Nathália Fernandes de Azevedo

**Evolução cromossômica em mamíferos:
Estudos comparativos por pintura
cromossômica em duas espécies de
preguiças da família Bradypodidae e em
duas espécies de marsupiais da família
Didelphidae**

Tese apresentada ao Instituto de
Biociências da Universidade de São
Paulo, para a obtenção de Título de
Doutor em Ciências, na Área de Biologia
(Genética)

São Paulo

2009

Nathália Fernandes de Azevedo

**Evolução cromossômica em mamíferos:
Estudos comparativos por pintura
cromossômica em duas espécies de
preguiças da família Bradypodidae e em
duas espécies de marsupiais da família
Didelphidae**

Tese apresentada ao Instituto de
Biociências da Universidade de São
Paulo, para a obtenção de Título de
Doutor em Ciências, na Área de Biologia
(Genética)

Orientadora: Angela M. Vianna Morgante

São Paulo

2009

AZEVEDO, NATHÁLIA FERNANDES

Evolução cromossômica em mamíferos:
Estudos comparativos por pintura
cromossômica em duas espécies de preguiças
da família Bradypodidae e em duas espécies
de marsupiais da família Didelphidae
94 pág.

Tese de Doutorado - Instituto de Biociências
da Universidade de São Paulo Departamento
de Genética e Biologia Evolutiva

1. Xenarthra. 2. Bradypodidae. 3. Didelphidae.
4. Preguiça. 5. Marsupial. 6. Pintura
cromossômica. 7. Cariótipo ancestral.

Comissão Julgadora:

Orientadora

**Este trabalho foi realizado com os auxílios financeiros da FAPESP
concedidos à orientadora e à aluna.**

**Aos meus pais, meus irmãos e
ao Bruno, dedico esta tese.**

“Success consists of going from failure to failure without loss of enthusiasm.”

Winston Churchill

AGRADECIMENTOS

Ao Bruno por sempre confiar em mim, me apoiando e dando força nas horas mais difíceis;

Aos meus pais pelo amor e dedicação em todos os momentos, por terem sempre me incentivado e por serem meus exemplos de moral;

Aos meus irmãos Lígia e Danilo, pelo companheirismo e apoio;

À. Angela pela sua orientação, confiança e apoio;

À Marta pelo auxílio constante na realização deste trabalho e pela ajuda e incentivo no início da minha carreira acadêmica;

À Maraisa pela ajuda ao longo de todo o desenvolvimento do projeto e na revisão, montagem e impressão da tese;

À Lígia e à Silvia sempre prestativas no auxílio com as culturas de células;

À Nadia pelas discussões proveitosas;

À Andrea pela obtenção do material utilizado no projeto;

Aos colegas do Laboratório de Genética Humana: Adriano, Ana Carla, Ana Carolina, Ana Cristina, Fernando, Jacaré, José, Karen, Larissa, Lilian, Luciana, Luiz, Rafaella, Sarita, Sylvie, e Teresa; pela contribuição no meu desenvolvimento científico e pessoal;

Aos técnicos do laboratório de Genética Humana: Fátima, Mara e Paulo Rogério por estarem sempre dispostos a ajudar;

À Cris e ao Fred pela amizade e disposição no desenvolvimento da técnica de microdissecção cromossômica e pelas discussões sobre citogenética animal;

Aos grandes e verdadeiros amigos: Felipe, Marcella C., Marcella S, Renata, Rodrigo, Tiago e Vanessa, pela cumplicidade em todos os momentos;

A toda a minha família, avós, tios, primos, sogros e cunhado pelo carinho e por estarem sempre presentes;

À FAPESP pela bolsa concedida;

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para este trabalho.

ÍNDICE

I. INTRODUÇÃO.....	1
1. GRUPOS BASAIS DE MAMÍFEROS.....	3
2. ESTUDOS CROMOSSÔMICOS COMPARATIVOS EM MAMÍFEROS.....	12
3. EVOLUÇÃO CAROTÍPICA EM MAMÍFEROS.....	32
II. OBJETIVOS.....	35
III. MATERIAL E MÉTODOS.....	36
1. MATERIAL.....	36
2. MÉTODOS.....	37
IV. RESULTADOS.....	41
1. COMPARAÇÃO ENTRE OS CROMOSSOMOS HUMANOS E OS CROMOSSOMOS DAS PREGUIÇAS <i>Bradypus torquatus</i> E <i>Bradypus variegatus</i>	41
2. COMPARAÇÃO ENTRE OS CROMOSSOMOS X DAS PREGUIÇAS (<i>Bradypus</i> <i>torquatus</i> E <i>Bradypus variegatus</i>).....	53
3. COMPARAÇÃO DOS CROMOSSOMOS X ENTRE DUAS ESPÉCIES DE MARSUPIAIS AMERICANOS.....	55
V. DISCUSSÃO.....	57
1. EVOLUÇÃO CAROTÍPICA EM XENARTHRA – EVIDÊNCIAS A PARTIR DE ESTUDOS COMPARATIVOS ENTRE OS CROMOSSOMOS HUMANOS E OS DE ESPÉCIES DE XENARTHRA.....	57
2. COMPARAÇÃO ENTRE OS CROMOSSOMOS X DAS PREGUIÇAS (<i>Bradypus</i> <i>torquatus</i> E <i>Bradypus variegatus</i>).....	69
3. COMPARAÇÃO ENTRE OS CROMOSSOMOS X DE DUAS ESPÉCIES DE MARSUPIAIS AMERICANOS	70
VI. SUMÁRIO E CONCLUSÕES.....	72
VII. ABSTRACT.....	75
VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	77

INTRODUÇÃO

I. INTRODUÇÃO

A classe dos mamíferos é dividida em duas subclasses, Prototheria (composta pela ordem Monotremata, com uma espécie de ornitorrinco e quatro espécies de equidnas) e Theria, que por sua vez é dividida em duas infraclases, Metatheria (marsupiais) e Eutheria (mamíferos placentários) (Myers *et al.*, 2008). Estima-se que a divergência dos monotremados tenha ocorrido há cerca de 160 milhões de anos (m.a.) e a dos marsupiais há aproximadamente 145 m.a (Bininda-Emonds *et al.*, 2007). O surgimento dos mamíferos placentários é estimado, com base em dados moleculares, em cerca de 100 m.a. atrás, no Cretáceo e a diversificação da maioria das ordens atuais deve ter ocorrido por volta de 85 m.a. (Eizirik *et al.*, 2001; Springer *et al.*, 2003; Bininda-Emonds *et al.*, 2007; Hallström & Janke, 2008).

Apesar de as relações filogenéticas entre as ordens de mamíferos placentários serem muito debatidas, a divisão do grupo em quatro clados supraordinais (revisão em Springer *et al.*, 2004) está se tornando consenso (Figura 1.1). Essa classificação é sugerida por dados moleculares de sequenciamento de DNA nuclear e mitocondrial e por alterações genômicas raras (Scally *et al.*, 2001; Murphy *et al.*, 2001a, 2001b; Delsuc *et al.*, 2002; Murphy *et al.*, 2004; Springer *et al.*, 2004; Kriegs *et al.*, 2006). As supraordens de Eutheria são representadas por quatro clados, dois com origem no hemisfério sul (Gondwana) - Afrotheria (que inclui seis ordens, Tubulidentata, Macroscelidae, Afrosoricida, Sirenia, Hyracoidea e Proboscidea) e Xenarthra (com duas ordens, Pilosa e Cingulata) - e dois clados do norte (Laurasia) - Euarchontoglires (constituído pelas ordens Dermoptera, Scadentia, Primata, Rodentia e Lagomorpha) e Laurasiatheria (que inclui as ordens Eulipotyphla, Carnivora, Pholidota, Cetartiodactyla, Perissodactyla e Chiroptera) (Springer *et al.*, 2004).

Figura I.1 - Árvore filogenética molecular dos mamíferos, destacando os quatro clados supraordinais de Eutheria (modificado de Springer *et al.*, 2004).

1. GRUPOS BASAIS DE MAMÍFEROS

1.1. MARSUPIAIS

O grupo dos marsupiais, com aproximadamente 280 espécies atuais, possui distribuição restrita ao continente americano e à Australásia. Das 18 famílias existentes 15 são australianas e apenas três americanas (Didelphidae, Microbiotheriidae e Caenolestidae). Dentre essas, Didelphidae, que apresenta distribuição mais ampla e possui mais de 80 espécies em 17 gêneros, é a única que ocorre no Brasil (Wilson & Reeder, 2005). Estima-se que a divergência dos marsupiais australianos e americanos tenha ocorrido há aproximadamente 69 m.a. (Nilsson *et al.*, 2004).

ESTUDOS CROMOSSÔMICOS NOS MARSUPIAIS

Por possuírem pequeno número diplóide e cromossomos grandes em relação aos outros mamíferos os marsupiais representam um material precioso em estudos citogenéticos. Uma grande variação no número diplóide ocorre no grupo, indo de $2n=10$ em *Pseudocheirus cupreus* a $2n=32$ em *Aepyprymus rufescens* (Hayman, 1990). No entanto, para as famílias americanas apenas três números diplóides foram descritos: $2n=22$, $2n=18$ e $2n=14$; a família Didelphidae é a única que apresenta os três números cromossômicos e todas as espécies de Microbiotheriidae e Caenolestidae têm $2n=14$ (revisão em Svartman, 1998). Svartman & Vianna-Morgante (1999) compararam os cariótipos dos três números diplóides descritos em Didelphidae com técnicas de bandamento G, C e hibridação *in situ* fluorescente (FISH). Foi observada total homologia entre os braços cromossômicos de espécies com diferentes números diplóides, confirmando o papel dos rearranjos Robertsonianos na evolução cariotípica dos marsupiais.

Um “cariótipo básico ancestral” de $2n=14$ foi proposto para os marsupiais, devido à preponderância desse número diplóide em espécies de quase todas as famílias, além da conservação no padrão de banda G nas diferentes espécies que apresentam esse número diplóide (Reig *et al.*, 1977; Rofe & Hayman, 1985; Hayman, 1990; Rens *et al.*, 2001). Um modelo diferente foi proposto por Sharman (1973), no qual fusões Robertsonianas

desempenhariam um papel primordial na evolução cariotípica de marsupiais, considerando $2n=14$ um complemento derivado e não ancestral. A partir da comparação dos padrões de banda G dos marsupiais americanos da família Didelphidae e da observação de seqüências teloméricas intersticiais em cinco autossomos da espécie *Marmosops incanus* ($2n=14$) e em um par autossômico de *Monodelphis domestica* ($2n=18$) foi sugerido para os marsupiais americanos um cariótipo ancestral de $2n=22$, que teria originado os demais números diplóides por fusões cêtricas (Svartman & Vianna-Morgante, 1998).

Quanto aos cromossomos sexuais, os marsupiais apresentam algumas características citológicas interessantes. O pequeno tamanho do cromossomo Y, puntiforme em muitas espécies e do cromossomo X, representando 3% do genoma, em relação aos 5% do cromossomo X dos eutérios (Hayman *et al.*, 1982). O cromossomo Y é completamente diferenciado e geneticamente isolado do X; esses cromossomos não possuem regiões pseudoautossômicas e não ocorre recombinação entre eles na meiose (Sharp, 1982; Hayman, 1990; Page *et al.*, 2005). Devido a essa diferenciação genética, os cromossomos sexuais não formam complexos sinaptonêmicos durante a Prófase I nos machos e uma estrutura especial, a placa densa, funciona como um mecanismo eficiente que garante a associação entre esses cromossomos não homólogos durante a meiose (Sharp, 1982, Page *et al.*, 2005; Page *et al.*, 2006). Além disso, a inativação do X é tecido-específica, paterna e incompleta, algumas espécies apresentam regiões organizadoras de nucléolos (NOR) no cromossomo X, que permanecem ativas nos dois cromossomos da fêmea (Hayman, 1990). Os cromossomos X dos marsupiais americanos são particularmente interessantes, pois apresentam grande variação no tamanho, o que tem clara correlação com o seu conteúdo de heterocromatina constitutiva (Svartman & Vianna-Morgante, 1999).

Estudos de mapeamento gênico no grupo vêm sendo realizados há décadas e os resultados mais interessantes foram obtidos com o mapeamento de genes do X humano. Genes localizados no braço longo e região pericentromérica do X humano foram mapeados também no X dos marsupiais, porém genes do braço curto do X humano, distais a Xp 11.23, foram mapeados nos autossomos desses animais (revisão em Wilcox *et al.*, 1996). Esses resultados vão contra a proposta de conservação do cromossomo X em

mamíferos (Ohno, 1967), já que apenas parte desse cromossomo mostra-se conservada no grupo.

O marsupial americano *Monodelphis domestica* teve o seu genoma sequenciado e uma versão anotada da sequência (MonDom 4) está disponível no banco de dados *Ensembl* (www.ensembl.org). A análise do seu genoma revelou uma alta identidade das sequências codificadoras com espécies de Eutheria (Mikkelsen *et al.*, 2007).

1.2. GRUPOS BASAIS DE MAMÍFEROS PLACENTÁRIOS

Apesar de a grande maioria dos estudos concordarem com a divisão das ordens de Eutheria em quatro clados supraordinais, ainda há muita controvérsia em relação a qual grupo comporia a base da árvore filogenética dos mamíferos placentários. Filogenias baseadas em dados morfológicos geralmente colocam Xenarthra nessa posição, assim como alguns estudos moleculares (Shoshani & Mckenna, 1998). Uma segunda proposta, apoiada por dados moleculares, sugere Afrotheria na posição mais basal do grupo (Murphy *et al.*, 2001a; Waddell *et al.*, 2001; Scally *et al.*, 2001; Amrine-Madsen *et al.*, 2003; Nikolaev *et al.*, 2007; Nishihara *et al.*, 2007). Uma terceira hipótese, apoiada por estudos moleculares e de filogenômica, considera Afrotheria e Xenarthra como grupos-irmãos, formando o clado Atlantogenata, que estaria na base da árvore filogenética de Eutheria (Waddell *et al.*, 1999; Madsen *et al.*, 2001; Delsuc *et al.*, 2002; Lin *et al.*, 2002; Hallström *et al.*, 2007; Murphy *et al.*, 2007; Waters *et al.*, 2007; Prasad *et al.*, 2008).

Tanto Xenarthra como Afrotheria surgiram há aproximadamente 100 m.a. (Eizirik *et al.*, 2001; Delsuc *et al.*, 2004), o que coincide com a data da separação da América do Sul (onde os Xenarthra se originaram) e da África (onde os Afrotheria se originaram). Assim, foi proposta uma conexão causal entre os eventos tectônicos e a diversificação dos mamíferos placentários (Murphy *et al.*, 2001b; Springer *et al.*, 2004; Wildman *et al.*, 2007).

1.2.1. AFROTHERIA

O clado supraordinal Afrotheria reúne seis ordens de Eutheria de origem africana e só passou a ser reconhecido após estudos moleculares (Springer *et al.*, 1997; Stanhope *et al.*, 1998). Dados citogenéticos, de filogenômica, de sequenciamento nuclear e mitocondrial apóiam essa classificação (Stanhope *et al.*, 1998, Springer *et al.*, 1999; Murphy *et al.*, 2001a, 2001b; Yang *et al.*, 2003; Svartman *et al.*, 2004; Kellogg *et al.*, 2007). No âmbito morfológico, ainda há pouca evidência que Afrotheria seja um agrupamento natural, já que reúne espécies pertencentes a diferentes ordens das classificações morfológicas (Ungulata, Tubulidentata, Macroscelidea e Lipotyphla). A hipótese inicial foi que um focinho móvel constituiria um traço morfológico sinapomórfico de Afrotheria, mas essa estrutura aparentemente não é homóloga entre as diferentes linhagens (Whidden, 2002). Mais recentemente uma série de similaridades para essas ordens, como morfologia da placenta, erupção tardia da dentição permanente, características vertebrais, entre outras, foram identificadas e propostas como sinapomorfias não moleculares dos Afrotheria (Carter *et al.*, 2004, 2006; Sánchez-Villagra *et al.*, 2007; Asher & Lehmann, 2008).

1.2.2. XENARTHRA

O grupo dos Xenarthra compreende duas ordens (1) Cingulata - composta por uma família, Dasypodidae, que inclui 21 espécies de tatu; e (2) Pilosa, composta por quatro famílias – Cyclopedidae e Myrmecophagidae, que incluem quatro espécies de tamanduá, e Bradypodidae e Megalonychidae, com seis espécies de preguiças (Wilson & Reeder, 2005).

A monofilia de Xenarthra é apoiada por dados morfológicos e moleculares (Engelman, 1985; Murphy *et al.*, 2001a, 2001b; Delsuc *et al.*, 2001, 2002; Möller-Krull *et al.*, 2007). A principal sinapomorfia morfológica do grupo é a presença das vértebras xenártricas, articulações adicionais entre vértebras dorsais e lombares, que dão o nome ao grupo (Glass, 1985).

Os Xenarthra surgiram na América do Sul (Gondwana) há aproximadamente 100 m.a. e a radiação do grupo ocorreu há cerca de 65 m.a., quando a América do Sul era um continente isolado (Delsuc *et al.*, 2004). Esse

isolamento foi essencial para o desenvolvimento de formas extremamente especializadas, que ocuparam uma grande variedade de nichos ecológicos. O grupo foi muito numeroso, com mais de 200 gêneros fósseis descritos, até o final do Pleistoceno, há cerca de 10.000 anos, quando a diversidade de Xenarthra diminuiu após evento dramático de extinção em massa que ocorreu nesse período (Patterson & Pascual, 1972). Os tatus representam a linhagem mais antiga e diversificada atualmente e sua divergência dos Pilosa é estimada em 65 m.a. As linhagens dos tamanduás e das preguiças se separaram há cerca de 55 m.a. (Delsuc *et al.*, 2004).

AS PREGUIÇAS

As preguiças atuais estão agrupadas em duas famílias (Wilson & Reeder, 2005). (1) Megalonychidae - família das preguiças de dois dedos nos membros anteriores. Atualmente composta por um único gênero, *Choloepus* e duas espécies, *C. hoffmanni* e *C. didactylus* (preguiça real). Essa família está restrita às florestas neotropicais úmidas da América Central e do norte da América do Sul (Wetzel, 1985). (2) Bradypodidae - família das preguiças de três dedos nos membros anteriores. Composta pelo gênero *Bradypus*, que compreende quatro espécies: (a) *B. variegatus* (preguiça comum ou de óculos) encontrada na Amazônia e nas regiões brasileiras de Mata Atlântica, caatinga e cerrado; (b) *B. torquatus* (preguiça de coleira), endêmica da Mata Atlântica brasileira; (c) *B. tridactylus* (preguiça de três dedos), encontrada na Amazônia (Wetzel, 1985) e (d) a recentemente identificada *B. pygmaeus* (preguiça-anã), endêmica da ilha Escudo de Veraguas, no arquipélago de Boca Del Toro, na costa caribenha do Panamá (Anderson e Handley Jr, 2001).

As duas famílias de preguiças divergiram há cerca de 20 m.a. (Delsuc *et al.*, 2004). Uma origem difilética para *Choloepus* e *Bradypus* foi proposta por alguns autores, com base em diferenças comportamentais, fisiológicas, morfológicas e moleculares, sugerindo que as aparentes similaridades entre as preguiças de três e dois dedos são, na verdade, consequência de paralelismo e que o modo de vida arboreal deve ter evoluído duas vezes no grupo (Höss *et al.*, 1996; Greenwood *et al.*, 2001).

Barros *et al.* (2003) estimaram, com base em dados de sequenciamento do DNA 16S mitocondrial, em apenas 400 mil anos a divergência entre as espécies *B. tridactylus* e *B. variegatus* e em 8 m.a. o tempo de divergência dessas duas espécies de *B. torquatus*. Com isso, os autores sugeriram que o status taxonômico da família deveria ser revisado e *B. torquatus* incluído em um gênero distinto. Na verdade, essa espécie já foi considerada em um gênero próprio (*Scaepus*), devido a diferenças anatômicas (Wetzel e Ávila-Pires, 1980).

Moraes-Barros (comunicação pessoal) analisou preguiças de coleções de museus e observou que comumente indivíduos de *B. variegatus* eram erroneamente identificados como *B. tridactylus*. Esse tipo de erro foi detectado em 27% dos indivíduos analisados, a maioria proveniente da região central do Norte do Brasil, onde essas duas espécies são simpátricas. Uma filogenia molecular foi, então, construída para as preguiças que tiveram sua identificação revisada morfolologicamente, indicando um tempo de divergência, entre *B. tridactylus* e *B. variegatus*, de aproximadamente 6 m.a. O tempo de divergência de 400 mil anos, estimado para essas duas espécies por Barros *et al.* (2003), é similar aos observados por Moraes-Barros para algumas linhagens mitocondriais de *B. variegatus*. Essa diferença de resultados deve ser explicada pela identificação errônea dos exemplares classificados como *B. tridactylus* no estudo de Barros *et al.* (2003).

Estudos mitocondriais também indicaram uma alta diversidade genética intraespecífica entre populações de diferentes regiões geográficas das espécies *B. variegatus* e *B. torquatus* (Moraes-Barros *et al.*, 2006; Moraes-Barros *et al.*, 2007). Os autores sugeriram que dois grupos filogeográficos principais existem na Mata Atlântica, um ao norte (Sudeste da Bahia para *B. torquatus* e Sudeste da Bahia e Teófilo Otoni, Minas Gerais, para *B. variegatus*) e outro ao sul (Espírito Santo, para *B. torquatus* e São Paulo, para *B. variegatus*).

De acordo com a lista oficial do IBAMA (MMA, IN nº3) e a lista vermelha da União Internacional para a Conservação da Natureza e dos Recursos Naturais (IUCN *Red List of Threatened species*, 2004), *B. torquatus* é uma espécie ameaçada de extinção devido à degradação da sua área de ocorrência, a Mata Atlântica.

ESTUDOS CROMOSSÔMICOS EM XENARTHRA

Apesar de os dados moleculares no grupo dos Xenarthra se acumularem rapidamente (Delsuc *et al.*, 2001, 2002, 2004; Barros *et al.*, 2003; Moraes-Barros *et al.*, 2006, 2007; Moller-Krull *et al.*, 2007) os seus cromossomos ainda são pouco estudados. A maioria dos cariótipos de espécies do grupo foram estudados apenas após coloração convencional (Jorge *et al.*, 1978; Barroso & Seuanez, 1991; Pereira *et al.*, 2004). O número diplóide em Xenarthra varia de $2n=38$ no tatu *Tolypeutes matacus* a $2n=65$ na preguiça *Choloepus didactylus* (Jorge *et al.*, 1977; Dobigny *et al.*, 2005). A comparação do padrão de bandas em Xenarthra é dificultada pelo pequeno tamanho da maioria dos seus cromossomos, ficando evidente a importância da utilização de outras técnicas citogenéticas para a análise da evolução cromossômica no grupo (Lizarralde *et al.*, 2005; Dobigny *et al.*, 2005; Svartman *et al.*, 2006; Yang *et al.*, 2006).

Nos tamanduás o número diplóide varia de $2n=54$ a $2n=64$, enquanto que nos tatus esse número vai de $2n=38$ a $2n=64$ (Jorge *et al.*, 1977; Pereira *et al.*, 2004; Lizarralde *et al.*, 2005). Lizarralde *et al.* (2005) estudaram os cromossomos de quatro espécies de tatus da família Dasypodidae (*Dasypus hybridus* $2n=64$, *Chaetophractus vellerosus* $2n=62$, *C. villosus* $2n=60$ e *Zaedyus pichiy* $2n=62$) pela hibridação com sondas contendo sequências teloméricas. Foi verificada a presença de telômero intersticial em duas espécies (*C. villosus* e *Z. pichiy*) e os autores sugeriram que esses sinais representem processos de fusão cromossômica entre acrocêntricos, resultado que apóia a hipótese de que a evolução cromossômica na família ocorreu no sentido da redução no número diplóide.

ESTUDOS CROMOSSÔMICOS EM PREGUIÇAS

A primeira descrição de um cariótipo de preguiça foi realizada por Corin-Frédéric (1969), que estudou por coloração convencional os cromossomos de *Choloepus hoffmanni*, descrevendo um número diplóide de 49 cromossomos, com uma provável translocação Y-autossomo nos machos. Os cariótipos descritos para o gênero *Choloepus* variam de $2n=49$ a $2n=65$, o que pode corresponder a espécies crípticas ainda não identificadas (Jorge, 1981; Jorge

et al., 1985; Kovacs *et al.*, 2001; Dobigny *et al.*, 2005; Svartman *et al.*, 2006). Mais recentemente Dobigny *et al.* (2005) apresentaram o cariótipo de um macho de *C. didactylus*, após bandamento G, revelando um número diplóide de 65 cromossomos, com uma translocação Y-autossomo. Svartman *et al.* (2006) estudaram os cromossomos de um indivíduo de *C. hoffmanni*, verificando um número diplóide de $2n=50$. Claramente a situação cariotípica no gênero ainda não está definida e estudos adicionais de taxonomia e citogenética precisam ser realizados.

Para o gênero *Bradypus* os números diplóides estão mais bem definidos. Os cromossomos de *Bradypus variegatus* foram estudados após coloração convencional (Jorge *et al.*, 1985), bandamento G e C e coloração Ag-NOR (Goldschmidt & Almeida, 1993; Goldschmidt *et al.*, 1995; Manchester, 2005). Em todos os estudos o número diplóide foi de $2n=54$. Jorge *et al.* (1985) descreveram o cromossomo Y da espécie como sendo de tamanho diminuto, enquanto que Goldschmidt & Almeida (1993) e Manchester (2005) descreveram esse cromossomo como um submetacêntrico de tamanho médio. A coloração Ag-NOR revelou que as regiões organizadoras de nucléolos (NOR) estavam restritas a um par autossômico (Goldschmidt *et al.*, 1995; Manchester, 2005), o que foi confirmado pela FISH com sonda de rDNA (Manchester, 2005). A banda C evidenciou heterocromatina constitutiva nas regiões pericentroméricas de todos os cromossomos, o menor autossomo completamente heterocromático e blocos de heterocromatina flanqueando a constrição secundária do cromossomo portador da NOR (Goldschmidt & Almeida, 1993; Manchester, 2005).

Os cromossomos de *Bradypus torquatus* também foram estudados por coloração convencional (Jorge & Pinder, 1990), bandamento G e C e coloração Ag-NOR (Goldschmidt *et al.*, 1995; Manchester, 2005). O cariótipo descrito por Manchester (2005), após bandamento G é semelhante ao descrito por Jorge & Pinder (1990), após coloração convencional, com $2n=50$; a principal diferença encontrada se refere ao cromossomo Y, descrito como metacêntrico por Jorge & Pinder (1990) e como acrocêntrico por Manchester (2005). O bandamento C revelou a presença de heterocromatina constitutiva nas regiões pericentroméricas de todos os cromossomos e blocos de heterocromatina intersticiais foram verificados em dois pares de autossomos (Manchester,

2005). A coloração Ag-NOR apresentou variação nas metáfases analisadas, os autores observaram de 5 a 12 cromossomos marcados (Goldschmidt *et al.*, 1995; Manchester, 2005). Já, a FISH com sonda de rDNA revelou a presença de sinais em apenas quatro pares de autossomos (Manchester, 2005).

Na espécie *Bradypus tridactylus*, análises, após coloração convencional e bandamentos G e C revelaram um número diplóide de $2n=52$ (Jorge, 1981; Dobigny *et al.*, 2005). Dobigny *et al.* (2005) descreveram o padrão de bandamento C da espécie, mostrando que quase todos os cromossomos possuem heterocromatina constitutiva nas regiões pericentroméricas, sendo o menor cromossomo quase inteiramente heterocromático.

Não há descrição na literatura do cariótipo da preguiça *B. pygmaeus*.

Manchester (2005) comparou os padrões de banda G dos cariótipos das espécies *B. variegatus* e *B. torquatus* com o cariótipo de *B. tridactylus* e *C. didactylus* descritos por Dobigny *et al.* (2005) e ressaltaram, (1) que alguns cromossomos conservavam o padrão de bandas nas quatro espécies de preguiças; (2) que os cromossomos de *C. didactylus* eram os mais diferentes entre as quatro espécies analisadas; e (3) que dentro do gênero *Bradypus*, *B. variegatus* e *B. tridactylus* apresentaram os cariótipos mais semelhantes.

Os ambientes em que as preguiças habitam vêm sendo cada vez mais degradados, o que representa ameaça à sua sobrevivência. Com isso, programas de conservação e manejo desses animais se tornam importantes e para isso é fundamental o estudo citogenético. A caracterização cromossômica do grupo pode identificar novas espécies, além de fornecer dados para a formação de pares de acasalamento que originem prole viável e fértil.

2. ESTUDOS CROMOSSÔMICOS COMPARATIVOS EM MAMÍFEROS

Estudos cromossômicos comparativos em espécies de mamíferos são realizados há décadas. Já em 1964, Ohno *et al.* apontaram a alta conservação do cromossomo X em diferentes espécies de mamíferos placentários. Com o desenvolvimento das técnicas de bandamento cromossômico e de citogenética comparativa foi possível verificar que essa alta conservação não estava restrita a esse cromossomo e que mamíferos pertencentes a diferentes famílias ou ordens compartilhavam autossomos conservados (Buckland & Evans, 1978; Dutrillaux, 1979; Dutrillaux & Couturier, 1983; Petit *et al.*, 1984). No entanto, esse tipo de análise apresentava certas limitações, uma vez que a comparação de cromossomos pequenos era particularmente difícil e na maioria das vezes não era possível a determinação da homologia de cariótipos completos, principalmente entre espécies distantes filogeneticamente. Com isso, experimentos de mapeamento gênico comparativo foram realizados para alguns grupos (O'Brien & Graves, 1991), permitindo a confirmação e refinamento dos mapas de homologia construídos a partir das interpretações dos estudos comparativos de bandamento cromossômico. Os primeiros estudos de mapeamento gênico eram trabalhosos e consumiam muito tempo, de modo que não era possível realizar uma abordagem em larga escala.

Com o desenvolvimento da técnica de pintura cromossômica, que consiste em uma FISH com sondas cromossomo específicas, comparações interespecíficas tornaram-se muito mais eficazes e refinadas, permitindo a identificação de sintenias conservadas e de rearranjos intercromossômicos, envolvendo segmentos de até 5 Megabases (Mb) em espécies de diferentes ordens de Eutheria (Schertan *et al.*, 1994). Aliada ao bandamento cromossômico, a pintura constitui ferramenta importante na obtenção de mapas de homologia (García *et al.*, 2000; Yang *et al.*, 2003; Svartman *et al.*, 2006).

2.1. A PINTURA CROMOSSÔMICA NA COMPARAÇÃO DOS CROMOSSOMOS DE MAMÍFEROS

A técnica de pintura cromossômica foi introduzida por Lichter *et al.* (1988) no estudo dos cromossomos humanos. Em seguida, a técnica passou a ser aplicada na comparação dos cromossomos humanos com os cromossomos de outras espécies de primatas (Wienberg *et al.*, 1990; Jauch *et al.*, 1992), evidenciando a eficiência da pintura cromossômica na demonstração de blocos de sentença conservados entre espécies, podendo validar correspondências propostas por comparações de padrões de bandas. A delimitação das homologies entre os complementos cromossômicos de vários primatas por essa técnica foi inicialmente possível devido ao alto grau de similaridade molecular entre os genomas das espécies desse grupo. Melhoramentos metodológicos permitiram que a pintura cromossômica comparativa pudesse ser estendida a espécies pertencentes a outras ordens de mamíferos (Zoo-FISH). O primeiro estudo desse tipo foi realizado por Scherthan *et al.* (1994) com a hibridação de bibliotecas de cromossomos humanos em preparações metafásicas de camundongo, cervo indiano e baleia.

O método mais utilizado para a obtenção de sondas para a pintura cromossômica é o *flow sorting*, que consiste na separação dos cromossomos de um cariótipo por citometria de fluxo, de acordo com o seu tamanho e conteúdo de bases (AT e GC) (Ferguson-Smith *et al.*, 2005). No entanto, o alto custo do equipamento e a necessidade de técnicos treinados para manipulá-lo faz com que essa técnica esteja disponível apenas em uma minoria dos laboratórios de citogenética. O *flow sorting* também exige a obtenção de culturas de células de boa qualidade, o que, dependendo da amostra, pode não ser possível. Outra limitação é que para os cariótipos de algumas espécies, geralmente com cromossomos muito semelhantes ou pequenos, a separação não é eficiente. A microdissecção surge, então, como um método alternativo mais trabalhoso, mas que pode suprir limitações do *flow sorting*. O método foi desenvolvido na década de 80 em análises de cromossomos politênicos de *Drosophila* e foi rapidamente aplicado aos genomas de mamíferos (Fan, 2002). A microdissecção consiste na raspagem do cromossomo ou região cromossômica alvo com uma microagulha, controlada por micromanipulador,

seguida da coleta do material em meio adequado (Weimer *et al.*, 1999). No entanto, a quantidade de cromossomos recolhidos por essa técnica é relativamente menor, o que gera sondas de qualidade mais baixa em relação às geradas por *flow sorting* e que, geralmente, não são funcionais quando aplicadas a grupos distantes filogeneticamente. Nos dois casos, o material obtido é amplificado e marcado em uma reação de DOP-PCR (*Degenerate Oligonucleotide-Primed Polymerase Chain Reaction*), como descrito por Telenius *et al.* (1992). As sondas podem, então, ser utilizadas em experimentos de FISH e irão hibridar com sequências complementares ao longo dos cromossomos, revelando as regiões de homologia.

A pintura cromossômica é uma técnica simples e reproduzível e os resultados são visíveis imediatamente, permitindo a delineação de blocos conservados entre espécies mesmo em cromossomos que não compartilham qualquer semelhança morfológica ou quanto ao padrão de bandas (Wienberg & Stanyon, 1997; Svartman *et al.*, 2006; Yang *et al.*, 2006; Huang *et al.*, 2008). A técnica permite construir rapidamente mapas comparativos de homologia cromossômica entre espécies, que fornecem informações para a compreensão da organização dos genomas de mamíferos e contribuem para a identificação de potenciais segmentos genômicos ancestrais (Chowdhary *et al.*, 1998; Yang *et al.*, 2003; Wienberg, 2004; Ferguson-Smith & Trifonov, 2007).

Apesar do potencial, a pintura cromossômica apresenta limitações. A sua resolução é de aproximadamente 5 Mb, falhando na identificação de pequenas regiões de homologia (Schertan *et al.*, 1994). Também não é possível a determinação da orientação do segmento conservado e nem a detecção de rearranjos intracromossômicos, como inversões ou inserções, que possam ter ocorrido nesses blocos (Wienberg & Stanyon, 1995; Stanyon *et al.*, 2001; Cardone *et al.*, 2002). Além disso, a pintura cromossômica só é bem sucedida entre espécies cujos genomas tenham divergido há até 105 m.a., assim, não é possível a pintura entre espécies de Eutheria e espécies pertencentes a outros grupos de mamíferos, como os marsupiais e os monotremados ou outros vertebrados (Ferguson-Smith & Trifonov, 2007). Isso deve ocorrer devido ao alto grau de reorganização dos genomas das espécies desses grupos distantes, como pode ser verificado na comparação entre os

genomas do marsupial *M. domestica* e o humano, disponível no *Ensembl*, em que fica evidente o embaralhamento dos segmentos sintênicos.

As soluções atuais para superar as limitações da técnica consistem no mapeamento de sequências únicas e na comparação entre genomas sequenciados. Por exemplo, a comparação entre os cromossomos do ornitorrinco (Monotremata) com os humanos e os da galinha foi realizada a partir do mapeamento de segmentos clonados em cromossomos artificiais de bactéria (BAC) (Rens *et al.*, 2007). Já, um mapa de homologia entre os cromossomos do marsupial *Monodelphis domestica* e os cromossomos humanos foi construído a partir da comparação de seus genomas *in silico* e está disponível no banco de dados *Ensembl*. No entanto, essas técnicas alternativas são mais trabalhosas e caras, além de estarem restritas a uma quantidade relativamente pequena de espécies. A pintura cromossômica, portanto, permanece como uma abordagem universal, que pode ser aplicada a uma grande quantidade de espécies, representando uma ferramenta efetiva no estudo da evolução dos cariótipos de Eutheria.

Alguns experimentos de pintura cromossômica também representam alternativas para as limitações da técnica. Por exemplo, a utilização de sondas cromossomo específicas provenientes de espécies com números diplóides altos, como os cães, permite a geração de mapas de homologia cromossômica de maior resolução, uma vez que esses cariótipos permitem a construção de sondas contendo segmentos menores do genoma (Müller *et al.*, 1998; Yang *et al.*, 1999). A pintura cromossômica recíproca, em que as sondas correspondentes aos cromossomos de uma espécie são aplicadas aos cromossomos de outra espécie e vice-versa, também é uma alternativa, que permite a identificação mais exata dos segmentos cromossômicos homólogos e pode fornecer informações a respeito dos pontos de quebra dos rearranjos (Wienberg & Stanyon, 1997). Esse tipo de estudo auxilia na identificação de segmentos ancestrais, uma vez que permite a verificação da homologia real entre os segmentos cromossômicos aparentemente compartilhados. Por exemplo, os cariótipos do porco e do gato foram estudados reciprocamente com o humano, o que demonstrou que as associações sintênicas de cromossomos humanos (HSA) 12/22 e HSA 16/19 nas duas espécies correspondiam aos mesmos segmentos humanos, confirmando sua homologia

real (Wienberg *et al.*, 1997; Goureau *et al.*, 1996). Por outro lado, foi demonstrado por pintura cromossômica recíproca que a associação HSA 2/8/4, detectada no pangolim e em Afrotheria, não corresponde a uma homologia real, uma vez que o segmento de HSA 2 é diferente nos dois grupos (Yang *et al.*, 2006).

À medida que os mapas comparativos de homologia cromossômica foram sendo esquematizados para diversas espécies de mamíferos verificou-se que certos blocos correspondentes a determinados cromossomos humanos tendiam a estar fundidos em outras espécies (Ferguson-Smith & Trifonov, 2007). A partir das comparações entre grupos distantes filogeneticamente, algumas dessas associações, compartilhadas por um grande número de clados, puderam ser classificadas como ancestrais. Uma característica é considerada ancestral somente se foi herdada do ancestral comum mais recente do grupo, sendo as outras associações classificadas como derivadas.

2.1.1. PINTURA CROMOSSÔMICA EM MAMÍFEROS PLACENTÁRIOS

A pintura cromossômica é uma ferramenta muito útil em estudos de filogenia, uma vez que os rearranjos cromossômicos são considerados alterações genômicas raras (Rokas & Holland, 2000), com probabilidade relativamente pequena de homoplasia (similaridades que não compartilham uma origem comum). A resolução da técnica é suficiente para permitir a reconstrução de linhagens que mostrem a relação entre espécies, famílias e ordens, revelando assinaturas cromossômicas características de cada linhagem (Ferguson-Smith & Trifonov, 2007). A comparação entre os cromossomos humanos e os de espécies representativas da grande maioria das ordens de mamíferos placentários já foi realizada, por meio de pintura cromossômica (Korstanje *et al.*, 1999; Müller *et al.*, 1999; Nie *et al.*, 2002; Volleth *et al.*, 2002; Yang *et al.*, 2003; Robinson *et al.*, 2004; Yang *et al.*, 2004; Ferguson-Smith *et al.*, 2005; Svartman *et al.*, 2006; Yang *et al.*, 2006; Balmus *et al.*, 2007; Kellogg *et al.*, 2007; Graphodatsky *et al.*, 2008; Nie *et al.*, 2008). Apenas a ordem Hyracoidea não teve os seus cromossomos comparados com os humanos diretamente por pintura cromossômica.

Com o número crescente de estudos de pintura cromossômica e a construção de mapas comparativos de homologia cromossômica para diversas espécies de Eutheria, tornou-se vital que esses dados fossem computadorizados e estivessem amplamente disponíveis. Assim, pesquisadores do *Cambridge Resource Centre for Comparative Genomics* e do *Sanger Centre* desenvolveram o banco de dados Chromhome (www.chromhome.org), que reúne dados de comparação cromossômica e mapas de homologia cromossômica produzidos para mais de 30 famílias de mamíferos.

Na Tabela I.1 estão listadas as principais associações sintênicas de autossomos humanos presentes nos cariótipos de espécies das supraordens Euarchontoglires e Laurasiatheria.

Espécies pertencentes à ordem dos primatas foram as primeiras a terem os seus cromossomos comparados com os humanos. O que se observa no grupo é uma alta conservação cariotípica, com exceção dos gibões, que possuem um cariótipo extremamente rearranjado (Müller *et al.*, 2003). Os grandes macacos (chimpanzé, orangotango e gorila) apresentam cariótipos quase idênticos aos humanos, diferindo apenas em relação a HSA 2, que corresponde a dois autossomos nos macacos e à translocação recíproca entre dois cromossomos no gorila, homólogos a HSA 5 e 17 (Stanyon *et al.*, 1992; Ferguson-Smith *et al.*, 2005). A associação HSA 14/15 é frequentemente observada em vários mamíferos, primatas e não primatas. Nos macacos do Novo Mundo essa associação está presente em todas as espécies estudadas, com HSA 14 conservado intacto, enquanto HSA 15 encontra-se fragmentado em dois ou três segmentos (Giffalli-lughetti, 2008). Um cariótipo ancestral de $2n=48$ para os primatas foi proposto por Frönicke (2005), com base em estudos de pintura cromossômica, contendo as associações HSA 3/21, 14/15, 12a/22b, 12b/22a e 7b/16p.

Tabela I.1 – Principais associações de autossomos humanos, consideradas não ancestrais de Eutheria, presentes em espécies das supraordens Euarchontoglires e Laurasiatheria

Supraordem	Ordem	Associações derivadas de autossomos humanos	Referências
Euarchontoglires	Primates	2/16, 5/7, 8/18, 10/16	Consigliere <i>et al.</i> (1996) Stanyon <i>et al.</i> (2000) Garcia <i>et al.</i> (2000)
	Dermoptera	1/2, 1/10, 2/21, 4/18, 7/15, 7/16, 7/19, 10p/16p	Nie <i>et al.</i> (2008)
	Scadentia	2/21, 10/16, 11/20	Müller <i>et al.</i> (1999)
	Rodentia	1/10, 3/19, 9/11	Graphodatsky <i>et al.</i> (2008)
	Lagomorpha	1/10, 9/11	Korstanje <i>et al.</i> (1999) Li <i>et al.</i> (2004)
Laurasiatheria	Carnivora	2/20, 3/19, 18/22	Rettenberger <i>et al.</i> (1995) Wienberg <i>et al.</i> (1997) Frönicke <i>et al.</i> (1997) Yang <i>et al.</i> (1999, 2000) Cavagna <i>et al.</i> (2000) Perelman <i>et al.</i> (2005)
	Cetartiodactyla	4/12, 5/19	Yang <i>et al.</i> (1997) Bielec <i>et al.</i> (1998) Biltueva <i>et al.</i> (2004) Balmus <i>et al.</i> (2007)
	Perissodactyla	1q/10, 5/19, 11/19	Yang <i>et al.</i> (2004)
	Chiroptera	1/6; 4/11, 4/19p, 8/13, 11/12, 18/20	Volleth <i>et al.</i> (1999, 2002)
	Eulipotyphla	1/5, 1/11, 3/19, 4/20, 5/19, 8/10, 8/13	Dixkens <i>et al.</i> (1998); Yang <i>et al.</i> (2006) Ye <i>et al.</i> (2006)
	Pholidota	1q/5, 1q/11, 2p/5, 4p+q/20, 5/13, 6/19, 7/11, 8q/10p	Yang <i>et al.</i> (2006)

Dermoptera foi a última ordem de Eutheria a ter os seus cromossomos comparados aos humanos por pintura cromossômica. Estudos de pintura recíproca demonstraram que a associação HSA 7/16 verificada no grupo não corresponde à associação considerada ancestral HSA 7b/16p (Nie *et al.*, 2008). A associação derivada HSA 2/21, compartilhada pelas ordens Dermoptera e Scadentia, foi sugerida como uma evidência cromossômica para a classificação das duas ordens como grupos-irmãos, como já havia sido sugerido, com confiabilidade moderada, por estudos moleculares (Springer *et al.*, 2003; Nie *et al.*, 2008).

Nos roedores, a pintura cromossômica tem sido particularmente produtiva na análise de espécies de famílias não Muroidea, como a Sciuridae (esquilos), que apresentam cariótipos altamente conservados (Stanyon *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2004, 2006). Um cariótipo ancestral para a ordem foi proposto, com $2n=50$ (Graphodatsky *et al.*, 2008). As associações derivadas HSA 1/10 e 9/11 foram detectadas em espécies de Rodentia e Lagomorpha, fornecendo apoio adicional à hipótese de que essas ordens são grupos-irmãos (Korstanje *et al.*, 1999; Li *et al.*, 2004).

Nos carnívoros, os estudos de pintura cromossômica apoiaram a separação filogenética do grupo em dois clados monofiléticos: Feliformia e Caniformia (Nie *et al.* 2002; Graphodatsky *et al.*, 2002; Perelman *et al.*, 2005). A família Felidae tem uma taxa de evolução cariotípica baixa e quase todas as espécies apresentam um número diplóide de 38 cromossomos, com um cariótipo muito semelhante ao proposto como o ancestral para carnívoros. Em contraste, as espécies da família Canidae apresentam cariótipos muito rearranjados (Yang *et al.*, 1999, Graphodatsky *et al.*, 2001).

A ordem Cetartiodactyla possui como assinaturas cromossômicas a associação HSA 5/19p e a fissão HSA 6p-q. O cariótipo ancestral proposto para a ordem possui um número diplóide de 52 cromossomos (Balmus *et al.*, 2007).

Em Chiroptera, a monofilia do grupo é fortemente apoiada por dados de citogenética comparativa. A associação HSA 4/19 está presente em todas as espécies estudadas e parece ser uma característica cromossômica da ordem (Volleth *et al.*, 2002).

Assinaturas cromossômicas para as supraordens Euarchontoglires e Laurasiatheria não foram identificadas, o que deve significar que a divergência inicial do grupo não foi acompanhada de rearranjos cromossômicos significativos (Ferguson-Smith & Trifonov, 2007).

PINTURA CROMOSSÔMICA NA SUPRAORDEM AFROTHERIA

As espécies de Afrotheria *Orycteropus afer* (porco da terra), *Loxodonta africana* (elefante africano), *Elephas maximus* (elefante asiático), *Macroscelides proboscideus* e *Elephantulus rupestris* (musaranho elefante),

Chrysochloris asiaticus (toupeira dourada) e *Trichechus manatus latirostris* (manatim da Flórida) tiveram os seus cromossomos comparados com os humanos pela pintura cromossômica (Yang *et al.*, 2003; Frönicke *et al.*, 2003; Robinson *et al.*, 2004; Svartman *et al.*, 2004; Kellogg *et al.*, 2007). Em todas as espécies estudadas as associações sintênicas HSA 1/19 e 5/21 foram detectadas. A associação HSA 5/21 não foi encontrada em qualquer outra espécie de Eutheria, enquanto que HSA 1/19 está presente também em espécies de Primata, Eulipothypla, Cetartiodactyla e Xenarthra (Bigoni *et al.*, 1997; Stanyon *et al.*, 2000, 2002; Bigoni *et al.*, 2003, 2004; Biltueva *et al.*, 2004; Nie *et al.*, 2006; Svartman *et al.*, 2006; Yang *et al.*, 2006; Ye *et al.*, 2006). Entretanto, estudos de pintura recíproca e de mapeamento gênico com espécies de Afrotheria, Cetartiodactyla e Primata demonstraram que a associação não é homóloga nesses grupos (Frönicke *et al.*, 2003; Yang *et al.*, 2003; Biltueva *et al.*, 2004; Nie *et al.*, 2006). A partir desses dados foi sugerido que as associações HSA 1/19 e 5/21 correspondem a sinapomorfias cromossômicas de Afrotheria, representando evidências não moleculares de que Afrotheria é um clado natural (Frönicke *et al.*, 2003; Svartman *et al.*, 2004; Kellogg *et al.*, 2007; Ruiz-Herrera & Robinson, 2007).

As associações consideradas ancestrais para os Eutheria pela maioria dos autores (Murphy *et al.*, 2003) foram observadas nas espécies estudadas de Afrotheria, apenas os elefantes e o manatim não apresentaram a associação HSA 4/8 (Yang *et al.*, 2003; Kellogg *et al.*, 2007). A associação HSA 10/12/22 também está presente em todas as espécies estudadas. Essa associação foi proposta como ancestral de Eutheria e foi observada também em Carnivora, estudos de pintura recíproca demonstraram que é homóloga nas duas ordens (Graphodatsky *et al.*, 2002; Nie *et al.*, 2002; Yang *et al.*, 2003; Frönicke *et al.*, 2003). Um único homólogo ao cromossomo 1 humano está presente nos cariótipos de Afrotheria, com exceção dos elefantes e do manatim (Yang *et al.*, 2003; Kellogg *et al.*, 2007). Esses dados apóiam a conservação de HSA 1 intacto no cariótipo ancestral de Eutheria, como proposto por Murphy *et al.* (2003).

Dentre as ordens que compõem o clado Afrotheria apenas Hyracoidea não teve os seus cromossomos diretamente comparados com os humanos por pintura cromossômica. No entanto, Pardini *et al.* (2007) realizaram um estudo

de pintura recíproca entre uma espécie de Hyracoidea (*Procavia capensis*) e outras três espécies de Afrotheria (*L. africana*, elefante africano, *T. manatus latirostris*, manatim da Flórida e *O. afer*, porco da terra), cujos cariótipos já foram comparados com o humano (Yang *et al.*, 2003; Kellogg *et al.*, 2007). Torna-se, assim, possível a comparação indireta entre os cromossomos humanos e os cromossomos de *P. capensis*.

PINTURA CROMOSSÔMICA NA SUPRAORDEM XENARTHRA

Um estudo de pintura cromossômica, comparando os cariótipos de três espécies de Xenarthra, foi realizado por Dobigny *et al.* (2005). Sondas correspondentes aos cromossomos da preguiça de dois dedos, *Choloepus didactylus*, foram hibridadas nos cromossomos de uma espécie de tamanduá (*Tamandua tetradactyla*) e uma espécie de preguiça de três dedos (*Bradypus tridactylus*). Os autores mostraram que os cariótipos das preguiças de dois e três dedos são similares e significativamente distintos do cariótipo do tamanduá. As sondas de alguns cromossomos também foram hibridadas no tatu (*Euphractus sexcinctus*), grupo externo da ordem Pilosa (tamanduás e preguiças), o que permitiu determinar a direção dos rearranjos verificados. O principal tipo de rearranjo encontrado foi a fusão cromossômica, mas também foram documentadas fissões e inversões, além de reposicionamento centromérico.

As espécies *Dasypus novemcinctus* (tatu), *Tamandua tetradactyla* (tamanduá), *Choloepus hoffmanni* e *Choloepus didactylus* (preguiças de dois dedos), representantes de três famílias de Xenarthra, já tiveram os seus cromossomos comparados com os humanos pela pintura cromossômica (Richard *et al.*, 2000, 2003; Murphy *et al.*, 2003; Svartman *et al.*, 2006; Yang *et al.*, 2006). Nas famílias Bradypodidae e Cyclopedidae esse tipo de estudo ainda não foi realizado. Os resultados obtidos com a pintura cromossômica nessas espécies estão resumidos na Tabela I.2.

Tabela 1.2 – Comparação dos cromossomos humanos e de *Xenarthra*, utilizando pintura cromossômica com sondas humanas¹

Espécies	Associações de autossomos humanos	Cromossomos humanos		
		Conservados	Dois blocos	Três ou mais blocos
<i>Choloepus hoffmanni</i> (2n=50) ²	3/21, 4/8, 7/16, 12/22(2x), 14/15, 16/19	1, 3, 4, 5, 6, 9 , 10, 11, 13 , 14, 15, 17 , 18 , 20, 21, X	2, 7, 12, 19 , 22	8? , 16
<i>Choloepus didactylus</i> (2n=65) ³	2/8, 3/21, 4/8, 7/10, 7/16, 12/22 (2x), 14/15	9, 13, 15, 17, 18, 20, 21, X	1, 3, 4, 5, 6, 10, 11, 12, 14, 16, 19 , 22	2, 7, 8
<i>Dasypus novemcinctus</i> (2n=64) ²	3/21(2x), 4/8, 7/16, 10/12, 12/22(2x), 14/15, 16/19	5, 9, 13, 14, 15, 17, 18, 20, X	1, 4, 6, 7, 10, 11, 16, 19? , 21, 22	2?, 3, 8 , 12
<i>Tamandua tetradactyla</i> (2n=54) ^{2,3}	1/9, 1/13, 1/19, 2/8, 3/6, 3/21, 4/8, 7/16, 8/17, 12/22(2x), 14/15 (2x), 16/19^(2,3), 3/22, 5/11, 7/20⁽²⁾, 20/7/10⁽³⁾	⁶⁽³⁾ , 9 , 10 ⁽²⁾ , 11 ⁽³⁾ , 13, 17, 18, 20, 21, X	2 ⁽²⁾ , 6 ⁽²⁾ , 7, 10 ⁽³⁾ , 11 ⁽²⁾ , 12, 14, 15, 16, 19, 22	1, 2 ⁽²⁾ , 3, 4, 5, 8

¹Características comuns a todas as espécies estão em negrito;

²Svartman *et al.* (2006); ³Yang *et al.* (2006)

Svartman *et al.* (2006) apontaram a grande semelhança entre os cariótipos das espécies de *Xenarthra* *D. novemcinctus*, *T. tetradactyla* e *C. hoffmanni* com o cariótipo ancestral de Eutheria de 2n=48 proposto por Murphy *et al.* (2003), estando todas as associações consideradas ancestrais presentes nas três espécies. Em *C. hoffmanni* essa conservação é mais evidente: vinte cromossomos dessa espécie parecem corresponder a cromossomos ancestrais e as únicas diferenças foram a conservação de HSA 10 (dividido em dois blocos no ancestral), HSA 8 dividido em três blocos (em dois no ancestral) e

HSA 16p dividido em dois blocos (intacto no ancestral). Os autores ressaltaram que nenhuma espécie de Afrotheria apresenta cariótipo tão semelhante ao proposto para o ancestral de Eutheria e sugeriram que a hipótese de que Xenarthra seja o grupo mais basal de Eutheria não pode ser descartada. O cariótipo do tatu também é muito similar ao ancestral, apenas com a divisão de alguns autossomos ancestrais e com a presença da associação HSA 10/12. O cariótipo do tamanduá aparece como o mais rearranjado entre os de Xenarthra com várias associações derivadas entre autossomos humanos. Svartman *et al.* (2006) sugeriram que talvez a divisão de HSA 8 em três blocos, verificada nas três espécies estudadas, seja uma marca cromossômica dessa supraordem.

Yang *et al.* (2006) analisaram os cromossomos da mesma espécie de tamanduá estudada por Svartman *et al.* (2006), obtendo resultados semelhantes, estando as diferenças indicadas na Tabela I.2. A preguiça *C. didactylus* também fez parte desse estudo e os autores documentaram nela as associações ancestrais de Eutheria propostas por Murphy *et al.* (2003), com exceção de HSA 16/19, presente na grande maioria dos mamíferos. Yang *et al.* (2006) sugeriram que as associações HSA 2/8 e 7/10, presentes nos cromossomos do tamanduá e de *C. didactylus*, possam representar assinaturas cromossômicas de Xenarthra. A associação HSA 7/10 também está presente nos cariótipos da preguiça *B. tridactylus* e do tatu *E. sexcinctus*, que apesar de não terem tido os seus cromossomos diretamente comparados com os humanos, foram comparados com a preguiça *C. didactylus* (Dobigny *et al.*, 2005) e, então, por inferência puderam ter determinadas as relações de seus cromossomos com os humanos.

Ferguson-Smith & Trifonov (2007) sugeriram que a associação sintênica HSA 1/19 seja uma característica cromossômica comum a Afrotheria e Xenarthra, apoiando a hipótese de que essas supraordens são grupos-irmãos (Murphy *et al.*, 2007; Prasad *et al.*, 2008). Essa associação em Afrotheria compreende o segmento HSA 19p e no tamanduá é muito provável que esse também seja o segmento envolvido, uma vez que essa espécie mantém a associação ancestral HSA 16q/19q (Yang *et al.*, 2006). No entanto, não há evidência de que os segmentos HSA 1 das associações sejam homólogos nos dois grupos e além disso, em Xenarthra essa associação só foi observada no

tamanduá, que apresenta o cariótipo mais rearranjado do grupo. Pode, assim, tratar-se de um caso de convergência.

2.2. CARIÓTIPOS ANCESTRAIS

Um dos principais objetivos dos estudos comparativos de pintura cromossômica entre mamíferos placentários é o estabelecimento de um cariótipo ancestral. A reconstrução de cariótipos ancestrais permite determinar os tipos de alterações cromossômicas e as épocas em que elas ocorreram ao longo da evolução de Eutheria, possibilitando o reconhecimento dos rearranjos que caracterizaram cada linhagem, além de auxiliar no mapeamento gênico (Haig, 1999; Murphy *et al.*, 2001c; Wienberg, 2004). Uma vez que o genoma ancestral é definido, as taxas de alterações cromossômicas não precisam mais ser estimadas pela comparação de dois genomas atuais, como sugerido por Rettenberger *et al.* (1995), mas podem ser inferidas por referência ao genoma ancestral (Frönicke, 2005).

A procura pelos cromossomos ancestrais de mamíferos tem uma longa tradição na citogenética. As primeiras tentativas de identificação de cariótipos ancestrais eram baseadas na observação das similaridades nos padrões de banda entre cromossomos de espécies distantes filogeneticamente, admitindo-se que esses cromossomos compartilhados estariam presentes no ancestral comum (Dutrillaux, 1979; Dutrillaux *et al.*, 1980; Nash & O'Brien, 1982). No entanto, só após a introdução da técnica de pintura cromossômica, mais precisamente da Zoo-FISH, na citogenética comparativa é que as suspeitas de homologias entre espécies puderam ser validadas e assim, os cariótipos ancestrais puderam ser propostos com maior confiabilidade (Murphy *et al.*, 2003; Frönicke, 2005; Ferguson-Smith & Trifonov, 2007).

Uma série de hipóteses, com números diplóides variando de $2n=44$ a $2n=50$, foram propostas para o cariótipo ancestral de Eutheria, com base em estudos de pintura cromossômica (Tabela I.3). Todas as propostas apresentam em comum a conservação dos cromossomos humanos inteiros HSA 3, 4, 5, 6, 9, 11, 13, 14, 15, 17, 18, 20, 21 e X, dos segmentos HSA $2p \rightarrow q1.2$, $2q1.2 \rightarrow qter$ e das associações sintênicas HSA 3/21, 12/22, 14/15 e 16/19.

Tabela I.3 - Principais propostas para o cariótipo ancestral de Eutheria, baseadas em estudos cromossômicos comparativos, após pintura cromossômica¹

Supraordens investigadas	Cariótipos propostos			Autores
	2n	Associações de autossomos humanos	Cromossomos humanos conservados	
Laurasiatheria	48	3/21, 12/22, 14/15, 16/19	3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 17, 18, 20, 21, 22, X	Chowdhary <i>et al.</i> (1998)
Laurasiatheria e Euarchontoglires	44	2/20, 3/21 , 4/8, 12/22(2x) , 14/15, 16/19	1, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 13, 14, 15, 17, 18, 20, 21, X	Haig (1999)
Laurasiatheria e Euarchontoglires	50	3/21 , 4/8/4, 7/16, 12/22(2x) , 14/15, 16/19	3, 4, 5, 6, 9, 11, 13, 14, 15, 17, 18, 20, 21, X	Murphy <i>et al.</i> (2001c)
Xenarthra, Laurasiatheria e Euarchontoglires	50	3/21 , 4/8, 7/16, 12/22(2x) , 14/15, 16/19	3, 4, 5, 6, 9, 11, 13, 14, 15, 17, 18, 20, 21, X	Richard <i>et al.</i> (2003)
Afrotheria, Laurasiatheria e Euarchontoglires	44	1/19, 3/21 , 4/8, 7/16, 10/12/22, 12/22, 14/15, 16/19	1, 3, 4, 5, 6, 9, 11, 13, 14, 15, 17, 18, 20, 21, X	Yang <i>et al.</i> (2003)
Afrotheria, Laurasiatheria e Euarchontoglires	46	3/21 , 4/8, 7/16, 10/12/22, 12/22, 14/15, 16/19	1, 3, 4, 5, 6, 9, 11, 13, 14, 15, 17, 18, 20, 21, X	Frönicke <i>et al.</i> (2003)
Afrotheria, Xenarthra, Laurasiatheria e Euarchontoglires	48	3/21 , 4/8/4, 7/16, 12/22(2x) , 14/15, 16/19	1, 3, 4, 5, 6, 9, 11, 13, 14, 15, 17, 18, 20, 21, X	Murphy <i>et al.</i> (2003)
Afrotheria, Xenarthra, Laurasiatheria e Euarchontoglires	46	3/21 , 4/8, 7/16, 10/12/22, 12/22, 14/15, 16/19	1, 3, 4, 5, 6, 9, 11, 13, 14, 15, 17, 18, 20, 21, X	Ferguson-Smith & Trifonov (2007)

¹ Características comuns a todas as propostas estão em negrito

A primeira tentativa de reconstrução do cariótipo ancestral de mamíferos placentários, com base em dados de Zoo-FISH, foi realizada por Chowdhary *et al.* (1998). Os autores realizaram análise comparativa dos dados já descritos de pintura cromossômica para sete espécies de mamíferos placentários não primatas, pertencentes às ordens, Artiodactyla, Carnivora e Perissodactyla,

incluindo também dados disponíveis de mapeamento gênico. Foi proposto um cariótipo ancestral com $2n=48$, contendo as associações HSA 3/21, 12/22, 14/15 e 16/19.

Em 1999, Haig propôs um cariótipo ancestral para Eutheria, baseado em dados da literatura de pintura cromossômica com sondas humanas em 23 espécies de mamíferos placentários, das quais nove eram não primatas, pertencentes às ordens Artiodactyla, Carnivora, Perissodactyla e Insetivora. Foi proposto um cariótipo ancestral com $2n=44$, conservando as mesmas associações sintênicas indicadas por Chowdhary *et al.* (1998) e incluindo as associações HSA 2p/20, 4/8p e 7/16.

Murphy *et al.* (2001c) realizaram uma análise dos dados existentes de Zoo-FISH para mais de 40 espécies, pertencentes a nove ordens de mamíferos placentários das supraordens Laurasiatheria e Euarchontoglires. Propuseram um cariótipo ancestral para Eutheria com $2n=50$, contendo as associações dos cromossomos humanos 3/21, 4/8/4, 7/16, 12/22 (2x), 14/15 e 16/19. Além de estarem presentes em uma série de espécies de diferentes ordens de mamíferos, algumas dessas associações também fazem parte dos genomas de grupos externos, como galinha (*Gallus gallus*) e zebrafish (*Danio rerio*) (Burt *et al.*, 1999; Postlethwait *et al.*, 2000). Os autores ressaltaram a necessidade da realização de estudos com os grupos mais basais de Eutheria (Afrotheria e Xenarthra) e com grupo externo mais adequado.

Um cariótipo ancestral de Eutheria também foi proposto por Richard *et al.* (2003). Os autores se basearam em dados de pintura cromossômica para espécies representativas de onze ordens de mamíferos placentários e comparações entre o padrão de bandas de mais de 200 espécies de Eutheria. Esse estudo incluiu espécies de três supraordens, Euarchontoglires, Laurasiatheria e Xenarthra (uma espécie de tatu, *D. novemcinctus*). Um cariótipo com $2n=50$ foi proposto, muito similar ao sugerido por Murphy *et al.* (2001c), contendo as mesmas associações sintênicas e HSA 1 representado por dois cromossomos ancestrais. Os autores reconstruíram esse cariótipo ancestral com os cromossomos, considerados ancestrais, de espécies atuais, após bandamento R. Richard *et al.* (2003) concluíram que poucos rearranjos intercromossômicos devem ter ocorrido ao longo dos cerca de 100 m.a. que separam as espécies atuais do ancestral comum de Eutheria, uma vez que,

aproximadamente dez rearranjos desse tipo são suficientes para se reconstruir o cariótipo humano, a partir do cariótipo ancestral proposto.

Yang *et al.* (2003) estudaram espécies de duas ordens de Afrotheria (Tubulidentata e Proboscidea) por pintura cromossômica com sondas humanas. Os resultados obtidos nesse trabalho, juntamente com dados da literatura para espécies representantes de Laurasiatheria e Euarchontoglires levaram os autores a propor um cariótipo ancestral para Eutheria, com $2n=44$. O cariótipo proposto incluiu, além das associações propostas por Murphy *et al.* (2001c), as associações HSA 1/19p e HSA 10p/12/22, verificadas nas espécies estudadas de Afrotheria. Os autores consideraram que a detecção dessas associações em espécies de Afrotheria, grupo basal de Eutheria, dava forte apoio à sua inclusão no cariótipo ancestral. Além disso, experimentos de pintura recíproca demonstraram que a associação HSA 10/12/22 era homóloga em Afrotheria e Carnivora (Graphodatsky *et al.*, 2002; Nie *et al.*, 2002). O cariótipo proposto por Yang *et al.* (2003) difere daquele com $2n=50$, sugerido por Murphy *et al.* (2001c), pela inclusão das associações HSA 1/19p e HSA 10/12/22 e a conservação de HSA 1 em um único bloco.

Fronicke *et al.* (2003) também estudaram os cromossomos de uma espécie de Afrotheria, o elefante africano e com isso sugeriram um cariótipo ancestral de Eutheria, com $2n=46$ cromossomos, similar ao proposto por Yang *et al.* (2003), porém sem a associação HSA 1/19. Os autores consideraram que essa associação não devia ser homóloga às encontradas em outros grupos, tratando-se, provavelmente, de uma sinapomorfia dessa supraordem.

Murphy *et al.* (2003) testaram as duas hipóteses propostas para a correspondência de HSA1 no cariótipo ancestral. A primeira é baseada nos estudos iniciais de pintura cromossômica comparativa que mostraram HSA1 dividido em pelo menos dois segmentos na maioria das espécies estudadas, levando à sua divisão em dois cromossomos no cariótipo ancestral de Eutheria (Chowdhary *et al.*, 1998; Murphy *et al.*, 2001c; Richard *et al.*, 2003). A hipótese alternativa apresenta HSA 1 intacto no ancestral, sendo fragmentado independentemente nas diferentes linhagens de mamíferos placentários (Yang *et al.*, 2003). Murphy *et al.* (2003) compararam mapas gênicos entre humanos, gatos, vacas, camundongos e ratos e verificaram que os pontos de quebra de HSA1 nas diferentes espécies eram muito próximos, porém, não idênticos.

A segunda parte do estudo de Murphy *et al.* (2003) consistiu em experimentos de pintura cromossômica recíproca entre espécies de mamíferos placentários que apresentaram dois cromossomos homólogos a HSA 1. Os dois pares de cromossomos correspondentes a HSA 1 de uma espécie foram marcados diferentemente e hibridados juntos em metáfases de outra espécie. Se esses cromossomos tivessem a mesma origem nas diferentes espécies cada par cromossômico correspondente a HSA 1 deveria ser identificado por uma cor. Caso os rearranjos que originaram esses cromossomos fossem diferentes, ocorreria a pintura com as duas cores em um mesmo cromossomo homólogo a HSA 1. Em praticamente todas as espécies estudadas foram observados homólogos a HSA 1 marcados com as duas cores, indicando que os cromossomos correspondentes ao cromossomo 1 humano não são idênticos nas diferentes espécies, possuindo pontos de quebra distintos.

O estudo de Murphy *et al.* (2003) incluiu ainda a pintura cromossômica com sonda correspondente a HSA 1 em uma espécie de baleia e em uma espécie de preguiça de dois dedos que ainda não haviam sido estudadas. Nos dois casos a sonda hibridou em apenas um cromossomo. Esses resultados apoiaram a hipótese de HSA 1 intacto no cariótipo ancestral de Eutheria. A localização física distinta dos pontos de quebra nas diferentes espécies é consistente com origens independentes para os cromossomos com homologia a HSA 1, que devem ter sido originados por eventos independentes de fissões cromossômicas. Os autores modificaram o cariótipo ancestral de Eutheria previamente proposto de $2n=50$, com dois cromossomos homólogos a HSA 1 (Murphy *et al.*, 2001c), para um de $2n=48$, com HSA 1 representado por um único cromossomo ancestral.

Svartman *et al.* (2004) estudaram os cromossomos da espécie de Afrotheria, *Macroscelides proboscideus* (musaranho-elefante) e verificaram a conservação de HSA1 em um único cromossomo também nessa espécie, apoiando as propostas de HSA 1 intacto no cariótipo ancestral de Eutheria (Yang *et al.* 2003; Murphy *et al.*, 2003). Quanto às associações HSA 1/19 e 10/12/22, propostas como ancestrais por Yang *et al.* (2003), Svartman *et al.* (2004) destacaram que não havia dados suficientes para a inclusão dessas associações no cariótipo ancestral de Eutheria e, assim, sugeriram que o cariótipo ancestral proposto por Murphy *et al.* (2003) seria o mais provável.

Estudos mais completos de comparação cromossômica entre humanos e espécies de Xenarthra foram realizados por Yang *et al.* (2006) e Svartman *et al.* (2006). As sintonias consideradas ancestrais pela maioria dos autores, HSA 3/21, 4/8, 7/16, 12/22 (2x) e 14/15, foram observadas em todas as espécies de Xenarthra estudadas e HSA 16/19 não estava presente apenas na preguiça *C. didactylus*, apoiando a inclusão dessas associações no cariótipo ancestral de Eutheria. Yang *et al.* (2006) confirmaram a inclusão da associação HSA 1/19 no cariótipo ancestral, com base em sua presença em todas as espécies de Afrotheria estudadas e em Xenarthra. No entanto, Svartman *et al.* (2006) não consideraram essa associação como um traço ancestral, uma vez que ela foi verificada em apenas uma espécie de Xenarthra, justamente no tamanduá (*T. tetradactyla*), a mais rearranjada do grupo. Quanto à associação sintênica HSA 10/12/22, proposta como ancestral de Eutheria por Yang *et al.* (2003), em Xenarthra apenas a sintonia HSA 10/12 foi observada no tatu (Svartman *et al.*, 2006), o que os autores não consideraram suficiente para a sua inclusão no cariótipo ancestral de Eutheria.

Mais recentemente, Ferguson-Smith & Trifonov (2007) apresentaram um cariótipo ancestral de Eutheria, com $2n=46$, baseado em associações sintênicas compartilhadas por espécies da grande maioria das ordens de mamíferos placentários. Esse cariótipo é muito similar ao proposto por Fröncke *et al.* (2003), contendo as associações HSA 3/21, 4/8, 7/16, 10/12/22, 12/22, 14/15 e 16/19 e HSA 1 conservado em um único cromossomo.

Uma característica muito interessante que pode ser observada em todos os cariótipos propostos para o ancestral de Eutheria é a alta conservação do cariótipo humano. Dez cromossomos humanos (HSA 1, 5, 6, 9, 11, 13, 17, 18, 20 e X) representam cromossomos ancestrais nas propostas mais recentes (Murphy *et al.*, 2003; Ferguson-Smith & Trifonov, 2007). O cromossomo X é particularmente interessante, pois é extremamente conservado em relação a seu tamanho, morfologia, padrão de bandas, ordem e conteúdo gênico nas espécies de mamíferos placentários, confirmando a hipótese de Ohno (1967), da conservação do cromossomo X nos mamíferos.

Essas propostas para o cariótipo ancestral de Eutheria são preliminares, uma vez que não incluíram comparações com grupo externo apropriado, como os marsupiais. Estudos de pintura cromossômica entre espécies de mamíferos

placentários e marsupiais não foram bem sucedidas, devido à extensa divergência do DNA cromossômico dessas espécies. O único experimento de pintura cromossômica entre marsupiais e humanos que apresentou hibridação foi a FISH com sonda correspondente ao cromossomo X do marsupial *M. eugenii* em metáfases humanas. A biblioteca desse cromossomo marcou o braço longo e uma região proximal no braço curto do cromossomo X humano (Glas *et al.*, 1999).

Com a finalização do sequenciamento do genoma do marsupial *Monodelphis domestica* (Mikkelsen *et al.*, 2007) foi possível a sua comparação com o genoma humano, o que permitiu a delimitação dos segmentos cromossômicos homólogos entre os dois grupos. A comparação *in silico* dos cromossomos de *M. domestica* com os cromossomos humanos está disponível no banco de dados *Ensembl*. Robinson & Ruiz-Herrera (2008) realizaram uma análise da última proposta para o cariótipo ancestral de mamíferos placentários (Ferguson-Smith & Trifonov, 2007), tendo os genomas de *M. domestica* (MonDom 4.0) e da galinha (WASHUC 1) como grupos externos. Dentre os dez cromossomos humanos propostos como conservados intactos no cariótipo ancestral, um deles (HSA 13) também está presente na galinha e outro (HSA 18) está presente no marsupial, indicando que esses cromossomos são simplesiomorfias de Eutheria. Em contraste, os cromossomos correspondentes a HSA 1, 5, 6, 9, 11, 17, 20 e X parecem ser sinapomorfias de mamíferos placentários, uma vez que não estão conservados nos grupos externos, apoiando a monofilia de Eutheria. Dentre as associações sintênicas consideradas ancestrais, HSA 4/8, 7/16, 12/22, 14/15 e 16/19 estão presentes tanto no marsupial quanto na galinha, representando traços simplesiomórficos de Eutheria. HSA 3/21 está presente na galinha, mas não no marsupial, em que a associação parece ter sido perdida por rearranjos intracromossômicos que levaram à sintenia HSA 21/Xp/3q/Xp/3q. A associação HSA 10p/12pq/22qt está presente no marsupial e, em parte, na galinha (HSA 12pq/22qt), sugerindo que HSA 12pq/22qt deveria estar presente no ancestral de Amniota e sua expansão incluindo HSA 10p é uma sinapomorfia unindo marsupiais e Eutheria. Portanto, as comparações *in silico* com grupos externos apropriados apoiaram a proposta de um cariótipo ancestral de Eutheria com 2n=46 cromossomos,

contendo as associações HSA 3/21, 4/8, 7/16, 10/12/22, 12/22, 14/15 e 16/19 (Frönicke *et al.*, 2003; Ferguson-Smith & Trifonov, 2007).

Comparações *in silico* também foram realizadas entre as seqüências dos genomas humano, da galinha, do *zebrafish* e do *pufferfish* (*Tetraodon nigroviridis*) para a reconstrução de um provável cariótipo ancestral de vertebrados (Kohn *et al.*, 2006). Os autores propuseram onze protocromossomos, muito conservados em aves e peixes, porém muito rearranjados em relação ao ancestral de Eutheria (Ferguson-Smith & Trifonov, 2007). Esses resultados indicam que um grande número de rearranjos ocorreu na linhagem dos Theria após a divergência das aves, há aproximadamente 300 m.a. Da mesma forma, grupos de ligação conservados, representando os cromossomos ancestrais de Eumetazoa, foram propostos a partir da comparação das seqüências humana e da anêmona-do-mar (Putnam *et al.*, 2007). Apesar de 700 m.a. de evolução independente, 40 grandes segmentos homólogos foram identificados, demonstrando a conservação de regiões cromossômicas mesmo em grupos muito distantes filogeneticamente.

3. EVOLUÇÃO CARIOTÍPICA EM MAMÍFEROS

Estudos citogenéticos em espécies de mamíferos têm revelado extensos blocos de DNA, muitas vezes correspondendo a cromossomos inteiros ou braços cromossômicos, conservados entre espécies distantes filogeneticamente. O que mantém essas regiões ligadas por um período tão longo de tempo evolutivo, no entanto, ainda não é muito bem compreendido. O número diplóide em mamíferos varia de $2n=6$, no cervo indiano (*Muntiacus muntjak*), a $2n=102$, em uma espécie de roedor sul-americano (*Tympanoctomys barrerae*). Apesar das diferenças em relação ao número e à morfologia cromossômica nos mamíferos, essas são geralmente resultantes da reorganização desses blocos sintênicos conservados, que se apresentam em diferentes combinações nas diferentes espécies (Ferguson-Smith & Trifonov, 2007).

A recombinação homóloga não alélica na meiose aparece como um mecanismo pelo qual segmentos conservados do genoma são separados e fundidos em diferentes combinações (Lupski & Stankiewicz, 2005; Kehrer-Sawatzi & Cooper, 2007). Estudos dos genomas de vários organismos têm evidenciado características que aumentam ou diminuem a probabilidade de rearranjos cromossômicos. Nos primatas, pontos de quebra de rearranjos intercromossômicos são freqüentemente encontrados em regiões de duplicações cromossômicas segmentais (Lupski & Stankiewicz, 2005; Kehrer-Sawatzi & Cooper, 2007).

Os pontos de quebra cromossômica tendem a estar localizados próximos aos centrômeros e podem ser recorrentes em várias linhagens ao longo da evolução cariotípica (Murphy *et al.*, 2005). Muitos desses pontos de quebra estão associados à formação de acrocêntricos, resultantes da fissão de um cromossomo com dois braços ou à formação de metacêntricos, produto da fusão de dois acrocêntricos. As fusões e fissões centroméricas são os tipos de rearranjos mais comuns na evolução cariotípica dos mamíferos e em algum momento da história evolutiva do grupo devem ter alterado cariótipos em relação ao número cromossômico, mesmo entre espécies próximas.

Uma correlação entre a localização de sítios frágeis cromossômicos em diversas espécies de Eutheria e pontos de quebra recorrentes também foi demonstrada (Robinson & Elder, 1987; Ronne, 1992; Stone *et al.*, 1993; Yang & Long, 1993; Rodriguez *et al.*, 2002; Ruiz-Herrera *et al.*, 2002, 2006; Ruiz-Herrera & Robinson, 2007), sugerindo que essas regiões instáveis podem ser um dos muitos fatores envolvidos na evolução cariotípica de mamíferos.

O número total de blocos rearranjados por conjunto autossômico haplóide, revelado pela citogenética, fornece em muitos casos uma medida da relação entre as espécies. Quando o genoma humano foi comparado com o genoma da maioria dos Eutheria 30 a 40 blocos de homologia foram identificados. No entanto, algumas espécies, como os cães e os gibões apresentam um número duas vezes maior de blocos dispersos conservados em relação ao genoma humano (Wienberg *et al.*, 1990; Yang *et al.*, 1999; Ferguson-Smith & Trifonov, 2007). Isso pode significar que na evolução dessas duas últimas espécies um maior número de eventos de recombinação ilegítima tenha ocorrido, originando rearranjos.

Apesar de uma taxa média de um rearranjo cromossômico a cada 10 m.a. ter sido estimada para a linhagem dos Eutheria (Richard *et al.*, 2003; Wienberg, 2004), não se pode dizer que exista um relógio molecular geral para esse tipo de alteração. As taxas de rearranjos cromossômicos variam dependendo do organismo e do tempo evolutivo da linhagem. Por exemplo, por 50 milhões de anos, a partir do ancestral de Eutheria até o ancestral dos primatas, apenas três rearranjos cromossômicos principais ocorreram (Ijdo *et al.*, 1991). Em seguida, uma repentina diversificação cariotípica ocorreu na linhagem que originou os gibões, com 24 rearranjos cromossômicos levando ao ancestral comum desses animais; rearranjos múltiplos subsequentes originaram o cariótipo das espécies atuais. Por outro lado, durante o mesmo período a taxa de evolução cariotípica nos grandes macacos foi extremamente baixa (Müller *et al.*, 2003; Wienberg, 2005).

Estudos com técnicas de maior resolução apontam taxas consideravelmente mais altas para os rearranjos em Eutheria do que as estimadas por estudos de pintura cromossômica. Isso porque essas técnicas permitem a detecção de rearranjos intracromossômicos e de outros pequenos demais para a detecção por pintura cromossômica (Wienberg, 2004). Estudos

de mapeamento gênico comparativo têm demonstrado que, para os mamíferos, as alterações intracromossômicas são de duas a quatro vezes mais comuns que as alterações intercromossômicas (Haig, 1999; Murphy *et al.*, 2000; Müller *et al.*, 2000; Band *et al.*, 2000; Eichler & Sankoff 2003; Pevzner e Tesler 2003), indicando que a alta conservação evolutiva dos grupos sintênicos em mamíferos não se estende à ordem gênica. Esses dados discordam das previsões de Erlich *et al.* (1997) de que translocações seriam mais comuns que inversões, baseadas na comparação dos cromossomos do camundongo (com cariótipo altamente rearranjado em relação aos demais mamíferos) e os humanos. As comparações de sequências genômicas entre grupos distantes filogeneticamente, como entre os genomas humanos e os do marsupial *M. domestica*, da galinha e do *zebrafish* também indicam taxas mais altas para os rearranjos intracromossômicos em mamíferos (Postlethwait *et al.*, 2000; Robinson & Ruiz-Herrera, 2008).

OBJETIVOS

II. OBJETIVOS

Este trabalho compreendeu o estudo cromossômico de grupos basais de mamíferos com o objetivo de contribuir para a compreensão da evolução cariotípica no grupo, incluindo a identificação de características ancestrais.

Para alcançar esse objetivo:

1) Estudamos os cromossomos das preguiças *Bradypus torquatus* e *Bradypus variegatus* (Bradypodidae), por meio de pintura cromossômica com sondas humanas com a finalidade de:

- a. Realizar a primeira comparação entre os cromossomos de espécies da família Bradypodidae e os cromossomos humanos, construindo mapas de homologia em relação aos cromossomos humanos.
- b. Comparar os cromossomos das duas espécies de preguiça, entre elas e com dados da literatura para outras espécies de Xenarthra, numa contribuição para a compreensão da evolução cariotípica no grupo.

2) Realizamos estudo comparativo do cromossomo X, por pintura cromossômica, entre as espécies de preguiça, *B. variegatus* e *B. torquatus* e entre as espécies de marsupiais americanos *Marmosops incanus* e *Metachirus nudicaudatus* (Didelphidae), para investigar a conservação desse cromossomo.

MATERIAL E MÉTODOS

III. MATERIAL E MÉTODOS

1. MATERIAL

PREGUIÇAS

As amostras de preguiça das espécies *Bradypus torquatus* e *Bradypus variegatus* foram coletadas e recebidas, no ano de 2005, pela então aluna de mestrado Andréia Manchester e pela Dra. Nadia Moraes-Barros (licença do IBAMA 032/2005-CGFAU/LIC). Essas amostras eram provenientes da Bahia, Minas Gerais e São Paulo. Neste trabalho utilizamos preparações metafásicas que estavam estocadas no laboratório a -20°C e também obtivemos preparações frescas a partir da cultura de células congeladas em nitrogênio líquido.

MARSUPIAIS

As preparações cromossômicas dos marsupiais *Marmosops incanus* e *Metachirus nudicaudatus* foram obtidas a partir de cultura de células congeladas em nitrogênio líquido. Essas amostras foram coletadas pela Dra. Meika A Mustrangi, entre abril de 1993 a agosto de 1996 e foram utilizadas no projeto de doutorado da Dra. Marta Svartman. As amostras de *M. nudicaudatus* eram provenientes da Fazenda Intervalles, Sete Barras, SP e as de *M. incanus* foram coletadas em Caucaia do Alto, Cotia, SP.

2. MÉTODOS

PINTURA CROMOSSÔMICA COM SONDAS DOS CROMOSSOMOS HUMANOS

A hibridação *in situ* fluorescente (FISH) de bibliotecas (pintura cromossômica) dos cromossomos humanos foi realizada nos cromossomos das preguiças. Foram utilizadas sondas, correspondentes a todos os cromossomos humanos, produzidas por *flow sorting* no laboratório do Dr Roscoe Stanyon (*Molecular Cytogenetics Core, National Cancer Institute, Frederick, Maryland*) e enviadas ao Laboratório de Genética Humana do Departamento de Genética e Biologia Evolutiva, IB-USP, por intermédio da Dra. Marta Svartman. Também utilizamos sondas comerciais (*WCP Chromosome Paint DNA Probes*, Vysis, Downers Grove, Estados Unidos) dos cromossomos HSA 3 e 21.

Para uso, as sondas obtidas por *flow sorting* eram inicialmente amplificadas em uma reação de DOP-PCR (Telenius *et al.*, 1992), com os seguintes reagentes: 2 µl de dNTP (0,2 mM), 2 µl de 10x *PCR Buffer*, 1 µl de MgCl₂ (50 mM), 2 µl de *primer* degenerado 6MW (10 µM), 2,5 unidades de Taq DNA Polimerase, 1 µl do estoque da sonda e água Mili-Q estéril para completar um volume final de 20 µl. Os reagentes utilizados foram produzidos pela Invitrogen (Carlsbed, Estados Unidos). O programa para a amplificação por PCR consistia em uma desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, seguida de 33 ciclos de 92°C por 1 minuto, 56°C por 2 minutos e 72°C por 2 minutos. Com o término dos ciclos uma extensão final a 72°C por 5 minutos era realizada.

Aproximadamente 1000 ng do produto amplificado era marcado com biotina ou digoxigenina, usando os Kits *Biotin-nick-translation* ou *Dig-nick-tranlation* (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemanha), conforme instruções do fabricante. A supressão de sequências repetitivas era realizada pela adição de 1 µg de *Human Cot-1 DNA* (Invitrogen) e a precipitação, pela adição de etanol 100% gelado e NaAc 3M.

As sondas precipitadas eram centrifugadas por 30 minutos a 13.000 rpm, lavadas com etanol 70% gelado e em seguida centrifugadas novamente por 15 minutos na mesma velocidade. O sobrenadante era descartado e o DNA seco ao ar. Ressuspendia-se, então, a sonda em 15 µl de meio de hibridação (formamida 50%, 2xSSC, 40 mM tampão fosfato - NaH_2PO_4 1M, Na_2HPO_4 1M, pH=8.2, 1x Denhart, SDS 0,1% e dextran sulfato 10%). A desnaturação da sonda era realizada por 10 minutos a 98°C, seguida de um período de *preannealing* a 37°C de 30 minutos. As preparações cromossômicas passavam pelo seguinte tratamento: um banho de 2xSSC a 37°C por uma hora, desidratação em etanol (50%, 70%, 100%) à temperatura ambiente, desnaturação a 72°C por 2 minutos em solução de formamida 70% e desidratação em uma série de etanol gelado (50%, 70% e 100%). A hibridação era realizada em câmara úmida (formamida 50%) a 37°C, por sete dias. Decorrido esse tempo era realizada a lavagem das lâminas em banho de formamida 50% e em 2xSSC, a 37°C, 3 minutos cada. Seguia-se um banho de PBT por 5 minutos à temperatura ambiente. A detecção das sondas marcadas com biotina era realizada com o anticorpo avidina acoplado ao fluorocromo FITC (1:100, Roche), enquanto que as sondas marcadas com digoxigenina eram detectadas com o anticorpo anti-digoxigenina acoplado ao fluorocromo rodamina (1:200, Roche). Nos dois casos a reação era realizada por 45 minutos a 37°C. As lâminas eram lavadas em três banhos em PBT por 3 minutos à temperatura ambiente e montadas com uma solução de DAPI (4', 6'-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride, Sigma-Aldrich Inc., St Louis, Estados Unidos) em *Vectashield Mounting Medium* (0,8 ng/µl, Vector Laboratories, Burlingame, Canadá). A análise cromossômica era feita em fotomicroscópio Zeiss Axiophot 2 e as imagens, capturadas por uma câmera CCD, eram processadas utilizando-se o programa ISIS (Metasystems).

No caso das sondas comerciais, 1,5 µl da sonda eram adicionados a 7 µl de *WCP Hybridization Buffer* (Vysis). A sonda era desnaturada a 73°C por 5 minutos e diretamente aplicada às preparações metafásicas. O tratamento das lâminas, o tempo e a temperatura de hibridação seguiram o mesmo protocolo descrito acima para os experimentos com as sondas obtidas por *flow sorting*. Após a hibridação, as lâminas eram lavadas em banho de formamida 50% e

outro de 2xSSC, a 37°C, 3 minutos cada, seguidos de banho de PBT por 5 minutos à temperatura ambiente. As lâminas eram, então, montadas e analisadas como descrito acima.

Para a identificação dos cromossomos das preguiças após a pintura cromossômica com as sondas humanas, as metáfases analisadas eram transferidas, em tons de cinza, para o programa IKAROS (Metasytems). Nesse programa eram realizadas as montagens dos cariótipos a partir da análise da morfologia e tamanho dos cromossomos e, quando possível, do padrão de bandas gerado pela coloração por DAPI. Foi seguida a organização dos cariótipos descritos por Manchester (2005) para *B. variegatus* e *B. torquatus*, após bandamento G.

OBTENÇÃO DE SONDAS POR MICRODISSECÇÃO CROMOSSÔMICA

Os procedimentos para a obtenção de sondas dos cromossomos X da preguiça *B. variegatus* e dos marsupiais *M. nudicaudatus* e *M. incanus* por microdissecção seguiram, com algumas modificações, o protocolo descrito por Weimer *et al.* (1999).

As preparações cromossômicas suspensas em fixador (3 metanol : 1 ácido acético) eram pingadas sobre uma lâmina de vidro e coradas por 10 minutos com Giemsa 10% em tampão fosfato Sörensen (Na_2HPO_4 0,03M, KH_2PO_4 0,03M, pH=6.8). Os procedimentos de microdissecção foram realizados em microscópio invertido (Axiovert S100, Zeiss) no qual um adaptador foi montado de forma a apoiar uma pipeta Pasteur siliconizada (solução de 5 μl de dimetilsilano em 50 μl de clorofórmio). Essa pipeta continha uma solução de proteinase K (50% glicerol, 10 mM Tris-HCL pH 7,5, 10 mM NaCl, 1% SDS e 500 $\mu\text{g/ml}$ proteinase K) para o recolhimento do material. Com a identificação do cromossomo almejado, a microdissecção era realizada com o auxílio de micromanipulador (*Transferrman NK2*, Eppendorf, Alemanha). Com uma microagulha de vidro era realizada a raspagem dos cromossomos, transferidos, em seguida, para a pipeta contendo a solução de proteinase K. A pipeta era, então, incubada a 60°C por 1 hora, para a digestão enzimática das

proteínas associadas aos cromossomos. Em seguida, a ponta da pipeta, contendo o material, era quebrada em um tubo de microcentrífuga, contendo reagentes para a amplificação do DNA em temperaturas baixas de *annealing* (1 µl de 10x PCR Buffer, 0,02 mM de cada dNTP, 5 µM de *primer* degenerado 6MW, 4 mM MgCl₂ e água Mili-Q estéril para completar um volume de 5 µl; os reagentes eram da Invitrogen). Todo o material utilizado para coleta e transferência do cromossomo era previamente esterilizado sob radiação UV por 2 horas. O programa de PCR consistia em uma primeira etapa de desnaturação a 92°C por 5 minutos, seguida de oito ciclos de 90°C por 1 minuto, 25°C por 2 minutos e 20 segundos e 34°C por 2 minutos. A cada ciclo, na temperatura de *annealing* do *primer* (25°C), 0,4 unidades da enzima T7 DNA polimerase (*Kit Sequenase*, USB Biochemicals, Cleveland, Estados Unidos) eram adicionadas, procedimento necessário pois essa enzima não é termoestável. Em seguida, após o término dos oito ciclos iniciais de amplificação, um *mix* de reagentes para PCR de temperatura mais alta de *annealing* era adicionado aos tubos contendo as amostras. Esse *mix* era composto por 5 µl de 10x PCR Buffer, 0,02 mM de cada dNTP, 1 µM de *primer* degenerado 6MW, 5 mM de MgCl₂, 2,5 unidades de Taq DNA polimerase (todos os reagentes eram da Invitrogen), 2,5 µl de detergente W1 e 27 µl de água Mili-Q estéril. Essa segunda etapa da PCR consistia em 33 ciclos a 92°C por 1 minuto, 56°C por 2 minutos e 72°C por 2 minutos, seguidos de extensão final a 72°C por 5 minutos.

As sondas assim obtidas foram utilizadas para FISH, seguindo o mesmo protocolo descrito acima para os experimentos com as sondas obtidas por *flow sorting*.

RESULTADOS

IV. RESULTADOS

1. COMPARAÇÃO ENTRE OS CROMOSSOMO HUMANOS E OS CROMOSSOMOS DAS PREGUIÇAS *Bradypus torquatus* E *Bradypus variegatus*

1.1. PINTURA CROMOSSÔMICA EM *Bradypus torquatus*

Realizamos pintura cromossômica em *B. torquatus* ($2n=50$), utilizando bibliotecas de todos os cromossomos humanos como sondas para a hibridação *in situ* fluorescente (FISH). Identificamos, assim, 32 segmentos conservados entre as espécies. Os resultados estão resumidos na Tabela IV.1.

Tabela IV.1 – Comparação dos cromossomos humanos e de *B. torquatus*, por FISH de bibliotecas dos cromossomos humanos nos cromossomos da preguiça.

Associações de autossomos humanos	Cromossomos humanos		
	Conservados	2 Blocos	3 Blocos
3/21, 4/8, 7/10, 7/16, 12/22(2x), 14/15, 17/19	1, 3, 4, 5, 6, 9, 11, 13, 14, 15, 17, 18, 20, 21, X	2, 7, 10, 12, 16, 19, 22	8

Cada uma das bibliotecas de 15 cromossomos humanos (HSA 1, 3, 4, 5, 6, 9, 11, 13, 14, 15, 17, 18, 20, 21 e X) hibridou em um único cromossomo ou segmento cromossômico na preguiça (Figuras IV.1, IV.3, IV.4).

Figura IV.1 - Metáfases de *B. torquatus* após FISH com bibliotecas dos cromossomos humanos 1, 5, 6, 9, 11, 13, 18, 20 e X. Cada cromossomo humano corresponde a um cromossomo na preguença.

Dois segmentos conservados em relação ao genoma humano foram detectados em *B. torquatus* pelas sondas correspondentes a HSA 2, 7, 10, 12, 16, 19 e 22 (Figuras IV.2, IV.3, IV.4).

Figura IV.2 - Metáfase de *B. torquatus* após FISH com biblioteca do cromossomos HSA 2, que marcou dois pares homólogos na preguiça.

A hibridação da biblioteca de HSA 8 revelou três sinais de hibridação nessa espécie (Figura IV.3). As associações consideradas ancestrais de Eutheria (HSA 3/21, 4/8, 7/16, 12/22 e 14/15) foram observadas no cariótipo de *B. torquatus* (Figura IV.3). A associação HSA 16/19, também considerada ancestral e presente nos cariótipos da maioria dos mamíferos placentários, não foi detectada nessa espécie.

Figura IV.3 - Metáfases de *B. torquatus* após FISH com bibliotecas de cromossomos humanos, que evidenciou as associações de autossomos humanos HSA 3/21, 4/8, 7/16, 12/22 e 14/15, consideradas ancestrais de Eutheria.

Além das associações consideradas ancestrais, a pintura com bibliotecas cromossômicas humanas também evidenciou duas associações derivadas no cariótipo de *B. torquatus*: HSA 7/10 e 17/19 (Figura IV.4).

Figura IV.4 - Metáfases de *B. torquatus* após FISH com bibliotecas de cromossomos humanos, evidenciando a presença das associações derivadas HSA 7/10 e 17/19.

O cariótipo de um macho de *B. torquatus* ($2n=50$), após bandamento G (Manchester, 2005), foi utilizado para a identificação dos cromossomos marcados pelas sondas humanas (Figura IV.5). As bibliotecas humanas não hibridaram com as regiões pericentroméricas dos cromossomos da preguiça. Além disso, as sondas humanas não hibridaram com o cromossomo 23 de *B. torquatus* (BTO 23), os braços curtos de BTO1 e BTO4 e um pequeno segmento proximal do braço longo de BTO1.

a)

b)

Figura IV.5 – Correspondências entre os cromossomos humanos e os de *B. torquatus*. Os cromossomos humanos correspondentes aos da preguiça estão representados pelos números à direita. (a) Cariótipo de macho de *B. torquatus*, após bandamento G (Manchester, 2005); (b) Diagrama dos cromossomos de *B. torquatus* cuja constituição em relação aos cromossomos humanos está representada pelas diferentes cores.

1.2. PINTURA CROMOSSÔMICA EM *Bradypus variegatus*

Realizamos pintura cromossômica em *B. variegatus* ($2n=54$), utilizando bibliotecas de todos os cromossomos humanos como sondas para FISH. Não obtivemos, entretanto, sinal de hibridação com a sonda de HSA 21. Identificamos 35 segmentos conservados entre as espécies. Os resultados estão resumidos na Tabela IV.2.

Tabela IV.2 – Comparação dos cromossomos humanos e de *B. variegatus*, por FISH de bibliotecas dos cromossomos humanos nos cromossomos da preguiça.

Associações de autossomos humanos	Cromossomos humanos		
	Conservados	2 Blocos	3 Blocos
4/8, 7/10, 7/16, 12/22, 12/22/16, 14/15, 17/19	5, 6, 9, 11, 13, 14, 15, 17, 18, 20, X	1, 2, 3, 4, 7, 10, 12, 19, 22	8, 16

Cada uma das bibliotecas de 11 cromossomos humanos (HSA 5, 6, 9, 11, 13, 14, 15, 17, 18, 20 e X) hibridou com um único cromossomo ou segmento cromossômico da preguiça (Figuras IV.6, IV.8, IV.9).

Figura IV.6 - Metáfases de *B. variegatus* após FISH com bibliotecas dos cromossomos humanos 5, 6, 9, 11, 13, 18, 20 e X. Cada cromossomo humano corresponde a um cromossomo na preguilha.

Dois segmentos conservados em relação ao genoma humano foram observados em *B. variegatus*, após FISH com as bibliotecas correspondentes a HSA 1, 2, 3, 4, 7, 10, 12, 19 e 22 (Figuras IV.7, IV.8, IV.9). A sonda de HSA 16 apresentou três sinais de hibridação em dois pares de cromossomos de *B. variegatus* (Figura IV.7)

Figura IV.7 - Metáfases de *B. variegatus* após FISH com bibliotecas dos cromossomos HSA 1, 2, 3 e 16, que marcaram dois pares homólogos, cada uma, na preguiça. A biblioteca de HSA16 marcou três segmentos, dois em um mesmo cromossomo.

A sonda correspondente a HSA 8 hibridou em três pares de cromossomos da preguiça (Figura IV.8). As associações consideradas ancestrais HSA 4/8, 7/16, 12/22 e 14/15 foram observadas no cariótipo de *B. variegatus*. Exemplos de FISH evidenciando algumas dessas associações estão representados na Figura IV.8. Assim como em *B. torquatus*, não observamos a associação HSA 16/19. Também não foi possível a verificação em *B. variegatus* da presença da associação ancestral HSA 3/21, uma vez que a biblioteca de HSA 21 não hibridou nos cromossomos dessa espécie.

Figura IV.8 - Metáfases de *B. variegatus* após FISH com bibliotecas de cromossomos humanos, que evidenciou as associações de autossomos humanos HSA 4/8, 12/22 e 14/15, consideradas ancestrais de Eutheria.

Três associações derivadas foram detectadas no cariótipo de *B. variegatus*, HSA 7/10, 12/22/16 e 17/19. Exemplos de FISH evidenciando algumas dessas associações estão representados na Figura IV.9.

Figura IV.9 - Metáfases de *B. variegatus* após FISH com bibliotecas de cromossomos humanos, que evidenciou as associações derivadas HSA 7/10 e 17/19

O cariótipo de um macho de *B. variegatus* ($2n=54$), após bandamento G (Manchester, 2005), foi utilizado para a identificação dos cromossomos marcados pelas sondas humanas (Figura IV.10). As bibliotecas humanas não hibridaram com as regiões pericentroméricas e com o cromossomo 25 de *B. variegatus* (BVA 25).

a)

b)

Figura IV.10 – Correspondências entre os cromossomos humanos e os de *B. variegatus*. Os cromossomos humanos correspondentes aos da preguiça estão representados pelos números à direita. (a) Cariótipo de macho de *B. variegatus*, após bandamento G (Manchester, 2005); (b) Diagrama dos cromossomos de *B. variegatus* cuja constituição em relação aos cromossomos humanos está representada pelas diferentes cores.

2. COMPARAÇÃO ENTRE OS CROMOSSOMOS X DAS PREGUIÇAS (*B. torquatus* E *B. variegatus*)

Realizamos a microdissecção do cromossomo X de *B. variegatus*, um submetacêntrico grande de fácil identificação. Primeiro essa sonda foi hibridada em preparações cromossômicas de uma fêmea da mesma espécie (Figura IV.11), demonstrando que a sonda marcava especificamente o cromossomo X. Uma região do braço longo desse cromossomo apresentou sinal de hibridação mais intenso. Em seguida, essa biblioteca foi hibridada em um macho de *B. variegatus*, marcando também especificamente o cromossomo X, sem apresentar sinais de hibridação no Y.

Figura IV.11 - Metáfase de fêmea de *B. variegatus* após FISH com a sonda obtida por microdissecção do cromossomo X da espécie.

A biblioteca do cromossomo X de *B. variegatus* foi, então, hibridada nos cromossomos de um macho da espécie *B. torquatus*, que possui um cromossomo X também submetacêntrico, com padrão de bandas semelhante ao de *B. variegatus* (Figuras IV.5 a e IV.10 a). A sonda pintou especificamente o cromossomo X de *B. torquatus*, com exceção da região pericentromérica. Não observamos segmentos em que o sinal de hibridação tivesse maior intensidade (Figura IV.12).

Figura IV.12 - Metáfase de um macho de *B. torquatus* após hibridação com a sonda obtida por microdissecção do cromossomo X de *B. variegatus*.

3. COMPARAÇÃO DOS CROMOSSOMOS X ENTRE DUAS ESPÉCIES DE MARSUPIAIS AMERICANOS

Realizamos a microdissecção dos cromossomos X dos marsupiais americanos *Marmosops incanus*, que possui um X relativamente grande e rico em heterocromatina, e *Metachirus nudicaudatus*, cujo cromossomo X tem tamanho diminuto e é basicamente eucromático (Svartman e Vianna-Morgante, 1999). A especificidade de cada sonda foi validada, pela hibridação em metáfases da espécie da qual foi obtida (Figura IV.13) e assim, observamos marcação mais intensa no braço longo do cromossomo X de *M. incanus* e nas regiões pericentromérica e telomérica do cromossomo X de *M. nudicaudatus*.

Figura IV.13. Metáfases de machos de a) *M. nudicaudatus* e b) *M. incanus*, após FISH com sonda obtida por microdissecção do cromossomo X da própria espécie.

A sonda do cromossomo X de *M. incanus* foi, então, hibridada nos cromossomos de *M. nudicaudatus*, observando-se marcação em toda a extensão do cromossomo X dessa espécie, com exceção da região pericentromérica (Figura IV.14).

Figura IV.14 - Metáfase de macho de *M. nudicaudatus* após hibridação com sonda obtida por microdissecção do cromossomo X de *M. incanus*.

Da mesma forma, a sonda correspondente ao cromossomo X de *M. nudicaudatus* (MNUX) foi hibridada nos cromossomos de *M. incanus*, resultando na pintura em toda extensão do cromossomo X dessa espécie, com exceção das regiões heterocromáticas (região pericentromérica e as extremidades dos dois braços) (Figura IV.15).

Figura IV.15 - Metáfase de macho de *M. incanus* após FISH com sonda obtida por microdissecção do cromossomo X de *M. nudicaudatus*.

DISCUSSÃO

V. DISCUSSÃO

1. EVOLUÇÃO CARIOTÍPICA EM XENARTHRA – EVIDÊNCIAS A PARTIR DE ESTUDOS COMPARATIVOS ENTRE OS CROMOSSOMOS HUMANOS E OS DE ESPÉCIES DE XENARTHRA

Neste trabalho, foi realizada pela primeira vez a comparação, por pintura cromossômica, entre os cariótipos humanos e os de duas espécies de preguiça, *B. torquatus* e *B. variegatus*. Buscamos assim, dados que viessem complementar os estudos de filogenia e evolução cariotípica em Xenarthra. Com esses resultados apenas os cromossomos de espécies da família Cyclopedidae de Xenarthra ainda não foram comparados com os humanos.

1.1. OS CARIÓTIPOS DE *Bradypus torquatus* E *Bradypus variegatus* QUANTO A SUA CORRESPONDÊNCIA COM OS CROMOSSOMOS HUMANOS

Na comparação com os cromossomos humanos, por pintura cromossômica com sondas de bibliotecas dos cromossomos humanos, os cariótipos de *B. torquatus* e *B. variegatus* mostraram-se semelhantes. Nas duas espécies de preguiças foram observados (a) as associações dos cromossomos humanos HSA 4/8, 7/10, 7/16, 12/22, 14/15 e 17/19, (b) a conservação de HSA 5, 6, 9, 11, 13, 14, 15, 17, 18, 20 e X, (c) dois pares compartilhando homologia com HSA 2, 7, 10, 12, 19 e 22 e (d) três pares, com segmentos homólogos a HSA 8. Além disso, não detectamos nessas duas espécies de preguiça a associação ancestral HSA 16/19, presente nos cariótipos da maioria dos mamíferos placentários.

As principais diferenças que detectamos entre os cariótipos das duas preguiças se referem a (a) HSA1, 3 e 4, conservados em *B. torquatus*, mas divididos em dois blocos em *B. variegatus*; (b) HSA 16, em dois blocos no cariótipo de *B. torquatus*, mas em três em *B. variegatus* e (c) presença da associação HSA 12/22/16 no cariótipo de *B. variegatus*, ausente em *B. torquatus*. A divisão de HSA 16 em três blocos em *B. variegatus* parece ser resultado de rearranjo intracromossômico, são observados três sinais de

hibridação, após a hibridação *in situ* com a sonda desse cromossomo humano, em dois cromossomos dessa espécie de preguiça. A associação ancestral HSA 3/21, presente em representantes de todas as ordens de Eutheria, foi observada no cariótipo de *B. torquatus*, porém não pode ser verificada em *B. variegatus*, uma vez que a biblioteca de HSA 21 não hibridou com os cromossomos dessa espécie. Muito provavelmente a ausência de hibridação dessa sonda nos cromossomos de *B. variegatus* não representa ausência de homologia com HSA 21 no cariótipo, uma vez que tivemos dificuldades técnicas com a hibridação da sonda obtida por *flow sorting*, que não hibridou também nos cromossomos de *B. torquatus*. Utilizamos, com sucesso, nessa última espécie, uma sonda comercial, que tínhamos em quantidade limitada, o que nos impossibilitou, em tempo hábil, o experimento de hibridação nos cromossomos de *B. variegatus*.

A pintura com as sondas correspondentes aos 23 cromossomos humanos evidenciou 32 segmentos conservados em *B. torquatus*, enquanto que em *B. variegatus* 35 segmentos foram detectados pela pintura com sondas de 22 cromossomos humanos. O cariótipo de *B. variegatus* ($2n=54$) aparece, portanto, mais rearranjado em relação ao humano do que o de *B. torquatus* ($2n=50$), principalmente devido a fissões de cromossomos, que levaram ao maior número diplóide dessa espécie.

Os braços curtos dos cromossomos 1 e 4 de *B. torquatus* (BTO 1 e 4), um pequeno segmento proximal do braço longo de BTO 1, BTO 23 inteiro, o cromossomo 25 inteiro de *B. variegatus* (BVA 25) e as regiões pericentroméricas dos cromossomos das duas espécies não foram marcados por qualquer sonda humana. Esses cromossomos e segmentos cromossômicos são ricos em heterocromatina, como evidenciado pelo bandamento C (Manchester, 2005), e devem, portanto, estar constituídos em grande parte por sequências repetitivas ausentes no genoma humano, não tendo, assim, homologia suficiente com as sondas humanas para que ocorra a hibridação *in situ*. Também não podemos descartar a hipótese de que a ausência de marcação nesses segmentos seja resultado de problemas técnicos de hibridação ou que as regiões homólogas apresentem tamanho reduzido, abaixo do limite de resolução da pintura cromossômica, que é de aproximadamente 5 Mb (Schertan *et al.*, 1994). Em *B. variegatus*, regiões não

marcadas também podem corresponder a HSA 21, única biblioteca humana que não produziu sinal de hibridação no cariótipo dessa espécie.

1.2. COMPARAÇÃO ENTRE OS CARIÓTIPOS DE *Bradypus torquatus* E *B. variegatus* E OS DE OUTRAS ESPÉCIES DE XENARTHRA, COM BASE NA CORRESPONDÊNCIA COM OS CROMOSSOMOS HUMANOS

Além das espécies de preguiça que estudamos outras quatro espécies de Xenarthra - *Tamandua tetradactyla* (tamanduá), *Dasypus novemcinctus* (tatu), *Choloepus hoffmanni* e *C. didactylus* (preguiças de dois dedos) - tiveram os seus cromossomos comparados com os humanos por pintura cromossômica (Svartman *et al.*, 2006, Yang *et al.*, 2006). O cariótipo de *Bradypus tridactylus* (preguiça de três dedos) foi comparado com o de *C. didactylus*, por pintura cromossômica com bibliotecas dos cromossomos de *C. didactylus* (CDI), excetuando CDI 18, 20 e 30, que correspondem a HSA 2/8, 14 e 11 (Dobigny *et al.*, 2005). Isso nos permitiu inferir correspondências entre os cromossomos de *B. tridactylus* e os cromossomos humanos (Figura V.1).

Figura V.1.- Diagrama dos cromossomos de *B. tridactylus* ($2n=52$), com os cromossomos humanos correspondentes representados pelos números à direita e pelas diferentes cores. A correspondência com os cromossomos humanos foi inferida a partir da comparação, por pintura cromossômica, entre os cromossomos de *B. tridactylus* e *C. didactylus* (Dobigny *et al.*, 2005) e entre os cromossomos de *C. didactylus* e os humanos (Yang *et al.*, 2006).

Reunindo os nossos resultados para *B. variegatus* e *B. torquatus* e aqueles obtidos para as espécies de Xenarthra acima descritas, observamos, em todas as espécies, (a) a conservação de HSA 9, 13, 17, 18, 20 e X, (b) dois pares compartilhando homologia com HSA 19 e 22 e (c) as associações HSA 4/8, 7/16, 12/22 e 14/15. A associação ancestral HSA 3/21 está presente em todas as espécies estudadas, com exceção de *B. variegatus*, que como discutimos acima, não obtivemos hibridação da sonda de HSA 21, o que não significa que a associação esteja ausente nessa espécie. A presença de três pares com homologia a HSA 8 foi detectada nos cromossomos de todas as espécies de Xenarthra, com exceção de *B. tridactylus*. Porém, a biblioteca de CDI 18, correspondente a HSA 2/8, não foi hibridada em *B. tridactylus* assim, é muito provável que essa espécie também apresente em seu cariótipo HSA 8 dividido em três blocos.

1.3. IDENTIFICAÇÃO DE ASSINATURAS CROMOSSÔMICAS NA SUPRAORDEM XENARTHRA

Yang *et al.* (2006) sugeriram que as associações HSA 2/8 e 7/10 seriam assinaturas cromossômicas da supraordem Xenarthra. Os autores detectaram a associação HSA 2/8 nos cariótipos da preguiça, *C. didactylus* e do tamanduá, *T. tetradactyla*, porém essa associação não foi observada no cariótipo de nenhuma outra espécie do grupo. Também não detectamos essa associação em *B. torquatus* e *B. variegatus* e, assim, concluímos que sua presença em *C. didactylus* e *T. tetradactyla*, que apresentam cariótipos muito rearranjados em relação aos outros Xenarthra, deve ser resultado de convergência.

A associação HSA 7/10 foi observada nos cariótipos de *C. didactylus* e *T. tetradactyla* e, por inferência, detectada nos cromossomos da preguiça *B. tridactylus* e do tatu *Euphractus sexcinctus* (Yang *et al.*, 2006). Também observamos essa associação nos cromossomos de *B. torquatus* e *B. variegatus*. A associação HSA 7/10 está, então, presente nos cariótipos de espécies representantes de quatro famílias de Xenarthra e não é verificada em nenhuma outra ordem de mamíferos placentários. Com isso, concordamos com Yang *et al.* (2006) na classificação dessa associação como uma assinatura cromossômica de Xenarthra. Das espécies estudadas de Xenarthra HSA 7/10

só não foi detectada nos cromossomos de *C. hoffmanni* e *D. novemcinctus* (Svartman *et al.*, 2006); no entanto, os autores notaram que o cromossomo da preguiça marcado apenas por HSA 7 não foi pintado por qualquer outra biblioteca humana, em uma pequena região terminal. É possível que esse segmento não marcado corresponda a HSA 10 e não tenha sido detectado por falha técnica ou devido ao pequeno segmento de homologia, insuficiente para a hibridação da sonda.

A divisão de HSA 8 em três blocos também foi proposta como sinapomorfia cromossômica de Xenarthra (Svartman *et al.*, 2006). Essa característica foi detectada nos cariótipos das preguiças de dois dedos, do tamanduá e do tatu (Svartman *et al.*, 2006; Yang *et al.*, 2006). Também observamos três pares com homologia a HSA 8 em *B. torquatus* e *B. variegatus* e assim apoiamos a hipótese de que a presença de três segmentos, ao invés dos dois segmentos correspondentes a HSA 8, geralmente presentes nos cariótipos dos mamíferos placentários e nos cariótipos propostos como ancestrais de Eutheria, constitui uma sinapomorfia cromossômica de Xenarthra.

As associações HSA 1/19 e 5/21 foram sugeridas como assinaturas cromossômicas da supraordem Afrotheria. Com a identificação da associação HSA 7/10 e da divisão de HSA 8 em três blocos em Xenarthra, esse grupo passa a ser a segunda supraordem de mamíferos placentários com características cromossômicas indicativas da monofilia do grupo. A fusão de segmentos dos cromossomos humanos 7 e 10 e a fissão de um dos segmentos correspondentes a HSA 8 devem ter ocorrido no ancestral comum de Xenarthra. É importante ressaltar que estudos de pintura cromossômica recíproca ou de mapeamento gênico precisam ser realizados para a confirmação de que os mesmos segmentos cromossômicos e pontos de quebra estão envolvidos nesses rearranjos nas diferentes espécies de Xenarthra.

Ordem Pilosa

Em comum para a ordem Pilosa (tamanduás e preguiças) foi observada a divisão de HSA 12 em dois blocos, representado por três blocos no tatu. Dois

pares com homologia a HSA 12 estão presentes nos cariótipos da maioria das espécies de mamíferos placentários e nos cariótipos propostos como ancestrais de Eutheria (Murphy *et al.*, 2003; Ferguson-Smith & Trifonov, 2007). A divisão desse cromossomo humano em três blocos no tatu, portanto, é uma característica derivada, enquanto que sua presença em dois blocos em Pilosa é um traço simplesiomórfico. Apesar de a monofilia da ordem Pilosa estar claramente apoiada em dados moleculares (Delsuc *et al.*, 2001, 2002; Möller-Krull *et al.*, 2007), não foram detectadas características cromossômicas sinapomórficas para o grupo. Provavelmente a divergência do clado não foi acompanhada de rearranjos cromossômicos significativos.

Subordem Folivora (preguiças)

Nas preguiças, a associação ancestral HSA 16/19 foi detectada na espécie *C. hoffmanni* (Svartman *et al.*, 2006), estando ausente em *C. didactylus* (Yang *et al.*, 2006). Demonstramos agora sua ausência também em *B. torquatus*, *B. variegatus* e *B. tridactylus*. É notável a perda dessa associação ancestral em quatro espécies de preguiças, uma vez que ela é encontrada na grande maioria dos mamíferos placentários. Essa associação pode ter sido perdida convergentemente, no ancestral comum do gênero *Bradypus* e na linhagem da espécie *C. didactylus* ou ter desaparecido no ancestral comum das preguiças e depois reaparecido, convergentemente, na linhagem de *C. hoffmanni*. Outra possibilidade é que *Choloepus* e *Bradypus* formem um grupo monofilético, porém que o gênero *Choloepus* seja parafilético, com a espécie *C. hoffmanni* tendo divergido primeiro e a associação HSA 16/19 sido desfeita no ancestral comum de *Bradypus* e *C. didactylus*. HSA 16q/19q é a única das associações consideradas ancestrais de Eutheria que é derivada de fusão cêntrica (Yang *et al.*, 2006). Pontos de quebra localizados em regiões centroméricas tendem a ser recorrentes (Murphy *et al.*, 2005), o que poderia explicar a perda dessa associação duas vezes, em *Bradypus* e em *C. didactylus*, ou até mesmo o seu reaparecimento em *C. hoffmanni*, caso essa associação tenha sido perdida em um ancestral comum das preguiças.

B. torquatus e *C. hoffmanni*, que possuem os menores números diplóides entre as preguiças, apresentam os cariótipos mais conservados em

relação aos propostos como ancestrais para Eutheria. Conservam intactos HSA 1, 3 e 4, cada um deles divididos em dois blocos em *B. variegatus* e *C. didactylus*. Murphy *et al.* (2003) ressaltaram que há uma forte correlação entre a manutenção do cromossomo ancestral correspondente a HSA 1 intacto e baixas taxas de evolução genômica, como no caso de golfinhos e humanos. De fato, as espécies *B. torquatus* e *C. hoffmanni* parecem possuir os cariótipos mais conservados entre as preguiças.

Nenhuma sinapomorfia cromossômica foi detectada unindo os dois gêneros de preguiças, o que pode significar que a divergência da subordem Folivora não tenha sido acompanhada de rearranjos cromossômicos significativos ou que esses dois gêneros não formam um clado monofilético. Uma origem difilética para *Choloepus* e *Bradypus* já foi sugerida (Höss *et al.*, 1996; Greenwood *et al.*, 2001). Alguns estudos moleculares indicam que as duas famílias de preguiça formam um clado monofilético (Delsuc *et al.*, 2001, 2002). Para o gênero *Choloepus* não foram observadas assinaturas cromossômicas.

Gênero *Bradypus*

Comparando os nossos resultados em *B. variegatus* e *B. torquatus* com os inferidos para *B. tridactylus*, verificamos que essas espécies compartilham a associação HSA 17/19, que não está presente em qualquer outra espécie de Xenarthra ou Eutheria. Com isso, propomos que essa associação represente uma assinatura cromossômica do gênero *Bradypus*, apoiando a monofilia do grupo, como já havia sido indicado por dados moleculares (Delsuc *et al.*, 2001, 2002). Alguns estudos morfológicos e moleculares sugerem a separação de *B. torquatus* em um gênero distinto (Wetzel e Ávila-Pires, 1980; Barros *et al.*, 2003).

A conservação de HSA 1 intacto e de HSA 16 em dois blocos são características comuns à *B. tridactylus* e *B. torquatus*. Já, a presença de dois homólogos a HSA 3 e 4 e da associação HSA 12/22/16 são características comuns aos cariótipos de *B. variegatus* e *B. tridactylus*. No entanto, as características compartilhadas por *B. torquatus* e *B. tridactylus* estão presentes nos cariótipos propostos como ancestrais de Eutheria, representando

simplesiomorfias. Já a presença da associação HSA 12/22/16 e das fissões de HSA 3 e 4, em *B. variegatus* e *B. tridactylus*, são características derivadas, ausentes do cariótipo ancestral. A fissão de HSA 3 e 4 já foi verificada em outras espécies de Eutheria, incluindo *Xenarthra* (Yang *et al.*, 2003, 2006; Svartman *et al.*, 2006; Huang *et al.*, 2008), porém a associação HSA 12/22/16 não foi observada nos cromossomos de qualquer outra espécie e nem em grupos externos. Assim, sugerimos que essa associação represente uma sinapomorfia cromossômica, unindo *B. variegatus* e *B. tridactylus* em um clado monofilético. A pintura cromossômica recíproca permitirá a identificação mais precisa dos segmentos cromossômicos participantes da associação HSA 12/22/16 e das fissões de HSA 3 e 4 nas duas espécies.

Manchester (2005) comparou os cariótipos de *B. torquatus* e *B. variegatus*, após bandamento G e C com o cariótipo de *B. tridactylus* descrito por Dobigny *et al.* (2005) e verificou que os cariótipos das preguiças *B. variegatus* e *B. tridactylus* eram os mais semelhantes do gênero. Nossos resultados concordam com os de Manchester (2005), já que os cariótipos de *B. variegatus* e *B. tridactylus* apresentaram maior similaridade no padrão de pintura com as bibliotecas humanas, compartilhando, inclusive, a associação derivada exclusiva, HSA 12/22/16.

1.4. POSIÇÃO FILOGENÉTICA DE XENARTHRA

Ainda há muita controvérsia a respeito de qual clado comporia a base da árvore filogenética de Eutheria, Afrotheria, *Xenarthra* ou uma combinação dos dois (Shoshani & Mackenna, 1998; Delsuc *et al.*, 2002; Springer *et al.*, 2004; Nishihara *et al.*, 2007; Nikolaev *et al.*, 2007; Hallström *et al.*, 2007; Murphy *et al.*, 2007; Prasad *et al.*, 2008). A associação HSA 1/19 foi proposta como uma sinapomorfia cromossômica unindo Afrotheria e *Xenarthra* (Ferguson-Smith & Trifonov, 2007). Essa associação foi encontrada em todas as espécies de Afrotheria estudadas, porém em *Xenarthra* ela só foi observada nos cromossomos do tamanduá, justamente a espécie com cariótipo mais rearranjado do grupo; além disso, não há evidências de que essa associação seja homóloga nas duas ordens (Yang *et al.*, 2003; Dobigny *et al.*, 2005; Svartman *et al.*, 2006; Yang *et al.*, 2006). Também não observamos essa

associação nos cromossomos de *B. variegatus* e *B. torquatus* e, assim, não temos dados que apoiem a classificação dessa associação como uma característica cromossômica, unindo Afrotheria e Xenarthra.

A partir da análise das comparações *in silico*, disponíveis no banco de dados *Ensembl*, dos genomas do marsupial, *Monodelphis domestica* e da galinha, *Gallus gallus*, com o genoma humano, verificamos uma associação entre os segmentos HSA 7q e 10p no cromossomo 8 do marsupial e 1 da galinha. A associação HSA 7/10 parece ser uma característica cromossômica de Xenarthra, porém experimentos de pintura cromossômica recíproca precisariam ser realizados para verificar se os mesmos segmentos cromossômicos estão envolvidos na associação em Xenarthra e nos grupos externos (marsupial e galinha). É provável que o segmento de HSA 10 da associação em Xenarthra seja HSA 10p, assim como no marsupial e na galinha, já que nos cariótipos propostos como ancestrais de Eutheria HSA 10 é dividido em dois cromossomos ancestrais (correspondentes a HSA 10p e 10q) e nos Xenarthra o menor segmento correspondente a HSA 10, que deve representar HSA 10p, está associado com HSA 7. Se for verificada a homologia real entre as associações HSA 7/10 presentes em Xenarthra e nos grupos externos, ter-se-á forte indicações para a classificação de Xenarthra como grupo basal de Eutheria e para a classificação dessa associação como ancestral de Eutheria. Caso Xenarthra componha sozinho a posição basal do grupo, a associação HSA 7/10, presente no ancestral dos mamíferos placentários teria sido perdida na linhagem levando às outras ordens de mamíferos placentários, após a divergência de Xenarthra. No caso de Afrotheria ser a primeira supraordem a divergir dos Eutheria ou de Xenarthra e Afrotheria serem grupos irmãos, hipótese que vem sendo cada vez mais fortalecida por estudos moleculares (Hallström *et al.*, 2007; Murphy *et al.*, 2007; Waters *et al.*, 2007; Prasad *et al.*, 2008), então a associação HSA 7/10, presente no ancestral, seria perdida duas vezes, na linhagem dos Afrotheria e na linhagem levando aos demais grupos de Eutheria.

Com base em estudos de pintura cromossômica com sondas humanas em espécies de Xenarthra, Svartman *et al.* (2006) não descartam a hipótese de que essa supraordem seja um grupo basal de Eutheria, uma vez que espécies

desse grupo apresentam cariótipos muito próximos aos propostos para o ancestral de Eutheria.

1.5. COMPARAÇÕES DOS CARIÓTIPOS DE *B. torquatus* E *B. variegatus* COM O CARIÓTIPO PROPOSTO COMO ANCESTRAL DE EUTHERIA

Comparamos os cariótipos de *B. torquatus* e *B. variegatus* com o último cariótipo proposto como ancestral para Eutheria (Ferguson-Smith & Trifonov, 2007). Essa proposta é a mais recente e inclui a maior quantidade de dados de pintura cromossômica em espécies pertencentes as quatro supraordens de mamíferos placentários. Além disso, ela foi validada pela comparação com grupos externos, marsupial e galinha (Robinson & Ruiz-Herrera, 2008). As principais diferenças que observamos entre os cariótipos de *B. torquatus* e o ancestral foram (a) a ausência das associações ancestrais HSA 10/12/22 e 16/19 na preguiça, (b) a presença das associações HSA 7/10 e 17/19 na preguiça, ausentes no ancestral e (c) a divisão de HSA 8 em três cromossomos na preguiça, presente em dois cromossomos no ancestral. Para *B. variegatus* além dessas diferenças, foram observadas (a) a divisão de HSA 1, 3 e 4 em dois blocos, conservados no ancestral, (b) a divisão em três blocos de HSA 16, presente em dois blocos no ancestral e (c) a presença da associação HSA 12/22/16, ausente no ancestral. A associação ancestral HSA 3/21 não pode ser verificada em *B. variegatus*, já que a sonda correspondente a HSA 21 não hibridou nos cromossomos dessa espécie, muito provavelmente por problemas técnicos. Com esses resultados concluímos que *B. torquatus* apresenta um cariótipo mais semelhante ao ancestral de Eutheria do que *B. variegatus*.

A validação da homologia da associação HSA 7/10 em Xenarthra e nos cariótipos de grupos externos é fundamental para sua inclusão no cariótipo ancestral de Eutheria.

1.6. CARIÓTIPO ANCESTRAL DE XENARTHRA

Com base nas comparações dos cariótipos de espécies de Xenarthra, pertencentes a quatro famílias do grupo, entre si ou com o cariótipo humano e considerando os cariótipos de grupos externos, chegamos à proposição de um

cariótipo ancestral para a supraordem Xenarthra, com $2n=48$ (Figura V.2). Esse cariótipo contém (a) as associações HSA 3/21, 4/8, 7/10, 7/16, 12/22 (2x), 14/15 e 16/19, (b) a conservação dos cromossomos HSA 1, 3, 4, 5, 6, 9, 11, 13, 14, 15, 17, 18, 20, 21 e X, (c) dois pares com homologia a HSA 2, 7, 10, 12, 16, 19 e 22 e (d) três pares com homologia a HSA 8.

Figura V.2 – Diagrama do cariótipo proposto para o ancestral de Xenarthra. Sua constituição em relação aos cromossomos humanos está representada pelas diferentes cores e pelos números à direita dos cromossomos.

Dobigny *et al.* (2005) sugeriram alguns cromossomos, ou associações de cromossomos de *C. didactylus* (CDI 7, 8, 10, 14, 17, 24, 29, 3/31, 5/13b, 6/22, 9/25 e 26/27) como ancestrais de Xenarthra, baseados na sua presença em pelo menos uma espécie de Pilosa e no grupo externo, o tatu *E. sexcinctus*. Esses cromossomos correspondem respectivamente a: HSA 1, 9, 1, 17, 13, 20, 7/16, 11/19, 3/21, 7/10, 5, 16/19. Dos cromossomos ancestrais de Xenarthra propostos por Dobigny *et al.* (2005), HSA 1 dividido em dois blocos e a associação HSA 11/19 não fazem parte do cariótipo que propusemos para o ancestral dessa supraordem. Na nossa proposta consideramos HSA 1 conservado intacto como uma característica ancestral de Xenarthra, isso porque esse cromossomo humano apresenta-se conservado no ancestral de Eutheria e em três espécies de Xenarthra (*C. hoffmanni*, *B. torquatus* e *B. variegatus*) e deve ter sido convergentemente dividido nos cariótipos das outras espécies do grupo, como já foi demonstrado para outros mamíferos

placentários (Murphy *et al.*, 2003). Quanto à associação HSA 11/19, não a incluímos no cariótipo ancestral de Xenarthra devido a sua presença em apenas duas espécies do grupo (*B. tridactylus* e *E. sexcinctus*), além de não fazer parte dos cariótipos de grupos externos e nem do proposto como ancestral de Eutheria. Os demais cromossomos sugeridos por Dobigny *et al* (2005), estão presentes também no cariótipo ancestral de Xenarthra que propomos.

B. torquatus é a espécie de Xenarthra com o cariótipo mais semelhante ao que propusemos para o ancestral do grupo, sendo as únicas diferenças a ausência da associação ancestral HSA 16/19 e a presença da associação derivada HSA 17/19. *C. hoffmanni* também apresenta um cariótipo conservado em relação ao ancestral de Xenarthra, diferindo pela divisão de HSA 16 em três blocos na preguia (em dois blocos no ancestral) e pela ausência de um segundo bloco de HSA10 associado a HSA7 (discussão no item 1.3).

Em relação ao cariótipo proposto como ancestral de Eutheria (Ferguson-Smith & Trifonov, 2007) nossa proposta para o cariótipo ancestral de Xenarthra difere (a) pela ausência da associação ancestral de Eutheria HSA 10/12/22; (b) pela presença da associação HSA 7/10, ausente na proposta para o cariótipo ancestral de Eutheria; e (c) pela divisão de HSA 8 em três blocos, com dois blocos correspondentes a esse cromossomo no ancestral de Eutheria.

2. COMPARAÇÃO ENTRE OS CROMOSSOMOS X DAS PREGUIÇAS (*B. torquatus* E *B. variegatus*)

A hibridação da biblioteca do cromossomo X de *B. variegatus*, obtida por microdissecção, em metáfases da própria espécie evidenciou uma região do X que era marcada com maior intensidade. Esse segmento parece corresponder a uma banda evidenciada pela coloração mais intensa por DAPI, sendo, porém banda C negativa (Manchester, 2005). É possível tratar-se de segmento com sequências repetitivas.

A biblioteca do X não produziu sinal de hibridação no cromossomo Y de macho da espécie. A pintura do cromossomo Y evidenciaria a presença de região pseudoautossômica. Yang *et al.* (2006) sugeriram que os cromossomos sexuais da preguiça *C. didactylus* compartilham homologia, ao observarem marcação de todo o braço longo do cromossomo Y, além do X, após hibridação de biblioteca do cromossomo X humano. Os próprios autores chamaram atenção para esse resultado inusitado, uma vez que nunca fora observada hibridação de sonda do cromossomo X no cromossomo Y de mamíferos de ordens distintas. Mesmo a hibridação de biblioteca do cromossomo X na região pseudoautossômica do cromossomo Y só foi observada entre espécies filogeneticamente muito próximas.

Com a hibridação da sonda do cromossomo X de *B. variegatus* nos cromossomos de *B. torquatus*, observamos a pintura total do cromossomo X, evidenciando a conservação desse cromossomo nas duas preguiças. Apenas a região pericentromérica, rica em heterocromatina, não foi marcada no X de *B. torquatus*, o que indica divergência das sequências heterocromáticas dos cromossomos X das duas espécies de preguiça. Dobigny *et al.* (2005) também detectaram a conservação desse cromossomo entre as espécies de Xenarthra, *C. didactylus*, *B. tridactylus* e *T. tetradactyla*. Nossos dados vêm se reunir aos demais que apóiam a conservação do cromossomo X em mamíferos, proposta já em 1967 por Ohno.

3. COMPARAÇÃO ENTRE OS CROMOSSOMOS X DE DUAS ESPÉCIES DE MARSUPIAIS AMERICANOS

Enquanto *M. nudicaudatus* apresenta um cromossomo X acrocêntrico, predominantemente eucromático, de tamanho diminuto, *M. incanus* possui um X submetacêntrico, relativamente grande, com dois blocos heterocromáticos nas extremidades dos braços cromossômicos (Svartman & Vianna-Morgante, 1999). A hibridação das sondas obtidas por microdissecção dos cromossomos X de *M. nudicaudatus* e *M. incanus* nos cromossomos das próprias espécies resultou na pintura de todo o cromossomo X, com marcação mais intensa no braço longo e região pericentromérica em *M. incanus* e na região pericentromérica e telomérica de *M. nudicaudatus*. Essa marcação diferencial deve ser resultante da presença de sequências repetitivas nessas regiões cromossômicas.

A pintura recíproca evidenciou a conservação das regiões eucromáticas do X entre essas espécies. Não observamos marcação das regiões pericentroméricas nas duas espécies e nem dos blocos distais heterocromáticos do cromossomo X de *M. incanus*, indicando que as duas espécies não compartilham as sequências repetitivas que compõem esses blocos de heterocromatina.

Rens *et al.* (1999) realizaram experimentos de hibridação com sondas correspondentes aos cromossomos X dos marsupiais australianos *Sminthopsis crassicaudata* e *Trichosurus vulpecula* em metáfases de *Macropus eugenii*. O cromossomo X dessa última espécie apresenta um braço curto predominantemente heterocromático, que também não apresentou marcação pelas sondas dos cromossomos X eucromáticos das duas outras espécies. Svartman & Vianna-Morgante (1999) realizaram experimentos de FISH com sondas de DNA genômico total entre três espécies de marsupiais americanos *Philander opossum*, *Micoureus demerarae* e *Marmosops incanus* e observaram que a pintura com as sondas nos cromossomos da própria espécie apresentava marcação em todo o cariótipo, com maior intensidade nas regiões heterocromáticas. Já a pintura entre espécies diferentes restringia-se às regiões eucromáticas, evidenciando, assim, a conservação da eucromatina e a

divergência das sequências heterocromáticas entre essas espécies de marsupiais.

Nossos resultados apontam a conservação da eucromatina dos cromossomos X de *M. nudicaudatus* e *M. incanus* e demonstram que as regiões de heterocromatina, tanto pericentromérica quanto distais, não são conservadas entre as espécies.

SUMÁRIO E CONCLUSÕES

VI. SUMÁRIO E CONCLUSÕES

Com o intuito de contribuir para a compreensão da evolução cariotípica em mamíferos, realizamos estudos comparativos, utilizando a pintura cromossômica, em dois grupos basais de mamíferos, as preguiças e os marsupiais. Realizamos comparações entre os cromossomos humanos e os cromossomos das preguiças de três dedos *Bradypus torquatus* e *Bradypus variegatus*, estabelecendo as homologias. A análise conjunta de nossos dados e daqueles da literatura sobre pintura cromossômica em outras espécies de Xenarthra permitiu identificar ou confirmar sinapomorfias cromossômicas dos grupos assim como características ancestrais. Também realizamos comparações entre os cromossomos X das duas espécies de preguiça e entre os cromossomos X dos marsupiais americanos *Marmosops incanus* e *Metachirus nudicaudatus*.

Os principais resultados e conclusões estão resumidos a seguir.

1. Os cariótipos de *B. torquatus* e *B. variegatus* são semelhantes quanto à correspondência com os cromossomos humanos. As duas espécies apresentaram em comum (a) a presença das associações dos cromossomos humanos (HSA) 4/8, 7/10, 7/16, 12/22, 14/15 e 17/19, (b) a conservação de HSA 5, 6, 9, 11, 13, 14, 15, 17, 18, 20 e X, (c) dois pares compartilhando homologia com HSA 2, 7, 10, 12, 19 e 22, (d) três pares, com segmentos homólogos a HSA 8 e (e) a ausência da associação ancestral de Eutheria HSA 16/19.

2. O cariótipo de *B. variegatus* ($2n=54$) é mais rearranjado em relação ao humano do que o de *B. torquatus* ($2n=50$), principalmente devido a fissões de cromossomos ancestrais, que levaram ao maior número diplóide dessa espécie.

3. Reunindo os dados para as preguiças *B. variegatus* e *B. torquatus* aos das demais espécies de Xenarthra que tiveram estabelecidas as correlações entre seus cromossomos e os cromossomos humanos, confirmamos como características presentes em todas as espécies dessa supraordem (a) a conservação de HSA 9, 13, 17, 18, 20 e X, (b) a presença de

dois pares cromossômicos compartilhando homologia com HSA 19 e 22 e (c) a presença das associações HSA 4/8, 7/16, 12/22 e 14/15.

4. Confirmamos a associação HSA 7/10 e a divisão de HSA 8 em três blocos como assinaturas cromossômicas da supraordem Xenarthra, o que concorda com a monofilia do grupo.

5. Mostramos que a associação HSA 17/19, presente nos cariótipos de *B. variegatus*, *B. torquatus* e *B. tridactylus*, parece ser assinatura cromossômica do gênero *Bradypus*, apoiando a monofilia do grupo.

6. Mostramos que a associação HSA 12/22/16 parece ser uma sinapomorfia cromossômica, unindo as espécies *B. variegatus* e *B. tridactylus*.

7. Considerando a correspondência com os cromossomos humanos, verificamos que os cariótipos de *B. variegatus* e *B. tridactylus* são os mais semelhantes, no gênero *Bradypus*.

8. A análise das correspondências entre as sequências dos cromossomos humanos e as sequências dos cromossomos de grupos externos de mamíferos placentários (marsupial e galinha) disponíveis no banco de dados *Ensembl*, mostrou que a associação HSA 7/10 presente na supraordem Xenarthra também ocorre nesses grupos externos. Confirmando-se a homologia dessa associação entre os grupos, ela deveria ser classificada como ancestral de Eutheria, apoiando a posição basal dos Xenarthra na árvore filogenética dos mamíferos placentários.

9. Nossas análises comparativas permitiram propor um cariótipo ancestral de Xenarthra com número diplóide de 48 cromossomos, incluindo (a) as associações HSA 3/21, 4/8, 7/10, 7/16, 12/22 (2x), 14/15 e 16/19, (b) a conservação dos cromossomos HSA 1, 3, 4, 5, 6, 9, 11, 13, 14, 15, 17, 18, 20, 21 e X, (c) dois pares cromossômicos com homologia a HSA 2, 7, 10, 12, 16, 19 e 22 e (d) três pares com homologia a HSA 8.

10. Entre os Xenarthra, *B. torquatus* e *C. hoffmanni*, com os menores números diplóides da supraordem, apresentam os cariótipos mais conservados em relação ao cariótipo que propusemos como ancestral de Xenarthra e também em relação ao mais recente cariótipo proposto como ancestral de Eutheria.

11. A conservação da eucromatina do cromossomo X foi evidenciada nos experimentos de pintura cromossômica interespecífica, entre as preguiças *B. torquatus* e *B. variegatus* e entre os marsupiais *M. incanus* e *M. nudicaudatus*. Os segmentos heterocromáticos desses cromossomos se mostraram divergentes, não permitindo a hibridação *in situ* interespecífica.

ABSTRACT

VII. ABSTRACT

In an attempt to shed additional light on mammalian karyotype evolution, we studied, by chromosome painting, the chromosomes of species from two mammalian basal groups, sloths and marsupials. We compared human chromosomes with the chromosomes of two species of three-toed sloths, *Bradypus torquatus* and *Bradypus variegatus*, establishing homologies. Analyzing together ours and published data on chromosome painting in Xenarthra species allowed us to identify or confirm chromosome synapomorphies and ancestral characteristics. We also used chromosome painting to compare the X chromosomes of *Bradypus torquatus* and *Bradypus variegatus* as well as the X chromosomes of two American marsupials, *Marmosops incanus* and *Metachirus nudicaudatus*.

Our main results and conclusions are summarized below.

1. The karyotypes of both *B. torquatus* and *B. variegatus* include (a) the human chromosomes associations HSA 4/8, 7/10, 7/16, 12/22, 14/15 and 17/19, (b) the conservation of HSA 5, 6, 9, 11, 13, 14, 15, 17, 18, 20 and X, (c) the disruption into two blocks of HSA 2, 7, 10, 12, 19 and 22, (d) three pairs sharing homologous segments with HSA 8, and (e) the absence of the ancestral eutherian association HSA 16/19.

2. *B. variegatus* (2n=54) presents a more rearranged karyotype, in relation to the human karyotype, than *B. torquatus* (2n=50), in particular due to fissions of ancestral chromosomes, which account for its higher diploid number.

3. Our data on *B. variegatus* and *B. torquatus* together with the previously published comparisons between human and Xenarthra chromosomes confirm, as characteristics common to the species of this super-order (a) the conservation of HSA 9, 13, 17, 18, 20 and X, (b) the disruption of HSA 19 and 22 into two blocks, and (c) the presence of the human chromosome associations HSA 4/8, 7/16, 12/22 and 14/15.

4. The human chromosome association HSA 7/10 and the disruption of HAS 8 into three blocks were confirmed as chromosome signatures for the super-order Xenarthra, supporting the monophyly of the group.

5. The HSA 17/19 association, which we demonstrated to be shared by *B. variegatus*, *B. torquatus* and *B. tridactylus* karyotypes, appears as a chromosome signature for the genus *Bradypus*, supporting the monophyly of the group.

6. The HSA 12/22/16 association seems to be a chromosome synapomorphic trait linking the species *B. variegatus* e *B. tridactylus*.

7. Take into account the correspondence between human and *Bradypus* chromosomes we observed that *B. variegatus* and *B. tridactylus* karyotypes are the most similar in the genus.

8. Based on the comparison of the human chromosomes sequences to the chromosomes sequences of the chicken and a marsupial species (outgroups to placental mammals), available in Ensembl database, we showed that a HSA 7/10 association, which is present in the super-order Xenarthra, is also present in the karyotype of the two outgroup species. As the homology between this chromosome association in Xenarthra and the outgroups are demonstrated, strong support for the classifications of this association as ancestral to Eutheria and of Xenarthra as a basal group in the eutherian phylogenetic tree will be given.

9. Our comparative analysis allow us to propose an ancestral Xenarthra karyotype with $2n=48$, including (a) the human chromosome associations HSA 3/21, 4/8, 7/10, 7/16, 12/22 (2x), 14/15 and 16/19, (b) the conservation of HSA 1, 3, 4, 5, 6, 9, 11, 13, 14, 15, 17, 18, 20, 21 and X, (c) the disruption into two blocks of HSA 2, 7, 10, 12, 16, 19 and 22, and (d) three pairs sharing homologous segments with HSA 8.

10. Among Xenarthra species, *B. torquatus* and *C. hoffmanni*, with the lowest diploid number of the super-order, show the most conserved karyotypes in relation to our proposed ancestral Xenarthra karyotype as well as to the most recently proposed ancestral eutherian karyotype.

11. The conservation of the X chromosome euchromatin was demonstrated by interspecific chromosome painting between the sloths, *B. torquatus* and *B. variegatus*, and between the marsupials, *M. incanus* and *M. nudicaudatus*. The X chromosome heterochromatic segments were shown to be divergent in the extent to prevent *in situ* hybridization between species.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Amrine-Madsen H, Koepfli K-P, Wayne RK, Springer MS: A new phylogenetic marker, apolipoprotein B, provides compelling evidence for eutherian relationships. **Mol Phylogenet Evol** **28**: 225-240, 2003
- Anderson RP & Handley Jr CO: A new species of three-toed sloth (Mammalia:Xenarthra) from Panama, with a review of the genus *Bradypus*. **Proc Biol Soc of Washington** **114**: 1-33, 2001.
- Asher RJ & Lehmann T: Dental eruption in afrotherian mammals. **BMC Biology** **6**: 14, 2008.
- Balmus G, Trifonov VA, Biltueva LS, O'Brien PCM, Alkalaeva ES, Fu B, Skidmore JA, Allen T, Graphodatsky AS, Yang F, Ferguson-Smith MA: Cross-species chromosome painting among camel, cattle, pig and human: further insights into the putative Cetartiodactyla ancestral karyotype. **Chromosome Res** **15**: 499-514, 2007.
- Band MR, Larson JH, Rebeiz M, Green CA, Heyen DW, Donovan J, Windish R, Steining C, Mahyuddin P, Womack JE, Lewin HA: An ordered comparative map of the cattle and human genomes. **Genome Res** **10**: 1359-1368, 2000.
- Barros M, Sampaio I, Schneider H: Phylogenetic analysis of 16S Mitochondrial DNA data in sloths and anteaters. **Genetic and Molecular Biology** **26**: 5-11, 2003.
- Barroso CM & Seuanez H: Chromosome studies on *Dasypus*, *Euphractus* and *Cabassous* genera (Edentata: Dasypodidae). **Cytobios** **68**: 179-196, 1991.
- Bielec PE, Gallagher DS, Womack JE, Busbee DL: Homologies between human and dolphin chromosomes detected by heterologous chromosome painting. **Cytogenet Cell Genet** **81**: 18-25, 1998.
- Bigoni F, Stanyon R, Koehler U, Morescalchi AM, Wienberg J: Mapping homology between human and black and white colobine monkey chromosomes by fluorescent in situ hybridization. **Am J Primatol** **42**: 289-298, 1997.

- Bigoni F, Stanyon R, Wimmer R, Schempp W: Chromosome painting shows that the proboscis monkey (*Nasalis larvatus*) has a derived karyotype and is phylogenetically nested within Asian Colobines. **Am J Primatol** **60**: 85-93, 2003.
- Bigoni F, Houck ML, Ryder OA, Wienberg J, Stanyon R: Chromosome painting shows that *Pygathrix nemaeus* has the most basal karyotype among Asia Colobinae. **Int J Primatol** **25**: 679-688, 2004.
- Biltueva LS, Yang F, Vorobieva NV, Graphodatsky AS: Comparative map between the domestic pig and dog. **Mamm Genome** **15**: 809-818, 2004.
- Bininda-Emonds ORP, Cardillo M, Jones KE, MacPhee RDE, Beck RMD, Grenyer R, Price SA, Vos RA, Gittleman JL, Purvis A: The delayed rise of present-day mammals. **Nature** **446**: 507-512, 2007.
- Buckland RA & Evans HJ: Cytogenetic aspects of phylogeny in the Bovidae. I. G-banding. **Cytogenet Cell Genet** **21**: 42-63, 1978.
- Burt DW, Bruley C, Dunn IC, Jones CT, Ramage A, Law AS, Morrice DR, Paton IR, Smith J, Windsor D *et al*: The dynamics of chromosome evolution in birds and mammals. **Nature** **402**: 411-413, 1999.
- Cardone MF, Ventura M, Tempesta S, Rocchi M, Archidiacono N: Analysis of chromosome conservation in *Lemur catta* studied by chromosome paints and BAC/PAC probes. **Chromosoma** **111**: 348-356, 2002.
- Carter AM, Enders AC, Kunzle H, Oduor-Okelo D, Vogel P: Placentation in species of phylogenetic importance: the Afrotheria. **Anim Reprod Sci** **82-83**: 35-48, 2004.
- Carter AM, Blankenship TN, Enders AC, Vogel P: The fetal membranes of the otter shrews and a synapomorphy for afrotheria. **Placenta** **27(2-3)**: 258-268, 2006.
- Cavagna P, Meenotti A, Stanyon R: Genomic homology of the domestic ferret with cats and humans. **Mamm Genome** **11**: 866-870, 2000.
- Chowdhary BP, Raudsepp T, Frönicke L, Scherthan H: Emerging patterns of comparative genome organization in some mammalian species as revealed by Zoo-FISH. **Genome Res** **8**: 577-589, 1998.
- Consigliere S, Stanyon R, Koehler U, Aforamoorthy G, Wienberg J: Chromosome painting defines genomic rearrangements between red howler monkey subspecies. **Chromosome Res** **4**: 264-270, 1996.

- Corin-Frédéric J: Les formules gonosomiques dites aberrates chez les mammifères euthériens. **Chromosoma** **27**: 268-287, 1969.
- Delsuc F, Catzeflis FM, Stanhope MJ, Douzery EJ: The evolution of armadillos, anteaters and sloths depicted by nuclear and mitochondrial phylogenies: Implications for the status of the enigmatic fossil Eurotamandua. **Proc R Soc Lond B Biol Sci** **268**: 1605-1615, 2001.
- Delsuc F, Scaly M, Stanhope MJ *et al*: Molecular phylogeny of living xenarthrans and the impact of characters and taxon sampling on the placental tree rootin. **Mol Biol Evol** **19**: 1656-1671, 2002.
- Delsuc F, Vizcaino SF, Douzery EJP: Influence of Tertiary paleoenvironmental changes on the diversification of South American mammals: A relaxed molecular clock study within Xenarthrans. **BMC Evol Biol** **4**: 11, 2004
- Dixkens C, Klett C, Bruch J, Kollak A, Serov OL, Zhdanova N, Vogel W, Hameister H: Zoo-FISH analysis in insectivores: "Evolution extols the virtue of the status quo". **Cytogenet Cell Genet** **80**: 61-67, 1998.
- Dobigny G, Yang F, O'Brien PC, Volobouev V, Kovacs A, Pieczarka JC, Ferguson-Smith MA, Robinson TJ: Low rate of genomic repatterning in Xenarthra inferred from chromosome painting data. **Chromosome Research** **13**: 651-663, 2005.
- Dutrillaux B: Very large analogy of chromosome banding between *Cebus capucinus* (Platyrrhini) and man. **Cytogenet Cell Genet** **24**: 84-94, 1979.
- Dutrillaux B, Viegas-Pequignot E, Couturier J: Great homology of chromosome banding of the rabbit (*Orytolagus cuniculus*) and primates, including man. **Ann Genet** **23**: 22-25, 1980.
- Dutrillaux B & Couturier J: The ancestral karyotype of Carnivora: comparison with that of platyrrhine monkeys. **Cytogenet Cell Genet** **35**: 200-208, 1983.
- Eichler EE & Sankoff D: Structural dynamics of eukaryotic chromosome evolution. **Science** **301**: 793-797, 2003.
- Eizirik E, Murphy WJ, O'Brien SJ: Molecular dating and biogeography of the early placental mammal radiation. **J Hered** **92**: 212-219, 2001.
- Engelman GF: The phylogeny of Xenarthra. In: Montgomery GG, ed. The Evolution and Ecology of armadillos, sloths and vermilinguas. Washington and London: Smithsonian University Press, 51-64, 1985.

- Erlich J, Sankoff D, Nadeau JH: Synteny conservation and chromosome rearrangements during mammalian evolution. **Genetics** **147**: 289-296, 1997.
- Fan YS: Molecular cytogenetics: protocols and applications. Humana Press, Totowa, New Jersey, 2002.
- Ferguson-Smith MA, Yang F, Rens W, O'Brien PC: The impact of chromosome sorting and painting on the comparative analysis of primate genomes. **Cytogenet Genome Res** **108**: 112-121, 2005.
- Ferguson-Smith MA & Trifonov V: Mammalian Karyotype evolution. **Nature Reviews Genetics** **8**: 950-962, 2007
- Frönicke L, Muller-Navia J, Romanakis K, Scherthan H: Chromosomal homeologies between human, harbor seal (*Phoca vitulina*) and the putative ancestral carnivore karyotype revealed by Zoo-FISH. **Chromosoma** **106**: 108-113, 1997.
- Frönicke L, Wienberg J, Stone G, Adams L, Stanyon R: Towards the deliniation of the ancestral Eutherian genome organization: Comparative genome maps of human and the African elephant (*Lexodonta africana*) generated by chromosome painting. **Proc R Soc Lond B Biol Sci** **270**: 1331-1340, 2003.
- Frönicke L: Origins of primate chromosomes as delineated by Zoo-FISH and alignments of human and mouse draft genome sequences. **Cytogenet Genome Res** **108**: 122-138, 2005.
- García F, Nogués C, Ponsa M, Ruiz-Herrera A, Egozcue J, Caldés MG: Chromosomal homologies between humans and *Cebus apella* (Primates) revealed by Zoo-FISH. **Mammalian Genome** **11**: 399-401, 2000.
- Giffalli-lughetti C: Evolução cromossômica: Estudo da variabilidade cariotípica em Platyrrhini e da homeologias e sintenias com cromossomos humanos. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, 2008.
- Glas R, Graves JAM, Toder R, Ferguson-Smith M, O'Brien PC: Cross-species chromosome painting between human and marsupial directly demonstrates the ancient region of the mammalian X. **Mamm Genome** **10**: 1115-1116, 1999.

- Glass BP: History of classification and nomenclature in Xenarthra (Edentata). In: Montgomery GG, ed. The evolution and ecology of armadillos, sloths, and vermilings. Washington and London: Smithsonian University Press, 51-64, 1985
- Goldschmidt B & Almeida JCC: Cytogenetic studies in sloths (*Bradypus variegatus*). **Revista Brasileira de Genética** **16**: 939-948, 1993.
- Goldschmidt B, Almeida JCC, Oliveira VL: Visualization of nuclear organizer regions in sloths (*Bradypus variegatus* and *Scaepus torquatus*). **Revista Brasileira de Genética** **18**: 111-113, 1995.
- Goureau A, Yerle M, Schmitz A, Riquet J, Milan D, Pinton P, Gellin J: Human and porcine correspondence of chromosome segments using bidirectional chromosome painting. **Genomics** **36**: 252-262, 1996.
- Graphodatsky AS, Yang F, O'Brien PC, Perelman P, Milne BS, Serdukova N, Kawada SI, Ferguson-Smith MA: Phylogenetic implications of the 38 putative ancestral chromosome segments for four canid species. **Cytogenet Cell Genet** **92**: 243-247, 2001.
- Graphodatsky AS, Yang F, Perelman PL, O'Brien PC, Serdukova NA, Milne BS, Bitueva LS, Fu B, Vorobieva NV, Kawada SI, Robinson TJ, Ferguson-Smith MA: Comparative molecular cytogenetic studies in the order Carnivora: mapping chromosomal rearrangements onto the phylogenetic tree. **Cytogenet Genome Res** **96(1-4)**: 137-145, 2002.
- Graphodatsky AS, Yang F, Dobigny G, Romanenko SA, Bitueva LS, Perlman PL, Beklemisheva VR, Alkalaeva EZ, Serdukova NA, Ferguson-Smith MA, Murphy WJ, Robinson T: Tracking genome organization in rodents by Zoo-FISH. **Chromosome Res** **16**: 261-274, 2008.
- Greenwood AD, Castresana J, Feldmayer-Fuchs G, Paabo S: A molecular phylogeny of two extinct sloths. **Mol Phyl Evol** **18**: 94-103, 2001.
- Haig D: A brief history of human autosomes. **Phil Trans R Soc Lond** **354**: 1447-1470, 1999.
- Hallstrom BM, Kullberg M, Nilsson MA, Janke A: Phylogenomic data analyses provide evidence that Xenarthra and Afrotheria are sister groups. **Mol Biol Evol** **24**: 2059-2068, 2007.

- Hallström BM & Janke A: Resolution among major placental mammal interordinal relationships with genome data imply that speciation influenced their earliest radiations. **BMC Evol Biol** **27 (8)**: 162, 2008.
- Hayman DL, Ashworth LK, Carrano AV: The relative DNA content of the eutherian and marsupial X chromosome. **Cytogenet Cell Genet** **34**: 265-270, 1982.
- Hayman DL: Marsupial cytogenetics. **Aust J Zool** **37**: 331-349, 1990.
- Hoss M, Dilling A, Currant A, Paabo S: Molecular phylogeny of the extinct ground sloth *Myiodon darwiniian*. **Proc Natl Acad Sci** **93**: 181-185, 1996.
- Huang L, Nesterenko A, Nie W, Wang J, Su W, Graphodatsky AS, Yang F: Karyotype evolution of giraffes (*Giraffa camelopardalis*) revealed by cross-species chromosome painting with Chinese muntjac (*Muntiacus reevesi*) and human (*Homo sapiens*) paints. **Cytogenet Genome Res** **122**: 132-138, 2008.
- Ijdo JW, Baldini A, Ward DC, Reeders ST, Wells RA: Origin of human chromosome 2: an ancestral telomere-telomere fusion. **Proc Natl Acad Sci USA** **88**: 9051-9055, 1991.
- Jauch A, Wienberg J, Stanyon R, Arnold N, Tofanelli S, Ishida T, Cremer T: Reconstruction of genomic rearrangements in great apes and gibbons by chromosome painting. **Proc Natl Acad Sci USA** **89**: 8611-8615, 1992.
- Jorge W, Meritt Jr DA, Benirschke K: Chromosome studies in Edentata. **Cytobios** **18**: 157-172, 1977.
- Jorge W, Meritt DA, Benirschke K: Chromosome studies in Edentata. **Cytobios** **18**: 157-172, 1978.
- Jorge W: Estudo cromossômico de algumas species da ordem Edentata. Tese de Livre Docência em Genética, Botucatu, UNESP, Instituto Básico de Biologia Medica e Agrícola, 1981
- Jorge W, Orsi-Souza AT, Best R: The somatic chromosomes of Xenarthra. In: Montgomery GG, ed. The Evolution and Ecology of armadillos, sloths and vermiliguas. Washington and London: Smithsonian University Press, 429-437, 1985.
- Jorge W & Pinder L: Chromosome study on the maned sloth *Bradypus torquatus* (Bradypodidae, Xenarthra). **Cytobios** **62**: 21-25, 1990.

- Kehrer-Sawatzki H & Cooper D: Structural divergence between the human and chimpanzee genomes. **Human Genet** **120**: 759-778, 2007.
- Kellogg ME, Burkett S, Dennis TR, Stone G, Gray BA, McGuire PM, Zori RT, Stanyon R: Chromosome painting in the manatee supports Afrotheria and Paenungulata. **BMC Evol Biol** **7**: 6, 2007.
- Khon M, Hogel J, Vogel W, Minich P, Kehrer-Sawatzki H, Graves JAM, Hameister H: Reconstruction of a 450-My-old ancestral vertebrate protokaryotype. **Trends Genet** **22(4)**: 203-210, 2006.
- Korstanje R, O'Brien PC, Yang F, Rens W, Bosma AA, Van Lith HA, Van Zutphen LF, Ferguson-Smith MA: Complete homology maps of the rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) and human by reciprocal chromosome painting. **Cytogenet Cell Genetics** **86**: 317-322, 1999.
- Kovacs A, Révay T, Tardy PE, Mezosi L: 2n=65 karyotype in a two-toed sloth (*Choloepus didactylus*, L). **Ann Génét** **44**: 43, 2001.
- Kriegs JO, Churakov G, Kieffmann M, Jordan U, Brosius J, Schmitz J: Retroposed elements as archives for the evolutionary history of placental mammals. **PLoS Biol** **4(4)**: e91, 2006.
- Li T, O'Brien PC, Biltueva L, Fu B, Wang J, Nie W, Ferguson-Smith MA, Graphodatsky AS, Yang F: Evolution of genome organizations of squirrels (Sciuridae) revealed by cross-species chromosome painting. **Chromosome Res** **12**: 317-335, 2004.
- Li T, Wang J, Su W, Nie W, Yang F: Karyotypic evolution of the family Sciuridae: inferences from the genome organizations of ground squirrels. **Cytogenet Genome Res** **112**: L270-276, 2006.
- Lichter P, Cremer T, Borden J, Manuelidis L, Ward DC: Delineation of individual human chromosomes in metaphase and interphase cells by *in situ* suppression hybridization using recombinant DNA libraries. **Hum Genet** **80**: 224-234, 1988.
- Lin YH, McLenachan PA, Gore AR, Phillips MJ, Ota R, Hndy MD, Penny D: Four new mitochondrial genomes and the increased instability of evolutionary trees of mammals from improved taxon sampling. **Mol Biol Evol** **19**: 2060-2070, 2002.

- Lizarralde MS, Bolzán AD, Poljak S, Pigozzi MI, Bustos J, Merani MS: Chromosomal localization of the telomeric (TTAGGG)_n sequence in four species of armadillo (Dasypodidae) from Argentina: an approach to explaining karyotype evolution in the Xenarthra. **Chromosome Res** **13**: 777-784, 2005.
- Lupski JR & Stankiewicz P: Genomic disorders: molecular mechanisms for rearrangements and conveyed phenotypes. **Plos Genet** **1**: e49, 2005.
- Madsen O, Scally M, Douady CJ, Kao DJ, DeBry RW, Adkins R, Amrine HM, Stanhope MJ, de Jong WW, Springer MS: Parallel adaptative radiations in two major clades of placental mammals. **Nature** **409**: 610-614, 2001.
- Manchester A: Estudo cromossômico de preguiças do gênero *Bradypus* (Xenarthra, Bradypodidae). Dissertação de mestrado, 2005.
- Mikkelsen TS *et al*: Genome of the marsupial *Monodelphis domestica* reveals innovation in non-coding sequences. **Nature** **447**: 167-178, 2007.
- Moller-Krull M, Delsuc F, Churakov G, Marker C, Superina M, Brosius J, Douzery EJP, Schmitz J: Retroposed elements and their flanking regions resolve the evolutionary history of xenarthran mammals (armadillos, anteaters, and sloths). **Mol Biol Evol** **24(11)**: 2573-2582, 2007.
- Moraes-Barros N, Silva JAB, Miyaki CY, Morgante JS: Comparative phylogeography of the Atlantic forest endemic sloth (*Bradypus torquatus*) and the widespread three-toed sloth (*Bradypus variegatus*) (Bradypodidae, Xenarthra). **Genetica** **126**: 189-198, 2006.
- Moraes-Barros N, Miyaki CY, Morgante JS: Identifying management units in non-endangered species: the example of the sloth *Bradypus variegatus* Schinz, 1825. **Braz J Biol** **67**: 829-837, 2007.
- Müller S, O'Brien PCM, Ferguson-Smith MA, Wienberg J: Cross-species colour segmenting: a novel tool in human karyotype analysis. **Cytometry** **33**: 445-452, 1998.
- Müller S, Stanyon R, O'Brien PCM, Ferguson-Smith MA, Plesker R, Wienberg J: Defining the ancestral karyotype of all primates by multidirectional chromosome painting between tree shrews, lemurs and humans. **Chromosoma** **108**: 393-400, 1999.

- Müller S, Stanyon R, Finelli P, Archidiacono N, Wienberg J: Molecular cytogenetic dissection of human chromosomes 3 and 21 evolution. **Proc Natl Acad Sci USA** **97**: 206-211, 2000.
- Müller S, Hollatz M, Wienberg J: Chromosomal phylogeny and evolution of gibbons (Hylobatidae). **Hum Genet** **113**: 493-501, 2003.
- Murphy WJ, Sun S, Chen ZQ, Yuhki N, Hirschmann D, Menotti-Raymond M, O'Brien SJ: A radiation hybrid map of the cat genome: implications for comparative mapping. **Genome Res** **10**: 691-702, 2000.
- Murphy WJ, Eizirik E, O'Brien SJ, Madsen O, Scally M, Douady CJ, Teeling E, Ryder OA, Stanhope MJ, de Jong WW, Springer MS: Resolution of the early placental mammal radiation using Bayesian phylogenetics. **Science** **295**: 2348-2351, 2001a.
- Murphy WJ, Eizirik E, Johnson WE, Ping Zhang YP, Ryder OA, O'Brien SJ: Molecular phylogenetics and the origin of placental mammals. **Nature** **409**: 614-618, 2001b.
- Murphy WJ, Stanyon R, O'Brien SJ: Evolution of mammalian genome organization inferred from comparative gene mapping. **Genome Biol** **2(6)**: REVIEWS0005, 2001c.
- Murphy WJ, Frönicke L, O'Brien SJ, Stanyon R: The origin of human chromosome 1 and its homologs in placental mammals. **Genome Res** **13**: 1880-1888, 2003.
- Murphy WJ, Pevzner PA, O'Brien SJ: Mammalian phylogenomics comes of age. **Trend Genet** **20**: 631-639, 2004.
- Murphy WJ, Larkin DM, Everts-van der Wind A, Bourque G, Tesler G, Auvil L, Beever JE, Chowdhary BP, Galibert F, Gatzke L, Hitte C, Meyers SN, Milan D, Ostrander EA, Pape G, Parker HG, Raudsepp T, Rogatcheva MB, Schook LB, Skow LC, Welge M, Womack JE, O'Brien SJ, Pevzner PA, Lewin HA: Dynamics of mammalian chromosome evolution inferred from multispecies comparative maps. **Science** **309**: 613-617, 2005.
- Murphy WJ, Pringle TH, Crider TA, Springer MS, Miller W: Using genomic data to unravel the root of the placental mammal phylogeny. **Genome Res** **17**: 413-421, 2007.
- Myers P, Espinosa R, Parr CS, Jones T, Hammond GS, Dewey TA: The animal diversity web (online - <http://animaldiversity.org>), 2008.

- Nash WG & O'Brien SJ: Conserved regions of homologous G banded chromosomes between orders in mammalian evolution: carnivores and primates. **Proc Natl Acad Sci USA** **79**: 6631-6635, 1982.
- Nie W, Wang J, O'Brien PC, Fu B, Ying T, Ferguson-Smith MA, Yang F: The genome phylogeny of domestic cat, red panda and five mustelid species revealed by comparative chromosome painting and G-banding. **Chromosome Res** **10(3)**: 209-222, 2002.
- Nie W, O'Brien PCM, Fu B, Wang J, Su W, Ferguson-Smith MA: Chromosome painting between human and lorisform prosimians: evidence for the HAS 7/16 synteny in the primate ancestral karyotype. **Am J Phys Anthropol** **129**: 250-259, 2006.
- Nie W, Fu B, O'Brien PCM, Wang J, Su W, Tanomtong A, Volobouev V, Ferguson-Smith MA, Yang F: Flying lemurs – The “flying tree shrews”? Molecular cytogenetic evidence for a Scadentia-Dermoptera sister clade. **BMC Biology** **6**: 18, 2008.
- Nikolaev S, Montoya-Burgos JI, Margulies EH, Rougemont J, Nyffeler B, Antonarakis SE: Early history of mammals is elucidated with the ENCODE multispecies sequencing data. **PLoS Genet** **3**: e2, 2007;
- Nilsson MA, Arnason U, Spencer PBS, Janke A: Marsupial relationships and a timeline for marsupial radiation in South Gondwana. **Gene** **340**: 189-196, 2004.
- Nishihara H, Okada N, Hasegawa M: Rooting the eutherian tree: the power and pitfalls of phylogenomics. **Genome Biol** **8**: R199, 2007.
- O'Brien SJ & Graves JA: Report of the committee on comparative gene mapping. **Cytogenet Cell Genet** **58**: 1124-1151, 1991
- Ohno S, Beçak W, Beçak ML: X-autosome ratio and the behavior pattern of individual X-chromosomes in placental mammals. **Chromosoma** **15**: 14-30, 1964.
- Ohno S: **Sex chromosomes and sex linked genes**. Springer Verlag, Berlin, 1967.
- Page J, Berríos S, Parra MT, Viera A, Suja JÁ, Prieto I, Barbero L, Rufas JS, Fernández-Donoso R: The program of sex chromosome pairing in meiosis is highly conserved across marsupial species: Implications for sex chromosome evolution. **Genetics** **170**: 793-799, 2005.

- Page J, Viera A, Parra MT, Fuente R, Suja JÁ, Prieto I, Barbero JL, Rufas JS, Berríos S, Fernández-Donoso R: Involvement of synaptonemal complex proteins in sex chromosome segregation during marsupial male meiosis. **PLoS Genetics** **2(8)**: e136, 2006.
- Pardini AT, O'Brien PCM, Fu B, Bonde RK, Elder FFB, Ferguson-Smith MA, Yang F, Robinson TJ: Chromosome painting among Proboscidea, Hyracoidea and Sirenia: support for Paenungulata (Afrotheria, Mammalia) but not Tethytheria. *Proc R Soc B* **274**: 1333-1340, 2007.
- Patterson B & Pascual R: The fossil mammal fauna of South America. **In**: Keast A, Erk FC, Glass PB (eds): Evolution, mammals and southern continents, pp. 247-309 (State University of New York Press, Albany), 1972.
- Petit D, Couturier J, Viegas-Pequignot E, Lombard M, Dutrillaux B: Great degree of homology between the ancestral karyotype of squirrels (rodents) and that of primates and carnivores. **Ann Genet** **27**: 201-212, 1984.
- Pereira HRJ, Jorge W, Teixeira da Costa MEL: Chromosome study of anteaters (Myrmecophagidae, Xenarthra): a preliminary report. **Genet Mol Biol** **27**: 391-394, 2004.
- Perelman PL, Graphodatsky AS, Serdukova NA, Nie W, Alkalaeva EZ, Fu B, Robinson TJ, Yang F: Karyotypic conservatism in the suborder Feliformia (Order Carnivora). **Cytogenet Genome Res** **108**: 348-354, 2005.
- Pevzner P & Tesler G: Genome rearrangements in mammalian evolution: lessons from human and mouse genomes. **Genome Res** **13(1)**: 37-45, 2003.
- Postlethwait JH, Woods IG, Ngo-Hazelett P, Yan YL, Kelly PD, Chu F, Huang H, Hill-Force A, Talbot WS: Zebrafish comparative genomics and the origins of vertebrate chromosomes. **Genome Res** **10**: 1890-1902, 2000.
- Prasad AB, Allard MW, NISC Comparative Sequencing Program, Green ED: Confirming the phylogeny of mammals by use of large comparative sequence data sets. **Mol Biol Evol** **25(9)**: 1795-1808, 2008
- Putnam NH *et al.*: Sea anemone genome reveals ancestral eumetazoan gene repertoire and genomic organization. **Science** **317**: 86-94, 2007. **Mol Biol Evol** **25 (9)**: 1795-1808, 2007.

- Reig OA, Gardner AL, Bianchi NO, Patton JL: The chromosomes of the Didelphidae (Marsupialia) and their evolutionary significance. **Biol J Linn Soc** **9**: 191-216, 1977.
- Rens W, O'Brien PC, Yang F, Graves JA, Ferguson-Smith MA: Karyotype relationships between four distantly related marsupials revealed by reciprocal chromosome painting. **Chromosome Res** **7**: 461-474, 1999.
- Rens WR, O'Brien PCM, Yang F, Graves JAM, Ferguson-Smith MA: Karyotype relationships between four distantly related marsupials revealed by reciprocal chromosome painting. **Chromosome Res** **9**: 301-309, 2001.
- Rens W, O'Brien PCM, Grutzner F, Clarke O, Graphodatskaya D, Tsend-Ayush E, Trifonov V, Skelton H, Wallis M, Johnston S, Veyrunes F, Graves JAM, Ferguson-Smith MA: The multiple sex chromosomes of platypus and echidna are not completely identical and several share homology with the avian Z. **Genome Biology** **8 (11)**: R243 ,2007
- Rettenberger G, Klett C, Zechner U, Bruch J, Just W, Vogel W, Hameister H: ZOO-FISH analysis: cat and human karyotypes closely resemble the putative ancestral mammalian karyotype. **Chromosome Res** **3**: 479-486, 1995.
- Richard F, Lombard M, Dutrillaux B: Phylogenetic origin of human chromosomes 7, 16, and 19 and their homologs in placental mammals. **Genome Res** **10**: 644-651, 2000.
- Richard F, Lombard M, Dutrillaux B: Reconstruction of the ancestral karyotype of eutherian mammals. **Chromosome Res** **11**: 605-618, 2003.
- Robinson TJ & Elder FF: Multiple common fragile sites are expressed in the genome of the laboratory rat. **Chromosoma** **96**: 45-49, 1987.
- Robinson TJ, Fu B, Ferguson-Smith MA, Yang F: Cross-species chromosome painting in the golden mole and elephant-shrew: support for the mammalian clades Afrotheria and Afroinsectiphillia but no Afroinsectivora. **Proc R Soc Lond B** **271**: 1477-1484, 2004.
- Robinson TJ & Ruiz-Herrera A: Defininf the ancestral eutherian karyotype: A cladistic interpretation of chromosome painting and genome sequence assembly data. **Chromosome Res** **16**: 1133-1141, 2008.

- Rodriguez V, Liambi S, Postiglioni A, Guevara K, Rincon G, Fernández G, Mernies B, Arruga MV: Localisation of aphidicolin-induced break points in Holstein-Friesian cattle (*Bos taurus*) using RBG-banding. **Genet Sel Evol** **34**: 649-656, 2002.
- Rofe R & Hayman D: G-banding evidence for a conserved complement in the Marsupialia. **Cytogenet Cell Genet** **39**: 40-50, 1985.
- Rokas A & Holland WA: Rare genomic changes as a tool for phylogenetics. **Trends Ecol Evol** **15**: 454-459, 2000.
- Ronne M: Putative fragile sites in the horse karyotype. **Hereditas** **117**: 127-136, 1992.
- Ruiz-Herrera A, Ponsa M, García F, Egozcue J, Garcia M: Fragile sites in human and *Macaca fascicularis* are breakpoints in chromosome evolution. **Chromosome Res** **10**: 33-44, 2002.
- Ruiz-Herrera A, Castresana J, Robinson TJ: Is mammalian evolution driven by regions of genome fragility? **Genome Biol** **7**: R115, 2006.
- Ruiz-Herrera A & Robinson TJ: Chromosomal instability in Afrotheria: fragile sites, evolutionary breakpoints and phylogenetic inference from genome sequence assemblies. **BMC Evol Biol** **7**: 199, 2007.
- Sánchez-Villagra MR, Narita Y, Kuratani S: Thoracolumbar vertebral number: the first skeletal synapomorphy for afrotherian mammals. **System Biodivers** **5**: 1-7, 2007.
- Sclay M, Madsen O, Douady CJ, de Jong WW, Stanhope MJ, Springer MS: Molecular evidence for the major clades of placental mammals. **J Mammal Evol** **8**: 239-277, 2001.
- Scherthan H, Cremer T, Arnason U, Weier HU, Lima-de-Faria A, Frönicke L: Comparative chromosome painting discloses homologous segments in distantly related mammals. **Nat Genet** **6**: 342-347, 1994.
- Sharman GB: The chromosomes of non-eutherian mammals, in Chiarelli AB, Capanna E (eds): Cytotaxonomy and vertebrate evolution, pp 485-530. Academic Press, New York/London, 1973
- Sharp P: Sex chromosome pairing during male meiosis in marsupials. **Chromosoma** **86**: 27-47, 1982.

- Shoshani J & McKenna MC: Higher taxonomic relationships among extant mammals based on morphology, with selected comparisons of results from molecular data. **Mol Phylogenet Evol** 9: 572-584, 1998.
- Springer MS, Cleven GC, Madsen O, de Jong WW, Waddell VG, Amrine HM, Stanhope MJ: Endemic African mammals shake the phylogenetic tree. **Nature** 388: 61-64, 1997.
- Springer MS, Amrine HM, Burk A, Stanhope MJ: Additional support for Afrotheria and Paenungulata, the performance of mitochondrial versus nuclear genes, and the impact of data partitions with heterogeneous base composition. **Syst Bio** 48(1): 65-75, 1999.
- Springer MS, Murphy WJ, Eizirik E, O'Brien SJ: Placental mammal diversification and the Cretaceous-Tertiary boundary. **Proc Natl Acad Sci USA** 100: 1056-1061, 2003.
- Springer MS, Stanhope MJ, Madsen O, de Jong WW: Molecules consolidate the placental mammal tree. **Trends in Ecology and Evolution** 19 (8): 430-438, 2004.
- Stanhope Mj, Madsen O, Waddell VG, Cleven GC, de Jong WW, Springer MS: Highly congruent molecular support for a diverse superordinal clade of endemic African mammals. **Mol Phylogenet Evol** 9(3): 501-508, 1998.
- Stanyon R, Wienberg J, Romagno D, Bigoni F, Jauch A, Cremer T: Molecular and classical cytogenetic analyses demonstrate an apomorphic reciprocal chromosomal translocation in *Gorilla gorilla*. **Am J Phys Anthropol** 88: 245-250, 1992.
- Stanyon R, Consigliere S, Müller S, Morescalchi A, Neusser M, Wienberg J: Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) maps chromosomal homologies between the dusky titi and squirrel monkey. **Am J Primatol** 50: 95-107, 2000.
- Stanyon R, Consigliere S, Bigoni F, Ferguson-Smith M, O'Brien PCM, Wienberg J: Reciprocal chromosome painting between a New World primate, the woolly monkey, and humans. **Chromosome Res** 9: 97-106, 2001.
- Stanyon R, Koehler U, Consigliere S: Chromosome painting reveals that galagos have highly derived karyotypes. **Am J Phys Anthropol** 117: 319-326, 2002.

- Stanyon R, Stone G, Garcia M, Fronicke L: Reciprocal chromosome painting shows that squirrels, unlike murid rodents, have a highly conserved genome organization. **Genomics 82**: 245-249, 2003.
- Stone DM, Stephens KE, Doles J: Folate-sensitive and aphidicolin-inducible fragile sites are expressed in the genome of the domestic cat. **Cancer Genet Cytogenet 65**: 130-134, 1993.
- Svartman M: Evolução Cariotípica de Marsupiais da Família Didelphidae. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, 1998.
- Svartman M & Vianna-Morgante AM: Karyotypical evolution of marsupials: from higher to lower diploid numbers. **Cytogenet Cell Genet 82**: 263-266, 1998.
- Svartman M & Vianna-Morgante AM: Comparative genome analysis in American marsupials: chromosome banding and *in situ* hybridization. **Chromosome Res 7**: 267-275, 1999.
- Svartman M, Stone G, Page JE, Stanyon R: A chromosome painting test of the basal Eutherian karyotype. **Chromosome Res 12**: 45-53, 2004.
- Svartman M, Stone G, Stanyon R: The ancestral Eutherian karyotype is present in Xenarthra. **PLoS Genetics 42(7)**: 1006-1011, 2006.
- Telenius H, Pelmeur AH, Tunnacliffe A, Carter NP, Bechmel A, Ferguson-Smith MA, Nordenskjöld M, Pfragner R, Ponder BAJ: Cytogenetic analysis by chromosome painting using DOP-PCR amplified flow-sorted chromosomes. **Gene Chrom Cancer 4**: 257-263, 1992.
- Volleth M, Klett C, Kollak A, Dixkens C, Winter Y, Just W, Vogel W, Hameister H: Zoo-FISH analysis in a species of the order Chiroptera: *Glossophaga soricina* (Phyllostomidae). **Chromosome Res 7**: 57-64, 1999.
- Volleth M, Heller KG, Pfeiffer RA, Hameister H: A comparative Zoo-FISH analysis in bats elucidates the phylogenetic relationships between Megachiroptera and five microchiropteran families. **Chromosome Res 10**: 477-497, 2002.
- Waddell PJ, Cao Y, Hauf J, Hasegawa M: Using novel phylogenetic methods to evaluate mammalian mtDNA, including amino acid-invariant sites-LogDet plus site stripping, to detect internal conflicts in the data, with special reference to the positions of hedgehog, armadillo, and elephant. **Syst Biol 48**: 31-53, 1999.

- Waddell PJ, Kishino H, Ota R: A phylogenetic foundation for comparative mammalian genomics. **Genome Inform** 12: 141-154, 2001.
- Waters PD, Dobigny G, Waddell PJ, Robinson TJ: Evolutionary history of LINE-1 in the major clades of placental mammals. **PLoS ONE** 2: e158, 2007.
- Weimer J, Kiechle M, Seger G, Wiedemann U, Ovens-Raeder A, Schuierer S, Kautza M, Siebert R, Arnold N: An easy and reliable procedure of microdissection technique for the analysis of chromosomal breakpoints and marker chromosomes. **Chromosome Res** 7: 355-362, 1999.
- Wetzel RM: The identification and distribution of recent Xenarthra (Edentata). In: Montgomery GG, ed. The Evolution and Ecology of Armadillos, sloths and vermilinguas. Washington and London: Smithsonian Institution Press, 5-21, 1985.
- Wetzel RM & Avila-Pires FD: Identification and distribution of the recent sloths of Brazil (Edentata). **Revista Brasileira de Biologia** 40: 831-836, 1980.
- Whidden HP: Extrinsic snout musculature in Afrotheria and Lipotyphla. **Journal of Mammalian Evolution** 9(1/2): 161-184, 2002.
- Wienberg J, Jauch A, Stanyon R, Cremer T: Molecular cytotaxonomy of primates by chromosomal *in situ* suppression hybridization. **Genomics** 8: 347-350, 1990.
- Wienberg J & Stanyon R: Chromosome painting in mammals as an approach to comparative genomics. **Curr Opin Genet Dev** 5: 792-797, 1995.
- Wienberg J & Stanyon R: Comparative painting of mammalian chromosomes. **Curr Opin Genet Dev** 7: 784-791, 1997.
- Wienberg J, Stanyon R, Nash WG, O'Brien PC, Yang F, O'Brien SJ, Ferguson-Smith MA: Conservation of human vs. feline genome organization revealed by reciprocal chromosome painting. **Cytogenet Cell Genet** 77: 211-217, 1997.
- Wienberg J: The evolution of eutherian chromosomes. **Curr Opin Genet Dev** 14: 657-666, 2004.
- Wienberg J: Fluorescence *in situ* hybridization to chromosomes as a tool to understand human and primate evolution. **Cytogenet Genome Res** 108: 139-160, 2005.

- Wilcox SA, Watson JM, Spencer JA, Graves JAM: Comparative mapping identifies the fusion point of an ancient mammalian X-autosomal rearrangement. **Genomics** **35**: 66-70, 1996.
- Wildman DE, Uddin M, Opazo JC, Liu G, Lefort V, Guindon S, Gascuel O, Grossman LI, Romero R, Goodman M: Genomics, biogeography, and the diversification of placental mammals. **PNAS** **104(36)**: 14395-14400, 2007.
- Wilson DE & Reeder DM: Mammal species of the world. A taxonomic and geographic reference (3rd ed.). Johns Hopkins University Press, 2, 142pp, 2005
- Yang MY & Long SE: Folate sensitive common fragile sites in chromosomes of the domestic pig (*Sus scrofa*). **Res Vet Sci** **55**: 231-235, 1993.
- Yang F, O'Brien PCM, Wienberg J, Neitzel H, Lin CC, Ferguson-Smith MA: Chromosomal evolution of the Chinese muntjac (*Muntiacus reevesi*). **Chromosoma** **106**: 37-43, 1997.
- Yang F, O'Brien PCM, Milne BS, Graphodatsky AS, Solanky N, Trifonov V, Rens W, Sargan D, Ferguson-Smith MA: A complete comparative chromosome map for the dog, red fox, and human and its integration with canine genetic maps. **Genomics** **62**: 189-202, 1999.
- Yang F, Graphodatsky AS, O'Brien PCM, Colabella A, Solanky N, Squire M, Sargan DR, Ferguson-Smith MA: Reciprocal chromosome painting illuminates the history of genome evolution of the domestic cat, dog and human. **Chromosome Res** **8**: 393-404, 2000.
- Yang F, Alkalaeva EZ, Perelman PL, Pardini AT, Harrison WR, O'Brien PCM, Fu B, Graphodatsky AS, Ferguson-Smith MA, Robinson TJ: Reciprocal chromosome painting among human, armadillo, and elephant (superorder Afrotheria) reveals the likely eutherian ancestral karyotype. **PNAS** **100 (3)**: 1062-1066, 2003.
- Yang F, Fu B, O'Brien PCM, Nie W, Ryder OA, Ferguson-Smith MA: Refined genome-wide comparative map of the domestic horse, donkey and human based on cross-species chromosome painting: insight into the occasional fertility of mules. **Chromosome Res** **12**: 65-76, 2004.

Yang F, Graphodatsky AS, Li T, Fu B, Dobigny G, Wang J, Perelman PL, Serdukova NA, Su W, O'Brien PCM, Wang Y, Ferguson-Smith MA, Volobouev V, Nie W: Comparative genome maps of the pangolin, hedgehog, sloth, anteater and human revealed by cross-species chromosome painting: further insight into the ancestral karyotype and genome evolution of eutheria mammals. **Chromosome Res**14: 283-296, 2006.

Ye J, Biltueva L, Huang L, Nie W, Wang J, Jing M, Su W, Vorobieva NV, Jiang X, Graphodatsky AS, Yang F: Cross-species chromosome painting unveils cytogenetic signatures for the Eulipotyphla and evidence for the polyphyly of Insectivora. **Chromosome Res** 14: 151-159, 2006.