E) *Mazama americana* (veado-mateiro, $2n=48$ a 53 ; $NF=46$ a 57). FOTOS: DUARTE, J.M.B.

Evolução cromossômica dos cervídeos

Abril et al. (2010) afirmaram que a evolução cromossômica dos cervídeos seguiu padrões distintos entre as diferentes subfamílias da família Cervidae.

De acordo com Bogenberger e colaboradores (1987) a família Cervidae ocupa uma posição especial em relação à variação cariotípica dentro dos mamíferos, pois apresenta uma extrema diversificação cromossômica, com números diplóides que variam de $2n=6/7$ no *Muntiacus muntjac* até $2n=80$ no *Capreolus pygargus* (NEITZEL, 1987).

Em 1987 foi proposto por Neitzel que o número diplóide e fundamental do ancestral comum hipotético dos cervídeos seria igual a 70. Este cariótipo seria composto por 68 cromossomos autossômicos acrocêntricos, o cromossomo X acrocêntrico e o Y metacêntrico (Figura 2) (NEITZEL, 1987; FONTANA e RUBINI, 1990). O número fundamental de braços cromossômicos (NF) é determinado considerando os cromossomos metacêntricos e submetacêntricos como tendo 2 braços e os cromossomos acrocêntricos e telocêntricos como tendo apenas 1 braço (PARIS CONFERENCE, 1971).

Tal cariótipo foi mantido e pode ser visualizado em duas espécies de cervídeos atuais pertencentes a diferentes subfamílias que são distantes filogeneticamente, o *M. gouazoubira* (cervídeo Neotropical da tribo Rangiferini) e o *H. inermis* (espécie asiática pertencente à tribo Capreolini). Os cariótipos de tais espécies não podem ser diferenciados tendo como base a morfologia cromossômica, números cromossômicos e padrões de banda G, C e Ag-RON (NEITZEL, 1987). Acredita-se que os cromossomos das outras espécies de cervídeos evoluíram a partir do cariótipo ancestral $2n=70$ (BOGENBERGER et al., 1987).

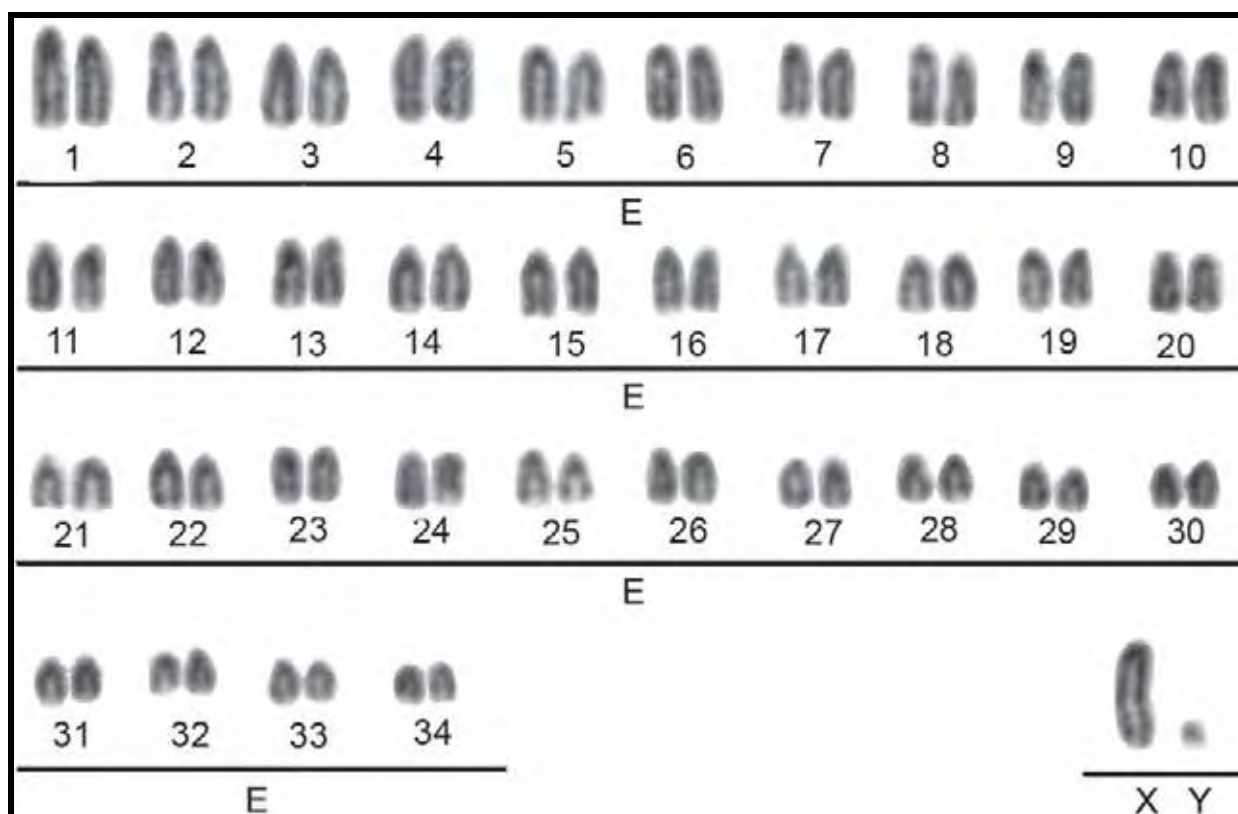


Figura 2 – Cariótipo padrão, com $2n=70$ e $NF=70$, de um macho da espécie *Mazama gouazoubira* corado com Giemsa. FONTE: ABRIL et al., 2010.

Com base na história da evolução cariotípica dos cervídeos, as espécies *M. gouazoubira* e *H. inermis* se separaram muito cedo na escala evolutiva e acumularam altos níveis de divergências anatômicas, além de terem retido o cariótipo ancestral por mais de 25 milhões de anos (NEITZEL, 1987).

A tribo Rangiferini, especialmente a subfamília Capreolinae, apresenta uma surpreendente complexidade cariotípica entre os gêneros e entre as espécies do mesmo gênero. Em 1990, Fontana e Rubini construíram um cladograma para tentar entender as relações filogenéticas das espécies da tribo Rangiferini por meio da evolução cariotípica (Figura 3). O cladograma se divide em dois ramos principais, sendo que de um lado estão as espécies do gênero *Mazama* e do outro o grupo principal *Odocoileus* (*O. virginianus borealis*, *O. hemionus*, *P. puda*, *A. americana*, *H. bisulcus*). Analisando-se o cladograma é possível perceber que as espécies de *Mazama* passaram por complexos rearranjos interespecíficos, como fusões em tandem, fusões Robertsonianas e inversões pericêntricas.

Já a diferenciação das espécies do grupo principal *Odocoileus* se deu por um menor número de mudanças cromossômicas durante o processo evolutivo.

A fusão Robertsoniana, também conhecida como fusão cêntrica ou translocação recíproca, é a variação cromossômica estrutural mais frequentemente encontrada em estudos citogenéticos. Essa variação consiste na troca recíproca de braços cromossômicos derivados da quebra pericentromérica de dois cromossomos acrocêntricos não homólogos, resultando em um cromossomo com dois braços e um pequeno fragmento. A fusão em tandem é um mecanismo de evolução cariotípica que tem sido reportada em várias espécies de mamíferos e pode ser classificada em: fusões centrômero-telômero, que ocorrem entre dois cromossomos acrocêntricos ou entre um acrocêntrico e um cromossomo de dois braços; e fusões telômero-telômero, que podem ocorrer entre dois cromossomos acrocêntricos ou entre um cromossomo de dois braços com o telômero de qualquer cromossomo. As inversões ocorrem quando um cromossomo é lesionado em dois pontos diferentes e se reorganiza de forma invertida. Se o segmento invertido ocorrer no mesmo braço cromossômico, não envolvendo o centrômero, a inversão é paracêntrica. Se o segmento invertido envolver os dois braços cromossômicos ao redor do centrômero, a inversão é pericêntrica, a qual pode ser detectada, com certa frequência, entre indivíduos de uma mesma espécie (GUERRA, 1988; ROBINSON e ELDER, 1993).

De acordo com Gilbert e colaboradores (2006), investigações moleculares tem ajudado muito na delimitação de clados dentro da família Cervidae e na compreensão da evolução de caracteres morfológicos. Já o estudo do perfil cariotípico desta família traz informações importantes sobre a evolução, devido à existência de uma ampla variação cromossômica interespecífica e intraespecífica, causada tanto pela presença de rearranjos no complemento A, como pela presença de cromossomos B ou supernumerários (DUARTE e JORGE, 1996).

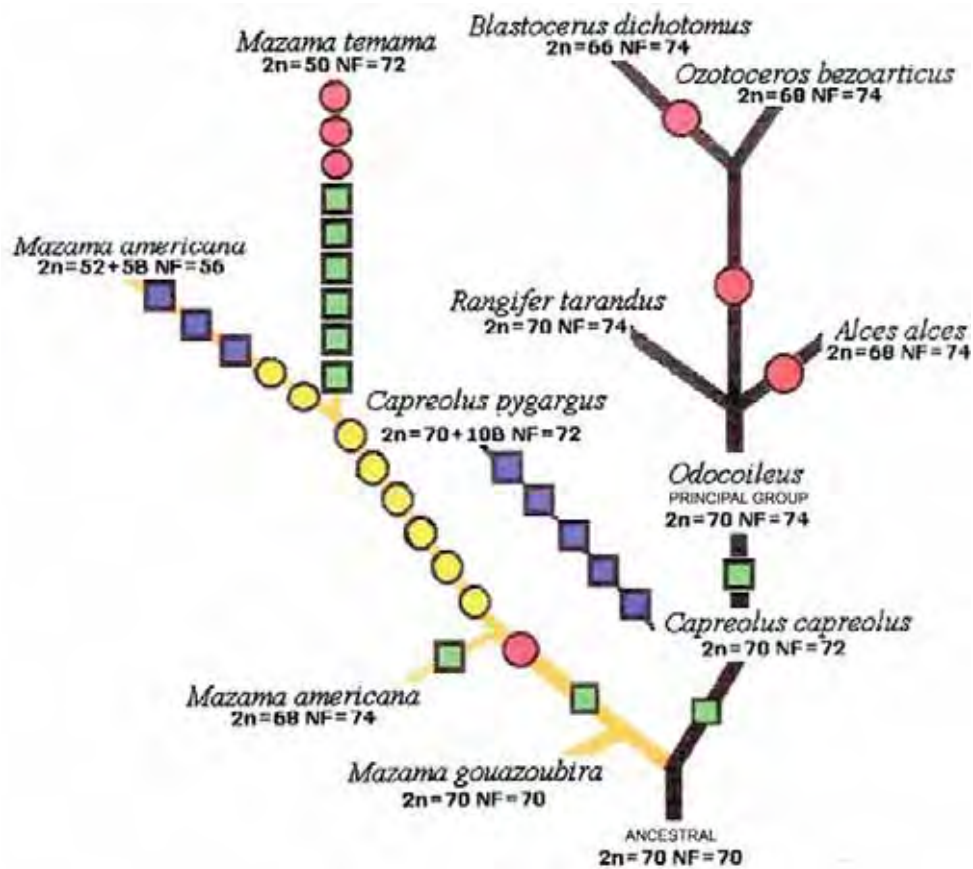


Figura 3 – Relações filogenéticas e evolução cariotípica da subfamília Capreolinae. Os quadrados verdes representam as inversões pericêntricas; os círculos vermelhos, as fusões Robertsonianas; os círculos amarelos, as fusões em tandem; os quadrados azuis, os cromossomos B; $2n$ é o número diplóide; NF é o número fundamental. No grupo principal *Odocoileus* estão as espécies *O. virginianus*, *O. borealis*, *O. hemionus*, *P. puda*, *A. americana* e *H. bisulcus*. FONTE: FONTANA e RUBINI, 1990, com adaptações.

A evolução cromossômica ocorrida nos cervídeos asiáticos do gênero *Muntiacus*, que são similares morfológicamente, exemplifica o padrão complexo da variação cromossômica apresentada pelas espécies da família Cervidae. Acredita-se que o cervídeo indiano *M. muntjak vaginalis*, que apresenta $2n=6$ nas fêmeas e $2n=7$ nos machos, tenha derivado do cervídeo chinês *M. reevesi*, com $2n=46$, por meio de complexos rearranjos, como as fusões em tandem e as fusões centroméricas (HSU et al., 1975; YANG et al., 1997). Em 1975, foi proposta a hipótese que os enormes cromossomos do *M. muntjak* resultaram dos complexos rearranjos dos pequenos cromossomos acrocêntricos da espécie *M. reevesi* (HSU et al., 1975). A hipótese da evolução cromossômica desses cervídeos asiáticos foi confirmada por

estudos citogenéticos comparativos, principalmente aqueles que usaram a pintura cromossômica como método de análise (YANG et al., 1995; YANG et al., 1997).

Para tentar explicar a história evolutiva dos *Mazama* foram levantadas duas hipóteses. Uma delas sugere que o gênero *Mazama* se desenvolveu independente da linhagem que gerou as espécies da subfamília Capreolinae, mas a espécie *M. gouazoubira* conservou o cariótipo ancestral enquanto a espécie *M. americana* fixou independentemente a inversão pericêntrica do X e outros rearranjos. Já a segunda hipótese argumenta que o gênero *Mazama* separou-se dos outros Odocoileinae depois que a inversão pericêntrica do X foi fixada, enquanto que *M. gouazoubira* reverteu esse rearranjo cromossômico (FONTANA e RUBINI, 1990).

Os cariótipos das espécies do gênero *Mazama* parecem ter surgido por meio de complexos rearranjos que ocorreram nas linhagens originadas a partir do ancestral com $2n=70$ e $NF=70$, como a inversão pericêntrica do cromossomo X, translocação de um autossomo com o X, translocações Robertsonianas e várias translocações em tandem (NEITZEL, 1987). Polimorfismos cromossômicos, que são as diferenças existentes entre os cariótipos de espécies diferentes ou entre indivíduos da mesma espécie, são derivados de rearranjos cromossômicos que ocorreram em ancestrais comuns (ALMEIDA et al., 2001).

Espécie *Mazama gouazoubira* (Fischer, 1814)

Também conhecido popularmente no Brasil como veado-catingueiro, veado-virá, veado cinza, entre outros nomes, esta espécie foi descrita pela primeira vez em 1801 por Azara, levando o nome de Gouazoubira. Fischer, em 1814, seguindo a descrição feita por Azara determinou o nome *Cervus gouazoupira*. Em 1999, Gardner propôs a ICZN (International Commission on Zoological Nomenclature) que fosse mantido o nome *Mazama gouazoubira* ao invés de *Mazama gouazoupira*. Desde então o nome correto da espécie é *M. gouazoubira* (ICZN, 2001; BLACK-DÉCIMA et al., 2010).

O veado-catingueiro possui pequeno a médio porte, seu peso varia de 11 a 25 kg e a altura média é de 50 cm na cernelha. Em relação à coloração da pelagem, pode ser observada uma grande variação morfológica externa. Geralmente, os animais que habitam as savanas possuem coloração amarronzada, os que vivem nas florestas são acinzentados e os que ocupam ambientes áridos possuem pelagem mais clara do que aqueles que

habitam ambientes mais úmidos e fechados. 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 uma pinta branca acima dos olhos, que pode ser vista na maioria dos indivíduos (PINDER e LEEUWENBERG, 1997).

Sendo um ruminante de pequeno porte, o veado-catingueiro necessita de uma dieta composta por alimentos ricos em proteínas, como as folhas, brotos, flores e frutos; porém, a preferência alimentar da espécie é pelos frutos. Este cervídeo possui hábito de vida solitário, encontrando-se com animais do sexo oposto apenas no período de acasalamento (PINDER e LEEUWENBERG, 1997).

Esses animais habitam lugares que vão desde florestas pluviais densas contínuas até savanas abertas com poucas e pequenas manchas de mata, estando sempre dependente das florestas para se alimentar e abrigar. Devido à grande plasticidade ecológica, esta espécie se adapta facilmente a terras tomadas pela agricultura (PINDER e LEEUWENBERG, 1997). Foi relatado por Black-Décima e colaboradores (2010) que esses animais são frequentemente encontrados em diversos tipos de plantações, como na cana-de-açúcar, nos eucaliptos, nas florestas de pinus e em qualquer outro tipo de plantação que tenha um remanescente de floresta ao redor.

Essa espécie pode ser observada no leste seco das pré-regiões dos Andes da Argentina e da Bolívia, estendendo-se a oeste na costa do Atlântico; seu limite, ao norte, é o sul da Amazônia e ao sul, inclui as regiões que vão do Uruguai até a província de Entre Rios, na Argentina. No Brasil, 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 4) (PINDER e LEEUWENBERG, 1997; DUARTE e JORGE, 1998; ROSSI, 2000).

Segundo dados publicados pela IUCN em 2008, esta espécie é classificada como sendo pouco preocupante (*Least Concern*). Em virtude de sua ampla distribuição e de sua ocorrência em áreas de proteção, esta espécie presume ter grandes populações que não aparentam correr riscos de um declínio populacional suficiente para ser categorizada, no presente momento, como uma espécie ameaçada. Porém, estudos recentes indicaram que as populações que estão em contato com o homem estão em declínio (IUCN, 2008).

Citogenética da espécie *Mazama gouazoubira*

A primeira análise citogenética da espécie *M. gouazoubira* foi realizada através de material coletado de uma fêmea, sendo determinado o número diplóide e fundamental da espécie igual a 70 (NEITZEL, 1979). Em 1987, Neitzel avaliou um macho da espécie, estabelecendo que o cromossomo X é o maior do lote, enquanto o Y é o menor. Este estudo também determinou os padrões de banda C, que marca grandes porções de heterocromatina centromérica e de banda G (Figura 5).

Porém, em 1992, Duarte encontrou indivíduos que apresentavam $2n=69$ e cromossomos B e, dos 35 animais estudados, 20% mostraram algum tipo de translocação. Além disso, este trabalho descreveu os padrões de coloração Ag-NOR da espécie, indicando que as regiões organizadoras de nucléolo se localizam na região telomérica dos pares cromossômicos 1 e 2.

Em outro estudo, foram analisados 14 animais dessa espécie, sendo que destes, 12 possuíam $2n=70$ (sendo todos os cromossomos acrocêntricos), 2 apresentaram $2n=69$ e em 3 animais foram encontrados de 1 a 3 cromossomos B. A redução do número diplóide de 70 para 69 foi causada pela ocorrência de uma fusão Robertsoniana (DUARTE e JORGE, 1996).



Figura 4 – Área de distribuição da espécie *Mazama gouazoubira*. FONTE: International Union for Conservation of Nature, 2008, com adaptações.

Ampliando-se a amostragem para 81 indivíduos de *M. gouazoubira*, Duarte e Jorge (1998) verificaram que entre os animais amostrados, 16% apresentaram 1 fusão Robertsoniana ($2n=69$), 3,7% continham 2 fusões Robertsonianas ($2n=68$) e 23,4% eram portadores de 1 a 3 cromossomos B. Nenhum dos cromossomos envolvidos nos rearranjos foram detectados, devido a dificuldade de obtenção de banda G. Este estudo revelou que a espécie estudada apresenta fragilidade cariotípica e que essas variações encontradas (rearranjos cromossômicos e presença dos cromossomos B) são comuns para a espécie (DUARTE e JORGE, 1998).

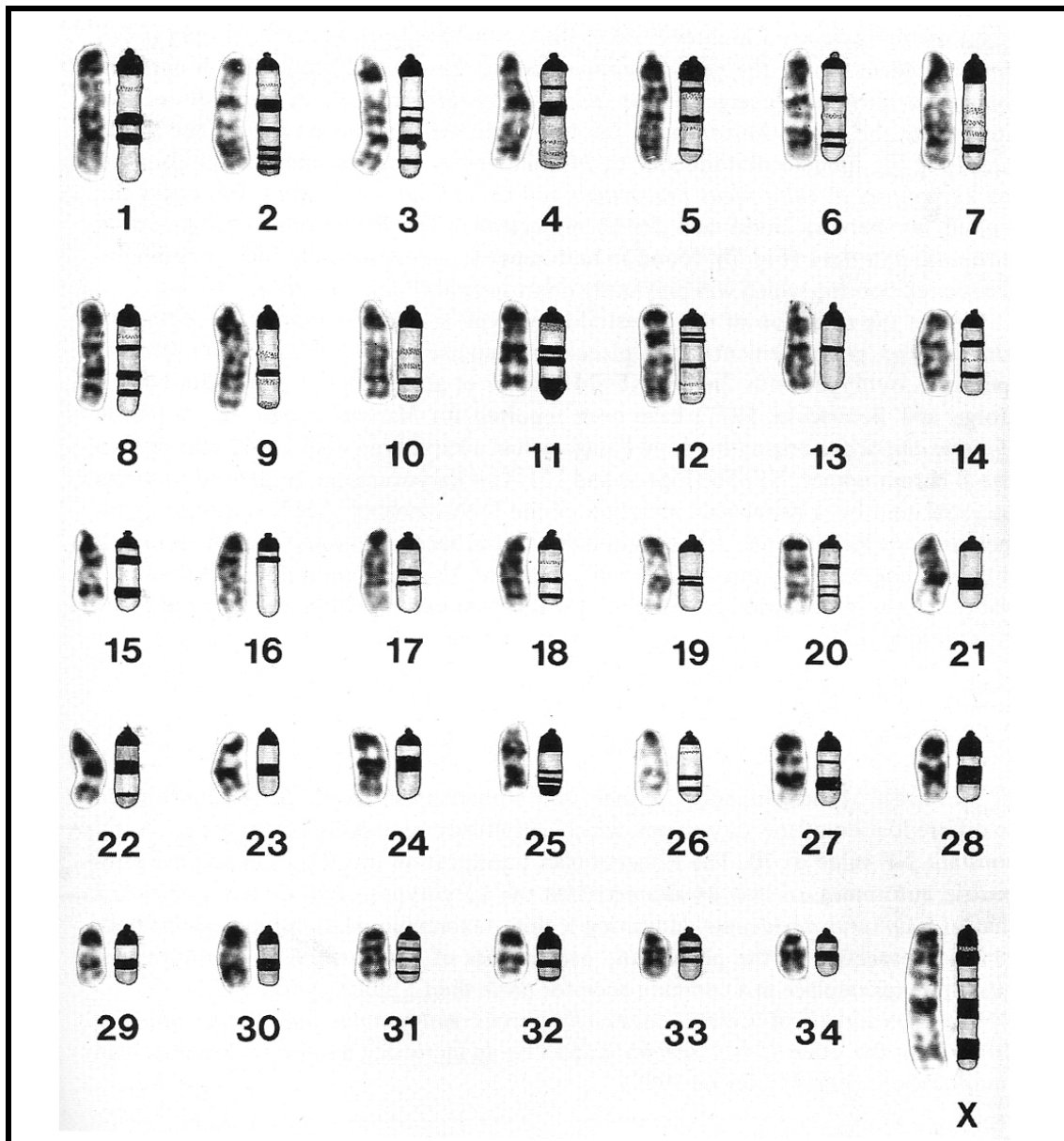


Figura 5 – Comparação entre o padrão de banda G e o ideograma do cariótipo hipotético que foi retido na espécie *Mazama gouazoubira* com $2n=70$ e $NF=70$. FONTE: NEITZEL, 1987.

Devido ao padrão de rearranjos cromossômicos dos cervídeos bem como a presença de cromossomos B, foi sugerido que os cromossomos B podem ser derivados de fragmentos cromossômicos cêntricos originados de quebras cromossômicas. Foi observado que os cromossomos B são pequenos e inconstantes nas metáfases de um mesmo indivíduo (DUARTE e JORGE, 1996; DUARTE e JORGE, 1998).

O estudo citogenético de espécies selvagens, como os cervídeos, é difícil de ser realizado especialmente pela dificuldade de se obter indivíduos para serem amostrados. Como na maioria das vezes apenas um ou poucos indivíduos de uma espécie são usados para inferir o padrão citogenético de toda a espécie, no caso dos cervídeos, devido à intensa variação inter e intra-específica, a descrição cariotípica é dificultada pela necessidade de uma amostragem ampliada (DUARTE, 1992).

Agentes mutagênicos e Doxorrubicina

Mutações genéticas são alterações ocorridas no DNA que podem afetar todos os seres vivos no decorrer da vida. O aparecimento das mutações é um processo fundamental para a evolução e diversidade das espécies, que pode ser causado por erros durante a duplicação do DNA, na divisão celular. Na natureza, existem agentes capazes de alterar a sequência das bases no DNA, acelerando ou aumentando o aparecimento de mutações, conhecidos como agentes mutagênicos ou mutágenos (RIBEIRO e MARQUES, 2003). Estes são definidos como causadores de danos no DNA resultando em mutações de ponto, deleções e inserções, recombinações, rearranjos, bem como outros tipos de alterações cromossômicas. Dentre os agentes mutagênicos, podem ser citados os químicos, como as drogas terapêuticas; os físicos, como as radiações ionizantes; os endógenos, como os radicais livres; e os biológicos, como as infecções virais e bacterianas (SUGIMURA, 2000). Os danos no material genético causados pelos mutágenos tendem a ser reparados por enzimas de reparo, mas caso a célula se divida antes que o reparo ocorra, este dano pode levar ao aparecimento de uma alteração permanente no DNA, que é dependente da concentração e do tipo do agente mutagênico (PINTO e FELZENSZWALB, 2003).

A doxorrubicina (DXR) ou adriamicina é uma substância da família das antraciclinas empregada na quimioterapia e que pode ser utilizada como indutor de quebras cromossômicas em estudos de mutagenicidade (TAN et al., 1973; BLUM e CARTER, 1979; YOUNG et al., 1981; RESENDE et al., 2010), sendo também amplamente empregada como um agente antineoplásico. Além de produzir radicais livres altamente tóxicos, a DXR causa quebras no DNA pela inibição da topoisomerase II e da atividade da helicase, interferindo na separação da fita dupla do DNA (KITADA et al., 1994; QUILES et al., 2002; ISLAH et al., 2005). Os radicais livres reativos são considerados mediadores da toxicidade induzida pela

DXR, sendo esta caracterizada por mudanças na morfologia e função das mitocôndrias (BACHMANN et al., 1975; PORTA et al., 1983). O processo oxidativo causado pelos radicais livres induz danos ao DNA e pode ser reparado pelo sistema de reparo celular mas se não houver reparo, vão ocorrer danos oxidativos que resultarão em alguns processos patofisiológicos, tais como a mutagênese, a carcinogênese e o envelhecimento celular (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1989; DIZDAROGLU et al., 2008). Se os danos causados pela DXR ao DNA não forem reparados, eles acumularão resultando em eventos mutacionais e aberrações cromossômicas (AC), tanto nas células saudáveis quanto nas células tumorais (ISLAH et al., 2005). É possível que a mutagenicidade da DXR possa ser decorrente dos danos causados pela catalização da NADH desidrogenase bem próximo do DNA (AKMAN et al., 1992). Exemplos dos danos celulares induzidos pela DXR são miocitólise, dilatação do sistema sarcotubular e edema intracelular (SINGAL et al., 1987). Dalledonne et al. (1992) sugerem que a DXR poderia influenciar na reorganização do citoesqueleto de actina, por um simples encurtamento dos filamentos de actina.

Fragilidade cromossômica e aberração cromossômica

Duarte e Jorge (1998) apresentaram uma teoria que poderia explicar a heterogeneidade cromossômica desse gênero, que é a fragilidade cromossômica, que propiciaria a ocorrência de quebras e trocas cromossômicas. Esses novos rearranjos poderiam induzir a formação de novas espécies após um isolamento geográfico em um curto período de tempo, levando a uma especiação alopátrica e até, em alguns casos, simpátrica. Os rearranjos estruturais causados pela fragilidade cromossômica podem estar relacionados à presença de blocos pericentroméricos e bandas intersticiais de heterocromatina constitutiva nos cromossomos da maioria das espécies do gênero *Mazama*. Um estudo realizado por Vargas-Munar et al. (2010) mostrou que os cromossomos das espécies do gênero *Mazama* possuem uma tendência a fragilidade quando comparados aos de *B. dichotomus*, que possui cromossomos mais estáveis. Tal fato corroborou a teoria proposta anteriormente (DUARTE e JORGE, 1998).

Fragilidade cromossômica é basicamente definida como a tendência de um cromossomo se quebrar (GLOVER e STEIN, 1988). Alterações que ocorrem na estrutura do cromossomo resultando em quebra ou em troca de material cromossômico são chamadas

de AC, as quais podem ser induzidas por agentes mutagênicos (NATARAJAN, 1976). A quebra cromossômica, além de ser uma das anormalidades cromossômicas que causa prejuízo direto ao DNA, também é conhecida por ser a indutora de recombinação mais potente em células de mamíferos. Análises experimentais mostraram que a quebra na dupla fita de DNA é a lesão principal no processo de formação das AC (NATARAJAN e OBE, 1978; BRYANT, 1998).

As AC, a frequência de micronúcleos e as trocas entre cromátides irmãs são parâmetros citogenéticos de mutagenicidade (SWIERENGA et al., 1991; SAVAGE, 1993; ROUET et al., 1994). Estudo feito por Vargas-Munar e colaboradores (2010) mostrou que o agente mutagênico DXR é um eficiente indutor de AC em cultivos celulares de linfócitos de cervídeos.

Classificação e formação das aberrações cromossômicas

Em 1975, Savage publicou um trabalho contendo um levantamento dos tipos de AC observadas nas primeiras metáfases analisadas após o tratamento com agentes mutagênicos por meio de um microscópio de luz. O referido trabalho ajudou esclarecer os princípios das classificações e algumas características que podem ajudar na identificação e quantificação dos tipos de AC comumente utilizadas.

Foram sugeridas duas teorias para tentar explicar a formação das AC. A primeira foi proposta por Sax e é conhecida como Teoria da Quebra e Reunião. Nesta teoria, após os cromossomos serem expostos a um agente mutagênico são observadas lesões primárias, que são marcadas pela ruptura das cromátides, originando duas partes quebradas. Essas partes tem um entre três possíveis destinos: a) os fragmentos quebrados se unem novamente formando a configuração original, ou seja, há uma reconstituição; b) se ao invés de uma lesão primária ocorrerem duas e essas lesões estarem próximas uma da outra, as 4 partes originadas podem se reunir formando várias configurações diferentes; c) se os resíduos provenientes das lesões primárias não se adaptarem nos eventos acima, ficarão soltos nas metáfases constituindo quebras simples (SAX, 1938; SAX, 1940; SAX, 1941). A segunda é a Teoria da Troca, sugerida por Revell, a qual define que o dano inicial não é a quebra, mas sim uma lesão instável (primeiro evento de dano) que tende a decair para um estado normal ou indetectável. Porém, se essas lesões acontecerem em pares, pode ocorrer

à formação de AC. Algumas quebras observadas nas metáfases são oriundas de eventos de trocas que falharam (REVELL, 1959). A via de reparo do DNA conhecida como recombinação homóloga pode causar danos ao DNA, sendo que estes danos surgem da mesma forma como pode ser observado na Teoria da Troca (O'DRISCOLL e JEGGO, 2006).

As AC podem ser categorizadas como sendo do tipo cromatídica, na qual apenas uma cromátide é afetada em uma determinada localização, indicando que esta região estava se duplicando no momento da exposição ao agente mutagênico; ou do tipo cromossômica, onde as mudanças estruturais induzidas afetam as duas cromátides na mesma localização (SAVAGE, 1975).

As trocas são definidas como a permuta entre as partes dos cromossomos após a ocorrência de lesões e podem ser dos tipos intercromossômica, onde ocorre a interação de partes cromossômicas de cromossomos diferentes (homólogos ou não); ou intracromossômica, na qual há a interação de partes cromossômicas provenientes de um mesmo cromossomo (SAVAGE, 1975).

A Figura 6a representa um cromossomo na forma de anel, que é uma AC do tipo cromossômica marcada pela troca intracromossômica completa e assimétrica, na qual as cromátides se unem formando um cromossomo centríco acompanhado por um fragmento acêntrico, que é formado pelas extremidades das cromátides envolvidas na quebra (SAX, 1940; PARIS CONFERENCE, 1971).

Cromossomos dicêntricos, mostrados na Figura 6b, são aberrações do tipo cromossômicas, onde há uma troca intercromossômica assimétrica, resultando em um cromossomo com dois centrômeros acompanhado por um fragmento acêntrico simples, derivado das extremidades quebradas dos cromossomos envolvidos. Em alguns casos, os fragmentos acêntricos são perdidos, não sendo possível observá-los nas metáfases (PARIS CONFERENCE, 1971; SAVAGE, 1975).

Os “gaps” ou lesões acromáticas são pequenas regiões não coradas que podem estar distribuídas em várias posições dos braços cromossômicos. Tais regiões variam de tamanho e de intensidade, podendo também indicar um pequeno deslocamento, com encurvamento ou alongamento da região. Grandes “gaps” são facilmente confundidos com quebras, porém essas lesões acromáticas não são regiões de descontinuidade e nem produzem fragmentos acêntricos. Os “gaps” podem ser cromatídicos (Figura 6c), que são restritos a apenas uma

cromátide, ou cromossômicos (Figura 6d), que são vistos nas duas cromátides na mesma localização. A origem dos “gaps” ainda é incerta, porém há indícios de que eles podem representar quebras cromatídicas simples e incompletas; erros na condensação cromossômica ou serem cicatrizes que marcam os pontos onde ocorreram trocas (SAX, 1938; ZIRKLE et al., 1956; SAVAGE, 1975).

Na Figura 6e e 6f estão representadas as quebras, que são conhecidas como rupturas simples e podem ser do tipo cromatídica ou cromossômica, originando fragmentos acêntricos. As quebras cromatídicas são induzidas na prófase, quando os cromossomos já estão duplicados possuindo duas cromátides. As quebras cromossômicas ocorrem durante o estágio final de quando os cromossomos não estão duplicados (SAX, 1940; SAVAGE, 1975).

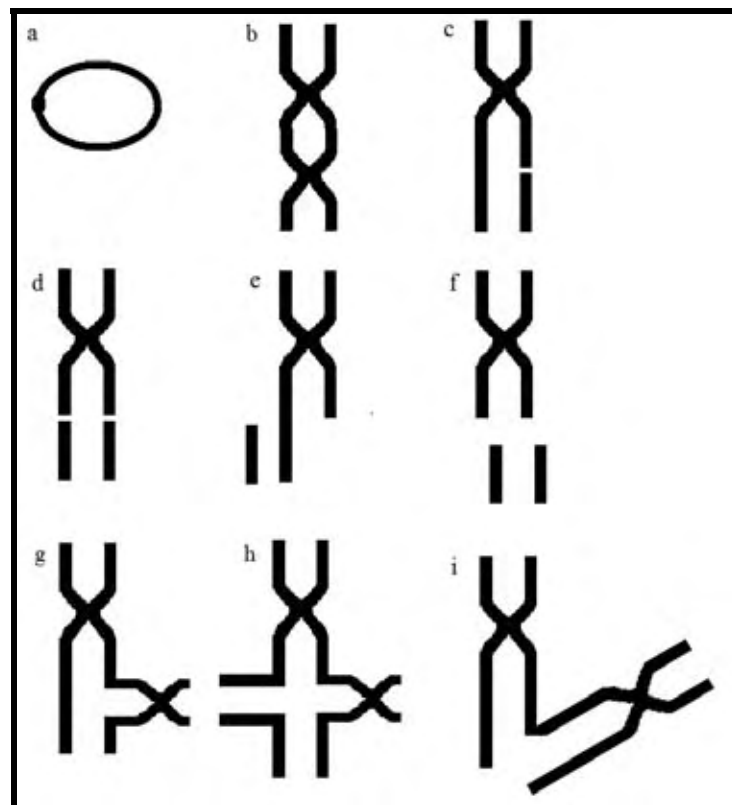


Figura 6 – Esquema com a classificação dos tipos de aberrações cromossômicas analisadas. (a) Cromossomo na forma de anel; (b) Cromossomo dicêntrico; (c) Cromossomo com gap cromatídico; (d) Cromossomo com gap cromossômico; (e) Cromossomo com quebra cromatídica; (f) Cromossomo com quebra cromossômica; (g) Cromossomo com forma trirradial; (h) Cromossomo com forma quadrirradial; (i) Cromossomo com rearranjo.

Na configuração trirradial (Figura 6g) acontecem trocas intercromossômicas e quebras isocromatídicas. É uma AC categorizada como cromatídica, com configuração de 3 braços que envolve dois cromossomos, sendo esta configuração originada pela interação de uma quebra isocromatídica com uma quebra cromatídica (SAVAGE, 1975).

A forma cromossômica quadrirradial é do tipo cromatídica caracterizada pela troca entre dois cromossomos, a qual pode ser visualizada na Figura 6h. Essa AC envolve duas ou mais lesões situadas nas cromátides de diferentes cromossomos (homólogos ou não), incidindo a troca recíproca das partes quebradas das cromátides dos cromossomos envolvidos no rearranjo. A Figura 7 mostra a representação esquemática da formação da configuração quadrirradial (GERMAN, 1964; SAVAGE, 1975).

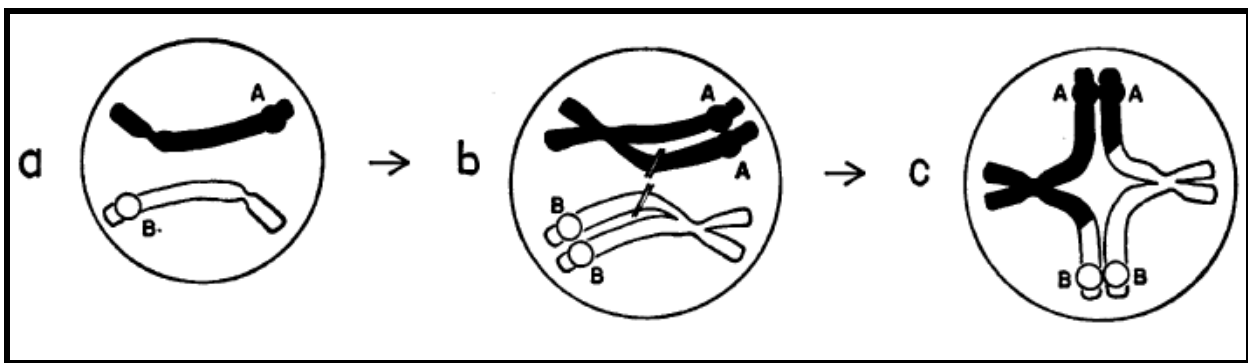


Figura 7 – Representação esquemática da formação da configuração quadrirradial. (a) dois cromossomos homólogos contendo dois alelos A e B, localizados perto dos telômeros dos braços longos; (b) depois da replicação, ocorre quebras em sítios semelhantes nas cromátides de cada cromossomo e depois uma troca intercromatídica; (c) configuração quadrirradial simétrica com centrômeros situados em braços opostos. FONTE: GERMAN, 1964, com adaptações.

A Figura 6i evidencia um rearranjo cromossômico, o qual pode ser definido como qualquer processo de alteração cromossômica que produz mudanças, sejam essas no conteúdo do DNA nuclear ou na estrutura física, levando a reordenação das sequências de DNA pré-existentes (RADMAN et al., 1982).

Bandamento G

Na genética, a década de 1970 foi marcada pela descoberta de novas técnicas conhecidas como bandamentos cromossômicos, os quais abriram novos horizontes para a pesquisa e o avanço citogenético (GUERRA, 1988; KASAHARA, 2009).

Uma das mais importantes é a Banda G, que produz padrões de bandas claras e escuras em todos os cromossomos. As bandas escuras apresentam maior conteúdo de bases A (Adenina) e T (Timina), sendo representadas pelos segmentos que reagem positivamente à técnica de banda G e que se condensam mais cedo na prófase. Já as bandas claras são representadas pelos segmentos que reagem negativamente à banda G e que condensam tardiamente na prófase. O bandamento G foi assim denominado, pois se pensava que o corante Giemsa poderia estar envolvido com o mecanismo de determinação dessas bandas (GUERRA, 1988; KASAHARA, 2009).

Esta técnica possibilita a identificação de rearranjos cromossômicos, como as deleções, duplicações, inversões e até mesmo de localizar as regiões específicas afetadas. Além disso, o bandamento G permite comparar cariótipos semelhantes de grupos de espécies muito próximas, podendo ser utilizado em estudos evolutivos. A banda G é amplamente aplicada para o pareamento correto dos homólogos, pois cada cromossomo possui um padrão distinto e bem caracterizado de bandas G (GUERRA, 1988).

Os padrões de bandas transversais claras e escuras podem ser obtidos por vários tipos de tratamentos, como a incubação das preparações cromossômicas em solução salina ou com o pré-tratamento com enzimas proteolíticas. Porém, o método mais utilizado é aquele em que os cromossomos são submetidos ao tratamento com a enzima tripsina e depois corados com o Giemsa (SEABRIGHT, 1971; KASAHARA, 2009).

Em algumas espécies de cervídeos a identificação dos cromossomos homólogos é dificultada pela morfologia e pelo número cromossômico, como por exemplo, na espécie *M. gouazoubira*, que possui 70 cromossomos acrocêntricos. Porém, a técnica de citogenética clássica conhecida como banda G auxilia não só na identificação dos pares homólogos, mas também na detecção de rearranjos que ocorreram durante a evolução cromossômica (DUARTE, 1992).

III. MATERIAL E MÉTODOS

Animais

Foram avaliados três machos e três fêmeas (F1, F2, F3, M1, M2 e M3) da espécie *M. gouazoubira*. Os animais eram mantidos em cativeiro pelo Núcleo de Pesquisa e Conservação de Cervídeos (NUPECCE), do Departamento de Zootecnia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da UNESP, Campus Jaboticabal. O presente trabalho foi avaliado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) desta unidade de Ensino (processo nº 007537/10) que certificou sua conformidade com os princípios éticos na experimentação animal, adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Acesso às amostras

Os animais foram contidos física e quimicamente por meio da aplicação manual ou por lançamento de dardos via zarabatana da associação anestésica 7 mg/kg de Cloridrato de ketamina, 1 mg/kg de cloridrato de xilazina. Após a contenção, foram colhidos 10 mL de sangue de cada indivíduo, para a realização de cultivos celulares. O sangue foi colhido da veia jugular e as amostras foram estocadas em geladeira à 4°C, logo após o procedimento. O processamento destas amostras foi realizado em laboratório num prazo máximo de 24 horas.

Cultivo celular e delineamento experimental

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 foi depositado em 3,150 mL de meio essencial mínimo modificado de Dulbecco (DMEM - Cultilab) enriquecido com 0,855 mL de soro fetal bovino (SFB – Cultilab) e 0,600 mL de fitohemaglutinina P. As culturas ficaram incubadas por 72 horas a 37,5°C e uma hora antes da colheita foram adicionados 0,300 mL de colchicina 0,0016 % (MOORHEAD et al., 1960).

Para induzir a expressão das aberrações cromossômicas, foi adicionado aos cultivos de linfócitos o Cloridrato de Doxorrubicina (Adriblastina® Pharmacia), em uma concentração de 0,25 µg/mL nas últimas 24 horas de cultivo (cultivos tratados com DXR) (ANTUNES e

TAKAHASHI, 1998). Para todos os animais analisados foram realizados cultivos controles, sem a adição de DXR. Os cultivos celulares de cada animal foram feitos em triplicata.

O procedimento de colheita e fixação das preparações cromossômicas foi feito seguindo o protocolo padrão cultivo de linfócitos. Os cultivos celulares foram retirados da estufa, depositados em tubos de fundo cônico e centrifugados por 6 minutos a 167,6 g sendo os sobrenadantes descartados. Os sedimentos foram ressuspensos em 10 mL de solução hipotônica KCl (0,067M) e incubados a 37°C por 20 minutos; após esse tempo foi feita a pré-fixação com 3 gotas de fixador (metanol e ácido acético 3:1 respectivamente). O material foi novamente centrifugado, o sobrenadante descartado e as células restituídas em 6 mL de solução fixadora, em três ocasiões. O material obtido foi gotejado em lâminas e submetido às técnicas de análise convencional e banda G.

Bandamento G

Na técnica de banda G (SEABRIGHT, 1971, com modificações), as lâminas contendo as preparações tratadas com DXR foram envelhecidas por 16 horas a 60°C e depois mantidas por um dia na geladeira. Após isso, as lâminas foram mergulhadas por 3 segundos em uma solução de tripsina (0,05 g de tripsina em 50 mL de tampão fosfato 0,06 M, pH 7,0) e lavadas em água destilada. Depois de secas, as lâminas foram coradas com o corante Wright em tampão fosfato 0,06 M, pH 6,8 (1:2) por aproximadamente 12 minutos.

Análise e captura das imagens

As análises das lâminas se deram por meio de código cego, para evitar viés no julgamento dos dados.

As metáfases da análise convencional e da banda G foram analisadas e obtidas na forma digital usando o microscópio Olympus BX60 (objetiva de 100x) equipado com câmera Zeiss AxioCam MRm, por meio do programa AxioVision Release 4.8.2. Todas as imagens foram editadas com o auxílio do programa Adobe Photoshop CS3.

Análise do índice mitótico

O cálculo do índice mitótico (IM) foi determinado pela razão entre o número de metáfases encontradas em 2000 células por cultura, sendo um total de 6000 células

analisadas por animal. O número obtido no IM é expresso em porcentagem (GALLOWAY et al., 1994; TAKAHASHI, 2003). Os valores médios das 3 repetições de cada animal foram comparados pelo teste de Tukey, com diferença de significância $p < 0,05$, com auxílio do programa estatístico Graph Pad Prism 5.

Análise das aberrações cromossômicas por coloração convencional (Giemsa)

A análise das metáfases foi realizada por um microscópio de luz com a objetiva de imersão (aumento: 1000 X). Em cada experimento foram analisadas 100 metáfases de preparações tratadas com DXR e 100 metáfases de preparações não tratadas (cultivos controle), ou seja, para cada animal, foram analisadas 300 metáfases de preparações tratadas com DXR e 300 metáfases do cultivo controle, com o intuito de se obter os parâmetros número total de AC e número total de metáfases que apresentaram AC, e também para a identificação e quantificação dos tipos de AC encontradas.

Em um primeiro momento, foram avaliados os números totais de AC e os números totais de metáfases que apresentaram AC, sendo que nas duas análises, foram comparados os valores obtidos nos cultivos controle com os valores dos cultivos tratados com a DXR. Tais parâmetros foram avaliados estatisticamente por análise de variância para experimentos inteiramente aleatorizados, para cada um dos animais. Os valores médios das 3 repetições de cada animal para estas duas características foram comparados pelo teste de Tukey, com diferença de significância $p < 0,05$, com auxílio do programa estatístico Graph Pad Prism 5.

Após isso, as AC foram classificadas, como exposto na Figura 6, em: anel (A), cromossomo dicêntrico (Dic), gap cromatídico (Gct), gap cromossômico (Gcr), quebra cromatídica (Qct), quebra cromossômica (Qcr), forma trirradial (Ft), forma quadrirradial (Fq) e rearranjo (Re) (EVANS e O'RIORDAN, 1975; SAVAGE, 1975; SAVAGE e SIMPSON, 1994).

Identificação cromossômica por bandamento G

Para cada animal foram analisadas 100 metáfases (tratadas com DXR) submetidas à técnica de bandamento G. Em cada metáfase, foram observados quantos cromossomos eram portadores de AC, com o intuito de determinar o número total de AC e o número total de metáfases que apresentaram AC.

A identificação precisa dos pares cromossômicos portadores de AC foi realizada pela técnica de banda G. Como base comparativa para esta identificação, foi utilizado o ideograma feito por Neitzel (1987) que pode ser visualizado na Figura 5.

Localização das regiões cromossômicas por bandamento G

Após a identificação dos cromossomos portadores de AC, foi feita a localização das regiões de quebras em cada um desses cromossomos. Para tanto, os cromossomos acrocêntricos foram divididos em 3 regiões em relação ao centrômero: proximal, mediana e distal. Para a localização das regiões de quebras, também foi utilizado como base comparativa o ideograma da Figura 5.

IV RESULTADOS

Seleção dos animais

Devido ao polimorfismo intraespecífico apresentado pela espécie estudada, alguns animais, que foram escolhidos de maneira aleatória, apresentaram algum tipo de variação cromossômica, como translocação ou cromossomo B. Na Tabela 1 estão representados a identificação, o sexo, o número diplóide e o tipo de variação cromossômica de cada animal.

Tabela 1- Identificação, sexo, número diplóide e tipo de variação cromossômica dos animais utilizados no projeto

Animais	Identificação	Sexo	Nº diplóide e tipo de variação cromossômica
1	F1	Fêmea	$2n = 70 + 0 \text{ a } 2B$ / Cromossomos B
2	F2	Fêmea	$2n = 69$ / Translocação (15,16)
3	F3	Fêmea	$2n = 70$
4	M1	Macho	$2n = 70 + 0 \text{ a } 3B$ / Cromossomos B
5	M2	Macho	$2n = 70$
6	M3	Macho	$2n = 70 + 0 \text{ a } 1B$ / Cromossomo B

Análise do índice mitótico

Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas nos valores do índice mitótico (IM) entre os cultivos celulares tratados com a DXR e os cultivos controle, indicando a ausência de citotoxicidade nas condições experimentais utilizadas nos cultivos celulares dos diferentes animais (Figura 8). Na Tabela 2 estão representados os valores médios com

o desvio padrão do IM de todos os cultivos celulares de fêmeas e de machos. Analisando-se a Tabela 2 é possível observar que não houve diferença significativa entre a média de fêmeas e machos, indicando que o sexo dos animais não interferiu no IM.

Tabela 2 – Média e desvio padrão do índice mitótico observado nos cultivos celulares controle e nos cultivos celulares submetidos ao tratamento com a DXR (cultivos + DXR) de fêmeas e machos.

Animais	Índice mitótico (Média±DP)	
	Cultivos Controle	Cultivos + DXR
F	3,40±0,90	3,11±0,29
M	3,37±0,35	3,19±0,11

DXR = doxorrubicina (0,25 µg/mL)

Foram analisadas 2000 células por cultivo celular, sendo um total de 6000 células por animal

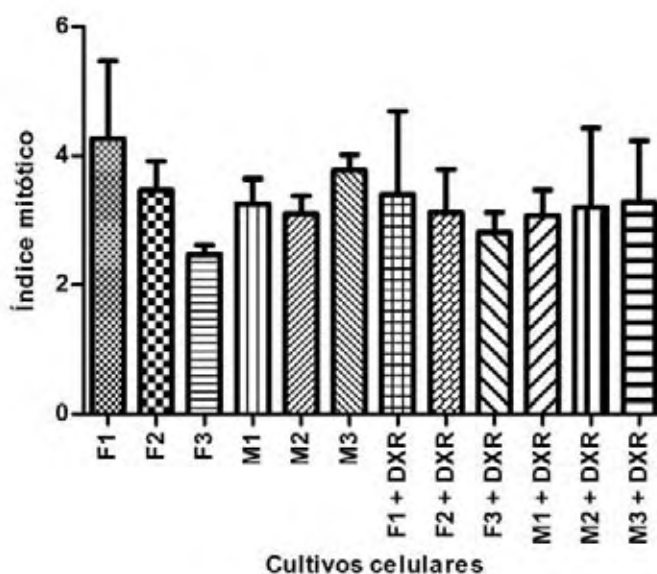


Figura 8 – Índice mitótico observado nos cultivos celulares controle e nos cultivos celulares submetidos ao tratamento com a DXR de fêmeas (F1, F2 e F3) e machos (M1, M2 e M3).

Análise das aberrações cromossômicas por coloração convencional (Giemsa)

Não foram observadas diferenças significativas no número de AC e no número de metáfases que apresentaram AC entre machos e fêmeas, tanto nos cultivos controle como nos cultivos tratados com a DXR, indicando que não houve influência do sexo (Tabela 3).

Em relação ao número total de AC, tanto nos machos como nas fêmeas, houve uma diferença estatisticamente significativa entre os cultivos celulares controle em relação aos cultivos que sofreram a incorporação da DXR, revelando um aumento significativo no número de AC encontradas nos cultivos tratados com a DXR (Figura 9).

Analisando-se o número total de metáfases que apresentaram AC, foi possível observar, tanto nos machos como nas fêmeas, uma diferença significativa entre os cultivos controle em relação aos cultivos tratados com a DXR. Tais dados mostram que os cultivos que sofreram o tratamento da DXR apresentaram um aumento estatisticamente significativo no número de metáfases que apresentaram AC (Figura 10).

Tabela 3 - Média e desvio padrão das triplicatas, em relação ao número total de aberrações cromossômicas (AC) e ao número total de metáfases que apresentaram AC nos cultivos celulares controle e cultivos celulares submetidos ao tratamento com a DXR (cultivo + DXR) em fêmeas e em machos.

Animais	Nº total de AC (Média±DP)		Nº total de metáfases com AC (Média±DP)	
	Cultivo controle	Cultivo + DXR	Cultivo Controle	Cultivo + DXR
F1	11,00±3,46	64,33±5,51	9,00±1,73	34,00±7,00
F2	11,00±1,00	62,66±29,14	8,33±1,15	34,66±6,65
F3	12,00±4,36	49,00±5,29	9,00±1,00	27,33±1,15
M1	12,33±4,93	50,00±3,00	8,66±3,51	29,33±1,53
M2	12,66±4,72	44,33±14,57	9,33±1,53	27,00±3,46
M3	11,66±1,53	42,33±17,09	8,00±1,00	25,33±3,51

DXR = doxorubicina (0,25 µg/mL)

Foram analisadas 100 metáfases por cultivo celular, sendo um total de 300 metáfases por animal

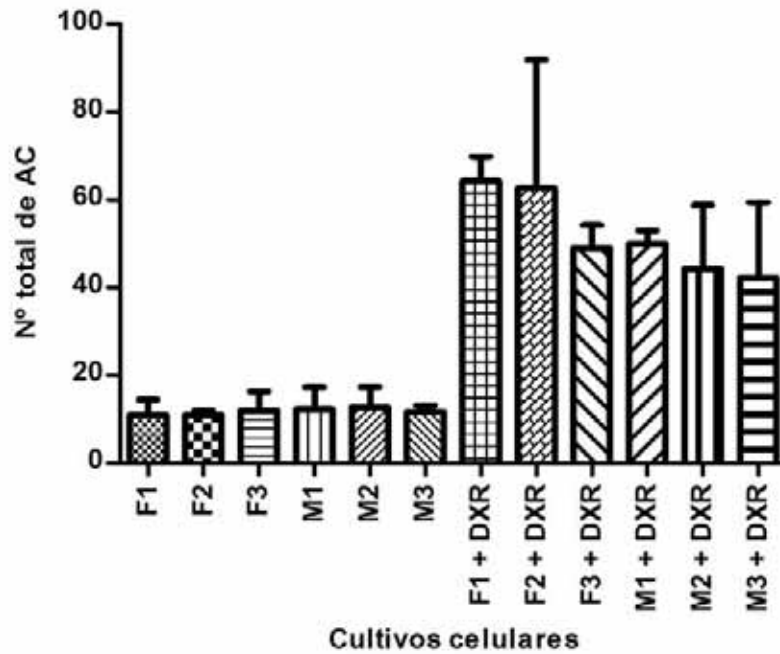


Figura 9 – Número total de aberrações cromossômicas (AC) encontradas nos cultivos celulares controle e cultivos celulares incorporados com doxorrubicina (DXR) de fêmeas (F1, F2 e F3) e machos (M1, M2 e M3).

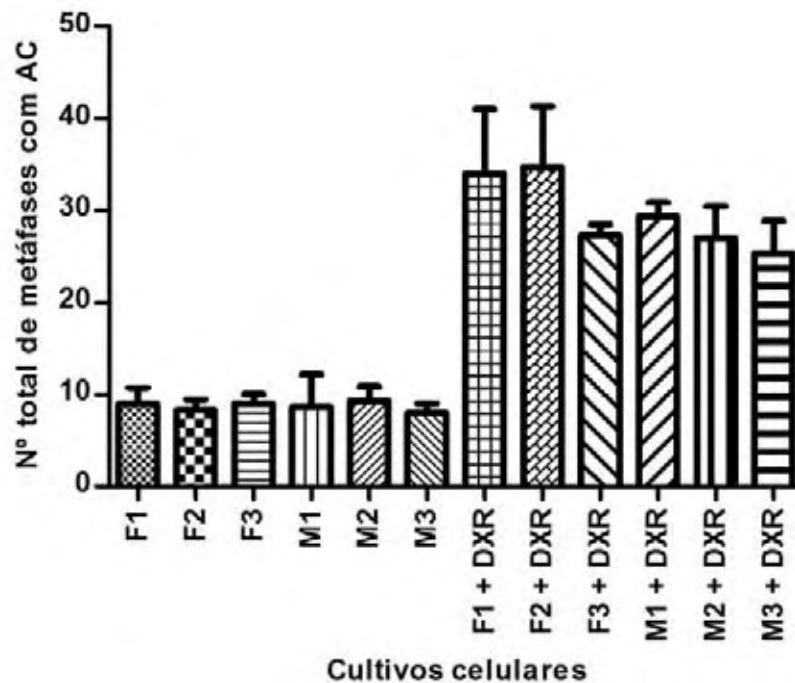


Figura 10 – Número total de metáfases que apresentaram aberrações cromossômicas (AC) encontradas nos cultivos celulares controle e cultivos celulares incorporados com DXR de fêmeas (F1, F2 e F3) e machos (M1, M2 e M3).

Os dados obtidos na identificação e quantificação dos tipos de AC analisadas, tanto dos cultivos controle como dos cultivos tratados com a DXR, podem ser visualizados na Tabela 4 para as fêmeas e para os machos. Tendo em vista os cultivos controle, tanto de fêmeas como de machos, é possível observar que os tipos de AC mais frequentemente encontrados foram as Qct e os Gct, seguidos dos cromossomos Dic, Re, A, Qcr, Gcr e Ft, respectivamente. A Fq não foi encontrada nos cultivos celulares controle de nenhum dos animais analisados.

Analisando os cultivos celulares submetidos ao tratamento com a DXR das fêmeas e dos machos, foi observado que os tipos de AC mais encontrados foram as Qct e os Gct, seguidos dos cromossomos Dic, Qcr, Gcr, Re, A e Ft, respectivamente. A Fq não foi encontrada nos cultivos celulares induzidos pela DXR de nenhum dos animais analisados. As frequências médias dos tipos de AC visualizadas nos cultivos celulares controle (C.C.) e nos cultivos celulares tratados com a DXR (C. + DXR) de fêmeas e machos estão representadas na Figura 11.

Em síntese, a ordem decrescente das AC observadas nos cultivos controle de fêmeas e machos foi: Qct > Gct > Dic > Re > A > Qcr > Gcr > Ft > Fq. Já a ordem decrescente de AC nos cultivos tratados com a DXR foi: Qct > Gct > Dic > Qcr > Gcr > Re > A > Ft > Fq.

Tabela 4 – Média e frequência das triplicatas em relação aos tipos de aberrações cromossômicas (AC) analisadas nos cultivos celulares controle e cultivos celulares tratados com DXR (cultivo + DXR) das fêmeas (F) e dos machos (M). As AC quantificadas foram: anel cromossômico (A), cromossomo dicêntrico (Dic), gap cromatídico (Gct), gap cromossômico (Gcr), quebra cromatídica (Qct), quebra cromossômica (Qcr), forma trirradial (Ft), forma quadrirradial (Fq) e rearranjo (Re).

Tipos de AC	Cultivo controle				Cultivo + DXR			
	F		M		F		M	
	Média	Frequência	Média	Frequência	Média	Frequência	Média	Frequência
A	0,33	2,92%	0,88	7,72%	2,44	4,16%	1,44	3,16%
Dic	1,66	14,7%	1,77	15,52%	7,44	12,8%	3,99	8,77%
Gct	2,44	21,6%	2,66	23,33%	13	22,16%	14,77	32,46%
Gcr	0,55	4,86%	0,44	3,86%	3,55	6,05%	2,77	6,09%
Qct	4,55	40,26%	4,22	37,01%	22	37,51%	16,10	35,39%
Qcr	0,66	5,84%	0,44	3,87%	6,66	11,35%	4,33	9,52%
Ft	0	0	0,11	0,97%	0,33	0,56%	0,11	0,24%
Fq	0	0	0	0	0	0	0	0
Re	1,11	9,82%	0,88	7,72%	3,22	5,5%	1,99	4,38%

DXR= doxorubicina (0,25 µg/mL)

Foram analisadas 300 metáfases por animal, sendo um total de 900 metáfases nas fêmeas e 900 nos machos, tanto nos cultivos controle como nos cultivos tratados com DXR.

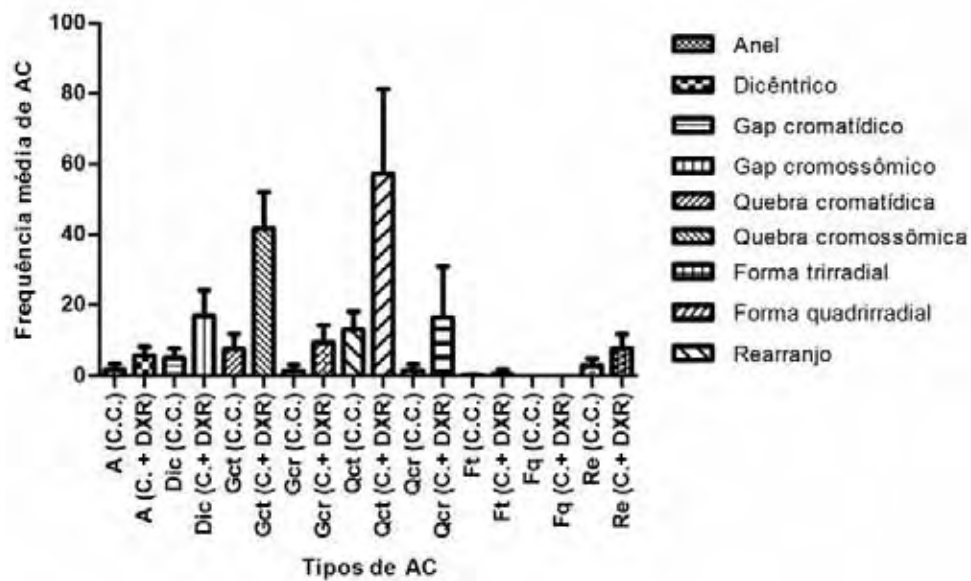


Figura 11 – Frequência média, de cada experimento, dos tipos de aberrações cromossômicas (AC) analisadas nos cultivos celulares controle (C.C.) e nos cultivos celulares submetidos ao tratamento da DXR (C. + DXR) de fêmeas e machos.

Nas Figuras 12, 13 e 14 estão ilustradas as AC encontradas nas metáfases dos cultivos celulares submetidos ao tratamento com a DXR e corados com Giemsa.

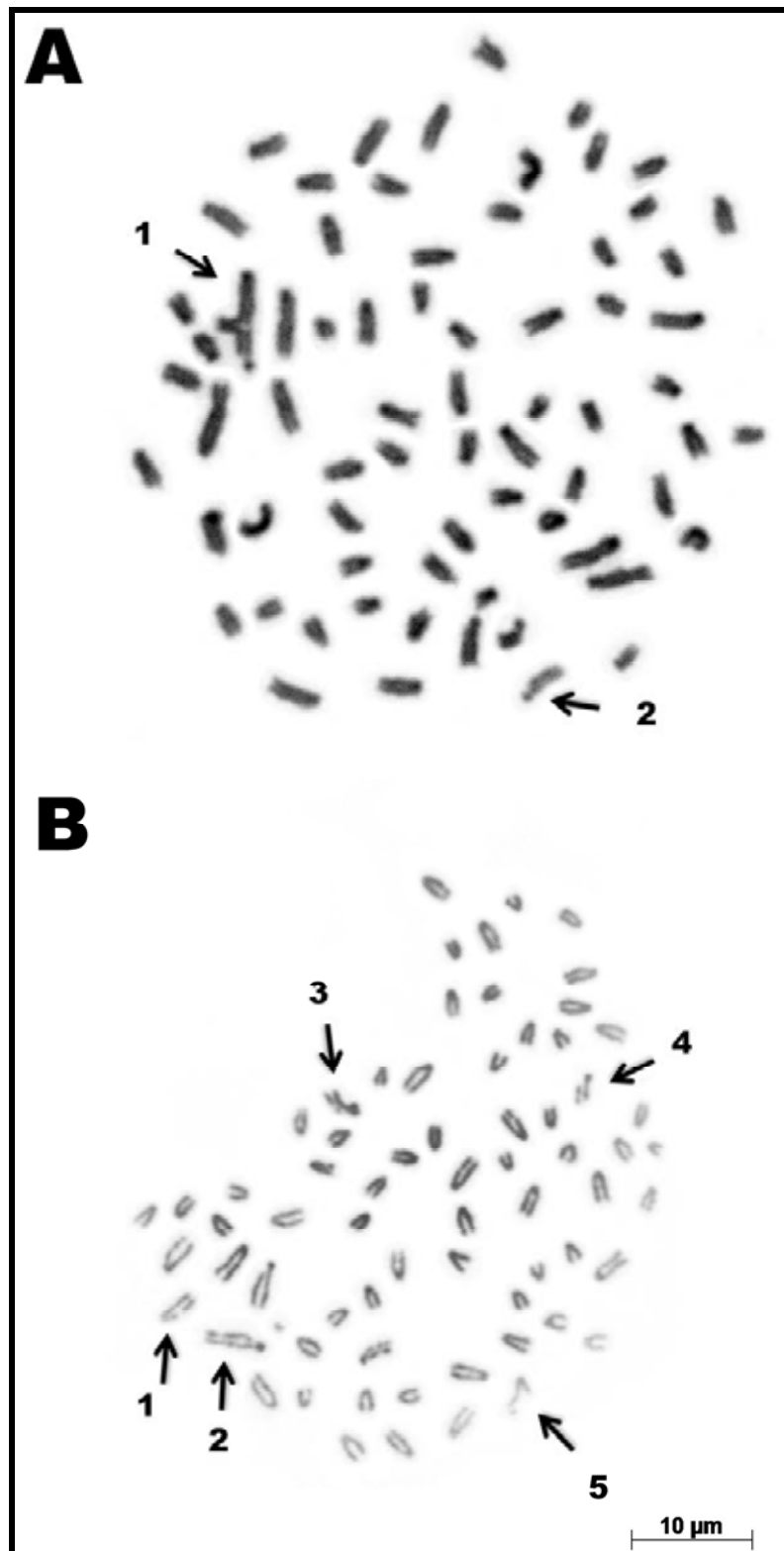


Figura 12 – Aberrações cromossômicas obtidas nas metáfases dos cultivos celulares submetidos ao tratamento com a DXR. (A) 1 – Forma trirradial e 2 – Gap cromatídico; (B) 1 e 2 – Gap cromatídico, 3 e 4– Quebra cromatídica e 5 – Quebra cromossômica. Todas as preparações cromossômicas foram coradas com Giemsa e analisadas em um aumento de 1000X.

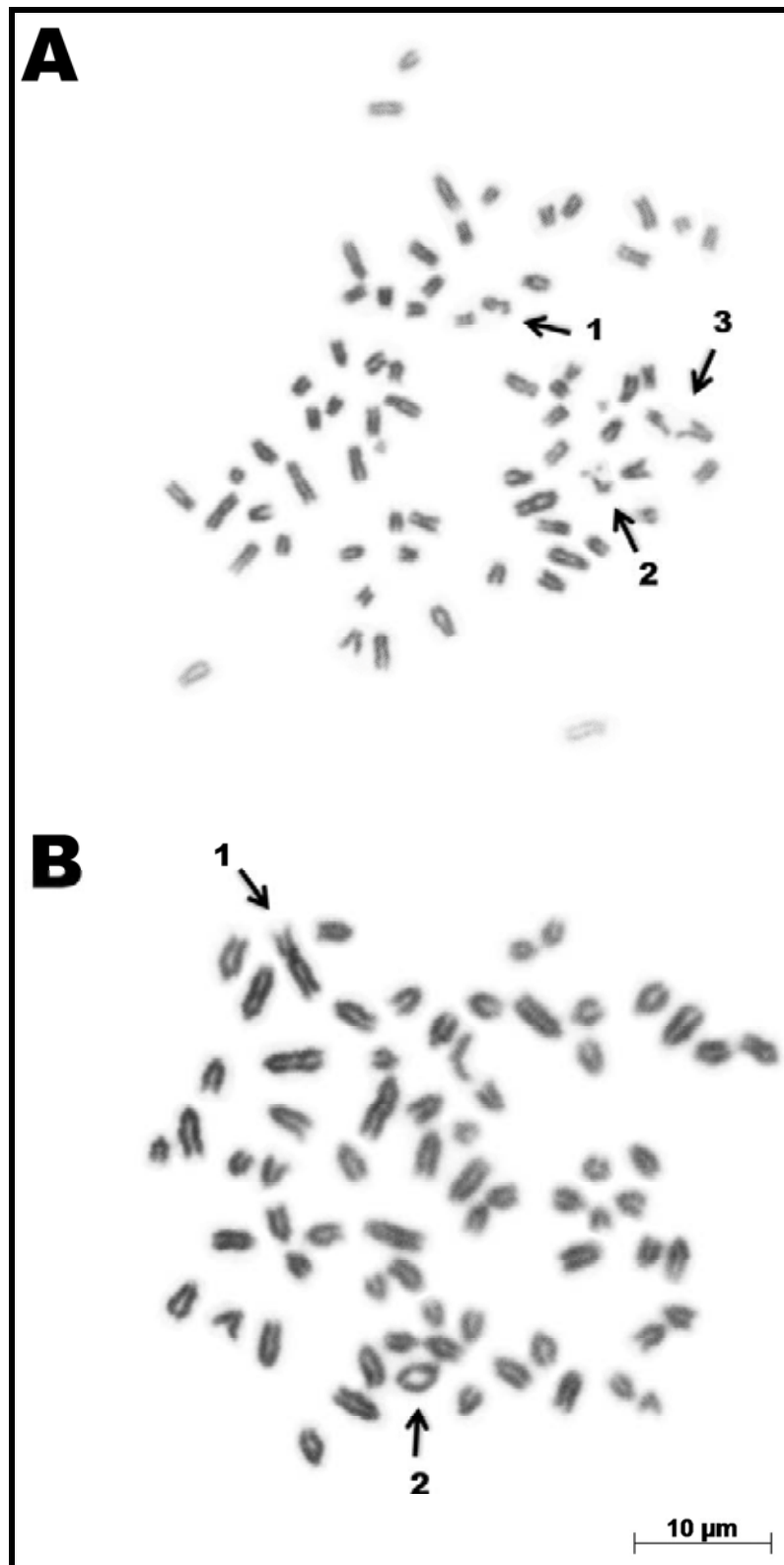


Figura 13 – Aberrações cromossômicas obtidas nas metáfases dos cultivos celulares submetidos ao tratamento com a DXR. (A) 1 – Quebra cromossômica, 2 – Quebra cromatídica e 3 - Rearranjo; (B) 1 – Rearranjo e 2 – Anel. Todas as preparações cromossômicas foram coradas com Giemsa e analisadas em um aumento de 1000X.

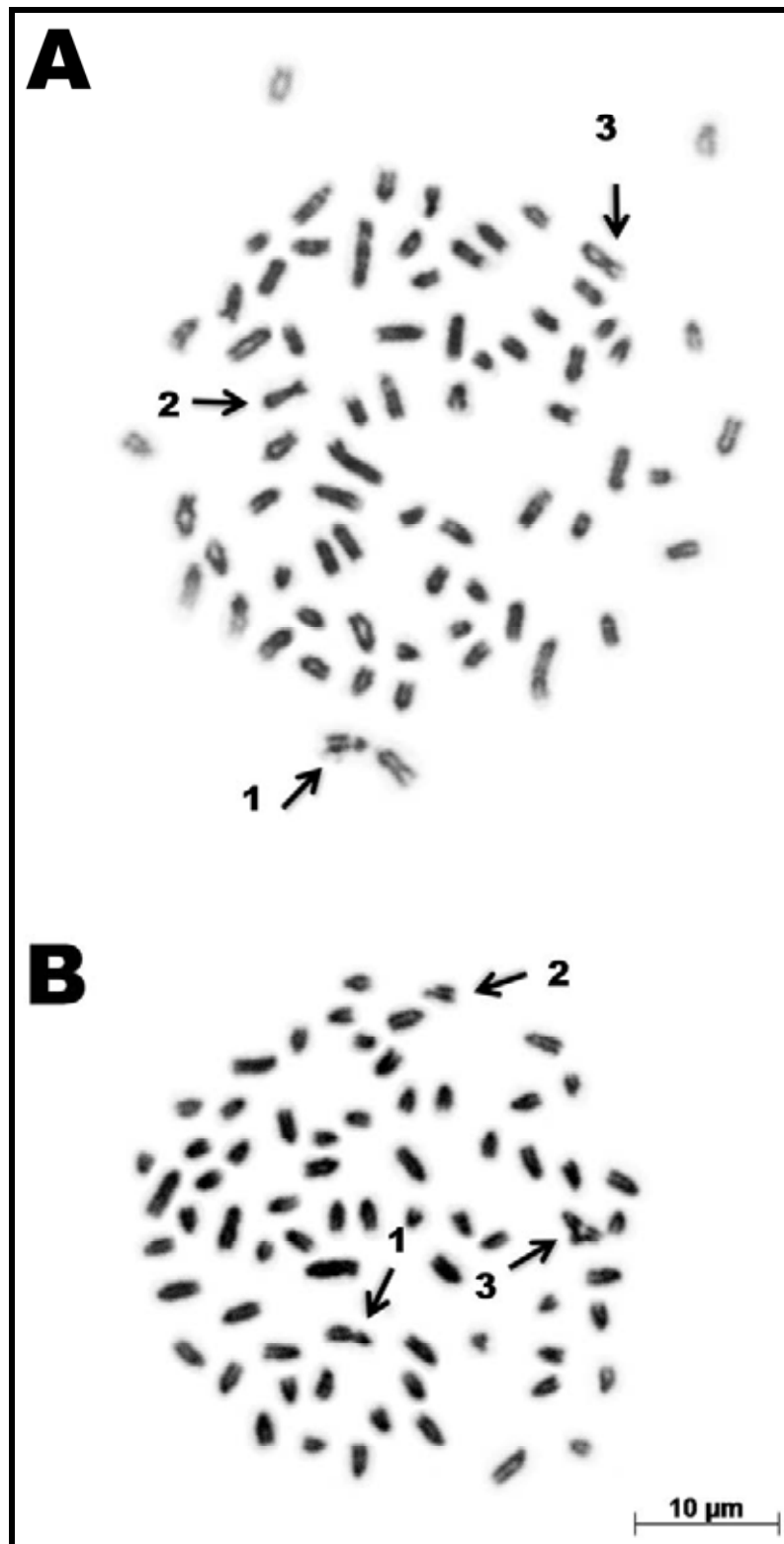


Figura 14 – Aberrações cromossômicas obtidas nas metáfases dos cultivos celulares submetidos ao tratamento com a DXR. (A) 1 – Gap cromossômico, 2 e 3 – Dicêntrico; (B) 1 – Quebra cromossômica, 2 – Gap cromatídico e 3 – Forma trirradial. Todas as preparações cromossômicas foram coradas com Giemsa e analisadas em um aumento de 1000X.

Identificação cromossômica por bandamento G

Os resultados obtidos por meio da análise do número total de AC e do número total de metáfases que apresentaram AC dos cultivos tratados com DXR submetidos ao bandamento G, estão mostrados na Figura 15 e na Tabela 5. É possível observar que não houve diferenças estatisticamente significativas em relação ao número total de AC e ao número total de metáfases que apresentaram AC entre fêmeas e machos, indicando que o sexo dos animais não influenciou nos resultados.

Pela análise das metáfases tratadas com DXR submetidas ao bandamento G, foi possível observar que não foram encontradas AC nos pares cromossômicos 12, 18, 19, 21, 22, 24, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34 e no cromossomo sexual Y, de todos os animais analisados.

Os pares 1, 2, 4, 5, 6, 7, 15, 16 e o cromossomo sexual X apresentaram AC em todos os animais avaliados. Já os pares 3, 10 e 20 apresentaram AC apenas nas metáfases do animal M1 e os pares 23, 25 e 26 apenas nas metáfases do animal F2. O par 9 apresentou AC em todos os animais analisados, com exceção do animal F2. O par 8 apresentou AC nos animais F1, F3, M2 e M3, o par 11 nos animais F1, F2, M1 e M2; o par 13 nos animais F2, F3 e M3; o par 14 nos animais F3 e M2; e o par 17 nos animais F1, F2, M2 e M3. Na Tabela 6 estão representadas as frequências de todos os cromossomos que apresentaram AC em fêmeas e em machos.

Analisando-se a Figura 16 é possível observar que entre todos os animais analisados, o par cromossômico que apresentou maior frequência de AC foi o 7 (15,17%), seguido dos pares X (12,41%), 2 (12,18%), 1 (11,03%), 4 (9,65%), 16 (9,19%), 6 (8,73%), 15 (6,66%), 5 (4,60%), 8 (2,52%), 9 (2,30%), 11 (1,38%), 17 (0,91%), 13 e 23 (0,69%), 14 e 25 (0,46%), 3, 10, 20 e 26 (0,23%), respectivamente.

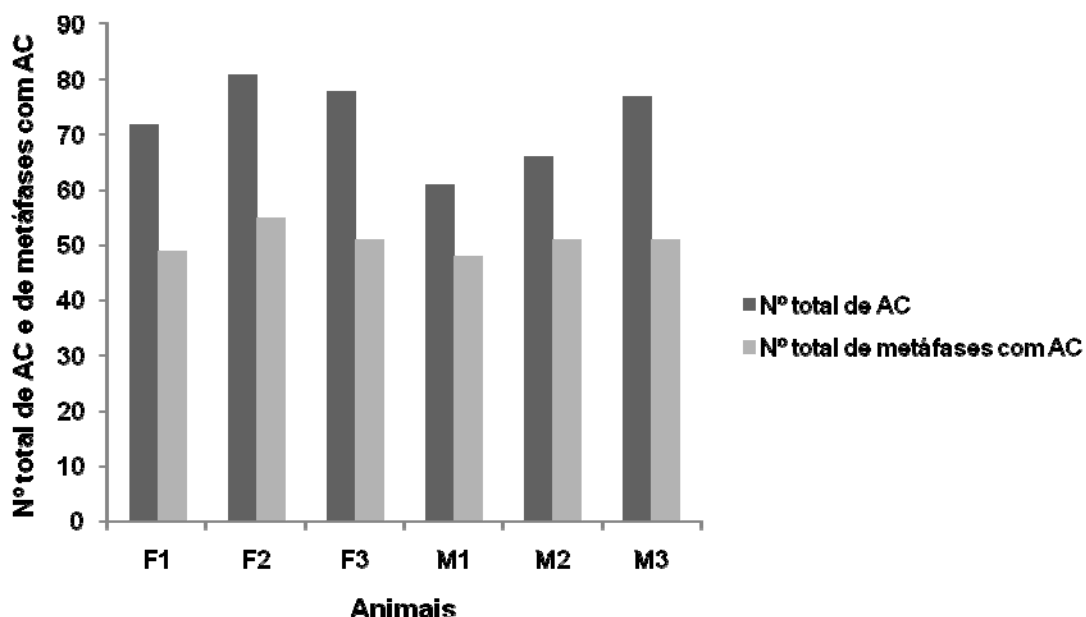


Figura 15 – Número total de aberrações cromossômicas (AC) e de metáfases com AC analisadas nos cultivos tratados com doxorubicina (DXR) submetidos ao bandamento G de fêmeas (F1, F2 e F3) e machos (M1, M2 e M3).

Tabela 5 – Frequência do número total de aberrações cromossômicas (AC) e do número de metáfases com AC analisados nos cultivos tratados com doxorubicina (DXR) submetidos ao bandamento G de fêmeas (F1, F2 e F3) e machos (M1, M2 e M3).

Animais	Cultivos + DXR	
	Nº total de AC (%)	Nº total de metáfases com AC (%)
F1	16,55	16,07
F2	18,62	18,03
F3	17,93	16,72
M1	14,02	15,74
M2	15,18	16,72
M3	17,70	16,72

DXR= doxorubicina (0,25 µg/mL)

Foram analisadas 100 metáfases tratadas com DXR submetidas ao bandamento G, por animal

Tabela 6 - Frequência total de cromossomos que apresentaram aberrações cromossômicas (AC) analisados nas metáfases dos cultivos celulares submetidos ao tratamento da doxorubicina DXR de fêmeas (F1= fêmea 1, F2= fêmea 2 e F3= fêmea 3) e machos (M1= macho 1, M2= macho 2 e M3= macho 3)

Pares cromossômicos	Frequência de AC em cada animal (%)					
	F1 ^a	F2 ^a	F3 ^a	M1 ^a	M2 ^a	M3 ^a
1	8,33	8,64	12,82	13,12	16,66	7,8
2	12,5	11,11	12,82	13,12	13,63	10,39
3	0	0	0	1,64	0	0
4	9,72	9,88	8,97	11,47	4,54	12,99
5	5,55	6,17	5,19	6,56	3,03	1,30
6	12,5	4,93	8,97	6,56	9,10	10,39
7	15,28	17,28	15,39	13,12	18,18	11,69
8	1,39	0	1,29	0	9,09	3,90
9	1,39	0	3,85	3,28	3,03	2,60
10	0	0	0	1,64	0	0
11	2,78	2,47	0	1,64	1,51	0
13	0	1,23	1,29	0	0	1,3
14	0	0	1,29	0	1,51	0
15	9,72	4,93	8,97	4,92	4,54	6,5
16	5,55	16,05	6,41	4,92	4,54	15,59
17	1,39	1,23	0	0	1,51	1,3
20	0	0	0	1,64	0	0
23	0	3,7	0	0	0	0
25	0	2,47	0	0	0	0
26	0	1,23	0	0	0	0
X	13,89	8,64	12,82	16,4	9,10	14,29

DXR= doxorubicina (0,25 µg/mL)

^a Foram analisadas 100 metáfases tratadas com DXR submetidas ao bandamento G por animal.

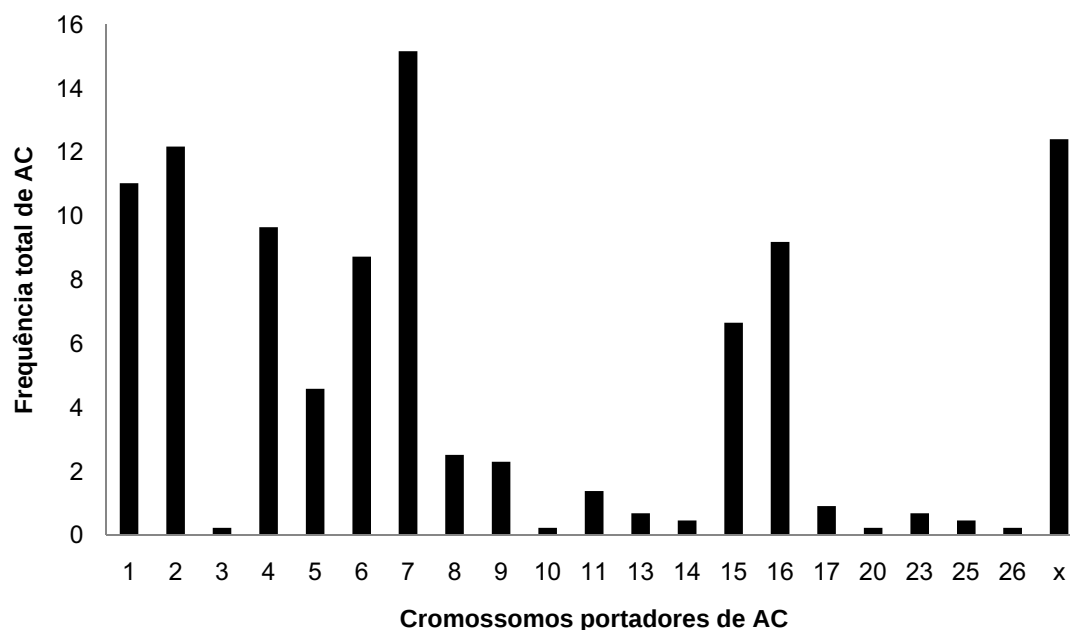


Figura 16 – Frequência total de aberrações nos cromossomos de *Mazama gouazoubira* analisados nas metáfases submetidas ao tratamento com DXR.

Localização das regiões cromossômicas por bandamento G

Os resultados obtidos pela análise das regiões de quebras que foram divididas em 3 partes e classificadas em relação ao centrômero como proximal, mediana e distal, estão apresentados na Tabela 7 e na Figura 17. Observando os dados obtidos é possível notar que as AC se concentraram com maior frequência na região proximal dos pares cromossômicos 1 e 17. Os pares 2, 6, 9, 20, 26 e o cromossomo sexual X apresentaram maior incidência de AC na região mediana. Na região distal foram encontradas AC nos pares 3, 4, 5, 7, 8, 10, 13, 15 e 16. Os pares 11 e 25 apresentaram os mesmos números de AC nas regiões proximal e distal. O par 14 exibiu taxas de ocorrência de AC iguais nas regiões proximal e mediana. O par 23 mostrou que as 3 regiões analisadas apresentaram o mesmo número de AC.

Analisando-se a Tabela 7 é possível perceber que na região distal foram encontradas 12 AC, na mediana 8 AC e na proximal 6 AC. Assim, pode concluir que foi na região cromossômica distal que houve a maior frequência de AC induzidas pela DXR.

Tabela 7 – Números totais de aberrações cromossômicas (AC) observados nas 3 regiões cromossômicas divididas em relação ao centrômero: proximal, mediana e distal, encontrados nos pares cromossômicos analisados nas metáfases dos cultivos celulares submetidos ao tratamento da doxorubicina (DXR) de fêmeas e machos

Pares cromossômicos	Regiões em relação ao centrômero		
	Proximal	Mediana	Distal
1	17	16	15
2	13	27	13
3	0	0	1
4	7	13	22
5	3	3	14
6	10	16	12
7	23	14	29
8	1	4	6
9	0	6	4
10	0	0	1
11	3	0	3
13	0	1	2
14	1	1	0
15	9	9	11
16	6	11	23
17	3	0	1
20	0	1	0
23	1	1	1
25	1	0	1
26	0	1	0
X	6	27	21

DXR= doxorubicina (0,25 µg/mL)

Foram analisadas 100 metáfases tratadas com DXR submetidas ao bandamento G por animal.

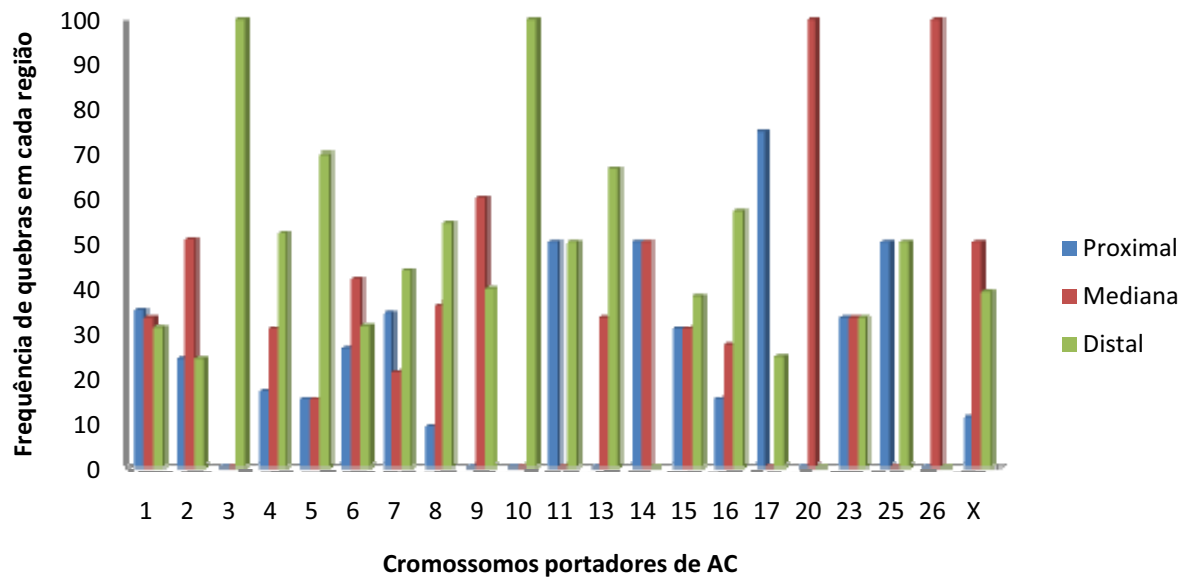


Figura 17 – Frequência total de aberrações cromossômicas (AC) observadas nas regiões proximal, mediana e distal dos cromossomos portadores de AC submetidos ao tratamento da DXR de fêmeas e machos.

Nas Figuras 18, 19 e 20 estão ilustrados os cromossomos portadores de AC, com a indicação de cada região onde essas estavam concentradas, encontrados nas metáfases dos cultivos celulares tratados com a DXR submetidos ao bandamento G.

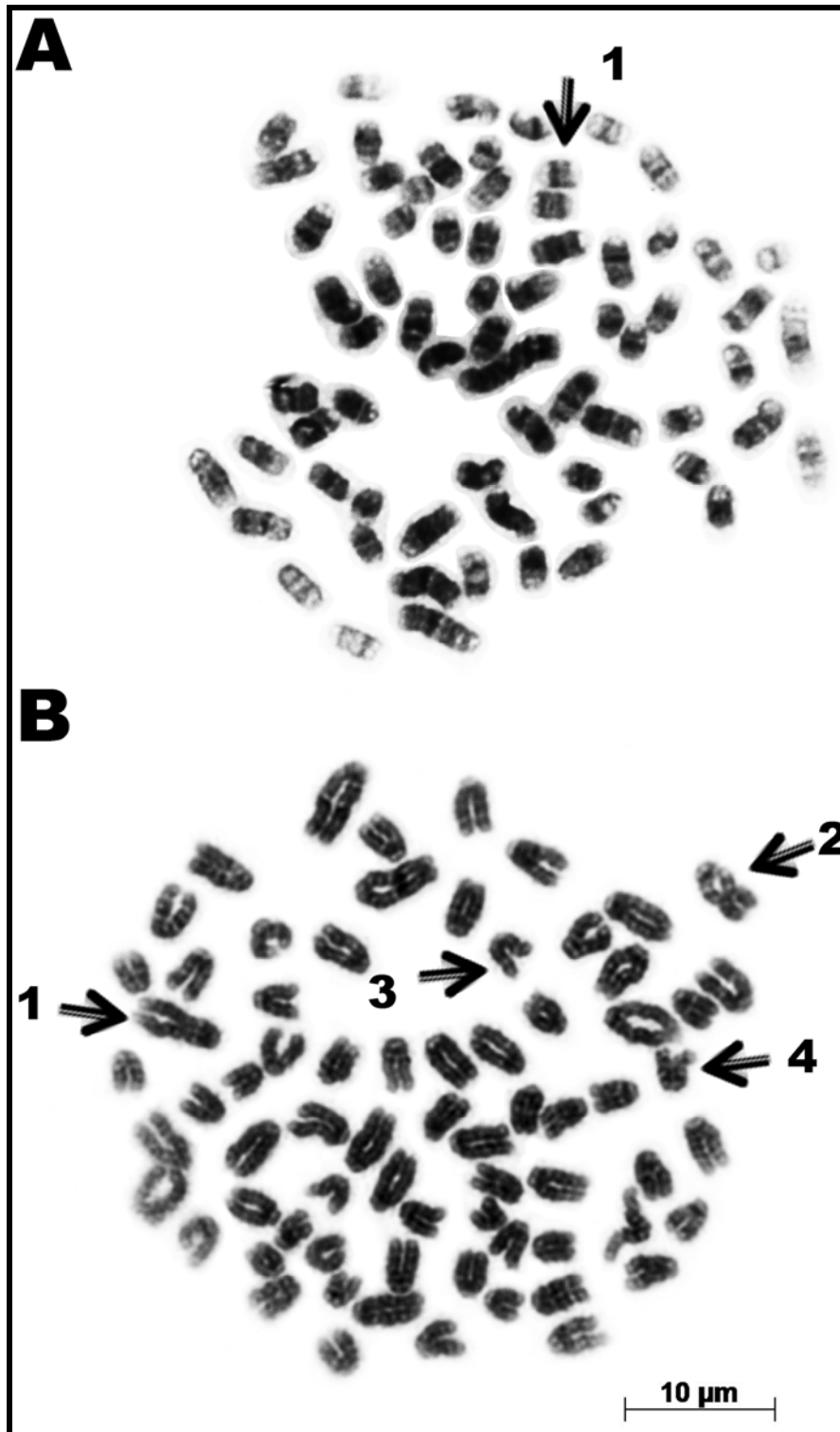


Figura 18 – Cromossomos portadores de aberrações cromossômicas (AC) e localização das AC em cada cromossomo, obtidos nas metáfases dos cultivos celulares tratados com a doxorubicina (DXR). (A) 1 – Cromossomo 16, região distal; (B) 1 – Cromossomo X, região mediana; 2 – Cromossomo 5, região mediana, 3 – Cromossomo 15, região mediana; 4 – Cromossomo 14, região mediana. Todas as preparações cromossômicas foram submetidas à técnica de bandamento G e analisadas em um aumento de 1000X.

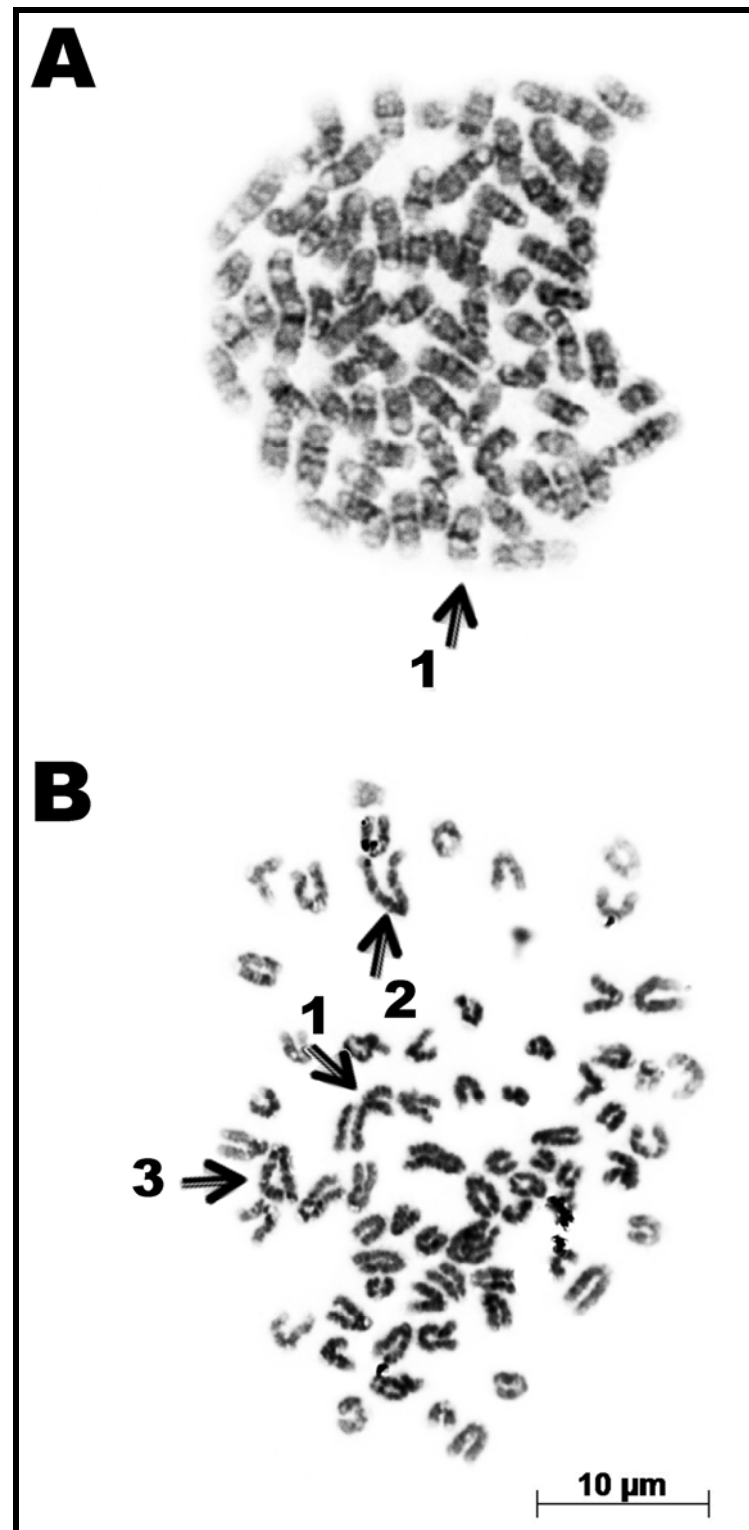


Figura 19 – Cromossomos portadores de aberrações cromossômicas (AC) e localização das AC em cada cromossomo, obtidos nas metáfases dos cultivos celulares tratados com a doxorubicina (DXR). (A) 1 – Cromossomo 9, região mediana; (B) 1 – Cromossomo X, região mediana; 2 – Cromossomo 1, região distal, 3 – Cromossomo 2, região distal. Todas as preparações cromossômicas foram submetidas à técnica de bandamento G e analisadas em um aumento de 1000X.

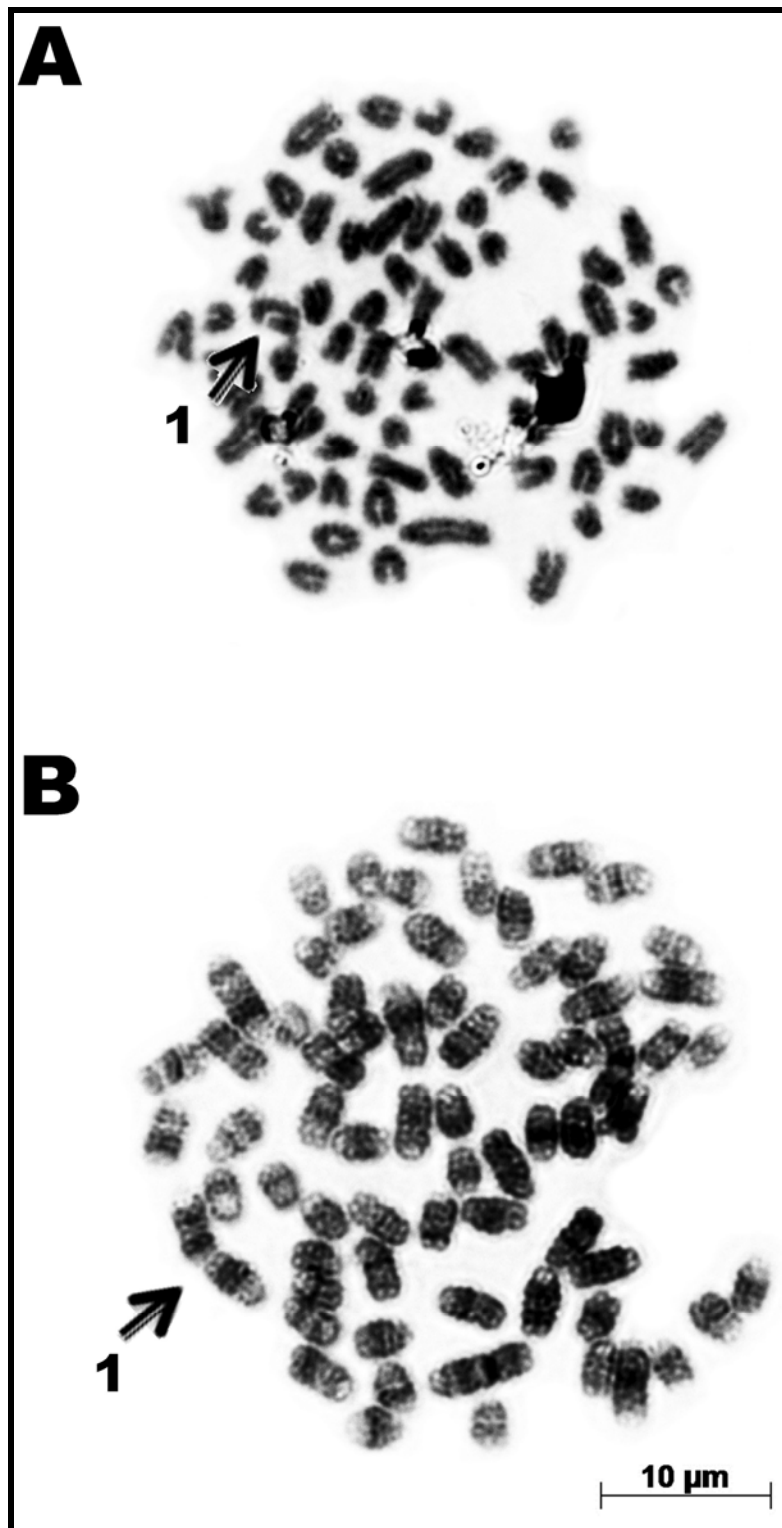


Figura 20 – Cromossomos portadores de aberrações cromossômicas (AC) e localização das AC em cada cromossomo, obtidos nas metáfases dos cultivos celulares tratados com a doxorubicina (DXR). (A) 1 – Cromossomo 7, região proximal; (B) 1 – Cromossomo X, região mediana. Todas as preparações cromossômicas foram submetidas à técnica de bandamento G e analisadas em um aumento de 1000X.

V DISCUSSÃO

A avaliação cariotípica dos animais da família Cervidae tem se mostrado muito interessante já que os estudos citogenéticos evidenciam uma extensa variação no número cromossômico e presença de cromossomos B (DUARTE E JORGE, 1996). Como os cromossomos das espécies do gênero *Mazama* possuem uma tendência a fragilidade (Vargas-Munar et al., 2010), este trabalho se propôs a identificar os cromossomos da espécie *Mazama gouazoubira* portadores de aberrações cromossômicas e localizar as regiões de quebras de cada um desses cromossomos.

Os dados obtidos dos 6 animais da espécie *Mazama gouazoubira* analisados, 3 apresentaram cromossomos B, 1 possuía uma fusão Robertsoniana (15;16) e apenas 2 não mostraram nenhum tipo de variação cromossômica. Estudos feitos por Duarte (1992) e Duarte e Jorge (1998) apontaram a presença de fusões Robertsonianas e de cromossomos B na maioria dos espécimes de *Mazama gouazoubira* avaliados. Estes dados presentes na literatura evidenciam o polimorfismo intraespecífico existente nesta espécie.

Foram feitos cultivos controle e cultivos submetidos ao tratamento do agente mutagênico DXR, a partir de linfócitos sanguíneos dos animais selecionados neste trabalho. Cultivos de linfócitos são indicadores extremamente sensíveis às mudanças cromossômicas estruturais induzidas por mutágenos (EVANS E O'RIORDAN, 1975).

O agente mutagênico utilizado para a indução de AC em cultivos celulares de linfócitos sanguíneos no presente trabalho foi a DXR. Na literatura podem ser encontrados vários trabalhos que relatam a utilização da DXR como indutor de AC (FURTADO et al., 2008; RESENDE et al., 2010; VARGAS-MUNAR et al., 2010). Segundo Vargas-Munar e colaboradores (2010), os cervídeos são menos sensíveis à DXR quando comparados ao homem, pois em concentrações semelhantes, este mutagênico induz de duas a três vezes mais AC em humanos (VIG, 1971).

Por meio da análise do índice mitótico foi possível perceber que o agente mutagênico DXR utilizado na concentração de 0,25 µg/mL não apresentou citotoxicidade. O índice mitótico é uma metodologia utilizada para quantificar a proliferação celular, estimando o número de células em metáfase (ELSTON e ELLIS, 1991; THOR et al., 1999). Vargas-Munar e colaboradores (2010) testaram diferentes doses de DXR em células de cervídeos,

revelando que concentrações acima de 0,25 µg/mL são citotóxicas, impedindo assim, o crescimento celular. A citotoxicidade produzida pela DXR pode acontecer por vários mecanismos como a formação de radicais livres, diferenciação da composição da membrana celular, alteração da função celular e intercalação com o DNA (KITADA et al., 1994; ANTUNES e TAKAHASHI, 1998; TAVARES et al., 1998; QUILES et al., 2002).

Os dados obtidos neste trabalho mostraram que os cultivos controle apresentaram AC, porém em menor frequência do que quando comparados com os cultivos tratados com DXR. Os cultivos controles são usados como parâmetro para a análise das AC espontâneas. Estudos realizados nos cromossomos das glândulas salivares de *Drosophila* apontaram a ocorrência espontânea de AC (NATARAJAN, 2002). Aula e Koskull (1976) afirmam ainda, que aberrações ocorrem na maioria das preparações cromossômicas que não foram expostas a nenhum tipo de agente mutagênico, porém em menor frequência.

Na literatura estão descritos trabalhos que mostram que as AC, induzidas pela DXR em linfócitos da medula óssea de ratos Wistar, foram encontradas em alta frequência nos cultivos tratados com DXR e em baixa frequência nos cultivos controle. Os autores relatam ainda, que nos cultivos tratados, a maioria das AC encontradas foram as Qct, mas também foram encontrados gaps, Qcr, trocas, Ft, Re e fragmentos acêntricos (ANTUNES e TAKAHASHI, 1998; GÜLKAÇ et al., 2004; YALÇIN et al., 2010). Em um estudo publicado recentemente, foram investigados citogeneticamente 50 animais da espécie *Bubalus bubalis* quanto à estabilidade cromossômica da espécie. Foi mostrado que os cultivos submetidos ao tratamento da bromodeoxiuridina, um outro agente mutagênico, apresentaram altas taxas de AC do que quando comparados com os cultivos controle, porém, essa diferença não foi significativa (GENUALDO et al., 2012).

As informações documentadas neste estudo apontaram que a AC mais frequente nos cultivos tratados com DXR foi a Qct. Foi notado que as AC predominantes em fibroblastos humano induzidas pela DXR foram do tipo cromatídicas (NEWSOME e LITTLEFIELD, 1975). As altas frequências dos danos cromatídicos podem ser justificadas pelo fato dos linfócitos serem expostos a algum agente mutagênico durante as fases S ou G₂, quando os cromossomos já apresentam as duas cromátides irmãs (EVANS E O'RIORDAN, 1975). Além disso, estudos mostram que a DXR é dependente da fase S do ciclo celular (TOFFOLI et al., 1996; RAO et al., 1975).

Devido à semelhança morfológica e de tamanho dos 68 cromossomos autossômicos da espécie em questão, colorações convencionais não são eficientes para o pareamento correto de homólogos. Por este motivo, a técnica de banda G foi utilizada para a identificação precisa dos cromossomos que sofreram rearranjos. De acordo com Folle e colaboradores (1998) regiões de quebras induzidas nos cromossomos podem ser identificadas usando bandamentos cromossômicos.

Assim, o bandamento G permitiu identificar os cromossomos portadores de AC, por meio da comparação dos cromossomos obtidos nos cultivos celulares tratados com DXR com o ideograma feito por Neitzel em 1987. Com base nessa comparação, foram identificados os cromossomos 1, 2, 4, 5, 6, 7, 15, 16 e o cromossomo sexual X como os que apresentaram as maiores frequências de AC entre os animais analisados. O agente antineoplásico e antibiótico estreptonigrina foi utilizado para induzir AC em linfócitos humanos, e neste estudo foram detectados os pares 1, 2 e 3 pelo bandamento G como os cromossomos que apresentaram maiores taxas de aberrações (COHEN, 1963).

Analisando-se cultivos de linfócitos, de pacientes com câncer, coletados imediatamente após o tratamento com o agente mutagênico físico radiação ionizante, foi possível observar, pelo bandamento G, que todos os pares cromossômicos apresentaram AC, com exceção apenas do cromossomo sexual Y. As maiores taxas de AC foram encontradas nos cromossomos 1, 3, 2, 7, 4, 9, 11 e 6, respectivamente (BARRIOS et al., 1989). A detecção de AC em quase todos os cromossomos pode ser explicada pelo fato do agente radiação ionizante ser um indutor de quebras cromossômicas aleatórias, tal propriedade também é encontrada na DXR (COQUELLE et al., 1997).

Em relação aos cromossomos sexuais, o presente estudo apontou que o cromossomo X apresentou altas taxas de AC, contrastando com o cromossomo Y, no qual não foram encontradas AC. Dados similares foram encontrados em um estudo que utilizou a azacitidina como indutor de AC. Esta é uma substância que inibe a metilação do DNA e é usada em estudos de fragilidade cromossômica. Por meio da adição dessa substância em cultivos de linfócitos bovinos, foi possível notar regiões de quebras no cromossomo sexual X e ausência dessas regiões no cromossomo sexual Y (LLAMBÍ et al., 2008). Visando identificar sítios frágeis e regiões de quebras em 45 animais da espécie *Ovis aries*, AC foram induzidas pela 5-fluorodeoxiuridina e, por meio do bandamento G, foi possível identificar AC em 29

cromossomos autossômicos e no cromossomo sexual X. Este trabalho mostrou também, que os cromossomos X das fêmeas são, geralmente, mais frágeis do que os cromossomos X dos machos (AHMAD, 2008). Esta informação presente na literatura afronta com os dados obtidos no presente estudo, no qual não foram observadas diferenças significativas entre o cromossomo X de fêmeas e machos.

No que se refere à localização das aberrações nos cromossomos em que as portam, foi observado que a região proximal apresentou o menor índice de AC, as quais se concentraram nas regiões mediana e distal em relação ao centrômero. Slota e colaboradores (2000) analisando vacas híbridas encontraram as AC reunidas na região mediana dos braços longos dos cromossomos analisados. Barrios e colaboradores (1989) mostraram que as regiões que apresentaram maior frequência de AC foram a mediana e a distal em relação ao centrômero, após a exposição de cultivos de linfócitos à radiação ionizante.

Nos cromossomos dos cervídeos são encontrados grandes blocos de heterocromatina centromérica. Em rearranjos cromossômicos que levam a formação de cromossomos de dois braços, com o passar do tempo, é observada a perda ou diminuição da heterocromatina centromérica. Como a maioria dos cromossomos acrocêntricos possuem heterocromatina centromérica, é possível que esta contribua com a organização estrutural desses cromossomos (NEITZEL, 1987). Certos trabalhos mostram que, em humanos, a maioria das AC e dos sítios frágeis estão localizadas nas regiões de heterocromatina constitutiva (MARLHENS et al., 1986; MIRÓ et al., 1987). Alguns pontos de quebras e sítios frágeis são encontrados na heterocromatina intercalar, que é um tipo de eucromatina que possui propriedade da heterocromatina constitutiva (LAIRD et al., 1987; MIRÓ et al., 1987). Em contraste com esses dados, o presente trabalho mostrou que a maior parte das AC não foram localizadas em regiões de heterocromatina constitutiva.

Dos 35 pares cromossômicos, foram localizadas AC em 21 pares autossômicos e no cromossomo sexual X que se concentraram nas regiões mediana e distal em relação ao centrômero. Apesar dos trabalhos presentes na literatura indicarem que a DXR causa AC em regiões distribuídas ao acaso nos cromossomos, apontando que esse é um poderoso agente mutagênico que não causa quebras em sítios-específicos (NEWSOME e LITTLEFIELD, 1975; COQUELLE et al., 1997), os dados apresentados neste estudo não

evidenciaram a aleatoriedade da ação da DXR. Isso pode ser explicado pelo fato de 13 pares cromossômicos de autossomos e o cromossomo sexual Y não terem exibido nenhum tipo de AC e, teoricamente, se a DXR é aleatória, em 600 metáfases analisadas todos os cromossomos deveriam ter apresentado AC, mesmo que em baixa frequência.

Outra justificativa plausível para o grande número de cromossomos envolvidos nas quebras (21 em 34 pares) e para a maior ocorrência de AC em alguns cromossomos em relação a outros é a fragilidade que estes podem apresentar. Os cromossomos do cariótipo basal da família Cervidae, retidos em *M. gouazoubira*, passaram por profundas modificações para originar os cariótipos das outras espécies do gênero, ou seja, sofreram inúmeras fusões cêntricas, em tandem e inversões diminuindo o número diplóide durante o processo de especiação (ABRIL et al., 2010).

A fragilidade cromossômica encontrada em *M. gouazoubira* em níveis superiores às outras espécies do gênero pode ter uma relação com o cariótipo ancestral ter sofrido tantos rearranjos para originar os cariótipos derivados (NEITZEL, 1987; FONTANA e RUBINI, 1990; DUARTE e JORGE, 1998; ABRIL et al., 2010; VARGAS-MUNAR, 2010). Em 2003, Pevzner e Tesler apresentaram um modelo para explicar a evolução cromossômica dos mamíferos, conhecido como “Ruptura Frágil”, o qual afirmava que, no genoma dos mamíferos, existem regiões frágeis (pequenas sequências) e regiões sólidas (longas sequências), as quais apresentam diferentes probabilidades de se quebrar. As regiões sólidas estão protegidas contra a ocorrência de rearranjos, uma vez que estas correspondem aos blocos de genes funcionais, que desempenham funções vitais ao desenvolvimento de um organismo. Já as regiões de fragilidade estão propensas a se quebrarem e se reorganizarem, representando, por exemplo, uma proporção pequena de blocos de genes envolvidos na capacidade adaptativa, devido ao alto custo evolutivo para se eliminar mutações que atingem vários genes simultaneamente (PENG et al., 2006; BECKER e LENHARD, 2007).

O modelo da fragilidade cromossômica pode ser evidenciado por meio da análise dos rearranjos que ocorreram nos genomas do homem e do rato ao longo da evolução cromossômica a partir de um ancestral comum, que mostra a existência de aglomerados de pontos de quebras situados próximos uns dos outros em determinados cromossomos (PEVZNER e TESTER, 2003).

A identificação dos pares cromossômicos com maiores taxas de aberrações no presente trabalho é o ponto de partida para futuros estudos do processo de evolução cariotípica do gênero *Mazama*. Utilizando sondas cromossômicas dos referidos pares pode-se conhecer com precisão, como os mesmos se comportaram ao longo da diferenciação cariotípica entre as espécies. Assim, será possível saber se as altas taxas de quebras nestes pares causadas pela DXR, um agente mutagênico aleatório, tem relação com os rearranjos ocorridos ao longo da evolução cromossômica.

VI CONCLUSÕES

Através dos dados obtidos pode-se concluir que o tipo de AC mais frequente tanto nos cultivos celulares controle como também nos cultivos celulares submetidos ao tratamento com a DXR foram as quebras cromatídicas. A DXR não causou AC aleatórias nos cromossomos de *Mazama gouazoubira*, indicando que as AC podem estar localizadas em pontos específicos. Alguns cromossomos apresentaram mais AC do que outros, fato que pode estar relacionado com a fragilidade cromossômica da espécie em questão. As regiões cromossômicas mediana e distal foram aquelas em que as AC se concentraram com maior frequência. Tais dados sugerem que estas regiões dos cromossomos podem estar mais suscetíveis à fragilidade cromossômica e consequentemente, poderiam estar envolvidas com a diferenciação cariotípica das espécies.

VII REFERÊNCIAS

- 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. **Neotropical Cervidology. Biology and Medicine of Latin American Deer**. FUNEP e IUCN, Jaboticabal, p. 190-201, 2010.
- AHMAD, A.; MUHAMMAD, A.; BABAR, M. E.; KHALID, J.; NADEEM, A. Expression and identification of folate-sensitive fragile sites in British Suffolk sheep (*Ovis aries*). **Journal of Genetics**, v. 87, p. 219-227, 2008.

- AKMAN, S. A.; DOROSHOW, J. H.; BURKE, T. G.; DIZDAROGLU, M. DNA base modifications induced in isolated human chromatin by NADH dehydrogenase-catalysed reduction of doxorubicin. **Biochemistry**, v. 31, p. 3500-3506, 1992.
- ALMEIDA, C. A. S.; BONVICINO, C. R.; LACHTERMACHER, M.; MOREIRA, M. A. M.; OCÍLIO, R.; SEUÁNEZ, H. N. Técnicas de avaliação da diversidade genética. *In*: GARAY, I.; DIAS, B. **Conservação da Biodiversidade em Ecossistemas Tropicais**. Petrópolis: Vozes, p. 430, 2001.
- ANTUNES, L. M.; TAKAHASHI, C. S. Effects of high doses of vitamins C and E against doxorubicin-induced chromosomal damage in Wistar rat bone marrow cells. **Mutation Research**, v. 419, p. 137-143, 1998.
- APLAN, P. D.; CHERVINSKY, D. S.; STANULLA, N.; BURHANS, W. C. Site-specific DNA cleavage within the MLL breakpoint cluster region induced by topoisomerase II inhibitors. **Blood**, v. 87, p. 2649-2658, 1996.
- AULA, P.; KOSKULL, H. Distribution of Spontaneous Chromosome Breaks in Human Chromosomes. **Human Genetics**, v. 32, p. 143-148, 1976.
- BACHMANN, E.; WEBER, E.; ZBINDEN, G. Effects of seven anthracycline antibiotics on electrocardiogram and mitochondrial function of rat hearts. **Agents Actions**, v. 5, p. 383-393, 1975.
- BARRIOS, L.; MIRÓ, R.; CABALLÍN, M. R.; FUSTER, C.; GUEDEA, F.; SUBIAS, A.; EGOZCUE, J. Cytogenetic Effects of Radiotherapy. **Cancer Genetics and Cytogenetics**, v. 41, p. 61-70, 1989.
- BECKER, T. S.; LENHARD, B. The random versus fragile breakage models of chromosome evolution: a matter of resolution. **Molecular Genetics & Genomics**, v. 278, p. 487-491, 2007.
- 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. **Neotropical Cervidology. Biology and Medicine of Latin American Deer**. FUNEP e IUCN, Jaboticabal, p. 190-201, 2010.
- BLUM, R. H.; CARTER, S. K. Adriamycin, a new anticancer drug with significant clinical activity. **Annals of Internal Medicine**, v. 80, p. 249-259, 1979.

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

BRYANT, P. The signal model: a possible explanation for the conversion of DNA double-strand breaks into chromatid breaks. **International Journal of Radiation Biology**, v. 73, p. 243-251, 1998.

COHEN, M. M. The Specific Effects of Streptonigrin Activity on Human Chromosomes in Culture. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 2, p. 271-279, 1963.

COQUELLE, A.; PIPIRAS, E.; TOLEDO, F.; BITTUN, G.; DEBATISSE, M. Expression of fragile sites triggers intrachromosomal mammalian gene amplification and sets boundaries to early amplicons. **Cell**, v. 89, p. 215-225, 1997.

DALLEDONNE, I.; MILZANI, A.; CONTINI, P.; BERNARDINI, P.; COLOMBO, R. Interaction of cardiac α -actinin and actin in the presence of doxorubicin. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 56, p. 229-238, 1992.

DIZDAROGLU, M.; KIRKALI, G.; JARUGA, P. Formamidopyrimidines in DNA: mechanisms of formation, repair, and biological effects. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 45, p. 1610-1621, 2008.

DUARTE, J. M. B. **Aspectos taxonômicos e citogenéticos de algumas espécies de cervídeos brasileiros**. Jaboticabal – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias. Tese de Mestrado, 153p., 1992.

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

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

DUARTE, J. M. B.; JORGE, W. Análise taxonômica dos *Mazama* cinzas do Brasil. In: **Análise citogenética e taxonômica do gênero *Mazama* (Cervidae; Artiodactyla) no Brasil**. Não paginado. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 1998.

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

- DUARTE, J. M. B. Artiodactyla – Cervidae. *In*: CUCAS, Z.; SILVA, J. C. R.; CATÃO-DIAS, J. L. (ed.). **Tratado de Animais Selvagens, Medicina Veterinária**. Roca, São Paulo, p. 641-664, 2007.
- DUARTE, J. M. B.; GONZÁLEZ, S. **Neotropical Cervidology. Biology and Medicine of Latin American Deer**. FUNEP e IUCN, Jaboticabal, 393p, 2010.
- EISENBERG, J. F. The evolutionary history of the Cervidae with special reference to the South American radiation. *In*: WEMMER, C. **Biology and Management of the Cervidae**. Smithsonian Institution Press, Washington D.C., p. 60-64, 1987.
- ELSTON, C. W.; ELLIS, I. O. Patological prognostic factors in breast cancer: I: The value of histological grade in breast cancer: Experience from a large study with long term follow-up. **Histopathology**, v. 19, p. 403-410, 1991.
- EVANS, H. J.; O'RIORDAN, M. L. Human peripheral blood lymphocytes for the analysis of chromosome aberrations in mutagen tests. **Mutation Research**, v. 31, p. 135-148, 1975.
- FOLLE, G. A.; MARTÍNEZ-LÓPEZ, W.; BOCCARDO, E.; OBE, G. Localization of chromosome breakpoints: implication of the chromatin structure and nuclear architecture. **Mutation Research**, v. 404, p. 17-26, 1998.
- FONTANA, F.; RUBINI, M. Chromosomal evolution in Cervidae. **BioSystems**, v. 34, p. 157-174, 1990.
- FURTADO, M. A.; ALMEIDA, L. C. F.; FURTADO, R. A.; CUNHA, W. R.; TAVARES, D. C. Antimutagenicity of rosmarinic acid in Swiss mice evaluated by the micronucleus assay. **Mutation Research**, v. 657, p. 150-154, 2008.
- GALLOWAY, S. M.; AARDEMA, M. J.; ISHIDATE, M. JR.; IVETT, J. L.; KIRKLAND, D. J.; MORITA, T.; MOLESSO, P.; SOFUNI, T. Report from working group on *in vitro* tests for chromosomal aberrations. **Mutation Research**, v. 312, p. 241-261, 1994.
- GEIST, V. **Deer of the world: Their evolution, behavior and ecology**. Mechanicsburg: Stackpole books, 415p., 1998.
- GENUALDO, V.; PERUCATTI, A.; IANNUZZI, A.; MEO, G. P. di; SPAGNUOLO, S. M.; CAPUTI-JAMBRENGHI, A.; COLETTA, A.; VONGHIA, G.; IANNUZZI, L. Chromosome fragility in river buffalo cows exposed to dioxins. **Journal of Applied Genetics**, v. 53, p. 221-226, 2012.

- GERMAN, J. Cytological evidence for crossing-over *in vitro* in human lymphoid cells. **Science**, v. 144, p. 298-3001; 1964.
- GILBERT, C.; ROPIQUET, A.; HASSANIN, A. Mitochondrial and nuclear phylogenies of Cervidae (Mammalia, Ruminantia): Systematics, morphology, and biogeography. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 40, p. 101-117, 2006.
- GLOVER, T. W.; STEIN, C. K. Chromosome breakage and recombination at fragile sites. **The American Journal of Human Genetics**, v. 43, p. 265-273, 1988.
- GROVES, C. P. Family Cervidae. In: PROTHERO, D. R.; FOSS, S. E. (ed.). **The Evolution of Artiodactyls**. Baltimore: Johns Hopkins University Press, p. 249-256, 2007.
- GRUBB, P. Order Artiodactyla. In: WILSON, D. E.; REEDER, D. M. (ed.). **Mammal species of the world, a taxonomic and geographic reference**. Baltimore: The John Hopkins University Press, p. 637-722, 2005.
- GUERRA, M. **Introdução à Citogenética Geral**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 142p., 1988.
- GÜLKAÇ, M. D.; AKPINAR, G.; ÜSTÜN, H.; KANLI, A. O. Effects of vitamin A on doxorubicin-induced chromosomal aberrations in bone marrow cells of rats. **Mutagenesis**, v. 19, p. 231-236, 2004.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, JMC. **Free radicals in biology and medicine**. Clarendon Press, Oxford, 2ª edição, 1989.
- HSU, T.C.; PATHAK, S.; CHEN, T. R. The possibility of latent centromeres and a proposed nomenclature system for total chromosome and whole arm translocations. **Cytogenetics and Cell Genetics**, v. 15, p. 41-49, 1975.
- ICZN. Opinion 1985 (Case 3018). *Cervus gouazoubira* Fischer, 1814 (currently *Mazama gouazoubira*; Mammalia, Artiodactyla): specific name conserved as the correct original spelling. **Bulletin of the Zoological Nomenclature**, 58:247, 2001.
- ISLAH, M.; HALSTEAD, B. W.; KADURA, I. A.; LI, B.; REID-HUBBARD, J. L.; FLICK, L.; ALTIZER, J. L.; DEAHL, J. T.; MONTEITH, D. K.; NEWTON, R. K.; WATSON, D. E. Relationships between genomic cell cycle, and mutagenic responses of TK6 cells exposed to DNA damaging chemicals. **Mutation Research**, v. 578, p. 100-116, 2005.
- Mazama gouazoubira*. Disponível em <www.iucnredlist.org>. Acesso em: 02 de junho de 2012.

- KASAHARA, S. **Introdução à pesquisa em citogenética de vertebrados**. 1ª ed. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 160p., 2009.
- KITADA, M.; HORIE, T.; AWAZU, S. Chemiluminescence associated with doxorubicin-induced lipid peroxidation in rat heart mitochondria. **Biochemical Pharmacology**, v. 48, p. 93-99, 1994.
- LAIRD, C.; JAFFE, E.; KARPEN, G.; LAMB, M.; NELSON, R. Fragile sites in human chromosomes as regions of late-replicating DNA. **Trends in Genetics**, v. 3, p. 274-280, 1987.
- LLAMBÍ, S.; COPPOLA, B.; GAGLIARDI, R.; TEJEDOR, T.; ARRUGA, M. V. 5'azacytidine effect in bovine lymphocytes chromosomes. **Acta Agronômica**, v. 57, p. 61-64, 2008.
- MARTINEZ, E. R. M.; ZAWADZKI, C. H.; FORESTI, F.; OLIVEIRA, C. Cytogenetic analysis of five *Hypostomus* species (Siluriformes, Loricariidae). **Genetics and Molecular Biology**, v. 34, p. 562-568, 2011.
- MARLHENS, F.; ACHKAR, W. A.; AURIAS, A.; COUTURIER, J.; DUTRILLAUX, A. M.; GERBAULT-SEREAU, M.; HOFFSCHIR, F.; LAMOLIATTE, E.; LEFRANÇOIS, D.; LOMBARD, M.; MULIERIS, M.; PRIEUR, M.; PROD'HOMME, M.; SABATIER, L.; VIEGAS-PÉQUIGNOT, E.; VOLOBOUEV, V.; DUTRILLAUX, B. The rate of chromosome breakage is age dependent in lymphocytes of adult controls. **Human Genetics**, v. 73, p. 290-297, 1986.
- MERINO, M. L.; ROSSI, R. V.; GROVES, C. Origin, systematics and morphological radiation. In: DUARTE, J. M. B.; GONZÁLEZ, S. **Neotropical Cervidology. Biology and Medicine of Latin American Deer**. FUNEP e IUCN, Jaboticabal, p. 2-11, 2010.
- MIRÓ, R.; CLEMENTE, I. C.; FUSTER, C.; EGOZCUE, J. Fragile sites, chromosome evolution, and human neoplasia. **Human Genetics**, v. 75, p. 345-349, 1987.
- 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**, v.20, p.13, 1960.
- NADEAU, J. H.; TAYLOR, B. A. Lengths of chromosomal segments conserved since divergence of man and mouse. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 81, p. 814-818, 1984.
- NATARAJAN, A. T. Molecular aspects of the origin of chromosome structural changes. **Biological Zentralbl**, v. 95, p. 139-156, 1976.

- NATARAJAN, A. T.; OBE, G. Molecular mechanisms involved in the production of chromosomal aberrations. Part I: Utilization of neurospora endonuclease for the study of aberration production in G2 stage of the cell cycle. **Mutation Research**, v. 52, p. 137-149, 1978.
- NATARAJAN, A. T. Chromosome aberrations: past, present and future. **Mutation Research**, v. 504, p. 3-16, 2002.
- NEITZEL, H. Chromosomenevolution in der Familie der Hirsche (Cervidae). **Bongo**, Berlin, v. 3, p. 27-38, 1979.
- NEITZEL, H. Chromosome evolution of Cervidae: Karyotypic and molecular aspects. *In*: OBE, G.; BASLER, A. (eds.). **Cytogenetics, basic and applied aspects**, Springer Verlag, Berlin, p. 90-112, 1987.
- NEWSOME, Y. L.; LITTLEFIELD, L. G. Adriamycin-induced chromosome aberrations in human fibroblasts. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 55, p. 1061-1064, 1975.
- NOWAK, R. M. Mammals of the world. London: **The Johns Hopkins University Press**, 5 ed. p. 1629, 1991.
- O'DRISCOLL, M.; JEGGO, P. A. The role of double-strand break repair – insights from human genetics. **Nature Reviews/ Genetics**, v. 7, p. 45-54, 2006.
- PARIS CONFERENCE. Standardization in human cytogenetics. **Birth Defects: Original Article Series**. The National Foundation – March of Dimes, New York, v. 8, 1971.
- PENG, Q.; PEVZNER, P. A.; TESLER, G. The fragile breakage versus random breakage models of chromosome evolution. **PLOS Computational Biology**, v. 2; p. 0100-0111, 2006.
- PEVZNER, P.; TESLER, G. Human and mouse genomic sequences reveal extensive breakpoint reuse in mammalian evolution. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, p. 7672-7677, 2003.
- PINDER, L.; LEEUWENBERG, F. Veado-catingueiro (*Mazama gouazoubira*, Fischer 1814). *In*: DUARTE, J. M. B. **Biologia e Conservação de Cervídeos Sul-Americanos: Blastocerus, Ozotoceros e Mazama**. FUNEP, Jaboticabal p. 60-67, 1997.
- PINTO, L. R. F.; FELZENSZWALB, I. Genética do câncer humano. *In*: RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. **Mutagênese Ambiental**. Canoas: ULBRA, p.29-48, 2003.

- PORTA, E. A.; JOHN, N. S.; MATSUMURA, L.; NAKASONE, B.; SABLAU, H. Acute adriamycin cardiotoxicity in rats. **Research Communications in Chemical Pathology Pharmacology**, v. 41, p. 125-137, 1983.
- QUILES, J. L.; HUERTAS, J. R.; BATTINO, M.; MATAIX, J.; RAMÍREZ-TORTOSA, M. C. Antioxidant nutrients and adriamycin toxicity. **Toxicology**, v. 180, p. 79-95, 2002.
- RADMAN, M.; JEGGO, P.; WAGNER, R. Chromosomal rearrangement and carcinogenesis. **Mutation Research**, v. 98, p. 249-264, 1982.
- RAO, P. N.; MAHAGAOKAR, S.; FREIREICH, E. J.; LOO, T. L.; GOTTLIEB, J. A. Schedule-dependent synergistic cytotoxicity of arabinofuranosylcytosine with adriamycin or 3,6-bis(5-chloro-2-piperidinyl)-2,5-piperazinedione in cultured cells. **Cancer Research**, v. 35, p. 2996-3000, 1975.
- RESENDE, F. A.; TOMAZELLA, I. M.; BARBOSA, L. C.; PONCE, M.; FURTADO, R. A.; PEREIRA, A. C.; BASTOS, J. K.; SILVA, M. L. A.; TAVARES, D. C. Effect of the dibenzylbutyrolactone lignan (-)-hinokinin on doxorubicin and methyl methanesulfonate clastogenicity in V79 Chinese hamster lung fibroblasts. **Mutation Research**, v. 700, p. 62-66, 2010.
- REVELL, S. H. The accurate estimation of chromatid breakage and its relevance to a new interpretation of chromatid aberrations induced by ionizing radiations. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 150, p. 563-589, 1959.
- RIBEIRO, L. R.; MARQUES, E. K. A importância da mutagênese ambiental na carcinogênese humana. In: RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. **Mutagênese Ambiental**. Canoas: ULBRA, p. 21-28, 2003.
- ROBINSON, T. J.; ELDER, F. F. B. Cytogenetics: its role in wildlife management and the genetic conservation of mammals. **Biological Conservation**, v. 63, p. 47-51, 1993.
- ROSSI, R. V. **Taxonomia de *Mazama* Rafinesque, 1817 do Brasil (Artiodactyla; Cervidae)**. Não paginado. Tese de Mestrado – Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil, 2000.
- ROUET, P.; SMITH, F.; JASIN, M. Introduction of double-strand breaks into the genome of mouse cells by expression of a rare-cutting endonuclease. **Molecular and Cellular Biology**, v. 14, p. 8096-8106, 1994.

- SAVAGE, J. R. K. Classification and relationships of induced chromosomal structural changes. **Journal of Medical Genetics**, v. 12, p. 103-122, 1975.
- SAVAGE, J. R. K. Update on target theory as applied to chromosome aberrations. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 22, p. 198-207, 1993.
- SAVAGE, J. R. K.; SIMPSON, P. J. FISH "painting" patterns resulting from complex exchanges. **Mutation Research**, v. 312, p. 51-60, 1994.
- SAX, K. Chromosome aberrations induced by X-rays. **Genetics**, v. 23, p. 494-516, 1938.
- SAX, K. An analysis of X-ray induced chromosomal aberrations in *Tradescantia*. **Genetics**, v. 25, p. 41-68, 1940.
- SAX, K. Types and frequencies of chromosomal aberrations induced by X-rays. **Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology**, v. 9, p. 93-103, 1941.
- SEABRIGHT, A. T. A rapid banding technique for human chromosomes. **The Lancet**, v. 2, p. 971-972, 1971.
- SINGAL, P.K.; DEALLY, C. M. R.; WEINBERG, L. E. Subcellular effects of adriamycin in the heart: A concise review. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 19, p. 817-828, 1987.
- SINGAL, P. K.; ILISKOVIC, N. Adriamycin cardiomyopathy. **The New England Journal of Medicine**, v. 339, p. 900-905, 1998.
- SLOTA, E.; DANIELAK-CZECH, B.; PIETRASZEWSKA, J.; KOZUBSKA-SOBOCIN'SKA, A. Preliminary identification of the fragile X in two crossbred cows. **Veterinárni Medicína**, v. 45, p. 308-310, 2000.
- SUGIMURA, T. Nutrition and dietary carcinogens. **Carcinogenesis**, v.21, p.387-395, 2000.
- SWIERENGA, S. H. H.; HEDDLE, J. A.; SIGAL, E. A.; GILMAN, J. P. W.; BRILLINGER, R. L.; DOUGLAS, G. R.; NESTMANN, E. R. Recommended protocols based on a survey of current practice in genotoxicity testing laboratories, IV. Chromosome aberrations and Sister-Chromatid exchange in Chinese hamster ovary, V79 Chinese hamster lung and human lymphocyte cultures. **Mutation Research**, v. 246, p. 301-322, 1991.
- 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.

- TAN, C.; ETCUBANAS, E.; WOLLNER, N.; ROSEN, G.; GILLADOGA, A.; SHOWEL, J.; MURPHY, L. M.; KRAKOFF, I. H. Adriamycin: An antitumor antibiotic in the treatment of neoplastic diseases. **Cancer**, v. 32, p. 9-17, 1973.
- TAVARES, D. C.; CECCHI, A. O.; ANTUNES, L. M. G.; TAKAHASHI, C. S. Protective effects of the amino acid glutamine and of ascorbic acid against chromosomal damage induced by doxorubicin in mammalian cells. **Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis**, v. 18, p. 153-161, 1998.
- THOR, A. D.; LIU, S.; MOORE II, D. H.; EDGERTON, S. M. Comparison of mitotic index, *in vitro* bromodeoxyuridine labeling, and MIB-1 assays to quantitate proliferation in breast cancer. **Journal of Clinical Oncology**, v. 17, p. 470-477, 1999.
- TOFFOLI, G.; CORONA, G.; GIGANTE, M.; BOIOCCHI, M. Inhibition of Pgp activity and cell cycle-dependent chemosensitivity to doxorubicin in the multidrug-resistant LoVo human colon cancer cell line. **European Journal of Cancer**, v. 9, p. 1591-1597, 1996.
- 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**, v. 9, p. 1545-1549, 2010.
- VIG, B. K. Chromosome aberrations induced in human leukocytes by the antileukemic antibiotic adriamycin. **Cancer Research**, v. 31, p. 32-37, 1971.
- VISLOBOKOVA, I. A. Fossil Deer of Eurasia. **Transactions of the Paleontological Institute**, v. 240, 1990.
- WALKER, E. Mammals of the world. **Baltimore and London: John Hopkins University Press**, p. 1398, 1991.
- WEMMER, C. Deer-Status survey and Conservation Action Plan. **International Union for Conservation of Nature/SSC Deer Specialist Group**, Cambridge, p. 107, 1998.
- YALÇIN, E.; ORUÇ, E.; ÇAVUSOĞLU, K.; YASPAR, K. Protective role of grape seed extract against doxorubicin-induced cardiotoxicity and genotoxicity in Albino mice. **Journal of Medicinal Food**, v. 13, p. 917-925, 2010.
- YANG, F.; CARTER, N.P.; FERGUSON-SMITH, M. A. A comparative study of karyotypes of muntjacs by chromosome painting. **Chromosoma**, v. 103, p. 642-652, 1995.

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

YOUNG, R. C.; OZOLS, R. F.; MYERS, C. E. The anthracycline antineoplastic drugs. **The New England Journal of Medicine**, v. 305, p. 139-153, 1981.

ZIRKLE, R. E.; BLOOM, W.; URETZ, R. B. Use of partial cell irradiation in studies of cell division. **Proceedings of the International Conference on the Peaceful Uses of Atomic Energy**, Geneva, v. 11, p. 273-282, 1956.