

CITOGENÉTICA DE PEQUENOS MAMÍFEROS A PARTIR DA EXTRAÇÃO DA MEDULA ÓSSEA: UMA DESCRIÇÃO MAIS DETALHADA DA TÉCNICA *IN VIVO* COM AJUSTES

ANA CLAUDIA BERNARDES-DIAS

Universidade Federal de Goiás, Instituto de Ciências Biológicas (ICB5), Avenida Esperança, s/n, Câmpus Samambaia, 74.690-900, Goiânia, Goiás, Brasil / Universidade Estadual de Goiás, Avenida Brasil, 435, Conj - St. Helio Leao, 75.860-000, Quirinópolis, Goiás, Brasil. diasanacb@gmail.com

CAROLINA PEREIRA FONTOURA

Universidade Estadual de Goiás, Avenida Brasil, 435, Conj - St. Helio Leao, 75.860-000, Quirinópolis - GO, Brasil / Instituto Federal Goiano, Rodovia Sul Goiana - Km 1 - Zona Rural, 75.901-970, Rio Verde, Goiás, Brasil.

PABLO RODRIGUES GONÇALVES

Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Biodiversidade e Sustentabilidade, Av. São José do Barreto, 764, São José do Barreto, 27.965-045, Macaé, Rio de Janeiro, Brasil.

CARINA AZEVEDO OLIVEIRA SILVA

Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Biodiversidade e Sustentabilidade, Av. São José do Barreto, 764, São José do Barreto, 27.965-045, Macaé, Rio de Janeiro, Brasil.

MARIA ANDREIA CORRÊA MENDONÇA

Instituto Federal Goiano, Rodovia Sul Goiana - Km 1 - Zona Rural, 75.901-970, Rio Verde, Goiás, Brasil.

WELLINGTON HANNIBAL

Universidade Estadual de Goiás, Avenida Brasil, 435, Conj - St. Helio Leao, 75.860-000, Quirinópolis - GO, Brasil / Instituto Federal Goiano, Rodovia Sul Goiana - Km 1 - Zona Rural, 75.901-970, Rio Verde, Goiás, Brasil.

Resumo: A citogenética é uma ferramenta eficaz na identificação de espécies de mamíferos, especialmente de roedores, além de auxiliar na compreensão das relações evolutivas e na conservação de diversos táxons do grupo. Os protocolos *in vivo* são úteis devido ao seu baixo custo, mas apresentam divergência metodológica, precisando ser frequentemente ajustados. Neste estudo, apresentamos um método para a análise citogenética de pequenos mamíferos a partir da medula óssea femoral, demonstrando a importância dessa padronização frente às outras abordagens. Aplicamos a técnica de Ford e Hamerton (1956) com atualizações: 1) adequação das quantidades e

concentrações de soluções utilizadas (colchicina e solução hipotônica); 2) descrição detalhada das etapas; 3) utilização de centrífuga como método de separação; 4) adição de procedimento de montagem de lâminas, o qual melhora a visualização de metáfases. Seis protocolos citogenéticos foram comparados em etapas importantes da preparação da amostra. Houve diferença na concentração das soluções de colchicina entre todos os métodos, e entre o tempo de ação da solução (de 15 minutos a 6 horas), etapas cruciais para a condensação dos cromossomos e geração de boas metáfases. Deste modo, destacamos que a metodologia apresentada em nosso estudo contribui com a padronização de um protocolo citogenético *in vivo* indicado para pequenos mamíferos, que possibilita o aproveitamento do material e redução no número de animais sacrificados para ajustes de metodologia, gerando amostras viáveis desde as primeiras tentativas.

Palavras-chave: citotaxonomia, cariótipo, roedores, marsupiais, protocolo.

CYTOGENETICS OF SMALL MAMMALS FROM BONE MARROW EXTRACTION: A MORE DETAILED DESCRIPTION OF THE *IN VIVO* TECHNIQUE WITH ADJUSTMENTS

Abstract: Cytogenetics is an effective tool for identifying species of mammals, especially rodents, and for understanding evolutionary relationships and conserving several taxa of the group. *In vivo* protocols are useful due to their low cost, but they present methodological divergence and need to be frequently adjusted. In this study, we present a method for the cytogenetic analysis of small mammals from femoral bone marrow, demonstrating the importance of this standardization compared to other approaches. We applied the technique of Ford and Hamerton (1956) with updates: 1) adjustment of the quantities and concentrations of solutions used (colchicine and hypotonic solution); 2) detailed description of the steps; 3) use of centrifugation as a separation method; 4) addition of a slide mounting procedure, which improves visualization of metaphases. Six cytogenetic protocols were compared in important stages of sample preparation. There was a difference in the concentration of the colchicine solutions between all the methods, and between the solution's action time (from 15 minutes to 6 hours), crucial stages for condensing the chromosomes and generating good metaphases. In this way, we highlight that the methodology presented in our study contributes to the standardization of an *in vivo* cytogenetic protocol suitable for small mammals, which makes it possible to take advantage of the material and reduce the number of animals sacrificed for methodology adjustments, generating viable samples from the very first attempts.

Keywords: cytotaxonomy, karyotype, rodents, marsupials, protocol.

INTRODUÇÃO

Desde a década de 1960, estudos citogenéticos empregando técnicas convencionais de coloração e bandeamento de cromossomos têm sido conduzidos em vertebrados (Breen, 2015). No início de 1970, as análises dos cariótipos de pequenos mamíferos no Brasil eram predominantemente baseadas em coloração convencional, e as descrições limitavam-se aos números diplóides e fundamentais (Di-Nizo et al., 2017), constituindo o que chamamos de "citogenética clássica". Com o passar dos anos e maior acessibilidade às diferentes técnicas em citogenética, houve diversos avanços no estudo de detalhes da estrutura cromossômica, a partir do emprego de técnicas de coloração diferencial (Ferguson-Smith, 2015; Goodpasture & Bloom, 1975), bandeamento, uso de fluorescência (Pinkel et al., 1986), uso de radioisótopos (Padue &

Gall, 1969) e citogenética molecular (Viegas-Pequignot et al., 1989), contribuindo para avançar no conhecimento da história evolutiva dos organismos (Ferguson-Smith, 2015).

No entanto, a citogenética clássica ainda mantém sua relevância como uma ferramenta eficaz na identificação de espécies e resolução de problemas taxonômicos (Dobigny & Yang, 2008), bem como na compreensão das relações evolutivas (Graphodatsky et al., 2011) e conservação da biodiversidade (Potter & Deakin, 2018). Tal relevância é observada em estudos envolvendo gêneros de roedores com alta similaridade morfológica entre as espécies (Bonvicino & Geise, 1995; Bonvicino et al., 2003; Brandão et al., 2022; Dobigny et al., 2002; Weksler & Bonvicino, 2005), na compreensão da divergência cromossômica em marsupiais, os quais têm apresentado uma distribuição bimodal, com a maioria das espécies exibindo $2n=14$ ou $2n=22$ (Sharman, 1974; Hayman, 1989; Oli-

veira & Miranda, 2015), e até mesmo para melhor entender mecanismos de especiação, dado que o estudo da variação cariotípica é considerado muito relevante para reconhecer espécies geneticamente isoladas (Brandão et al., 2022; Patton, 2004; Weksler & Bonvicino, 2005).

As análises citogenéticas em pequenos mamíferos não-voadores podem ser realizadas por meio da técnica de preparação citológica a partir da medula óssea, com injeção subcutânea de colchicina, conforme descrito por Ford & Hamerton (1956). O órgão em questão apresenta intensa atividade hematopoiética, o que resulta em uma maior quantidade de células passando pela divisão mitótica (Guerra & Souza, 2002). No entanto, alguns estudos apresentam divergências quanto aos métodos empregados para essa mesma técnica (Ford & Hamerton, 1956; Patton, 1967; Silva, 1994; Guerra & Souza, 2002; Kasahara, 2009; Geise, 2014). As diferentes abordagens nos protocolos de citogenética para pequenos mamíferos podem ocasionar o desperdício de materiais, tempo, recurso financeiro, e também da vida do animal, pela tentativa de otimizar os métodos da pesquisa.

Neste estudo apresentamos um método padronizado para a análise citogenética de pequenos mamíferos a partir da extração de medula óssea. O método proposto visa aumentar a eficácia na obtenção de cromossomos mitóticos, o que demonstra a relevância dessa padronização em contraste com abordagens clássicas.

MATERIAL E MÉTODOS

A metodologia ajustada foi conduzida no Laboratório de Ecologia e Biogeografia de Mamíferos, na Universidade Estadual de Goiás, e também no Instituto de Biodiversidade e Sustentabilidade - NUPEM/UFRJ. As capturas e coletas de pequenos mamíferos foram licenciadas no Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio, nº 17418-1, 69328-1, 69328-2, 79453-1), também foram protocoladas pelo comitê de ética em pesquisa com animais da Universidade Estadual de Goiás e da Universidade Federal do Rio de Janeiro (CEUA-UEG, protocolo N. 009/19, CEUA-UFRJ-Macaé MAC021). A técnica apresentada neste trabalho foi adaptada da técnica de Ford e Hamerton (1956), a partir de algumas modificações já previstas em outros trabalhos (Guerra & Souza, 2002; Geise, 2014).

MATERIAIS E SOLUÇÕES UTILIZADAS

- Bisturi e tesoura cirúrgica.
- Seringas de 1 e 5 ml (com agulha hipodérmica 0,3.13 mm⁻¹).
- Placa de petri pequena (5 ml).
- Tubos falcon 15 e 50 ml.
- Banho-maria.

- Pipetas Pasteur.
- Centrífuga (manual ou digital).
- Lâminas de microscopia.
- Placa aquecedora (ou bico de bunsen).
- Solução de colchicina a 0,5% (50 ml de água destilada e 0,15 g de colchicina).
- Solução hipotônica de KCL a 0,075 M (50 ml de água destilada e 0,28 g de KCL).
- Solução fixadora Carnoy (na proporção de 3 partes de metanol para 1 de ácido acético glacial [3:1]).
- Solução de Giemsa a 5% (100 ml de água destilada e 5 ml de Giemsa).

Por se tratar de materiais com certa toxicidade, recomenda-se o uso de equipamentos de proteção individual e capela de exaustão, principalmente na preparação da solução fixadora e solução de colchicina. Essa última solução pode ser fracionada e armazenada em congelador, sendo possível manter um frasco em geladeira, desde que com uso frequente, por até 6 meses (Guerra & Souza, 2002).

PROCEDIMENTOS

1 - Com o animal vivo, é injetada a solução de colchicina a 0,5%, na proporção de 1 ml a cada 100g da massa do animal. A injeção deve ser intraperitoneal e realizada com agulha hipodérmica, na parte ventral do animal, no quadrante inferior direito. Recomenda-se injetar a solução com o animal posicionado de cabeça para baixo, para evitar que os órgãos vitais sejam atingidos. Após a injeção, esperar 1:30h para a ação da colchicina.

2 - Para a eutanásia do animal é recomendado o uso de métodos aprovados pelas resoluções vigentes do Conselho Nacional de Controle sobre Experimentação Animal (CONCEA), como por exemplo, a injeção de anestésicos (Sikes et al., 2016). Os anestésicos xilazina e cetamina são então aplicados em superdose, para induzir a morte do animal (Favoretto et al., 2019), após 1:30h da aplicação de colchicina. Recomenda-se que as injeções sejam intraperitoneais.

3 - Confirmada a morte do animal, é então deferida uma incisão ventral com bisturi, partindo do ventre ao ânus do animal. A abertura deve ser apenas de tamanho suficiente para a exposição do quadríceps, para isso deve-se liberar a pele do ventre e da região da coxa. Avistado o quadríceps, com uma tesoura cirúrgica sem ponta, a articulação do fêmur com a tíbia e fíbula é desconectada, o mesmo é feito com a articulação entre o quadril e o fêmur. Com um bisturi e auxílio de uma pinça, é feita a raspagem e retirada total da musculatura ainda presa ao fêmur. Com a tesoura sem ponta, são cortadas as epífises do fêmur, que é transferido para uma placa de petri pequena (5 cm de diâmetro).

4 - Rapidamente, para que não haja coagulação

da medula, é preciso "lavar" o canal do fêmur com 5 ml de solução hipotônica de KCl (KCl 0,075M). Com a ajuda de uma pinça dentada para segurar o fêmur, e de uma seringa, a solução hipotônica é injetada pelo canal do fêmur até que a medula seja toda extraída sobre a placa de petri. O processo pode ser repetido (reaproveitando o líquido que ficou na placa), até que o osso fique totalmente limpo, e só então o fêmur pode ser descartado. Caso ainda haja fragmentos medulares, é preciso sugar e liberar o líquido com a seringa diversas vezes, a fim de descompactar o material medular. Ao fazer isso, deve-se tomar cuidado para não aplicar muita pressão no êmbolo ou provocar bolhas, pois isso pode danificar o material.

5 - Transferir essa solução para um tubo falcon de 15 ml, completar com solução hipotônica até a marcação de 10 ml, e inverter o tubo 3 vezes, para possibilitar o choque hipotônico. Levar ao banho maria por 30 min a 37 °C.

6 - Após o banho maria, adicionar 1 ml de fixador Carnoy gelado) e homogeneizar, invertendo o tubo outra vez. Colocar na centrífuga a 1500 rpm por 10 minutos (se for a centrífuga manual são 5 minutos).

7 - Após a centrifugação, desprezar o sobrenadante e adicionar mais 10 ml de fixador Carnoy gelado. Homogeneizar com a pipeta Pasteur e voltar para a centrífuga, repetindo o passo 7 por mais duas vezes.

8 - Após finalizar, adicionar 10 ml de Fixador Carnoy e armazenar a amostra no congelador.

PREPARAÇÃO DAS LÂMINAS

O ideal é que as lâminas para microscopia

estejam extremamente limpas para esse processo. Para isso, as lâminas podem ser limpas manualmente com álcool 70% e papel macio, e submergidas em água destilada gelada até o momento da deposição da amostra, para proteger a lâmina da impregnação de plumas e outras sujidades.

9 - Para a deposição da amostra na lâmina, é crucial que se pingue o material a uma distância mínima de 30 cm (Fig. 1). A distância que a gota percorre entre a pipeta e a lâmina faz com que haja rompimento da membrana celular, dispersando os cromossomos. De 1 a 3 gotas de amostra já é o suficiente.

10 - Após esse processo, é preciso chacoalhar a lâmina vigorosamente, a fim de promover o espalhamento da amostra (Fig. 1). Como a amostra é conservada em solução contendo ácido acético, os equipamentos de proteção (luvas de vinil ou de látex sem pó, jaleco, óculos) são essenciais.

11 - As lâminas são então colocadas em placa aquecedora, em uma temperatura de 50°C graus, por aproximadamente 2 minutos (Fig. 1). Este processo também pode ser feito no bico de bunsen, mergulhando a lâmina em metanol antes da deposição da amostra, e flambando em seguida.

12- A coloração comum é feita com Giemsa, e pode ser feita logo após a secagem das lâminas. A solução possui Giemsa a 5%, e com cinco minutos de imersão, as lâminas ficam coradas de forma satisfatória.

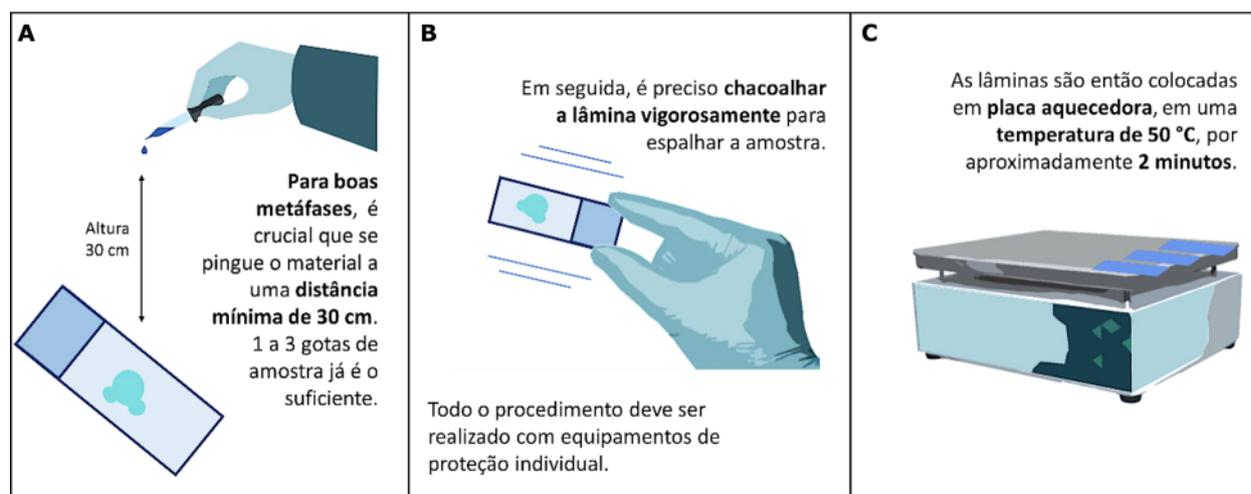


Fig. 1. Processo de montagem das lâminas para visualização de metáfases. A. Deposição da amostra a uma distância mínima de 30 cm. B. Agitação da lâmina para o espalhamento do material. C. Fixação e secagem das lâminas em placa aquecedora.

Fig. 1. Procedure for preparing slides to visualize metaphases. A. Applying the sample at a minimum distance of 30 cm. B. Shaking the slide to spread the material. C. Fixing and drying the slides on a hot plate.

RESULTADOS

Na literatura são apresentados diferentes protocolos possíveis de serem feitos em campo (que não utilizam meio de cultura) a partir da medula óssea (Tab. 1). Apesar de todos serem utilizados e sugeridos para o mesmo grupo taxonômico, há diferenças entre os métodos.

Um dos primeiros protocolos a serem aplicados foi o de Ford & Hamerton (1956), que utilizava telas de nylon para filtração e limpeza do material celular. Em relação ao uso da centrífuga para a lavagem e refinamento do material, houve divergências nos métodos quanto ao tempo e velocidade de rotação do aparelho (Tab. 1).

Há diferença na concentração da solução de colchicina em todos os protocolos, variando de 0,01% a 2%. As duas metodologias mais utilizadas por trabalhos de citogenética, de Ford & Hamerton (1956) (1227 citações) e Guerra & Souza (2002) (443 citações) apresentam uma significativa diferença na concentração da solução de colchicina (0,175% menor no protocolo de Ford & Hamerton), etapa importante do processo, uma vez que o uso desta solução está ligada ao bloqueio do ciclo celular em metáfase, permitindo a obtenção dos cromossomos.

O tempo de ação da solução de colchicina (após aplicada no animal), também diverge en-

tre técnicas. Ford e Hamerton (1956) e Guerra & Souza (2002) sugerem o período de 1 a 2 horas, enquanto Kasahara (2009), Silva (1994), Geise (2014, p. 221) e Patton (1967) sugerem 15 minutos, 1 hora, 40 a 60 minutos de ação e 3 a 6 horas de ação respectivamente. Ou seja, há uma variação no tempo de ação de 4:45h entre os protocolos.

O protocolo apresentado neste estudo, foi testado em 17 espécies e 43 indivíduos. Apesar das adaptações do protocolo serem inicialmente direcionadas para pequenos mamíferos não-voadores, morcegos também apresentaram resultados satisfatórios com o procedimento (Tab. 2)

As metáfases se apresentam espaçadas, com cromossomos bem condensados e sem sobreposição (Fig. 2). A hipotonização e a deposição da amostra a certa distância, são os processos que melhoram, de fato, a visualização, ao provocar o espalhamento (pouca ou ausência de sobreposição), ajudando na individualização dos cromossomos.

DISCUSSÃO

É válido que haja diversos protocolos e adaptações dentre laboratórios na citogenética, porém, mudanças significativas em certos passos podem comprometer totalmente o material, impossibilitando a visualização e utilização dos

Tab. 1. Passos chave de diferentes técnicas citogenéticas a partir da extração de medula óssea de pequenos mamíferos.

Tab. 1. Key-steps of different cytogenetic techniques for from bone marrow extraction of small mammals.

Autor	Quantidade de solução de colchicina injetada	Tempo de ação da colchicina	Via da injeção de colchicina	Concentração da solução de colchicina	Tempo de centrífuga	Rotação da centrífuga	Número de citações (Google acadêmico)
Ford & Hamerton (1956)	0,5 ml	Entre 1 a 2 horas	Intraperitoneal	0,025%	Não é utilizado	Não é utilizado	1243
Patton (1967)	1ml.100g ⁻¹	Entre 3 a 6 horas	Intraperitoneal	0,05%	5 minutos	500 rpm	413
Silva (1994)	0,5ml.100g ⁻¹	1 hora	Subcutânea	0,1%	10 minutos	1200 rpm	11
Guerra & Souza (2002)	1ml.100g ⁻¹	Entre 1 a 2 horas	Subcutânea	0,2%	5 minutos	800 rpm	459
Kasahara (2009)	1ml.100g ⁻¹	15 minutos	Intraperitoneal	Entre 0,01% e 2%	Não especifica	Não especifica	61
Geise (2014, p. 221)	1ml.100g ⁻¹	Entre 40-60 minutos	Subcutânea	0,01%	Entre 8 a 10 minutos	1500 rpm	12
Presente estudo	1ml.100g ⁻¹	1:30 hora	Intraperitoneal	0,5%	10 minutos	1500 rpm	-

Tab. 2. Espécies analisadas com o protocolo descrito no presente estudo, respectivos números de exemplares cariotipados (N), números diploides (2n), número de braços autossômicos (NF) e número de células metafásicas analisadas (*Met*).

Tab. 2. Species analyzed following the protocol described in the present study, number of individuals karyotyped (N), diploid number (2n), number of autosomal arms (NF) and number of metaphasic cells examined (*Met*).

Táxons	N	2n	NF	Met
Didelphimorphia				
Didelphidae				
<i>Cryptonanus agricolai</i> (Moojen, 1943)	1	14	24	30
<i>Didelphis aurita</i> (Wied-Neuwied, 1826)	1	22	20	30
<i>Gracilinanus agilis</i> (Burmeister, 1854)	1	14	24	
<i>Marmosops incanus</i> (Lund, 1840)	2	14	24	30
Rodentia				
Cricetidae				
<i>Akodon cursor</i> (Winge, 1887)	14	14	17-20	312
<i>Calomys expulsus</i> (Lund, 1841)	5	66	68	33
<i>Hylaeamys megacephalus</i> (Fischer, 1814)	2	50,54	62	
<i>Necomys lasiurus</i> (Lund, 1841)	1	34	34	30
<i>Nectomys squamipes</i> (Brants, 1827)	4	56,57	56,57	160
<i>Oecomys catherinae</i> (Thomas, 1909)	1	60	64	60
<i>Oecomys cleberi</i> (Locks, 1981)	5	80	124,134	
<i>Oligoryzomys mattogrossae</i> (Allen, 1916)	4	62	65	
<i>Oligoryzomys nigripes</i> (Olfers, 1818)	1	62	80	120
<i>Rhipidomys macrurus</i> (Gervais, 1855)	1	44	49,50	
Chiroptera				
Phyllostomidae				
<i>Artibeus lituratus</i> (Olfers, 1818)	1	31	58	51
<i>Chiroderma villosum</i> (Peters, 1860)	1	26	48	65
<i>Platyrrhinus recifinus</i> (Thomas, 1901)	1	30	56	90

dados. Variações na montagem das lâminas, podem ser realizadas e testadas diversas vezes, já a falha na preparação da amostra celular, invalida todo o processo, pois não há segundas chances a partir de um mesmo indivíduo.

As maiores variações encontradas nos métodos envolvem o uso da colchicina: concentração e tempo de ação. De forma geral, protocolos mais recentes sugerem maior concentração de colchicina (exceto em Geise,

2014), mas a alta concentração não parece estar associada à via de aplicação, visto que, a via intraperitoneal possui absorção mais rápida do que a via subcutânea, e permite a injeção de maiores volumes, sendo a mais indicada para pequenos mamíferos, se tomados os devidos cuidados na aplicação (Favoretto et al., 2019).

Ao se utilizar de um método invasivo, que causa a morte do animal, é de suma importância que todas as informações coletadas sejam

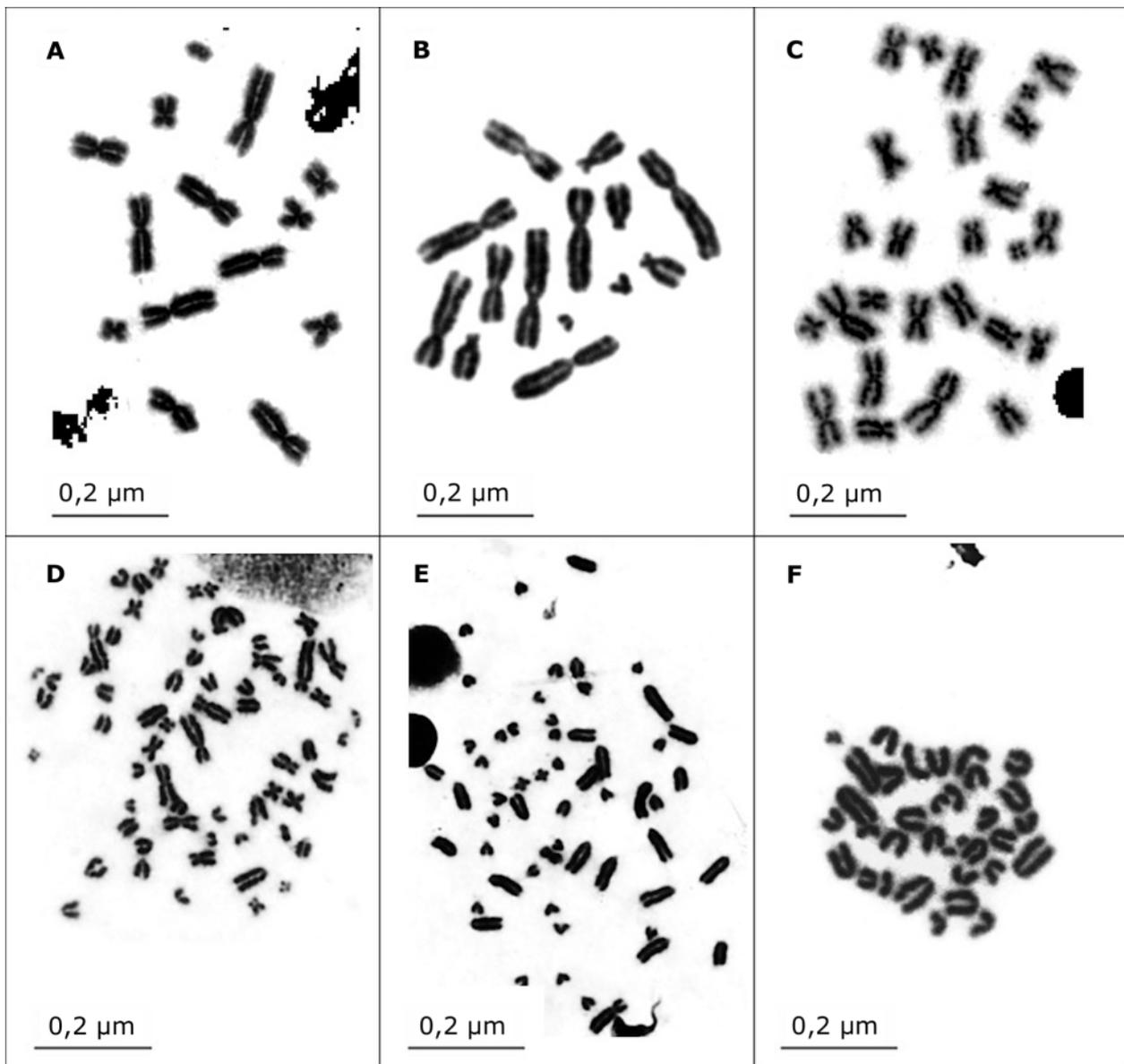


Fig. 2. Metáfases obtidas a partir do protocolo apresentado no presente estudo. A. *Marmosops incanus* (Lund, 1840) ($2n = 14$). B. *Cryptonanus agricolai* (Moojen, 1943) ($2n = 14$). C. *Chiroderma villosum* (Peters, 1860) ($2n = 26$). D. *Oligoryzomys nigripes* (Olfers, 1818) ($2n = 62$); E. *Nectomys squamipes* (Brants, 1827) ($2n = 56$). F. *Necromys lasiurus* (Lund, 1841) ($2n = 34$).

Fig. 2. Metaphases obtained from the protocol presented in this study. A. *Marmosops incanus* (Lund, 1840) ($2n = 14$). B. *Cryptonanus agricolai* (Moojen, 1943) ($2n = 14$). C. *Chiroderma villosum* (Peters, 1860) ($2n = 26$). D. *Oligoryzomys nigripes* (Olfers, 1818) ($2n = 62$); E. *Nectomys squamipes* (Brants, 1827) ($2n = 56$). F. *Necromys lasiurus* (Lund, 1841) ($2n = 34$).

maximamente aproveitadas, sendo direcionadas a estudos morfológicos, taxonômicos, genéticos e moleculares (Gentile et al., 2023). Protocolos confusos ou muito divergentes fazem com que a equipe de pesquisa tenha que testar e ajustar o método, resultando na morte de alguns animais, que nem sempre tem suas amostras genéticas totalmente aproveitadas.

A visualização e identificação correta dos

cromossomos depende de uma boa técnica. A utilização de colchicina e tratamento hipotônico das células trazem avanços nessa questão, por proporcionarem melhor espalhamento e individualização dos cromossomos mitóticos, possibilitando uma análise segura do cariótipo (Kasahara, 2009). Por isso, estes passos devem ser descritos de forma minuciosa, para que a execução gere a observação do número e morfologia dos cromossomos de forma clara.

É certo que a citogenética clássica não mostra todos os detalhes cromossômicos, mas é a partir dela que foram feitos os protocolos atuais. Nos últimos 40 anos, técnicas de bandeamento e de hibridização *in situ* por fluorescência (FISH) têm desempenhado um papel significativo na elucidação de variações e rearranjos cromossômicos sucedidos durante a evolução das espécies (Di-Nizo et al., 2017; Ferguson-Smith & Trifonov, 2007). Se hoje se sabe sobre a intensa variação cromossômica de roedores (Nagamachi et al., 2015; Romanenko et al., 2012) e sobre o alto grau de conservação dos cromossomos de marsupiais (Deakin, 2018; Silva et al., 2017), é devido a boa execução de técnicas clássicas que envolvem puramente a visualização da morfologia e número cromossômico, aliada às técnicas atuais para algumas espécies.

Apesar do progresso em protocolos atuais, a utilização de preparações citogenéticas *in vivo*, coloração convencional com Giemsa e bandeamento ainda representam a base do estudo cromossômico, além de uma alternativa economicamente viável que continua a ser empregada atualmente (Di-Nizo et al., 2017). Desta forma, acreditamos que a metodologia adotada neste estudo contribui com a padronização de um protocolo citogenético *in vivo* indicado para pequenos mamíferos, que possibilita o aproveitamento do material e a diminuição de animais sacrificados para eventuais ajustes de metodologia, gerando amostras viáveis desde as primeiras tentativas.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos à Universidade Estadual de Goiás, ao Instituto Federal Goiano, e ao Instituto de Biodiversidade e Sustentabilidade - NUPEM/UFRJ por disponibilizar estrutura e materiais para este trabalho. Agradecemos também pelo apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES)- Código de Financiamento 001, à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Goiás (FAPEG) pelas bolsas e recursos concedidos, e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ) pelas bolsas de produtividade - área zoologia concedidas aos pesquisadores P.R.G. e W. H.

REFERÊNCIAS

- Bonvicino, C. R.; A. R. E. A. N. De Menezes & J. A. Oliveira.** 2003. Molecular and karyologic variation in the genus *Isothrix* (Rodentia, Echimyidae). *Hereditas*. 139:206-211. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1601-5223.2003.01807.x>.
- Bonvicino, C. R. & L. Geise.** 1995. Taxonomic status of *Delomys dorsalis collinus* Thomas, 1917 (Rodentia, Cricetidae) and description of a new karyotype. *Zeitschrift für Säugetierkunde*, 60:124-127. Disponível em: <<https://www.biodiversitylibrary.org/page/45525765#page/138/mode/1up>>. Acesso em 30 ago. 2023.
- Brandão, M. V., A. P. Carmignotto, A. R. Percequillo, A. U. Christoff, A. C. Mendes-Oliveira & L. Geise.** 2022. A new species of *Akodon* Meyen, 1833 (Rodentia: Cricetidae) from dry forests of the Amazonia-Cerrado transition. *Zootaxa*. 5205(5): 401-435. DOI: <https://doi.org/10.11646/zootaxa.5205.5.1>.
- Breen, M.** 2015. Comparative Cytogenetics. In: eLS (Ed.). Chichester, John Wiley & Sons, Ltd. DOI: <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0005801>
- Deakin J. E.** 2018. Chromosome Evolution in Marsupials. *Genes (Basel)*. 9(2): 72. DOI: <https://doi.org/10.3390/genes9020072>
- Di-Nizo, C. B., K. R. da Silva Banci, Y. Sato-Kuwabara & M. J. D. J. Silva.** 2017. Advances in cytogenetics of Brazilian rodents: cytotaxonomy, chromosome evolution and new karyotypic data. *Comp. cytog.* 11(4): 833. DOI: <https://doi.org/10.3897/CompCytogen.v11i4.19925>
- Dobigny, G., V. Aniskin & V. Volobouev.** 2002. Explosive chromosome evolution and speciation in the gerbil genus *Taterillus* (Rodentia, Gerbillinae): a case of two new cryptic species. *Cytog. and Gen. Res.* 96: 117-124. DOI: <https://doi.org/10.1159/000063044>
- Dobigny, G. & F. F. Yang.** 2008. Comparative cytogenetics in the genomics era: cytogenomics comes of age. *Chrom. Res.* 16(1): 1-4. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10577-008-1213-y>
- Favoretto, S. M., D. I. Seabra & M. C. M. Olivato.** 2019. Guia de eutanásia para animais de ensino e pesquisa. Universidade Federal de São Paulo. Disponível em: <https://ceua.unifesp.br/images/documentos/CEUA/Guia_Eutanasia_UNIFESP_-_versao_final_042019.pdf>. Acesso em 08 dez. 2023.
- Ferguson-Smith M. A. & V. Trifonov.** 2007. Mammalian karyotype evolution. *Nat Rev Genet.* 8(12): 950-962. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrg2199>

- Ferguson-Smith, M. A.** 2015. History and evolution of cytogenetics. *Mol Cytog.* 8: 19. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13039-015-0125-8>
- Ford, C. E. & J. L. Hamerton.** 1956. A colchicine, hypotonic citrate, squash sequence for mammalian chromosomes. *Stain tech.* 31(6): 247-251. DOI: <https://doi.org/10.3109/10520295609113814>
- Geise, L.** 2014. Procedimentos genéticos iniciais na captura e preparação de mamíferos. pp. 221-235. In: Peracchi, A. L., B. K. Rosaneis, N. R. dos Reis & M. N. Fregonezi (Eds.). *Técnicas de estudos aplicadas aos mamíferos silvestres brasileiros*. Rio de Janeiro, Technical Books Editora.
- Gentile, R., D. Loretto, M. Kajin, S. R. Freitas, R. Finotti, M. V. Vieira & R. Cerqueira.** 2023. Garrafão Project: Origin, history and main aspects of the development of the largest long-term study of ecology of small mammals in Brazil. *Oec. Aust.* 27(2): 106-120. DOI: <https://doi.org/10.4257/oeco.2023.2702.01>
- Guerra, M. & M. D. Souza.** 2002. Como observar cromossomos: um guia de técnicas em citogenética vegetal, animal e humana. Ribeirão Preto, FUNPEC, 201. Disponível em: http://www.ensp.fiocruz.br/portal-ensp/_uploads/documentos-pessoais/documento-pessoal_52172.pdf. Acesso em 30 ago. 2023.
- Goodpasture, C. & S. E. Bloom.** 1975. Visualization of nucleolar organizer regions in mammalian chromosomes using silver staining. *Chromosoma.* 53: 37-50. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF00329389>
- Graphodatsky, A. S., V. A. Trifonov & R. Stanyon.** 2011. The genome diversity and karyotype evolution of mammals. *Mol Cyt.* 4: 22. DOI: <https://doi.org/10.1186/1755-8166-4-22>
- Kasahara, S.** 2009. Introdução à pesquisa em citogenética de vertebrados. Ribeirão Preto, Sociedade Brasileira de Genética, 160.
- Nagamachi, C. Y., F. Eliana, J. C. Pieczarka, A. L. Pereira, C. E. F. Silva, C. C. Rosa, E. M. S. S. Souza, J. A. Pinto, M. J. R. Costa, S. M. Malcher, V. D. S. Paixão & W. O. Silva.** 2015. Citogenética de pequenos mamíferos não-voadores da Amazônia Brasileira. pp. 275-307. In: Mendes-Oliveira, A. C. & C. L. Miranda (Eds.). *Pequenos mamíferos não-voadores da Amazônia brasileira*. Rio de Janeiro, Sociedade Brasileira de Mastozoologia.
- Oliveira, A. C. M. & C. L. Miranda.** 2015. Pequenos mamíferos não-voadores da Amazônia brasileira. Sociedade Brasileira de Mastozoologia, 336 p. Disponível em: <https://www.sbmz.org/wp-content/uploads/2020/06/Pequenos-mamiferos-nao-voadores-da-amazonia-Brasileira.pdf>. Acesso em 30 de ago. 2023.
- Pardue, M. L. & J. G. Gall.** 1969. Molecular hybridization of radioactive DNA to the DNA of cytological preparations. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 64(2): 600-604. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.64.2.600>
- Patton, J. L.** 1967. Chromosome studies of certain pocket mice, genus *Perognathus* (Rodentia: heteromyidae). *J. Mammal.* 48(1): 27-37. DOI: <https://doi.org/10.2307/1378167>
- Patton, J. L.** 2004. Comparative genomics and the role of chromosomal rearrangements in species divergence: a paradigm revisited. *Masto. Neot.* 11(2): 147-150. Disponível em: http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0327-93832004000200001. Acesso em 30 ago. 2023.
- Pinkel D., T. Straume & J. W. Gray.** 1986. Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proc. of the Nat. Aca. of Sci.* 83(9): 2934-2938. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.83.9.2934>
- Potter, S. & J. E. Deakin.** 2018. Cytogenetics: An important inclusion in the conservation genetics toolbox. *Pac. Cons. Bio.* 24(3): 280-288. DOI: <https://doi.org/10.1071/PC18016>
- Romanenko S. A., P. L. Perelman, V. A. Trifonov & A. S. Graphodatsky.** 2012. Chromosomal evolution in Rodentia. *Heredity.* 108: 4-16. DOI: <https://doi.org/10.1038/hdy.2011.110>
- Sharman, G. B.** 1974. Marsupial taxonomy and phylogeny. *Aust. Mamm.* 1(2): 137-154.
- Hayman, D. L.** 1989. Marsupial Cytogenetics. *Aust. Jour. of Zoo.* 37: 331-349. DOI: <https://doi.org/10.1071/ZO9890331>
- Sikes, R. S.** 2016. Guidelines of the American Society of Mammalogists for the use of wild mammals in research and education. *Journ. of Mamm.* 97(3): 663-688. DOI: <https://doi.org/10.1093/jmammal/gyw078>

Silva, M. J. de J. 1994. Estudos cromossômicos e de complexos sinaptonêmicos em roedores brasileiros da tribo Oryzomyini (Rodentia, Cricetidae) (Dissertação Mestrado. Universidade de São Paulo, São Paulo). Disponível em: <<https://repositorio.usp.br/item/000740181>>. Acesso em 30 ago. 2023.

Silva C. E. F. E., R. A. de Andrade, E. M. S. de Souza, E. S. Eler, M. N. F. da Silva & E. Feldberg. 2017. Comparative cytogenetics of some marsupial species (Didelphimorphia, Didelphidae) from the Amazon basin. *Comp Cytogenet.* 11(4): 703-725. DOI: <https://doi.org/10.3897/CompCytogen.v11i4.13962>

Viegas-Pequignot, E., B. Dutrillaux, H. Magdelenat & M. Coppey-Moisan. 1989. Mapping of single-copy DNA sequences on human chromosomes by in situ hybridization with biotinylated probes: enhancement of detection sensitivity by intensified-fluorescence digital-imaging microscopy. *Proc. of the Nat. Acad. of Sci.* 86(2): 582-586. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.86.2.582>

Weksler, M. & C. R. Bonvicino. 2005. Taxonomy of pigmy rice rats genus *Oligoryzomys* Bangs, 1900 (Rodentia, Sigmodontinae) of the Brazilian cerrado. 1900: 21045. Disponível em: < https://www.academia.edu/13242978/Taxonomy_of_pigmy_rice_rats_genus_Oligoryzomys_Bangs_1900_Rodentia_Sigmodontinae_of_the_Brazilian_Cerrado_with_the_description_of_two_new_species>. Acesso em 30 ago. 2023.

Editor Convidado / Editor Invitado / Guest Editor: Victor Hugo García-Mérchan, UQuindío, Colombia

Recebido / Recibido / Received: 31.08.2023

Revisado / Revised: 20.12.2023

Aceito / Aceptado / Accepted: 04.01.2024

Publicado / Published: 13.01.2024

DOI: <https://doi.org/10.5216/rbn.v20iesp.77169>

Dados disponíveis / Datos disponibles / Available data: Não informado.