

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

**CARACTERIZAÇÃO DE HOMOLOGIAS ENTRE SONDAS DE
BACs DE BOVINO (*Bos taurus*) E CROMOSSOMOS DE
VEADO-CATINGUEIRO (*Mazama gouazoubira*): NOVAS
PERSPECTIVAS EM ESTUDOS INTRA E
INTERESPECÍFICOS DO GÊNERO *MAZAMA***

Agda Maria Bernegossi
Médica Veterinária

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

**CARACTERIZAÇÃO DE HOMOLOGIAS ENTRE SONDAS DE
BACS DE BOVINO (*Bos taurus*) E CROMOSSOMOS DE
VEADO-CATINGUEIRO (*Mazama gouazoubira*): NOVAS
PERSPECTIVAS EM ESTUDOS INTRA E
INTERESPECÍFICOS DO GÊNERO *MAZAMA***

Discente: Agda Maria Bernegossi

Orientador: Prof. Dr. José Maurício Barbanti Duarte

**Dissertação de mestrado apresentada à
Faculdade de Ciências Agrárias e
Veterinárias – Unesp, Campus de
Jaboticabal, como parte das exigências para
a obtenção do título de Mestre em Genética e
Melhoramento Animal**

B525c Bernegossi, Agda Maria
Caracterização de homologias entre sondas de BACs de bovino (Bos taurus) e cromossomos de veado-catingueiro (Mazama gouazoubira): novas perspectivas em estudos intra e interespecíficos do gênero Mazama / Agda Maria Bernegossi. -- Jaboticabal, 2021
69 p. : il., tabs., fotos

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal
Orientador: José Maurício Barbanti Duarte

1. Genética animal. 2. Citogenética. 3. Cromossomos. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal



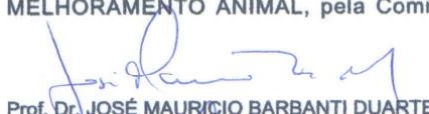
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

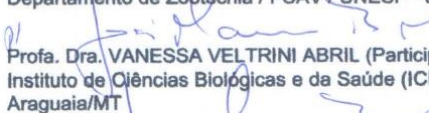
TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: CARACTERIZAÇÃO DE HOMOLOGIAS ENTRE SONDAS DE BACs DE BOVINO (*Bos taurus*) E CROMOSSOMOS DE VEADO-CATINGUEIRO (*Mazama gouazoubira*): NOVAS PERSPECTIVAS EM ESTUDOS INTRA E INTERESPECÍFICOS DO GÊNERO *MAZAMA*

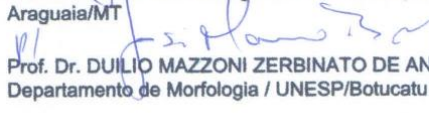
AUTORA: AGDA MARIA BERNEGOSSI

ORIENTADOR: JOSÉ MAURICIO BARBANTI DUARTE

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


Prof. Dr. JOSÉ MAURÍCIO BARBANTI DUARTE (Participação Virtual)
Departamento de Zootecnia / FCAV / UNESP - Jaboticabal


Profa. Dra. VANESSA VELTRINI ABRIL (Participação Virtual)
Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde (ICBS) - Campus Universitário do Araguaia CUA/UFMT / Pontal do Araguaia/MT


Prof. Dr. DÚLIO MAZZONI ZERBINATO DE ANDRADE SILVA (Participação Virtual)
Departamento de Morfologia / UNESP/Botucatu

Jaboticabal, 01 de setembro de 2021

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Agda Maria Bernegossi – Nascida em 01 de março de 1994, na cidade de Campinas, SP, Brasil. Graduada em Medicina Veterinária em dezembro de 2018, pela Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), câmpus de Botucatu. Realizou Intercâmbio como Bolsista do Programa Ciências sem Fronteiras com formação complementar pela National University of Ireland - Galway, no período de junho de 2014 a junho de 2015. Foi bolsista de iniciação científica PIBIC/CNPq junto ao Centro de Medicina e Pesquisa em Animais Selvagens (CEMPAS), departamento de Cirurgia Veterinária e Reprodução Animal FMVZ/UNESP; e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) junto ao Núcleo de Pesquisa e Conservação de Cervídeos (NUPECCE), Departamento de Zootecnia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV), UNESP, câmpus de Jaboticabal. Realizou parte de sua pesquisa como Estagiária de Pesquisa no Exterior pela FAPESP no Institute of Molecular and Cellular Biology, Novosibirsk, Rússia. Ingressou no mestrado em março de 2019 no Programa de Genética e Melhoramento Animal da FCAV/UNESP com projeto financiado pela FAPESP. Durante a execução desse trabalho, usufruiu de Bolsa Pesquisa Estágio no Exterior, desenvolvendo parte da pesquisa no Veterinary Research Institute em Brno, República Tcheca.

“[...]

Uma flor nasceu na rua!
Passem de longe, bondes, ônibus, rio de aço do tráfego.

Uma flor ainda desbotada
ilude a polícia, rompe o asfalto.
Façam completo silêncio, paralistem os negócios,
garanto que uma flor nasceu.

Sua cor não se percebe.
Suas pétalas não se abrem.
Seu nome não está nos livros.
É feia. Mas é realmente uma flor.

Sento-me no chão da capital do país às cinco horas da tarde
e lentamente passo a mão nessa forma insegura.

[...]

É feia. Mas é uma flor. Furou o asfalto, o tédio, o nojo e o ódio.”

(Trecho do poema “A Flor e a Náusea” de Carlos Drummond de Andrade)

Aos meus pais **José e Elione**
pelo amor incondicional e constante incentivo,
pilares da minha formação
Dedico

AGRADECIMENTOS

Agradeço...

Ao meu orientador, Prof. Dr. José Maurício Barbanti Duarte, pela oportunidade e confiança em desenvolver esse trabalho sob sua orientação. Muito obrigada pela preocupação com minha formação profissional.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, processo nº 2018/25769-9) e à Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” pelos recursos e bolsas investidos nesse trabalho.

Ao Núcleo de Pesquisa e Conservação de Cervídeos (NUPECCE) e seus integrantes e ex-integrantes que me acolheram com carinho. Agradeço aos amigos Isabel, Rullian, Valdir, Maria Helena, Pedro, Francisco, Marina, Jefferson, Márcio, David, Liss, Bianca, Yuki, Cláudia e dona Lúcia pela boa convivência e valiosa troca durante meu mestrado; especialmente a Eluzai e a Gabrielle, pela amizade e força constante, que ajudaram a dissipar inseguranças nos momentos complicados.

Ao técnico de laboratório João Airton Bôer pela ajuda laboratorial, conversas e conselhos, tão importantes para o desenvolvimento do projeto.

A aqueles que serviram de inspiração Dr. Duílio e Dra. Iara, obrigada pelas importantes demonstrações de sabedoria.

Às minhas orientadas de iniciação científica Júlia e Marina, pela confiança e carinho.

À toda equipe do Veterinary Research Institute, pela parceria e pelas enriquecedoras discussões das análises citogenéticas, em especial a Dra. Miluse Vozdova, Dra. Halina Cernohorska, Dra. Svatava Kubickova e Ma. Dita Kadlcikova.

Aos meus amigos Barbara, Matheus, Julia, Luis, Victor, Neylon, Amanda, Rachel, Thais, Nanda, e todas as LUZES, que sempre estiveram ao meu lado, pela amizade incondicional e pelo apoio demonstrado ao longo da minha trajetória.

Ao meu companheiro Pedro Henrique, que me incentiva todos os dias e suportou todos os meus momentos de estresse durante o processo, pela dedicação, carinho e compreensão.

Aos meus pais, Elione e José, que sempre primaram pela minha educação, agradeço pelo carinho, afeto, dedicação e cuidado que me deram durante toda a minha existência; a minha irmã Aline, exemplo de pesquisadora, pelas incontáveis horas de ajuda e fonte inesgotável de suporte emocional; e a minha irmã Ana, pela amizade e atenção dedicadas sempre que precisei.

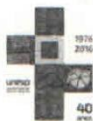
À Brisa, vira-lata mais linda, pelo companheirismo diário.

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

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	iv
ABSTRACT	v
1. INTRODUÇÃO	01
2. REVISÃO DE LITERATURA	03
2.1. A família Cervidae e a diversidade cariotípica dos cervídeos.....	03
2.2. A complexidade do Gênero <i>Mazama</i>	07
2.3. A espécie <i>Mazama gouazoubira</i> e sua importância como base nos estudos cariotípicos do gênero.....	12
2.4. Citogenética Molecular e sua importância nos estudos da família Cervidae.....	17
3. OBJETIVOS	23
4. MATERIAL E MÉTODOS	24
4.1. Amostras.....	24
4.2. Cultivo de Fibroblastos e Preparações Cromossômicas.....	24
4.2.1. Semeadura.....	24
4.2.2. Repique.....	25
4.2.3. Colheita.....	26
4.3. Banda G.....	26
4.4. Aquisição de clones BAC, Obtenção e Marcação das sondas.....	27
4.4.1. Aquisição dos clones BAC.....	27
4.4.2. Preparo do DNA de BAC.....	29
4.4.3. Marcação dos clones BAC.....	30
4.5. Hibridização <i>in situ</i> fluorescente.....	32

4.6. Biometria cromossômica e Idiograma.....	33
4.7. Mapa citogenético.....	33
5. RESULTADOS.....	34
5.1. Banda G e Idiograma.....	34
5.2. Eficácia das sondas de BACs.....	36
5.3 Rearranjos evolutivos entre bovino e veado-catingueiro e produção do mapa citogenético dos 106 novos marcadores.....	38
6. DISCUSSÃO.....	43
7.CONCLUSÃO.....	47
8. REFERÊNCIAS.....	47
9. APÊNDICE	55



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



CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto de pesquisa intitulado "**O uso de topótipos atuais para produção de genótipos e citótipos na revisão taxonômica do gênero *Mazama*: a base para a conservação das espécies**", protocolo nº 005433/19, sob a responsabilidade do Prof. Dr. José Mauricio Barbanti Duarte, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao Filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, no decreto 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), da FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS, UNESP - CÂMPUS DE JABOTICABAL-SP, em reunião ordinária de 16 de maio de 2019.

Vigência do Projeto	01/06/2019 a 30/05/2024
Espécie / Linhagem	Todas as espécies do Gênero <i>Mazama</i>
Nº de animais	45 espécies
Peso / Idade	Entre 8 e 40 kgs. Exemplares adultos (> 2 anos de idade)
Sexo	Animais adultos de qualquer sexo, preferivelmente machos
Origem	Natureza: Vida livre

Jaboticabal, 16 de maio de 2019.

Prof.ª Dr.ª Fabiana Pilarski
Coordenadora – CEUA

Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias
Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane, s/n CEP 14884-900 - Jaboticabal/ SP - Brasil
tel 16 3209 7100 www.fcav.unesp.br

CARACTERIZAÇÃO DE HOMOLOGIAS ENTRE SONDAS DE BACs DE BOVINO (*Bos taurus*) E CROMOSSOMOS DE VEADO-CATINGUEIRO (*Mazama gouazoubira*): NOVAS PERSPECTIVAS EM ESTUDOS INTRA E INTERESPECÍFICOS DO GÊNERO *MAZAMA*

RESUMO – A família Cervidae é reconhecida por uma acentuada diversidade cariotípica, reflexo de sua elevada taxa de evolução cromossômica. Os cervídeos neotropicais do gênero *Mazama* destacam-se por um expressivo polimorfismo cromossômico. Embora as espécies desse gênero demonstrem uma elevada variação nos valores de seus números diploides ($2n$), elas são morfologicamente semelhantes e estão intimamente relacionadas. Por consequência, o grupo é cercado de incertezas taxonômicas. A evolução cromossômica das espécies do gênero a partir do cariótipo hipotético ancestral, retido pelo veado-catingueiro (*Mazama gouazoubira*, $2n = 70$), é pouco compreendida e carece de análise citogenética molecular. Dessa forma, o presente estudo caracterizou as homologias cromossômicas entre bovino (*Bos taurus*, $2n = 60$) e *M. gouazoubira* usando uma combinação de clones cromossomos artificiais de bactéria (BAC) derivados do genoma bovino. Por hibridização *in situ* fluorescente, foi construído um mapa citogenético com 106 novos marcadores para os 34 pares de autossomos e para o cromossomo X do veado-catingueiro. As sondas de BACs de bovino mostraram-se satisfatórias para o estabelecimento de marcadores cromossômicos em cervídeos. Foi demonstrado que as diferenças evolutivas entre o cariótipo de *B. taurus* e os cromossomos do *M. gouazoubira* incluem 5 fissões e uma fusão em tandem em bovino. Cada grupo de sondas de BACs derivadas dos pares cromossômicos 1, 2, 5, 6, 8 e 9 apresentaram sinais de hibridização em dois cromossomos diferentes, enquanto os pares 28 e 26 estão fusionados em tandem em um único cromossomo acrocêntrico em *M. gouazoubira*. Para os demais cromossomos, as BACs derivadas do mesmo autossomo bovino apresentaram sinais em um único par cromossômico no veado-catingueiro. Além disso, as análises detectaram que os homólogos aos pares do autossomo 1 e do cromossomo X apresentaram rearranjos intracromossômicos no *M. gouazoubira*. Sendo assim, espera-se que os estudos futuros usando os marcadores produzidos resultem em um grande conhecimento taxonômico e reprodutivo para o gênero os cervídeos neotropicais.

Palavras-chave: cariótipo ancestral, citogenética molecular, evolução cromossômica, mapa citogenético.

**CHARACTERIZATION OF HOMOLOGIES BETWEEN BOVINE BAC PROBES
(*Bos taurus*) AND GRAY BROCKET DEER (*Mazama gouazoubira*)
CHROMOSOMES: A NEW PERSPECTIVE ON INTRA AND INTERSPECIFIC
STUDIES OF THE GENUS *MAZAMA***

ABSTRACT – The Cervidae family presents a marked karyotypic variation as a reflection of its high rate of chromosome evolution. The Neotropical deer from the genus *Mazama* stands out for its expressive chromosomal polymorphism. Although the species of the genus differ in the values of their diploid number ($2n$), they are closely related and similar morphologically. Due to this, the group exhibits taxonomic uncertainties. The chromosomal evolution of the *Mazama* species from the hypothetical ancestral karyotype, retained by the gray brocket *Mazama gouazoubira* ($2n = 70$), is poorly understood and lacks molecular cytogenetic analysis. Then, the present study revealed chromosomal homologies between bovine (*Bos taurus*, $2n = 60$) and *M. gouazoubira* using a combination of bacterial artificial chromosome (BAC) clones derived from cattle. By fluorescent *in situ* hybridization, we constructed a cytogenetic map with 106 new markers to the 34 gray brocket autosomes and the X chromosome. Our results showed that bovine BAC probes proved to be satisfactory for the establishment of chromosomal markers in deer. The evolutionary differences between the bovine and gray brocket deer chromosomes include five fissions and one tandem fusion in the cattle. Each group of BAC probes derived from bovine chromosomes pairs 1, 2, 5, 6, 8, and 9 presented hybridization signals on two different chromosomes, while pairs 28 and 26 are fused in tandem on a single acrocentric chromosome in *M. gouazoubira*. For the other chromosomes, the BAC probes derived from the same bovine autosome showed signals in a unique chromosome pair in *M. gouazoubira*. Moreover, we detected that the homologous to the autosome pair 1 and X chromosome are intrachromosomally rearranged in *M. gouazoubira*. Therefore, it is expected that future studies using the produced markers result in great taxonomic and reproductive knowledge for brocket deer.

Keywords: ancestral karyotype, chromosome evolution, cytogenetic map, molecular cytogenetics.

1. INTRODUÇÃO

Os cervídeos, pertencentes à ordem Cetartiodactyla e a família Cervidae, apresentam uma acentuada diversidade cariotípica que parece ser reflexo de uma das taxas de evolução cromossômica mais elevadas dentro da classe dos mamíferos (Fontana e Rubini, 1990). A grande pluralidade de cariótipos, a observação frequente de rearranjos cromossômicos, assim como a presença de cromossomos B em várias espécies, tornam esse grupo atraente para estudos citogenéticos evolutivos (Neitzel, 1987; Abril et al., 2010a).

Nesse contexto, o gênero *Mazama* destaca-se por um expressivo polimorfismo cromossômico. As espécies *Mazama americana* ($2n = 42-53+0-7B$; $NF = 46-56$), *Mazama bororo* ($2n = 34-36+4-5B$; $NF = 46$), *Mazama nana* ($2n = 36-41+1-6B$; $NF = 58$), *Mazama gouazoubira* ($2n = 68-70+0-3B$; $NF = 70$) e *Mazama nemorivaga* ($2n = 67-70+2-8B$; $NF = 70$) exibem variação intraespecífica de seus números diploides devido à uma instabilidade cromossômica descrita para o gênero (Duarte, 1998; Abril et al., 2010b). A presença de cromossomos susceptíveis a quebras é vista como possível causa da origem de complexos rearranjos cromossômicos, frequentemente observados em indivíduos pertencentes ao gênero (Vargas-Munar et al., 2010; Tomazella et al., 2017). Apesar da grande diversidade cariotípica apresentada, as espécies de *Mazama* se apresentam intimamente relacionadas e morfologicamente semelhantes, fato que culminou em erros na classificação taxonômica com descrições de complexos de espécies crípticas (Duarte e Jorge, 2003; Duarte et al., 2008; Abril et al., 2010b; González e Duarte, 2020; Cifuentes-Rincón et al., 2020).

A citogenética tem sido indicada como uma importante ferramenta de auxílio para a classificação taxonômica dos cervídeos e no entendimento dos sucessivos rearranjos cromossômicos observados no grupo (Abril et al., 2010a; González e Duarte, 2020). Por bandamento cromossômico, no final da década de 80, foi proposto que o mecanismo primário de diferenciação cariotípica das espécies de cervídeos foi baseado em fusões cromossômicas, que reduzem o número diploide e alteram o número fundamental de braços cromossômicos (Neitzel, 1987; Fontana e Rubini, 1990). Adicionalmente, a espécie *Mazama gouazoubira* e a espécie *Hydropotes inermis* foram reconhecidas por terem retido o cariótipo basal hipotético da família

Cervidae, o qual apresenta $2n = 70$ e $NF = 70$, sendo 68 autossomos acrocêntricos, o X acrocêntrico e o maior do lote, e o Y metacêntrico e o menor do lote (Neitzel, 1987; Fontana e Rubini, 1990).

O bandamento cromossômico é considerado um indicador confiável de homologia cromossômica interespecífica, entretanto, quando é necessário comparar espécies filogeneticamente distantes ou que passaram por um rápido processo de evolução cariotípica, métodos mais avançados que detectam homologias ao nível do DNA são mais indicados (Rubes et al., 2008a; Graphodatsky et al., 2011). Assim sendo, o advento da hibridização *in situ* fluorescente (FISH) representa um grande salto qualitativo, permitindo uma análise mais fidedigna das relações filogenéticas e um entendimento mais acurado do contexto das translocações (Rubes et al., 2008a; Kasahara, 2009; Graphodatsky et al., 2011).

O conhecimento dos mecanismos de evolução a partir do cariótipo ancestral retido por *M. gouazoubira* é de extrema importância no auxílio das análises filogenéticas do gênero *Mazama*, que exhibe incessantes dúvidas quanto a sua taxonomia (Abril et al., 2010b; Cifuentes-Rincón et al., 2020; González e Duarte, 2020). Dessa forma, o presente estudo possui como finalidade a caracterização das homologias de sondas derivadas de clones BAC de *Bos taurus* no genoma da espécie *Mazama gouazoubira* e produção de um mapa citogenético dos novos marcadores produzidos. Acredita-se que essa caracterização representa um grande salto qualitativo nas análises filogenéticas, pois permitirá um estudo acurado do cenário dos rearranjos na evolução dos cromossomos nas espécies do gênero e um melhor entendimento do polimorfismo cromossômico característico do grupo. Consequentemente, o mapa citogenético poderá ser utilizado como base de referência para posteriores estudos, auxiliando na revisão taxonômica das espécies e na elucidação dos processos evolutivos que envolvem o grupo.

O presente trabalho foi avaliado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências Agrárias da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (processo nº 005433/19) que certificou sua conformidade com os princípios éticos na experimentação animal, adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A família Cervidae e a diversidade cariotípica dos cervídeos

A família Cervidae, pertencente à Ordem Cetartiodactyla, é composta por mamíferos ungulados de características morfológicas, ecológicas e genéticas altamente diversificadas (Duarte e González, 2010). São descritos, até o momento, 55 espécies e 18 gêneros (Zurano et al., 2019) distribuídos pelos continentes Europeu, Americano e Asiático (Merino e Rossi, 2010). Ocupam diversos habitats, como áreas alagadas (*Blastocerus dichotomus*) e florestas secas de terra firme (*Mazama americana*) (Duarte e Merino, 1997). Inclui desde indivíduos com tamanho reduzido, como a espécie *Pudu mephistophiles*, de peso aproximado de 6 quilos; até indivíduos de grande massa corporal, como a espécie *Alces alces*, que pode ultrapassar os 600 quilos (Merino e Rossi, 2010). Os machos da família desenvolveram chifres, estrutura óssea maciça e renovável originada a partir do osso frontal, com exceção da espécie *Hydropotes inermis*, em que ambos os sexos não possuem chifres, mas grandes caninos superiores. Apenas na rena, *Rangifer tarandus*, o chifre está presente em ambos os gêneros, masculino e feminino (Merino e Rossi, 2010).

Acredita-se que os primeiros representantes de Cervidae viveram em florestas tropicais na Eurásia no início do Mioceno, sendo sua origem datada para 13 mya (milhões de anos atrás) (Eisenberg, 1987; Geist, 1998; Zurano et al., 2019). Possivelmente, na transição do Mioceno e Plioceno, por volta de 5 mya, os cervídeos chegaram a América no Norte através do Estreito de Bering. A partir da formação do istmo do Panamá, no grande intercâmbio americano, os cervídeos da América do Norte expandiram-se para a América do Sul. Essa dispersão ocorreu durante a transição do Plioceno para o Pleistoceno, aproximadamente 2,5 mya (Webb, 2000). Segundo Gilbert et al. (2006), a colonização de novas espécies na América do Sul ocorreu em dois momentos: uma primeira vez no início do Plioceno pelo ancestral do clado dos cervídeos sul-americanos e, uma segunda vez, no final na transição entre Plio-Pleistoceno pelas espécies *Mazama americana* e *Odocoileus virginianus*. O registro fóssil indica que os pequenos cervídeos relacionadas aos gêneros *Pudu* e *Mazama* evoluíram durante o Plio-Pleistoceno e descenderam de ancestrais maiores

que apresentavam chifres mais desenvolvidos (Eisenberg, 2000; Webb, 2000; Gilbert et al., 2006). Como consequência a uma rápida radiação adaptativa, novas características, como corpo pequeno e chifre simples, foram adquiridas independentemente no gênero *Pudu* e nas espécies de *Mazama* (Webb, 2000; Gilbert et al., 2006).

Os cervídeos destacam-se entre os mamíferos pela história evolutiva pouco compreendida que culminou em recorrentes alterações no seu esquema de classificação (Duarte et al., 2008; Merino e Rossi, 2010; González e Duarte, 2020). Como reflexo do advento das técnicas citogenéticas e moleculares, a taxonomia da família tem sido rediscutida nas últimas décadas (Duarte et al., 2008; Abril et al., 2010b; Gutiérrez et al., 2017; Heckeberg, 2020; Cifuentes-Rincón et al., 2020). As abordagens mais modernas complementam os dados morfológicos e auxiliam no entendimento do contexto por trás das complexas relações entre os táxons (Duarte et al., 2008; González e Duarte, 2020).

Reconhecidos pela elevada taxa de evolução cromossômica e pela marcante diversidade de cariótipos, os cervídeos possuem número diploide variando de $2n=6$ nas fêmeas de *M. muntjak vaginalis* a $2n = 70$ em *M. gouazoubira* (Fontana e Rubini, 1990). Essa acentuada variedade cariotípica está relacionada a rearranjos cromossômicos que são comumente observados nas espécies da família (Neitzel, 1987; Fontana e Rubini, 1990; Duarte e Jorge, 1996; Abril et al., 2010a).

O mecanismo primário de evolução cariotípica dos cervídeos foi fundamentado em fusões cromossômicas, como translocações Robertsonianas e fusões em tandem, que levam à redução do número de cromossomos e alteram o número fundamental de braços cromossômicos (Neitzel, 1987; Fontana e Rubini, 1990). As subfamílias do grupo são descritas possuindo particularidades em seus rearranjos cromossômicos predominantes, apresentando mecanismos de evolução cariotípicas que diferem entre suas linhagens. As fusões cêntricas, por exemplo, são frequentemente associadas as diferenças cromossômicas na tribo Cervini, enquanto as fusões em tandem são o principal rearranjo conduzindo a rápida evolução de cariótipos na tribo Muntiacini (Fontana e Rubini, 1990; Yang et al., 1997a; Bonnet-Garnier et al., 2003; Chi et al., 2005). Adicionalmente, após análise citogenética de 30 espécies e 20 subespécies de cervídeos da tribo Rangiferini, dois ramos principais foram propostos para a árvore

filogenética da tribo: enquanto a evolução cromossômica do grupo principal de *Odocoileus* sofreu uma diferenciação pouco complexa, as espécies do gênero *Mazama* passaram por diversos rearranjos cromossômicos interespecíficos durante sua diferenciação cariotípica envolvendo inversões pericêntricas, fusões em tandem e fusões cêntricas (Figura 1) (Fontana e Rubini, 1990; Abril e Duarte, 2008; Abril et al., 2010a; Cifuentes-Rincón et al., 2020).

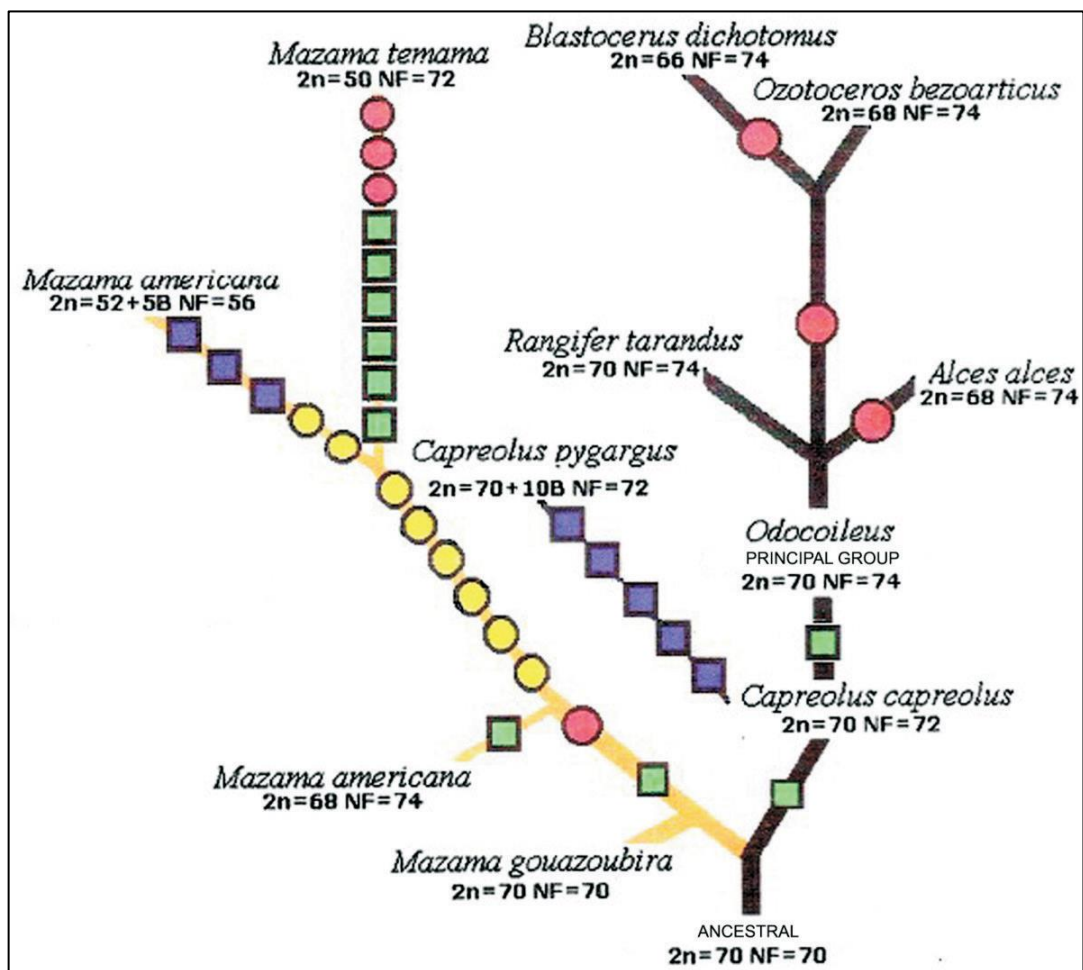


Figura 1. Diferenciação cariotípica e relações filogenéticas dentro da subfamília Capreolinae. Os quadrados verdes representam as inversões pericêntricas; os quadrados azuis os cromossomos B; os círculos amarelos as fusões em tandem e os círculos vermelhos as fusões cêntricas. O grupo principal de *Odocoileus* representam as espécies *O. virginianus borealis*, *O. hemionus*, *Pudu puda*, *Alces americana* e *Hippocamelus bisulcus*. 2n = número diploide e NF = número fundamental. (Abril et al., 2010a, adaptado de Fontana e Rubini, 1990).

A presença de cromossomos B, ou supernumerários, estabelecem uma variabilidade cromossômica nas espécies que os possuem visto que apresentam variação inter e intraindividual de seu número (Neitzel, 1987; Duarte, 1998; Abril et al., 2010a). São elementos extras no cariótipo que não seguem o modelo de herança mendeliana e exibem variação em número entre populações, indivíduos e até em nível celular (Camacho, 2005; Kasahara, 2009). Em Cervidae, os cromossomos B foram identificados no genoma dos gêneros *Capreolus* e *Mazama*, sendo os menores cromossomos do lote, exceto pelo cromossomo Y. Também, os cromossomos supernumerários apresentam variação intraindividual em todas as espécies de cervídeos portadores (Neitzel, 1987; Duarte e Jorge, 1996, 2003; Abril e Duarte, 2008; Abril et al., 2010a; Fiorillo et al., 2013). Alguns estudos moleculares passaram a abordar o conteúdo e a atividade de cromossomos B em cervídeos, porém, esses estudos se limitam as espécies *C. pygargus* ($2n = 70 + 0-14B$) e *M. gouazoubira* ($2n = 70 + 0-3B$). Demonstrou-se que apesar de apresentarem o mesmo cariótipo padrão ($2n = 70 + Bs$), essas espécies apresentam uma grande diferença no conteúdo genético de seus cromossomos supernumerários, sendo que na espécie *C. pygargus* o cromossomo B se mostrou mais derivado (Trifonov et al., 2013; Makunin et al., 2016).

A citogenética é uma importante ferramenta no auxílio da identificação de espécies da família Cervidae, sobretudo nos grupos que passaram por complexo e rápido processo de evolução cariotípica, tais como os gêneros *Mazama* e *Muntiacus* (Yang et al., 1995; Mudd et al., 2020; González e Duarte, 2020). Nos indivíduos desses gêneros, a diversidade de cariótipos acompanha reduzidos níveis de diferenciação morfológica, o que dificulta a categorização taxonômica das suas espécies (Yang et al., 1997a, b e c; Duarte e Jorge, 2003; Chi et al., 2005; Abril e Duarte, 2008; Abril et al., 2010b; Cifuentes-Rincón et al., 2020). O entendimento dos rearranjos cromossômicos e suas funções nos eventos de especiação, nesse contexto, ocupa parcela imprescindível nas análises filogenéticas (Duarte et al., 2008; González e Duarte, 2020).

2.2 A complexidade do gênero *Mazama*

O gênero *Mazama* Rafinesque, 1817 compreende um amplo grupo de cervídeos neotropicais. Sua distribuição se estende do Estado de Veracruz no México até a Argentina Central (Merino e Rossi, 2010). Integra espécies de tamanho pequeno a médio, nas quais os machos possuem chifres curtos, não ramificados e pontiagudos. Tais espécies apresentam hábitos solitários e ocupam habitats diversos, incluindo florestas tropicais chuvosas e secas, florestas montanhosas e savanas arbóreas (Duarte e González, 2010).

A taxonomia do gênero *Mazama* representa um dos maiores obstáculos aos pesquisadores do grupo por conta da dificuldade amostral, já que ocorrem em vegetação densa e possuem comportamento evasivo e, pela complexidade de seu processo evolutivo (Merino e Rossi, 2010; González et al., 2010). O grupo apresenta incertezas em sua taxonomia e a classificação das espécies do gênero é controversa (Duarte et al., 2008; González et al., 2010; Gutiérrez et al., 2017; Heckeberg, 2020). São reconhecidas até o momento nove espécies válidas de *Mazama*: *Mazama americana* Erxleben, 1777, *Mazama temama* Kerr, 1792, *Mazama gouazoubira* Fischer, 1814, *Mazama nemorivaga* Cuvier, 1817, *Mazama rufina* Bourcier e Pucheran, 1852, *Mazama nana* Hensel, 1872, *Mazama pandora* Merriam, 1908, *Mazama chunyi* HersHKovitz, 1959 e *Mazama bororo* Duarte, 1996 (Merino e Rossi, 2010; Gutiérrez et al., 2017). Entretanto, o agrupamento dessas espécies nesse táxon foi baseado sobretudo em caracteres morfológicos (Allen, 1915; Cabrera, 1960; Merino e Rossi, 2010). O advento das metodologias modernas demonstrou que a morfologia não é critério suficiente para avaliar questões taxonômicas do gênero devido ao elevado grau de convergência adaptativa (Duarte et al., 2008; Abril et al., 2010b; Gutiérrez et al., 2017; Heckeberg, 2020).

A condição não monofilética de *Mazama* tem sido extensamente relatada na literatura (Gilbert et al., 2006; Duarte et al., 2008; Hassanin et al., 2012; Gutiérrez et al., 2017; Heckeberg, 2020). Análises filogenéticas dos cervídeos da América do Sul separou com alto suporte as espécies de *Mazama* em duas subtribos que divergiram há aproximadamente 5 milhões de anos. A subtribo *Blastocerina* incluem as espécies de *M. gouazoubira* e *M. nemorivaga*, juntamente com outros gêneros como *Blastocerus*, *Ozotoceros* e *Hippocamelus*. Por sua vez, a subtribo *Odocoileina*

abrange as espécies *M. nana*, *M. bororo*, duas linhagens de *M. americana* e o gênero *Odocoileus* (Duarte et al., 2008; Gutiérrez et al., 2017; Heckeberg, 2020). Dentro de Blastocerina, essas análises demonstraram ainda que *M. gouazoubira* e *M. nemorivaga* não possuem ancestral comum exclusivo, não sendo intimamente relacionados do ponto de vista filogenético (Figura 2) (Duarte et al., 2008; Gutierrez et al., 2017; Heckeberg, 2020). Assim, dois novos gêneros devem ser propostos, um para a linhagem que inclui *M. gouazoubira* e *M. chunyi*, e outro para a espécie *M. nemorivaga* (Gutiérrez et al., 2017). Já a nomenclatura *Mazama* deve ser mantido nos táxons relacionados a espécie tipo do gênero *M. americana*, pertencente ao clado de Odocoileina (Gutiérrez et al., 2017; Cifuentes-Rincón et al., 2020).

Do ponto de vista cromossômico, o panorama encontrado é uma intrigante diversidade de cariótipos. Entre as espécies do gênero, o número diploide varia entre $2n = 32$ a $2n = 70$, entretanto, comumente é relatado um polimorfismo cromossômico intraespecífico característico (Duarte e Jorge, 2003; Abril e Duarte, 2008; Abril et al., 2010; Fiorillo et al., 2013; Valeri et al., 2018). Essa variação inter e intraespecífica está frequentemente associada a presença de cromossomos instáveis e susceptíveis a quebras, características responsáveis por sucessivos rearranjos cromossômicos (Vargas-Munar, 2010; Tomazella et al., 2017). Em decorrência desses aspectos, a classificação de *Mazama* não pode ser entendida sem uma análise citogenética minuciosa (Duarte et al., 2008; Abril et al., 2010b).

A espécie *Mazama americana*, por exemplo, exhibe um cenário singular que evidencia essa particularidade do grupo. No Brasil, foram descritas seis variedades cariotípicas que possuem coerência geográfica, denominadas citótipos. Os citótipos ainda podem apresentar variações no seus números cromossômicos, porém, menores do que as demonstradas entre eles. Cada variante possivelmente pode vir a ser descrita como nova espécie. Ainda, as possíveis novas espécies podem estar ameaçadas de extinção (Figura 3) (Abril et al., 2010b). Adicionalmente, a caracterização citogenética de um indivíduo coletado na Guiana Francesa, localidade de descrição da espécie, exibiu cariótipo que não se enquadra em nenhum citótipo previamente relatado para as variantes do Brasil apesar da grande semelhança morfológica. O achado corrobora a existência de um complexo de espécies crípticas e sugere que *Mazama americana* sensu Erxleben, 1777 é uma espécie diferente de

todos os citótipos já descritos na literatura (Cifuentes-Rincón et al., 2020).

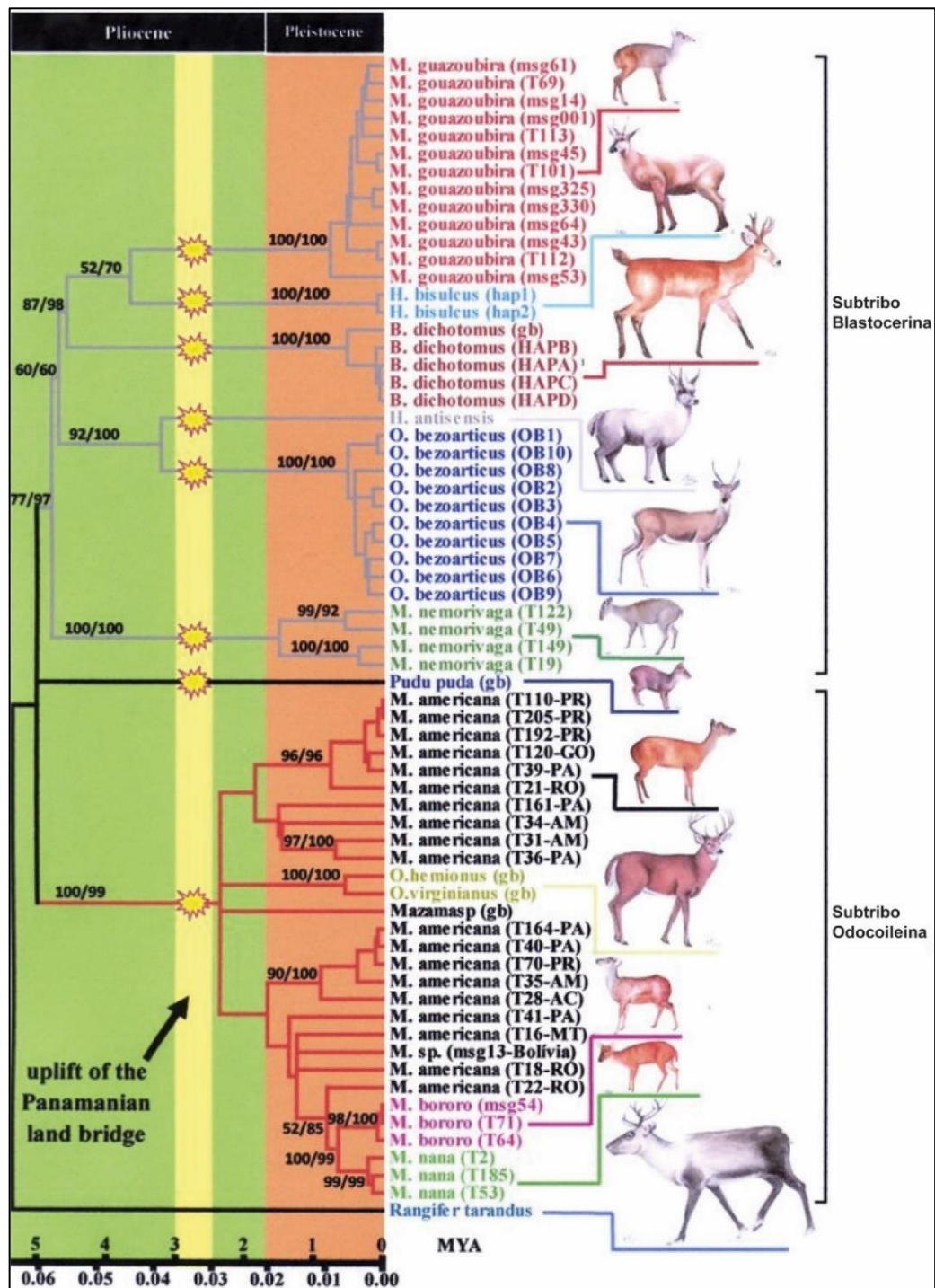


Figura 2. Relações filogenéticas dos cervídeos neotropicais (Odocoileini: Capreolinae: Cervidae) utilizando um fragmento de 935 pb do citocromo B do DNA mitocondrial. A análise separou com alto suporte as espécies de *Mazama* em duas subtribos que divergiram há aproximadamente 5 milhões de anos: subtribo Odocoileina e subtribo Blastocerina (adaptado de Duarte et al., 2008).

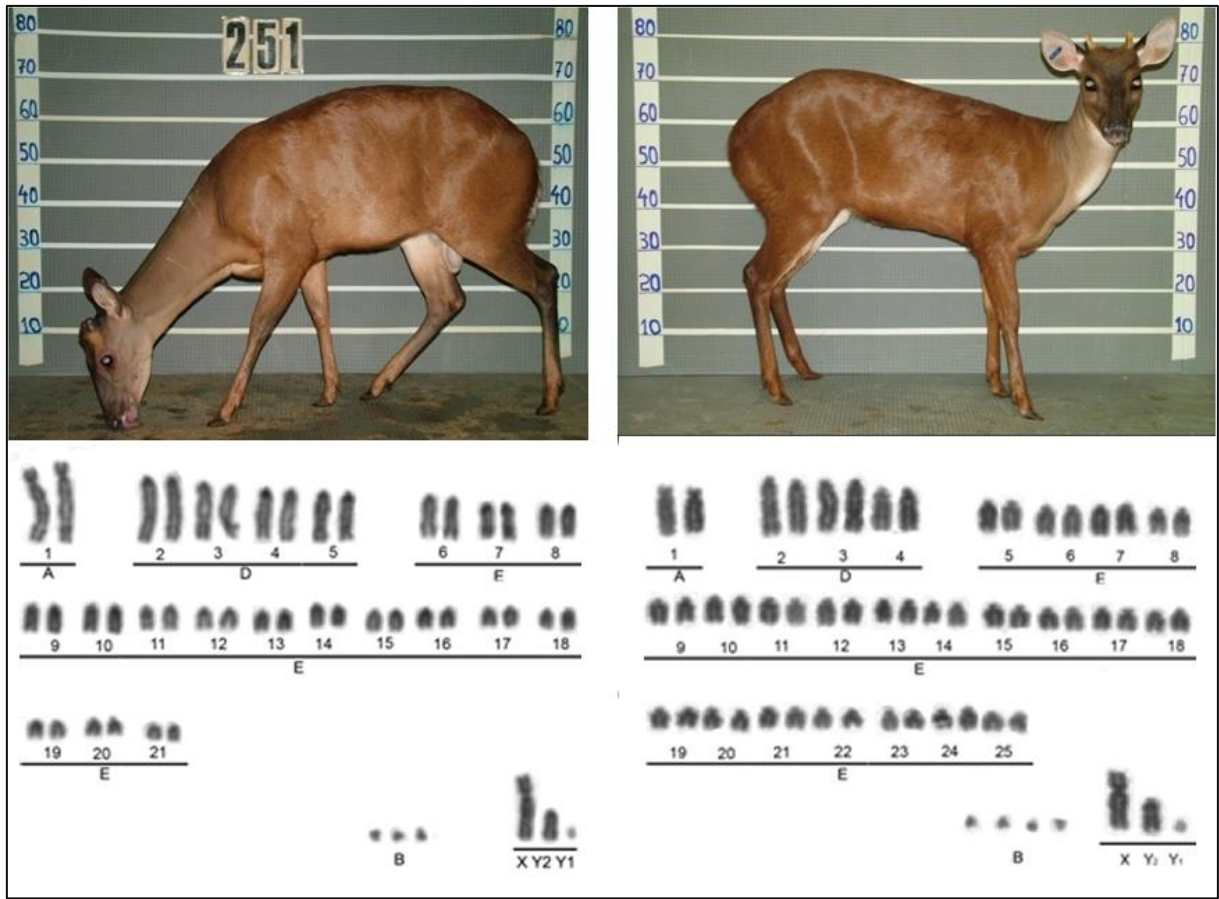


Figura 3. Dois indivíduos machos de *Mazama americana* com morfologias externas muito semelhantes e elevada diferença cariotípica. À esquerda, indivíduo do citótipo Juína, com $2n = 45 + 3Bs$ e à direita, indivíduo do citótipo Paraná, com $2n = 53 + 4Bs$ (Abril et al., 2010a).

O veado-mateiro-pequeno *Mazama bororo* Duarte, 1996, por sua vez, foi erroneamente classificada como *Mazama americana* Erxleben, 1777 sob análise morfológica (Cabrera, 1960; Czernay, 1987). Somente após estudos cromossômicos, que demonstraram uma enorme diferença entre o cariótipo do *M. bororo* ($2n = 32 - 34$, $NF = 46$) de todos aqueles já descritos para *M. americana* ($2n = 42 - 52$, $NF = 48 - 57$), o táxon foi individualizado e classificado como uma nova espécie. Essas duas espécies só podem ser distinguidas por seus cariótipos notavelmente diferentes (Duarte e Jorge, 2003).

A ocorrência de translocações Robertsonianas é frequentemente descrita em *Mazama*. Na espécie *M. gouazoubira*, esse tipo de fusão foi observado em cinco indivíduos de vinte analisados em uma população do Pantanal da Nhecolândia, Mato Grosso do Sul, Brasil (Valeri et al., 2018). Já na espécie *Mazama nana*, a presença

dessa translocação levou a descrição de oito diferentes variantes cariotípicas. As variações observadas para essa espécie não tiveram correlação geográfica, e, portanto, não foram separadas em citótipos, e sim reconhecidas como polimorfismo cromossômico intraespecífico (Abril e Duarte, 2008).

A presença de variações cromossômicas intraespecíficas potencialmente exerce influência na estabilidade gamética e na produção dos gametas. Acredita-se que uma fusão cêntrica em heterozigose possa reduzir a fertilidade em virtude da segregação gamética irregular durante a meiose (Baker e Bickham, 1986). Entretanto, a análise do complexo sinaptonêmico de um indivíduo de *M. americana*, portador de uma fusão cêntrica em heterozigose, verificou que a formação de gametas desequilibrados é improvável, uma vez que geralmente se formam trivalentes na meiose (Aquino et al., 2013). Subfertilidade e infertilidade, contudo, foram observadas em híbridos de citótipos de *M. americana* de parentais com divergência cromossômica maior que dois cromossomos. Sendo assim, observou-se a presença de mecanismo de isolamento reprodutivo pós-zigótico com o acúmulo de rearranjos cromossômicos sugerindo-se assim que populações com mais de dois cromossomos de diferença estão reprodutivamente isoladas (Cursino et al., 2014; Salviano et al., 2017).

A especiação do gênero *Mazama* foi baseada em alterações cromossômicas que não conduziram a uma mudança gênica significativa. A ocorrência de rearranjos cromossômicos e a elevada frequência da observação de polimorfismo cromossômico no gênero contribui para a formação de novas espécies em situação de isolamento geográfico (Duarte e Jorge, 1996; Duarte e Merino, 1997; Duarte et al., 2008). Adicionalmente, a presença de cromossomos B causa uma variabilidade cromossômica inter e intraespecífica (Neitzel, 1987; Duarte, 1998; Abril et al., 2010a).

Considerando as características apresentadas, acredita-se que o gênero se encontra em plena evolução e que suas espécies ainda não fixaram seus cariótipos (Duarte e Merino, 1997). O contexto da rápida evolução cromossômica em que o gênero se insere reforça a citogenética como técnica de nobre valor para compreender a relação dos táxons, a qual deve ser o alicerce dos estudos taxonômicos do grupo (González e Duarte, 2020; Cifuentes-Rincón et al., 2020).

2.3 A espécie *Mazama gouazoubira* e sua importância como base nos estudos cariotípicos do gênero

O veado cinza *Mazama gouazoubira* Fisher, 1814, conhecido como veado-catingueiro, é uma espécie de cervídeo neotropical encontrado na América do Sul. Possui pequeno a médio porte e ampla variação na coloração de sua pelagem, caracterizada por ser amarronzada nas formas de savana e acinzentada nas formas de floresta (Black-Décima et al., 2010). Apresenta mancha superciliar esbranquiçada, característica marcante da espécie, e a face interna da orelha e inferior da cauda de coloração branca. Sua altura média é de 50 cm na cernelha e seu peso na fase adulta varia de 17 a 23 kg. Os machos possuem chifres simples e inclinados pósterodorsalmente (Figura 4) (Duarte e Merino, 1997; Rossi, 2000; Black-Décima et al., 2010).



Figura 4. Indivíduo macho da espécie *Mazama gouazoubira* (Black-Décima et al., 2010).

O veado-catingueiro apresenta extensa distribuição geográfica devido a sua elevada plasticidade ecológica (Duarte, 2007). A espécie é encontrada desde regiões secas e pré-andinas da Argentina e Bolívia, estendendo-se para a costa atlântica a

oeste. Seu limite norte fica ao sul da região amazônica e seu limite sul inclui todo o Uruguai até a província de Entre Rios na Argentina (Black-Décima et al., 2010). No Brasil, está presente em todos os biomas do território (Figura 5), com exceção da região Amazônica (Duarte, 1998). É considerado a espécie mais abundante da América do Sul, sendo classificada pela *International Union for Conservation of Nature* em um status de conservação “menos preocupante” (Black-Décima e Vogliotti, 2016).

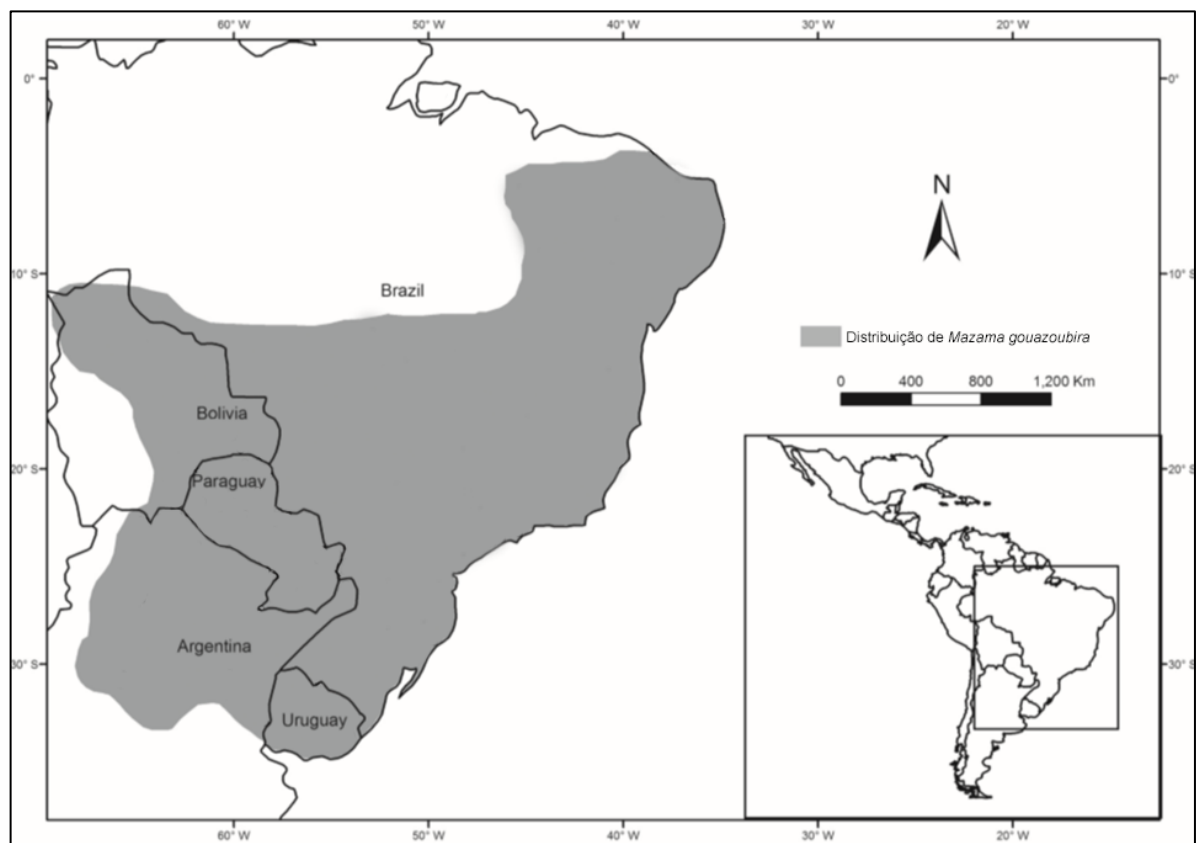


Figura 5. Mapa da área de distribuição da espécie *Mazama gouazoubira* (Black-Décima et al., 2010, com modificações).

Conforme anteriormente comentado, o veado-catingueiro foi alocado em *Mazama* Rafinesque, 1817 devido a convergência morfológica apresentada pelas espécies que compõem este grupo (Duarte et al., 2008). Contudo, considerando os problemas taxonômicos do gênero *Mazama* que já foram amplamente demonstrados por estudos filogenéticos (Duarte et al., 2008; Gutiérrez et al., 2017; Heckeberg et al., 2020), a mudança do nome de gênero para a espécie *Mazama gouazoubira* Fisher, 1814 é necessária e urgente. O gênero *Mazama* deverá ser mantido para as espécies relacionadas a espécie *Mazama americana*, espécie tipo do gênero. O nome *Subulo*

Smith, 1827 foi sugerido como o mais adequado para a alteração, sendo a mudança de nomenclatura do táxon para *Subulo gouazoubira*. Também, diante da ausência de um holótipo e dos problemas taxonômicos que envolvem esse grupo de cervídeos, foi proposto uma nova série tipo, neótipo e paraneótipos, a partir de topotipos atuais da espécie coletados próximos a localidade de descrição em Asunción, Paraguai (Bernegossi et al., 2021, no prelo).

A primeira descrição citogenética da espécie *M. gouazoubira* foi realizada por Neitzel (1979) a partir da análise de uma fêmea, que obteve número diploide de $2n = 70$ e $NF = 70$. Em 1987, através da análise de um macho da espécie, Neitzel definiu que todos os autossomos da espécie são acrocêntricos, sendo o cromossomo sexual X acrocêntrico e maior do lote, e o Y metacêntrico e o menor do lote. Além disso, foi proposto um idiograma do padrão de Banda G para a espécie (Figura 6). Sugeriu-se que essa composição cariotípica teria sido retida do ancestral hipotético comum da família Cervidae (Neitzel, 1987; Fontana e Rubini, 1990). Dessa forma, os cervídeos das demais espécies do gênero *Mazama*, e de toda família, presumivelmente se formaram decorrentes de diversos rearranjos cromossômicos em diferentes combinações a partir do cariótipo do veado-catingueiro.

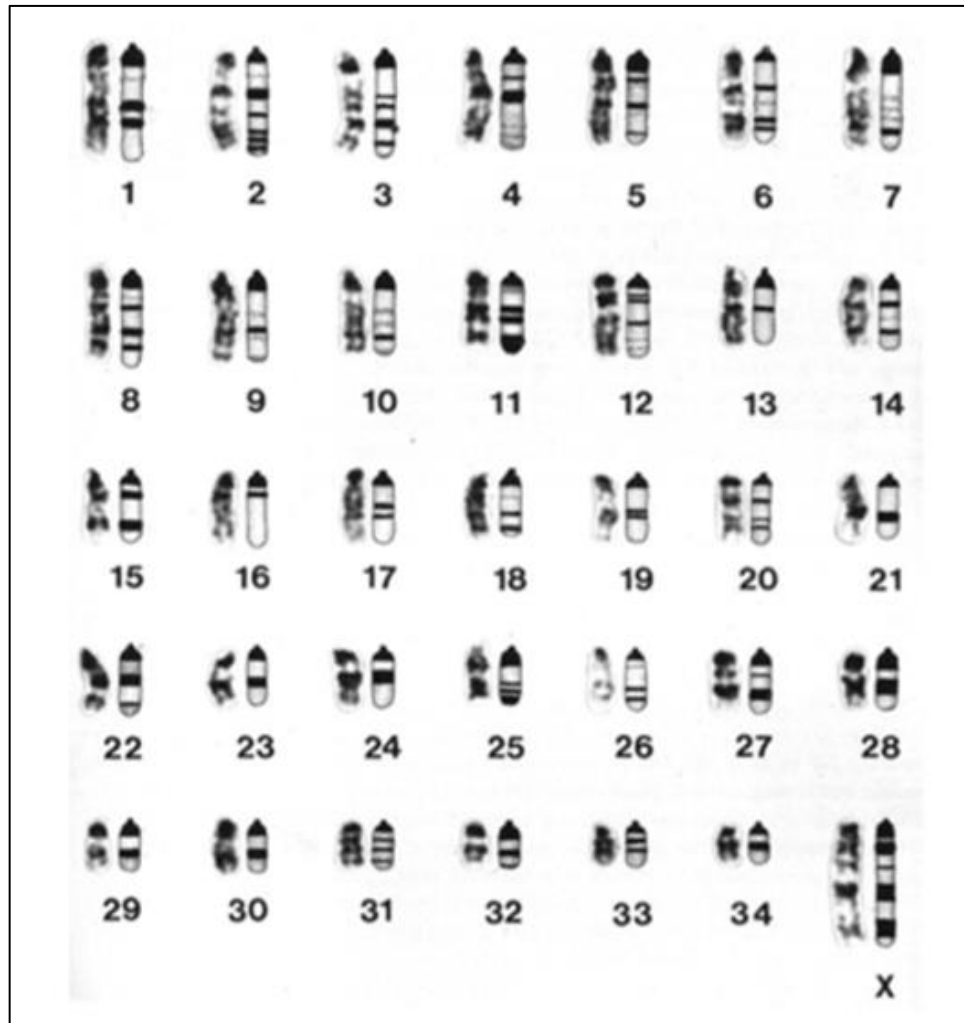


Figura 6. Idiograma do padrão de Banda G da espécie *Mazama gouazoubira*, ancestral hipotético da família Cervidae, com $2n=70$ e $NF=70$, todos os autossomos acrocêntricos, sendo o cromossomo X acrocêntrico e maior do lote (Neitzel, 1987).

O veado-catingueiro já foi amplamente estudado através da citogenética clássica (Neitzel, 1987; Duarte, 1992; Duarte, 1998; Tomazella, 2016; Tomazella et al., 2017; Valeri et al., 2018). Uma importante característica da espécie é a presença de polimorfismo cromossômico intraespecífico, decorrentes de fusões cêntricas e das variações no número de cromossomos supernumerários (Duarte, 1992; Tomazella, 2016; Valeri et al., 2018). Tomazella (2016) analisou 135 indivíduos de *M. gouazoubira*. Desses, seis animais (8,82%) foram heterozigotos para uma translocação Robertsoniana, um indivíduo (1,47%) foi homozigoto para uma translocação Robertsoniana e 14 animais (20,59%) foram portadores de cromossomos B e heterozigotos para uma translocação Robertsoniana.

Posteriormente, Valeri et al. (2018) investigou citogeneticamente uma população de vida livre do pantanal da Nhecolândia no estado do Mato Grosso do Sul no Brasil. Entre os indivíduos analisados, 9 possuíam cromossomos B e 5 possuíam fusão cêntrica em heterozigose ($2n = 69$ e $FN = 70$) (Figura 7).

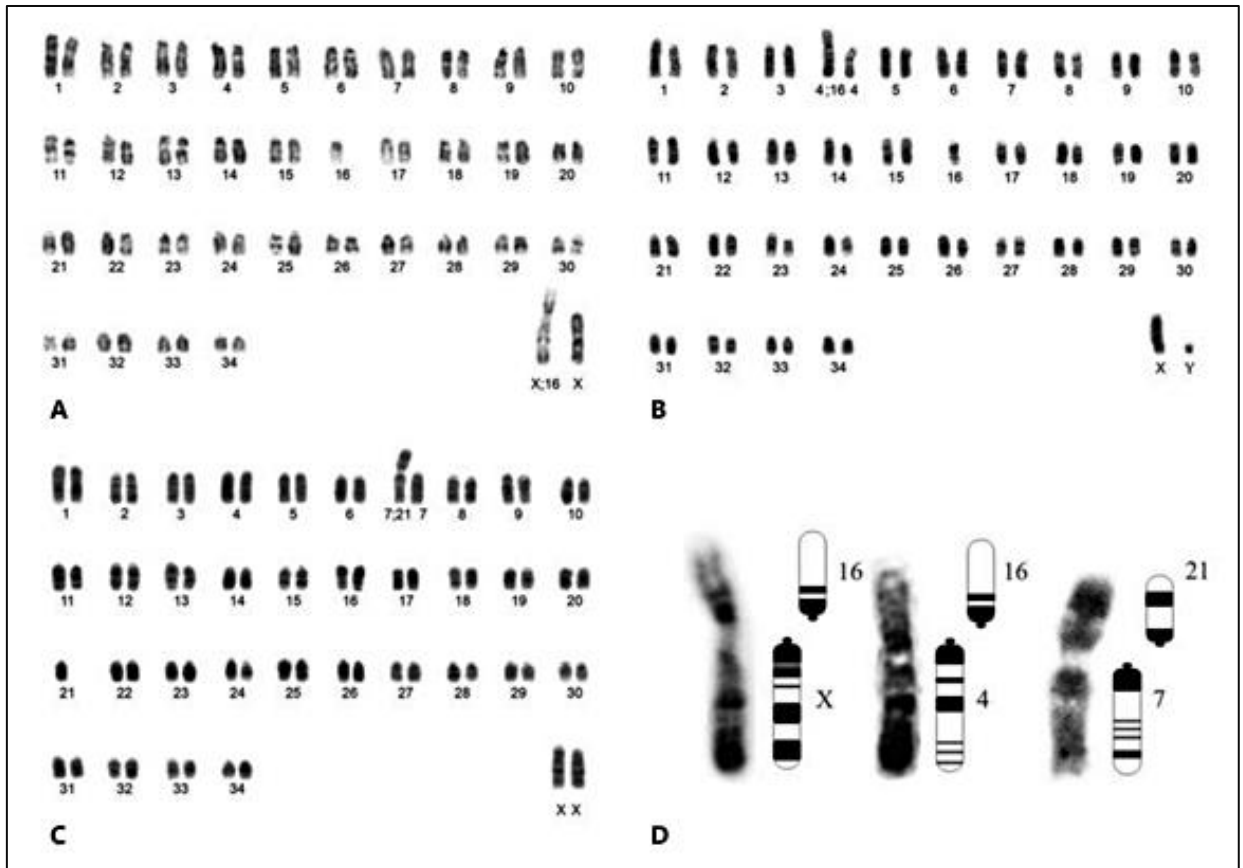


Figura 7. Cariótipos de *M. gouazoubira* apresentando translocação Robertsoniana em heterozigose. (A) Cariótipo representando a translocação entre o cromossomo X e o autossomo 16, (B) cariótipo representando a translocação entre os autossomos 4 e 16, (C) cariótipo representando a translocação entre os autossomos 7 e 21. (D) Banda G dos cromossomos translocação e representação gráfica, segundo Neitzel (1987), das respectivas translocações (Valeri et al., 2018).

Buscando compreender a variação cromossômica intraespecífica presente no veado-catingueiro, alguns trabalhos investigaram a fragilidade cromossômica da espécie pelo uso da droga mutagênica doxorrubicina (Vargas-Munar et al., 2010; Tomazella et al., 2017). Essa droga, pertencente ao grupo das antraciclinas, provoca mutação no DNA devido ao aumento de radicais livres altamente tóxicos ou por sua ação direta, através da inibição da atividade da topoisomerase II e da helicase que

interferem na separação do DNA de fita dupla (Quiles et al., 2002; Islaih et al., 2005; Resende et al., 2010). A espécie *M. gouazoubira*, entre as espécies *M. americana*, *M. nana* e *Blastocerus dichotomus*, foi a mais afetada pela ação do mutagênico e a espécie *B. dichotomus*, a menos afetada. Diante do exposto, sugeriu-se que *M. gouazoubira* possui elevada fragilidade cromossômica e que a ocorrência de translocações seria comum para a espécie (Vargas-Munar et al., 2010). Os cromossomos envolvidos nos sítios de quebras induzidas pela droga doxorubicina no veado-catingueiro foi posteriormente caracterizado por bandamento G, segundo idiograma de Neitzel (1987). Os pares 7 (15,18%), X (12,42%), 2 (12,19%), 1 (11,04%), 4 (9,66%), 16 (9,20%) e 6 (8,74%) foram os cromossomos com maior frequência de aberrações cromossômicas, sendo que 14 pares de autossomos e o cromossomo Y não apresentaram aberrações (Tomazella et al., 2017).

A retenção do cariótipo ancestral (Neitzel, 1987; Fontana e Rubini, 1990), a presença de sítios frágeis (Vargas-Munar et al., 2010; Tomazella et al., 2017), o polimorfismo cromossômico e a ocorrência de cromossomos B (Duarte, 1992; Tomazella, 2016; Valeri et al., 2018) posiciona a espécie *M. gouazoubira* como um ótimo modelo para os estudos citogenéticos do complexo gênero *Mazama* e ponto de partida para compreensão da origem dos cariótipos das demais espécies.

2.4 Citogenética Molecular e importância nos estudos da família Cervidae

Como discutido nos tópicos anteriores, as técnicas citogenéticas possuem grande relevância no fornecimento de dados no estudo de animais selvagens de vida livre e em cativeiro, conferindo descobertas importantes para a gestão e a conservação da fauna (Rubes et al., 2008a; González e Duarte, 2020; Cifuentes-Rincón et al., 2020). No início da década de 1970, o advento de métodos que propiciavam marcações ao longo dos cromossomos, permitiu uma melhor compreensão de suas estruturas e funções (Kasahara, 2009; Graphodatsky et al., 2011).

Comumente, na citogenética comparativa, o bandamento cromossômico é visto como um indicador confiável de homologia cromossômica para o entendimento das divergências cariotípicas interespecíficas (Graphodatsky et al., 2011). Entretanto, a comparação de espécies filogeneticamente distantes ou que passaram por um rápido

processo de evolução cromossômica requerem uma análise mais refinada e metodologia mais avançada, a nível de DNA (Graphodatsky et al., 2011). A incorporação de técnicas moleculares na citogenética aperfeiçoou, nesse sentido, a análise dos processos genéticos que contribuem para a diferenciação das espécies. A técnica de hibridização *in situ* fluorescente (FISH) representou um salto qualitativo nas análises cromossômicas e uma eficiente comparação entre espécies (Rubes et al., 2008a; Kasahara, 2009; Graphodatsky et al., 2011).

A metodologia da FISH consiste em uma reação de hibridização entre sequências complementares de DNA ou RNA a partir da utilização de sondas previamente marcadas com fluorocromos. Os fluorocromos são responsáveis por emitir múltiplos sinais coloridos fluorescentes nos sítios de hibridização com o DNA-alvo (Liher e Weise, 2017). A técnica possui sensibilidade elevada e depende sobretudo do conjunto e da qualidade das sondas utilizadas (Kasahara, 2009). A partir dela, foi possível observar complexos mecanismos de reorganização entre segmentos cromossômicos e por consequência, as relações filogenéticas entre as espécies se tornaram mais fidedignas (Graphodatsky et al., 2011).

O método de citogenética molecular mais comumente utilizado, a pintura cromossômica, que geralmente utiliza cromossomos inteiros como sonda, esbarra na dificuldade na detecção de rearranjos intracromossômicos (Ferguson-Smith e Trifonov, 2007). A nível citogenético molecular, os rearranjos intracromossômicos podem ser identificados por sondas específicas para regiões cromossômicas, derivadas da microdissecção, ou pela utilização de DNA clonado, como nos cromossomos artificiais de bactérias (BACs). O grande avanço no sequenciamento dos genomas de diferentes espécies produziu amplas bibliotecas de clones de BAC mapeados com precisão e que podem ser usados de forma muito eficiente em experimentos de FISH (Rocchi et al., 2012).

Nesse sentido, sondas de BACs têm sido cada vez mais utilizadas como marcadores cromossomo-específicos e na construção de mapas citogenéticos de diferentes espécies (Pedrosa-Harand, 2012). A principal vantagem do uso de BACs como sondas em estudos de FISH, é o tamanho e as sequências definidas dos insertos (Liher, 2017). A abordagem da FISH com uso de BACs representou um elo visual poderoso para trabalhar com a organização citogenética de diferentes espécies

(Rocchi et al., 2012). Dessa forma, o uso dessas sondas tornou possível a detecção precisa de rearranjos intracromossômicos e locais de quebras cromossômicas (Liher, 2017).

Dentro da família Cervidae, o gênero *Muntiacus*, reconhecido por apresentar um complexo e rápido processo de evolução cariotípica semelhante ao exposto para *Mazama*, possui importantes estudos de citogenética molecular que levaram ao melhor entendimento de reorganização cromossômica das espécies atuais do gênero (Yang et al., 1995; Yang et al., 1997a, b e c). Sob bandamento G foi hipotetizado que as diferentes espécies de *Muntiacus* resultaram de múltiplas fusões em tandem e centroméricas a partir de cromossomos acrocêntricos ancestrais menores (Shi et al., 1980). A FISH permitiu observar que os cromossomos 1, 2, 3, 4, 5 e 11 da espécie chinesa *Muntiacus reevesi* ($2n = 42$) evoluíram exclusivamente por fusões em tandem a partir do cariótipo basal da família. Todavia, a análise dos cromossomos da espécie indiana *Muntiacus muntjak vaginalis* ($2n = 6♀/7♂$) demonstrou que não é possível reconstruir o cariótipo do muntíaco-indiano exclusivamente por fusões em tandem a partir do cariótipo ancestral. Diante disso, demonstrou-se que, além das fusões em tandem e centroméricas, outros rearranjos tiveram relevância na evolução das espécies do gênero (Yang et al., 1997a).

Em contraposição, as espécies do gênero *Mazama* carecem de estudos citogenéticos moleculares para melhor compreensão de seu processo de evolução cariotípica marcado por contínuos rearranjos cromossômicos (Abril, 2009; Tomazella, 2016). Os estudos prévios de evolução cromossômica das espécies do gênero a partir do cariótipo hipotético ancestral, retido pela espécie *Mazama gouazoubira*, foram ineficazes pela dificuldade de produção dos marcadores cromossômicos. A obtenção de marcações espécie-específicas, para caracterização dos cromossomos carreadores de translocações Robertsonianas isolados por microdissecção da espécie, foram impossibilitadas pela hibridização centromérica, em região de heterocromatina, de todos os demais cromossomos. Diante disso, não foi possível diferenciar os sítios de hibridização específicos dos sítios inespecíficos. Os resultados demonstraram um impasse na supressão de sequências repetitivas por diferentes DNA supressores (Abril, 2009; Tomazella, 2016).

Uma alternativa para solucionar o problema de marcações inespecíficas é

trabalhar com hibridização *in situ* entre diferentes espécies. Devido a rápida evolução e degeneração das sequências de DNA repetitivo, as sondas produzidas a partir de outra espécie e sua posterior caracterização para a determinação de homologias interespecíficas, aparecem como opção para a produção de marcadores cromossômicos para estudos intra e interespecíficos (Trifonov et al., 2017).

Nesse contexto, o rápido progresso no conhecimento do genoma bovino fez desse animal um modelo ideal para estudos citogenéticos e genômicos comparativos (Bovine Genome Sequencing and Analysis Consortium, 2009). O número diploide bovino é de $2n = 60$, sendo composto por 58 autossomos acrocêntricos e 2 cromossomos sexuais (Gallagher e Womack, 1992). Sondas cromossômicas fluorescentes dessa espécie já foram amplamente utilizadas em estudos comparativos de cariótipos, tanto em espécies filogeneticamente próximas e intimamente relacionadas quanto em espécies distantes da família Cetartiodactyla (Rubes et al., 2008b; Ropiquet et al., 2010; Cernohorska et al., 2012; Cernohorska et al., 2013; Frohlich et al., 2016; Frohlich et al., 2017).

Em estudo comparativo com cervídeos, Dementyeva et al. (2010) utilizaram sondas de cromossomos inteiros de dromedário (*Camelus dromedarius*) no genoma da corça siberiana (*Capreolus pygargus*). A pintura cromossômica revelou 53 homologias autossômicas no genoma da espécie do cervídeo. De forma indireta por meio das homologias pré-estabelecidas entre dromedário e bovino (*Bos taurus*), o estudo detectou que 8 rearranjos cromossômicos separam os cariótipos de *C. pygargus* e *B. taurus*, sendo 6 fissões na espécie *C. pygargus*. Adicionalmente, combinando os resultados com dados publicados anteriormente, o trabalho deduziu as correspondências cromossômicas entre o ancestral hipotético da infraordem Pecora, dromedário, bovino e *C. pygargus*.

De forma semelhante, Frohlich et al. (2017) utilizaram sondas de cromossomos inteiros de bovino nas espécies *Cervus elaphus* ($2n = 68$, CEL), *Elaphurus davidianus* ($2n = 68$, EDA), *Cervus timorensis russa* ($2n = 60$, CTR), *Rucervus eldii* ($2n = 58$, REL), *Alces alces* ($2n = 68$, AAL), *Rangifer tarandus* ($2n = 70$, RDA), *Capreolus capreolus* ($2n = 70$, CCA), *Dama dama* ($2n = 68$, DDA) e *Muntiacus reevesi* ($2n = 46$, MRE) para a detecção de segmentos conservados e de rearranjos inter e intracromossômicos. Nesse estudo, os resultados obtidos a partir das 29 sondas de cromossomos inteiros

da espécie *Bos taurus* evidenciaram que, a despeito da diversidade cariotípica das espécies de cervídeos participantes, todas apresentaram o mesmo número de 35 segmentos cromossômicos conservados no cariótipo de *Bos taurus*. Os achados de Frohlich et al. (2017) concordaram com os resultados anteriormente apontados por Dementyeva et al. (2010), constatando de forma mais refinada o padrão evolutivo para a família.

Ademais, os autores descreveram rearranjos intracromossômicos utilizando um conjunto de sondas de clones BAC, nos cromossomos homólogos ao par BTA1 (Frohlich et al., 2017). Em todas as nove espécies estudadas, o homólogo ao BTA1 se apresentou dividido em dois cromossomos de tamanhos diferentes, sendo o maior desses de morfologia acrocêntrica (EDA, DDA, CEL, CTR, REL e CCA) ou submetacêntrica (AAL e RTA), devido a mudança de posição no centrômero. As espécies cujo homólogo maior possui morfologia acrocêntrica apresentam alterações intracromossômicas na ordem das sondas de BACs do BTA1 (Frohlich et al., 2017). Nestes, os clones das regiões distais e terminais do BTA1 hibridizaram em regiões mediais do homólogo de maior tamanho nos cervídeos (Figura 8). Nas espécies AAL e RTA, esses clones hibridizaram com a região distal (em relação ao centrômero) do braço p do cromossomo submetacêntrico. Para todas as espécies estudadas, o clone BAC derivado da região proximal de BTA1 hibridizou com as regiões proximais do homólogo de menor tamanho (Frohlich et al., 2017).

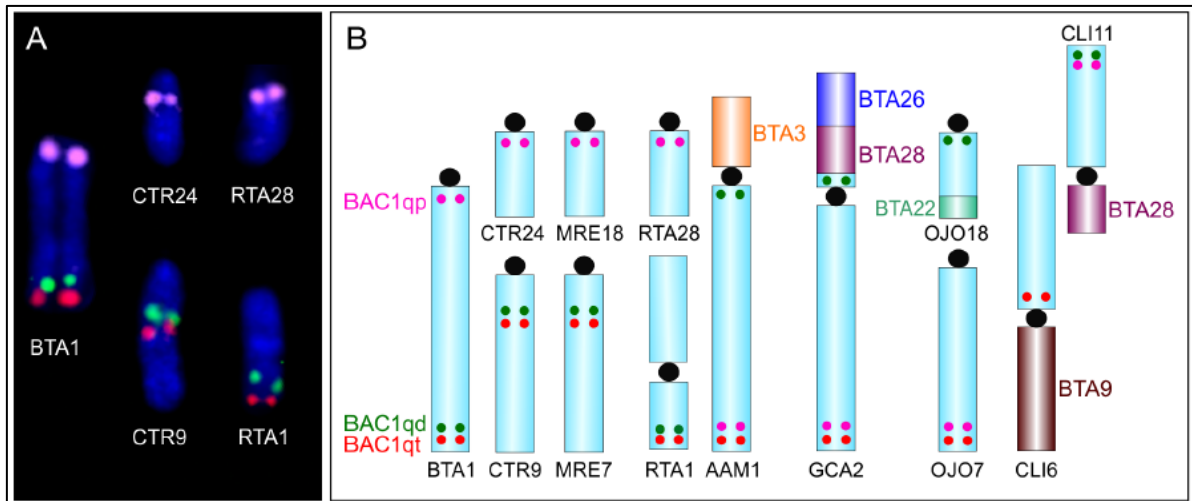


Figura 8: FISH mostrando a hibridização das sondas de BACs do cromossomo bovino 1 e sua ilustração esquemática em várias espécies de cetartidactílos. (A) Padrão de hibridização das sondas de bovino BAC1qp (rosa), BAC1qd (verde) e BAC1qt (vermelho) em cromossomos de *Bos taurus* (BTA), *Cervus timorensis rusa* (CTR) e *Rangifer tarandus* (RTA). (B) Ilustração demonstrando rearranjos dos homólogos ao BTA1 em *Cervus timorensis rusa* (CTR), *Muntiacus reevesi* (MRE), *Rangifer tarandus* (RTA), *Antilocapra americana* (AAM), *Giraffa camelopardalis* (GCA), *Okapia johnstoni* (OJO) e *Choeropsis liberiensis* (CLI). Os pontos aproximam as posições das sondas BAC1qp (rosa), BAC1qd (verde) e BAC1qt (vermelho) (Frohlich et al., 2017).

Já o cromossomo sexual X foi amplamente estudado em Cetartiodactyla quanto aos seus rearranjos intracromossômicos pelo uso de sondas derivadas de clones BAC de bovino. A análise detalhada no mapeamento do X mostrou que as espécies não-ruminantes estudadas (porco, camelo, baleia e hipopótamo) compartilham o mesmo mapa de marcação do cromossomo X, enquanto nas espécies de ruminantes a taxa de rearranjos X-específicos excede significativamente a dos demais mamíferos eutérios (Proskuryakova et al., 2017). Sumarizando os achados do uso de sondas de BAC em Cervídeos, o cromossomo X possuiu uma grande variação de morfologia e na extensão da conservação dos cromossomos sexuais: a família Capreolinae apresenta uma morfologia metacêntrica uniforme com disposição semelhante dos blocos sintênicos entre suas espécies; em contraste, a subfamília Cervinae é caracterizada pela ocorrência de grande variedade de rearranjos no cromossomo X como reposicionamento do centrômero, inversões e fusões X-autossômicas (Proskuryakova et al., 2017).

Mais recentemente, Galindo et al. (2021a) indicaram que sondas de pintura cromossômica e sondas de clones BAC derivados da espécie bovina possuem resultados satisfatórios como marcadores cromossômicos para o veados neotropicais do gênero *Mazama*. Assim, elas vêm sendo utilizadas na confirmação de cromossomos participantes de translocações Robertsonianas, previamente descritas por banda G (Tomazella, 2016), em indivíduos de *Mazama gouazoubira* com redução do número diploide de $2n = 70$ para $2n = 69$ (Galindo et al., 2021a).

Diante do exposto, o mapeamento de clones BAC para todo o conjunto cromossômico de uma espécie que reteve o cariótipo ancestral é de enorme relevância para compreender, de forma refinada e detalhada, o processo de evolução cariotípica dentro do gênero *Mazama*. Inclusive, a definição de marcadores cromossômicos para o cariótipo ancestral permitirá seu uso na determinação das reais diferenças cariotípicas entre as várias espécies de *Mazama* e os efeito reprodutivo que elas produzem. Consequentemente, essas diferenças poderão ser utilizadas como uma das principais ferramentas para as definições taxonômicas do grupo.

3. OBJETIVOS

O objetivo principal desse trabalho é caracterizar as homologias de sondas de clones BAC derivadas do genoma bovino nos cromossomos da espécie *Mazama gouazoubira*. Para tanto, os seguintes objetivos específicos foram determinados:

- Propor novo idiograma do padrão de Banda G para a espécie *M. gouazoubira*;
- Caracterizar, mapear e esquematizar as homologias entre sondas de BACs de bovino e os cromossomos da espécie *M. gouazoubira*;
- Produzir marcadores cromossômicos para estudos intra e interespecíficos do gênero *Mazama*.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Esse trabalho foi parcialmente desenvolvido no laboratório de Citogenética do Núcleo de Pesquisa e Conservação de Cervídeos (NUPECCE), Jaboticabal, Brasil e parcialmente no Veterinary Research Institute (VRI), Brno, República Tcheca. O cultivo celular foi realizado no NUPECCE (tópicos 4.1 e 4.2) e as metodologias de Banda G (tópico 4.3), aquisição de clones BAC, obtenção e marcação das sondas (tópico 4.4) no VRI. A Hibridização *in situ* fluorescente (Tópico 4.5) foi realizada em ambos os laboratórios.

4.1 Amostras

Foram avaliadas amostras de pele de três indivíduos machos da espécie *M. gouazoubira* apresentando $2n = 70$ e $NF = 70$ (Tabela 1). As amostras estavam estocadas no banco criogênico do Núcleo de Pesquisa e Conservação de Cervídeos (NUPECCE), localizado na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista - FCAV/UNESP, Campus de Jaboticabal.

Tabela 1: Identificação, cariótipo e origem dos indivíduos selecionados:

Identificação	2n	NF	Cromossomo B	Origem
T194	70	70	0-3	Serra da Mesa - GO
T376	70	70	0	Pitangueiras - SP
T384	70	70	0	Guarací- SP

4.2 Cultivo de Fibroblastos e Preparações Cromossômicas

4.2.1 Semeadura

As amostras de pele foram descongeladas em banho-maria (37°C) até que o meio com as células congeladas voltasse ao estado líquido. Em fluxo laminar, o fragmento foi lavado duas vezes em 2,0 mL de PBS (10g NaCl/L + 0,25g KCl/L + 1,44g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ /L + 0,25g KH_2PO_4 /L) em placas de Petri descartáveis. O material foi divulsionado com lâmina de bisturi em placa de Petri contendo 1,0 mL de solução

completa de cultivo DMEM (Meio Essencial Mínimo Modificado de Dulbecco Cultilab™/L + 3,7 g de bicarbonato/L + 1,0 mL de sulfato de gentamicina/L + 2,0 mL de anfotericina B/L, pH 6,8-7,1). Os diversos fragmentos de aproximadamente 1 mm² foram transferidos para frascos de cultivo T25 (TPP™) que continham 1,0 mL de meio DMEM e 1,0 mL de soro fetal bovino (SFB) Cultilab™. Os frascos foram levados para estufa a 5% CO₂ e 37°C por 48 horas sem qualquer movimento (Verma e Babu, 1995). A cultura primária (Figura 9a) foi monitorada diariamente e o meio trocado a cada 48 horas. Após aderência dos fragmentos de pele, mudou-se a quantidade do meio para 2,5 mL de DMEM com 15% de SFB até a formação de uma monocamada de células no fundo do frasco (Figura 9b).

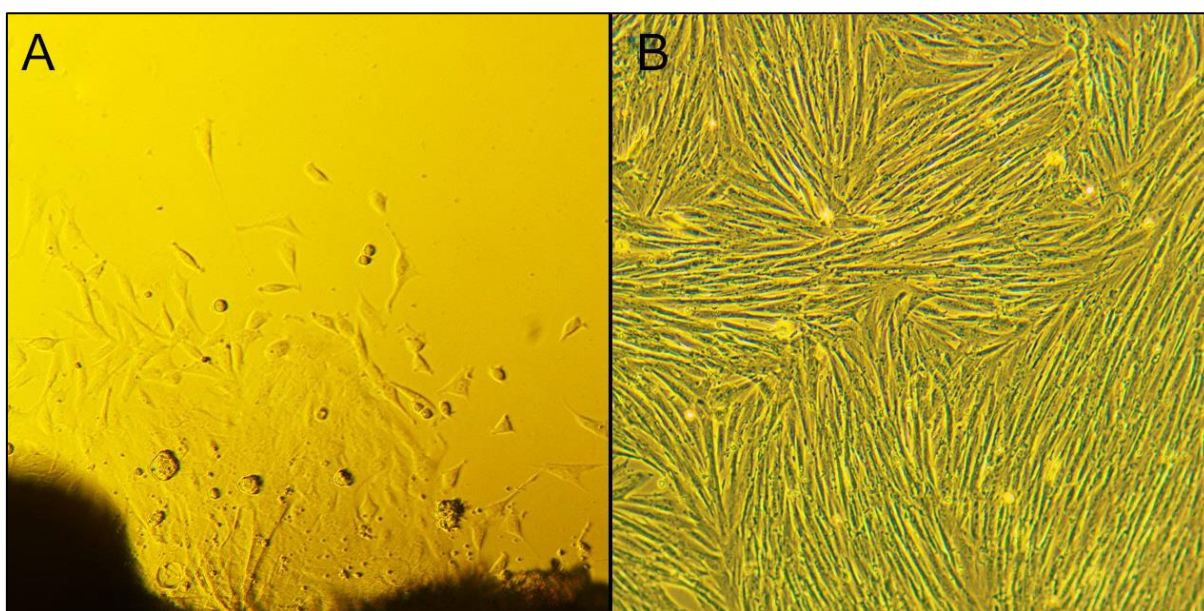


Figura 9. (A) Início do crescimento celular a partir de um fragmento de pele de *M. gouazoubira* no 7º dia de cultivo e (B) confluência celular no 15º dia de cultivo. Fotos obtidas com microscópio invertido, aumento de 40x.

4.2.2 Repique

Após o crescimento adequado da monocamada de células, foi realizado o repique dos cultivos. O método consistiu em desprezar o meio presente nas garrafas, e lavá-las 3 vezes com 2,0 mL de PBS. Para soltura das células aderidas a monocamada, as garrafas foram tripsinizadas com 1,0 mL de tripsina (8,0g NaCl/L + 0,4g KCl/L + 0,58 g NaHCO₃/L + 1 g glucose/L + 0,005 g vermelho fenol/L + 0,2 g EDTA/L + 0,5 g tripsina/L, pH 7,2-7,4). A cultura foi monitorada em microscópio

invertido para verificar se as células soltaram do fundo do frasco e então, imediatamente, a tripsina foi inativada com 200 μ L de SFB e 800 μ L de DMEM. Dividiu-se o material da garrafa mãe entre novos frascos, as quais foram monitoradas e tratadas como descrito anteriormente (subitem 4.2.1) até obter um número suficiente de cultivos secundários.

4.2.3 Colheita

Após atingirem a confluência celular, um dia antes da colheita, foi realizada a pré-tripsinização das garrafas. Passadas 24 horas da pré-tripsinização e trinta minutos antes da colheita, foram adicionados 60 μ L de colchicina (0,016%) CultilabTM em cada frasco, os quais permaneceram incubados a 37°C e 5% de CO₂. Depois, foi realizada a tripsinização para que as células se desprendessem dos frascos. O conteúdo dos frascos foi transferido para tubos de centrífuga cônico e, então, centrifugados por cinco minutos a 167,6 g e os sobrenadantes descartados. Após o descarte dos sobrenadantes, os sedimentos foram ressuspensos em 8 mL de solução hipotônica KCl 0,067M e incubados no banho-maria a 37°C por vinte minutos. Posterior a incubação, a pré-fixação dos materiais foi realizada adicionando-se três gotas de fixador (solução de metanol e ácido acético 3:1). Os tubos foram centrifugados por cinco minutos a 1.200 rpm e os sobrenadantes descartados. Os sedimentos foram ressuspensos em três ocasiões (6,0, 4,0 e 3,0 mL) com solução fixadora. As preparações cromossômicas obtidas a partir dos cultivos de fibroblastos foram gotejadas em lâminas para posterior uso nas técnicas de banda G e hibridização *in situ* fluorescente.

4.3 Banda G

A banda G foi realizada de acordo com o protocolo descrito em Seabright (1971), modificado. Para tanto, após o gotejamento do material, as lâminas foram deixadas overnight a 50 °C. Depois, foram incubadas em solução 2xSSC a 50°C por 50 minutos. Posterior a incubação, foram mergulhadas em solução de tripsina (0,02%) a 38°C durante 30 segundos, sendo, em seguida, lavadas em solução tampão Sorensen (0,1M, pH 6.8). Finalmente, as lâminas foram coradas em solução corante Giemsa em tampão Sorensen (0,1M, pH 6,8) por 2 minutos, lavadas em água

destilada e deixadas para secar. As lâminas foram analisadas usando um microscópio Zeiss Axio Imager Z2 e as imagens digitais foram capturadas com o software ISIS (Meta-Systems, Altussheim, Alemanha).

4.4 Aquisição de clones BAC, Obtenção e Marcação das sondas

4.4.1 Aquisição dos clones BAC

Um conjunto de 107 clones BAC foram adquiridos comercialmente da biblioteca bovina CHORI-240 com base no NCBI ARS-UCD1.2 Assembly data e obtidos do BACPAC Genomics, Emeryville, CA, USA (Tabela 2).

Do par cromossômico BTA1 ao par BTA11, foram selecionados quatro clones BAC compreendendo as localizações centromérica, proximal, distal e terminal dos cromossomos. A partir do cromossomo BTA12 até o BTA29, três clones BAC foram selecionados das regiões centromérica, medial e terminal. Para o cromossomo X, nove clones foram adquiridos envolvendo o braço q e braço p do cromossomo sexual bovino. Com base nos trabalhos de Dementyeva et al. (2010) e Frohlich et al. (2017), tentou-se estimar os pontos de quebras dos autossomos BTA1, 2, 5, 6, 8 e 9, que apresentavam dois cromossomos homólogos diferentes em diversas espécies da família Cervidae. Dessa forma, caso o padrão for equivalente em *Mazama gouazoubira*, cada homólogo possuirá dois marcadores BAC.

Os clones recebidos foram pré-inoculados transferindo uma colônia de bactérias para uma placa com meio LB ágar com 12,5 µg / ml de cloranfenicol. A placa foi deixada em estufa a 37°C por 24 horas. Posteriormente, a placa foi removida e colocada em refrigeração até sua extração.

Tabela 2: Lista dos clones BAC adquiridos para caracterização em diferentes espécies de cervídeos neotropicais. Os clones foram selecionados da biblioteca bovina CHORI-240. Abreviações: cent = centromérica; prox = proximal; dist = distal; term = terminal.

Cromossomo bovino (BTA)	Clone BAC (cent)	Posição em BTA (Mb)	Clone BAC (prox)	Posição em BTA (Mb)	Clone BAC (dist)	Posição em BTA (Mb)	Clone BAC (term)		Posição em BTA (Mb)
BTA1	106N15	2.08-2.25	69G2	57.29-57,48	109I18	116.68-116.91	273F5		154.36-154.55
BTA2	42D15	9.51-9.71	110M8	44.41-44,65	124N14	96.51-96.71	437C7		135.51- 135.71
BTA3	24H18	4.38-4.62	274A19	53.24-53.51	106P15	98.75-98.97	433N8		121.25-121.43
BTA4	168K3	5.43-5.62	215P21	40.28-40.51	95A8	77.04-77.23	259C9		119.29-119.48
BTA5	411D6	5.81-5.99	59F16	68.51-68,70	78L8	70.86-71.06	100C21		119.70-119.89
BTA6	89B23	3.37-3.55	46O3	61.12-61.34	45E5	64.74-64.97	200F18		117.34-117.56
BTA7	57O13	1.36-1.56	117P3	38.88-39.13	57A5	81.18 -81.42	105G13		109.52-109.76
BTA8	418M12	1.50-1.67	71G4	62.73-62.93	223P21	63.95-64.13	504A4		112.10-112.29
BTA9	448F18	9.19-9.39	78C10	60.39-60.60	64B22	63.97-64.19	90A6		103.38-103.59
BTA10	173B8	3.97-4.21	131N22	42.65-42.86	90G7	76.15-76.37	214M18		103.02-103.24
BTA11	98M8	3.70-3.92	91N11	37.25-37.46	164D13	72.21-72.43	463C19		106.02-106.22
Cromossomo bovino (BTA)	Clone BAC (cent)	Posição em BTA (Mb)	Clone BAC (medial)	Posição em BTA (Mb)	Clone BAC (term)	Posição em BTA (Mb)	Clone BAC		Posição em BTA (Mb)
BTA12	68F22	11.10-11.33	27O21	36.43-36.65	115C4	86.36-86.58	BTAXp	159O16	22.97-23.15
BTA13	174M6	7.23-7.44	114C2	42.80-43.05	278J11	75.01-75.26		67P21	33.57-33.81
BTA14	319C15	0.87-1.06	58J6	36.99-37.22	278M23	81.17-81.38		442N4	35.53-35.73
BTA15	122B6	5.29-5.51	121K12	41.87-42.09	399A11	77.08-77.28	BTAXqprox	311B9	45.22-45.422
BTA16	283F4	2.65-2.86	124O11	38.84-39.04	140I17	80.23-80.49		93K24	52.41-52.62
BTA17	63H8	3.90-4.12	215C16	35.26-35.46	98F22	72.19-72.41		316D2	61.09-61.27
BTA18	121P7	2.76-2.96	79A23	34.69-34.92	105L6	65.58-65.76	BTAXqdist	40H2	66.94-67.12
BTA19	130E10	9.12-9.34	50L8	34.35-34.57	188A20	55.91-56.09	BTAXPAR	453C5	133.34-133.53
BTA20	189H8	5.16-6.89	60G20	35.32-35.51	378K8	71.13-71.32		326C13	137.12-137.32
BTA21	95M7	5.45-5.66	377F11	33.80-33.98	283I6	66.79-67.00			
BTA22	153G8	1.61-1.82	168H4	38.93-39.12	155B17	59.06-59.29			
BTA23	194A20	7.27-7.48	77G24	28.26-28.47	166B3	50.80-51.03			
BTA24	205G22	0.61-0.82	90M14	32.92-33.16	453P2	61.93-62.12			
BTA25	93C17	3.86-4.09	89A17	21.27-21.51	124M6	37.22-37.43			
BTA26	205E12	8.51-8.68	47G11	24.54-24.77	457G23	49.25-49.41			
BTA27	79A12	1.27-1.52	41E12	26.81-27.00	126M6	41.90-42.14			
BTA28	321F10	1.40-1.59	108O21	24.74-24.94	361P13	44.02-44.18			
BT29	384F12	5.79-5.96	103L15	28.99-29.16	472F18	39.69-39.85			

4.4.2. Preparo do DNA de BAC

Para a extração do DNA, foi utilizado protocolo adaptado do método incluído no *Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification Systems*. Uma colônia bacteriana do pré-inóculo foi colhida, transferida e cultivada em meio de cultura líquido com 12,5 µg / ml de cloranfenicol e incubada overnight a 37°C. Após retirado da estufa, o conteúdo do tubo contendo a cultura foi despejada em tubo falcon de 15,0 ml e centrifugado a 3.000 rpm por 10 minutos. Subsequentemente, o sobrenadante foi descartado e o pellet de bactéria ressuspendido e lavado em 1,0 mL de PBS. O conteúdo foi transferido para um tubo eppendorf. O tubo eppendorf foi centrifugado por 10 minutos a 3.000 rpm. O sobrenadante foi então descartado e o tubo invertido em papel filtro para remover o excesso de líquido.

Para produção do lisado purificado, o sedimento celular foi ressuspendido em 250 µl da solução "*Cell Resuspension Solution*". Foram adicionados 250 µl de "*Cell Lysis Solution*" e a solução do eppendorf foi então homogeneizada delicadamente. Posteriormente, foram adicionados 10 µl da solução "*Alkaline Protease Solution*" e o tubo foi incubado por 5 minutos a temperatura ambiente. Posterior a incubação, foram adicionados 350 µl da solução "*Neutralization Solution*" e o conteúdo do tubo homogeneizado delicadamente. O lisado bacteriano foi então centrifugado a 13.000 rpm por 10 minutos em temperatura ambiente. Foi inserido a coluna de centrifugação no tubo de coleta e, então, o lisado foi transferido para a coluna. Posteriormente, o tubo foi centrifugado a 13.000 rpm por 1 minuto a temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado.

A coluna foi reinserida no tubo de coleta e 750 µl da solução "*Wash Solution*" foram adicionados. O tubo foi centrifugado a 13.000 rpm por 1 minuto e, posteriormente, o sobrenadante descartado. O procedimento de lavagem foi novamente realizado utilizando 250 µl da solução "*Wash Solution*". A coluna foi transferida para um microtubo de 1,5 ml estéril. O DNA das BACs foi eluído em 100 µl de água livre de nuclease e incubado por 5 minutos a temperatura ambiente. Após esse período, o microtubo foi centrifugado a 13.000 rpm por 1 minuto. O sobrenadante foi transferido para um tubo de armazenamento e a coluna descartada. A concentração do DNA foi estimada através do NanoDrop®. O microtubo com o DNA purificado foi identificado e armazenado -20°C.

4.4.3 Marcação dos clones BAC

A marcação dos clones BAC para serem utilizados como sondas foi realizada com Green-DdUTP (Abbott, IL, USA), biotina 16-dUTP ou digoxigenina-11-dUTP (Roche, Mannheim, Alemanha) utilizando protocolo adaptado do método incluído no kit *BioPrime® Array CGH Genomic Labeling System* (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Para isso, 10,5 µL de DNA foi misturado com 10,0 µL de “2,5X Random Primers Solution”. A mistura foi incubada a 95°C por 5 minutos e, em seguida, esfriada imediatamente em gelo por 5 minutos. Subsequentemente, foram pipetados os seguintes reagentes: 2,5 µL de “dUTP Nucleotide Mix”, 1,5 µL de nucleotídeo dUTP marcado e 0,5 µL da solução “Exo– Klenow Fragment”. A solução foi agitada brevemente e centrifugada. A mistura foi incubada a 37°C por 2 horas em um termociclador.

Para identificação de possíveis rearranjos intracromossômicos entre *Bos taurus* e a espécie *Mazama gouazoubira*, as sondas foram marcadas conforme indicado na Tabela 3. Para a sonda da região pseudoautossômica (PAR), os dois clones de BAC foram usados em conjunto em uma única sonda. Dessa forma, foram produzidas um total de 106 sondas para os 107 clones adquiridos.

Tabela 3. Marcação das sondas pelos diferentes nucleotídeo-dUTP-marcados. As ordens dos nucleotídeos-dUTP foram escolhidas de forma que os rearranjos intracromossômicos sejam facilmente identificados. A marcação foi realizada com Green-DdUTP (Abbott, IL, USA), biotina 16-dUTP ou digoxigenina-11-dUTP (Roche, Mannheim, Alemanha). A coloração observada no microscópio de fluorescência após hibridização e detecção são apresentadas para cada tipo de nucleotídeo-dUTP utilizado.

Cromossomo	Número de sondas por cromossomo	Marcação
BTA 1 – BTA 11	4 sondas	Green-dUTP (verde) - sonda região centromérica; Digoxigenina (rosa)- sonda região proximal; Green-dUTP (verde) - sonda região distal; Biotina (amarelo) - sonda região terminal;
BTA 11 – BTA 29	3 sondas	Green-dUTP (verde)- sonda região centromérica; Digoxigenina (rosa)- sonda região medial (rosa); Biotina (amarelo) - sonda região terminal (amarelo); *exceto BTA 17 BTA17: Biotina- clone região centromérica; Digoxigenina- sonda região medial; Green-dUTP - sonda região terminal
BTA X	9 sondas	<u>Região Braço p:</u> Green-dUTP- sonda clone 67P21 Digoxigenina- sonda clone 159O26 Biotina- sonda clone 442N4 <u>Região Proximal Braço q:</u> Green-dUTP - sonda clone 93K24 Digoxigenina- sonda clone 311B9 Biotina- sonda clone 316D2 <u>Região Distal Braço q</u> Green-dUTP: sonda clone 40H2 Biotina- clones 453C5 e 326C13 (sonda de região pseudoautossômica);

4.5 Hibridização *in situ* fluorescente

As lâminas com preparações cromossômicas de *M. gouazoubira* foram incubadas em solução de 2xSSC a 70°C em banho-maria por 30 minutos e, após esse período, deixadas para esfriar em temperatura ambiente por 20 minutos. Subsequentemente, foram lavadas em 0,1xSSC por 1 minuto e desnaturadas em solução de 0,07M NaOH por 1 minuto. Após desnaturação, foram incubadas em solução 0,1xSSC e 2xSSC, a 4°C por 1 minuto cada e, finalmente, em série alcoólica (70%, 80%, 96%) em temperatura ambiente, 1 minuto cada novamente.

Concomitantemente, foi preparado o mix de hibridização conforme apresentado na tabela 4. Foram utilizados DNA Cot bovino (Hybloc™ Competitor DNA, Applied Genetics Laboratories Inc. Melbourne, USA) e DNA de espermatozoides de salmão (Ultrapure™ Salmon Sperm DNA Solution, Invitrogen®) como DNA supressores a fim de se inibir a hibridização de sequências repetitivas.

Tabela 4. Mistura de hibridização para volume final de 10 µl:

Reagente	Volume
Master Mix*	7 µl
(*5ml formamida+1g Sulfato de dextrano+ 1 ml 20xSSC)	
DNA Cot bovino	1 µl
DNA de espermatozoides de Salmão	0.6 µl
Sonda	0,7 µl -1,4 µl por sonda

A mistura de hibridização foi aquecida a 92°C por 10 minutos e incubada a 37°C por 30 minutos. Posteriormente, essa foi adicionada às lâminas que foram cobertas por lamínula e incubadas em câmara úmida a 37°C por 40 horas.

Para a lavagem pós-hibridização, as lâminas foram incubadas em solução 0.7xSSC por 2 minutos a 70°C e em 2xSSC por 2 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, foram incubadas em câmara úmida a 37°C com 100 µL de solução bloqueio (0,1g de solução bloqueio Sigma- Aldrich®, dissolvido em 9 ml H₂O + 1 ml solução TN) por 10 minutos.

A detecção foi realizada com Streptavidine-Cy5 (Invitrogen/Molecular Probes

Camarillo, CA, USA), para as sondas marcadas com biotina-16-dUT, e com antidigoxigenina-rodamina (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA) para as sondas marcadas com digoxigenina-11-dUTP. Para isso, 0,25 µl de cada anticorpo diluído em 100 µl de solução bloqueio foram adicionados a cada lâmina, as quais foram incubadas em câmara úmida por 45 minutos. Após a detecção, as lâminas foram lavadas em solução 1xTNT três vezes por 5 minutos cada. Os cromossomos foram contrastados com 4',6-Diamidino-2-Phenylindole (DAPI) (Vozdova et al., 2019).

Os sinais de hibridização foram examinados usando um microscópio fluorescente Zeiss Axio Imager Z2 e as imagens digitais foram capturadas com o software ISIS (Meta-Systems, Altussheim, Alemanha). As imagens obtidas foram editadas com o auxílio do software ISIS e Adobe Photoshop CC 2015.

4.6 Biometria cromossômica e Idiograma

Após a banda G e considerando os dados complementares de marcação das sondas de BACs, os cromossomos foram classificados segundo as homologias com os cromossomos bovinos (ISCNDB, 2000) e, posteriormente, foi realizada a biometria cromossômica. Os cromossomos foram medidos de acordo com o comprimento relativo (CR) de 20 metáfases organizadas por banda G. Foram examinadas sete metáfases para os indivíduos T376 e T384, e seis metáfases para o indivíduo T194.

Depois de devidamente classificado pela homologia bovina, o comprimento relativo dos cromossomos foi usado como base para a organização dos cromossomos. A classificação final foi definida estatisticamente por meio do valor médio do CR de todas as metáfases examinadas. Esse valor foi considerado para a montagem de um novo idiograma de banda G. Para uma representação gráfica dos cromossomos, foi utilizado o software Adobe Illustrator 2020.

4.7 Mapa citogenético

Um mapa citogenético representando todos os novos marcadores obtidos no presente estudo foi montado graficamente. Para isso, foi utilizado o programa Adobe Illustrator 2020.

5. RESULTADOS

5.1 Banda G e Idiograma

Foram selecionadas 20 metáfases da espécie *M. gouazoubira* sob bandamento G. Após definir a homologia com a espécie *B. taurus*, calculamos o comprimento relativo (CR) dos cromossomos. As metáfases foram organizadas usando o tamanho do valor médio de CR. A média final e o cromossomo bovino correspondente são mostrados no Apêndice A. Cromossomos metafásicos representativas de cada indivíduo sob bandamento G e suas homologias com os cromossomos bovinos podem ser visualizadas na Figura 10. Ademais, o novo idiograma da banda G proposto para a espécie *Mazama gouazoubira* está representado na Figura 11.

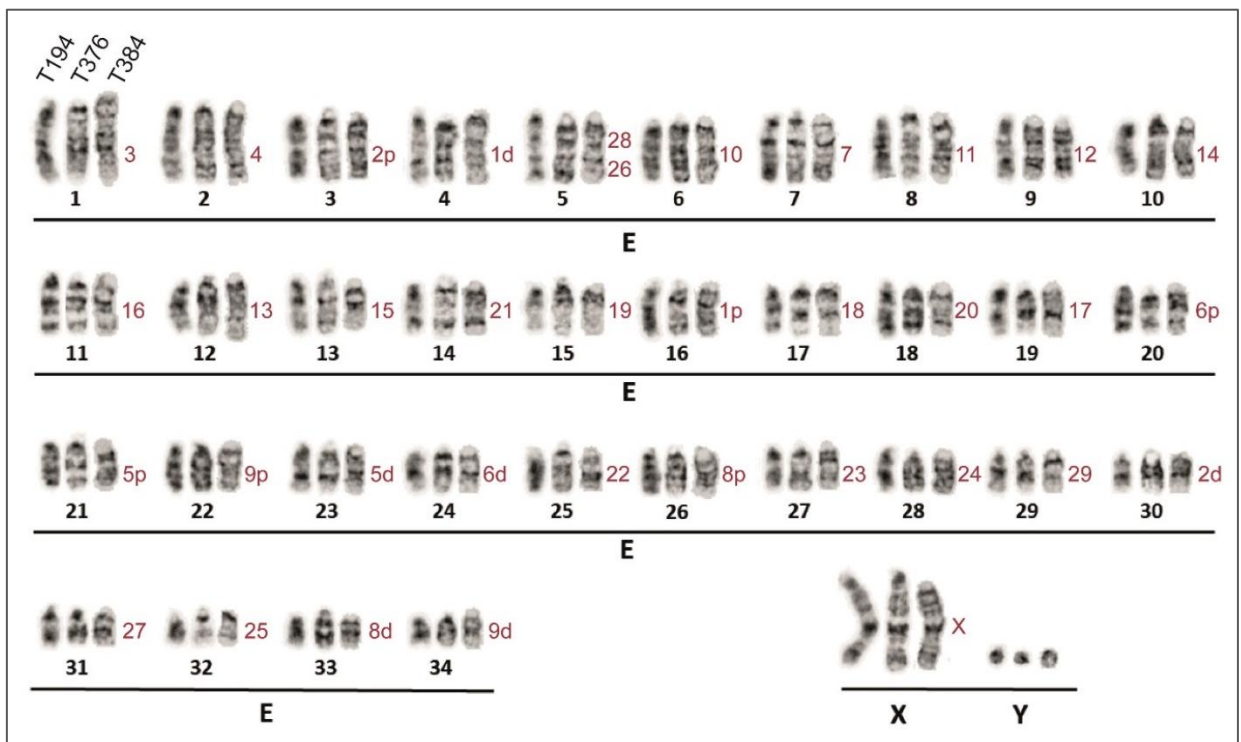


Figura 10. Cromossomos metafásicos sob Bandamento G dos indivíduos T194, T376 e T384. As homologias com os cromossomos bovino são mostradas à direita em vermelho. p = região proximal e d = região distal do cromossomo homólogo.

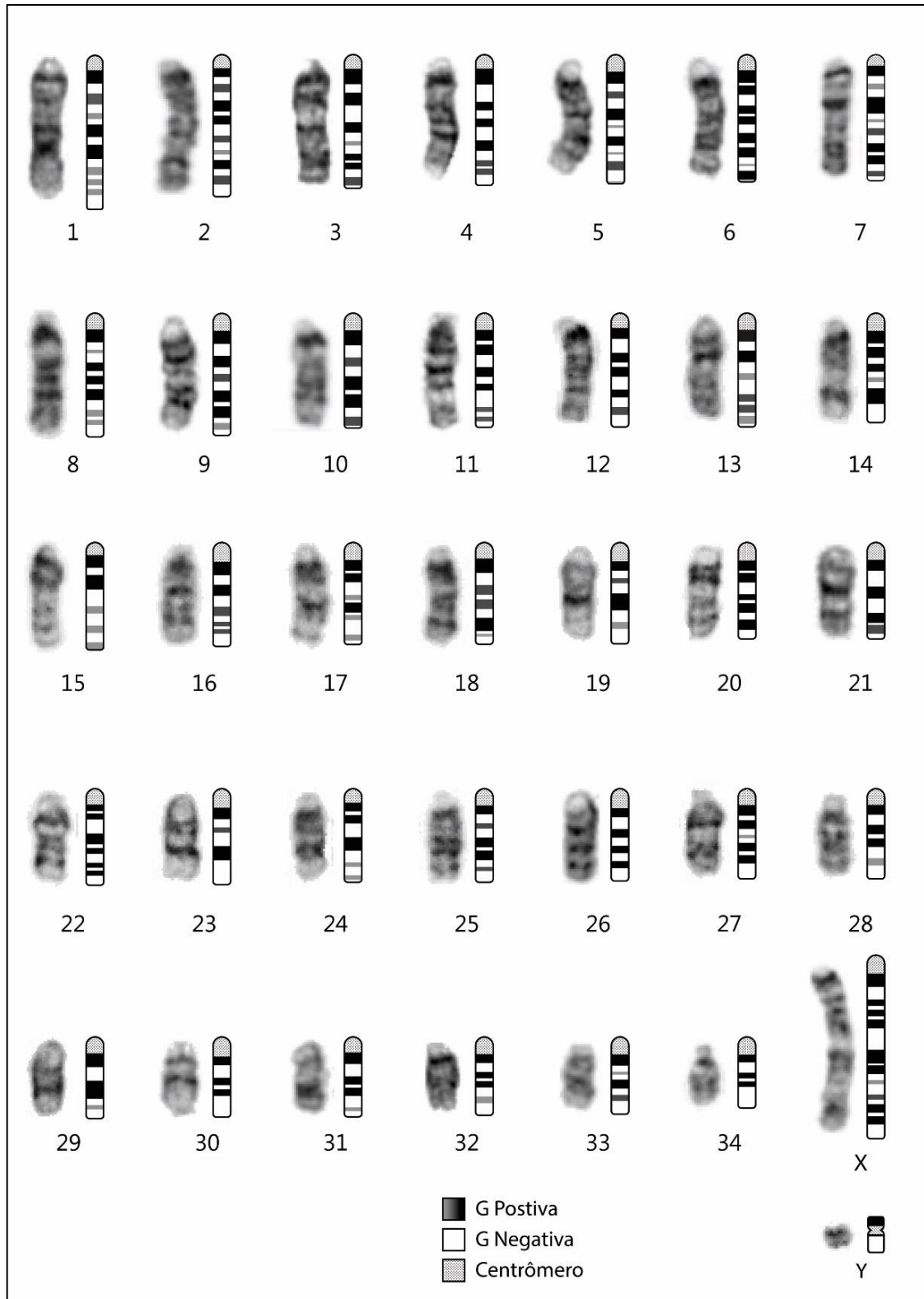


Figura 11. Novo idiograma proposto para Banda G em *Mazama gouazoubira* com otimização da qualidade do padrão de bandas.

5.2 Eficácia das sondas de BACs

Todo o conjunto de sondas de BACs produzidas foram hibridizadas em metáfases da espécie *B. taurus* com a finalidade de se confirmar a correta localização da marcação desejada. Dos 107 clones selecionados para a produção de sondas, apenas um clone, derivado da região medial de BTA14 (CH240-58J6) mostrou um sinal de hibridização em cromossomo diferente do par 14, marcando um pequeno cromossomo acrocêntrico. A hibridização dos outros 106 clones produziu os resultados desejáveis e foram testadas em metáfases de *Mazama gouazoubira*, seguindo o padrão de marcação proposto na tabela 2 (Figura 12).

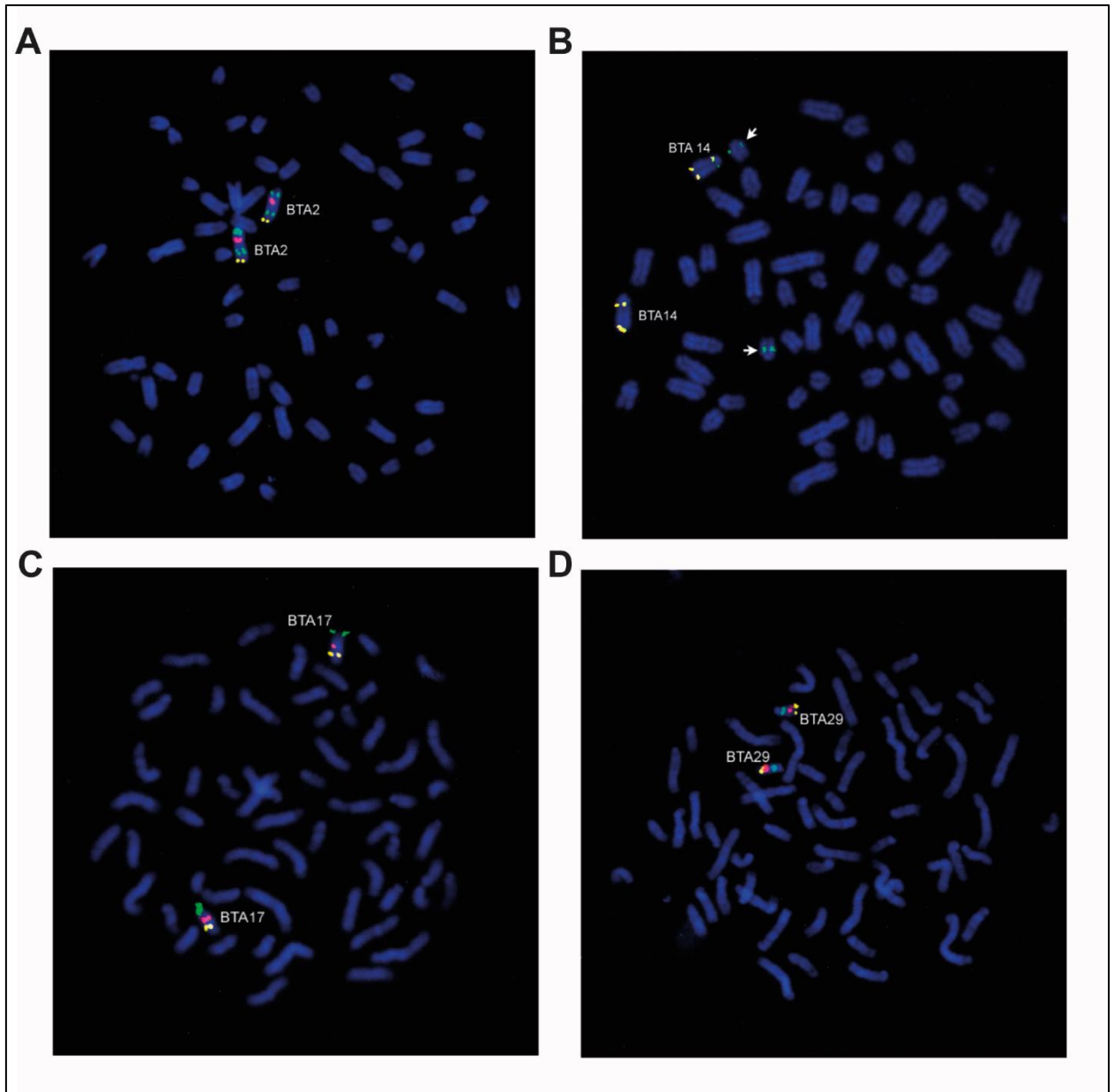


Figura 12. FISH mostrando os padrões de hibridização obtidos com sondas de BACs derivadas dos cromossomos de bovino (BTA) em metáfases de BTA. Sinais de hibridização dos clones derivados de (A) BTA2; (B) BTA14, as setas indicam a sonda do clone CH240-58J6, derivado da região medial, com sinais de hibridização na região pericentromérica de pequeno cromossomo acrocêntrico; (C) BTA17 e (D) BTA29 nos cromossomos esperados. A contra coloração foi realizada com DAPI (azul) e a marcação com digoxigenina (rosa), Green-dUTP (verde) e biotina (amarelo). Aumento de 1000x em microscópio de fluorescência.

5.3 Rearranjos evolutivos entre bovino e veado-catingueiro e produção do mapa citogenético dos 106 novos marcadores

Após avaliar a efetividade das sondas, a homologia cromossômica entre bovino e o veado-catingueiro (MGO) foi determinada pela hibridização das sondas produzidas em cromossomos de MGO. Todas as sondas utilizadas obtiveram sinais de hibridização em MGO (Apêndice A). A sonda CH240-58J6, derivada do BTA14, não foi hibridizada em *M. gouazoubira* devido a sua falha em marcar o cromossomo pretendido em bovino. A partir dos resultados das hibridizações, foi produzido um mapa citogenético com 106 novos marcadores para a espécie. A representação gráfica dos cromossomos com o local de marcação de cada sonda hibridizada com sucesso está na Figura 13.

As sondas de BACs derivadas dos pares BTA1, BTA2, BTA5, BTA6, BTA8 e BTA9 demonstraram sinais de hibridização em dois cromossomos diferentes, entretanto, apenas para os cromossomos BTA2 e BTA9 os dois cromossomos homólogos em *M. gouazoubira* tiveram dois marcadores cada. Nos cromossomos BTA1, BTA5, BTA6 e BTA8, três marcadores hibridizaram em um cromossomo homólogo enquanto o outro apresentou apenas um marcador (Figura 14a). Adicionalmente, os marcadores dos cromossomos BTA26 e BTA28 indicam que estes cromossomos bovinos estão fusionados em tandem em um único cromossomo de MGO. Nas demais análises, o grupo de sondas de BACs derivadas do mesmo autossomo bovino apresentaram sinais em um único par cromossômico em MGO (Figura 14b, c, d, e).

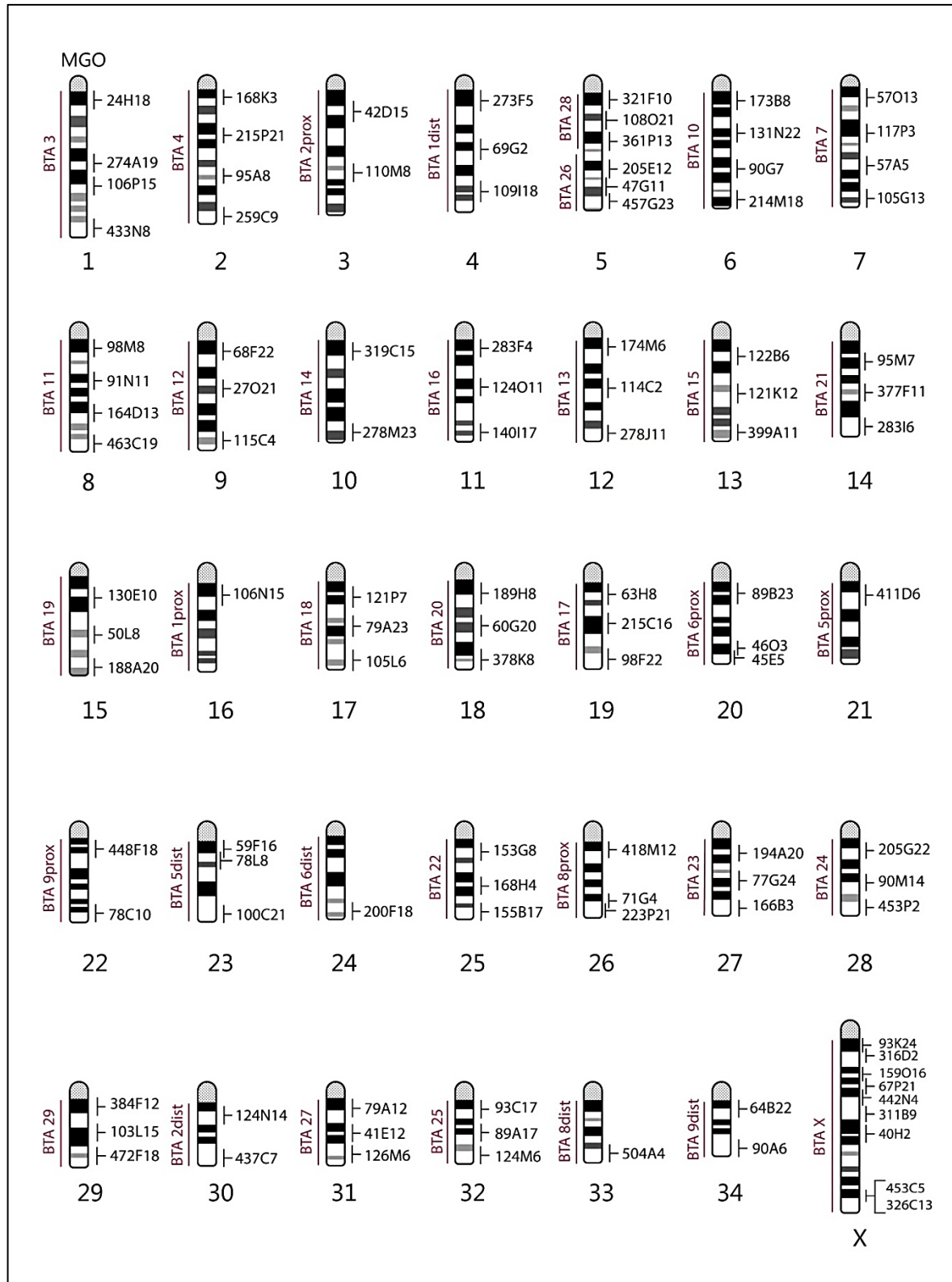


Figura 13. Mapa citogenético dos 106 novos marcadores para a espécie *Mazama gouazoubira* (MGO). A homologia com o cromossomo bovino está à esquerda e a identificação e localização dos clones de BAC estão à direita da representação gráfica de cada cromossomo MGO.

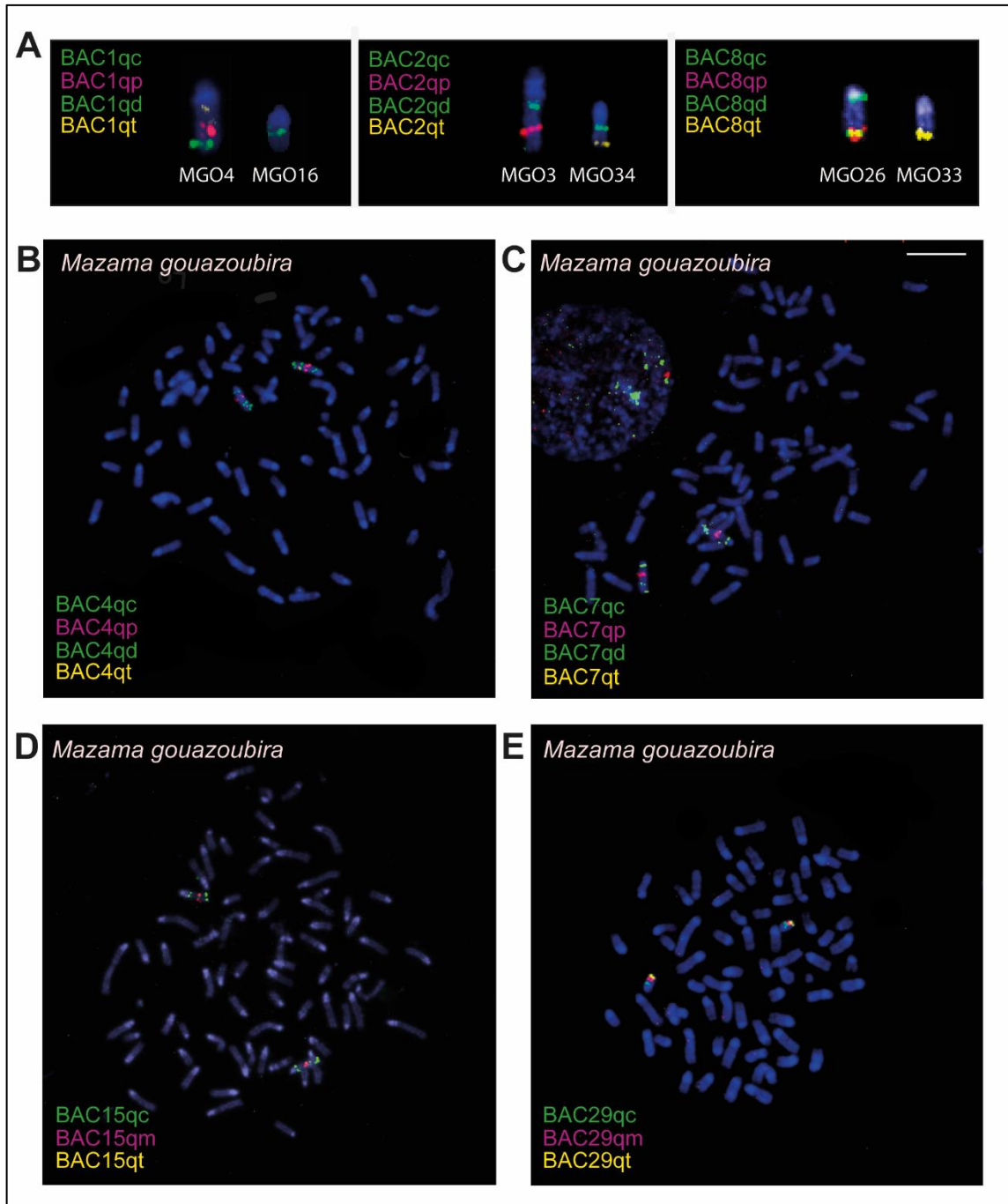


Figura 14. FISH mostrando a hibridização de sondas de BACs derivadas de genoma bovino (BTA) em cromossomos de *Mazama gouazoubira* (MGO): (A) cromossomos BTA1, BTA2 e BTA8 aparecem fissionados em MGO; (B) sondas derivadas do BTA4 e (C) BTA7 hibridizaram com grande cromossomo acrocêntrico; (D) sondas derivadas de BTA15 e (E) BTA29 hibridizaram com pequeno cromossomo acrocêntrico. A contra coloração foi feita com DAPI (azul) e a marcação com digoxigenina (rosa), Green-dUTP (verde) e biotina (amarelo). Aumento de 1000x em microscópio de fluorescência (barra de escala de 10 µm).

Ademais, rearranjos intracromossômicos foram observados entre as duas espécies. O homólogo ao BTA1 não é apenas dividido em dois cromossomos diferentes em MGO, mas também é reorganizado no cromossomo acrocêntrico maior (MGO4). A sonda BAC derivada da região centromérica do BTA1 (BAC1qc) hibridizou com a região centromérica do cromossomo MGO16; enquanto as BACs das região proximal (BAC1qp), distal (BAC1qd) e terminal (BAC1qt) hibridizaram com o par MGO4. As sondas BAC1qt e BAC1qp hibridizaram com as regiões centromérica e medial, respectivamente, enquanto a sonda BAC1qd hibridizou com a região distal (Figura 15a).

Para uma melhor descrição dos rearranjos presentes no cromossomo sexual X do veado-catingueiro, foram utilizadas nove sondas de BACs derivadas do cromossomo BTAX. Para a hibridização, as sondas foram separadas em três grupos de acordo com a localização dos clones BAC no cromossomo X submetacêntrico de bovino: grupo 1 formado pelas sondas localizadas do braço p (BTAXp), grupo 2 composto por sondas localizadas na região proximal do braço q (BTAXqp), e grupo 3 formado pela sonda de região distal do braço q (BTAXqd) e pela sonda da região pseudoautossômica (PAR).

Os resultados da FISH mostraram que as regiões BTAXp (grupo 1) e BTAXqp (grupo 2) estão reorganizadas. O grupo BTAXqp ficou dividida em dois blocos: os clones 93K29 e 316D9 hibridizaram com a região proximal do MGOX; já a sonda do clone 311B9, pertencente ao mesmo grupo, hibridizou em região medial do cromossomo. Também proximal, entre os dois blocos do BTAXqp, foram observados os sinais de hibridização das sondas do BTAXp. O grupo do BTAXqd, compreendendo a sonda do clone BAC 40H2 e a sonda da região pseudoautossômica, não foi reorganizado (Figura 15b).

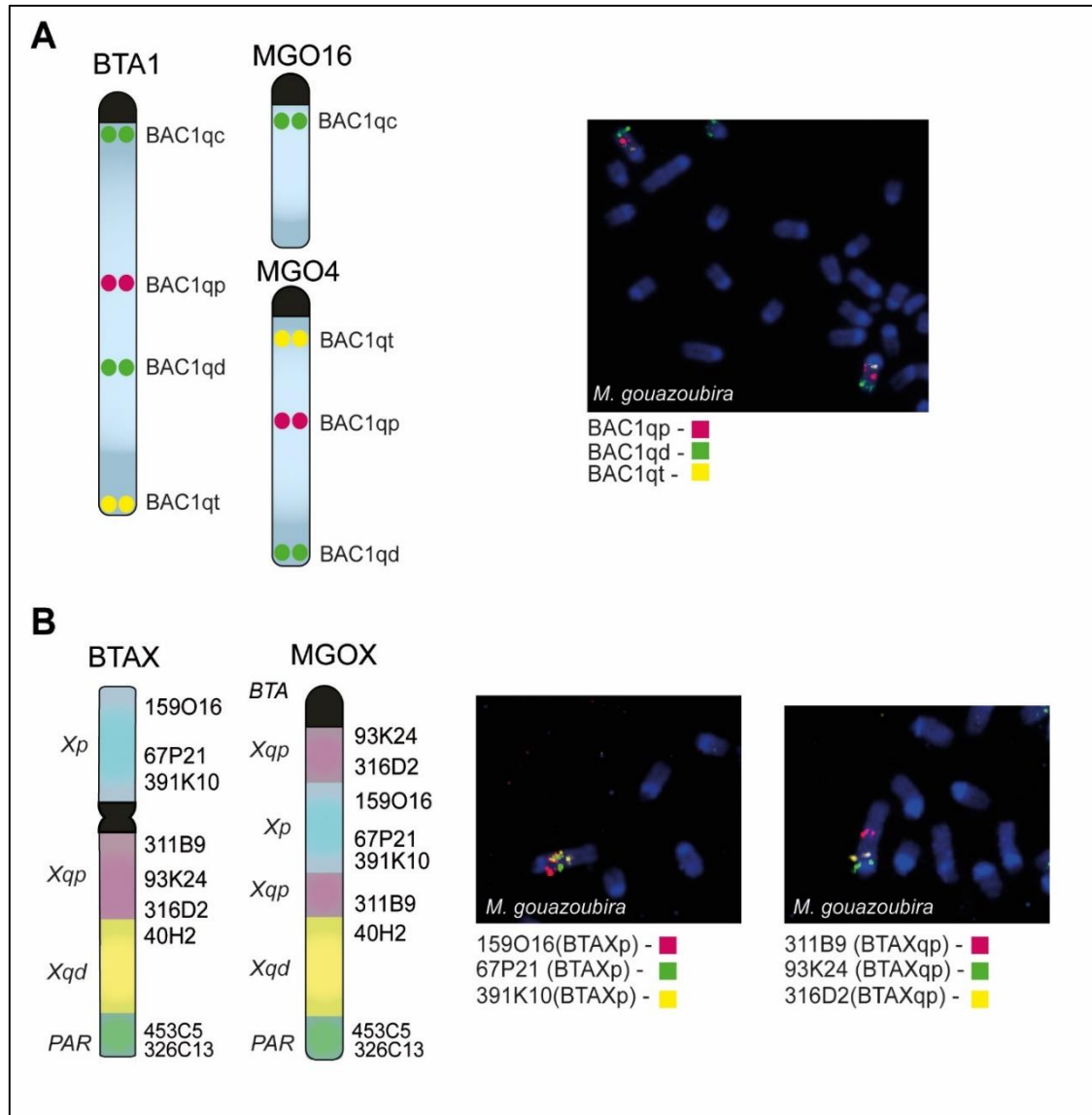


Figura 15. Representação gráfica e imagens da hibridização *in situ* fluorescente (FISH) nos cromossomos de veado-catingueiro (MGO) que apresentaram rearranjos intracromossômicos em comparação ao bovino (BTA): (A) BTA1 homólogo aos cromossomos MGO4 e MGO16. O sinal de hibridização da sonda de região telomérica do BTA1 (BAC1t) está em região centromérica; a marcação da região proximal (BAC1qp) está em região medial e a sonda de região distal (BAC1d) está em região terminal de MGO4. A sonda BAC1qc hibridizou com região centromérica de MGO16. (B) MGOX homólogo ao BTAX. Os sinais de hibridização visualizados em MGOX indicaram que o as sondas do braço p de BTAX (BTA Xp) e da região proximal do braço q (BTAXqp) se encontram rearranjadas, enquanto a região distal e pseudoautossômica do braço q (BTAXqd e PAR, respectivamente) não estão reorganizadas. A contra coloração foi feita com DAPI (azul) e a marcação com digoxigenina (rosa), Green-dUTP (verde) e biotina (amarelo). Aumento de 1000x em microscópio de fluorescência.

6. DISCUSSÃO

O instigante cenário da citogenética do cervídeos neotropicais demanda uma análise aprofundada dos cariótipos de suas espécies (Duarte e Jorge, 2003; Abril e Duarte, 2008; Abril et al., 2010b; Cifuentes-Rincón et al., 2020). O presente estudo representa a extensão da análise cromossômica em cervídeos neotropicais, por uma abordagem mais sensível que as técnicas de bandamento clássicas: a citogenética molecular. Essa nova abordagem é particularmente fundamental quando a análise citogenética possui grande importância nas análises filogenéticas, dado que técnicas baseadas em bandas cromossômicas clássicas podem conter imprecisões (Cernohorska et al., 2012).

O veado-catingueiro é reconhecido por ter retido o cariótipo ancestral dos cervídeos (Neitzel, 1987; Fontana e Rubini, 1990; Dementyeva et al., 2010). Foi produzido um idiograma atualizado de banda G da espécie visando uma melhor resolução de visualização das bandas. A representação esquemática da banda G tem um valor importante no estudo de cervídeos neotropicais devido aos polimorfismos cromossômicos frequentemente relatados (Abril e Duarte 2008; Abril et al., 2010b; Valeri et al., 2018). No entanto, é preciso ressaltar que *M. gouazoubira* apresenta cromossomos de morfologia e comprimento notavelmente semelhantes, sendo todos os autossomos e o X acrocêntricos (Neitzel, 1987; Duarte, 1992; Tomazella, 2016). Sendo assim, o estudo cromossômico dessa espécie requer bandas de alta qualidade e, mesmo nessa condição, as análises podem apresentar equívocos. Adicionalmente, os cervídeos neotropicais são reconhecidos pela rápida e complexa evolução cariotípica (Duarte e Jorge, 2003; Abril e Duarte, 2008; Abril et al., 2010a; Cifuentes-Rincón et al., 2020). Nesse caso, as técnicas citogenéticas moleculares se mostram mais adequadas e acuradas para o estudo das reorganizações cromossômicas (Graphodatsky et al., 2011). Consequentemente, para a otimização das análises futuras e resultados comparativos precisos, foram produzidos marcadores citogenéticos moleculares para a espécie que reteve o cariótipo ancestral da família.

Neste trabalho, foi apresentada a primeira investigação buscando a produção de um mapa cariotípico de alta-resolução pela produção de 106 novos marcadores para uma espécie de cervídeo neotropical. As análises detectaram que as sondas de

BACs derivadas dos cromossomos de *Bos taurus* demonstraram padrões de hibridização eficientes para identificar os cromossomos de *Mazama gouazoubira*. Diversas relações cariotípicas e detecção de rearranjos cromossômicos da ordem Cetartiodactyla já haviam sido determinadas através da utilização de sondas derivadas dos cromossomos de bovino (Ropiquet et al., 2010; Cernohorska et al., 2012; Cernohorska et al., 2013; Cernohorska et al., 2014; Frohlich et al., 2016; Frohlich et al., 2017). Para Cervidae, sondas de pintura cromossômica e de BACs de bovino foram particularmente utilizadas nas espécies *Cervus elaphus*, *Elaphurus davidianus*, *Cervus timorensis russa*, *Rucervus eldii*, *Alces alces*, *Rangifer tarandus*, *Capreolus capreolus*, *Dama dama* e *Muntiacus reevesi* (Frohlich et al., 2017).

Conforme identificado em nossos resultados, foi detectado que as diferenças entre bovino e cervídeos incluem 6 fissões (BTA1, 2, 5, 6, 8 e 9) e uma fusão em tandem (BTA 26/28), corroborando com as análises de Dementyeva et al. (2010) e Frohlich et al. (2017). O padrão das fissões dos seis cromossomos BTA é característico das espécies da família e a fusão entre o 26 e 28 é descrita como típica para a infraordem Pecora, com exceção da família Bovidae (Dementyeva et al., 2010; Frohlich et al., 2017).

O veado-catingueiro também apresentou reorganização no homólogo ao BTA1, o qual não é dividido somente em dois pares acrocêntricos, mas também é rearranjado no cromossomo homólogo MGO4. Rearranjos evolutivos intracromossômicos foram descritos anteriormente para os homólogos ao BTA1 em Cervidae (Frohlich et al., 2017). Entretanto, a reorganização em *M. gouazoubira* difere das espécies de cervídeos previamente estudadas. Enquanto os clones BAC da região terminal de BTA1 hibridizaram com a região medial do homólogo acrocêntrico maior em *E. davidianus*, *D. dama*, *C. elaphus*, *C. timorensis russa*, *R. eldii*, *C. capreolus* e *M. reevesi* ou a parte distal (em relação ao centrômero) do braço p do homólogo submetacêntrico em *A. alces* e *R. tarandus* (Frohlich et al., 2017), em MGO a mesma sonda hibridizou em região centromérica do homólogo acrocêntrico maior.

O cromossomo sexual X é reconhecido por suas complexas alterações cromossômicas dentro de Cetartiodactyla (Proskuryakova et al., 2017). Os cervídeos apresentam cromossomos X de diferentes morfologias além de espécies que exibem sistema sexual múltiplo pela presença de rearranjos X-autossômicos (Yang et al.,

1995; Chi et al., 2005; Abril et al., 2010). Para o cromossomo X, dois tipos diferentes foram descritos previamente para cervídeos: a variante acrocêntrica, encontrada nas espécies da subfamília Cervinae; e a submetacêntrica, característica da subfamília Capreolinae (Frohlich et al., 2017). Usando um conjunto de clones BAC apropriados, demonstramos que o cromossomo MGOX é semelhante à variante acrocêntrica descrita por Frohlich et al. (2017) quanto a ordem de BACs. Essa variante foi descrita nas espécies de cervídeos estudadas da subfamília Cervinae, formada pelas tribos Cervini, a qual engloba os gêneros *Dama*, *Axis*, *Rucervus*, *Panolia*, *Elaphurus* e *Cervus*; e tribo Muntiacini, que compreende os gêneros *Muntiacus* e *Elaphodus*.

Como uma exceção ao resto de sua subfamília, a espécie *M. gouazoubira* conservou a morfologia acrocêntrica descrita para as espécies que retiveram o cariótipo ancestral. Em contraposição, a morfologia submetacêntrica do cromossomo X foi resultado de uma inversão pericêntrica que ocorreu cedo na diferenciação da subfamília Capreolinae, que consiste nas tribos Capreolini (*Capreolus* e *Hydropotes*), Alceini (*Alces*) e Odocoileini (*Rangifer*, *Odocoileus*, *Blastocerus*, *Ozotoceros*, *Hippocamelus*, *Pudu* e *Mazama*) (Abril et al., 2010a; Frohlich et al., 2017).

Dentro do contexto apresentado pelos cervídeos neotropicais, onde o estudo da evolução cariotípica e dos polimorfismos são escassos e fundamentados em técnicas clássicas, a produção do mapa citogenético de novos marcadores ajudará a compreender a história evolutiva do grupo. A comparação da localização das sondas de BACs mapeadas no presente estudo permitirá a detecção dos homólogos e a orientação dos segmentos cromossômicos ancestrais nas demais espécies de cervídeos. Um excelente exemplo da aplicação dos mapas comparativos é demonstrado pelos estudos de evolução cariotípica do gênero *Muntiacus* (Yang et al., 1997 a,b e c; Chi et al., 2005; Mudd et al., 2020). Semelhante ao gênero *Mazama*, esse grupo de veados asiáticos possui uma grande diversidade cariotípica associada a uma rápida evolução (Mudd et al., 2020). Para avaliar a evolução cromossômica desse grupo, uma biblioteca de clones BAC do muntíaco-indiano (*Muntiacus muntjack vaginalis*, $2n = 6$ nas fêmeas e 7 nos machos) foi construída (Chi et al., 2005). O mapeamento comparativo desses clones BAC entre essa espécie, o qual possui o menor número cromossômico de todos os mamíferos, e o muntíaco-chinês (*Muntiacus reevesi*, $2n = 46$), que possui o maior número diploide do gênero, sugeriu que

todas as fusões em tandem que ocorreram durante a evolução do cariótipo da espécie indiana foram fusões centrômero-telômero. O estudo não detectou rearranjos intrassegmentais entre as duas espécies (Chi et al., 2005).

Outra possível aplicação dos novos marcadores produzidos encontra-se na avaliação do impacto dos polimorfismos cromossômicos como barreiras reprodutivas. Clones BAC de bovino foram utilizados para a visualização clara dos produtos da segregação meiótica de indivíduos portadores de rearranjos cromossômicos em heterozigose das espécies *M. americana* e *M. gouazoubira*. De forma geral, esses estudos demonstraram que as fusões cêntricas (translocações Robertsonianas) afetam pouco a ploidia dos espermatozoide, enquanto, as fusões em tandem mostraram importante efeito na segregação meiótica dos cromossomos envolvidos, com elevadas taxas de gametas desbalanceados (Galindo et al., 2021a e b). Além disto, por serem sondas de regiões específicas, o uso de BACs auxiliou na detecção de uma inversão pericêntrica no cromossomo MGO4 em carreadores da Translocação Robertsoniana 4;16 e verificou uma porcentagem maior de erros meióticos nos portadores dessa inversão daqueles que só possuíam a translocação (Galindo et al., 2021b). Conforme demonstrado, a citogenética molecular e o monitoramento citogenético de espécies selvagens em programas de conservação *in situ* ou *ex situ* é altamente recomendado por prover informações que podem ser implementadas no manejo da vida selvagem e em estratégias de conservação. O uso dos clones BAC foi de grande importância no maior entendimento das barreiras reprodutivas provocadas por rearranjos cromossômicos e, por consequência, no padrão de especiação do gênero *Mazama*.

7. CONCLUSÃO

Muitas questões evolutivas e taxonômicas permanecem nas espécies de cervídeos. Nesse contexto, a técnica de hibridação *in situ* fluorescente é uma ferramenta poderosa na citogenética comparativa e uma promessa para a melhor

interpretação dos eventos de evolução cariotípica e formação de barreiras reprodutivas para os cervídeos neotropicais, pouco estudados pela citogenética molecular. As sondas de BACs derivadas de genoma bovino mostraram-se eficientes no estabelecimento de marcadores cromossômicos para a espécie neotropical *Mazama gouazoubira*. O mapa citogenético de um cervídeo que reteve o cariótipo putativo ancestral aplicado para outras espécies proporcionará uma melhor compreensão do cenário da evolução cariotípica, do papel dos polimorfismos cromossômicos como barreiras reprodutivas e auxiliará na descrição de espécies crípticas. Assim, espera-se que os estudos futuros usando os marcadores produzidos resultem em um grande conhecimento taxonômico e reprodutivo contribuindo no planejamento do manejo e da conservação das espécies selvagens.

8. REFERÊNCIAS

Abril VV, Duarte JMB (2008) Chromosome polymorphism in the Brazilian dwarf brocket deer, *Mazama nana* (Mammalia, Cervidae). **Genetics and Molecular Biology** 3:53-57.

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

Abril VV, Sarria-Perea JA, Vargas-Munar DSF, Duarte JMB (2010) Chromosome Evolution. In.: Duarte JMB e Gonzalez S (Eds.) **Neotropical Cervidology, Biology and Medicine of Latin American Deer**. Jaboticabal/Gland: Funep/IUCN, p. 18-26.

Abril VV, Carnelossi EAG, González S, Duarte JMB (2010) Elucidating the Evolution of the red brocket deer *Mazama americana* Complex (Artiodactyla; Cervidae). **Cytogenetic and Genome Research** 128:177-187.

Allen JA (1915) Notes on American deer of the genus *Mazama*. **Bulletin of the American Museum of Natural History** 34:521–553.

Aquino CI, Abril VV, Duarte JMB (2013) Meiotic pairing of B chromosomes, multiple sexual system, and Robertsonian fusion in the red brocket deer *Mazama americana* (Mammalia, Cervidae). **Genetics and Molecular Research** 12:3566-3574.

Baker RJ, Bickham JW (1986) Speciation by monobrachial centric fusions. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** 83:8245-8248.

Black-Décima PA, Rossi RV, Voglioti A, Cartes JL, Maffei L, Duarte JMB, González S, Juliá JP (2010) Brown Brocket Deer *Mazama gouazoubira* (Fischer 1814). In.: Duarte JMB, González S (Eds.) **Neotropical Cervidology: Biology and Medicine of Latin American Deer**. Funep/IUCN, Jaboticabal/Gland, p. 190–201.

Black-Décima PA, Vogliotti A (2016) *Mazama gouazoubira*, Gray Brocket. **The IUCN Red List of Threatened Species** e.T29620A22154584.

Bonnet-Garnier A, Claro F, Thévenon S, Gautier M, Hayes H (2003) Identification by R-banding and FISH of chromosome arms involved in Robertsonian translocations in several deer species. **Chromosome Research** 11: 649-663.

Bovine Genome Sequencing and Analysis Consortium: The Genome Sequence of Taurine Cattle: A Window to Ruminant Biology and Evolution (2009). **Science** 324: 522–528.

Camacho JPM (2005) B Chromosomes. In.: Gregory TR (Ed.) **The Evolution of the Genome**. San Diego: Elsevier Inc., p. 223–286.

Cabrera A (1960) Catálogo de los mamíferos de América del Sur. **Revista Museo Argentino Bernardino Rivadavia** 4:309-732.

Cernohorska H, Kubickova S, Vahala J, Rubes J (2012) Molecular insights into X;BTA5 chromosome rearrangements in the tribe Antilopini (Bovidae). **Cytogenetics and Genome Research** 136: 188–198.

Cernohorska H, Kubickova S, Kopečna O, Kulemzina AI, Perelman PL, Elder FFB, Robinson TJ, Graphodatsky AS, Rubes J (2013) Molecular cytogenetic insights to the phylogenetic affinities of the giraffe (*Giraffa camelopardalis*) and pronghorn (*Antilocapra americana*). **Chromosome Research** 21:447–460.

Cernohorska H, Kubickova S, Kopečna O, Vozdova M, Matthee CA, Robinson TJ, Rubes J (2014) Nanger, Eudorcas, Gazella, and Antelope form a well-supported chromosomal clade within Antilopini (Bovidae, Cetartiodactyla). **Chromosoma** 124: 235-247.

Chi J, Huang L, Nie W, Wang J, Su B, Yang F (2005) Defining the orientation of the tandem fusions that occurred during the evolution of Indian muntjac chromosomes by BAC mapping. **Chromosoma** 114: 167-172.

Cifuentes-Rincón A, Morales-Donoso JA, Sandoval EDP, Tomazella, IM, Mantellatto AMB, Thoisy B, Duarte JMB (2020). Designation of a neotype for *Mazama americana*

(Artiodactyla, Cervidae) reveals a cryptic new complex of brocket deer species. **ZooKeys** 958:143–164.

Cursino MS, Salviano MB, Abril VV, Zanetti ES, Duarte JMB (2014) The role of chromosome variation in the speciation of the red brocket deer complex: the study of reproductive isolation in females. **BMC Evolutionary Biology** 14:40.

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

Dementyeva PV, Trifonov VA, Kulemzina AI, Graphodatsky AS (2010) Reconstruction of the putative Cervidae ancestral karyotype by chromosome painting of Siberian roe deer (*Capreolus pygargus*) with dromedary probes. **Cytogenetic and Genome Research** 128:228-235.

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

Duarte JMB, Jorge W (1996) Chromosomal polymorphism in several populations of deer (genus *Mazama*) from Brazil. **Archivos de Zootecnia** 45:281-287.

Duarte JMB, Merino ML (1997) Taxonomia e evolução. In.: Duarte JMB (Ed.). **Biologia e Conservação de Cervídeos Sul-Americanos: Blastocerus, Ozotoceros e Mazama**. Jaboticabal:Funep, p. 1-21.

Duarte JMB (1998) **Análise citogenética e taxonômica do gênero Mazama (Cervidae; Artiodactyla) no Brasil**. 45 f. Tese (Doutorado em Genética) Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu.

Duarte JMB, Jorge W (2003) Morphologic and cytogenetic description of the small red brocket (*Mazama bororo* Duarte, 1996) in Brazil. **Mammalia** 67:403–410.

Duarte JMB (2007) Artiodactyla – Cervidae. In.: Cucas Z, Silva JCR, Catao-Dias JL (Eds.). **Tratado de Animais Selvagens: Medicina Veterinária**, Roca, Sao Paulo, pp. 641–664.

Duarte JMB, Gonzalez S, Maldonado JE (2008) The surprising evolutionary history of South American deer. **Molecular Phylogenetics and Evolution** 49:17-22.

Duarte JMB, Gonzalez S (Eds.) (2010) **Neotropical Cervidology. Biology and Medicine of Latin American Deer**. Jaboticabal: FUNEP e IUCN, 394p.

Eisenberg JF (1987) The evolutionary history of the Cervidae with special reference to the South American radiation. In.: Wemmer C (Ed.). **Biology and Management of the Cervidae**. Washington: Smithsonian Institution Press, p. 60-64.

Eisenberg JF (2000) The contemporary Cervidae of Central and South America. In.: Vrba ES; Schaller GB (Eds.) **Antelopes, Deer, and Relatives: fossil record, behavioral ecology, systematic, and conservation**. New Haven: Yale University Press, p. 189-202.

Ferguson-Smith MA, Trifonov V (2007). Mammalian karyotype evolution. **Nature Reviews Genetics** 8, 950–962.

Fiorillo BF, Sarria-Perea JA, Abril VV, Duarte JMB (2013) Cytogenetic description of the Amazonian brown brocket *Mazama nemorivaga* (Artiodactyla, Cervidae). **Comparative Cytogenetics**. 7(1):25-31.

Fontana F, Rubini M (1990) Chromosomal evolution in Cervidae. **BioSystems** 34: 157-174.

Frohlich J, Kubickova S, Cernohorska H, Musilova P, Muskova H, Rubes J. (2016) A comparative study of pygmy hippopotamus (*Choeropsis liberiensis*) karyotype by cross-species chromosome painting. **Journal of Mammalian Evolution** 24:465–474.

Frohlich J, Kubickova S, Musilova P, Cernohorska H, Muskova H, Vodicka R, Rubes J (2017) Karyotype relationships among selected deer species and cattle revealed by bovine FISH probes. **PLoS ONE** 12(11): e0187559.

Gallagher DS Jr, Womack JE (1992) Chromosome conservation in the Bovidae. **Journal of Heredity** 83(4): 287-298.

Galindo DJ, Vozdova M, Kubickova S, Cernohorska H, Bernegossi AM, Kadlcikova D, Rubes J, Duarte JMB (2021) Sperm chromosome segregation of rob(4;16) and rob(4;16)inv(4) in the brown brocket deer (*Mazama gouazoubira*). **Theriogenology** 168:33-34.

Galindo DJ, Martins GS, Vozdova M, Cernohorska H, Kubickova S, Bernegossi AM, Kadlcikova D, Rubes J, Duarte JMB (2021) Chromosomal Polymorphism and Speciation: The Case of the Genus *Mazama* (Cetartiodactyla; Cervidae). **Genes** 12:165.

Geist V (1998) **Deer of the world. Their evolution, behaviour, and ecology**. Pennsylvania: Stackpole Books, 421.p.

Gilbert C, Ropiquet A., Hassanin A (2006) Mitochondrial and nuclear phylogenies of Cervidae (Mammalia, Ruminantia): Systematics, morphology, and biogeography. **Molecular Phylogenetics and Evolution** 40:101-117.

González S, Duarte JMB, Maldonado JE (2010). Molecular Phylogenetics and Evolution. In.: Duarte JMB, Gonzalez S. (Eds.) **Neotropical Cervidology, Biology and Medicine of Latin American Deer**. Jaboticabal/Gland: Funep/IUCN, p. 12-17.

González S; Duarte JMB (2020). Speciation, evolutionary history and conservation trends of Neotropical deer. **Mastozoologia Neotropical** 27:37-47.

Graphodatsky AS, Trifonov VA, Stanyon R (2011) The genome diversity and karyotype evolution of mammals. **Molecular Cytogenetics** 4(1):22.

Gutiérrez EE, Helgen KM, McDonough MM, Bauer F, Hawkins MTR, Escobedo-Morales LA, Patterson BD, Maldonado JE (2017) A gene-tree test of the traditional taxonomy of American deer: the importance of voucher specimens, geographic data, and dense sampling. **ZooKeys** 697:87-131.

Quiles JL, Huertas JR; Battino M; Mataix J; Ramírez-Tortosa MC (2002) Antioxidant nutrients and adriamycin toxicity. **Toxicology** 180:79-95.

Hassanin A, Delsuc F, Ropiquet A, Hammer C, Jansen Van Vuuren B, Matthee C, Ruiz-Garcia M, Catzeflis F, Areskoug V, Nguyen TT, Couloux A (2012) Pattern and timing of diversification of Cetartiodactyla (Mammalia, Laurasiatheria), as revealed by a comprehensive analysis of mitochondrial genomes. **Comptes Rendus - Biologies** 335:32–50.

Heckeberg NS (2020) The systematics of the Cervidae: a total evidence approach. **PeerJ** 8:e8114.

ISCNDB (2000) International system for chromosome nomenclature of domestic bovids. **Cytogenetics and Cell Genetics**. 92:283–299.

Islaih M, Halstead BW, Kadura IA, Li B, Reid-Hubbard JL, Flick L, Altizer JL, Thom Deahl J, Monteith DK, Newton RK, et al. (2005) Relationships between genomic cell cycle, and mutagenic responses of TK6 cells exposed to DNA damaging chemicals. **Mutation Research** 578:100-116.

Kasahara S (2009) Introdução à Pesquisa em Citogenética de Vertebrados. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 160p.

Liher T, Weise A (2017) Background. In.: Liher T (Ed.). **Fluorescence *in situ* Hybridization (FISH) – Application Guide**. Springer, p. 1-14.

Liehr T (2017) Homemade Locus-Specific FISH Probes: Bacterial Artificial Chromosomes. In.: Liher T (Ed.). **Fluorescence *in situ* Hybridization (FISH) – Application Guide**. Springer, p. 101-106.

Makunin AI, Kichigin IG, Larkin DM, et al. (2016) Contrasting origin of B chromosome in two cervids (Siberian roe deer and grey brocket deer) unravelled by chromosome-specific DNA sequencing. **BioMed Central Genomics** 17:618-632.

Merino ML, Rossi RV (2010) Origin, Systematics, and Morphological Radiation. In.: Duarte JMB e Gonzalez S (Eds.) **Neotropical Cervidology, Biology and Medicine of Latin American Deer**. Jaboticabal/Gland: Funep/IUCN, p. 2-11.

Mudd AB, Bredeson JV, Baum R, Hockemeyer D, Rokhsar DS (2020) Analysis of muntjac deer genome and chromatin architecture reveals rapid karyotype evolution. **Communications Biology** 3(1):480.

Neitzel H (1979) Chromosomenevolution in der Familie der Hirsche (Cervidae). **Bongo** 3:27 – 38.

Neitzel H (1987) Chromosome evolution of Cervidae: Karyotypic and molecular aspects. In.: Obe G., Basler A (Eds.). **Cytogenetics, basic and applied aspects**, Berlin: Springer Verlag, p. 90-112.

Pedrosa-Harand A (2012) Hibridização *in situ* de BACs. In.: Guerra M (Ed.). **Citogenética molecular: Protocolos comentados**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, p 35-58.

Proskuryakova AA, Kulemzina AI, et al. (2017) X chromosome evolution in Cetartiodactyla. **Genes** 8:216 (2017).

Resende FA; Tomazella IM, Barbosa LC, Ponce M, Furtado RA, Pereira AC, Bastos JK, Silva MLA, Tavares DC (2010). Effect of the dibenzylbutyrolactone lignan (-)-hinokinin on doxorubicin and methyl methanesulfonate clastogenicity in V79 Chinese hamster lung fibroblasts. **Mutation Research** 700:62-66.

Rocchi M, Archidiacono N, Schempp W, Capozzi O, Stanyon R. (2012) Centromere repositioning in mammals. **Heredity** 108(1):59-67.

Ropiquet A, Hassanin A, Pagacova E, Gerbault-Seureau M, Cernohorska H, Kubickova S et al. (2010) A paradox revealed: karyotype evolution in the four-horned antelope occurs by tandem fusion (Mammalia, Bovidae, *Tetracerus quadricornis*). **Chromosome Research** 18:277–286.

Rossi RV (2000) Taxonomia de *Mazama* Rafinesque, 1817 do Brasil (Artiodactyla, Cervidae). 169p. Dissertação (Mestrado em Zoologia). Universidade de São Paulo, São Paulo.

Rubes J, Musilova P, Mastromonaco GF (2008) Cytogenetics of wild and captive bred non-domestic animals. **Cytogenetic and Genome Research** 120:61-68.

Rubes J, Kubickova S, Pagacova E, Cernohorska H, di Berardino D, Antoninova M, et al. (2008) Phylogenomic study of spiral-horned antelope by cross-species chromosome painting. **Chromosome Research** 16:935–947.

Salviano MB, Cursino MS, Zanetti ES, Abril VV, Duarte JMB (2017) Intraspecific chromosome polymorphisms can lead to reproductive isolation and speciation: an example in red brocket deer (*Mazama americana*). **Biology of Reproduction** 96(6):1279–1287.

Seabright M (1972) A rapid banding technique for human chromosomes. **Lancet** 2:971–972.

Shi L, Ye Y, Duan X (1980) Comparative cytogenetic studies on the red muntjac, Chinese muntjac and their F1 hybrids. **Cytogenetics and Cell Genetics** 26: 22–27.

Trifonov VA, Dementyeva PV, Larkin DM, O'Brien PC, Perelman PL, Yang F, Ferguson-Smith MA, Graphodatsky AS. (2013). Transcription of a protein-coding gene on B chromosomes of the Siberian roe deer (*Capreolus pygargus*). **BMC Biology** 11(1):90.

Trifonov V, Vorobieva N, Rens W (2017) FISH with and without Cot-1 DNA. In.: Liher T(Ed.). **Fluorescence *in situ* Hybridization (FISH) – Application Guide**. Springer, p. 99-109.

Tomazella IM (2016) **Análise do polimorfismo cromossômico em *Mazama gouazoubira* (Artiodactyla; Cervidae): implicações para a evolução cariotípica em Cervidae**. 108p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento Animal) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal.

Tomazella IM, Abril VV, Duarte JMB (2017) Identifying *Mazama gouazoubira* (Artiodactyla; Cervidae) chromosomes involved in rearrangements induced by doxorubicin. **Genetics and Molecular Biology**. 40(2):460-467.

Valeri MP, Tomazella IM, Duarte JMB (2018) Intrapopulation Chromosomal Polymorphism in *Mazama gouazoubira* (Cetartiodactyla; Cervidae): The Emergence of a New Species? **Cytogenetic and Genome Research** 154:147-152.

Vargas-Munar DSF, Sarria-Perea J, Duarte JMB (2010) Different responses to doxorubicin-induced chromosome aberrations in Brazilian deer species. **Genetics and Molecular Research** 9(3): 1545-1549.

Verma RS, Babu A (1995) **Human chromosomes: principles and techniques**. New York: McGraw Hill, 419p.

Vozdova M, Kubickova S, Cernohorska H, Fröhlich J, Vodicka R, Rubes J (2019) Comparative study of the bush dog (*Speothos venaticus*) karyotype and analysis of satellite DNA Sequences and their chromosome distribution in six species of canidae. **Cytogenetics and Genome Research** 159:88–96.

Webb DS (2000) Evolutionary History of new world cervidae. In.: Vrba ES, Schaller GB (Eds.) **Antelopes, Deer, and Relatives: fossil record, behavioral ecology, systematic, and conservation**. New Haven: Yale University Press, p. 38-64.

Yang F, Carter NP; Shi L, Ferguson-Smith MA (1995) A comparative study of karyotypes of muntjacs by chromosome painting. **Chromosoma**, Berlin 103:642- 652.

Yang F, O'Brien PCM, Wienberg J, Ferguson-Smith MA (1997) A reappraisal of the tandem fusion theory of karyotype evolution in the Indian muntjac using chromosome painting. **Chromosome Research** 5:109-117.

Yang F, O'Brien PCM, Wienberg J, Neitzel H, Lin CC, Ferguson Smith MA (1997) Chromosomal evolution of the Chinese muntjac (*Muntiacus reevesi*). **Chromosoma** 106:37–43.

Yang F, O'Brien PCM, Wienberg J, Ferguson-Smith MA (1997) Evolution of the black muntjac (*Muntiacus crinifrons*) karyotype revealed by comparative chromosome painting. **Cytogenetics and Cell Genetics** 76:59-63.

Yang F, Graphodatsky AS (2017) Animal Probes and ZOO-FISH. In.: Liher T. **Fluorescence *in situ* Hybridization (FISH) – Application Guide**. Springer, p. 395-415.

Zurano JP, Magalhães FM, Asato AE, Silva G, Bidau CJ, Mesquita DO, Costa GC (2019) Cetartiodactyla: updating a time-calibrated molecular phylogeny. **Molecular Phylogenetics and Evolution** 133:256–262.

APÊNDICE A

Tabela 1. Classificação proposta para *Mazama gouazoubira* baseada no comprimento relativo (CR) e homologia com os cromossomos de bovino (BTA). Os correspondentes marcadores BACs para cada cromossomo do veado-catingueiro são mostrados na última coluna.

Classificação	CR (média)	Homologia BTA	Clones BAC
1	4,0694	3	24H18, 274A19, 106P15, 433N8
2	3,7231	4	168K3, 215P21, 95A8, 259C9
3	3,5119	2prox	42D15, 110M8
4	3,4366	1dist	273F5, 69G2, 109I18
5	3,3931	28/26	321F10, 108O21, 361P13/205E12,47G11, 457G23
6	3,3496	10	173B8, 131N22, 90G7, 214M18
7	3,3041	7	57O13, 117P3, 57A5, 105G13
8	3,2382	11	98M8, 91N11, 164D13, 463C19
9	3,2038	12	68F22, 27O21, 115C4
10	3,0415	14	319C15, 278M23
11	2,9984	16	283F4, 124O11, 140I17
12	2,9754	13	174M6, 114C2, 278J11
13	2,9745	15	122B6, 121K12, 399A11
14	2,8668	21	95M7, 377F11, 283I6
15	2,8275	19	130E10, 50L8, 188A20
16	2,7274	1prox	106N15
17	2,6791	18	121P7, 79A23, 105L6
18	2,6706	20	189H8, 60G20, 378K8
19	2,6566	17	63H8, 215C16, 98F22
20	2,5288	6prox	89B23, 46O3, 45E5
21	2,5284	5prox	411D6
22	2,5263	9prox	448F18, 78C10
23	2,5231	5dist	59F16, 78L8, 100C21
24	2,4583	6dist	200F18
25	2,4544	22	153G8, 168H4, 155B17
26	2,4232	8prox	418M12, 71G4, 223P21
27	2,3690	23	194A20,77G24, 166B3
28	2,3670	24	205G22, 90M14, 453P2
29	2,1812	29	384F12, 103L15, 472F18
30	2,1142	2dist	124N14, 437C7
31	2,0891	27	79A12, 41E12, 126M6
32	2,0619	25	93C17, 89A17, 124M6
33	2,0190	8dist	504A4
34	1,8635	9dist	64B22, 90A6
X	4,8265	X	93K24, 316D2, 159O16,67P21, 442N4, 311B9, 40H2, 302C6, 453C5, 326C13
Y	1,0539	-	-