

Marcella Mergulhão Tecliarini

Aplicação de Pintura Cromossômica  
em Espécies da Família Accipitridae (Aves, Falconiformes):  
Considerações Filogenéticas e Evolutivas

Belém-PA

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

**Aplicação de Pintura Cromossômica em  
Espécies da Família Accipitridae (Aves,  
Falconiformes): Considerações Filogenéticas e  
Evolutivas**

**MARCELLA MERGULHÃO TAGLIARINI**

**BELÉM  
2013**

**MARCELLA MERGULHÃO TAGLIARINI**

**Aplicação de Pintura Cromossômica em  
Espécies da Família Accipitridae (Aves,  
Falconiformes): Considerações Filogenéticas e  
Evolutivas**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Neurociências e Biologia Celular, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor.

Orientador: Prof. Dr. Edivaldo H. C. de Oliveira

Área de Concentração: Biologia Celular

**BELÉM  
2013**

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

**Aplicação de Pintura Cromossômica em Espécies da Família**

**Accipitridae (Aves, Falconiformes): Considerações**

**Filogenéticas e Evolutivas**

**MARCELLA MERGULHÃO TAGLIARINI**

**BANCA EXAMINADORA:**

---

**Prof. Dr. Edivaldo Herculano C. de Oliveira (UFPA)  
(Orientador)**

---

**Profa. Dra. Margarida Maria C. de Lima (UFPA)**

---

**Profa. Dra. Ciane Martins de Oliveira (IESAM)**

---

**Dra. Daniela C. da Cruz Rocha (IEC)**

---

**Prof. Dr. Ricardo José Gunski (UNIPAMPA)**

**BELÉM  
2013**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**  
**Biblioteca do Instituto Evandro Chagas**

---

Tagliarini, Marcella Mergulhão.

Aplicação de pintura cromossômica em espécies da família Accipitridae (Aves Falconiformes): considerações filogenéticas e evolutivas / Marcella Mergulhão Tagliarini. – Belém, 2014

86 f.: il; 30 cm

Orientador: Dr. Edivaldo Herculano Corrêa de Oliveira

Tese (Doutorado em Neurociências e Biologia Celular) – Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular, 2013.

1. Falconiformes. 2. Accipitridae. 3. FISH. 4. Cariótipo. I. de Oliveira, Edivaldo Herculano Corrêa, *orient.* II. Universidade Federal do Pará. III. Título.

CDD: 598.916

---

Dedico este trabalho ao meu orientador, **Prof. Dr. Edivaldo de Oliveira** por ser um exemplo de pesquisador, amar o que faz e contagiar aqueles que tem o prazer de conviver com ele com esse amor pela ciência.

**“O conhecimento é orgulhoso por saber tanto.  
A sabedoria é humilde por não saber mais”**

**William Cowpar – Poeta inglês (1731-1800)**

## AGRADECIMENTOS

- Ao meu orientador Prof. Dr. **Edivaldo Herculano Corrêa de Oliveira** pelo apoio, amizade, paciência e incentivo constante durante todos esses anos;
- À toda equipe do Laboratório de Cultura de Tecidos da Seção de Meio Ambiente do Instituto Evandro Chagas pela colaboração e por tornar o ambiente de trabalho agradável;
- À MSC Maria de Fátima Assis, pelos ensinamentos para toda vida e por ter nos recebido de braços abertos;
- Ao Criadouro Gavião Real (Capitão Poço/PA) e ao Parque Mangal das Garças (Belém/PA) que colaboraram cedendo o material biológico;
- À CAPES pelo fomento;
- À UFPA e ao IEC por toda infra-estrutura que me foi fornecida.



**SUMÁRIO**

<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	CONSIDERAÇÕES GERAIS: ORDEM FALCONIFORMES	<b>1</b>
<b>1.2</b>	FAMÍLIA ACCIPITRIDAE	<b>6</b>
<b>1.2.1</b>	<b>Subfamília Buteoninae</b>	<b>8</b>
<b>1.2.1.1</b>	<i>Asturina nítida</i> - Gavião-Pedrês	<b>10</b>
<b>1.2.1.2</b>	<i>Buteogallus meridionalis</i> - Gavião-Caboclo	<b>12</b>
<b>1.2.1.3</b>	<i>Rupornis magnirostris</i> - Gavião-Carijó	<b>14</b>
<b>1.2.2</b>	<b>Subfamília Harpiinae</b>	<b>16</b>
<b>1.2.2.1</b>	<i>Morphnus guianensis</i> - Uiraçú-Falso	<b>17</b>
<b>1.2.2.2</b>	<i>Harpia harpyja</i> - Gavião-Real	<b>19</b>
<b>1.3</b>	CITOGENÉTICA DE AVES	<b>22</b>
<b>1.3.1</b>	<b>Citogenética Molecular</b>	<b>23</b>
<b>1.3.2</b>	<b>Pintura Cromossômica em Aves</b>	<b>24</b>
<b>1.4</b>	DADOS CITOGENÉTICOS DA FAMÍLIA ACCIPITRIDAE	<b>27</b>
<b>1.5</b>	PINTURA CROMOSSÔMICA EM ANÁLISES	<b>28</b>
	FILOGENÉTICAS	
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>31</b>
<b>2.1</b>	OBJETIVO GERAL	<b>31</b>
<b>2.2</b>	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	<b>31</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>33</b>
<b>3.1</b>	COLETA DE AMOSTRAS	<b>33</b>
<b>3.2</b>	CULTURA DE FIBROBLASTOS	<b>34</b>
<b>3.3</b>	OBTENÇÃO DE CROMOSSOMOS METAFÁSICOS	<b>35</b>
<b>3.4</b>	PREPARAÇÃO DAS LÂMINAS	<b>36</b>

3.5	TÉCNICA DE COLORAÇÃO CONVENCIONAL	36
3.6	HIBRIDIZAÇÃO <i>IN SITU</i> COM FLUORESCÊNCIA (FISH)	37
3.6.1	Hibridação fluorescente <i>in situ</i> (FISH) com sonda de rDNA 18S/28S e sonda Telomérica	37
3.6.1.1	Preparação e marcação da sonda de rDNA	37
3.6.1.2	Preparação e marcação da sonda telomérica	38
3.6.1.3	Preparação das lâminas para hibridização com sondas de rDNA	38
3.6.2	Hibridação fluorescente <i>in situ</i> (FISH) com sonda cromossomo-específicas de <i>Gallusgallus</i> e de <i>Leucopternis albicollis</i>	39
3.6.2.1	Preparação das lâminas	39
3.6.2.2	Desnaturação das Sondas de DNA e dos Cromossomos Metafásicos	40
3.6.2.3	Hibridação e detecção dos sinais correspondentes	40
3.7	ANÁLISE CARIOTÍPICA	41
3.7.1	Citogenética Clássica	41
3.7.2	Experimentos de FISH e Captura de Imagens	42
4.	RESULTADOS	43
4.1	O CARIÓTIPO DAS ESPÉCIES DA SUBFAMÍLIA BUTEONINAE	43
4.1.1	<i>Rupornis magnirostris</i>	43
4.1.2	<i>Buteogallus meridionalis</i>	43
4.1.3	<i>Asturina nitida</i>	44

4.2	O CARIÓTIPO DAS ESPÉCIES DA SUBFAMÍLIA HARPIINAE	44
4.2.1	<i>Harpia Harpyja</i>	44
4.2.2	<i>Morphnus guianensis</i>	46
4.3	EXPERIMENTOS DE HIBRIDIZAÇÃO <i>IN SITU</i>	47
4.3.1	Subfamília Buteoninae	47
4.3.6	Subfamília Harpiinae	51
5.	<b>DISCUSSÃO</b>	59
5.1	SUBFAMÍLIA BUTEONINAE	60
5.2	SUBFAMÍLIA HARPIINAE	63
5.3	EVOLUÇÃO CARÍOTÍPICA EM ACCIPITRIDAE	67
6.	<b>CONCLUSÃO</b>	72
7.	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	74

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 –** Exemplos de Falconiformes apresentando características comuns ao grupo como bico afiado e curvo, penas brancas, marrons e cinzas, e olhos voltados para frente. Em sentido horário: *Buteogallus meridionalis*, *Asturina nitida*, *Harpia harpyja*, *Rupornis magnirostris* e *Morphnus guianensis*. FONTE: <http://www.avesderapinabrasil.com> **2**
- Figura 2 -** Mapa do mundo ilustrando padrões espaciais de diversidade de Falconiformes para cada domínio considerado endêmico FONTE: RANGEL *et al.*, 2004. **3**
- Figura 3 –** Algumas das propostas de classificação para a ordem Falconiformes. FONTE: GRIFFITHS, 1999. **4**
- Figura 4–** Proposta de SIBLEY & ALHQUIST (1990) para a classificação de Falconiformes, incluindo esse grupo como uma infra-ordem dentro de Ciconiiformes e excluindo Cathartidae que foi incluída na infra-ordem Ciconiidae. **5**
- Figura 5 -** Diferentes propostas de subdivisões da família Accipitridae com a respectiva nomenclatura adotada pelos autores e parte dos gêneros inclusos nos agrupamentos. FONTE: MIGOTTO, 2008. **9**
- Figura 6–** Exemplos de Gavião Pedrês adulto (esquerda) e jovem (direita). FONTE: <http://www.wikiaves.com> **10**
- Figura 7–** Casal de Gavião Pedrês, ninho da ave e um exemplar jovem, respectivamente. FONTE: <http://www.wikiaves.com> **11**
- Figura 8–** Distribuição geográfica do Gavião Pedrês em território brasileiro. As regiões em verde correspondem às áreas onde a espécie é encontrada. FONTE: <http://www.avesrapinabrasil.com> **12**
- Figura 9–** Gavião Caboclo adulto e jovem, respectivamente. FONTE: <http://www.wikiaves.com> **13**
- Figura 10–** Casal de Gavião Caboclo e indivíduo filhote. FONTE: <http://www.wikiaves.com> **13**
- Figura 11–** Distribuição geográfica do Gavião Caboclo em território brasileiro. As regiões em verde correspondem às áreas onde a espécie é encontrada. FONTE: <http://www.avesrapinabrasil.com> **14**

- Figura 12–** Gavião Carijó adulto e jovem, respectivamente. FONTE: <http://www.wikiaves.com> **15**
- Figura 13–** Casal de Gavião Carijó, ninho da espécie e indivíduo filhote, respectivamente. FONTE: <http://www.wikiaves.com> **16**
- Figura 14–** Distribuição geográfica do Gavião Carijó em território brasileiro. As regiões em verde correspondem às áreas onde a espécie é encontrada. FONTE: <http://www.avesrapinabrasil.com> **16**
- Figura 15–** Falso Uiraçú adulto e jovem, respectivamente. FONTE: <http://www.wikiaves.com> **17**
- Figura 16–** Ninho e filhote de Uiraçú Falso. FONTE: <http://www.wikiaves.com> **18**
- Figura 17–** Distribuição geográfica do Falso Uiraçú em território brasileiro. FONTE: <http://www.avesrapinabrasil.com> **19**
- Figura 18–** Gavião Real macho, fêmea e jovem, respectivamente. FONTE: <http://www.wikiaves.com> **20**
- Figura 19–** Casal de Gavião Real, ninho da espécie e indivíduo filhote, respectivamente. FONTE: <http://www.wikiaves.com> **20**
- Figura 20–** Distribuição geográfica do Gavião Real em território brasileiro. FONTE: <http://www.avesrapinabrasil.com> **21**
- Figura 21–** Rearranjos cromossômicos no cariótipo da harpia (*Harpia harpyja*). Comparado com o cariótipo ancestral hipotético das aves ( $2n = 80$ ). O cariótipo da harpia passou por uma grande reorganização, com a ocorrência de fusões e fissões cromossômicas. Os pares GGA1-6 foram identificados individualmente. O par sexual não se encontra representado no esquema. FONTE: DE OLIVEIRA *et al.*, 2005. **26**
- Figura 22–** **A:** Cariótipo do gavião carijó (*Rupornis magnirostris*) em coloração convencional, com  $2n = 68$  e  $NF = 100$ ; **B:** Cariótipo do gavião caboclo (*Buteogallus meridionalis*) em coloração convencional, com  $2n = 68$  e  $NF = 102$  **C:** Cariótipo do gavião pedrês (*Asturina nitida*) em coloração convencional, com  $2n = 68$  e  $NF = 102$ . **45**
- Figura 23–** **A:** Cariótipo de uma fêmea do Gavião Real (*Harpia harpyja*) em coloração convencional, com  $2n = 58$  e  $NF$  **46**

= 112. **B:** Cariótipo de uma fêmea do Falso Uiraçú (*Morphnus guianensis*) em coloração convencional, com  $2n = 54$  e  $NF = 112$ .

- Figura 24–** Metáfase de *Rupornis magnirostris* em coloração convencional representando a subfamília Buteoninae, onde o braço curto do par 7 é portador dos genes 18S e 28S e apresenta uma constrição secundária (indicada pelas setas). **47**
- Figura 25–** Resultado do FISH com as sondas de rDNA e teloméricas, respectivamente, de *Rupornis magnirostris* (**A e B**); *Buteogallus meridionalis* (**C e D**); e *Asturina nítida* (**E e F**). **48**
- Figura 26–** Imagem representativa com algumas hibridizações com sondas de *Gallus gallus* em *Buteogallus meridionalis*, *Asturina nítida* e *Rupornis magnirostris*. **50**
- Figura 27–** Mapa de Homeologia entre *Gallus gallus* e *Asturina nítida* **50**
- Figura 28–** Hibridização de sondas teloméricas em metáfase de *Morphnus guianensis* evidenciando marcações nas regiões teloméricas de todos os pares, e também intersticiais em alguns cromossomos de tamanho médio, ocorrendo na região centromérica ou na região mediana do braço longo (setas). **51**
- Figura 29–** Experimentos de FISH com sondas de 18/28S rDNA em *Morphnus guianensis* evidenciando marcação em um par de macrocromossomos (provavelmente par 1) (**A**) e *Harpia harpyja* que apresentou dois pares marcados, provavelmente o 6 e o 25 (**B**). **52**
- Figura 30–** Experimentos de FISH utilizando sondas cromossomo-específicas de macrocromossomos de *Gallus gallus* em metáfases de Harpia: **A:** GGA1 (verde) e GGA 5 (vermelho); **B:** GGA3 (verde) e GGA5 (vermelho); **C:** GGA6 (vermelho) e **D:** GGA4 (vermelho). **54**
- Figura 31–** Resultados da hibridização de sondas de *Gallus* correspondentes ao par 2 (**A**) e ao par 11 (**B**). As setas indicam um intervalo na hibridização de GGA2, que é preenchido pelo cromossomo GGA 11. **55**
- Figura 32–** Mapa de homologia entre *Harpia harpyja* e *Gallus gallus* **56**
- Figura 33–** Resultados da hibridização de sondas de *Gallus gallus* em *Morphnus guianensis* correspondentes ao par GGA1 (**A**), GGA2 (**B**), GGA4 (**C**), e GG5 em vermelho e GGA6 **57**

em verde (D).

- Figura 34–** Mapa de homologia entre *Morphnus guianensis* e *Gallus gallus* **58**
- Figura 35–** Experimento extra utilizando sonda correspondente à associação GGA1p/GGA6 de *L. albicollis* (LAL3) em BME, ANI e RMA, respectivamente, confirma a assinatura citogenética comum para as espécies de Buteoninae analisadas por FISH. **62**
- Figura 36–** Mapa de homologia entre a harpia e *Gallus gallus*. As homologias encontradas em nossos experimentos são indicadas com as cores nos cromossomos. Segmentos em preto são segmentos não hibridizados com as sondas 1-11. As linhas ao lado direito de cada par mostram as homologias propostas em DE OLIVEIRA *et al.* (2005). **64**

**LISTA DE TABELAS**

<b>Tabela I –</b>	Espécies analisadas no presente trabalho	<b>33</b>
<b>Tabela II –</b>	Correspondência entre os cromossomos de <i>Gallus gallus</i> e as espécies de Buteoninae	<b>49</b>
<b>Tabela III –</b>	Correspondência entre os cromossomos de <i>Gallus gallus</i> e as espécies de Harpiinae	<b>53</b>



## RESUMO

As análises citogenéticas de diversos Falconiformes mostraram que os accipitrídeos têm uma organização cromossômica atípica na classe Aves, com um número diplóide relativamente baixo (média de  $2n=66$ ) e poucos pares de microcromossomos (4 a 6 pares). Propostas baseadas em citogenética clássica sugeriram que esse fato devia-se à fusão de microcromossomos presentes no cariótipo ancestral das Aves. No intuito de contribuir para o esclarecimento das questões referentes à evolução cromossômica e filogenética dessa família, três espécies da subfamília Buteoninae (*Rupornis magnirostris*, *Buteogallus meridionalis* e *Asturina nitida*) e duas espécies da subfamília Harpiinae (*Harpia harpyja* e *Morphnus guianensis*) foram analisados citogeneticamente através da aplicação de técnicas de citogenética clássica e molecular. As espécies de Buteoninae apresentaram cariótipos muito semelhantes, com número diplóide igual a 68; o número de cromossomos de dois braços entre 17 e 21, o cromossomo Z submetacêntrico e o W metacêntrico em *R. magnirostris* e submetacêntrico em *Asturina nitida*. O uso de sondas de 18/28S rDNA mostrou a localização de regiões organizadoras de nucléolo em um par submetacêntrico médio nas três espécies, correspondendo ao braço curto do par 7. Sequências teloméricas foram mapeadas não só na região terminal dos braços, mas também em algumas posições intersticiais. Sondas de cromossomo inteiro derivadas dos pares 1 a 10 de *Gallus gallus* (GGA) produziram o mesmo número de sinais nessas três espécies. A disponibilidade das sondas de cromossomos totais derivadas de *Leucopternis albicollis* confirmou a existência de uma assinatura citogenética comum para as espécies de Buteoninae analisadas por FISH, que se trata da associação entre GGA1p e GGA6, inclusive com um sítio de sequência telomérica intersticial reforçando esse fato. As espécies de Harpiinae analisadas mostraram que o número diplóide das espécies de *H. harpyja* e *M. guianensis* foi igual a 58 e 54, respectivamente, e que ambas as espécies apresentam vinte e dois pares de cromossomos de dois braços, mesmo *Harpia* apresentando dois pares a mais. 18/28S rDNA produziram sinais no braço curto do par 1 em *M. guianensis* e em dois pares em *H. harpyja* (pares 6 e 25). Sequências teloméricas intersticiais também foram observadas em alguns pares. Apesar da similaridade na morfologia cromossômica, não foram observadas associações compartilhadas por essas duas espécies. As diferentes associações observadas em *Morphnus* e *Harpia* mostram que essas espécies sofreram uma reorganização genômica expressiva após sua separação em linhagens independentes. Além disso, ausência de associações semelhantes sugere que houve fissões nos macrocromossomos do ancestral em comum desse grupo, e as fusões foram subsequentes ao seu isolamento como linhagens diferentes. Os resultados aqui apresentados, somados àqueles publicados anteriormente com outras espécies de Accipitridae indicam que os processos de fissões envolvendo os macrocromossomos de GGA e fusões entre esses segmentos e entre esses e microcromossomos são rearranjos recorrentes nesse grupo. Apesar dos Falconidae também apresentarem cariótipos atípicos, e números diploides baixos, os dados globais da citogenética de Accipitridae indicam que, assim como postulado para as semelhanças morfológicas entre esses dois grupos, os cariótipos rearranjados corresponderiam a homoplasias, do ponto de vista evolutivo, apoiando que essas duas famílias não formam um grupo monofilético.

Palavras-chave: Accipitridae, Buteoninae, FISH, filogenia, cariótipo

## ABSTRACT

Cytogenetic analyses of Falconiformes have showed that Accipitridae have atypical chromosomal organization among birds, with relatively low diploid numbers (mean of  $2n=66$ ) and a few pairs of microchromosomes (4 to 6 pairs). Proposals based on classical cytogenetics suggested that this fact was a result of fusions of microchromosomes found in the Avian putative ancestor karyotype. With the aim of contributing to clarify questions concerning chromosomal evolution and phylogenetics of this family, we analyzed three species of subfamily Buteoninae (*Rupornis magnirostris*, *Buteogallus meridionalis* e *Asturina nitida*) and two of subfamily Harpiinae (*Harpia harpyja* e *Morphnus guianensis*) by means of classical and molecular cytogenetics. Buteoninae species showed karyotypes with diploid number 68 and FN varying from 100 to 102; the number of banded chromosomes varied between 17 and 21, Z chromosome was submetacentric and W chromosome was metacentric in *R. magnirostris* and submetacentric in *Asturina nitida*. 18/28 rDNA probes showed that nucleolar organizer regions are located in a medium-sized submetacentric pair, corresponding to the short arm of pair 7. Telomeric sequences were found not only on terminal region of the chromosomes, but also on some interstitial regions. Whole-chromosome paints derived from pairs 1 to 11 of *Gallus gallus* (GGA) produced the same number of signals in these species. The availability of whole-chromosome probes derived of *Leucopternis albicollis* confirmed the presence of a common cytogenetic signature for Buteoninae species, corresponding to the association between GGA1p and GGA6. An interstitial telomeric sequence found in this pair reinforces this fact. Concerning the species of Harpiinae, the conventional staining analyses showed that *H. harpyja* and *M. guianensis* have  $2n=58$  and  $2n=56$ , respectively. Both species have 22 pairs of banded chromosomes, although *H. harpyja* has two more chromosomes than *M. guianensis*. 18/28S rDNA mapped on the short arm of pair 1 in *M. guianensis* and in two pairs in *H. harpyja* (6 and 25). Telomeric sequences were found on the terminal regions, but also on interstitial locations in some chromosomes. Despite the apparent karyotypic similarity, no common associations were found in these two species. The different associations observed in *Morphnus* and *Harpia* indicate that these species suffered an extensive genomic reorganization after their separation in two independent lineages. Moreover, the absence of shared associations suggests that the fissions of macrochromosomes have occurred in the common ancestor of this group, and that fusions were subsequent to their isolation as different lineages. Our results, together with previous reports in other species of Accipitridae, indicate that the processes of fissions involving the macrochromosomes of GGA and fusions between these segments and between them and microchromosomes are recurrent rearrangements in this group. Although Falconidae species also show atypical karyotypes, with low diploid numbers, global cytogenetic data of Accipitridae indicate that, similarly to the morphological traits between these two families, the rearranged karyotypes would correspond to homoplasies, from the evolutionary point of view, supporting the idea that these families do not form a monophyletic group.

Key words: Accipitridae, Buteoninae, FISH, phylogeny, Karyotype

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS: ORDEM FALCONIFORMES

Os Falconiformes, também conhecidos como aves de rapina diurnas, são formidáveis predadores, armados com garras poderosas, bico em forma de gancho que lhes permite rasgar a carne de sua presa com facilidade, e visão aguda (Figura 1). Geralmente possuem asas largas bem adaptadas para voos longos. Caçam durante o dia e se alimentam de uma grande variedade de presas, incluindo peixes, pequenos mamíferos, répteis e carniça. O grupo inclui águias, gaviões, milhafres, o pássaro secretário, falcões e abutres do velho mundo (SICK, 1997).

Com base nos dados existentes, existem mais de 340 espécies de Falconiformes. É difícil determinar um número exato, pois alguns táxons são considerados espécies por alguns autores, enquanto por outros são classificadas como subespécies ou variações. No Brasil, segundo o Comitê Brasileiro de Registros Ornitológicos (CBRO), existem 75 espécies de Falconiformes, sendo 48 Accipitrídeos (águias e gaviões), 21 Falconídeos (falcões) e 6 Cathartídeos (urubus). A região neotropical concentra o maior número de espécies de rapinantes do mundo (SICK, 1997).

A maioria das aves de rapina apresenta a plumagem com cores monótonas consistindo principalmente de penas brancas, marrons ou cinzas que se misturam com a paisagem circundante. Seus olhos estão voltados para a frente, uma orientação que torna mais fácil para elas detectar presas. A forma da sua cauda reflete seu comportamento aéreo. Espécies que exigem maior capacidade de manobra em voo têm amplas caudas; espécies que dependem mais da velocidade de manobra têm caudas curtas, e as espécies que

requerem a habilidade de voar em velocidades lentas têm caudas bifurcadas (Klappenbach, 2013).



Figura 1: As espécies de Falconiformes apresentam características em comum ao grupo, como bico curvo, penas predominantemente das cores branca, cinza ou marrom, olhos voltados para a frente. (A) *Buteogallus meridionalis*; (B) *Asturina nitida*; (C) *Harpia harpyja*; (E) *Morphnus guianensis*; (F) *Rupornis magnirostris*. (Fonte: <http://www.avesderapinabrasil.com>).

A distribuição de aves de rapina varia entre os subgrupos. Falcões, gaviões e águias estão entre as aves mais cosmopolitas do grupo, ocorrendo em todos os continentes, exceto na Antártida. Em contraste, o pássaro secretário habita uma área restrita na África sub-saariana. Abutres do Novo Mundo vivem apenas na América do Sul e do Norte. De uma forma abrangente, as espécies ocupam vários habitats diferentes, incluindo ártico, tundra, florestas, desertos e zonas costeiras (Figura 2) (RANGEL *et. al.*, 2004).

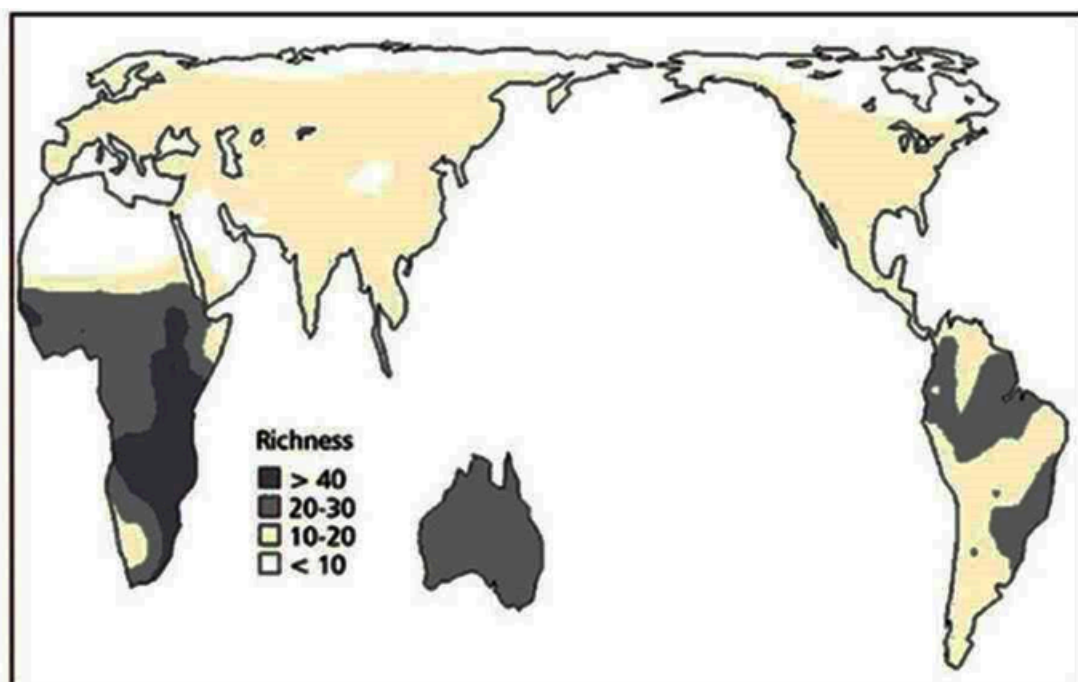


Figura 2: Mapa do mundo, ilustrando padrões espaciais de diversidade de Falconiformes para cada domínio considerado endêmico. (Fonte: Rangel *et al.*, 2004)

A sistemática da ordem Falconiformes encontra-se entre as mais problemáticas dentre as Aves, e um grande número de aves de rapina foi agrupado em uma única ordem porque, historicamente, as propostas de classificação dependiam principalmente da estrutura das patas e do bico (FEDUCCIA, 1999) (Figura 3).

Na figura 3 observamos as diferentes propostas de classificações ao longo dos anos, conforme os estudos foram sendo aprofundados. Em todas as classificações, com exceção da última, a família Cathartidae é incluída no grupo como sendo de origem monofilética. O que hoje é considerado a família Accipitridae, durante muito tempo foi agrupado como subfamília Accipitrinae e considerado grupo irmão de Pandioninae. Tanto o monofiletismo como as

relações das famílias dentro da própria ordem estão em questão. Não existem registros fósseis indicando que as diferentes famílias originaram-se de um ancestral comum, permitindo a suposição por parte de alguns autores de que os Falconiformes podem ter sido resultado de uma convergência evolutiva entre grupos de origem polifilética, fazendo com que não haja nenhuma relação estrita entre as espécies fósseis e as espécies viventes (BROWN & AMADON, 1968; FEDUCCIA, 1980; DEL HOYO *et al.*, 1994).

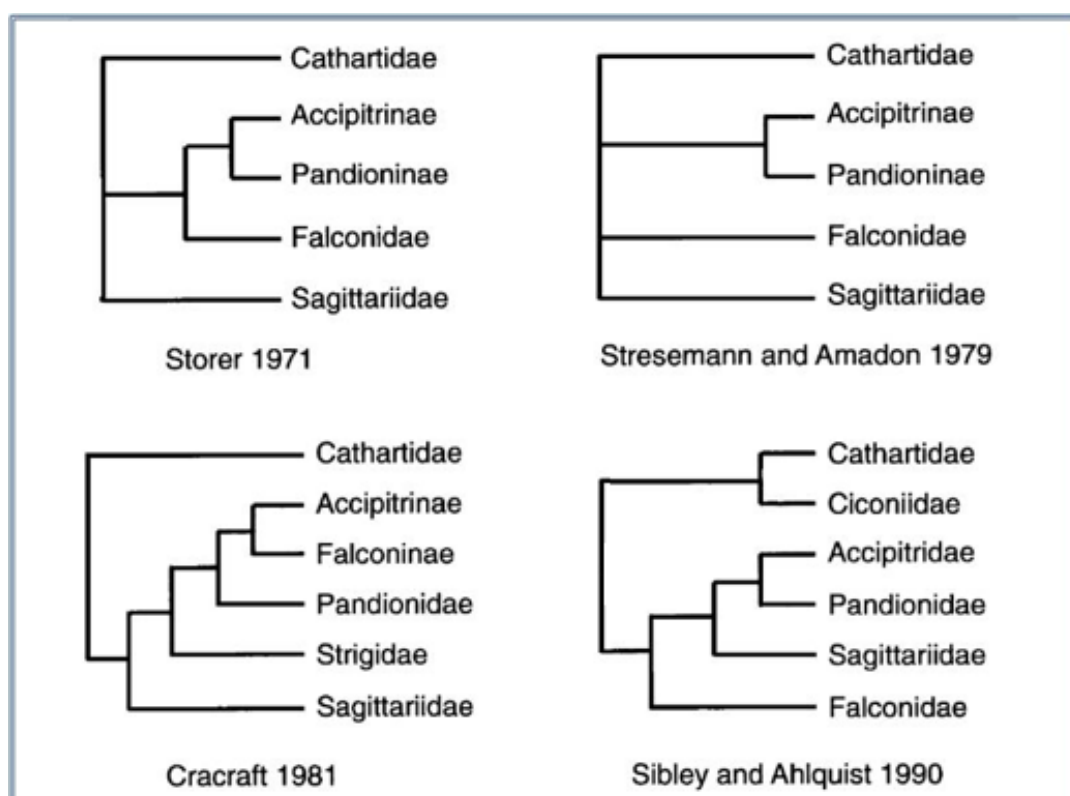


Figura 3: Algumas das propostas de classificação para a ordem Falconiformes.

Os detalhados estudos anatômicos de HUDSON (1948) e JOLLIE (1976, 1977 a-c) corroboram essa idéia. No entanto, o estudo da anatomia comparada da siringe realizado por GRIFFITHS (1994), concluiu que todas as famílias dos tradicionais Falconiformes representam uma única linhagem evolutiva. Dessa

forma, segundo FEDUCCIA (1996), a origem monofilética ou polifilética de Falconiformes figura entre os maiores desafios para a sistemática de Aves.

Outros problemas taxonômicos envolvem as relações filogenéticas entre as famílias dentro de cada grupo (MAYR & CLARKE, 2003; HACKET *et al.*, 2008) e as relações menos inclusivas dentro delas (OLSON, 1985). Certamente, uma das questões mais discutidas, refere-se à permanência dos abutres do novo mundo (Cathartidae) na ordem Falconiformes e seu relacionamento com as cegonhas (Ciconiiformes) (LIGON, 1967; REA, 1983; SIBLEY & AHLQUIST, 1990) (Figura 4) ou mesmo sua elevação ao nível de ordem (Cathartiformes) (ALVARENGA, 1985; BRITO, 2008).

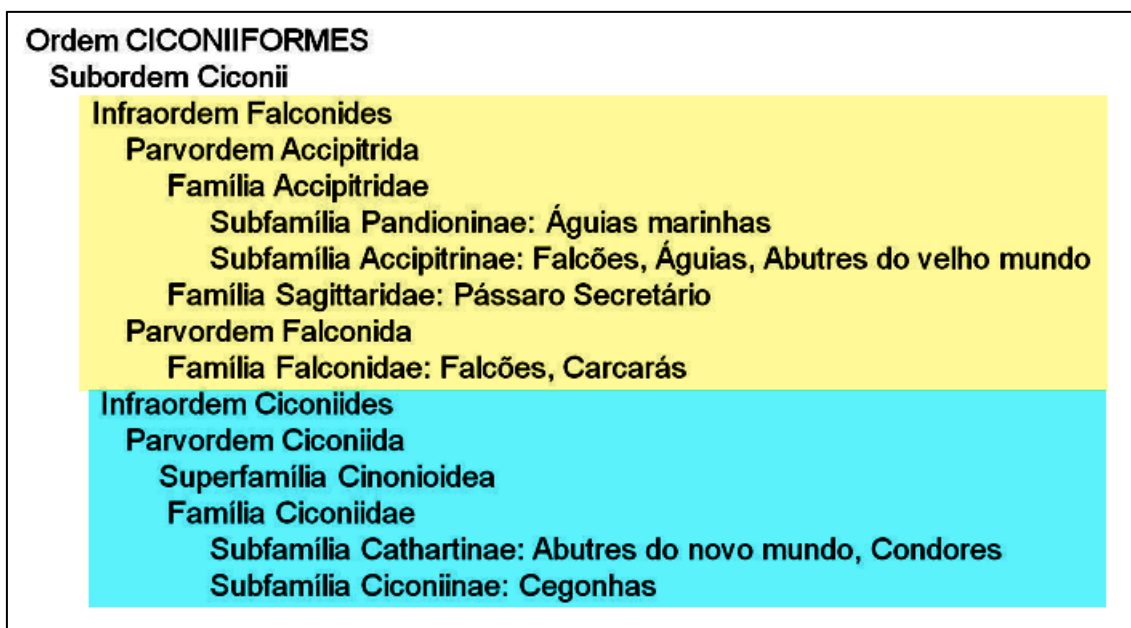


Figura 4: Proposta de SIBLEY & ALHQUIST (1990) para a classificação de Falconiformes, incluindo esse grupo como uma Infraordem dentro de Ciconiiformes. Observe que Cathartidae foi incluída dentro de outra Infraordem (Ciconiides).

Análises de seqüências do gene *citocromo b* (*cyt b*) (AVISE *et al.*, 1994; SEIBOLD & HELBIG, 1995; WINK *et al.*, 1998) apoiam a inclusão de abutres do Novo Mundo em Ciconiiformes, mas a relação dessa ordem com respeito aos Accipitridae e Cathartidae ainda não foi resolvida.

## 1.2 FAMÍLIA ACCIPITRIDAE

A Família Accipitridae inclui aves de rapina diurnas e os necrófagos do Velho Mundo, unidas por certos caracteres relacionados à predação, como o bico curto e afiado, em forma de gancho, com uma massa macia em sua base superior, chamado de cera, sendo o local por onde passam suas narinas. As patas apresentam-se fortes e com garras longas e curvadas e com um dedo oposto (FEDUCCIA, 1999).

Os jovens tem um rápido crescimento de sua plumagem primária, seguido de seis a oito semanas de cuidados no ninho para realizar o seu primeiro voo. E no período de um a três anos de idade são considerados adultos ainda sexualmente imaturos. Macho e fêmea distinguem-se geralmente pelo tamanho, sendo frequentemente a fêmea maior, podendo chegar a ser um terço maior que seu companheiro (SICK, 1997).

É a mais numerosa dentre os Falconiformes, incluindo gaviões, águias e abutres do Velho Mundo, ocorrendo em todo o globo com exceção do continente Antártico e algumas ilhas oceânicas. Ocupam diversos habitats, desde desertos e tundras às florestas tropicais, sendo que alguns gêneros e espécies apresentam diferentes padrões de distribuição como, por exemplo, os abutres e as águias cobreiras (gênero *Circaetus*) que ocorrem exclusivamente no Velho Mundo e a maioria dos representantes do gênero *Buteo* que são mais abundantes e diversificados na região Neotropical (MIGOTTO, 2008).

O número de espécies reconhecidas para a família varia na literatura, oscilando entre 237 (THIOLLAY, 1994) e 276 (FERGUSON-LEES & CHRISTIE, 2001). Estas espécies são alocadas em aproximadamente 64 gêneros, dos quais 38 são monotípicos; os gêneros mais ricamente



representados são *Buteo* e *Accipiter* com 28 e 50 espécies, respectivamente (THIOLLAY, 1994).

O monofiletismo dos Accipitridae não é questionado na literatura. Em contrapartida, o arranjo taxonômico dentro da família, dividindo-a em subgrupos, constitui-se em um problema de extrema controvérsia (AMARAL *et al.*, 2006).

Alguns autores reconhecem a necessidade de dividir essa família em subfamílias, enquanto outros estabelecem apenas agrupamentos intrafamiliares informais, ausentes de critérios filogenéticos bem definidos (PETERS, 1931; HELLMAYR & CONOVER, 1949; AMADON & BULL, 1988). Estes tipos de arranjos baseiam-se, principalmente, em similaridades morfológicas externas e em dados comportamentais, como forma de nidificação, alimentação e exibição de voo.

Outros autores propõem divisões da família Accipitridae, utilizando-se de caracteres anatômicos diversos e, mais recentemente, de sequências de DNA (JOLLIE *et al.*, 1977 a-c; BED'HOM *et al.*, 1999). Com a incorporação das metodologias cladísticas às análises de caracteres morfológicos e moleculares, as classificações propostas atualmente tendem a ser filogeneticamente mais informativas. A figura 5 ilustra algumas diferentes propostas classificatórias.

Com o desenvolvimento da biologia molecular e das técnicas de extração e sequenciamento de DNA, foi realizada uma série de estudos utilizando conjuntos genéticos diversos. Os trabalhos de HARING *et al.* (2001), RIESING *et al.* (2003), KRUCKENHAUSER *et al.* (2004), WINK & SAUER-GÜRTH (2004), HELBIG *et al.* (2005), LERNER & MINDELL (2005), GRIFFITHS *et al.* (2007), LERNER *et al.* (2008), AMARAL *et al.* (2006) e AMARAL (2008)

trouxeram importantes contribuições para a compreensão dos processos evolutivos, relações filogenéticas e relações menos inclusivas na família Accipitridae.

Nesse contexto, LERNER & MINDELL (2005) sugerem que as subdivisões ou subfamílias propostas previamente para os Accipitridae não correspondem a grupos monofiléticos, proposta apoiada por GRIFFITHS *et al.* (2007). Dessa maneira, os primeiros autores, com base em marcadores nucleares e mitocondriais, reconfiguraram parte das subfamílias já propostas na literatura, propondo duas novas subfamílias às doze previamente sugeridas.

Apesar das diferentes propostas, o grupo Buteoninae (*Buteo* e outros gêneros sub-buteoninae) é reconhecido na maioria das classificações sugeridas. Da mesma forma, a subfamília Harpiinae é geralmente mantida como um grupo no nível de subfamília, apesar de HELLMAYR & CONOVER (1949) e HOLDOWAY (1984) incluir suas espécies em Buteoninae. Esse grupo apresenta ampla distribuição geográfica na região Neotropical, apesar de haver espécies em outros continentes.

### **1.2.1 Subfamília Buteoninae**

Um dos maiores grupos da família Accipitridae, a subfamília buteoninae inclui 24 espécies de “sub-buteoninos” (AMADON 1982), dos gêneros: *Parabuteo*, *Buteogallus*, *Leucopternis*, *Geranoaetus*, *Harpyhaliaetus*, *Heterospizias* e *Busarellus*; dois gêneros de milhafres (LERNER & MINDELL, 2005), e 25 a 28 espécies do gênero *Buteo* (FERGUSON-LEES e CHRISTIE, 2001; DICKINSON, 2003).

<b>Pycraft (1902)</b>	<b>Peters (1931)</b>
1 - ELANINAE ( <i>Elanus</i> )	1 - PANDIONINAE ( <i>Pandion</i> )
2 - MILVINAE ( <i>Haliaeetus, Ictinia, Rosthramus</i> )	2 - ELANINAE ( <i>Elanus, Cbelictinia</i> )
3 - PERNINAE ( <i>Leptodon, Pandion</i> )	3 - MILVINAE ( <i>Harpagus, Ictinia, Rosthramus</i> )
4 - AQUILINAE ( <i>Aquila, Spizaetus</i> )	4 - PERNINAE ( <i>Elanoides, Leptodon</i> )
5 - VULTURINAE ( <i>Gyps, Necrosyrtes</i> )	5 - AEGYPIINAE ( <i>Gyps, Necrosyrtes</i> )
6 - CIRCAETINAE ( <i>Circaetus</i> )	6 - CIRCAETINAE ( <i>Circaetus</i> )
7 - CIRCINAE ( <i>Circus, Geranospiza</i> )	7 - CIRCINAE ( <i>Circus, Geranospiza</i> )
8 - THRASAETINAE ( <i>Harpia, Morphnus</i> )	8 - BUTEONINAE ( <i>Busarellus, Buteo, Buteogallus, Geranoaetus, Harpyhaliaetus, Leucopternis, Parabuteo, Harpia, Haliaeetus, Aquila, Spizaetus</i> )
9 - URUBITINGINAE ( <i>Buteogallus</i> )	9 - ACCIPITRINAE ( <i>Accipiter, Heterospizias</i> )
10 - BUTEONINAE ( <i>Busarellus, Buteo, Geranoaetus, Leucopternis, Parabuteo</i> )	
11 - ACCIPITRINAE ( <i>Accipiter</i> )	
<b>Hellmayr &amp; Conover (1949)</b>	<b>Amadon &amp; Bull (1988)</b>
1 - PANDIONINAE ( <i>Pandion</i> )	1 - ELANINAE ( <i>Gampsonyx, Elanus</i> )
2 - ELANINAE ( <i>Elanus</i> )	2 - MILVINAE ( <i>Harpagus, Ictinia, Rosthramus</i> )
3 - MILVINAE ( <i>Harpagus, Rosthramus, Ictinia</i> )	3 - PERNINAE ( <i>Elanoides, Leptodon</i> )
4 - PERNINAE ( <i>Elanoides, Leptodon</i> )	4 - AEGYPIINAE ( <i>Gyps, Necrosyrtes</i> )
5 - CIRCINAE ( <i>Circus, Geranospiza</i> )	5 - CIRCAETINAE ( <i>Circaetus</i> )
6 - BUTEONINAE ( <i>Busarellus, Buteo, Buteogallus Harpyhaliaetus, Parabuteo, Leucopternis, Morphnus Harpia, Haliaeetus, Aquila, Spizaetus</i> )	6 - "SEA EAGLES" ( <i>Haliaeetus</i> )
7 - ACCIPITRINAE ( <i>Accipiter, Heterospizias</i> )	7 - "HARPY EAGLES" ( <i>Harpia</i> )
	8 - AQUILINAE ( <i>Aquila, Spizaetus</i> )
	9 - SUB-BUTEOS ( <i>Busarellus, Buteo, Buteogallus, Geranoaetus, Harpyhaliaetus, Heterospizias, Leucopternis, Parabuteo, Geranospiza</i> )
	10 - ACCIPITRINAE ( <i>Accipiter</i> )
<b>Holdaway (1994)</b>	<b>Lerner &amp; Mindell (2005)</b>
1 - ELANOIDINAE ( <i>Elanoides</i> )	1 - ELANINAE ( <i>Elanus</i> )
2 - ELANINAE ( <i>Elanus, Gampsonyx</i> )	2 - MILVINAE ( <i>Milvus</i> )
3 - GYPAETINAE ( <i>Pernis, Gypaetus, Necrosyrtes, Aegypius, Gyps, Polyboroides, Circaetus</i> )	3 - PERNINAE ( <i>Leptodon</i> )
4 - CIRCINAE ( <i>Circus, Geranospiza</i> )	4 - MELIERAXINAE ( <i>Melierax</i> )
5 - MACHAERHAMPHINAE ( <i>Machaerhamphus</i> )	5 - AEGYPIINAE ( <i>Gyps, Necrosyrtes</i> )
6 - MILVINAE ( <i>Buteogallus, Milvus, Haliastur, Haliaeetus, Ichthyophaga</i> )	6 - GYPAETINAE ( <i>Gypaetus</i> )
7 - ACCIPITRINAE ( <i>Busarellus, Buteo, Geranoaetus, Heterospizias, Leucopternis, Parabuteo, Harpagus, Ictinia, Harpia, Morphnus, Aquila, Spizaetus, Melierax, Accipiter</i> )	7 - CIRCAETINAE ( <i>Circaetus</i> )
	8 - CIRCINAE ( <i>Circus</i> )
	9 - POLYBOROIDINAE ( <i>Polyboroides</i> )
	10 - HALIAEETINAE ( <i>Haliaeetus</i> )
	11 - HARPIINAE ( <i>Harpia</i> )
	12 - AQUILINAE ( <i>Aquila, Spizaetus</i> )
	13 - BUTEONINAE ( <i>Busarellus, Buteo, Buteogallus, Geranoaetus, Harpyhaliaetus, Heterospizias, Leucopternis, Parabuteo, Geranospiza, Ictinia, Rosthramus</i> )
	14 - ACCIPITRINAE ( <i>Accipiter</i> )

**Figura 5:** Diferentes propostas de subdivisões da família Accipitridae com a respectiva nomenclatura adotada pelos autores e parte dos gêneros inclusos nos agrupamentos. FONTE: MIGOTTO, 2008.

LERNER & MINDELL (2005), com dados moleculares, validaram a subfamília Buteoninae e nela incluíram os gêneros *Buteo*, *Geranoaetus*, *Parabuteo*, *Buteogallus*, *Harpyhaliaetus*, *Leucopternis*, *Ictinia*, *Rosthramus*,

*Geranospiza*, *Busarellus* e *Heteropzias*; embora sem amostrar os dois últimos. A proposta filogenética de HOLDAWAY (1994), com base em osteologia, mostra-se neste aspecto, extremamente discordante dos dados moleculares. Os gaviões buteoninos aparecem em um clado extremamente diverso (nomeado pelo autor como Accipitrinae), o qual inclui outros gêneros de Accipitridae, representantes de outros subgrupos (Milvinae, Aquilinae). Em nossas análises serão incluídas três espécies dessa subfamília:

#### 1.2.1.1 *Asturina nítida* - Gavião-Pedrês

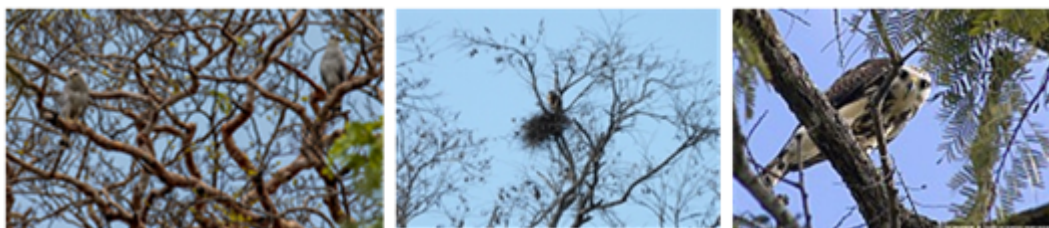
O Gavião-pedrês é uma ave também conhecido como gavião-cinza. Mede cerca de 43 cm de comprimento, pesando de 378 a 660 gramas. Tem uma envergadura de asas de até 98 cm. Possui as partes superiores cinza-claras, partes inferiores finamente barradas de cinza e branco, cauda atravessada por uma faixa branca. Os jovens imaturos tem as bases primárias amareladas (Figura 6).



Figura 6: Exemplos de gavião-pedrez (*Asturina nitida*), jovem (à direita) e adulto (à esquerda) (Fonte: [www.wikiaves.com](http://www.wikiaves.com))

Alimentam-se de aves, répteis e insetos. É rápido e ágil podendo perseguir suas presas por manobras entre as árvores. Caça também a partir de poleiros e gosta de planar à procura de presas (GLINSKI, 1988; SICK, 1997).

Faz o ninho com galhos secos no alto das árvores, pondo de dois a três ovos. Os filhotes permanecem no ninho por cerca de 6 semanas. O período de incubação é de aproximadamente 32 dias e é realizado por ambos os pais (Figura 7). Aos 2 anos de idade os indivíduos atingem a maturidade sexual. O macho fornece com maior frequência o alimento para a fêmea nas duas primeiras semanas de pós-incubação, após esse período a fêmea também ajuda na caça (GLINSKI, 1988; SICK, 1997).



**Figura 7:** Casal de Gavião Pedrês, ninho da ave e um exemplar jovem, respectivamente. FONTE: <http://www.wikiaves.com>

Vive na borda de matas, campos, cerrados e florestas. Ave rápida e ágil bate asas e plana por pouco tempo para arrebatrar a presa. No voo, usa as correntes de ar quente para adquirir altura. Ocorre desde o sul dos Estados Unidos até a Argentina e no Brasil setentrional e leste-meridional até São Paulo (GLINSKI, 1988; SICK, 1997) (Figura 8).



Figura 8: Distribuição geográfica do gavião-pedrez em território brasileiro, em verde. (Fonte: <http://www.avesrapinabrasil.com>).

#### 1.2.1.2 *Buteogallus meridionalis* - Gavião-Caboclo

O gavião-caboclo, também conhecido pelos nomes de gavião-casaca-de-couro, gavião-telha (São Paulo), gavião-fumaça (Mato Grosso) e gavião-tinga (Pará), é uma espécie comum em campos, pastagens, borda de alagados, manguezais e no cerrado. A espécie mede cerca de 55 centímetros de comprimento, com plumagem ferrugínea. O adulto é todo marrom avermelhado, com a ponta das asas e cauda negras e penas longas. Possui uma faixa branca, estreita, na cauda. Pernas e pele das narinas são amarelas. Bico negro e olho marrom avermelhado. A cauda é creme, com finas listras escuras. Faixa larga subterminal negra. Penas longas das asas com listras finas e ponta negra (ANTAS,2005; SICK, 1997 )(Figura 9).



Figura 9: Gavião Caboclo adulto e jovem, respectivamente. FONTE: <http://www.wikiaves.com>

É um gavião de áreas abertas, campos e cerrados, onde se alimenta de várias presas, como pequenos mamíferos, aves, cobras, lagartos, rãs, sapos e grandes insetos. Na baixa das águas, apanha caranguejos. Reproduz-se de julho a novembro (Figura 10). Faz ninho à pouca altura, sobre árvores baixas ou palmeiras. Põem um ou, raramente, 2 ovos brancos (ANTAS,2005; SICK, 1997).



Figura 10: Casal de gaviões-caboclos e filhote em ninho (FONTE: [www.wikiaves.com](http://www.wikiaves.com)).

Presente em quase todo o Brasil, com exceção de áreas densamente florestadas. Encontrado também do Panamá à Argentina (ANTAS,2005; SICK, 1997) (Figura 11).



Figura 11: Distribuição geográfica do gavião-pedrez em território brasileiro, em verde. (Fonte: <http://www.avesrapinabrasil.com>).

#### 1.2.1.3 *Rupornis magnirostris* - Gavião-Carijó

O gavião-carijó é encontrado em diferentes ambientes, ocorrendo do México à Argentina e em todo o Brasil. É a espécie predominante no Brasil. Pesa de 250 a 300 gramas, e mede de 31 a 41 centímetros, sendo os machos 20% menores que as fêmeas. Há grande diferença entre os adultos e os imaturos, sendo que os últimos podem ser confundidos com vários outros gaviões, pois apresentam a coloração marrom-carijó. Já os adultos apresentam a ponta do bico negra com a base amarelada, a cabeça e a parte superior das asas são amarronzadas, mas tornam-se cinzas à medida que a ave amadurece. O peito é ferruginoso, a barriga e as pernas são brancas e finamente barradas com listras ferrugíneas. A base da cauda é branca, mas vai se tornando barrada em direção à extremidade. Existem duas listras negras bem visíveis na extremidade da cauda. Quando em vôo suas asas são largas e de comprimento médio. A coloração básica da parte inferior das asas é o bege estriado com finas listras escuras (SICK, 1997 ) (Figura 12).



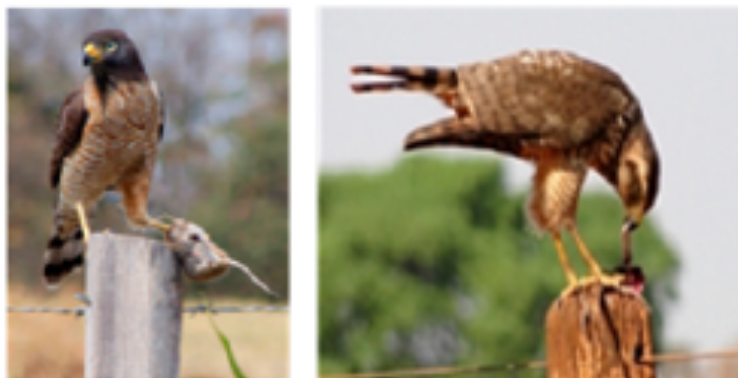


Figura 12: Gavião carijó adulto (esquerda) e jovem (direita). (Fonte: <http://www.wikiaves.com>)

O gavião-carijó vive em casais que constroem um ninho de gravetos revestido por folhas com cerca de meio metro de diâmetro, geralmente no topo de uma árvore grande (Figura 13). As fêmeas apresentam os dois ovários desenvolvidos em vez de apenas o esquerdo como nas outras aves. A postura de em média 2 ovos é depositada sobre um revestimento de folhas secas e incubada pela fêmea. Durante este período de cerca de um mês, a fêmea é alimentada pelo macho. Os ovos são geralmente manchados, de cor muito variável, até dentro de uma mesma postura. Quando está reproduzindo pode tornar-se agressivo, atacando até mesmo seres humanos que se aproximem de seu ninho (SICK, 1997).

É uma das espécies mais comuns de nosso país (Figura 14), ocorre em todos os estados, habitando os mais variados ambientes: campos, bordas de mata, áreas urbanas, etc., sendo mais raro em áreas densamente florestadas (SICK, 1997).



Figura 13: Gavião carijó: casal, ninho e filhote. (Fonte: <http://www.wikiaves.com>)

Nas últimas décadas este gavião passou a se tornar mais comum nos centros urbanos, se adaptando com sucesso a este ambiente, pois nas cidades a oferta de presas é maior e os seus predadores naturais (outras aves de rapina maiores) são escassos.



Figura 14: A cor verde indica que o gavião carijó é encontrado em todo o território nacional. (Fonte: <http://www.avesrapinabrasil.com>).

### 1.2.2 Subfamília Harpiinae

As quatro espécies e gêneros das chamadas Águias Harpias que constituem a subfamília Harpiinae estão entre os maiores raptos e são encontrados nas florestas equatoriais e tropicais das Américas, nas Filipinas e na Nova Guiné. Este grupo é geralmente considerado monofilético devido ao

seu grande tamanho, falta e penas no tarso e similaridades no comportamento (BROWN AND AMADON, 1968; THIOLLAY, 1994); no entanto, alguns autores têm sugerido que as espécies do novo mundo não são irmãs das espécies do velho mundo (JOLLIE, 1977b). As duas espécies neotropicais serão incluídas no presente trabalho: *Morphnus guianensis* e *Harpia harpyja*.

#### 1.2.2.1 *Morphnus guianensis* - Uiraçú-Falso

O uiraçu-falso é conhecido também como gavião-real-falso. Segundo a Lista Vermelha de Espécies Ameaçadas da IUCN, *M. guianensis* tem o status de “quase ameaçada” (NT - Near Threatened). Mede de 81 a 91 cm de comprimento, sendo as fêmeas maiores e mais robustas que os machos, fato comum aos Accipitridae. Na cabeça, apresentam penacho escuro, com uma única pena negra medial maior, diferenciando-o do gavião-real, com duas penas. Pode apresentar-se tanto em fase clara como escura. Na fase clara, mais comum, o ventre é predominantemente branco, com estrias bege-claro, a partir do peito acinzentado. A cauda apresenta padrão barrado. Em vista dorsal, as asas são negras. O padrão escuro, pouco comum, foi primeiramente descrito como espécie distinta. É quase totalmente negro, ponteados de branco, e estrias brancas no ventre (SICK, 1997) (Figura 15).

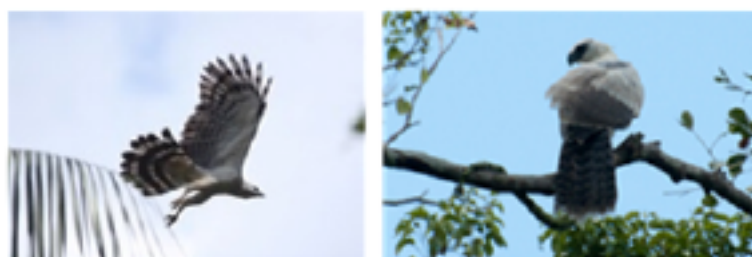


Figura 15: Falso Uiraçú adulto e jovem, respectivamente. (FONTE: <http://www.wikiaves.com>).

Caça outras aves como jacus e jacamins, embaixo de fruteiras (SICK, 1997). Geralmente são produzidos dois ovos. Os ninhos são construídos a cerca de 30 m do solo e podem ser reutilizados por vários ciclos reprodutivos (Figura 16) e o período de incubação dos ovos é de 40 a 50 dias.



Figura 16: Ninho e filhote de Uiraçu Falso. (Fonte: <http://www.wikiaves.com>).

Podemos encontrar o gavião-real falso em florestas conservadas ou com pouca alteração, chamadas de primárias e secundárias. Esse gavião vive em altitudes que vão desde o nível do mar até acima dos mil metros. Vive sozinho ou em pares, passando boa parte do tempo imóvel, oculto em um poleiro alto de onde procura suas presas. Existia em grande parte do Brasil (Figura 17). Podia ser encontrado nas Florestas Amazônica e Atlântica, mas com a eliminação da vegetação, principalmente na porção leste do Brasil, tem se reduzido consideravelmente. Atualmente tornou-se bastante raro, ocorrendo principalmente na Amazônia, onde há grandes áreas contínuas de florestas úmidas (SICK, 1997; FERGUSON-LESS & CHRISTIE, 2001).



Figura 17: Distribuição geográfica do Falso Uiraçu em território brasileiro. (Fonte: <http://www.avesrapinabrasil.com>)

#### 1.2.2.2 *Harpia harpyja* - Gavião-Real

O Gavião-real é conhecido também como Gavião-de-penacho, Guiraçu (uirá, guirá = ave, açu = grande), Hárpia e Uiraçu. Embora não seja a maior das aves predadoras do planeta, é tida como a mais forte. É considerada a maior águia brasileira. Possui bico potente e suas garras são maiores que as do urso pardo americano, suas pernas tem a grossura de um punho de um homem (SICK, 1997).

Tem um crescimento populacional muito lento. Este fato, associado à destruição de grandes áreas florestais e à caça indiscriminada, torna a espécie ameaçada de extinção em nosso país. Mede cerca de 105 cm de comprimento e até 220 cm de envergadura. O macho mede cerca 57 cm de altura e pesa 4,8 kg. A fêmea mede cerca de 90 cm de altura e pesa até 9 kg (SICK, 1997) (Figura 18).



Figura 18: Gavião Real macho, fêmea e jovem, respectivamente. (Fonte: <http://www.wikiaves.com> )

Alimenta-se de animais grandes, como a preguiça-real, mutuns, coatás, macacos-prego e guaribas, filhotes de veados, araras-azuis, seriemas, tatus, cachorro-do-mato, iguanas e cobras. Faz ninho no alto das árvores maiores, como samaumeiras e castanheiras, de onde observa tudo ao redor. O ninho, tão grande quanto o de um tuiuiú, é construído com pilhas de galhos. Põe 2 ovos cinza-esbranquiçados entre setembro e novembro, os quais pesam em torno de 110 g e tem período de incubação de 52 dias. Geralmente apenas um filhote sobrevive, levando cerca de 5 meses para voar, e de 2 a 3 anos para se tornar adulto, dependendo dos cuidados dos pais por um ano ou mais (Figura 19). A espécie não se reproduz todos os anos, pois necessita de mais de um ano para completar o período reprodutivo (OLIVEIRA & SILVA, 2006).



Figura 19: Casal de Gavião Real, ninho da espécie e indivíduo filhote, respectivamente. (Fonte: <http://www.wikiaves.com>).

Espécie rara, habita florestas primárias densas e florestas de galeria. Vive solitário ou aos pares na copa das árvores. Apesar do seu tamanho, é bastante ágil e difícil de ser visto. Presente no Brasil em regiões florestais remotas, sobretudo na Amazônia, ou em áreas protegidas, como reservas de Mata Atlântica (Figura 20). Eles migram em algumas épocas do ano para o estado de São Paulo. Encontrado também do México à Argentina (OLIVEIRA & SILVA, 2006).



Figura 20: Distribuição geográfica do Gavião Real em território brasileiro. (Fonte: <http://www.avesrapinabrasil.com>).

### 1.3 CITOGENÉTICA DE AVES

Mesmo sendo estudada desde a década de 1960, estima-se que menos de 14% das espécies de aves brasileiras tiveram seus cariótipos conhecidos até 2006 (DE LUCCA & ROCHA, 1992; SANTOS & GUNSKI, 2006). Em comparação com outros grupos, como peixes e mamíferos, o estudo cariotípico das Aves apresenta-se em defasagem (DE OLIVEIRA & JORGE, 2000).

As duas principais características do cariótipo das Aves são: um número diplóide elevado e a presença de muitos cromossomos de tamanho diminuto, denominados microcromossomos (DE OLIVEIRA & JORGE, 2000). Um cariótipo típico das aves apresenta de 6 a 10 pares de macrocromossomos e cerca de 30 pares de microcromossomos, totalizando aproximadamente 80 cromossomos. Entretanto, algumas espécies apresentam número de cromossomos abaixo dessa média, como alguns Falconidae, nos quais o número diplóide pode estar reduzido a 50 (DE OLIVEIRA & JORGE, 2000). No galo (*Gallusgallus*), aproximadamente 55% do genoma está contido nos cinco primeiros pares, 20% nos cromossomos de 6 a 10 e os 25% restantes nos microcromossomos (BLOOM *et al.*, 1993). Os cromossomos sexuais de aves são do tipo ZZ/ZW, o que significa que a fêmea apresenta o par sexual heteromórfico. Devido ao reduzido tamanho do genoma das aves, a heterocromatina constitutiva, região rica em sequências repetitivas, está localizada na maioria das vezes somente no W e na região pericentromérica dos macrocromossomos (BLOOM *et al.*, 1993).

Em 1976, DE BOER na publicação onde descrevia cariótipos de 16 espécies da ordem Falconiformes já afirmava que a variação nas estruturas cariotípicas encontradas em Falconiformes é muito maior do que a encontrada



em outros grupos de aves. No entanto, ela instiga uma questão ainda não respondida, que se fundamenta na dúvida se essa heterogeneidade cariotípica ocorre devido à origem polifilética dessas aves de rapina diurnas, ou se a variação ocorreu em ramificações a partir de um ancestral comum. Dessa forma, a aplicação de técnicas que refinem os dados já obtidos por estudos de citogenética clássica, possibilitaria a análise da presença de sinapomorfias para reforçar o monofiletismo ou o polifiletismo desse grupo.

### **1.3.1 Citogenética Molecular**

O desenvolvimento de novas metodologias em sequenciamento de DNA, mapeamento gênico e análise cromossômica permitiram um grande avanço na compreensão da organização, estrutura e evolução do complemento cromossômico. As técnicas de hibridização *in situ* proporcionaram uma ligação entre os dados moleculares de sequências de DNA e a citogenética, podendo ser utilizadas no mapeamento físico dessas sequências e na identificação e caracterização de cromossomos ou segmentos cromossômicos (SCHWARZACHER e HESLOP-HARRISON, 2000).

Através da comparação da ordem e sequência de genes em diferentes genomas, é possível traçar os caminhos evolutivos tomados pelo ancestral desses grupos. O potencial dessas metodologias é bem ilustrado em trabalhos publicados principalmente em mamíferos (revisão em CHOWDHARY & RAUDSEPP, 2001), dentre os quais podemos destacar as análises em primatas neotropicais, que já incluem um grande número de espécies analisadas (revisão em DE OLIVEIRA *et al.*, 2012).

Uma das técnicas mais importantes é a pintura cromossômica comparativa (ZOO-FISH). Essa técnica consiste na separação individual de cromossomos por citometria de fluxo ou microdissecção e posterior produção de sondas marcadas por fluorocromos. As sondas são utilizadas em experimentos de hibridização *in situ* em cromossomos metafásicos de outras espécies, permitindo a identificação exata de cromossomos ou segmentos cromossômicos entre espécies filogeneticamente distantes. Os experimentos podem utilizar uma única sonda, ou diversas sondas marcadas com fluorocromos diferentes, e que serão distinguidas pelas suas cores (SCHWARZACHER e HESLOP-HARRISON, 2000).

### **1.3.2 Pintura Cromossômica em Aves**

A pintura cromossômica comparativa em Aves vem superando as limitações impostas pelas características do seu cariótipo, pois, devido ao seu pequeno tamanho, um grande número de microcromossomos não apresenta padrões de bandeamento que permitam a comparação e análise de homologias. Vários artigos com aplicação de sondas cromossomo-específicas em aves foram publicados nos últimos anos, explorando diferentes abordagens como mecanismos de diversificação cromossômica (SHETTY *et al.*, 1999; DE OLIVEIRA *et al.*, 2005), filogenia (SHIBUSAWA *et al.*, 2004 a, b), diferenciação dos cromossomos sexuais (GRAVES, 2001), e mapeamento cromossômico (MASABANDA *et al.*, 2004, NISHIDA *et al.*, 2007; NIE *et al.*, 2009; DE OLIVEIRA *et al.*, 2010; TAGLIARINI *et al.*, 2011), entre outros.

Até o momento, foram utilizadas sondas de apenas duas espécies (*Gallus gallus* e *Leucopternis albicollis*) nas comparações cromossômicas entre

espécies de Falconiformes (DE OLIVEIRA *et al.*, 2010). Entre as espécies de Aves, *Gallus gallus* é a que apresenta o mapeamento gênico melhor desenvolvido. A aplicação de sondas cromossomo-específicas dos macrocromossomos de *Gallus* em emu (*Dromaius novaehollandiae*), duas espécies separadas por 80 milhões de anos, revelou apenas um rearranjo cromossômico, já que o cromossomo GGA 4 marcou um macrocromossomo e um microcromossomo em *Dromaius* (SHETTY *et al.*, 1999). Posteriormente, o mesmo resultado foi obtido no condor da Califórnia (*Gymnogyps californianus*), pombo (*Columba livia*), tentilhão (*Fringilla coelebs*), tordo (*Turdus iliacus*) e três espécies de faisão, entre outras (RAUDSEPP *et al.*, 2002; GUTTENBACH *et al.*, 2003; DERJUSHEVA *et al.*, 2004), sugerindo que o cromossomo GGA 4 representaria um estado apomórfico em relação ao cariótipo ancestral das Aves. O mesmo resultado foi observado em espécies de Falconiformes como Harpya (*Harpia harpyja*), Urubu de cabeça vermelha (*Cathartes aura*), Abutres do velho mundo (*Gyps rueppelli*, *Gyps fulvus* e *Gypaetus barbatus*), (DE OLIVEIRA *et al.*, 2005; TAGLIARINI *et al.*, 2011; NANDA *et al.*, 2006) e Strigiformes, como a coruja murucututu (*Pulsatrix perspicillata*) (DE OLIVEIRA *et al.*, 2008). Pode-se dizer que a análise de espécies que apresentam o cariótipo formado por um grupo de macrocromossomos (aproximadamente 8-10 pares) e muitos pares de microcromossomos revelou uma grande constância cariotípica, com a maioria dos grupos sintênicos mantendo-se inalterada. Esse cariótipo básico deve ser semelhante ao cariótipo ancestral das Aves, já que alguns répteis apresentam o cariótipo bimodal e as análises de mapeamento gênico identificaram uma ordem semelhante àquela observada em *Gallus* (RODIONOV, 1997, DERJUSHEVA *et al.*, 2004).

Os primeiros resultados desses estudos em aves de rapina foram com sondas cromossomo-específicas de *Gallus* em experimentos de hibridização *in situ* no cariótipo da harpia (*Harpia harpyja*) (DE OLIVEIRA *et al.*, 2005). Como outras aves de rapina, a harpia apresenta um número diplóide relativamente baixo,  $2n=58$ , e poucos pares de microcromossomos. O trabalho foi realizado com a utilização de sondas referentes aos seis primeiros pares de *Gallus* mais o cromossomo Z, reunidos em um *pool* de sete cores, mais um *pool* contendo dezoito pares de microcromossomos, todos marcados com a mesma cor e revelou uma completa reorganização genômica na harpia, com a ocorrência de fusões, translocações e fissões (Figura 21). Esses dados mostram a ocorrência de uma drástica reorganização genômica na harpia, que pode ser estendida para outras aves de rapina com cariótipos similares.

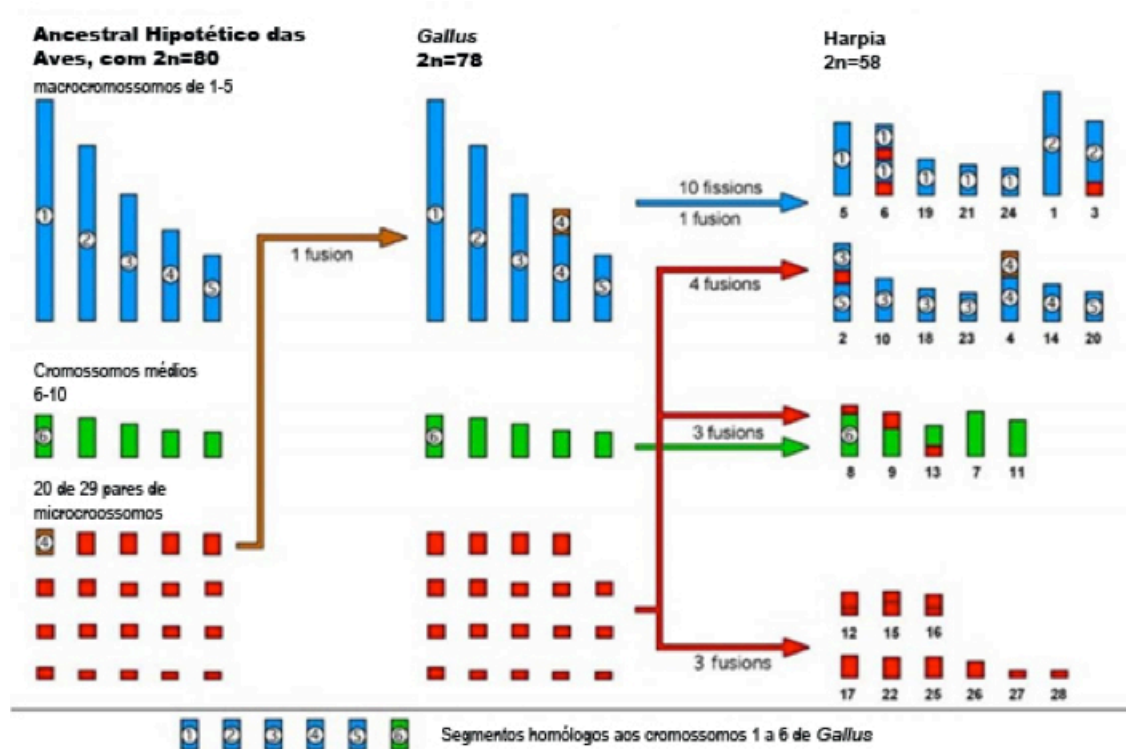


Figura 21: Rearranjos cromossômicos observados na comparação entre o cariótipo da harpia com aquele de *Gallus gallus* e do ancestral hipotético das Aves. Os pares GGA1-6 aparecem identificados pelo número no círculo. O par sexual não está representado no esquema (Adaptado de de Oliveira *et al.*, 2006).

#### 1.4 DADOS CITOGENÉTICOS DA FAMÍLIA ACCIPITRIDAE

Accipitridae (Aves, Falconiformes) é a quarta maior família não-passerinae (aproximadamente 240 espécies) e encontra-se entre os grupos de aves com o maior número de espécies analisadas citogeneticamente (BED'HOM, 1999, AMARAL & JORGE, 2003), devido principalmente à atraente diversidade cariotípica observada, incomum para a maioria de ordens de aves, que conservam um cariótipo muito semelhante entre si, sem grandes variações no número ou fórmula cromossômica. A análise dessa variação cromossômica vem revelando importantes caracteres para análises filogenéticas (DE OLIVEIRA *et al.*, 2006; NANDA *et al.*, 2006; DE OLIVEIRA *et al.*, 2010).

As aves de rapina diurnas apresentam números cromossômicos relativamente baixos, entre 50-70, e poucos pares de microcromossomos. De fato, os cromossomos diminuem de tamanho gradativamente entrando num grupo de quatro a oito pares de microcromossomos, distintos dos restantes pelo seu tamanho diminuto (BED'HOM, 1999).

Há alguns anos atrás, foram publicados resultados utilizando sondas cromossomo-específicas de *Gallus* em experimentos de hibridização *in situ* no cariótipo da harpia (*Harpia harpyja*) a águia mais possante do mundo, pertencente à subfamília Harpiinae (DE OLIVEIRA *et al.* 2005), nos abutres do velho mundo, pertencentes à subfamília Aegyptiinae (NANDA *et al.*, 2006) e em *Leucopternis albicollis*, da subfamília Buteoninae (DE OLIVEIRA *et al.*, 2010). De modo geral, diversos rearranjos foram detectados, mostrando que as diferentes linhagens de Accipitrídeos sofreram muitos rearranjos cromossômicos.

Assim como na harpia (Figura 21), o citado estudo de NANDA *et al.* (2006) com pintura cromossômica em abutres do Velho Mundo revelou extensa reorganização cariotípica nesse grupo. Os cromossomos de 1 a 5 de *Gallus* também hibridizaram em mais de um par de cromossomos (entre três e cinco) nas diferentes espécies analisadas, que também apresentam baixo número diplóide e poucos pares de microcromossomos. A mesma organização foi observada nas hibridizações feitas de GGA em *Leucopternis albicollis*. Já na hibridização reversa feito com sondas de *Leucopternis albicollis* (LAL) em GGA, foi observado que várias sondas de LAL se comportavam como sondas região-específicas (DE OLIVEIRA *et al.*, 2010).

### 1.5 PINTURA CROMOSSÔMICA EM ANÁLISES FILOGENÉTICAS

Sondas cromossomo-específicas de uma espécie podem ser hibridizadas *in situ* em uma metáfase de outra espécie, detectando homologias entre as duas espécies. Muitas vezes a sonda pode hibridizar em apenas um cromossomo, indicando que o cromossomo inteiro encontra-se conservado. Outras vezes, vários cromossomos ou segmentos de diferentes cromossomos são marcados, indicando que rearranjos intercromossômicos ocorreram durante a divergência das espécies. A utilização da técnica de FISH reversa, por exemplo, auxilia em uma identificação mais detalhada de homologias entre diferentes espécies. Uma importante aplicação 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 (GRIFFIN *et al.*, 2007).

Em Accipitridae, o poder dessa metodologia ficou bem ilustrado nos resultados da comparação entre *Gallus* e harpia (DE OLIVEIRA *et al.*, 2005), de *Gallus* e abutres do velho mundo (NANDA *et al.*, 2006) e de *Gallus* e gavião branco (DE OLIVEIRA *et al.*, 2010). Um número maior de espécies analisadas por essa técnica permitirá a identificação de rearranjos cromossômicos comuns a diferentes grupos de espécies, que em uma análise filogenética funcionariam como sinapomorfias na resolução de filogenias ainda controversas. É importante observar que os rearranjos cromossômicos são altamente específicos. O grande número de rearranjos cromossômicos observados nas espécies de Accipitridae analisadas até o momento sugere a existência de grupos de rearranjos que podem ser exclusivos de ramificações dentro do clado das aves de rapina, que podem ser explorados em análises filogenéticas minuciosas.

Mesmo em aves com aparente conservação cromossômica, dados interessantes podem ser obtidos com técnicas variantes da pintura cromossômica. Sondas construídas a partir de segmentos de DNA, como os clones de cDNA permitem também a análise do mapeamento gênico dessas espécies, o que pode revelar rearranjos intracromossômicos não detectados pela aplicação de sondas cromossomo-específicas. Um exemplo interessante é a comparação entre oito espécies pertencentes à ordem Galiformes (SHIBUSAWA *et al.*, 2004a). Esses autores detectaram vários rearranjos intracromossômicos não revelados pelo uso de sondas cromossomo-específicas: várias inversões ocorreram em diferentes macrocromossomos, e as relações filogenéticas entre essas espécies, propostas a partir do uso dos

dados cromossômicos, apresentaram uma grande semelhança com propostas anteriores construídas a partir de dados moleculares.

Os exemplos citados anteriormente indicam que a filogenômica a partir do uso de sondas cromossomo-específicas ou segmento-específicas é uma poderosa ferramenta filogenética, e sua aplicação poderá trazer não só o esclarecimento nas relações de parentesco entre diferentes grupos de aves, mas também sobre os mecanismos de reorganização genômica que ocorreram nessa classe.



## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Analisar as homologias cromossômicas entre cinco espécies de Accipitrídeos neotropicais (*Harpia harpyja* e *Morphnus guianensis*, *Rupornis magnirostris*, *Asturina nitida* e *Buteogallus meridionalis*), por técnica de hibridização por fluorescência *in situ* (FISH) usando sondas teloméricas, de rDNA, e de cromossomo total derivadas de *Gallus gallus*.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Definir homologias cromossômicas entre *Harpia harpyja* e *Gallus gallus*;
- Definir homologias cromossômicas entre *Morphnus guianensis* e *Gallus gallus*;
- Comparar as homologias cromossômicas entre *H. harpyja*, *M. guianensis* e inferir sobre os padrões de evolução cariotípica em Harpiinae Neotropicais.
- Definir homologias cromossômicas entre *Buteogallus meridionalis* e *Gallus gallus*;
- Definir homologias cromossômicas entre *Rupornis magnirostris* e *Gallus gallus*;
- Definir homologias cromossômicas entre *Asturina nitida* e *Gallus gallus*;

- Comparar as homologias cromossômicas entre *B. meridionalis*, *R. magnirostris* e *A. nitida* e inferir sobre os padrões de evolução cariotípica em Buteoninae Neotropicais.

- Comparar os dados obtidos com outros Accipitridae previamente analisados, e inferir sobre os padrões de evolução cariotípica nessa família.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 COLETA DE AMOSTRAS

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Universidade Federal do Pará (CEPAE UFPA 170/13). Foram coletadas amostras de cinco espécies pertencentes a duas subfamílias distintas de Accipitridae (Harpiinae e Buteoninae), mantidas em cativeiro no Parque Mangal das Garças e no Criadouro Gavião Real (tabela I). De cada indivíduo, foram coletados bulbos de penas jovens, ou biópsias de pele. Para transporte, essas amostras foram colocadas em tubos de centrifuga contendo meio DMEM com antibióticos e fungicidas. Os procedimentos de coleta foram acompanhados pelos médicos veterinários das instituições responsáveis pelos animais.

**Tabela I** – Espécies analisadas no presente trabalho

Nome Científico	Nome Vulgar	Sexo	Procedência
<i>Morphnus guianensis</i>	Uiraçu Falso	Fêmea Macho	CGR CGR
<i>Harpia harpyja</i>	Harpia	Fêmea Macho	CGR CGR
<i>Asturina nitida</i>	Gavião Pedrês	Fêmea	CGR
<i>Buteogallus meridionalis</i>	Gavião Caboclo	Macho	CGR CGR
<i>Rupornis magnirostris</i>	Gavião Carijó	Fêmea	PMG

**Legenda:** CGR= Criadouro Gavião Real – Capitão Poço/PA; PMG= Parque Mangal das Garças – Belém/PA.

### 3.2 CULTURA DE FIBROBLASTOS

Foi utilizada a técnica de desagregação enzimática de polpa de pena segundo MARTINS (1988) para cultura de fibroblastos, ambas com modificações:

1. Em uma câmara de fluxo laminar, o bulbo da pena foi colocado em uma placa de Petri estéril e, com o auxílio de tesoura (ou bisturi) e pinças estéreis, foi aberto para que sua polpa fosse retirada;

2. O tecido limpo foi transferido para uma segunda placa de Petri, contendo 3 mL de colagenase tipo IV a 0,1%, e então foi seccionado em pequenos fragmentos.

3. O material foi ressuspendido com pipeta Pasteur e incubado por 30 minutos, em estufa a 37°C.

4. Foram adicionados 2 mL de meio de cultura à temperatura ambiente com 10% de soro bovino fetal.

5. O material foi novamente ressuspendido, e então foi transferido para um tubo de centrifuga, sendo centrifugado por 10 minutos, à 800 rpm.

6. Após a centrifugação, o sobrenadante foi desprezado, e foram adicionados ao tubo 5 mL de meio completo (contendo 10% de soro bovino fetal, 1% de antibióticos, 0,5% de fungizone e 1% de L-glutamina) para que o material pudesse ser ressuspendido novamente e transferido para uma garrafa de cultura (Corning 25 cm<sup>2</sup>).

7. A garrafa foi incubada a temperatura de 37°C a 40°C, dando início desta maneira à cultura primária.

8. As garrafas foram repicadas e os cromossomos foram obtidos a partir da segunda passagem, sendo mantidas algumas garrafas nas primeiras passagens para criopreservação.

### 3.3 OBTENÇÃO DE CROMOSSOMOS METAFÁSICOS

Quando as garrafas apresentavam-se com um grande número de células em divisão, detectadas através de análise em invertoscópio, procedia-se com a obtenção de cromossomos metafásicos, utilizando-se o método padrão, como proposto por MARTINS (1988).

1. Foram adicionados 100 uL de colchicina à garrafa de cultura, que foi devolvida à estufa e incubada por 1 hora;

2. Terminado o tempo, a garrafa foi submetida à ação da tripsina para que ocorresse o descolamento das células da superfície plástica do recipiente de cultura;

3. O material foi transferido para um tubo de fundo cônico, e foi centrifugado a 1000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi desprezado.

4. Foram adicionados 10 mL de solução de cloreto de potássio (KCl) 0,075M a 37°C. O material foi ressuscendido utilizando pipeta Pasteur, e deixado na estufa por mais 1 hora. Passado esse tempo, foi acrescentado 1 mL de fixador Carnoy (numa proporção de 3:1 de metanol e ácido acético), ressuscendido mais uma vez e centrifugado por 10 minutos a 1000 rpm.

5. O sobrenadante foi descartado, e foram acrescentados 5 mL de fixador Carnoy gelado e recém preparado. O material foi ressuscendido e centrifugado por 10 minutos a 1000 rpm. Esse processo foi repetido por mais

três vezes e na última lavagem, foram adicionados cerca de 2 mL, e o material foi acondicionado em geladeira.

### **3.4 PREPARAÇÃO DAS LÂMINAS**

Antes de sua utilização, as lâminas foram rigorosamente lavadas com detergente neutro, colocadas em um recipiente com água destilada e guardadas na geladeira. Como procedimento geral:

1. No momento de serem utilizadas, as lâminas foram retiradas do recipiente contendo água destilada, e secas com lenço de papel.
2. A lâmina foi deixada por alguns minutos em uma caixa de alumínio em banho-maria a aproximadamente 50°C;
3. A suspensão cromossômica condicionada em tubo de centrífuga foi devidamente ressuspensa com pipeta Pasteur e com uma micropipeta, 20µL desse material foi gotejado na lâmina.
4. Após alguns minutos, a lâmina foi retirada da caixa, e guardada para aplicação das técnicas de pintura cromossômica, ou corada para análise.

### **3.5 TÉCNICA DE COLORAÇÃO CONVENCIONAL**

Esse tipo de coloração foi utilizada para análise do número e morfologia dos cromossomos. Para esse tipo de análise, as lâminas foram coradas com Giemsa.

1. 0,5 mL de corante foi diluído em 10 mL de tampão fosfato pH 6,8, obtendo-se assim uma solução a 5%. A solução foi despejada sobre a lâmina, permanecendo por 10 minutos.
2. Logo depois a lâmina foi lavada com água destilada, e secada à temperatura ambiente.

### 3.6 HIBRIDIZAÇÃO *IN SITU* COM FLUORESCÊNCIA (FISH)

Foram utilizadas sondas cromossomo-específicas de *Gallus gallus* (pares 1-11 e Z), obtidas por citometria de fluxo e desenvolvidas no Cambridge Resource Centre for Comparative Genomics (Cambridge, Reino Unido). Além dessas, foram utilizadas sondas de rDNA e teloméricas, amplificadas e marcadas a partir de iniciadores adquiridos especificamente para essas sequências.

#### 3.6.1 Hibridação fluorescente *in situ* (FISH) com sonda de rDNA18S/28S e sonda Telomérica

##### 3.6.1.1 Preparação e marcação da sonda de rDNA

A sonda de DNAr 18S foi obtida por PCR (Polymerase Chain Reaction) a partir do DNA total de *Leucopternis albicollis*, usando os primers 18S F(5' CCG CTT TGG TGA CTC TTG AT 3') e 18S R (5' CCG AGG ACC TCA CTA AAC CA 3'). Os parâmetros para marcação foram: 31µL de água Milli-Q, 5µL de tampão da enzima Taq polimerase (10X), 5µL de MgCl<sub>2</sub> (25mM), 1µL de dATP, dCTP, dGTP e dTTP (2mM cada), 1µL de cada primer (10mM), 0,5µL de Taq polimerase (5U/µL) e 2µL de DNA molde. Total da reação: 50µL.

O programa de PCR utilizado apresentou as seguintes condições:

1 – 94°C → 2'	} 35 X
2 – 94°C → 45''	
3 – 52°C → 45''	
4 – 72°C → 1'30''	
5 – 72°C → 5''	

Após verificação do resultado da PCR em gel, as sondas foram marcadas com biotina pela técnica de *Nick Translation*, utilizando-se o kit “*Nick Translation*” da Roche, segundo as especificações do fabricante, e mantidas em freezer até o momento do uso.

### 3.6.1.2 Preparação e marcação da sonda telomérica

A sonda utilizada para detecção de sequências teloméricas foi amplificada e marcada por PCR, sendo digoxigenina 11-dUTP (Roche AppliedScience). Foram usados primers (TTAGGG)<sub>5</sub> e (CCCTAA)<sub>5</sub> e os parâmetros para marcação foram: 33,9µL de água Milli-Q , 5µL de tampão de enzima Taq polimerase (10X), 2µL de MgCl<sub>2</sub> (25mM), 1µL de dATP, dCTP e dGTP, e 0,7µL de dTTP (2mM cada), 1 µL de Biotina-11-dUTP, 1,5µL de cada primer (10mM), 0,4µL de Taq polimerase (5U/µL) e 1µL de DNA molde. Total da reação: 50µL.

O programa de PCR utilizado apresentou as seguintes condições:

1 – 95°C → 2'	}	35 X
2 – 94°C → 45''		
3 – 50°C → 45''		
4 – 66°C → 1'30''		
5 – 72°C → 5''		

### 3.6.1.3 Preparação das lâminas para hibridização com sondas de rDNA

As lâminas foram preparadas como no item 3.3, e imediatamente após sua secagem, foram observadas ao microscópio com contraste de fase, para avaliação de sua qualidade. Constatada uma boa qualidade, as lâminas



com as preparações cromossômicas foram tratadas com RNase e desidratadas, seguindo as etapas abaixo:

1. As lâminas foram incubadas com uma solução de RNase diluída em 4xSSC/T (100 µg/ml) por 20 minutos, a 37°C.
2. Após esse período, as lâminas foram incubadas em 2xSSC por 5 minutos, por duas vezes.
3. As lâminas foram então desidratadas em uma série de etanóis a 70% (2x), 90% (2x) e 100%, 5 minutos em cada banho.
4. Depois disso, as lâminas foram incubadas por duas horas em estufa a 65°C.

### **3.6.2 Hibridação fluorescente *in situ* (FISH) com sonda cromossomo-específicas de *Gallus gallus* e de *Leucopternis albicollis***

Foram utilizadas sondas correspondentes aos autossomos de 1 a 10 mais o Z de *Gallus gallus* (GGA). Em *Harpia harpyja* e *Morphnus guianensis*, utilizamos a sonda GGA11 em experimentos extras, assim como a sonda de *Leucopternis albicollis* (LAL) correspondente ao autossomos 3 nas espécies de Buteoninae, para confirmar a fusão entre os segmentos correspondentes a GGA1p e GGA6.

#### **3.6.2.1 Preparação das lâminas**

As lâminas foram preparadas como no item 3.3, e imediatamente após sua secagem, foram observadas ao microscópio com contraste de fase, para avaliação de sua qualidade. Constatada uma boa qualidade, as lâminas

com as preparações cromossômicas seguiram para desidratação na série de etanóis e incubadas a 65°C por duas horas.

### **3.6.2.2** Desnaturação das Sondas de DNA e dos Cromossomos Metafásicos

Antes de sua utilização, as sondas foram adicionadas à solução de hibridização, em uma proporção de 2 µL de sondas para 13 µL de solução, em um tubo de microcentrífuga. Foi feita a desnaturação das sondas, mantendo o tubo a 75°C por 10 minutos em banho-maria. No caso das sondas cromossomo-específicas, o material permaneceu a 75°C por 10 minutos, e depois foi mantido a 37°C por 30 minutos antes do uso, permitindo assim que as seqüências repetitivas de DNA se reassociassem.

Da mesma forma, as lâminas seguiram para o processo de desnaturação dos cromossomos metafásicos, seguindo os seguintes passos:

1. As lâminas foram incubadas por 90 segundos em formamida 70%/2xSSC a 73°C.
2. Imediatamente após a desnaturação, as lâminas foram mergulhadas em etanol a 70%, gelado, e incubadas por 4 minutos.
3. As lâminas foram desidratadas em uma série de etanóis a 70% (1x), 90% (2x) e 100% (1x), 2 minutos em cada banho.

### **3.6.2.3** Hibridação e detecção dos sinais correspondentes

Após as sondas serem desnaturadas, em solução de hibridização, foram aplicados 15 µL de solução de hibridização contendo as sondas, de acordo com os passos a seguir:

1. As lâminas foram incubadas em câmara úmida a 37°C por 24 horas (rDNA e teloméricas) ou 72 horas (no caso das sondas cromossomo-específicas).
2. Foi feita a lavagem de estringência, incubando-se as lâminas com solução de formamida 50% em 2xSSC pH 7,0 por 5 minutos, a 40°C, duas vezes;
3. As lâminas foram lavadas com 2xSSC a 40°C, por 5 minutos;
4. Cerca de 200 µL de solução de detecção foram colocados sobre cada lâmina, e as mesmas foram incubadas por 20 minutos, a 37°C.
5. Depois disso, as lâminas foram lavadas por três vezes com 4xSST a 38°C, 5 minutos cada.
6. Após escorrer o excesso de 4xSST, colocou-se cada lâmina sobre uma lamínula contendo duas gotas de meio de montagem (*antifade* e DAPI).
7. O excesso de meio de montagem foi retirado em um bloco de papel filtro, e a lamínula foi selada com o uso de esmalte incolor.

### **3.7 ANÁLISE CARIOTÍPICA**

#### **3.7.1 Citogenética Clássica**

As lâminas em coloração convencional foram analisadas em microscópio óptico Leica D-1000, com objetiva de imersão com 100 vezes de aumento e ocular com 10 vezes de aumento. As localizações das melhores metáfases foram registradas em uma lâmina branca, para posterior captura em sistema digital. De cada animal, pelo menos 20 metáfases em coloração convencional foram utilizadas para a definição do número diplóide e morfologia cromossômica.

### **3.7.2 Experimentos de FISH e Captura de Imagens**

As lâminas com coloração fluorescente foram analisadas em fotomicroscópio de fluorescência Zeiss Axiophot II, com objetiva de 63x e ocular com aumento de 10x. O optovar foi de 1,6, e os filtros utilizados foram Zeiss BP 436, FT 460 e LP 470.

As imagens foram capturadas digitalmente com o auxílio de câmera Zeiss AxioCam MRm, por meio do programa AxioVision 3.1 (controlador da câmera de vídeo e de captura digital de imagens). No caso da preparação com fluorescência, foi feita uma pseudo-coloração das imagens no próprio programa AxioVision. Na edição final das imagens, utilizamos o programa *Adobe Photoshop 7.1*.

## **4. RESULTADOS**

### **4.1. O CARIÓTIPO DAS ESPÉCIES DA SUBFAMÍLIA BUTEONINAE**

As espécies dessa subfamília, analisadas no presente trabalho apresentaram constituições cariotípicas bastante semelhantes, com o mesmo número cromossômico ( $2n=68$ ). Entretanto, pequenas diferenças foram observadas na morfologia, afetando o comprimento dos braços.

#### **4.1.1. *Rupornis magnirostris***

Foi analisado uma fêmea dessa espécie, que apresentou  $2n=68$ . O cariótipo mostrou dezessete pares grandes e médios de dois braços (1-17); doze pares pequenos, dos quais sete são acrocêntricos (18-22, 25) e quatro são de dois braços (23-24, 26-27); e seis pares menores, correspondendo a microcromossomos (28-33). O cromossomo Z é um submetacêntrico grande, e o W um metacêntrico pequeno (Figura 22A).

#### **4.1.2. *Buteogallus meridionalis***

Os dois espécimes analisados, ambos machos, apresentaram  $2n=68$ . O cariótipo apresentou oito pares de submetacêntricos grandes, onze pares de cromossomos metacêntricos (cinco pares de cromossomos médios e sete pares de cromossomos pequenos) e quatorze pares acrocêntricos, incluindo seis pares de microcromossomos (Figura 22B).

#### **4.1.3. *Asturina nitida***

Foi estudado um indivíduo do sexo feminino que apresentou  $2n=68$ , com dez pares de cromossomos submetacêntricos (cinco pares grandes e cinco pares médios), sete metacêntricos e dez pares acrocêntricos e seis pares de microcromossomos. O cromossomo Z é um submetacêntrico médio, e o W é um submetacêntrico pequeno (Figura 22C).

### **4.2. O CARIÓTIPO DAS ESPÉCIES DA SUBFAMÍLIA HARPIINAE**

As espécies da Subfamília Harpiinae apresentaram os números diplóides mais baixos para a família Accipitridae, com  $2n=58$  em *Harpia harpyja* e  $2n=54$  em *Morphnus guianensis*, ambos caracterizados por uma maior quantidade de pares de dois braços em relação aos acrocêntricos.

#### **4.2.1. *Harpia harpyja***

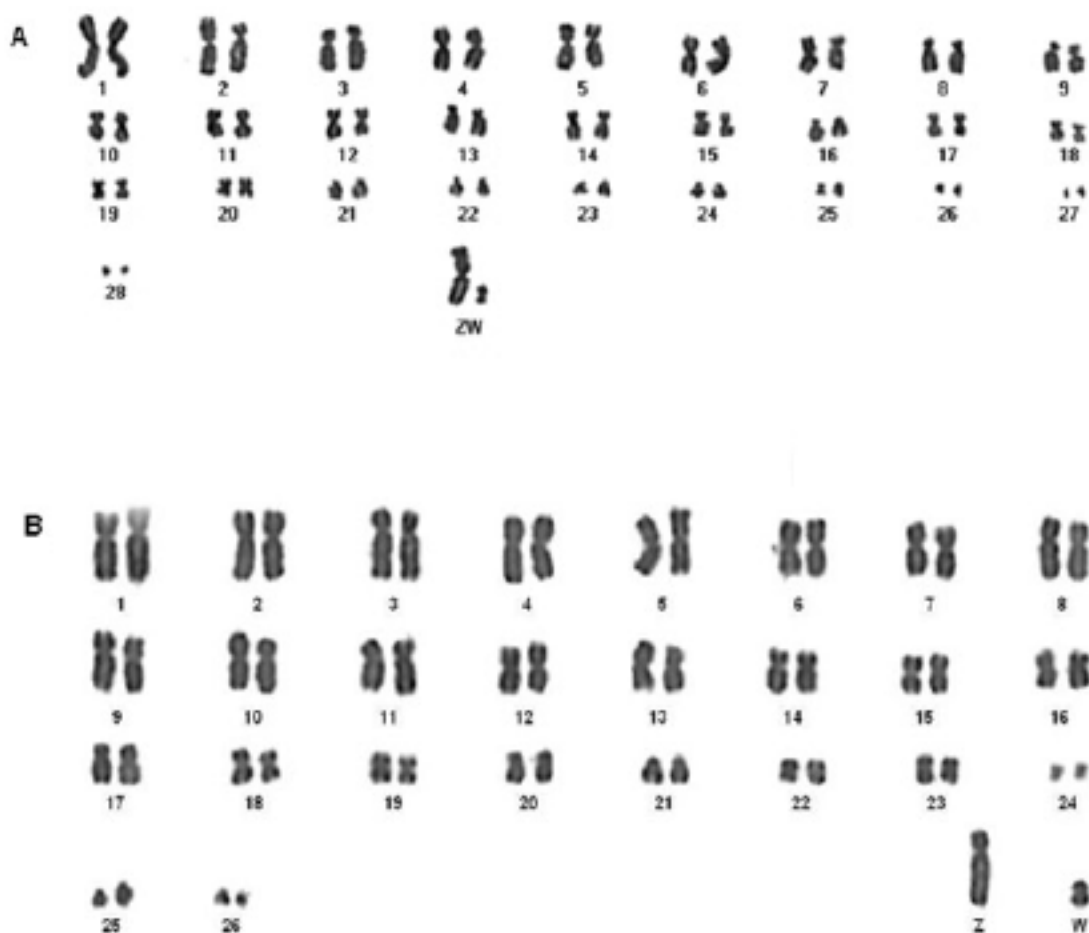
Foram analisados dois exemplares, um macho e uma fêmea, que apresentaram 58 cromossomos, sendo que desses, dezoito pares são de dois braços e dez pares são autossômicos acrocêntricos, sendo os três últimos pares microcromossomos. O cromossomo sexual Z é um submetacêntrico grande, enquanto o W é um submetacêntrico de tamanho médio (Figura 23A).



**Figura 22:** **A:** Cariótipo do gavião carijó (*Rupornis magnirostris*) em coloração convencional, com  $2n = 68$ ; **B:** Cariótipo do gavião caboclo (*Buteogallus meridionalis*) em coloração convencional, com  $2n = 68$ ; **C:** Cariótipo do gavião pedrês (*Asturina nitida*) em coloração convencional, com  $2n = 68$ .

#### 4.2.2 *Morphnus guianensis*

Um macho e uma fêmea dessa espécie foram estudados apresentando um cariótipo com  $2n=54$  cromossomos. O complemento cromossômico apresentou quinze pares grandes e médios de dois braços (1-15); seis pares pequenos de dois braços (17-20, 22-23) sendo que o par 21 é acrocêntrico e os 3 últimos pares são microcromossomos (24-26). O cromossomo Z é um submetacêntrico grande, equivalente em tamanho ao par 1 e o W é um submetacêntrico pequeno comparado em tamanho ao par 22 ou 23 (Figura 24B).



**Figura 23:** **A:** Cariótipo de uma fêmea do Gavião Real (*Harpia harpyja*) em coloração convencional, com  $2n= 58$ . **B:** Cariótipo de uma fêmea de Falso uiraçú (*Morphnus guianensis*) em coloração convencional, com  $2n= 54$ .



### 4.3 EXPERIMENTOS DE HIBRIDIZAÇÃO *IN SITU*

#### 4.3.1 Subfamília Buteoninae

As hibridizações com sondas teloméricas mostraram resultados similares nas três espécies, marcando não apenas as regiões terminais da maioria dos cromossomos, mas também em regiões intersticiais (Figura 26 B, D e F). Sinais encontrados em microcromossomos tenderam a ser mais brilhantes que os encontrados nos macrocromossomos.

As sondas correspondentes à porção 18S/28S dos genes de rDNA mostraram que essas sequências estão presentes em apenas um par de cromossomos (Figura 24), correspondendo ao braço curto do par 7, onde é possível visualizar uma constrição secundária, por coloração convencional (Figura 25 A, C e E).



Figura 24: Metáfase de *Rupornis magnirostris* em coloração convencional, mostrando uma constrição secundária no braço curto do par 7 (setas), portador da região organizadora de nucléolo (genes 18S e 28S)

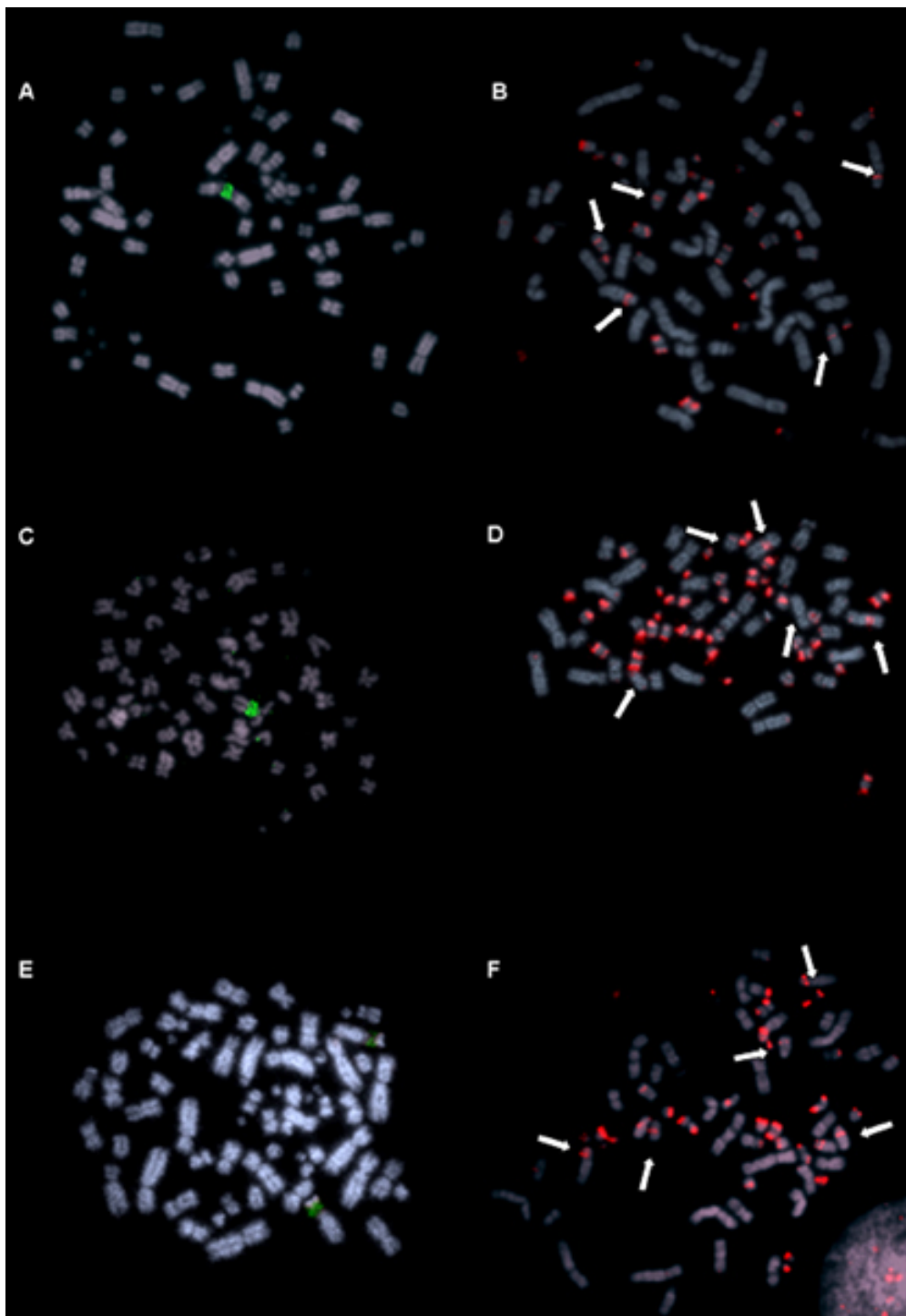
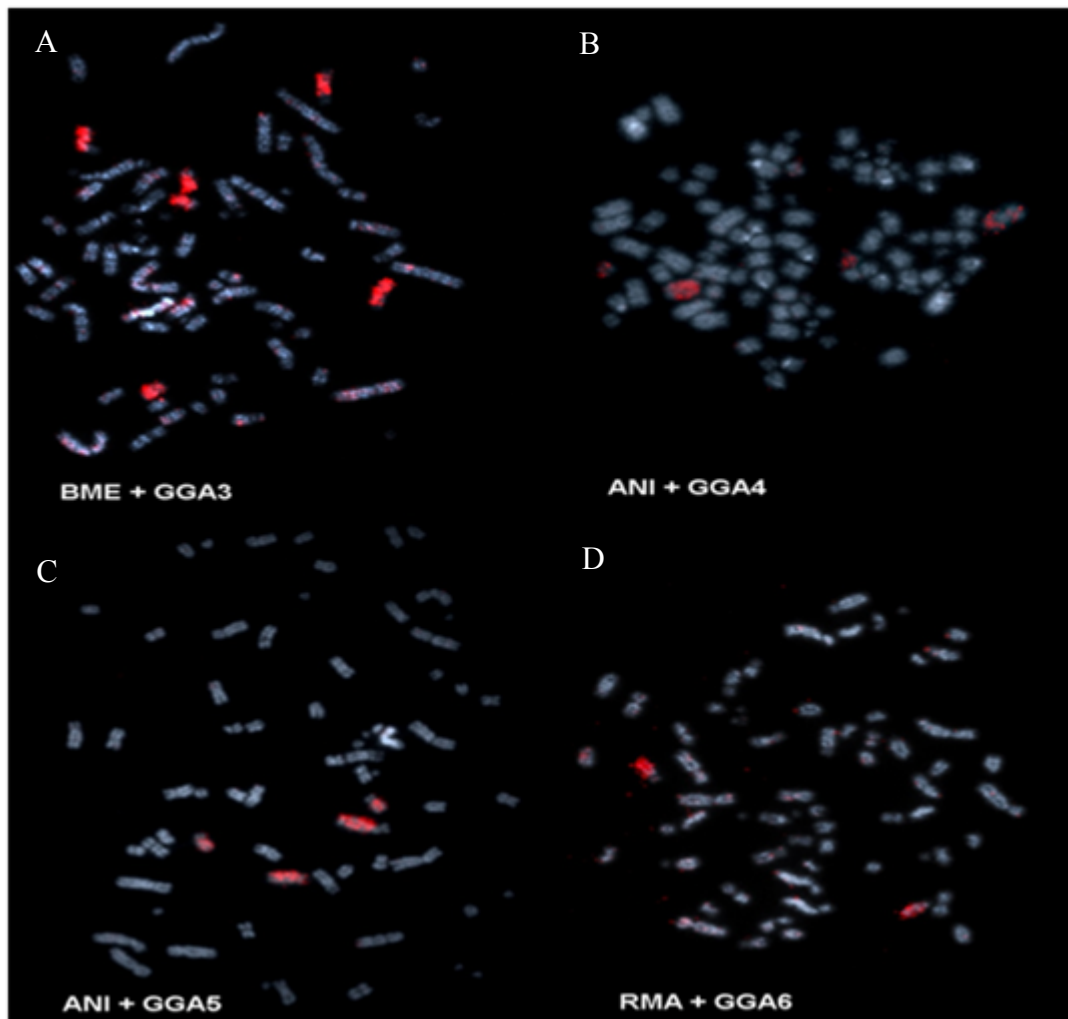


Figura 25: Resultados de FISH com sondas de rDNA (esquerda) e teloméricas (direita) em metáfases de *Rupornis magnirostris* (A e B), *Buteogallus meridionalis* (C e D) e *Asturina nitida* (E e F).

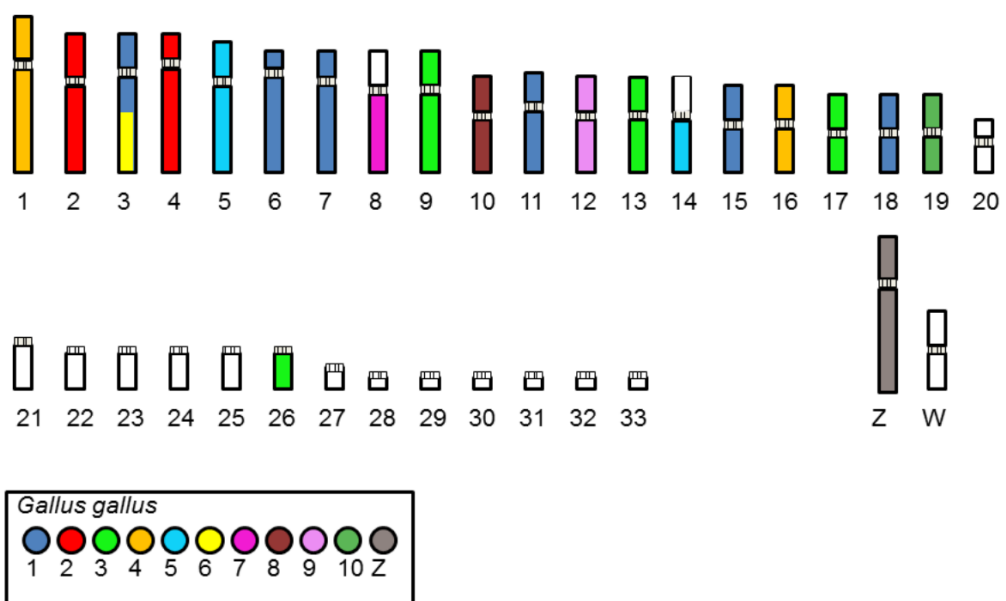
As sondas de cromossomo total de *Gallus gallus* mostraram que *B. meridionallis*, *A. nitida* e *R. magnirostris* compartilham os mesmos grupos sintênicos, com GGA 1 a GGA 10 hibridizando de 1 a 5 pares diferentes (Tabela II e Figura 26 A-D). O mapa de homologia é mostrado na figura 27.

**Tabela II:** Correspondência entre os cromossomos de *Gallus gallus* e as espécies de Buteoninae

<b>Sondas de <i>Gallus gallus</i> (pares)</b>	<b>Cromossomos de Buteoninae</b>
1	3p, 6, 7, 15 e 18
2	2, 4
3	9, 13, 1 e 26
4	1 e 16
5	5, 14q
6	3q
7	8q
8	10
9	12
10	19
Z	Z



**Figura 26:** Imagem representativa com algumas hibridizações com sonda de *Gallus gallus* em *Buteogallus meridionalis*, *Asturina nitida* e *Rupornis magnirostris*.



**Figura 27:** Mapa de homologia entre *Gallus gallus* e *Asturina nitida*.

#### 4.3.2. Subfamília Harpiinae

As sondas teloméricas foram aplicadas em metáfases de *Morphnus guianensis*. Observaram-se marcações nas regiões teloméricas de todos os pares, e também intersticiais em alguns cromossomos de tamanho médio, ocorrendo na região centromérica ou na região mediana do braço longo. (Figura 28).

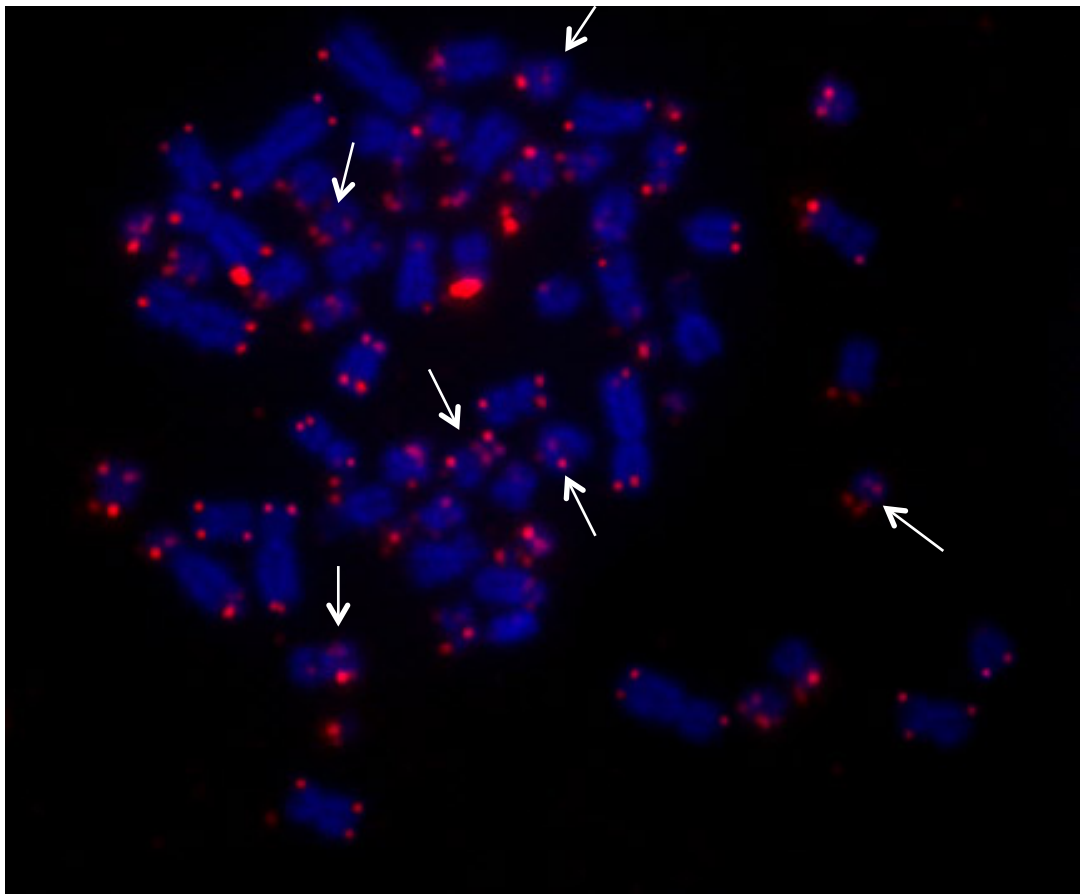


Figura 28: Hibridização de sondas teloméricas em metáfase de *Morphnus guianensis* evidenciando marcações nas regiões teloméricas de todos os pares, e também intersticiais em alguns cromossomos de tamanho médio, ocorrendo na região centromérica ou na região mediana do braço longo (setas).

As sondas de 18/28S rDNA hibridizaram em um par de macrocromossomos em *M. guianensis* (par 1), no braço curto, em região com constrição secundária (Figura 29A). Em *Harpia harpyja* essa sonda hibridizou

em dois pares distintos, sendo um o par 6, no braço curto, e outra em um par de cromossomos pequenos (provavelmente par 25) (Figura 29B).

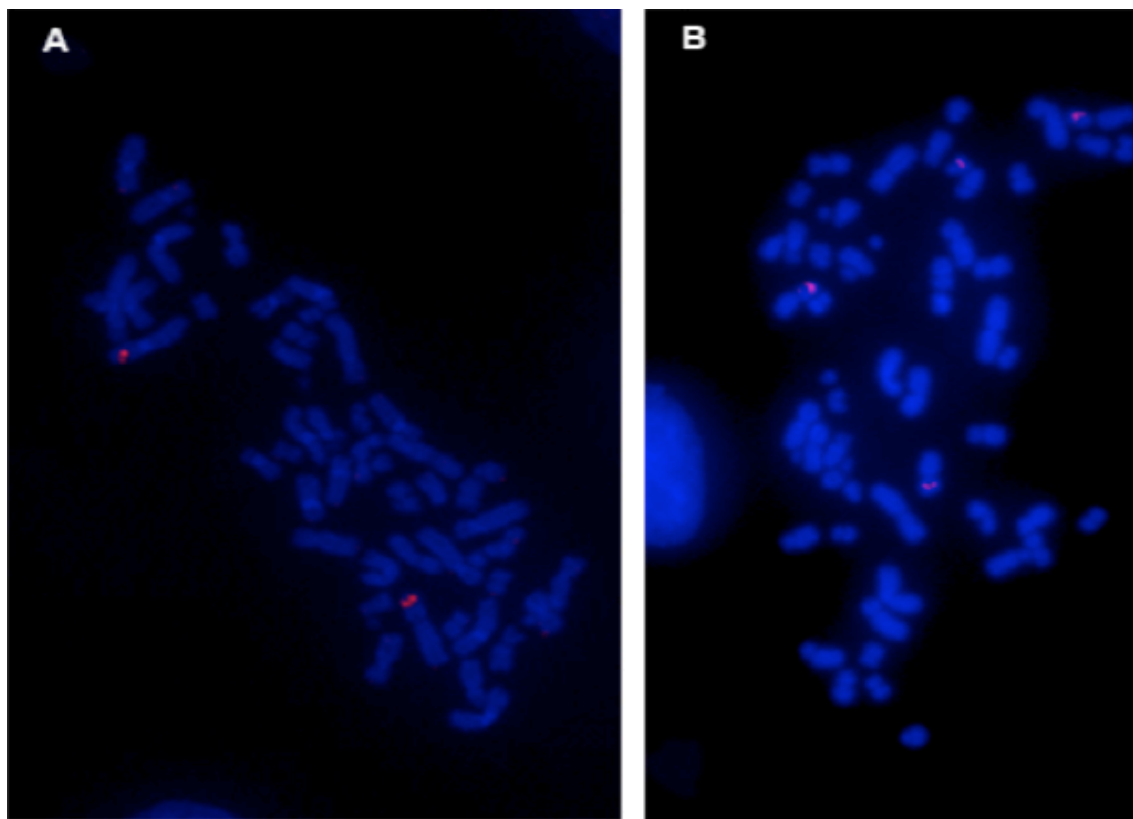


Figura 29: Experimentos de FISH com sondas 18/28S rDNA em *Morphnus guianensis* (A), evidenciando marcação em um par de macrocromossomos (par 1), e em *Harpia harpyja* (B), que apresentou dois pares marcados (par 6, que apresentou uma constrição secundária, e outro par pequeno, provavelmente 25).

As sondas cromossomo-específicas derivadas de *Gallus gallus* foram aplicadas em cromossomos metafásicos de *Harpia harpyja* e revelaram que todos os pares de macrocromossomos de 1 a 5 de GGA encontram-se fragmentados em vários pares distintos em harpia. Já os cromossomos correspondentes a GGA 6, 7, 8, 9 e 10 marcaram um cromossomo ou braço cromossômico cada. O cromossomo GGA 11 apresentou uma localização inusitada, marcando a porção proximal do braço curto do cromossomo 1 de HHA. Esses resultados estão apresentados na tabela III, enquanto alguns resultados representativos desses experimentos estão ilustrados na figura 30 e

31. Na figura 32 podemos observar o mapa de homologia entre as espécies de *Harpia harpyja* e *Gallus gallus*.

**Tabela III:** Correspondência entre os cromossomos de *Gallus gallus* e as espécies de Harpiinae

Sondas de <i>Gallus gallus</i>	Cromossomos de Harpiinae	
	HHA*	MGU**
1	6, 19, 4p, 21	2p, 3, 8, 13
2	1, 3	5p, 11q, 20q
3	2p, 10, 23	1, 2q, 6q, 9
4	5, 14	4, 14q
5	2q, 15q	5q, 17q
6	7q	7
7	4q	6p
8	8q	10
9	12q	16
10	9q	18q
11	Parte 1p	19q

\* HHA: *Harpia harpyja*

\*\* MGU: *Morphnus guianensis*

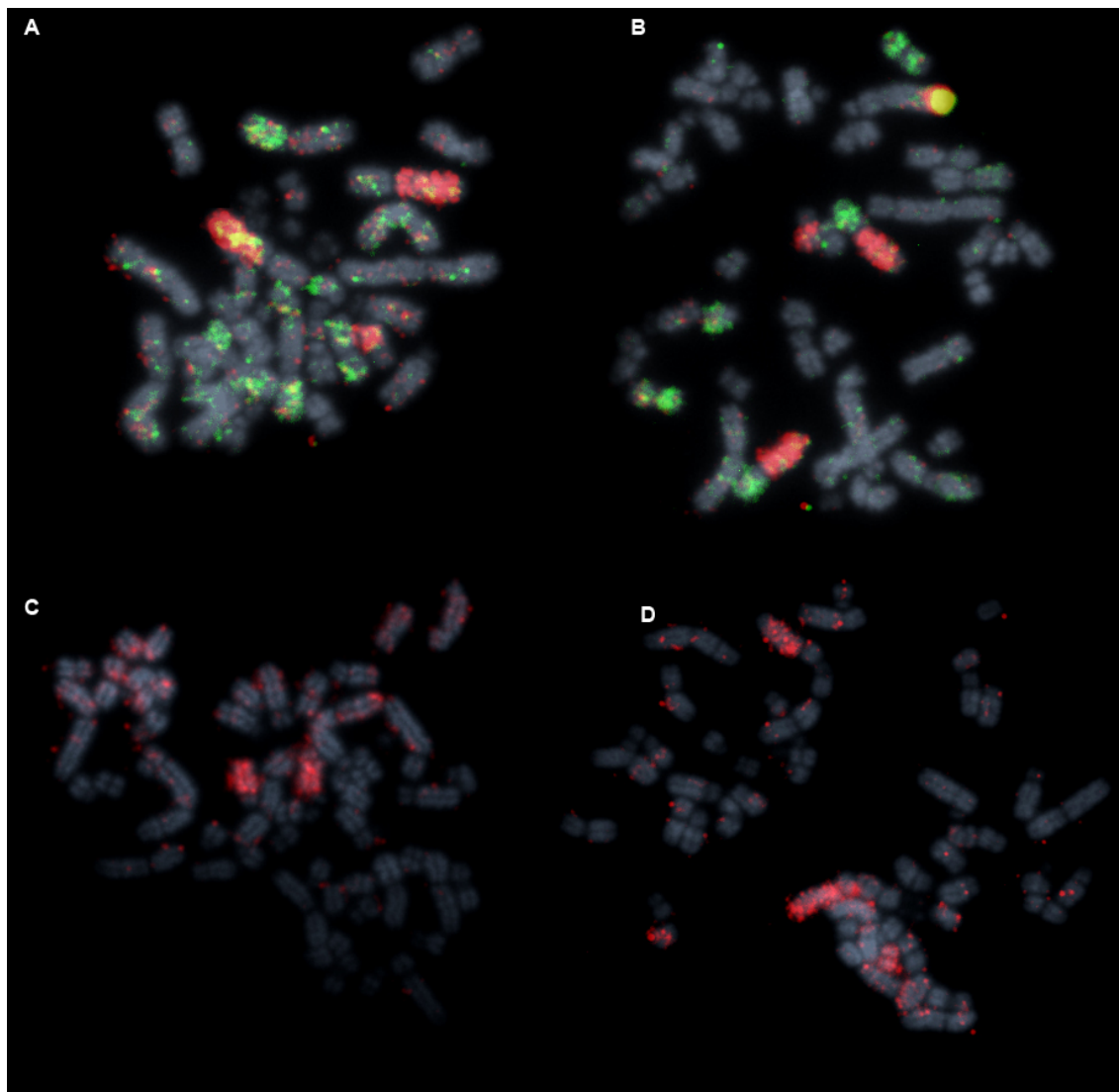


Figura 30: Experimentos de FISH utilizando sondas cromossomo-específicas de macrocromossomos de *Gallus gallus* em metáfases de Harpia: A: GGA1 (verde) e GGA 5 (vermelho); B: GGA3 (verde) e GGA5 (vermelho); C: GGA6 (vermelho) e D: GGA4 (vermelho).



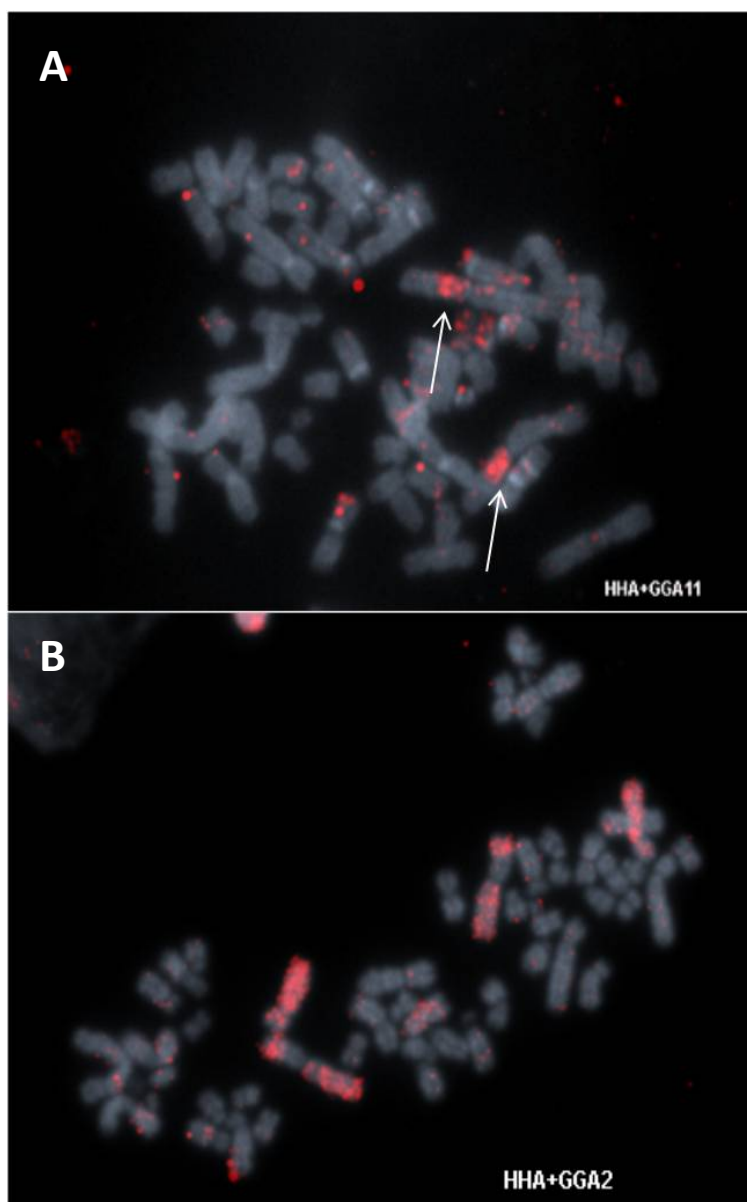


Figura 31: Resultados da hibridização de sondas de *Gallus* correspondentes ao par 11(A) e ao par 2 (B). As setas indicam a posição do cromossomo 11, que preenche um gap observado na hibridização com GGA2 (B).

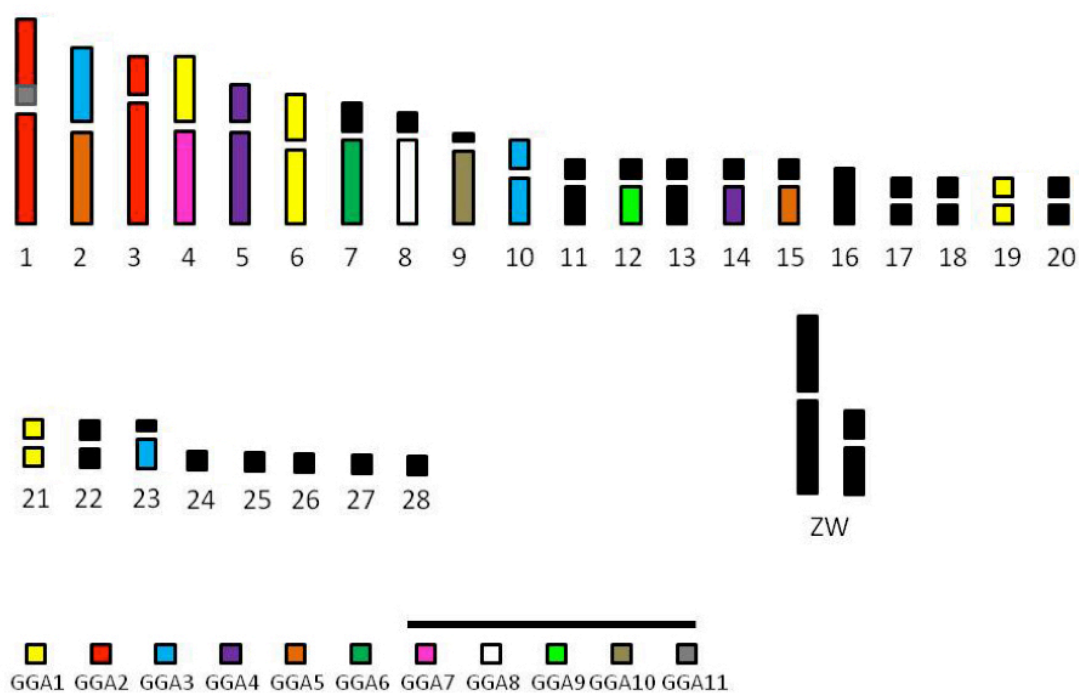
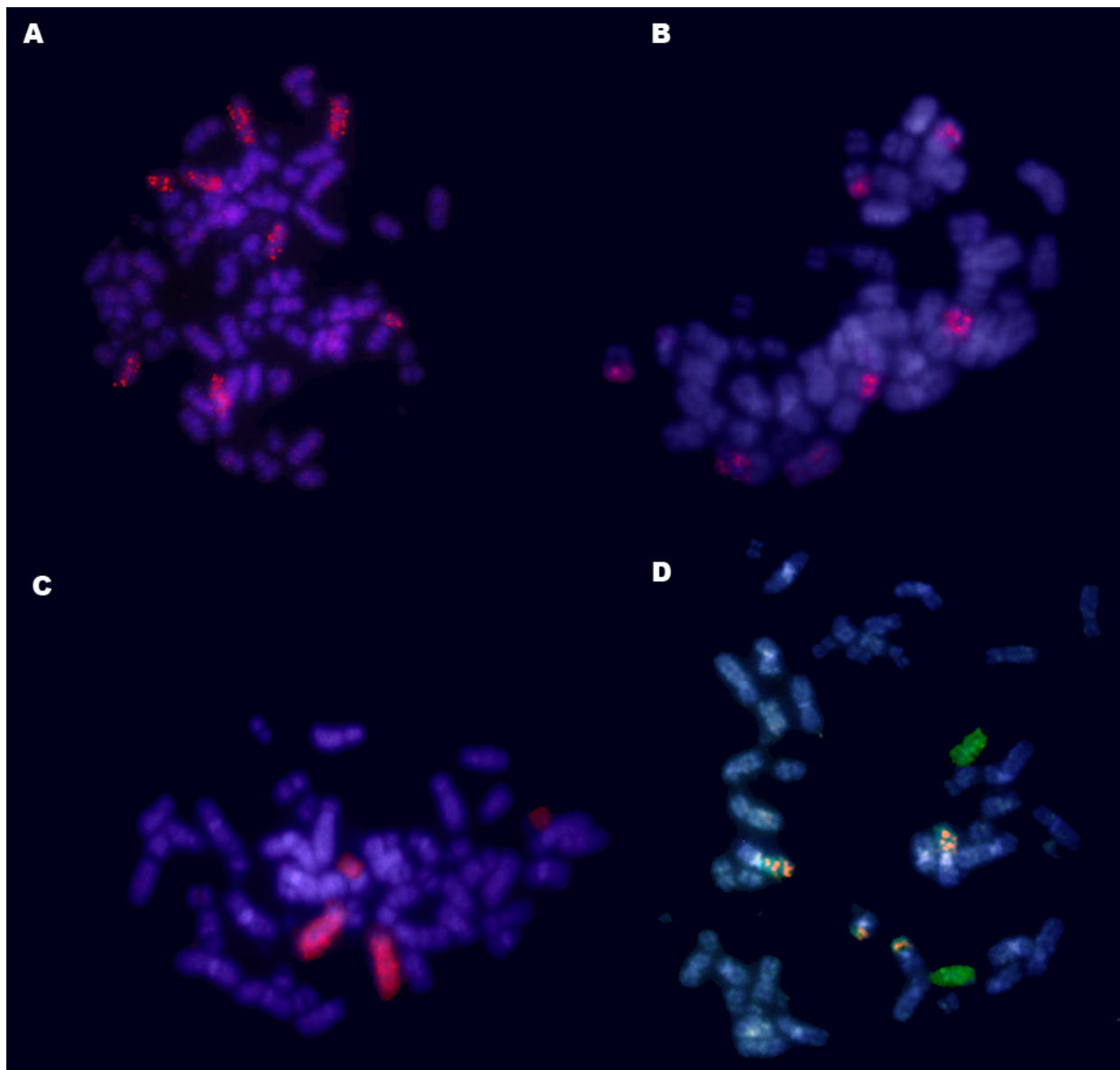
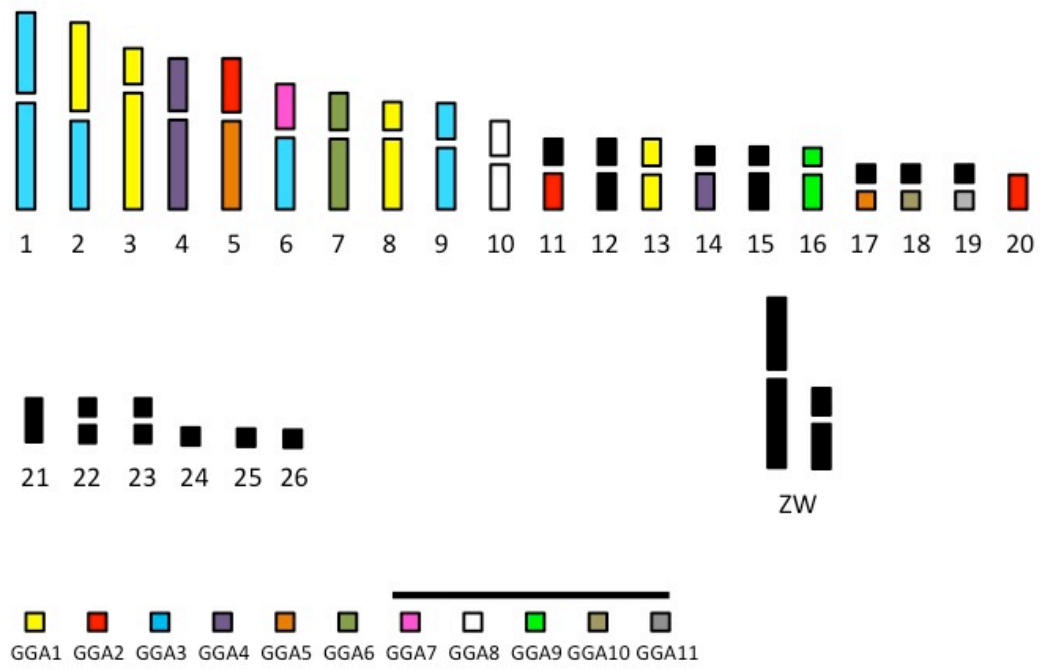


Figura 32: Mapa de homologia entre *Harpia harpyja* e *Gallus gallus*.

*Morphnus guianensis* apresentou um resultado similar à harpia no que se refere à marcação de mais de um par cromossômico por sondas cromossomo-específicas de *Gallus gallus*. Da mesma forma, as sondas referentes aos pares GGA 7 a 10 corresponderam a um único par cromossômico ou braço cromossômico, cada. Já GGA 11 marcou o braço longo do par 19. Alguns experimentos representativos são mostrados na figura 33, enquanto na figura 34 apresentamos o mapa de homologia entre MGU e GGA.



**Figura 33:** Resultados da hibridização de sondas de *Gallus gallus* em *Morphnus guianensis* correspondentes ao par GGA1 (**A**), GGA2 (**B**), GGA4 (**C**), e GG5 em vermelho e GGA6 em verde (**D**).



**Figura 34:** Mapa de homologia entre *Morphnus guianensis* e *Gallus gallus*

## 5. DISCUSSÃO

As espécies agrupadas na ordem Falconiformes apresentam em conjunto uma das maiores variações cariotípicas dentre as diferentes ordens da classe Aves. Essa variação cromossômica foi um dos atrativos que fez dessa ordem uma das mais estudadas citogeneticamente dentre as Aves. Mesmo assim, segundo AMARAL & JORGE (2003), entre 1966 e 2001 foram estudadas apenas 66 espécies, número que corresponde a aproximadamente 20% de todas as espécies da ordem. Esse número sofreu pouca modificação nos últimos anos, e se considerarmos as análises por técnicas de citogenética molecular, esse número cai para menos de 10 espécies.

Os números diplóides variam de  $2n=40$  em algumas espécies do gênero *Falco*, a  $2n=92$  em *Caracara* e *Milvago*, todos da família Falconidae (AMARAL & JORGE, 2003; TAGLIARINI *et al.*, 2007). Na família Accipitridae, essa variação apresenta intervalos mais próximos entre si, indo de  $2n=54$ , observado em *Morphnus guianensis*, a  $2n=82$ , em *Aquila alberti* (WILLIAMS & BERNISKE, 1976; PADILLA *et al.*, 1999). Mesmo assim, a variação numérica e morfológica entre os cariótipos de suas diferentes espécies é surpreendente, e o entendimento do processo de evolução cromossômica nesse grupo vem sendo alvo de estudos desde as décadas de 60/70, início dos estudos citogenéticos em Aves (DE BOER, 1976). Por essa razão, também, várias espécies de Accipitridae já foram analisadas por citogenética molecular: a harpia (*Harpia harpyja*), três espécies de abutres do Velho Mundo (*Gyps rueppelli*, *Gyps fulvus*, *Gypaetus barbatus*) e o gavião branco (*Leucopternis albicollis*) (DE OLIVEIRA *et al.*, 2005; NANDA *et al.*, 2006; DE OLIVEIRA *et al.*, 2010). Além disso, é uma das poucas ordens de Aves com sondas

cromossomo-específicas desenvolvidas a partir de uma de suas espécies: *Leucopternis albicollis* (DE OLIVEIRA *et al.*, 2010).

Apesar das primeiras propostas para a explicação do baixo número diplóide terem considerado fusões entre os microcromossomos como principal tipo de rearranjo envolvido (DE BOER, 1976), os dados de pintura cromossômica mostraram que, ao contrário do que se pensava, houve um grande número de fissões envolvendo os macrocromossomos durante a evolução cariotípica do grupo, além de fusões envolvendo não só os microcromossomos, mas também os cromossomos de maior tamanho (DE OLIVEIRA *et al.*, 2005, 2010; NANDA *et al.*, 2006). O elevado número de rearranjos cromossômicos diferentes observados nas espécies analisadas até o momento nos levou a fazer uma análise em outras espécies, filogeneticamente próximas, pertencentes a duas subfamílias de Accipitridae, na tentativa de entender o processo de evolução cariotípica, mas também de encontrar assinaturas cromossômicas que apoiem ou não sua proximidade filogenética.

### 5.1 SUBFAMÍLIA BUTEONINAE

As espécies de Buteoninae tem mostrado um número diplóide de 66 a 68 cromossomos (SCHMUTZ *et al.*, 1993; SKINNER & GRIFFIN, 2012; DE OLIVEIRA *et al.*, 2010). A análise dos cariótipos de dez diferentes espécies de buteoninos por Schmutz *et al.* (1993) levou os autores a dividi-los em 3 grupos baseados na morfologia dos cromossomos, com 15, 19 ou 20 pares de autossomos de 2 braços. No entanto, *Asturina nitida* e *Rupornis magnirostris* foram incluídos no grupo com 19 cromossomos de 2 braços, enquanto nos

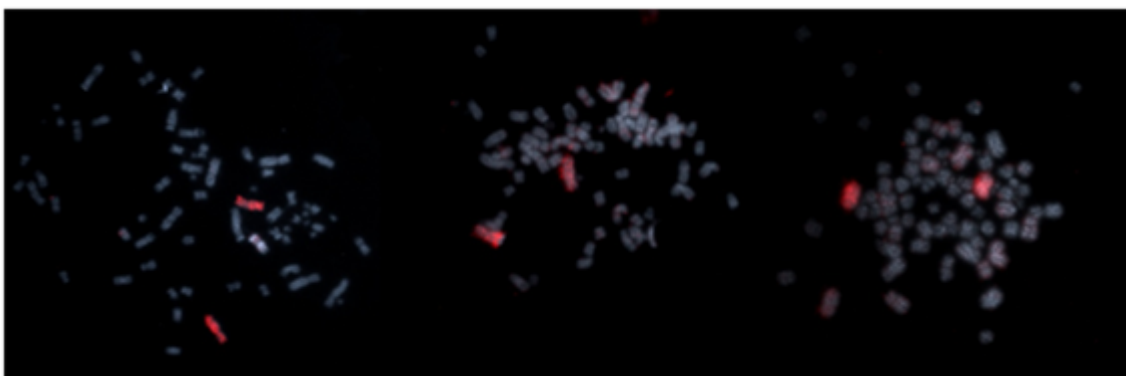
nossos resultados, essas espécies mostraram 20 cromossomos de dois braços.

Concordando com nossos resultados, esses autores encontraram um par de cromossomos portadores de NOR. Experimentos de pintura cromossômica mostraram que esse par portador da NOR corresponde a uma associação entre GGA7 e um par de microcromossomos, já que GGA7 hibridizou todo o braço longo desse par e nenhuma outra sonda de macrocromossomo produziu sinal no braço curto. O local da NOR associada ao GGA7 é também diferente do resultado encontrado na harpia, em que cada NOR foi observada no braço curto do par 8 (uma associação entre GGA6 e um microcromossomo) (DE OLIVEIRA *et al.*, 2005). Não existem dados relativos à posição da NOR em outras espécies de Accipitridae usando análises por FISH.

Sondas de cromossomo inteiro derivadas dos primeiros dez pares de *Gallus* (GGA1–10) produziram o mesmo número de sinais nas três espécies desta subfamília analisadas neste trabalho, correspondendo aos resultados encontrados em *Leucopternis albicollis* (DE OLIVEIRA *et al.*, 2010). Assim, pode ser discutido que as diferenças encontradas no número de cromossomos de dois braços foram resultado de rearranjos intracromossômicos (inversão pericêntrica ou troca centromérica) ou ainda fusões envolvendo dois microcromossomos no caso de *L. albicollis*, diminuindo assim, nessa última espécie, o número diploide de  $2n=68$  para  $2n=66$ .

A disponibilidade das sondas de cromossomos totais derivadas de Buteoninae (*Leucopternis albicollis*) permitiram uma pintura cromossômica recíproca com *Gallus gallus*, e confirmaram que os cariótipos de aves de rapina são rearranjados devido a uma fragmentação de alguns pares de

macrocromossomos e fusões desses fragmentos com microcromossomos (DE OLIVEIRA *et al.*, 2010). Nossos experimentos revelaram a existência de uma assinatura citogenética comum para as espécies de Buteoninae analisadas por FISH, que se trata da associação GGA1/GGA6. Após essa constatação, um experimento extra utilizando a sonda do par 3 de *L. albicollis* (LAL3), correspondente à associação GGA1p/GGA6, confirmou nosso achado, visto que hibridizou em um par submetacêntrico nas três espécies analisadas, enquanto em *Gallus gallus* hibridizou no braço curto de GGA1 e em todo GGA6 (Figura 35).



**Figura 35:** Experimento extra utilizando sonda correspondente à associação GGA1p/GGA6 de *L. albicollis* (LAL3) em BME, ANI e RMA, respectivamente, confirma a assinatura citogenética comum para as espécies de Buteoninae analisadas por FISH.

Este fato apóia a relação filogenética próxima das espécies de buteoninos sul americanas, considerando que essa associação não foi observada em outros grupos de Accipitrídeos até o momento (DE OLIVEIRA *et al.*, 2005; NANDA *et al.*, 2006). Em adição, a similaridade aparente encontrada nas espécies analisadas em SCHMUTZ *et al.* (1993) da América do norte, e não incluídas neste estudo, nos levam a estender esses resultados a outras espécies do gênero *Buteo*. Assim, os gêneros *Leucopternis*, *Buteogallus*,



*Asturina*, *Rupornis* e *Buteo*, apresentam-se filogeneticamente próximas, provavelmente compartilhando a associação GGA1p/GGA6, não encontrada, por exemplo, na águia harpia, que às vezes é incluída na mesma subfamília.

Os dados obtidos no presente estudo revelaram um importante marcador citotaxonômico para Buteoninos, mostrando uma exclusiva sinapomorfia cromossômica, e também levantou questões importantes que abrangem a distribuição, ativação e inativação centromérica. Adicionalmente, os achados apoiam a idéia de que Buteoninae deveria ser tratado como um grupo monofilético dentro de Accipitridae, incluindo não apenas *Buteo*, mas também os chamados de gaviões sub-buteoninos (*Asturina*, *Rupornis* e *Leucopternis*). A análise das espécies holárticas de Buteoninae irá esclarecer a relação entre as espécies desse táxon.

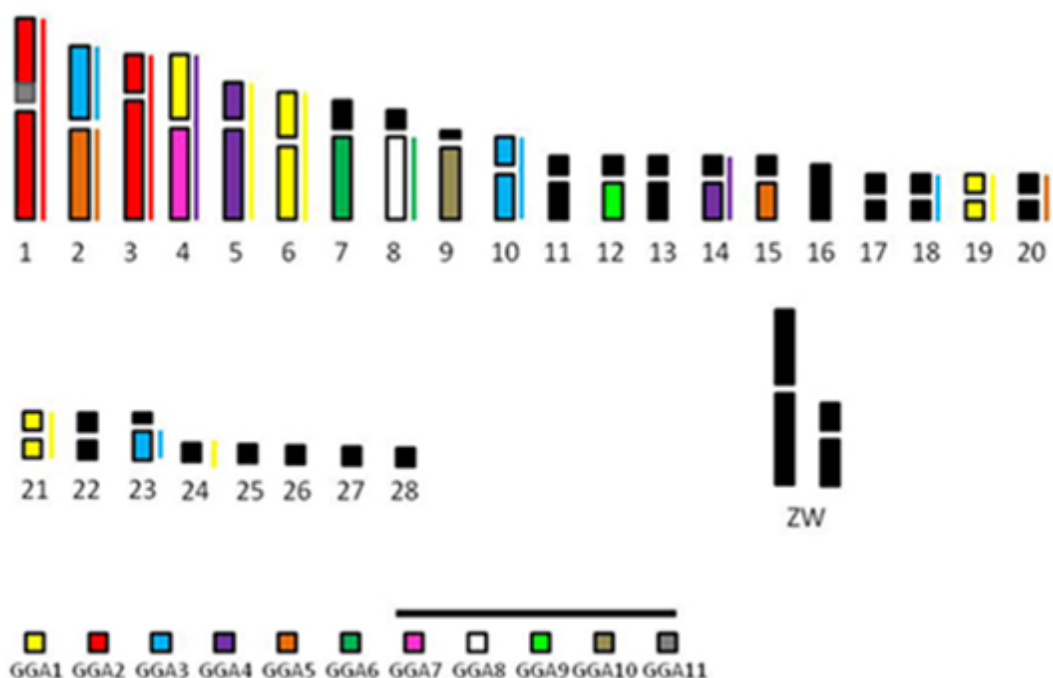
## 5.2 SUBFAMILIA HARPIINAE

Esta subfamília é formada por quatro espécies: *Morphnus guianensis* e *Harpia harpyja*, são os representantes Neotropicais da subfamília e, no Velho Mundo, encontramos a harpia da Nova-Guiné (*Harpyopsis novaeguineae*) e a águia-filipina (*Pithecophaga jeffreyi*). Em estudos baseados em DNA nuclear e mitocondrial, as três primeiras espécies são consideradas altamente similares formando um clado com alto suporte. A quarta espécie, entretanto, foi considerada mais próxima de um grupo irmão chamado de Circaetinae (LERNER & MINDELL, 2005)

As análises por coloração convencional mostraram que o número diplóide das espécies de *Harpia harpyja* e *Morphnus guianensis* foi igual a 58 e 54, respectivamente, e que ambas as espécies apresentam vinte e dois pares de

cromossomos de dois braços, apesar da harpia apresentar dois pares a mais. Levando em consideração apenas esta característica, pode ser sugerida uma fusão de microcromossomos para formar cromossomos de dois braços em *Morphnus*, ou até a quebra de um par de cromossomos de dois braços em *Harpia*, já que o par 16 de *Harpia* é acrocêntrico enquanto que o de *Morphnus* é de dois braços.

A comparação da harpia com dados publicados anteriormente mostra que a maioria das homologias encontradas foi similar ao trabalho prévio (DE OLIVEIRA *et al.*, 2005). Entretanto, alguns experimentos mostraram resultados diferentes, como no caso das homologias com os pares 1, 3 e 4, como pode ser visto no esquema apresentado na figura 36.



**36:** Mapa de homologia entre a harpia e *Gallus gallus*. As homologias encontradas em nossos experimentos são indicadas com as cores nos cromossomos. Segmentos em preto são segmentos não hibridizados com as sondas 1-11. As linhas ao lado direito de cada par mostram as homologias propostas em DE OLIVEIRA *et al.* (2005).

Um dos motivos para as diferenças entre os resultados da harpia pode ser o fato de que no trabalho publicado anteriormente foi utilizado um *pool* de sete cores, contendo os pares 1-6 e Z. Devido à distância filogenética entre essas espécies, as sete cores não foram diferenciadas com muita clareza. Nos nossos experimentos foram utilizadas hibridizações individuais ou de duas cores, e as quantidades de sondas aplicadas puderam ser melhor controladas de acordo com a qualidade dos experimentos, sendo repetidas com uma concentração maior no caso de sinais fracos ou duvidosos.

Os resultados das homologias de harpia com as sondas GGA7 a GGA11 são inéditas. Observamos a inserção de um microcromossomo (GGA11) na porção proximal do braço curto do cromossomo 1 de harpia. Esse fato talvez possa ser explicado pela ocorrência de uma fusão, seguida de inversão. As hibridizações com as sondas GGA2 mostram um *gap* no local de inserção de GGA11 (figura 31).

O par 4 de harpia mostrou ser composto por uma associação entre um segmento de GGA1 e o cromossomo GGA7. Essa associação ainda não havia sido descrita em nenhuma espécie de aves. A aplicação de sondas em *Morphnus guianensis*, confirma que essa associação é uma autapomorfia, já que em MGU a única associação observada do cromossomo 1 de *Gallus*, é com o GGA3.

Assim como em HHA, a sonda correspondente ao cromossomo 1 de GGA marcou 4 pares em MGU. Porém as sondas GGA2 e GGA3 apresentaram uma marcação a mais em MGU do que em HHA (GGA2 marcou 3 pares em MGU enquanto marcou 2 em HHA, e GGA3 marcou 4 pares em MGU, ao passo que em HHA, marcou em 3). As sondas restantes apresentaram a mesma

quantidade de sinais nas duas espécies. A fragmentação de GGA1 em quatro pares distintos pode ser uma sinapomorfia de Harpiinae, visto que em Buteoninae este cromossomo originou cinco pares. Em abutres do Velho Mundo, das espécies analisadas, duas apresentaram GGA1 fragmentado em cinco pares, enquanto uma dela apresentou-o em quatro pares (NANDA *et al.*, 2006). A aplicação de sondas cromossomo-específicas de *L. albicollis* ou de BACs derivados de *Gallus* poderão confirmar se os pontos de quebra são recorrentes. Apesar da similaridade na morfologia cromossômica, as diferentes associações observadas em *Morphnus* e *Harpia* mostram que essas espécies sofreram uma reorganização genômica expressiva após sua separação em linhagens independentes.

De qualquer forma, algumas similaridades também foram observadas. A sonda GGA4 marcou o mesmo cromossomo de tamanho médio de dois braços, provavelmente correspondendo ao par 14, nas duas espécies. Além disso, outros segmentos apresentaram-se sem fissões, apesar de poder estar em associação em uma espécie, enquanto na outra correspondiam a um cromossomo inteiro. Dessa forma, a sonda GGA6 correspondeu, em *Morphnus* ao cromossomo 7 em sua totalidade, enquanto que na *Harpia*, essa sonda marcou o braço longo do mesmo cromossomo 7. Da mesma forma, a sonda GGA8 marcou todo o cromossomo 10 em *Morphnus*, e em *Harpia*, marcou apenas o braço longo do cromossomo 8. A sonda GGA9 marcou o cromossomo 16 inteiro de *Morphnus* enquanto marcou apenas o braço longo do cromossomo 12 em *Harpia*. Baseando-se nesse fato, seria possível sugerir que no cariótipo de *Harpia* ocorreram fusões desses elementos (GGA7, 8 e 9) com microcromossomos. Fusões de microcromossomos já foram confirmadas

por dados publicados anteriormente, com a aplicação de um *pool* de 19 pares de microcromossomos de GGA em *Harpia* (DE OLIVEIRA *et al.* 2005), e confirmariam, em parte, que o número mais baixo de pares de microcromossomos visto em cariótipos de Accipitridae é devido à ocorrência de fusões desses elementos. Diferentemente do proposto por DE BOER (1976), essas fusões não ocorreram somente entre microcromossomos, mas envolveram muitas vezes microcromossomos e cromossomos de tamanho pequeno ou médio.

A ausência de associações semelhantes em *Morphnus* e *Harpia* sugere que houve fragmentações no ancestral em comum desse grupo, e as fusões foram subsequentes ao seu isolamento como linhagens diferentes. Infelizmente, não há dados cariotípicos de *Harpyopsis novaeguineae*, e como a inclusão da espécie *Pithecophaga jeffreyi* ( $2n=66$ ) não tem sido apoiada em análises filogenéticas mais recentes, é impossível traçar uma discussão a respeito da evolução cariotípica nessa subfamília.

### 5.3 EVOLUÇÃO CARIOTÍPICA EM ACCIPITRIDAE

Baseado em exaustivas análises citogenéticas de diversos Falconiformes, DE BOER (1976) sugeriu que os accipitrídeos têm a organização cromossômica mais atípica dentre os grupos da classe Aves, por causa do número de microcromossomos extremamente baixo (4 a 6 pares) e um número diplóide relativamente baixo (média  $2n= 66$ ). De acordo com o autor, essa redução extrema do número de microcromossomos devia-se a uma tendência que, em contraste a muitas Aves, favorecia a formação de macrocromossomos.

Considerando-se as limitações das técnicas de bandeamento G em Aves, que apresentam um número de bandas menor que mamíferos, e impossíveis de se visualizar em cromossomos pequenos, a hipótese de fusões envolvendo microcromossomos como principal agente na diminuição do número diplóide foi apoiada pelos estudos posteriores com citogenética clássica.

Devido a isso, uma grande expectativa foi criada em relação aos resultados de pintura cromossômica em Accipitridae. Os primeiros resultados de experimentos em aves de rapina utilizando sondas cromossomo-específicas de *Gallus* surgiram em 2005, no cariótipo da harpia (*Harpia harpyja*) (DE OLIVEIRA *et al.*, 2005), com um número diplóide relativamente baixo,  $2n=58$ , e poucos pares de microcromossomos. Os dados revelaram uma completa reorganização genômica na harpia, com a ocorrência de fusões, translocações e fissões. Os maiores pares cromossômicos de *Gallus* apresentaram-se fissionados no cariótipo dessa espécie, originando de 2 a 5 cromossomos distintos. Resultados que apóiam esse comportamento cromossômico foram encontrados em três espécies de abutres do Velho Mundo, com complemento cromossômico variando de 60 a 66 cromossomos (NANDA *et al.*, 2006). Nessas espécies, as sondas de *Gallus gallus* aplicadas (GGA1-10) identificaram regiões homólogas distribuídas em 20 a 22 pares das espécies estudadas. Ao contrário das sondas de 6 a 10, que apresentam extrema conservação nos genomas estudados (marcando na maioria dos casos 1 par cada uma), as sondas de 1 a 5 não conservam sua integridade e se incorporam em diferentes cromossomos, cada.

A comparação entre as espécies de Accipitridae, assim como com Falconidae, mostra uma tendência geral de fragmentação de

macrocromossomos de *Gallus* (supostamente similares a grupos sintênicos encontrados no cariótipo hipotético ancestral de Aves, exceto por GGA4, que corresponde a dois diferentes elementos – par 4 e 10) (GRIFFIN & SKINNER, 2007). Também é notável que grupos sintênicos correspondentes a GGA4p/GGA4q, GGA6, GGA7, GGA8, GGA9 e GGA10 tendem a ser conservados, apesar de às vezes se encontrarem fusionados com outros elementos, mas nunca fragmentados, nas aves de rapina.

Outro ponto relevante é a assinatura cromossômica encontrada em Buteoninae que não é compartilhada por nenhum outro grupo de Accipitridae. A associação GGA1/GGA6 foi corroborada através de sondas de *Leucopternis albicollis* e não foi encontrada em nenhuma outra subfamília de Accipitridae, representando uma sinapomorfia cromossômica exclusiva do grupo de buteoninos.

Uma clara dicotomia é observada quando comparamos espécies de *Falco* (Falconidae) com espécies de Accipitridae, considerando os rearranjos de GGA1–3, que se separaram em dois elementos em *Falco*, enquanto que em Accipitridae esse número alcança de 3 a 6 pares de cromossomos derivados (DE OLIVEIRA *et al.*, 2005, 2010; NANDA *et al.*, 2006; NISHIDA *et al.*, 2008). De fato, várias propostas de classificação desses grupos sugerem que Falconidae e Accipitridae não formam um grupo monofilético, e suas semelhanças morfológicas resultam de um paralelismo evolutivo. De fato, em um trabalho recente, baseado em dados de sequenciamento de 19 loci independentes em 169 espécies de aves, posicionou ambas as famílias em um mesmo clado, porém apoiou uma proximidade filogenética entre as espécies de Falconidae e os Psitaciformes, enquanto a família Accipitridae seria mais

próxima das ordens Strigiformes, Coraciformes e Coliformes (HACKETT *et al.*, 2008). Neste mesmo trabalho, o grupo-irmão dos Accipitridae seria formado pelos abutres do Novo Mundo (Cathartidae). Considerando que as espécies de Cathartidae apresentam um complemento diploide muito semelhante ao do ancestral hipotético das Aves, com  $2n=80$ , e os pares 1 a 11 com correspondência de *Gallus gallus* (com exceção do GGA4, que corresponderia aos pares 4 e 11 do ancestral) (TAGLIARINI *et al.*, 2011), podemos afirmar que, caso essa proposta filogenética esteja correta, a reorganização observada em Accipitridae ocorreu logo após a divisão do grupo ancestral nessas duas famílias – Accipitridae e Cathartidae. Adicionalmente, a reorganização observada em Falconidae seria um fenômeno independente e diferente da ocorrida em Accipitridae: os números diploides mais baixos, encontrados em muitas espécies de ambos os grupos, seria apenas uma homoplasia, do ponto de vista evolutivo.

Além dessas questões filogenéticas, uma importante área a ser investigada é a dinâmica das sequências centroméricas e teloméricas no processo de evolução cromossômica em Accipitridae. As sondas teloméricas, inclusive, mostraram algumas marcações intersticiais nas espécies de Buteoninae analisadas, provavelmente indicando locais onde ocorreram fusões *in tandem*, como por exemplo o par 3, correspondente à fusão de GGA6/GGA1p.

Nos três grupos de Accipitridae analisados até o momento – abutres, Buteonineos e Harpiinae - foi observado a falta de sinais de hibridização das sondas dos macrocromossomos de GGA em braços inteiros de alguns pares cromossômicos, ou em parte dos mesmos. A explicação mais parcimoniosa é



de que esses cromossomos podem ter sido resultado de fusões repetidas *in tandem* de microcromossomos. Esse parecer hipotético só será definitivamente resolvido quando dados de pintura comparativa para sondas de microcromossomos de GGA se tornarem disponíveis.

Baseados nos fatos discutidos anteriormente, podemos concluir que os resultados apresentados em Accipitridae indicam que as espécies dessa família sofreram uma extensa reorganização genômica, aparentemente independente daquela observada em outras aves de rapina diurnas (Falconiformes). Isso também implica que, caso a família Cathartidae seja realmente próxima dos Accipitridae filogeneticamente, corresponderiam a um grupo basal, pelo menos do ponto de vista cromossômico. Finalmente, podemos afirmar que a filogenômica, a partir do uso de sondas cromossomo-específicas ou segmento-específicas, é uma poderosa ferramenta filogenética, e sua aplicação poderá trazer não só o esclarecimento nas relações de parentesco entre diferentes grupos de aves, revelando assinaturas cromossômicas que representam sinapomorfias, mas também sobre os mecanismos de reorganização genômica que ocorreram nessa classe.

## 6. CONCLUSÃO

A análise citogenética de três espécies de Buteoninae e duas espécies de Harpiinae nos permitiu concluir que:

1. *Rupornis magnirostris*, *Buteogallus meridionalis* e *Asturina nitida* apresentaram  $2n=68$ , com cariótipos muito semelhantes entre si. O cromossomo Z é um submetacêntrico grande, e o W um metacêntrico pequeno.
2. A disponibilidade das sondas de cromossomos totais derivadas de *Leucopternis albicollis* revelou a existência de uma assinatura citogenética comum para as espécies de Buteoninae analisadas por FISH, que se trata da associação entre GGA1 e GGA6.
3. *Harpia Harpyja* apresentou 58 cromossomos dos quais apenas três pares são microcromossomos. O cromossomo sexual Z é um submetacêntrico grande enquanto o W é um submetacêntrico de tamanho médio. *Morphnus guianensis* apresentou um cariótipo com  $2n=54$  cromossomos, sendo os 3 últimos pares microcromossomos. O cromossomo Z é um submetacêntrico grande, equivalente em tamanho ao par 1 e o W é um submetacêntrico pequeno comparado em tamanho ao par 22 ou 23.
4. Apesar da similaridade na morfologia cromossômica, as diferentes associações observadas em *Morphnus* e *Harpia* mostram que essas espécies sofreram uma reorganização genômica expressiva após sua separação em linhagens independentes. Além disso, ausência de associações semelhantes sugere que houve fragmentações no

ancestral em comum desse grupo, e as fusões foram subsequentes ao seu isolamento como linhagens diferentes.

5. Os resultados apresentados em Accipitridae indicam que a reorganização cromossômica dessa família deve ter ocorrido independentemente daquela observada em Falconidae. Esse dado apoiaria propostas que sugerem que esses dois grupos não são próximos filogeneticamente, mas que suas características morfológicas semelhantes corresponderiam a um paralelismo evolutivo. Da mesma forma, seus cariótipos atípicos seriam, do ponto de vista evolutivo, homoplasias.
6. A filogenômica a partir do uso de sondas cromossomo-específicas ou segmento-específicas tem a capacidade de esclarecer as relações de parentesco entre diferentes grupos de aves, revelando sinapomorfias e mecanismos de reorganização genômica que ocorreram nessa classe.

## 7.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABOUT.COM – Animals Wildlife (Acesso em Setembro 2013) -  
[HTTP://ANIMALS.ABOUT.COM/OD/BIRDSOFPREY/P/BIRDSOFPREY](http://animals.about.com/od/birdsofprey/p/birdsofprey).

ALVARENGA, H. (1985) **Notas sobre os Cathartidae (Aves) e descrição de um novo gênero do Cenozóico brasileiro** *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v. 57, n. 3, p. 349 – 357.

AMADON, D. (1982) **A revision of sub-buteoninae hawks (Accipitridae, Aves)** *American Museum Novitates*, n. 2741, p 1-20.

AMADON, D.; BULL, J. (1988) **Hawks and owls of the world: a distributional and taxonomic list** *Western Foundation of Vertebrate Zoology*, v. 3, n. 4, p. 295 – 257.

AMARAL, K. F & JORGE, W. (2003) **The chromosomes of the order Falconiformes: a review** *Ararajuba*11(1): 65-73.

AMARAL, F. S. R.; MILLER, M. J.; SILVEIRA, L. F.; BERMINGHAM, E.; WAJNTAL, A. (2006) **Polyphyly of the hawk genera *Leucopternis* and *Buteogallus* (Aves, Accipitridae): multiple habitat shifts during the Neotropicalbuteonine diversification** *BMC Evolutionary Biology*, 6:10.

AMARAL, F. S. R. (2008) **Estudos moleculares em Acipitrídeos (Aves, Accipitridae): uma perspectiva evolutiva** São Paulo, 162p Tese

(Doutorado), Departamento de Genética e Biologia Evolutiva, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo.

ANTAS, P. T. Z. (2005) **Aves do Pantanal RPPN**. Sesc.

AVES DE RAPINA DO BRASIL (ACESSO EM SETEMBRO DE 2013) -  
[HTTP://WWW.AVESDERAPINABRASIL.COM](http://www.avesderapinabrasil.com)

AVISE J. C.; NELSON W. S.; SIBLEY C. G. (1994) **DNA sequence support for a close phylogenetic relationship between some storks and New World vultures** *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 5173–5177.

BED'HOM, B. (1999) **Etude des caryotypes atypiques des Accipitridae (Aves, Falconiformes) par cytogenetique classique et molecular, et modelisation de leur evolution** Tese de Doutorado, Museu de História Natural. Paris, França.

BLOOM, S. E.; DELANY, M. E.; MUSCARELLA, D. E. (1993) **Constant and Variable Features of Avian Chromosomes** *In: Manipulation of the Avian Genomes* CRC Press Inc. P. 39-59.

BRITO, G. R. R. (2008) **Análises filogenéticas de Cathartidae (Aves) com base em caracteres osteológicos** São Paulo, 139 p. Tese (Doutorado), Departamento de Zoologia, Instituto de Biociências, universidade de São Paulo.

BROWN, L. & AMADON, D.(1968) **Eagles, Hawks and Falcons of the World**  
*McGraw Hill Book Company.*

CHOWDHARY, B. P. & RAUDSEPP, T., (2001) **Chromosome painting in farm, pet and wild animal species** *Methods Cell Sci.*23:37–55.

DE BOER, L.E.M. (1976).**The somatic chromosomes of 16 species of Falconiformes (Aves) and the karyological relationships of the order**  
*Genética* 46:77-113.

DE LUCCA, E.J. & ROCHA, G.T. (1992). **Citogenética de Aves** *Bol. Mus. Para Emilio Goeldi, série Zool* 8:33-68.

DE OLIVEIRA, M.D.V; JORGE, W. (2000) **Análise cromossômica em Aves**  
*Melopsittacus* 3(2):72-80.

DE OLIVEIRA, E. H. C.; HABERMANN, F.; LACERDA, O.; SBALQUEIRO, I. J.; WIENBERG, J.; MULLER, E. S. (2005) **Chromosome reshuffling in birds of prey: the karyotypes of the world's largest eagle (Harpy eagle, *Harpia harpyja*) compared to that of the chicken (*Gallus gallus*)**  
*Chromosoma* 114:338-343.

DE OLIVEIRA, E. H. C.; TAGLIARINI, M. M.; NAGAMACHI, C. Y.; PIECZARKA, J. C. (2006) **Comparação genômica em aves através de sondas**

**cromossomo- específicas** *Revista Brasileira de Ornitologia* MS 06-005:X-XX.

DE OLIVEIRA, E.H.C. ; DE MOURA, S.P. ; DOS ANJOS, L.J.S. ; NAGAMACHI, C.Y. ; PIECZARKA, J.C. ; O'BRIAN, PCM ; FERGUSON-SMITH, M.A. (2008) **Comparative chromosome painting between chicken and spectacled owl (*Pulsatrix perspicillata*): implications for chromosomal evolution in the Strigidae (Aves, Strigiformes)** *Cytogenetic and Genome Research*, 122: 157-162.

DE OLIVEIRA, EHC ; TAGLIARINI, MM. ; RISSINO, JD ; PIECZARKA, JC. ; NAGAMACHI, CY. ; O BRIEN, PCM. ; FERGUSON-SMITH, MA.(2010). **Reciprocal chromosome painting between white hawk (*Leucopternis albicollis*) and chicken reveals extensive fusions and fissions during karyotype evolution of accipitridae (Aves, Falconiformes)** *Chromosome Research*, 18:349-355.

DE OLIVEIRA, E. H. C.; NEUSSER, M.; MÜLLER, S. (2012) **Chromosome evolution in new world monkeys (Platyrrhini)** *Cytogenetic and Genome Research* (Printed ed.) v. 137, p. 259 – 272.

DEL HOYO, J.; ELLIOTT, A.; SARGATAL, J. (1994) **Handbook of the birds of the world. Vol 2. New World vultures to Guineafowl** *Lynx Edicions*, Barcelona. 639pp.

- DERJUSHEVA, S.; KURGANOVA, A.; HABERMAN, F.; GAGINSKAIA, E.  
(2004) **High chromosome conservation detected by comparative chromosome painting in chicken, pigeon and passerine birds**  
*Chromosome Res.* 12:715-723.
- DICKINSON, E. C. (2003) **The toward and more complete check list of the birds of the world** *Christopher helm*, London.
- FEDUCCIA, A. (1980) **The age of birds** *Cambridge, Harvard Univ. Press.*
- FEDUCCIA, A. (1996) **The origin and evolution of birds** *Yale, Yale University Press*, 420 p.
- FEDUCCIA A. (1999) **The Origin and Evolution of Birds** *New Haven, CT: Yale Univ. Press.* 2nd ed.
- FERGUSON-LEES, J.; CHRISTIE, D. A. (2001) **Raptors of the World** *New York: Houghton Mifflin Company.*
- GLINSKI, R. (1988) **Gray hawk** Pp. 83 – 86. In: GLINSKI, R.; PENDLETON, B.; MOSS, M.; LEFRANC, M.; MILSAP, B. **Proceedings of the southwest raptor management symposium and workshop** Washington, D. C.: National Wildlife Federation.



GRIFFIN, DK, ROBERTSON, L.B.W., TEMPEST, H.G., SKINNER, B.M. (2007).

**The evolution of the avian genome as revealed by comparative molecularcytogenetics** *Cytogenet Gen Res* 117:64-77.

GRIFFITHS, C. S. (1994a) **Monophyly of the Falconiformes based on the syringeal morphology** *Auk* 111:787-805.

GRIFFITHS, C. S.; BARROWCLOUGH, G. F.; GROTH, J. G.; MERTZ, L. A. (2007) **Phylogeny, diversity and classification of the Accipitridae based on DNA sequences of the RAG-1 exon** *Journal of Avian Biology*, v. 38, n. 5, p. 587 – 602.

GUTTENBACH, M.; NANDA, I.; FEICHTINGER, W.; MASABANDA, J. S. ; GRIFIN D. K. ; SCHMID, M. (2003) **Comparative chromosome painting of chicken autosomal paints 1–9 in nine different bird species** *Cytogenet. Genome Res.* 103:173–184.

HACKET, S. J.; KIMBALL, R. T.; REDDY, S.; BOWIE, R. C. K.; BRAUM, E. L.; BRAUM, M. J.; CHOJNOWSKI, J. L.; COX, W.A.; HAN, K.; HARSHMAN, J.; HUDDLESTON, C. J.; MARKS, B. D.; MIGLIA, K. J.; MOORE, W. S.; SHELDON, F. H.; STEADMAN, W.D.; WITT, C. C.; YURI, T. (2008) **Aphylogenomic studi of birds reveals their evolutionary history** *Science*, n. 320, p. 1763 – 1768.

HARING, E.; KRUCKENHAUSER, L.; GAMAUF, A.; RIESING, M. J.; PINSKER, W. (2001) **The complete sequence of the mitochondrial genome of *Buteo buteo* (Aves, Accipitridae) indicates an early split in the phylogeny of raptors** *Molecular Biology and Evolution*, v. 18, n. 10, p. 1892 – 1904.

HELBIG, A. J.; KOCUMA, A.; SEIBOLD, I.; BRAUN, M. J. (2005) **A multi-gene phylogeny of aquiline eagles (Aves: Accipitriformes) reveals extensive paraphyly at the genus level** *Molecular Phylogenetics and Evolution* 35:147–164.

HELLMAYR, C. E. & CONOVER, B. (1949) **Catalogue of birds of the Americas part 1.** *Chicago, Field Museum of Natural History*, v. 13, n. 4, 359 p.

HOLDAWAY, R. N. (1994) **An exploratory phylogenetics analysis of the genera of the Accipitridae, with notes on the biogeography of the family** In: MEYBURG, B. U.; CHANCELLOR, R. D. (eds). Berlin, Proceedings of the IV World Conference on birds of prey and owls.

HUDSON, G. E. (1948) **Studies on the muscles of the pelvic appendage in birds II: The heterogeneous Order Falconiformes** *American Midland Naturalist*, Vol. 39, no. 1: 102-127.

JOLLIE, M. (1976) **A contribution to the morphology and phylogeny of the Falconiformes** *Evol. Theor.* 1: 285-298.

JOLLIE, M. (1977a) **A contribution to the morphology and phylogeny of the Falconiformes** *Evol. Theor.* 2: 115-208.

JOLLIE, M. (1977b) **A contribution to the morphology and phylogeny of the Falconiformes** *Evol. Theor.* 2: 209-300.

JOLLIE, M. (1977c) **A contribution to the morphology and phylogeny of the Falconiformes** *Evol. Theor.* 3: 1-141.

KLAPPENBACH, L (2013). **Birds of Prey.** Disponível em <http://animals.about.com/od/birdsofprey/p/birdsofprey.htm>. Acessado em 26/07/2013

KRUCKENHAUSER, L.; HARING, E.; PINSKER, W.; RIESING, M. J.; WINKLER, H.; WINK, M.; GAMAUF, A. (2004) **Genetic vs morphological differentiation of old world buzzards (*genus Buteo*, Accipitridae)** *Zoologica Scripta*, v. 33, n. 3, p. 197 – 211.

LERNER, H. R. L. & MINDELL, D. P. (2005) **Phylogeny of eagles, Old World vultures, and Accipitridae based on nuclear and mitochondrial** *Molecular Phylogenetics and Evolution* 37 (2005) 327–346.

LERNER, H. R. L.; KLAVER, M. C.; MINDELL, D. P. (2008) **Molecular phylogenetics of Buteoninae birds of prey (Accipitridae)** *Auk*, v. 304, n. 2, p. 304 – 315.

LIGON, J. D. (1967) **Relationships of the Cathartidae vultures** *Occasional papers of the Museum of Zoology of the University of Michigan*, n. 651, p. 1 – 26.

MARTINS, M. M. (1988). **Sexagem de aves a partir de material de polpa de pena** Botucatu, UNESP. Dissertação (Mestrado) Departamento de Genética. Instituto de Biociências da UNESP. 50p.

MAYR, G.; CLARKE, J. (2003) **The deep divergences of neornithine birds: a phylogenetic analysis of morphological characters** *Cladistics*, v. 19, n. 6, p. 527 – 553.

MIGOTTO, R. (2008) **Inferência filogenética em gaviões buteoninos (Aves: Accipitridae) com base em caracteres osteológicos cranianos** Pp 99 Dissertação (Mestrado). Departamento de Zoologia. Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo.

NANDA, I.; KARL, E.; VOLOBOUEV, V.; GRIFFIN, D. K.; SCHARTL, M.; SCHMID, M. (2006) **Extensive gross genomic rearrangements between chicken and old world vultures (Falconiformes: Accipitridae)** *Cytogenet Genome Res* 112:286–295.

NIE W.; O'BRIEN, P. C. M.; NG, B. L.; FU, B.; VOLOBOUEV, V.; CARTER, N. P.; FERGUSON-SMITH, M. A.; YANG, F. (2009) **Avian comparative genomics: reciprocal chromosome painting between domestic chicken (*Gallus gallus*) and the stone curlew (*Burhinus oedicnemus*, Charadriiformes) — An atypical species with low diploid number** *Chromosome Research* 17:99– 113.

NISHIDA, C.; ISHIJIMA, J.; KOSAKA, A.; TANABE, H.; HABERMANN, F. A.; GRIFFIN, D. K.; MATSUDA, Y. (2007) **Characterization of chromosome structures of Falconidae (Falconidae, Falconiformes, Aves) by chromosome painting and delineation of chromosome rearrangements during their differentiation** *Chromosome Research* 16:171 – 181.

OLIVEIRA, AL & SILVA, RS (2006). **Registro de Harpia (*Harpia harpyja*) no cerrado de Tapira, Minas Gerais, Brasil.** *Revista Brasileira de Ornitologia* 14 (4) 433–434.

OLSON, S.L. (1985) **The fossil record of birds** *In: Avian biology Volume VIII*  
Edited by: Farner D, King J R, Parkes K. *New York:Academic Press*; 79-239.

PADILLA, J.A.; MARTINEZ-TRANCON, M.; RABASCO, A.; FERNANDEZ-GARCIA, J.L. (1999) **The karyotype of the Iberian imperial eagle (*Aquila***

**adalberti)** analyzed by classical and DNA replication banding  
*Cytogenet Cell Genet* 84:61–66.

PETERS, J. (1931) **Check-list of birds of the world** *Harvard University Press*,  
*Cambridge*.

PYCRAFT, W. P. (1902) **Contributions to the osteology of birds. Part V. Falconiformes** *Proceedings Zoological Society of London*, n. 1902, p. 277 – 320.

RANGEL, T. F. L.V. B.; DINIZ-FILHO, J. A. F. (2004) **Worldwide patterns in species richness of falconiformes: analytical null models, geometric constraints, and the mid-domain effect** *Braz. J. Biol.* v. 64, n. 2, São Carlos.

RAUDSEPP, T.; HOUCK, M. L.; O'BRIAN, P. C.; FERGUNSON-SMITH, M. A.; RYDER, O. A.; CHOWDHARY, B. P. (2002) **Cytogenetic analysis of California Condor (*Gymnogyps californianus*) chromosomes: comparison with chicken (*Gallus gallus*) macrochromosomes** *Cytogenet Genome Res.* 98:54-60.

REA, A. M. (1983) **Cathartidae affinities: a brief overview** In: WILBUR, S. R.; KACKSON, J. A. **Vulture biology and management** *Berckley, University of California Press*, p. 26 – 53.

- RIESING, M. L.; KRUCKENHAUSER, L.; GAMUF, A.; HARING, E. (2003) **Molecular phylogeny of the genus *Buteo* (Aves: Accipitridae) based on mitochondrial marker sequences** *Molecular Phylogenetics and Evolution*, v. 27, n. 2, p. 328 – 342.
- RODIONOV, A. V. (1997) **Evolution of avian chromosomes and linkage groups** *Rus. J. Genet.* 33:605–617.
- SANTOS, L. P.; GUNSKI, R. J. (2006) **Revisão de dados citogenéticos sobre a avifauna brasileira** *Revista Brasileira de Ornitologia* 14 (1) 35-45.
- SCHMUTZ, S. M.; MOKER, J. S.; THUE, T. D. (1993) **Chromosomes of four north-american Buteoninae hawks** *J Raptor Res* 27(4):196 – 202.
- SCHWARZACHER T; HESLOP-HARRISON, P. (2000). **Practical in situ Hybridization** *Bios Scintific Publishers Limited, Nova York, EUA.* 203p.
- SEIBOLD I. & HELBIG A. J. (1995) **Evolutionary history of New and Old World vultures inferred from nucleotide sequences of the mitochondrial cytochrome b gene** *Phil Trans R Soc Lond B Biol Sci* 350: 163–178.

SHETTY S.; GRIFFIN D. K.; GRAVES J. A. (1999) **Comparative painting reveals strong chromosome homology over 80 million years of bird evolution** *Chromosome Res* 7:289–295.

SHIBUSAWA M.; NISHIBORI M.; NISHIDA-UMEHARA C.; TSUDZUKI M.; MASABANDA J.; GRIFFIN D. K.; MATSUDA Y. (2004a) **Karyotypic evolution in the Galliformes: an examination of the process of karyotypic evolution by comparison of the molecular cytogenetic findings with the molecular phylogeny** *Cytogenet Genome Res* 106:111–119.

SHIBUSAWA M.; NISHIDA-UMEHARA C.; TSUDZUKI M.; MASABANDA J.; GRIFFIN D. K.; MATSUDA Y. (2004b) **A comparative karyological study of the blue-breasted quail (*Coturnix chinensis*, Phasianidae) and California quail (*Callipepla californica*, Odontophoridae)** *Cytogenet Genome Res* 106:82–90.

SIBLEY, C. G. & AHLQUIST J. E. (1990) **Phylogeny and Classification of Birds: a study in molecular evolution** *New Haven & London: Yale University Press.*

SICK, H. (1997) **Ornitologia Brasileira Nova Fronteira, RJ, Brasil.** 912p.



SKINNER, B. M.; GRIFFIN, D. K. (2012) **Intrachromosomal rearrangements in avian genome evolution: evidence for regions prone to breakpoints** *Heredity* 108:37 – 41.

TAGLIARINI, M. M.; NAGAMACHI, C. Y.; PIECZARKA, J. C.; DE OLIVEIRA, E. H. C. (2007) **Description of two new karyotypes and cytotaxonomic considerations on Falconiformes Ararajuba**. *Revista Brasileira de Ornitologia*, v. 15, p. 261-266.

TAGLIARINI, M. M.; O'BRIAN, P. C. M ; FERGUSON-SMITH, M. A.; DE OLIVEIRA, E. H. C (2011) **Maintenance of syntenic groups between Cathartidae and Gallus gallus indicates symplesiomorphic karyotypes in new world vultures** *Genetics and Molecular Biology*, v. 34, p. 80-83

THIOLLAY, J. M. (1994) **Family Accipitridae (Hawks and Eagles)** *In: Handbook of the birds of the world New World Vultures to Guinea-fowl* Volume 2. Edited by: Hoyo J del, Elliott A, Sargatal J. Barcelona: Lynx Edicions; 52-205.

WIKI AVES (Acesso em setembro de 2013) - WWW.WIKIAVES.COM

WILLIAMS, R. M. & BENIRSCKE, K.(1976) **The chromosomes of four species of falconiformes** *Experientia* 32:310-311.

WINK, M.; SEIBOLD, I.; LOTFIKHAH, F.; BEDNAREK, W. (1998) **Molecular systematics of Holarctic raptors (Order Falconiformes)** *In:*

Chancellor, R.D., Meyburg, B.-U., Ferrero, J.J. (Eds.), **Holarctic Birds of Prey** *Adenex, WWGBP, Calamonte*, pp. 29–48.

WINK, M.; SAUER-GÜRTH, H. (2004) **Phylogenetics relationships in diurnal raptors based on nucleotide sequences on mitochondrial and nuclear marker genes** In: MEYBURG, B. U.; CHANCELLOR, R. D. (eds.) **Proceeding of the VI World Conference on birds of prey and owls**. Budapest, Hungary.