



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS E BIOLOGIA  
CELULAR

JAMILLY AMARAL PINTO

ANÁLISE CITOGENÉTICA DE DUAS ESPÉCIES DO GÊNERO *Hylaeamys*  
(Rodentia: Cricetidae) POR CITOGENÉTICA CLASSICA E MOLECULAR

BELÉM - PA  
2013

JAMILLY AMARAL PINTO

ANÁLISE CITOGENÉTICA DE DUAS ESPÉCIES DO GÊNERO *Hylaeamys*  
(Rodentia: Cricetidae) POR CITOGENÉTICA CLÁSSICA E MOLECULAR

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Neurociências e Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará, como requisito para obtenção do título de Mestre em Neurociências e Biologia Celular.

Área de concentração: Biologia Celular

Orientador: Prof. Dr<sup>a</sup>. Cleusa Yoshiko Nagamachi

BELÉM - PA  
2013

A minha mãe Vera por seu amor incondicional e exemplo de perseverança. Duas coisas que me fizeram chegar onde estou sem ter medo de desafios, mesmo que eles acabem em fracassos. Pois me ensinou que o fracasso é a oportunidade de se começar de novo! Te amo e obrigada por me amar!

## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar tenho que agradecer a Deus por me conceder: a serenidade, para aceitar as coisas que não posso mudar; a coragem para mudar as coisas que posso e a sabedoria para saber a diferença. Pois sem essas três qualidades não alcançaria a realização deste trabalho!

A Prof<sup>a</sup>.Dr<sup>a</sup>. Cleusa Yoshiko Nagamachi, pois se não fosse a sua confiança, em mim depositada, esse trabalho não teria sido realizado. E por ser, não só para mim, um exemplo de pesquisadora honesta e sempre presente na orientação de seus alunos. Muito, muito obrigada!

Ao Prof. Dr. Julio C. Pieczarka por ser mais um exemplo de Pesquisador honesto e bom caráter. Agradeço também, pois sem ele nós não teríamos condições de fazer metade dos trabalhos que fazemos no laboratório.

A minha família, especialmente minha irmãs Thenilly e Nazaré, pois sempre me deram todo o apoio por acreditaram em mim. Amo vocês!

A minha cunhada Liane e meu irmão Paulinho, por, não só serem peças-chaves na realização deste trabalho, mas por serem exemplos de amizade, honestidade e pesquisadores competentes! Nem preciso dizer que amo vocês!

Agradeço, também, as minhas três riquezas: Luana, Eduardo e Sabrina. Só Deus sabe o quanto os amo!

As tias Ana, Conceição, Graça, Maria José, Regina (*In memoriam*), Socorro, Suely e Tereza por serem mais que tias em minha vida, participando como mães na minha formação moral e profissional. Não tenho nem palavras para agradecer! Muito obrigada!

A chefe de minha família, Sarah Amaral um exemplo de mulher batalhadora e de fé. Fé que repassou para todos os filhos, netos e bisnetos!

A todos os tios e tias, primos e primas, por simplesmente existirem e fazerem parte da minha história! Obrigada!

A todos os meus amigos, que foram essenciais nesta caminhada em especial: Thayse, Milla, Ananda, Willam, Carlos, Vergiana, Fernando, Celina, Stella, Adenilson, Jéssica, Aauto, Isabela, Bené, Nelys, Lucyanne e Danilo. Obrigada por

insistirem para que eu continuasse. Obrigada por perceberem em mim um talento que minha autocrítica jamais permitiria que se desenvolvesse. Obrigada pelas risadas que vocês arrancam de mim sempre que necessário. Obrigada por me permitir estar ao lado de vocês! Amo vocês!

Ao Jorge pela preparação do material de cultura, além do apoio e dicas de como melhorar este trabalho! Te agradeço!

A Conceição, Shirley e as Prof<sup>as</sup> Dr<sup>as</sup> Susana Milhomem e Renata Noronha pelos momentos de descontração e por sempre manterem a organização do laboratório, o que facilitou a realização dos experimentos!

Ao Dr. Rogério Rossi, pela identificação taxonômica e ao Prof. Dr. Paulo Asfora por ceder as amostras de *Hylaeamys oniscus*.

A Universidade Federal do Pará pelo apóio técnico e científico. E a Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Pará (FAPESPA), por conceder a bolsa de estudos durante os 2 anos de minha pós-graduação!

“Deus nos fez perfeitos e não escolhe os capacitados mas, capacita os escolhidos. Fazer ou não fazer algo só depende da nossa vontade e perseverança”.

(Albert Einstein)

## LISTA DE FIGURAS, TABELAS E QUADROS

<b>Figura 1.</b> Parte da diversidade de dentição, musculatura e formato craniano de algumas famílias de roedores _____	13
<b>Quadro 1.</b> Lista de gêneros atualmente atribuídos a Tribo Oryzomyini _____	15
<b>Figura 2.</b> Distribuição das espécies de <i>Hylaeamys</i> no Brasil _____	16
<b>Tabela 1.</b> Variação no número diploide ( $2n$ ) das espécies de <i>Hylaeamys</i> , de acordo com Weksler et al., 2006 _____	17
<b>Figura 3.</b> Principais etapas da técnica de FISH _____	19
<b>Figura 4.</b> Tipos de sondas utilizadas na técnica de FISH _____	20
<b>Figura 5.</b> Fundamentos de técnicas baseadas em FISH. (A) ZOO-FISH: sondas cromossomo-específicas, por exemplo de humano, são hibridizadas em outros mamíferos. (B) FISH reverso: permite após o ZOO-FISH a identificação correta dos segmentos que se encontram fragmentados na espécie 2, com uma nova hibridização, onde se utilizam sondas cromossomo-específicas da espécie 2 em hibridização de humanos. (C) FISH multidirecional: sondas de mais de uma espécie, já mapeadas, são aplicadas em uma outra espécie _____	21
<b>Quadro 2.</b> Combinação de sondas em proporções iguais utilizando três fluorocromos (FITC, Cy3 e Cy5) _____	22
<b>Figura 6.</b> Métodos de obtenção de sondas. Em <b>A</b> , esquema da separação de cromossomos por citometria de fluxo ( <i>flow sorting</i> ). Em <b>B</b> , esquematização do invertoscópio com equipamento de microdissecção) _____	24
<b>Figura 7.</b> Exemplos de cariótipo de fluxo. A) Fêmea de <i>Hylaeamys megacephalus</i> ( $2n=54$ ). B) Feto de <i>Hylaeamys megacephalus</i> ( $2n=50$ ) _____	25
<b>Figura 8.</b> Mapa dos locais de coleta, tanto de <i>Hylaeamys megacephalus</i> como de <i>Hylaeamys oniscus</i> _____	28
<b>Figura 9.</b> Padrões de bandeamento G (A) e padrões de bandeamento C (B) em <i>Hylaeamys oniscus</i> ( $2n= 52/NF=62$ ) _____	35
<b>Figura 10.</b> <i>Hylaeamys oniscus</i> : A – Bandeamento G mapeado com picos de HME; B – Hibridização dos picos que correspondem ao cromossomos 14 e 19 de HME _____	36

## SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

1	INTRODUÇÃO	12
1.1	A Ordem Rodentia	12
1.1.1	A subfamília Sigmodontinae e a tribo Oryzomyini	14
1.1.2	O Gênero <i>Hylaeamys</i> (Weksler <i>et al</i> , 2006)	15
1.2	A Importância da Citogenética em Roedores	17
1.3	A Citogenética Molecular	18
1.3.1.	Hibridização <i>in situ</i> por fluorescência – FISH	18
1.3.1.1	A Sonda	19
1.3.1.2	A Pintura Cromossômica	21
1.3.1.3	Obtenção das Sondas para Pintura Cromossômica	23
1.3.1.3.1	Amplificação da Sonda	25
1.3.1.3.2	Marcação da Sonda	26
2.	OBJETIVO	27
2.1	Objetivo Geral	27
2.2	Objetivo Específico	27
3	MATERIAL E MÉTODOS	28
3.1	MATERIAL	28
3.2	MÉTODOS	29
3.2.1	Obtenção direta de Cromossomos Metafásicos	29
3.2.2	Obtenção via Cultura de Células de Cromossomos Metafásicos	29
3.2.3	Preparo das Lâminas	30
3.2.4	Técnicas de Citogenética Clássica	30
3.2.4.1	Coloração Convencional	31
3.2.4.2	Bandeamentos Cromossômicos	31
3.2.4.2.1	Bandeamento G	31
3.2.4.2.2	Bandeamento C	31
3.2.5	Técnica de Citogenética Molecular / Hibridização In Situ Fluorescente (FISH)	32
3.2.5.1	Preparação da Lâmina	32

3.2.5.2 Desnaturação cromossômica	32
3.2.5.3 Hibridização	32
3.2.5.4 Lavagem de Estringência	32
3.2.5.5 Detecção de sondas	33
3.2.6 Análise cromossômica e Montagem dos Cariótipos	33
4 RESULTADOS	34
5 DISCUSSÃO	37
6 CONCLUSÃO	39
7 REFERÊNCIAS	40
8 ANEXO	47

## RESUMO

Os roedores formam uma das mais numerosas e antigas ordens da classe Mammalia. Na América do Sul, a ordem Rodentia compreende cerca de 42% das espécies de mamíferos, sendo que desta parcela mais de 50% pertencem a família Cricetidae, que inclui a subfamília Sigmodontinae. O gênero *Hylaeamys* está agrupado na tribo Oryzomyini e corresponde a um dos 10 novos gêneros propostos para espécies e grupos de espécies dentro de *Oryzomys*. *Hylaeamys* corresponde ao “grupo *megacephalus*”, sendo constituído pelas espécies *H. acritus*, *H. laticeps*, *H. megacephalus*, *H. perenensis*, *H. oniscus*, *H. tatei* e *H. yunganus* distribuídas na Venezuela, Trinidad, Guianas, Paraguai e no Brasil, em áreas de floresta tropical amazônica, mata atlântica e cerrado. Este trabalho visa analisar marcadores cromossômicos em duas espécies do gênero *Hylaeamys*, fornecendo dados que auxiliem na sua caracterização taxonômica e citogenética. Foram trabalhadas dezenove amostras de *Hylaeamys megacephalus* (HME) e quatro de *Hylaeamys oniscus* (HON). HME apresenta  $2n=54$  e HON,  $2n=52$ . Os resultados obtidos por bandeamentos G, C e por hibridização *in situ*, com sondas de cromossomo total de *Hylaeamys megacephalus* permitiram determinar as características cromossômicas das espécies em estudo, além de permitir uma análise comparativa entre as mesmas e em relação a *Cerradomys langguthi*, observando assim suas homeologias e diferenças cariotípicas. As duas espécies de *Hylaeamys* diferem por um rearranjo tipo fusão/fissão cêntrica onde HON apresenta a associação 14/19 de HME. Esta associação é compartilhada com CLA com inversão (19/14/19). Este trabalho é um marco para estudos de filogenia cromossômica do gênero *Hylaeamys*.

Palavras-chave: Roedor, *Oryzomys*, *Hylaeamys*, Citogenética, Pintura Cromossômica, Fish.

## ABSTRACT

Rodents are one of the largest and oldest orders of the class Mammalia. In South America, the order Rodentia comprises about 42% of mammal species, and from this more than 50% belong to the family Cricetidae, which includes the subfamily Sigmodontinae. The genus *Hylaeamys* is inserted in the tribe Oryzomyini and corresponds to one of 10 new genera proposed for species and species groups within *Oryzomys*. *Hylaeamys* is the equivalent of "megacephalus group", and consists of the species *H. acritus*, *H. laticeps*, *H. megacephalus*, *H. perenensis*, *H. oniscus*, *H. tatei* and *H. yunganus*, distributed in Venezuela, Trinidad, Guyana, Paraguay and Brazil, in areas of the Amazon rain forest, Atlantic rainforest and savannah. This study aims to analyze chromosomal markers in two species of the genus *Hylaeamys*, providing data to assist in its taxonomic and cytogenetic characterization. Nineteen samples of *Hylaeamys megacephalus* (HME) and four samples of *Hylaeamys oniscus* (HON) were analyzed. HME has  $2n = 54$  and HON,  $2n = 52$ . The results obtained by G- and C-banding and Fluorescent *In Situ* Hybridization with whole chromosome probes from *Hylaeamys megacephalus* made it possible to determine the chromosomal characteristics of the species studied, as well as allowing a comparative analysis between them, and in comparison with *Cerradomys langguthi*, observing homeologies and karyotypic differences. The two species of *Hylaeamys* differ by a centric fission/fusion rearrangement in which HON shows the association of the pairs 14/19 of HME. This association is shared with CLA with an inversion (19/14/19). This work is an achievement for phylogeny and chromosomal studies on the genus *Hylaeamys*.

Keywords: Rodent, *Oryzomys*, *Hylaeamys*, Cytogenetics, Chromosome painting, Fish.

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.3 A Ordem Rodentia

Segundo Dawson (1967), os roedores são membros importantes de quase todas as faunas, desde o Paleoceno Superior, tornando-se diversificados e abundantes durante o Eoceno na América do Norte e Eurásia. Contudo as mais recentes radiações estão relacionadas às famílias Cricetidae no Novo Mundo e Muridae na África e Sudeste da Ásia (EISEMBERG, 1983). Atualmente, os roedores representam a ordem mais numerosa e diversificada dentre os mamíferos vivos possuindo, aproximadamente, 481 gêneros e 2277 espécies (WILSON & REEDER, 2005) dos quais, 75 gêneros e 240 espécies são endêmicas do Brasil (REIS ET AL, 2011).

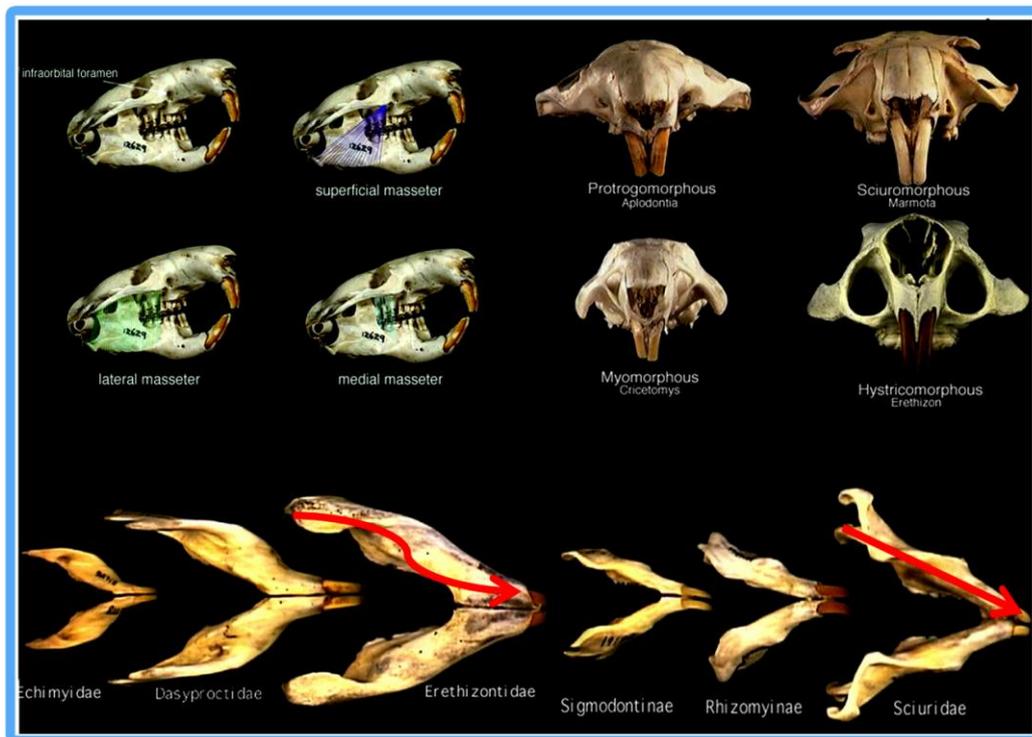
Os indivíduos dessa ordem são evolutivamente bem adaptados, já que estão presentes em praticamente todos os tipos de nichos. Alguns autores relacionaram, esse sucesso adaptativo da ordem Rodentia, à algumas características: o tamanho corporal, que em sua maioria, são animais de pequeno porte (com exceção da capivara - *Hydrochoerus hydrochoeris* - que pode alcançar 1,3 m de altura e pesar até 50 Kg), o que permite a ocupação de ambientes inexplorados por animais maiores; o comportamento, pois são rápidos e esquivos, o que facilita sua proteção contra possíveis predadores; o ciclo reprodutivo, possuindo uma elevada taxa reprodutiva, permitindo aos roedores a formação de grandes populações; o seu hábito alimentar diversificado, pois são predominantemente herbívoros, mas podem atuar como carnívoros, piscívoros, insetívoros e onívoros (COLBERT, 1969; LANDRY JUNIOR, 1970; SMITH & PATTON, 1999).

A dentição desses animais é destacada como sendo uma de suas características mais marcantes. Possuem um par de incisivos superiores grandes que crescem continuamente e sobrepõem-se ao par inferior; não possuem outros incisivos ou caninos e poucos molares e pré-molares são encontrados, sendo os incisivos separados dos outros dentes por um grande espaço denominado de diastema (COLBERT, 1969; NOWAK, 1999).

Em vista disso, características cranianas e dentárias são as mais utilizadas para efetuar a classificação do grupo (Figura 1). Porém, segundo Mattevi & Andrades-Miranda (2006), a grande diversidade morfológica, o número notável de ramos de descendência e a evolução paralela de caracteres similares nos diversos grupos de roedores provocaram controvérsias entre os taxonomistas sobre a classificação

desses animais. Levando em consideração as diferenças estruturais do crânio e a relação do músculo masseter com o conduto infra-orbitário os roedores foram classificados em três grandes categorias subordinais: Sciuromorpha, Myomorpha e Hystricomorpha (SIMPSON, 1945; ANDERSON, 1967).

Figura 1. Parte da diversidade de dentição, musculatura e formato craniano de algumas famílias de roedores.



Fonte: Adaptada de <http://www.arlis.org>

Porém, Woods (1976) e Hartenberger (1981), baseados em outras diferenças presentes na musculatura da área cranial e nas formas da mandíbula e do crânio, propuseram um novo reagrupamento das famílias em duas sub-ordens: Sciurognathi e Hystricognathi. Neste arranjo, Sciuromorpha, Myomorpha e uma família de Hystricomorpha (Ctenodactylidae) foram unidas em Sciurognathi, na qual Myomorpha passou a ser infra-ordem; os outros membros de Hystricomorpha foram agrupados na sub-ordem Hystricognathi. Nesta classificação, houve modificações quanto à localização de algumas famílias. Assim, as famílias Geomyidae, Heteromyidae (pertencente à antiga sub-ordem Sciuromorpha) e Ctenodactylidae (pertencente a antiga sub-ordem Hystricomorpha) passaram a integrar a infra-ordem Myomorpha.

### 1.3.1 A subfamília Sigmodontinae e a tribo Oryzomyini

A subfamília Sigmodontinae constitui um dos grupos mais diversificados e complexos de mamíferos do Novo Mundo, com aproximadamente 84 gêneros e 380 espécies distribuídas em nove tribos: Abrotrichini, Akodontini, Ichthyomyini, Oryzomyini, Phyllotini, Reithrodontini, Sigmodontini, Thomasomyini e Wiedomyini, sendo que alguns desses gêneros não foram incluídos em nenhuma tribo, *incertae sedis* (D'ELÍA *et al.*, 2007). Devido à grande variação morfológica e ecológica, a tribo Oryzomyini é reconhecida por diversos autores como sendo um dos agrupamentos mais diversificado dentro da subfamília Sigmodontinae.

Os representantes da tribo Oryzomyini apresentam uma distribuição desde o sudeste dos Estados Unidos até o extremo sul da América do Sul (EISENBERG & REDFORD, 1999). Essa tribo engloba cerca de 40% das espécies da subfamília Sigmodontinae. Atualmente é constituída de 33 gêneros (destes 5 extintos), além de três táxons do grupo do gênero que ainda não estão descritos (Quadro 1) e 130 espécies (WEKSLER&PERCEQUILLO, 2011). Dentre eles está o gênero *Hylaeamys* que primeiramente seus integrantes foram descritos como pertencentes ao gênero *Oryzomys* (WEKSLER *et al.*, 2006; PINE *et al.*, 2012).

Quadro 1. Lista de gêneros atualmente atribuídos a Tribo Oryzomyini.

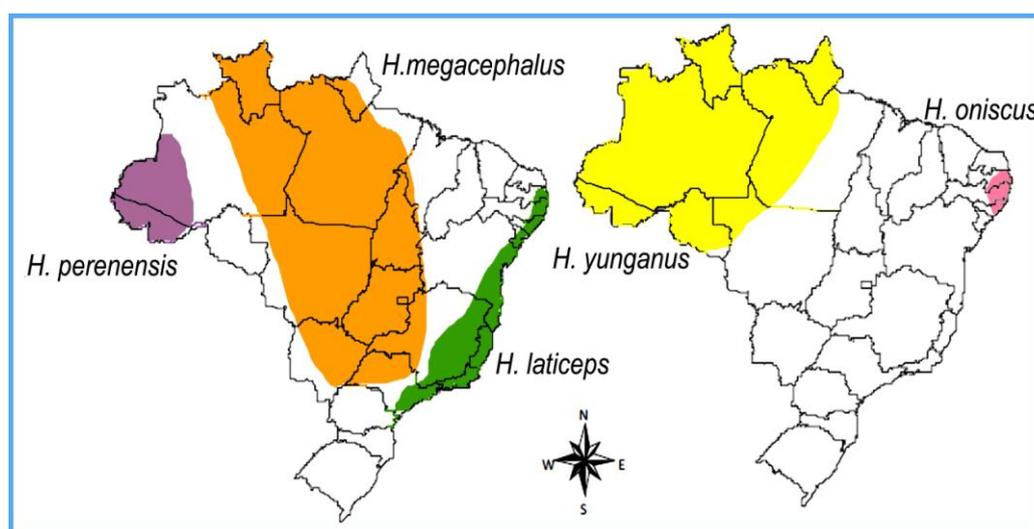
Gênero	Táxons Extintos	Táxons não descritos
Aegialomys	†Agathaeromys	alfaroi group
Amphinectomys	†Carletonomys	chapmani group
Cerradomys	†Megalomys	aphrastus group
Drymoreomys	†Noronhomys	
Eremoryzomys	†Pennatomys	
Euryoryzomys		
Handleyomys		
Holochilus		
Hylaeamys		
Lundomys		
Melanomys		
Microakodontomys		
Microryzomys		
Mindomys		
Neacomys		
Nectomys		
Nephelomys		
Nesoryzomys		
Oecomys		
Oligoryzomys		
Oreoryzomys		
Oryzomys		
Pseudoryzomys		
Scolomys		
Sigmodontomys		
Sooretamys		
Transandinomys		
Zygodontomys		

### 1.3.2 O Gênero *Hylaeamys* (Weksler *et al*, 2006)

Como mencionado anteriormente, os integrantes deste gênero, foram por muito tempo agrupados no gênero *Oryzomys*. O gênero *Oryzomys* reunia espécies que apresentavam variações morfológicas, fisiológicas e genéticas que indicavam a possibilidade de não ser uma entidade monofilética, portanto essas espécies não compartilhavam a mesma história evolutiva (BONVICINO & ALMEIDA, 2001; MYERS *et al*, 1995; WEKSLER *et al*, 2006). Em 2006 Weksler e colaboradores, utilizando-se de dados morfológicos, citogenéticos e moleculares dividiram o gênero *Oryzomys* em dez novos gêneros. Como resultado desta mudança, o gênero *Oryzomys* ficou restrito ao “grupo *palustris*”.

Portanto, o gênero *Hylaeamys* é um dos dez novos gêneros descritos por Weksler *et al.* (2006) para o grupo polifilético *Oryzomys* e corresponde ao grupo “*megacephalus*” de vários autores. Possui sete espécies válidas (*H. acritus*, *H. laticeps*, *H. megacephalus*, *H. perenensis*, *H. oniscus*, *H. tatei* e *H. yunganus*) distribuídas na Venezuela, Trinidad, Guianas, Paraguai e no Brasil, em áreas de floresta tropical amazônica, mata atlântica e cerrado. Segundo Reis (2011), as espécies, deste gênero, com registro de localização no território brasileiro são: *Hylaeamys laticeps* (região costeira, desde o estado da Paraíba até São Paulo e leste de Minas Gerais), *Hylaeamys megacephalus* (leste do estado do Amazonas, Roraima, Pará, oeste do Amapá, Mato Grosso, sudoeste do Maranhão, Tocantins, Goiás e Distrito Federal, Mato Grosso do Sul, oeste de Minas Gerais e norte de São Paulo), *Hylaeamys perenensis* (estado do Acre sudoeste do Amazonas), *Hylaeamys yunganus* (estados do Acre, Amazonas, Roraima, Amapá, oeste do Pará, Rondônia e noroeste de Mato Grosso). Entretanto, há uma controvérsia do trabalho de Reis (2011) com diversos autores com relação a distribuição de *Hylaeamys oniscus*, que segundo esses autores teria sua distribuição restrita aos estados de Alagoas, Pernambuco e Paraíba (MAIA, 1990; OLIVEIRA & LANGGUTH, 2004; PERCEQUILLO, 1998) (Figura 2).

Figura 2. Distribuição das espécies de *Hylaeamys* no Brasil.



Fonte: Adaptado de Bonvicino (2008).

Estudos citogenéticos apontam que dentro do gênero *Hylaeamys*, podemos encontrar uma variação no 2n de 48 a 60 (Tabela 1) (SVARTMAN & ALMEIDA,

1992; WEKSLER *et al.*, 1999; VOLOBOUEV & ANISKIN, 2000; ANDRADES-MIRANDA *et al.*, 2000; GEISE & PEREIRA, 2008).

Tabela1. Variação no número diploide (2n) das espécies de *Hylaeamys*, de acordo com Weksler *et al.* (2006).

<b>Hylaeamys Weksler <i>et al.</i>, 2006</b>	<b>2n</b>	<b>Fonte</b>
<i>H.acritus</i> (Emmons & Patton, 2005)	Não descrito	-
<i>H.laticeps</i> (Lund, 1840) (inclui <i>saltator</i> Winge, 1888 e <i>seuanezi</i> Weksler <i>et al.</i> , 1999)	48, 52 e 54	Maia, 1990 Svartman & Almeida, 1992 Weksler <i>et al.</i> , 1999 Geise & Pereira, 2008
<i>H.megacephalus</i> (Fischer, 1814) (inclui <i>capito</i> - Olfers, 1818; <i>cephalotes</i> - Desmarest, 1819; <i>velutinus</i> - J.A. Allen & Chapman, 1893; <i>goeldii</i> - Thomas, 1897 e <i>modestus</i> - J.A. Allen, 1899)	52 e 54	Leitão & Barros, 1977 Barros, 1978 Volobouev & Aniskin, 2000
<i>H.oniscus</i> (Thomas, 1904)	52	Maia, 1990
<i>H.perenensis</i> (J.A. Allen, 1901)	52	Musser <i>et al.</i> , 1998
<i>H.tatei</i> (Musser <i>et al.</i> , 1998)	Não descrito	-
<i>H.yunganus</i> (Thomas, 1902)	58 e 60	Gardner & Patton, 1976 Baker <i>et al.</i> , 1983 Volobouev & Aniskin, 2000

#### 1.4 A Importância da Citogenética em Roedores

Devido a diversidade morfológica e/ou por existir, dentre os roedores, casos em que duas espécies podem apresentar padrões morfológicos com diferenças tão sutis ou até mesmo indistinguíveis – espécies crípticas (FUTUYMA, 1980; DOBIGNY *et al.*, 2002; ROSA *et al.*, 2012), há uma grande dificuldade na identificação taxonômica desses animais. Estes dados mostram a necessidade de se utilizar técnicas mais acuradas para o seu reconhecimento. A citogenética é uma das ciências que vem sendo utilizadas para auxiliar na elucidação de problemas de identificação de espécies junto com a taxonomia.

Uma das mais importantes causas de evolução dos organismos é a ocorrência de mutações genéticas, podendo ocorrer tanto a nível de DNA ou gênico, como também a nível macromolecular ou cromossômico. As alterações cromossômicas mais comuns encontrados, diferenciando cariótipos de roedores, são rearranjos estruturais balanceados dos tipos: fusões e fissões cêntricas, fusões *in tandem*, translocações simples e recíprocas, além de inversões pericêntricas e paracêntricas. Segundo King (1993), esses rearranjos, por terem potencial para ter efeito de heterose negativa no indivíduo heterozigoto, podem levar à especiação cromossômica.

### **1.3 A Citogenética Molecular**

#### **1.3.1. Hibridização *in situ* por fluorescência – FISH**

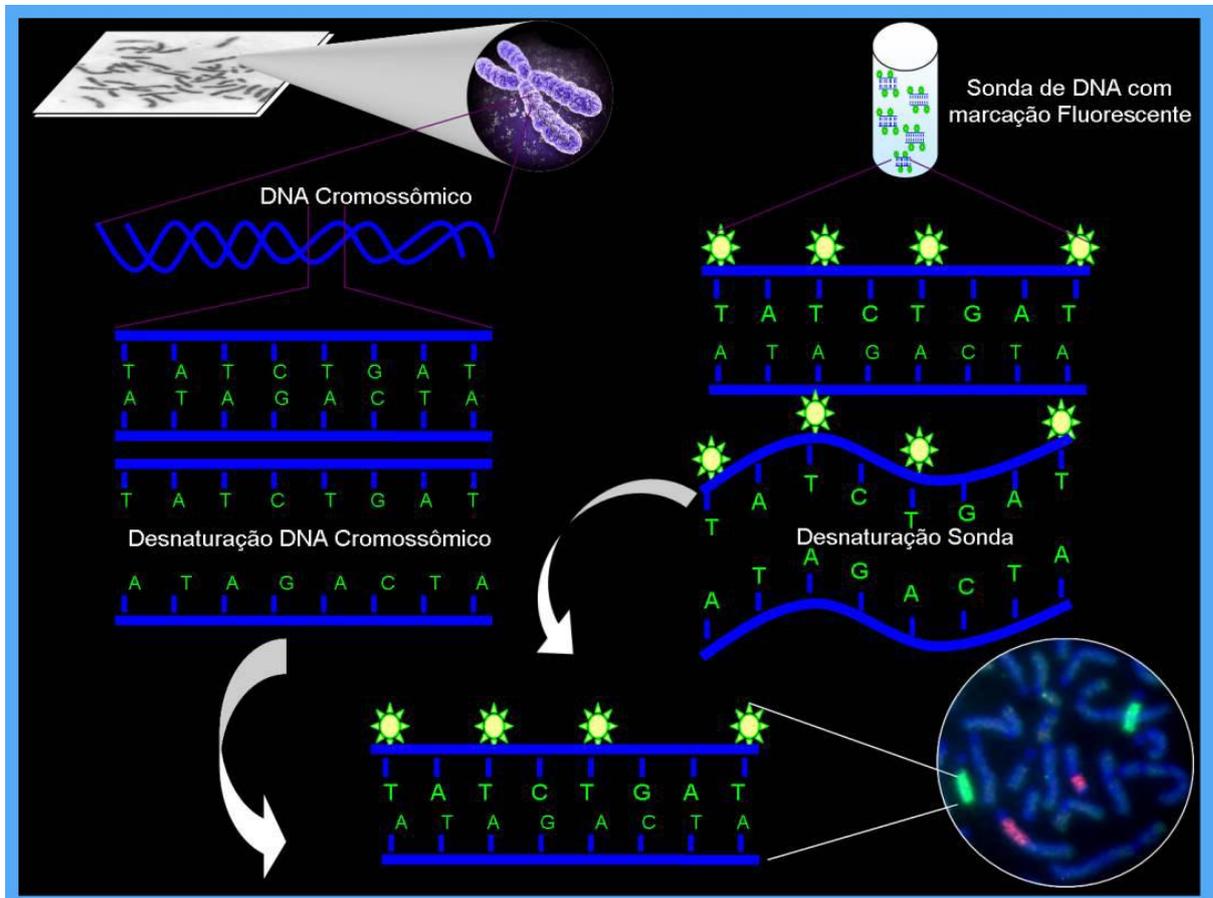
Pode-se dizer que um dos progressos mais importante da citogenética foi o desenvolvimento da técnica de hibridização *in situ* por fluorescência. Graças a essa tecnologia tornou-se possível a detecção de sequências específicas de ácidos nucléicos em cromossomos, células e tecidos. A técnica de FISH vem sendo utilizada como uma ferramenta de grande valia para mostrar alterações que vão além da resolução visual ou de difícil interpretação, ou seja, que dificilmente são identificadas pelos bandeamentos cromossômicos.

Essa técnica foi desenvolvida primeiramente por Pardue & Gall (1969) e de forma paralela e independentemente por John e colaboradores (1969), ambos utilizando marcações radioativas. A utilização dessas marcações radioativas era um dos grandes fatores que tornavam a técnica muito limitada. A substituição pelos corantes florescentes acabou com essa limitação, pois os mesmos dão uma melhor resolução, além de que, são mais seguros para se trabalhar e permitem a utilização simultânea de várias sondas marcadas com corantes fluorescentes de cores distintas. Esse aperfeiçoamento na marcação da sonda contribuiu significativamente para o surgimento da tecnologia atual de hibridização *in situ* com fluorescência (FISH) desenvolvida por Pinkel *et al.* (1986), e com isso, a citogenética sofreu uma nova transformação, comparável ao desenvolvimento das técnicas de bandeamentos na década de 70.

Esta técnica consiste basicamente no pareamento de determinado segmento de DNA ou RNA com uma sequência de nucleotídeos complementar, visando verificar se a célula alvo possui essa sequência e qual a sua exata localização. Para visualizar o segmento de DNA ou RNA hibridizado é necessário que ele esteja

marcado com alguma molécula de fácil identificação, funcionando como uma sonda para detectar a sequência complementar de nucleotídeos (Figura 3).

Figura 3. Principais etapas da técnica de FISH



Fonte: Adaptada de Guerra (2004)

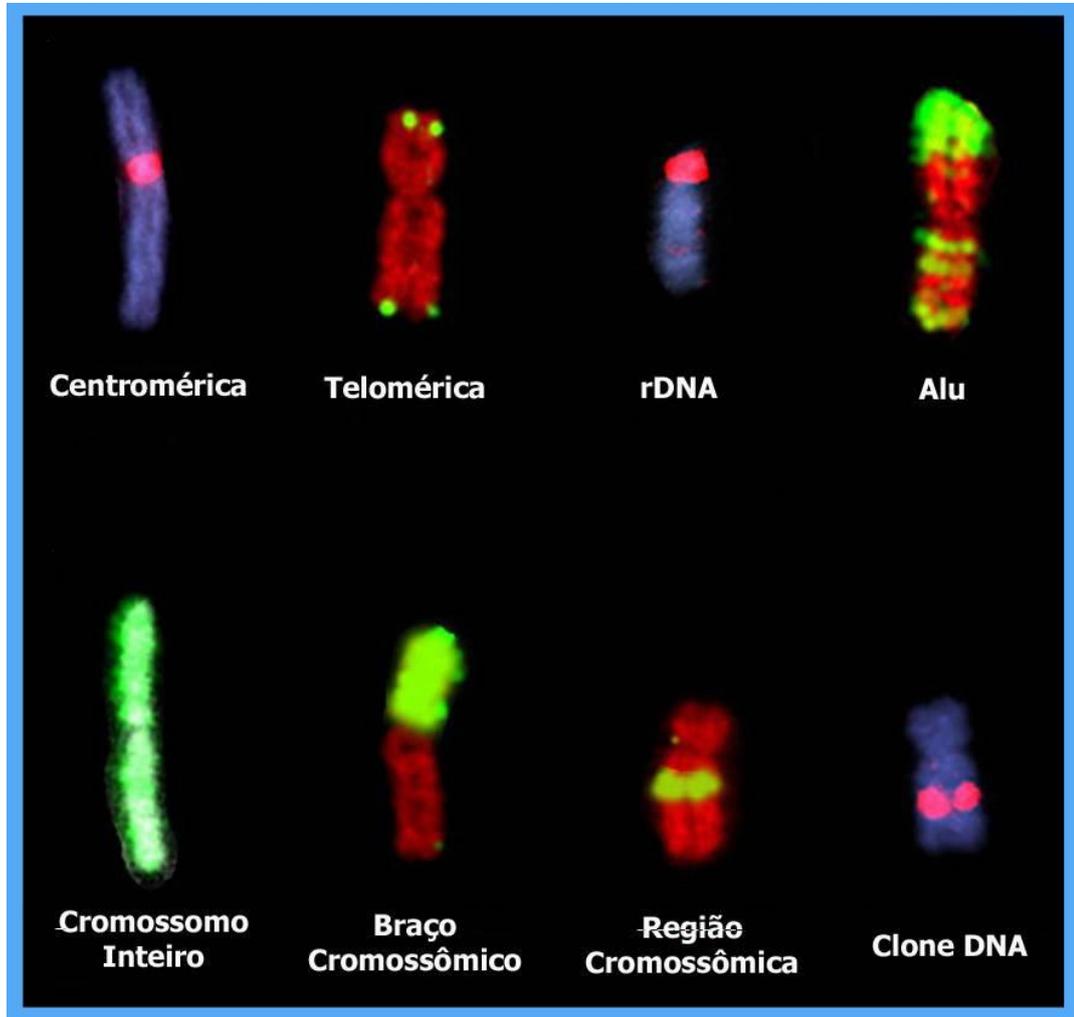
### 1.3.1.1 A Sonda

Como mencionado anteriormente a sonda é qualquer sequência de DNA ou RNA isolada, amplificada e marcada para a sua posterior localização (GUERRA, 2004). Ou seja, é possível fazer sonda de qualquer sequência de DNA desde se consiga isolar essa sequência.

Tudo depende do tipo de sonda que se quer produzir, por exemplo, se o interesse for a produção de sonda de sequência única, haverá a necessidade de construir os primers para isolar a sequência de interesse por PCR a questão neste caso, é conseguir desenhar os primers adequados para isolar a sequência de interesse. Atualmente existem vários tipos de sondas, que podem ser utilizadas na FISH: sondas de sequências repetitivas organizadas em tandem; sondas de dna

repetitivo disperso; sondas de sequências únicas ou de poucas cópias; sondas genômicas; sondas cromossômicas (Figura 4).

Figura 4. Tipos de sondas utilizadas na técnica de FISH.

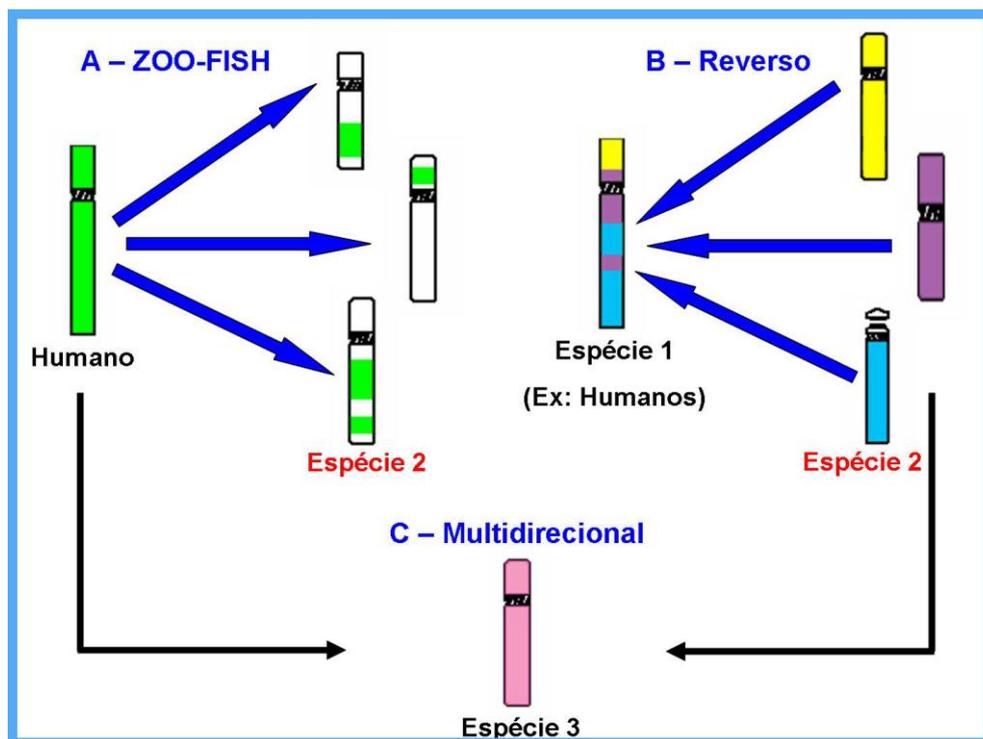


Fonte: Retirado de [www.chrombios.com](http://www.chrombios.com)

### 1.3.1.2 A Pintura Cromossômica

As sondas cromossômicas, que serão o foco deste trabalho, são utilizadas na técnica de pintura cromossômica (chromosome painting), no qual utilizam-se cromossomos inteiros como sonda (Jauch *et al.*, 1992). A pintura cromossômica é uma variação da FISH na qual os cromossomos são “pintados” em diferentes cores por meio de hibridizações (Guerra, 2004). Quando sequências de DNA (sonda) de uma espécie são usadas para hibridizar em cromossomos de outras espécies em experimentos de pintura cromossômica, o procedimento é chamado de ZOO-FISH (JUNIOR & MARTINS, 2004) (Figura 5).

Figura 5. Fundamentos de técnicas baseadas em FISH. (A) ZOO-FISH: sondas cromossomo-específicas, por exemplo de humano, são hibridizadas em outros mamíferos. (B) FISH reverso: permite após o ZOO-FISH a identificação correta dos segmentos que se encontram fragmentados na espécie 2, com uma nova hibridização, onde se utilizam sondas cromossomo-específicas da espécie 2 em hibridização de humanos. (C) FISH multidirecional: sondas de mais de uma espécie, já mapeadas, são aplicadas em uma outra espécie.



Fonte: Adaptado de Oliveira (2001).

A pintura cromossômica comparativa pode ser um processo muito demorado, se for utilizada apenas uma sonda cromossômica por experimento. A utilização de duas ou mais sondas (FISH Multicor ou M-FISH) na mesma metáfase agiliza esse processo, além de gerar economia de amostras, pois você pode analisar diversas sondas em um número menor de metáfases. Para isso, se faz necessário que as sondas sejam coradas com fluorocromos diferentes, para distinguir qual sonda hibridizou com qual região cromossômica. Para tanto, é necessário o uso de marcação combinatória de fluorocromos. A fórmula que determina o número de sondas marcadas com um determinado número de fluorocromos é dado por  $2^N - 1$  (em que  $N$  é igual ao número de fluorocromos), de acordo com o Quadro 2. Os fluorocromos e filtros de fluorescência desenvolvidos nos últimos anos tornaram

possível esse tipo de abordagem, permitindo visualizar vários cromossomos de uma espécie em uma única metáfase de outra espécie.

Quadro 2. Combinação de sondas em proporções iguais utilizando três fluorocromos (FITC, Cy3 e Cy5)

	FITC-dUTP	Cy3 - dUTP	Cy5 - dUTP	COR
SONDA 1	+			
SONDA 2		+		
SONDA 3			+	
SONDA 4	+	+		
SONDA 5		+	+	
SONDA 6	+		+	
SONDA 7	+	+	+	

A pintura cromossômica tem tido numerosas aplicações no mapeamento genômico comparativo de diversos grupos de vertebrados. Em mamíferos de maneira geral vem sendo bastante utilizada, desde primatas (FINOTELO *et al*, 2010; RODRIGUES *et al*, 2011) até morcegos (PIECZARKA *et al*, 2005; AO *et al*, 2007; SOTERO-CAIO *et al*, 2011). Porém, mesmo com toda a diversidade já relatada neste trabalho, os estudos com pintura cromossômica em roedores ainda são incipientes, tendo sido estudados menos de 100 espécies por essa técnica (para revisão, ver Romanenko *et al.*, 2012). Na subfamília Sigmodontinae, por exemplo, dos seus 84 gêneros teve apenas 5 gêneros com algumas espécimes estudadas por pintura cromossômica: Akodon (VENTURA *et al*, 2009; HASS *et al*, 2008), Necromys (HASS *et al*, 2011), Olygoryzomys (HASS *et al*, 2008), Sigmodon ( SWIER *et al* 2009) e Thaptomys (HASS *et al*, 2011). Assim, é notório que os estudos realizados até o momento ainda não são suficientes para entendermos a diversidade dos Sigmodontinae, o que demonstra a importância deste trabalho.

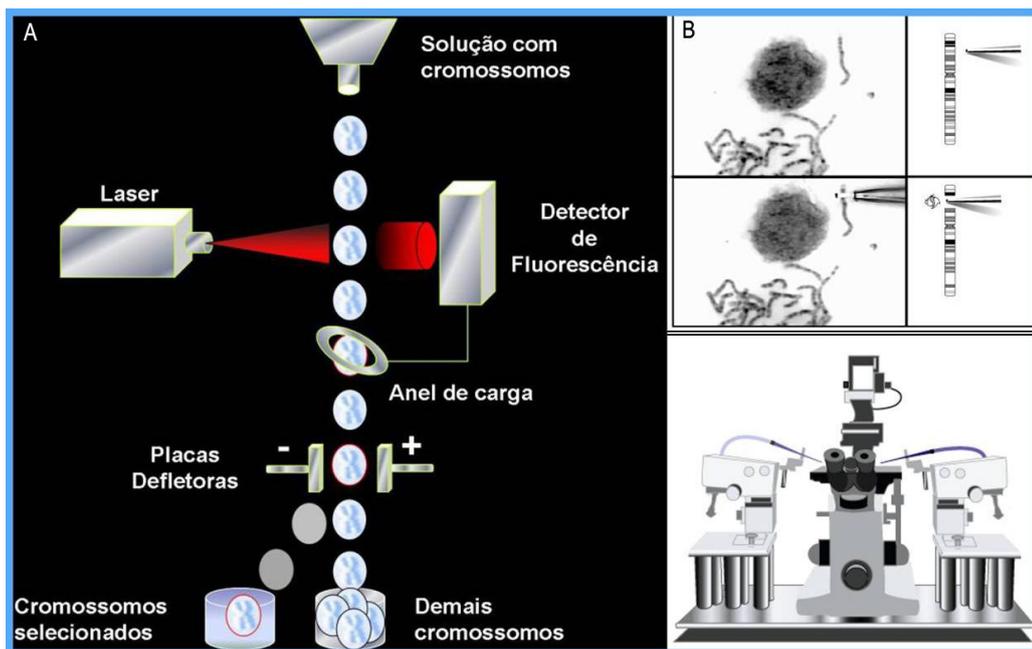
### 1.3.1.3 Obtenção das Sondas para Pintura Cromossômica

Como o presente trabalho utilizará a técnica de pintura cromossômica, onde se faz necessário o uso de sondas de cromossomos inteiros, vamos tomar por foco a obtenção de sonda para a pintura cromossômica. A Citometria de Fluxo e a

técnica de Microdissecção são os principais métodos de produção de sonda para esse tipo de FISH.

Na Citometria de Fluxo os cromossomos são separados e purificados segundo a sua composição de pares de bases após serem corados com um ou mais corantes de DNA fluorescentes (PIECZARKA *et al*, 2005 e NAGAMACHI *et al*, 2013). Nesta técnica, uma solução com cromossomos corados (neste caso é necessário uma boa cultura de fibroblasto) é impelida através de um canal extremamente fino e liberada na forma de gotas minúsculas, cada uma contendo no máximo um cromossomo. Os cromossomos são corados com dois corantes fluorescentes um com afinidade de ligação para pares de base AT (CMA3) e outro para GC (Hoechst). Quando uma gota contendo um cromossomo passa por dois canhões de laser, os feixes de raios lasers atravessa o cromossomo corado fluorescente e a quantidade de luz emitida é medida por um detector de fluorescência (Figura 6-A). Como a quantidade de fluorocromos ligados ao cromossomo é proporcional à sua quantidade de DNA, cromossomos com diferentes quantidades de DNA podem ser distinguidos por sua fluorescência (NAGAMACHI *et al*, 2013).

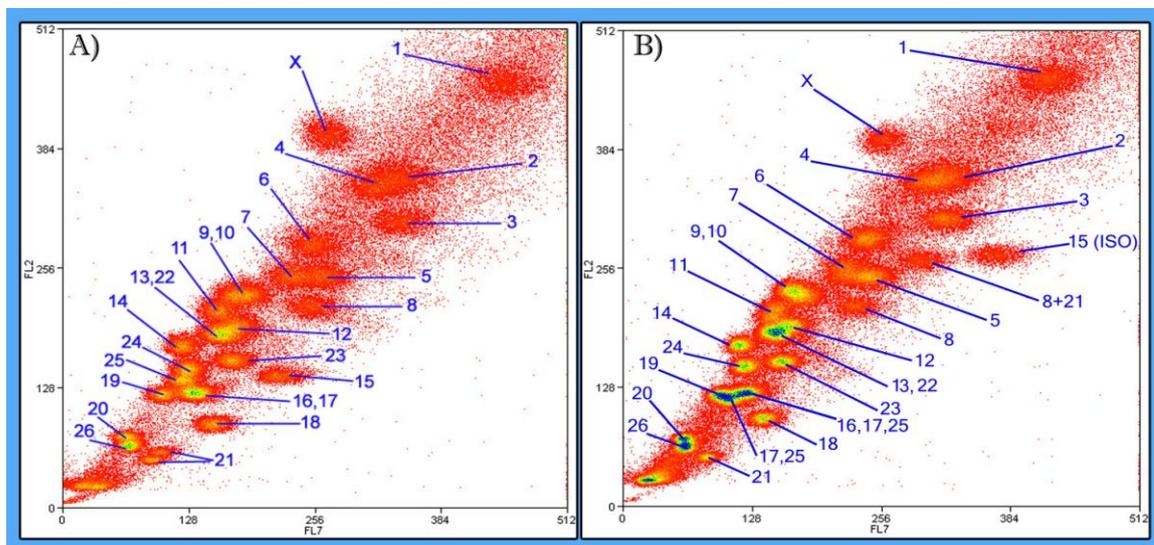
Figura 6. Métodos de obtenção de sondas. Em **A**, esquema da separação de cromossomos por citometria de fluxo (*flow sorting*). Em **B**, esquematização do invertoscópio com equipamento de microdissecção).



Fonte: Amaral, 2003

Segundo Guerra (2004), se o cariótipo contiver cromossomos muito semelhantes na quantidade de DNA, a distinção entre eles poderá ser feita pela sua proporção de AT:GC. Neste caso se faz necessário o uso de uma dupla marcação, utilizando-se simultaneamente um fluorocromo que se liga preferencialmente a regiões ricas em AT (o DAPI ou o Hoechst) e outro com maior afinidade por GC (geralmente a cromomicina A3). Esses fluorocromos emitem luz com comprimentos de onda diferentes, permitindo que a quantidade de cada um seja medida separadamente. Dessa maneira, a proporção de AT:GC daquele cromossomo é estimada, gerando um cariótipo de fluxo, permitindo sua identificação (Figura 7). Feito isso, o citômetro pode ser programado para deslocar determinado cromossomo do fluxo de microgotas e coletá-lo em um recipiente à parte (nesse caso, a técnica é então denominada separação por fluxo). Para isso, a microgota com o cromossomo especificado receberá uma carga elétrica, permitindo posteriormente deslocá-la do fluxo por placas defletoras (Figura 6-A).

Figura 7. Exemplos de cariótipo de fluxo. A) Fêmea de *Hylaeamys megacephalus* ( $2n=54$ ). B) Feto de *Hylaeamys megacephalus* ( $2n=50$ ).



Fonte: Nagamachi *et al*, 2013

Já na Microdissecção, há a dissecação dos cromossomos com uma microagulha de vidro, que possibilita dissecar todo o cromossomo ou regiões específicas dele (Figura 6-B). Nesse caso, determinado cromossomo é isolado de algumas metáfases espalhadas em uma lamínula, utilizando-se um aparelho de micromanipulação. A micromanipulação permite também isolar apenas um braço cromossômico ou mesmo determinada banda C ou G (Senger *et al.*, 1990;

Cannizzaro, 1996). Assim, é possível produzir sondas específicas para regiões cromossômicas bem pequenas. Uma vez isolado um pequeno número de cromossomos iguais, suas diversas sequências de DNA devem ser amplificadas para produzir uma quantidade adequada para hibridização e para estoque. A limitação desta técnica é que as sondas produzidas são sondas de baixa complexidade e fica fraca – é difícil hibridizar em metáfases de outras espécies - não dá pra usar para fazer mapeamento genômico comparativo – servindo apenas para resolver problemas dentro da espécie ou, no máximo entre espécies muito próximas.

#### **1.3.1.3.1 Amplificação da Sonda**

Quando as sondas são grandes, isoladas por esses dois métodos, não temos primers específicos. Assim, para fazer a amplificação e depois, a marcação, a gente tem que usar um primer degenerado (DOP-PCR). Esse primer permite a produção de fragmentos de DNA de 200 pb a 2 Kb, que se liga em qualquer lugar aleatoriamente e vai amplificando a partir de onde se ligou (VERMA & BABU, 1995). Isso significa que pode ficar segmentos sem amplificar porque o primer não se ligou. Por isso, quando você isola cromossomo por citometria de fluxo, por exemplo, é separado uma grande quantidade de cópias do mesmo cromossomo. Dessa forma é mais difícil ficar algum segmento sem amplificar pela DOP-PCR. Mas, quando você isola cromossomo por microdissecção, é impossível você microdissecar, por exemplo 400 cópias do mesmo cromossomo que está na lâmina. Com isso há chances do primer degenerado não se ligar em algum segmento e portanto, não amplificar aquele segmento é muito grande.

#### **1.3.1.3.2 Marcação da Sonda**

Basicamente existem dois tipos de marcação da sonda para a técnica de FISH: a direta e a indireta. Na marcação direta usa-se o dUTP ligado com um fluorocromo (WIEGANT *et al.*, 2000). Já na marcação indireta, quando se usa na reação de amplificação, o dUTP é ligado a um hapteno, tais quais biotina e a digoxigenina, funcionando como um antígeno. Para que o sinal da sonda com marcação indireta seja visualizada, precisa-se fazer a detecção do sinal, que seria uma reação tipo antígeno-anticorpo, onde o anticorpo estará ligado com um fluorocromo.

## **2 OBJETIVO**

### **2.1 Objetivo Geral**

Analisar marcadores cromossômicos em espécies do gênero *Hylaeamys*, fornecendo dados que auxiliem na sua caracterização taxonômica e citogenética.

### **2.1 Objetivo Específico**

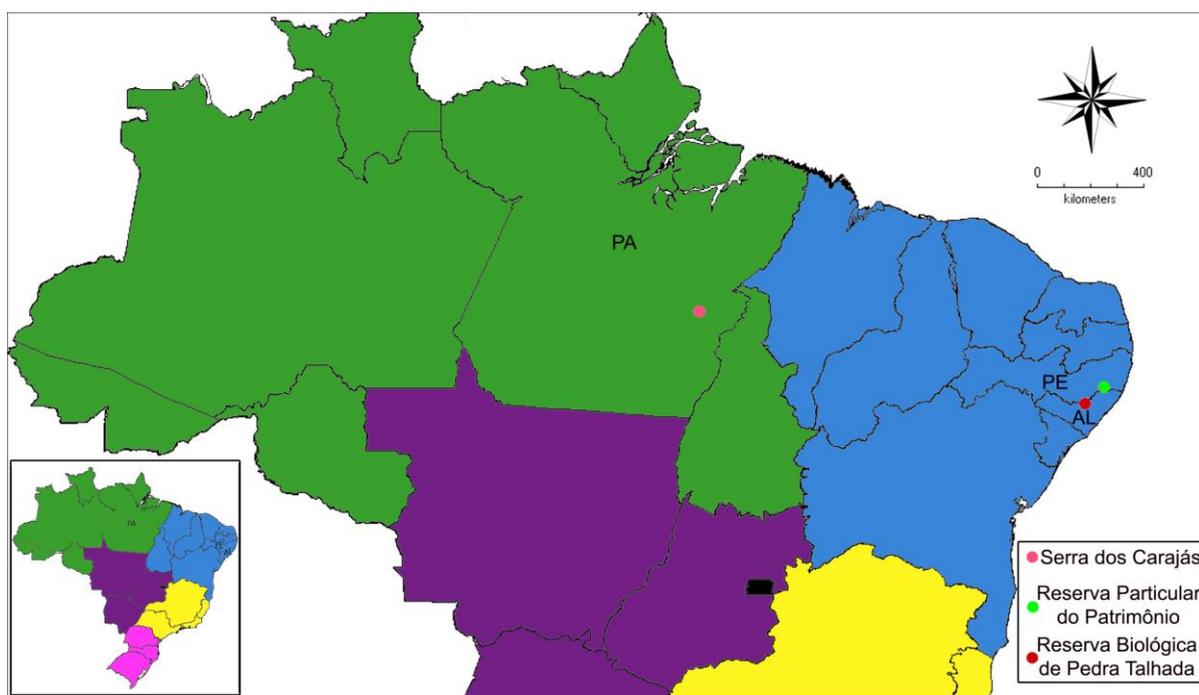
- Caracterizar os cariótipos das espécies *Hylaeamys megacephalus* e *Hylaeamys oniscus*;
- Estabelecer as homeologias entre os cariótipos.
- Montar um quadro comparativo entre as espécies evidenciando as possíveis reorganizações cromossômicas.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 MATERIAL

Neste trabalho foram trabalhadas amostras de *Hylaeamys megacephalus* (HME) e *Hylaeamys oniscus* (HON). Constitui a amostra de HME: 18 animais adultos (8 machos e 10 fêmeas) e um feto coletadas na Serra dos Carajás, município de Parauapebas/PA (6° 4' 15" Sul, 49° 54' 15" Oeste). Foram coletados ainda, para a produção deste trabalho quatro indivíduos da espécie *Hylaeamys oniscus* (dois casais), onde um casal foi coletado na [Reserva Particular do Patrimônio Natural](#) Frei Caneca (Jaqueira/PE) (8° 44' 20" Sul, 35° 47' 36" Oeste) e o outro casal na Reserva Biológica de Pedra Talhada (Quebrangulo/AL) (9° 19' 24" Sul, 36° 19' 24" Sul, 36° 28' 28" Oeste) (Figura 8).

Figura 8. Mapa dos locais de coleta, tanto de *Hylaeamys megacephalus* como de *Hylaeamys oniscus*.



#### 3.2 MÉTODOS

##### 3.2.1 Obtenção direta de Cromossomos Metafásicos

A obtenção dos cromossomos metafásicos foi através do Método Direto, pela técnica de Ford & Hamerton (1956), com modificações.

- O animal foi colocado no interior de uma cuba anestésica e sacrificado por inalação de vapores de éter;

- Em seguida foi extraído o fêmur esquerdo e colocado em uma placa de Petri contendo 5 mL de uma solução de Hanks, pH 7,0;
- Feito isso, as epífises foram cortadas e a medula extraída por jatos de solução isotônica de Hanks, utilizando-se uma seringa de vidro de 5 mL;
- Após a separação celular, o material foi colocado em um tubo de centrifuga, homogeneizado e centrifugado a uma velocidade de 1000 rpm durante 10 minutos;
- O sobrenadante foi desprezado e o sedimento, ressuspendido suavemente em 10 mL de solução hipotônica de Cloreto de Potássio (KCl);
- Acrescentou-se 1mL de fixador Carnoy (3 mL de metanol para 1 mL de ácido acético) e, com uma pipeta Pasteur, o material foi homogeneizado;
- O material foi novamente centrifugado a 1000 rpm por 10 minutos, o sobrenadante descartado e o sedimento ressuspensado com pipeta Pasteur em 5 mL de fixador Carnoy (3:1). Este procedimento foi realizado por mais duas vezes.

### **3.2.2 Obtenção via Cultura de Células de Cromossomos Metafásicos**

Alguns espécimes tiveram a preparações cromossômicas obtidas a partir de cultura primaria de fibroblastos, segundo Egozcue (1971).

- Retirou-se biopsias de tecidos (orelha, cauda, pulmão, feto ou placenta) coletadas em campo com grande assepsia local e colocadas em meio de cultura reforçado com antibióticos e assim mantidos até serem transportados ao laboratório;
- Na capela de fluxo laminar, o tecido foi então colocado em uma placa de Petri contendo meio DMEM com 20% de soro bovino fetal (SBF). A biopsia foi picotada com o auxílio de uma pinça e uma tesoura estéreis, em pequenos fragmentos de aproximadamente 1 mm<sup>3</sup>;
- Os fragmentos foram colocados na parte inferior de uma garrafa de cultura, previamente umedecida com SBF, com o auxílio de uma pipeta Pasteur. A garrafa foi deixada em repouso por 30 minutos para a fixação das biopsias, e em seguida foram acrescentados 2,5 mL de meio completo na parede superior da garrafa;

- Após cerca de três a cinco dias, foi verificado o crescimento da cultura. Ocorrendo proliferação celular, mais 3 mL de meio foram adicionados;
- Para a obtenção das células em metáfase foi adicionado às culturas 0,5 mL de colchicina e encubada a 37° C durante 30 à 40 minutos;
- O meio foi então transferido para um tubo de centrifuga e as garrafas tripsinizadas, recolhendo-se todo o sobrenadante. Foram acrescentados 10 mL de solução hipotônica de KCl 0,075 M, a suspensão homogeneizada e mantida a 37° C por 12 minutos;
- Foi acrescentado 1 mL de fixador (3:1) e a suspensão foi novamente homogeneizada e centrifugada a 1000 RPM por 10 minutos;
- O sobrenadante foi desprezado e acrescentado mais 6 mL de fixador no tubo, homogeneizado e centrifugado novamente. Este último procedimento foi repetido por mais duas vezes. O material foi armazenado com fixador no freezer.

### **3.2.3 Preparo das Lâminas**

As lâminas foram rigorosamente limpas com detergente neutro, colocadas em recipientes com água destilada e guardadas na geladeira. No momento de serem utilizadas, foram lavadas novamente com água destilada e sabão neutro, porém foram limpas também com álcool a 70%. Após isso, foram pingadas duas gotas do material, previamente ressuspendido, em cada lâmina e deixadas secarem no banho-maria a 60°C. Em seguida elas foram envelhecidas em estufa a 37°C, pelo tempo mínimo de 72h, para em seguida serem analisadas e posteriormente submetidas a bandeamentos cromossômicos.

### **3.2.4 Técnicas de Citogenética Clássica**

#### **3.2.4.1 Coloração Convencional**

Para análise do número e morfologia cromossômica, as lâminas foram submetidas à coloração com corante Giemsa, diluído em tampão fosfato (0,2M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> + 0,2M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), pH 6,8, na proporção de 1:30, durante 10 minutos. Passado o tempo, as lâminas foram lavadas com água destilada e secadas ao ar.

#### **3.2.4.2 Bandeamentos Cromossômicos**

##### **3.2.4.2.1 Bandeamento G**

A técnica foi realizada de acordo com Sumner *et al.* (1971), com modificações:

- Foi preparada uma solução de 2xSSC (0,3 M NaCl + 0,03 M Na<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>), e mantida em banho-maria a 60°C;
- As lamínas com preparações citológicas foram mergulhadas no 2xSSC e mantidas em contato com a solução por cerca de 1 a 5 minutos, lavadas em seguida com água destilada, e postas para secar ao ar;
- Em seguida as lâminas foram coradas com solução corante Wright (0,125 g de corante, diluído em 50 mL de Metanol), diluído em tampão fosfato, pH 6,8 na proporção 3:1, durante 2 minutos e 30 segundos. Após o tempo, as lâminas foram lavadas com água destilada, postas para secar ao ar e submetidas à análise no microscópio;

#### **3.2.4.2.2 Bandeamento C**

A técnica realizada foi baseada em Sumner (1972), com algumas modificações:

- Preparações citológicas foram incubadas em solução de hidróxido de bário (Ba (OH)<sub>2</sub> 8H<sub>2</sub>O) 5%, em banho-maria a 60°C durante 2 minutos;
- Após este tempo, as lâminas foram mergulhadas em solução de ácido clorídrico (HCl) 0.2 N, 60°C durante 1 minuto e lavadas em água destilada;
- Em seguida, as lâminas foram mergulhadas em solução de 2XSSC, 60°C por 40 minutos e lavadas em água destilada;
- A coloração foi feita com corante Giemsa (solução de uso) durante 40 minutos, seguida de lavagem em água destilada, secagem ao ar e análise ao microscópio;

#### **3.2.5 Técnica de Citogenética Molecular / Hibridização In Situ Fluorescente (FISH)**

A técnica de FISH será adaptada de Pinkel *et al.*, 1986.

##### **3.2.5.1 Preparação da Lâmina**

As lamínas com o material citológico foram mantidas na estufa a 37°C por 3 dias. Em seguida, a lamina foi exposta à uma solução de pepsina (50 ml de HCl 4,8 N para 0,5 ml de pepsina) por 3 minutos, posteriormente passou por uma lavagem em três soluções de 2xSSC por 1 minuto cada. Os cromossomos foram desidratados

com etanol (série de 2x no etanol a 70% 2 minutos em cada; 2x no de 90% 2 minutos em cada e 1x no de 100% por 10 minutos). Posteriormente foi levada para a estufa a 60°C, por aproximadamente 1 a 3 horas, dependendo da sensibilidade do material.

#### **3.2.5.2 Desnaturação cromossômica**

Após ser submetida ao procedimento acima, a lamina foi imersa em uma solução de formamida 70% (70 ml de formamida e 30 ml de 2xSSC), durante 1 minuto, a 60°C. Para interromper a ação da formamida 70%, passado o tempo de 1 minuto, a lamina foi colocada em uma solução de etanol 70% gelado por 5 minutos. Após, o material foi novamente desidratado em etanol (série de 1x no etanol a 70% por 2 minutos; 2x no de 90% por 2 minutos em cada e 1x no de 100% por 10 minutos).

#### **3.2.5.3 Hibridização**

Paralelamente ao processo de desnaturação cromossômica, a solução contendo as sondas foi colocada em banho-maria a 70°C por 12 minutos e em seguida foi acondicionada em estufa à 37°C por aproximadamente 30 minutos (pre-annealing). Depois da desnaturação cromossômica e do pre-annealing, a sonda foi pingada na lamina com o material citológico colocando uma lamínula sobre ela e vedada com cola PVC. Posteriormente as laminas foram incubadas em estufa a 37°C durante três dias.

#### **3.2.5.4 Lavagem de Estringência**

Passado os três dias, as laminas foram expostas à soluções acondicionadas em banho-maria a 45 °C (2x na formamida 50% por 5 minutos cada; 2x no 2xSSC; 1x no 4xSSC/Tween 0,2% por 5 minutos) para a retirada de marcações inespecíficas, resultados de pareamentos inespecíficos.

#### **3.2.5.5 Detecção de sondas**

As laminas que estavam com sondas marcadas com biomarcador diretamente, passaram por três soluções de 4xSSC/Tween 0,2% por 2 minutos (cada) em temperatura ambiente, onde em seguida foi pingado 8µl de solução DAPI com anti-fade e foram cobertas com uma lamínula e selada com esmalte.

Porém, as laminas com sondas marcadas com um biomarcador de forma indireta passaram pela detecção desse biomarcador. Foi pingada nas laminas contendo o material citológico uma solução de detecção que dependerá do biomarcador utilizado. Por exemplo, se a sonda estava marcada com biotina foi

utilizada uma solução contendo 0,2 µl de avidina Cy3 mais 200 µl de 4xSSC/Tween 0,2% ou uma solução contendo na mesma proporção anterior avidina FITC. Após colocar a solução de detecção nas lâminas, estas foram cobertas com lamínula plástica e deixadas em câmara úmida a 37°C por 30 minutos. Após, foi retirada a lamínula e as lâminas passaram pelas três lavagens em 4xSSC/Tween 0,2% por 2 minutos (cada) em temperatura ambiente. Após foi pingado 8 µl de solução DAPI com anti-fade e foram cobertas com uma lamínula e selada com esmalte.

### **3.2.6 Análise cromossômica e Montagem dos Cariótipos**

As lâminas foram analisadas ao microscópio óptico Zeiss Axiostar, com oculares de 10X e objetivas de 10X, 40X e 100X, seguindo a iluminação de Köeler. Em seguida, foram escolhidas as melhores metáfases, para serem fotografadas digitalmente. As metáfases de bandeamento clássico foram capturadas em um microscópio Olympus, e montadas de acordo com a morfologia e em ordem decrescente de tamanho com o sistema de captura de imagem e montagem de cariótipos SpectraView® da Applied Spectral Imaging (ASI). Para a análise da FISH, as imagens digitais foram obtidas em um microscópio Axiophot, através de uma câmera CCD Zeiss AxioCam. Após a análise das imagens foi possível mapear o genoma do *Hylaeamys megacephalus* (2n=54) no cariótipo da espécie em estudo, o que permitiu a análise dos rearranjos ocorridos entre as espécies.

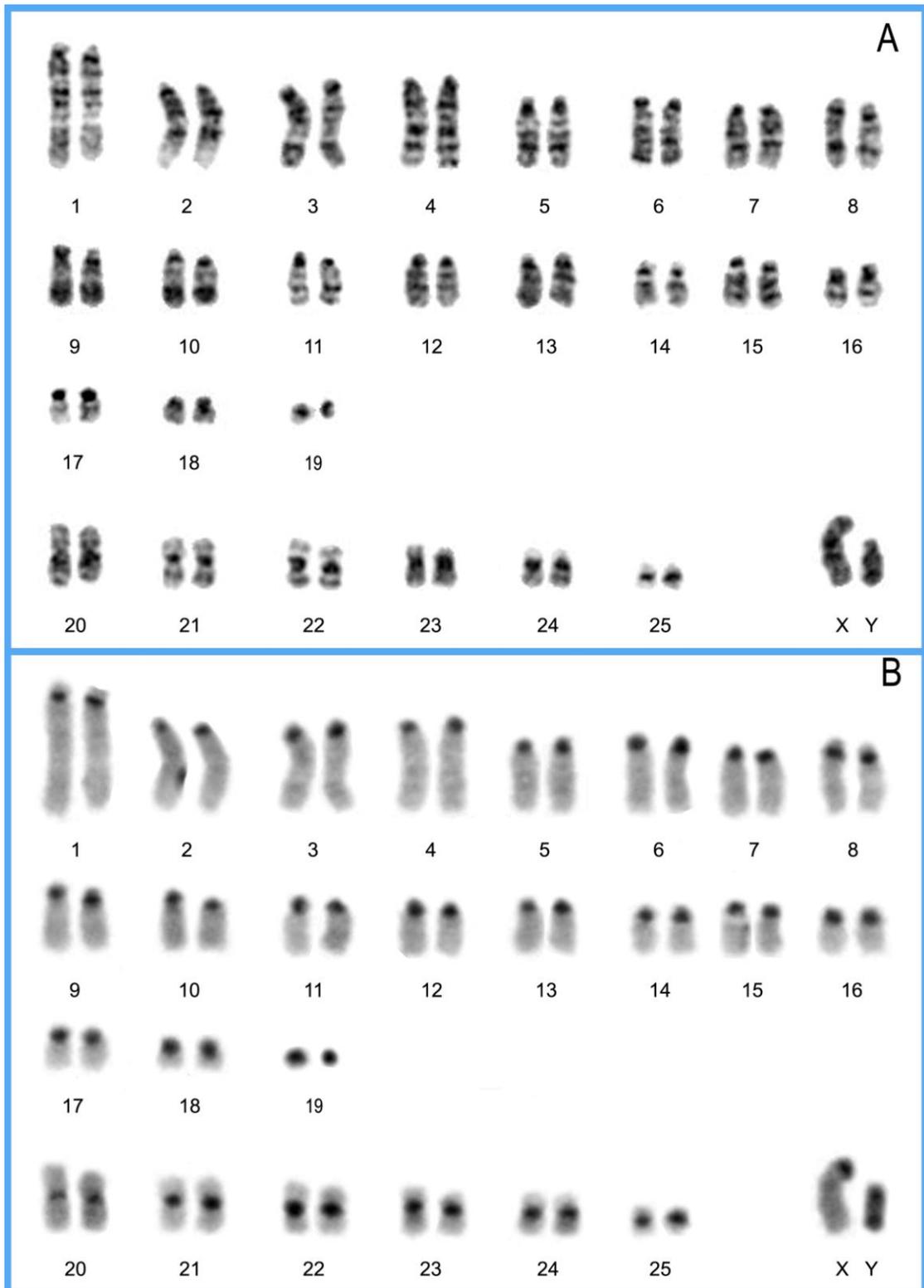
## **4. RESULTADOS**

Todas as amostras de *Hylaeamys megacephalus* coletadas na Serra dos Carajás, município de Parauapebas/PA foram analisadas por citogenética clássica. O que resultou na co-autoria de um artigo científico (Apêndice), já publicado. No presente artigo houve a produção de sondas cromossômicas inteiras, no Centro de Recurso para Gênômica Comparativa do Departamento de Medicina Veterinária, da Universidade de Cambridge (UK). Essas sondas foram produzidas, por Citometria de Fluxo, a partir de cultura de fibroblastos, de dois espécimes de HME, uma fêmea adulta com 2n=54/NF=62 e outro, um feto, com 2n=50/NF=62. Essas sondas foram utilizadas no mapeamento de *Cerradomys langguthi* (2n=46/NF=62) e foram utilizadas para a conclusão do presente trabalho.

Já os espécimes de *Hylaeamys oniscus*, apresentam 2n= 52/NF=62, sendo 38 cromossomos autossômicos acrocêntricos e 12 cromossomos autossômicos de dois braços. O cromossomo X é acrocêntrico de tamanho grande e o Y é

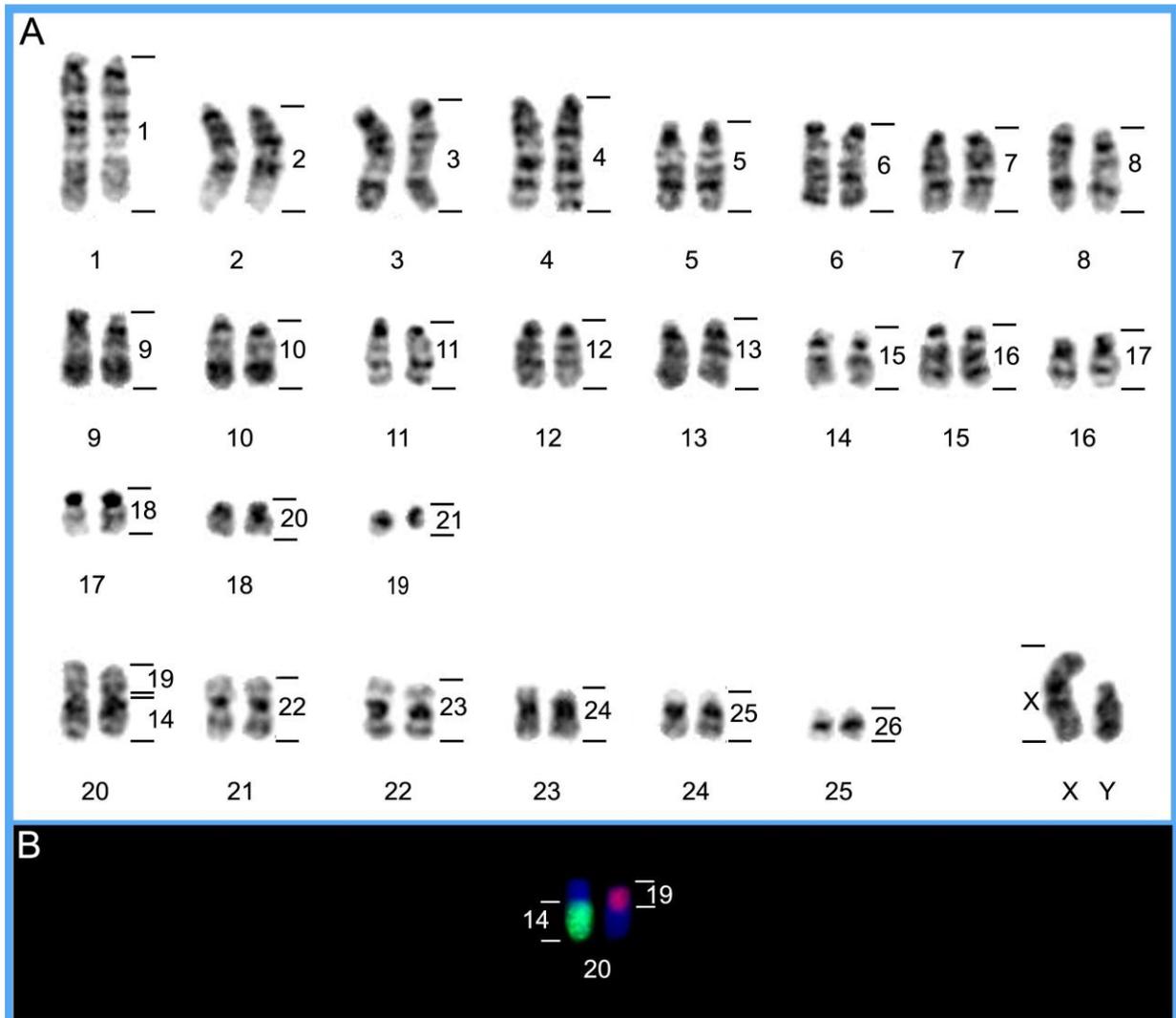
acrocêntrico médio. O bandeamento G (Figura 9 - A) permitiu o pareamento de todos os cromossomos. O padrão de bandeamento C (Figura 9 - B) mostra que a heterocromatina constitutiva (HC) está presente na região centromérica dos 25 pares autossômicos. O cromossomo X também se apresentou heterocromático na região centromérica, sendo o cromossomo Y quase todo heterocromático.

Figura 9. Padrões de bandeamento G (A) e padrões de bandeamento C (B) em *Hylaeamys oniscus* ( $2n=52/NF=62$ )



Os 24 picos de *Hylaeamys megacephalus* (HME) foram todos hibridizados em metáfases de *H. oniscus* (HON). Os resultados mostram que todos os 24 picos mantiveram sintenia conservada no cariótipo de HON (Figura 10A), sendo que 22 picos hibridizaram em cromossomos inteiros e dois picos (HME 14 e 19) hibridizaram em associação, correspondendo ao par 20 de HON (Figura 10B).

Figura 10. *Hylaeamys oniscus*: A – Bandeamento G mapeado com picos de HME; B – Hibridização dos picos que correspondem ao cromossomos 14 e 19 de HME.



## 5. DISCUSSÃO

Como já mencionado neste trabalho, os estudos com pintura cromossômica em roedores ainda são insuficientes se compararmos o número de espécies que a ordem possui. Romanenko *et al.* (2012) visando entender a evolução cromossômica da ordem Rodentia destacaram tendo sido estudados menos de 100 espécies por essa técnica. Nagamachi *et al.* (2013) adicionaram a esses grupos de espécies estudados as espécies *Hylaeamys megacephalus* e *Cerradomys langguthi*.

Em nosso trabalho foram estudados comparativamente os cariótipos de *Hylaeamys megacephalus* (HME) e *Hylaeamys oniscus* (HON), utilizando técnicas de citogenética clássica e molecular. A utilização conjunta dessas técnicas nos permitiu determinar as características cromossômicas das espécies em estudo, permitindo assim uma análise comparativa das homeologias existentes entre as duas espécies do gênero *Hylaeamys*.

O cariótipo de *H. oniscus* corrobora com o cariótipo apresentado por Maia (1990), apresentando similaridade com o descrito por Volobouev & Aniskin (2000) para espécimes de *Hylaeamys megacephalus* da Amazônia peruana com relação ao número diploide e fundamental. Os resultados obtidos por bandeamentos clássicos (Bandeamentos G e C) no presente trabalho são pioneiros para HON não possibilitando, desta forma, qualquer análise comparativa. No entanto nos permite discordar com Musser *et al.* (1998) quando os mesmos inferem que *H. oniscus* seria sinonímia de *H. laticeps* (HLA), pois ao compararmos nossos resultados com os já descritos na literatura para *H. laticeps* (SVARTMAN & ALMEIDA, 1992; GEISE & PEREIRA, 2008) e analisarmos o padrão de bandeamentos bem como a morfologia dos cromossomos e número diplóide verifica-se que trata-se de duas espécies distintas. O cariótipo proposto por Svartman & Almeida (1992) para HLA (2n=54 e NF=62) possui 42 cromossomos autossômicos acrocêntricos e 10 cromossomos autossômicos de dois braços, o assemelha-se com o cariótipo descrito para HME proposto por Nagamachi *et al.* (2013). Já no trabalho de Geise & Pereira (2008), houve a identificação apenas do número diploide (2n=48), o que difere não só do HON proposto nesse trabalho, bem como do proposto por Svartman & Almeida (1992). O mesmo acontece ao compararmos o cariótipo de *H. yunganus* descrito por Volobouev e Aniskin (2000), onde possui o número diploide (2n=58), com 50 cromossomos autossômicos acrocêntricos e 6 cromossomos autossômicos de dois braços o que o difere de *Hylaeamys oniscus*.

Na literatura ainda não se tem muita informação sobre *H. perenensis* tendo apenas o seu  $2n$  (52) descrito. Com relação a *H. tatei* e *H. acritus*, não podemos sequer comparar a nível de número diplóide por não existir na literatura essas informações.

Ao compararmos o cariótipo de *Hylaeamys oniscus* com o cariótipo de *Hylaeamys megacephalus* ( $2n=54$ ) descrito por Nagamachi *et al.* (2013), verifica-se que a diferença do número diploide deve-se a fusão dos pares 19 e 14 de HME resultando, em *H. oniscus*, um par de cromossomos metacêntrico de tamanho médio (par 20). Essa fusão só foi possível ser detectada com certeza, graças à utilização das sondas de cromossomo total de *Hylaeamys megacephalus* (NAGAMACHI *et al.*, 2013).

Ao compararmos o cariótipo de HON com o de *Cerradomys langguth* (CLA) mapeado com sondas de HME (NAGAMACHI *et al.*, 2013), verificamos que CLA também apresenta a associação 19/14 porém, com inversão (19/14/19) e associado com vários outros cromossomos de HME (5/19/14/19/5/[16,17]/[13,22]/3/[13/22]/20) formando o par 1, o maior cromossomo de CLA. Na análise comparativa entre os cariótipos de HON e CLA em relação ao HME, verificamos que os cromossomos 15, 18, 23, 24, 25 e 26 de HME são compartilhados na forma livre entre HON e CLA, porém, em CLA os pares 23 a 26, que são de dois braços em HME e HON, são acrocêntricos em CLA, mostrando a ocorrência de inversões pericêntricas diferenciando o cariótipo de CLA. Os cromossomos HME 15 e 18, que correspondem aos cromossomos HON 14 e 17 e CLA 12 e 16, são compartilhados entre as 3 espécies sem qualquer rearranjo visível. É interessante fazer o mapeamento de outras espécies da tribo Oryzomyini (Sigmodontinae) para verificar algumas questões que surgiram da análise comparativa entre HME, HON e CLA: 1) Se esses dois pares compartilhados sem nenhum rearranjo constitui uma característica simplesiomórfica ou sinapomórfica para a tribo; 2) Se a forma de dois braços dos pares 23 a 26, compartilhados por HME e HON é primitiva ou derivada em relação à forma acrocêntrica encontrada em CLA; 3) Se a associação 19/14 presente em HON e compartilhada com inversão por CLA é primitiva ou derivada. Essas questões vão poder ser resolvidas ao longo do tempo, com o mapeamento das diferentes espécies de Tribo Oryzomyini e de outras Tribos da subfamília Sigmodontinae.

Este trabalho junto com Nagamachi *et al.* (2013), é um marco para estudos de filogenia cromossômica do gênero *Hylaeamys*. Para isso se faz necessário o mapeamentos das outras cinco espécies de *Hylaeamys*, para que se possa entender a diversificação cromossômica das diferentes espécies deste gênero.

## 6. CONCLUSÃO

Ao término desse trabalho, foi possível chegarmos a algumas conclusões a respeito da caracterização de *Hylaeamys megacephalus* (HME) e *Hylaeamys oniscus* (HMO):

1. A diferença nos cariótipos das espécies deve-se a uma fusão do cromossomo 19 e 14 de HME, o que resultou em um par de cromossomos metacêntrico de tamanho grande em HON;
2. A análise comparativa entre HME, HON e CLA nos fez entender a importância de fazer o mapeamento de outras espécies da tribo Oryzomyini (Sigmodontinae) para elucidar encontrar as homeologias cromossômicas e entender os mecanismos de rearranjos que ocorreram diferenciando os cariótipos das diferentes espécies.
3. Para entendermos a filogenia cromossômica do gênero *Hylaeamys*, faz-se necessário o mapeamentos das outras cinco espécies do gênero.

## 7. REFERÊNCIAS

- ANDERSON, S. **Introduction to Rodents**. In: Recent Mammals of the world. A Synopse of Families. Anderson S & Jones jr. JK. The Ronald Press Company, New York, p. 206 – 209. 1967.
- ANDRADES-MIRANDA, J.; ZANCHIN, N. I. T.; OLIVEIRA, L. F. B.; LANGGUTH, A. R.; MATTEVI, M. S. Cytogenetic studies in nine taxa of the genus *Oryzomys* (Rodentia, Sigmodontinae) from Brazil. **Mammalia** 65: 461-472. 2000.
- AO, L.; MAO, X.; NIE, W.; GU, X.; FENG, Q.; WANG, J.; SU, W.; WANG, Y.; VOLLETH, M.; YANG, F. Karyotypic evolution and phylogenetic relationships in the order Chiroptera as revealed by G-banding comparison and chromosome painting. **Chromosome Research**, 15: 257-267. 2007.
- BONVICINO, C. R. **Guia dos Roedores do Brasil, com chaves para gêneros baseadas em caracteres externos** /C. R. Bonvicino, J. A. Oliveira, P. S. D'Andrea. - Rio de Janeiro: Centro Pan-Americano de Febre Aftosa - OPAS/OMS, 2008.
- BONVICINO, C. R & ALMEIDA, F.C. Karyotype, morphology and taxonomic status of *Calomys expulsus* (Rodentia: Sigmodontinae). **Mammalia** 64: 339-351.2001.
- CANNIZZARO, L. A. Chromosome microdissection: a brief overview. **Cytogenet. Cell Genetic.**, 74:157-160. 1996.
- COLBERT, E. H. **Rodents and Rabbits. In: Evolution of vertebrates: a history of back boned animals through time**. New York, John Wiley and Sons. (2): 321-334.1969.
- 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** 71: 187-194. 2007.
- DAWSON, M. R. **Fossil History of the families of recent mammals**. In: Recent Mammals of the world. A Synopse of Families. Anderson, S. & Jones jr., J.K. The Ronald Press Company, New York, (1): 12-53. 1967.

DOBIGNY, G.; ANISKIN, V.; VOLOBOUEV, V. Explosive chromosome evolution and speciation in the gerbil genus *Taterillus* (Rodentia, Gerbillinae): a case of two new cryptic species. **Cytogenetic and Genome Research** (96): 117-124. 2002.

EGOZCUE, J. **Técnicas em Citogenética**. Editorial Espaxs. Barcelona. p.144. 1971.

EISEMBERG, J. F. **The Grandorder Archonta**. In: The Mammalian Radiations an Analysis of Trends in Evolution, Adaptation and Behavior. The Athlone Press Ltd, London (1): 144 – 170. 1983.

EISENBERG, J. F & REDFORD, K. H. **Mammals of the Neotropics, the central neotropics: Equador, Peru, Bolívia, Brasil**. Universisty of Chicago Press. (3): 609p. 1999.

FINOTELO, L. F. M.; AMARAL, P. J. S.; PIECZARKA, J. C.; OLIVEIRA, E. H. C.; PISSINATTI, A.; NEUSSER, M. Chromosome phylogeny of the subfamily Pitheciinae (Platyrrhini, Primates) by classic cytogenetics and chromosome painting. **BMC Evolutionary Biology** 10: 10-189. 2010.

FORD, C. E & HAMERTON, J. L. A colchicine hypotonic citrate squash sequence for mammalian chromosome. **Stain Technology** (3): 247-251. 1956.

FUTUYMA, D. J & MAYER, G. C. Non-allopatric speciation in animals. **Systematic Zoology**, (29): 254-272, 1980.

GEISE, L & PEREIRA, L. G. Rodents (Rodentia) and marsupials (Didelphimorphia) in the municipalities of Ilhéus and Pau Brasil, state of Bahia, Brazil. **Check List** 4(2): 174–177, 2008.

GUERRA, M. **FISH – Conceitos e Aplicações na citogenética**. Ribeirão Preto. Sociedade Brasileira de Genética, 184p. 2004.

HARTENBERGER, J. L. **The Order Rodentia: Major Question on Their Evolutionary Origin, Relationships and Suprafamilial Sytematics**. Montpellier, Institut des Sciences de l'Evolution, p.33. 1981.

HASS, I.; MÜLLER, S.; ARTONI, R. F.; SBALQUEIRO, I. J. Comparative chromosome maps of Neotropical rodents *Necomys lasiurus* and *Thaptomys nigrita*

(Cricetidae) established by ZOO-FISH. **Cytogenetic and Genome Research**, 135: 42–50. 2011.

HASS, I.; SBALQUEIRO, I. J.; MÜLLER, S. Chromosomal phylogeny of four Akodontini species (Rodentia, Cricetidae) from Southern Brazil established by Zoo-FISH using *Mus musculus* (Muridae) painting probes. **Chromosome Research**, 16: 75-88. 2008

JAUCH, A.; WIENBERG, J.; STANYON, R.; ARNOLD, N.; TOFANELLI, S.; ISHIDA, T.; CREMER, T. Reconstruction of genomic rearrangements in great apes and gibbons by chromosome painting. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 89: 8611-8615. 1992.

JOHN, H.; BIRNSTIEL, M.; JONES, K. RNA: DNA hybrids at the cytogenetical level. **Nature**, 223: 582-587. 1969.

JUNIOR, P. M. G & MARTINS, C. **FISH – conceitos e aplicações na citogenética** / Organizado por Marcelo Guerra – Ribeirão Preto : Sociedade Brasileira de Genética, 2004. 184p. 2004

KING M. **Species evolution: The role of chromosome change**. Cambridge University Press: Cambridge. 1993

LANDRY, JR. S.O. **The Rodentia as Carnicores**. Q. Ver. Biol. 45: 351 – 372. 1970

MAIA V. Karyotype of *Oryzomys capito oniscus* (Rodentia), from northeastern Brazil. **Revista Brasileira de Genética**, 13 (2): 377-382. 1990.

MATTEVI, M. S & ANDRADES-MIRANDA, J. Estudos Genéticos nos Roedores da Tribo *Oryzomyini*. In: Freitas, T. R. O.; Vieira, E; Pacheco, S; Christoff, A. (Org.). **Mamíferos do Brasil: Genética, Sistemática, Ecologia e Conservação**. São Carlos, SP: Suprema Gráfica e Editora, p. 107-138. 2006.

MYERS, P.; LUNDRIGAN, B.; TUCKER, P. K. Molecular phylogenetics of Oryzomyine rodents: the genus *Oligoryzomys*. **Mol. Phylogenet. Evol.** 4: 372–382. 1995.

NAGAMACHI, C.Y.; PIECZARKA, J.C.; O'BRIEN, P. C. M; PINTO, J. Á.; MALCHER, S. M.; PEREIRA, A. L.; RISSINO, J. D.; MENDES-OLIVEIRA, A.C.; ROSSI, R.V.;

FERGUSON-SMITH, M. A. FISH with whole chromosome and telomeric probes demonstrates huge karyotypic reorganization with ITS between two species of *Oryzomyini* (Sigmodontinae, Rodentia): *Hylaeamys megacephalus* probes on *Cerradomys langguthi* karyotype. **Chromosome Research**. 2013.

NOWAK, R. M. **Walkers mammals of the world**. Fifth Edition. Baltimore. The Johns Hopkins Univ. Press. 642p. 1999.

OLIVEIRA, F. F & LANGGUTH, A. Pequenos mamíferos (Didelphimorphia e Rodentia) de Paraíba e Pernambuco. **Rev. Nordest. Biol.** 18:19-86. 2004.

PARDUE, M. L & GALL, J. G. Molecular hybridization of radioactive DNA to the DNA of cytological preparations. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 64: 600-604.1969.

PERCEQUILLO, A. R. Sistemática de *Oryzomys* Eaird, 1858 do Leste do Brasil (Muroidea, Sigmodontinae). **Master's Degree**. Universidade de São Paulo. Sao Paulo. 1998.

PIECZARKA, J. C.; NAGAMACHI, C. Y.; O'BRIEN, P. C. M.; YANG, F.; RENS, W.; BARROS, R. M. Reciprocal chromosome painting between two South American bats: *Carollia brevicauda* and *Phyllostomus hastatus* (Phyllostomidae, Chiroptera). **Chromosome Research**, 13: 339-347. 2005.

PINE, R. H.; TIMM, R. M.; WEKSLER, M. A newly recognized clade of trans-Andean *Oryzomyini* (Rodentia: Cricetidae), with description of a new genus. **Journal of Mammalogy**, 93(3):851–870. 2012.

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

REIS, N. R.; PERACCHI, A. L.; PEDRO, W. A.; LIMA, I. P. **Mamíferos do Brasil**. In: Nélio R. dos Reis (ed). Londrina 2: 1-439. 2011.

RODRIGUES, L. R.; PIECZARKA, J. C.; PISSINATI, A.; de OLIVEIRA, E. H.; das DORES, R. J.; NAGAMACHI, C. Y. Genomic mapping of human chromosome paints

on the threatened masked Titi monkey (*Callicebus personatus*). **Cytogenet Genome Res** 133:1–7. 2011.

ROMANENKO, S. A.; PERELMAN, P. L.; TRIFONOV, V. A.; GRAPHODATSKY, A. S. Review Chromosomal evolution in Rodentia. **Heredity**. 108, 4–16. 2012.

ROSA, C. C.; FLORES, T.; PIECZARKA, J. C.; ROSSI, R. V.; SAMPAIO, M. I. C.; RISSINO, J. D.; AMARAL, P. J. S.; NAGAMACHI, C. Y. Genetic and morphological variability in South American rodent *Oecomys* (Sigmodontinae, Rodentia): evidence for a complex of species. **Journal of Genetics**. 2012.

SENGER, G.; LÜDECKE, H. J.; HORSTHEMKE, B.; CLAUSSEN, U. Microdissection of banded human chromosomes. **Hum. Genet.**, 84: 507-511. 1990.

SIMPSON, G. G. The Principles of Classification and a classification of mammals. **Bull. Amer. Mus. Nat. Hist.**, 85: 1 – 350. 1945.

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**. 1999.

SOTERO-CAIO, C.G.; PIECZARKA, J.C.; NAGAMACHI, C.Y.; GOMES, A. J.B.; LIRA, T.C.; O'BRIEN, P.C.M.; FERGUSON-SMITH, M.A.; SOUZA, M.J.; SANTOS, N. Chromosomal homologies among vampire bats revealed by chromosome painting (Phyllostomidae, Chiroptera). **Cytogenetic and Genome Research**, 132:156–164. 2011.

SUMNER, A.T.; EVANS, H.J.; BUCKLAND, R.A. New technique for distinguishing between human chromosomes. **Nature New Biology** 232: 31-32.1971.

SUMNER, A.T. A simple technique for demonstrating centromere 484 heterochromatin. **Experimental Cell Research**, 75: 304-306. 1972.

SVARTMAN, M. & ALMEIDA, E.J.C. The karyotype of *Oryzomys capito laticeps* (Cricetidae, Rodentia) from central Brazil. **Revista Brasileira de Genética** 15: 963-972. 1992.

SWIER, V.J.; BRADLEY, R.D.; RENS, W.; ELDER, F.F.B.; BAKER, R.J. Patterns of chromosomal evolution in *Sigmodon*, evidence from whole chromosome paints. **Cytogenetic and Genome Research** 125: 54-66. 2009.

VENTURA, K.; O'BRIEN, P.C.M.; YONENAGA-YASSUDA, Y.; FERGUSON-SMITH, M.A. Chromosome homologies of the highly rearranged karyotypes of four *Akodon* species (Rodentia, Cricetidae) resolved by reciprocal chromosome painting: the evolution of the lowest diploid number in rodents. **Chromosome Research**, 17:1063–1078. 2009

VERMA, R.S & BABU, A. **Human chromosomes - Principles and Techniques**. McGraw-Hill, Inc, USA. 1995.

VOLOBOUEV, V.T & ANISKIN, V.M. Comparative chromosome banding analysis of three South American species of rice rats of the genus *Oryzomys* (Rodentia, Sigmodontinae). **Chromosome Research**, 8: 295-304. 2000.

WEKSLER, M.; GEISE, L.; CERQUEIRA, R. A new species of *Oryzomys* (Rodentia, Sigmodontinae) from southeast Brazil, with comments on the classification of the *O. capito* species group. **Zoological Journal of the Linnean Society**, 125: 445-462. 1999.

WEKSLER, M.; PERCEQUILLO, A.R.; VOSS, R. Ten New Genera of Oryzomyine Rodents (Cricetidae: Sigmodontinae). **American Museum Novitates**, 3537:1-29. 2006

WEKSLER, M & PERCEQUILLO, A.R. Key to the genera of the tribe Oryzomyini (Rodentia: Cricetidae: Sigmodontinae). **Mastozoología Neotropical**, 18(2):281-292, Mendoza, 2011.

WIEGANT, J.; BEZROOKOVE, V.; ROSENBERG, C.; TANKE, H.J.; RAAP, A.K.; ZHANG, H.; BITTNER, M.; TRENT, J.M.; MELTZER, P. Differentially painting human chromosome arms with combined binary ratio-labelling fluorescence in situ hybridization. **Genome Res.**, 10: 861-865. 2000.

WILSON, D.E. & REEDER, D.M. Mammal Species of the World: A Taxonomic and Geographic Reference. **John Hopkins University Press**, 3: 1-2142. 2005.

WOODS, C.A. **What is a Hystricomorph – hystricognathi rodent?** Ann. Meeting.  
20:63-84. 1976.

## 8 ANEXO: ARTIGO PÚBLICADO

FISH with whole chromosome and telomeric probes demonstrates huge karyotypic reorganization with ITS between two species of Oryzomyini (Sigmodontinae, Rodentia): *Hylaeamys megacephalus* probes on *Cerradomys langguthi* karyotype

Cleusa Yoshiko Nagamachi<sup>1,\*</sup>; Julio Cesar Pieczarka<sup>1,\*</sup>; Patricia Caroline Mary O'Brien<sup>2</sup>; Jamilly Amaral Pinto<sup>1</sup>; Stella Miranda Malcher<sup>1</sup>; Adenilson Leão Pereira<sup>1</sup>; Jorge das Dores Rissino<sup>1</sup>; Ana Cristina Mendes-Oliveira<sup>3</sup>; Rogério Vieira Rossi<sup>4</sup>; Malcolm Andrew Ferguson-Smith<sup>2</sup>

<sup>1</sup>*Laboratório de Citogenética, ICB, Universidade Federal do Pará and \*CNPq Researcher, Brazil.*

<sup>2</sup>*Cambridge Resource Centre for Comparative Genomics, Department of Veterinary Medicine, University of Cambridge, UK.*

<sup>3</sup>*Laboratório de Zoologia e Ecologia de Vertebrados, ICB, Universidade Federal do Pará, Brazil.*

<sup>4</sup>*Departamento de Biologia e Zoologia, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Mato Grosso, Brazil.*