

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA

Utilização de marcadores citogenéticos na análise comparativa dos grandes *Artibeus* (Phyllostomidae, Chiroptera), avaliando estruturas conservadas e sítios espécie- específicos

MARCELA MARIA PEREIRA DE LEMOS PINTO

RECIFE

2007

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA

Utilização de marcadores citogenéticos na análise comparativa dos grandes *Artibeus* (Phyllostomidae, Chiroptera), avaliando estruturas conservadas e sítios espécie- específicos

MARCELA MARIA PEREIRA DE LEMOS PINTO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Mestre em Genética.

Orientadora: Prof^a Dr^a Neide Santos

Co-Orientadora: Prof^a Dr^a Maria José de Souza Lopes

Recife – PE

- 2007 -

Pinto, Marcela Maria Pereira de Lemos

Utilização de marcadores citogenéticos no análise comparativa dos grandes Artibeus (Phyllostomidae, Chiroptera), avaliando estruturas conservadas e sítios espécie-específicos / Marcela Maria Pereira de Lemos Pinto. – Recife: O Autor, 2007.

vii, 81 folhas : il., fig., tab., quadro.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCB. Genética, 2007.

Inclui bibliografia e anexo.

1. Citogenética – Genética de populações 2. Marcadores genéticos 3. Morcegos I. Título.

575.17

CDU (2.ed.)

UFPE

576.58

CDD (22.ed.)

CCB – 2007-090

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA

Parecer da comissão examinadora da defesa de dissertação de Mestrado de

MARCELA MARIA PEREIRA DE LEMOS PINTO

“Utilização de marcadores citogenéticos na análise comparativa dos grandes *Artibeus* (Phyllostomidae, Chiroptera), avaliando estruturas conservadas e sítios espécie- específicos”

Área de Concentração: Genética e evolução

A comissão examinadora, composta pelos professores abaixo, sob a presidência do primeiro, considera a candidata

MARCELA MARIA PEREIRA DE LEMOS PINTO como **aprovada**.

Recife, 04 de abril de 2006

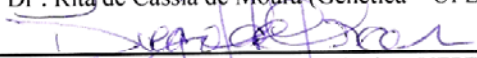
Orientador:


Dr.^a. Neide Santos (Genética – UFPE)

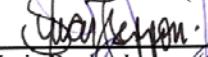
Membro Externo:


Dr.^a. Rita de Cássia de Moura (Genética – UPE)

Membro Interno:


Dr. Diego Astúa de Moraes (Zoologia – UFPE)

Membro Interno:


Dr.^a. Ana Maria Benito-Iscron (Genética – UFPE)

Coordenador do Programa:


Dr. Marcos Antonio de Moraes Junior (Genética-UFPE)

Agradecimentos

A Deus, que esteve comigo sempre que precisei e me proporcionou mais esta oportunidade de progresso.

À minha família que sempre me apoiou com carinho, paciência e afeto. Meu porto seguro que jamais irá me desamparar nas minhas metas presentes e futuras. Agradeço a todos vocês de coração.

À minha querida orientadora Neide Santos por sua dedicação, paciência e esforço de estar sempre presente e disposta a nos ouvir e ajudar nas dificuldades encontradas, nos guiando e aconselhando sempre que preciso. Sua contribuição foi de fundamental importância na conclusão e acabamento do trabalho.

À Prof^{ra}. Maria José pelos auxílios e préstimos em um momento de grande importância, nas correções e na participação efetiva do meu trabalho.

Às técnicas de laboratório Cirlene e Francisca pela importante ajuda na realização de nosso trabalho. Mas principalmente, por serem as grandes amigas que são.

Ao Prof. Marcelo Guerra e a Ana Emília pela disponibilização do sistema de captura de imagem, necessária para finalização do meu experimento.

A Katharine Raquel Pereira dos Santos, Ana Paloma Tavares de Araújo da Universidade Federal da Paraíba (UFPB) e ao Prof. Alfredo Ricardo Langguth Bonino pela fundamental contribuição na identificação taxonômica dos exemplares utilizados nesse trabalho.

A “Seu Mário”, grande amigo nas horas difíceis, escalando cavernas, desbravando matas fechadas, atravessando riachos e “correntezas”. Sua energia contagia a todos os envolvidos nas coletas e no seu próprio convívio.

Aos amigos do laboratório que sempre dão uma “forcinha”, ajudando no trabalho e tornando o ambiente do laboratório mais agradável: Cibele, desbravadora de cavernas e matas; Helen, alto astral; Luis Henrique, eterno filhote; Guilherme, amigo do peito; Pollyanna, minha consultora favorita; Vilminha, receptáculo do saber; Myrella, sempre no batente; João, coletor dos Noctílios; e aos novos amigos: Diogo, Sarah, e Luzia.

À minha grande amiga Merilane, pela paciência diária, pelo incentivo nas horas mais difíceis. Você é dessas pessoas que quando passa por nossas vidas deixa um pouco de si e leva um pouco da gente. Poucas vezes encontrei alguém que cativasse tantas pessoas ao longo de sua trajetória, valeu amiga.

A todos que contribuíram de alguma forma para que eu pudesse chegar aonde cheguei. Espero poder retribuir de algum modo à esperança depositada em mim e em meus feitos.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	vi
LISTA DE FIGURAS E TABELAS	vii
RESUMO	8
1. INTRODUÇÃO	9
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	12
2.1 Aspectos Gerais da Ordem Chiroptera	12
2.1.1 Distribuição e ocorrência	12
2.1.2 Características Biológicas	14
2.1.3 Importância Ecológica	16
2.2 Análise Sistemática do Gênero <i>Artibeus</i>	17
2.2.1 <i>Artibeus planirostris</i> X <i>A. jamaicensis</i> : Espécies distintas ou Co-específicas?	20
2.3 Aspectos Evolutivos e Citogenéticos da Família Phyllostomidae	23
2.3.1 Mecanismos Cromossômicos de Determinação Sexual	27
2.3.1.1 Comportamento Meiótico dos Sistemas Sexuais: Múltiplos e Neo-XY	31
2.4 Análise de Marcadores Cromossômicos em Morcegos: Técnicas de Bandeamento e FISH	33
2.4.1 Heterocromatina – Bandeamento C	34
2.4.2 Regiões Organizadoras de Nucléolos – RONS	39
2.4.3 Fluorocromos – Eucromatina, HC e RONS	41
2.4.4 FISH – Sondas Teloméricas e Ribossomais	43
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46
4. MANUSCRITO DE ARTIGO CIENTÍFICO	
Utilização de marcadores citogenéticos na análise comparativa dos grandes <i>Artibeus</i> (Phyllostomidae, Chiroptera), avaliando estruturas conservadas e sítios específicos espécie- específicos	54
5. CONCLUSÕES	74
6. ANEXOS	77
6.1. Instruções para Autores	77

LISTA DE ABREVIATURAS

Ag	Prata
AgNO ₃	Nitrato de Prata
Ag-RON	Coloração com nitrato de prata
AT	Adenina - Timina
Ba (OH) ₂	Hidróxido de Bário
CB-CMA ₃	Bandeamento C com CMA ₃
CB-DAPI	Bandeamento C com DAPI
CBG	<i>C-bands by Barium Hydroxide using Giemsa</i> Bandeamento C com Giemsa
CMA ₃	Cromomicina A ₃
DAPI	4,6-diamidino-2-fenilindol
DNA	<i>Desoxiribonucleic Acid</i> Ácido Desoxirribonucléico
DNAr	DNA ribossomal
FISH	<i>Fluorescent in situ Hybridization</i> Hibridização <i>in situ</i> Fluorescente
GC	Guanina - Citosina
HC	Heterocromatina Constitutiva
HCL	Ácido Clorídrico
ITS	Seqüência Telomérica Intersticial
MM	Mitramicina
NF	Número Fundamental
RAG2	<i>Recombination Activating Gene-2</i> Gene-2 de Ativação de Recombinação
RBA	<i>Replication Bands</i> Bandas de replicação
RONs	Região Organizadora de Nucléolo
VS	Vesícula Sexual

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Revisão Bibliográfica

Quadro 1. Classificação Sistemática de Phyllostomidae, segundo Baker <i>et al.</i> (2003).	13
Tabela 1. Distribuição geográfica do gênero <i>Artibeus</i> no Brasil	18
Tabela 2. Análise convencional referente à família Phyllostomidae.	25
Figura 1. Árvores filogenéticas construída por Guerrero <i>et al.</i> (2003) com base em características morfométricas (a) e por Lim <i>et al.</i> (2004) através de gene mitocondrial (b).	22
Figura 2. Esquema hipotético da provável origem do cromossomo X na subfamília Stenodermatinae.	30
Figura 3. (a) trivalente sexual XY_1Y_2 obtido através da coloração com E-PTA de células em paquíteno; (b) esquema ilustrativo do complexo sexual.	32

Manuscrito

Tabela 1. Padrão de HC no complemento cromossômico das quatro espécies de <i>Artibeus</i>	61
Tabela 2. Variação do número de RON ativas por célula nos grandes <i>Artibeus</i>	61
Figura 1. Cariótipo convencional de macho de <i>Artibeus obscurus</i> (a). Em destaque estão os sistemas sexuais de machos de <i>A. fimbriatus</i> (b), <i>A. jamaicensis</i> (c) e <i>A. lituratus</i> (d)	71
Figura 2. Bandeamento C no cariótipo de macho de <i>A. obscurus</i> (a), <i>A. fimbriatus</i> (b), <i>A. jamaicensis</i> (d) e fêmea de <i>A. lituratus</i> (c), cujo par sexual do macho está em destaque.	72
Figura 3. Metáfases mitóticas de <i>A. obscurus</i> (a-c) e <i>Artibeus fimbriatus</i> (d-f). Coloração seqüencial $AgNO_3/CMA_3/DAPI$: (a, d) $AgNO_3$, (b, e) CMA_3 e (c, f) DAPI. As setas indicam as RONS.	73

Resumo

O gênero *Artibeus* (Stenodermatinae) está constituído por 18 espécies e possui distribuição restrita à região Neotropical. No Brasil foram formalmente registradas apenas quatro espécies dos grandes *Artibeus*: *A. lituratus*, *A. jamaicensis*, *A. obscurus* e *A. fimbriatus*. Neste trabalho foi realizado um estudo citogenético comparativo nos grandes *Artibeus* através de técnicas diferenciais e moleculares de análise cromossômica. As preparações cromossômicas foram obtidas a partir de medula óssea de *A. obscurus* (6 machos e 8 fêmeas), *A. fimbriatus* (2 machos e 4 fêmeas), *A. jamaicensis* (8 machos e 5 fêmeas) e *A. lituratus* (10 machos e 10 fêmeas) coletados no Estado de Pernambuco. O cariótipo das espécies analisadas está constituído por $2n=30/31$ (XX;XY₁Y₂) e número fundamental (NF=56), diferindo entre si pelo tamanho de Y₁ e Y₂. O bandejamento C evidenciou blocos de heterocromatina constitutiva (HC) nas regiões pericentroméricas de todos os cromossomos, além de pequenos blocos de HC na região telomérica dos pares 5, 6, 7 e X em todas as espécies. Além disso, *A. obscurus* apresentou blocos intersticiais no braço curto e longo do par 1, como também nos braços longos dos pares 2, 5 e 6, e nos telômeros do braço curto do par 9. Por sua vez, em *A. jamaicensis* observaram-se blocos teloméricos nos braços curtos dos pares 9 e 13, e blocos intersticiais nos braços longos dos cromossomos 1, 2 e 6. A presença de um bloco intersticial também foi verificada no braço longo do par 6 de *A. lituratus*. Em todos os indivíduos, o braço longo do X mostrou uma coloração diferencial em relação ao complemento cromossômico, e os acrocêntricos Y₁ e Y₂ mostraram-se heterocromáticos exceto por *A. jamaicensis*, cujo Y₂ exibiu blocos centroméricos e distais. Nas quatro espécies analisadas, as RONS estavam localizadas nas contrações secundárias dos pares 5, 6 e 7, exibindo variação individual de distribuição de atividade das RONS em cerca de três a quatro cromossomos. Através da coloração seqüencial observou-se que os blocos heterocromáticos associados às RONS em *A. obscurus* e *A. fimbriatus* apresentaram riqueza em pares de bases GC. O estudo realizado proporcionou a análise comparativa das espécies, permitindo a visualização tanto de estruturas conservadas pelo gênero *Artibeus* como de divergências características de cada indivíduo, permitindo a correta individualização de espécies que ocorrem em simpatria no Nordeste brasileiro.

Palavras-chaves: Chiroptera, *Artibeus*, bandejamento C, Ag-RON, CMA₃, DAPI.

1. Introdução

A ordem Chiroptera compreende, aproximadamente, 1113 espécies agrupadas em 199 gêneros, 18 famílias e duas subordens: Megachiroptera (Pteropodidae) e Microchiroptera, que possui 17 famílias, das quais nove têm ocorrência nas Américas, estando todas representadas no Brasil: Emballonuridae, Furipteridae, Molossidae, Mormoopidae, Natalidae, Noctilionidae, Phyllostomidae, Thyropteridae e Vespertilionidae (Simmons, 2005).

A classificação taxonômica dos quirópteros, particularmente do gênero *Artibeus*, ainda é motivo de muitas controvérsias e tem sido sujeita a inúmeras alterações, com base no conjunto de caracteres avaliados. Em geral, são analisadas características morfológicas e métricas, principalmente as do crânio, o que dificulta a identificação de relações filogenéticas com base, apenas, em detalhes intensamente envolvidos no processo adaptativo. Conseqüentemente é importante a análise de outros aspectos, entre os quais se destaca a caracterização cariotípica, que permite avaliar os padrões da evolução cromossômica (Varella-Garcia *et al.*, 1989; Taddei *et al.*, 1998; Wetterer *et al.*, 2000; Jones *et al.*, 2002).

Dentre as técnicas amplamente utilizadas para o estudo citogenético de morcegos, destaca-se o bandejamento G, que permite a identificação dos cromossomos e de seus eventuais rearranjos. Adicionalmente, as técnicas de bandejamento C e de coloração com nitrato de prata (AgNO_3) que marcam regiões de heterocromatina constitutiva (HC) e regiões organizadoras de nucléolos (RONs), respectivamente, têm permitido a identificação de áreas cromossômicas específicas. Dados da literatura, referente a morcegos, mostram que espécies estreitamente relacionadas freqüentemente apresentam padrões de bandas G bastante conservados. Contudo, uma certa diferenciação ocorre quanto aos padrões de bandejamento C e RONs. Estes marcadores

cromossômicos, aliados aos estudos taxonômicos têm auxiliado no melhor entendimento dos mecanismos evolutivos responsáveis pelas divergências encontradas nos diferentes grupos da ordem Chiroptera (Varella-Garcia *et al.*, 1989; Souza e Araújo, 1990; Santos e Souza, 1998a, b; Rodrigues *et al.*, 2000; Neves *et al.*, 2001; Santos *et al.*, 2001; 2002; Leite-Silva *et al.*, 2003).

Fluorocromos específicos para pares de bases AT (4,6-diamidino-2-fenilindol – DAPI) ou GC (Cromomicina A₃ – CMA₃ e Mitramicina – MM), têm sido pouco utilizados em morcegos. Apenas alguns representantes das famílias Vespertilionidae, Phyllostomidae e Molossidae foram estudados com esse enfoque (Bickham, 1987; Ruedas *et al.*, 1990; Santos e Souza, 1998a,b; Santos *et al.*, 2001; Leite-Silva *et al.*, 2003; Barros, 2006). Esta metodologia revela padrões de bandeamento fluorescentes ou não fluorescentes, que são interpretados em função do conteúdo de pares de bases de regiões cromossômicas específicas, permitindo a caracterização de diferentes classes de HC (rica em pares de bases AT e/ou GC, ou sem especificidade) e da eucromatina (bandas G e R) dentro ou entre cariótipos distintos (Sumner, 2003).

Neste estudo foi realizada uma análise comparativa, através de marcadores citogenéticos diferenciais (bandeamento C e coloração com AgNO₃) e moleculares (tríplice coloração CMA₃/DA/DAPI), nos grandes *Artibeus* (*A. obscurus*, *A. fimbriatus*, *A. lituratus* e *A. jamaicensis*) para avaliar e estabelecer os mecanismos evolutivos atuantes na diferenciação desse grupo.

- Analisando o complemento cromossômico (número diplóide, NF e sistema sexual) em através da coloração convencional;
- Caracterizando o padrão da heterocromatina constitutiva (HC) através do bandeamento C com Giemsa (CBG) em *A. obscurus*, *A. fimbriatus*, *A. jamaicensis* e *A. lituratus* para verificar padrões espécie-específico;

- Identificando e avaliando a atividade das regiões organizadoras de nucléolos (RONS), no complemento cromossômico, através da coloração com o nitrato de prata nas espécies analisadas.
- Utilizando fluorocromos base-específicos CMA₃ e DAPI para qualificar a cromatina de *A. obscurus* e *A. fimbriatus*, particularmente a HC e as regiões espaçadoras presentes nas RONS;

Além disso, essas técnicas foram úteis na avaliação e determinação de prováveis diferenciações interespecíficas que, aliadas à prévia análise sistemática, poderão auxiliar na correta individualização dos representantes do gênero *Artibeus*.

2. Revisão da Literatura

2.1 Aspectos Gerais da Ordem Chiroptera

2.1.1 Distribuição e Ocorrência

Os morcegos são considerados o segundo grupo de mamíferos mais abundante, representando cerca de 25% de todas as espécies deste grupo. Apresentam distribuição mundial, incluindo grandes altitudes e ilhas remotas, como a Nova Zelândia, embora a maioria das espécies ocorra nos trópicos (Altringham, 1996; Jones, 2002).

A ordem Chiroptera compreende, aproximadamente, 1113 espécies agrupadas em 199 gêneros, 18 famílias e duas subordens: Megachiroptera e Microchiroptera. A subordem Megachiroptera está representada por uma única família, Pteropodidae, ocorrendo nas regiões tropicais e subtropicais da África, Sudeste da Ásia, Austrália, Samoa e Ilhas Carolinas. Microchiroptera inclui 17 famílias, cuja distribuição é mundial, exceto nas regiões polares e em algumas ilhas distantes dos continentes. Dessas famílias, nove têm ocorrência nas Américas, estando todas representadas no Brasil: Emballonuridae, Furipteridae, Molossidae, Mormoopidae, Natalidae, Noctilionidae, Phyllostomidae, Thyropteridae e Vespertilionidae (Simmons, 2005).

A família Phyllostomidae, representada pelos morcegos com folhas nasais do Novo Mundo, é um grupo bastante diversificado. Exibe o maior número de gêneros (57) e espécies (160) entre os Chiropteras Neotropicais, compreendendo 11 subfamílias (Quadro 1): Carrollinae, Desmodontinae, Glossophaginae, Glyphonycterinae, Lonchophyllinae, Lonchorhininae, Macrotinae, Micronycterinae, Phyllostominae, Rhinophyllinae e Stenodermatinae (Baker *et al.*, 2003; Simmons, 2005).

Quadro 1 – Classificação Sistemática de Phyllostomidae, segundo Baker *et al.* (2003).

Família Phyllostomidae	
Macrotinae	Lonchophyllinae
<i>Macrotus</i>	<i>Lionycteris</i>
Micronycterinae	<i>Lonchophylla</i>
<i>Micronycteris</i>	<i>Platalina</i>
<i>Lampronnycteris</i>	Carolliinae
Desmodontinae	<i>Carollia</i>
Diphyllini	Glyphonycterinae
<i>Diphylla</i>	<i>Glyphonycteris</i>
Desmodontini	<i>Trinycteris</i>
<i>Desmodus</i>	Rhinophyllinae
<i>Diaemus</i>	<i>Rhinophylla</i>
Lonchorhininae	Stenodermatinae
<i>Lonchorhina</i>	Sturnirini
Phyllostominae	<i>Sturnira</i>
Macrophyllini	Stenodermatini
<i>Macrophyllum</i>	Vampyressina
<i>Trachops</i>	<i>Chiroderma</i>
Phyllostomini	<i>Vampyriscus</i>
<i>Lophostoma</i>	<i>Uroderma</i>
<i>Tonatia</i>	<i>Vampyressa</i>
<i>Mimon</i>	<i>Mesophylla</i>
<i>Phylloderma</i>	<i>Vampyrodes</i>
<i>Phyllostomus</i>	<i>Platyrrhinus</i>
Vampyrini	Mesostenodermatini
<i>Chrotopterus</i>	Enchisthenina
<i>Vampyrum</i>	<i>Enchisthenes</i>
Glossophaginae	Ectophyllina
Glossophagini	<i>Ectophylla</i>
<i>Monophyllus</i>	Artibeina
<i>Glossophaga</i>	<i>Artibeus</i>
<i>Leptonycteris</i>	<i>Dermanura</i>
Brachyphyllini	Stenodermatina
<i>Brachyphylla</i>	<i>Ariteus</i>
Phyllonycterini	<i>Ardops</i>
<i>Erophylla</i>	<i>Stenoderma</i>
<i>Phyllonycteris</i>	<i>Centurio</i>
Choeronycterini	<i>Pygoderma</i>
Anourina	<i>Sphaeronycteris</i>
<i>Anoura</i>	<i>Ametrida</i>
Choeronycterina	<i>Phyllops</i>
<i>Hylonycteris</i>	
<i>Choeroniscus</i>	
<i>Choeronycteris</i>	
<i>Musonycteris</i>	
<i>Lichonycteris</i>	
<i>Scleronycteris</i>	

A subfamília Stenodermatinae é detentora da maior diversidade de gêneros (20) e espécies (62), em relação às demais subfamílias da ordem Chiroptera (Wetterer *et al.*, 2000; Jones *et al.*, 2002; Baker *et al.*, 2003). Através da análise, em conjunto, de caracteres morfo-anatômicos (Wetterer *et al.*, 2000), da utilização de gene nucleares – RAG2 – (Baker *et al.*, 2000) e de genes ribossômicos mitocondriais (Baker *et al.*, 2003), foram reconhecidas três tribos para essa subfamília: Sturnirini, Stenodermatini (subtribo Vampyressina) e Mesostenodermatini, que compreende quatro subtribos: Enchisthenina (gênero *Enchisthenes*), Ecthophyllina (gênero *Ecthophylla*), Artibeina (gêneros *Artibeus* e *Dermanura*) e Stenodermatina (gêneros *Artibeus*, *Stenoderma* e *Ametrida*) (Baker *et al.*, 2003).

2.1.2 Características Biológicas

Os morcegos compreendem aos únicos mamíferos com asas, possuindo características morfológicas e fisiológicas únicas, que os capacitam ao voo verdadeiro (Varella-Garcia e Taddei, 1989). Como é sugerido por seu nome, “Chiroptera” (cheir=mão, pteron=asa), estes organismos sofreram modificações em seus membros superiores, pelo alongamento dos ossos metacarpiais e falanges, possibilitando assim o controle e sustentação dos movimentos do patágio (membrana da asa). Apesar das adaptações sofridas, a estrutura óssea dos membros que formam as asas (úmero, ulna, metacarpo e falanges) não difere significativamente da dos demais mamíferos, contrariamente ao observado nas aves e nos répteis voadores extintos (Altringham, 1996; Jones, 2002).

Embora a capacidade de voo seja a qualidade mais marcante dos morcegos, considera-se que suas características faciais apresentam, possivelmente, o maior grau de variação em relação a qualquer outro grupo de mamíferos. Estas se encontram

intrinsecamente relacionadas com as suas diferentes dietas e métodos de obtenção de alimento. De acordo com seus hábitos alimentares, os morcegos podem ser classificados em seis categorias distintas: frugívoros, insetívoros, nectívoros, onívoros, hematófagos e piscívoros (Hill e Smith, 1984; Altringham, 1996).

A ampla diversidade morfológica exibida pela ordem Chiroptera é, em parte, consequência de modificações inerentes a sua dieta e a seus nichos ecológicos. Segundo Baker *et al.* (2003), o cerne das divergências quanto à reconstrução da história filogenética da família Phyllostomidae envolve as adaptações alimentares sofridas pelos representantes deste grupo. Esta problemática pode ser estendida para toda a ordem, considerando que o agrupamento dos indivíduos em seus respectivos clados baseia-se primeiramente nos caracteres morfométricos e anatômicos.

Representantes da subordem Megachiroptera, também conhecidos como raposas voadoras, caracterizam-se por seu grande porte (antebraço – 40 a 220 mm; peso – 2g a 1,5 kg; envergadura até 2 m) e por apresentarem olhos grandes, focinho e orelhas simples, destituídas de trago¹. A alimentação dos megaquiropteros está constituída, exclusivamente, por frutas, flores, néctar e pólen, dependendo geralmente da visão e do olfato para encontrarem seu alimento (Altringham, 1996; Jones, 2002).

Os morcegos da subordem Microchiroptera, em contrapartida, freqüentemente exibem olhos pequenos, orelhas grandes e complexas, e os membros da família Phyllostomidae possuem folhas nasais. Estas duas últimas características estão intimamente associadas com a ecolocalização, habilidade presente em todas as espécies desta subordem. Embora a dieta de grande parte dos microquiropteros esteja baseada no consumo de insetos, verifica-se extensa diversidade de hábitos alimentares, como frutas, néctar, pólen, pequenos vertebrados (incluindo outros morcegos, pássaros e peixes) e sangue (Altringham, 1996; Jones, 2002).

¹Apêndice membranoso na abertura do conduto auditivo externo

A ecolocalização (sonar), presente na maioria dos morcegos, consiste na emissão de um pulso ultra-sônico (acima de 15 kHz) produzido na laringe, cujo eco é captado por meio de orelhas especialmente adaptadas, fornecendo, assim, informações a respeito do meio ambiente. A frequência, intensidade e duração do som emitido diferem entre as espécies, podendo ser utilizado na identificação desses indivíduos, através de equipamentos especializados na detecção de chamados de alta frequência. Os microquiropteros utilizam a ecolocalização para a navegação, forrageamento e alimentação, todavia observa-se que algumas espécies desta subordem utilizam preferencialmente a visão, o olfato e a audição passiva para a detecção de seu alimento (por exemplo, as espécies frugíveras) (Jones, 2002).

2.1.3 Importância Ecológica

Os morcegos representam importantes reguladores de ecossistemas tropicais, correspondendo a cerca de 40 a 50% das espécies de mamíferos em determinadas regiões. Sua notável diversidade de formas, adaptações morfológicas e hábitos alimentares, permitem a utilização dos mais variados nichos, em complexa relação de interdependência com o meio. À medida que partilham os recursos, em especial os alimentares, os morcegos influenciam a dinâmica dos ecossistemas naturais, sendo indicadores naturais dos níveis de alterações ambientais, além de serem úteis em estudos sobre biodiversidade. Desta forma esses organismos podem ser utilizados como “ferramentas” na identificação dos processos biológicos envolvidos na perda ou transformação do habitat natural (Bianconi *et al.*, 2004).

A importante atuação dos morcegos no controle de pragas é realizada pelos insetívoros, graças à sua influência sobre as populações de algumas espécies de insetos. Os de hábito frugívoro participam da dispersão de sementes semelhante aos pássaros,

através de seu guano ou no deslocamento de frutos, auxiliando assim no processo de reflorestamento. Além disso, algumas espécies nectívoras participam da polinização de determinadas plantas (Bianconi *et al.*, 2004).

Apenas três espécies da ordem Chiroptera são hematófagas²: *Diphylla ecaudata*, *Diaemus youngi* e *Desmodus rotundus* (Desmodontinae, Pyllostomidae), constituindo, portanto, potenciais transmissores do vírus da raiva para mamíferos silvestres (incluindo outros morcegos), domésticos e, eventualmente, para o homem. Os morcegos também podem ser reservatórios naturais de agentes infecciosos, como o *Toxoplasma gondii*, *Trypanosoma cruzi* e *Histoplasma capsulatum*, fungo patogênico (causador da histoplasmose) encontrado no solo em excrementos eliminados em seus abrigos naturais (cavernas). Além disso, o guano dos morcegos tem sido identificado como poderoso alérgeno, indutor de rinite e asma em humanos (Varella-Garcia e Taddei, 1989; Jones, 2002).

2.2 Análise Sistemática do Gênero *Artibeus*

A classificação taxonômica da ordem Chiroptera baseia-se, principalmente, em características morfológicas e métricas, avaliadas principalmente no crânio. Entretanto, os morcegos estão inseridos entre o grupo de mamíferos mais antigo e divergente, dificultando a identificação das relações filogenéticas com base, apenas, em detalhes intensamente envolvidos no processo adaptativo. Conseqüentemente é importante a análise de outros aspectos, entre os quais se destaca a caracterização cariotípica, que permite avaliar a intensidade e os padrões da evolução cromossômica (Varella-Garcia *et al.*, 1989; Wetterer *et al.*, 2000; Jones *et al.*, 2002).

²Indivíduo que se alimenta obrigatoriamente de sangue.

O gênero *Artibeus* (Leach, 1821) está constituído por 18 espécies distribuídas em três subgêneros *Artibeus* (grandes *Artibeus*), *Dermanura* e *Koopmania* (pequenos *Artibeus*), possuindo distribuição restrita à Região Neotropical, por toda América Central e do Sul, desde o Brasil até o norte da Argentina (Koopman, 1993; Eisenberg e Redford, 1999; Simmons, 2005). Algumas espécies deste gênero estão entre os filostomídeos mais comuns e abundantes em comunidades Neotropicais, a exemplo de *A. lituratus* (Olfers, 1818) e *A. fimbriatus* (Gray, 1838) que, no extremo sul do Brasil, chegam a representar mais de 70% dos morcegos coletados em áreas de Mata Atlântica (Rui e Fabián, 1997; Rui e Drehmer, 2004). A sistemática das espécies do gênero *Artibeus* ainda é motivo de muitas controvérsias, decorrentes em sua maioria, da falta de informações adequadas sobre a distribuição geográfica e a variação nos diferentes taxa (Taddei *et al.*, 1998).

No Brasil, segundo Simmons (2005), são encontradas quatro espécies de grandes *Artibeus*: *A. lituratus*; *A. jamaicensis* (Leach, 1821); *A. obscurus* (Schinz, 1821) e *A. fimbriatus*; e cinco pequenos *Artibeus*: *A. anderseni* (Osgood, 1916); *A. cinereus* (Gervais, 1856); *A. concolor* (Peters, 1865); *A. glaucus* (Thomas, 1893) e *A. gnomus* (Handley, 1987). A localização das nove espécies no território brasileiro está discriminada na tabela 1.

Tabela 1 – Distribuição geográfica do gênero *Artibeus* no Brasil

Espécies	Estados
<i>A. anderseni</i>	AC, AM, MT, PA, RO e RR.
<i>A. cinereus</i>	AC, AL, AM, AP, BA, DF, ES, MA, MT, PA PB, PE, RJ RO e SP
<i>A. concolor</i>	AM, CE, PA, PI, RO e RR.
<i>A. fimbriatus</i>	BA, CE, DF, ES, MG, PE, PR, RJ, RS, SC e SP
<i>A. glaucus</i>	PA, RR e sul do Brasil.
<i>A. gnomus</i>	AM, BA, ES, MT e PA.
<i>A. jamaicensis</i>	AC, AL, AM, AP, BA, CE, DF, ES, MA, MG, MS, MT, PA, PB, PE, PI, PR, RJ, RO, RR e SP.
<i>A. lituratus</i>	AC, AL, AM, AP, BA, CE, DF, ES, MG, MS, MT, PA, PE, PR, RJ, RO, RR, RS, SC e SP.
<i>A. obscurus</i>	AC, AM, AP, BA, CE, ES, MG, MT, PA, PB, PE, PI, PR, RJ, RO, RR, SC e SP.

Com base em medições morfométricas dos grandes *Artibeus*, Taddei *et al.* (1998) realizaram extenso estudo comparativo em espécimes das regiões Norte, Nordeste, Centro-oeste e Sudeste do Brasil, em que estabeleceu semelhanças e diferenças intra e interespecífica (de acordo com a região analisada) e apresentaram algumas particularidades desse gênero. No Sudeste, verificou-se que as quatro espécies exibiram, no geral, uma sequência crescente em termos de dimensões externas e cranianas. Assim, os representantes de *A. obscurus* compreenderam os menores indivíduos, seguidos por *A. jamaicensis*, *A. fimbriatus* e *A. lituratus*. Nessa região, o maior grau de dificuldade para uma identificação segura foi observado para *A. fimbriatus* e *A. lituratus*, visto que são espécies simpátricas e sintópicas (em grande parte de suas áreas de distribuição), e que apresentaram maior faixa de sobreposição entre as medidas analisadas (distribuição das frequências do comprimento total do crânio). Neste caso, a distinção entre os indivíduos foi possível através da comparação em conjunto de outras características (comprimento do antebraço, comprimento total do crânio e largura pós-orbitária).

Ainda de acordo com Taddei *et al.* (1998), a diferenciação dos grandes *Artibeus* é menos complexa na região Norte, devido à ausência de *A. fimbriatus*, bem como ao fato de que *A. obscurus* é a espécie que apresenta as menores dimensões. Embora tenha se verificado que *A. lituratus* seja significativamente maior do que *A. jamaicensis*, em relação às características externas, essas duas espécies mostraram-se morfometricamente muito semelhantes, no que se refere às várias características cranianas observadas. Em contrapartida, na região Nordeste os representantes de *A. jamaicensis* exibiram dimensões externas e cranianas relativamente menores daquelas registradas nas regiões Sudeste e Norte, resultando em uma maior sobreposição entre as medidas desta espécie com as de *A. obscurus*. Embora tenha havido dificuldade na

diferenciação entre essas espécies, o mesmo não foi observado para *A. lituratus* e *A. fimbriatus* que puderam ser facilmente separadas daquelas com base em caracteres morfométricos.

Indivíduos da espécie *A. jamaicensis* apresentam extensa variação morfológica, com padrões relativamente complexos, estando esta divergência intraespecífica associada com o seu local de incidência (Golfo do México, Península de Yucatan, Ilha de São Vicente, América do Sul e algumas ilhas do Caribe). No Brasil, representantes de populações da região Nordeste apresentam as menores dimensões conhecidas para esta espécie e, provavelmente, seja a espécie do gênero *Artibeus* mais abundante. Deste modo, a similaridade com *A. obscurus*, tanto com relação às medidas externas como cranianas é significativamente maior (Taddei *et al.*, 1998; Ortega e Castro-Arellano, 2001).

Considerando a grande similaridade morfológica entre os grandes *Artibeus* (particularmente entre *A. jamaicensis* e *A. obscurus*) e a sobreposição de seus nichos ecológicos no Nordeste, torna-se necessária a comparação de outras características externas (cor e comprimento do pêlo) e cranianas (posição da constrição pós-orbitária, presença do terceiro molar superior), para uma melhor determinação taxonômica dessas espécies (Lim e Wilson, 1993; Taddei *et al.*, 1998; Ortega e Castro-Arellano, 2001; Rui e Drehmer, 2004).

2.2.1 *Artibeus planirostris* X *A. jamaicensis*: Espécies distintas ou Co-específicas?

A variabilidade entre as populações de *A. jamaicensis* é bem conhecida, sendo reconhecidas cerca de oito diferentes subespécies, considerando tamanho, cor da pelagem e o número dos molares superiores (Guerrero *et al.*, 2004).

A partir de estudo realizado por Handley (1987, 1989), na região de Llanos – Venezuela, *A. fallax*, *A. hercules* e *A. planirostris* foram consideradas subespécies de *A. jamaicensis*, desta *A. planirostris* é considerada como um “sinônimo júnior” ou variante geográfica. Contrariamente, Owen (1987; 1988) obteve resultados através de análises filogenéticas e fenéticas que indicaram a separação de *A. planirostris*, e também de *A. fraterculus*, da espécie *A. jamaicensis*. Adicionalmente, Lim (1997), com base em análises multivariadas (a partir de dados craniométricos), assim como Koopman (1993), ratificou a individualização das espécies mencionadas, de modo que *A. jamaicensis* e *A. planirostris* corresponderem a duas espécies distintas.

A utilização de marcadores moleculares, como ferramenta para inferências filogenéticas e evolutivas, forneceu novas evidências e perspectivas que possibilitaram o esclarecimento de algumas divergências taxonômicas acerca do “complexo *A. jamaicensis*” (cerca de 8 subespécies) (Guerrero *et al.*, 2004).

Philips *et al.* (1991) e Pumo *et al.* (1996) analisaram o DNA mitocondrial de espécies do gênero *Artibeus* e concluíram que *A. jamaicensis* (da América Central e Caribe) e *A. planirostris* (da Guiana Francesa e de São Vicente) representavam duas linhagens diferentes, caracterizadas por diferentes haplótipos de DNA mitocondrial. Similares foram os resultados obtidos por Guerrero *et al.* (2003), que com base em dados morfológicos e moleculares realizaram análise filogenética, verificando que *A. jamaicensis* estaria mais relacionada com *A. obscurus* do que com *A. planirostris* (Figura 1a). Adicionalmente, Lim *et al.* (2004) por meio de análises de parcimônia, obtidas através do gene mitocondrial citocromo-b, sugeriram que estas espécies consistiriam em taxa distantemente relacionados (Figura 1b).

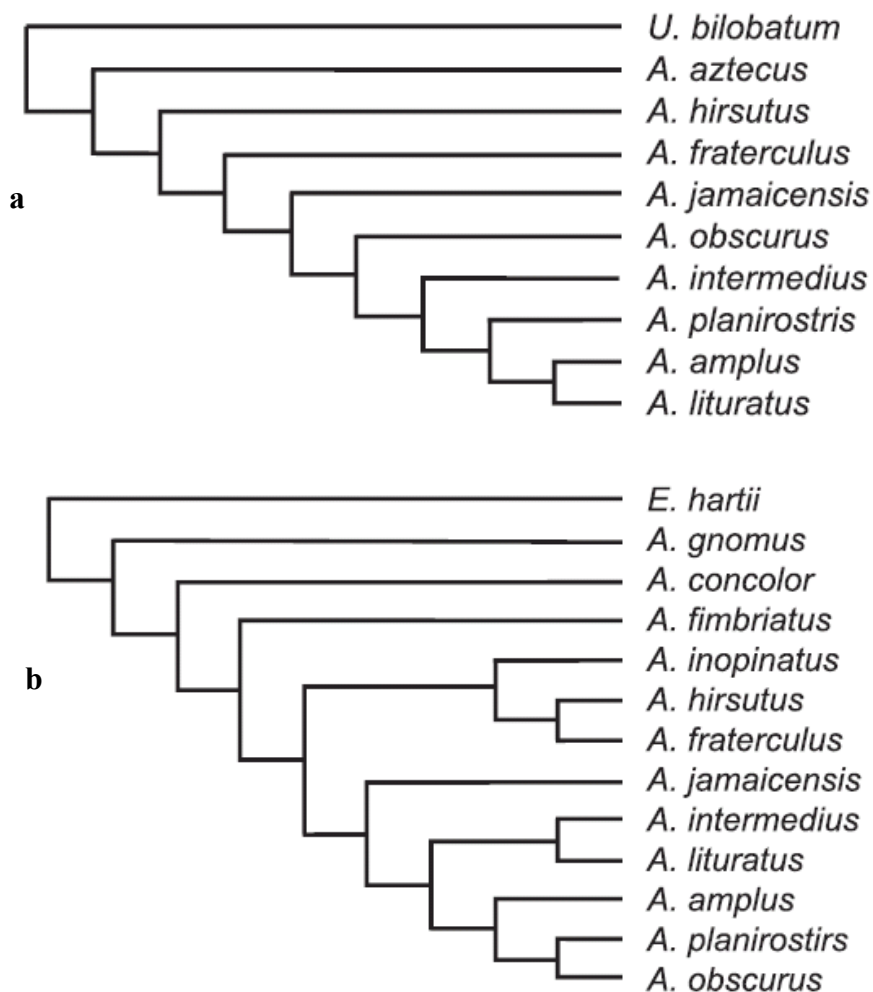


Figura 1 – Árvores filogenéticas construída por Guerrero *et al.* (2003) com base em características morfométricas (a) e por Lim *et al.* (2004) através de gene mitocondrial (b).

Divergências quanto à identificação de *A. jamaicensis* e *A. planirostris*, e de outras espécies do gênero *Artibeus*, estão intimamente associadas à dificuldade de diferenciá-las tanto entre si quanto de suas respectivas espécies simpátricas (grandes *Artibeus*), incluindo *A. amplus*, *A. obscurus* e, em menor grau, *A. lituratus*. Isto decorre da extensa similaridade observada em suas características morfológicas, cranianas e externas, freqüentemente impossibilitando a correta identificação das espécies, particularmente daquelas que exibem variação geográfica ao longo de sua área de distribuição (Lim *et al.*, 2004).

Embora dificuldades relacionadas com a taxonomia dos grandes *Artibeus* ainda gerem controvérsias, particularmente em relação à sistemática de *A. jamaicensis* e *A. planirostris*, atualmente a maioria dos autores (Bárquez *et al.*, 1991; Redford e Eisenberg, 1992; Bárquez *et al.*, 1993; Lim e Wilson, 1993; Lim, 1997; van Den Bussche *et al.*, 1998; Guerrero *et al.*, 2003; Lim *et al.*, 2003, 2004) considera estes organismos separados em diferentes taxa, compreendendo, portanto espécies distintas (Hollis, 2005).

2.3 Aspectos Evolutivos e Citogenéticos da Família Phyllostomidae

A evolução cromossômica de algumas famílias da ordem Chiroptera (Phyllostomidae, Noctilionidae, Mormopidae, Vespertilionidae e Mystacinidae) não ocorreu de forma linear. Contrariamente, as alterações cromossômicas apresentaram diferenças tanto na extensão quanto na velocidade dos eventos evolutivos. Desse modo, os morcegos foram classificados entre os que apresentaram conservacionismo e os que sofreram megaevolução cariotípica. Neste caso, espécies estreitamente relacionadas podem exibir extensos rearranjos cromossômicos, não sendo sequer possível determinar a presença de homeologias através do bandeamento-G (Baker e Bickham, 1980). De acordo com Varella-Garcia *et al.* (1989), esta não-uniformidade na evolução cromossômica é uma característica da ordem Chiroptera.

A compreensão das homeologias, bem como das alterações envolvidas nas divergências cariotípicas são fundamentais para a determinação do cariótipo primitivo e, conseqüentemente, estabelecer sua condição derivada. Embora a evolução cromossômica da família Phyllostomidae seja um assunto ainda muito discutido, Baker e Bickham (1980) sugeriram que $2n=42$ e $NF=60$ seria a condição primitiva para este grupo, com base em análise cladística realizada nesta e em família relacionadas

(Noctilionidae, Mormoopidae e Vespertilionidae) através dos bandeamentos C e G (Tabela 2). Subseqüentes interpretações dos mecanismos de diferenciação cariotípica, de Phyllostomidae, têm sido baseadas na premissa de que todos os cariótipos evoluíram desta condição, com ocorrência de redução dos números diplóides através de eventos de fusão cêntrica (Patton e Baker, 1979).

As translocações são consideradas como um dos fenômenos mais atuantes na evolução cromossômica dos mamíferos, especialmente as Robertsonianas³, que podem ser responsáveis pela formação de cromossomos meta-submetacêntricos e subtelocêntricos, a partir de dois elementos acrocêntricos. Quando uma fusão ocorre entre um autossomo e os cromossomos sexuais há redução tanto do número diplóide quanto do número fundamental. Caso o evento aconteça entre o X, mas não envolva o Y, resultará na diferença do número diplóide da fêmea em relação ao seu respectivo macho, embora permaneça o mesmo NF (Baker e Bickham, 1980).

A atuação das translocações Robertsonianas pode ser observada em toda a ordem Chiroptera, em particular na família Phyllostomidae, que de fato compreende a família mais intensamente estudada sob o enfoque citogenético. Diferentes análises citogenéticas têm mostrado que a família Phyllostomidae apresenta grande variação cariotípica: números diplóides ($2n$) que vão de $2n=14$ em *Vampyressa melissa* (Stenodermatinae) a $2n=46$ em *Macrotus waterhousii* (Macrotinae) e número de braços autossômicos (número fundamental = NF) variando de 20 (*Tonatia bidens*) a 68 (*Micronycteris megalotis*) (Baker, 1979).

³Fusão de dois cromossomos acrocêntricos.

Tabela 2 – Análise convencional referente à família Phyllostomidae.

Subfamílias						
Espécies		2n	NF	X	Y	Y ₂
Lonchorhininae	<i>Lonchotrira aurita</i>	32	60	M	A	n/o
Macrotinae	<i>Macrotus californicus</i>	40	60	SM	SM	n/o
	<i>M. waterhousii</i>	46	60	SM/M	A	n/o
Micronycterinae	<i>Micronycteris brachyotis</i>	32	60	SM	-	n/o
	<i>M. daeviesi</i>	28	52	ST	A	n/o
	<i>M. hirsuta</i>	28/30	32	A	A	n/o
	<i>M. megalotis</i>	40	68	ST/SM	A	n/o
	<i>M. minuta</i>	28	50/52	ST/SM	A/-	n/o
	<i>M. nicefori</i>	28	52	SM/M	A/-	n/o
	<i>M. schmidtorum</i>	38	66	ST/SM	A	n/o
	<i>M. sylvestris</i>	22	40	-	-	n/o
Phyllostominae	<i>Chrotopterus auritus</i>	28	52	SM	A	n/o
	<i>Macrophyllum macrophyllum</i>	32	56	SM	-	-
	<i>Mimon bennettii</i>	30	56	SM	A	n/o
	<i>M. crenulatum</i>	32	60	SM/M	A/M	n/o
	<i>M. koepckeae</i>	32	60	SM	A	n/o
	<i>Phylloiderma stenops</i>	32	58	M	A	n/o
	<i>Phyllostomus discolor</i>	32	60	SM/M	A	n/o
	<i>P. elongatus</i>	32	58	SM	A	n/o
	<i>P. hastatus</i>	32	58	SM/M	A	n/o
	<i>P. latifolius</i>	32	58	SM	A	n/o
	<i>P. stenops</i>	32	58	-	-	n/o
	<i>Tonatia bidens</i>	16	20	M	A	n/o
	<i>T. brasiliense</i>	30	56	ST	A/-	n/o
	<i>T. carrikeri</i>	26	46	-	-	n/o
	<i>T. minuta</i>	30	56	SM	A	n/o
	<i>T. schulzi</i>	28	36	A	A	n/o
	<i>T. silvicola</i>	34	60	SM	A	n/o
	<i>T. venezuelae</i>	30	56	-	-	n/o
	<i>Trachops cirrhosus</i>	30	56	ST	A	n/o
	<i>Vampyrus spectrum</i>	30	56	SM	A	n/o
Glossophaginae	<i>Anoura caudifer</i>	30	56	SM	A	n/o
	<i>A. cultrata</i>	30	54	SM	A	n/o
	<i>A. geoffroyi</i>	30	56	SM	A	n/o
	<i>Choeroniscus godmani</i>	19/20	32/36	SM	ST/A	A
	<i>C. intermedius</i>	20	36	SM	A	n/o
	<i>C. mexicana</i>	24-26	SM	SM	-	n/o
	<i>Brachyphylla cavernarum</i>	32	60	SM	A	n/o
	<i>B. nana</i>	32	60	SM	A	n/o
	<i>B. pumila</i>	32	60	SM	A	n/o
	<i>Erophylla sezekorni</i>	32	60	SM	A	n/o
	<i>Glossophaga alticola</i>	32	60	M	A	n/o
	<i>Glossophaga commissarisi</i>	32	60	M	A	n/o
	<i>G. longirostris</i>	32	60	M	A	n/o
	<i>G. soricina</i>	32	60	M/SM	A	n/o
	<i>Hylonycteris underwoodi</i>	16	24	-	-	n/o
	<i>Leptonycteris sanborni</i>	32	60	M	A	n/o
	<i>L. nivalis</i>	32	60	-	-	n/o
	<i>Lichonycteris obscura</i>	24/28	44/50	SM	A	n/o
	<i>Monophyllus pletodon</i>	32	60	SM	A	n/o
	<i>M. redmani</i>	32	60	SM	A	n/o
	<i>Phyllonycteris aphylla</i>	32	60	SM	A	n/o
	<i>P. obtusa</i>	32	60	SM	A	n/o
Lonchophyllinae	<i>Lionycteris spurreli</i>	28	50	SM	A	n/o
	<i>Lonchophylla robusta</i>	28	50	SM	A	n/o
	<i>L. thomasi</i>	30/32	34/38	ST/SM	A	n/o
Carolliinae	<i>Carollia brevicauda</i>	20-21	36	ST	A	A
	<i>C. castanea</i>	20-21/22	36/38	SM/ST	A	A/-

Carolliinae	<i>C. perspicillata</i>	20-21/21/20	36	ST/SM	A	A
	<i>C. subrufa</i>	20-21	36	ST	ST	A
Rhinophyllinae	<i>Rhinophylla fischeriae</i>	34	56	SM	A	n/o
	<i>R. pumilio</i>	34/36	62/64	M/SM	A/SM	n/o
Stenodermatinae	<i>Ametrida centurio</i>	30-31	-	ST	SM	M/ST
	<i>Ardops nichollsi</i>	30-31	56	SM	ST	A
	<i>Ariteus flavescens</i>	30-31	56	ST	ST	A
	<i>Artibeus aztecus</i>	30-31	56	ST	A	A
	<i>A. cinereus</i>	30-31/30	56	ST	SM/M	M/-
	<i>A. concolor</i>	30/31	56	ST	SM/A	M/A
	<i>A. obscurus</i>	30-31	56	ST	A	A
	<i>A. fimbriatus</i>	30-31	56	-	-	-
	<i>A. glaucus</i>	30-31	56	ST	A	A
	<i>A. hirsutus</i>	30-31	56	ST	ST	A
	<i>A. inopinatus</i>	30-31	56	ST	ST	A
	<i>A. jamaicensis</i>	30-31/30	56	ST	A/-	A
	<i>A. lituratus</i>	30-31	56	SM/ST	A/ST	A/SM
	<i>A. phaeotis</i>	30	56	ST	SM	n/o
	<i>A. planirostris</i>	30-31	56	ST	A	A
	<i>A. toltecus</i>	30-31	56	ST	A	A
	<i>A. watsoni</i>	30	56	ST	SM	n/o
	<i>Centurio senex</i>	28	52	ST	SM	n/o
	<i>Chiroderma improvisum</i>	26	48	ST	ST	n/o
	<i>C. salvini</i>	26	48	ST/SM	SM	n/o
	<i>C. trinitatum</i>	26	48	ST	SM/ST	n/o
	<i>C. villosum</i>	26	48	ST/SM	SM	n/o
	<i>Ectophylla alba</i>	30	56	SM	A	n/o
	<i>Enchisthenes hartii</i>	30/30-31	56	ST	SM	-/A
	<i>Mesophylla macconnelli</i>	21/21-22	20	A	n/o	n/o
	<i>Phyllops haitiensis</i>	30-31/30	56	ST	ST	A/-
	<i>Platyrrhinus brachycephalus</i>	30	56	ST	SM	n/o
	<i>P. dorsalis</i>	30	56	ST	SM	n/o
	<i>P. helleri</i>	30	56	ST	SM	n/o
	<i>P. infuscus</i>	30	56	ST	A	n/o
	<i>P. lineatus</i>	30	56	ST	-	n/o
	<i>P. nigellus</i>	30	56	ST	A	n/o
	<i>P. recifinus</i>	30	56	ST	-	n/o
	<i>P. vittatus</i>	30	56	ST	A	n/o
	<i>Pygoderma bilobatum</i>	30-31	56	M	SM	SM
	<i>Sphaeonycteris toxophyllum</i>	28	52	ST	SM	n/o
	<i>Stenoderma rufum</i>	30-31	56	ST	A	A
	<i>Sturnira bidens</i>	30	56	ST	A	n/o
	<i>S. erythromos</i>	30	56	ST	A	n/o
	<i>S. lilium</i>	30	56	ST	SM	n/o
	<i>S. ludovici</i>	30	56	ST	SM/A	n/o
	<i>S. magna</i>	30	56	ST	A	n/o
	<i>S. mordax</i>	30	56	-	-	n/o
	<i>S. nana</i>	30	56	ST	A	n/o
	<i>S. thomasi</i>	30	56	-	-	n/o
	<i>S. tildae</i>	30	-	ST	SM	n/o
	<i>Uroderma bilobatum</i>	38 a 49	48/50	ST/SM	SM/M	n/o
	<i>Uroderma magnirostrum</i>	35/36	60-62	SM/SM	SM/M	n/o
	<i>Uroderma bilobatum</i>	38-44	44-50	ST/SM	SM/M	n/o
	<i>Uroderma magnirostrum</i>	35-36	60-62	SM/SM	SM/M	n/o
	<i>Vampyressa melissa</i>	14	24	ST	-	n/o
	<i>V. nymphaea</i>	26	48	ST	SM/A	n/o
	<i>V. pusilla</i>	18/23/22-23/23-24	20/22	ST/A	SM/ST	n/o
	<i>Vampyriscus bidens</i>	26	48	-	-	n/o
	<i>V. brocki</i>	24	44	ST	-	n/o
	<i>Vampyrodes caraccioli</i>	30	46	ST	SM	n/o
Desmodontinae	<i>Desmodus rotundus</i>	28	52	SM	A/ST	n/o
	<i>Diaemus youngii</i>	32	60	SM	A	n/o
	<i>Diphylla ecaudata</i>	28/32	52/60	SM	A	n/o

M= Metacêntrico; SM= Submetacêntrico; ST= Subtelocêntrico; A= Acrocêntrico

- = dado não disponível ou não reportado na literatura; n/o= não observado

Referências: Baker (1979), Varella-Garcia *et al.* (1989), Santos e Souza (1998), Volleth *et al.* (1999); Noronha, (2000), Rodrigues *et al.* (2000), Santos *et al.* (2001), Santos *et al.* (2002), Baker *et al.* (2003), Pieczarka *et al.* (2005), Silva *et al.* (2005), Faria e Morielle-Versute (2006)

Stenodermatinae compreende a maior subfamília de Phyllostomidae, estando representada por 62 espécies, cujas análises cariotípicas abrangem divergentes números diplóides e fundamentais de $2n=14$ (*Vampyressa melissa*) a $2n=44$ (*Uroderma bilobatum*) e de $NF=20$ (*V. pusilla*) a $NF=62$ (*U. magnirostrum*), respectivamente. Embora essa subfamília seja caracterizada por extensa conservação cariotípica, na maioria das espécies, como é o caso dos gêneros *Artibeus*, *Sturnira* e *Platyrrhinus*, que apresentam cariótipos altamente conservados, também são encontrados grupos que englobam espécies portadoras de inúmeros rearranjos cromossômicos, como os gêneros *Uroderma* e *Vampyressa*, que exibem variação inter e intraespecífica (Baker, 1979; Varella-Garcia *et al.*, 1989; Silva *et al.*, 2005).

2.3.1 Mecanismos Cromossômicos de Determinação Sexual

De acordo com a teoria clássica, os cromossomos sexuais heteromórficos evoluíram a partir de um par de autossomos homomórficos, cuja diferenciação cromossômica envolveu tanto a supressão de crossing-over dos cromossomos ancestrais quanto a subsequente degeneração do cromossomo Y nos indivíduos heterogaméticos. Estes eventos, portanto, estão envolvidos na origem do sistema simples de determinação cromossômica do sexo (XX;XY), que é o mais recorrente em mamíferos, sendo também o mais freqüente em morcegos (Sumner, 2003).

Em geral, translocações entre autossomos e cromossomos sexuais (X e Y) ocorrem apenas em casos esporádicos na classe Mammalia, principalmente quando ocorre em uma única família. Estes rearranjos, entretanto, foram descritos em 61 espécies de Phyllostomidae: 23 com sistema sexual múltiplo (XX; XY₁Y₂) e 28 com sistema sexual Neo-XY. Os representantes da subfamília Stenodermatinae possuem o maior número de espécies que sofreram tais rearranjos, havendo aqueles que exibem

sistema sexual múltiplo (18), nos gêneros *Ametrida*, *Ardops*, *Artibeus*, *Enchistenes*, *Phyllops* e *Stenoderma*, e os que apresentam o sistema sexual Neo-XY (25 espécies), nos gêneros *Sturnira*, *Platyrrhinus*, *Chiroderma*, *Uroderma*, *Vampyressa* e *Artibeus*. A ocorrência do sistema sexual do tipo X0, extremamente raro em mamíferos, foi descrita em machos de *Mesophylla macconnelli* (Stenodermatinae), nos quais foram observados números diplóides de $2n=22$ nas fêmeas a 21 nos machos. (Baker, 1979; Tucker, 1986; Varella-Garcia *et al.*, 1989; Souza e Araújo, 1990; Santos e Souza, 1998b; Noronha, 2000).

Embora o gênero *Artibeus* seja caracterizado por exibir extenso conservacionismo cariotípico, foi descrita a presença dos sistemas sexuais múltiplo (*A. aztecus*, *A. glaucus*, *A. hirsutus*, *A. inopinatus*, *A. jamaicensis*, *A. lituratus*, *A. planirostris*, *A. obscurus* e *A. toltecus*) e Neo-XY (*A. phaeotis* e *A. watsoni*) em seus representantes. Além disso, *A. cinereus* exibiu dualismo quanto ao mecanismo de determinação sexual, visto que exemplares provenientes do Estado de Pernambuco e do Pará exibiram sistema sexual (Neo-XY), contrastando com os indivíduos analisados em Trinidad ($XX;XY_1Y_2$), correspondendo então a um exemplo de variação geográfica para esta espécie (Baker, 1979; Tucker, 1986; Souza e Araújo, 1990).

Segundo Tucker (1986) a origem do sistema múltiplo, bem como a presença dos cromossomos compostos do tipo neo-XY, na família Phyllostomidae, foi atribuída à fixação evolutiva de translocações ancestrais entre cromossomos sexuais e autossomos. A teoria baseia-se no pressuposto de que o X original, representado por um pequeno acrocêntrico, sofreu uma translocação com um autossomo na porção intersticial de seu braço longo (Xq). Esta conclusão foi proposta através de bandeamento com RBA (“replication bands”), onde se observou a presença de uma banda de replicação intermediária em relação ao braço curto e ao restante do X. Uma segunda translocação

teria ocorrido no braço curto do cromossomo X (Xp), envolvendo a fusão de um autossomo. Seu respectivo homólogo (Y₂) participaria, então, da formação do sistema de determinação sexual do tipo múltiplo, juntamente com o Y original (Y₁). No caso dos indivíduos neo-XY, um evento adicional teria atuado no surgimento desse sistema composto: o homólogo livre (Y₂) do autossomo translocado para o Xp se fusionaria ao Y original (Y₁), resultando em um elemento meta-submetacêntrico. As hipóteses de translocações descritas anteriormente pela autora foram confirmadas pela técnica de bandeamento C com Giemsa, dos cromossomos sexuais de espécies representativas das subfamílias Stenodermatinae (*Artibeus toltecus*, *Platyrrhinus lineatus* e *Chiroderma villosum*) e Phyllostominae (*Micronycteris hirsuta*).

Entre os citogeneticistas há consenso geral sobre a hipótese de Tucker (1986), que trata da participação de translocações envolvendo autossomos e cromossomos sexuais (Xp e Y) na formação do sistema sexual múltiplo; e do comportamento meiótico de X, Y₁ e Y₂ com formação de uma estrutura trivalente (Tucker e Bickham, 1986; Solari e Pigozzi, 1994; Noronha, 2000). Todavia, recentemente, foi questionada a condição considerada primitiva para o X na família Phyllostomidae proposta por Tucker (1986), com formulação de uma hipótese alternativa.

De acordo com Rodrigues *et al.*, (2003), alguns pontos utilizados como referência no trabalho de Tucker (1986) estão equivocados, dentre eles destacam-se:

1. A falta de uma explicação acerca do autossomo homólogo àquele que foi translocado para o cromossomo X original (acrocêntrico);
2. A utilização de um elemento acrocêntrico, representado pelo X em *Micronycteris hirsuta*, como referência a condição original do X para a subfamília Stenodermatinae;

3. O fato de que o gênero *Micronycteris* possui alta variação cariotípica, e que todas as espécies, com exceção de *M. hirsuta*, exibem o cromossomo X com dois braços.

Considerando os pontos citados, os autores verificaram que a morfologia acrocêntrica de X observada em *M. hirsuta* não poderia ser utilizada como uma condição ancestral, uma vez que esta característica está restrita a essa espécie como mencionado no estudo citogenético realizado por Baker (1979). Além disso, a alta variabilidade do gênero *Micronycteris* permite inferir sobre a possibilidade de autapomorfia⁴ do elemento X nessa espécie. Então, a rota alternativa proposta para a evolução do cromossomo X, que originalmente teria dois braços, envolveria inicialmente rearranjos, possivelmente uma fusão em *tandem* (centrômero – telômero), no autossomo homólogo ao Y₂, seguida de inativação do centrômero original (Figura 2). Isto explica, então, a presença da banda intersticial no Xq como sendo um material remanescente do centrômero inativado.

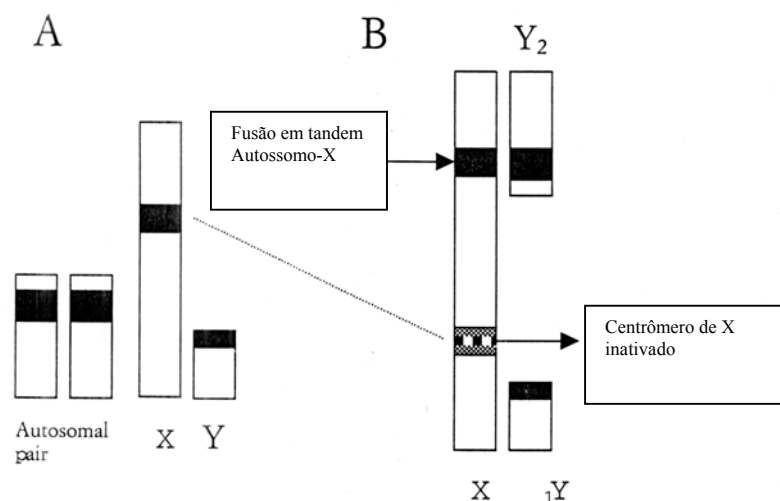


Figura 2 – Esquema hipotético da provável origem do cromossomo X na subfamília Stenodermatinae. Fonte: Rodrigues *et al.* (2003).

⁴Quando uma característica derivada está presente unicamente em um determinado grupo, distinguindo-o dos demais.

2.3.1.1 Comportamento Meiótico dos Sistemas Sexuais: Múltiplos e Neo-XY

Os cromossomos sexuais dos mamíferos exibem comportamento único durante a espermatogênese dos machos, quando a inativação do X (interrupção da síntese de mRNA) nos espermatócitos primários é generalizada na prófase meiótica. O processo é morfológicamente caracterizado pela condensação inicial da vesícula sexual (VS), que corresponde ao complexo ou bivalente formado pelo X e Y, responsável pelo correto pareamento dos alossomos na meiose. Uma espermatogênese normal é assegurada pelo controle assincrônico do X, ou seja, inativação dos genes ligados ao X e atividade gênica dos autossomos na meiose. Supõe-se que alterações genéticas, como translocações entre os autossomos e os pares sexuais, poderiam afetar diretamente os mecanismos de controle cromossômico, incapacitando-os, e causando esterilidade (Delobel *et al.*, 1998).

Dada a importância dessa estrutura, Noronha *et al.* (2001) realizaram um estudo comparativo em espécies da família Phyllostomidae (*Glossophaga soricina*, *Artibeus obscurus*, *A. lituratus*, *A. cinereus* e *Uroderma magnirostrum*) que apresentavam diferentes mecanismos sexuais. Eles verificaram que a VS de *Glossophaga soricina* (XX;XY), exibia comportamento assincrônico em relação aos bivalentes autossômicos. Estes exibiram pontos quiasmáticos característicos, indicadores de atividade gênica nesses cromossomos. Embora o bivalente sexual, nessa espécie, praticamente não tenha apresentado atividade gênica, existia uma pequena região de homologia denominada pseudoautossômica, onde ocorreu o pareamento “ponta a ponta” dos cromossomos heteromórficos. Logo a VS asseguraria a união de X e Y até sua disjunção na anáfase I.

Os bivalentes autossômicos de *A. lituratus* e de *A. obscurus* (XX;XY₁Y₂) exibiram pontos com quiasmas em toda a extensão dos cromossomos autossômicos,

indicando atividade gênica nessas regiões, exatamente como *G. soricina*, que possui sistema simples. Entretanto, a VS das espécies com sistema múltiplo ficou limitada aos segmentos autossômicos translocados. De modo que o trivalente sexual XY_1Y_2 apresentava duas regiões distintas de pareamento (Figura 3a-b): o pareamento do Xq com o Y original (Y_1), na região pseudoautossômica (ponta a ponta) de uma das extremidades; e o pareamento entre o segmento autossômico translocado para o X (Xp) e seu respectivo homólogo (Y_2), na outra extremidade (Solari e Pigozzi, 1994; Noronha *et al.*, 2001)

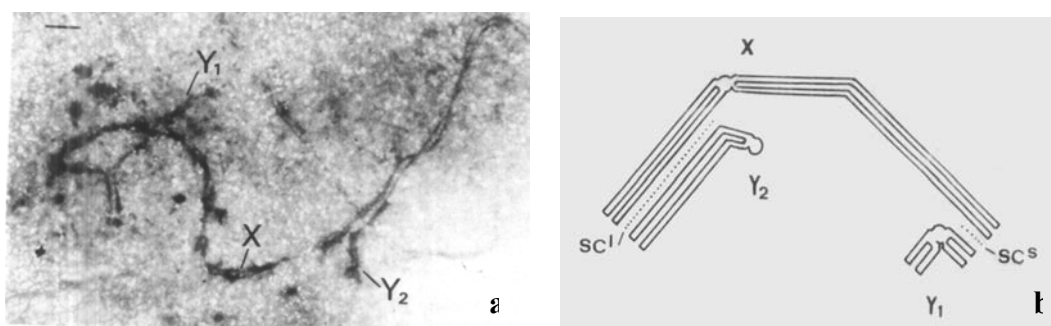


Figura 3 - (a) trivalente sexual XY_1Y_2 obtido através da coloração com E-PTA de células em paquíteno de *A. lituratus*; (b) esquema ilustrativo do complexo sexual. Fonte: Solari e Pigozzi, (1994).

A presença de um bloco heterocromático, separando o cromossomo sexual original do segmento autossômico, translocado para o X , foi descrita por Kasahara e Dutrillaux (1983) nos trivalentes sexuais de *Artibeus lituratus*. Esta característica peculiar é indispensável aos mamíferos submetidos a tais rearranjos, pois inibe a inativação do segmento autossômico, que é fundamental para a manutenção da segregação regular do trivalente na anáfase I, impedindo assim a formação de gametas aneuplóides. Além disso, a presença de dois quiasmas também assegura a correta segregação do trivalente, de modo que um pólo recebe o cromossomo X enquanto que para o outro vão os elementos Y_1 e Y_2 (Solari e Pigozzi, 1994; Noronha *et al.*, 2001).

Nos indivíduos com sistema neo-XY (*U. magnirostrum*), os segmentos originais de X e Y permaneceram pareados nas células meióticas (paquíteno), formando uma vesícula sexual característica. Assim como foi descrito para espécies com sistema múltiplo, observou-se a presença de um bloco de heterocromatina, possivelmente, atuando na separação do bivalente sexual em duas regiões distintas: segmentos autosômicos translocados e o par sexual original. A partir dessas observações, Noronha *et al.* (2001), sugerem a independência de ambas as regiões e, em adição, especulam a possível atuação do bloco de heterocromatina no bloqueio da inativação dos autossomos translocados, como visto para o sistema múltiplo.

2.4 Análise de Marcadores Cromossômicos em Morcegos: Técnicas de Bandeamento e FISH

O início da década de 70 representa o advento das técnicas de bandeamento cromossômico, em especial as bandas Q, G e R, que permitem a caracterização longitudinal dos cromossomos e a inferência de possíveis rearranjos em mamíferos (Sumner, 2003).

Dentre as técnicas citogenéticas atualmente empregadas para a análise dos morcegos, destaca-se o bandeamento G (Seabright, 1971), que promove a diferenciação longitudinal dos cromossomos, permitindo o correto pareamento dos homólogos; a técnica de bandeamento C (Sumner, 1972) e a coloração com nitrato de prata (Howell e Black, 1980), que marcam regiões de heterocromatina constitutiva (HC) e regiões organizadoras de nucléolos (RONs), respectivamente.

Dados da literatura, referente a morcegos, mostram que espécies estreitamente relacionadas freqüentemente apresentam padrões de bandas G bastante conservados. Contudo, certa diferenciação ocorre quanto aos padrões de banda C e RONs. Estes

marcadores cromossômicos, aliados aos estudos taxonômicos, têm auxiliado no melhor entendimento dos mecanismos evolutivos, responsáveis pelas divergências encontradas nos diferentes grupos da ordem Chiroptera. A elucidação de aspectos relacionados à filogenia dos vários taxa, por exemplo, tornou-se possível pelo avanço e melhoramento de tais marcadores citogenéticos (Varella-Garcia *et al.*, 1989; Souza e Araújo, 1990; Santos e Souza, 1998a, b; Rodrigues *et al.*, 2000; Neves *et al.*, 2001; Santos *et al.*, 2001; 2002; Leite-Silva *et al.*, 2003).

O tratamento com fluorocromos base-específicos, como cromomicina A₃ (CMA₃) e DAPI, tem sido utilizado na caracterização de diferentes classes da HC (rica em pares de bases GC e/ou AT, ou sem especificidade) e no estudo da composição da heterocromatina e das regiões espaçadoras associada às RONS (Santos e Souza, 1998 a, b; Santos *et al.*, 2001; Leite-Silva *et al.*, 2003).

Mais recentemente, novos enfoques citogenéticos têm sido desenvolvidos com a utilização de sondas específicas para localização de seqüências cromossômicas através da hibridização *in situ* fluorescente (FISH). Essa metodologia representa uma tecnologia direta, rápida, de alta resolução e bastante eficaz para a detecção e mapeamento de segmentos-alvo de DNA, por meio de uma sonda complementar a sítios específicos de DNA (Guerra, 2004).

2.4.1 Heterocromatina – Bandeamento C

A cromatina dos eucariotas basicamente é composta de duas estruturas distintas, denominadas: eucromatina e heterocromatina. O termo heterocromatina foi introduzido por Heitz (1928), para se referir ao material cromossômico que se mantinha intensamente condensado durante todo o ciclo celular. A eucromatina, por outro lado, representa regiões cromossômicas que sofrem alterações estruturais (condensação e

descondensação) no decorrer desse ciclo (Sumner, 1990). Existem dois tipos principais de heterocromatina: facultativa e constitutiva, que exibem algumas diferenças de acordo com seu conteúdo de DNA, particularmente pela riqueza de DNA satélite⁵. Este material genético irá determinar a natureza (estável ou reversível), o grau de polimorfismo e as propriedades de coloração da heterocromatina, quando submetida ao bandeamento C com Giemsa (corando positivamente ou negativamente) (Multani *et al.*, 2001; Mattei e Luciani, 2003).

A heterocromatina constitutiva (HC) difere substancialmente da eucromatina pela composição de bases de seu DNA. É caracterizada pela presença de grande parte do DNA satélite, apresenta replicação tardia em relação à eucromatina (geralmente no final da fase S do ciclo celular) e exibe baixa ou nenhuma atividade transcripcional. Esta condição está associada, em parte, ao estado constantemente condensado deste tipo de cromatina que atua no bloqueio da transcrição (Guerra, 1988; Sumner, 2003).

O bandeamento C com Giemsa (CBG) é o procedimento mais importante para evidenciar a heterocromatina constitutiva nos cariótipos e núcleos de diferentes organismos eucariotas. Nesta técnica o pré-tratamento (HCL 0,2N; Ba (OH)₂; 2 x SSC) modifica a estrutura do cromossomo, resultando na extração preferencial de proteínas e de DNA das regiões eucromáticas, fornecendo assim um padrão característico de bandas. Provavelmente, este mecanismo está associado a peculiaridades inerentes a HC, sobretudo às proteínas não-histônicas, que formam um complexo que dificulta a retirada de DNA heterocromático. Apesar da eficiência em evidenciar regiões heterocromáticas, o bandeamento C não revela todos os tipos de HC ou, ainda, estas podem se apresentar fracamente ou não totalmente coradas (Sumner, 2003).

A ocorrência preferencial da heterocromatina constitutiva é descrita em determinadas regiões dos cromossomos, em particular nos centrômeros ou nas suas

proximidades (pericentromérica ou paracentromérica), formando blocos de tamanho variável de acordo com o grupo analisado. Segmentos heterocromáticos também foram descritos nas regiões teloméricas e, em menor número, intersticiais de algumas espécies (Sumner, 2003).

A ordem Chiroptera é caracterizada por apresentar conteúdo reduzido de HC em relação ao genoma da maioria das espécies (van Den Bussche *et al.*, 1995). Além disso, blocos heterocromáticos situados, preferencialmente, nas regiões pericentroméricas de todos os cromossomos do complemento têm sido descritos como regra geral. Dentre os quirópteros há os que exibem um padrão de distribuição de HC restrito às proximidades do centrômero, como nos filostomídeos: *Phyllostomus hastatus*, *P. discolor*, *P. elongatus* (Varella-Garcia *et al.*, 1989; Santos e Souza, 1998b; Rodrigues *et al.*, 2000; Estevam, 2005), *Chrotopterus auritus* (Morielle-Versute *et al.*, 1992), *Anoura caudifer*, *Chiroderma villosum*, *C. doriae* (Varella-Garcia *et al.*, 1989), *Lonchorhina aurita* e *Trachops cirrhosus* (Barros, 2006), nos molossídeos *Molossus molossus* e *M. ater* (Leite-Silva *et al.*, 2003) e nos vespertilionídeos: *Pipistrellus pipistrellus*, *P. kuhlii*, *P. nathusii*, *Glischropus tylopus* e *Lasiurus borealis* (Volleth *et al.*, 2001).

Contudo, a presença de heterocromatina também tem sido verificada nas regiões intersticiais e/ou teloméricas de algumas espécies, a exemplo de *Carollia perspicillata*, *Choeroniscus minor*, *Artibeus lituratus*, *A. planirostris*, *A. jamaicensis*, *A. cinereus*, *Diaemus youngi*, *Desmodus rotundus*, *Diphylla ecaudata*, *Anoura caudifer*, *Glossophaga soricina*, *Molossops planirostris*, *Sturnira lillium* e *Platyrrhinus lineatus*. (Souza e Araújo, 1990; Santos e Souza, 1998a; Volleth *et al.*, 1999; Neves *et al.*, 2001; Santos *et al.*, 2001; Leite-Silva *et al.*, 2003). Embora tenham sido descritas diferenças na quantidade e localização dos sítios heterocromáticos, tais alterações não

desempenham papel significativo de variação cromossômica em morcegos (van Den Bussche *et al.*, 1995).

Vários padrões de distribuição de HC foram descritos no cariótipo de *Choeroniscus minor* (Glossophaginae): blocos centroméricos nos pares 1 e 9 e no cromossomo X; na região distal do braço longo do par 1, em que os homólogos apresentaram alternativamente uma banda única ou duas bandas menores, separadas por um pequeno segmento eucromático (heteromorfismo). Por esse padrão, Neves *et al.* (2001) hipotetizaram a presença de uma inversão paracêntrica, que não pôde ser detectada através do bandeamento G, no braço curto de seis pares subtelocêntricos (2, 4-8): o par 2 apresentou uma variação na extensão de seu braço, consequência da diferença na quantidade de HC; o par 3 também exibiu heteromorfismo na localização do bloco de HC no braço longo dos homólogos (pericentromérica e proximal), indicando que esta diferença foi resultado de uma pequena inversão paracêntrica.

A análise citogenética comparativa entre *Uroderma magnirostrum* e *U. bilobatum* (Stenodermatinae), cujos complementos cromossômicos correspondem a $2n=36$ e $2n=42$, respectivamente, foram submetidos ao bandeamento C e revelaram HC localizada na região pericentromérica de todos os autossomos e na porção distal do braço curto dos pares submetacêntricos (5-14), além de um bloco distal no braço longo do par 6 em *U. magnirostrum*. A espécie *U. bilobatum*, por sua vez, apresentou HC pericentromérica em todos os autossomos e na região distal do braço curto de dois pares submetacêntricos (1 e 2). As duas espécies mostraram similaridades na distribuição da HC centromérica e terminal no braço curto do cromossomo X, além de apresentarem um bloco heterocromático no braço longo do Y. Entretanto, *U. magnirostrum* exibiu heteromorfismo no par 5, evidenciado pelo bandeamento C, que permitiu não só

estabelecer diferenças entre os homólogos como também possibilitou inferir sobre a origem do evento observado (Silva *et al.*, 2005).

A análise de HC em espécies do gênero *Artibeus* tem sido de grande valia na diferenciação de espécies que são morfologicamente idênticas. De acordo com Souza e Araújo (1990), e Santos e Souza (1998a) a localização da HC está presente nas regiões pericentroméricas de todos os cromossomos, e nos telômeros (braço curto) dos subtelocêntricos 5, 6, 7, 9 e X das espécies *A. cinereus*, *A. lituratus* e *A. jamaicensis*. Esta, adicionalmente, mostrou blocos intersticiais nos braços longos dos cromossomos 1, 2, 3, e blocos teloméricos nos braços curtos do par 13. Em todas as espécies analisadas verificou-se a coloração diferencial da eucromatina do X, quando comparada com a do complemento cromossômico. Os acrocêntricos Y_1 e Y_2 mostraram-se quase inteiramente heterocromáticos, principalmente o Y original.

Em indivíduos que possuem sistema sexual simples, o cromossomo Y geralmente se apresenta quase que totalmente heterocromático. Do mesmo modo, aqueles que têm sistema sexual múltiplo exibem o Y_1 (Y original) heterocromático, entretanto diferem pela presença de bandas características do Y_2 (homólogo livre do autossomo translocado ao Xp). Por outro lado há, ainda, os que apresentam o sistema sexual composto do tipo neo-XY, que se destacam pela presença simultânea de dois padrões distintos de HC nos braços curtos e longos do Y metacêntrico. Nos representantes da subfamília Stenodermatinae (Phyllostomidae), em geral, o braço longo do cromossomo X mostra um padrão diferencial do restante da cromatina quando submetido ao bandeamento C (Souza e Araújo, 1990; Morielle-Versute *et al.*, 1992; Santos e Souza, 1998 a, b; Rodrigues *et al.*, 2000; Santos *et al.*, 2001).

2.4.2 Regiões Organizadoras de Nucléolos – RONS

Nos eucariotas, os genes de DNA ribossômico (DNAr) estão organizados em duas famílias gênicas diferentes: a principal codifica o DNAr 45S (18S, 5.8S e 28S), e outra que codifica o DNAr 5S. Os genes principais do DNAr estão ligados a sítios cromossômicos específicos nos pares homólogos, conhecidos como regiões organizadoras de nucléolos (RONS) que estão envolvidas com a transcrição do RNA ribossômico. Os genes do DNAr 5s tendem a se inserir em apenas um dos pares cromossômicos. Ambas as famílias de DNAr estão presentes em numerosas cópias de unidades repetitivas (Pendás *et al.*, 1993; Martínez *et al.*, 1996; Suzuki *et al.*, 1996; Mäkinen *et al.*, 1997; Martins e Galetti, 1998; Sumner, 2003).

As regiões organizadoras de nucléolos são ferramentas úteis para o estudo da organização estrutural e funcional dos cromossomos, sendo consideradas importantes no entendimento dos mecanismos evolutivos. O tratamento do material citológico com nitrato de prata (AgNO₃) é o método citogenético mais comumente utilizado para detectar a posição das RONS (Ag-RON). Esta técnica exhibe alta seletividade ao evidenciar as RONS presentes na interfase nuclear, nos cromossomos meióticos e mitóticos. Entretanto, há uma limitação inerente a essa técnica, visto que apenas as RONS que se encontravam transcripcionalmente ativas na interfase anterior são impregnadas com o corante, devido à reação do nitrato de prata com as proteínas ácidas (ribonucleoproteínas) residuais associadas ao DNAr. Dessa forma, o uso da Ag-RON é mais eficaz no estudo da expressão e não na localização dos genes ribossomais (Pendás *et al.*, 1993; Sumner, 2003).

A relação entre as RONS e as constrições secundárias tem sido relatada a em alguns grupos de animais, particularmente em indivíduos da família Vespertilionidae

(Morielle e Varella-Garcia, 1988; Santos e Souza, 1998a; Santos *et al.*, 2002; Sumner, 2003).

A condição considerada ancestral para os filostomídeos é a incidência de RONS em um único par de autossomos. Esta hipótese baseia-se na presença dessa característica em indivíduos da subfamília Macrotinae, considerada a mais primitiva, e nos noctilionídeos, que compreendem um grupo externo, estritamente relacionado a esta família. Desse modo, Morielle-Versute e Varella-Garcia (1988) sugeriram que a presença de RONS múltiplas descritas em algumas espécies da subfamília Stenodermatinae, particularmente dos gêneros *Chiroderma* e *Artibeus*, cuja característica mais freqüente é a presença de RONS em três pares autossômicos, tenham origem na fragmentação e amplificação das seqüências de rDNA. A análise de indivíduos da ordem Chiroptera com a técnica Ag-RON permitiu concluir que esses organismos apresentam uma das maiores variabilidades em relação ao número de RONS entre os mamíferos, especialmente quando se considera a espécie *Myotis myotis* (Vespertilionidae) que exibe RONS em 14 pares autossômicos (Morielle e Varella-Garcia, 1988; Souza e Araújo, 1990; Santos e Souza, 1998b; Santos *et al.*, 2002; Barros, 2006).

Dois padrões de distribuição das RONS foram distinguidos no gênero *Artibeus* através de Ag-RON: (1) nas regiões distais dos braços curtos dos pares 5, 6 e 7, em *A. lituratus*, *A. jamaicensis* e *A. fimbriatus*, e (2) na região intersticial dos braços longos dos pares 10 e 13 em *A. cinereus*. Um sítio adicional foi observado na região intersticial do braço longo do par 5 de *A. fimbriatus* (Santos *et al.*, 2002). Considerando a atividade dessas estruturas no gênero *Artibeus*, tem sido observada uma variabilidade intraindividual e interespecífica nas espécies *A. lituratus* e *A. jamaicensis*, com média

de 4 a 5 cromossomos marcados (Morielle e Varella-Garcia, 1988; Souza e Araújo, 1990;

Apesar de ser considerada uma condição incomum, a presença de RONS em cromossomos sexuais foi observada em alguns mamíferos, incluindo duas espécies da ordem Chiroptera, *Carollia perspicillata* e *C. castanea*, que apresentam RONS nos cromossomos sexuais: X (*Carollia perspicillata* e *C. castanea*) e Y (*C. castanea*). Uma particularidade é encontrada nos machos de *C. perspicillata* que apresentam possivelmente uma redução de 50% nas seqüências de rDNA (Morielle e Varella-Garcia, 1988; Santos e Souza, 1998a).

Estudos realizados em espécies da família Phyllostomidae envolvendo a variabilidade do número de RONS ativas por célula, mostraram que as freqüências das marcações por metáfase diferiram significativamente entre indivíduos e espécies com RONS múltiplas. Por outro lado, espécies que possuíam apenas um único par de RONS por célula, não foi observada nenhuma variabilidade. As diferenças observadas na localização e número das RONS indicam que estas são “hotspots”, freqüentemente envolvidos em rearranjos cromossômicos que podem ser utilizados como instrumento para a avaliação de relações filogenéticas (Souza e Araújo, 1990; Santos *et al.*, 2002).

2.4.3 Fluorocromos – Eucromatina, HC e RONS

O emprego de uma ampla variedade de fluorocromos tem sido utilizado para produzir padrões fluorescentes característicos, de acordo com sua afinidade aos pares de base AT ou GC do DNA, em vários organismos. Em alguns casos esses corantes são associados a outros marcadores que podem ser ou não fluorescentes (contracorantes) para obtenção de resultados diferenciados. Dependendo de sua especificidade, os corantes fluorescentes irão originar um padrão de bandas similar aos dos bandeamentos

Q ou R na eucromatina ou, ainda, reproduzir as bandas exibidas no bandeamento C após o pré-tratamento (Verma e Babu, 1995; Sumner, 1990).

Em morcegos, dados sobre o uso de fluorocromos base-específicos na análise cromossômica são escassos. Apenas três espécies da família Vespertilionidae (*Lasiurus intermedius*, *Scotophilus dinganii* e *S. viridis*), nove de Phyllostomidae (*Carollia perspicillata*, *Artibeus lituratus*, *A. jamaicensis*, *A. cinereus*, *Phyllostomus discolor*, *Trachops cirrhosus*, *Lonchorhina aurita*, *Desmodus rotundus* e *Diphylla ecaudata*) e três de Molossidae (*Molossus ater*, *M. molossus* e *Molossops planirostris*) foram estudadas com esse enfoque, permitindo uma melhor caracterização da heterocromatina constitutiva associada aos sítios de DNAr (Bickham, 1987; Ruedas *et al.*, 1990; Santos e Souza, 1998a,b; Santos *et al.*, 2001; Leite-Silva *et al.*, 2003; Silva *et al.*, 2005; Barros, 2006).

Metáfases mitóticas de *C. perspicillata*, *A. lituratus*, *A. jamaicensis*, *A. cinereus*, *P. discolor*, *D. rotundus* e *D. ecaudata* tratadas para o bandeamento C e coradas com DAPI (CB-DAPI) mostraram um padrão de blocos de heterocromatina similar ao bandeamento C com Giemsa (CBG). Através da coloração CB-CMA₃, em *A. lituratus* e *A. jamaicensis* foram evidenciados blocos teloméricos nos braços curtos de alguns cromossomos e no braço longo do Y₁, na espécie *P. discolor* apenas o padrão de bandas R foi visualizado (Santos e Souza, 1998a,b; Santos *et al.*, 2001).

Apesar do amplo emprego da coloração com AgNO₃ em vertebrados na identificação das RONS, o tratamento com fluorocromos GC específicos como a cromomicina A₃ (CMA₃) e a mitramicina (MM) têm sido utilizado para revelar RONS ativas ou inativas no complemento cromossômico. Estas estruturas estão comumente associadas a famílias de DNA ricas em pares de base GC, geralmente em regiões heterocromáticas (Salvadori *et al.*, 1995).

Nos representantes da família Phyllostomidae, as respostas diferenciais aos fluorocromos CMA₃ e DAPI têm sugerido uma heterogeneidade quanto a composição de bases das regiões intergênicas presentes nas RONS. A coloração sequencial AgNO₃/CMA₃ evidenciou regiões espaçadoras CMA₃ positivas em *Carollia perspicillata*, *Desmodus rotundus*, *Diphylla ecaudata*, *Lonchorhina aurita*, *Phyllostomus discolor*; e CMA₃ neutras em *Trachops cirrhosus*. Adicionalmente, a tríplice coloração CMA₃/DA/DAPI tem realçado padrões de bandas R (ricas em GC) com CMA₃ e tem revelado uma coloração uniforme ao longo dos cromossomos ou um fraco padrão de bandas G (ricas em AT com DAPI) (Santos e Souza, 1998 a,b; Santos *et al.*, 2001; Barros, 2006).

2.4.4 FISH – Sondas Teloméricas e Ribossomais

Os telômeros correspondem a envoltórios terminais de cromossomos, compostos por proteína e DNA. A estrutura básica e a função dos telômeros têm sido conservadas ao longo da evolução, reflexo de seu importante papel na estabilidade dos cromossomos por impedir possíveis fusões e degradações. A análise de FISH com sonda telomérica (TTAGGG)_n realizada em diversas espécies de vertebrados, comprovou a conservação dessa sequência nesse grupo. Sua presença tem sido detectada não apenas nos telômeros, mas também em regiões cromossômicas pericentroméricas e intersticiais, denominadas como sítios teloméricos intersticiais (ITS). Na maioria dos casos, os ITS coincidem com regiões de heterocromatina constitutiva. (Meyne *et al.*, 1990; Ono e Yoshida, 1997; Finato *et al.*, 2000; McEachern *et al.*, 2000; Pagnozzi *et al.*, 2000; Guerra, 2004).

A variabilidade na distribuição e quantidade da sequência telomérica (TTAGGG)_n foi descrita por Meyne *et al.*, (1990) através de FISH em diversos grupos de vertebrados, incluindo a ordem Chiroptera. Foram observados padrões unicamente teloméricos nas espécies *Macrotus waterhousii*, *M. californicus*, *Monophyllus redmani*, *Molossus molossus* e *Pteronotus macleayii*. Adicionalmente, foram evidenciadas ITS na região centromérica de *Artibeus jamaicensis*, *Carollia perspicillata*, *Eumopus glaucinus* e *E. perotis* em algumas espécies do gênero *Chiroderma* (Meyne *et al.*, 1990; Finato *et al.*, 2000).

A presença de sítios não teloméricos tem considerável importância visto sua relação com processos evolutivos resultantes de rearranjos cromossômicos, tais como inversões e fusões cêntricas. Deste modo análise da localização de ITS corresponde a um modelo elucidativo da evolução cariotípica dos vertebrados (Meyne *et al.*, 1990; Guerra, 2004). Em contrapartida o aparecimento de ITS pode estar relacionado ao fato dessas sequências serem um componente do DNA satélite de algumas espécies de mamíferos. Assim, os sítios detectados por FISH com sonda telomérica poderiam constituir uma característica polimórfica nas populações naturais, como observado em *Micoureus demerarae* (2n=14) (Pagnozzi *et al.*, 2000) e em *Eulemur macaco* (2n=44) (Garagna *et al.*, 1997).

Mais recentemente, têm sido utilizada a FISH com sonda de DNAr em alguns grupos, permitindo um maior entendimento quanto à variabilidade dos genes ribossomais. Como esse método não depende da presença de proteínas ácidas, pode ser empregado para localizar as sequências de DNAr no genoma, independente de sua atividade (Baker *et al.*, 1992; Guerra, 2004).

Apesar de existir uma correlação entre as RONS marcadas com o nitrato de prata e a FISH, foram observadas diferenças quando se compararam os resultados obtidos

através dessas duas técnicas em representantes de Rodentia, Suidae, Canidae e em várias espécies de peixes (Guerra, 2004).

A análise do número de sítios de DNAr em 50 espécies de morcegos, representadas por sete famílias e 38 gêneros, através da FISH com sonda ribossômica por Baker *et al.* (1992) revelou a presença de um número reduzido de sítios ribossomais, variando de um a quatro pares de cromossomos, e também constatou a pouca variação entre as espécies analisadas.

A localização de RONS em 15 espécies de morcegos através da Ag-RON e FISH foram descritas por Santos *et al.*, (2001; 2002), para verificar tanto a atividade das RONS quanto para detectar os sítios de genes de DNAr, respectivamente. As espécies analisadas eram representantes dos gêneros *Desmodus*, *Diphylla* (Desmodontinae), *Phyllostomus*, *Phylloderma*, *Trachops*, *Tonatia* (Phyllostominae), *Artibeus*, *Platyrrhinus*, *Sturnira*, (Stenodermatinae) e *Glossophaga* (Glossophaginae). Desses representantes, apenas o gênero *Artibeus* apresentou RONS múltiplas (*A. lituratus*, *A. jamaicensis*, *A. fimbriatus* e *A. cinereus*), estando localizadas nos braços curtos dos pares subtelocêntricos 5, 6 e 7, e adicionalmente no braço longo de um dos cromossomos 5 em *A. fimbriatus*. Em *A. cinereus*, as RONS estavam localizadas intersticialmente no braço longo dos pares 10 e 13. A utilização de FISH com sonda ribossômica confirmou o número e a posição das RONS em todas as espécies, exceto em *A. cinereus*, que apresentou sinais de hibridização nos pares 9, 10 e 13, indicando a ocorrência de RON silenciosa no par 9 nessa espécie, a primeira descrita em morcegos.

3. Referências Bibliográficas

- Altringham JD (1996) Bats, Biology and Behaviour. Oxford: Oxford University Press.
- Baker RJ (1979) Karyology. In: Baker RJ, Jones JK and Carter DC (eds.) Biology of the bats of the New World family Phyllostomatidae. Part III. Special Publications, Museum of Texas Tech. University, pp. 107-155.
- Baker RJ and Bickham JW (1980) Karyotypic evolution in bats: evidence of extensive and conservative chromosomal evolution in closely related taxa. Syst. Zool. 29: 239-253.
- Baker RJ, Maltbie M, Owen JG, Hamilton, MJ and Bradley RD (1992) Reduced number of ribosomal sites in bats: evidenced for a mechanism to contain genome size. J. Mammal. 73: 847-858.
- Baker RJ, Porter CA, Patton JC and van Den Bussche RA (2000) Systematics of bats of the family Phyllostomidae based on *RAG2* DNA sequences. Occasional Papers, Museum of Texas Tech. University 202: 1-16.
- Baker RJ, Hoofer SR, Porter CA and van Den Bussche RA (2003). Diversification among New World leaf-nosed bats: An evolutionary hypothesis and classification inferred from digenomic congruence of DNA sequence. Occasional papers 230: 1-32.
- Bárquez RM, Giannini NP and Mares MA (1993) Guide to the bats of Argentina. Oklahoma, Museum of Natural History, Norman.
- Bárquez RM, Mares MA, Ojeda RA and Giannini N (1991) Mammals of Tucuman (Mamíferos de Tucuman). Museum of Natural History Norman, Oklahoma.
- Barros HMDR (2006) Análise Cariotípica nos Morcegos *Lonchorhina aurita* e *Trachops cirrhosus* (Phyllostomidae) Usando Técnicas Citogenéticas Diferenciais e Moleculares. Dissertação de Mestrado, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco.
- Bianconi GV, Mikich SB and Pedro WA (2004) Diversidade de morcegos (Mammalia, Chiroptera) em remanescentes florestais do município de Fênix, noroeste do Paraná, Brasil. Rev. Brasil. Zool. 21 (4): 943-954.
- Bickham JW (1987) Chromosomal variation among seven species of lasiurine bats (Chiroptera: Vespertilionidae). J. Mammal. 68: 837-842.

- Delobel B, Djelati R, Gabriel-Robez O, Croquette MF, Rousseaux-Prevost R, Rousseaux J, Rigot JM and Rumples Y (1998) Y-autosome translocations and infertility: usefulness of molecular, cytogenetic and meiotic studies. *Human Genetics* 102: 98-102.
- Eisenberg JF and Redford KH (1999) *Mammals of the Neotropics. The Central Neotropics: Ecuador, Peru, Bolivia, Brazil*. Chicago, The University of Chicago Press, vol. 3, 609p.
- Estevam LH (2005) *Phyllostomus elongatus* e *Phyllostomus discolor* (Chiroptera: Phyllostomidae): um estudo citogenético-comparativo. Monografia apresentada ao curso de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco.
- Faria KC and Morielle-Versute E (2002) In situ hybridization of bat chromosomes with human (TTAGGG)_n probe, after previous digestion with Alu I. *Genet. Mol. Biol.* 25(4): 365-371.
- Faria KC and Morielle-Versute E (2006) Genetic relationships between Brazilian species of Molossidae and Phyllostomidae (Chiroptera, Mammalia). *Genetica* 126:215–225.
- Finato AO, Varella-Garcia M, Tajara EH, Taddei VA and Morielle-Versute E (2000) Intrachromosomal distribution of telomeric repeats in *Eumops glaucinus* and *Eumops perotis* (Molossidae, Chiroptera). *Chromosome Res.* 8: 563-569.
- Garagna S, Ronchetti E, Mascheretti S, Crovella S, Formenti D, Rumpher YS and Romanini MGM (1997). Non-telomeric chromosome localization of (TTAGGG)_n repeats in the genus *Eulemur*. *Chromosome Res* 5: 487-491.
- Guerra, M (1988) *Introdução à Citogenética geral*. Ed. Guanabara. Pp.140.
- Guerra, M (2004) *FISH – Conceitos e aplicações na citogenética*. Ed. SBG.
- Guerrero JA, De Luna E and Sánchez-Hernández C (2003) Morphometrics in the quantification of character state identity for the assessment of primary homology: an analysis of character variation of the genus *Artibeus* (Chiroptera: Phyllostomidae). *Biological J. Linnean Society* 80: 45-55.
- Guerrero JA, De Luna E and González D (2004) Taxonomic status of *Artibeus jamaicensis triomylus* inferred from molecular and morphometric data. *J. Mammalogy*, 85 (5):866–874.
- Jones KE (2002) Chiroptera. *Encyclopedia of Life Sciences*. Macmillan Publishers Ltd, pp. 1-5.

- Jones KE, Purvis A, MacLarnon A, Bininda-Emonds ORP and Simmons NB (2002) A phylogenetic supertree of the bats (Mammalia: Chiroptera). *Biological Review* 77:223-259.
- Handley Jr CO (1987) New species of mammals from northern south America: fruit-eating bats, genus *Artibeus* Leach. *Studies in Neotropical Mammalogy: Essays in Honor Philip Hershkovitz*. Fieldiana Zoology, n.s., Chicago, 1382 (39): 163-172.
- Handley Jr CO (1989) The *Artibeus* of Gray 1838, p. 443-468. *Advances in Neotropical Mammalogy*. Gainesville, The Sandhill Crane Press, 614p.
- Heitz E (1928) Das Heterochromatin der Moose. *J.B. Wist. Botan* 69: 762-818.
- Hill JE and Smith JD (1984) *Bats—A natural history*, University of Texas Press.
- Hollis L (2005) Mammalian Species: *Artibeus planirostris*. *American Society of Mammalogists* (775): 1-6.
- Howell WM and Black DA (1980) Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. *Experientia* 36: 1014-1015.
- Kasahara S and Dutrillaux B (1983) Chromosome banding patterns of four species of bats, with special reference to a case of X-autosome translocation. *Ann. Genetics* 26: 197-201.
- Koopman KF (1993) Order Chiroptera. *Mammal species of the world: a taxonomic and geographic reference*. Washington, D.C., Smithsonian Institution Press, 2nd ed, pp. 137-241.
- Leite-Silva C, Santos N, Fagundes V, Yonenaga-Yassuda Y and Souza MJ (2003) Karyotypic characterization of the bat species *Molossus ater*, *M. molossus* and *Molossops planirostris* (Chiroptera, Molossidae) using FISH and banding techniques. *Hereditas* 138: 94-100.
- Lim BK and Wilson DE (1993) Taxonomic status of *Artibeus amplus* (Chiroptera: Phyllostomidae) in northern South America. *J. Mammalogy* 74: 763-768.
- Lim BK (1997) Morphometric differentiation and species status of allopatric fruit-eating bats *Artibeus jamaicensis* and *A. planirostris* in Venezuela. *Studies on Neotropical Fauna and Environment* 32: 65-71.
- Lim BK, Genoways HH and Engstrom MD (2003) Results of the Alcoa Foundation-Suriname Expeditions. XII. First record of the giant fruit-eating bat, *A. amplus*, (Mammalia: Chiroptera) from Suriname with a review of the species. *Annals of the Carnegie Museum, Pittsburgh*, 72 (2): 99-107.

- Lim BK, Engstrom MD, Lee TE, Patton JC and Bickham JW (2004) Molecular differentiation of large species of fruit-eating bats (*Artibeus*) and phylogenetic relationships based on cytochrome b gene. *Acta Chiropterologica* 6: 1-12.
- Mäkinen A; Zijlstra C; De Haan NA; Mellink CHM and Bosma A.A (1997) Localization of 18S + 28S and 5S ribosomal RNA genes in the dog by fluorescence in situ hybridization. *Cytogenet. Cell Genet.* 78: 231-235.
- Martínez JL; Morán P; Garcia-Vázquez E and Pendás AM (1996) Chromosomal localization of the major and 5S rRNA genes in the European eel (*Anguilla anguilla*). *Cytogenet. Cell Genet* 73: 149-152.
- Martins C and Galetti Jr PM (1998) Karyotype similarity between two sympatric Schizodon fish species (Anostomidae, Characiformes) from Paraguay River basin. *Genet. Mol. Biol.* 21: 355-360.
- Mattei MG and Luciani J (2003) Heterochromatin, from chromosome to protein. *Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Hematology*.
- McEachern MJ, Krauskopf A, Blackburn EH (2000) Telomeres and their control. *Annu. Rev. Genet.* 334: 331-358.
- Meyne J, Baker RJ, Hobart HH, Hsu TC, Ryder OA, Ward OG, Wiley JE, Wurster-Hill D, Yates TL and Moyzis RK (1990) Distribution of non-telomeric sites of the (TTAGGG)_n telomeric sequence in vertebrate chromosomes. *Chromosoma* 99: 3-10.
- Morielle E and Varella-Garcia M (1988) Variability of nucleolus organizer regions in phyllostomid bats. *Rev. Brasil. Genet.* 11 (4): 853-871.
- Morielle-Versute E, Taddei VA and Varella-Garcia M (1992) Chromosome banding studies of *Chrotopterus auritus* (Chiroptera: Phyllostomidae). *Rev. Brasil. Genet.* 15 (3): 569-573.
- Multani AS, Ozen M, Furlong CL, Zhao Y-J, Hsu TC and Pathak S (2001) Heterochromatin and interstitial telomeric DNA homology. *Chromosoma* 110: 214-220.
- Neves ACB, Pieczarka JC, Barros RMS, Marques-Aguiar S, Rodrigues LRR and Nagamachi CY (2001) Cytogenetic studies on *Choeroniscus minor* (Chiroptera, Phyllostomidae) from the Amazon region. *Cytobios* 105: 91-98.
- Noronha RCR (2000) Reconstrução do comportamento meiótico em Phyllostomidae (Chiroptera). *Dissertação de Mestrado. Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará.*

- Noronha RCR, Namagachi CY, Pieczarka JC, Marques-Aguiar S and Barros RMS (2001) Sex-autosome translocations: meiotic behaviour suggests an inactivation block with permanence of autosomal gene activity in Phyllostomid bats. *Caryologia* 54 (3): 267-277.
- Ono T and Yoshida MC (1997) Differences in the chromosomal distribution of telomeric (TTAGGG)_n sequences in two species of the vespertilionid bats. *Chromosome Res.* 5: 203-205.
- Ortega J and Castro-Arellano I (2001) Mammalian Species: *Artibeus jamaicensis*. American Society of Mammalogists, 662: 1–9.
- Owen RD (1987) Phylogenetic analyses of the bat subfamily Stenodermatinae (Mammalia: Chiroptera). Special Publications, The Museum, Texas Tech University 26: 1-65.
- Owen RD (1988) Phenetic analyses of the bat subfamily Stenodermatinae (Mammalia: Chiroptera). *J. Mammalogy* 69: 795-810.
- Pagnozzi JM, Silva MJJ and Yonenaga-Yassuda Y (2000) Intraspecific variation in the distribution of the interstitial telomeric (TTAGGG)_n sequences in *Micoureus demerarae* (Marsupialia: Didelphidae). *Chromosome Res.* 8: 585-591.
- Patton JL and Baker RJ (1979) Chromosomal homology and evolution of phyllostomatoid bats. *Syst. Zool.* 27: 449-462.
- Pendás AM, Morán P and García-Vázquez E (1993). Ribosomal RNA genes are interspersed throughout a heterochromatic chromosome arm in Atlantic salmon. *Cytogenet. Cell Genet.* 63: 128-130.
- Phillips CJ, Pumo DE, Genoways HH, Ray PR and Brishley CA (1991) Mitochondrial DNA evolution and phylogeography in two neotropical fruit bats, *Artibeus jamaicensis* and *Artibeus lituratus*. *Latin American Mammalogy: history, biodiversity, and conservation*. Pp. 97-123.
- Pieczarka JC, Nagamachi CY, O'Brien PCM, Yang F, Rens W, Barros RMS, Noronha RCR, Rissino J, de Oliveira EHC and Ferguson-Smith MA (2005) Reciprocal chromosome painting between two South American bats: *Carollia brevicauda* and *Phyllostomus hastatus* (Phyllostomidae, Chiroptera). *Chromosome Res.* 13: 339–347.
- Pumo DE, Kim I, Remsen J, Philips CJ and Genoways HH (1996) Molecular systematics of the fruit bat, *Artibeus jamaicensis*: origin of an unusual island population. *J. Mammalogy* 77: 491-503.

- Redford KH and Eisenberg JF (1992) Mammals of the Neotropics. University of Chicago Press, Illinois.
- Reis NR, Peracchi AL, Pedro WA, Lima IP (2006) Mamíferos do Brasil. Londrina, 437pp.
- Rodrigues LRR, Barros RMS, Assis MFL, Marques-Aguiar SA, Pieczarka JC and Nagamachi CY (2000) Chromosome comparison between two species of *Phyllostomus* (Chiroptera - Phyllostomidae) from Eastern Amazonia, with some phylogenetic insights. Genet. Mol. Biol. 23 (3): 595-599.
- Rodrigues LRR, Barros RMS, Marques-Aguiar S, Assis MFL, Pieczarka JC and Nagamachi CY (2003) Comparative cytogenetics of two phyllostomids bats. A new hypothesis to the origin of the rearranged X chromosome from *Artibeus lituratus* (Chiroptera, Phyllostomidae). Caryologia 56 (4): 413-419.
- Ruedas LA, Lee Jr. TE, Bickham W and Schlitter DA (1990) Chromosomes of five species of vespertilionid bats from Africa. J. Mammalogy 71: 94-100.
- Rui AM and Fabián ME (1997) Quirópteros de la familia Phyllostomidae (Mammalia, Chiroptera) em selvas del estado de Rio Grande do Sul, Brasil. Chiroptera Neotropical, Brasília, 3 (2): 75-77.
- Rui AM and Drehmer CJ (2004) Anomalias e variações na fórmula dentária em morcegos do gênero *Artibeus* Leach (Chiroptera, Phyllostomidae). Rev. Brasil. Zool. 21 (3): 639-648.
- Salvadori S, Deima AM, Coluccia E, Floridia G, Rossi E and Zuffardi O (1995) Colocalization of (TTAGGG)_n temomeric sequences and ribosomal genes in Atlantic eels. Chromosome Res. 3: 54-58.
- Santos N and Souza MJ (1998a) Characterization of the constitutive heterochromatin of *Carollia perspicillata* (Phyllostomidae, Chiroptera) using the base-specific fluorochromes, CMA₃ (GC) and DAPI (AT). Caryologia 51: 51-60.
- Santos N and Souza MJ (1998b) Use of fluorochromes chromomycin A₃ and DAPI to study constitutive heterochromatin and NORs in four species of bats (Phyllostomidae). Caryologia 51: 265-278.
- Santos N, Fagundes V, Yonenaga-Yassuda Y and Souza MJ (2001) Comparative karyology of brazilian vampire bats *Desmodus rotundus* and *Diphylla ecaudata* (Phyllostomidae, Chiroptera): banding patterns, base-specific fluorochromes and FISH of ribossomal genes. Hereditas 134: 189-194.

- Santos N, Fagundes V, Yonenaga-Yassuda Y and Souza MJ (2002) Localization of rRNA genes in Phyllostomidae bats reveals silent NORs in *Artibeus cinereus*. *Hereditas* 136: 137-143.
- Seabright M (1971) A rapid banding technique for human chromosomes. *Lancet* 2: 971-972.
- Silva AM, Marques-Aguiar SA, Barros RMS, Nagamachi CY and Pieczarka JC (2005) Comparative cytogenetic analysis in the species *Uroderma magnirostrum* and *U. bilobatum* (cytotype 2n=42) (Phyllostomidae, Stenodermatinae) in the Brazilian Amazon. *Genet. Mol. Biol.* 28 (2): 248-253.
- Simmons NB (2005) Mammal species of the world: A Taxonomic and geographic reference. Baltimore, The Johns Hopkins University Press, 3^aed, v1, 312-529.
- Solari AJ and Pigozzi MI (1994) Fine structure of the XY body in the XY₁Y₂ trivalent of the bat *Artibeus lituratus*. *Chromosome Res.* 2: 53-58.
- Souza MJ and Araújo MCP (1990) Conservative pattern of the G-bands and diversity of C-banding patterns and NORs in Stenodermatinae (Chiroptera-Phyllostomatidae). *Rev. Brasil. Genet.* 13: 255-268.
- Sumner AT (1972) A sample technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Expl. Cell Res.* 75: 304-306.
- Sumner AT (1990) Chromosome banding. 1st ed. Unwin Hyman Ltd. London, UK, 434 p.
- Sumner AT (2003) Chromosomes: organization and function. Blackwell Publishing. North Berwick, UK.
- Suzuki H; Sakurai S and Matsuda Y (1996) Rat 5S rDNA spacer sequence and chromosomal assignment of the genes to the extreme terminal region of chromosome 19. *Cytogenet. Cell Genet* 72: 1-4.
- Taddei VA (1996) Sistemática de quirópteros. *Boletim do Instituto Pasteur*, 1(2): 3-15.
- Taddei VA, Nobile CA and Morielle-Versute E (1998) Distribuição geográfica e análise morfométrica comparativa em *Artibeus obscurus* (Schinz, 1821) e *Artibeus fimbriatus* (Gray, 1838) (Mammalia, Chiroptera, Phyllostomidae). *Ensaio e Ciência, Campo Grande*, 2 (2): 71-127.
- Tucker PK (1986) Sex chromosome-autosome translocations in the leaf-nosed bats family Phyllostomidae. I. Mitotic analyses of the subfamilies Stenodermatinae and Phyllostominae. *Cytogenet. Cell Genet.* 43: 19-27.

- Tucker PK and Bickham JW (1986) Sex chromosome-autosome translocations in the leaf-nosed bats family Phyllostomidae. II. Meiotic analyses of the subfamilies Stenodermatinae and Phyllostominae. *Cytogenet. Cell Genet.* 43: 28-37.
- van Den Bussche RA, Longmire JL, Baker RJ (1995) How bats achieve a small C-value: frequency of repetitive DNA in *Macrotus*. *Mamm Genome* 6:521–525.
- van Den Bussche RJL, Hudgeons JL and Baker RJ (1998) Phylogenetic accuracy among the New World bat genera *Artibeus*, *Dermanura* and *Koopmania*. *Bat biology and conservation*. Smithsonian Institution Press. Washington, DC, pp. 59-71.
- Varella-Garcia M, Morielle-Versute E and Taddei VA (1989) A survey of cytogenetic data on Brazilian bats. *Rev. Brasil. Genet.* 12: 761-793.
- Varella-Garcia M and Taddei VA (1989) Citogenética de Quirópteros: Métodos e Aplicações. *Rev. Bras. Zool.* 6: 297-323.
- Verma RS and Babu A (1995) human chromosome: Principles and techniques. McGraw-Hill.
- Volleth M, Klett C, Kollak A, Dixkens C, Winter Y, Just W, Vogel W and Hameister H (1999) ZOO-FISH analysis in a species of the order Chiroptera: *Glossophaga soricina* (Phyllostomidae). *Chromosome Res.* 7: 57-64.
- Volleth M, Bronner G, Göpfert MC, Heller KG, von Helversen O and Yong HS (2001) Karyotype comparison and phylogenetic relationships of Pipistrellus-like bats (Vespertilionidae; Chiroptera; Mammalia). *Chromosome Res.* 9: 25-46.
- Wetterer, AL, Rockman MV and Simoons NB (2000) Phylogeny of phyllostomid bats (Mammalia: Chiroptera): data from diverse morphological systems, sex chromosomes, and restriction sites. *Bulletin of the American Museum of Natural History* 248: 1-200.

4. Manuscrito de Artigo Científico

Utilização de marcadores citogenéticos na análise comparativa dos grandes *Artibeus* (Phyllostomidae, Chiroptera), avaliando estruturas conservadas e sítios espécie- específicos

Marcela Maria Pereira de Lemos Pinto*, Maria José de Souza, Ana Paloma Tavares de Araújo, Katharine Raquel Pereira dos Santos, Alfredo Ricardo Langguth Bonino e Neide Santos

Utilização de marcadores citogenéticos na análise comparativa dos grandes *Artibeus* (Phyllostomidae, Chiroptera), avaliando estruturas conservadas e sítios específicos espécie- específicos

Marcela Maria Pereira de Lemos Pinto*, Maria José de Souza Lopes, Ana Paloma Tavares de Araújo, Katharine Raquel Pereira dos Santos, Alfredo Ricardo Langguth Bonino e Neide Santos

Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Genética, Laboratório de Citogenética Animal, Recife, PE, Brasil.

Palavras-chave: *Artibeus*, bandeamento C, Ag-RON, CMA₃, DAPI.

Enviar correspondência para Neide Santos.

Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Genética, Laboratório de Citogenética Animal, Av. Prof. Moraes Rego s/n Cidade Universitária, 50670-901 Recife, PE, Brasil.

E-mail: santos_neide@yahoo.com.br

Resumo

O gênero *Artibeus* (Stenodermatinae) está constituído por 18 espécies, das quais nove foram descritas no Brasil. Neste trabalho foi realizado um estudo citogenético comparativo nos grandes *Artibeus* (*A. obscurus*, *A. fimbriatus*, *A. lituratus* e *A. jamaicensis*) através de bandejamento C (CBG), coloração com AgNO_3 e fluorocromos base-específicos. As espécies apresentaram $2n=30$ (XX) e 31 (XY_1Y_2), com Número Fundamental=56. O CBG evidenciou blocos de heterocromatina constitutiva (HC) nas regiões pericentroméricas de todos os cromossomos, teloméricas dos pares 5, 6, 7 e X, e uma coloração diferencial no braço longo do X nas quatro espécies. Além disso, os Y_1 e Y_2 se apresentaram totalmente heterocromáticos, exceto para *A. jamaicensis*. Também foi observada a presença de HC em sítios específicos nos autossomos de cada espécie. As RONS estavam localizadas nas contrações secundárias dos braços curtos, nos pares 5, 6 e 7, exibindo variação intraindividual e interespecífica. Através da coloração sequencial $\text{AgNO}_3/\text{CMA}_3/\text{DA}/\text{DAPI}$ observou-se que a associação da HC com as RONS exibiu marcação CMA_3 positiva em *A. obscurus* e *A. fimbriatus*, indicando riqueza em pares de bases GC nessa região. O estudo realizado proporcionou a análise comparativa das espécies, permitindo sua correta individualização, particularmente, das que ocorrem em simpatria no Nordeste brasileiro.

Introdução

A família Phyllostomidae, representada pelos morcegos com folhas nasais, é um grupo bastante diversificado. Apresenta o maior número de gêneros e espécies entre os Chiroptera Neotropicais, compreendendo 11 subfamílias: Carrollinae, Desmodontinae, Glossophaginae, Glyphonycterinae, Lonchophyllinae, Lonchorhininae, Macrochinae, Micronycterinae, Phyllostominae, Rhinophyllinae e Stenodermatinae. Esta última é detentora da maior biodiversidade de gêneros (20) e espécies (62), em relação às demais subfamílias da ordem Chiroptera (Baker *et al.*, 2003).

O gênero *Artibeus* (Leach, 1821) está constituído por 18 espécies, distribuídas em três subgêneros *Artibeus* (grandes *Artibeus*), *Dermanura* e *Koopmania* (pequenos *Artibeus*). Possui distribuição restrita à região Neotropical, por toda a América Central e do Sul, desde o Brasil até o norte da Argentina (Koopman, 1993; Eisenberg e Redford, 1999; Simmons, 2005). No Brasil, foram formalmente registradas apenas quatro espécies dos grandes *Artibeus*: *A. obscurus*, *A. fimbriatus*, *A. lituratus* e *A. jamaicensis*. As duas últimas são de ocorrência conhecida na maior parte do território brasileiro. *A. obscurus* distribui-se na Amazônia, atingindo o Norte de Mato Grosso, se expandindo pelas regiões Nordeste e Sudeste. Por sua vez, *A. fimbriatus* distribui-se nas regiões Nordeste, DF, Sudeste e Sul, ocorrendo em simpatria com *A. obscurus*, *A. lituratus* e *A. jamaicensis* (Simmons, 2005).

A sistemática dos grandes *Artibeus* ainda é motivo de muitas controvérsias, decorrentes da extensa similaridade de seus caracteres morfométricos; da variabilidade intraespecífica nas dimensões de *A. jamaicensis*; e da sobreposição de seus nichos ecológicos, dificultando assim a correta separação das espécies desse gênero (Handley 1987, 1989; Taddei *et al.*, 1998).

Dentre as técnicas citogenéticas atualmente empregadas para a análise dos morcegos, destacam-se o bandeamento G (Seabright, 1971), que promove a diferenciação longitudinal dos cromossomos, permitindo o correto pareamento dos homólogos e a verificação de rearranjos cromossômicos; a técnica de bandeamento C (Sumner, 1972) e a coloração com nitrato de prata (Howell e Black, 1980), que marcam as regiões de heterocromatina constitutiva (HC) e as regiões organizadoras de nucléolos (RONs), respectivamente.

A ordem Chiroptera está caracterizada pela presença de reduzido conteúdo heterocromático em relação ao genoma da maioria dos mamíferos (van Den Bussche *et al.*, 1995). Além disso, têm sido amplamente descrito a presença de blocos heterocromáticos, situados, preferencialmente, nas regiões pericentroméricas de todo o complemento

cromossômico. Na família Phyllostomidae, verifica-se que a maioria espécies exibe um padrão de HC restrito ao centrômero, embora a presença de heterocromatina também tenha sido observada nas regiões intersticiais e/ou teloméricas do complemento de alguns representantes (Santos e Souza, 1998a,b; Neves *et al.*, 2001; Santos *et al.*, 2001).

As RONS têm sido evidenciadas pela coloração com nitrato de prata (Ag-RON) em apenas um par cromossômico, na maioria das espécies de morcegos, estando frequentemente localizadas na constrição secundária dos autossomos. Este padrão tem sido considerado como uma condição ancestral na família Phyllostomidae, com base na presença dessa característica em indivíduos da subfamília Macrotinae, considerada a mais primitiva, e nos noctilionídeos, que compreendem um grupo externo, estritamente relacionado a esta família. A ocorrência de RONS múltiplas tem sido descrita em algumas espécies da subfamília Stenodermatinae, cuja característica mais freqüente é a sua presença em 3 a 4 pares autossômicos (Morielle-Versute e Varella-Garcia, 1988; Santos e Souza, 1998b).

O uso de fluorocromos base-específicos, como a Cromomicina A₃ (CMA₃) e o 4,6-diamidino-2-fenilindol (DAPI), tem sido aplicado na caracterização de diferentes classes da HC (rica em pares de bases GC e/ou AT, ou sem especificidade), e no estudo da composição da heterocromatina e das regiões intergênicas associada às RONS (Santos e Souza, 1998 a, b; Santos *et al.*, 2001; Leite-Silva *et al.*, 2003). Em morcegos, estudos citogenéticos utilizando fluorocromos são escassos, visto que apenas nove espécies da família Phyllostomidae foram estudadas com esse enfoque. O fluorocromo DAPI, freqüentemente, tem apresentado uma coloração uniforme ou um fraco padrão de bandas G, enquanto que com o CMA₃ tem sido exibido um padrão de bandas R (Santos e Souza, 1998a,b; Santos *et al.*, 2001).

Neste trabalho foram utilizados marcadores citogenéticos (bandeamento C e coloração com AgNO₃) e moleculares (tríplice coloração CMA₃/DA/DAPI) nas espécies *Artibeus obscurus* e *A. fimbriatus*, para realizar análise comparativa destas com *A. jamaicensis* e *A. lituratus*, com intuito de avaliar e determinar prováveis diferenciações interespecíficas, que aliadas à prévia identificação taxonômica, poderão auxiliar na correta individualização dos representantes do gênero *Artibeus*.

Material e Métodos

Análises cromossômicas foram realizadas a partir de preparações diretas de medula óssea em 14 indivíduos de *Artibeus obscurus* (6 machos e 8 fêmeas); 6 de *A. fimbriatus* (2 machos e 4 fêmeas); 13 de *A. jamaicensis* (8 machos e 5 fêmeas); 20 indivíduos de *A. lituratus* (10 machos e 10 fêmeas) capturados nos municípios de Igarassu (Latitude: 7°48'45''S; Longitude: 34°56'15''W), Água Preta (Latitude: 8°41'15''S; Longitude: 35°33'45''W), Rio Formoso (Latitude: 8°41'15''S; Longitude: 35°11'15''W), Ipojuca (Latitude: 8°26'15''S; Longitude: 35°03'45''W), Recife (Latitude: 8°03'45''S; Longitude: 34°56'15''W) no Estado de Pernambuco, Nordeste do Brasil. A identificação taxonômica foi realizada pelo Prof^o Alfredo Ricardo Langguth Bonino, Katharine Raquel Pereira dos Santos e Ana Paloma Tavares de Araújo da Universidade Federal da Paraíba (UFPB).

Padrões de bandeamento C (CBG) e Ag-RON foram obtidos pelos métodos de Sumner (1972) e Howell e Black (1980), respectivamente, com algumas modificações. A tríplice coloração CMA₃/DA/DAPI foi realizada de acordo com Schweizer (1980), com algumas modificações (Santos e Souza, 1998a). Para a coloração seqüencial AgNO₃/CMA₃/DAPI as lâminas foram descoradas de acordo com Dos Santos Guerra (1991) e coradas com CMA₃/DA/DAPI.

As fotomicrografias foram feitas no fotomicroscópio Leica DMLB, utilizando o filme Kodak Imagelink ASA 25, para coloração convencional, bandeamento C e coloração com AgNO₃. As cópias foram feitas em papel Kodak Kodabrome II RC F3 e Ilford. No caso das lâminas submetidas à coloração seqüencial AgNO₃/CMA₃/DA/DAPI, foi utilizado o sistema de captura de imagem IM50.

Resultados

A coloração convencional permitiu a visualização do número diplóide, a morfologia cromossômica e a determinação do sistema sexual dos cariótipos analisados: *Artibeus obscurus*, *A. fimbriatus*, *A. lituratus* e *A. jamaicensis* apresentaram idênticos número diplóide $2n=30, XX; 2n=31, XY_1Y_2$ e número fundamental igual a 56 ($NF=56$), compreendendo cromossomos meta-submetacêntricos (1-4, 8-14), subtelocêntricos (5, 6, 7 e X) e dois pequenos acrocêntricos (Y_1 e Y_2). As quatro espécies, contudo, diferiram entre si por apresentarem tamanhos distintos entre o Y_1 e o Y_2 (Fig. 1).

O bandeamento C (CBG) evidenciou blocos de heterocromatina constitutiva (HC) nas regiões pericentroméricas de todos os cromossomos, além de pequenos blocos de HC na região telomérica dos pares 5, 6, 7 e X nas quatro espécies (Fig. 2a-d). Além disso, *A. obscurus* (Fig. 2a) apresentou blocos intersticiais nos braços curtos e longos do par 1, como também nos braços longos dos cromossomos 2, 5 e 6, e nos telômeros do braço curto do par 9. Por sua vez, em *A. jamaicensis* (Fig. 2d) foram observados blocos teloméricos nos braços curtos dos pares 9 e 13, e blocos intersticiais nos braços longos dos cromossomos 1, 2 e 6. A presença de um bloco intersticial também foi verificada no braço longo do par 6 em *A. lituratus* (Fig. 2c). Em todos os indivíduos foi verificada ainda uma coloração diferencial do braço longo do X, quando comparada com a eucromatina do complemento cromossômico. O cromossomo Y_2 mostrou-se quase inteiramente heterocromático, exceto para *A. jamaicensis* que, diferentemente, exibiu um bloco pericentromérico e um distal (Fig. 2d). O padrão do Y_1 não pôde ser determinado com precisão, em decorrência de seu tamanho puntiforme. A tabela 1 mostra o padrão de banda C observado no complemento cromossômico das quatro espécies analisadas.

A coloração com nitrato de prata revelou que *Artibeus obscurus*, *A. fimbriatus* (Fig. 3a,d), *A. lituratus* e *A. jamaicensis* possuem três pares de RONS situados na região terminal dos braços curtos dos autossomos 5, 6 e 7. A análise de um total de 100 metáfases por espécie permitiu determinar a frequência de atividade das RONS, correspondendo a uma média de três a quatro cromossomos marcados por célula. Os resultados obtidos possibilitaram verificar a variabilidade de atividade das RONS, tanto inter como intraespecificamente (Tabela 2).

A coloração sequencial $AgNO_3/CMA_3/DA/DAPI$ evidenciou uma correspondência entre as regiões CMA_3 positivas com os sítios marcados pelo nitrato de prata em *A. obscurus* e *A. fimbriatus* (Fig. 3a-f). Ambas as espécies apresentaram associação de HC com as RONS e

marcações positivas para o fluorocromo CMA₃, refletindo assim a riqueza de pares GC nesses sítios heterocromáticos. Adicionais marcações CMA₃ positivas foram observadas nas regiões pericentroméricas de alguns cromossomos, particularmente nos pares 1 e 2 de *A. obscurus* e no par 6 de *A. obscurus* e *A. fimbriatus*, indicando uma HC rica em pares de bases GC nessas regiões cromossômicas (Figuras 3b,e). Contudo, a coloração com DAPI exibiu um padrão uniforme em todos os cromossomos (Figuras 3c-d).

Tabela 1: Padrão de HC no complemento cromossômico das quatro espécies de *Artibeus*

Espécies	Padrão de banda C				
	Pericentromérico	Telomérico (p)	Intersticial	Disperso	Distal
<i>A. lituratus</i>	+	5, 6, 7 e X	6	Y ₁ e Y ₂	-
<i>A. fimbriatus</i>	+	5, 6, 7 e X	-	Y ₁ e Y ₂	-
<i>A. jamaicensis</i>	+	5, 6, 7, 9 , 13 e X	1 , 2 e 6	Y ₁	Y₂
<i>A. obscurus</i>	+	5, 6, 7, 9 e X	1* , 2 , 5 e 6	Y ₁ e Y ₂	-

(p) = braço curto; (q) = braço longo; * = também em p

+ = todos os cromossomos

Tabela 2: Variação do número de RON ativas por célula nos grandes *Artibeus*

Indivíduo	Número de RON ativas por célula						Nº total de células analisadas por indivíduo
	1	2	3	4	5	6	
<i>A. obscurus</i>	0	17	53	71	12	16	169
<i>A. fimbriatus</i>	0	14	40	58	27	22	157
<i>A. lituratus</i>	0	7	30	36	22	24	119
<i>A. jamaicensis</i>	0	14	28	47	11	25	123
Total	0	52	151	212	72	87	241
(%) do total	0	21,6	62,6	88	29,9	36,1	

Discussão

A análise cromossômica convencional das quatro espécies possibilitou uma comparação interespecífica dos grandes *Artibeus*, confirmando uma extensa similaridade entre os representantes desse gênero (Baker, 1979; Souza e Araújo, 1990; Santos e Souza, 1998b; Santos *et al.*, 2002). Apesar dos complementos cromossômicos de *A. obscurus*, *A. fimbriatus*, *A. lituratus* e *A. jamaicensis* serem morfologicamente semelhantes, as espécies apresentaram diferenças de tamanho dos alossomos Y_1 e Y_2 , como descrito por Hsu *et al.* (1968) para as espécies *A. lituratus*, *A. jamaicensis* e *A. toltecus*.

O sistema sexual múltiplo, em morcegos, é provavelmente originado a partir de translocações entre autossomos e o cromossomo X, em que um dos autossomos se fusionou ao braço curto do X e seu respectivo homólogo (Y_2) passou a integrar o sistema de determinação sexual, juntamente com o Y original (Y_1) (Tucker, 1986; Rodrigues *et al.*, 2003). Embora esses rearranjos entre autossomos e alossomos ocorram apenas esporadicamente na classe Mammalia, na família Phyllostomidae os mesmos foram descritos em 23 espécies, das quais 18 encontram-se em Stenodermatinae. De acordo com Baker (1979), no gênero *Artibeus* o sistema múltiplo tem sido observado em pelo menos 11 espécies: *A. aztecus*, *A. cinereus*, *A. glaucus* e *A. toltecus* (subgênero *Dermanura*); *A. obscurus*, *A. fimbriatus*, *A. hirsutus*, *A. inopinatus*, *A. jamaicensis*, *A. lituratus* e *A. planirostris* (subgênero *Artibeus*). O padrão obtido no presente trabalho corrobora ao que foi descrito para *A. obscurus*, *A. fimbriatus*, *A. lituratus* e *A. jamaicensis*. A subfamília Stenodermatinae é caracterizada por apresentar grupos com extensa conservação cariotípica, incluindo representantes do gênero *Artibeus*. Entretanto, uma variação geográfica envolvendo os cromossomos sexuais foi descrito para *A. cinereus*, que apresentou $2n=30,XX$ e $2n=31,XY_1Y_2$ em espécimes coletado em Trinidad (Tucker, 1986) e, em contrapartida, exibiu $2n=30$ para ambos os sexos em indivíduos provenientes de Pernambuco (Souza e Araújo, 1990) e Belém do Pará (Noronha, 2000), Brasil, representando o sistema composto do tipo neo-XY. Este mecanismo sexual é derivado do sistema múltiplo, resultado da fusão entre Y_1 e Y_2 , tendo sido descrito para algumas espécies do gênero *Artibeus* (*A. toltecus* e *A. watsoni*) (Tucker, 1986).

A distribuição pericentromérica de HC mostrada pelas quatro espécies analisadas também tem sido observada na maioria das espécies da família Phyllostomidae. Além disso, foi verificada uma coloração diferencial no braço longo do X, que é considerada uma característica de representantes de Stenodermatinae, indicando a ocorrência de uma

euromatina dispersa, com propriedades estruturais diferentes da euromatina do genoma dessas espécies. O padrão heterocromático observado nos acrocêntricos Y_1 e Y_2 está de acordo ao que tem sido descrito para outros representantes dos filostomídeos (Souza e Araújo, 1990; Santos e Souza, 1998b; Santos *et al.*, 2001, 2002). Entretanto, o Y_2 de *A. jamaicensis* exibiu um padrão diferencial de bandas, centromérica e distal, o que reflete o seu caráter autossômico, homólogo ao autossomo translocado para o braço curto do X. A ausência deste padrão em *A. obscurus*, *A. fimbriatus* e *A. lituratus*, que também possuem sistema sexual múltiplo, provavelmente, deve-se ao grau de condensação de seus acrocêntricos.

Blocos de HC nas regiões pericentroméricas de todos os cromossomos e teloméricas dos pares 5, 6, 7 e X, correspondem a um padrão compartilhado por *A. obscurus*, *A. fimbriatus*, *A. lituratus* e *A. jamaicensis*, e por outros representantes de Stenodermatinae. Adicionalmente, cada espécie exibiu um conjunto particular de bandas heterocromáticas, que permitiu sua individualização e diferenciação.

A distribuição de HC, exibida neste trabalho, apresentou algumas discrepâncias em relação aos trabalhos de Souza e Araújo (1990) e Santos e Souza (1998a), quanto à presença de blocos intersticiais de HC no braço longo do par 6 em *A. lituratus* e *A. jamaicensis*. Em contrapartida, tais autores descreveram a ocorrência de bandas teloméricas no braço curto do par 9 de *A. lituratus* e intersticiais no braço longo do par 3 de *A. jamaicensis*. As divergências apresentadas estão, provavelmente, vinculadas ao grau de condensação dos cromossomos em cada estudo realizado, o que poderia mascarar a ocorrência de HC em determinadas regiões do complemento cromossômico, logo, resultando em modificações no padrão de HC.

Variações intragenéricas na distribuição de heterocromatina constitutiva foram descritas apenas em casos esporádicos na família Phyllostomidae. A uniformidade do padrão de HC tem sido observada principalmente, em grupos que apresentam extensa conservação cariotípica, a exemplo das espécies *Phyllostomus discolor*, *P. hastatus* e *P. elongatus* (subfamília Phyllostominae), cuja HC está restrita à região pericentromérica dos cromossomos (Morielle e Varella-Garcia, 1988; Varella-Garcia *et al.* 1989). Entretanto, o que se verificou no gênero *Artibeus* (*A. obscurus*, *A. fimbriatus*, *A. lituratus*, *A. jamaicensis* e *A. cinereus*) a despeito de sua alta taxa de conservação, foi um diferenciado padrão de bandas heterocromáticas em cada espécie analisada, similarmente ao que se observa no gênero *Uroderma* (Silva *et al.*, 2005). Este, apesar de constituir um membro da subfamília Stenodermatinae, como *Artibeus*, apresenta megaevolução cariotípica (Baker e Bickham, 1980), de modo que seus representantes exibem extensas disparidades cromossômicas, incluindo o padrão de HC.

A localização das RONS verificada através da coloração com AgNO_3 nos subtelocêntricos 5, 6 e 7 em *A. lituratus*, *A. jamaicensis* e *A. fimbriatus*, juntamente com o dado inédito de *A. obscurus*, foi similar ao descrito por Santos *et al.* (2002) para o gênero *Artibeus*, que distinguiram dois tipos de distribuição das RONS: 1) nas regiões distais dos braços curtos dos pares 5, 6 e 7 (*A. lituratus*, *A. jamaicensis* e *A. fimbriatus*) e 2) na região intersticial dos braços longos dos pares 10 e 13 em (*A. cinereus*). Para a espécie *A. fimbriatus* verificou-se ainda uma marcação adicional, na região intersticial do braço longo do par 5, que não foi observado neste trabalho. Esses autores utilizaram FISH com sonda ribossômica 18S, para averiguar a localização dos sítios de DNAr, constatando-se variação na relação do número e localização das RONS em *A. cinereus*, que correspondeu ao primeiro sítio silencioso de DNAr (par 9) em morcegos.

Considerando que o gênero *Artibeus* tem sido caracterizado por apresentar três pares de RONS, a variação observada nas espécies analisadas (3 a 4 marcações) está de acordo com estudos realizados nesse grupo (4 a 5 marcações), e em representantes da família Phyllostomidae, que envolveram a variabilidade do número de RONS ativas por célula. Estes trabalhos mostraram que a frequência de marcações por metáfase difere significativamente entre indivíduos e espécies com RONS múltiplas. Todavia, isto não é regra para espécies que possuem apenas um único par de RONS por célula, uma vez que não exibem alterações significativas na atividade dessas estruturas. As diferenças verificadas na localização e número das RONS indicam que estas são “hotspots” frequentemente envolvidos em rearranjos cromossômicos, podendo ser utilizadas como instrumento para a avaliação de relações filogenéticas (Morielle e Varella-Garcia, 1988; Souza e Araujo, 1990; Santos *et al.*, 2002).

Apesar do amplo emprego da coloração com AgNO_3 em vertebrados, na identificação das RONS, o tratamento com fluorocromos GC específicos, como a CMA_3 , têm sido utilizado para revelar RONS ativas ou inativas no complemento cromossômico. Estas estruturas são formadas por seqüências espaçadoras ou estão associadas a regiões heterocromáticas, ambas comumente ligadas a famílias de DNA ricas em pares de base GC (Salvadori *et al.* 1995; Silva e Maistro, 2006). As espécies *A. obscurus* e *A. fimbriatus* apresentaram associação de blocos heterocromáticos com as RONS, que exibiram riqueza em pares de base GC pois reagiram positivamente ao fluorocromo CMA_3 . Este resultado é similar ao descrito por Santos e Souza (1998a), para as espécies *A. lituratus* e *A. jamaicensis*, cuja associação (RONS + HC) resultou em semelhante marcação fluorescente e, também, mostraram-se neutras ao corante DAPI.

Nos representantes da família Phyllostomidae, as respostas diferenciais aos fluorocromos CMA₃ e DAPI têm sugerido uma heterogeneidade quanto a composição de bases das regiões intergênicas presentes nas RONS. A coloração seqüencial AgNO₃/CMA₃ evidenciou regiões espaçadoras CMA₃ positivas em *Carollia perspicillata*, *Desmodus rotundus*, *Diphylla ecaudata*, *Lonchorhina aurita* *Phyllostomus discolor*; e CMA₃ neutras em *Trachops cirrhosus*. Adicionalmente, a tríplice coloração CMA₃/DA/DAPI tem realçado os padrões de bandas R (ricas em GC) com CMA₃ e tem revelado uma coloração uniforme ao longo dos cromossomos ou um fraco padrão de bandas G (ricas em AT com DAPI) (Santos e Souza, 1998 a,b; Santos *et al.*, 2001; Barros, 2006).

Marcadores citogenéticos diferenciais e moleculares, aliados aos estudos taxonômicos, têm permitido uma melhor compreensão das relações filogenéticas e dos mecanismos responsáveis pela divergência cromossômica dos diferentes táxons da ordem Chiroptera. O estudo realizado proporcionou a análise comparativa das espécies, permitindo a visualização de estruturas conservadas e compartilhadas pelo gênero *Artibeus*. Além disso, possibilitou identificar divergências intragenéricas em um grupo que é caracterizado por exibir extensa conservação cariotípica.

Considerando a grande similaridade de características morfológicas entre *Artibeus obscurus*, *A. fimbriatus*, *A. lituratus* e *A. jamaicensis*, além da superposição de seus nichos ecológicos no Nordeste brasileiro, Taddei *et al.* (1998) destacaram a necessidade da análise de amplos caracteres na determinação taxonômica dessas espécies.

A caracterização cromossômica descrita neste trabalho, especificamente o padrão de HC, proporcionou a diferenciação citotaxonômica de *A. obscurus*, *A. fimbriatus*, *A. lituratus* e *A. jamaicensis*. Os dados obtidos neste trabalho serão de grande importância, pois permitirão a correta individualização de espécies que ocorrem em simpatria no Nordeste brasileiro.

Agradecimentos

Os autores agradecem as Sras. Francisca Tavares Lira e Cirlene Maria da Silva pelo suporte técnico neste trabalho e a Marcelo Guerra e Ana Emília Barros e Silva pela ajuda na disponibilização do sistema de captura de imagem. A Katharine Raquel Pereira dos Santos, Ana Paloma Tavares de Araujo da Universidade Federal da Paraíba e ao Prof. Alfredo Ricardo Langguth Bonino (UFPB) pela fundamental contribuição na identificação taxonômica dos exemplares utilizados nesse trabalho. Agradecemos ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pelo apoio financeiro ao projeto.

Apêndice

Família Phyllostomidae

Artibeus obscurus

M 318 (3214) - Saltinho (Rio formoso)
M 319 (3206) - Saltinho (Rio formoso)
M 336 (3235) - Saltinho (Rio formoso)
M 337 (3238) - Saltinho (Rio formoso)
M 340 (3216) - Saltinho (Rio formoso)
M 344 (3237) - Saltinho (Rio formoso)
M 359 (3230) - Saltinho (Rio formoso)
M 381 (3181) - Saltinho (Rio formoso)
M 397 (3186) - Dois irmãos
M 455 (3189) - Saltinho (Rio formoso)
M 478 (3179) - Saltinho (Rio formoso)

A. fimbriatus

M 346 (3215) - Saltinho (Rio formoso)
M 382 (3184) - Saltinho (Rio formoso)
M 395 (3177) - Dois irmãos
M 453 (3175) - Saltinho (Rio formoso)
M 479 (3192) - Saltinho (Rio formoso)

A. lituratus

M 221 (3418) - Igarassu
M 379 (3178) - Saltinho (Rio formoso)
M 446 (3191) - Saltinho (Rio formoso)
M 454 (3182) - Saltinho (Rio formoso)
M 475 (3188) - Saltinho (Rio formoso)
M 476 (3180) - Saltinho (Rio formoso)

A. jamaicensis

M 118 (3424) - Igarassu
M 124 (3212) - Igarassu
M 137 (3423) - Aldeia
M 188 (3428) - Igarassu
M 262 (3220) - Água Preta (Fazenda Camarão)
M 263 (3218) - Água Preta (Fazenda Camarão)
M 393 (3202) - Dois irmãos
M 400 (3176) - Dois irmãos
M 401 (3196) - Dois irmãos

Referências

- Baker RJ (1979) Karyology. In: Baker RJ, Jones JK and Carter DC (eds.) Biology of the bats of the New World family Phyllostomatidae. Part III. Special Publications, Museum of TexasTech. University, pp. 107-155.
- Baker RJ and Bickham JW (1980) Karyotypic evolution in bats: evidence of extensive and conservative chromosomal evolution in closely related taxa. Syst. Zool. 29: 239-253.
- Baker RJ, Hoofer SR, Porter CA and van Den Bussche RA (2003). Diversification among New World leaf-nosed bats: An evolutionary hypothesis and classification inferred from digenomic congruence of DNA sequence. Occasional papers 230: 1-32.
- Barros HMDR (2006) Análise Cariotípica nos Morcegos *Lonchorhina aurita* e *Trachops cirrhosus* (Phyllostomidae) Usando Técnicas Citogenéticas Diferenciais e Moleculares. Dissertação apresentada ao Mestrado de Genética, UFPE, Brasil.
- Dos Santos Guerra M (1991) Cis-acting regulation of NOR cistrons in *Eleutherine bulbosa* (Iridaceae). Genetica 83: 235-241.
- Eisenberg JF and Redford KH (1999) Mammals of the Neotropics. The Central Neotropics: Ecuador, Peru, Bolivia, Brazil. Chicago, The University of Chicago Press, vol. 3, 609p.
- Handley Jr CO (1987) New species of mammals from northern south America: fruit-eating bats, genus *Artibeus* Leach. Studies in Neotropical Mammalogy: Essays in Honor Philip Hershkovitz. Fieldiana Zoology, n.s., Chicago, 1382 (39): 163-172.
- Handley Jr CO (1989) The *Artibeus* of Gray 1838, p. 443-468. Advances in Neotropical Mammalogy. Gainesville, The Sandhill Crane Press, 614p.
- Howell WM and Black DA (1980) Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. Experientia 36: 1014-1015.
- Hsu T; Baker RJ and Utakoji T (1968) The multiple sex chromosome system of American leaf-nosed bats (Chiroptera, Phyllostomatidae). Cytogenetics 7: 27-38.
- Koopman KF (1993) Order Chiroptera. Mammal species of the world: a taxonomic and geographic reference. Washington, D.C., Smithsonian Institution Press, 2nd ed, pp. 137-241.
- Leite-Silva C, Santos N, Fagundes V, Yonenaga-Yassuda Y and Souza MJ (2003) Karyotypic characterization of the bat species *Molossus ater*, *M. molossus* and *Molossops planirostris* (Chiroptera, Molossidae) using FISH and banding techniques. Hereditas 138: 94-100.

- Morielle E and Varella-Garcia M (1988) Variability of nucleolus organizer regions in phyllostomid bats. *Rev. Brasil. Genet.* 11 (4): 853-871.
- Neves ACB, Pieczarka JC, Barros RMS, Marques-Aguiar S, Rodrigues LRR and Nagamachi CY (2001) Cytogenetic studies on *Choeroniscus minor* (Chiroptera, Phyllostomidae) from the Amazon region. *Cytobios* 105: 91-98.
- Noronha RCR (2000) Reconstrução do comportamento meiótico em Phyllostomidae (Chiroptera). Dissertação de Mestrado. Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará.
- Rodrigues LRR, Barros RMS, Marques-Aguiar S, Assis MFL, Pieczarka JC and Nagamachi CY (2003) Comparative cytogenetics of two phyllostomids bats. A new hypothesis to the origin of the rearranged X chromosome from *Artibeus lituratus* (Chiroptera, Phyllostomidae). *Caryologia* 56 (4): 413-419.
- Salvadori S, Deima AM, Coluccia E, Floridia G, Rossi E and Zuffardi O (1995) Colocalization of (TTAGGG)_n temomeric sequences and ribosomal genes in Atlantic eels. *Chromosome Res.* 3: 54-58.
- Santos N and Souza MJ (1998a) Characterization of the constitutive heterochromatin of *Carollia perspicillata* (Phyllostomidae, Chiroptera) using the base-specific fluorochromes, CMA₃ (GC) and DAPI (AT). *Caryologia* 51: 51-60.
- Santos N and Souza MJ (1998b) Use of fluorochromes chromomycin A₃ and DAPI to study constitutive heterochromatin and NORs in four species of bats (Phyllostomidae). *Caryologia* 51: 265-278.
- Santos N, Fagundes V, Yonenaga-Yassuda Y and Souza MJ (2001) Comparative karyology of brazilian vampire bats *Desmodus rotundus* and *Diphylla ecaudata* (Phyllostomidae, Chiroptera): banding patterns, base-specific fluorochromes and FISH of ribosomal genes. *Hereditas* 134: 189-194.
- Santos N, Fagundes V, Yonenaga-Yassuda Y and Souza MJ (2002) Localization of rRNA genes in Phyllostomidae bats reveals silent NORs in *Artibeus cinereus*. *Hereditas* 136: 137-143.
- Schweizer D (1980) Simultaneous fluorescent staining of R bands and specific heterochromatic regions (DA-DAPI bands) in human chromosomes. *Cytogenet. Cell Genet.* 27: 190-193.
- Seabright M (1971) A rapid banding technique for human chromosomes. *Lancet* 2: 971-972.
- Silva AM, Marques-Aguiar SA, Barros RMS, Nagamachi CY and Pieczarka JC (2005) Comparative cytogenetic analysis in the species *Uroderma magnirostrum* and *U.*

- bilobatum* (cytotype $2n=42$) (Phyllostomidae, Stenodermatinae) in the Brazilian Amazon. Genet. Mol. Biol. 28 (2): 248-253.
- Silva AR and Maistro EL (2006) Cytogenetic divergence between two sympatric species of *Characidium* (Teleostei, Characiformes, Crenuchidae) from the Machado River, Minas Gerais, Brazil. Genet.Mol.Biol. 29 (3): 459-463.
- Simmons NB (2005) Mammal species of the world: A Taxonomic and geographic reference. Baltimore, The Johns Hopkins University Press, 3^aed, v1, 312-529.
- Souza MJ and Araújo MCP (1990) Conservative pattern of the G-bands and diversity of C-banding patterns and NORs in Stenodermatinae (Chiroptera-Phyllostomatidae). Rev. Brasil. Genet. 13: 255-268.
- Sumner AT (1972) A sample technique for demonstrating centromeric heterochromatin. Expl. Cell Res. 75: 304-306.
- Taddei VA, Nobile CA and Morielle-Versute E (1998) Distribuição geográfica e análise morfológica comparativa em *Artibeus obscurus* (Schinz, 1821) e *Artibeus fimbriatus* Gray, 1838 (Mammalia, Chiroptera, Phyllostomidae). Ensaios e Ciência, Campo Grande, 2 (2): 71-127.
- Tucker PK (1986) Sex chromosome-autosome translocations in the leaf-nosed bats family Phyllostomidae. I. Mitotic analyses of the subfamilies Stenodermatinae and Phyllostominae. Cytogenet. Cell Genet. 43: 19-27.
- van Den Bussche RA, Longmire JL, Baker RJ (1995) How bats achieve a small C-value: frequency of repetitive DNA in *Macrotus*. Mamm Genome 6:521–525.
- Varella-Garcia M, Morielle-Versute E and Taddei VA (1989) A survey of cytogenetic data on Brazilian bats. Rev. Brasil. Genet.12: 761-793.

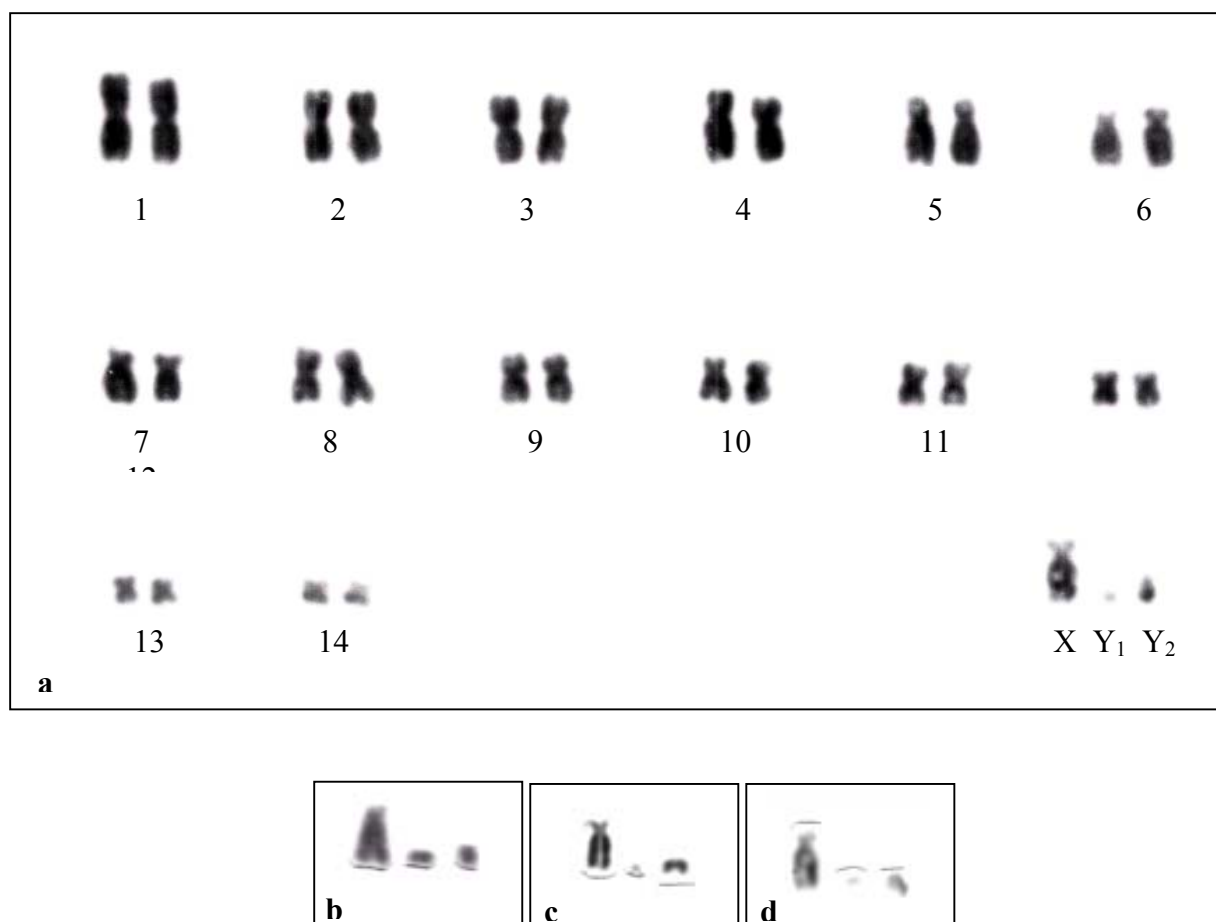


Figura 1: Cariótipo convencional de macho de *Artibeus obscurus* (a). Em destaque estão os sistemas sexuais de machos de *A. fimbriatus* (b), *A. jamaicensis* (c) e *A. lituratus* (d)

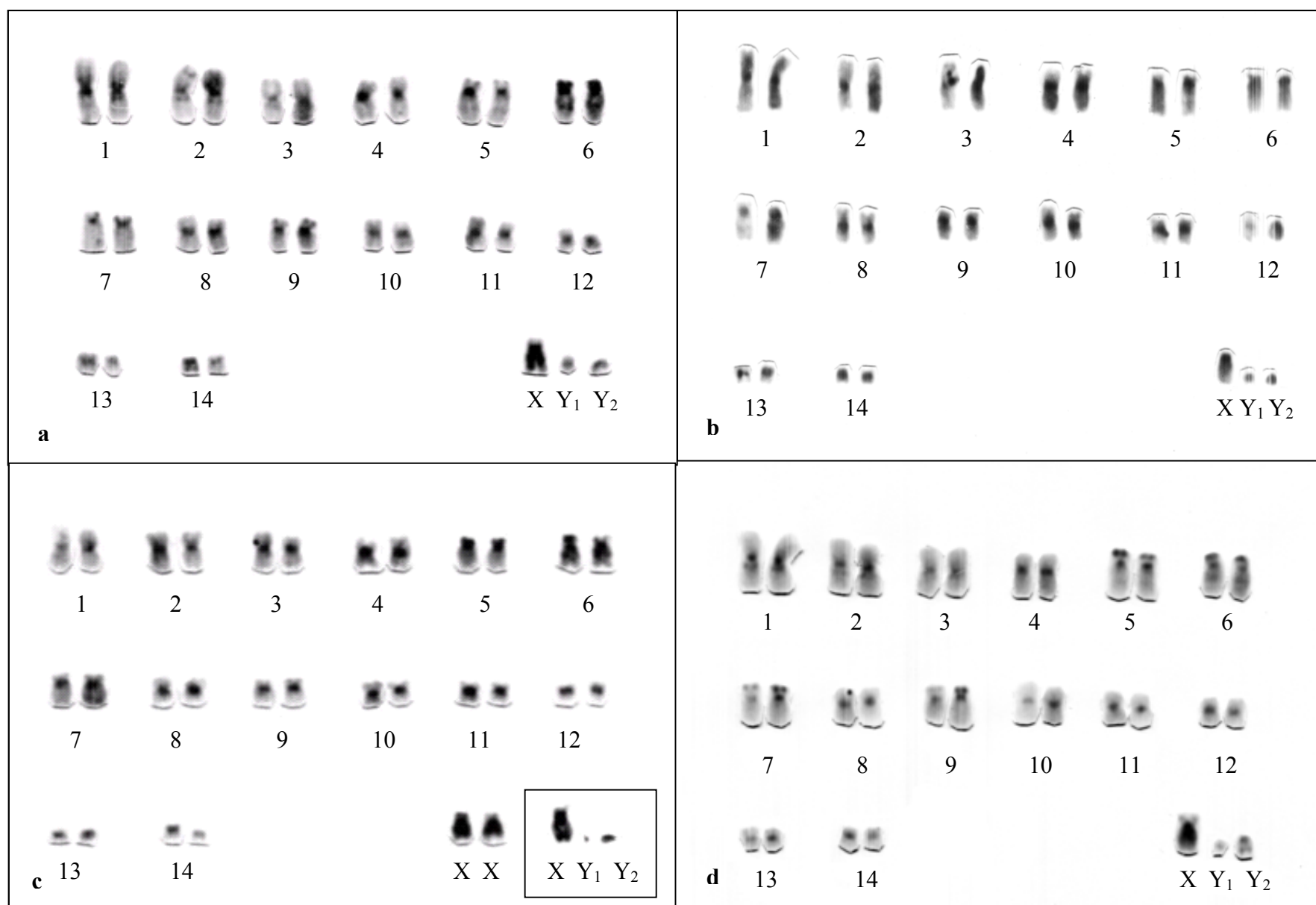


Figura 2: Bandeamento C no cariótipo de macho de *A. obscurus* (a), *A. fimbriatus* (b), *A. jamaicensis* (d) e fêmea de *A. lituratus* (c), cujo par sexual do macho está em destaque.

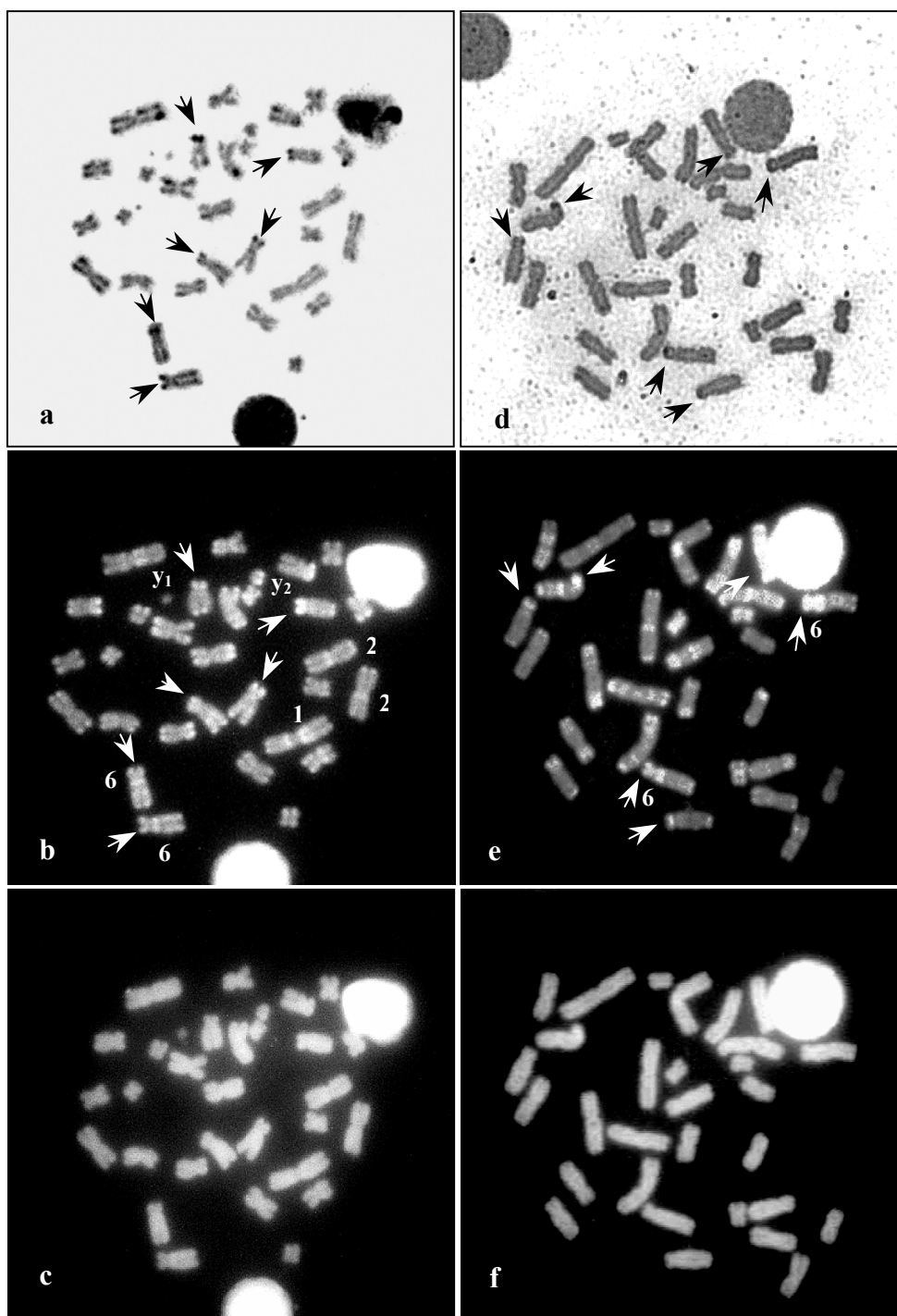


Figura 3: Metáfases mitóticas de *Artibeus obscurus* (a-c) e *A. fimbriatus* (d-f). Coloração sequencial AgNO₃/CMA₃/DAPI: (a, d) AgNO₃, (b, e) CMA₃ e (c, f) DAPI. As setas indicam as RONS.

5. Conclusões

1. Embora as translocações Robertsonianas tenham participado ativamente da evolução cromossômica na ordem Chiroptera, alguns grupos são caracterizados por exibir extensa conservação cariotípica, como o gênero *Artibeus*, cujas espécies analisadas apresentaram semelhantes complementos cromossômicos.
2. As espécies *Artibeus obscurus* e *A. fimbriatus* apresentaram $2n=30,XX$; $2n=31,XY_1Y_2$ e $NF=56$, condição considerada primitiva para a família Phyllostomidae, por sua alta frequência entre os cariótipos dos representantes de suas diferentes subfamílias.
3. A presença do sistema de determinação sexual do tipo múltiplo (XX ; XY_1Y_2), descrita em *Artibeus obscurus*, *A. fimbriatus*, *A. lituratus* e *A. jamaicensis*, está relacionada a peculiaridades da subfamília Stenodermatinae. Esta possui o maior número de indivíduos que sofreram rearranjos envolvendo autossomos e cromossomos sexuais entre os filostomídeos, apresentando espécies com mecanismos sexuais simples, múltiplos e compostos.
4. Padrão de HC descrito pela primeira vez para *A. obscurus* e *A. fimbriatus*, juntamente com *A. lituratus* e *A. jamaicensis*, proporcionou a diferenciação citotaxonômica dos grandes *Artibeus*, permitindo a precisa diferenciação das espécies através de marcadores espécie-específicos.
5. A coloração diferencial observada pela eucromatina presente no braço longo do X das quatro espécies, quando submetidas ao bandeamento C, frequentemente tem sido observada em representantes da subfamília Stenodermatinae.
6. A presença de RONS múltiplas, geralmente 3 pares, em espécies dos gêneros *Artibeus* é, provavelmente, resultado da fragmentação das seqüências de rDNA.
7. A utilização de flurocromos base-específicos (CMA_3 e DAPI) nos representantes da família Phyllostomidae tem apresentado, geralmente, uma riqueza em pares de bases GC nas regiões heterocromáticas e espaçadoras associadas às RONS, e uma

coloração uniforme com o DAPI, como foi observada em *A. obscurus* e *A. fimbriatus*.

8. A caracterização da HC, através da tríplice coloração, possibilitou a qualificação molecular dessa estrutura, revelando uma predominante associação de heterocromatina com seqüências ricas em pares GC. As espécies *A. obscurus* e *A. fimbriatus* apresentaram marcações CMA₃⁺ nas regiões teloméricas e pericentroméricas de alguns cromossomos, corroborando com os dados descritos para Phyllostomidae, particularmente *A. lituratus* e *A. jamaicensis*. Essas regiões correspondem a sítios heterocromáticos preferenciais presentes nos quirópteros.

6. Abstract

The genus *Artibeus* (Stenodermatinae) comprises 18 species and its distribution is restricted to the Neotropical Region. In Brazil had been registered only four great species of the *Artibeus*: *A. lituratus*, *A. jamaicensis*, *A. obscurus* and *A. fimbriatus*. In this work a comparative cytogenetic study was carried out in great the *Artibeus* through differential and molecular techniques of chromosomic analysis. The chromosomic preparations were obtained from marrow bone of *Artibeus obscurus* (6 males and 8 females), *A. fimbriatus* (2 males and 4 females), *A. jamaicensis* (8 males and 5 females) and *A. lituratus* (10 males and 10 females) collected in Pernambuco (Brazil). The species citotype presented $2n=30/31$ (XX;XY₁Y₂), and Fundamental Number (NF=56). In all species, however, the chromosomes Y₁ and Y₂ had differed between itself for presenting distinct sizes. C-banding shows blocks of constitutive heterochromatin (HC) in the pericentromeric regions of all the chromosomes and small heterochromatic blocks in the telomeric region of pairs 5, 6, 7 e X for all. Moreover *A. obscurus* presented interstitial blocks in the short and long arms of pair 1, as well as in the long arms of pairs 2, 5 and 6, besides in telomeres of pair 9. On other hands, *A. jamaicensis* exhibited telomeric blocks in the long arms of pairs 9 and 13, besides had been observed interstitial blocks in the long arms of pairs 1, 2 and 6. The presence of an interstitial block was also was presented in the long arm of pair 6 in *A. lituratus*. In all the individuals, the long arm of X was darked when compared with the euchromatin of the others chromosomes, and the Y₁ and Y₂ had revealed heterochromatinized, except by *A. jamaicensis* which showed centromeric and distal blocks in Y₂. In the four analyzed species, the RONS were located in the secondary constriction of pairs 5, 6 and 7, showing intraindividual variation in distribution of the activity of the RONS corresponded to three or four marked chromosomes. Through the sequential coloration AgNO₃/CMA₃/DA/DAPI was observed that the heterochromatic blocks associated to the RONS in *A. obscurus* and *A. fimbriatus* presented GC-richness. This work allows a comparative analysis in genus *Artibeus*, which exhibits both conserved structures for all and unique marks for each species. Therefore was possible individualize them.

Key words: *Artibeus*, C-banding, Ag-RON, CMA₃, DAPI.

7. Anexos

7.1 Genetics and Molecular Biology

SCOPE AND POLICY

Genetics and Molecular Biology (formerly named *Revista Brasileira de Genética/Brazilian Journal of Genetics* - ISSN 0100-8455) is published quarterly by the Sociedade Brasileira de Genética ([Brazilian Society of Genetics](#)).

The Journal considers contributions that present the results of original research in genetics, evolution and related scientific disciplines.

Although **Genetics and Molecular Biology** is an official publication of the Brazilian Society of Genetics, contributors are not required to be members of the Society.

It is a fundamental condition that submitted manuscripts have not been and will not be published elsewhere. With the acceptance of a manuscript for publication, the publishers acquire full and exclusive copyright for all languages and countries.

Manuscripts considered in conformity with the scope of the journal as judged by the Editor in conjunction with the Editorial Board are reviewed by the Associate Editors and two or more external reviewers. Acceptance by the Editor is based on the quality of the work as substantial contribution to the field and on the overall presentation of the manuscript.

SUBMISSION OF PAPERS

1. Manuscripts should be submitted to:

Angela	M.	Vianna-Morgante,	Editor-in-Chief
Genetics	and	Molecular	Biology
Rua Capitão	Adelmio	Norberto da	Silva, 736
14025-670 Ribeirão Preto, SP - Brazil			

2. A submission package sent to the Editorial Office must contain: a) A cover letter signed by all authors stating that they have approved the submission of the manuscript and that the findings have not been published or are not under consideration for publication elsewhere.

b) A hard copy of the manuscript, including original figures.

c) A copy of any unpublished or in-press companion articles referred to in the submission.

d) An electronic copy of the text, tables and figures. Formats for text are Word or RTF, in Windows platform. Images in TIFF or JPEG formats should be sent in separate files (For Figures, see detailed instructions in 3.1.h). Mailed disks must be labeled with the

first author's last name, platform and software (see detailed instructions below). Failure to adhere to these guidelines can delay the handling of your contribution and manuscripts may be returned before being reviewed.

3. Categories of Contribution 3.1. Research Articles

Manuscripts must be written in English in double-spaced, 12-point type throughout, including the References Cited section, appendices, tables and legends; printed on one side only of A4 paper with 2.5 cm margins; marked with consecutive page numbers, beginning with the cover page.

The following elements must start on a new page and be ordered as they are listed below:

a) **The title page** must contain: a concise and informative title; the authors' names (first name at full length); the authors' institutional affiliation, including department, institution, city, state or province and country; different affiliations indicated with superscript numbers; a short running title of about 35 characters, including spaces; up to five key words; the corresponding author's name, postal address, phone and fax numbers and email address. The corresponding author is the person responsible for checking the page proofs, arranging for the payment of color illustrations and author's alteration charges.

b) **The Abstract** must be a single paragraph that does not exceed 200 words and summarizes the main results and conclusions of the study. It should not contain references.

c) **The text** must be as succinct as possible. *Text citations*: articles should be referred to by authors' surnames and date of publication; citations with two authors must include both names; in citations with three or more authors, name the first author and use *et al.* List two or more references in the same citation in chronological order, separated by semi-colons. When two or more works in a citation were published in the same year, list them alphabetically by the first author surname. For two or more works by the same author(s) in a citation, list them chronologically, with the years separated by commas. (Example: Freire-Maia *et al.*, 1966a, 1966b, 2000). Only articles that are published or in press should be cited. In the case of personal communications or unpublished results, all contributors must be listed by initials and last name (*et al.* should not be used). *Numbers*: In the text, numbers nine or less must be written out except as part of a date, a fraction or decimal, a percentage, or a unit of measurement. Use Arabic numerals for numbers larger than nine. Avoid starting a sentence with a number. *Binomial Names*: Latin names of genera, species and intraspecific taxa in the text must be printed in italics; names of orders and families should appear in the Title and also when first mentioned in the text. URLs for programs, data or other sources should be listed in the Internet Resources Section, immediately after the References Section, not in the text. URLs for citations of publications in electronic journals should appear in the reference section.

The text includes the following elements:

Introduction - Description of the background that led to the study.

Material (or Subjects) and Methods - Details relevant to the conduct of the study. Statistical methods should be explained at the end of this section.

Results - Undue repetition in text and tables should be avoided. Comment on significance of results is appropriate but broader discussion should be part of the Discussion section.

Discussion - The findings of the study should be placed in context of relevant published data. Ideas presented in other publications should not be discussed solely to make an exhaustive presentation.

Some manuscripts may require different formats appropriate to their content.

d) **The Acknowledgments** must be a single paragraph that immediately follows the discussion and includes references to grant support.

e) **The References Section:** references must be ordered alphabetically by the first author surname; references with the same first author should be ordered as follows: first, as single author in chronological order; next, with only one more co-author in alphabetical order by the second author; and finally followed by references with more than two co-authors, in chronological order, independent of the second author surnames. Use standard abbreviations for journal titles. Only articles that are published or in press should be included in this section. Works submitted to a publication but not yet accepted, personal communications and unpublished data must be cited within the text. "Personal communication" refers to individuals other than the authors of the manuscript being submitted; "unpublished data" refers to data produced by at least one of the authors of the manuscript being submitted.

Sample journal article citation:

Breuer ME and Pavan C (1955) Behaviour of polytene chromosomes of *Rhynchosciara angela* at different stages of larval development. *Chromosoma* 7:371-386.

Yonenaga-Yassuda Y, Rodrigues MT and Pellegrino KCM (2005) Chromosomal banding patterns in the eyelid-less microteiid lizard radiation: The $X_1X_1X_2X_2:X_1X_2Y$ sex chromosome system in *Calyptommatus* and the karyotypes of *Psilophthalmus* and *Tretioscincus* (Squamata, Gymnophthalmidae). *Genet Mol Biol* 28:700-709.

Sample book citation:

Dobzhansky T (1951) *Genetics and Origin of Species*. 3rd edition. Columbia University Press, New York, 364 pp.

Sample chapter-in-book citation:

Crawford DC and Howard-Peebles PN (2005) Fragile X: From cytogenetics to molecular genetics. In Gersen SL and Keagle MB (eds) *The Principles of Clinical Cytogenetics*. 2nd edition. Humana Press, New Jersey, pp 495-513.

Sample electronic article citation:

Simin K, Wu H, Lu L, Pinkel D, Albertson D, Cardiff RD and Van Dyke T (2004) pRb inactivation in mammary cells reveals common mechanisms for tumor initiation and progression in divergent epithelia. *Plos Biol* 2:194-205. <http://www.plosbiology.org>.

f) **Internet Resources Section:** this section should contain a list of URLs referring to data presented in the text, software programs and other Internet resources used during data processing. When databases are cited, date of consultation must be stated.

Sample Internet resource citation:

Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM), <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/OMIM> (September 4, 2005)

LEM Software, http://dir.niehs.nih.gov/dirbb/weinbergfiles/hybrid_design.htm

g) **Tables:** each table must start on a new page. A concise title should be provided above the table. Tables must be numbered consecutively in Arabic numerals. Each column must have a title in the box head. Footnotes typed directly below the table should be indicated in lowercase superscript numbers.

h) **Figures** must be numbered consecutively in Arabic numerals. Legends should be typed on a separate sheet. A set of original illustrations of the highest quality must be provided in glossy paper. If you have created figures electronically submit them also as hard copies. Scanned figures should not be submitted. Images should be in TIFF or JPEG format and provided in separate files. Figures in Word format cannot be published. Journal quality reproduction will require grayscale and color at resolution yielding 300 dpi. Authors should submit bitmapped line art at resolution yielding 600-1200 dpi. These resolutions refer to the output size of the file; if it is anticipated that images will be enlarged or reduced, the resolutions should be adjusted accordingly. Identify each illustration by affixing on the back a label containing: the number of the figure, the name of the first author and an arrow indicating top of illustration. Illustrations supplied on disks must follow instructions in item 2 (Submission package). Color illustration can be accepted, but authors are asked to defray the cost. For costs of color figures, check with the Editorial Office.

i) **Nomenclature** should adhere to current international standards.

j) **Sequences** may appear in text or in figure. DNA, RNA and protein sequences equal to or greater than 50 units must be entered into public databases. The accession number must be provided and released to the general public together with publication of the article. Long sequences requiring more than two pages to reproduce will not be published unless the Editorial decision is that the publication is necessary. Complete mtDNA sequence will not be published.

k) **Data access:** reference should be made to availability of detailed data and materials used for reported studies.

l) **Ethical issues:** Reports of experiments on live vertebrates must include a brief statement that the institutional review board approved the work. For experiments involving human subjects, authors must also include a statement that informed consent

was obtained from all subjects. If photos or any other identifiable data are included, a copy of the signed consent must accompany the manuscript.

3.2 Short Communications

Present brief observations that do not warrant full-length articles. They should not be considered preliminary communications. They should be 15 or fewer typed pages in double spaced 12-point type, including literature cited. They should include an Abstract no longer than five percent of the paper's length and no further subdivision with introduction, material and methods, results and discussion in a single section. Up to two tables and two figures may be submitted. The title page and reference section format is that of full-length article.

3.3 Letters to the Editor

Relate or respond to recent published items in the journal. Discussions of political, social and ethical issues of interest to geneticists are also welcome in this form.

3.4 Review Articles

Review Articles are welcome.

3.5 Book Reviews

Publishers are invited to submit books on Genetics, Evolution and related disciplines, for review in the journal. Aspiring reviewers may propose writing a review.

3.6 History, Story and Memories

Accounts on historical aspects of Genetics relating to Brazil.

4. Proofs Page proofs will be sent to the corresponding author. Changes made to page proofs, apart from printer's errors, will be charged to the authors. Notes added in proof require Editorial approval.

5. Reprints Reprints are free of charge and provided as a pdf-file.