



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO VALE DO SÃO FRANCISCO  
CURSO DE GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**Palloma Lima de Oliveira**

**ANÁLISE CITOGENÉTICA COMPARATIVA ENTRE *Pecari  
tajacu* (LINNAEUS, 1758) E *Tayassu pecari* (LINK, 1795)  
(CETARTIODACTYLA: TAYASSUIDAE)**

Petrolina

2017

**PALLOMA LIMA DE OLIVEIRA**

**ANÁLISE CITOGENÉTICA COMPARATIVA ENTRE *Pecari tajacu* (LINNAEUS, 1758) E *Tayassu pecari* (LINK, 1795)  
(CETARTIODACTYLA: TAYASSUIDAE)**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Colegiado de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Vale do São Francisco, *Campus* Ciências Agrárias, como requisito parcial para a obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Kyria Cilene de Andrade Bortoleti  
Coorientador: Dr<sup>a</sup>. Helen Maria Duarte do Rêgo Barros

Petrolina

2017

O48a Oliveira, Palloma Lima de  
Análise citogenética comparativa entre *pecari tajacu* (linnaeus, 1758) e *tayassu pecari* (link, 1795) (cetartiodactyla: tayassuidae) / Palloma Lima de Oliveira. -- Petrolina, 2017.  
XIV, 55 f.: il. ; 29 cm.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Federal do Vale do São Francisco, Campus Ciências Agrárias, Petrolina, 2017.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Kyria Cilene de Andrade Bortoleti.

Referências.

1. Citogenética. 2. Queixada. 3. Cateto. 4. Evolução cariotípica. I. Título. II. Universidade Federal do Vale do São Francisco

CDD 574.87322

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO VALE DO SÃO FRANCISCO**  
**CURSO DE GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**FOLHA DE APROVAÇÃO**

Palloma Lima de Oliveira

**ANÁLISE CITOGENÉTICA COMPARATIVA ENTRE *Pecari tajacu* (LINNAEUS, 1758) e *Tayassu pecari* (LINK, 1795) (CETARTIODACTYLA: TAYASSUIDAE)**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Colegiado de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Vale do São Francisco, *Campus* Ciências Agrárias, como requisito parcial para a obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

Aprovado em: 11 de OUTUBRO de 2017.

**Banca Examinadora**

Myria Cilene de Andrade Bortoleti

Dr<sup>a</sup>. Kyria Cilene de Andrade Bortoleti – Orientadora  
Universidade Federal do Vale do São Francisco

Adriana V. Sales Bispo

Dr<sup>a</sup>. Adriana Valéria Sales Bispo – Primeira Examinadora  
IF Sertão *Campus* Salgueiro

Marco Aurélio Gallo de França

Dr. Marco Aurélio Gallo de França – Segundo Examinador  
Universidade Federal do Vale do São Francisco

A Deus;  
Aos meus queridos pais, Paulo (*in memoriam*) e Maria Lúcia, pelo exemplo de vida e  
por serem os melhores pais que eu poderia ter;  
Aos meus irmãos, Charles e Gleydson, por todo apoio, carinho, atenção e união,

Dedico.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a **Deus**, por me dar o dom da vida, por guiar meus passos, não me deixar cair e nem me abalar pelas pedras encontradas no meu caminho. Por ter me concedido sabedoria para seguir em frente, e por ter guiado meus passos nessa trajetória.

Especialmente aos meus amados Pais, **Paulo Xavier de Oliveira** (*in memoriam*) e **Maria Lúcia de Lima Oliveira**, por toda dedicação e apoio que me deram na busca dos meus objetivos, e por estarem sempre do meu lado. Tudo que sou hoje é resultado da educação que vocês me proporcionaram.

Aos meus irmãos **Charles de Lima Oliveira** e **Gleydson Lima de Oliveira**, por estarem ao meu lado, por incentivarem meus sonhos e por sempre estenderem a mão quando precisei. À minha cunhada **Maria das Graças**, por estar sempre por perto e me presentear com meu sobrinho **Luan**, meu eterno príncipe, amor da minha vida. Amo vocês.

Aos meus avós, **Joaquim João de Lima** (*in memoriam*), **Maria Cândida de Lima** (*in memoriam*), **Ubaldo Xavier de Oliveira** (*in memoriam*) e **Joana Barbosa de Oliveira**, por mostrarem que a base da família é o amor, união, que a humildade é fundamental e que não importa o que aconteça na vida, o sorriso no rosto e o brilho no olhar não podem faltar. “Se estamos juntos tudo conquistamos”

Agradeço à **Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Kyria Cilene de Andrade Bortoleti**, exemplo de dedicação e competência, por ter me concedido o privilégio de sua orientação, amizade, paciência, ensinamentos e apoio muito além de sua obrigação. Durante todo o período foi mais que uma orientadora, me acolheu como uma filha e sempre serás a minha Prof. querida, morarás eternamente em meu coração. Sou muito grata.

À **Dr<sup>a</sup>. Helen Maria Duarte do Rêgo Barros**, és linda como uma flor, pela imprescindível coorientação, e por estar sempre disposta a ajudar. Sua dedicação e humildade sempre me ensinaram muito, tenha minha eterna gratidão.

Aos meus **tios, tias e primos**, por todo cuidado e preocupação; família é a base de tudo e sou eternamente grata por todo apoio de vocês nessa trajetória. Peço desculpas por minha ausência em muitas comemorações. Amo vocês.

Ao **Leandro da Silva Oliveira, Joselias da Silva Oliveira** (titio) e **Nilzete Ramos de Oliveira Silva** (titia), que me acolheram carinhosamente, sempre com palavras de fortalecimento, vocês ficarão gravados eternamente em meu coração. Sou muito grata e feliz por ter conhecido, e vivenciado um grande exemplo de amor verdadeiro. Deus abençoe!

À minha querida amiga **Núbia Coelho de Amorim**, pelo apoio e companherismo nessa caminhada. Esteve ao meu lado em todos os momentos, sempre escutando o meu amor pela citogenética, ficando feliz com as minhas conquistas. E a **Gregório Magno**, por toda amizade e carinho. Vocês dois foram e são fundamentais na minha vida, sempre presentes na minha caminhada. Deus continue abençoando vocês!

Às minhas amigas **Emanuelly Monteiro, Paula Rosane e Bruna Kalinne**, pelos momentos de descontração e por entenderem a minha ausência em muitos momentos. Amo vocês!

À minha amiga e prima **Cinthia Silva dos Santos**, pelo apoio, pelos conselhos, pela amizade e ótima convivência no período da graduação. A sua companhia foi essencial nessa trajetória, carrego comigo as boas conversas que tivemos e as inúmeras histórias. Entramos juntas e vamos sair juntas!

Aos amigos do laboratório, pelos momentos de descontração e força. Ninguém consegue nada sozinho e serei eternamente grata pelos dias na companhia de vocês. Sentirei saudades dos dias tão divertidos, no qual passei ao lado de cada um, bem como de compartilhar as angústias. Vocês me deram força quando mais precisei e disso jamais esquecerei. Sempre terão um espaço em meu coração: **Cinthia Silva, Elianderson Sá, Laysla Motta, Araújo Sara, Ingrid Giovanna, Jayanne Miranda, Jadilson Marianno**. Não posso deixar de mencionar o meu amado grupo "Quarteto", as histórias vividas jamais serão esquecidas, vocês ("Una,

Layslita e minha pequena”) ocupam um lugar muito especial em minha vida e sempre estarão comigo, porque estão gravadas em meu coração.

Aos membros do Laboratório de Etologia Aplicada (Universidade Estadual de Santa Cruz), em particular à **Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Selene Sequeira da Cunha Nogueira, Thaise da Silva Oliveira Costa, Rogério Martins Borges, Diego Correia dos Santos e Deni**, pela permissão e ajuda na coleta de sangue dos animais, proporcionando a realização desse trabalho. E também ao **professor Alexandre Dias Munhoz e Uillians Volkart**, por disponibilizar o Laboratório de Aulas de Análises Clínicas (Universidade Estadual de Santa Cruz) para a realização dos procedimentos de citogenética, e pela ajuda durante o processo de incubação e retirada da cultura de linfócitos. O apoio de vocês foi fundamental.

À **Gabriela Felix**, minha veterinária preferida, sempre esteve disponível para as coletas. Você é um grande exemplo de humildade e dedicação com o seu trabalho, demonstrando muita preocupação com os animais, mesmo em momentos difíceis você sempre demonstrou animação e habilidade, sou eternamente grata.

À **Universidade Estadual de Santa Cruz**, por contribuir com a pesquisa.

À **Universidade Federal do Vale do São Francisco**, pela contribuição à minha formação profissional.

Ao **CEMAFAUNA** Caatinga, por oferecer toda a infraestrutura necessária.

Ao **Ministério da Integração Nacional**, mediante o CEMAFAUNA/UNIVASF, pela bolsa concedida.



“Comece fazendo o que é necessário, depois o que é possível e de repente você  
estará fazendo o impossível”.

(São Francisco de Assis)

## RESUMO

As espécies *Pecari tajacu* (Linnaeus, 1758) e *Tayassu pecari* (Link, 1795), conhecidas popularmente como cateto e queixada, respectivamente, encontram-se distribuídas no continente Americano, sendo assim chamados de porcos americanos. São onívoras e indicadoras ambientais, bem como apresentam carne com baixo teor de gordura e seu couro é utilizado na produção de bolsas e luvas, destacando a sua importância ecológica e econômica. Estes porcos estão em declínio populacional, principalmente devido à perda de habitat, fragmentação e caça, ressaltando a sua participação em programas de conservação. No presente estudo, uma análise citogenética comparativa entre *P. tajacu* e *T. pecari* foi realizada, com o intuito de identificar marcadores cromossômicos que contribuam para o entendimento dos mecanismos de diferenciação e evolução cariotípica desses táxons, fornecendo subsídios para estratégias conservacionistas. Para isso, amostras de sangue periférico foram coletadas de cinco (quatro fêmeas e um macho) e sete indivíduos (quatro fêmeas e três machos) de cateto e queixada, respectivamente, provenientes de populações cativas (Ilhéus/BA). Análises cromossômicas foram realizadas a partir da cultura de linfócitos do sangue, sendo as lâminas submetidas às técnicas de coloração convencional, bandeamentos C e G, impregnação por nitrato de prata ( $\text{AgNO}_3$ ) e hibridização *in situ* fluorescente (FISH), com sondas de DNA ribossomal (DNAr) 35S (pTa 71) e DNA telomérico, ambas marcadas com digoxigenina-11-dUTP. *Pecari tajacu* e *Tayassu pecari* apresentaram número diploide  $2n = 30$  e  $2n = 26$ , XX ou XY, respectivamente, bem como número fundamental em comum (NF = 46). Em queixada, heteromorfismo para o cromossomo X foi notado pela presença de um homólogo acrocêntrico e outro submetacêntrico. Bandas  $C^+$  foram evidenciadas, predominantemente, nas regiões centroméricas dos complementos cromossômicos de ambas as espécies; entretanto, blocos tênues também foram visualizados nas regiões intersticiais e terminais, ressaltando a presença de diferentes classes de heterocromatina ao longo dos cromossomos dos porcos americanos. O bandeamento G permitiu o pareamento dos cromossomos homólogos em nível intraespecífico, revelando que essas espécies apresentam cariótipos divergentes, o que dificultou a identificação de homeologias cromossômicas, com exceção do braço longo do cromossomo X. A impregnação argêntica e a FISH com DNAr 35S evidenciaram a presença de 12 (pares cromossômicos 2, 6, 8, 9, 12 e 13) e quatro sítios (pares cromossômicos 4 e 8) de DNAr em cateto e queixada, respectivamente. Paralelamente, a presença de sequências teloméricas intersticiais (ITS) foi revelada adjacente ao centrômero do cromossomo X submetacêntrico de queixada. Este trabalho relata a primeira descrição de sítios de DNAr para *P. tajacu*, bem como a ocorrência de heteromorfismo do cromossomo X em *T. pecari*, cuja origem é discutida. Os marcadores citogenéticos enfatizaram que os cariótipos desses porcos americanos apresentam grandes divergências, as quais podem estar relacionadas ao acúmulo de rearranjos cromossômicos, a exemplo de translocações, inversões e reposicionamento centromérico, gerando implicações taxonômicas. Assim, estudos moleculares, de morfometria geométrica e citogenéticos complementares, como pintura cromossômica, serão fundamentais para uma melhor discussão sobre a história evolutiva de Tayassuidae.

**Palavras-chave:** Cateto. Queixada. Evolução cariotípica.

## ABSTRACT

*Pecari tajacu* (Linnaeus, 1758) and *Tayassu pecari* (Link, 1795), common name Collared Peccary and White-lipped Peccary, respectively, are found throughout the Americas, so they are called New World pigs. They are omnivorous and environmental indicator species, as well as they have low-fat meat, and their leather are used in the production of bags and gloves, so they have an ecological and economic importance. Collared Peccary and White-lipped Peccary populations are decreasing due to habitat loss, fragmentation and hunting, so conservation actions are important for these species. Here, we performed a comparative cytogenetic analysis between *P. tajacu* and *T. pecari* to identify chromosome markers, which can contribute to understand their karyotype differentiation and evolution, providing data for conservation strategies. For this, blood samples were collected from five captive Collared Peccary (four females and one male) and from seven captive White-lipped Peccary specimens (four females and three males) from the Laboratório de Etologia Aplicada (Universidade Estadual de Santa Cruz), Ilhéus, Bahia state, Brazil. Chromosome preparations were obtained by lymphocytes culture from peripheral blood samples, then the slides were submitted to the Giemsa staining, GTG- and CBG-banding, silver nitrate staining (AgNOR) and fluorescence in situ hybridization (FISH), with 35S ribosomal DNA (rDNA) probe (pTa 71) and telomeric DNA probe, both of which were labeled with digoxigenin-11-dUTP. *Pecari tajacu* and *Tayassu pecari* presented diploid chromosome number  $2n = 30$  and  $2n = 26$ , XX or XY, respectively, and the same fundamental number (FN = 46). Chromosome heteromorphism in White-lipped Peccary was noted for the X chromosome by the presence of an acrocentric and submetacentric heterozygous pair in female specimens. The C-positive heterochromatin was mainly found at the centromeres of most chromosomes in *P. tajacu* and *T. pecari*, although thin C-bands were observed at interstitial and telomeric locations, emphasizing the presence of different classes of constitutive heterochromatin on peccaries chromosomes. The G-banding allowed to identify all homologs in each species, revealing a karyotypic variation among those taxa, since chromosome homeologies were not easy to recognize, with exception of the Xq arm. The AgNOR staining and FISH with 35S rDNA showed the presence of 12 (pairs 2, 6, 8, 9, 12 and 13) and four sites (pairs 4 and 8) of rDNA in the Collared and White-lipped peccaries karyotypes, respectively. In addition, the occurrence of interstitial telomeric sequences (ITS) was revealed close to the centromere of the submetacentric X chromosome in *T. pecari*. In this work, we describe, for the first time, the rDNA sites of *P. tajacu*, as well as a case of heteromorphism involving the X chromosome in White-lipped Peccary, whose origin is discussed. The cytogenetic markers have emphasized the great dissimilarity between the peccaries karyotypes, which can be related to the accumulated chromosomal rearrangements that occurred during their evolution, such as translocations, inversions and centromere reposition, generating taxonomic implications. Thus, molecular analyses, geometric morphometric technique and additional cytogenetic studies, such as chromosome painting will contribute to a better discussion on the evolutionary history of Tayassuidae.

**Key-words:** Collared Peccary. White-lipped Peccary. Karyotype evolution.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** - Representantes da espécie *Pecari tajacu*.....25
- Figura 2** - Representantes da espécie *Tayassu pecari* .....25
- Figura 3** - Composição cromossômica de *Pecari tajacu* ( $2n = 30$ , XX; NF = 46) e *Tayassu pecari* ( $2n = 26$ , XX; NF= 46) do nordeste do Brasil. (a) Coloração convencional de *P. tajacu*; (b) Coloração convencional de *T. pecari*; (c) Cromossomos sexuais de indivíduos machos de *T. pecari*, evidenciando variantes cromossômicas do X com morfologias acrocêntrica e submetacêntrica, respectivamente, e Y acrocêntrico. Inseto I representa cromossomos sexuais de *P. tajacu* (X e Y acrocêntricos) e inseto II demonstra heteromorfismo cromossômico do par sexual X em relação às morfologias acrocêntrica e submetacêntrica. Escala (em b) = 7,5  $\mu\text{m}$ .....39
- Figura 4** - Padrão de bandeamento C, com predominância de bandas C<sup>+</sup> nas regiões centroméricas dos autossomos e do cromossomo X. (a) *Pecari tajacu*; (b) *Tayassu pecari*. Inseto I evidenciando a marcação no centrômero do X acrocêntrico e do submetacêntrico, respectivamente, o que comprova par heteromórfico em queixada; e inseto II exibindo cromossomos sexuais de macho de *T. pecari*, com Y heterocromático. Escala (em b) = 7,5  $\mu\text{m}$ .....40
- Figura 5** - Padrão de bandeamento G. (a) *Pecari tajacu*; (b) *Tayassu pecari*. Inseto I mostra caso de heteromorfismo no par sexual em exemplar fêmea de queixada (X acrocêntrico e submetacêntrico, respectivamente), e inseto II apresenta cromossomos sexuais de indivíduo macho da espécie (X submetacêntrico e Y acrocêntrico). Escala (em b) = 7,5  $\mu\text{m}$ .....41
- Figura 6** - Coloração com AgNO<sub>3</sub> (a – b) e hibridização *in situ* fluorescente com DNAr 35S (c – d) em *Pecari tajacu* (esquerda) e *Tayassu pecari* (direita), evidenciando a presença de seis pares cromossômicos portadores de sítios de DNAr 35S em *P. tajacu* (pares 2, 6, 8, 9, 12 e 13) (c), nem sempre revelados pela impregnação argêntica (a), bem como de dois pares cromossômicos (pares 4 e 8) em *T. pecari* (b e d). Escala (em d) = 7,5  $\mu\text{m}$ .....42
- Figura 7** - Heteromorfismo no cromossomo X de *Tayassu pecari* visualizado pelas técnicas de bandeamento C (a), bandeamento G (b) e FISH com sonda de DNA telomérico (C). Seta em c indica a presença de ITS (Sequências Teloméricas Intersticiais) na região adjacente ao centrômero do cromossomo X submetacêntrico.....43

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Comparação morfológica dos cromossomos autossômicos e sexuais de <i>Pecari tajacu</i> em relação a outros trabalhos da literatura. ....	44
---	----

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$2n$	Número diploide
$\text{AgNO}_3$	Nitrato de prata
AT	Adenina – Timina
Banda C <sup>+</sup>	Região de Heterocromatina positiva
Banda G <sup>-</sup>	Banda G negativa
Banda G <sup>+</sup>	Banda G positiva
$\text{Ba(OH)}_2$	Hidróxido de bário
B.O.D.	Estufa Incubadora para Demanda Bioquímica
DNAr	DNA Ribossomal
FISH	Fluorescence <i>in situ</i> Hybridization Hibridização <i>in situ</i> Fluorescente
GC	Guanina – Citosina
HC	Heterocromatina Constitutiva
HCl	Ácido clorídrico
ITS	Interstitial Telomeric Sequences Sequências Teloméricas Intersticiais
NF	Número Fundamental
PCR	Reação de Cadeia em Polimerase
RONs	Regiões Organizadoras de Nucléolos
TA	Temperatura Ambiente
UESC	Universidade Estadual de Santa Cruz

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>16</b>
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>18</b>
2.1. OBJETIVO GERAL.....	18
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	18
<b>3. REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	<b>19</b>
3.1. SISTEMÁTICA E TAXONOMIA: CLADO CETARTIODACTYLA, SUBORDEM SUIFORMES E FAMÍLIA TAYASSUIDAE.....	19
3.2. DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DA FAMÍLIA TAYASSUIDAE, COM ÊNFASE EM <i>Pecari tajacu</i> E <i>Tayassu pecari</i> .....	21
3.3. CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DE <i>Pecari tajacu</i> E <i>Tayassu pecari</i> .....	23
3.4. CITOGENÉTICA CLÁSSICA E MOLECULAR .....	26
3.5. CITOGENÉTICA NA FAMÍLIA TAYASSUIDAE .....	29
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>31</b>
4.1. MANEJO DOS ANIMAIS E COLETA DO MATERIAL BIOLÓGICO .....	31
4.2. OBTENÇÃO DE CROMOSSOMOS METAFÁSICOS .....	31
4.3. PREPARAÇÃO DE LÂMINAS .....	32
4.4. TÉCNICAS CITOGENÉTICAS .....	33
4.4.1. Coloração convencional .....	33
4.4.2. Bandeamento C .....	33
4.4.3. Bandeamento G .....	33
4.4.4. Impregnação por nitrato de prata .....	34
4.4.5. Hibridização <i>in situ</i> Fluorescente (FISH).....	34
4.4.5.1. Obtenção das sondas .....	34
4.4.5.2. Pré-tratamento das lâminas e Hibridização <i>in situ</i> .....	35
4.4.5.3. Lavagens pós-hibridização e detecção do sinal.....	35
4.9. ANÁLISES DOS DADOS .....	36
<b>5. RESULTADOS</b> .....	<b>37</b>
<b>6. DISCUSSÃO</b> .....	<b>43</b>
<b>7. CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	<b>48</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> <sup>1</sup> .....	<b>49</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Os mamíferos são considerados um grupo bem diversificado, sendo alvo de interesse para estudos morfológicos, ecológicos, genéticos, entre outros. Entretanto, apesar do acúmulo de dados científicos sobre estes animais, faz-se necessário compreender a classificação das espécies, bem como a evolução dos táxons (REIS et al., 2006).

Considerado um dos clados mais diversos dentre os mamíferos, o Cetartiodactyla apresenta 22 famílias e 132 gêneros (HASSANIN et al., 2012). Pertencente à subordem Suiformes, a família Tayassuidae é composta por três espécies *Pecari tajacu* (Linnaeus, 1758), *Tayassu pecari* (Link, 1795) e *Catagonus wagneri* (Rusconi, 1930), conhecidas popularmente como cateto, queixada e caititu do Chaco, respectivamente (GONGORA; MORAN, 2005). Morfologicamente, os porcos americanos apresentam estômago subdividido em três compartimentos, uma glândula de cheiro na região dorsal e um tamanho corpóreo médio de 30 Kg (RUVINSKY et al., 2011; SOWLS, 1974), sendo sua carne e couro bastante valorizados do ponto de vista comercial.

Tais animais apresentam ampla distribuição no Continente Americano. *Pecari tajacu* está distribuído do sudoeste dos Estados Unidos (América do Norte) ao norte da Argentina (América do Sul), enquanto que, representantes de *T. pecari* são encontrados do sul do México ao norte da Argentina. Por sua vez, reconhecido apenas por registros fósseis, *C. wagneri* foi encontrado na fronteira Paraguai-Bolívia-Argentina (RUVINSKY et al., 2011; SILVA; FREITAS; SBALQUEIRO, 2010).

No Brasil, essas espécies distribuem-se geograficamente em todos os biomas, revelando uma grande capacidade de se adaptar a diferentes ambientes. Entretanto, encontram-se em declínio populacional, devido ao desmatamento, perda de habitat e a caça (DESBIEZ et al., 2012; KEUROGHLIAN et al., 2012), estando *T. pecari* classificado no estado de vulnerabilidade (IUCN, 2017). Associadamente, os representantes de *P. tajacu* e *T. Pecari* podem ser encontrados em cativeiros, promovendo a homozigosidade e propiciando o acúmulo de alterações cromossômicas nestes animais (LIMA et al., 2004).



Os parâmetros citogenéticos têm sido utilizados como ferramentas importantes para o conhecimento do patrimônio genético das espécies, para a resolução de incertezas taxonômicas, identificando espécies crípticas e sinonímias, na definição de unidades de manejo dentro das espécies, na delimitação de espécies simpátricas e/ou alopátricas, por exemplo, fornecendo assim subsídios para as estratégias conservacionistas. No Brasil, poucos estudos relatam a caracterização cariotípica do cateto e queixada, principalmente para o nordeste, sendo a primeira descrição realizada por Krallinger (1936) utilizando coloração convencional, a qual determina e compara informações importantes sobre número, morfologia e tamanho cromossômico. Adicionalmente, outros trabalhos já foram publicados envolvendo as técnicas de bandeamento cromossômico, a exemplo dos bandeamentos G (ANDREA et al., 2001) e C (ADEGA et al., 2007) e Hibridização *in situ* fluorescente (FISH) mediante sondas cromossômicas (ADEGA et al., 2006; BOSMA et al., 2004).

Os estudos filogenéticos com caracteres morfológicos, moleculares e cromossômicos têm evidenciado divergências em relação à diversificação das espécies *C. wagneri* ( $2n = 20$ ), *T. pecari* ( $2n = 26$ ) e *P. tajacu* ( $2n = 30$ ), enfatizando a possível ocorrência de inversões, translocações, fusões e fissões cêntricas na evolução cromossômica das espécies em questão. Desta forma, uma análise citogenética comparativa entre *P. tajacu* e *T. pecari* investigará a ocorrência de rearranjos cromossômicos estruturais, como sendo responsáveis por mecanismos de evolução cariotípica, fornecendo assim suporte para estudos filogenéticos e conservacionistas no grupo.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. OBJETIVO GERAL

Efetuar uma análise citogenética comparativa entre *Pecari tajacu* e *Tayassu pecari*, mediante técnicas de coloração convencional, bandeamento cromossômico e hibridização *in situ* fluorescente (FISH) com DNA Ribossomal (DNAr) 35S e DNA telomérico, a fim de identificar marcadores cromossômicos que contribuam para o entendimento dos mecanismos de diferenciação cariotípica entre as duas espécies.

### 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar os números diploide e fundamental, assim como a morfologia cromossômica, em indivíduos de *P. tajacu* e *T. pecari*, mediante a técnica de coloração convencional;
- Evidenciar o padrão de distribuição da heterocromatina constitutiva (HC) e identificar possíveis heteromorfismos no cariótipo das espécies em estudo, utilizando a técnica de bandeamento C com Giemsa (CBG);
- Observar homeologias e possíveis rearranjos cromossômicos no cariótipo das referidas espécies, por intermédio do padrão de distribuição da eucromatina, evidenciado pela técnica de bandeamento G;
- Identificar o número e localização de regiões organizadoras de nucléolos (RONs) ativas e inativas nos cromossomos metafásicos de cateto e queixada, através da impregnação com nitrato de prata (AgNO<sub>3</sub>) e FISH com DNAr 35S;
- Analisar as relações de diferenciação cariotípica entre as espécies avaliadas neste trabalho, contribuindo para estudos de evolução cromossômica em Tayassuidae.

### 3. REFERENCIAL TEÓRICO

#### 3.1. SISTEMÁTICA E TAXONOMIA: CLADO CETARTIODACTYLA, SUBORDEM SUIFORMES E FAMÍLIA TAYASSUIDAE

O clado Cetartiodactyla é um dos mais diversos grupos de mamíferos, sendo constituído por 332 espécies reconhecidas e classificadas em 132 gêneros e 22 famílias (HASSANIN et al., 2012). Originalmente, os membros de Cetartiodactyla eram agrupados em duas ordens, conhecidas como Cetacea e Artiodactyla. Esta última era considerada um grupo monofilético e proximamente relacionada à Cetaceae, com base em estudos morfológicos revelando um ancestral em comum, *Condylarthra* (PRICE; BININDA-EMONDS; GITTLEMAN, 2005).

Estudos realizados com sequências de RNAr (RNA ribossômico) 12S e do Citocromo B (CytB) sugeriram que os representantes de Cetaceae seria grupo irmão de Hippopotamidae, formando o clado Whippomorpha, bem como que estes estariam agrupados dentro de Artiodactyla, refutando a hipótese da monofilia para este grupo, levando assim a delimitação do clado Certatiodactyla (MONTGELARD; CATZEFLIS; DOUZERY, 1997; ZHOU et al., 2011).

Embora estudos filogenéticos, envolvendo sequências genômicas nuclear e mitocondrial, tenham sido desenvolvidos para Certatiodactyla, algumas incertezas ainda são reconhecidas devido aos baixos suportes obtidos nas árvores filogenéticas. Ruvinsky et al. (2011) afirmaram que, inicialmente, Cetartiodactyla apresentava três subordens bem estabelecidas: Tylopoda, Ruminantia e Suiformes, sendo esta última considerada basal mediante características morfológicas. Entretanto, estes autores relataram a formação de uma quarta subordem denominada Cetancodonta, a qual agruparia os golfinhos, baleias e hipopótamos (HUFFMAN, 2009; PRICE; BININDA-EMONDS; GITTLEMAN, 2005).

Por sua vez, Hassanin et al. (2012) relatam a existência de três linhagens dentro desta ordem: Centruminantia, a qual é constituída pelo agrupamento do clado Whippomorpha e Ruminantia; Suina ou Suiformes (porcos e *peccaries*); e, Tylopoda, o qual é apontado como grupo basal. A subordem Suiformes ou Suina é constituída por duas famílias monofiléticas (HASSANIN et al., 2012): Suidae (Gray, 1821), grupo

mais diverso, constituído por seis gêneros e 18 a 19 espécies distribuídas no sudeste Asiático, Eurasia e/ou África, sendo popularmente conhecidos como porcos domésticos; e Tayassuidae (Palmer, 1897), a qual é formada por três espécies conhecidas como porcos americanos, uma vez que estão distribuídas apenas neste Continente (RUVINSKY et al., 2011).

Análises cladísticas, usando características morfológicas e registros fósseis, têm permitido inferir sobre a diferenciação entre os suídeos e taiassuídeos. Tais dados sugeriram que o primeiro registro de representantes de Suidae (pertencente ao gênero *Hyotherium*) ocorreu no início do Oligoceno no subcontinente Indiano, bem como indicaram que a divergência de Suidae e Tayassuidae pode ter ocorrido durante o Eoceno (56,0 – 33,9 Ma) (ORLIAC; PIERRE-OLIVIER; DUCROCQ, 2010). Por outro lado, a partir de dados moleculares, estimou-se que divergência entre Tayassuidae e Suidae ocorreu a 56,0 – 33,9 Ma (Eoceno tardio) (FRANTZ et al., 2016; GONGORA et al., 2011; ORLIAC; PIERRE-OLIVIER; DUCROCQ, 2010). A família Tayassuidae compreendem as espécies *Pecari tajacu* (Linnaeus, 1758), anteriormente denominada como *Tayassu tajacu* (Linnaeus, 1758), e comumente conhecida como caititu ou cateto, *Tayassu pecari* (Link, 1795) e *Catagonus wagneri* (Rusconi, 1930), popularmente denominadas como queixada e caititu do Chaco, respectivamente (GONGORA; MORAN, 2005).

Considerando dados morfológicos, moleculares e citogenéticos, existem hipóteses conflitantes sobre a evolução e parentesco dos porcos americanos. Utilizando análises dentais e craniais, Wetzel et al. (1975) propuseram que as espécies *P. tajacu* e *T. pecari* seriam mais proximamente relacionadas do que *C. wagneri*. Por sua vez, as análises moleculares com sequências de CytB e citogenéticas suportam a sugestão que as espécies *T. pecari* e *C. wagneri* estão estreitamente mais relacionados do que o *P. tajacu*. Alguns autores acreditam que *P. tajacu* divergiu do clado constituído por *T. pecari* e *C. wagneri* entre o final do Mioceno e o Plioceno (5,333 – 3,600 Ma). Posteriormente, entre o final do Plioceno e início do Pleistoceno (2,58 – 1,80 Ma), houve a diferenciação entre *T. pecari* e *C. wagneri* (GONGORA; MORAN, 2005; THEIMER; KEIM, 1998).

Por outro lado, a partir de registro fóssil e análises evolutivas baseadas em DNA mitocondrial, sugere-se que a divergência de *P. tajacu* e *T. pecari* poderia ter ocorrido antes da conclusão da ponte de terra no istmo do Panamá, a qual ocorreu no final do Plioceno (2,58 Ma) (ADEGA et al., 2007).

### 3.2. DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DA FAMÍLIA TAYASSUIDAE, COM ÊNFASE EM *Pecari tajacu* E *Tayassu pecari*

Os representantes da família Tayassuidae têm a origem descrita para o Sudeste Asiático, no final do Eoceno (56 – 33,9 Ma), resultantes da divergência entre estes e os porcos domésticos pertencentes à família Suidae (GONGORA; MORAN, 2005; RUVINSKY et al., 2011). Após essa diferenciação, os *peccaries* migraram para Eurásia, África e América do Norte, colonizando posteriormente a América do Sul (DUCROCQ, 1994).

Atualmente, essas espécies são encontradas apenas no continente Americano (RUVINSKY et al., 2011), motivo pelo qual são chamados de porcos americanos, apresentando uma distribuição geográfica diferenciada. Em termos gerais, *Pecari tajacu* está distribuído do sudoeste dos Estados Unidos (América do Norte) ao norte da Argentina (América do Sul), enquanto que, representantes de *T. pecari* são encontrados do sul do México ao norte da Argentina. Por sua vez, reconhecido apenas por registros fósseis, *Catagonus wagneri* foi encontrado na fronteira Paraguai-Bolívia-Argentina (RUVINSKY et al., 2011; SILVA; FREITAS; SBALQUEIRO, 2010).

De acordo com Gongora et al. (2006), duas hipóteses são válidas para a distribuição atual dos porcos americanos no Novo Mundo. Primeiramente, encontra-se proposto que os representantes de Tayassuidae migraram da América do Norte para a América Central e do Sul, onde diversificaram mediante radiação adaptativa durante o Pleistoceno (MAYER; WETZEL, 1987; WETZEL, 1977a;b) a 2 Ma. Por sua vez, Wright (1989) sugeriu que os porcos americanos divergiram na América do Norte durante o fim do Mioceno à 10 Ma e que, posteriormente, eles colonizaram a América do Sul.

No Brasil, a ocorrência das espécies *P. tajacu* e *T. pecari* mostra-se divergente ao longo dos biomas brasileiros; entretanto, elas podem ser encontradas em simpatria em fragmentos florestais (SICURO; OLIVEIRA, 2002). O cateto apresenta uma ampla distribuição geográfica no território nacional, sendo encontrados nas áreas com cobertura vegetal em quase todos os biomas brasileiros, as quais correspondem a 12% da área original da Mata Atlântica (onde se encontra

classificada como quase ameaçada), a 50% do Cerrado, a 30% da Caatinga, a 80% da Amazônia e do Pantanal (DESBIEZ et al., 2012).

Esta espécie consegue sobreviver em variadas condições de habitat, desde regiões de florestas tropicais úmidas a regiões semiáridas, mostrando-se resistente a ações antrópicas, exceto em ambientes extremamente alterados. Este fato deve-se a exibição de adaptações tanto morfológicas quanto fisiológicas, fazendo com que este animal module e/ou insira itens alimentares em sua dieta, a exemplo de frutas, folhas, raízes e tubérculos (COSTA; PAULA, 2005; SOWLS, 1997). Devido a estas características, os catetos são considerados dispersores de sementes e indicadores ambientais, respaldando a importância ecológica desses animais.

Por outro lado, o queixada exibe uma distribuição mais restrita nos biomas brasileiros, sendo comumente encontrado em florestas úmidas e densas e usualmente primárias; contudo, podem habitar regiões secas (NOWAK 1991). Nestas regiões, a sua distribuição é dependente da variedade de habitats, uso de córregos e disponibilidade de frutas (KEUROGHLIAN; EATON, 2009), sendo este animal mais seletivo quanto aos itens alimentares (SICURO; OLIVEIRA, 2002). São classificados como, principalmente, frugívoros, alimentando-se também de sementes, raízes, larvas de inseto, minhocas, entre outros, bem como são importantes na manutenção dos ecossistemas como predadores e dispersores de sementes (KEUROGHLIAN et al., 2012).

Devido à alteração de habitat, a população de queixada sofreu uma redução de 30% nos últimos 22 anos na Caatinga. Por sua vez, é notável a existência de grandes populações de queixadas no Pantanal e na Amazônia, uma vez que estas regiões apresentam uma maior expansão de áreas conservadas (KEUROGHLIAN et al., 2012). Assim, é notório a sensibilidade de *T. pecari* à degradação ambiental, fato que esta ocasionando uma diminuição da ocupação deste porco americano no território brasileiro (ANDRADE et al., 2015), sendo classificado no estado de vulnerabilidade (IUCN, 2017).

Associada ao desmatamento e perda de habitat, o cateto e queixada têm sofrido diferentes impactos atrelados à caça levando ao declínio populacional. Estas espécies apresentam uma carne com teor de gordura inferior aos demais porcos e um couro de qualidade usado na produção de bolsas e luvas, despertando um alto interesse comercial (COSTA; PAULA, 2005; DEUTSCH; PUGLIA, 1990; SILVA; FREITAS; SBALQUEIRO, 2010).

*Pecari tajacu* mostra uma capacidade peculiar de resiliência à caça superior a *T. pecari*, a qual pode ser associada à própria capacidade de sobreviver em ambientes fragmentados, bem como ao comportamento biológico dessa espécie. Os catetos formam populações com 10 a 50 indivíduos, ocupando uma área menor para seu deslocamento (BECK, 2006; MENDES PONTES; CHIVERS, 2007; MORALES et al., 2015; NOGUEIRA-FILHO; NOGUEIRA; SATO, 1999), os quais tendem a dispersar quando atacados. Contrariamente, *T. pecari* se desloca em grupos superiores a 100 indivíduos (BECK, 2006), os quais respondem aos ataques com uma maior coesão entre eles (FRAGOSO, 1994), tornando-os mais vulneráveis a caça.

Por fim, ambas as espécies adaptam-se bem a cativeiros (ALBUQUERQUE et al., 2004), sendo relatada a hibridização entre elas nestes locais e na natureza, resultando em híbridos selvagens estéreis (RUVINSKY et al., 2011).

### 3.3. CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DE *Pecari tajacu* E *Tayassu pecari*

Em termos gerais, a ordem Artiodactyla apresenta características marcantes a exemplo do eixo de simetria das patas, relacionados ao terceiro e quarto dígito, bem como a ausência do primeiro dígito e a redução em níveis diferentes do segundo e do quinto dígito. Exibem uma especialização na dentição, podendo apresentar de 30 a 40 dentes, bem como uma diferenciação no estômago que pode ser simples ou complexo - apresentando três ou quatro câmaras (REIS et al., 2006).

Morfologicamente, os porcos domésticos e americanos apresentam um disco no focinho, bem como o sistema reprodutivo similar (SONNER et al., 2004); entretanto, as diferenças morfológicas entre as duas famílias são bem relevantes. Entre estas, pode-se citar a presença de estômago simples nos representantes da família Suidae, a presença da vesícula biliar, ausência da glândula de cheiro, presença de uma cauda mais comprida (20 a 23 vértebras), e a presença de quatro dígitos (ALBUQUERQUE et al., 2016). Nos representantes da família Tayassuidae observa-se um tamanho corporal médio, a presença de estômago subdividido em três compartimentos, dente canino superior apontado para baixo, cauda curta com

sete vértebras e ausência da vesícula biliar (ALBUQUERQUE et al., 2016; RUVINSKY et al., 2011).

As espécies *P. tajacu* e *T. pecari* são caracterizadas por apresentarem uma cabeça pequena em formato triangular, as patas anteriores e posteriores dispostas por quatro e três membros, respectivamente, sendo que apenas duas são funcionais, bem como pela cauda vestigial (REIS et al., 2006). Outra característica marcante é presença de uma glândula odorífera, localizada na região dorsal próxima a cauda, denominada de glândula dorsal. Esta glândula secreta uma substância oleosa com o odor do almísco, utilizada para marcação de território, comportamento social propiciando o domínio sobre o parceiro, evitando a entrada de outros indivíduos da mesma espécie no grupo, bem como para o reconhecimento individual (MORALES et al., 2015). A maturidade sexual de ambas as espécies é com dez meses de idade (SONNER et al., 2004). O dimorfismo sexual da espécie é de difícil visualização, sendo necessária a identificação do escroto dos machos em muitos casos (COSTA; PAULA, 2005).

O cateto adulto exhibe algumas características específicas, como por exemplo, a presença de pelos esbranquiçados ao redor do olho e em volta do pescoço, aparentando um formato de “colar” ou “anel”, enquanto que, no restante do corpo, sua pelagem é mais escura (FIGURA 1) (PEREIRA-JÚNIOR et al., 2014). Contudo, indivíduos mais jovens têm uma diferenciação nesse padrão de cor, apresentando uma coloração mais avermelhada-acinzentada e uma parte distinta marrom escura. Associadamente, apresenta caninos bem desenvolvidos, com formatos triangulares e direcionados para fora, divergindo do queixada (REIS et al., 2006).

Por sua vez, o *T. pecari* exhibe pelos brancos ao longo da mandíbula, motivo pelo qual recebe o nome popular de queixada; no restante do corpo, seus pelos mostram-se marrom escuro ou negro (FIGURA 2). Similarmente aos catetos, os indivíduos jovens apresentam diferenciação na cor do pelo, havendo uma variação em cores castanho claro e escuro ao longo do corpo (REIS et al., 2006).



**Figura 1** - Representantes da espécie *Pecari tajacu*.



Fonte: Arquivo pessoal

**Figura 2** - Representantes da espécie *Tayassu pecari*.



Fonte: Arquivo pessoal

### 3.4. CITOGENÉTICA CLÁSSICA E MOLECULAR

A citogenética surgiu devido à sobreposição dos conhecimentos da citologia e da genética. Desde então, expandiu-se e foi incorporada nas mais diversas áreas da biologia, como taxonomia, bioquímica, medicina clínica e melhoramento vegetal e animal (GUERRA, 1988).

GUERRA (1988) define a citogenética como “todo e qualquer estudo relativo ao cromossomo isolado ou em conjunto, condensado ou distendido, tanto no que diz respeito à sua morfologia, organização, função e replicação, quanto à sua variação e evolução”. Assim, a citogenética configura-se como uma importante ferramenta nos estudos evolutivos, taxonômicos e filogenéticos.

As técnicas de citogenética clássica empregadas na caracterização cromossômica incluem a coloração convencional e diferencial (bandamentos G, C e impregnação por nitrato de prata). O cariótipo convencional permite determinar o número diploide ( $2n$ ), o número fundamental (NF), o sistema de determinação do sexo e variações intra e interespecíficas do número e morfologia cromossômicas. Dentre essas modificações, em alguns táxons, é possível notar uma variação morfológica entre os cromossomos homólogos, a qual é denominada de polimorfismo ou heteromorfismo (OLIVEIRA et al., 2011). A identificação desses polimorfismos cromossômicos é comum em cariótipos de animais silvestres (PUERTAS; DÍAZ; ORTIZ, 2004).

Um grande progresso nos conhecimentos citogenéticos foi notado com a aplicação das técnicas de bandamentos cromossômicos, a qual possibilitou a observação de estruturas cromossômicas transversais (bandas) de variados tamanhos e localização no cromossomo, propiciando assim a caracterização de cada cromossomo em várias espécies (DRETS, 2002).

A técnica de bandamento C permite identificar a heterocromatina constitutiva (HC) e a possível presença de heteromorfismo (GUERRA, 1988), a qual representa uma considerável proporção do genoma dos eucariotos. São regiões constituídas por sequências de DNA altamente repetitivo, com elevado nível de condensação, baixa densidade gênica e recombinação meiótica reduzida, replicação tardia durante a fase S e inativação transcricional. Encontra-se distribuída em blocos, devido a modificações pós-transcricionais nos nucleossomos, como

metilação de H3 e acetilação de H3 e H4 (ELGIN; GREWAL, 2003; HENIKOFF, 2000) e, preferencialmente, em posições centroméricas e teloméricas (KUBIS; SCHMIDT; HESLOP-HARRISON, 1998).

Por sua vez, a técnica de bandeamento G é caracterizado por evidenciar a região eucromática, constituída por: bandas claras [bandas G negativas ( $G^-$ )], onde os segmentos cromossômicos são condensados mais tardiamente na prófase e apresentam DNA rico em bases GC; e bandas escuras [bandas G positivas ( $G^+$ )], onde as regiões são condensadas mais cedo na prófase e o DNA é rico em bases AT (GUERRA, 1988). O padrão de bandeamento G fornece informações importantes no estudo comparativo da estrutura do cariótipo entre táxons proximamente relacionados, permitindo a identificação precisa dos cromossomos e podendo revelar rearranjos ocorridos durante a evolução cromossômica. Além disso, a detecção de rearranjos cromossômicos proporciona dados que podem ser utilizados em análises filogenéticas (BARROS et al., 2009; SANTOS et al., 2007)

A impregnação por nitrato de prata ( $AgNO_3$ ) evidencia nucléolos em células interfásicas e Regiões Organizadoras de Nucléolos (RONs), também conhecidas como constrições secundárias (GOODPASTURE; BLOOM, 1975). Essa técnica apresenta limitações, uma vez que só serão marcadas RONs que foram ativamente transcritas durante a intérfase anterior, o que pode subestimar a quantidade de RONs presentes no cariótipo de uma espécie (GROSS et al., 2010; SOARES-SCOTT et al., 2005).

Desta forma, em termos gerais, a HC e as RONs constituem marcadores cromossômicos que podem variar entre ou dentro de espécies, sendo também usados em análises citogenéticas comparativas (IPUCHA; GIMÉNEZ; BIDAU, 2008; LEMOS-PINTO et al., 2012; TAGLIARINI et al., 2013).

O desenvolvimento de novas metodologias utilizando o DNA, mapeamento gênico e análise cromossômica permitiram um grande avanço na compreensão da organização, estrutura e evolução do complemento cromossômico. A técnica de hibridização *in situ* fluorescente (FISH) permitiu uma ligação entre os dados moleculares de sequências de DNA e a citogenética, podendo ser utilizada no mapeamento físico destas sequências e na identificação e caracterização de cromossomos ou segmentos cromossômicos (SCHWARZACHER; HESLOP-HARRISON, 2000).

Atualmente, a FISH é uma técnica muito utilizada, devido o seu elevado poder informativo e por sua especificidade. De maneira sucinta, o processo consiste na desnaturação e hibridização do ácido nucleico alvo com uma sonda adequada e complementar (DNA ou RNA conhecido e previamente marcado com alguma molécula de fácil identificação) possibilitando a localização *in situ* e sequências de ácidos nucleicos (DNA ou RNA) nos cromossomos, citoplasma, organelas ou tecidos (GUERRA, 2004).

Muitos tipos de sequências têm sido utilizadas na FISH, incluindo cópias únicas ou com baixo número de repetições, até aquelas altamente repetitivas, como por exemplo, DNA ribossomal (DNAr) 5S e 45S, sequências centroméricas e teloméricas (GUERRA, 2004). O RNAr é o principal componente estrutural do ribossomo; os genes de RNAr 5S e 45S apresentam-se altamente repetitivos e arranjados *em tandem* em *loci* no genoma de diferentes espécies. Tal distribuição e o número de sítios discretos propiciam sua extensa utilização na FISH (PEDROSA-HARAND; GUERRA, 2004), tornando os *loci* de DNAr marcadores valiosos para investigação e evolução cromossômica. Vale salientar que os sítios de DNAr correspondem às RONS, as quais frequentemente se encontram colocalizados com blocos de HC.

A técnica de FISH também tem permitido analisar a distribuição do DNA telomérico nos cromossomos, que consiste da sequência TTAGGG repetida *em tandem* em mamíferos, estando conservada em diferentes grupos e normalmente observada nas regiões terminais (telômeros). A detecção da sequência (TTAGGG)<sub>n</sub> em sítios não-teloméricos (regiões intersticiais) pode significar a presença de resquícios de telômeros verdadeiros, resultantes de rearranjos cromossômicos como fusão e fissão cêntrica, inversões e translocações, que ocorreram durante a evolução cariotípica (BRUSCHI et al., 2014). Meyne et al. (1990) sugeriram que espécies ancestrais de um determinado grupo tendem a ter sequências teloméricas nas regiões distais, enquanto espécies mais derivadas podem exibir tais sequências em outras regiões.

Desta forma, o uso de variadas técnicas citogenéticas propicia a identificação de homologias cromossômicas intra- e interespecíficas facilitando os estudos de evolução cariotípica entre táxons relacionados.

### 3.5. CITOGENÉTICA NA FAMÍLIA TAYASSUIDAE

Considerando os estudos citogenéticos na família Tayassuidae, os números cromossômicos diploides foram definidos para as espécies *P. tajacu* ( $2n = 30$ ) (KRALLINGER, 1936), *T. pecari* ( $2n = 26$ ) (GIANNONI, 1972) e *C. wagneri* ( $2n = 20$ ) (BENIRSCHKE; KUMAMOTO; MERITT, 1985), levantando-se duas teorias sobre a evolução cromossômica neste grupo taxonômico e sua relação com a filogenia proposta com a diferenciação de dois clados (*P. tajacu* e *T. pecari/C.wagneri*) (GONGORA; MORAN, 2005; THEIMER; KEIM, 1998).

Embora ambas as teorias suportem a inclusão de *P. tajacu* em um gênero distinto, a primeira hipótese baseia-se na ocorrência de fusão cromossômica a partir de um cariótipo ancestral (*P. tajacu*;  $2n = 30$ ) (BENIRSCHKE; KUMAMOTO, 1989); enquanto que, a segunda teoria suporta a possibilidade de um aumento do número cromossômico diploide ancestral (*C. wagneri*;  $2n = 20$ ) por fissões cromossômicas (TODD, 1985). Com base no descrito acima, as investigações sobre a ocorrência de rearranjos cromossômicos têm direcionado os estudos citogenéticos em Tayassuidae, mediante as diferentes técnicas citogenéticas, com caráter descritivo ou comparativo.

As análises descritivas apontam que o cariótipo de *P. tajacu* apresenta diferenças entre representantes coletados na América do Norte (ADEGA et al., 2006) e América do Sul (BOSMA et al., 2004; CARVALHO et al., 2008), em relação ao número de cromossomos com um braço e com dois braços, bem como a morfologia do cromossomo sexual X, o qual se mostrou submetacêntrico e acrocêntrico em representantes da América do Norte e do Sul, respectivamente. Essas divergências foram analisadas mediante bandeamento G e pintura cromossômica, evidenciando a ocorrência de rearranjos cromossômicos envolvendo o maior par cromossômico metacêntrico e um pequeno cromossomo acrocêntrico (ADEGA et al., 2006; BOSMA et al., 2004).

Em relação à *T. pecari*, a descrição cariotípica revelou a presença de dois grandes pares cromossômicos submetacêntricos, nove pares de cromossomos com dois braços e um menor par de cromossomos acrocêntricos, bem como cromossomos sexuais com a morfologia do tipo acrocêntrico (ADEGA et al., 2007; SILVA; FREITAS; SBALQUEIRO, 2010). Estudos realizados com populações

brasileiras coletadas no Sudeste e Centro-oeste evidenciaram cromossomos X acrocêntrico e submetacêntrico, respectivamente, em *T. pecari* notando-se a presença de polimorfismos também para a citada espécie (BOSMA et al., 2004; GIANNONI; FERRERI; GIANNONI, 1981).

Com o intuito de investigar a distribuição da heterocromatina para o entendimento de relações filogenéticas, bandas C positivas (C<sup>+</sup>), resultantes da digestão *in situ* com enzimas de restrição com o bandeamento C sequencial, foram visualizadas nas regiões intersticiais, centroméricas e teloméricas dos cromossomos de *P. tajacu* e *T. pecari* (ADEGA et al., 2007). Entretanto, a espécie *P. tajacu* mostrou uma maior heterogeneidade de heterocromatina constitutiva, em comparação *T. pecari*, enfatizando uma maior variação genética entre os genótipos deste táxon. Tal variabilidade intraespecífica já tinha sido reportada para *P. tajacu* em nível de sequências de DNA mitocondrial, mostrando populações geneticamente estruturadas (GONGORA; MORAN, 2005; GONGORA et al., 2006).

Estudos citogenéticos comparativos têm sido realizados em *P. tajacu*, mediante a pintura cromossômica com sondas de ovelhas e porcos domésticos, revelando a presença de segmentos sintênicos entre os representantes de Suidae e Tayassuidae. Ao hibridizar sondas cromossômicas de porco doméstico em *P. tajacu*, a análise comparativa revelou vários rearranjos cromossômicos, os quais devem ter ocorrido em um ancestral comum corroborando a situação monofilética dos Suiformes (BOSMA et al., 2004).

Além dos estudos evolutivos, a citogenética tem sido utilizada como uma ferramenta potencial para monitoramento reprodutivo de animais em cativeiro, a exemplo dos catetos e queixadas. A partir de análises realizadas com *P. tajacu*, *T. pecari* e um híbrido natural, Andrea et al. (2001) observaram o número cromossômico  $2n = 28$  cromossomos, sendo 15 cromossomos semelhantes a *P. tajacu* e 13 cromossomos similares a *T. pecari*. Além disso, as quebras cromossômicas têm sido notadas em populações de *P. tajacu*, as quais foram associadas ao potencial genotóxico da vermifugação dos animais (LIMA et al., 2004; SILVA; FREITAS; SBALQUEIRO, 2010).

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. MANEJO DOS ANIMAIS E COLETA DO MATERIAL BIOLÓGICO

Os indivíduos de *P. tajacu* e *T. pecari* foram provenientes de populações mantidas em cativeiro na Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC) localizado na cidade de Ilhéus/BA (4°47'46''S, 39°10'22''O). Tais animais encontravam-se dispostos em diferentes recintos ao ar livre, cercados com tela de alambrado de 1,5 m de altura sustentada por mourões de eucalipto.

Para o manejo, os animais foram direcionados para um recinto onde existe uma estrutura que facilita a contenção física com uma rede do tipo puçá; após contenção, o animal foi imobilizado por, no mínimo, duas pessoas com experiência neste tipo de atividade.

O número de cinco catetos (um macho e quatro fêmeas) e sete queixadas (três machos e quatro fêmeas) foi manejado com o auxílio de uma médica veterinária para coleta do material biológico. Após assepsia com álcool etílico 70%, cerca de 1 a 2 mL de sangue foi coletado a partir da veia cefálica e acondicionado em tubos heparinizados para evitar a coagulação do mesmo. Após a coleta, o animal foi solto no recinto onde originalmente são mantidos.

Vale salientar que, para a execução deste trabalho, este estudo foi submetido ao Comissão de Ética do Uso de Animais da UESC, seguindo os princípios éticos que regem estudos em animais.

### 4.2. OBTENÇÃO DE CROMOSSOMOS METAFÁSICOS

A cultura de linfócitos, oriunda do sangue periférico, para a obtenção de cromossomos metafásicos mitóticos foi realizado seguindo o protocolo descrito por Moorhead et al. (1960), com algumas modificações. Em câmara de fluxo laminar, o sangue coletado foi incubado em tubo Falcon estéril, devidamente etiquetado com a identificação do animal, contendo 4 mL de meio de cultura (RPMI 1640-GIBCO), 1 mL do soro bovino fetal (Cultilab) e 0,2 mL de fitohemaglutinina (Sigma). A cultura foi

mantida por 96 h a 37 °C em uma B.O.D, para obtenção de um maior número de metáfases.

Após 95 h de incubação, adicionou-se 0,1 mL de colchicina (0,01%) a cultura, para o bloqueio do ciclo celular, a qual foi mantida por 1 h a 37 °C. Em seguida, o material foi centrifugado a 1800 rpm por 6 min, sendo o sobrenadante descartado com o auxílio de uma pipeta Pasteur. Para a realização do choque hipotônico, o volume 1 mL de KCl 0,075M a 37 °C foi adicionado ao material, o qual foi mantido sob agitação. Ao completar dois minutos, acrescentou-se 7 mL de KCl 0,075M ao tubo, o qual foi colocado em banho-maria por 45 min a 37 °C. Posteriormente, o material foi centrifugado a 1800 rpm por 6 min e o sobrenadante descartado.

Em seguida, o material foi ressuscitado em 5 mL de Carnoy (metanol: ácido acético; 3:1, v/v), homogeneizado com auxílio da pipeta Pauster e mantido por 20 min a temperatura ambiente (TA). Após esse período, os tubos foram novamente centrifugados, sempre pelo tempo e velocidade previamente descritos. Após descarte do sobrenadante, este procedimento foi repetido por mais duas vezes, com a troca de fixador fresco, para a retirada de impurezas da suspensão celular obtida, a qual foi armazenada a 4 °C até a sua utilização.

Salienta-se que esta etapa foi realizada no Laboratório de Aulas de Análises Clínicas da UESC localizada em Ilhéus – BA.

#### 4.3. PREPARAÇÃO DE LÂMINAS

Para a preparação citológica, a suspensão celular foi concentrada em 1 mL do fixador mediante uma centrifugação a 1800 rpm por 6 min. Com o auxílio de uma pipeta Pasteur, a suspensão celular foi ressuscitada e gotejada sobre lâminas limpas, em banho-maria a 60 °C, sendo posteriormente secas a TA e submetidas às diferentes técnicas citogenéticas.



#### 4.4. TÉCNICAS CITOGENÉTICAS

##### 4.4.1. Coloração convencional

Para análise convencional, as lâminas foram coradas em solução de Giemsa a 5% por 10 minutos, sendo lavadas em água destilada e montadas com bálsamo do Canadá.

##### 4.4.2. Bandeamento C

O procedimento da técnica de bandeamento C seguiu o protocolo descrito por Sumner (1972), com algumas alterações. Lâminas envelhecidas por cinco dias foram mergulhadas em uma solução ácido clorídrico (HCl) 0,2 N por 30 minutos a TA para os indivíduos de *Tayassu pecari* e por 15 minutos a 45 °C para representantes de *Pecari tajacu*. Posteriormente, as preparações citológicas foram lavadas com água destilada, deixadas secar e submetidas à ação do hidróxido de bário [Ba(OH)<sub>2</sub>] à 60 °C por tempos diferenciados nas duas espécies, *T. pecari* (1 minuto e 55 segundos) e *P. tajacu* (1 minuto e 57 segundos). Em seguida, foram lavadas em banhos rápidos de HCl 0,2 N, com água destilada e secas a TA. Posteriormente, as lâminas foram mergulhadas em solução 2X SSC a 60 °C por 30 minutos para ambas as espécies, lavadas em água destilada, secas ao ar e coradas com Giemsa 5 % por 12 minutos.

##### 4.4.3. Bandeamento G

Para a execução da técnica de bandeamento G, seguiu-se o protocolo de Seabright (1971), com algumas modificações. Lâminas envelhecidas por cinco dias foram mergulhadas na tripsina 0,1% por 7 segundos. Passado esse período, as

preparações citológicas foram lavadas duas vezes em soro fisiológico a TA e secas ao ar. Posteriormente, as lâminas foram coradas com Giemsa 5 % por 5 minutos.

#### **4.4.4. Impregnação por nitrato de prata**

Para realização desta técnica, utilizou-se o protocolo descrito por Howell e Black (1980), com algumas modificações. Sobre lâminas envelhecidas, foi pingada uma gota de solução coloidal de gelatina em cada extremidade da lâmina (0,5 g de gelatina incolor em 25 mL de água destilada quente, mais 0,5 mL de ácido fórmico) e duas gotas de solução de prata a 50% (1 g de  $\text{AgNO}_3$  em 2 mL de água destilada), cobrindo-se com lamínula. Posteriormente, as lâminas foram mantidas em câmara úmida previamente aquecida, em uma Estufa Incubadora para Demanda Bioquímica de Oxigênio (B.O.D) a 60 °C por aproximadamente cinco minutos ou até assumir uma coloração caramelo. Em seguida, as lâminas foram lavadas com água destilada até a completa retirada da lamínula e depois de secas, sofreram uma contra-coloração com Giemsa a 5% por cinco minutos.

#### **4.4.5. Hibridização *in situ* Fluorescente (FISH)**

##### **4.4.5.1. Obtenção das sondas**

A sonda pTa 71 contendo a unidade de repetição DNAr 35S (DNAr 18S-5,8S-25S), oriunda de *Triticum aestivum*, foi marcada com digoxigenina-11-dUTP (Roche) por *nick translation* (Invitrogen).

Por sua vez, a sonda telomérica (TTAGGG) foi amplificada e marcada pela Reação de Cadeia em Polimerase (PCR), usando os primers (TTAGGG)<sub>5</sub> e (CCCTAA)<sub>5</sub> para amplificação (IJDO et al., 1991) e digoxigenina 11-dUTP para marcação.

#### 4.4.5.2. Pré-tratamento das lâminas e Hibridização *in situ*

As lâminas contendo o material citológico foram envelhecidas por cinco dias a TA, sendo submetidas à desidratação em série alcoólica (etanol 70%, 85% e 100% gelados) por 5 minutos cada. Em seguida, foram colocadas para secar por 30 minutos a 55 °C em termobloco e deixadas por 10 minutos à TA. Posteriormente, as lâminas foram submetidas ao tratamento com RNase 100 µg/mL por 1 h em câmara úmida a 37 °C, realizando em seguida três lavagens de 5 minutos cada em 2X SSC. Após este procedimento, as preparações cromossômicas foram incubadas em solução de pepsina 10 µg/mL por 20 minutos em câmara úmida a 37 °C, lavadas em 2X SSC durante 5 minutos (três lavagens), imersas por 10 minutos em solução de paraformaldeído 4% e lavadas, novamente, três vezes em 2X SSC durante 5 minutos cada. Em seguida, o material foi novamente desidratado em série etílica (70%, 85% e 100% gelados) por 5 minutos e as lâminas foram colocadas para secar a 37 °C em B.O.D.

A hibridização *in situ* seguiu o protocolo descrito por Pinkel et al. (1988) com algumas modificações sugeridas por Cabral-de-Mello, Moura e Martins (2010). Foram utilizados para a mistura de hibridização cerca de 100 ng de sonda, formamida (50%), sulfato de dextrano (10%) e 20X SSC totalizando um volume final de 15 µL, o qual foi desnaturado da mistura a 95 °C por 5 minutos. Simultaneamente, as lâminas foram submetidas à formamida 70% (em 2XSSC) a 72 °C por 5 minutos com o intuito de desnaturá-la. Posteriormente à desnaturação do mix de hibridização e das lâminas, a mistura foi adicionada a preparação cromossômica, a qual foi coberta com uma lamínula e incubada em câmara úmida a 37 °C por ao menos 18 h.

#### 4.4.5.3. Lavagens pós-hibridização e detecção do sinal

Passado às 18h, as lâminas foram submetidas a uma lavagem em solução 2XSSC a 72 °C durante 5 minutos. Posteriormente, estas foram lavadas em uma solução de 1X PBD à TA, para a retirada de marcações inespecíficas, e mantidas

nesta solução para proceder à detecção dos fluorocromos. As sondas foram detectadas com Anti-digoxigenina-Rodamina (Roche) durante 45 minutos em câmara úmida a 37 °C. Em seguida, as lâminas foram lavadas três vezes em 1X PBD a 45 °C por 5 minutos cada, e mantidas desta solução até sua montagem. Os cromossomos foram contra-coradas com 20 µL de solução contendo DAPI (2 µg/mL) e vectashield antifade (Vector), na proporção de 1:1. Por fim, as lâminas foram lutadas com esmalte, deixadas secar e guardadas em um lugar escuro e na geladeira.

#### 4.9. ANÁLISES DOS DADOS

Para o estabelecimento do número diploide e classificação morfológica dos cromossomos, o número mínimo de 10 metáfases foi analisado em cada exemplar e, ao menos, três cariótipos foram medidos e montados por intermédio dos programas MicroMeasure v.3.3 e Adobe Photoshop CS4, respectivamente. Com relação à morfologia, a classificação cromossômica seguiu a descrita por Levan; Fredga e Sandberg (1964), com modificações sugeridas por Guerra (1988). Por sua vez, o número fundamental (NF) de autossomos foi calculado pela soma dos braços curtos e longos de cromossomos com dois braços (metacêntricos e submetacêntricos) e longos com um braço (acrocêntricos).

O microscópio de epifluorescência Leica DM2500 foi utilizado para análises das lâminas submetidas a técnica de FISH (campo escuro). As imagens das melhores células de coloração convencional, bandeamento cromossômico (campo claro) e FISH foram capturadas mediante o uso da câmera Leica DFC345 FX e software Leica LASX, sendo otimizadas para melhor brilho e contraste com o Adobe Photoshop CS4 (Adobe Systems Incorporated).

## 5. RESULTADOS

As espécies estudadas *P. tajacu* e *T. pecari* apresentaram números cromossômico e fundamental de  $2n = 30$ , XX ou XY; NF = 46 e  $2n = 26$ , XX ou XY; NF = 46, respectivamente (FIGURA 3).

A partir da classificação morfológica foi possível identificar no cariótipo do cateto seis pares metacêntricos (pares 1, 3, 4, 5, 6 e 7), três pares submetacêntricos (2, 10 e 11), cinco pares acrocêntricos (8, 9, 12, 13 e 14) e o par sexual composto por X e Y acrocêntricos (TABELA 1; FIGURA 3a). Para o queixada, o complemento autossômico foi constituído por seis pares metacêntricos (pares 4, 5, 6, 7, 8 e 10), cinco pares submetacêntricos (1, 2, 3, 9 e 11) e um par acrocêntrico (12). Em se tratando dos cromossomos sexuais, as fêmeas (XX) apresentaram heteromorfismo, notando-se a presença de um homólogo acrocêntrico e o outro submetacêntrico, em todos os indivíduos analisados neste trabalho (FIGURA 3b). Por sua vez, nos machos (XY) foi observado cromossomo X acrocêntrico ou submetacêntrico, enquanto o Y exibiu morfologia acrocêntrica (FIGURA 3c).

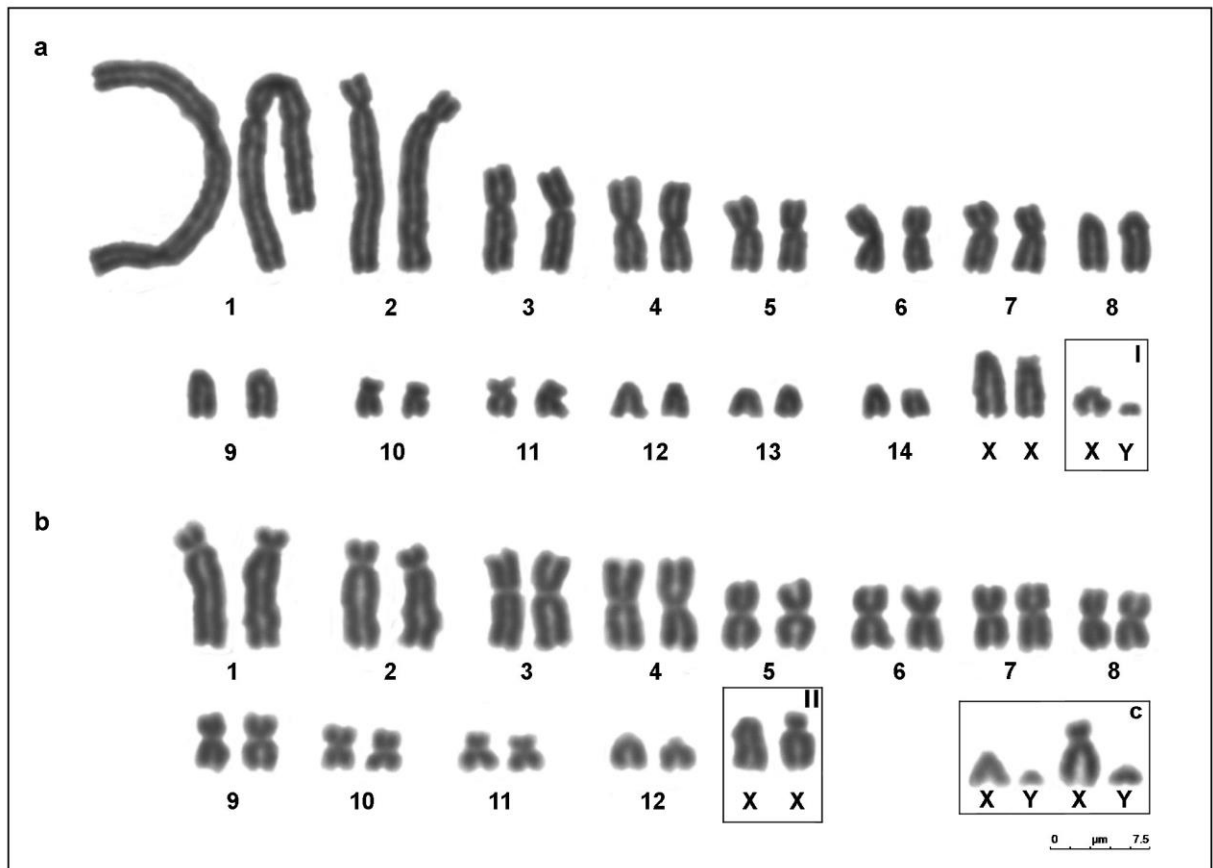
O caso de heteromorfismo *T. pecari* também foi comprovado pelas técnicas de bandeamento C e G (FIGURAS 4 e 5). Em relação ao bandeamento C, a presença de bandas C<sup>+</sup> (bandas C positivas) foi visualizada na região do centrômero nos autossomos e no cromossomo X de cateto (FIGURA 4a) e queixada (FIGURA 4b), evidenciando um padrão de distribuição centromérico para a HC, além de demonstrar a diferença morfológica entre os cromossomos X homólogos na última espécie (FIGURA 4b). Associadamente, em alguns cromossomos de *P. tajacu* e *T. pecari*, foi visualizada a presença de tênues blocos intersticiais e terminais, os quais não se mostraram visíveis em todas as células analisadas. Por fim, em ambos os táxons, o cromossomo Y mostrou-se heterocromático (FIGURA 4b).

A análise do bandeamento G, além de propiciar a identificação dos cromossomos homólogos no cariótipo das espécies avaliadas mediante o padrão de bandas G<sup>+</sup> (bandas G positivas) e G<sup>-</sup> (bandas G negativas) (FIGURA 5), mostrou a presença do heteromorfismo no par sexual de *T. pecari*, conforme notado pela diferença no número e na distribuição das bandas G entre os cromossomos X acrocêntrico e submetacêntrico (FIGURA 5b), sugerindo a ocorrência de rearranjos intra e/ou intercromossômicos. Adicionalmente, esta técnica indica o aparecimento

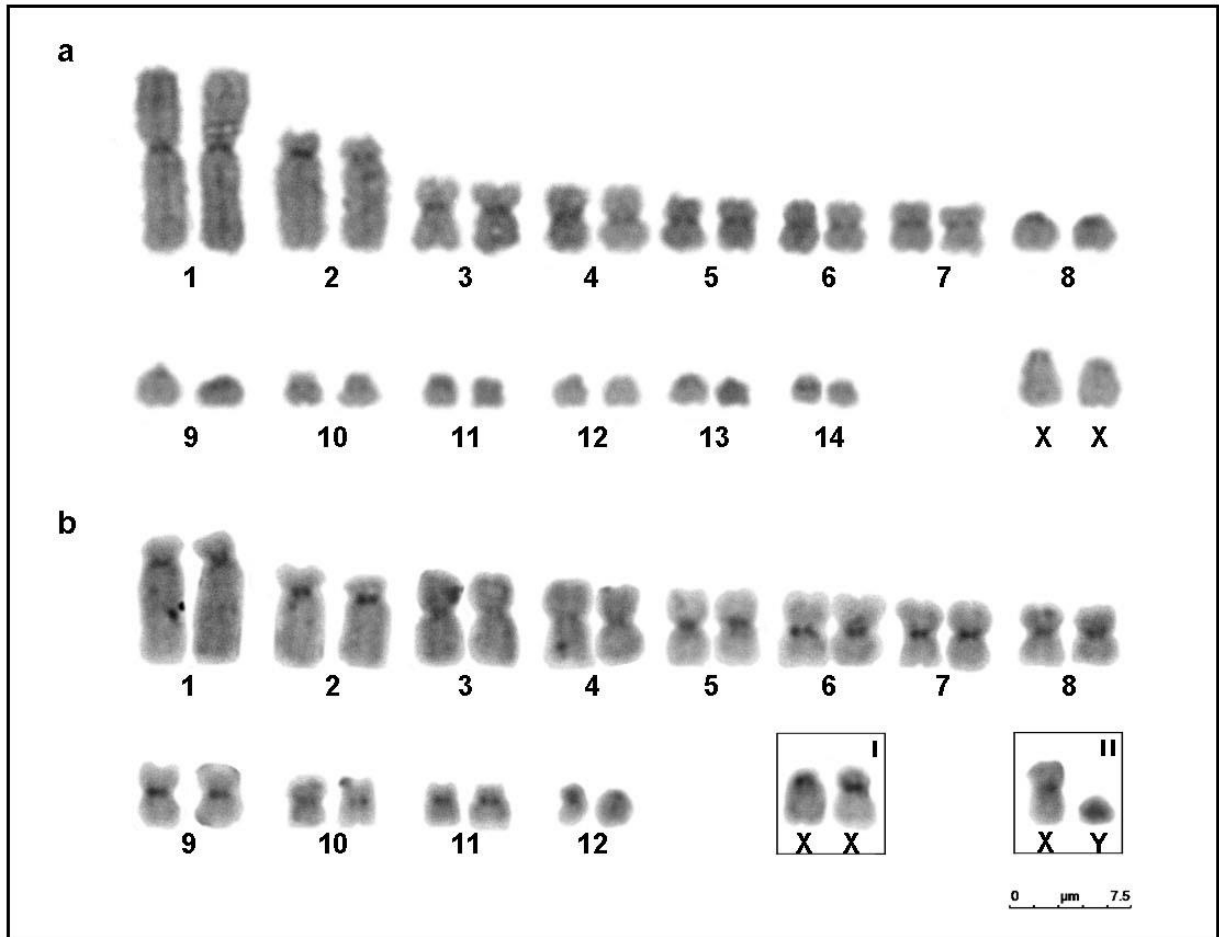
de sequências homeólogas na maior parte dos braços longos dos cromossomos X de *P. tajacu* e *T. pecari* (FIGURA 5).

A impregnação com  $\text{AgNO}_3$  indicou RONS ativas em seis e dois pares de autossomos de *P. tajacu* (FIGURA 6a) e *T. pecari* (FIGURA 6b), respectivamente, dados confirmados pela FISH com DNAr 35S. Em *P. tajacu*, sítios de DNAr foram notados na região proximal do braço curto do par submetacêntrico 2, na região centromérica do par metacêntrico 6 e nos braços curtos dos pares acrocêntricos 8, 9, 12 e 13 (FIGURA 6c). Por sua vez, em *T. pecari*, quatro marcações foram visualizadas na região intersticial do braço longo do par metacêntrico 4 e no braço curto do par metacêntrico 8, adjacente ao centrômero (FIGURA 6d). Por fim, a FISH com sonda telomérica revelou sequências teloméricas intersticiais (ITS) no braço curto do cromossomo X submetacêntrico adjacentes à região centromérica nessa espécie (FIGURA 7).

**Figura 3** - Composição cromossômica de *Pecari tajacu* ( $2n = 30$ , XX; NF = 46) e *Tayassu pecari* ( $2n = 26$ , XX; NF= 46) do nordeste do Brasil. (a) Coloração convencional de *P. tajacu*; (b) Coloração convencional de *T. pecari*; (c) Cromossomos sexuais de indivíduos machos de *T. pecari*, evidenciando variantes cromossômicas do X com morfologias acrocêntrica e submetacêntrica, respectivamente, e Y acrocêntrico. Inseto I representa cromossomos sexuais de *P. tajacu* (X e Y acrocêntricos) e inseto II demonstra heteromorfismo cromossômico do par sexual X em relação às morfologias acrocêntrica e submetacêntrica. Escala (em b) = 7,5  $\mu\text{m}$ .

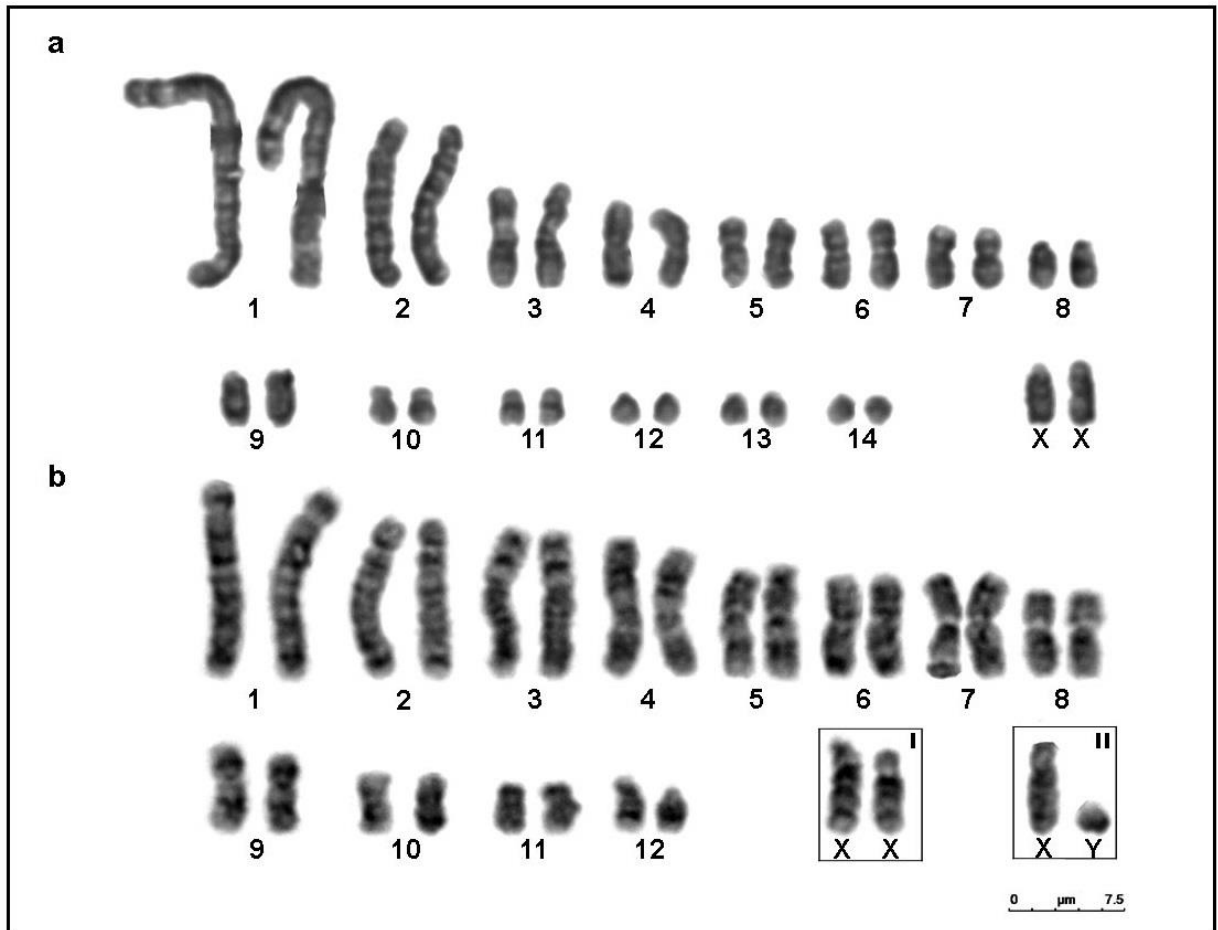


**Figura 4** - Padrão de bandeamento C, com predominância de bandas C<sup>+</sup> nas regiões centroméricas dos autossomos e do cromossomo X. (a) *Pecari tajacu*; (b) *Tayassu pecari*. Inseto I evidenciando a marcação no centrômero do X acrocêntrico e do submetacêntrico, respectivamente, o que comprova par heteromórfico em queixada; e inseto II exibindo cromossomos sexuais de macho de *T. pecari*, com Y heterocromático. Escala (em b) = 7,5 µm.

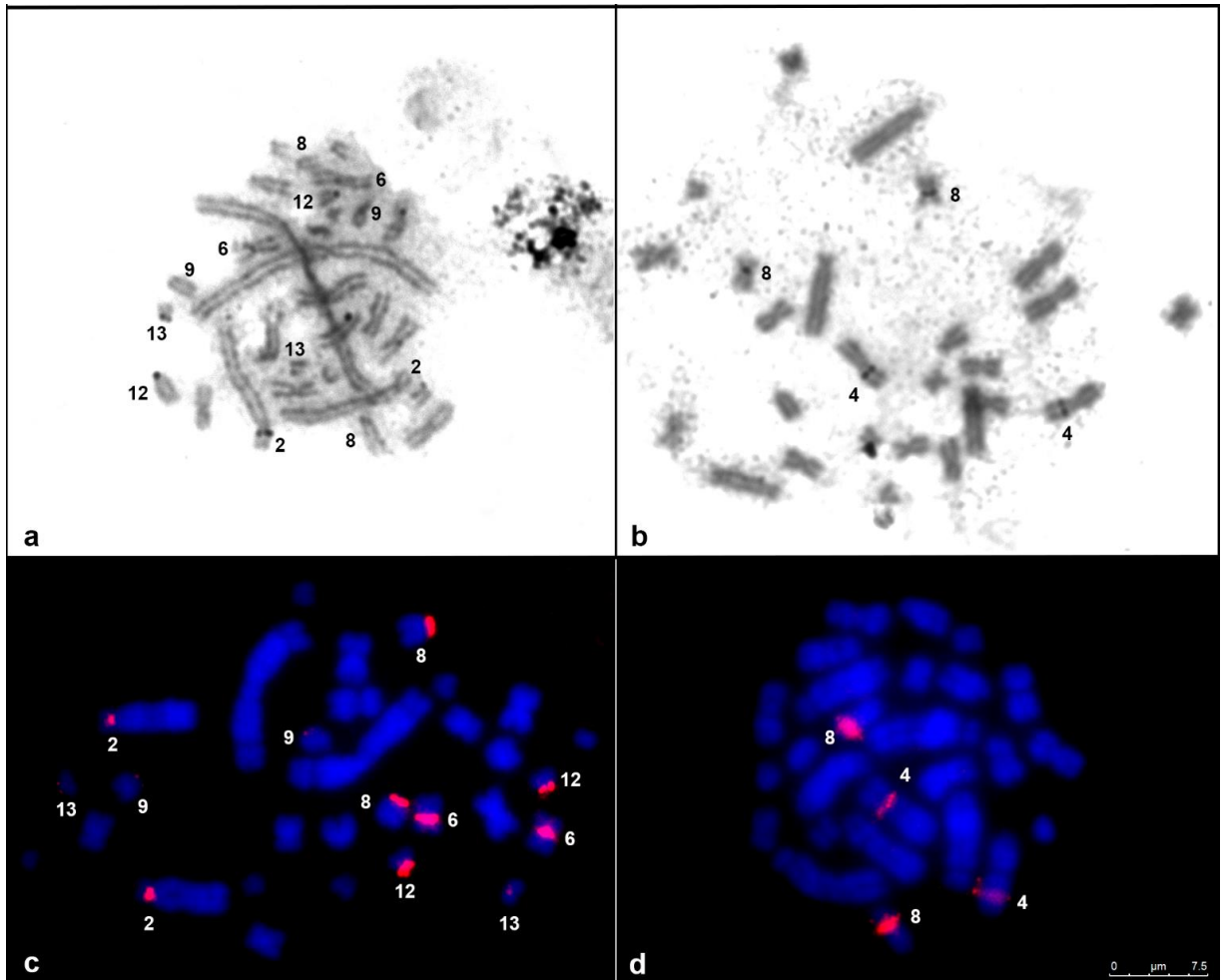




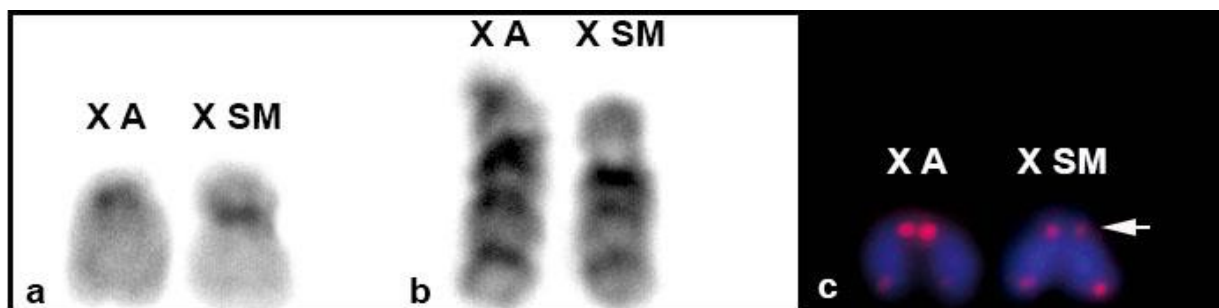
**Figura 5** - Padrão de bandeamento G. (a) *Pecari tajacu*; (b) *Tayassu pecari*. Inseto I mostra caso de heteromosfismo no par sexual em exemplar fêmea de queixada (X acrocêntrico e submetacêntrico, respectivamente) e inseto II apresenta cromossomos sexuais de indivíduo macho da espécie (X submetacêntrico e Y acrocêntrico). Escala (em b) = 7,5  $\mu$ m.



**Figura 6** - Coloração com  $\text{AgNO}_3$  (a – b) e hibridização *in situ* fluorescente com DNAr 35S (c – d) em *Pecari tajacu* (esquerda) e *Tayassu pecari* (direita), evidenciando a presença de seis pares cromossômicos portadores de sítios de DNAr 35S em *P. tajacu* (pares 2, 6, 8, 9, 12 e 13) (c), nem sempre revelados pela impregnação argêntica (a), bem como de dois pares cromossômicos (pares 4 e 8) em *T. pecari* (b e d). Escala (em d) = 7,5  $\mu\text{m}$ .



**Figura 7** - Heteromorfismo no cromossomo X de *Tayassu pecari* visualizado pelas técnicas de bandeamento C (a), bandeamento G (b) e FISH com sonda de DNA telomérico (c). Seta em c indica a presença de ITS (Sequências Teloméricas Intersticiais) na região adjacente ao centrômero do cromossomo X submetacêntrico.



Legenda: X A (cromossomo X homólogo acrocêntrico); X SM (cromossomo X homólogo submetacêntrico).

## 6. DISCUSSÃO

No presente estudo, o número cromossômico diploide encontrado para *P. tajacu* ( $2n = 30$ ) e *T. pecari* ( $2n = 26$ ) está de acordo com o reportado na literatura (ADEGA; CHAVES; GUEDES-PINTO, 2007; BOSMA et al., 2004; GIANNONI, 1972). Entretanto, para o cateto, diferenças cariotípicas foram observadas em comparação a outras populações provenientes do continente Americano. Em relação aos estudos desenvolvidos na América do Sul foram notadas divergências quanto ao número de cromossomos metacêntricos, submetacêntricos, acrocêntricos e telocêntricos (TABELA 1), as quais provavelmente podem estar relacionadas aos diferentes critérios adotados para a classificação cromossômica, a exemplo da escassez de medição dos cromossomos (ANDREA et al., 2001; BOSMA et al., 2004; CARVALHO et al., 2008; PUERTAS et al., 2004).

Adicionalmente, comparando-se os trabalhos citogenéticos desenvolvidos na América do Norte (ADEGA; CHAVES; GUEDES-PINTO, 2007; ADEGA et al., 2006) e América do Sul (ANDREA et al., 2001; BOSMA et al., 2004; CARVALHO et al., 2008; PUERTAS et al., 2004), incluindo o presente estudo, é notável o acúmulo de rearranjos cromossômicos nos autossomos e cromossomo X (submetacêntrico na população norte-americana e, predominantemente, acrocêntrico em representantes da América do Sul) de cateto, distinguindo essas duas populações. Diferenças na estrutura cariotípica têm sido apontadas como possíveis barreiras para eventos de hibridização, o que pode promover o isolamento populacional e, conseqüentemente,

acarretar implicações taxonômicas em grupos de organismos, como é o caso do que pode estar acontecendo em ambas populações de *P. tajacu*.

**Tabela 1** - Comparação morfológica dos cromossomos autossômicos e sexuais de *Pecari tajacu* em relação a outros trabalhos da literatura.

Cromossomo	Presente Estudo	Andrea et al. (2001)	Bosma et al. (2004)	Puertas et al. (2004)	Souza et al. (2008)
1	M	SM	SM	SM	M
2	SM	A/T	SM	A	SM
3	M	SM	SM	SM	SM
4	M	M	M	M	M
5	M	SM	SM	M	SM
6	M	SM	SM	SM	SM
7	M	SM	SM	SM	SM
8	A	SM	SM	ST	A/T
9	A	A	SM	A	A/T
10	SM	SM	SM	A	A/T
11	SM	A	A/T	ST	A/T
12	A	SM	A/T	ST	A/T
13	A	A	A/T	ST	A/T
14	A	A	A/T	ST	A/T
X	A	SM/A	A/T	SM	A/T
Y	A	A	M/SM	A	A/T

Legenda: M = Metacêntrico; SM = Submetacêntrico; A = Acrocêntrico; T = Telocêntrico.

O padrão de distribuição centromérico da HC observado em *P. tajacu* e *T. pecari* mostrou-se similar ao descrito por Adegá; Chaves e Guedes-Pinto (2007), os quais observaram a presença de bandas C<sup>+</sup>, principalmente, na região centromérica do complemento cromossômico dessas espécies, mediante o bandeamento C clássico. Este procedimento também revelou bandas terminais e intersticiais nos cariótipos de ambos os táxons, as quais podem ser equivalentes às bandas tênues visualizadas neste trabalho. Além de verificar a localização da HC, por intermédio da digestão por endonucleases de restrição *in situ* com o bandeamento C sequencial, tais autores investigaram a caracterização da heterogeneidade deste marcador, sugerindo que o cariótipo autossômico de cateto é uma condição ancestral em relação ao de queixada, devido ao acúmulo de maior diversidade na heterocromatina constitutiva. Por outro lado, o cromossomo X ancestral de Tayassuidae seria o de *T. pecari*, novamente, levando em consideração o proposto pela evolução em concerto (homogeneização das sequências de DNA repetitivo) (ADEGA; CHAVES; GUEDES-PINTO, 2007; ELDER; TURNER, 1995).

Considerando a localização preferencial de pontos de quebras nas sequências repetitivas e a suposição de que a presença da HC tem sido associada à maior facilidade de ocorrência dos rearranjos cromossômicos (CHAVES; SANTOS; GUEDES-PINTO, 2004), os quais tem acontecido durante a evolução de *P. tajacu* e *T. pecari*, a divergência cariotípica observada entre essas espécies, além de estar relacionada à variação encontrada na HC (ADEGA; CHAVES; GUEDES-PINTO, 2007), também tem sido reportada por estudos de pintura cromossômica comparativa (ADEGA et al., 2006; BOSMA et al., 2004).

A técnica de bandeamento G permitiu verificar a diferença cariotípica existente entre o cateto e o queixada, não sendo possível reconhecer homeologias cromossômicas entre os autossomos somente pelo padrão de bandas G obtido. Por outro lado, como o X encontra-se relativamente conservado entre os mamíferos, possíveis sequências homeólogas puderam ser identificadas na maior parte dos braços longos desse cromossomo, comparando-se ambos os táxons.

Apesar disso, o caso de heteromorfismo revelado pela primeira vez nesse trabalho, envolvendo o cromossomo X de *T. pecari* em relação às morfologias acrocêntrica e submetacêntrica, parece corresponder ao que tem sido reportado na literatura, em que exceção à condição conservada do X ocorre em táxons de Cetartiodactyla, o qual varia tanto em morfologia como no padrão de bandeamento

G. A hipótese sugerida é que esse cromossomo tem sofrido vários rearranjos, os quais têm mudado a posição do centrômero e a ordem dos segmentos sintênicos, durante os milhões de anos de especiação dos Cetartiodactyla (PROSKURYAKOVA et al., 2017). Ainda, em relação à filogenia da ordem, os grupos irmãos (como Suidae) compartilham o tipo ancestral de cromossomo X (morfologia metacêntrica), entretanto, parece não ser o caso de *T. pecari* (Suinae, Tayassuidae), como evidenciado pelo heteromorfismo no X aqui descrito, sendo comprovado pelas várias técnicas de citogenética aplicadas neste trabalho. Adicionalmente, Proskuryakova et al. (2017) indicam que os rearranjos chave envolvidos na evolução do cromossomo X em Cetartiodactyla foram as inversões (paracêntrica e pericêntrica) e o reposicionamento centromérico.

De acordo com Adegas et al. (2006) a população norte-americana de *P. tajacu* apresenta cromossomo X mais similar a um típico X de mamífero, com morfologia submetacêntrica, do que o exibido pela população da América do Sul (X acrocêntrico). Em relação à maior diversidade de HC, o cromossomo X ancestral de Tayassuidae seria o de *T. pecari*, que no estudo de Adegas; Chaves e Guedes-Pinto (2007) mostrou-se acrocêntrico. Por sua vez, relações filogenéticas incluindo as três espécies de taiassuídeos existentes (*P. tajacu*, *T. pecari* e *C. wagneri*), utilizando marcadores nucleares e mitocondriais (GONGORA; MORAN, 2005), bem como análises filogeográficas em *P. tajacu* usando sequências nucleares e mitocondriais (GONGORA et al., 2006), além de estudos sobre a caracterização da heterogeneidade de HC (ADEGAS; CHAVES; GUEDES-PINTO, 2007) e trabalhos com pintura cromossômica (ADEGAS et al., 2006; BOSMA et al., 2004), mostram grande dissimilaridade entre as espécies e também as populações de cateto, indicando que *P. tajacu* divergiu do ancestral comum de *T. pecari* e *C. wagneri* entre o final do Mioceno e o final do Plioceno, ainda na América do Norte, antes da emergência e conclusão do Istmo do Panamá (final do Plioceno), bem como da colonização da América do Sul pelos taiassuídeos. Dessa forma, tem sido proposto dois clados na filogenia de Tayassuidae, *P. tajacu* e *T. pecari* / *C. wagneri*, onde as duas últimas espécies são mais proximamente relacionadas entre si do que com o cateto (GONGORA; MORAN, 2005).

Considerando os dados evolutivos abordados anteriormente, tanto cromossômicos quanto moleculares, incluindo as informações cariotípicas deste estudo, é possível sugerir que o cromossomo X de *T. pecari* pode ter evoluído da

forma submetacêntrica (população da América do Norte de *P. tajacu*) para uma condição acrocêntrica (populações sul-americanas de *P. tajacu* e *T. pecari* mais diversificadas), podendo estar retomando a morfologia submetacêntrica, como evidenciado pelas variantes cromossômicas do X com morfologias acrocêntricas e submetacêntricas, bem como as ITS constatadas nos braços curtos dos cromossomos X submetacêntricos, observadas nos exemplares de queixada examinados. No entanto, as técnicas citogenéticas realizadas neste trabalho não permitiram indicar qual o tipo de rearranjo sofrido por este cromossomo, se inversões ou reposicionamento de centrômero, mostrando-se limitadas para este fim, havendo a necessidade de usar técnicas de citogenética molecular mais refinadas, como a pintura cromossômica comparativa.

Quanto ao maior número de sítios Ag-ROn / DNAr 35S notado em *P. tajacu* e descrito pela primeira vez nesse estudo, pode-se estar relacionado ao fato do complemento autossômico dessa espécie apresentar acúmulo de maior diversidade na HC comparado ao de *T. pecari* (ADEGA; CHAVES; GUEDES-PINTO, 2007), uma vez que tem sido proposto a associação da ocorrência deste marcador à maior facilidade de acontecimentos de rearranjos cromossômicos (CHAVES; SANTOS; GUEDES-PINTO, 2004). Isso somado à situação que as RONs / sítios de DNAr podem estar colocalizados com as regiões de heterocromatina constitutiva (GUERRA, 2000), possibilitaria a expansão daquelas sequências repetitivas no genoma do cateto. Adicionalmente, as marcações reveladas pelas técnicas de impregnação por AgNO<sub>3</sub> e FISH com sonda de DNAr 35S em queixada foram coincidentes às reportadas na literatura para a espécie (ZIJLSTRA et al., 1997).

Por fim, a distinção cariotípica reportada no presente trabalho e na literatura entre *P. tajacu* e *T. pecari*, assim como, entre as populações de cateto, que parecem ser geneticamente estruturadas, permitem inferir que a radiação adaptativa das duas espécies foi extremamente rápida. Assim, pesquisas adicionais combinando abordagens citogenéticas, moleculares e de morfometria geométrica poderão esclarecer a taxonomia de Tayassuidae, auxiliando estratégias de manejo e ações conservacionistas, além de contribuir para um melhor entendimento da história evolutiva do grupo.

## 7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

- As análises convencionais mostraram número diploide para *P. tajacu* e *T. pecari* condizente com o descrito na literatura; no entanto, diferenças cariotípicas foram detectadas entre os espécimes de cateto estudados e outras populações, tanto da América do Sul (divergências quanto à classificação morfológica dos cromossomos), quanto do Norte (distinções cromossômicas estruturais). Para o queixada, um caso de heteromorfismo envolvendo o cromossomo X foi evidenciado pelas diferentes técnicas citogenéticas realizadas, sendo descrito pela primeira vez nesse estudo.
- O padrão de distribuição principalmente centromérico da heterocromatina constitutiva observado no cariótipo das espécies examinadas, assim como as bandas tênues visualizadas nas regiões intersticiais e terminais de alguns cromossomos foram similares ao reportado para outras populações, indicando diferentes classes desse marcador nos cromossomos de *P. tajacu* e *T. pecari*.
- Não foi possível identificar homeologias comparando-se os complementos autossômicos de cateto e queixada somente pelo padrão de bandas G, devido à divergência cariotípica existente entre as duas espécies, relatada em vários outros estudos; contudo, exceção ocorreu para o braço longo do cromossomo X, que apesar de ser relativamente conservado entre os mamíferos, encontra-se evoluindo por rearranjos intra e/ou intercromossômicos em *T. pecari* (variantes com morfologias acrocêntricas e submetacêntricas).
- O número e localização dos sítios Ag-RON / DNAr 35S para *P. tajacu* são descritos pela primeira vez nesse trabalho, revelando uma maior quantidade de marcações comparada às encontradas em *T. pecari* (coincidentes com a literatura), podendo ser devido ao acúmulo de maior diversidade na HC daquela espécie, o que pode facilitar a ocorrência de rearranjos cromossômicos, possibilitando a expansão dos sítios de DNAr no cateto.



- Os marcadores cromossômicos utilizados nesse trabalho indicaram a divergência cariotípica existente entre *P. tajacu* e *T. pecari*, inferindo que rearranjos cromossômicos estão ocorrendo, proporcionando a diferenciação interespecífica, o que pode acarretar implicações taxonômicas em Tayassuidae.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS <sup>1</sup>

ADEGA, F.; CHAVES, R.; GUEDES-PINTO, H. Chromosomal evolution and phylogenetic analyses in *Tayassu pecari* and *Pecari tajacu* (Tayassuidae): tales from constitutive heterochromatin. **Journal of genetics**, v. 86, n. 1, p. 19-26, 2007.

ADEGA, F.; CHAVES, R.; KOFLER, A.; KRAUSMAN, P. R.; MASABANDA, J.; WIENBERG, J.; GUEDES-PINTO, H. High-resolution comparative chromosome painting in the Arizona collared peccary (*Pecari tajacu*, Tayassuidae): a comparison with the karyotype of pig and sheep. **Chromosome Research**, v. 14, n. 3, p. 243-251, 2006.

ALBUQUERQUE, N. I.; DIAS, H.; GUIMARÃES, D. D. A.; PENDU, Y. L.; GARCIA, A.; KAHWAGE, P.; SELIGMANN, I. Criação de caititus em cativeiro: sistema intensivo de produção na Amazônia Oriental. **Embrapa Amazônia Oriental-Livros técnicos (INFOTECA-E)**, 2016.

ALBUQUERQUE, N. I.; GUIMARÃES, D. A.; LE PENDU, Y.; SILVA, J. V.; DIAS, H. L. Sistema de Produção de caititus (*Tayassu tajacu*) em Cativeiro para a Pequena Agricultura na Amazônia. **Iquitos- Peru**, 2004.

ANDRADE, L. A.; PEREIRA, I. M.; LEITE, U. T.; BARBOSA, M. R. V. Analyses of the stract of two caatinga physionomy in sao joão do cariri, paraiba state. **Cerne**, v. 11, n. 3, p. 253-262, 2015.

ANDREA, M. V.; OLIVEIRA, C.; ROCHA, G. T.; FORESTI, F. Cytogenetical and histological studies in testis of *Tayassu tajacu* (Cateto), *Tayassu pecari* (Queixada) and a natural interspecific hybrid. **Journal of Animal Breeding and Genetics**, v. 118, n. 2, p. 125-134, 2001.

BARROS, H. M. D. R.; SOTERO-CAIO, C. G. D.; SANTOS, N.; SOUZA, M. J. D. Comparative cytogenetic analysis between *Lonchorhina aurita* and *Trachops cirrhosus* (Chiroptera, Phyllostomidae). **Genetics and molecular biology**, v. 32, n. 4, p. 748-752, 2009.

---

<sup>1</sup> De acordo com Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR 6023.

BECK, H. A review of peccary-palm interactions and their ecological ramifications across the Neotropics. **Journal of Mammalogy**, v. 87, n. 3, p. 519-530, 2006.

BENIRSCHKE, K.; KUMAMOTO, A. T. Further studies on the chromosomes of three species of peccary. **Adv. Neotr. Mammal**, v. 1, p. 309-316, 1989.

BERNIRSCHKE, K.; KUMAMOTO, A. T.; MERITT, D. A. Chromosomes of the Chacoan Peccary, *Catagonus wagneri* (Rusconi). **The Journal of Heredity**, v. 76, p.95-98, 1985.

BOSMA, A. A.; DE HAAN, N. A.; ARKESTEIJN, G. J. A.; YANG, F.; YERLE, M.; ZIJLSTRA, C. Comparative chromosome painting between the domestic pig (*Sus scrofa*) and two species of peccary, the collared peccary (*Tayassu tajacu*) and the white-lipped peccary (*T. pecari*): a phylogenetic perspective. **Cytogenetic and genome research**, v.105, n. 1, p. 115-121, 2004.

BRUSCHI, D. P.; RIVERA, M.; LIMA, A. P.; ZÚÑIGA, A. B.; RECCO-PIMENTEL, S. M. Interstitial Telomeric Sequences (ITS) and major rDNA mapping reveal insights into the karyotypical evolution of Neotropical leaf frogs species (Phyllomedusa, Hylidae, Anura). **Molecular cytogenetics**, v. 7, n. 1, p. 22, 2014.

CABRAL-DE-MELLO, D. C.; MOURA, R. C.; MARTINS, C. Chromosomal mapping of repetitive DNAs in the beetle *Dichotomius geminatus* provides the first evidence for an association of 5S rRNA and histone H3 genes in insects, and repetitive DNA similarity between the B chromosome and A complement. **Heredity (Edinburgh. Print)**, v. 104, p. 393-400, 2010.

CARVALHO, P.; SOUZA, A. S. K.; SELIGMANN, I. C.; RODRÍGUEZ, R. M. Brief Note Chromosome comparison between populations of the collared peccary, *Tayassu tajacu*, raised in captivity. **Biocell**, v. 32, n. 2, p. 207-210, 2008.

CHAVES, R.; SANTOS, S.; GUEDES-PINTO, H. Comparative analysis (Hippotragini versus Caprini, Bovidae) of X-chromosome's constitutive heterochromatin by in situ restriction endonuclease digestion: X-chromosome constitutive heterochromatin evolution. **Genetica**, v. 121, n. 3, p. 315-325, 2004.

COSTA, D. S.; PAULA, T. A. R. D. Coleta e avaliação do sêmen de catetos (*Tayassu tajacu*). **Biota Neotropica**, v. 5, n. 2, p. 131-136, 2005.

DESBIEZ, A. L. J.; KEUROGHLIAN, A.; DE MELLO BEISIEGEL, B.; MEDICI, E. P.; GATTI, A.; PONTES, A. R. M.; DE PINHO, G. M. Avaliação do risco de extinção do cateto Pecari tajacu (Linnaeus, 1758), no Brasil. **Biodiversidade Brasileira**, n. 1, p. 74-83, 2012.

DEUTSCH, L. A.; PUGLIA, L.R. **Os Animais Silvestres- Proteção, Doenças e Manejo**. Globo, 2nd edition, p. 1990.

DRETS, M. E. Una saga citogenética: El descubrimiento de los métodos de bandeado cromosómico. Significado y proyección bio-médica. **Revista Médica del Uruguay**, v. 18, n. 2, p. 107-121, 2002.

- DUCROCQ, S. An Eocene peccary from Thailand and the biogeographical origins of the Artiodactyl family Tayassuidae. **Palaeontology**, v. 37, n. 4, p. 765-780, 1994.
- ELDER JR, J. F.; TURNER, B. J. Concerted evolution of repetitive DNA sequences in eukaryotes. **The Quarterly Review of Biology**, v. 70, n. 3, p. 297-320, 1995.
- ELGIN, S. C. R.; GREWAL, S. I. S. Heterochromatin: silence in golden. **Current Biology**, v. 13, p. 895-898, 2003.
- FRAGOSO, J. M. V. **Large mammals and the community dynamics of an Amazonian rain forest**. 1994.
- FRANTZ, L.; MEIJAARD, E.; GONGORA, J.; HAILE, J.; GROENEN, M. A.; LARSON, G. The evolution of Suidae. **Annual review of animal biosciences**, v. 4, p. 61-85, 2016.
- GIANNONI, M. A. Os Cariótipos das Espécies *Tayassu tajacu* e *Tayassu albirostris*. **São Paulo**, 1972.
- GIANNONI, M. A.; FERRARI, I.; GIANNONI, M. L. Chromosome polymorphism among Brazilian populations of *Tayassu albirostris* (peccary). **Revista Brasil Genética**, v. 4, p.117–134, 1981.
- GONGORA, J.; CUDDAHEE, R. E.; NASCIMENTO, F. F. D.; PALGRAVE, C. J.; LOWDEN, S.; HO, S. Y.; RANDI, E. Rethinking the evolution of extant sub-Saharan African suids (Suidae, Artiodactyla). **Zoologica Scripta**, v. 40, n. 4, p. 327-335, 2011.
- GONGORA, J.; MORALES, S.; BERNAL, J. E.; MORAN, C. Phylogenetic divisions among Collared peccaries (*Pecari tajacu*) detected using mitochondrial and nuclear sequences. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 41, n.1, p.1-11, 2006.
- GONGORA, J.; MORAN, C. Nuclear and mitochondrial evolutionary analyses of Collared, White-lipped, and Chacoan peccaries (Tayassuidae). **Molecular phylogenetics and evolution**, v.34, n.1,p. 181-189, 2005.
- GOODPASTURE, C.; BLOOM, S. E. Visualization of nucleolar organizer regions in mammalian chromosomes using silver staining. **chromosoma**, v. 53, n. 1, p. 37-50, 1975.
- GROSS, M. C.; SCHNEIDER, C. H.; VALENTE, G. T.; MARTINS, C.; FELDBERG, E. Variability of 18S rDNA locus among Symphysodon fishes: chromosomal rearrangements. **Journal of Fish Biology**, v. 76, n. 5, p. 1117-1127, 2010.
- GUERRA, M. Hibridização in situ: princípios básicos. **FISH: Conceitos e Aplicações na Citogenética. Sociedade Brasileira de Genética: Ribeirão Preto**, p. 1-32, 2004.

GUERRA, M. S. **Introdução à citogenética geral**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara, p. 142, 1988.

GUERRA, M. Patterns of heterochromatin distribution in plant chromosomes. **Genetics and molecular biology**, v. 23, n. 4, p. 1029-1041, 2000.

HASSANIN, A.; DELSUC, F.; ROPIQUET, A.; HAMMER, C.; VAN VUUREN, B. J.; MATTHEE, C.; RUIZ-GARCIA, M.; CATZEFLIS, F.; ARESKOUG, V.; NGUYEN, T. T.; COULOUX, A. Pattern and timing of diversification of Cetartiodactyla (Mammalia, Laurasiatheria), as revealed by a comprehensive analysis of mitochondrial genomes. **Comptes rendus biologiques**, v. 335, n. 1, p. 32-50, 2012.

HENIKOFF, S. Heterochromatin function in complex genomes. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer**, v. 1470, n. 1, p. 01-08, 2000.

HOWELL, W. M.; BLACK, D. A. Controlled silver staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. **Experientia**, 1980.

HUFFMAN, B. Your guide to the world's hoofed mammals, 2009. Disponível em: <<http://www.ultimateungulate.com>>. Acesso em 06. Ago. 2016.

IJDO, J. W.; WELLS, R. A.; BALDINI, A.; REEDERS, S. T. Improved telomere detection using a telomere repeat probe (TTAGGG) n generated by PCR. **Nucleic Acids Research**, v. 19, n. 17, p. 4780, 1991.

IPUCHA, M. C.; GIMÉNEZ, M. D.; BIDAU, C. J. Heterogeneity of heterochromatin in six species of *Ctenomys* (Rodentia: Octodontoidea: Ctenomyidae) from Argentina revealed by a combined analysis of C- and RE-banding. **Acta theriologica**, v. 53, n. 1, p. 57-71, 2008.

IUCN. **The IUCN Red List of Threatened Species**. 2017. Disponível em: <<http://www.iucnredlist.org/details/41778/0>>. Acesso em 21. Jun. 2017.

KEUROGHLIAN, A.; DESBIEZ, A. L. J.; DE MELLO BEISIEGEL, B.; MEDICI, E. P.; GATTI, A.; PONTES, A. R. M.; DE PINHO, G. M. Avaliação do risco de extinção do queixada *Tayassu pecari* Link, 1795, no Brasil. **Biodiversidade Brasileira**, n. 1, p. 84-102, 2012.

KEUROGHLIAN, A.; EATON, D. P. Removal of palm fruits and ecosystem engineering in palm stands by white-lipped peccaries (*Tayassu pecari*) and other frugivores in an isolated Atlantic Forest fragment. **Biodiversity and Conservation**, v. 18, n. 7, p. 1733-1750, 2009.

KRALLINGER, H. F. Die Chromosomen des Halsbandpekaris (*Pecari tajacu*). **Cell and Tissue Research**, v. 24, n. 1, 1936.

KUBIS, S.; SCHMIDT, T.; HESLOP-HARRISON, J. S. Repetitive DNA elements as a major component of plant genomes. **Annals of Botany**, v. 82, n. suppl\_1, p. 45-55, 1998.

LEMOS-PINTO, M. M. P.; SILVA-CALIXTO, M.; SOUZA, M. J.; ARAÚJO, A. P. T.; LANGGUTH, A.; SANTOS, N. Cytotaxonomy of the subgenus *Artibeus* (Phyllostomidae, Chiroptera) by characterization of species-specific markers. **Comparative cytogenetics**, v. 6, n. 1, p. 17, 2012.

LEVAN, A.; FREDGA, K.; SANDBERG, A. A. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. **Hereditas**, v.52, p. 201-220, dec. 1964.

LIMA, J. F. D. S.; GUEDES, F. B.; SILVA, R. W.; HASS, I.; CAVALLI, I. J.; SILVA, J. D.; SBALQUEIRO, I. J. Unexpected chromosomal alterations in *Tayassu tajacu* (Artiodactyla: Tayassuidae) in captivity. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 41, n.1, p. 10-13, 2004.

MAYER, J. J.; WETZEL, R. M. *Tayassu pecari*. **Mammalia Species**, v. 293, 1987.

MENDES PONTES, A. R.; CHIVERS, D. J. Peccary movements as determinants of the movements of large cats in Brazilian Amazonia. **Journal of Zoology**, v. 273, n. 3, p. 257-265, 2007.

MEYNE, J.; BAKER, R. J.; HOBART, H. H.; HSU, T. C.; RYDER, O. A.; WARD, O. G.; WILWY, J. E.; WURSTER-HILL, D. H.; YATES, T. L.; MOYZIS, R. K. Distribution of non-telomeric sites of the (TTAGGG) n telomeric sequence in vertebrate chromosomes. **Chromosoma**, v. 99, n. 1, p. 3-10, 1990.

MONTGELARD, C.; CATZEFLIS, F. M.; DOUZERY, E. Phylogenetic relationships of artiodactyls and cetaceans as deduced from the comparison of cytochrome b and 12S rRNA mitochondrial sequences. **Molecular Biology and Evolution**, v. 14, n. 5, p. 550-559, 1997.

MOORHEAD, P. S.; NOWEL, P. C.; MELLMAN, J. W.; BATTISPPS, D. M.; HUMGERFORD, D. A. Chromosome Preparations of Leukocytes Cultured from Human Peripheral Blood, **Experimental Cellular Research**, 1960

MORALES, J. C. G.; GUADARRAMA, V.M.F.; BLASIO, A. L.; GUEVARA-FIORE, P.; ANTOLÍN, J. R.; SÁNCHEZ, E. Q. Regionalización histológica de la glándula dorsal del pecarí de collar (Artiodactyla, Tayassuidae: Pecari tajacu). **CiÊNCIA ergo-sum**, v. 22, n. 3, p. 225-232, 2015.

NOGUEIRA-FILHO, S. L. G.; NOGUEIRA, S. S. C.; SATO, T. A estrutura social de pecaris (Mammalia, Tayassuidae) em cativeiro. **Revista de Etologia**, v. 1, n. 2, p. 89-98, 1999.

NOWAK, R.M. Walker's Mammals of the World. **The John Hopkins University Press**, p. 1629, 1991. p. 1-7, 1991.

OLIVEIRA, M. A. O.; ANDARI, V. C. M. A.; FRANCISCO, L. S. F.; UENO, J. U.; OLIVEIRA, R. M.; MARTINHAGO, C. D. M. Alterações no cariótipo que podem gerar infertilidade ou abortamento de repetição. **Femina**, v. 39, n. 2, 2011.

ORLIAC, M. J.; PIERRE-OLIVIER, A.; DUCROCQ, S. Phylogenetic relationships of the Suidae (Mammalia, Cetartiodactyla): new insights on the relationships within Suoidea. **Zoologica Scripta**, v. 39, n. 4, p. 315-330, 2010.

PEDROSA-HARAND, A.; GUERRA, M. Contribuições da FISH para a citogenética de plantas. **FISH–Conceitos e Aplicações na Citogenética**. Edited by M. Guerra. **Sociedade Brasileira de Genética. Ribeirão Preto**, p. 33-59, 2004.

PEREIRA-JÚNIOR, R.; SOUSA, S.; VALADARES, A.; OLIVEIRA, M.; ALMEIDA, K. Fauna helmintológica de catetos (*Tayassu tajacu*-Linnaeus, 1758) e suas implicações para produção comercial–revisão de literatura. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, 2014.

PINKEL, D.; LANDEGENT, J.; COLLINS, C.; FUSCOE, J.; SEGRAVES, R.; LUCAS, J.; GRAY, J. Fluorescence in situ hybridization with human chromosome-specific libraries: detection of trisomy 21 and translocations of chromosome 4. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 85, n. 23, p. 9138-9142, 1988.

PRICE, S. A.; BININDA-EMONDS, O. R.; GITTLEMAN, J. L. A complete phylogeny of the whales, dolphins and even-toed hoofed mammals (Cetartiodactyla). **Biological reviews**, v.80, n. 03, p. 445-473, 2005.

PROSKURYAKOVA, A. A.; KULEMZINA, A. I.; PERELMAN, P. L.; MAKUNIN, A. I.; LARKIN, D. M.; FARRÉ, M.; ROELKE-PARKER, M. E. X Chromosome Evolution in Cetartiodactyla. **Genes**, v. 8, n. 9, p. 216, 2017.

PUERTAS, D. F.; DÍAZ, I. D.; ORTIZ, J. B. L. Evidencia de estructuración cromosómica asociada con la distribución geográfica de Pecari de Collar (*Tayassu tajacu*) de Centro y Suramérica. In: **VI Congreso Internacional sobre Manejo de fauna Silvestre en la Amazônia y Latinoamérica: Libro de Resúmenes. Iquitos-Peru**. 2004.

REIS, N. R.; PERACCHI, A. L.; PEDRO, W. A.; LIMA, I. P. **Mamíferos do Brasil**. Eds. Londrina-Paraná.v. 1 p.437, 2006.

RUVINSKY, A.; FOTHSCHILD, M. F.; LARSON, G.; GONGORA, J. **The Genetics of the Pig**. (Eds) CAB Internacional, v. 2, 2011.

SANTOS, R. M. L.; PELLEGRINO, K. C. M.; RODRIGUES, M. T.; YONENAGA-YASSUDA, Y. Banding patterns and chromosomal evolution in five species of neotropical Teiinae lizards (Squamata: Teiidae). **Genetica**, v. 131, n. 3, p. 231-240, 2007.

SCHWARZACHER, T.; HESLOP-HARRISON, P. **Practical in situ hybridization**. BIOS Scientific Publishers Ltd, 2000.

SEABRIGHT, M. A rapid banding technique for human chromosomes. **Lancet**, v. 2, p. 971-972, 1971.

SICURO, F. L.; OLIVEIRA, L. F. B. Coexistence of peccaries and feral hogs in the Brazilian Pantanal wetland: an ecomorphological view. **Journal of Mammalogy**, v.83, n. 1, p. 207-217, 2002.

SILVA, R. W; FREITAS, T. R. O; SBALQUEIRO, I. J. Evaluation of genetic variability in the collared peccary *Pecari tajacu* and the white-lipped peccary *Tayassu pecari* by microsatellite markers. **Genetics and molecular biology**, v. 33, n. 1, p. 62-67, 2010.

SOARES-SCOTT, M. D.; MELETTI, L. M.; BERNACCI, L. C.; PASSOS, I. R. S.; FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F. Citogenética clássica e molecular em passifloras. **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**, p. 210-240, 2005.

SONNER, J. B.; MIGLINO, M. A.; SANTOS, T. C. D.; CARVALHAL, R.; NETO, A.; MOURA, C. E. B. D.; OLIVEIRA, M. F. D. Aspectos macroscópicos e morfométricos dos testículos em catetos e queixadas. **Biota Neotropica**, p. 1-13, 2004.

SOWLS, L. K. Social behavior of the collared peccary *Dicotyles tajacu* (L.). **The behavior of ungulates and its relation to management (Geist, V., Walther, F. ed). Morges, Switzerland: IUCN**, v. 24, p. 144-165, 1974.

SOWLS, L. K. Javelinas and other peccaries: their biology, management, and use. **Texas A e M University Press**, p. 325, 1997.

SUMNER, A. T. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. **Experimental Cell Research**, n. 75, p. 304-306, 1972.

TAGLIARINI, M. M.; NAGAMACHI, C. Y.; PIECZARKA, J. C.; OLIVEIRA, E. H. C. Description of two new karyotypes and cytotaxonomic considerations on Falconiformes. **Revista Brasileira de Ornitologia-Brazilian Journal of Ornithology**, v. 15, n. 29, p. 6, 2013.

THEIMER, T. C.; KEIM, P. Phylogenetic relationships of peccaries based on mitochondrial cytochrome b DNA sequences. **Journal of Mammalogy**, v. 79, n. 2, p. 566-572, 1998.

TODD, N. B. Significance of a diploid number of 20 in the peccary *Catagonus wagneri*. **Journal of Heredity**, v. 76, n. 4, p. 310-310, 1985.

WETZEL, R. M.; DUBOS, R. E.; MARTIN, R. L.; MEYERS, P. *Catagonus*, an "extinct" peccary alive in Paraguay. **Science**, v. 189, p. 379, 1975.

WETZEL, R. M. The extinction of peccaries and a new case of survival. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 288, n. 1, p. 538-544, 1977a.

WETZEL, R. M. The chacoan peccary *Catagonus wagneri* (Rusconi). **Carnegie Museum of Natural History**, v. 3, p. 1-36, 1977b.

WRIGHT, D. B. Phylogenetic relationships of *Catagonus wagneri*: sister taxa from the Tertiary of North America. **Advances in Neotropical Mammalogy**. Sandhill Crane Press, Gainesville, Florida, p. 281-308, 1989.

ZHOU, X.; XU, S.; YANG, Y.; ZHOU, K.; YANG, G. Phylogenomic analyses and improved resolution of Cetartiodactyla. **Molecular phylogenetics and evolution**, v. 61, n. 2, p. 255-264, 2011.

ZIJLSTRA, C.; MELLINK, C. H. M.; DE HAAN, N. A.; BOSMA, A. A. Localization of the 18S, 5.8 S and 28S rRNA genes and the 5S rRNA genes in the babirusa and the white-lipped peccary. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 77, n. 3-4, p. 273-277, 1997.