

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

LUANA TAVARES BARBOSA

CONTRIBUIÇÕES CITOGENÉTICAS NAS ESPÉCIES *GALICTIS CUJA*
(CARNIVORA, MUSTELIDAE) E *SCAPTEROMYS* (RODENTIA, CRICETIDAE).

1. DESCRIÇÃO CROMOSSÔMICA, UTILIZANDO CITOGENÉTICA CLÁSSICA
E MOLECULAR, DA ESPÉCIE *GALICTIS CUJA* (CARNIVORA,
MUSTELIDAE)
2. CARACTERIZAÇÃO CARIOTÍPICA ATRAVÉS DA CITOGENÉTICA
CLÁSSICA E ANÁLISE FILOGENÉTICA EM CITÓTIPOS DO GÊNERO
SCAPTEROMYS (RODENTIA, CRICETIDAE)

CURITIBA
2013

LUANA TAVARES BARBOSA

CONTRIBUIÇÕES CITOGENÉTICAS NAS ESPÉCIES *GALICTIS CUJA*
(CARNIVORA, MUSTELIDAE) E *SCAPTEROMYS* (RODENTIA, CRICETIDAE).

1. DESCRIÇÃO CROMOSSÔMICA, UTILIZANDO CITOGENÉTICA CLÁSSICA E MOLECULAR, DA ESPÉCIE *GALICTIS CUJA* (CARNIVORA, MUSTELIDAE)
2. CARACTERIZAÇÃO CARIOTÍPICA ATRAVÉS DA CITOGENÉTICA CLÁSSICA E ANÁLISE FILOGENÉTICA EM CITÓTIPOS DO GÊNERO *SCAPTEROMYS* (RODENTIA, CRICETIDAE)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Genética.

Orientador: Prof. Dr. Thales Renato O de Freitas

Co-orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Iris Hass

CURITIBA

2013

Dedico este trabalho à minha mãe Floriza, meu irmão
Jefferson, minha tia Mariza, minha vó Elza.

Às minhas filhas caninas Mel e Pinha

Por todo o amor, por quem eu sou e por tudo o que
alcansei.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao professor Dr. Ives José Sbalqueiro pela oportunidade de iniciar meu estágio em 2009 no laboratório de Citogenética Animal da UFPR, e dessa forma me deixado entrar no mundo dos roedores. Pelo apoio, conselhos e amizade. Por me ensinar tudo que sei sobre técnicas de bandejamento.

Agradeço à Professora Dra. Iris Hass pela oportunidade de ser monitoria em genética na graduação e ter me orientado na monografia, pela compreensão, conselhos, apoio e paciência em todos os momentos durante esses 4 anos de convívio. Espero não ter te cansado muito.

Agradeço ao professor Dr. Thales Renato O de Freitas pela chance em ser sua orientada no mestrado, dando conselhos mesmo longe.

Agradeço aos meus colegas de mestrado Juliana Cochenski, Janaína de Sena, Shenia Pedro Bom, Carlos Eduardo Ibaldo, por fazerem essa etapa não ser tão cansativa. Pelas risadas e conselhos nos momentos de desespero e desânimo, e pela ajuda em momentos tensos como provas e seminários, compartilhando comigo seus conhecimentos.

Agradeço aos meus colegas do Laboratório de Citogenética Animal, Charles, Marina, Mariana, Gracyelle, André, Marília, Devânia, Fernanda, Aline, William, por me acompanharem nessa jornada, pelos momentos de descontração, pela paciência. Podem contar comigo em qualquer hora, ficarei feliz em ajudar.

Agradeço à pós-doutoranda Paula Moiana pela amizade e alegria. Por lutar comigo na busca pelo melhor protocolo de FISH, por ser tão paciente e animada mesmo não conseguindo ver o que queríamos.

Agradeço a técnica de FISH, ao termo-agitador e à Lei de Murphy por me fazerem uma pessoa mais calma, corajosa e flexível (literalmente por passar a noite dormindo em uma cadeira). Saio do mestrado uma pessoa melhor com certeza.

Agradeço aos professores do departamento de Genética da UFPR, por compartilharem seus conhecimentos com dedicação e paciência. Sempre buscando artigos interessantes e que me fizessem questionar a ciência e não apenas aceitar os resultados.

Agradeço à minha família, por sempre estarem na torcida mesmo de longe. Aceitarem minha escolha, ausência, cansaço, mau humor, choros. Enfim, por me aceitarem cientista, que mesmo não entendo o porquê de matar tantos ratinhos, torcerem para que eu coletasse muitos. Obrigado por fazerem meus finais de semanas em casa mais leves e permitir que minha bateria fosse recarregada para seguir em frente.

Agradeço às minhas filhas caninas, Mel e Pinha, pelo amor que sempre estão prontas em dar. Vocês me fazem uma pessoa melhor e mais feliz.

Agradeço à Capes (REUNI) pelo apoio financeiro e permitir a dedicação exclusiva ao meu trabalho.

A todos que porventura eu tenha esquecido, mas que passaram em minha vida nesses dois anos, meu muito obrigada!

“E nem entendo aquilo que entendo: pois estou infinitamente maior que eu mesma, e não me alcanço.”

Clarice Lispector

RESUMO - 1

A espécie *Galictis cuja* distribui-se do Centro ao Sul do Brasil. Esta espécie de mustelídeo, apresenta corpo alongado, membros curtos, cabeça achatada e coloração cinza amarelada, com tonalidade escura da garganta ao ventre, e também nos membros. Habitam áreas abertas e florestas, geralmente, em locais próximos a água. Apresentam atividade noturna e alimentam-se de pequenos vertebrados. O cariótipo de *G. cuja*, aqui descrito, é o primeiro registro, para o Sul do Brasil, e é de um macho coletado no município de Massaranduba, no Estado de Santa Catarina. A análise de 15 metáfases, em coloração comum, mostrou os números diplóide igual a 38 e o número de braços dos cromossomos autossômicos igual a 68. Os 38 cromossomos estão distribuídos em 7 pares de subtelocêntricos, 4 de metacêntricos, 5 de submetacêntricos, 2 de acrocêntricos, mais o cromossomo X metacêntrico e o cromossomo Y que é um pequeno acrocêntrico, todos caracterizados por mensuração e classificados conforme a razão do braços (RB). Em coloração com Giemsa foi observada a presença de uma constrição secundária bem evidente no par acrocêntrico de menor tamanho, que se mostrou conspícua quando da coloração com nitrato de prata. Tanto a constrição secundária como a banda Ag-NOR não foram descritas na outra espécie deste gênero, *Galictis vittata*. A banda C confirmou constrição secundária no par cromossômico 18. Análises preliminares em ZOO-FISH utilizando sondas de cromossomos humanos revelaram sinais no par cromossômico 2 no braço q (HSA 3), no par 11 no braço q (HSA 6), no par 9 no braço q (HSA 9), no par 14 no braço q (HSA 10), no par 16(HSA 11), e no par cromossômico do par 13(HSA 13).

ABSTRACT – 1

The species *Galictis cuja* is distributed from the Center to the South of Brazil. These mustelid species features elongated body, short limbs, flattened head and it has a yellowish-gray color, with a dark shade from the throat to the abdomen, along with the members. The habitat is characterized by open areas and forests, commonly, in places near water. These animals are more active during the night and eat small vertebrates. The *G. cuja* karyotype described in this study is the first report from the South of Brazil and it comes from a male collected in Massaranduba country, in Santa Catarina state. The analysis of 15 metaphases in standard staining showed a diploid number of 38 chromosomes and 68 autosomic arms. The 38 chromosomes are distributed in 7 subtelocentric pairs, 4 metacentric, 5 submetacentric, 2 acrocentric, plus the metacentric X chromosome and the Y chromosome, which is a small acrocentric, all characterized by measurement and classified according to the arm ratio criteria. With the standard staining it was possible to observe a secondary constriction evident in the acrocentric pair of smaller size, which proved to be conspicuous to silver nitrate staining. Both the secondary constriction as the Ag-NOR banded karyotype were not described in the other species of this genus, *Galictis vittata*. The C-banded karyotype confirmed a secondary constriction in the chromosome 18. Preliminary analyzes in ZOO-FISH, using human chromosomes probes revealed signs of hybridization in the long arm of chromosome pair 2 (HSA3),, long arm of chromosome pair 11(HSA6),, long arm of chromosome pair 9(HAS 9),, long arm of chromosome pair 14(HSA10), and in the chromosome pair 13(HSA11), and 16(HSA12).

RESUMO – 2

O gênero *Scapteromys* se distribui ao longo da porção sul do continente sulamericano, na Bacia do Rio Prata. São encontrados quatro diferentes citótipos, que parecem ter uma estruturação geográficas: $2n = 32$ no Paraguai e Argentina, $2n = 24$ no Uruguai e $2n = 24, 34$ e 36 no Brasil. Neste trabalho são analisados e caracterizados citogeneticamente 20 exemplares, 17 coletados no estado do Paraná e 3 coletados no estado de Santa Catarina. Todas as espécimes provenientes do Paraná apresentam $2n = 36$, com três pares autossômicos metacêntricos / submetacêntricos (3, 9 e 10) e o restante acrocêntrico, incluindo os sexuais. Observou-se a marcação de RONS em três pares de cromossomos: centromérica no par 3 e no X, e terminal no par 4. A heterocromatina constitutiva em ambos citótipos apresentou distribuição sendo restrita a apenas um par autossômico 10 e aos sexuais. Com o bandeamento G foi possível fazer o correto pareamento dos homólogos.

ABSTRACT – 2

The genus *Scapteromys* is distributed along the southern portion of the South American continent, in the Bacia do Rio Prata. Four different cytotypes are found, which seem to have a geographical structuring: $2n = 32$ in Paraguay and Argentina, $2n = 24$ in Uruguay and $2n = 24, 34$ and 36 in Brazil. In this study are analyzed and characterized cytogenetically, 20 specimens, 17 collected in the Paraná state and 3 collected in the Santa Catarina state. All specimens from Paraná have the diploid number $2n = 36$, with three metacentric/submetacentric (3, 9 and 10) autosomic pairs, the remaining chromosomes being acrocentric, including the sexual chromosomes. The silver nitrate staining was observed on three pairs of chromosomes: centromeric on pair 3 and on X chromosome, and in the terminal portion of pair 4. The constitutive heterochromatin in the cytotype showed distribution being restricted to the chromosome pair 10 and the sexual chromosomes. With the G-banding technique it was possible to make the correct pairing of homologs.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. <i>Galictis cuja</i> (foto de Renata Bornholdt)	40
Figura 2. Cariótipo de <i>Galictis cuja</i> macho ($2n=38$ e $NA= 71$), constrição secundária no par 18 indicada pela seta	42
Figura 3. Cariótipo em bandamento G de <i>Galictis cuja</i> macho ($2n=38$ e $NA= 71$), constrição secundária no par 18 indicada pela seta	43
Figura 4. Metáfase de <i>Galictis cuja</i> macho em bandamento C ($2n=38$ e $NA= 71$), marcações no par 18 indicado pela seta	43
Figura 5. Metáfase de <i>Galictis cuja</i> macho em bandamento NOR ($2n=38$ e $NA= 71$), marcações no par 18 indicado pela seta	43
Figura 6. Hibridação com sondas humanas 3 e 6 (a,c,e) e suas respectivas imagens de metáfases capturadas (b,d,f)	45
Figura 7. Hibridação com sondas humanas 9 e 10 (a,c,e) e suas respectivas imagens de metáfases capturadas (b,d,f)	46
Figura 8. Hibridação com sondas humanas 11 e 12 (a,c,e) e suas respectivas imagens de metáfases capturadas (b,d,f)	47
Figura 9. Cariótipo em banda G de <i>Galictis cuja</i> com as sondas hibridizadas à direita.	48
Figura 10. <i>Scapteromys</i> (Foto de Ives Sbalqueiro)	59
Figura 11. Cariótipo em coloração convencional de <i>Scapteromys</i> macho ($2n=36$ e $NA= 42$)	67
Figura 12. Cariótipo em bandamento G de <i>Scapteromys</i> macho ($2n=36$ e $NA= 42$)	68
Figura 13. Cariótipo em bandamento C de <i>Scapteromys</i> macho ($2n=36$ e $NA= 42$)	69
Figura 14. Metáfase de <i>Scapteromys</i> ($2n=36$) em coloração NOR com flechas indicando as marcações.	69

LISTA DE TABELAS

TABELA 1- NOMENCLATURA CROMOSSÔMICA SEGUNDO LEVAN <i>et al.</i> (1964)	32
TABELA 2- ETAPAS DA PCR DE MARCAÇÃO (2ª DOP-PCR)	36
TABELA 3- RELAÇÃO ENTRE BRAÇOS CROMOSSOMICOS DE <i>Galictis cuja</i> , SEGUNDO LEVAN <i>et al.</i> (1964)	41
TABELA 4. MARCAÇÕES OBSERVADAS EM BANDAS NOR POR METÁFASE, COM SEUS RESPECTIVOS PARES MARCADOS	70
TABELA 5. NÚMERO DE MARCAÇÕES POR CÉLULA	70

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
CAPÍTULO I: DESCRIÇÃO CROMOSSÔMICA, UTILIZANDO CITOGENÉTICA CLÁSSICA E MOLECULAR, DA ESPÉCIE <i>GALICTIS CUJA</i> (CARNIVORA, MUSTELIDAE)	20
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
2.1 ORDEM CARNIVORA	21
2.1.1 FAMÍLIA MUSTELIDAE	22
2.1.2 GÊNERO <i>GALICTIS CUJA</i>	23
2.1.3 ESTUDOS CITOGENÉTICOS DA ORDEM CARNIVORA	23
2.2 ESTUDOS FILOGENÉTICOS	27
2.2.1 FILOGENIA DA FAMÍLIA MUSTELIDAE	27
2.3 CITOGENÉTICA MOLECULAR	29
3. OBJETIVO GERAL	30
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	31
4. MATERIAIS E MÉTODOS	31
4.1 PREPARAÇÃO DIRETA DA MEDULA ÓSSEA	31
4.2 PREPARAÇÃO DAS LÂMINAS	32

4.3 IDENTIFICAÇÃO MORFOLÓGICA DOS CROMOSSOMOS	32
4.4 TÉCNICAS DE BANDEAMENTO	33
4.4.1 COLORAÇÃO CONVENCIONAL	33
4.4.2 BANDEAMENTO C	33
4.4.3 BANDEAMENTO G	33
4.4.4 BANDEAMENTO NOR	34
4.4.5 CAPTURA DE IMAGENS	35
4.5 HIBRIDAÇÃO IN SITU	35
4.5.1 PREPARAÇÃO DAS SONDAS CROMOSSOMO ESPECÍFICAS	35
4.5.2 VERIFICAÇÃO DOS FRAGMENTOS PRODUZIDOS NA DOP-PCR	36
4.5.3 PREPARAÇÃO DAS SONDAS PARA HIBRIDAÇÃO	37
4.5.4 MONTAGEM DAS LÂMINAS PARA HIBRIDAÇÃO	37
4.5.5 DESNATURAÇÃO	38
4.5.6 PREPARAÇÃO DAS LÂMINAS PARA HIBRIDAÇÃO	38
4.5.7 HIBRIDAÇÃO	38
4.5.8 LAVAGENS PÓS-HIBRIDAÇÃO	39
4.5.9 DETECÇÃO DOS SINAIS	39

4.5.10 ANÁLISE E CAPTURA DE IMAGENS	39
4.5.11 MAPA CROMOSSÔMICO	40
5. RESULTADOS	40
5.1 CARACTERIZAÇÃO CITOGENÉTICA	40
5.1.1 COLORAÇÃO COMUM	40
5.1.2 BANDEAMENTO G	43
5.1.3 BANDEAMENTO C	44
5.1.4 BANDEAMENTO NOR	44
5.1.5 HIBRIDAÇÃO	45
5.1.5.1 SONDAS HSA3 E HSA6	45
5.1.5.2 SONDAS HSA9 E HSA10	46
5.1.5.3 SONDAS HSA11 E HSA12	47
5.1.6 MAPA CROMOSSÔMICO	48
6. DISCUSSÃO	48
6.1 CARACTERIZAÇÃO CROMOSSÔMICA	48
6.2 BANDEAMENTOS	50
6.3 HIBRIDAÇÃO IN SITU COM SONDAS CROMOSSOMO-ESPECÍFICAS HUMANAS	51
7. CONCLUSÃO	53

CAPÍTULO II: CARACTERIZAÇÃO CARIOTÍPICA ATRAVÉS DA	54
CITOGENÉTICA CLÁSSICA E ANÁLISE FILOGENÉTICA EM	
CITÓTIPOS DO GÊNERO SCAPTEROMYS (RODENTIA, CRICETIDAE)	
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	55
2.1 ORDEM RODENTIA	55
2.1.1 FAMÍLIA CRICETIDAE	57
2.1.2 TRIBO AKODONTINI	58
2.1.3 GÊNERO <i>SCAPTEROMYS</i>	59
2.2 ALTERAÇÃO ESTRUTURAL NO NÚMERO CROMOSSÔMICO	60
2.2.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS	60
2.2.2 ALTERAÇÃO NA ESTRUTURA DE CROMOSSOMOS DE	61
ROEDORES E SUAS IMPLICAÇÕES EVOLUTIVAS	
2.2.3 INVERSÕES	61
2.2.4 TRANSLOCAÇÕES	62
2.2.4.1 TRANSLOCAÇÃO RECÍPROCA E NÃO RECÍPROCA	62
2.2.4.2 FUSÕES E FISSÕES CÊNTRICAS	63
3. OBJETIVOS GERAIS	63
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	63
4. MATERIAIS E MÉTODOS	64

4.1 COMPARAÇÃO CROMOSSÔMICA	64
4.2 PREPARAÇÃO DAS LÂMINAS	64
4.3 TÉCNICAS DE BANDEAMENTO	65
4.3.1 COLORAÇÃO CONVENCIONAL	65
4.3.2 BANDEAMENTO C	65
4.3.3 BANDEAMENTO G	65
4.3.4 BANDEAMENTO NOR	66
4.3.5 CAPTURA DE IMAGEM	67
5. RESULTADOS	67
5.1 CARACTERIZAÇÃO CITOGENÉTICA	67
5.1.1 COLORAÇÃO COMUM	67
5.1.2 BANDEAMENTO G	68
5.1.3 BANDEAMENTO C	68
5.1.4 BANDEAMENTO NOR	69
6. DISCUSSÃO	70
7. CONCLUSÃO	74

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

75

ANEXO I

91

1. INTRODUÇÃO

Este trabalho se apresenta em dois capítulos, intitulado: Contribuições Citogenéticas sobre *Galictis cuja* (CARNIVORA, MUSTELIDAE) e gênero *Scapteromys* (RODENTIA, CRICETIDAE).

No capítulo I, denominado: “Descrição cromossômica, utilizando citogenética clássica e molecular, de *Galictis cuja* (CARNIVORA, MUSTELIDAE)”, trata da caracterização citogenética de *G. cuja* a primeira registrada para o Sul do Brasil, de um macho coletado no Município de Massaranduba, Estado de Santa Catarina, bem como os resultados preliminares de hibridação *in situ* utilizando sondas humanas. O gênero *Galictis* (Mammalia, Carnivora, Mustelidae) são os furões neotropicais e é um táxon ainda pouco conhecido, com escassez de informações na literatura e ausência de sua caracterização cariotípica. Este cenário faz com que os furões neotropicais sejam um dos grupos de mustelídeos menos estudados nas Américas.

No capítulo II intitulado: “Caracterização cariotípica através da citogenética clássica e análise filogenética em citótipos do gênero *Scapteromys* (RODENTIA, CRICETIDAE)”, será apresentada a caracterização citogenética ($2n=36$) com base em 20 exemplares, 17 coletados no Estado do Paraná e 3 no Estado de Santa Catarina.

CAPÍTULO I
DESCRIÇÃO CROMOSSÔMICA UTILIZANDO CITOGENÉTICA CLÁSSICA E
MOLECULAR DA ESPÉCIE *GALICTIS CUJA* (CARNIVORA, MUSTELIDAE)

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 ORDEM CARNIVORA

Os membros da Ordem Carnivora, de forma geral, alimentam-se de vertebrados, apresentando a capacidade de desmembrar suas presas com dentes, mandíbula e crânio fortes. As espécies desse grupo apresentam diferenças quanto ao seu hábito alimentar, comportamento de predação, morfologia e biomecânica de todo o aparato envolvido (BIKNEVICIUS & VAN VALKENBURG, 1996).

Os primeiros registros fósseis dos carnívoros são datados de 63 milhões de anos, quando duas famílias (Viverravidae e Miacidae), hoje extintas, encontravam-se distribuídas pela Europa, Ásia e América do Norte. Na Austrália e na América do Sul, onde não ocorriam carnívoros terrestres, eram os marsupiais os responsáveis por preencher os seus nichos (COX & MOORE, 1993; HUNT JR., 1996). Há nove milhões de anos foi iniciada a migração para a porção central e sul da América do Sul a partir da América do Norte. Posteriormente, por meio da junção das Américas pelo Istmo do Panamá, há cerca de três a quatro milhões de anos outros carnívoros atingiram a América do Sul (EISENBERG & REDFORD, 1999; INDRUSIAK & EIZIRIK, 2003).

Atualmente, espécies dessa Ordem encontram-se distribuídas por diferentes habitats, sendo encontradas em regiões com clima árido, florestas tropicais, campos, cerrados, savanas, montanhas, planícies e ambientes árticos. Apenas o continente australiano não apresenta ocorrência natural desta Ordem, onde foi introduzida a espécie *Canis familiaris dingo* (dingo) cerca de 4.000 e 5.000 anos ser humano, vivendo atualmente como população asselvajada (EISENBERG & REDFORD, 1999; NOWAK, 1999).

Wozencraft (2005) classifica a Ordem Carnivora em duas subordens: Feliformia (Feloidea) e Caniformia (Canoidea). Atualmente, a ordem compreende 15 famílias, 287 espécies, sendo encontrada no Brasil 29 espécies, entre representantes das famílias Felidae, Canidae, Mustelidae, Otariidae, Mephitidae e Procyonidae (EISENBERG & REDFORD, 1999).

A principal característica desse grupo é a capacidade de predação, graças a estruturas fortes como dentes, músculos e crânio que permitem encontrar, capturar e matar a presa (EMMONS & FEER, 1997)

Devido ao processo evolutivo várias espécies apresentam dieta onívora. Com tamanho, forma e hábito de vida que permitem que essas espécies ocupem diferentes nichos sendo predadores do topo da cadeia alimentar. Assim regulam o tamanho das populações de suas presas e contribuem para a manutenção da dinâmica do ecossistema (EWER, 1973; EMMONS & FEER, 1997; EISENBERG & REDFORD, 1999; NOWAK, 1999; TERBORGH *et al.* 1999).

Mesmo com sua importância ecológica, a maioria das espécies de carnívoros estão ameaçadas de extinção devido às atividades antropogênicas como caça esportiva, para comércio ilegal de peles, tráfico de animais vivos e a caça praticada por produtores rurais devido a danos econômicos causados às criações domésticas. Entretanto, a maior ameaça que sofrem é a redução, fragmentação ou total destruição de seus habitats, que pode levar à diminuição de suas áreas de vida e das populações de suas presas (INDRUSIAK & EIZIRIK, 2003; MIRANDA, 2003; MARGARIDO & BRAGA, 2004).

Das 29 espécies encontradas no Brasil, 10 constam na Lista da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção sendo elas: *Speothos venaticus* (Cachorro-vinagre), *Chrysocyon brachyurus* (Lobo Guará), *Pteronura brasiliensis* (Ariranha), *Leopardus pardalis mitis* (Jaguatirica), *Leopardus tigrinus* (Gato-do-mato), *Leopardus wiedii* (Gato-maracajá), *Oncifelis colocolo* (Gato-palheiro), *Puma concolor capricornensis* (Onça-parda), *Puma concolor greeni* (Suçuarana), *Panthera onca* (Onça-pintada) estando todas vulneráveis (MACHADO *et al.*, 2005), além de outras espécies ameaçadas especialmente para alguns estados brasileiros que possuem suas listas regionais (MACHADO *et al.*, 1998; SÃO PAULO, 1998; BERGALO *et al.*, 2000; INDRUSIAK & EIZIRIK, 2003; MARGARIDO & BRAGA, 2004; ESPÍRITO SANTO, 2005).

2.1.1 FAMÍLIA MUSTELIDAE

Consiste na Família com maior número de espécies dentro da ordem Carnívora, e inclui as doninhas, lontras, irara, furão, zorrilho e ariranha (BRYANT, RUSSEL & FITCH; 1993)

Os membros dessa Família originaram-se na América do Norte e Europa durante o Oligoceno, migrando para América do Sul no Plioceno e ocupando o

nicho ecológico dos pequenos carnívoros (EISENBERG & REDFORD, 1999). Seus representantes atualmente, ocorrem em praticamente todo o mundo, com exceção da Antártica e da Austrália (NOWAK, 1999). Apresentam corpo alongado, cabeça pequena, pernas relativamente curtas e cauda geralmente longa, porém menor que o comprimento do corpo. Possuem pelagem densa e são plantígrados (animal que apóia toda e completamente a planta dos pés ao pisar no chão) com cinco dedos em todos os membros. Apresentam hábito terrestre, arborícola ou aquático e são predadores, alimentando-se principalmente de carne, sendo que algumas espécies são predominantemente onívoras (*Eyra barbara* e *Conepatus semistriatus*) ou piscívoras (*Lontra longicaudatus* e *Pteronura brasiliensis*). Como apresentam garras e mandíbula fortes conseguem alimentar-se de presas maiores que seu próprio tamanho.

Possuem a glândula anal bem desenvolvida, que produz um odor forte e característico usado para comunicação e defesa (SILVA, 1994; EMMONS & FEER, 1997; EISENBERG & REDFORD, 1999; FELDHAMER et al., 1999; PIMENTEL et al., 2001).

No Brasil são registradas seis espécies distribuídas em cinco gêneros (EISENBERG & REDFORD, 1999; FELDHAMER et al., 1999). Segundo Wonzencraft (2005), a família Mustelidae está dividida nas subfamílias Mustelinae (doninhas, irara e furão) e Lutrinae (lontras e ariranha), ambas com representantes no Brasil.

2.1.2 GÊNERO *GALICTIS*

Distribui-se do sudeste do México até o Brasil, onde ocorre principalmente nas regiões norte e nordeste (VIEIRA, 1955; CARVALHO, 1983; EISENBERG & REDFORD, 1999; SILVA et al., 2004; LIM et al., 2006). Atualmente são reconhecidas duas espécies do gênero *Galictis*: o furão pequeno (*G. cuja*, Molina, 1782) e o furão grande (*G. vittata*, Schreber, 1776) (WONZENCRAFT, 2005).

O tempo de divergência entre as duas espécies foi estimado em 2,8 milhões de anos, durante a segunda e maior onda de diversificação de mustelídeos no Plioceno (KOEPLI et al., 2008). Segundo Yensen & Tarifa (2003), o ancestral comum dos furões neotropicais se originou na América do Norte, ocorrendo uma

posterior invasão na América do Sul através do istmo do Panamá. O parente mais próximo das espécies de *Galictis* é um pequeno mustelídeo patagônico, *Lyncodon patagonicus*. Os gêneros *Galictis* e *Lyncodon*, por sua vez, são consideradas como grupo irmão das espécies também pouco conhecidas *Ictonyx libyca*, *Ictonyx striatus*, *Poecilogale albinucha* e *Vormela peregusna* (KOEPLI *et al.*, 2008; WOLSAN & SATO, 2010).

Com base nas informações disponíveis sobre o gênero *Galictis* pode-se estabelecer uma caracterização geral. O *Galictis vittata* conhecido como “furão grande” ou “cachorro-do-mato” é um pouco maior que o *G. cuja*, podendo pesar até 3 Kg. Apresenta corpo alongado, variando entre 47,5 cm a 55 cm de comprimento e os membros são curtos. A garganta, ventre, face e membros são negros, o dorso é acinzentado apresentando uma faixa branca que se estende da testa aos ombros (VIEIRA, 1946; SILVA, 1994; EMMONS & FEER, 1997; EISENBERG & REDFORD, 1999; NOWAK, 1999; MIRANDA, 2003).

Abrigam-se em tocas abandonadas, forrageando o solo e, apesar de predominar seu hábito predador, tem uma dieta composta por uma variedade de alimentos como ovos, frutos, invertebrados e vertebrados (KAUFMANN & KAUFMANN, 1965; SUNQUIST *et al.*, 1989).

O *Galictis cuja*, conhecido como “furão pequeno” é um pouco menor que o *G. vittata*, possui corpo alongado e membros curtos. O comprimento da cabeça e do corpo varia de 40 cm a 45 cm e a cauda pode variar de 15 cm a 19 cm de comprimento. O peso pode variar de 1kg a 3kg nos indivíduos. Apresenta a parte dorsal do corpo acinzentado e patas, ventre e face negras. Na cabeça existe uma faixa branca que alonga-se até o pescoço. Como apresenta membros curtos e corpo alongado consegue correr próximo ao chão e se esconder em tocas ou na vegetação (VIEIRA, 1946; SILVA, 1994; EISENBERG & REDFORD, 1999; NOWAK, 1999; MIRANDA, 2003).

Apresentam comportamento característico de andarem em fila. Alimentam-se predominantemente de vertebrados, como pequenos mamíferos, répteis, anfíbios e aves. No entanto, já foi verificado o consumo de presas maiores, como a capivara (*Hydrochoerus hydrochaeris*), provavelmente originado da ingestão de carcarça (ROCHA-MENDES, 2005). Apresentam atividade crepuscular e noturna, vivem em florestas e áreas abertas, podendo se abrigar em tocas abandonadas ou

cavadas por eles mesmos (SILVA, 1994; FONSECA *et al.*, 1996; EISENBERG & REDFORD, 1999; NOWAK, 1999; CÂMARA & MURTA, 2003; MIRANDA, 2003). Quando vivem em regiões próximas às zonas rurais, atacam aves domésticas especialmente galinhas, causando grandes estragos. Ambas as espécies até o momento não constam na Lista Brasileira de Fauna Ameaçada de Extinção (MACHADO *et al.*, 2005), sendo consideradas de baixo risco ou de menor preocupação na Lista Vermelha mundial da IUCN – União Internacional para Conservação da Natureza (IUCN, 2006), além de constarem no apêndice III da CITES - Convenção sobre o Comércio Internacional das Espécies da Fauna e da Flora Silvestres Ameaçadas de Extinção (CITES, 2006).

Uma variedade de parasitas foram descobertos em indivíduos de *Galictis cuja*. Ovos de carrapato do gênero *Amblyomma* foram relatados no Brasil (SINKOC *et al.*, 1998). Infecções por nematódeos renais gigantes (*Diocotophyme renale*) já foram relatadas em *G. cuja*. Esses indivíduos podem ser hospedeiros de até 8 parasitas durante a vida. (BARROS *et al.* 1990).

Galictis cuja pode também ser reservatório da doença de Chagas. Na cidade de Santiago Del Estero, Argentina, houve notificação de infecção por *Trypanosoma cruzi*, sendo também relatada sua presença em indivíduos coletados no estado de São Paulo, Brasil (WISNIVESKY-COLLI *et al.*, 1992; FERRIOLLI & BARRETO, 1969).

Segundo Vieira (1996), *G. cuja* é a quinta espécie de mamíferos que mais morre nas estradas, vítimas de atropelamento na região central do Brasil, correspondendo a 6,1% das espécies atropeladas.

2.1.3 ESTUDOS CITOGENÉTICOS DA ORDEM CARNIVORA

A Ordem Carnivora apresenta sete famílias que estão agrupados em duas superfamílias: a Canioidea e a Feloidea (NOWAK e PARADISO, 1983). Muitas espécies já apresentam caracterização citogenética e alguns padrões já foram observados com base em comparações do bandeamento G, demonstrando que a maioria dos cariótipos de carnívoros são altamente conservados, com exceções de algumas espécies das famílias Canidae e Ursidae que apresentam maior número

de rearranjos cromossômicos (WURSTER-HILL & GRAY, 1975; WURSTER-HILL & CENTERWALL, 1982; DUTRILLAUX & COUTURIER, 1983).

O cariótipo do gato (*Felis catus*) composto $2n=38$ e $NF=72$ é considerado como modelo para a Família Felidae e também como cariótipo ancestral, já que 13 dos 19 pares cromossômicos encontram-se nas demais espécies de felinos, sendo também similar a cromossomos de outras famílias da ordem Carnivora, incluindo o Mustelidae e Procyonidae. Os felinos apresentam composição cariotípica variando de $2n=36$ a 38, número fundamental de 72 a 76, e as estruturas e padrões de bandeamento dos cromossomos sexuais são semelhantes aos de outras espécies da ordem, havendo homeologias cromossômicas com os cromossomos sexuais humanos (NASH e O'BRIEN, 1982; O'BRIEN *et al.*, 1982; MURPHY *et al.*, 1999).

Pathak & Wurster-Hill (1977) estudaram a distribuição da heterocromatina constitutiva no genoma de nove espécies de Felidae (*Felis nigripes*, *Felis catus*, *Felis pardalis*, *Felis margarita*, *Felis manul*, *Felis concolor*, *Acinonyx jubatus*, *Panthera pardus* e *Panthera leo*), uma espécie de Mustelidae (*Mustela putorius furo*), duas espécies de Procyonidae (*Procyon lotor*, *Bassariscus astutus*) uma espécie de Viverridae (*Atilax paludinosus*), uma espécie de Canidae (*Canis familiaris*) e uma espécie de Ursidae (*Ursus americanus*) pelo padrão do bandeamento C. Observou-se que poucos cromossomos da família Felidae apresentaram marcação do bandeamento, sendo restrita a região telomérica em um ou em ambos os braços, a maioria dos cromossomos tiveram marcação da heterocromatina ausente. O padrão de bandeamento C encontrado no mustelídeo ($2n=40$) é composto por três pares de cromossomos de dois braços com um braço completamente heterocromático, cinco pares cromossômicos com bandas C centroméricas, um par com banda C terminal, sendo que os restantes dos pares não apresentaram heterocromatina distinta. O cromossomo Y apresentou marcação por inteiro. Nos Procyonidae ($2n=38$) o padrão do bandeamento foi semelhante, apresentando marcação no braço curto do par de cromossomos subtelocêntricos e marcação centromérica nos pares cromossômicos restantes. O cromossomo Y é totalmente marcado. O padrão encontrado no Viverridae (macho $2n=35$, fêmea $2n=36$) é composto por praticamente todos os cromossomos com marcação pericentromérica, sendo que apenas um par de cromossomos submetacêntricos pequenos é marcado na região terminal, nas fêmeas os braços

curtos de um par subtlocêntrico é completamente marcado e nos machos apenas um desses braços é marcado. O X apresenta pouca quantidade de heterocromatina constitutiva, por isso é pouco marcado. Nos Canidae ($2n=78$) o padrão encontrado é composto pelos cromossomos X bem marcados nas regiões pericentromérica e proximal do braço longo. O Ursidae ($2n=74$) apresenta apenas marcações nas regiões centroméricas de todos os cromossomos não ocorrendo nas regiões terminais.

Com base nesses estudos, foi possível estabelecer padrões cariotípicos através da marcação da heterocromatina e ao se comparar com outros mamíferos, os carnívoros apresentam uma quantidade menor de heterocromatina constitutiva no genoma.

2.2 ESTUDOS FILOGENÉTICOS

2.2.1 FILOGENIA DA FAMÍLIA MUSTELIDAE

Mustelidae é a mais rica em espécies entre todas as famílias da ordem Carnivora, originando com isso um maior número de estudos sobre sua evolução e biogeografia. A diversidade ecomorfológica é alta, refletindo na adaptação de espécies de Mustelidae em diferentes habitats e com diferentes hábitos (GIVNISH e SYTSMA, 1997). Muitos dos arranjos taxonômicos propostos para esta Família foram baseados na morfologia, sendo os gêneros classificados em subfamílias que apresentaram similaridade ecomorfológica (POCOCK, 1921; SIMPSON, 1945).

Pocock (1921) classificou-a em 15 Subfamílias baseada na análise descritiva de caracteres externos. Já o sistema proposto por Simpson (1945) classificou-a, baseada na similaridade adaptativa, em 5 Subfamílias: Lutrinae, Melinae, Mellivorinae, Mephitinae e Mustelinae.

Recentes estudos (Koepfli & Wayne, 2003; Fulton & Strobeck, 2006; Koepfli *et al.*, 2008; Wolsan & Sato, 2010) com base em multilocus de DNA têm proposto que existe relação filogenética próxima entre espécies de doninhas do Velho Mundo (África) e furões do Novo Mundo (América do Norte e América do Sul). Devido a distância entre as regiões, suas histórias evolutivas e biogeográficas tornaram-se intrigantes. A característica que ambas as espécies compartilham é a

coloração contrastante da pelagem. O comportamento defensivo como identificação da proximidade dos predadores e excreção de odor pela glândula anal atualmente tem sido citada, sugerindo que o valor adaptativo primário da coloração marcante da pelagem está envolvida na advertência à potenciais predadores (POCOCK, 1909; KOEPFLI *et al.*, 2008).

Como existe uma divergência entre a relação filogenética entre essas espécies alguns autores como Fulton & Strobeck (2006) e Koepfli *et al.* (2008) adotaram o nome subfamiliar *Galictinae* (REIG, 1956) para uní-las em uma mesma subfamília, já Wolsan & Sato (2010) classificaram-nas em subfamília *Ictonychinae* (POCOCK, 1922) por esta ser a primeira classificação estabelecida na Comissão Internacional de Nomenclatura Zoológica em 1999.

Na última década diversos estudos tem tentado conhecer e estabelecer a história da família Mustelidae (FLYNN *et al.*, 2005; KOEPFLI & WAYNE, 2003; SATO *et al.*, 2003, 2004, 2006, 2009; ÁRNASON *et al.*, 2007; KOEPFLI *et al.*, 2007, 2008; HARDING & SMITH, 2009; EIZIRIK *et al.*, 2010; WOLSAN & SATO, 2012)

A monofilia desse táxon tem sido confirmada de forma conclusiva e muitas relações filogenéticas tem sido resolvidas de forma convincente, e o grau de consenso entre as estimativas publicadas de tempos de divergências para linhagens específicas tem sido melhoradas recentemente. No entanto, há aspectos importantes da filogenia do Mustelidae e sua cronologia que ainda aguardam esclarecimento, como o padrão e seu tempo de diversificação e a posição filogenética da doninha (*Lyncodon patagonicus*) que apresentou diversificação filogenética rápida (WOLSAN & SATO, 2012).

Marmi *et al* (2004) propõe mudanças na taxonomia da Família Mustelidae com base na análise de 241 sequências de genes do citocromo b e 33 sequências da região flanqueadora do complexo repetitivo de 33 espécies de Mustelídeos.

Já Koepfli *et al.* (2008) utilizando uma variedade de métodos de reconstrução filogenética (Máxima Parsimônia, Máxima Verossimilhança e Métodos de Inferência Bayesiana) propôs uma filogenia quase completa da Família Mustelidae, através de uma matriz de dados que compreendeu 22 segmentos gênicos. Conclui-se que os mustelídeos são consistentemente agrupados em quatro subtipos principais e três linhagens monotípicas e que quase todos os nós

desta topologia foram bem suportadas. Além disso, através da aplicação de técnicas Bayesianas foi mostrada a ocorrência de duas explosões de diversificação, a primeira vez durante o Mioceno, que deu origem aos subtipos primários existentes, e a segunda durante o Plioceno, que deu origem a grande parte da diversidade de espécies observadas hoje. Estas explosões de diversificação coincidiram com as mudanças paleoambientais e bióticas que ocorreram durante o Neogeno. Análises biogeográficas indicaram que a maior parte da diversidade existente de Mustelidae originou-se na Eurásia ocorrendo a colonização da África, América do Norte e América do Sul através da dispersão das espécies .

Em um estudo mais recente de Wolsan & Sato (2012), foram analisados dados de DNA mitocondrial de 44 espécies e, com a utilização de uma variedade de métodos de reconstrução filogenética, foi possível estabelecer as linhagens existentes durante o processo de dispersão das espécies da Família Mustelidae. Originou-se na Ásia e se diferenciou em quatro linhagens: a primeira linhagem denominada Mephitidae, sucedido por Ailuridae seguida pela separação das linhagens Procyonidae e Mustelidae. Os desdobramentos iniciais da radiação, em grande parte evoluiu para indivíduos semelhantes a texugos, enquanto que as divergências posteriores se adaptaram a outros nichos, incluindo os de doninhas, martas e lontras (Mustelinae, Ictonychinae, e Lutrinae). O estudo também elucidou a posição filogenética do *Lyncodon patagonicus* revelando que os gêneros *Galictis* e *Lyncodon* são táxons irmãos.

2.3 CITOGENÉTICA MOLECULAR

As técnicas de coloração em cromossomos mitóticos, juntamente com o desenvolvimento da técnica de hibridação *in situ* permitiram um avanço nos estudos de citogenética comparada. Já na década de 70, foram propostos mapas comparativos de cerca de 50 espécies diferentes de vertebrados, incluindo muitos mamíferos de importância econômica ou que servem como modelos biomédicos, através da utilização de metodologias que envolvem a hibridação *in situ* (CGOW, 1996). Com base nas informações obtidas por estes métodos é possível fazer estudos comparativos intra e interespecíficos entre diferentes citótipos para se

estabelecer a relação evolutiva entre eles. A determinação do estado plesiomórfico, apomórfico ou sinapomórfico dos caracteres podem servir como base para organização sistemática dos taxa considerados (HENNIG, 1956 ; DE PINNA, 1991).

Nesses estudos são utilizadas sondas cromossomo-específicas de uma espécie que será hibridizada *in situ* em cromossomos em metáfase de outra espécie, detectando assim homologias cromossômicas, ou seja, é possível detectar sequências conservadas dos genomas das duas espécies. Esta variação da técnica de hibridação é chamada de ZOO-FISH. A sonda às vezes, pode hibridar em apenas um cromossomo, indicando que o cromossomo inteiro encontra-se conservado. Outras vezes, vários cromossomos ou segmentos de diferentes cromossomos são marcados, mostrando que rearranjos intercromossômicos ocorreram durante a divergência das espécies. A utilização da técnica de FISH reversa ou ZOO FISH reversa auxilia em uma identificação mais detalhada de homologias entre diferentes espécies, ou seja, detecta seqüências conservadas (HASS, 2006). Uma das aplicações desta técnica é no estudo da evolução cariotípica, tanto para determinar mecanismos de mudanças cromossômicas ocorridas, no decorrer da história evolutiva do grupo, como na determinação das relações filogenéticas (FERGUSON-SMITH *et al.*, 1998). Um dos métodos baseia-se no uso de pinturas cromossômicas (Chromosome Paints), que são misturas de sondas de DNA, usualmente derivadas de cromossomos separados por citometria de fluxo ou microdissecção e amplificadas por PCR (Polymerase Chain Reaction) (GRAY *et al.*, 1979; LÜDECKE *et al.*, 1989; WIENBERG; STANYON, 1998).

3. OBJETIVO GERAL

Com os dados apresentados no trabalho é possível contribuir com uma caracterização cariotípica da espécie *Galictis cuja*, sendo o primeiro coletado na região Sul do Brasil.

3. 1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Caracterizar citogeneticamente, através de coloração comum e bandeamentos (banda C, G e NOR) o cariótipo de *Galictis cuja*;
- b) Aplicar a técnica de ZOO-FISH na espécie *Galictis cuja* utilizando sondas cromossomo-específicas de *Homo sapiens sapiens*;
- c) Comparar a ocorrência de sintenias cromossômicas e associações sintênicas entre *Galictis cuja* e dados da literatura.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

O exemplar estudado é um macho da espécie *Galictis cuja* (Molina,1782), proveniente do Município de Massaranduba, no Estado de Santa Catarina, que foi encontrado atropelado e ainda vivo, sendo levado ao laboratório de Citogenética Animal da UFPR.

4.1 PREPARAÇÃO DIRETA DA MEDULA ÓSSEA

Em laboratório o animal foi submetido a uma preparação direta da medula óssea, seguindo Ford e Hamerton (1956), com modificações (SBALQUEIRO & NASCIMENTO, 1996). Primeiramente foi injetado intraperitonealmente, 1ml de solução de colchicina à 0,1% para cada 100g de peso animal. Após verificação da morte do animal foram anotadas características corporais como peso, comprimento total e comprimento da cauda, tamanho interno e externo da orelha, comprimento das patas anterior e posterior.

Ao final das anotações, foi feita uma abertura abdominal onde foi confirmado o sexo do animal através da visualização de suas gônadas: testículos. Em seguida, foram removidos os fêmures, cortando suas epífises. Com uma seringa, contendo solução hipotônica (KCL 0,075M), foi transferido o material da medula diretamente a um tubo de centrifuga. A seguir, o material foi ressuspendido gentilmente e mantido em uma temperatura de 37° C por 20 minutos.

O material a seguir foi centrifugado a 800 rpm por 10 minutos sendo removido em seguida o sobrenadante. Foi ressuspendido o precipitado e

adicionado lentamente o fixador ácido-alcoólico (3 metanol : 1 ácido acético), que é preparado no momento que foi utilizado.

4.2. PREPARAÇÃO DAS LÂMINAS

As lâminas utilizadas foram higienizadas primeiramente com detergente neutro, água corrente e água destilada. Em seguida foram fervidas em água destilada, sendo armazenadas em geladeira imersas em álcool absoluto.

Na preparação da lâmina, duas gotas do material obtido da preparação citológica (preparação direta da medula óssea) foram pingadas na lâmina.

4.3. IDENTIFICAÇÃO MORFOLÓGICA DOS CROMOSSOMOS

A identificação e classificação cromossômica seguiu o proposto por Levan *et al.* (1964) que classifica os cromossomos de acordo com a razão entre o comprimento dos braços cromossômicos ($r = q/p$) onde p é o comprimento cromossômico (cm) do braço curto, q é o comprimento cromossômico (cm) do braço longo. Classificando-os em metacêntrico (r entre 1,0 a 1,7), submetacêntrico (r entre 1,7 a 3,0), subtelocêntrico (r entre 3,01 a 7,0) e acrocêntrico (r maior que 7,01).

TABELA 1- NOMENCLATURA CROMOSSÔMICA SEGUNDO LEVAN *et. al.* (1964)

Cromossomos	Localização do centrômero	Razão entre os braços (r)
M	Médio	1,0
M	Região mediana	1,1 – 1,7
SM	Região submediana	1,8 – 3,0
St	Região subterminal	3,1 – 7,0
A	Região terminal (acrocêntrico)	7,1 – 0,0
A	Terminal (acrocêntrico)	00

4.4. TÉCNICAS DE BANDAMENTO

4.4.1. COLORAÇÃO CONVENCIONAL

As lâminas montadas foram coradas com Giemsa, diluído em tampão fosfato pH 6,8 a 5%, por um período de 8 minutos, à temperatura ambiente. Em seguida, lavadas em água corrente e, após secarem, observadas ao microscópio e analisadas.

4.4.2. BANDEAMENTO C

O bandeamento C permite a visualização de regiões de heterocromatina constitutiva, usando para isso Bário e Giemsa. Foi seguido o protocolo descrito em Sumner (1972) com modificações realizadas no Laboratório de Citogenética Animal da UFPR

- A lâmina pode ser preparada no dia ou envelhecida por três dias a 40°C.
- Passar em 0,2N HCl a 43-45°C por 2 minutos.
- Lavar em H₂O destilada e secar.
- Mergulhar em solução de bário 5% a 43-45°C por 15 segundos, sendo que esse tempo pode ser aumentado ou diminuído conforme os resultados obtidos.
- Passar em 0,2N HCl a 43-45°C por 2 minutos.
- Lavar bem, com jatos de H₂O destilada.
- Mergulhar em solução salina 2SSC pH 7,0 a 60-65°C por 15 minutos.
- Lavar em água destilada e corar conforme protocolo de coloração convencional.

4.4.3. BANDEAMENTO G

Este procedimento evidencia bandas claras e escuras nos cromossomos, utilizando tripsina e Giemsa, o que permite o correto pareamento deles. A técnica de banda G foi empregada conforme Seabright (1971), modificada por Sbalqueiro (1989):

- Preparar as lâminas e envelhecer por 3-4 dias em estufa a 40°C.
- Incubar as lâminas em tampão fosfato pH 6,8 por 2 minutos.

- Incubar em solução de tripsina a 0,03% dissolvida em tampão fosfato pH 6,8 ou solução de Hanks por 30 segundos. Esse tempo pode ser aumentado ou diminuído conforme os resultados obtidos.
- Lavar rapidamente em água destilada, álcool absoluto e água destilada.
- Incubar em tampão Fosfato pH 6,8 por 1 minuto.
- Corar com Giemsa (tamponado em pH 6,8) a 2,5% por 5 minutos.
- Lavar em água filtrada, esperar secar e observar ao microscópio.

4.4.4. BANDEAMENTO NOR

Esta técnica permite a observação das regiões organizadoras de nucléolo e evidenciação do complexo sinaptonêmico em material de meiose. Foi seguido o protocolo descrito por Howell & Black (1980), com modificações de Sbalqueiro (1989):

- Preparar as lâminas e envelhecer por no mínimo 4 dias a 40°C.
- Incubar as lâminas em tampão Borato pH 9,2 de 5 a 10 minutos.
- Lavar em água destilada e secar ao ar.
- Colocar sobre a lâmina duas gotas de solução coloidal (0,25g de gelatina + 5 ml de água bidestilada aquecida + 0,2 ml de ácido fórmico), mais quatro gotas de solução de Prata a 50% (1g de Prata + 2 ml de água bidestilada + duas gotas de formalina).
- Homogeneizar as soluções com uma pipeta Pasteur.
- Cobrir com lamínula, colocar a lâmina numa câmara úmida (pode ser uma placa de Petri com papel filtro umedecido), mantendo em estufa a 70°C até atingir uma coloração castanho-dourada (cerca de 8 minutos).
- Lavar em água destilada, descartando a lamínula.
- Corar com Giemsa (tamponado em pH 6,8) a 2% por 1 minuto, lavar, secar ao ar e observar ao microscópio.

4.4.5 CAPTURA DE IMAGENS

De cada uma das colorações foram selecionadas e capturadas as três melhores metáfases para montagem dos cariogramas com a utilização do fotomicroscópio Zeiss-Axiophot.

4.5 HIBRIDAÇÃO IN SITU

Para a hibridação *in situ* foram necessárias as seguintes etapas de acordo com HASS (2006):

- seleção das melhores preparações citogenéticas;
- verificação da qualidade das metáfases a serem hibridadas;
- preparação das sondas genômicas;
- hibridação com sondas cromossomo-específicas de *Mus musculus* em citótipos de *Scapteromys* e sondas humanas em citótipos de *Galictis cuja*;
- processo de lavagem;
- detecção dos sinais gerados;
- captura das imagens e análise dos dados

4.5.1 PREPARAÇÃO DE SONDAS CROMOSSOMO-ESPECÍFICAS

As sondas cromossomo-específicas humanas foram marcadas com biotina (tamra) ou dinitrofenol e hibridadas em *Galictis cuja*.

Reamplificação – 2a. DOP-PCR - marcação com fluorocromos em um volume final de 25µl.

Reagentes da 2a. DOP-PCR:

- 1µl de DNA cromossômico (100ng do produto estoque);
- 2,5µl de 10Xtampão para PCR;
- 1,5µl de dNTP MIX;
- 1µl de Biotina-dUTP ou Dinitrofenol-dUTP;

- 2,5µl de iniciador 6MW ou F/S;
- 1,25µl de 20XW1 detergente,
- 0,3µl a 0,5µl de Taq Polimerase;
- 14,75µl de água ultrapura

- Os reagentes foram adicionados em um tubo de microcentrífuga de 1,5µl (sem o DNA cromossômico); agitados em Vórtex e centrifugados rapidamente resultando na mistura de reação mãe;

- Foram colocados 24µl da mistura de reação mãe em tubos de microcentrífuga de 0,5µl, depois acrescido 1µl a 1,5µl de DNA genômico; agitados em Vórtex e centrifugados rapidamente;

- Os tubos são submetidos à reação de PCR no termociclador, seguindo as etapas (Tabela 2):

TABELA 2- ETAPAS DA PCR DE MARCAÇÃO (2ª DOP-PCR)

ETAPAS	TEMPERATURA(C°)	TEMPO(min.)	CICLOS
Desnaturação inicial	94°	3	1
Desnaturação	94°	1	30
Anelamento	62°	1	30
Extensão	72°	1:30	30
Extensão final	72°	8	1

4.5.2. VERIFICAÇÃO DOS FRAGMENTOS PRODUZIDOS NA DOP-PCR

Nesta etapa foi usada 3µl da reação final da DOP-PCR, produtos da primeira amplificação, e misturada com 1µl de corante, aplicando-se em um gel de agarose 1% em TAE 1X. Sendo utilizado um marcador de pares de base – Hind III – para observar a obtenção de bandas de 550 a 2300 pares de bases. A corrida do gel foi realizada a 130W/150mA por 20 min. A visualização das bandas no gel foi realizada após coloração em Brometo de Etídio por 15 minutos, seguido de lavagem em água por 5 minutos. Depois o gel foi fotografado.

Segundo Hass (2006) as bandas entre 500 e 2300 pares de bases são considerados bons para a hibridação, sendo seguido este padrão de tamanho no trabalho.

4.5.3. PREPARAÇÃO DAS SONDAS PARA HIBRIDAÇÃO

Após a marcação das sondas cromossomo-específicas, estas são preparadas para comporem a solução de hibridação, conforme o seguinte procedimento:

- Misturou-se em um tubo de microcentrífuga de 1,5 ml a sonda cromossomo específica no volume 22µl;
- Acrescentou-se 0,1 de volume de acetato de sódio 3M; 2,5 de volume de etanol gelado; 5µl de Human Cot -1DNA; 3µl de DNA de esperma de salmão;
- Agitou-se em vórtex e centrifugou-se rapidamente;
- Deixou-se em freezer -20°C por 30 min;
- Centrifugou-se a 13.000rpm por 18 min;
- Removeu-se o sobrenadante e secou-se o material em estufa a 60°C por 1 min;
- Adicionou-se 10µl de tampão de hibridação e deixa-se no termo-agitador a 37°C por pelo menos uma hora para que o material fique homogeneamente misturado, de preferência por 12 horas.

4.5.4. MONTAGEM DAS LÂMINAS PARA HIBRIDAÇÃO

Esta etapa consistiu em preparar os cromossomos para receber as sondas, e assim ocorrer a hibridação. Consistiu dos seguintes procedimentos de acordo com Hass (2006):

- Incubar as lâminas de vidro 76X26mm em etanol/éter na proporção 1:1 por 3 min;
- Secar as lâminas com papel toalha, identificando-as devidamente;
- Colocar as lâminas dentro de uma caixa de metal, incubando-as dentro do banho-maria a 55°C por 1 min, para que se forme um filme de vapor d'água, pingando-se uma ou duas gotas da suspensão celular em cada lâmina, dependendo do tipo de

hibridação espécie-específica. Em seguida goteja-se, sobre o material uma gota de solução ácido-alcoólica, para melhor separar os cromossomos nas metáfases;

- Deixar a lâmina no banho-maria por mais ou menos 1 min para secar bem;
- Observar as lâminas ao microscópio invertido para verificar a quantidade de citoplasma nas metáfases;
- Dependendo da quantidade de citoplasma, deixar as lâminas de 50 segundos a 40 min em Pepsina (99ml de água, 1 ml de HCl 1N e 50 μ l de Pepsina 10%), no banho-maria, a 37°C;
- Incubar as lâminas em 1XPBS, temperatura ambiente, por 5 min;
- Repetir o passo anterior por mais duas vezes;
- Incubar as lâminas em álcool 70%, 90% e 100% por 3 min cada;
- Secar as lâminas por 1 h a 60°C ou por 24 horas a 37°C.

4.5.5. DESNATURAÇÃO DAS SONDAS DE DNA MARCADAS

- Retirar os tubos de microcentrífuga com as sondas do termo-agitador, e colocar em banho-maria a 70 ou 72°C por 7 min para desnaturar;
- Incubar as sondas em banho-maria a 37°C por 30 a 50 min, para a reassociação das seqüências repetitivas de DNA.

4.5.6. PREPARAÇÃO DAS LÂMINAS MONTADAS PARA HIBRIDAÇÃO

- Colocar as lâminas preparadas em solução de formamida 70% (70ml de formamida P.A., 30 ml de 2XSSC e pH= 7,0) a 72°C por 1:30 min;
- Incubar em etanol 70%, 90%, gelados, e etanol 100%, temperatura ambiente, por 3 min cada;
- Deixar escorrer o excesso de etanol 100% para que a lâmina seque rapidamente.

4.5.7. HIBRIDAÇÃO

- Pingar sobre uma das áreas dos exemplares celulares, as sondas de DNA marcadas e desnaturadas;

- Repetir o passo anterior para a outra área de células, caso seja realizada outra hibridação simultânea;
- Cobrir cada área com uma lamínula de 20x20mm;
- Fixar as bordas da lamínula com um selante;
- Corar as lâminas montadas em uma caixa de metal, para que fiquem fora da ação da luz e levar ao banho-maria a 37°C, por 72 h, para que ocorra a hibridação.

4.5.8. LAVAGENS PÓS-HIBRIDAÇÃO

- Retirar o selante e as lamínulas da lâmina com auxílio de uma pinça;
- Incubar as lâminas em solução 2xSSC a temperatura ambiente por 1 min;
- Proceder com a lavagem das lâminas com alta estringência, no caso das hibridações com a mesma espécie ou espécies relacionadas;
- Incubar as lâminas em solução de 0,1XSSC a 62°C por 5 min;
- Repetir por mais duas vezes o passo anterior;
- Incubar as lâminas em 2xSSC por 1 min.

4.5.9. DETECÇÃO DOS SINAIS DE HIBRIDAÇÃO

Os sistemas de marcação e detecção empregados foram escolhidos de acordo com o tipo de experimento executado, os cromossomos foram marcados com DAPI.

4.5.10 ANÁLISE E CAPTURA DE IMAGEM

Do indivíduo foram montada lâminas para que fosse possível escolher as melhores preparações, onde as metáfases estivessem com número cromossômico completo, espalhados e estendidos, e com pouco citoplasma. Utilizou-se o microscópio Zeiss-Axiophot acoplado a um sistema de fluorescência com uma lâmpada de mercúrio HBO 100, sendo utilizada na documentação digital a objetiva de 63X (Planapochromat).

4.5.11 MAPA CROMOSSÔMICO

As regiões de hibridação foram identificadas utilizando o padrão de banda G obtido pela contra-coloração com ActinimicinaD/DAPI, ao lado de cada cromossomo ou região marcada foram identificadas as sondas humanas que hibridizaram.

5. RESULTADOS

O indivíduo pertencente ao gênero *Galictis cuja* (Figura 1) foi coletado no município de Massaranduba do Estado de Santa Catarina. Localiza-se a uma latitude 26°36'38" sul e a uma longitude 49°00'30" oeste, estando a uma altitude de 38 metros .



Figura 1. *Galictis cuja* foto de Renata Bornholdt

5.1. CARACTERIZAÇÃO CITOGENÉTICA

5.1.1. COLORAÇÃO COMUM

Foram analisadas 15 metáfases em coloração comum (Figura 2) de um indivíduo de *Galictis cuja* macho, que apresentou $2n=38$, $NA= 68$ e $NF=71$, sendo composto por 18 pares autossômicos mais o par sexual XY. Com base na classificação cromossômica de Levan *et al.* (1964) foi possível caracterizar o

cariótipo com 4 pares cromossômicos metacêntricos, 7 pares subtelocêntricos, 4 pares submetacêntricos, 2 pares acrocêntricos e o par sexual formado por X metacêntrico e Y acrocêntrico pequeno (Figura 4). Foi observada a presença de uma constrição secundária bem evidente no par acrocêntrico 18, que se mostrou conspícua quando da coloração com Nitrato de Prata (Figura 4 e 6).

TABELA 3- RELAÇÃO ENTRE BRAÇOS CROMOSSÔMICOS DE *Galictis cuja*, SEGUNDO LEVAN *et. al.* (1964)

PAR	p	q	r	Classificação
1	0,3	0,8	2,66	SM
2	0,3	0,9	3,0	SM
3	0,2	0,6	3,0	SM
4	0,2	0,6	3,0	SM
5	0,2	0,5	2,5	SM
6	0,5	0,6	1,2	M
7	0,4	0,6	1,5	M
8	0,3	0,4	1,3	M
9	0,2	0,4	2,0	M
10	0,15	0,3	2,0	M
11	0,2	0,2	1,0	M
12	0,2	0,2	1,0	M
13	0,1	0,8	8,0	A
14	0,1	0,4	4,0	ST
15	0,1	0,5	5,0	ST
16	0,1	0,4	4,0	ST
17	0	0,4	0	A
18	0,1	0,2	2,0	SM
X	0,2	0,7	3,5	ST
Y	0	0,2	0	A

p =braço cromossômico curto; q= braço cromossômico longo;
r= razão entre os braços

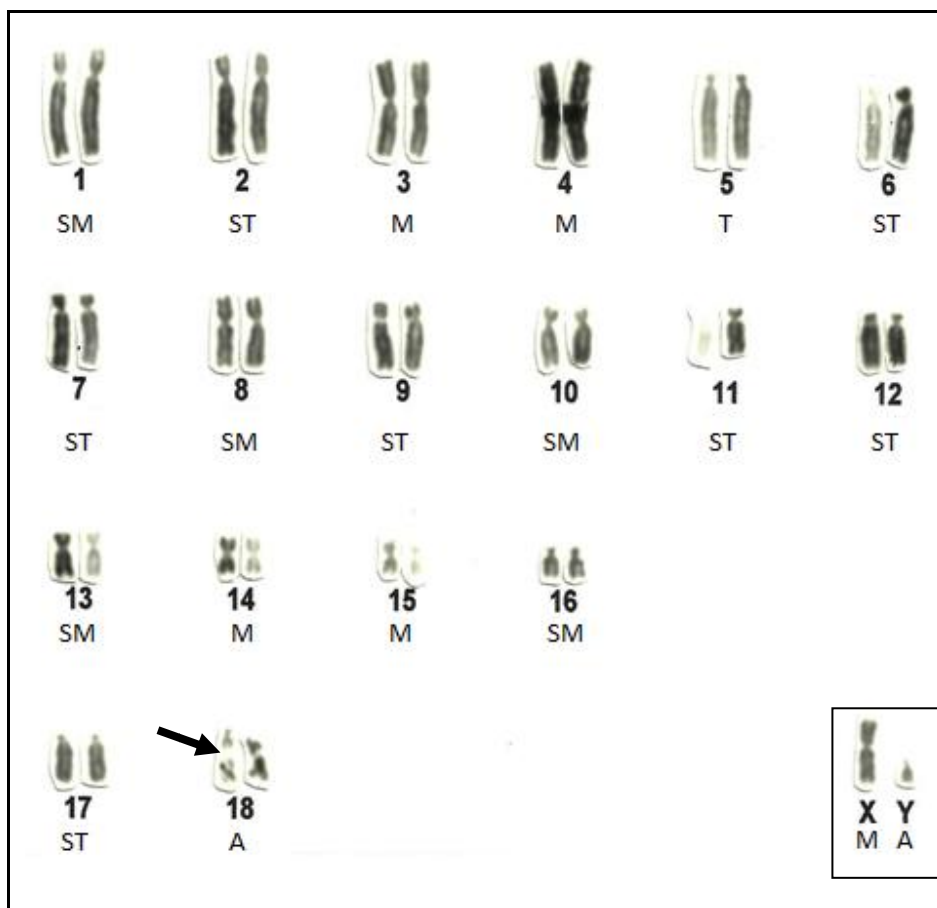


Figura 2. Cariótipo de *Galictis cuja* macho ($2n=38$, $NA=68$ e $NF=71$), constrição secundária no par 18 indicada pela seta.

5.1.2 BANDEAMENTO G

Com a montagem do cariótipo do indivíduo de *Galictis cuja* é possível observar as marcações de regiões claras que correspondem a regiões heterocromáticas que apresentam replicação tardia e ricas em AT e escuras que são regiões eucromáticas com replicação adiantada e rica em GC nos cromossomos, característico desta técnica de bandeamento. Pode-se nota a constrição secundária no par 18 acrocêntrico.

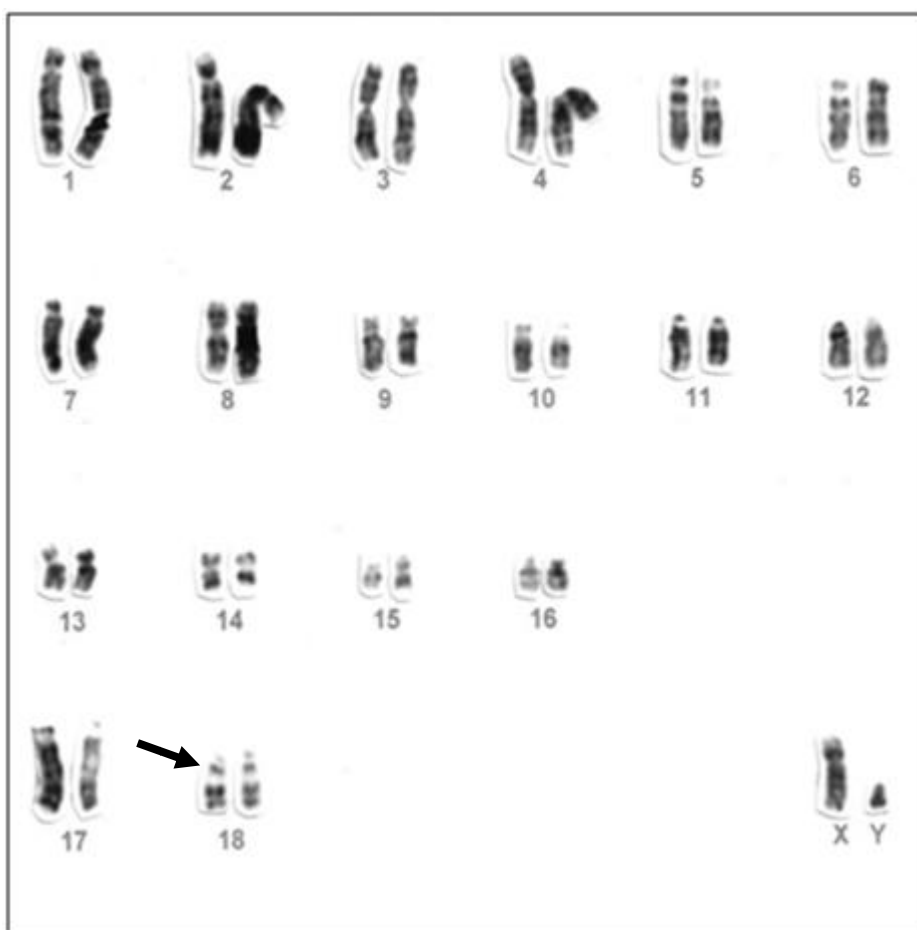


Figura 3. Cariótipo em bandeamento G de *Galictis cuja* mach ($2n=38$, $NA=68$ e $NF=71$), constrição secundária no par 18 indicada pela seta.

5.1.3 BANDEAMENTO C

Com base nas análises das melhores metáfases de *G. cuja* foi possível observar a marcação do par autossômico 18, indicadas pelas setas (Figura 5).

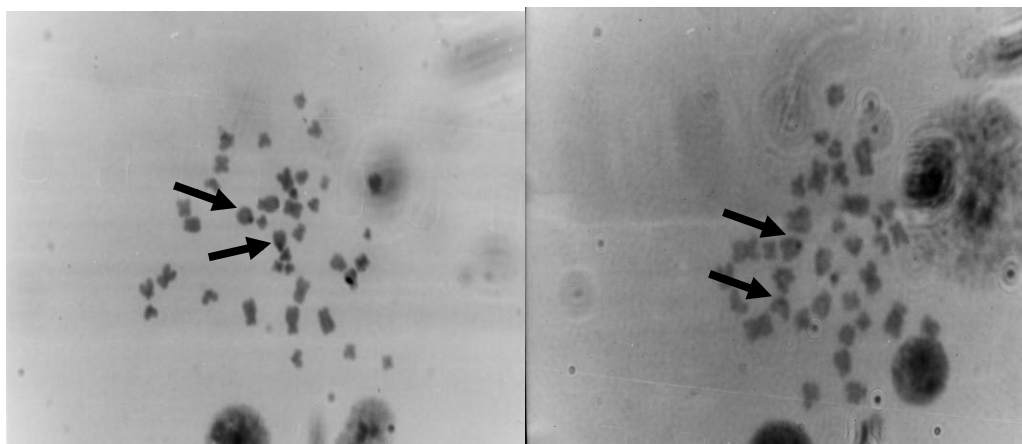


Figura 4. Metáfase de *G. cuja* com bandeamento C, marcações no par cromossômico 18 indicadas com seta.

5.1.4 BANDEAMENTO NOR

Com a técnica de bandamento NOR pode-se observar a marcação em 2 cromossomos nas metáfases de *Galictis cuja* no par 18, sendo indicadas por uma seta na figura 5. Tanto a constrição secundária como a banda Ag-NOR não haviam sido observadas na outra espécie deste gênero.

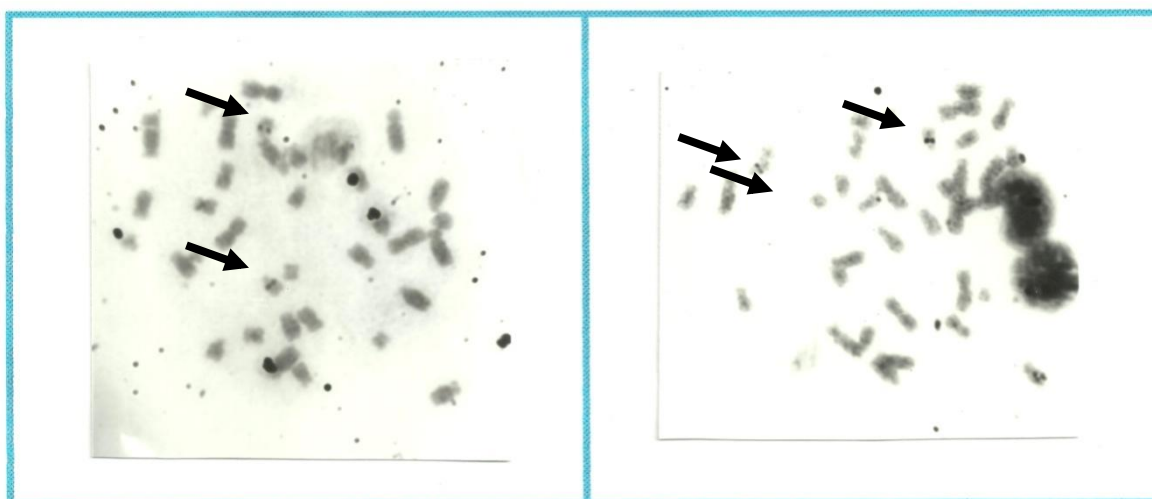


Figura 5. Metáfase de *Galictis cuja* macho em bandeamento NOR ($2n=38$ e $NF=71$), com indicações das marcações. Setas indicam marcação nos cromossomos do par 18.

5.1.5 HIBRIDAÇÃO IN SITU

Foram analisadas 10 a 15 metáfases por experimento utilizando sondas cromossomo-específicas de humano chamadas sondas HSA 3, 6, 9,10 ,11 e 12, sendo que 10 metáfases foram fotomicrografadas e utilizadas para a identificação do cromossomo que hibridou em *Galictis cuja*.

5.1.5.1 SONDAS HSA 3 e HSA 6

Foram usadas sondas humanas que correspondem aos cromossomos humanos 3 (coloração vermelha) e 6 (coloração verde).

Sonda HSA 3 hibridou no cromossomo do par 2 no braço q e a sonda HSA 6 hibridou no cromossomo do par 11 no braço q.

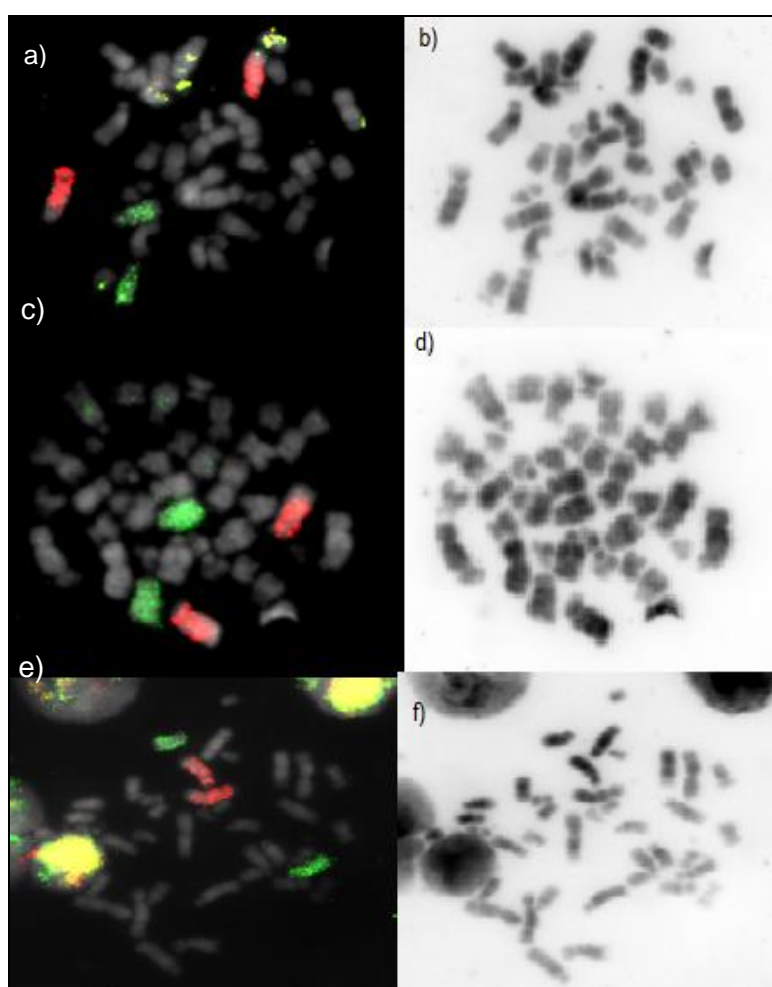


Figura 6: Hibridações com sondas humanas 3 e 6 (a,c,e); em vermelho HSA 3 e em verde HSA 6 e suas respectivas imagens em contra-coloração ActinomicinaD/DAPI (b,d,f).

5.1.5.2 SONDAS HSA 9 e HSA 10

Foram usadas sondas humanas que correspondem aos cromossomos 9 (coloração vermelha) e 10 (coloração verde).

Sonda HSA 9 hibridou no cromossomo do par 9 no braço q e a sonda HSA 10 hibridou no cromossomo do par 14 no braço q.

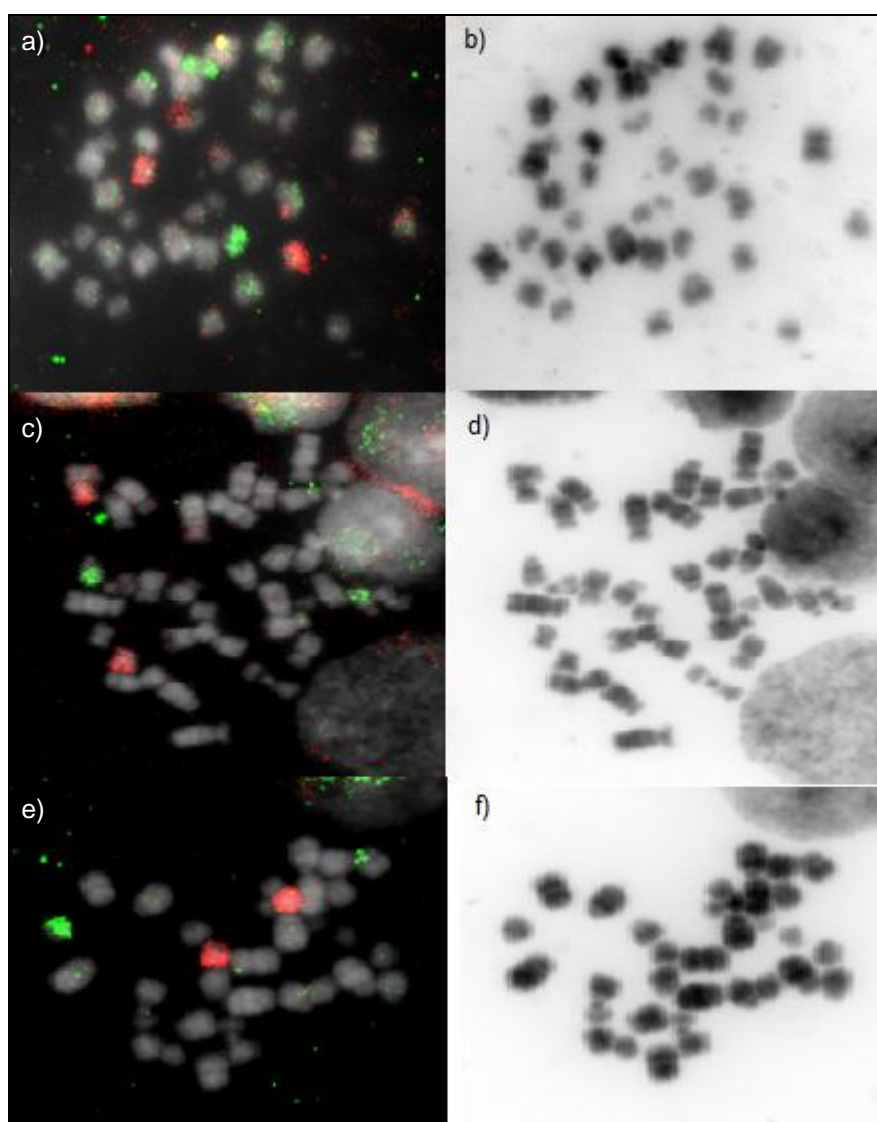


Figura 7. Híbridações com sondas humanas 9 e 10 (a,c,e); em vermelho HSA 9 e em verde HSA 10 e suas respectivas imagens em contra-coloração ActinomicinaD/DAPI (b,d,f).

5.1.5.3 SONDAS HSA11 e HSA12

Foram usadas sondas humanas que correspondem a cromossomos humanos 11 (coloração vermelho) e 12 (coloração verde).

Sonda HSA 11 hibridou no cromossomo do par 16 e a sonda HSA 12 hibridou no cromossomo do par 13 .

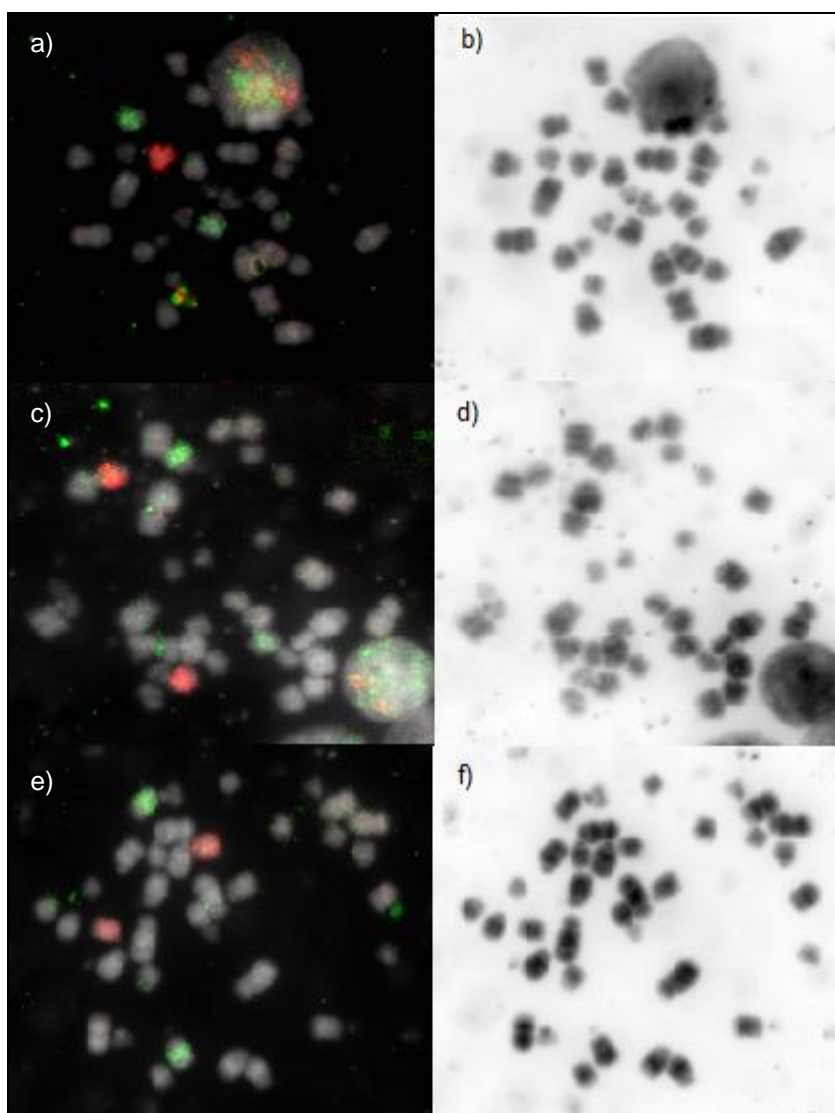


Figura 8. Hibridações com sondas humanas 11 e 12 (a,c,e); em vermelho HSA 11 e em verde HSA 12 e suas respectivas imagens em contra-coloração ActinomicinaD/DAPI (b,d,f).

5.1.6 MAPA CROMOSSÔMICO

Utilizando o cariótipo em banda G, é apresentado o mapa cromossômico com as sondas hibridadas à direita do par cromossômico e sua cor correspondente, que evidenciaram homeologia cromossômica com as sondas humanas HSA 3, 6, 9, 10, 11 e 12 nos cromossomos de *Galictis cuja*, 2, 11, 9, 14, 16 e 13, respectivamente.

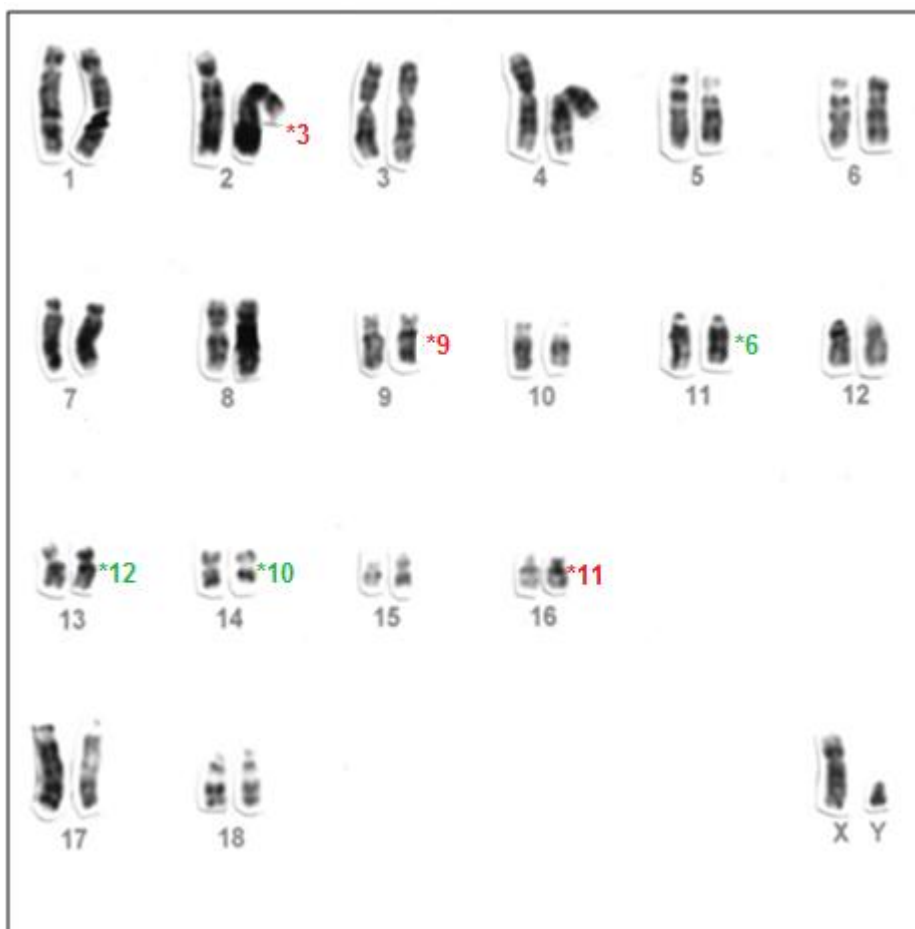


Figura 9. Cariótipo em banda G de *Galictis cuja* com as sondas hibridadas à direita

6. DISCUSSÃO

6.1. CARACTERIZAÇÃO CROMOSSÔMICA

Estudos citogenéticos têm auxiliado muito na compreensão de variação intra e interespecífica, variação intra e interpopulacional, bem como na identificação de espécies crípticas e na resolução dos problemas taxonômicos (GUERRA, 1988;

MACGREGOR, 1993). Segundo Nie *et al.* (2002) que utilizaram rearranjos cromossômicos para investigar algumas questões sistemáticas relativas à filogenia do genoma do gato doméstico, panda vermelho e cinco espécies de mustelídeos. No entanto, enquanto os estudos citogenéticos foram realizados em algumas espécies da Família (Freitas *et al.*, 1975; Kurose *et al.*, 2000; Graphodatsky *et al.*, 2002), não há estudos publicados sobre a constituição cromossômica de *Galictis cuja*.

O cariótipo apresentado neste trabalho da espécie *Galictis cuja* apresenta número diplóide igual a 38 e número fundamental igual a 71. Esse mesmo valor diplóide é encontrado em muitas outras espécies da Família Mustelidae, totalizando 60% das espécies com mesmo número cromossômico (FRANCO-DE-SÁ, *et al.*, 2007).

O número diplóide em Mustelidae varia de 30 em *Mustela vison* (Graphodatsky *et al.*, 2000) a 44 em *Mustela altaica* (Graphodatsky *et al.*, 1976), *Mustela ermina orientalis* e *Mustela mustela anakuma* (OBARA, 1991). Apesar dos cariótipos da Família serem conservados em relação ao número cromossômico, eles apresentam diferenças consideráveis na estrutura dos cromossomos, indicando que ocorreram várias rearranjos durante a evolução deste grupo (COUTURIER & DUTRILLAUX, 1986). Os cromossomos sexuais também diferem na morfologia (metacêntrico, submetacêntrico, subtelocêntrico e acrocêntrico) e tamanho (grande, médio, pequeno), mas o cromossomo Y permanece sendo o menor (FRANCO-DE-SÁ, *et al.*, 2007).

Como a Ordem Carnívora apresenta organizações do genoma contrastantes, suas famílias são consideradas os melhores exemplos para estudo do papel dos rearranjos cromossômicos na especiação por apresentarem cariótipos conservados com algumas exceções (WURSTER-HILL & CENTERWALL, 1982; DUTRILLAUX & COUTURIER, 1983).

Embora as relações filogenéticas em Carnívora tenham passado por revisões frequentes, toda a evidência molecular disponível suporta o monofilismo dos carnívoros, que consiste em dois grupos monofiléticos, Feliformia e Caniformia. A subordem Caniformia geralmente consiste de Canidae, Ursidae, Procyonidae, Mustelidae, Ailuridae, Mephitidae, Otariidae, Odobenidae e Phocidae (BININDA – EMONDS, 1999; EIZIRIK *et al.*, 2010).

6.2. BANDEAMENTOS

O bandeamento C em mamíferos normalmente é centromérico ou pericentromérico, por exemplo, em humanos o cromossomo Y apresenta marcação centromérica e terminal, em baleias, esquilos e outras espécies também encontra-se marcação na região terminal. Na Ordem Carnívora a distribuição e quantidade da heterocromatina constitutiva diferenciada pode ser explicada pelas propriedades do DNA repetitivo (composição, sequência, arranjo) que influencia no sucesso da técnica, pela quantidade de heterocromatina nos cariótipos de carnívoros parecer ser menor se comparado a outros mamíferos, por estar presente em outros locais servindo como proteção de regiões específicas do cromossomo como centrômero (PATHAK & WURSTER-HILL, 1977)

Em mustelídeos encontra-se uma diversidade no padrão de bandeamento C, com alguns indivíduos apresentando marcações no braço curto, enquanto outros só mostram região heterocromática no centrômero (FREITAS *et al.* 1975; KUROSE, *et al.*, 2000). O padrão encontrado no *G. cuja* concorda com esse padrão da família, estando presente apenas nas regiões centroméricas dos cromossomos.

A análise comparativa com o cariótipo em banda G de *Galictis vittata*, apresentados pela literatura, evidencia uma alta similaridade não só quanto ao padrão de bandas como também na morfologia cromossômica.

Em algumas espécies de mamíferos existe marcação no cromossomo Y, em alguns cromossomos autossômicos, não sendo observado marcação no cromossomo X. Esse padrão é encontrado em algumas espécies da Ordem Carnívora., como no cão doméstico onde existe marcação de NOR em três pares de autossomos e no Y. Em outras espécies como o antílope (*Ammospermophilus harrisi*), o primata *Hylobates syndactylus*, e no guaxinim observa-se o mesmo padrão de marcação de NOR no par sexual, mesmo estes não sendo carnívoros (PATHAK, *et. al.*, 1982)

A banda NOR aqui evidenciada, no par 18, não havia sido descrita para a espécie *G. vittata*, reforçando realmente serem entidades específicas diferentes.

6.3 HIBRIDAÇÃO IN SITU COM SONDAS CROMOSSOMO-ESPECÍFICAS HUMANAS

Nos últimos anos, sondas de pintura cromossômica específica foram feitas a partir de nove carnívoros: o gato doméstico (*Felis catus*, FCA) (Weinberg *et al.*, 1997), o cão doméstico (*Canis familiaris*, CFA) (Graphodatsky *et al.*, 2000), a raposa vermelha (*Vulpes vulpes*, UVV) (Yang *et al.*, 1999), o guaxinim japonês (*Nyctereutes procyonoides*, NPR) (Nash *et al.*, 2001), o vison-americano (*Mustela vison*, MVI) (Graphodatsky *et al.*, 2002), a fuinha (*Martes foina*, MFO) (Nie *et al.*, 2002), o panda gigante (*Ailuropoda melanoleuca*, AME) (Nash *et al.*, 1998), o gambá listrado (*Mephitis mephitis*, MME) e o gambá encapuzado (*Mefitismo macroura*, MMA) (Perelman *et al.*, 2008). Diversos mapas cromossômicos comparativos foram estabelecidos entre os carnívoros, e a relação filogenética entre os diferentes grupos foram revisados por pintura cromossômica (NASH *et al.*, 2008; GRAPHODATSKY *et al.*, 2008; NIE *et al.*, 2002; TIAN *et al.*, 2004; PERELMAN *et al.*, 2008).

Atualmente, cerca de 40 espécies representando a maioria dos grupos de carnívoros têm sido estudado por pintura cromossoma de espécies cruzadas. Esses estudos permitem uma visão dos rearranjos inter-cromossômicos do genoma e a proposição de cariótipos ancestrais de toda a ordem e algumas famílias (NASH *et al.*, 2001, 2008; GRAPHODASKY *et al.*, 2002, 2008; MURPHY *et al.*, 2001; TIAN *et al.*, 2004; PERELMAN *et al.*, 2005, 2008). No entanto, estudos citogenéticos moleculares comparativos na ordem Carnivora até agora não tem conseguido analisar os rearranjos inter e intra-cromossômico com base em análises filogenéticas. Estudos com pintura cromossômica demonstraram que *Canis familiaris* (CFA), com o maior número diplóide ($2n = 78$) e o cariótipo mais reorganizado dentre os carnívoros, é uma espécie ideal para estudos com pinturas cromossômicas e que as sondas de pintura CFA poderia revelar inversões que teriam escapado à detecção utilizando sondas de pintura a partir de espécies com genomas com sintenias conservadas como a humana (*Homo sapiens*, HSA) e *Felis catus* (FCA) (YANG *et al.*, 2000).

Com base em sequências de genes nucleares Eizirik *et al.* (2010) propôs uma filogenia molecular completa para 50 diferentes gêneros que representam todas as famílias carnívoros e construiu um relógio molecular para a evolução da

Carnívoro. Muitas espécies com dados de pintura também foram incluídos neste estudo.

Em um estudo mais recente Nie *et al.* (2012), utiliza como cariótipo de carnívoro ancestral (CCA) $2n=42$ para mapear os rearranjos cromossômicos ocorridos durante a divergência dessa Ordem.

As relações evolutivas entre as espécies cariotípicas em Mustelidae foram detalhados por Graphodatsky *et al.* (2002). De acordo com eles a diferenciação cariotípica dos mustelídeos do ancestral comum provavelmente ocorreu por meio de diversos rearranjos (fusões cêntricas e fissões, adição de heterocromatina, inversões pericêntricas) que causaram a variabilidade de cariótipo observada na família Mustelidae. A análise comparativa dos segmentos cromossômicos em mustelídeos e em espécies fora do grupo revelou 18 supostos segmentos autossômicos conservados, que são, provavelmente, os cromossomos ancestrais ou braços cromossômicos (Graphodatsky *et al.*, 2002). O papel dos rearranjos cromossômicos na especiação permanece controverso, porém alguns deles são encontrados na maioria dos nós da árvore filogenética dos carnívoros (BININDA – EMONDS, 1999; EIZIRIK *et al.*, 2010).

Nossos resultados corroboram com os resultados da literatura em hibridações realizadas em *Mustela vison* ($2n=30$), onde as sondas HSA (3, 6, 9, 11 e 12) apresentaram marcação em sinal único. Já a sonda HSA 10 apresentou dois sinais em dois pares de cromossomos diferentes nesta espécie (Graphodatsky *et al.*, 2002). A hibridação com as outras 18 sondas cromossomo-específicas de humanos, poderão revelar novas sintenias cromossômicas na espécie *Galictis cuja*.

7. CONCLUSÃO

Conclui-se no capítulo I “Descrição Cromossômica utilizando citogenética clássica e molecular da espécie *Galictis cuja* (CARNIVORA, MUSTELIDAE)” que:

- Esta é a primeira caracterização citogenética para a espécie de *Galictis cuja*, apresentando $2n=38$, $NA= 68$ e $NF= 71$ composto por 18 pares autossômicos, sendo 4 pares metacêntricos, 7 pares subtelocêntricos, 5 pares submetacêntricos, 2 pares acrocêntricos, X metacêntrico e Y acrocêntrico, sendo observada a presença de constrição secundária no par 18;
- O bandeamento G apresentou-se similar aos cariótipos de espécies próximas descritos em literatura;
- O bandeamento C apresentou marcação na região centromérica dos cromossomos do par 18;
- A banda Ag-NOR reforçou a identificação da constrição secundária nos cromossomos do par 18;
- As hibridações nos cromossomos de *Galictis cuja* utilizando sondas cromossômicas humanas foram satisfatórias e a primeira descrita, onde se obteve sinais: HSA3 hibridou no cromossomo do par 2 no braço q de *G. cuja*, HSA6 hibridou no cromossomo do par 11 no braço q, HSA9 hibridou no cromossomo do par 9 no braço q, HSA10 hibridou no cromossomo do par 14 no braço q, HSA11 hibridou no cromossomo do par 16 e HSA12 hibridou no cromossomo do par 13, dados que corroboram as marcações únicas, exceto pela sonda HSA10, que em literatura foi verificada em dois sinais.
- Com a caracterização citogenética foi possível observar que a espécie segue o padrão no número cromossômico dentro da Família Mustelidae sendo necessário estudos complementares para a análise completa da hibridação com sondas humanas.

CAPÍTULO II
CARACTERIZAÇÃO CARIOTÍPICA ATRAVÉS DA CITOGENÉTICA CLÁSSICA E
ANÁLISE FILOGENÉTICA EM CITÓTIPOS DO GÊNERO *SCAPTEROMYS*
(RODENTIA, CRICETIDAE)

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 ORDEM RODENTIA

O verbo roer vem do latim *rodere* e significa roedor, um nome adequado para os membros da ordem Rodentia. A ordem Rodentia possui aproximadamente 468 gêneros e 2.052 espécies, representando, assim, cerca de 37,5% dos gêneros e 43,5% das espécies de mamíferos atuais (ROSE & ARCHIBALD, 2005). A característica mais marcante dos roedores, um par de grandes dentes incisivos que crescem continuamente ao longo da vida, permitiu que eles explorassem quase todos os tipos de alimentos, de gramíneas e grãos, até insetos, nozes e tubérculos. Aliando isto a uma grande capacidade de adaptação a diferentes ambientes, ciclos de vida curtos e alta taxa de reprodução, os roedores colonizaram quase todos os ambientes terrestres existentes construindo uma história de sucesso evolutivo notável (VAUGHAN; RYAN; CZAPLEWSKI, 2000).

Seu tamanho varia bastante, abrangendo desde camundongos, com apenas 5 cm de comprimento, até a capivara *Hydrochoerus hydrochaeris* com 1,20 m. Em geral possuem corpo compacto com pernas curtas, apresentando as solas das patas descobertas. As espécies dessa ordem diferem das outras de mamíferos por apresentarem dois pares de incisivos, um superior e outro inferior, de crescimento contínuo, e pela ausência de caninos, sendo característico um longo diastema (espaço) entre os incisivos e os molariformes, tendo o incisivo grande. A parte anterior de cada molar possui o esmalte bem resistente, enquanto que a parte posterior possui uma macia dentina. Esse arranjo dos dentes incisivos, somado ao seu contínuo crescimento, permite que eles assumam a forma de lâminas cortantes, o que é de grande valia, principalmente quando se precisa abrir um fruto duro para poder pegar a sua semente (COLBERT, 1969; NOWAK, 1994).

As espécies também apresentam adaptações diversas para sua sobrevivência, podendo assim ser: terrestres, arborícolas, fossoriais, saltatórios (formas de desertos) ou semi-aquáticos, mas não existem formas marinhas (SARAGE e LONG, 1986).

Existe uma grande divergência entre os autores no que diz respeito à classificação dos roedores em categorias subordinais. Inicialmente os roedores foram divididos em três subordens, baseada na musculatura da mandíbula associada à estrutura do crânio (SIMPSON, 1945; ANDERSON *et al.*, 1967): Sciuromorpha (roedores semelhantes a esquilos), formada pelas famílias Aplodontidae, Sciuridae, Geomyidae, Heteromyidae, Castoridae, Anomaluridae e Pedetidae; Myomorpha (roedores semelhantes a ratos), formada por Muridae, Gliridae, Seleviniidae, Zapodidae e Dipodidae; e Hystricomorpha (roedores semelhantes a porcos-espinhos), formada por Hystricidae, Erethizontidae, Caviidae, Hydrochaeridae, Dinomyidae, Heptaxodontidae, Dasyproctidae, Chinchillidae, Capromyidae, Octodontidae, Ctenomyidae, Abrocomidae, Echimyidae, Thryonomyidae, Petromyidae, Bathyergidae, e Ctenodactylidae.

Posteriormente, outras diferenças presentes na musculatura craniana e formas da mandíbula e do crânio, foram utilizadas para reagrupar as famílias em duas subordens: Sciurognathi e Hystricognathi, palavras que se referem aos diferentes tipos de mandíbulas (POUGH *et al.*, 2003). Reig (1981) adotou a proposta dicotômica de Woods (1976), subdividindo a ordem Rodentia em duas subordens: Sciurognathi e Hystricognathi e a subfamília Sigmodontinae em sete tribos: Akodontini, Ichthyominae, Oryzomini, Phyllotomini, Scaptero subordens myini, Sigmodontini, Wiedomyimi.

Com base em evidências morfológicas e moleculares, Carleton e Musser (2005) propõem a divisão da ordem Rodentia em cinco subordens: Anomaluromorpha, que abrange duas famílias de roedores africanos (4 gêneros e 9 espécies); Hystricomorpha, que inclui chinchilas, porcos-espinho, ratos-de-espinho, capivaras, entre outros (18 famílias, 77 gêneros e 290 espécies); Castorimorpha, que inclui castores e ratos-canguru (3 famílias, 7 gêneros e 62 espécies); Sciuromorpha, que engloba esquilos e outros (3 famílias, 61 gêneros e 307 espécies); Myomorpha, que inclui ratos-saltadores, hamsters, ratos e camundongos (7 famílias, 323 gêneros e 1569 espécies).

Atualmente nove tribos são reconhecidas dentro da subfamília Sigmodontinae: Abrotrichini, Akodontini, Ichthyomyini, Oryzomyini, Phyllotini, Reithrodontini, Sigmodontini, Thomasomyini e Wiedomyini, com alguns gêneros

permanecendo ainda incertae sedis, sem uma relação precisa definida com os demais (D'ELÍA et al., 2007).

2.1.1. FAMÍLIA CRICETIDAE

A família Cricetidae engloba 55% das espécies de roedores sul-americanos, o que representa 22% das espécies de mamíferos de todo o continente. Esta família está dividida em duas subfamílias: Sigmodontinae, para a maioria dos roedores da América do Sul e Neotominae, os roedores da América do Norte, utilizando esta dicotomia por razões fenéticas e filogenética (REIG, 1984).

As espécies dessa família possuem hábitos gregários, vivem em casais ou solitários. Algumas espécies podem apresentar costumes nômades e alta capacidade reprodutiva na presença de fartura de alimentos e de espaço físico, tendendo a aumentar o número de indivíduos até que o ambiente torne-se escasso, para aí então procurar novos espaços (HASS, 2006).

Os cricetídeos apresentam controles populacionais, que podem ser tanto pela saída de indivíduos da comunidade como pela ocorrência de elevadas mortalidades. Estes aspectos são bem observados nas espécies que procriam durante todo o ano, como aquelas que habitam regiões quentes do mundo e as que apresentam ninhadas com uma média de três filhotes, mesmo quando em cativeiro. Outro aspecto diz respeito ao período de gestação destes animais, que pode variar de 21 a 30 dias, e logo após a fêmea dar a cria, ela está apta para novo acasalamento (MELLO, 1986).

Alguns membros da família apresentam importância médica, por serem possíveis reservatórios naturais do *Schistosoma mansoni* (DIAS; PIRES; PINTO, 1980). Uma doença grave e freqüentemente fatal é a hantavirose, cujo vírus é amplamente encontrado em indivíduos da subfamília Sigmodontinae (ESCU TENAIRE; CHALON; VERHAGEN, 2000). Na América do Sul os registros mais abundantes estão associados a exemplares, principalmente, dos gêneros *Abothrix*, *Eligmodontia*, *Oligoryzomys* e *Reithrodon* (LOZADA; GUTHMANN; BACCALA, 2000). No Brasil os casos de hantavirose humana foram estudados principalmente no Estado de São Paulo, porém as análises sobre os hospedeiros

naturais são quase nulas, destacando-se a quase inexistência de conhecimentos biológicos e ecológicos das espécies transmissoras da doença no território nacional (JOHNSON; DE SOUZA; FERREIRA, 1999).

2.1.2 TRIBO AKODONTINI

Dentre os sigmodontíneos destaca-se a tribo Akodontini - uma das mais numerosas com aproximadamente 35% do total da diversidade da subfamília sigmodontinae composta por cerca de 81 espécies (MUSSER; CARLETON, 2005).

A Tribo apresenta ampla distribuição geográfica, sendo que a maior parte de seus gêneros e espécies estão concentrados nas regiões mais centrais da Cordilheira dos Andes, que é proposta como sendo a área original de diferenciação dos Akodontinos (REIG 1984, 1987). Muitos autores sugerem que esta Tribo seja monofilética e evolutivamente derivada de um estoque orizomino primitivo (GARDNER; PATTON, 1976; BIANCHI *et al.*, 1971; REIG 1977, 1984).

Neste grupo destaca-se a grande variabilidade cariotípica podendo ser encontrado indivíduos apresentando número diplóide $2n=10$ no gênero *Akodon* até $2n=54$ no gênero *Oxymycterus* e número de braços dos cromossomos autossômicos com variação $NA= 14- 16$ (*Akodon*) a $NA= 60-64$ (*Oxymycterus*). Essa variabilidade justifica-se pela existência de rearranjos cromossômicos. Algumas espécies exemplificam a presença de rearranjos em seus cariótipos como *Akodon cursor* que devido a inversão pericêntrica e um rearranjo complexo apresenta cariótipo que varia de $2n=14,15$ e 16 ; alguns indivíduos de *Akodon montensis* apresentam cromossomo B em seu cariótipo, em *Deltamys kempfi* existe a presença de fusões cêntricas e um sistema cromossômico múltiplo de determinação sexual, e em *Scapteromys* a presença de fusões cêntricas. Estas características levam a problemas taxonômicos, dificultando no estabelecimento de uma classificação dessas espécies de roedores (SBALQUEIRO, 1989).

2.1.3. GÊNERO *SCAPTEROMYS*

Distribuem-se por regiões da Bacia do Rio Paraná incluindo o leste da Argentina, Uruguai e sul do Paraguai e Brasil. Os indivíduos do gênero *Scapteromys* apresentam tamanho mediano e cauda pouco menor que o corpo. Sua coloração na região dorsal varia do marrom claro ao cinza claro e a ventral do cinza claro ao esbranquiçado. Suas orelhas são cobertas por pêlos. Seu hábito é terrestre e semi-aquático. Habitam áreas próximas a cursos d'água, sendo por isso conhecidos como “ratos-do-pântano”. Seu período de atividade é noturno e se alimentam principalmente de oligoquetos e insetos. (D'ELIA; PARDIÑAS, 2004; OLIVEIRA; BONVICINO, 2006).



Figura 10. *Scapteromys* (Foto de Ives Sbalqueiro)

O gênero apresenta quatro diferentes citótipos: $2n = 32$ na Argentina e Paraguai, $2n = 24$ no Uruguai e Brasil, $2n = 34$ e $2n = 36$ ocorrendo apenas no Brasil (BRUM, 1965; BRUM *et al.* 1972; FRONZA; WAINBERG; LLORENTE, 1976; FREITAS; MATTEVI; OLIVEIRA, 1984; BRUM *et al.*, 1986; ANDRADES-MIRANDA, 1999; D'ELIA; PARDIÑAS, 2004; RABELO *et al.*, 2008). O número de braços autossômicos em todos os citótipos é igual a 40, sendo sugerido por Freitas *et al.* (1984) que a variação se deve a uma série de eventos de fissão-fusão cêntrica. Através da comparação dos padrões de banda G, foi sugerido que esses mecanismos tenham atuado na evolução cariotípica do táxon.

Nos mesmos citótipos são observadas até seis marcações de RONS (regiões organizadoras de nucléolos) nos autossomos, além do par sexual (FREITAS; MATTEVI; OLIVIERA, 1984; ANDRADES-MIRANDA *et al.*, 1999).

Foram encontradas RONS apenas no citótipo $2n = 24$, em número de quatro (FREITAS *et al.*, 1984). Andrades-Miranda *et al.* (1999) descreve a ocorrência de marcações de RONS no par sexual e em seis cromossomos autossomos nos citótipos $2n = 24$ e $2n = 34$, sem no entanto especificar os pares.

Numa revisão recente, as populações uruguaias de *Scapteromys* foram assinaladas na espécie *S. tumidus* e as argentinas e paraguaias *S. aquaticus*, levando em conta diferenças na morfologia craniana e análise da sequência de DNA do gene mitocondrial citocromo B (D'ELIA; PARDIÑAS, 2004). As populações brasileiras permanecem sem um estudo sistemático mais aprofundado. É sugerido que provavelmente se trate de espécies distintas, devido às diferenças citogenéticas apresentadas e à morfologia (FREITAS; MATTEVI; OLIVEIRA, 1984).

2.2 ALTERAÇÃO NA ESTRUTURA E NO NÚMERO CROMOSSÔMICO

2.2.1 CONSIDERAÇÕES CITOGENÉTICAS

Nas ordens de mamíferos a diversidade cariotípica é bem acentuada, principalmente na variação do número cromossômico que pode ser desde 6 e 7 em *Muntiacus muntjak* até 102 em *Tympanoctomys barrerae* (WURSTER e BENIRSCHKE, 1970; CONTRERAS *et al.*, 1990). As diferenças existentes entre os cariótipos de diferentes espécies, e as diferenças entre indivíduos da mesma espécie (espécies cromossomicamente polimórficas), dependem de rearranjos cromossômicos que ocorreram em um passado remoto ou em um mais recente.

A especiação por alopatria, divergência gênica cumulativa seguida de isolamento geográfico, segundo Mayr (1969, 1977) seria o modo pelo qual as alterações genômicas se fixariam e dariam origem a novas espécies.

King (1993) considera que os principais rearranjos envolvidos nos processos de isolamento reprodutivo tendo como consequência a especiação, podem ser classificados em: mudanças com heterose potencialmente negativa (fusões em tandem, translocações e inversões) e mudanças adaptativas ou neutras (adição ou deleção de heterocromatina e polimorfismos cromossômicos).

Os rearranjos cromossômicos podem envolver um ou mais cromossomos ao mesmo tempo, e parecem depender de dois fatores: quebra cromossômica e ligação do segmento de forma diferente da posição original.

Para White (1968), o polimorfismo cromossômico surgido em uma população pequena e isolada, é resultante do cruzamento de um indivíduo alterado cromossomicamente com um indivíduo sem alteração.

Seguindo o modelo acima, Wilson *et al.* (1975) e Bush *et al.* (1977) sugerem que os roedores através da alta reprodutividade, baixa mobilidade e ocupação de nichos restritos seriam privilegiados por este processo.

2.2.2 ALTERAÇÕES NA ESTRUTURA DOS CROMOSSOMOS DE ROEDORES E SUAS IMPLICAÇÕES EVOLUTIVAS

De acordo com os autores relacionados, os rearranjos cromossômicos podem levar a especiação, tendo por isso papel importante no processo evolutivo dos roedores. Os rearranjos que estariam envolvidos nesse processo seriam principalmente: as inversões, translocações, fusões-fissões cêntricas e fusões em tandem.

2.2.3 INVERSÕES

Nesse tipo de rearranjo, o segmento cromossômico intersticial resultante de duas quebras une-se ao restante do cromossomo de uma maneira invertida. Caso este segmento inclua o centrômero - inversão pericêntrica - poderão ocorrer alterações na morfologia do cromossomo, podendo ou não alterar o número de braços. No caso contrário - inversão paracêntrica - a forma do cromossomo permanece sem alteração, o mesmo acontece com o número de braços. Nestes dois casos o padrão das bandas cromossômicas será modificado.

Em alguns grupos de roedores as inversões pericêntricas parecem ter tido importante papel no mecanismo de evolução cromossômica, como é o caso da espécie *Oryzomys albigularis*, estudada em bandeamento G, que apresenta $2n = 66$ e $NA = 86$ a 100, onde foram observadas inversões em sete pares cromossômicos (AGUILERA *et al.*, 1995).

GEISE *et al.* (1998), estudando comparativamente cariótipos de *Akodon cursor* provenientes de diferentes localidades do Brasil, verificaram que 39 espécimens de *Akodon cursor* com $2n = 14$, mostravam uma variação no NA, de 18 a 21 braços cromossômicos, decorrente de inversões pericêntricas nos pares cromossômicos 2 e 3, já evidenciados por SBALQUEIRO; NASCIMENTO (1996) em exemplares do Estado do Paraná.

2.2.4 TRANSLOCAÇÕES

A translocação é a transferência de um segmento de um cromossomo para outro não-homólogo, existindo diferentes tipos.

2.2.4.1 TRANSLOCAÇÕES RECÍPROCAS E NÃO-RECÍPROCAS

A translocação pode ser não recíproca, quando um segmento de um dos cromossomos é translocado para outro e pode ser recíproca quando dois cromossomos trocam partes entre si. Em algumas translocações não recíprocas, pode ou não ocorrer redução no número de cromossomos de acordo com o tamanho do segmento transferido, se o segmento restante for acrocêntrico ou de tamanho muito pequeno, ele é perdido em divisões celulares posteriores.

Em translocações recíprocas a meiose de heterozigotos apresenta a formação de agrupamentos em anéis, estes dependendo da orientação do centrômero durante a anáfase I, poderão ou não provocar a diminuição da fertilidade do híbrido WHITE (1973).

Sbalqueiro *et al.*, (1984) descreveram a ocorrência de um mecanismo de determinação sexual do tipo $X_1 X_1 X_2 X_2 / X_1 X_2 Y$ em *Deltamys kempi*, decorrente de uma translocação Y-autossomo, resultando em machos com $2n=37$ e $NA=38$ em indivíduos do Brasil e Argentina, existindo também duas fusões cêntricas que resultam em machos com $2n=35$ e 36 devido a formação de cromossomos translocados $t(2,3)$ e $t(9,15)$.

2.2.4.2 FUSÕES E FISSÕES CÊNTRICAS

Fusão cêntrica caracteriza-se pela união de dois cromossomos acrocêntricos ou telocêntrico em suas regiões centroméricas, sendo conhecida como translocação robertsoniana. Ao passo que a fissão consiste em uma quebra na região centromérica de um cromossomo de dois braços, originando dois cromossomos telocêntricos. Com esses rearranjos a fertilidade dos heterozigotos pode ser afetada, caso sejam originados gametas aneuplóides como consequência de disjunção na segregação meiótica (GUERRA, 1988).

A presença ou não de gametas aneuplóides depende do tamanho relativo dos cromossomos envolvidos e do número e posição dos quiasmas (WHITE, 1973). Liascovich et al. (1990), relatam a ocorrência de três fusões cêntricas na espécie *Akodon simulator simulator*, $2n= 38, 39, 40, 41$ e 42 , que foram identificadas através de G, exemplificando um novo polimorfismo robertsoniano.

A fusão em *tandem*, um tipo de translocação não recíproca, está diretamente relacionada à evolução cariotípica de várias espécies, como ocorre em *Nectomys squamipes*, cariótipo básicos $2n=52$ e 56 , onde foram identificadas através de bandas C, G e R, duas fusões em tandem envolvendo quatro pares de autossomos (YONENAGA – YASSUDA *et al.*, 1988; ZANCHIN, 1988)

3 OBJETIVOS GERAIS

Considerando-se os problemas de classificação e incertezas em relação ao grupo *Scapteromys*, estudos citogenéticos foram realizadas com o objetivo de elucidar os problemas taxonômicos e evolutivos do gênero.

3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Caracterizar citogeneticamente, através de coloração comum e bandeamentos (banda C, G e NOR) o *Scapteromys sp.* ocorrente no Estado do Paraná;

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Foram realizadas coletas de 20 espécimens de *Scapetromys* em Araucária, São José dos Pinhais e São Matheus do Sul no estado do Paraná, sendo tombados no Museu de História Natural Capão da Imbuia (MHNCI) da Universidade Federal do Paraná. Utilizando licença :

4.1 PREPARAÇÃO DIRETA DA MEDULA ÓSSEA

Em laboratório os animais capturados foram submetido a uma preparação direta da medula óssea, seguindo Ford e Hamerton (1956), com modificações (SBALQUEIRO e NASCIMENTO, 1996). Primeiramente foi injetado intraperitonealmente, 1ml de solução de colchicina à 0,1% para cada 100g de peso animal. Após verificação da morte do animal foram anotadas características corporais como peso, comprimento total e comprimento da cauda, tamanho interno e externo da orelha, comprimento das patas anterior e posterior.

Ao final das anotações, foi feita uma abertura abdominal onde foi confirmado o sexo dos exemplares através da visualização de suas gônadas: testículos ou ovários. Em seguida, foram removidos os fêmures, cortando suas epífises. Com uma seringa, contendo solução hipotônica (KCL 0,075M), foi transferido o material da medula diretamente a um tubo de centrifuga. A seguir, o material foi ressuspensionado e mantido em uma temperatura de 37° C por 20 minutos.

O material a seguir foi centrifugado a 800 rpm por 10 minutos sendo removido em seguida o sobrenadante. Foi ressuspensionado o precipitado e adicionado lentamente o fixador ácido-alcoólico (3 metanol : 1 ácido acético), que é preparado no momento da utilização.

4.2. PREPARAÇÃO DAS LÂMINAS

As lâminas utilizadas foram higienizadas primeiramente com detergente neutro, água corrente e água destilada. Em seguida foram fervidas em água destilada, sendo armazenadas em geladeira imersas em álcool absoluto.

Na preparação da lâmina, duas gotas do material obtido na preparação citológica (preparação direta da medula óssea), na lâmina.

4.3 TÉCNICAS DE BANDEAMENTO

4.3.1 COLORAÇÃO CONVENCIONAL

As lâminas montadas foram coradas com Giemsa, diluído em tampão fosfato pH 6,8 a 5%, por um período de 8 minutos, à temperatura ambiente. Em seguida, lavadas em água corrente e, após secarem, observadas ao microscópio e analisadas.

4.3.2. BANDEAMENTO C

O bandeamento C permite a visualização de regiões de heterocromatina constitutiva, usando para isso bário e Giemsa. Foi seguido o protocolo descrito em SUMNER (1972) com modificações realizadas no Laboratório de Citogenética Animal -UFPR

- A lâmina pode ser preparada no dia ou envelhecida por três dias a 40°C.
- Passar em 0,2N HCl a 43-45°C por 2 minutos.
- Lavar em H₂O destilada e secar.
- Mergulhar em solução de bário 5% a 43-45°C por 15 segundos, sendo que esse tempo pode ser aumentado ou diminuído conforme os resultados obtidos.
- Passar em 0,2N HCl a 43-45°C por 2 minutos.
- Lavar bem, com jatos de H₂O destilada.
- Mergulhar em solução salina 2SSC pH 7,0 a 60-65°C por 15 minutos.
- Lavar em água destilada e corar conforme protocolo de coloração convencional.

4.3.3. BANDEAMENTO G

Este procedimento evidencia bandas claras e escuras nos cromossomos, utilizando tripsina e Giemsa, o que permite o correto pareamento deles. A técnica

de banda G foi empregada conforme SEABRIGHT (1971), modificada em SBALQUEIRO (1989):

- Preparar as lâminas e envelhecer por 3-4 dias em estufa a 40°C.
- Incubar as lâminas em tampão fosfato pH 6,8 por 2 minutos.
- Incubar em solução de tripsina a 0,03% dissolvida em tampão fosfato pH 6,8 ou solução de Hanks por 30 segundos. Esse tempo pode ser aumentado ou diminuído conforme os resultados obtidos.
- Lavar rapidamente em água destilada, álcool absoluto e água destilada.
- Incubar em tampão fosfato pH 6,8 por 1 minuto.
- Corar com Giemsa (tamponado em pH 6,8) a 2,5% por 5 minutos.
- Lavar em água filtrada, esperar secar e observar ao microscópio.

4.3.4 BANDEAMENTO NOR

Esta técnica permite a observação das regiões organizadoras de nucléolo e evidenciação do complexo sinaptonêmico em material de meiose. Foi seguido o protocolo descrito por HOWELL e BLACK (1980), com modificações de SBALQUEIRO (1989):

- Preparar as lâminas e envelhecer por no mínimo 4 dias a 40°C.
- Incubar as lâminas em tampão borato pH 9,2 de 5 a 10 minutos.
- Lavar em água destilada e secar ao ar.
- Colocar sobre a lâmina duas gotas de solução coloidal (0,25g de gelatina + 5 ml de água bidestilada aquecida + 0,2 ml de ácido fórmico), mais quatro gotas de solução de prata a 50% (1g de prata + 2 ml de água bidestilada + duas gotas de formalina).
- Homogeneizar as soluções com uma pipeta Pasteur.
- Cobrir com lamínula, colocar a lâmina numa câmara úmida (pode ser uma placa de Petri com papel filtro umedecido), mantendo em estufa a 70°C até atingir uma coloração castanho-dourada (cerca de 8 minutos).
- Lavar em água destilada, descartando a lamínula.
- Corar com Giemsa (tamponado em pH 6,8) a 2% por 1 minuto, lavar, secar ao ar e observar ao microscópio.

4.3.5 CAPTURA DE IMAGENS

De cada uma das colorações foram selecionadas e capturadas as três melhores metáfases para montagem dos cariogramas com a utilização do fotomicroscópio Zeiss-Axiophot.

5. RESULTADOS

Foram realizadas coletas de 20 indivíduos do gênero de *Scapteromys* no Estado do Paraná..

5.1 CARACTERIZAÇÃO CITOGENÉTICA

5.1.1 COLORAÇÃO CONVENCIONAL

No presente trabalho foi analisado em coloração comum, o $2n$ e NA de um macho de *Scapteromys*. Apresenta cariótipo com $2n=36$ e $NA=42$ (Figura 13), sendo composto por 17 pares autossômicos mais o par sexual XY. Os pares 1 e 2 são acrocêntricos grandes, o par 3 metacêntrico grande, o par 4 submetacêntrico grande, os pares 5, 6, 7 e 8 acrocêntricos médios, os pares 9 e 10 metacêntricos pequenos e os pares 11, 12, 13, 14, 15 e 16 acrocêntricos pequenos. O X é um acrocêntrico de tamanho similar aos pares autossômicos 6 e 7 e o Y é o menor cromossomo acrocêntrico.

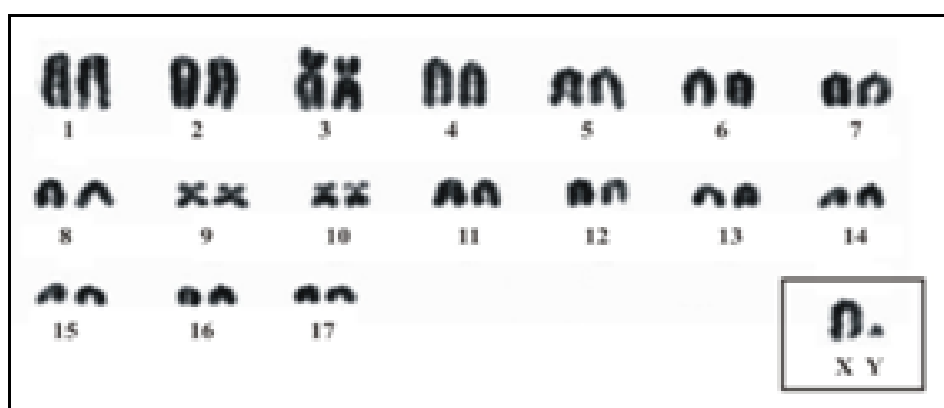


Figura 11. Cariótipo em coloração convencional de *Scapteromys* macho ($2n=36$ e $NA=42$)

5.1.2 BANDEAMENTO G

Através do bandejamento G (Figura 13) foi possível identificar e parear corretamente todos os cromossomos, assim como verificar uma inversão pericêntrica no cromossomo do par 2

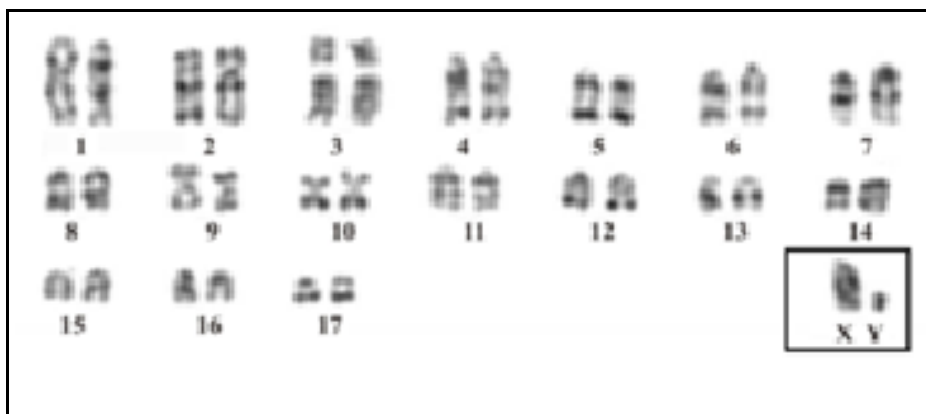


Figura 12. Cariótipo em bandejamento G de *Scapteromys* macho ($2n=36$ e $NA=42$), inversão pericêntrica no cromossomo do par 2.

5.1.3 BANDEAMENTO C

A aplicação do bandejamento C revelou uma distribuição de heterocromatina constitutiva restrita a região pericentromérica do par 10 e do cromossomo X e ao cromossomo Y.

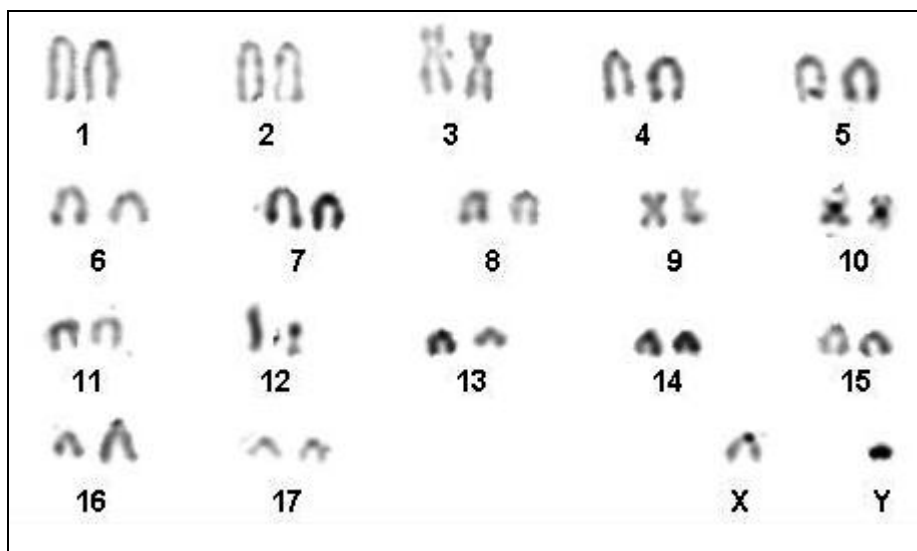


Figura 13. Cariótipo em bandeamento C de *Scapteromys* macho ($2n=36$ e $NA=42$)

5.1.4 BANDEAMENTO NOR

Em bandeamento NOR, foram evidenciadas marcações nos pares 3, 8 e no cromossomo X (Figura 16). A número de RONS observadas variou de zero a seis: na região pericentromérica do par 3 e do X e na porção distal do braço longo do par 4.

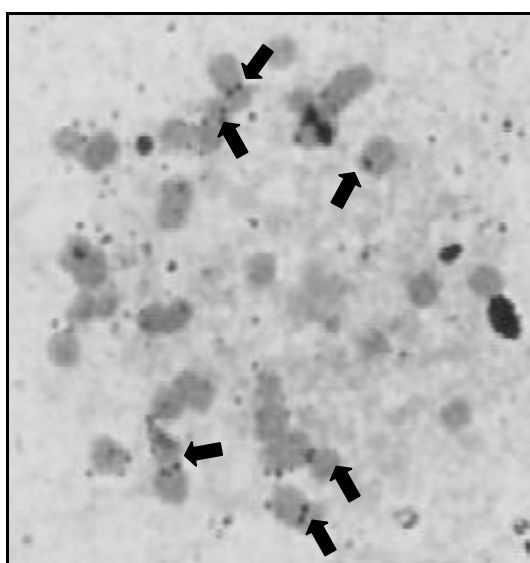


Figura 14. Metáfase de *Scapteromys* em bandeamento NOR, flechas indicam marcações nos pares 3, 8 e no cromossomo X.

TABELA 4. MARCAÇÕES OBSERVADAS EM BANDA NOR POR METÁFASE, COM SEUS RESPECTIVOS PARES MARCADOS

Protocolo	Células analisadas	Par 3			Par 9			X		Y	
		0	1	2	0	1	2	0	1	0	1
P1007	25	0	5	20	2	10	13	11	14	15	10
P1036	25	0	2	23	4	14	7	8	17	18	7
Total	50	0	7	43	6	24	20	19	31	33	17

TABELA 5. NÚMERO DE MARCAÇÕES POR CÉLULAS

Marcação	0	1	2	3	4	5	6
Protocolo							
P1007	7	0	1	4	12	6	0
P1036	5	0	2	4	10	8	1
Total	12	0	3	8	22	14	1

6. DISCUSSÃO

Como abordado anteriormente no presente trabalho, existe uma grande discussão quanto à classificação taxonômica do gênero *Scapteromys*, onde o impasse taxonômico do gênero acarretou mudanças constantes em sua classificação.

Fitzinger (1867) foi o primeiro em estabelecer *Scapteromys* como um gênero, porém nos anos seguintes poucos autores adotaram tal classificação, sendo usado o nome *Hesperomys* (Thomas, 1884) classificando-o como subgênero. Em seu trabalho Thomas (1917) refere-se aos espécimes coletados na Argentina como *S. tomentosus* com a observação de que os espécimes diferiam de *S. tumidus* apenas na cor. Três anos mais tarde, Thomas (1920) retificou sua classificação anterior e o reclassificou como *S. aquaticus*. Nas quatro décadas seguintes, poucas referências à nova espécie em trabalhos taxonômicos surgiram. Massoia e Fornes (1964) foram os autores que mais contribuíram para a taxonomia

do gênero, com base em análises de morfometria do crânio, dentes e morfologia externa entre as populações da Argentina e Uruguai, conseguindo estabelecer uma comparação entre *S. tumidus* e *S. aquaticus*. Constatou-se que a principal diferença é limitada à forma da sutura frontoparietal e a largura da fossa mesoptergóide. Estes autores também mencionaram que os indivíduos de *S. tumidus* são acastanhadas e parecem ser um pouco maiores do que as de *S. aquaticus*, que são enegrecidas. Ao serem relatados indivíduos com fenótipos intermediários os autores consideraram essas espécies como subespécies do gênero. Assim, *S. t. tumidus* é distribuída entre Uruguai e *S. t. aquaticus* teria uma distribuição na Argentina, a nordeste de Buenos Aires e no sul da província de Entre Rios. No entanto, um registro isolado da província de Santa Fé, começou a preencher esta lacuna geográfica (CONTRERAS, 1966). Posteriormente, Myers e Wetzel (1979) relataram espécimes provenientes do Paraguai. Como pode-se notar a classificação taxonômica de Massoia e Fornes (1964) relacionada com sua distribuição geográfica não tornou-se absoluta.

Para Hershkovitz (1966) o gênero apresentava apenas a espécie *S. tumidus* sem qualquer divisão interna.

No presente trabalho os achados citogenéticos descritos coincidem com os observados por Freitas *et al.* (1984), no qual ele descreve o cariótipo de indivíduos de Piraquara – PR ($2n = 36$). Neste trabalho os autores comparam os citótipos $2n = 24$, 32 e 36 e observam, através do bandeamento G, uma completa correspondência entre os braços longos deles. Sugere-se que translocações Robertsonianas seriam o principal mecanismo responsável pela redução no número diplóide, e destaca-se a distribuição restrita de heterocromatina constitutiva, contrariando-se a idéia de que esta favorece a evolução cariotípica. Com base nessas análises cariotípicas pode-se acreditar existir mais de uma espécie de *Scapteromys* no Brasil, com *Scapteromys aquaticus* sendo restrito à região sul do país.

O cromossomo X dos espécimes coletados no Brasil por Freitas *et al.* (1984) apresenta morfologia acrocêntrica de tamanho médio, o mesmo padrão encontrado no presente trabalho, enquanto que os coletados em Punta Lara (Argentina) apresentaram morfologia variando entre acrocêntrico e submetacêntrico

em um espécime feminino, e acrocêntrico em outras fêmeas (Fronza *et. al.* 1976), corroborando com a hipótese de mais de uma espécie do gênero.

Em Andrades-Miranda *et al.* (1994) compara-se os cariótipos de *Scapteromys* ($2n = 34$ e $2n = 24$) e *Kunsia* ($2n = 44$) utilizando-se diversas técnicas de coloração, enzimas de restrição e hibridização *in situ* com fluorescência. Apesar da afinidade entre os gêneros apontada por técnicas moleculares, não foram encontradas homeologias em bandeamento G e nos padrões gerados pela aplicação das enzimas de restrição. Apesar da aparente semelhança entre os diversos citótipos de *Scapteromys* em bandeamento G, até agora não foram encontrados híbridos entre eles, mesmo em locais onde ocorrem em simpatria. Pode-se inferir a partir disto que os rearranjos observados possam estar atuando como barreiras reprodutivas pós-zigóticas, tornando híbridos inviáveis.

A grande maioria das espécies de roedores neotropicais apresentam ainda controvérsia quanto sua classificação, sendo que a maior contribuição para o entendimento filogenético e evolutivo dos roedores neotropicais, através da análise detalhada dos cromossomos, deu-se por intermédio de estudos comparativos em bandas C, G e NOR (BAKER; KOOP; HAIDUK, 1983; SBALQUEIRO, 1989; ESPINOSA; REIG, 1991; GEISE; CANAVEZ; SEUÁNEZ, 1998; MARTINO; FILIPPUCCI; CAPANNA, 2002).

Em um estudo de D'Elia *et. al.* (2004) basearam-se nos caracteres morfológicos e sequência do DNA mitocondrial do gene do citocromo b de 47 espécies do gênero de 16 populações da Argentina, Paraguai e Uruguai. Propuseram a separação do gênero *Scapteromys* em duas espécies distintas, uma formado pelas espécies da Argentina, Paraguai e oeste do Uruguai, e outra com as populações restantes do Uruguai, sendo ainda necessários estudos para esclarecer a classificação das populações brasileiras do gênero.

Bonvicino *et. al.* (2013) analisando as diferenças cariotípicas do gênero ($2n = 24, 32, 34, 36$, todos com $NF = 40$, resultantes de sucessivas fusões cêntricas) em indivíduos coletados em quatro localidades: Brasil, Paraguai, Uruguai e Argentina, sugere fortemente que *S. tumidus* possa constituir um táxon complexo. Foram analisados dois genes nucleares (RAG2 e GHR) e um mitocondrial (citocromo b) sendo possível observar a presença de diversos clados, com forte estruturação das populações e dos citótipos, concluindo assim que o gênero

Scapteromys parece ser um táxon complexo, englobando pelo menos quatro espécies plenas as quais mostram relações claras com seus padrões cromossômicos, sugerindo que este tenha sido um mecanismo fortemente associado com sua cladogênese. Nesse trabalho, a análise filogenética confirmou o monofiletismo de *Scapteromys*, agrupando os haplótipos de Paraguai, Argentina, Uruguai e Brasil, não havendo uma estrutura geográfica devido ao tipo de rede obtida que é o tipo estrela. A rede mostrou o haplótipo mais freqüente do Brasil em uma posição central, estando conectado diretamente com haplótipos do Paraguai e Argentina enquanto que hapótipo do Uruguai foi ligado em um outro haplótipo do Brasil que conecta-se a esse haplótipo central. Com base nesse haplótipo central, conclui-se que este é o mais ancestral, havendo baixa diferenciação entre as localidades.

Barreiras geográficas, como o rio Uruguai, entre as populações da Argentina e Brasil poderia estar associada com o alto nível de diferenciação genético, porém o efeito deste rio como único promotor de divergência genética não foi observada para *S. aquaticus*. O mesmo padrão foi relatado entre as populações da Argentina e Uruguai por D'Elia & Pardiñas (2004). Este cenário demonstrou um baixo nível de diversidade nessas populações sugerindo uma recente história da expansão populacional sem a influência do rio. Com base nas análises de Bonvicino *et. al.*, juntamente com os cariótipos estabelecidos para a população brasileira de *Scapteromys*, existem quatro cariomorfotipos no país, que correspondem às duas espécies já conhecidas de *Scapteromys* e duas ainda não identificadas. Estes dados indicam que a diversidade real do gênero é subestimada e estudos multidisciplinares são necessários para compreender a estruturação desse gênero.

7. CONCLUSÃO

Conclui-se no presente trabalho que:

1. O cariótipo apresentado do gênero *Scapteromys* ($2n=36$, $NF=42$) apresenta 17 pares autossômicos, sendo 14 pares acrocêntricos, 3 metacêntricos e os cromossomos sexuais X e Y acrocêntricos;
2. A presença da heterocromatina evidenciada por banda C é restrita ao par de autossomo 10 e ao par sexual;
3. A marcação de NOR ocorreu nos pares 3, 8 e X. Esses dados coincidem com os já apresentados em pesquisas anteriores para esse gênero, corroborando a hipótese de que o gênero apresenta não mais que 3 espécies no Brasil.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUILERA, M.; PEREZZAPATA, A.; MARTINO, A. Cytogenetics and karyosystematics of *Oryzomys albigularis* (Rodentia, Cricetidae) from Venezuela. **Cytogenet. Cell. Genet.** v. 69, p. 44-49, 1995.

ÁRNASON, Ú.; GULLBERG, A.; JANKE, A.; KULLBERG, M. 2007 Mitogenomic analyses of caniform relationships. **Mol. Phylogenet. Evol.** v. 45, p.863–874, 2007.

ANDERSON, S.; JONES JR., J. K. Recent Mammals of the world. A synopsis of families. 1967. **The Ronald press Company**, p. 3 –11.

ANDRADES-MIRANDA, J. **Investigação sobre a natureza do genoma de *Scapteromys tumidus* (Rodentia, Cricetidae)**. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular). Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Rio Grande do Sul, 1994.

ANDRADES-MIRANDA, J.; NUNES, A.P.; OLIVEIRA, L.F.B.; MATTEVI, M.S. The karyotype of the South American rodent *Kansia tomentosus* (Lichtenstein, 1830). **Cytobios.** v. 98, p. 137-147, 1999.

BARROS, D. M., M. L. LORINI, AND V. G. PERSSON. Dioctophymosis in the little grison (*Galictis cuja*). **Journal of Wildlife Diseases.** Kansas. 1990. p. 538–539.

BAKER, R. J.; KOOP, B. F.; HAIDUK, M. W. **Resolving systematic relationships with G-bands: A study of five genera of South American cricetine rodents.** Systematic Zoology. v. 32. p.403-416. 1983.

BERGALO, H. G.; ROCHA, C. F. D.; ALVES, M. A. S.; VAN SLUYS, M. **A fauna ameaçada de extinção do Estado do Rio de Janeiro.** Rio de Janeiro: Editora UERJ, 2000, 166 p.

BIANCHI, N. O.; REIG, O. A.; MOLINA, O. J. Cytogenetics of the South American Akodont rodents (Cricetidae). I. A progress report of Argentinian and Venezuelan forms. **Evolution**, v. 25, p.724-736, 1971.

BININDA-EMONDS, O.R.P.; GITTLEMAN, J.L.; PURVIS, A. **Building large trees by combining phylogenetic information: a complete phylogeny of the extant Carnivora (Mammalia).** Biological Reviews. v.74. n.2. p. 143-175.1999.

BIKNEVICIUS, A. R.; VAN VALKENBURG, B. Design for killing: craniodental adaptations.. Carnivore behavior, ecology and evolution. In: **GITTLEMAN, J. L.** v. 2. New York: Cornell University Press, 1996. p. 393-428.

BONVICINO, C.; FERNANDES, F. A.; VIANA, M.C.; TEIXEIRA, B. R.; D'ANDREA, P. S. **Scapteromys aquaticus (Rodentia: Sigmodontinae) in Brazil with comments on karyotype and phylogenetics relationships.** ZOOLOGIA. v. 30. p. 242–247. 2013.

BRYANT, H. N.; RUSSELL, A. P.; FITCH, W. D.. Phylogenetic relationships within the extant Mustelidae (Carnivora): appraisal of the cladistic status of the Simpsonian subfamilies. **Zoological Journal of the Linnean Society.** 1993. p. 301-334.

BRUM, N. **Investigaciones citogenéticas sobre algunas especies de Cricetidae (Rodentia) del Uruguay.**In: II Congresso LatinoAmericano de Zoologia. 1965.

BRUM, N.; LAFUENTE, N; KIBLISKY, P. Cytogenetic studies in the cricetid rodent *Scapteromys tumidus* (Rodentia-Cricetidae). **Specialia.** v.28. p. 1373. 1972.

BRUM, N.; OLIVER, G.; GENTILE DE FRONZA, T.; WAINBERG, R. Karyological studies of South American rodents (Rodentia: Cricetidae). **Caryologia.** v. 39. p. 131–142, 1986.

BUSH, G. L.; CASE, S. M.; WILSON, A. C. e PATTON, J. L. Rapid speciation and chromosomal evolution in mammals. **Proc. Nat. Acad. Sci, USA,** v. 74, p. 394, 1977.

CÂMARA, T.; MURTA, R. Mamíferos da Serra do Cipó. Belo Horizonte: Editora PUC-Minas/Museu de Ciências Naturais, 2003, 129 p.

CAMIN, J. H. ; SOKAL, R. R. A method for deducing branching sequences in phylogeny. **Evolution** , v.19, p. 311-26, 1965.

CARLETON, M.D.; MUSSER, G.G. **Order Rodentia, Mammal Species of the World: A Taxonomic and Geographic Reference.** Johns Hopkins University Press, Baltimore, 3rd ed. p. 745-752. 2005.

CARVALHO, C. T. **Lista nominal dos mamíferos brasileiros.** Boletim Técnico do Instituto Florestal de São Paulo. v. 37. São Paulo: 1983, p. 31-115.

CGOW (COMPARATIVE GENOME ORGANIZATION OF VERTEBRATES: FIRST INTERNATIONAL WORKSHOP). **Mamm Genome**, v. 7, p. 717-734, 1996.

CITES - **Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora**. CITES species database. 2006.

COLBERT, E.H. Rodents and Rabbits. In: **Evolution of vertebrates: a history of the backboned animals through time**. 2. ed. New York, John Wiley and Sons, p. 321-334. 1969.

COUTURIER, J.; DUTRILLAUX, B. **Évolution chromosomique chez les carnivores**. *Mammalia*. v.50. p.124-162. 1986.

COX, C. B.; MOORE, P. D. Biogeography: an ecological and evolutionary approach. 5 ed. **USA: Blackwell Science**, 326p. 1993.

D'ELIA G. **Phylogenetics of Sigmodontinae (Rodentia, Muroidea, Cricetidae), with special reference to the akodont group, and with additional comments on historical biogeography**. *Cladistics*: 19, 307–323. 2003.

D'ELÍA, G.; PARDIÑAS, U.F.J. Systematics of Argentinean, Paraguayan, and Uruguayan swamp rats of the genus *Scapteromys* (Rodentia, Cricetidae, Sigmodontinae). **Journal of Mammalogy**. p. 897–910,. 2004.

D'ELÍA, G.; PARDIÑAS, U.F.J.; TETA, P.; PATTON, J.L. Definition and diagnosis of a new tribe of sigmodontine rodents (Cricetidae: Sigmodontinae), and a revised classification of the subfamily. **Gayana** . v.2 , p.187-194. 2007.

DIAS, L. C. S.; PIRES, F. D. A.; PINTO, A. C. W. Parasitological and ecological aspects of *Shistosomiasis mansoni* in the valley of the Paraíba do Sul river (São Paulo State, Brazil) : Natural infection of small mammals with *Schistosoma mansoni*. **Trans. Roy Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 72, p. 496-500, 1980.

DUTRILLAUX, B.; COUTURIER, J. **The ancestral karyotype of Carnivora: comparison with that of platyrrhinus monkeys**. *Cytogenet Cell Genet*. v. 35. p. 200–208. 1983.

DE PINNA, M. C. C. Concepts and tests of homology in the cladistic paradigm. **Cladistics** v.7, p. 367–394, 1991.

EISENBERG, J. F.; REDFORD, K. H. Mammals of the neotropics: the central neotropics (Ecuador, Peru, Bolivia, Brazil). **The University of Chicago Press**. Chicago and London:, v. 3,p. 609 . 1999.

ESPINOSA, M.B.; REIG, O.A. **Cytogenetics and karyosystematics of South American Oryzomyine rodents (Cricetidae, Sigmodontinae) III**. Banding karyotypes of Argentinian Oligoryzomys. *Zeitschrift für Säugetierkunde*. v.56. p.306-317.1991.

EIZIRIK, E.; MURPHY, W.J.; KOEPFLI, K.P.; JOHNSON, W.E.; DRAGOO, J.W.; WAYNE, R.K.; O'BRIEN, S.J. Pattern and timing of diversification of the mammalian order Carnivora inferred from multiple nuclear gene sequences. **Molecular Phylogenetics and Evolution**. v. 56, p. 49-63. 2010.

EMMONS, L. H.; FEER, F. Neotropical rainforest mammals: A field guide. Chicago: **The University of Chicago Press**, 2. ed. 307 p .1997.

ESCUTENAIRE, S.; CHALON, P.; VERHAGEN, R. **Spatial and temporal dynamics of Puumala hantavirus infection in reservoir vole (*Clethrionomys glareolus*) populations in Belgium**. *Virus Research*, v. 67, p. 91-107, 2000.

ESPÍRITO SANTO. **Diário Oficial – Vitória**, 16 de junho de 2005. Vitória. 2005.

EWER, R. F. The Carnivores. Ithaca, New York: **Cornell University Press**. 1973.

FARRIS, J. S. Methods for computing Wagner trees. v.19, p. 83-92, 1970.

FELDHAMER, G. A.; DRICKAMER, L. C.; VESSEY, S. H.; MERRIT, J. F. **Mammalogy: adaptation, diversity, and ecology**. Boston. In: WCB/McGraw-Hill. p. 563.1999.

FERGUSON-SMITH M.A.; YANG F.; O'BRIEN P.C.M. **Comparative mapping using chromosome sorting and painting**. *Journal ILAR*.p. 68-76.1998.

FERRIOLLI FILHO, F.; BARRETTO, M. P. **Estudios sobre reservatórios e vectores silvestres do *Trypanosoma cruzi*. XXXV—Infecção natural do furão**,

Galictis cuja furax (Thomas, 1907) pelo T. cruzi. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo. v. 11, p. 264–273. 1969.

FLYNN, J. J.; CROFT, D.A.; CHARRIER, R.; WYSS, A.R.; HÉRAILLI, G.; GARCIA, M. **New Mesotheriidae (Mammalia, Notoungulata, Typotheria), geochronology and tectonics of the Caragua area, northernmost Chile.** Journal of South American Earth Sciences. v. 19, p. 55-74. 2005.

FONSECA, G. A. B.; HERRMANN, G.; LEITE, Y. L. R.; MITTERMEIER, R. A.; RYLANDS, A. B.; PATTON, J. L. **Lista anotada dos mamíferos do Brasil.** Conservation International & Fundação Biodiversitas, v.4, p. 438 , 1996.

FORD, C.E. ; HAMERTON, J. L. **A cochicine hypotonic citrate squash sequence for mammalian chromosome.** Stain Tech. v. 31, p. 247-51, 1956.

FRANCO-DE-SÁ, J.F.O.; ROSAS, F.C.W.; FELDBERG, E. **Cytogenetic study of the giant otter Pteronura brasiliensis Zimmermann 1780 (Carnivora, Mustelidae, Lutrinae).** Genetics and Molecular Biology. v. 30. p. 1093-1096. 2007.

FREITAS, T.R.O., MATTEVI, M.S. ; OLIVEIRA, L.F.B. **Karyotype characterization of Lontra (Lutra longicaudis longicaudis, Mustelidae, Carnivora).** Mammalian Chromosomes Newsletter. v. 23. P.91-96. 1975.

FREITAS, T. R. O.; MATTEVI, M. S.; OLIVEIRA, L. F. B. **Unusual C-band in three karyotypically rearranged forms of Scapteromys (Rodentia, Cricetidae) from Brazil.** Cytogenetics and Cell Genetics. v. 38, p. 39–44,1984.

FITZINGER, L. J. 1867. **Versuch einer natürlichen Anordnung der Nagethiere (Rodentia).** Sitzungsberichte der Akademie der Wissenschaften in Wien. v. 16. p.157–168. 1867.

FROENICKE, L. **Origins of primate chromosomes-as delineated by Zoo-FISH and alignments of human and mouse draft genome sequences.** Cytogenet Genome Res., v. 108, p. 122-138, 2005.

FRONZA, T.; WAINBERG, R. L.; LLORENTE, B. E. **Polimorfismo del cromosoma X y significacion filogenetica del cariotipo de la “Rata acuatica” Scapteromys aquaticus (Rodentia, Cricetidae) de la ribera de Punta Lara (Argentina).** Mendeliana. v. 1, p. 41–48 ,1976.

FULTON T. L.; STROBECK, C. **Molecular phylogeny of the Arctoidea (Carnivora): effect of missing data on supertree and supermatrix analyses of multiple gene data sets.** Mol. Phylogenet. Evol. v.41, p.165–181. 2006

GARDNER, A.L.; PATTON, J.L. **Karyotypic variation in oryzomyine rodents (Cricetinae) with comments on chromosomal evolution in the neotropical cricetine complex.** Occas. Pap. Mus. Zool. v. 49, p. 1-48, 1976.

GEISE, L.; CANAVEZ, F. C.; SEUÁNEZ, H. N. **Comparative karyology in Akodon (Rodentia, Sigmodontinae) from Southeastern Brazil.** Heredity, v. 89, p. 158-163, 1998.

GIVINISH, T. J.; K. J. SYSTMA.. **Consistency, characters, and the likelihood of correct phylogenetic inference.** Mol. Phylog. Evol.v. 7, p. 320–330. 1997.

GRAY, J.W.; LANGLOIS, G.; CARRANO, A. **High resolution chromosome analysis: one or two parameter flow cytometry.** Chromosoma, v. 73, p.9-27, 1979.

GRAPHODATSKY, A.S.; VOLUBUEV, V.;; TERNOVSKY, D.; RADJABLI, S. **G-banding patterns of seven mustelid species (Mustelidae, Carnivora) in Russian.** Zool Zh . v.55. p.1704-1709. 1976.

GRAPHODATSKY, A.S.; YANG, F.; O'BRIEN, P.C.; SERDUKOVA, N.; MILNE, B.S.; TRIFONOV, V. **A comparative chromosome map of the Arctic fox, red fox and dog defined by chromosome painting and high resolution G-banding.** Chromosome Res. v. 8. p. 253–263. 2000.

GRAPHODATSKY, A.S.; YANG, F.; PERELMAN, P.; O'BRIEN, P.C.; SERDUKOVA, N.; MILNE, B.S. **Comparative molecular cytogenetic studies in the order Carnivora: mapping chromosomal rearrangements onto the phylogenetic tree.** Cytogenet Genome Res. v. 96. P 137-145. 2002.

GRAPHODATSKY, A.S.; PERELMAN, P.L.; SOKOLIVSKAYA, N. V.; BEKLEMISHEVA, V.R.; SERDUKOVA, N.A.; DOBIGNY, G. **Phylogenomics of the dog and fox family (Canidae, Carnivora) revealed by chromosome painting.** Chromosome Res. v. 16. p. 129–143. 2008.

GUERRA, M. **Introdução à Citogenética Geral.** Ed. Guanabara, Rio de Janeiro, 142 pp. 1988.

HARDING, L. E.; SMITH, F.A.. **Mustela or Vison? Evidence for the taxonomic status of the American mink and a distinct biogeographic radiation of American weasels.** *Molecular Phylogenetics and Evolution*. v. 52, p. 632-642. 2009

HASS, I .**Análise filogenética por pintura cromossômica multicolor, em roedores da tribo Akodontini (Rodentia, Cricetidae), ocorrentes na região sul do Brasil.** 188 f. Tese (Doutorado em Genética) - Departamento de Biologia, Universidade Federal do Paraná, Paraná, 2006.

HENNIG, W. Muscidae [Part, Lieferung 194]. **Die Fliegen der palaearktischen Region.** In Lindner. 1956. p.97-144.

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

HUNT JR.; R. M. **Biogeography of the Order Carnivora.** In: GITTLEMAN, J. L. *Carnivore behavior, ecology and evolution.* New York: Cornell University Press, 1996, p. 485-541.

INDRUSIAK, C.; EIZIRIK, E. Carnívoros. In: FONTANA, C. S.; BENCKE, G. A.; REIS, R. E. **Livro Vermelho da Fauna Ameaçada de Extinção no Rio Grande do Sul.** Porto Alegre , 2003, p. 507-533.

IUCN - **International Union for Conservation of Nature and Natural Resources.** IUCN Red List of Threatened Species. 2006.

JOHNSON, A. M.; DE SOUZA, L. T. M.; FERREIRA, I. B. et al. Genetic investigation of novel hantaviruses causing fatal HPS in Brazil. **Journal. Med. Virol.** v. 59, n. 4, p. 527- 535, 1999.

KAUFMANN, J. F.; KAUFMANN, A. **Observations of the behavior of tayras and grisons.** *Z.Säugetierk*, v. 30, p. 146-155, 1965,

KING, M. **Species Evolution: The Role of Chromosome Changes.** Cambridge, Cambridge University Press, 1993.

KLUGE, A. G. ; FARRIS, J. S. **Quantitative phyletics and the evolution of Anurans.** Syst. Zool. v. 18, p. 1-32, 1969.

KOEPFLI, K.P.; WAYNE, R.K. **Type I STS markers are more informative than cytochrome B in phylogenetic reconstruction of the Mustelidae (Mammalia: Carnivora).** Syst. Biol. v. 5, p. 571–93. 2003.

KOEPFLI, K. P.; GOMPPER, M. E.; EIZIRIK, E.; Ho, C. C.; LINDEN, L.; MALDONADO, J. E.; WAYNE, R. K. **Phylogeny of the Procyonidae (Mammalia : Carnivora): Molecules, morphology and the Great American Interchange.** Molecular Phylogenetics and Evolution, v. 43, p. 1076-1095.2007.

KOEPFLI, K. P.; DEERE, K. A.; SLATER, G. J.; BEGG, C.; BEGG, K.; GRASSMAN, L.; LUCHERINI M.; VERON, G.; WAYNE, R. K. **Multigene phylogeny of the Mustelidae: resolving relationships, tempo and biogeographic history of a mammalian adaptive radiation.** BMC Biol. 2008.

KUROSE, N.; MASUDA, R.; AOR, T.; WATANABE, S. **Karyological differentiation between two closely related mustelids, the Japanese weasel *Mustela itatsi* and the Siberian weasel *Mustela siberica*.** Caryologia. v. 53. p.269-275. 2000.

LEVAN, A.; FREDGA, K.; SANDBERG, A.A. **Nomenclature for centromeric position on chromossomes.** Hereditas, v.52. p.201-220.1964.

LIASCOVICH, R. C. **Multiple autossomal polymorphism in populations of *Akodon simulator simulator* (Thomas, 1916) from Tucuman, Argentina (Rodentia, Cricetidae).**Genetica. v. 180, p. 165-175, 1990.

LIM, B. K; ENGSTROM, M. D.; OCHOA, J. G. **Preliminary checklist of the mammals of the Guiana Shield (Venezuela: Amazonas, Bolívar, Delta Amacuro; Guyana; Surinam; French Guiana).** Smithsonian Institute.2006.

LOZADA, M.; GUTHMANN, N.; BACCALA, N. **Microhabitat selection of five sigmodontine rodents in a forest-steppe transition zone in northwestern Patagonia.** Studies on Neotropical Fauna and Enviroment, v. 35, n. 2, p. 85-90, 2000.

LÜDECKE, H.J.; SENGER, G.; CLAUSSEN, U.; HORTHEMKE, B. **Cloning defined regions of the human genome by microdissection of banded chromosomes and enzymatic amplification.** Nature, v. 338, p. 348-350, 1989.

MACGREGOR, H.C. **An Introduction to Animal Cytogenetics.** Chapman & Hall, London, 238 p. 1993.

MACHADO, A. B. M.; FONSECA, G. A. B.; MACHADO, R. B.; AGUIAR, L. M.; LINS, L. V. **Livro vermelho das espécies ameaçadas de extinção da fauna de Minas Gerais.** Belo Horizonte. Fundação Biodiversitas, 1998, p. 608 .

MACHADO, A. B. M.; MARTINS, C. S.; DRUMMOND, G. M. **Lista da fauna brasileira ameaçada de extinção: incluindo as espécies quase ameaçadas e deficientes em dados.** Belo Horizonte. Fundação Biodiversitas, 2005, p. 158 .

MARGARIDO, T. C. M.; BRAGA, F. G. **Mamíferos** In: MIKICH, S. B.; BÉRNILS, R. S. Livro Vermelho da Fauna Ameaçada no Estado do Paraná. Curitiba: Secretaria Estadual de Meio Ambiente, Instituto Ambiental do Paraná, 2004, p. 25-142.

MARTINO, A.M.G.; FILIPPUCCI, M.G.; CAPANNA, E. **Evolutionary pattern of Calomys hummelincki (Husson, 1960; Rodentia, Sigmodontinae) inferred from cytogenetic and allozymic data.** J. Neotropical Mammal., 9, 187-197. 2002.

MASSOIA, E.; FORNES, A. **Notas sobre el género Scapteromys (Rodentia-Cricetidae). I. Sistemática, distribución geográfica y rasgos etoecológicos de Scapteromys tumidus (Waterhouse).** Physis. v. 24. p.279–297. 1964.

MAYR, E. **Species, speciation and chromosomes.** In: BENIRSCHKE, K. ed. Comparative mammalian cytogenetics. Berlin, Springer-Verlag. p. 1-7, 1969.

MAYR, E. **Populações, espécies e evolução.** São Paulo, Ed. Universal. v. 5, 485p.,1977.

MELLO, D. A. **Estudos sobre o ciclo biológico de Holochilus brasiliensis (Cricetidae, Rodentia) em laboratório.** Bol. Mus. Paraense Emílio Goeldi, v. 2, n. 2, p. 181-192, 1986.

MIRANDA, E. E. **Natureza, conservação e cultura: ensaios sobre a relação do homem com a natureza no Brasil.** São Paulo. Metalivros, 2003, 180 p.

MURPHY, W.J.; MENOTTI-RAYMOND, M.; LYONS, L.A.; THOMPSON, M.A.; O'BRIEN, S.J. **Development of a Feline Whole Genome Radiation Hybrid Panel and Comparative Mapping of Human Chromosome 12 and 22 Loci.** *Genomics*. v. 57, p.1–8.1999.

MURPHY, W.J.; STANYON, R.; O'BRIEN, S. J. **Evolution of mammalian genome organization inferred from comparative gene mapping.** *Genome Biol* 2.REVIEWS.2001.

MUSSER, G. G.; CARLETON, M. D. Family Muridae. In: D. E. WILSON and D. M. REEDER. **Mammal species of the World: a taxonomic and geographic reference.** 2nd ed. Washington, D.C. Smithsonian Institution Press, 1993.

MUSSER, G.G.; CARLETON, M.D. Family Muridae. In: Wilson DE, Reeder DM, eds. **Mammal species of the World: a taxonomic and geographic reference.**, 3rd ed. Smithsonian Institution. Washington, p. 501-753. 2005.

NASH, W. G.; O'BRIEN, S. J. **Conserved regions of homologous G-banded chromosomes between orders in mammalian evolution: Carnivores and primates.** USA. *Proc. Natl. Acad. Sci.* v.79. p. 6631–6635. 1982.

NASH, W.G.; WIENBERG, J.; FERGUNSON-SMITH, M.A.; MENNINGER, J.C.; O'BRIEN, S. J. **Comparative genomics: tracking chromosome evolution in the family Ursidae using reciprocal chromosome painting.** *Cytogenet Cell Genet.* v. 83.p. 182–192. 1998.

NASH, W.G.; MENNINGER, J.C.; WIENBERG, J.; PADILHA-NASH, H.M.; O'BRIEN, S.J. **The pattern of phylogenomic evolution of the Canidae.** *Cytogenet Cell Genet.* v. 95. p. 210–224. 2001.

NASH, W.G.; MENNINGER, J.C.; WIENBERG, J.; PADILHA-NASH, H.M.; STONE, G.; PERELMAN, P.L.; O'BRIEN, S.J. **The ancestral carnivore karyotype (2n=38) lives today in ringtails.** *J Hered.* v.99. p. 241–253. 2008.

NIE, W.; WANG, J.; O'BRIEN, P.C.; FU, B.; YING, T.; FERGUNSON-SMITH, M.A. **The genome phylogeny of domestic cat, red panda and five mustelid species revealed by comparative chromosome painting and G-banding.** *Chromosome Res.* v. 10. p. 209–222. 2002,

NIE, W.; WANG, J.; SU, W.; WANG, D.; TANOMTONG, A.; PERELMAN, P.L.; GRAPHODATSKY, A.S.; YANG, F. **Chromosomal rearrangements and karyotype evolution in carnivores revealed by chromosome painting**. *Heredity*. v.108. p. 17–27. 2012.

NOWAK, R.; PARADISO, J. **Walker's Mammals of the World**: 4. ed. Baltimore, MD: The Johns Hopkins University Press. 1983.
NOWAK, R.M. **Walker's Bats of the World**. Baltimore Johns Hopkins University Press, 287p. 1994.

NOWAK, R. M. **Walker's Mammals of the World**. Baltimore: The John Hopkins University Press, 1999.

OBARA, Y. **Karyosystematics of mustelid carnivores of Japan**. *Honyurui Kagaku*. Mam Sci. v. 30. p.197-220. 1991.

O'BRIEN, S. J.; NASH, W.G. **Genetic mapping in mammals: Chromosome map of the domestic cat**. *Science*. v. 216. p. 257–265. 1982.

OLIVEIRA, J.A.; BONVICINO, C.R. Ordem Rodentia. In N.R. Reis, A.L. Peracchi, W.A. Pedro, & I.P. Lima. **Mamíferos do Brasil**. Imprensa da UEL, Londrina, p. 347-406. 2006.

PATHAK, S.; WURSTER-HILL, D. H. **Distribution of constitutive heterochromatin in carnivores**. *Cytogenet Cell Genet*. v.18. p. 245-254. 1977.

PATHAK, S.; VAN TUINEM, P.; MERRY, D.E. **Heterochromatin, synaptonemal complex, and NOR activity in the somatic and germ cells of a male domestic dog, *Canis familiaris* (Mammalia, Carnivora)**. *Cytogenet Cell Genet*. v. 34. p. 112-118. 1982.

PERELMAN, P.L.; GRAPHODATSKY, A.S.; SERDUKOVA, N.A.; NIE, W.; ALKALAEVA, E.Z.; FU, B. **Karyotypic conservatism in the suborder Feliformia (Order Carnivora)**. *Cytogenet Genome Res*.v. 108. p.348–354. 2005.

PERELMAN, P.L.; GRAPHODATSKY, A.S.; DRAGOO, J.W.; SERDYUKOVA, N.A.; STONE, G.; CAVAGNA, P. **Chromosome painting shows that skunks (*Mephitidae*, Carnivora) have highly rearranged karyotypes**. *Chromosome Res*. v.16. p. 1215–1231. 2008.

PIMENTEL, T. L.; REIS, M. L.; PASSERINO, A. S. M. **Order Carnivora, Family Mustelidae**. In: FOWLER, M. E.; CUBAS, Z. S. *Biology, medicine and surgery of south american wild animals*. 2001, p. 323-331.

POCOCK, R. I.; **On the external and cranial characters of the European badger (Meles) and the American badger (Taxidea)**. *Proc Zool Soc Lond.* p.423-436. 1921.

REIG, O. A. **A proponed unified nomenclatura for the enamebled components of the molar teeth of the Cricetidae (Rodentia)**. *J. Zool.* v. 181, p. 227-241, 1977.

REIG, O. A. **Teoria del origen y desarrollo de la fauna de mamíferos de America del Sur**. *Mus. Munic. Cienc. Nat. "Lorenzo Scaglia"*, v. 1, p. 1-161, 1981.

REIG, O. A. **Distribuição geográfica e história evolutiva dos roedores muroideos sul americanos (Cricetidae: Sigmodontinae)**. *Brasil. Genet*, v.7, p. 333-65. 1984.

REIG, O. A. **Diversity patterns and differentiation of high andean rodents**. In: Vuilleumier, F e Monasterio, M. *High Altitude Tropical Biogeography*. Oxford University Press, p. 404 – 439. 1986.

REIG, O. A. **An assesmentr of the systematics and evolution of the Akodontini, whit the description of new fossil species of Akodon (Cricetidae: Sigmontinae)**. *Fieldiana Zool* , v. 39, p. 347-99. 1987.

ROCHA-MENDES, F. **Ecologia alimentar de carnívoros (Mammalia: Carnivora) e elementos de etnozologia do município de Fênix, Paraná, Brasil**. 72 p. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal) – Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2005.

SÃO PAULO. **Fauna ameaçada no Estado de São Paulo**. Secretaria do Meio Ambiente Governo do Estado de São Paulo: SMA/CED. São Paulo. 56p. 1998.

SARAGE, R.J.G.; LONG, M.R. *Mammal Evolution*. British Museun (Natural History). Cromwell Road, London, cap.9, p. 113-129. 1986.

SATO, J.J.; HOSODA, T.; WOLSAN, M.; TSUCHIYA, K.; YAMAMOTO, Y.; SUZUKI, H. **Phylogenetic relationships and divergence times among mustelids (Mammalia: Carnivora) based on nucleotide sequences of the nuclear**

interphotoreceptor retinoid binding protein and mitochondrial cytochrome b genes. Zool. Sci. v. 20, p. 243-264. 2003.

SATO, J.J.; SUZUKI, H. **Phylogenetic relationships and divergence times of the genus Tokudaia within Murinae (Muridae; Rodentia) inferred from the nucleotide sequences encoding the mitochondrial cytochrome b and nuclear recombination-activating gene 1 and interphotoreceptor retinoid-binding protein.** Journal Zool. v.82, p. 1343-1351. 2004.

SATO, J.J.; HOSODA, T.; WOLSAN, M.; SUZUKI, H. **Molecular phylogeny of arctoids (Mammalia: Carnivora) with emphasis on phylogenetic and taxonomic positions of the ferret-badgers and skunks.** Zool. Sci. v. 21, p.111-118. 2004.

SATO, J.J.; WOLSAN, M.; SUZUKI, H.; HOSODA, T.; YAMAGUCHI, Y.; HIYAMA, K.; KOBAYASHI, M.; MINAMI, S. **Evidence from nuclear DNA sequences sheds light on the phylogenetic relationships of Pinnipedia: single origin with affinity to Musteloidea.** Zool. Sci. v. 23, p. 125-146. 2006.

SATO, J.J.; WOLSAN, M.;PREVOSTI, F.J.; D'ELIA, G.; BEGG, C.; BEGG,K.; HOSODA, T.; CAMPBELL, L.K.; SUZUKI, H. **Evolutionary and biogeographic history of weasel-like carnivorans (Musteloidea).** Molecular Phylogenetics and Evolution. v.63, P. 745-757, 2012.

SBALQUEIRO, I.J.; MATTEVI, M.S.; OLIVEIRA, L.F.B. **An X1 X1 X2 X2/ X1 X2Y mechanism of sex determination in South American rodent, Deltamys kempi (Rodentia, Cricetidae).** Cytog. Cell Genet., v. 38, p. 50-55, 1984.

SBALQUEIRO, I. J., A. M. S. BUENO, J. MOREIRA, A. P. D. RAMOS, C. PADOVANI, A. XIMENEZ, and J. M. S. AGOSTINI. **Cariótipo com 96 cromossomos em Echimys dasythrix, o mais elevado número diplóide entre os mamíferos.** Congresso Brasileiro de Zoologia,15. Curitiba, p. 532. 1988

SBALQUEIRO, I. J. **Análises cromossômicas e filogenéticas em algumas espécies de roedores da Região Sul.** Tese (Doutorado em Genética) – Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul,1989.

SBALQUEIRO, I.J. & NASCIMENTO, A.P . **Occurrence of Akodon cursor (Rodentia, Cricetidae) with 14, 15 and 16 chromosome karyotypes in the same geographic area in South Brazil.** Braz J Genet. v. 19, p. 565-569.1996.

SEABRIGHT, M. **A rapid banding technique for human chromosomes.** Lancet. v.2, p. 971. 1971.

SILVA, F. **Mamíferos silvestres** - Rio Grande do Sul. Porto Alegre: Fundação Zoobotânica do Rio Grande do Sul, 1994, 246 p.

SILVA, J. M. C.; TABARELLI, M.; FONSECA, M. T.; LINS, L. V. **Biodiversidade da caatinga: áreas e ações prioritárias para a conservação.** Brasília: MMA, UFPE. 382 p. 2004

SIMPSON, G. G. **The principles of classification and a classification of mammals.** Bull. Amer. Mus. Nat. Hist., v.85, p. 1-350. 1945.

SINKOC, A. L., J. G. W. BRUM, W. MORAES, AND P. CRENSHAW. **Ixodidae parasitos de animais silvestres na região de Foz do Iguaçu, Brasil e Argentina.** Arquivos do Instituto Biologico.v.65, p.29–33. 1998.

SMITH, M.F.; PATTON, J.L. **Phylogenetic relationships and the radiation of sigmodontine rodents in South America: evidence from cytochrome b.** Journal of Mammalian Evolution. v. 6. p. 89–128.1999.

SUMNER, A.T. **A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin.** Exp. Cell Res. v. 75, p. 304-306. 1972.

SUNQUIST, M. E.; SUNQUIST, F.; DANEKE, D. E. Ecological separation in a Venezuelan Llanos carnivore community. In: REDFORD, K. H.; EISENBERG, J. F. **Advances in neotropical mammalogy.** Gainesville, Florida: Snadhill Crane Press. p. 197-232. 1989.

TERBORGH, J. **Réquien for nature.** Covelo Califórnia and Washington, D.C.: Island Press. 1999.

TIAN, Y.; NIE, W.; WANG, J.; FERGUNSON-SMITH, M.A.; YANG, F. **Chromosome evolution in bears: reconstructing phylogenetic relationships by crossspecies chromosome painting.** Chromosome Res. v.12. p. 55–63. 2004.

THOMAS, O. **On small mammals from the Delta del Parana´.** Annals and Magazine of Natural History. v. 20. p.95–100. 1917.

THOMAS, O. **New species of Reithrodon, Abrocoma and Scapteromys from Argentina.** Annals and Magazine of Natural History. p. 5. p.473–478. 1920.

VAUGHAN, T., J. RYAN, N. CZAPLEWSKI. **Mammalogy.** 4^a ed. Philadelphia: Saunders College Publishing. 2000.

VIEIRA, C. C. **Carnívoros do Estado de São Paulo.** Arquivos de Zoologia. v. 5, n. 3. p. 135- 175. 1946.

VIEIRA, C. C. **Lista remissiva de mamíferos do Brasil.** Arquivos de Zoologia. v. 7. p. 341-487. 1955.

VIEIRA, E. M. **Highway mortality of mammals in central Brazil.** **Ciencia y Cultura.** Journal of the Brazilian Association for the Advancement of Science. p.270–272. 1996.

WIENBERG, J.; STANYON, R.; NASH, W.G.; O'BRIEN, P.C.; YANG, F, O'BRIEN. **Conservation of human vs. feline genome organization revealed by reciprocal chromosome painting.** Cytogenet Cell Genet. v. 77. P. 211–217. 1997.

WIENBERG J.; STANYON R. **Comparative chromosome painting of primate genomes.** ILAR Journal. v. 39, p. 77-91, 1998.

WILSON, A. C. ; BUSH, G. L. : CASE, S. M. ; KING, M. C. **Social structuring of Mammalian population and rate of chromosomal evolution.** Proc. Nat. Acad. Sci. USA. v. 72, p. 506-511, 1975.

WISNIVESKY-COLLI, C. **Sylvatic American trypanosomiasis in Argentina. Trypanosoma cruzi infection in mammals from the Chaco forest in Santiago del Estero.** Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene v.86, p.38–41. 1992.

WHITE, M. J. D. **Models of speciation.** Science, v. 159, p. 1065-70, 1968.

WHITE, M. J. D. **Animals cytology and evolution.** 3 ed. Cambridge, Univ. Press, p. 961, 1973.

WOLSAN, M.; SATO, J.J. **Effects of data incompleteness on the relative performance of parsimony and Bayesian approaches in a supermatrix phylogenetic reconstruction of Mustelidae and Procyonidae (Carnivora).** Cladistics. v. 26, p.168-194. 2010.

WOZENCRAFT, W. C. Order Carnivora. In: WILSON, D. E.; REEDER, D. M. (Eds.) **Mammal Species of the World: A Taxonomic and Geographic Reference.** 3ª edição. Baltimore: John Hopkins University Press. p. 532-628. 2005.

WURSTER, D.H. ; BENIRSCHKE, K. **Indian muntjac, *Muntiacus muntjak*: a deer with a low diploid chromosome number.** Science. v. 168, p.1364 -1366.1970.

WURSTER-HILL, D. H.; GRAY, C.W. **The interrelationship of chromosome banding patterns in procyonids, viverrids, and felids.** Cytogenetic Cell Genetics. v. 15. p. 306-331. 1975.

WURSTER-HILL, D. H.; CENTERWALL, W. R. **The interrelationships of chromosome banding patterns in canids, mustelids, hyena, and felids.** Cytogenet Cell Genet. v. 34. p. 178–192. 1982.

YANG, F.; GRAPHODATSKY, A. S.; O'BRIEN, P.C.M.; COLABELLA, A.; SOLANKY, N.; SQUIRE, M. **Reciprocal chromosome painting illuminates the history of genome evolution of the domestic cat, dog and human.** Chromosome Res. v. 8.p. 393–404.2000.

YENSEN, E., & T. TARIFA.. ***Galictis vittata*.** Mammalian Species. v.727, p.1–8. 2003

YONENAGA - YASSUDA, Y.; MAIA, V.; L'ABBATE, M. Two tandem fusions and supernumerary chromosomes in *Nectomys squamipes* (Cricetidae, Rodentia). **Caryologia**, v. 41, p. 25-39, 1988.

ANEXO I

CARACTERIZAÇÃO CARIOTÍPICA ATRAVÉS DA CITOGENÉTICA CLÁSSICA E ANÁLISE FILOGENÉTICA EM CITÓTIPOS DO GÊNERO SCAPTEROMYS (RODENTIA, CRICETIDAE)

Luana Tavares Barbosa ^{1,3}, Guilherme Pereira Rabelo ^{1,3}, Iris Hass ^{1,3}, André Filipe Testoni ^{1,3}, Sérgio Luiz Althoff ², Ives José Sbalqueiro ^{1,3}, Thales Renato Ochotorena de Freitas ^{3,4}

1 Laboratório de Citogenética Animal, Departamento de Genética, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, Brasil.

2 Laboratório de Biologia Animal, Departamento de Ciências Naturais, Fundação Universidade Regional de Blumenau, Blumenau, Santa Catarina, Brasil.

3 Programa de Pós-Graduação em Genética, Departamento de Genética, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, Brasil.

4 Laboratório de Citogenética e Evolução, Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.

Palavras-chave: *Scapteromys*, Rodentia, citogenética.

Luana Tavares Barbosa

Rua Amazonas, 850, 80610-030, Curitiba, PR, Brasil.

Telefone: (41) 3359.0392 (41) 9916.4968

E-mail: luanabarbos@gmail.com

Resumo

O gênero *Scapteromys* se distribui ao longo da porção sul do continente sulamericano, na Bacia do Rio Prata. São encontrados quatro diferentes citótipos, que parecem ter uma estruturação geográficas: $2n = 32$ no Paraguai e Argentina, $2n = 24$ no Uruguai e $2n = 24, 34$ e 36 no Brasil. Neste trabalho são analisados e caracterizados citogeneticamente 20 exemplares coletados no Estados do Paraná e Santa Catarina. Todos espécimes provenientes do Paraná apresentam $2n = 36$, com três pares autossômicos metacêntricos / submetacêntricos (3, 9 e 10) e o restante acrocêntrico, incluindo os sexuais. Observou-se a marcação de RONS em três pares de cromossomos: centromérica no par 3 e no X, e terminal no par 4. Todos indivíduos coletados em Santa Catarina apresentaram $2n = 34$, com quatro pares metacêntricos / submetacêntricos (3, 4, 9 e 10). Os restante dos autossomos, assim como os cromossomos sexuais, são acrocêntricos. A heterocromatina constitutiva em ambos citótipos apresentou distribuição semelhante, sendo restrita a apenas um par autossômico (10) e aos sexuais. Apesar da semelhança entre os citótipos, a diferença é devido a apenas umas fusão cêntrica, não foram encontrados híbridos, possivelmente devido a barreiras reprodutivas ocasionadas por esse rearranjo. Para a análise filogenética, foram comparados kariogramas em banda G de 5 espécies de roedores akodontinos *Thaptomys nigrita* (TNI), *Akodon serrensis* (ASE), *Akodon paranaensis* (APA), *Necromys lasirus* (NLA), *Akodon montensis* (AMO), e as três espécies de *Scapteromys* encontradas no Brasil, $2n=36$ (SCA), $2n=34$ (SCA2) e $2n=24$ (SCA3), utilizando como grupos externos o *Oligoryzomys flavescens* e o *Oecomys* sp. A análise no programa PAUP* (versão 4.0b10, Swofford, 2001) foi realizada através de comandos de pesquisa Heurística, parsimônia e com aceleração da transformação do caráter. Também se consideraram os caracteres desordenadamente e com pesos iguais para cada um. Dos 56 caracteres, 12 foram viáveis e não informativos na parcimônia e 44 informativos para a obtenção da parcimônia. O valor do índice de consistência para a árvore foi de 87,85%, o índice de retenção obtido foi de 85,39% e o número de passos foram 107. A Árvore Filogenética proposta no trabalho reforçou a classificação taxonômica do gênero pertencer à tribo Akodontini, refutando a classificação baseada na morfologia que o classificava como pertencente à tribo Scapteromyini.

Introdução

O gênero *Scapteromys* pertence à subfamília Sigmodontinae, de roedores murídeos sulamericanos. Sua distribuição abrange parte da Bacia do Prata e regiões próximas na Argentina, Brasil, Paraguai e Uruguai (Carleton e Musser, 2005). Sua ocorrência está associada a ambientes úmidos, como pântanos e banhados, e a cursos d'água, de onde vem seu nome comum em inglês "swamp rat" (rato do pântano).

Tradicionalmente agrupado com *Kunsia* e *Bibimys* na Tribo Scapteromyini (Reig, 1984; Musser e Carleton, 1993), estudos moleculares confirmam a afinidade de *Scapteromys* e *Kunsia*, mas não com *Bibimys*, e inclui estes na Tribo Akodontini (Smith e Patton, 1999; D'Elia 2003). Um estudo sistemático recente (D'Elia e Pardiñas, 2004) delimitou duas espécies para o gênero: *S. tumidus*, que ocorre predominantemente no Uruguai e *S. aquaticus*, com distribuição no leste da Argentina e sul do Paraguai. As populações dos estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná no Brasil não foram avaliadas sistematicamente, com sua taxonomia permanecendo obscura. Ao longo de sua distribuição, é observada uma notável variação cariotípica: as populações argentinas e paraguaias apresentam em sua maioria $2n = 32$ (Fronza et al., 1976; Brum et al., 1986; D'Elia e Pardiñas, 2004), as uruguaias $2n = 24$ (Brum 1965; Brum et al. 1972; Brum et al. 1986, D'Elia e Pardiñas, 2004) e as brasileiras $2n = 24, 34$ e 36 (Freitas et al., 1984; Andrades-Miranda, 1994). Com base nos aspectos morfológicos e citogenéticos, Freitas et al. (1984) e Oliveira et al. (1982) sugerem que as populações com $2n = 34$ e 36 podem consistir uma espécie distinta.

Material e Métodos

No presente trabalho são descritos os citótipos de indivíduos de *Scapteromys* coletados nos Estados do Paraná (municípios de Araucária, Piraquara, São José dos Pinhais e São Matheus do Sul) e Santa Catarina (Campo Belo do Sul e São Domingos) (Tabela 1). A captura dos animais foi feita utilizando-se armadilhas de arame galvanizado iscadas com milho, banana, pasta de amendoim e sardinha. O material citogenético foi obtido através da técnica de preparação direta de medula óssea (Ford e Hamerton, 1956; Sbalqueiro, 1989). A avaliação do número diplóide e morfologia dos cromossomos foi realizada

utilizando-se a coloração convencional com Giemsa a 5%, com a análise de pelo menos de 20 células por indivíduo. Também foram aplicadas as técnicas de bandeamento C (Sumner, 1972; Sbalqueiro 1989), bandeamento G (Seabright 1971; Sbalqueiro 1989) e marcação das regiões organizadoras de nucléolo através da impregnação com prata (Howell e Black, 1980; Sbalqueiro, 1989), com a análise de pelo menos 10 células de cada técnica por indivíduo. No total foram analisados 20 indivíduos: dois machos de Campo Belo do Sul – SC, um macho de São Domingos – SC, um macho de Araucária, três machos e uma fêmea de Piraquara – PR, três machos e uma fêmea de São José dos Pinhás – PR, quatro machos e quatro fêmeas de São Matheus do Sul – PR (Tabela 1). Os crânios e peles foram preparados e depositados no Museu de História Natural Capão da Imbuia (MHNCI) e na Coleção Científica do Laboratório de Biologia Animal da Fundação Universidade Regional de Blumenau (FURB).

Para a análise filogenética, foram comparados cariogramas em Banda G diversas espécies de roedores akodontinos, utilizando como grupo externo o *Oligoryzomys flavescens* e *Oecomys* sp. (Tabela 2). Foram utilizados como caracteres os cromossomos inteiros e os rearranjos como mudança de estado. A partir disso foi obtida uma matriz de dados (Tabela 3), submetida a uma análise de máxima parcimônia utilizando o software PAUP* (versão 4.0b10, Swofford, 2001). Foram utilizadas as opções de pesquisa exaustiva, com caracteres não ordenados e com peso equivalente e 2000 replicações de bootstrap para avaliar a consistência dos nós.

Resultados

Todos indivíduos coletados em Santa Catarina apresentaram $2n = 34$ e $FNa = 40$ (Figura 1a); os pares 1 e 2 são acrocêntricos grandes, o par 3 metacêntrico grande, o par 4 submetacêntrico grande, os pares 5, 6, 7 e 8 acrocêntricos médios, os pares 9 e 10 metacêntricos pequenos e os pares 11, 12, 13, 14, 15 e 16 acrocêntricos pequenos. O X é um acrocêntrico de tamanho similar aos pares autossômicos 6 e 7 e o Y é o menor cromossomo acrocêntrico.

A aplicação do bandeamento C revelou uma distribuição de heterocromatina constitutiva restrita a região pericentromérica do par 10 e do cromossomo X e ao cromossomo Y (Figura 2a). Os indivíduos coletados no Paraná apresentaram de

foram geral $2n = 36$ e $Fna = 40$ (Figura 1b). Os pares 1, 2 e 4 do complemento autossômico são acrocêntricos grandes, o par 3 submetacêntrico grande, os pares 5, 6, 7 e 8 são acrocêntricos médios, os pares 9 e 10 metacêntricos médios e os pares 11, 12, 13, 14, 15, 16 e 17 acrocêntricos pequenos. O X é um acrocêntrico de tamanho médio e o Y o menor acrocêntrico. O bandeamento C apresentou um padrão similar ao descrito para o citótipo $2n = 34$, com marcação pericentromérica em um par autossômico (10) e no X e marcação do Y por inteiro (Figura 2b). Através do bandeamento G foi possível identificar e parear corretamente todos os cromossomos (Figura 1c). A número de RONS observadas variou de zero a seis: na região pericentromérica dos pares autossômicos 3 e 9 e nos cromossomos sexuais X e Y (Figura 2c). De um total de 50 células analisadas em dois indivíduos machos, sete apresentaram marcação em um elemento do par 3 e 43 marcação nos dois elementos, seis não apresentaram marcação no par 9, 24 com marcação em um elemento e 20 marcação nos dois elementos. Quanto ao par sexual, 19 não apresentaram marcação no cromossomo X e 31 células foram marcadas, 33 células não marcaram o cromossomo Y, com 17 marcadas (Tabela 4). Quanto ao número total de marcações por célula, 12 não apresentaram nenhuma marcação, nenhuma com uma marcação, três células com duas marcações, oito células com três marcações, 22 células com quatro marcações, 14 células com cinco marcações e uma célula com as seis marcações (Tabela 5).

A análise filogenética utilizou caracteres não ordenados e foram feitas comparações cromossômicas entre 10 espécies: *Olygoryzomys flavescens* (OFL), *Oecomys* sp. (OSP), *Thaptomys nigrita* (TNI), *Akodon serrensis* (ASE), *Akodon paranaensis* (APA), *Necromys lasirus* (NLA), *Akodon montensis* (AMO) e as três espécies de *Scapteromys* encontradas no Brasil, $2n=36$ (SCA), $2n=32$ (SCA2) e $2n=24$ (SCA3). A análise no programa PAUP foi realizada através de comandos de pesquisa Heurística, parsimônia e com aceleração da transformação do caráter. Também se consideraram os caracteres desordenadamente e com pesos iguais para cada um. Dos 56 caracteres, 12 não informativos na parcimônia e 44 informativos para a obtenção da parcimônia. O valor do índice de consistência para a árvore foi de 87,85%, o índice de retenção obtido foi de 85,39% e o número de passos foram 107.

Foi obtida apenas uma árvore parcimoniosa (Figura 4) revelando a presença de um grupo constituído por oito espécies de akodontinos, exceto OFL e OSP onde se observa o agrupamento de duas espécies do gênero *Akodon* (ASE e APA), evidenciado por um Bootstrap igual a 92%, NLA e AMO agruparam-se com Bootstrap de 71% e o gênero de *Scapteromys* agruparam-se apresentando um Bootstrap de 98% indicando boa consistência desse agrupamento. Duas espécies de *Scapteromys* (SCA e SCA2) são mais próximas com um Bootstrap de 78%, apresentando cariótipos $2n=36$ e $2n=34$ respectivamente.

Nota-se que o agrupamento do gênero de *Scapteromys* está junto das outras 5 espécies da tribo Akodontini, mostrando que este pode mesmo fazer parte da tribo. Se este não fizesse parte provavelmente o grupo de *Scapteromys* estaria posicionado fora desses ramos da tribo, indicando sua não relação com eles.

Discussão

As localidades de coleta descritas neste trabalho expandem consideravelmente a área de distribuição do gênero no Paraná e confirmam a presença dele em Santa Catarina, que tinha sido apontada como de possível ocorrência por Cherem et al. (2004). Os achados citogenéticos descritos coincidem com aqueles observados por Freitas et al. (1984), no qual ele descreve o cariótipo de indivíduos de Piraquara – PR ($2n = 36$), Esmeralda – RS e Cambará – RS ($2n = 34$). Neste trabalho os autores comparam os citótipos $2n = 36$, 34 e 24 e observam, através do bandeamento G, uma completa correspondência entre os braço longos deles. Sugere-se que translocações Robertsonianas seriam o principal mecanismo responsável pela redução no número diplóide, e destaca-se a distribuição restrita de heterocromatina constitutiva, contrariando-se a idéia de que esta favorece a evolução cariotípica. Em Andrades-Miranda et al. (2004) compara-se os cariótipos de *Scapteromys* ($2n = 34$ e $2n = 24$) e *Kunsia* ($2n = 44$) utilizando-se diversas técnicas de coloração, enzimas de restrição e hibridização in situ com fluorescência. Apesar da afinidade entre os gêneros apontada por técnicas moleculares, não foram encontradas homeologias em bandeamento G e nos padrões gerados pela aplicação das enzimas de restrição.

Apesar da aparente semelhança entre os diversos citótipos de *Scapteromys* em bandeamento G, até agora não foram encontrados híbridos entre eles, mesmo em locais onde ocorrem em simpatria. Pode-se inferir a partir disto que os rearranjos observados possam estar atuando como barreiras reprodutivas pós-zigóticas, tornando híbridos inviáveis. Deve-se destacar no entanto a necessidade de maiores esforços de coleta e estudo das formas com $2n = 34$ e $2n = 36$, que seriam as mais semelhantes entre si, sendo a diferença observada resultado de uma fusão cêntrica. Estas possuem atualmente uma distribuição bastante restrita, com poucos indivíduos coletados e analisados citogeneticamente.

Os resultados apontados pela reconstrução filogenética utilizando bandeamento G coincidem com aqueles obtidos por Smith e Patton (1999) e D'Elia (2003), utilizando o gene citocromo b em ambos trabalhos e o gene IRBP no segundo. Neste, o gêneros *Scapteromys* ocupam uma posição basal na Tribo Akodontini, o que sugere que sejam formas mais primitivas e próximas do ancestral akodontini. O *Thaptomys* ocupa uma posição intermediária, com o restante das espécies formando dois clados bem definidos: um incluindo as espécies de *Necromys* e outro as espécies de *Akodon*. No presente trabalho as espécies de *Akodon* não formaram um agrupamento único, sendo que *Akodon serrensis* se mostrou bastante próximo ao *Akodon paranaensis* e o *Akodon montensis* formando um outro clado juntamente com *Necromys lasiurus*. Esta diferença pode ser explicada pela natureza dos dados utilizados - comparação de padrões de bandeamento G, ao invés de genética molecular – e pelas quantidade de espécies amostras. Smith e Patton (1999) utilizou cinco espécimes de três espécies de *Necromys* e 18 espécies de *Akodon* e D'Elia (2003) utilizou seis espécimes de quatro espécies *Necromys* e 12 espécimes de 11 espécies de *Akodon*, o que possibilitaria uma maior resolução na filogenia destas.

Agradecimentos

Agradecimento ao Laboratório de Citogenética Animal (UFPR) e Biologia Animal – (FURB) e às suas equipes pelo material cedido e auxílio em campo. À PRPPG-Genética (UFPR), Fundação Araucária e REUNI pelo apoio financeiro.

Referências

ANDRADES-MIRANDA, J. 1994. Investigação sobre a natureza do genoma de *Scapteromys tumidus* (Rodentia, Cricetidae). Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular). Porto Alegre, Brasil: Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

ANDRADES-MIRANDA J, NUNES AP, OLIVEIRA LFB and MATTEVI MM. 1999. The karyotype of the South American rodent *Kunsia tomentosus* (Lichtenstein, 1830). *Cytobios* 98: 137-147.

BRUM N. 1965. Investigaciones citogenéticas sobre algunas espécies de Cricetidae (Rodentia) del Uruguay. *Anais II Congresso Latino-Americano de Zoologia* 2: 315-320.

BRUM N, OLIVER G, GENTILE DE FRONZA T and WAINBERG R. 1986. Karyological studies of South American rodents (Rodentia: Cricetidae). I. Comparative chromosomic analysis in *Scapteromys* taxa. *Caryologia* 39: 131-142.

BRUM N, LAFUENTE N, KIBLISKY P. 1972. Cytogenetic studies in the cricetid rodent *Scapteromys tumidus* (Rodentia-Cricetidae). *Specialia* 28: 1373.

CARLETON MD and MUSSER GG. 2005. Order Rodentia, p. 745-752 In: DE WILSON DE and REEDER DM (Eds). *Mammal Species of the World: A Taxonomic and Geographic Reference*. Johns Hopkins University Press, Baltimore, 3rd ed., XXXVIII+2142p.

CHEREM JJ, SIMOES-LOPES PC, ALTHOFF SL, GRAIPEL ME. 2004. Lista dos mamíferos do Estado de Santa Catarina, Sul do Brasil. *Mast. Neotrop.* 11(2): 151-184.

D'ELIA G. Phylogenetics of Sigmodontinae (Rodentia, Muroidea, Cricetidae), with special reference to the akodont group, and with additional comments on historical biogeography. *Cladistics*: 19, 307–323. 2003.

D'ELIA G and PARDIÑAS UFJ. 2004. Systematics of Argentinean, Paraguayan and Uruguayan swamp rats of the genus *Scapteromys* (Rodentia, Cricetidae, Sigmodontinae). *Journal of Mammalogy* 85(5): 897-910.

FREITAS TR, MATTEVI MS and OLIVEIRA LFB. 1984. Unusual C-band patterns in three karyotypically rearranged forms of *Scapteromys* (Rodentia, Cricetidae) from Brazil. *Cytogenet Cell Genet* 38(1): 39-44.

FRONZA T, WAINBERG RL and LLORENTE BE. 1976. Polimorfismo del cromosoma X y significacion filogenética del cariotipo de la "Rata aquatica" *Scapteromys aquaticus* (Rodentia, Cricetidae) de la ribera de Punta Lara (Argentina). *Mendeliana* 1: 41-48.

FORD CE and HAMERTON JL. 1956. A colchicine hypotonic citrate squash sequence for mammalian chromosome. *Stain Tech* 31: 247-51.

HOWELL WM and BLACK DA. 1980. Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1 step method. *Experientia* (Basel), 36: 1014-1015.

MUSSER GG and CARLETON MD. 1993. Family Muridae In: DE WILSON DE and REEDER DM (Eds). *Mammal species of the world: a taxonomic and geographic reference*. Smithsonian Institution Press, Washington, D.C.

OLIVEIRA LFB, FREITAS TRO and MATTEVI MS. 1982. Considerações sobre o gênero *Scapteromys* no Sul do Brasil com a descrição de uma nova espécie (Mammalia, Rodentia, Cricetidae) In: IX Congresso Brasileiro de Zoologia, Porto Alegre. IX Congresso Brasileiro de Zoologia (Resumos), 35-35.

REIG OA. 1984. Distribuição geográfica e história evolutiva dos roedores muroideos sulamericanos (Cricetidae: Sigmodontinae). *Rev. Brasil. Genet.* 7(2): 333-365.

SBALQUEIRO IJ. 1989. Análises cromossômicas e filogenéticas em algumas espécies de roedores da Região Sul do Brasil. Tese de Doutorado. Porto Alegre, Brasil: Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

SEABRIGHT M. 1971. A rapid banding technique for human chromosomes. *Lancet* 2:971–972.

SMITH MF and PATTON JL. 1999. Phylogenetic relationships and the radiation of sigmodontine rodents in South America: evidence from cytochrome b. *Journal of Mammalian Evolution* 6: 89–128.

SUMNER AT. 1972. A simple technique for demonstrating centomeric heterochromatin. *Exp. Cell Res.* 75: 304-6.

Tabelas

TABELA 1. Locais e número de exemplares de *Scapteromys* estudados no Paraná e Santa Catarina

Localidade	Número de indivíduos		Cariótipo	
	Machos	Fêmeas	2N	NA
Campo Belo do Sul - SC	2	-	34	40
São Domingos - SC	1	-	34	40
São José dos Pinhais - PR	3	1	36	40
Araucária – PR	1	-	36	40
Piraquara – PR	3	1	36	40
São Matheus do Sul - PR	4	4	36	40

TABELA 2. Exemplares utilizados para a comparação em bandeamento G

Espécie	2n	NA
<i>Oligoryzomys flavescens</i> (OFL)	64	66
<i>Oecomys</i> sp. (OSP)	60	64
<i>Akodon montensis</i> (AMO)	24	42
<i>Akodon paranaensis</i> (APA)	44	44
<i>Akodon serrensis</i> (ASE)	46	46

SCA3 42242200120000202002200003000000400010400000000302031000

TABELA 4. Marcações observadas em banda NOR por metáfase, com seus respectivos pares marcados

		Par 3			Par 9			X		Y	
Protocolo	Células analisadas	0	1	2	0	1	2	0	1	0	1
P1007	25	0	5	20	2	10	13	11	14	15	10
P1036	25	0	2	23	4	14	7	8	17	18	7
Total	50	0	7	43	6	24	20	19	31	33	17

TABELA 5. Número de marcações por célula

Protocolo	0	1	2	3	4	5	6
P1007	7	0	1	4	12	6	0
P1036	5	0	2	4	10	8	1
Total	12	0	3	8	22	14	1

Figuras

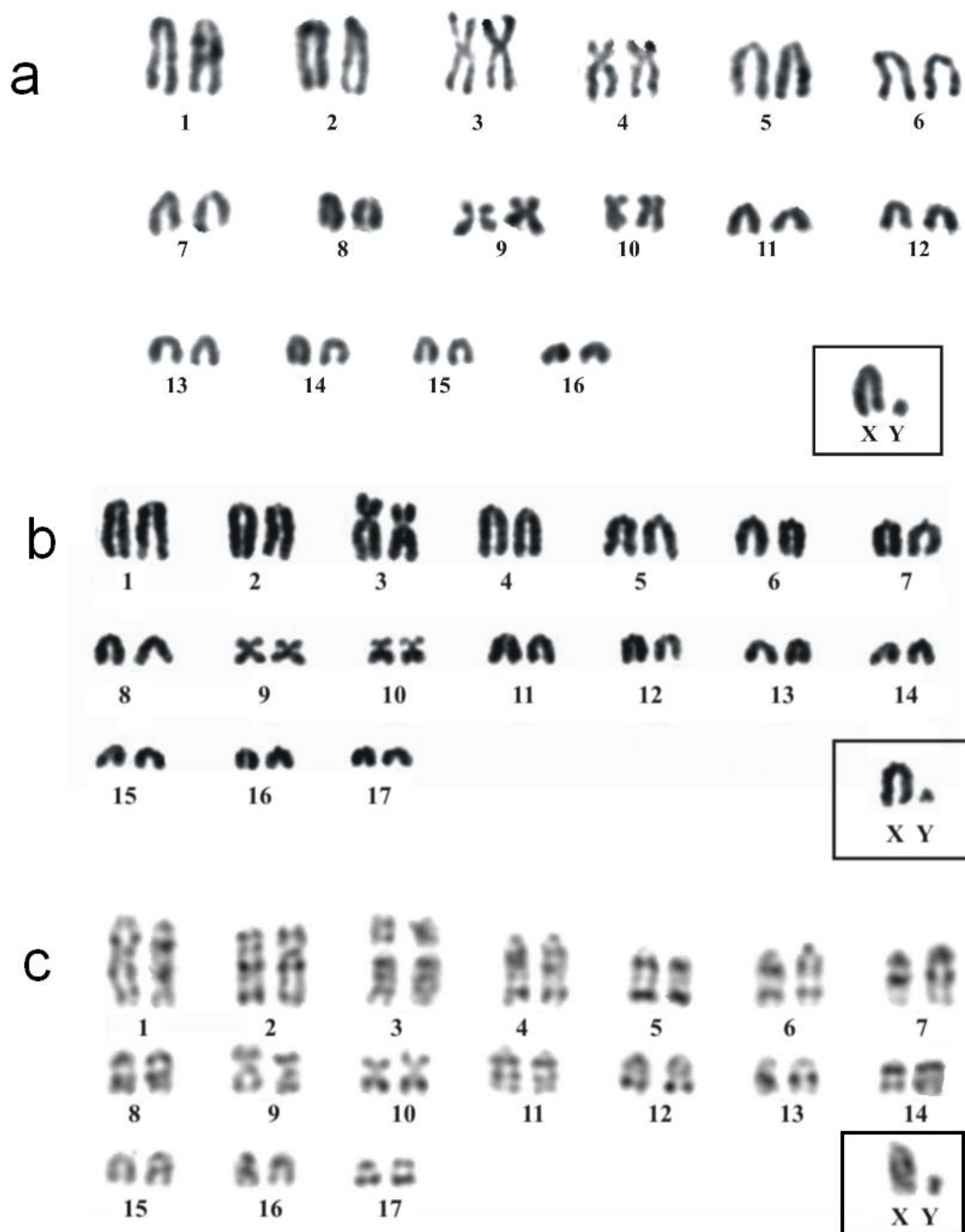


FIGURA 1. (a) Cariograma em coloração comum de macho de *Scapteromys* $2n = 34$. (b) Cariograma em coloração comum de macho de *Scapteromys* $2n = 36$. (c) Cariograma em bandeamento G de macho de *Scapteromys* $2n = 36$.

